

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

**Mosaik-Trisomie 7 in normalen humanen Geweben;
FISH-Studie zur Alters- und Gewebetyp-Abhängigkeit**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2008

vorgelegt von: Carmen Fromberg
geb. am: 26.09.1979 in: Neunkirchen/Saar

0 Inhaltsverzeichnis

0 INHALTSVERZEICHNIS.....	2
1 ZUSAMMENFASSUNG.....	5
1.1 DEUTSCHE ZUSAMMENFASSUNG.....	5
1.2 ENGLISH SUMMARY.....	6
2 EINLEITUNG.....	7
2.1 NUMERISCHE ABBERATIONEN BEIM MENSCHEN.....	7
2.1.1 Numerische Abberationen der Autosomen.....	7
2.1.2 Numerische Abberationen der Gonosomen.....	8
2.2 VORKOMMEN VON ANEUSOMIEN VON CHROMOSOM 7 UND 8.....	8
2.3 BEWERTUNG UND HYPOTHESEN.....	9
2.3.1 Bewertung.....	9
2.3.2 Zur Bedeutung der Trisomie 7 werden folgende Hypothesen diskutiert:.....	10
2.4 VORSTELLUNG DER ARBEIT.....	11
2.4.1 Zielvorstellung / eigene Fragestellung.....	11
2.4.2 Konzept der Arbeit / Durchführung.....	11
2.5 DIE FLUORESCENZ-IN-SITU-HYBRIDISIERUNG (FISH).....	12
3 MATERIAL UND METHODE.....	14
3.1 MATERIAL.....	14
3.1.1 Probandenkollektiv.....	14
3.1.2 Entnommenes Material.....	15
3.1.3 Bezugsquellen der vorgefertigten Materialien und Lösungen.....	16
3.1.4 DNA-Sonden.....	16
3.1.5 Lösungen und Puffer aus eigener Herstellung.....	16
3.1.5.1 Deionisiertes Formamid.....	16
3.1.5.2 PBS-Stocklösung 1M (= 20 x PBS).....	17
3.1.5.3 SSC-Stocklösung (= 20 x SSC).....	17
3.1.5.4 Dig1-Puffer.....	18
3.1.5.5 Dig3-Puffer.....	18
3.1.5.6 Farbsubstrat-Gemisch.....	19
3.1.5.7 Mastermix 2.1.....	19
3.2 METHODEN.....	21
3.2.1 Präparationsmethoden.....	21
3.2.1.1 Mundschleimhautabstrich.....	21
3.2.1.2 Haarwurzelpräparation.....	21
3.2.1.3 Blutentnahme und -präparation.....	22
3.2.2 Giemsa-Trypsin-G-Bänderung (GTG-Bänderung).....	25

3.2.3 Sondenmarkierung.....	26
3.2.3.1 Nick-Translation.....	26
3.2.3.2 Dot-Blot.....	30
3.2.4 Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung (FISH).....	33
3.2.4.1 Hybridisierung.....	33
3.2.4.2 Stringente Waschung und Detektion.....	36
3.2.5 Auswertung und Dokumentation.....	38
3.2.5.1 Auswertung.....	38
3.2.5.2 Dokumentation.....	39
4 ERGEBNISSE.....	40
4.1 ERGEBNISSE DER FISH-ANALYSEN.....	41
4.1.1 Trisomie 7.....	41
4.1.1.1 Blutlymphozyten.....	41
4.1.1.2 Haarwurzelzellen.....	43
4.1.1.3 Mundschleimhautzellen.....	45
4.1.1.4 Gewebevergleich.....	47
4.1.2 Trisomie 8.....	48
4.1.2.1 Blutlymphozyten.....	48
4.1.2.2 Haarwurzelzellen.....	50
4.1.2.3 Mundschleimhautzellen.....	51
4.1.2.4 Gewebevergleich.....	52
4.1.3 Prozentuales Vorkommen der Chromosomen 7, 8, 10 und 12 in den untersuchten Geweben.....	53
4.1.3.1 Blutlymphozyten.....	53
4.1.3.2 Haarwurzelzellen.....	54
4.1.3.3 Mundschleimhautzellen.....	55
4.1.4 Prozentuale Trisomie-Raten der Chromosomen 7, 8, 10 und 12 in den untersuchten Geweben.....	56
4.2 ERGEBNISSE DER ZYTOGENETISCHEN UNTERSUCHUNGEN.....	59
5 DISKUSSION.....	65
5.1 AUSSAGEKRAFT DER GEWÄHLTEN UNTERSUCHUNGSMETHODE.....	65
5.2 BEWERTUNG DER ERGEBNISSE.....	67
6 ANHANG.....	70
6.1 PROTOKOLLE IN STICHPUNKTEN.....	70
6.1.1 Mundschleimhautabstrich.....	70
6.1.2 Haarwurzelpräparation.....	70
6.1.3 Blutpräparation.....	70
6.1.4 G-Banden-Darstellung mit Trypsin (GTG-Bänderung).....	72
6.1.5 Nick-Translation.....	73
6.1.6 Dot Blot.....	75
6.1.7 FISH-Hybridisierung für Lymphozyten.....	76
6.1.8 FISH-Hybridisierung für Haarwurzelzellen.....	77

<i>6.1.9 FISH-Hybridisierung für Mundschleimhaut</i>	79
<i>6.1.10 Stringente Waschung und Detektion nach FISH</i>	80
6.2 ERGEBNISSE DER ZYTOGENETISCHEN ANALYSE (DETAILLIERTE AUFFÜHRUNG)	82
6.3 ERGEBNISSE DER FISH	85
<i>6.3.1 Proband Nr. 5</i>	<i>85</i>
<i>6.3.2 Proband Nr. 6</i>	<i>86</i>
<i>6.3.3 Proband Nr. 7</i>	<i>87</i>
<i>6.3.4 Proband Nr. 8</i>	<i>88</i>
<i>6.3.5 Proband Nr. 9</i>	<i>89</i>
<i>6.3.6 Proband Nr. 10</i>	<i>90</i>
<i>6.3.7 Proband Nr. 11</i>	<i>91</i>
<i>6.3.8 Proband Nr. 12</i>	<i>92</i>
<i>6.3.9 Proband Nr. 13</i>	<i>93</i>
<i>6.3.10 Proband Nr. 14</i>	<i>94</i>
<i>6.3.11 Proband Nr. 15</i>	<i>95</i>
<i>6.3.12 Proband Nr. 16</i>	<i>96</i>
<i>6.3.13 Proband Nr. 17</i>	<i>97</i>
<i>6.3.14 Proband Nr. 18</i>	<i>98</i>
<i>6.3.15 Proband Nr. 19</i>	<i>99</i>
<i>6.3.16 Proband Nr. 20</i>	<i>100</i>
6.4 DIAGRAMME	101
7 LITERATURVERZEICHNIS	110
8 ABBILDUNGSVERZEICHNIS	116
9 DANK	118
10 LEBENS LAUF	119

1 Zusammenfassung

1.1 Deutsche Zusammenfassung

Das zytogenetische Phänomen der somatischen Mosaik-Trisomie 7 ist bezüglich seiner Wertigkeit bislang nicht eindeutig geklärt. Sowohl in malignen als auch benignen Tumoren, entzündlichen und proliferativen Erkrankungen wie auch unterschiedlichen scheinbar normalen Geweben wurde das Vorkommen von Mosaiktrisomie 7 beschrieben. Aufgrund der zum Teil krankheitsassoziierten, zum Teil unspezifischen Beobachtung wurde die These eines rein altersabhängigen Auftretens von 7-trisomen Zellen diskutiert.

Im Rahmen der hier vorgestellten Arbeit sollte zum Einen ein Alters-Phänomen, zum Anderen eine Gewebetyp-Abhängigkeit als möglicher Faktor der Mosaiktrisomie 7 geklärt werden. An einem Kollektiv von 16 im Wesentlichen gesunden über-80-jährigen Probanden wurde hierzu eine FISH-Studie zum numerischen Gehalt von Chromosom 7 im Vergleich zu Chromosom 8, 10 bzw. 12 durchgeführt. Die Untersuchung erfolgte jeweils an Blutlymphozyten, Haarwurzel- und Mundschleimhautzellen. Der basale Karyotyp wurde an Blutlymphozyten mittels konventioneller Zytogenetik ermittelt.

An Blutlymphozyten konnte weder durch die FISH-Analyse noch durch die konventionelle Zytogenetik das Auftreten bzw. ein vermehrter Zugewinn von Zellen mit Mosaik-Trisomie 7 - oder eines der anderen analysierten Chromosomen - beobachtet werden. Ebenfalls wurde an Haarwurzelzellen bei keinem Individuum eine relevante Trisomie 7 erhoben.

In Mundschleimhautzellen zeigte sich hingegen eine Mosaiktrisomie 7 als inkonstantes Phänomen bei 6 von 16 Probanden (37,5%) mit variablem Mosaikanteil von >2-12,5% der analysierten Zellen. Eine relevante Trisomie der Kontrollchromosomen wurde in Mundschleimhautzellen - auch der betroffenen Probanden - nicht beobachtet. Diese Befunde belegen, dass eine Trisomie 7 gewebetyp-abhängig in normaler Mundschleimhaut sehr alter Individuen auftreten kann. Ob eine tatsächliche Altersabhängigkeit des Phänomens vorliegt muss durch Vergleichsuntersuchung an Mundschleimhautzellen jüngerer Probanden letztendlich geklärt werden. Da die Beobachtung nicht einheitlich auftrat, sind individualspezifische weitere kausale Faktoren bei der Entstehung bzw. Vermehrung einer Mosaiktrisomie 7 in normalen Zellen anzunehmen.

1.2 English summary

The cytogenetical phenomenon of the somatic mosaic-trisomy 7 has not been definitely resolved up to now concerning its validity. The occurrence of the mosaic-trisomy 7 has been described both in malignant and in benign tumors, inflammatory and proliferating diseases as well as in different apparently normal tissues. The thesis of the occurrence of the mosaic-trisomy 7 depending only on age has been discussed owing to a partly illness-associated respectively a partly unspecific observation. In the course of this dissertation both an age-phenomenon and a tissue-dependency were to be clarified as possible reasons for the mosaic-trisomy 7.

In order to do so, a FISH-research was carried out with the help of a group of 16 essentially healthy individuals, who are all over the age of 80, to compare the numerical content of chromosome 7 to the ones of chromosomes 8, 10 and 12. The examination was given to each of the following cell- types: blood lymphocytes, hair-root-cells, and mucosal cells of buccal-smears. The basal karotype was ascertained by means of conventional cytogenetics.

Neither through FISH-analysis nor through conventional cytogenetics was it possible to observe the occurrence and the increased gain in cells with mosaic-trisomy 7 respectively. The same applies to all the other analysed chromosomes mentioned above. Likewise, no significant trisomy 7 was found in any of the individuals' hair-root-cells.

However, the mosaic-trisomy 7 was found as an inconsistent phenomenon in the cells of the mucous membrane of the mouth in six of the 16 subjects (37,5%) with a variable mosaic-share of >2-12,5% of the analysed cells. A relevant trisomy in the cells of the mucous membrane was not found in the other analysed chromosomes (chromosomes 8, 10 and 12). The same applies to those six individuals mentioned above concerning the mosaic-trisomy 7. These results prove that trisomy 7 depending on tissue can occur in normal cells of the mucous membrane in very old individuals. Further examination to compare the cells of the mucous membrane of younger subjects to the older ones will have to prove, if this phenomenon is really depending on age. Due to the heterogeneity of the observation one could conclude that further causal factors cause the origin as well as the increase of the mosaic-trisomy 7 in normal cells.

2 Einleitung

2.1 Numerische Abberationen beim Menschen

Chromosomenabberationen sind Abweichungen von der normalen Chromosomenzahl (numerische Abberation) oder strukturelle Abweichungen einzelner Chromosomen. Ursächlich hierfür ist meistens eine Störung in der Meiose.

Numerische Chromosomenabberationen sind beim Menschen nur sehr Wenige bekannt. Die überwiegende Mehrzahl aller Embryonen und Föten mit Chromsomenanomalien ist nicht oder nur bei Anomalien in Mosaikform, d.h. nur ein Teil der Zellen ist betroffen, lebensfähig. Etwa 0,5% aller Neugeborenen hat eine Chromosomenanomalie mit Krankheitswert. Diese sind zu unterscheiden in Abberationen der Gonosomen und der Autosomen. Gonosomale Abberationen sind deutlich häufiger und in ihrem Schweregrad meist unterhalb dem autosomaler Abberationen. (Baty et al. 210-16;Fryns et al. 237-40;Heller et al. 81-83;Kivirikko et al. 541-44;Lukusa et al. 215-20;Sago et al. 343-46;Smeets, Vandenbossche, and Fryns 85-89;Staals et al. 233-37;Starke et al. 1169-74;Starke et al. 26-30;Van Der Burgt et al. 739-41;Yancey et al. 856-60;Zumkeller et al. 261-64;Zumkeller et al. 261-64)

2.1.1 Numerische Abberationen der Autosomen

Unter den autosomalen numerischen Abberationen sind nur diejenigen Menschen mit Trisomien der Chromosomen 13, 18 und 21 lebensfähig. (Castel et al. 235-41;Dunlap, Aziz, and Rosenbaum 159-86;FitzPatrick and Boyd 301;Harada and Niikawa 198-201) Diese kommen sowohl als durchgehende Trisomie als auch als Mosaiktrisomie vor. Bei der Mosaiktrisomie können die Symptome abgeschwächt sein, je nach Anteil der betroffenen Zellen.

Durchgehende Trisomien anderer Autosomen wurden bisher nur in Abortmaterial oder im Rahmen der pränatalen Diagnostik entdeckt. In Einzelfällen sind Kinder beschrieben, die post partum einige Monate überlebt haben. Mosaiktrisomien von sonstigen Autosomen außer 13, 18 und 21 sind demnach als nicht dauerhaft lebensfähig anzusehen. Einzige bisher bekannte Ausnahmen bei den konstitutionellen Trisomien bilden Mosaiktrisomien der Chromosomen 8 und 9.

2.1.2 Numerische Abberationen der Gonosomen

Im Gegensatz zu den Autosomen sind durchaus lebensfähige gonosomale Abberationen bekannt und auch schon seit langem beschrieben. Als konstitutionelle Abberationen sind das Klinefelter-Syndrom (47, XXY), das XYY-Syndrom (47, XYY), das TripleX-Syndrom (47, XXX) und das Ullrich-Turner-Syndrom (45, X0) bekannt. Diese kommen sowohl als durchgehende Abberation als auch in Mosaikform vor.

Darüber hinaus wurden als Besonderheit bei älteren Menschen sowohl Zugewinne als auch Verluste von Heterosomen beschrieben. (Sinclair et al. 20-23) Aufgrund ihrer Entstehung durch somatische Mutation treten diese Veränderungen bei Entstehung nach der Geburt ausschließlich als Mosaik auf. Dabei scheint es sich um regelmäßig auftretende Alterungsprozesse zu handeln.

2.2 Vorkommen von Aneusomien von Chromosom 7 und 8

Neben den oben beschriebenen Abberationen von Chromosom 13, 18 und 21 sind zusätzlich als relativ häufige Erscheinungen Aneusomien von Chromosom 7 und 8 beobachtet worden. (Broberg et al. 310-15; Mondello et al. 715-19; Paulsson et al. 160-65) Diese sind bisher jedoch nur als chromosomale Mosaik gefunden worden, bei denen von einer somatischen Mutation als Entstehungsmechanismus ausgegangen wird. Dies führt bei ortsgebundenen Zellen zu lokal gehäuften Auftreten im Gewebe.

Für unsere Fragestellung von besonderem Interesse ist die Mosaiktrisomie des Chromosoms Nr. 7. Diese wurde bisher in sehr unterschiedlichen Geweben gefunden:

Aus historischer Sicht wurden zunächst chromosomale Abberationen in Tumorgeweben unterschiedlicher Organe entdeckt. Hierzu gehören Neoplasien des Gehirns (Glioblastom), der Mamma, des Colons, des Knochenmarks, etc. (Belge et al. 198-202; Kameoka et al. 159-64; Yamada et al. 46-52; Garipidou et al. 717-19; Hara et al. 630-33; Mark et al. 184-89; Afify and Mark 101-05; Afify, Bland, and Mark 201-08; Paulsson et al. 3010-15; Cuneo et al. 21-26; Adeyinka et al. 119-21; Fagioli et al. 116-22; Bardi et al. 82-84; Bardi et al. 149-52; Rohen et al. 92; Rohen et al. 33-39; Amalfitano et al. 6-9; Paulsson et al. 66-69; Mark et al. 76-81; Mark et al. 111-14; Afify and Mark 127-32; Mark et al. 1735-37)

Später erfolgte die Entdeckung der Trisomie 7 in chronisch entzündlich veränderten Geweben: in Synovialzellen bei chronischer Osteoarthritis (Ermis et al. 651-54; Ermis et al. 232-34; Dahlen et al. 19-24; Broberg et al. 310-15; Broberg et al. 30-34) und chronisch rheumatoider Arthritis, in artherosklerotischen Plaques (Matturri et al. 755-61; Casalone et al. 139-43; Matturri et al. 833-36; Matturri et al. 23-33), bei chronischer Glomerulonephritis (Elfving et al. 90-96) und bei Dupuytren'scher Kontraktur. (Dal Cin et al. 137-40; Dal Cin et al. 162-64)

Schließlich fanden sich aber auch in scheinbaren Normalgeweben signifikante Trisomieraten. (Broberg et al. 310-15; Jin et al. 63-72; Mondello et al. 715-19)

Bisher nicht ausreichend untersucht ist die Verteilung von Mosaiken im Gesamtorganismus. Dies kommt dadurch zustande, dass die meisten bisher bekannten Daten auf bei Routineuntersuchungen erhobenen Befunden basieren. Dabei werden meist Blutlymphozyten untersucht. Diese lassen als nicht ortsständige Zellen keine Aussage über eine Verteilung im Körper zu. Zytogenetische Untersuchungen beziehen sich meist konkret auf ein als pathologisch angesehenes Gewebeareal und lassen somit auch nur eine lokale Aussage zu.

2.3 Bewertung und Hypothesen

2.3.1 Bewertung

In neoplastischem Gewebe wird Zellen mit Trisomie 7 ein Wachstumsvorteil gegenüber Zellen mit regelrechtem Chromosomensatz zugeschrieben. Begründet wird diese Annahme durch die Lokalisation von Wachstumsfaktoren auf diesem Chromosom, das bei vielen Tumoren zumindest trisom, wenn nicht häufiger vorhanden ist. Dies stellt eine mögliche Erklärung für das unkontrollierte Wachstum von Tumorzellen dar. Nicht geklärt ist die Frage, ob die Trisomie 7 durch den Tumor entsteht, also eine Folge der Neoplasie ist, oder ob sie durch die Häufung von Wachstumsfaktoren erst die Möglichkeit zur Tumorentstehung bietet, demnach also die eigentliche Ursache darstellt.

Der Zusammenhang des gehäuften Vorkommens von Trisomie 7 in chronisch entzündlichem Gewebe wird ebenfalls im Vorhandensein von Wachstumsfaktoren auf diesem Chromosom gesehen. Da durch eine chronische Entzündung ein ständiger Proliferationsreiz gesetzt wird

kommt es zur überschießenden Vermehrung entsprechend sensitiver Zellen, z.B. solcher mit einer bestehenden Trisomie 7, so dass diese im Verlauf gehäuft angetroffen werden.

Besondere Aufmerksamkeit muss in Zusammenhang mit der Trisomie 7 auf sogenanntes Normalgewebe gelenkt werden. In diesem Fall ist unter dem Begriff Normalgewebe histomorphologisch unauffälliges Gewebe in direkter Nachbarschaft von Tumoren zu verstehen. In gezielten Untersuchungen wurden hier trotz mikroskopisch-histologischer Normalbefunde auf chromosomaler Ebene bereits Veränderungen gefunden, darunter auch erhöhte Raten an Trisomie 7.

2.3.2 Zur Bedeutung der Trisomie 7 werden folgende Hypothesen diskutiert:

1. Hypothese: „Die Trisomie 7 stellt eine krankheitsassoziierte Veränderung bei bestimmten Erkrankungen dar.“

Damit wäre die Trisomie entweder eine kausale Veränderung, die ein wesentlicher Faktor in der Entstehung eben dieser Erkrankung ist, oder aber sie tritt als Folge der Erkrankung in ihrem weiteren Verlauf auf.

Typische Beispiele hierfür bildet das Vorkommen von Mosaiktrisomie 7 in verschiedenen Tumoren und chronisch entzündlichen Geweben.

2. Hypothese: „Die (Mosaik-)Trisomie 7 stellt eine altersassoziierte Veränderung dar.“

Bereits bei früheren Arbeiten ist das gehäufte Auftreten von chromosomalen Abberationen in höherem Alter aufgefallen. (Broberg et al. 310-15) So sind in höherem Lebensalter sowohl Verluste als auch Zugewinne von Gonosomen bekannt, ohne dass bisher ein Zusammenhang zu einer Erkrankung nachgewiesen werden konnte. Dies gilt für beide Geschlechtschromosomen. Ursache und Bedeutung dieser Veränderungen sind bisher unbekannt. Über den Zugewinn oder Verlust von Autosomen ist bisher wenig bekannt. Für eine abschließende Beurteilung liegen allerdings nicht genügend Daten vor, da bei Personen dieses Alters außerhalb einer gezielten Studie kein Anlass zu einer zytogenetischen Untersuchung besteht.

3. Hypothese: „Die Mosaiktrisomie 7 stellt eine gewebespezifische Veränderung dar.“

Unabhängig von der (vermuteten) Ursache ist die Trisomie 7 bisher nur in bestimmten Geweben nachgewiesen worden und ist auch kaum für Blutlymphozyten beschrieben, die das häufigste Material zytogenetischer Untersuchungen darstellen. Daher kann davon ausgegangen werden, dass es sich hierbei um eine gewebespezifische Veränderung handelt.

2.4 Vorstellung der Arbeit

2.4.1 Zielvorstellung / eigene Fragestellung

Vor dem dargestellten Hintergrund sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob es sich bei der Trisomie 7 möglicherweise um ein in normalen Geweben auftretendes Altersphänomen handelt. Weiterhin sollte geklärt werden, ob im Falle eines Auftretens eine Präferenz für bestimmte Gewebetypen besteht.

Nicht eingegangen wird in dieser Arbeit auf die Hypothese des kausalen Zusammenhangs zwischen der Trisomie 7 und bestimmten Erkrankungen. Um eine mögliche Beeinflussung der Ergebnisse durch diesen Punkt möglichst zu vermeiden wurden nur altersentsprechend gesunde Probanden ausgewählt. Zu diesem Zweck kooperierten wir mit einer ophthalmologischen Praxis, in welcher ambulante Cataract-Operationen durchgeführt werden. Da die Cataract eine typische Erkrankung des höheren Alters ist erreichten wir dort unter den zur Operation anstehenden Patienten genügend Probanden der gesuchten Altersstufe.

Zeitgleich wurde eine zweite Arbeit durchgeführt, deren Schwerpunkt auf der Untersuchung der Altersabhängigkeit bei gleichem Gewebetyp liegt.

2.4.2 Konzept der Arbeit / Durchführung

Um für die Untersuchung unterschiedliche Gewebetypen zu erhalten, die gut zugänglich sind und deren Entnahme für freiwillige Probanden tolerierbar ist haben wir uns für Blutlymphozyten, Haarwurzeln und Mundschleimhautzellen als Untersuchungsmaterial entschieden. An den Zellen dieser Gewebe wurde ein intraindividueller Vergleich in Bezug auf die Anzahl von Chromosom 7 und 8 durchgeführt.

Da sich Haarwurzel- und Mundschleimhautzellen nur sehr schlecht kultivieren und zur Teilung anregen lassen wurde ein Untersuchungsverfahren benötigt, das auch bei Interphasekernen anwendbar ist. Bei der gegebenen Fragestellung erwies sich die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) als die geeignete Methode. Haarwurzelzellen und Mundschleimhautzellen wurden bei Entnahme direkt auf einen Objektträger aufgebracht und später weiter bearbeitet und ausgewertet. Es wurden jeweils die Chromosomen 7 und 8 markiert und ausgewertet. Die Blutlymphozyten wurden nach Kurzzeitkultur von 3 Tagen geerntet. Dadurch ergab sich die Möglichkeit zusätzlich zur FISH-Untersuchung noch eine Karyotypisierung durchzuführen.

2.5 Die Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung (FISH)

Die In-Situ-Hybridisierung wurde erstmals 1969 von Pardue und Gall beschrieben und im gleichen Jahr unabhängig davon von John et al. (Pardue and Gall 600-04; John, Birnstiel, and Jones 582-87). Dazu wurden Chromosomen aus Drosophila-Speichel radioaktiv markiert und mittels sensitiver Platten detektiert. Diese Methode erwies sich als sehr effektiv. Sie machte erstmals die gezielte Kennzeichnung bestimmter Chromosomen bzw. Chromosomenabschnitte möglich. Aufgrund der Verwendung radioaktiver Strahlung war allerdings ein hoher Sicherheitsaufwand nötig. Dies beschränkte die Anwendung der Methode auf entsprechend ausgerüstete Laboratorien.

1984 gelang Landegent et al und 1986 Pinkel et al die Entwicklung einer Markierung mittels fluoreszierender Farbstoffe, die mittels entsprechender Filter direkt im Mikroskop detektiert werden konnten (Landegent et al. 61-72; Pinkel, Straume, and Gray 2934-38; Pinkel et al. 151-57). Durch die vereinfachte Handhabung und den deutlich geringeren Schutzaufwand wurde die Methode damit erstmals Reihenuntersuchungen zugänglich und entwickelte sich sehr schnell zu einer Standardmethode in der zytogenetischen Forschung und Diagnostik. Im Gegensatz zur radioaktiven Markierung können mit der FISH auch mehrere Regionen in einem Set markiert und getrennt ausgewertet werden, da inzwischen verschiedenfarbige Fluorochrome zur Verfügung stehen und auch komplette Kits kommerziell angeboten werden.

Bei der FISH bedient man sich spezifischer Nukleinsäuresequenzen, die als Sonden eingesetzt werden. (Swiger and Tucker 245-54) Diese Sonden werden sequenzhomolog zur zu analysierenden Sequenz gewählt, wodurch sie bei der Hybridisierung spezifisch binden und

durch die Markierung mit einem Fluoreszenzfarbstoff eine visuelle Erfassung der fraglichen Sequenz ermöglichen.

Hierbei stehen unterschiedliche Sondentypen zur Verfügung: Die Hole-chromosome-paint-Sonde, die zentromerische Repeat-Sonde und Single-Copy-Sonden:

Bei Hole-chromosome-paint-Sonden wird das gesamte Chromosom mit entsprechend fluoreszierenden Farbstoffen markiert.

Zentromerische Repeat-Sonden binden in der perizentromerischen Region. Dort sind spezifische repetitive Sequenzen vorhanden, an welche die Sonde und später der Farbstoff binden können. Durch die hohe Kopienzahl der Targetsequenz entsteht bereits ohne weitere Verstärkung ein helles Signal. Somit ist es bei dieser Technik ausreichend die Sonde einmalig mit einem Fluoreszenzfarbstoff zu detektieren. Eine Signalamplifikation entfällt. Dadurch werden weitere Arbeitsschritte mit entsprechendem Aufwand und möglichen Fehlerquellen überflüssig. Ein weiterer wichtiger Vorteil besteht darin, dass auch in Interphasekernen die Zielregion der Sonde in kondensiertem Zustand vorliegt, was eine Anwendung außerhalb der Metaphase ermöglicht. Es können also auch Zellen untersucht werden, die sich nicht teilen. Somit sind zentromerische Repeat-Sonden auch in bradytrophem Gewebe anwendbar. Es ergeben sich deutlich abgrenzbare und gut auszählbare Signale.

Single-copy-Sonden detektieren einzelne Gene. Sie sind hochspezifisch für bestimmte Genloki, zeigen allerdings eine größere Neigung zu Kreuzreaktionen als zentromerische Repeat-Sonden. Aufgrund der kurzen Anlagerungssequenz muss das Signal der Sonde in weiteren Arbeitsschritten verstärkt werden. Die Sonde eignet sich gut zum Auffinden von Mikrodeletionen.

Aufgrund der schwierigen Anregung zur Zellteilung von Mundschleimhaut- und Haarwurzelzellen haben wir uns bei der bestehenden Fragestellung für die Verwendung von zentromerischen Repeat-Sonden als Methode der Wahl entschieden.

3 Material und Methode

3.1 Material

3.1.1 Probandenkollektiv

Entsprechend des Untersuchungszieles, genetische Veränderungen bei älteren Menschen zu erfassen, wurde als Mindestalter für die Teilnahme an unserer Studie ein Alter von 80 Jahren festgesetzt. Um ausreichende Anzahl von Studienteilnehmern ansprechen zu können kooperierten wir mit einer Augenarztpraxis, in der ambulante Cataract-Operationen und Fluoreszenzangiographien durchgeführt werden, da diese Untersuchungen bzw. Operationen fast ausschließlich bei entsprechendem Alter erforderlich sind.

Zu den Einschlußkriterien für unsere Probanden gehörte außer dem Alter von 80 Jahren oder mehr der anamnestiche Ausschluss einer rheumatischen Erkrankung. Des Weiteren ergab sich eine relative Selektion in Bezug auf schwerwiegende Erkrankungen dahingehend, dass alle teilnehmenden Probanden zum Operationstermin eine OP-Tauglichkeit in Lokalanästhesie vorweisen mussten. In diesem Kollektiv nicht auszuschließen waren typische Erkrankungen des Alters wie arterielle Hypertonie und Diabetes mellitus. Diese wurden anamnestisch nicht erfasst.

Anhand von Zellen der Probanden Nr. 1 bis 4 wurde die Methode evaluiert. Die Probanden Nr. 5 bis 20 nahmen an der eigentlichen Studie teil.

Probandenliste:

Fallnummer	Name	Geburtsdatum	Geschlecht	Probenentnahme am	Bemerkung
1	CW	20.04.1978	♀	02.04.2001	Methodenevaluation
2	SB	22.10.1977	♂	02.04.2001	Methodenevaluation
3	CF	26.09.1979	♀	02.04.2001	Methodenevaluation
4	GJ	17.04.1921	♀	13.06.2001	Methodenevaluation
5	KH	22.08.1918	♂	13.06.2001	Untersuchung
6	HR	26.10.1914	♀	20.06.2001	Untersuchung
7	HR	23.08.1920	♀	20.06.2001	Untersuchung
8	RF	15.02.1919	♀	04.07.2001	Untersuchung
9	IS	26.07.1920	♀	18.07.2001	Untersuchung
10	HK	21.10.1920	♂	18.07.2001	Untersuchung
11	AM	19.02.1918	♀	25.07.2001	Untersuchung
12	AA	17.09.1919	♀	25.07.2001	Untersuchung

13	HS	04.10.1916	♂	20.08.2001	Untersuchung
14	EA	29.09.1919	♂	20.08.2001	Untersuchung
15	GB	08.04.1920	♀	20.08.2001	Untersuchung
16	RS	13.09.1920	♂	29.08.2001	Untersuchung
17	ET	11.08.1914	♂	29.08.2001	Untersuchung
18	PA	11.01.1918	♂	29.08.2001	Untersuchung
19	AT	05.11.1919	♀	03.09.2001	Untersuchung
20	KS	27.11.1920	♀	03.09.2001	Untersuchung

An Untersuchung teilnehmende Probanden:

Alter [Jahre]	Männer [Anzahl]	Frauen [Anzahl]	Gesamt [Anzahl]
80	2	3	5
81	1	3	4
82	1	1	2
83	1	1	2
84	1	0	1
85	0	0	0
86	0	1	1
87	1	0	1
gesamt	7	9	16

16 Probanden: 7 Männer
 9 Frauen

Altersspektrum Männer: 80 Jahre bis 87 Jahre

Altersspektrum Frauen: 80 Jahre bis 86 Jahre

Altersspektrum gesamt: 80 Jahre bis 87 Jahre

Durchschnittsalter Männer: 82,43 Jahre

Durchschnittsalter Frauen: 81,55 Jahre

Durchschnittsalter gesamt: 81,94 Jahre

3.1.2 Entnommenes Material

Von jedem Probanden wurden einige Mundschleimhautabstriche sowie ein bis zwei Haarwurzelausstriche angefertigt und einige Milliliter Venenblut entnommen. An allen Materialien wurde eine Fluoreszenz-in-situ-Hybrisisierung durchgeführt. Die Blutprobe wurde nach Lymphozytenkultur zusätzlich zur Karyotypisierung verwendet.

3.1.3 Bezugsquellen der vorgefertigten Materialien und Lösungen

Substanz	Handelsname	Firma	Nummer
Colcemid	Karyomax	GIBCO-BRL	15210-040
Tween	Tween20	SIGMA	
Bactotrypsin	Bactotrypsin	Difco	165707KA
Translationsmix-Dig	Dig-Nick-Mix	Roche	1745816
Translationsmix-Bio	Bio-Nick-Mix	Roche	1745824
Humane Cot1-DNA	hCot1-DNA	Roche	1581074
Dowex	Dowex MR3	Sigma	1-9005
Giemsa-Stocklösung	Giemsa	Merck	
PB-Max	PB-Max supplementiert	Gibco-BRL	10386-035

3.1.4 DNA-Sonden

Als Sonden für die FISH werden Alpha-satellite-repeat-Sonden verwendet, die sich als Zentromer-Sonden spezifisch an die Chromosomen anlagern. Diese Sonden werden mit Biotin oder Avidin markiert, welches wiederum mit spezifischen Antikörpern detektiert wird.

	Chromosom 7	Chromsom 8	Chromosom 10	Chromosom 12
Name	PUC 7t1	PJM 128	PA 10 RR8	PA12 H8
Clone	alrhoide Sequenz	alrhoide Sequenz ATCC 59904	alrhoide Sequenz ATCC 61396	alrhoide Sequenz ATCC 61398
Gen-locus	D7Z1	D8 Z2	D10 Z1	D12 Z1

3.1.5 Lösungen und Puffer aus eigener Herstellung

Im Folgenden angeführte Lösungen und Puffer wurden im von uns im Labor hergestellt.

3.1.5.1 Deionisiertes Formamid

(Handschuhe tragen, giftig!)

Ansatz:

- 1) 10 g Ionenaustauscher pro 100 ml Formamid zugeben.
- 2) Ca. 1/2 bis 1 Stunde mit abgeglühtem Rührfisch stark rühren, bis ein pH zwischen 6,0 und 7,0 erreicht ist. (Bei zu langem Rühren wird der pH zu sauer.)
- 3) Durch doppelten Faltenfilter filtrieren.
- 4) Aliquotieren in Falcontubes oder Grüner-Flaschen für die Zellkultur (innen steril).

- 5) Aufbewahren bei -20°C.

Ionenaustauscher: Dowex® MR3: Sigma 1-9005

3.1.5.2 PBS-Stocklösung 1M (= 20 x PBS)

benötigte Chemikalien:

- 1) 29,25g Na₂HPO₄ 2 x H₂O (Di-Natriumhydrogen-phosphat-Dihydrat)
Merck-Nr.: 6580
- 2) 4,9g KH₂PO₄ (Kaliumdihydrogenphosphat) M = 136,09g
Merck-Nr.: 4873
- 3) 160g NaCl (Natriumchlorid)
Merck-Nr.: 6404

Ansatz:

- 1) und 2) in genügend A. dest. steril (<1000ml) lösen, dann 3) zugeben.
- pH auf 7,2 einstellen, mit HCl oder NaOH
- mit A. dest. steril auf 1000ml auffüllen
- autoklavieren

Die PBS-Arbeitslösung wird durch Verdünnen der Stammlösung mit deionisiertem Wasser direkt vor den Versuchen hergestellt.

Bsp: 1xPBS (=0,05M PBS):

Die Stammlösung wird 1:20 mit A. dest. verdünnt

3.1.5.3 SSC-Stocklösung (= 20 x SSC)

= 3 M NaCl + 0,3 M Tri-Natriumcitrat-Dihydrat in A. dest.

Ansatz für 1l:

$$1) M_{(\text{Tri-Natriumcitrat-Dihydrat})} = 294,1 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$$

für $c = 0,3 \frac{\text{mol}}{\text{l}}$ in 1l Lösung gilt:

$$m = c \cdot M \cdot V = 0,3 \frac{\text{mol}}{\text{l}} \cdot 294,1 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \cdot 1\text{l} = 88,23\text{g}$$

$$2) M_{(\text{NaCl})} = 58,44 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$$

für $c = 3 \frac{\text{mol}}{\text{l}}$ in 1l Lösung gilt:

$$m = c \cdot M \cdot V = 3 \frac{\text{mol}}{\text{l}} \cdot 58,44 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \cdot 1\text{l} = 175,32\text{g}$$

- 1) und 2) in A. dest. lösen (<1000ml)
- pH einstellen auf 7,0
- mit A. dest. auf 1000 ml auffüllen
- autoklavieren

3.1.5.4 Dig1-Puffer

Ansatz für 200 ml

- 2 M Tris-HCl (pH=7,5) wird 1:20 verdünnt → 10 ml
 - 4 M NaCl wird 1:26,6 verdünnt → 7,5 ml
 - mit 182,5 ml A. dest. auf 200 ml auffüllen
- 200 ml 100 mM Tris-HCl (pH=7,5) mit 150 mM NaCl

3.1.5.5 Dig3-Puffer

Ansatz für 200 ml

- 1 M Tris-HCl (pH=7,5) 1:10 verdünnen → 20 ml
 - 4 M NaCl 1:40 verdünnen → 5 ml
 - 1 M MgCl₂ 1:20 verdünnen → 10 ml
 - mit 165 ml A. dest. auf 200 ml auffüllen
- 100 mM Tris-HCl (pH=7,5) und 100 mM NaCl und 50 mM MgCl₂

3.1.5.6 Farbsubstrat-Gemisch

für den Dot-Blot

- 5,7 ml Dig3-Puffer
- 33 µl NBT
- 25 µl BCIP

Durch die alkalische Phosphatase werden vom Phosphatgeber (BCIP) Phosphatreste abgespalten und auf das Farbsubstrat (NBT) übertragen, wodurch dieses mit blauer Farbe ausfällt.

Stocklösungen:

- NBT(Nitro-blue-tetrazolium): 0,5g/10ml 70% DMF, Firma: Biomol
- BCIP(Bromocriptomphosphat): 0,5g/10ml DMF, Firma: Biomol

3.1.5.7 Mastermix 2.1

Ansetzen im Falcontube (innen steril):

5,5 ml Formamid deionisiert

1 g Dextransulfat

0,5 ml 20 x SSC

- stark vortexen
- einige Stunden bei 70°C im Wasserbad zum Lösen des Dextransulfats (Falcon im Wasserbad)
- auf Raumtemperatur abkühlen lassen
- pH einstellen auf 7,0: vorsichtig! titrieren mit 1 N HCl
- Volumen mit A. dest. steril auf 7 ml einstellen

Tipps und Tricks:

- bei zu kleinem Ansatz kann der pH nur schlecht eingestellt werden. → mehrfache Menge ansetzen
- bei Ansetzen HANDSCHUHE tragen, giftig!

- sterile Einmalpipetten verwenden / autoclavierte Pipettenspitzen
- autoclaviertes oder sterilfiltriertes 20 x SSC verwenden
- Formamid reinst verwenden (beste Qualität)
z.B. IBI (ist bereits deionisiert) oder Ridel de Häen (deionisieren! in
Plastikeinmalgefäß)
- Dextransulfat schütten, nicht mit Spatel in den Vorratsbehälter gehen.

3.2 Methoden

3.2.1 Präparationsmethoden

3.2.1.1 Mundschleimhautabstrich

Der Mundschleimhautabstrich dient der Gewinnung vereinzelter Mundschleimhautzellen zur Untersuchung mit Interphase-FISH.

Der Proband spült den Mund kräftig mit einem Schluck Wasser, um den Mundschleim und abgestorbene Epithelien zu entfernen. Besonders die Backen sollen gut gespült werden, da diese den Entnahmeort darstellen. Daraufhin schabt man mit einem Holzspatel kräftig an der Wangeninnenseite entlang, um einige Zellen abzulösen, die sich dann auf einen gewaschenen fettfreien Objektträger ausstreichen lassen. Die Prozedur wird wiederholt bis genügend Material gewonnen wurde. Sobald die Zellen angetrocknet sind werden die Objektträger zum Fixieren 10 Minuten lang in eiskaltes Methanol gestellt und sind danach fertig für Transport und Bearbeitung.

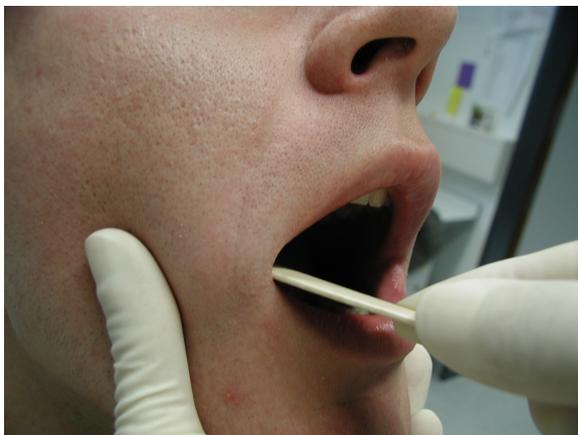


Abbildung 1: Durchführung des Mundschleimhautabstriches mittels Holzspatel und Ausstreichen der Mundschleimhautzellen auf den Objektträger

3.2.1.2 Haarwurzelpräparation

Die Haarwurzelpräparation dient der Gewinnung vereinzelter Haarwurzelzellen zur Untersuchung mittels Interphase-FISH.

Einzelne möglichst dicke Haare werden am Scheitel ausgewählt und mit einer Epilationspinzette herausgezogen. An der Wurzel sollte ein deutlicher weißer Balg zu sehen sein. Mit diesem Ende werden die Haare zwei bis drei Minuten in 60%ige Essigsäure gelegt, damit sich das umgebende Gewebe lockert und so die Zellen vereinzelt auf dem Objektträger abgestreift werden können. Je länger die Vorbehandlung mit der Essigsäure dauert, desto verstreuter lassen sich die Zellen austreichen. Durch eine zu lange Säurebehandlung werden die Zellen allerdings stark angegriffen und liefern bei der Hybridisierung schlechte Ergebnisse in Form von ausgezogenen Spots. Für diese Untersuchung hat sich eine Zeit von ca. zwei Minuten als optimal erwiesen.

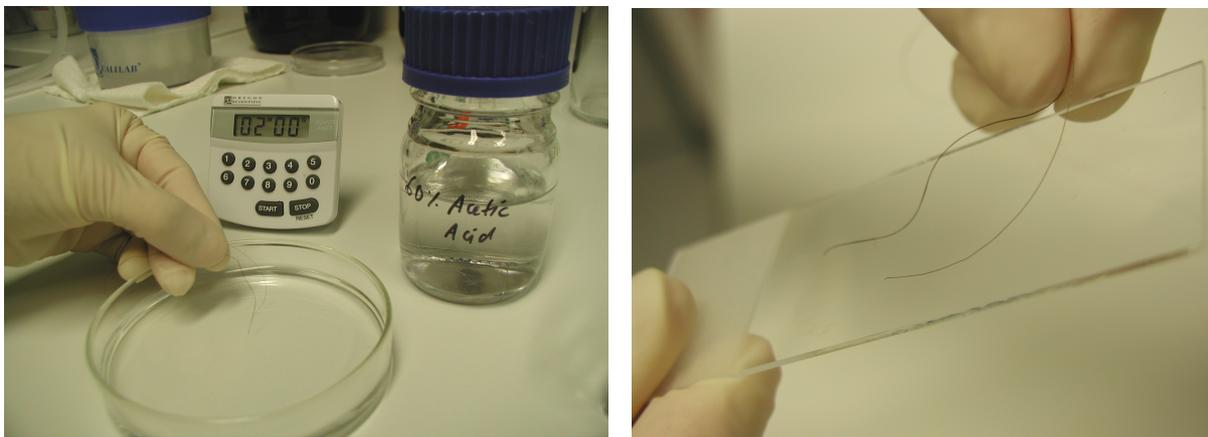


Abbildung 2: Einlegen der Haarwurzel in 60%ige Essigsäure für 2 bis 3 Minuten zum Lockern der Zellen im Haarwurzelbalg und Ausstreichen der Haarwurzelzellen auf den Objektträger

3.2.1.3 Blutentnahme und -präparation

Die Blutentnahme dient der Gewinnung von kernhaltigen Lymphozyten, die mit Interphase- und Metaphase-FISH untersucht werden. Aus dem entnommenen Blut werden die Lymphozyten als kernhaltige Zellen zur Teilung angeregt und nach drei Tagen aus dem Blut separiert und fixiert. Sie werden dann als Tropfpräparat auf Objektträgern bearbeitet und untersucht.

Zu Behandlungszwecken wurde allen Probanden am Tag der Probenentnahme ein venöser Zugang gelegt. Hieraus wurden vor Injektion anderer Substanzen unter sterilen Bedingungen einige Milliliter Venenblut in eine Lithium-Heparin-Monovette entnommen. Die Verwendung von Heparin als Antikoagulanzen garantiert die Vitalität der Lymphozyten bis zur Überbringung

in ein Kulturmedium. Die Anlage der Kultur erfolgt spätestens 3 Tage nach Blutentnahme. Bis dahin erfolgt die Aufbewahrung in der sterilen Monovette bei 4 °C. Vor dem Kulturansatz werden Zell- und Plasmaphase noch einmal gemischt, um reguläre Konzentrationsverhältnisse zu erhalten.

Die Anlage der Kultur erfolgt unter der Sterilbank, um eine Kontamination zu vermeiden. Hierdurch würde die Lymphozytenvermehrung beeinträchtigt und zusätzlich Fremd-DNA ins Untersuchungsgemisch eingeschleust.

Je Kultur werden 8 ml Komplettmedium vorgelegt: PB-Max supplimentiert mit Phythämatogglutinin, L-Glutamin, 10% Fetales Kälberserum (FKS) und 1% Penicillin/Streptomycin. Phythämatogglutinin ist ein pflanzliches Antigen aus der Saubohne das einen Antigenreiz (Mitosereiz) für die Lymphozyten im Blut darstellt und so durch eine Immunreaktion zu ihrer Proliferation führt. Durch die Vermehrung der Lymphozyten wird zum einen die Ausbeute erhöht und zum anderen entsteht die Möglichkeit, die Zellen später in der Metaphase zu arretieren, was Voraussetzung für eine Karyotypisierung ist. L-Glutamin stellt den zur Vermehrung notwendigen Nährstoff bereit. Fetales Kälberserum (FKS) wird als biologische Grundsubstanz verwendet, in der alle Bestandteile des Plasmas vorhanden sind. Penicillin/Streptomycin schließlich bietet als Antibiotika-Kombination einen gewissen Schutz vor eventuell vorhandenen Keimen.

Zu der Grundsubstanz werden bei Männern 0,7 ml und bei Frauen 0,8 ml Vollblut gegeben. Die Blutmenge variiert aufgrund des unterschiedlichen Zell-Plasma-Verhältnisses bei Männern und Frauen. Um optimale Bedingungen für die Proliferation der Lymphozyten zu bieten wird das Medium-Blut-Gemisch bei 37 °C inkubiert und einmal täglich geschwenkt. Die Kultur kann mit oder ohne CO₂-Begasung erfolgen. Nach 72 Stunden sind ausreichend Lymphozyten vorhanden und die enthaltenen Nährstoffe soweit metabolisiert, dass die Aberntung erfolgen muss.

Um die Lymphozyten bei der Aberntung in der Metaphase zu halten werden zu jeder Kultur 40 µl sterile Colcemid-Lösung gegeben und gemischt. Colcemid ist ein Zellgift, das die Ausbildung des Spindelapparates verhindert und dazu führt, dass die homologen Chromosomen nicht aus der Äquatorialebene hinaus an die Pole gezogen werden und die Zellteilung vollendet wird. Somit wird die Zelle in der Metaphase arretiert. Um eine

genügende Zellzahl in Metaphase zu erhalten wird die Kultur für 90 Minuten bei 37 °C inkubiert.

Um die Zellen von der restlichen Lösung zu trennen wird das Medium-Blut-Gemisch in Zentrifugenröhrchen überführt und bei 1000 Umdrehungen pro Minute für 10 Minuten ohne Bremse zentrifugiert. Der entstehende Überstand aus Plasma und Nährlösung kann jetzt abgesaugt werden, bis auf einen Rest von ungefähr 0,5 ml, in dem die Zellen resuspendiert werden.

Anschließend erfolgt die Hypotoniebehandlung mittels 0,52 %igem KCl. Durch die Hypotonie wird das Chromatin der Interphasekerne aufgelockert und eine spätere Sondenanlagerung vereinfacht. Außerdem werden kernlose Erythrozyten, die nicht zu genetischen Untersuchungen herangezogen werden können, zur Ruptur gebracht und in späteren Wasch- und Zentrifugationsschritten entfernt. Die kernhaltigen Zellen quellen auf und die Kernmembran rupturiert anschließend bei dem mechanischen Stress des Auftropfens. Bei guter Hypotonie ist der Kern nach dem Auftropfen nicht mehr von Plasma umgeben und der Kerninhalt (Chromosomen oder Interphasechromatin) ist direkt zugänglich. Dadurch wird im Gegensatz zu den Haarwurzel- und Mundschleimhautzellen ein Pepsinverdau zur Proteinolyse überflüssig. Hierbei ist es wichtig, dass nicht durch zu starke Hypotonie die Chromosomen so weit verstreut werden, dass sie nicht mehr einem einzelnen Kern zugeordnet werden können. Die Hypotoniebehandlung erfolgt mit 8 ml vorgewärmtem 0,52%igem KCl (37 °C), in dem die Zellen resuspendiert werden und benötigt witterungsabhängig zwischen 4 und 10 Minuten. Danach werden die Zellen 10 Minuten bei 1000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert, um sie vom KCl zu trennen und der Überstand wird bis auf einen Rest von 0,5 ml abgesaugt. In diesem werden die Zellen resuspendiert.

Um die Zellen in dieser Form zu erhalten und lagerungsfähig zu machen werden sie mit eisgekühlter Fixativlösung aus Methanol und Eisessig (Methanol : Eisessig = 3 : 1) überschichtet. Im ersten Fixierschritt ist die Verklumpungsgefahr sehr groß. Deshalb darf das Fixans zuerst nur tropfenweise zugegeben werden und muss sofort mit der Zelllösung durchmischt werden. Klumpen die sich an dieser Stelle bilden sind später nicht mehr auflösbar. Insgesamt werden 8 ml Fixativ zugegeben und die Zellen darin resuspendiert. Um eine gute Fixierung zu erreichen müssen die Zellen 30 Minuten bei 4 °C stehen bleiben. Dies ermöglicht dem Fixans eine ausreichende Durchdringung der Zellen. Die Entfernung des

Fixans erfolgt nach 10minütiger Zentrifugation bei 1000 Umdrehungen pro Minute durch Absaugen des Überstandes. Anschließend wird das entstandene Zellpellet resuspendiert.

Die Prozedur des Fixierens mit anschließender Zentrifugation, Absaugen und Resuspension muss noch zweimal wiederholt werden, bis die Zellen als dauerhaft fixiert angesehen werden können. Dabei ist die Wartezeit von 30 Minuten nicht mehr nötig.

Die fixierte Zellsuspension kann jetzt auf gereinigte fettfreie Objektträger aufgetropft werden. Damit sich der Tropfen gut auf dem Objektträger verteilt und die Zellen nicht zu dicht zusammen liegen muss der Objektträger vorher befeuchtet werden. Normalerweise genügt der Feuchtigkeitsniederschlag nach kräftigem Anhauchen. Bei sehr trockener Witterung wird der Objektträger kurz mit Fixativ überschichtet.

Ist der Objektträger getrocknet wird im Phasenkontrastmikroskop die Zelldichte und Zellmorphologie kontrolliert. Es müssen genügend intakte Kerne im Gesichtsfeld vorhanden sein, ohne sich zu berühren und es darf kein zu ausgeprägter zytolplasmatischer Saum um die Kerne liegen. Dieser erschwert das Eindringen der Sonde und führt zu schlechten Hybridisierungsergebnissen. Für die G-Banden-Darstellung ist entscheidend, dass genügend Metaphasen vorhanden sind. Für die FISH sind Interphasekerne ausreichend.

Die Behandlung der FISH-Präparate ist an dieser Stelle abgeschlossen. Die Präparate zur G-Bänderung werden noch künstlich vorgealtert, um später eine schärfere Abgrenzung der Banden zu erreichen. Zu diesem Zweck werden sie für eine Stunde auf eine Heizplatte mit 80 °C gelegt und über Nacht bei 60 °C im Brutschrank gelagert.

3.2.2 Giemsa-Trypsin-G-Bänderung (GTG-Bänderung)

Die G-Bänderung dient der Karyotypisierung der Zellen durch einen Trypsinverdau mit anschließender Färbung. Hierdurch können chromosomale Abberationen erkannt und zugeordnet werden. Die Färbung beruht darauf, dass das in der Lösung enthaltene Trypsin die CG-reichen Areale stärker andaut als die AT-reichen Areale. Die AT-reichen Areale sind aufgrund der relativen Inaktivität deutlich stärker kondensiert als die CG-reichen Areale, die in entkondensiertem Zustand leichter abgelesen werden können und damit auch leichter angreifbar sind.

Für die Färbung werden die Objektträger mit den aufgetropften Lymphozyten 50 bis 60 Sekunden bei 37 °C in 0,5 ml rehydriertes Bactotrypsin gestellt. Zum Beenden des Verdaus werden die Objektträger zweimal kurz in 0,9%iger NaCl-Lösung geschwenkt.

Die unterschiedlich stark verdauten Regionen bilden in der darauffolgenden Färbung entsprechend ihrem Verdauungsgrad verschieden intensiv gefärbte Banden. Zur Färbung wird eine 5%ige Giemsa-Lösung verwendet, in welche die Objektträger für fünf Minuten gestellt werden. Die überflüssige Farbe wird durch zweimaliges Schwenken in destilliertem Wasser abgewaschen und der Objektträger getrocknet. Anhand dieser Banden kann jedes Chromosom eindeutig identifiziert werden.

Zum Mikroskopieren und zur dauerhaften Aufbewahrung werden die Objektträger mit Roti Histokitt und einem Deckglas eingedeckt.

Ist das Ergebnis nicht zufriedenstellend, kann bei einer weiteren Färbung durch Variieren der Trypsin-Zeit die Stärke des Verdaus reguliert werden. Stehen keine weiteren Präparate mehr zur Verfügung kann die Prozedur bei zu schwachem Verdau nach Entfärbung und Entölung in absolutem Alkohol wiederholt werden.

3.2.3 Sondenmarkierung

3.2.3.1 Nick-Translation

Die Nick-Translation dient der Markierung einer DNA-Doppelstrang-Sonde durch Anhängen spezifischer Moleküle, die später mit Antikörpern oder ähnlich spezifischen Molekülen detektiert werden können. Die markierten Sonden werden zur genauen Zuordnung der Chromosomen verwendet. Als Markersubstanzen werden Biotin und Digoxigenin verwendet.

Zu den Sonden wird ein fertiger Translationsmix (Dig-Nick-Mix oder Bio-Nick-Mix) gegeben. Dieser besteht aus DNaseI, DNA-Polymerase, markierten und unmarkierten Nukleotiden in einem geeigneten Puffer.

Die DNaseI ist eine Endonuklease, die zu einem Verlust einzelner Nukleotide auf einem der beiden Stränge führt. Es entstehen sogenannte Nicks: Lücken in der Basenfolge. Dabei ist der

komplementäre Strang erhalten und kann später als Matrix dienen für das Wiederauffüllen des Doppelstranges.

Dieses Auffüllen wird durch die DNA-PolymeraseI bewerkstelligt. Sie füllt die Nicks in dem Doppelstrang entsprechend der Matrix wieder vollständig auf. Dabei verwendet sie die in der Lösung vorhandenen Nukleotide. Adenin, Guanin und Cytosin sind dabei in normaler Form zugegeben. Die Base Thymin ist durch Uracil ersetzt. Zwei Drittel liegen in ursprünglicher Form vor und ein Drittel als markiertes Biotin-D-UTP (bzw. Digoxigenin-D-UTP). Es wird also statistisch bei jedem dritten Uracil ein markiertes Molekül eingebaut, das später detektiert werden kann. Wären alle Uracil-Moleküle Biotin-markiert würde das spätere Detektionssignal theoretisch stärker ausfallen. Dies ist allerdings aus sterischen Gründen nicht möglich, weil das Biotin-Molekül so groß ist, dass es zu Behinderungen beim Einbau käme.

Im Endergebnis liegt bei dieser Methode alle 60 bis 100 Basenpaare ein markiertes Nukleotid vor. Dies bietet vor allem bei Repeat-Sonden eine gute Markierung für kleine bis mittelgroße DNA-Stücke.

Es wurden die Zentromersonden für die Chromosomen 7, 8, 10 und 12 markiert. Die Sonden lagen in folgenden Konzentrationen vor:

Chromosom 7:	840 µg/ml
Chromosom 8:	130 µg/ml
Chromosom 10:	318 µg/ml
Chromosom 12:	600 µg/ml

Daraus ergibt sich das benötigte Volumen für ein Mikrogramm Sonde:

Chromosom 7:	1 µg $\hat{=}$ 1,2 µl
Chromosom 8:	1 µg $\hat{=}$ 7,7 µl
Chromosom 10:	1 µg $\hat{=}$ 3,15 µl
Chromosom 12:	1 µg $\hat{=}$ 1,7 µl

Es wird je 1 µg Sonde mit Aqua dest. steril auf 16 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Dazu werden je 4 µl Dig- bzw Bio-Nick-Mix zugegeben.

Das bedeutet im Einzelnen:

- Dig-Nick Chromosom 7:
14,8 µl A. dest. steril
+ 1,2 µl DNA
+ 4 µl Dig-Nick-Mix

- Dig-Nick Chromosom 8:
8,3 µl A. dest. steril
+ 7,7 µl DNA
+ 4 µl Dig-Nick-Mix

- Bio-Nick Chromosom 8:
8,3 µl A. dest. steril
+ 7,7 µl DNA
+ 4 µl Bio-Nick-Mix

- Bio-Nick Chromosom 10:
12,85 µl A. dest. steril
+ 3,15 µl DNA
+ 4 µl Bio-Nick-Mix

- Bio-Nick Chromosom 12
14,3 µl A. dest. steril
+ 1,7 µl DNA
+ 4 µl Bio-Nick-Mix

Es ergibt sich jeweils ein Gesamtvolumen von 20 µl. Damit die Stammlösung für weitere Reaktionen nicht ihre Aktivität verliert empfiehlt es sich, diese während des Pipettierens ständig auf Eis zu halten.

Das Sonden-Enzym-Gemisch wird 90 Minuten bei 15°C im Kühlwasserbad inkubiert, damit das Biotin bzw. Digoxigenin vom Enzymmix eingebaut werden kann.

Der Reaktionsstopp erfolgt danach durch Hitzedenaturierung des Enzyms im 65°C Wasserbad für 10 Minuten.

Nach Austestung der Sonden in unserem Protokoll und mit unseren Stringenzbedingungen ergab sich eine Neigung zu Kreuzhybridisierungen durch die vielfachen repetitiven Sequenzen. Um diese zu unterbinden wird der Sonde schon jetzt eine gewisse Menge repetitiver DNA zugeführt, um diese Sequenzen durch Absättigung zu blocken. Dazu werden je Tube 1 µl hCOT1-DNA (c=10µg/µl) und 1 µl Heringssperma-DNA (c=10µg/µl) zugegeben.

Um die markierte DNA zum Ausfällen zu bringen wird die Salzkonzentration in dem Gemisch erhöht und gleichzeitig Ethanol zugegeben. Als Salz wird 1/10 des Volumens, also 2,2 µl 3M Na-Acetat zugegeben und das 2,2-fache des resultierenden Volumens an eisgekühltem Ethanol, also 53,24 µl. Um die gesamte enthaltene DNA zu fällen wird die Lösung bei -20 °C über Nacht stehen gelassen.

Am nächsten Tag wird die gefällte DNA mittels Zentrifugation am Boden des Eppendorf-Tubes gesammelt. Dies geschieht in der Kühlzentrifuge bei 4 °C und 13.000 Umdrehungen pro Minute. Nach 15 Minuten hat sich ein sichtbares DNA-Pellet gebildet, das am Boden haftet, so dass man den Überstand ausrinnen lassen kann. Um alle Überreste der Enzyme und Salze zu entfernen werden 200 bis 300 µl 70 %iges eisgekühltes Ethanol zugegeben und in der Kühlzentrifuge bei 4°C mit 13.000 Umdrehungen pro Minute für 5 Minuten zentrifugiert. Nach dem Dekantieren ist die DNA relativ frei von Verunreinigungen.

Um später definierte Konzentrationsverhältnisse zu erhalten muss dem DNA-Pellet das restliche Wasser entzogen werden. Dies kann in der Vakuum-Zentrifuge geschehen oder durch Aufstellen im Wärmeschrank bei 37 °C.

Nach einer Resuspension in 50 µl Aqua dest. steril ergibt sich eine Endkonzentration der Stocklösung von 20 ng/µl.

3.2.3.2 Dot-Blot

Der Dot-Blot dient der Markierungskontrolle der Sonde. Mithilfe einer Farbreaktion wird der Einbau von Biotin bzw. Digoxigenin an die Sonden-DNA nachgewiesen. Es handelt sich um einen Antikörper-Nachweis mit enzymgekoppeltem Farbniederschlag. Durch Herstellen einer Verdünnungsreihe wird eine semiquantitative Beurteilbarkeit der Sondenmarkierung erreicht.

Auf Parafilm wird für jede Sonde eine Reihe aus 6 Tropfen zu je 18 μl 6 x SSC vorgelegt. Ein besonderes Augenmerk muss hier auf der Dokumentation liegen, da es nicht möglich ist den Parafilm zu beschriften und es so sehr leicht zu Verwechslungen kommen kann bezüglich der Tatsache, welcher Spot welche Konzentration welcher Sonde enthält. Um dies überhaupt zu ermöglichen wird die obere linke Ecke als Orientierungspunkt abgeschnitten.

Aus diesen Tropfen wird eine Verdünnungsreihe hergestellt. Dazu wird zuerst zu dem am weitesten links liegenden Tropfen 2 μl der zu untersuchenden Sonde gegeben. Dieser Tropfen wird durch Auf- und Abpipettieren gut gemischt und stellt somit schon die erste Verdünnungsstufe mit einer Endkonzentration von 20 ng dar (Verdünnung 1:10). Aus diesem Tropfen werden 2 μl , also ein Zehntel, entnommen und in den nächsten Tropfen überführt. Nach dem Vermischen ergibt sich auch hier eine Verdünnung von 1:10. Die Endkonzentration beträgt 2 ng. Dieses Schema wird bis zum letzten Tropfen durchgeführt und ergibt hier eine Verdünnung von 1:100.000 mit einer Endkonzentration von 200 fg. Dabei entspricht eine Konzentration von 20 ng dem normalen Hybridisierungsansatz.

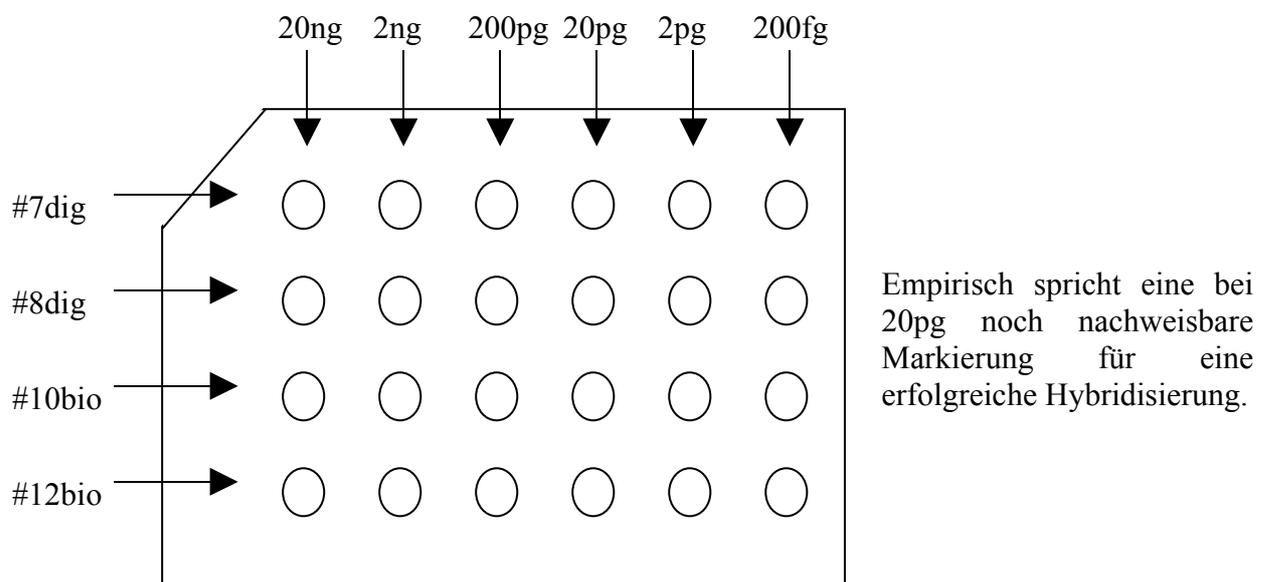


Abbildung 3: Auf Parafilm aufgetropfte Sondenlösungen

Nachdem die Verdünnungsreihe hergestellt ist werden nun aus jedem Tropfen 2 µl nach gleichem Muster auf eine saugfähige Nitrocellulosemembran übertragen und dort gebunden. Dazu wird die Membran nach dem Trocknen UV-Licht mit einer Intensität von 1200 µJoule/cm² ausgesetzt. Dies bewirkt eine irreversible Bindung der DNA an die Membran. Um eine diffuse Anlagerung des Detektionsantikörpers an die polaren Proteine der Membran zu verhindern wird die Membran zuerst bei 37 °C in 1%BSA/6xSSC geblockt.

An die Primärmarkierung der DNA werden Antikörper oder andere spezifisch bindende Proteine angelagert. In unserem Protokoll werden Streptavidin für Biotin bzw. anti-Dig-Antikörper für Digoxigenin verwendet. Bei Streptavidin handelt es sich nicht um einen Antikörper. Das Protein bindet allerdings so spezifisch an Digoxigenin, dass es sich in dieser Funktion nicht von einem Antikörper unterscheidet. Der Einfachheit halber wird Streptavidin daher im weiteren Text als Antikörper bezeichnet. Diese Proteine sind in einem Verhältnis von 1:1000 in 4xSSC/1%BSA gelöst. Deshalb wird zum Milieuangleich zweimal in Puffer kurz inkubiert, bevor jeweils 3 ml Antikörperlösung zugegeben werden. Dies ist das Mindestvolumen das geeignet ist, um den Dot-Blot ausreichend abzudecken. Die Adsorption erfolgt bei Raumtemperatur innerhalb von 30 Minuten. Die überschüssigen Antikörper werden mit der Pufferlösung abgekippt und die Membran zweimal in Puffer gewaschen. Anschließend wird die Membran auf pH=9,5 äquilibriert, da hier das Wirkoptimum der alkalischen Phosphatase für die Farbumsetzung von BCIP (Bromo-criptol-indyl-phosphat) zu NBT (Nitro-blue-tetrozolium) liegt. Dazu wird die Membran für 10 Minuten in Dot-PufferII inkubiert.

Nach Entfernen der Äquilibrierungslösung wird im letzten Schritt die Bindung der Antikörper mittels einer Farbreaktion nachgewiesen. Hierbei wird ein zugegebenes Farbsubstrat durch die an die Antikörper gebundene alkalische Phosphatase zu einem braunschwarzen Farbstoff umgesetzt, der bei genügender Intensität vom menschlichen Auge wahrgenommen wird. Dazu werden 5,7 ml Dot-Puffer mit 33 µl des Phosphatdonors BCIP und 45 µl des Farbstoffs NBT als Substrat zugegeben. Die Farbreaktion läuft im Dunkeln ab und dauert ungefähr 5 bis 10 Minuten. Die Zeit muss so abgepasst werden, dass die Spots deutlich sichtbar sind, sich aber noch kein diffuser Farbhintergrund gebildet hat, der schwach gefärbte Spots überdecken kann. Die Reaktion wird durch Zugabe von Ethanol gestoppt und die Membran getrocknet. Danach ist sie fertig zur Auswertung.

Bei einer ausreichenden Markierung sollten die Dots der ersten drei Verdünnungsstufen zu erkennen sein. Vier Dots weisen auf eine optimale Markierung hin.

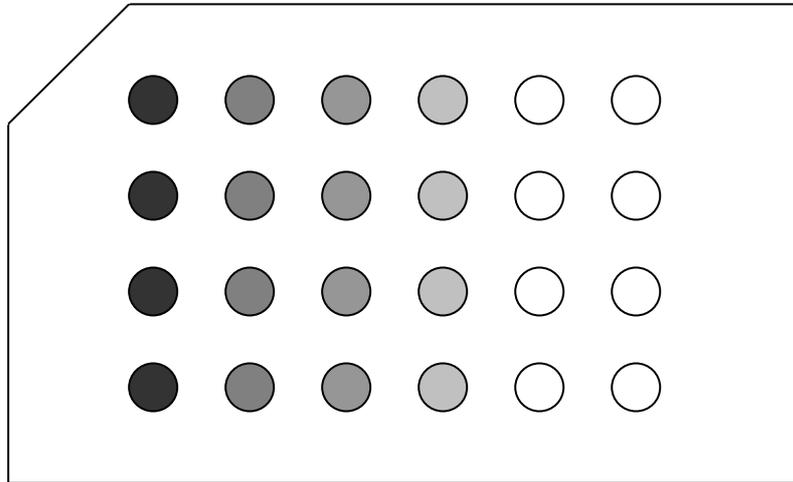


Abbildung 4: Farbreaktion der auf Nitrocellulose-Membran aufgetragenen Sondenlösung bei optimaler Sondenmarkierung

Sind weniger als drei Dots erkennbar, so ist nicht genügend Sonde für eine Hybridisierung markiert.

Der Dot-Blot liefert allerdings keine Differenzierung, ob während der Präparation ein DNA-Verlust stattgefunden hat, also die Gesamtmenge der markierten DNA vermindert ist, oder ob eine genügende Menge DNA vorhanden ist, diese aber in ungenügendem Maße markiert wurde.

Bei einem reinen DNA-Verlust aber ansonsten guter Markierung kann die geringere Sondenkonzentration dadurch ausgeglichen werden, dass während der Hybridisierung ein größeres Volumen der Sondenlösung eingesetzt wird. Dies lässt sich dadurch nachweisen, dass bei einer Hybridisierungsreihe mit unterschiedlichen Konzentrationen bei Einsatz der sonst üblichen Sondenvolumens keine Signale erkennbar sind, jedoch bei Einsatz z.B. der drei- oder vierfachen Volumina, da hier entsprechend die Menge der vorhandenen Sonde steigt.

Bei schlechter DNA-Markierung ist die Sondenmenge je Volumen zwar normal, aber nur ein geringer Anteil dieser Sonde ist markiert und somit später auch detektierbar. Hier ergibt sich auch bei Steigerung der Sondenvolumina in der Hybridisierungsreihe kein sichtbares Signal, da ein zu großer Teil der Zielregion von nicht-markierter Sonden-DNA eingenommen wird und somit kein ausreichend intensives Signal zustande kommt. Das kann auch durch Einsatz eines größeren Sondenvolumens bei der Hybridisierung nicht ausgeglichen werden.

Nachfolgend einige Beispiele für mögliche Ergebnisse:

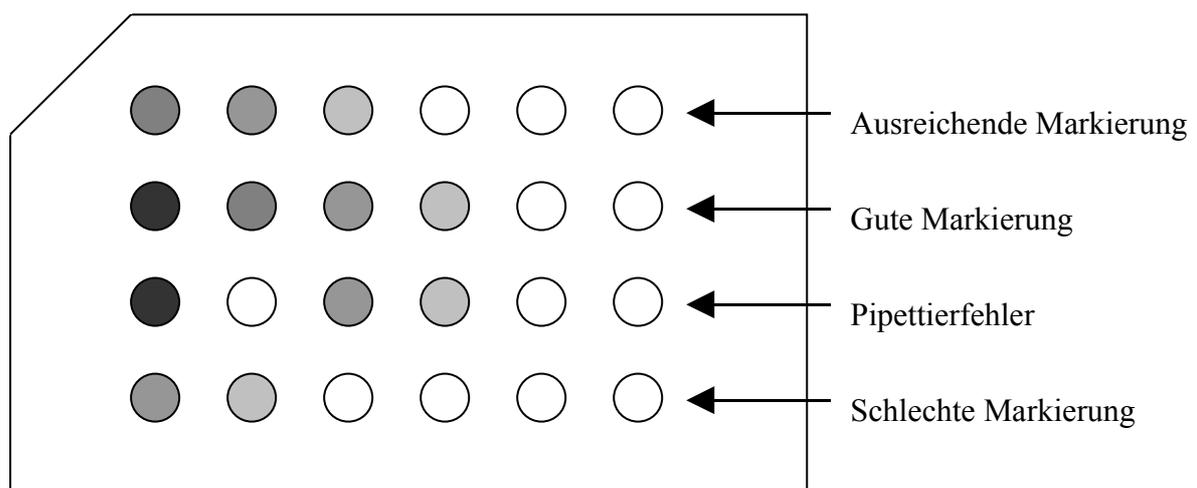


Abbildung 5: Mögliche Ergebnisse des Dot-Blot

3.2.4 Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung (FISH)

Die FISH dient dem quantitativen Nachweis der untersuchten Chromosomen (#7, #8, #10, #12). Dazu werden markierte chromosomenspezifische Sonden in die DNA der Zellen eingebracht und zur Anlagerung gebracht. In einem weiteren Schritt können diese dann sichtbar gemacht und schließlich ausgewertet werden.

3.2.4.1 Hybridisierung

Die vorbereiteten Präparate werden mit den Sonden hybridisiert, das heißt die markierte Sonden-DNA wird in spezifischer Lokalisation zur Anlagerung gebracht.

In einem Durchgang können bis zu sechs Objektträger bearbeitet werden.

Für die unterschiedlichen Probenmaterialien mussten verschiedene Protokolle entworfen werden. Diese unterscheiden sich hinsichtlich einer Vorbehandlung mit einer Pepsinlösung zum enzymatischen Verdau der Proteine. Bei Lymphozytenpräparaten kann auf ihren Einsatz verzichtet werden. Durch die angewendete Präparationsweise liegen die Lymphozyten vereinzelt, meist ohne Zytoplasma, auf dem Objektträger und ihre DNA ist relativ leicht zugänglich. Die eigentliche Hybridisierung erfolgt bei allen Probenmaterialien gleich.

Vorbehandlung von Haarwurzel- und Mundschleimhautzellen

Im ersten Schritt wird durch künstliche Voralterung die Chromosomenmorphologie verbessert. Dies geschieht durch Eintauchen der Objektträger in 37°C warmes 2 x SSC für 30 Minuten. Danach erfolgt der Pepsinverdau, ebenfalls bei 37°C, da dies dem physiologischen Temperaturoptimum des Enzyms entspricht. Die optimale Konzentration beträgt 0,005% Pepsin in 0,01 N HCl. Die Zeit für den Verdau ist so gewählt, dass das die Zellen umgebende Material, vor allem Proteine, weitgehend entfernt wurden, aber die Zellkerne selbst noch nicht in ihrer Struktur angegriffen sind. Für Haarwurzelzellen sind 15 Minuten ausreichend, für Mundschleimhautzellen werden aufgrund des umgebenden Schleims 25 Minuten benötigt. Damit nach Ablauf der Zeit die proteinolytische Reaktion nicht unkontrolliert weiterläuft und zu übermäßigem Verdau führt werden die Objektträger in eine Lösung 2 x SSC bei Raumtemperatur überführt und hier 5 Minuten belassen. Dieser Schritt dient gleichzeitig zur Milieuangleichung an das folgende Fixans, das in 2 x SSC gelöst ist. Zur besseren Haftung auf dem Untergrund werden die Objektträger bei Raumtemperatur 10 Minuten in 0,1%PFA/1xPBS postfixiert und anschließend getrocknet. Die Trocknung erfolgt immer senkrecht stehend, damit sich möglichst wenig Salze aus den Lösungen auf dem Objektträger ablagern.

Vorbehandlung von Lymphozyten

Bei den Lymphozytenpräparaten ist eine Verdauung mit Pepsin in der Regel nicht nötig. Hier ist der Zugang der Sonde bereits erleichtert durch die durchgeführte Hypotonisierung und den geringeren Cytoplasmasaum.

Die Lymphozytenpräparate werden zur „groben“ Reinigung eventueller Auflagerungen, vor allem nach längerer Lagerung, ein bis zwei Minuten bei Raumtemperatur in 2 x SSC gespült und anschließend in einer 4°C warmen aufsteigenden Ethanol-Reihe von 70%, 90%, 100% dehydriert und anschließend getrocknet.

Hybridisierungsprotokoll für vorbereitete Lymphozyten, Haarwurzelzellen und Mundschleimhautzellen:

Um eine Anlagerung der Sonden an die Chromosomen zu ermöglichen muss die DNA der Zellen denaturiert, das heißt in ihre Einzelstränge gespalten werden. Dies geschieht durch Kombination von chemischer und thermischer Denaturierung.

Die chemische Denaturierung erfolgt durch 70%FA/2xSSC. Hiervon werden je 100 µl auf einen Objektträger gegeben und mit einem Deckglas abgedeckt. Zur Kombination mit der thermischen Denaturierung werden die überschichteten Objektträger jetzt für zwei Minuten auf eine 80°C heiße Heizplatte gelegt. Hierbei muss die Zeit genau eingehalten werden. Ansonsten kann es zur Ablösung von DNA und dadurch zu DNA-Verlust kommen. Außerdem leidet bei zu langer Hitzeeinwirkung die chromosomale Morphologie ebenso wie die Morphologie der Zellkerne, was zu einer schwächeren Anfärbbarkeit führt. Insgesamt wird bei Nichteinhalten der Denaturierungszeit der Hybridisierungserfolg herabgesetzt.

Die Denaturierungsreaktion wird beendet, indem nach Ablösen des Deckglases die Objektträger in -20°C kaltes Ethanol getaucht werden. Hiermit wird durch die tiefe Temperatur die thermische Denaturierung gestoppt und gleichzeitig die Denaturierungslösung abgespült und dem Präparat Wasser entzogen. Somit wird auch die chemische Denaturierung gestoppt und durch den Wasserentzug gleichzeitig eine Renaturierung unmöglich gemacht. Die Objektträger durchlaufen eine aufsteigende Ethanol-Reihe von 70%, 90%, und 100% Ethanol und verweilen je zwei Minuten in jeder Konzentrationsstufe. Danach werden die Objektträger getrocknet, um durch die Abwesenheit von Wasser auch weiterhin eine Renaturierung zu vermeiden.

Die eigentliche Hybridisierung erfolgt mit einer Lösung, die die einzubringende Sonde im Gemisch mit geeigneten Stringenzbedingungen enthält. Der sog. Hybridisierungsmix enthält einen Basispuffer zur Einstellung des Ionenmilieus, Formamid in der Endkonzentration von 55% zur Herstellung der Stringenzbedingungen, unspezifische Blockungs-DNA in 1µg/µl Endkonzentration und 0,5 bis 1 µl Sondenlösung (entspricht 10 bis 20 ng Sonde). In unserem Protokoll sind dies: 7 µl Mastermix2.1, enthaltend 55% Formamid, 1 µl Blockungs-DNA und 0,5 bis 1 µl Sonde.

Die Blockungs-DNA besteht aus 0,5 µl Heringssperma-DNA (c = 10 mg/ml) und 0,5 µl humaner COT1-DNA (c = 10 mg/ml). Diese DNA-Abschnitte enthalten vorwiegend

repetitive Sequenzen und lagern sich unspezifisch an die repetitiven Sequenzen des Genoms an. Damit wird eine unspezifische Anlagerung der Sonden-DNA an diese Loci verhindert. Als eigentliche Sonden-DNA wird chromosomenspezifische DNA verwendet, die unterschiedlich markiert ist, um nach der Detektion eine Unterscheidung der Chromosomen zu ermöglichen. Bei den durchgeführten Untersuchungen wurden Biotin und Digoxigenin als Marker verwendet.

Dieser Hybridisierungsmix wird für fünf Minuten im Wasserbad bei mindestens 75°C denaturiert. Die Spaltung in ihre Einzelstränge ist wie bei den Präparaten selbst die Voraussetzung für die Anlagerung an die Chromosomen. Von dem denaturierten Hybridisierungsmix werden je 10 µl auf einen Spot aufgetragen und mit einem Deckglas eingedeckt. Die zusätzliche Abdichtung mit Fotokleber (Fixogum) verhindert weitgehend einen Wasserverlust und erhält das feuchte Mikroklima das zur Anlagerung an die Chromosomen nötig ist. Fixogum ist später vollständig wieder ablösbar. Die Hybridisierung erfolgt bei 37 °C in einer feuchten Kammer. Sie ist nach 7 Stunden abgeschlossen, verliert aber durch einige Stunden längere Hybridisierung nichts von ihrer Qualität. Dadurch bietet sich eine Hybridisierung über Nacht an.

3.2.4.2 Stringente Waschung und Detektion

Am nächsten Tag wird das Fixogum vom Objektträger abgezogen und das Deckglas in 2xSSC abgelöst.

Zuerst muss unspezifisch und zuviel gebundene Sonden-DNA entfernt werden, um ein diffuses Hintergrundleuchten zu vermeiden bzw. zu minimieren. Dies wird erreicht durch zweimaliges Waschen in Formamid. Die Faktoren Zeit, Temperatur der Lösung und Konzentration des Formamids legen hierbei die Stringenzbedingungen fest, bestimmen also wie genau die Sonden-DNA passen muss und wie fest sie gebunden sein muss, um nicht wieder abgelöst zu werden. Hier hat sich eine Lösung von 50%FA/2xSSC bei einer Temperatur von 42 °C für zwei mal 20 Minuten bewährt.

Um auch alle schon abgelösten Sonden-Reste, die noch auf dem Objektträger haften abzulösen werden die Objektträger noch zweimal bei 42 °C für je 10 Minuten in

2xSSC/Tween20 gespült. Tween20 ist ein Tensid und erleichtert somit das Ablösen nicht mehr gebundener DNA vom Objektträger.

Anschließend wird der Objektträger für die weitere Bearbeitung durch kurzes Spülen in 2xSSC wieder auf Raumtemperatur gebracht.

Um ein unspezifisches Anlagern der Antikörper zu verhindern wird der gesamte Objektträger mit Rinderserumalbumin als unspezifischem Protein geblockt. Dazu wird er mit 100 µl 4xSSC/3%BSA überschichtet und in einer feuchten Hybridisierungskammer für 15 Minuten bei 37°C inkubiert.

Alle nachfolgenden Schritte müssen wegen der Lichtempfindlichkeit der Fluoreszenzfarbstoffe bei herabgesetzter Beleuchtung durchgeführt werden.

Zur Detektion der Sonden wird der Objektträger mit 100 µl einer Antikörperlösung überschichtet. Diese Detektionslösung enthält 50 µl Avidin/Fitc und 50 µl anti-Dig/Texas-Red mit jeweils 5 µg Antikörper, gelöst in 4xSSC/Tween/1%BSA. An die Antikörper ist bereits ein Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt, und zwar Fitc an Avidin (grünes Signal) und Texasred an anti-Dig (rotes Signal). Die enthaltenen Antikörper binden spezifisch an das Biotin bzw. Digoxigenin der Sonden und führen so zu einer Anreicherung des von ihnen gebundenen Fluoreszenzfarbstoffes in der entsprechenden Region. Hierbei ist Avidin genaugenommen kein Antikörper, bindet aufgrund seiner räumlichen Struktur aber so spezifisch an Biotin, dass es für diesen Zweck einem Antikörper gleichwertig eingesetzt werden kann. Die Zuordnung des Farbstoffes zu den Chromosomen wurde bei jeder Hybridisierungsreihe im vorherigen Verfahren festgelegt und protokolliert. Sie dient somit der Auszählung der Chromosomen.

Die Anlagerung der Antikörper erfolgt bei 37°C in der feuchten Hybridisierungskammer und hat nach ungefähr 60 Minuten ein Maximum erreicht. Überflüssige Sonde und Farbstoff werden in 4xSSC bei 37°C ausgewaschen. Die Behandlung erfolgt drei mal für je fünf Minuten. Anschließend wird ca. eine Minute in Aqua dest. geschwenkt, um die Salze aus den Lösungen vom Objektträger zu entfernen und dann luftgetrocknet.

Das anschließende Eindecken mit DAPI/Antifade dient der Anfärbung der Kerne (DAPI) und dem Schutz des Fluorochroms vor zu schnellem Verblässen (Antifade). Pro Objektträger genügen 20 µl. Aufgrund des hochviskösen Charakters des Antifade und der entsprechend langsamen Ausbreitung muss das Präparat mindestens 30 Minuten bei 4°C lagern, bevor eine zuverlässige Auswertung erfolgen kann.

3.2.5 Auswertung und Dokumentation

3.2.5.1 Auswertung

Die fertigen Objektträger werden mit Hilfe eines Fluoreszenz-Mikroskopes ausgewertet. Das Mikroskop besitzt einen DAPI-Filter zum Auffinden und Beurteilen der Zellkerne und je einen Filter für die Farbstoffe Fitc und Texasred zum Auszählen der Chromosomensignale.

Zuerst werden die Zellkerne im DAPI-Filter aufgesucht und ihre Morphologie beurteilt. Diese entscheidet darüber, ob die Zellen überhaupt in die Auswertung eingehen. Die Kerne müssen folgende Kriterien erfüllen:

- gute DAPI-Färbung
- nicht gelappte Kerne
- nicht mehrere Kerne übereinander
- keine ausgefransten, „zerfressenen“ Kerne
- keine Kernfragmente.

Die Auswertung der Chromosomenzahl erfolgt im Fitc- und Texasred-Filter. Vermerkt wird jeweils die Anzahl der Spots, die Chromosomen entsprechen. Nicht gezählt werden dürfen:

- autofluoreszierender Dreck (in allen Filtern erkennbar, auch in solchen, für die gar keine Fluorochrome verwendet wurden)
- unspezifische Anlagerungen der Sonde an Dreck (genau gleiche Spots in Fitc- und Texasred-Filter)
- unspezifische Hintergrundfärbung
- split-spots als doppelte Signale:

Diese sind dadurch gekennzeichnet, dass sie durch einen dünnen fluoreszierenden Faden miteinander verbunden sind, der oft nur beim Fokussieren durch alle Ebenen

erkennbar wird und auch nicht lichtintensiv genug ist, um auf den Aufnahmen zu erscheinen.

3.2.5.2 Dokumentation

Von allen ausgezählten Präparaten werden die Ergebnisse in tabellarischer Form festgehalten (siehe Anhang).

Von ausgewählten Zellen werden Aufnahmen zur Dokumentation vor allem der trisomen Befunde angefertigt. Dies erfolgte über eine an das Mikroskop angeschlossene digitale Kamera mit Hilfe der Bildbearbeitungssoftware ISIS4 (in-situ-imaging-system Version 4.0).

Zu beachten ist, dass im Foto immer nur eine Ebene scharf dargestellt ist und somit teilweise Signale verloren gehen, weil sie in einer anderen Ebene liegen. Andererseits erscheinen split-spots häufig als zwei getrennte Signale, weil der dünne Verbindungsfaden zwischen den beiden Signalen normalerweise nicht zu erkennen ist.

4 Ergebnisse

An der Untersuchung nahmen 16 Probanden im Alter von 80 bis 87 Jahren teil. Das Durchschnittsalter lag bei 81,94 Jahren. Unter den Probanden waren 9 Frauen im Alter von 80 bis 86 Jahren mit einem Durchschnittsalter von 81,55 Jahren und 7 Männer von 80 bis 87 Jahren mit einem Durchschnittsalter von 82,43 Jahren.

Angestrebt wurde jeweils für das Untersuchungsmaterial Blutlymphozyten, Haarwurzelzellen und Mundschleimhautzellen die Auszählung von 200 Kernen. Aufgrund begrenzten Materials konnte dies bei Mundschleimhaut- und Haarwurzelzellen nicht immer erreicht werden.

Bei den Untersuchungen zu Chromosom 7 war das Material von Mundschleimhautzellen und Haarwurzelzellen von 3 Probanden nicht auswertbar. Für Chromosom 8 war das Material von jeweils 8 Probanden nicht auswertbar. Außerdem konnten von einem Probanden nur 153 Kerne der Haarwurzelzellen ausgezählt werden.

4.1 Ergebnisse der FISH-Analysen

Die Auswertung erfolgte jeweils nach Zelltypen und Chromosomen getrennt.

4.1.1 Trisomie 7

4.1.1.1 Blutlymphozyten

Es wurden 16 Probanden mit jeweils 200 Zellkernen ausgezählt. Der Mittelwert lag bei einer Trisomierate von 0,906% mit einer Standardabweichung von 0,565%. Der niedrigste Wert war eine Trisomierate von 0%, der höchste Wert eine Trisomierate von 2%. Der Median lag bei 0,75% mit einer unteren Quartile von 0,5% und einer oberen Quartile von 1,125%.

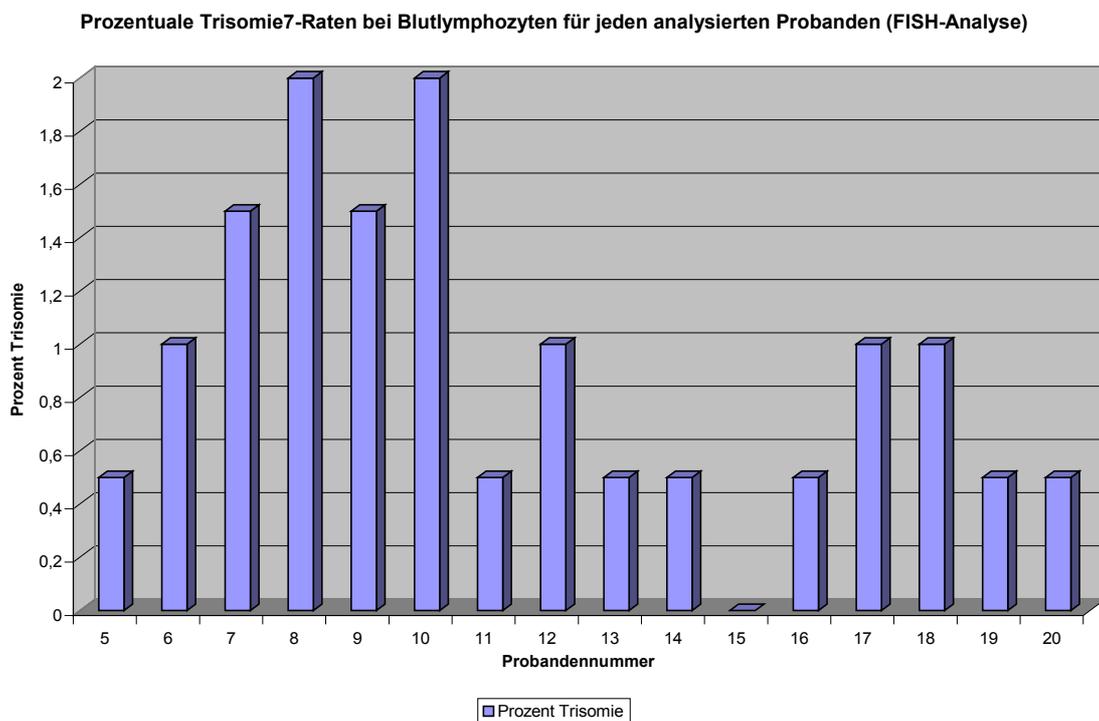


Diagramm 1: Prozentuale Trisomie7-Raten bei Blutlymphozyten für jeden analysierten Probanden (FISH-Analyse)

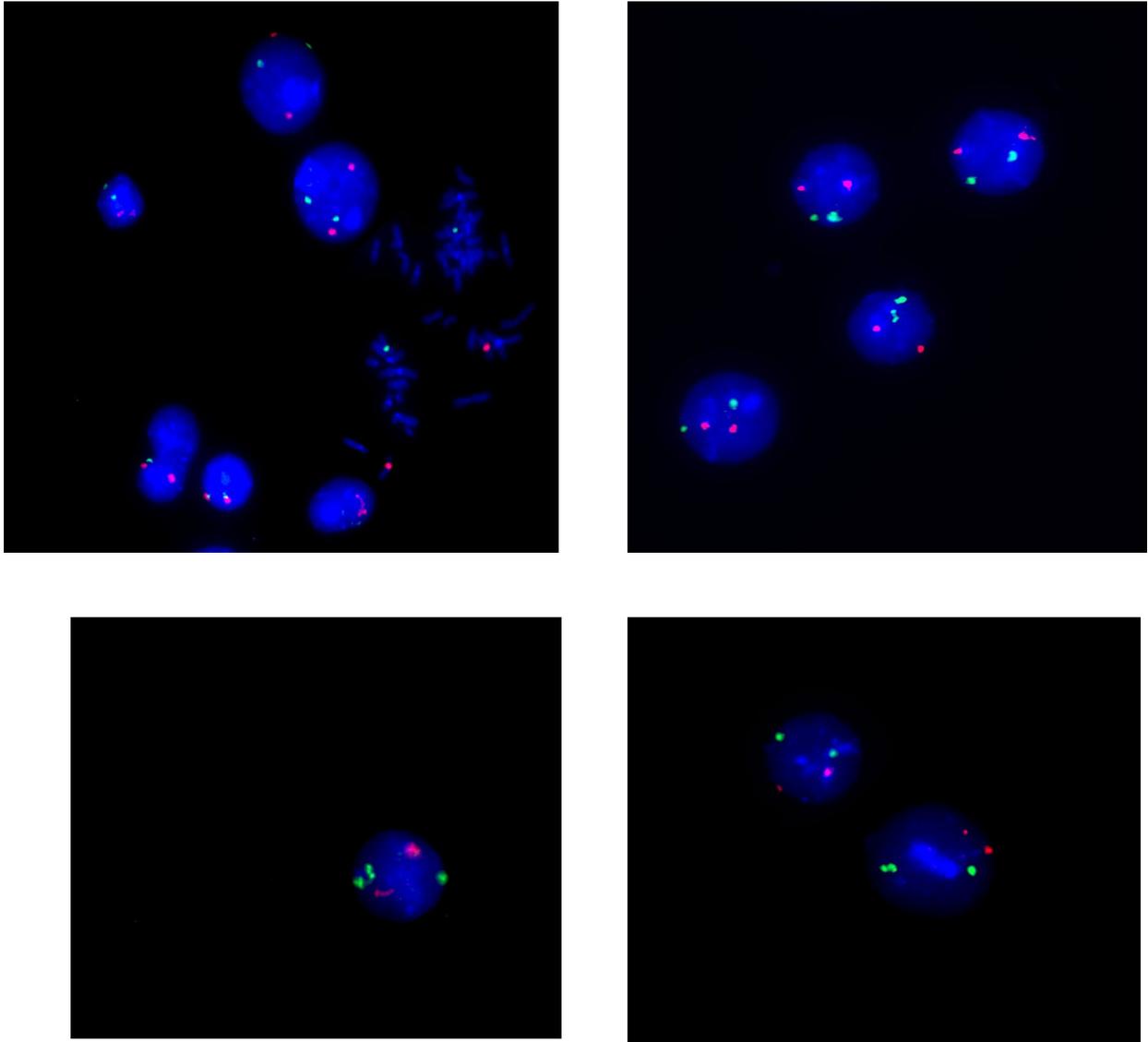


Abbildung 6: FISH in Blutlymphozyten: Cohybridisierung mittels Zentromersonden der Chromosomen 7 (FITC) und 10 (Texas Red): Disome Zellen und Mitose

4.1.1.2 Haarwurzelzellen

Es wurden 12 Probanden mit jeweils 200 Zellkernen ausgezählt. Der Mittelwert lag bei einer Trisomierate von 1,125% mit einer Standardabweichung von 0,916%. Der niedrigste Wert war eine Trisomierate von 0%, der höchste Wert eine Trisomierate von 3%. Der Median lag bei 1% mit einer unteren Quartile von 0,5% und einer oberen Quartile von 1,625%.

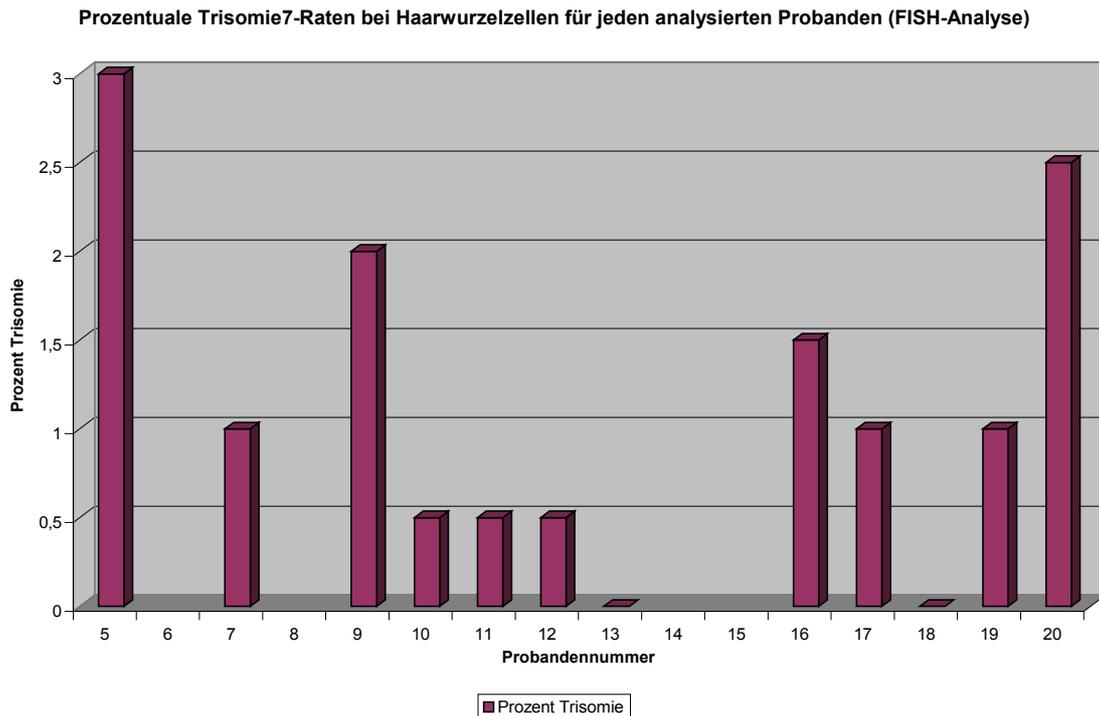


Diagramm 2: Prozentuale Trisomie7-Raten bei Haarwurzelzellen für jeden analysierten Probanden (FISH-Analyse)

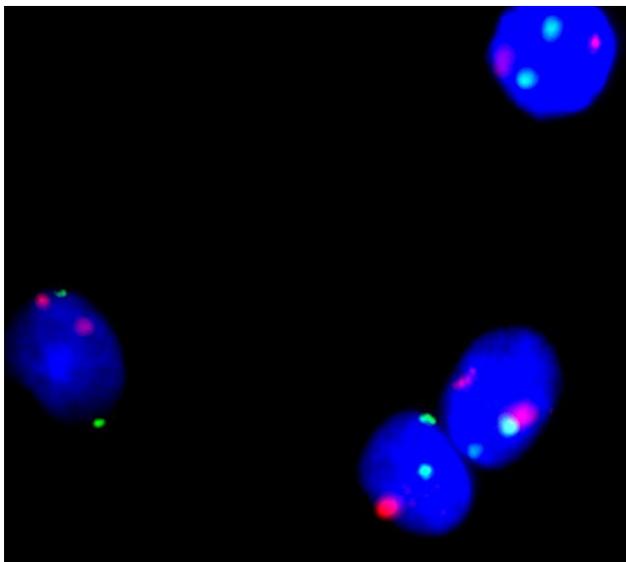


Abbildung 7: FISH in Haarwurzelzellen: Cohybridisierung mittels Zentromersonden der Chromosomen 7 (FITC) und 10 (Texas Red); Disomie für Chromosomen 7 und 10

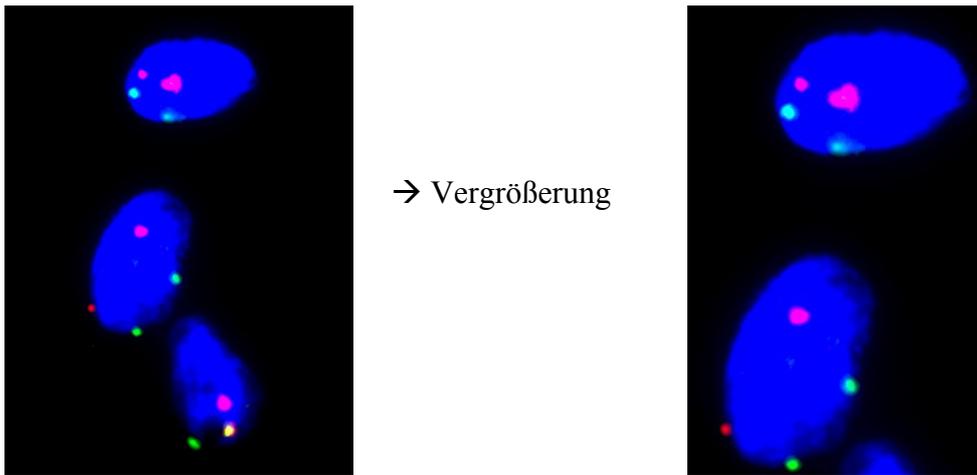


Abbildung 8: FISH in Haarwurzelzellen: Cohybridisierung mittels Zentromersonden der Chromosomen 7 (FITC) und 10 (Texas Red); Disomie für Chromosomen 7 und 10

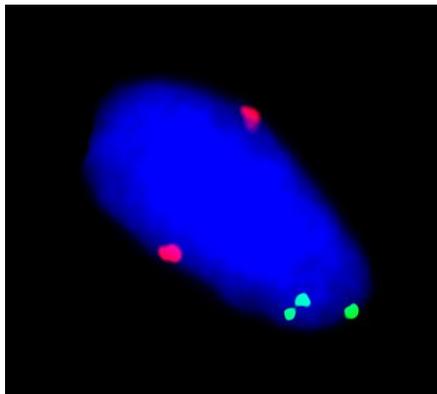


Abbildung 9: FISH in Haarwurzelzellen: Cohybridisierung mittels Zentromersonden der Chromosomen 7 (FITC) und 10 (Texas Red); Einzelzelle mit Trisomie 7 bei Disomie des Kontrollchromosoms 10

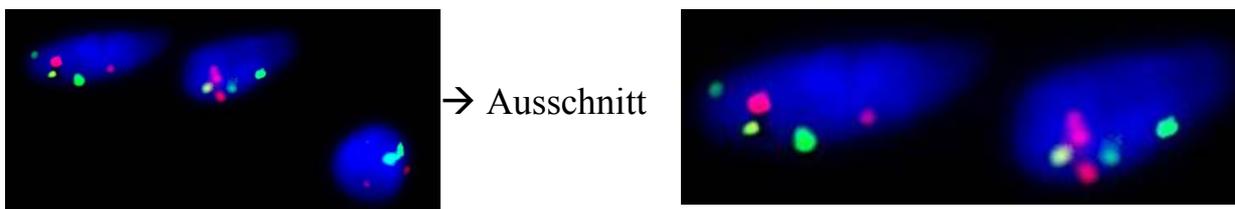


Abbildung 10: FISH in Haarwurzelzellen: Cohybridisierung mittels Zentromersonden der Chromosomen 7 (FITC) und 8 (Texas Red); eine Zelle mit Disomie für Chromosom 7 und 8, zwei Zellen mit Trisomie 7 bei Disomie 8

4.1.1.3 Mundschleimhautzellen

Es wurden 13 Probanden mit jeweils 200 Zellkernen ausgezählt. Der Mittelwert lag bei einer Trisomierate von 3,769% mit einer Standardabweichung von 3,881%. Der niedrigste Wert war eine Trisomierate von 0,5%, der höchste Wert eine Trisomierate von 12,5%. Der Median lag bei 2% mit einer unteren Quartile von 1% und einer oberen Quartile von 4,5%.

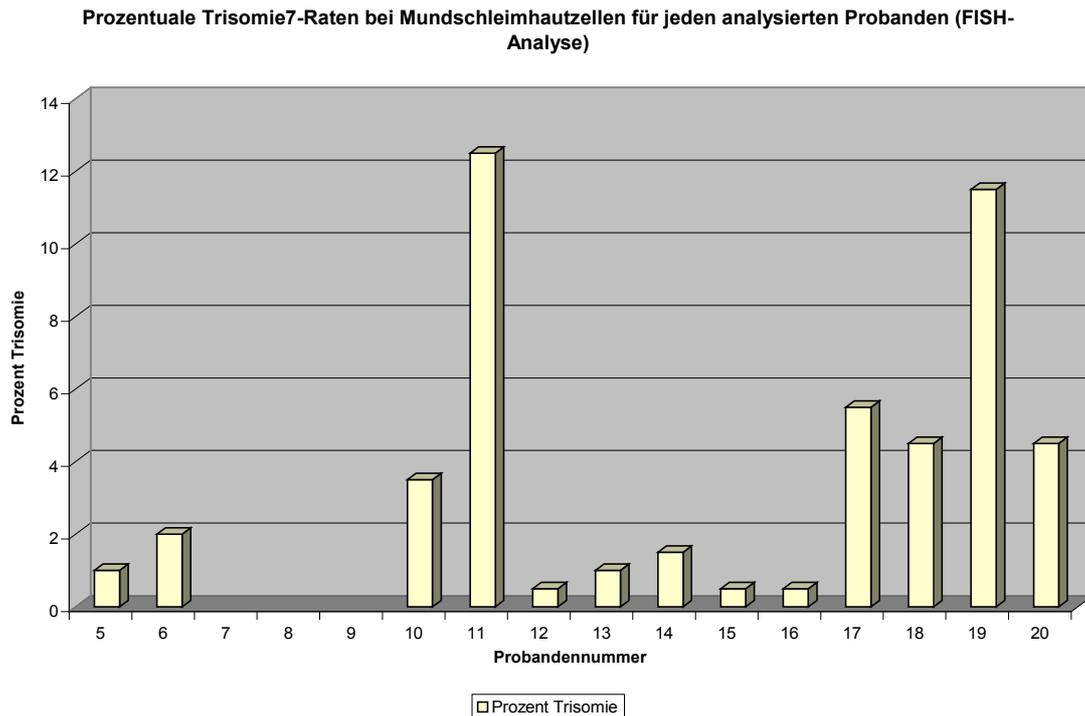


Diagramm 3: Prozentuale Trisomie7-Raten bei Mundschleimhautzellen für jeden analysierten Probanden (FISH-Analyse)

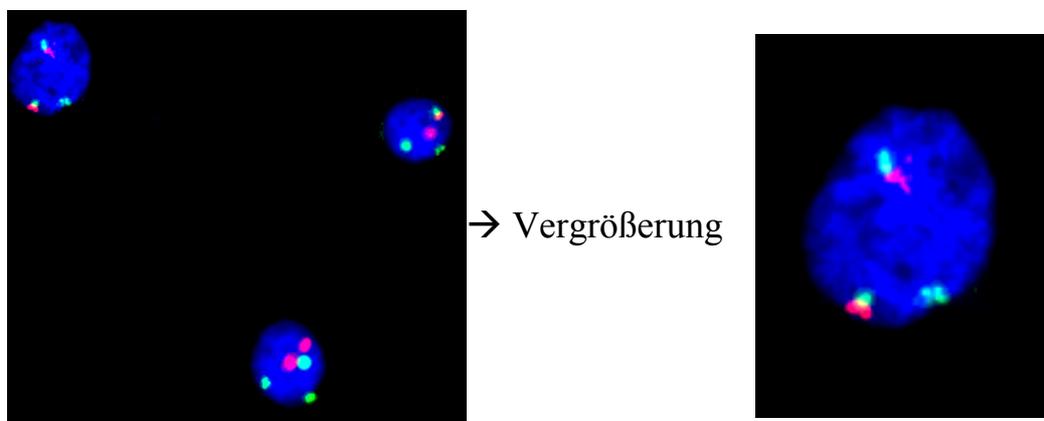


Abbildung 11: FISH in Mundschleimhautzellen: Cohybridisierung mittels Zentromersonden der Chromosomen 7 (FITC) und 10 (Texas Red); 3 Zellen mit Trisomie 7 bei Disomie 10



Abbildung 12: FISH in Mundschleimhautzellen: Cohybridisierung mittels Zentromersonden der Chromosomen 7 (FITC) und 10 (Texas Red); eine Zelle mit Trisomie 7 und Disomie 10; eine Zelle mit Disomie 7 und 10

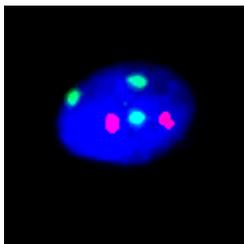


Abbildung 13: FISH in Mundschleimhautzellen: Cohybridisierung mittels Zentromersonden der Chromosomen 7 (FITC) und 10 (Texas Red); eine Zelle mit Trisomie 7 und Disomie 10

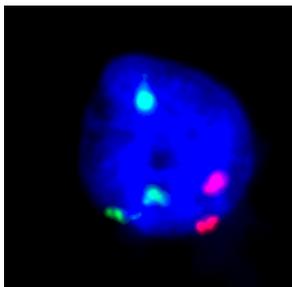


Abbildung 14: FISH in Mundschleimhautzellen: Cohybridisierung mittels Zentromersonden der Chromosomen 7 (FITC) und 10 (Texas Red); eine Zelle mit Trisomie 7 und Disomie 10

4.1.1.4 Gewebevergleich

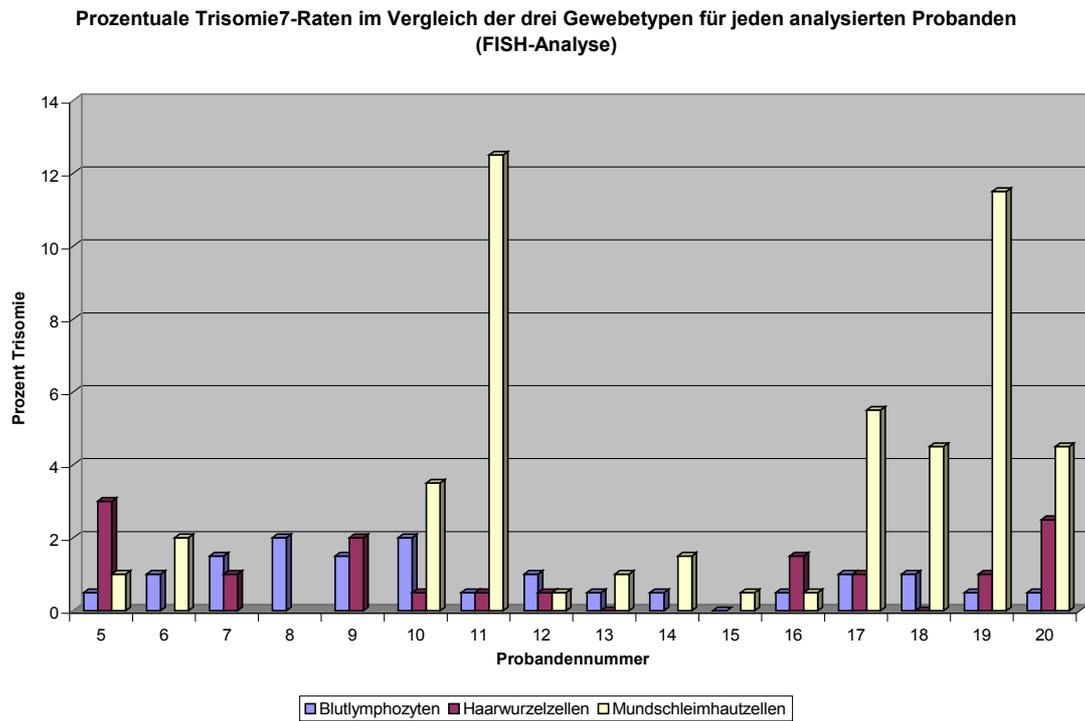


Diagramm 4: Prozentuale Trisomie7-Raten im Vergleich der drei Gewebetypen für jeden analysierten Probanden (FISH-Analyse)

4.1.2 Trisomie 8

4.1.2.1 Blutlymphozyten

Es wurden 16 Probanden mit jeweils 200 Zellkernen ausgezählt. Der Mittelwert lag bei einer Trisomierate von 0,75% mit einer Standardabweichung von 0,707%. Der niedrigste Wert war eine Trisomierate von 0%, der höchste Wert eine Trisomierate von 2,5%. Der Median lag bei 0,5% mit einer unteren Quartile von 0,375% und einer oberen Quartile von 1%.

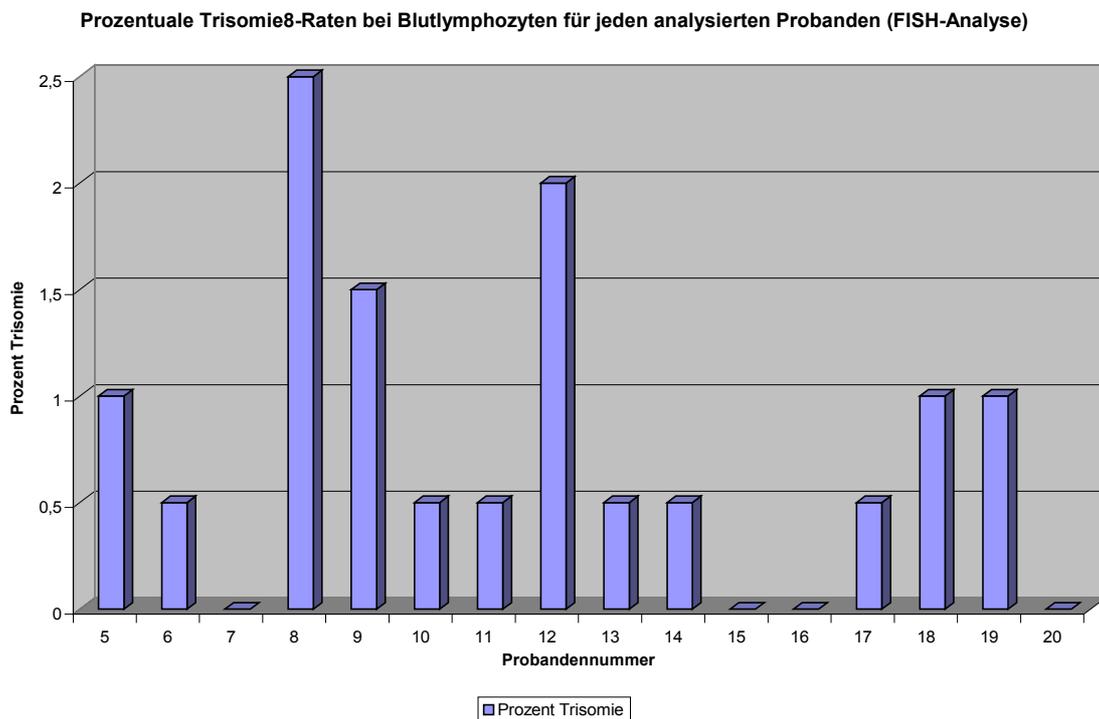


Diagramm 5: Prozentuale Trisomie8-Raten bei Blutlymphozyten für jeden analysierten Probanden (FISH-Analyse)

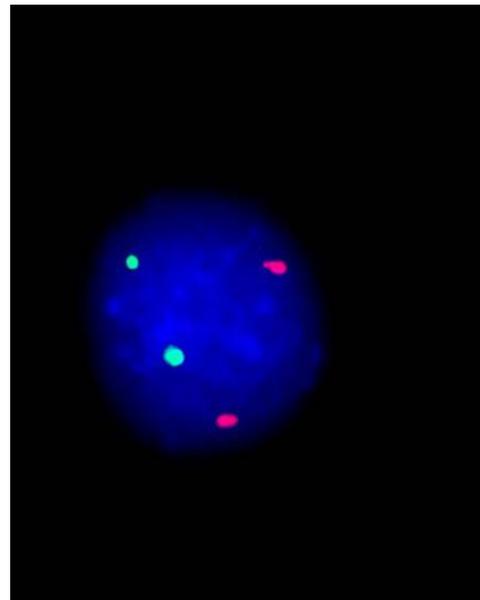
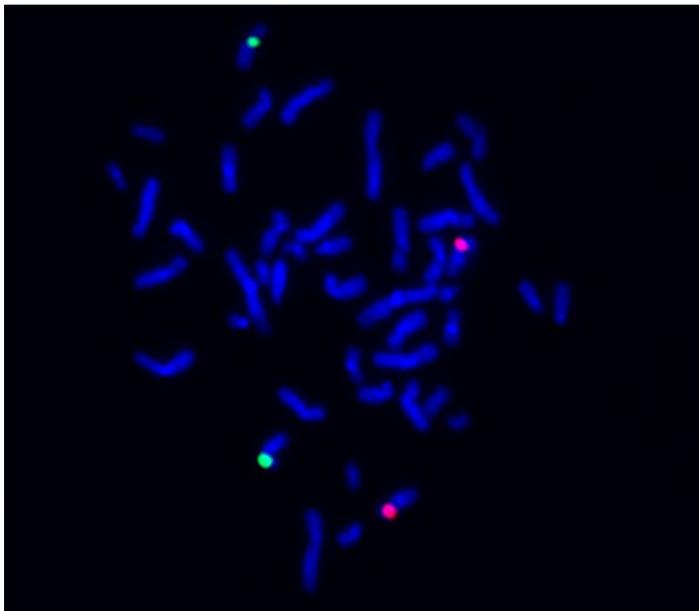
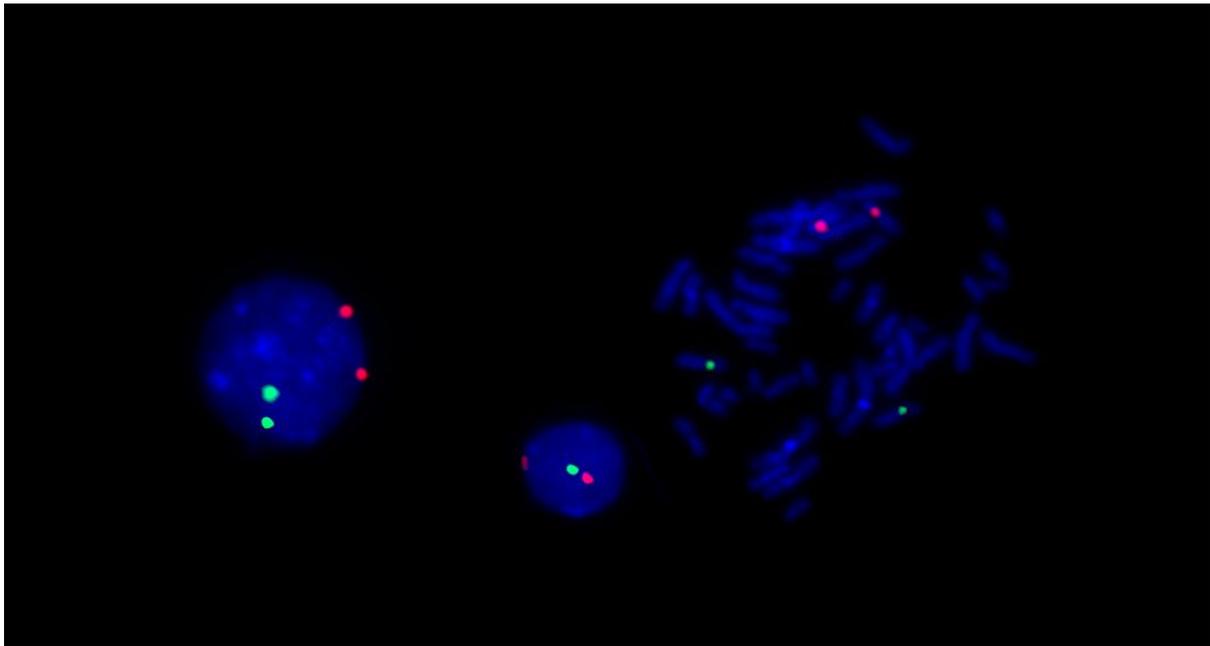


Abbildung 15: FISH in Blutlymphozyten: Cohybridisierung mittels Zentromersonden der Chromosomen 8 (FITC) und 12 (Texas Red); Disomie der gezeigten Zellen und Mitosen

4.1.2.2 Haarwurzelzellen

Es wurden 11 Probanden mit jeweils 200 Zellkernen ausgezählt, mit Ausnahme eines Probanden, bei dem nur 153 Kerne des Haarwurzelausstriches ausgezählt werden konnten. Der Mittelwert lag bei einer Trisomierate von 0,955% mit einer Standardabweichung von 1,215%. Der niedrigste Wert war eine Trisomierate von 0%, der höchste Wert eine Trisomierate von 4,5%. Der Median lag bei 0,5% mit einer unteren Quartile von 0,25% und einer oberen Quartile von 1%.

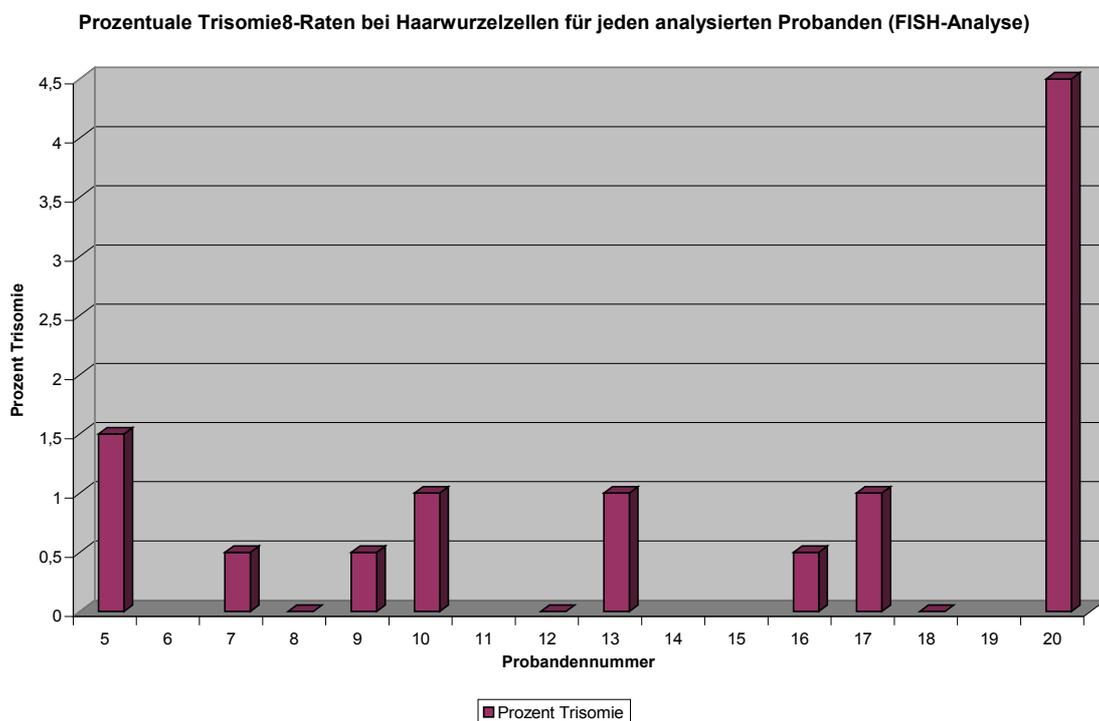


Diagramm 6: Prozentuale Trisomie8-Raten bei Haarwurzelzellen für jeden analysierten Probanden (FISH-Analyse)

4.1.2.3 Mundschleimhautzellen

Es wurden 11 Probanden mit jeweils 200 Zellkernen ausgezählt. Der Mittelwert lag bei einer Trisomierate von 0,773% mit einer Standardabweichung von 0,888%. Der niedrigste Wert war eine Trisomierate von 0%, der höchste Wert eine Trisomierate von 3%. Der Median lag bei 0,5% mit einer unteren Quartile von 0% und einer oberen Quartile von 1,25%.

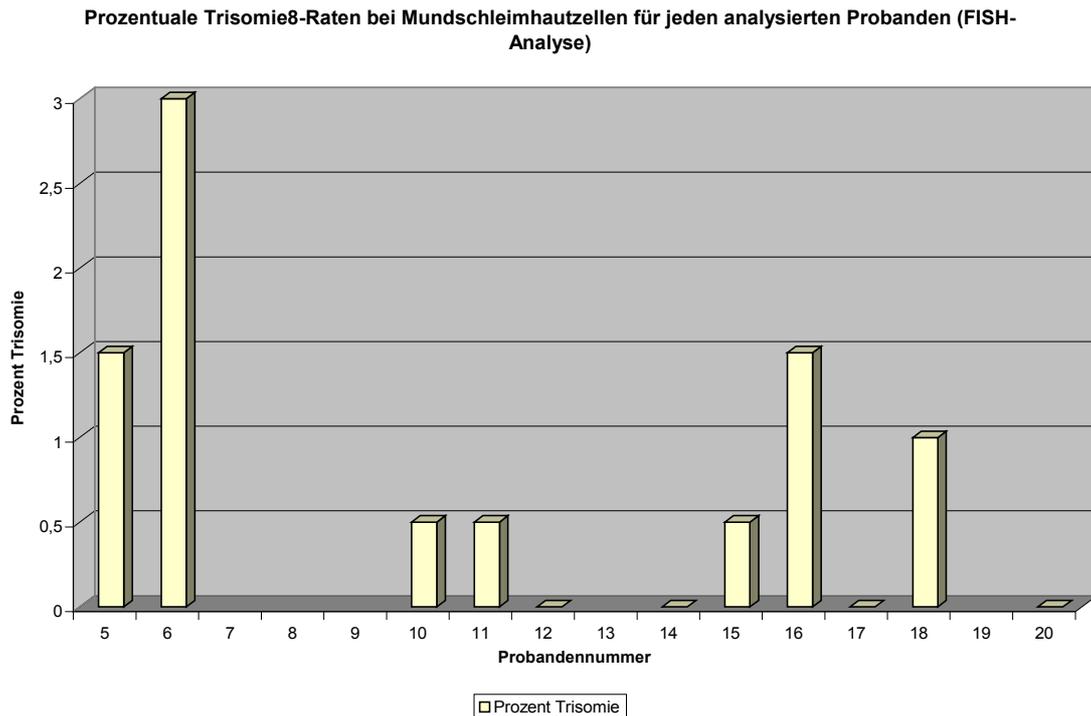


Diagramm 7: Prozentuale Trisomie8-Raten bei Mundschleimhautzellen für jeden analysierten Probanden (FISH-Analyse)

4.1.2.4 Gewebevergleich

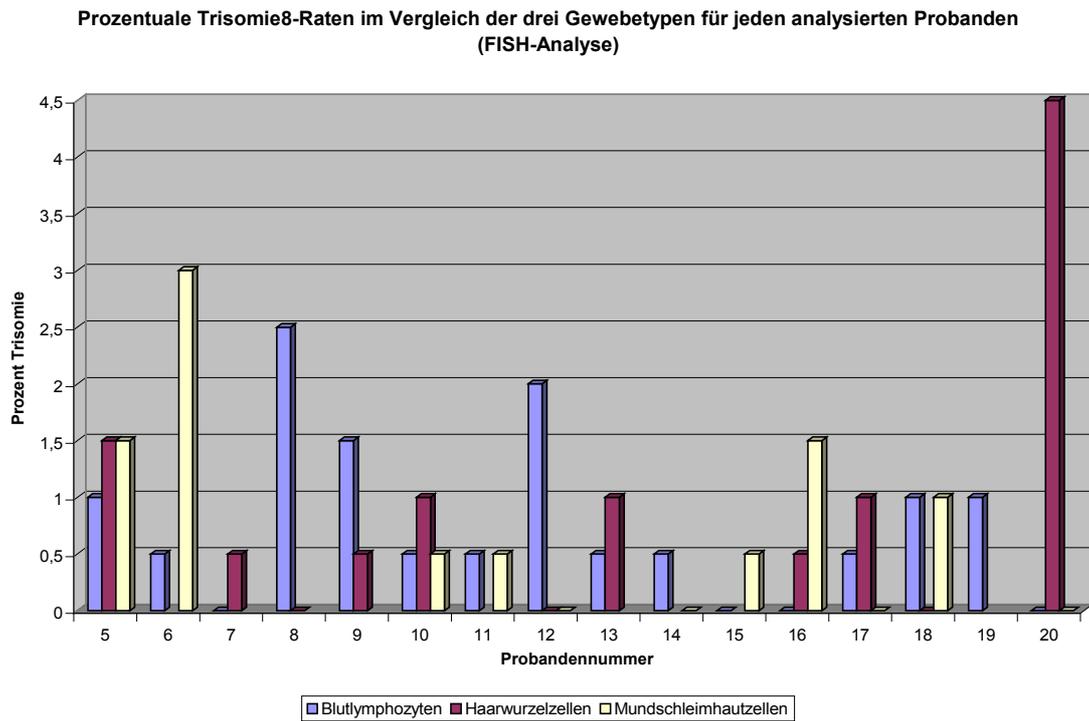


Diagramm 8: Prozentuale Trisomie8-Raten im Vergleich der drei Gewebetypen für jeden analysierten Probanden (FISH-Analyse)

4.1.3 Prozentuales Vorkommen der Chromosomen 7, 8, 10 und 12 in den untersuchten Geweben

4.1.3.1 Blutlymphozyten

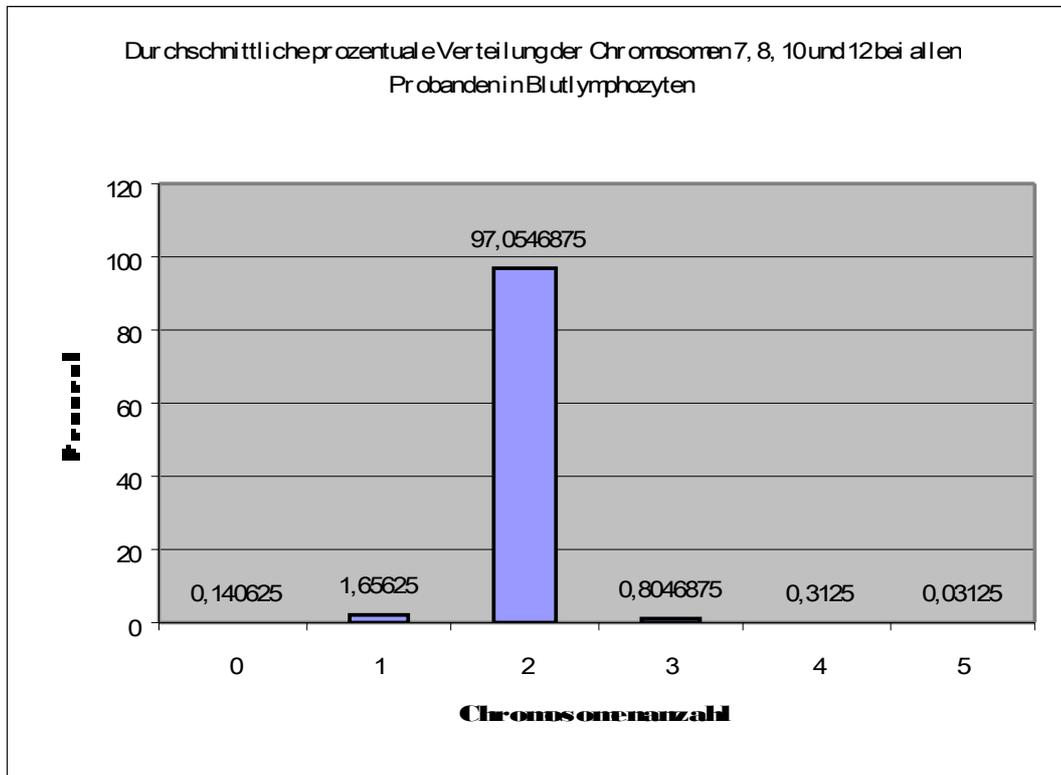


Diagramm 9: Durchschnittliche prozentuale Verteilung der Chromosomen 7, 8, 10 und 12 bei allen Probanden in Blutlymphozyten

4.1.3.2 Haarwurzelzellen

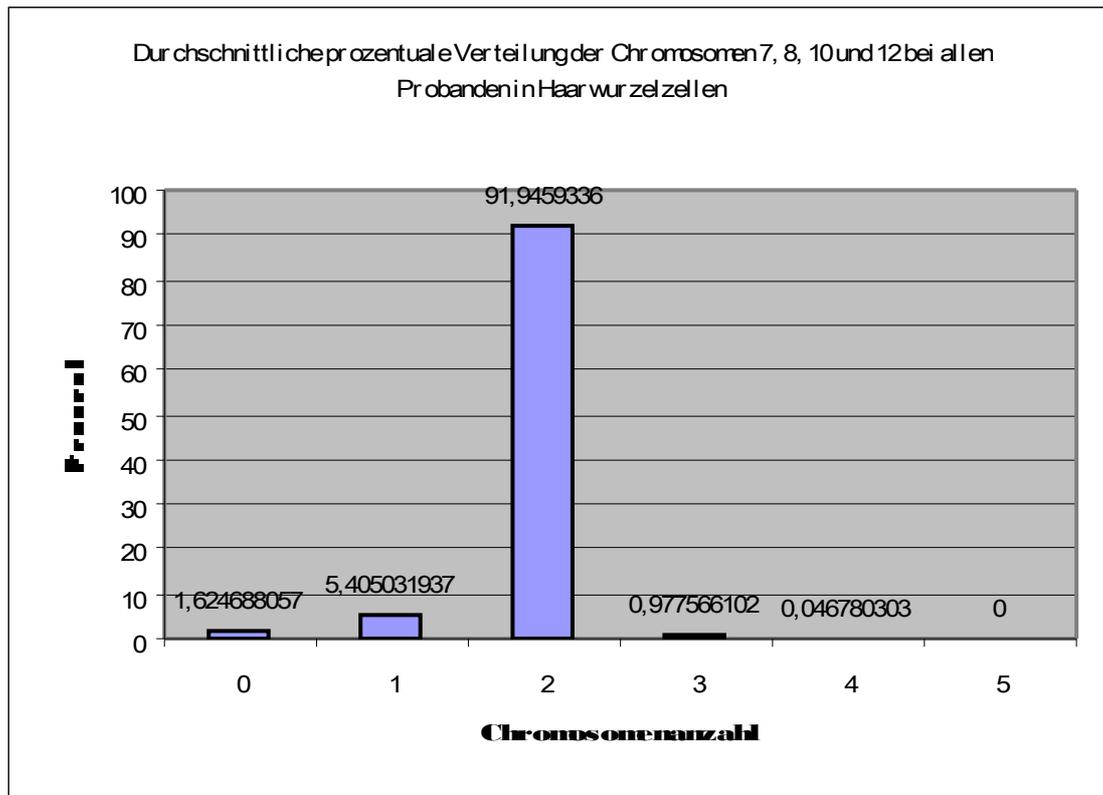


Diagramm 10: Durchschnittliche prozentuale Verteilung der Chromosomen 7, 8, 10 und 12 bei allen Probanden in Haarwurzelzellen

4.1.3.3 Mundschleinhautzellen

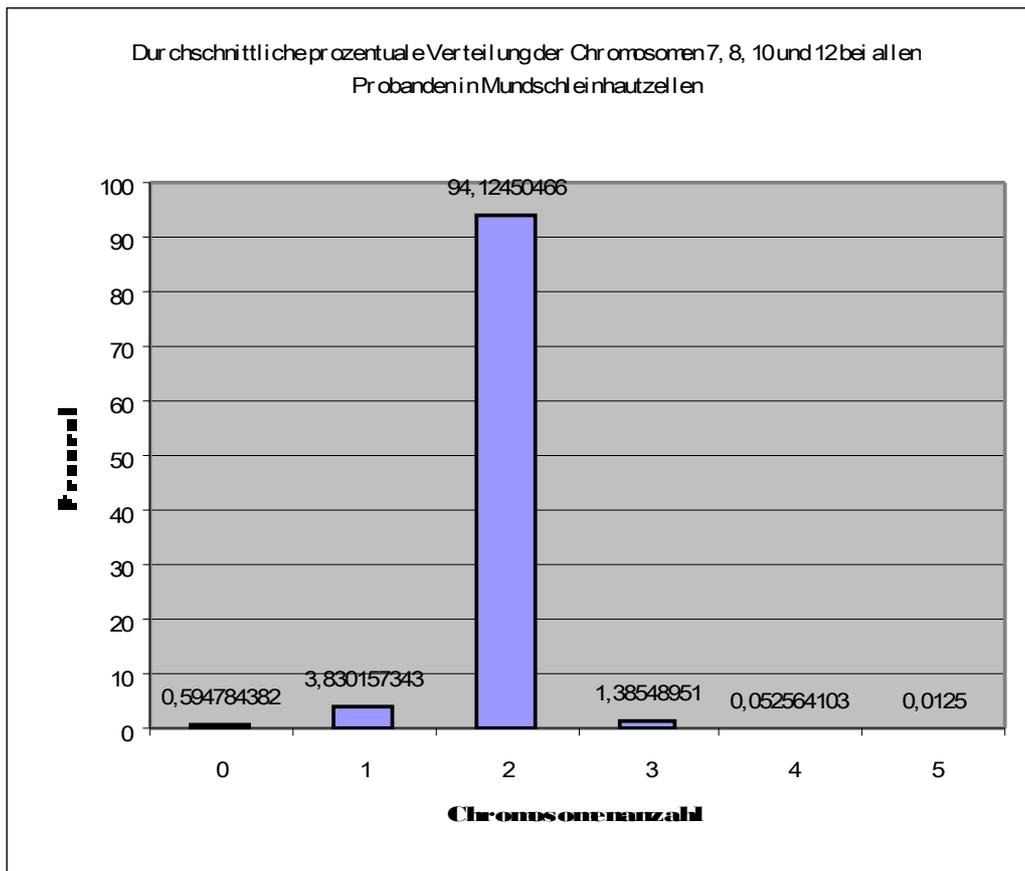


Diagramm 11: Durchschnittliche prozentuale Verteilung der Chromosomen 7, 8, 10 und 12 bei allen Probanden in Mundschleinhautzellen

Insgesamt ist bei allen durchgeführten FISH-Analysen im Mittelwert zu beobachten, dass in allen Geweben für alle untersuchten Chromosomen der mit Abstand größte Teil einen regelrechten disomen Chromosomensatz zeigt. Im Mittelwert waren bei keinem der untersuchten Gewebe relevante Trisomieraten der Chromosomen 7, 8, 10 und 12 zu beobachten.

4.1.4 Prozentuale Trisomie-Raten der Chromosomen 7, 8, 10 und 12 in den untersuchten Geweben

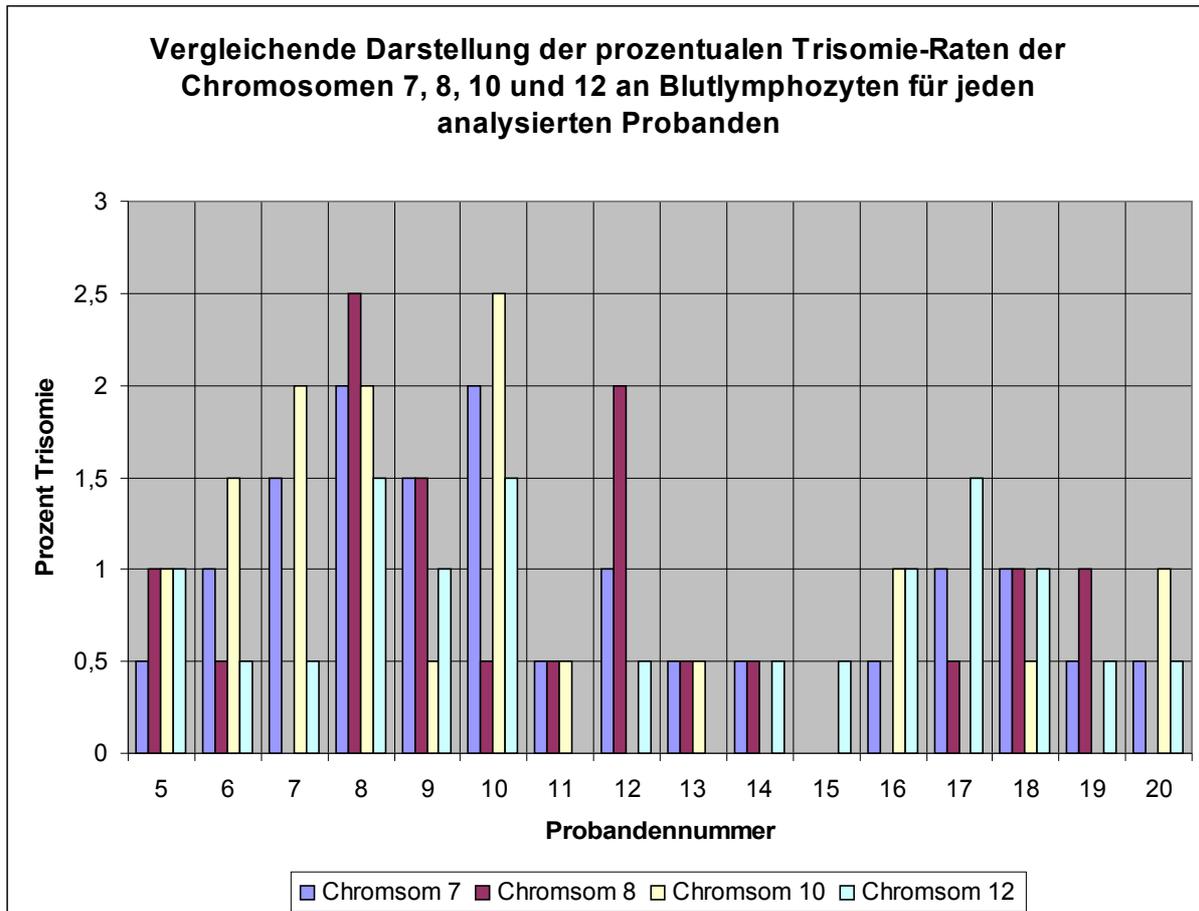


Diagramm 12: Vergleichende Darstellung der prozentualen Trisomie-Raten der Chromosomen 7, 8, 10 und 12 an Blutlymphozyten für jeden analysierten Probanden (FISH-Analyse)

Bezüglich der Trisomie-Raten zeigte sich in den Blutlymphozyten keine relevante Erhöhung eines Chromosoms. Insbesondere für Chromosom 7 war mit maximal zwei Prozent Trisomie keine Erhöhung über den Cut-off-Level festzustellen. Die höchsten Werte lagen bei 2,5 Prozent für Chromosom 8 bei Proband Nr. 8 und ebenfalls 2,5 Prozent für Chromosom 10 bei Proband Nr. 10.

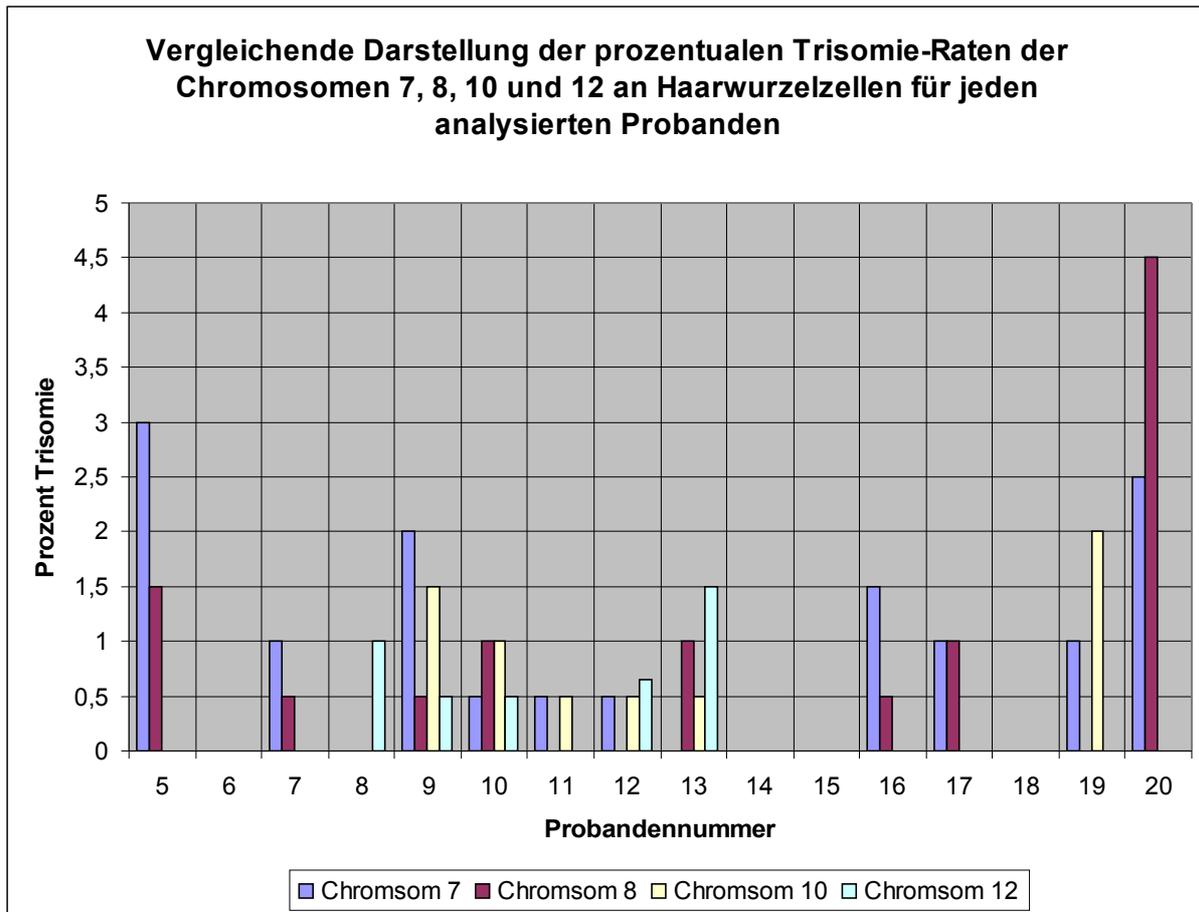


Diagramm 13: Vergleichende Darstellung der prozentualen Trisomie-Raten der Chromosomen 7, 8, 10 und 12 an Haarwurzelzellen für jeden analysierten Probanden (FISH-Analyse)

Bezüglich der Trisomie-Raten bei Haarwurzelzellen zeigten sich relevante Erhöhungen für Chromosom 7 bei Proband Nr. 5 auf 3 Prozent und Proband Nr. 20 auf 2 Prozent. Auffallend war die Erhöhung von Chromosom 8 auf 4,5 Prozent ebenfalls bei Proband Nr. 20. Einschränkend muss hier gesehen werden, dass nicht alle Chromosomen bei allen Probanden ausgewertet werden konnten.

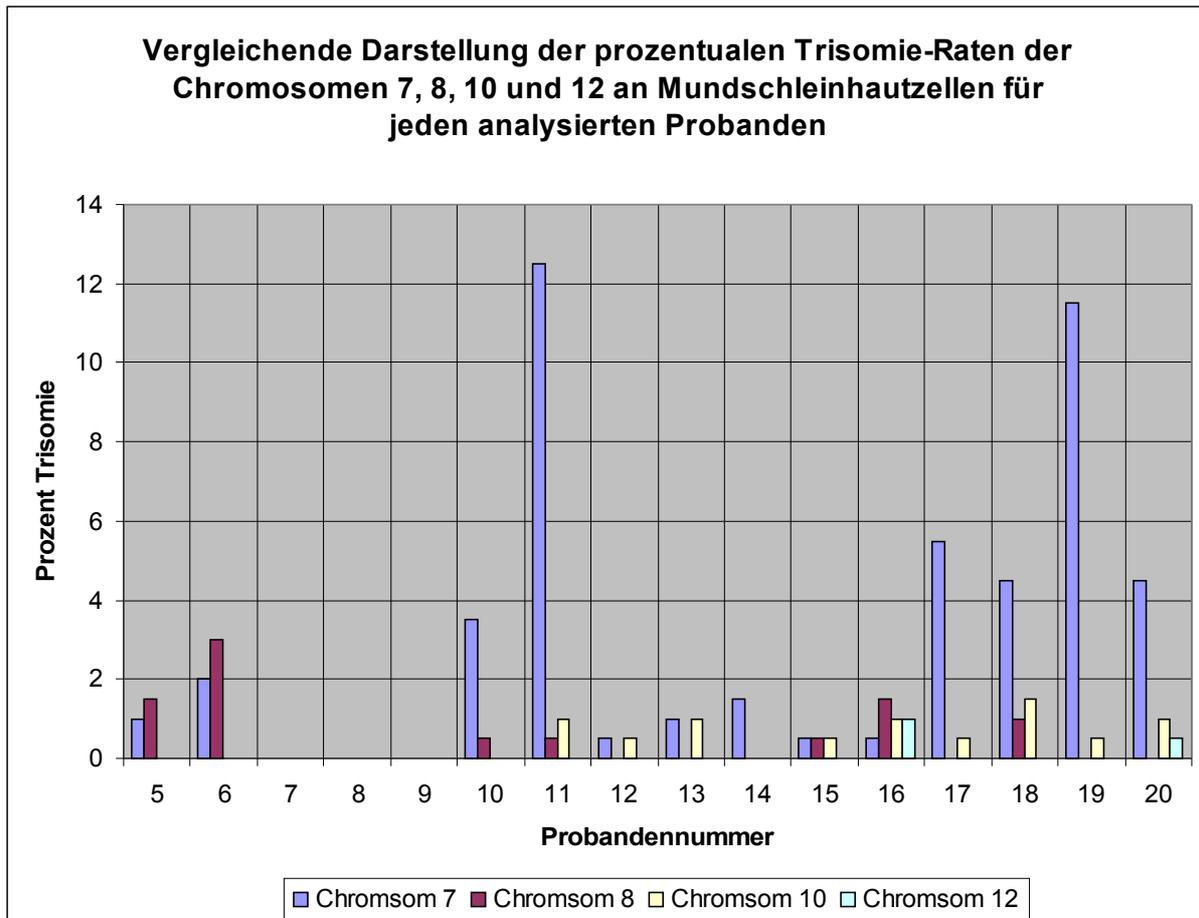


Diagramm 14: Vergleichende Darstellung der prozentualen Trisomie-Raten der Chromosomen 7, 8, 10 und 12 an Mundschleimhautzellen für jeden analysierten Probanden (FISH-Analyse)

Bezüglich der Trisomie-Raten zeigten sich in den Mundschleimhautzellen relevante Erhöhungen ausschließlich für die Chromosomen 7 und 8. Hierbei sahen wir bei Chromosom 8 nur einmal eine Erhöhung auf 3 Prozent bei Proband Nr. 6. Bezüglich des Chromosoms 7 waren allerdings Erhöhungen bei mehreren Probanden auffällig: 3,5 Prozent bei Proband Nr. 10; 4,5 Prozent bei Proband Nr. 18 und 20; 5,5 Prozent bei Proband Nr. 17 und als herausragende Werte sahen wir bei Proband Nr. 19 11,5 Prozent und bei Proband Nr. 11 12,5 Prozent.

4.2 Ergebnisse der zytogenetischen Untersuchungen

Bei den von allen Probanden angefertigten Karyogrammen wurde eine Auswertung von 15 Metaphasen pro Proband angestrebt. Mit Ausnahme von 3 Probanden konnte diese Anzahl überall erreicht werden. Bei den betroffenen drei Probanden konnte aufgrund von Präparationsproblemen nur eine Auswertung von 3 bis 6 Metaphasen erfolgen.

Ein in allen Metaphasen komplett unauffälliger Karyotyp konnte nur bei drei Probanden festgestellt werden. Hierbei handelte es sich allerdings um diejenigen Probanden, bei welchen nur 3 bis 6 Metaphasen ausgezählt werden konnten.

Bei 15 von 16 Probanden fanden wir einen basal unauffälligen Karyotyp mit Grundmuster 46,XX oder 46,XY.



Abbildung 16: normale Metaphase

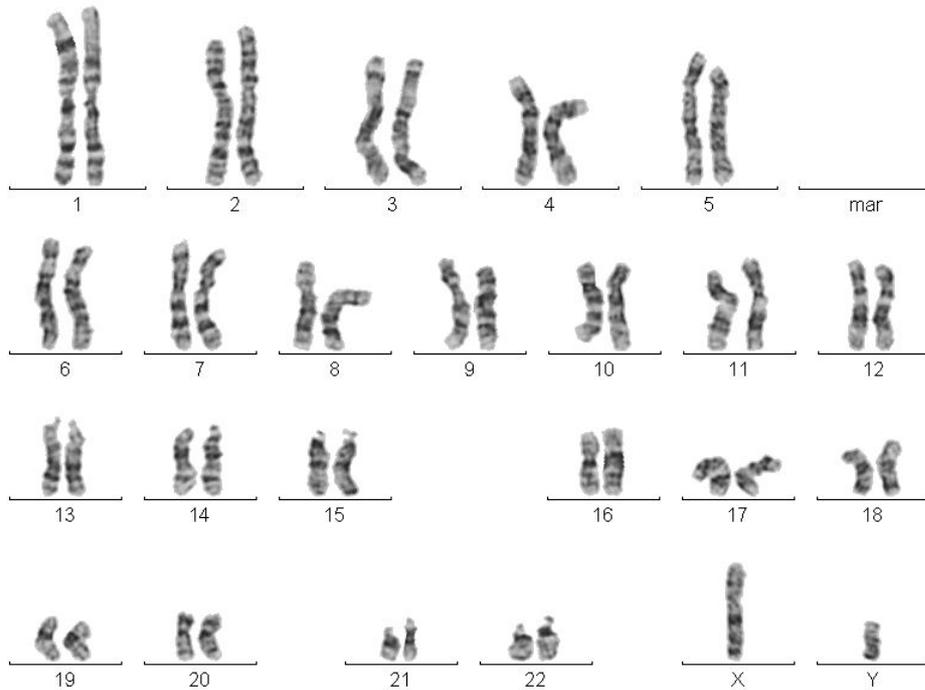


Abbildung 17: normaler männlicher Karyotyp: 46,XY

Bei einem Probanden (Proband Nr. 19) wurde als konstitutionelle strukturelle Chromosomenanomalie eine Inversion am Chromosom Nr. 6 festgestellt: $\text{inv}(6)(\text{p}22;\text{q}22)$.

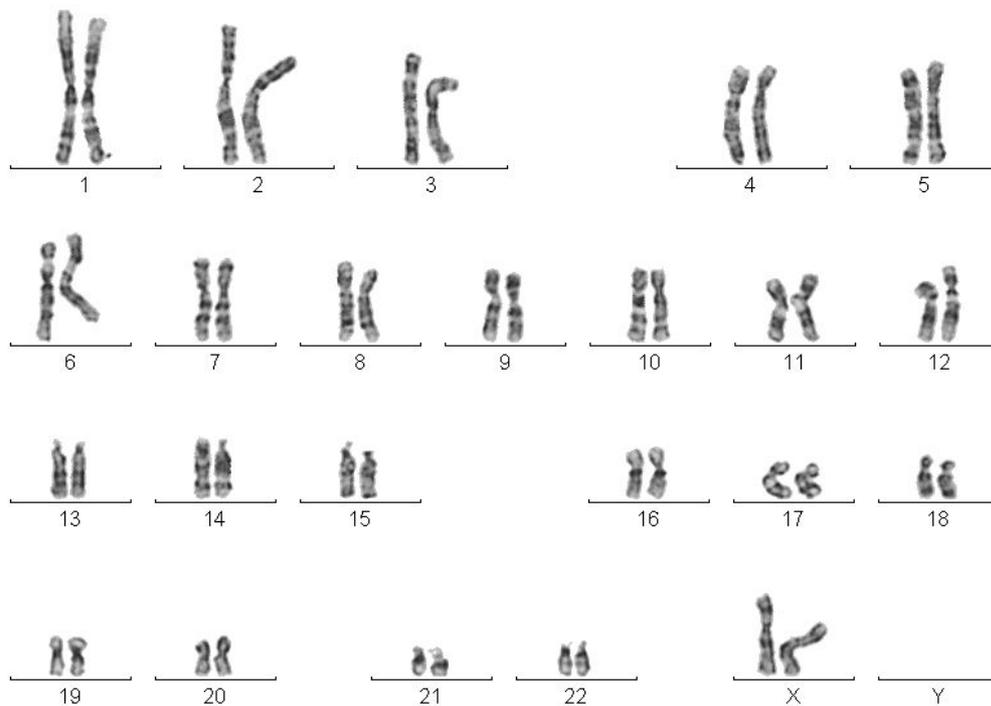


Abbildung 18: Weiblicher Karyotyp mit einer durchgehenden Inversion 6: 46,XX,inv6

Als wiederholte Beobachtung fanden wir Zugewinne und Verluste der Geschlechtschromosomen bei insgesamt neun Probanden, was als typisches altersassoziiertes zytogenetisches Phänomen bekannt ist. Hierbei sahen wir fünfmal den Zugewinn jeweils eines X-Chromosoms in je einer Mitose pro betroffenem Proband; bei sechs Probanden wurde der Verlust eines X-Chromosoms beobachtet (in vier Fällen nur eine betroffene Mitose, in einem Fall zwei betroffenen Mitosen, in einem Fall Verlust beider X-Chromosomen bei Auftreten mehrerer kleinerer Markerchromosomen). Den Verlust des Y-Chromosoms sahen wir nur bei einem Probanden in einer Mitose.

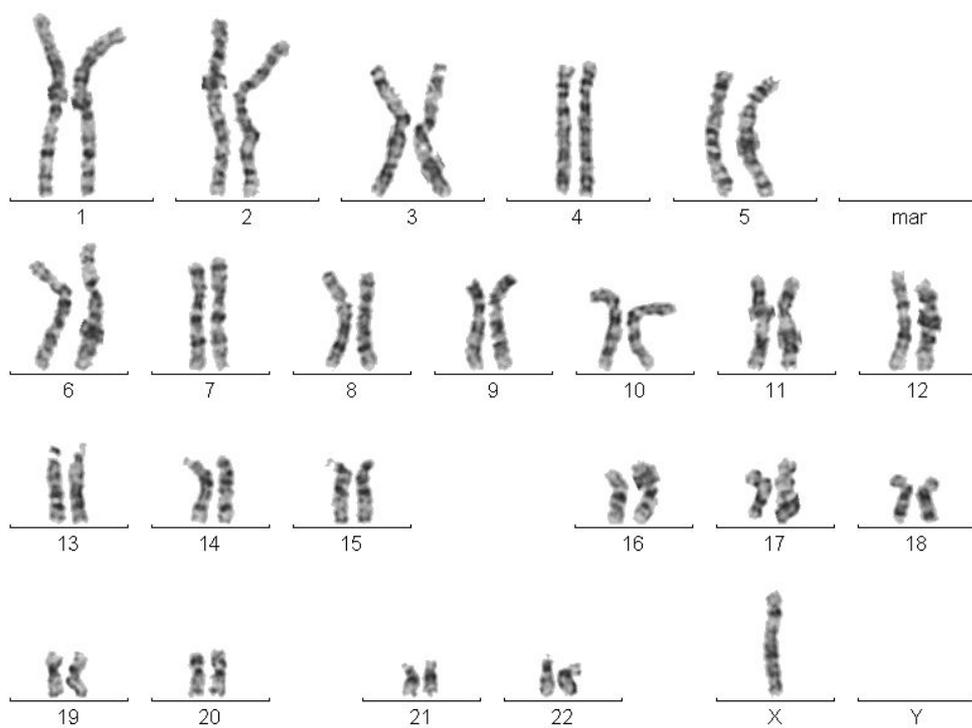


Abbildung 19: Verlust eines X-Chromosoms: 45,X-X

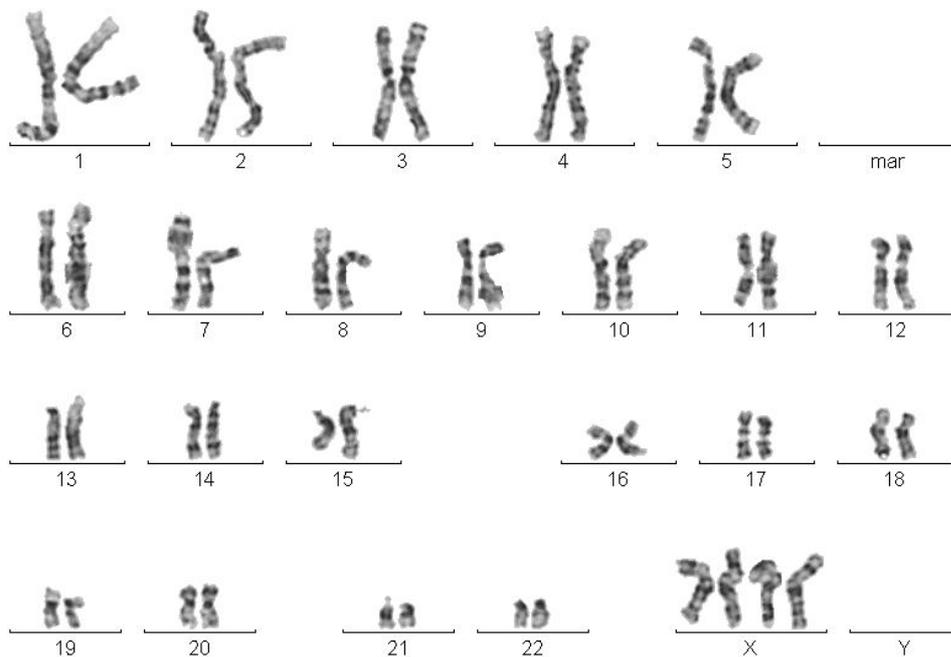


Abbildung 20: Zugewinn von zwei X-Chromosomen: 48,XXXX

Eine Trisomie 7 oder 8 wurde weder als einzelzellige noch als klonale Veränderung festgestellt. Abgesehen von der Inversion 6 bei Proband Nr. 19 wurde auch keine sonstige klonale Veränderung von Autosomen nachgewiesen.

Darüber hinaus wurde eine Reihe numerischer oder struktureller chromosomaler Veränderungen als nicht wiederholte Einzelbefunde in jeweils nur einer Zelle gesehen. Dies waren im Einzelnen:

Inversion 18q in einer Mitose und Zugewinn von Chromosom 21 in einer Mitose bei Proband Nr. 7; Deletion von Chromosom 4 und 10 in je einer Mitose bei Proband Nr. 9; Zugewinn von Chromosom 2 in einer Mitose bei Proband Nr. 10; Zugewinn von Chromosom 21 und Verlust von Chromosom 8 und 9 in je einer Mitose bei Proband 11; Verlust von Chromosom 21 bei einer Mitose bei Proband Nr. 13; 46,XX,der(1p),der(10),der(11p) bei Proband Nr. 15; fragliche Translokation t(1q;19p) bei Proband Nr. 16; Verlust von Chromosom 14, 21 und X in je einer Mitose und Zugewinn von Chromosom 22 in 2 Mitosen bei Proband Nr. 17; Verlust von 9q und Translokationen t(2;12)(q11;q11) und t(2;18),(p25;q21) in je einer Mitose bei Proband Nr. 18; Verlust von Chromosom X und Zugewinn von Chromosom X und Translokation t(6;7)(q23;q36) in je einer Mitose bei Proband Nr. 20.

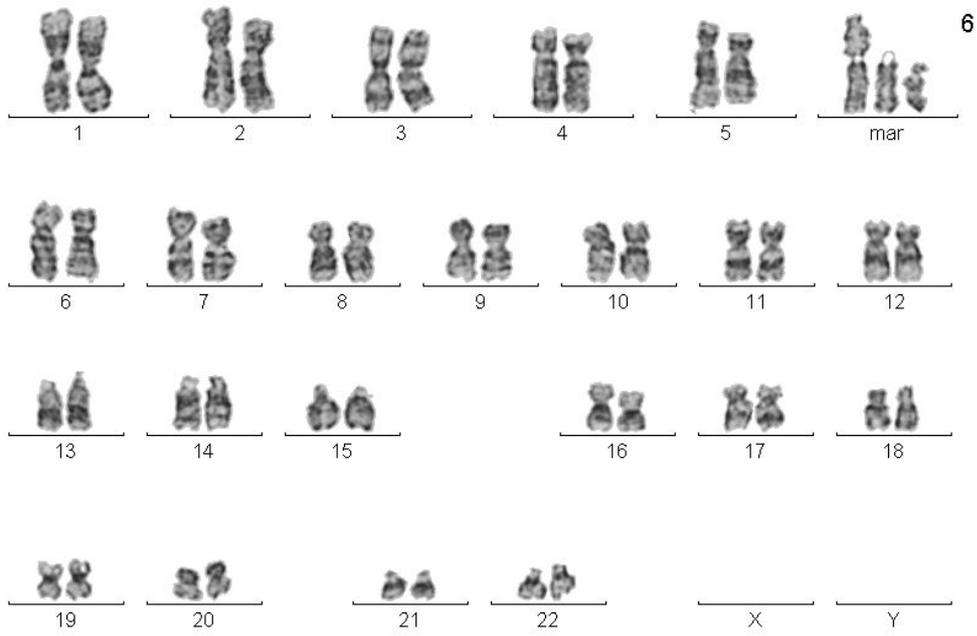


Abbildung 21: Strukturelle Abberation

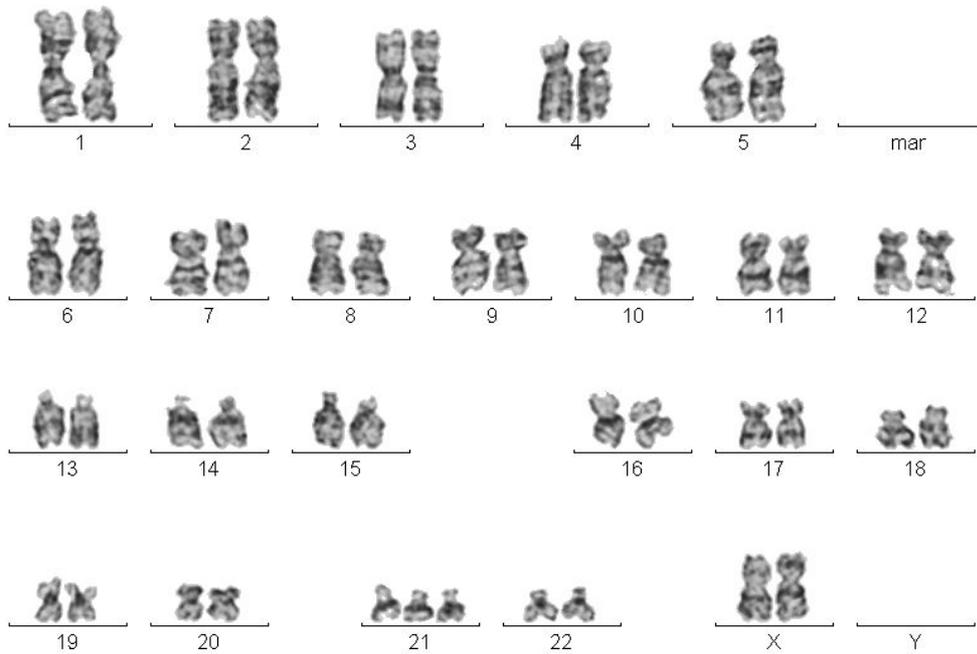


Abbildung 22: Zugewinn von Chromosom 21: 47,XX+21

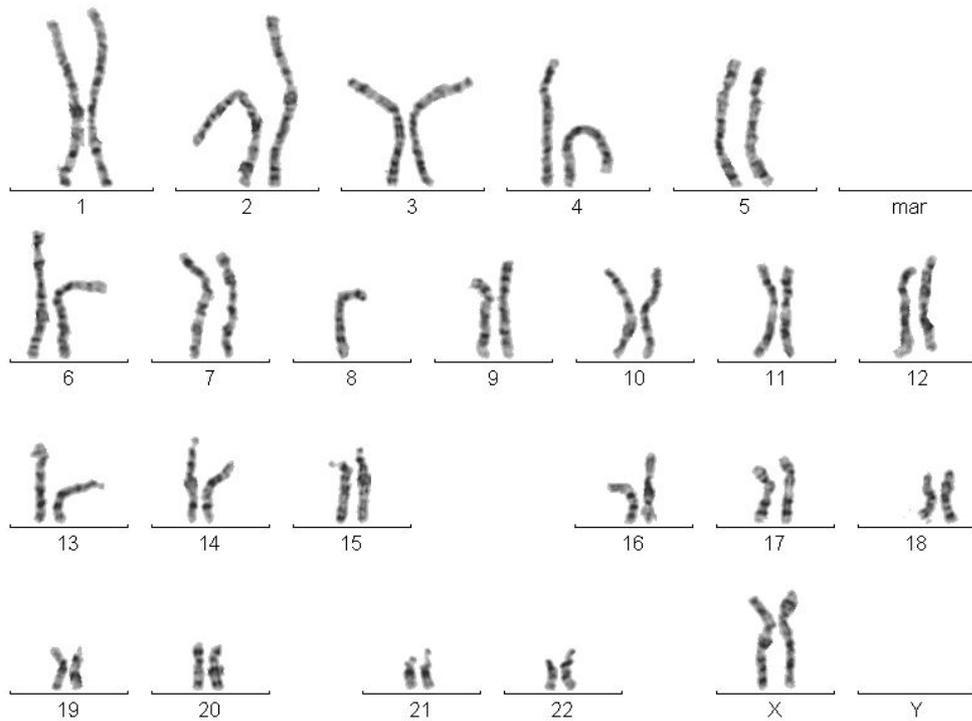


Abbildung 23: Verlust von Chromosom 8: 45,XX-8

Eine durchgehende Abweichung des Karyotyps in allen ausgezählten Metaphasen zeigte sich nur in einem einzigen Fall: Bei Proband 19 sahen wir eine Inversion des Chromosoms 6 mit dem Karyotyp 46,XX,inv(6)(p22;q22),1qh+. Bei einem einzelnen Zellkern dieses Probanden fand sich der angegebene Karyotyp in Kombination mit dem Verlust eines X-Chromosoms (45,X,inv(6),(p22;q22),1qh+).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass wir eine durchgehende Trisomie 7 oder 8 nicht einmal gefunden haben.

Die detaillierte Auflistung der zytogenetischen Ergebnisse ist für die einzelnen Probanden im Anhang aufgelistet.

5 Diskussion

5.1 Aussagekraft der gewählten Untersuchungsmethode

Aufgrund des Untersuchungsmaterials, das auch Haarwurzeln und Mundschleimhautzellen beinhaltet, musste eine Methode gewählt werden, welche die Untersuchung an Interphasekernen ermöglicht. Die einzige Methode, die aktuell am Interphasekern die gezielte Darstellung von einzelnen Chromosomen möglich macht, ist die Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH).

Der Nachteil dieser Methode besteht darin, dass es sich hier nur um einen indirekten Nachweis der Chromosomen über die Auszählung farblicher Markierungen handelt. Das Chromosom selbst kann nicht direkt sichtbar gemacht werden. Die Bewertung der Chromosomenanzahl erfolgt entsprechend indirekt durch die Erfassung von Chromosomenspezifischen Hybridisierungssignalen. Grundsätzlich ist hier eine Abweichung von der tatsächlichen Chromosomenzahl möglich; zum Einen durch Fehlinterpretation von Hybridisierungssignalen z.B. bei sog. Split spots, unspezifischer Sondenbindung bzw. Kreuzhybridisierung, zum Anderen durch ineffiziente Hybridisierung mit mangelhafter Nachweissicherheit. Um entsprechende Abweichungen möglichst gering zu halten oder weitgehend auszuschließen, wurde jeweils eine Cohybridisierung mit Sondenmolekülen für ein weiteres Chromosom als interne Kontrolle durchgeführt. Hierdurch konnte im Vergleich sowohl die Hybridisierungseffizienz überprüft sowie ein möglicher Untersucher-Bias durch Fehlinterpretation minimiert werden. Als entsprechende Kontrollchromosomen wurden hierbei andere C-Gruppen-Chromosomen verwendet, für welche numerische Abweichungen in normalen Geweben bislang nicht beschrieben waren. In Einzelfällen mußte allerdings aus Materialbeschränkung auf eine Cohybridisierung der Chromosomen 7 und 8 zurückgegriffen werden (für beide Chromosomen ist eine somatische Zugewinn in bestimmten Geweben beschrieben); eine relevante Trisomie von Chromosom 8 wurde allerdings nicht beobachtet, so dass auch in diesen Fällen die interne Kontrolle für Chromosom 7 als aussagekräftig gewertet werden kann. Durch die direkte interne Kontrolle konnte gezeigt werden, dass in den relevanten Fällen tatsächlich ausschließlich das Chromosom 7 vermehrt war. Ein weiterer Vorteil besteht in der Möglichkeit mit relativ geringem Aufwand eine hohe Zahl von Zellkernen auszuwerten zu können. So wurde in unserer Untersuchung eine Zahl von 200 Zellkernen pro Fall und Gewebe angestrebt.

In unserer Untersuchung beobachteten wir in allen untersuchten Geweben insgesamt eine gute Hybridisierungseffizienz. Diese zeigte sich darin, dass bei nahezu allen Fällen und Geweben der Anteil von Zellen mit weniger als zwei Signalen (der hypothetischen Annahme des Normalzustandes entsprechend) bzw. von Zellen ohne Signale sehr gering war (160 von insgesamt 3042 ausgewerteten Signalen).

Als weitere Kontrolle erbrachte die Analyse der konventionellen zytogenetischen Befunde der Blutlymphozyten - bei zwar geringerer Zellzahl (ca. 12-15 Mitosezellen) - für Chromosom 7 und 8 keine relevante Abweichung von den erhobenen FISH-Ergebnissen in der Anzahl der ausgewerteten Chromosomen.

Insgesamt ist daher die hier angewandte Fluoreszenz in situ Hybridisierung als Methode der Wahl mit guter Aussagekraft für die gegebene Fragestellung anzusehen.

Aufgrund der beschriebenen Fehlermöglichkeiten der FISH-Analyse für numerische Fragestellungen wurde an Lymphozyten ein sog. Cut-off-level von 2% für FISH-Signale ermittelt; erst numerische Abweichungen in einem prozentualen Anteil von > 2% werden demnach als relevante Befunde gewertet. In Analogie hierzu wurden trotz der genannten guten Hybridisierungseffizienz in dieser Arbeit sowohl für Lymphozyten als auch für Haarwurzels- und Mundschleimhautzellen nur Trisomie-werte von >2% als relevant gewertet.

5.2 Bewertung der Ergebnisse

Eine somatische Trisomie 7 einzelner Zellen wird als zytogenetisches Phänomen in ganz unterschiedlichen Konstellationen beobachtet. Primär wurden Chromosom 7-trisome Zellen dabei in verschiedenen malignen oder benignen Tumoren beschrieben. Zunächst wurde hier eine tumorspezifische Bedeutung vermutet, zumal die Trisomie 7 zum Teil als charakteristisches Phänomen z.B. in Hirn- oder Nierentumoren bekannt ist. Die chromosomale Analyse an Zellen und Geweben auch im Rahmen anderer z.B. entzündlicher Erkrankungen (z.B. Synovialzellen bei rheumatoider Arthritis) konnte dagegen das Auftreten Chromosom 7-trisomer Zellen auch unabhängig von einer zugrunde liegenden proliferativen Erkrankung zeigen. Diese Beobachtung, insbesondere die einer Mosaik-Trisomie 7 auch in scheinbar völlig normalen Gewebekonstruktionen, stellte die primär angenommene Bedeutung der Mosaiktrisomie 7 als krankheitsspezifisch bzw. -assoziiert infrage. In Zusammenhang mit einem erhöhten Altersdurchschnitt von Patienten mit bestimmten Tumorerkrankungen erschien ein unter Umständen altersassoziiertes Auftreten von 7-trisomen Zellen möglich. Vor diesem Hintergrund erfolgte die zytogenetische und molekulargenetische Analyse verschiedener normaler Zellen bei sehr alten Individuen.

Das Auftreten einer Mosaiktrisomie 7 mit einer relevant erhöhten Trisomierate wurde in unserer Untersuchung ausschließlich in Mundschleimhautzellen gefunden. Dabei ließ sich nicht in jedem Probanden eine relevante Trisomie 7 (>2%) nachweisen, was bei Erfassung der durchschnittlichen Trisomie 7-Rate zu einem relativ geringen prozentualen Anstieg von lediglich 3,77 Prozent führte. Bei einzelnen Individuen konnten dagegen auffällige Werte von bis zu 12,5% dargestellt werden. Die Befunde belegen, dass eine somatische Trisomie von Chromosom 7 als krankheitsunabhängiges Phänomen in normalen Zellen auftreten kann. Die Beobachtung bezog sich studienbedingt auf ein Probandenkollektiv mit ausgesprochen hohem Altersdurchschnitt. Eine Altersassoziation der Trisomie 7 erscheint somit möglich. Zum Beleg eines tatsächlichen Altersbezuges sind Vergleichsuntersuchungen an Mundschleimhautzellen eines jungen Probandenkollektivs erforderlich. Eine successiv in der Arbeitsgruppe durchgeführte FISH-Studie an Mundschleimhautzellen jüngerer Individuen von ca. 20 bis maximal 50 Jahren zeigte ebenfalls in einzelnen Individuen eine Mosaiktrisomie 7, allerdings mit deutlich niedrigerem Anteil von maximal 6,5% in lediglich einem Fall. Unter Einbeziehung der dort erhobenen Befunde wird die These eines zumindest

quantitativ durch das Lebensalter beeinflussten Phänomens für die Mosaik-Trisomie 7 in Mundschleimhautzellen wahrscheinlich.

Das inkonstante Auftreten bei nur einzelnen Individuen ließe sich dabei durch unbekannte individuelle Einflussfaktoren erklären.

Zwar war bei den untersuchten Probanden keine wesentliche Grunderkrankung oder Tumorerkrankung bekannt; eine nicht erfasste unter Umständen lokale Störung im Bereich der Mundhöhle (z.B. Prothesendruck, z.B. Nikotinabusus) ist als möglicher Provokationsfaktor nicht ausgeschlossen.

Sowohl in Blutlymphozyten, als auch in Haarwurzeln konnte keine relevante bzw. signifikante Erhöhung der Trisomierate von Chromosom 7 nachgewiesen werden.

Auch bei Probanden mit deutlich erhöhter Trisomie 7-Rate in der Mundschleimhaut zeigte sich kein Anstieg der Trisomie-7-Rate in den beiden anderen Zelltypen. Insbesondere auch bei der konventionellen zytogenetischen Analyse an Blutzellen wurde eine Trisomie 7 - entgegen einer Vielzahl anderer Einzelzellbefunde - überhaupt nicht beobachtet. Das Auftreten von somatischer Trisomie 7 nur in bestimmten Zelltypen eines Individuums lässt als mögliche Erklärung eine Gewebespezifität annehmen.

Eine Chromosomen-Trisomie führt zum Ungleichgewicht in der Expression einer Vielzahl von Genen. Der Einfluss der abnormen Regulation ist häufig ungünstig, was sich durch die Störung der Embryonalentwicklung oder somatische Probleme bei konstitutionellen Trisomien zeigen lässt. Grundsätzlich können im Einzelfall entsprechende Veränderungen der Genexpression im Rahmen einer somatischen Trisomie allerdings für bestimmte Zelltypen normaler Gewebe auch von Vorteil sein. Bei zufälligem Auftreten einer solchen Trisomie wäre hier ein Überlebensvorteil und damit eine selektive Wachstumsbegünstigung möglich.

Das Chromosom 7 beherbergt eine Reihe von Genen, die in der Zellproliferation und Entzündungsvorgängen eine Rolle spielen; unter anderem sind z.B. die Gene für Hepatocyte-growth-factor-receptor (HGFR), platelet-derived-growth-factor (PDGF) alpha, epidermal-growth-factor-receptor (EGFR) oder Interleukin-6 (IL6) auf Chromosom 7 lokalisiert. Aus Untersuchungen an Abortgewebe bei konstitutioneller Trisomie 7 ließ sich eine gesteigerte zelluläre Proliferation und vermehrte DNA-Synthese zeigen. Für Zellen unterschiedlicher Differenzierung sind unterschiedliche zelluläre Leistungen und Gene erforderlich. Eine Trisomie 7 wurde zwar in einer Reihe ganz unterschiedlicher Tumore und Gewebetypen gefunden; es fällt allerdings auf, dass bei nicht-neoplastischen Erkrankungen überwiegend

mesenchymale Gewebe (z.B. Synovia) und hier vor allem in proliferativen Konstitutionen (z.B. atherosklerotische Plaquebildung, z.B. Dupuytren'sche Kontraktur, z.B. Synovialproliferation bei Rheuma) beschrieben wurden. Unter Umständen ist für diese Zell- oder Gewebetypen das Vorliegen einer Trisomie 7 günstig und verhilft betroffenen Zellen zum Wachstumsvorteil. Hierdurch kann eine primäre 7-trisome Zelllinie anteilmäßig gegenüber der normalen Zellpopulation sogar zunehmen. Dieses Phänomen könnte auch den in unserer Studie (bzw. Folgestudie) an Mundschleimhaut beobachteten Effekt einer relativen Zunahme von 7-trisomen Zellanteil mit zunehmendem Alter (= Populationsvermehrung) bei einzelnen Individuen erklären. In gleicher Weise ist eine selektive Vermehrung 7-trisomer Zellen im Rahmen einer entzündlichen Gewebeproliferation denkbar (Ermis et al. 651-54).

In analysierten Blutlymphozyten konnte eine Trisomie 7 weder in der zytogenetischen noch in der FISH-Analyse belegt werden. Blutzellen sind aufgrund der relativ einfachen Durchführbarkeit der zytogenetischen Analyse weltweit das zytogenetisch meistuntersuchte „Normalgewebe“; dennoch ist das Auftreten einer Mosaiktrisomie 7 im Blut normaler gesunder Individuen nicht bekannt. Die Entstehung einer Trisomie erfolgt überwiegend durch chromosomale Fehlverteilung in der Zellteilung. Hierbei ist die Entstehung jeweils einer trisomen und einer monosomen Zelle bezüglich des betroffenen Chromosoms zu fordern. Dennoch werden Trisomien und Monosomien in den betroffenen Geweben nicht immer in gleichen Teilen gefunden, was auf selektive Vorgänge zurückgeführt wird. Bei negativer Selektion kann eine Zelle absterben bzw. das Wachstum einstellen. Beim Myelodysplastischen Syndrom (MDS), einer prämaligen Veränderung der Blutbildungszellen, findet sich als charakteristische zytogenetische Veränderung nicht selten eine Monosomie 7; das Auftreten von Trisomie 7 dagegen nicht. Es ist somit möglich, dass 7-trisome Blutlymphozyten einer negativen Selektion ausgesetzt sind und daher nicht im Blut beobachtet werden. Die hier dargestellten Befunde lassen sich im Zusammenhang mit den geschilderten Überlegungen als weitere Belege einer Gewebespezifität der Trisomie 7 deuten.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass in der durchgeführten Studie eine gewebespezifische Trisomie 7 in Mundschleimhautzellen mit anscheinend starkem individualspezifischem Einfluss gefunden wurde. Der zu vermutende Altersbezug besteht unter Umständen aufgrund selektiver Begünstigung und vermehrter Proliferationstendenz nach dem Entstehen einer Trisomie 7.

6 Anhang

6.1 Protokolle in Stichpunkten

Für alle Protokolle gilt: Ohne angegebene Temperatur ist Raumtemperatur anzunehmen.

6.1.1 Mundschleimhautabstrich

- Mund mit Wasser spülen → ausspucken
- mit Holzspatel an der Wangeninnenseite mehrfach kräftig schaben
- auf gewaschene, fettfreie Objektträger ausstreichen
- antrocknen lassen
- Fixierung in Methanol, ⚡ eiskalt, · 10 min

6.1.2 Haarwurzelpräparation

- Haare nicht frisch gewaschen
- einzelne, möglichst dicke Haare am Scheitel auswählen und ausreißen
- Es sollte ein schöner weißer Balg am Haarenden zu sehen sein.
- Objektträger bereitlegen (gewaschen, fettfrei)
- Haare in 60% Essigsäure □ 2-3 min einweichen
- Haare einzeln über Objektträger streichen: Sie sollten eine erkennbare weißliche Bahn hinterlassen.
 - falls keine Spur sichtbar: Haar nochmals 1 min in Essigsäure legen, erneut ausstreichen
- antrocknen lassen
- Fixierung in Methanol, ⚡ eiskalt, · 10 min

6.1.3 Blutpräparation

- sterile Blutentnahme in Lithium-Heparin-Monovette
- Kulturansatz:
 - 0,8 ml Vollblut bei Frauen; 0,7 ml Vollblut bei Männern
 - 8 ml Medium: PB Max supplimentiert mit Phythämatoagglutinin + L-Glutamin + 10% FCS + 1% Penicillin/Streptomycin

-
- 72 h im Brutschrank bei \downarrow 37°C inkubieren (ohne CO₂-Begasung), täglich einmal schwenken.
- Abernten:
- 1) 40 μ l sterile Colcemidlösung zugeben, gut mischen
 - 2) \square 1 ½ Stunden Inkubation im Brutschrank \downarrow 37°C (ohne CO₂-Begasung)
 - 3) Medium-Blut-Gemisch in Zentrifugenröhrchen überführen
 - 4) \square 10 min bei 1000 U/min zentrifugieren (ohne Bremse)
 - 5) Überstand absaugen, verbleibendes Zellpellet in 8 ml 0,52% KCl (\downarrow 37°C) resuspendieren
 - 6) \square 4-10 min bei \downarrow 37°C inkubieren (witterungsabhängig)
 - 7) \square 10 min bei 1000 U/min zentrifugieren (ohne Bremse)
 - 8) KCl absaugen bis auf einen Rest von ca. 0,5 ml, Zellen darin resuspendieren
- 9) Suspension vorsichtig (zuerst nur tropfenweise) mit eisgekühlter Fixativ-Lösung überschichten und Zellen durch sanftes Resuspendieren mischen, insgesamt 8 ml Fixativ zugeben
- 10) \square 30 min bei \downarrow 4°C stehen lassen
 - 11) \square 10 min bei 1000 U/min zentrifugieren (ohne Bremse)
 - 12) Überstand absaugen, Pellet resuspendieren
- 13) Schritt 9 - 12 zwei mal wiederholen, dabei ist keine Wartezeit mehr nötig (Schritt 10 entfällt)
- 14) nach 3. Fixierschritt Zellsuspension auf gereinigte fettfreie (feuchte) Objektträger auftropfen, danach trocknen lassen
- 15) Objektträger beschriften
- 16) optische Kontrolle der fixierten, aufgetropften Lymphozyten im Phasenkontrastmikroskop
- 17) bei Objektträgern zur G-Bänderung: Metaphasealterung der Objektträger auf \downarrow 80°C Heizplatte für \square 1h; · über Nacht bei \downarrow 60°C im Wärmeschrank
- Lösungen:
- Fixativ: Methanol-Eisessig 3:1

60 ml Methanol + 20 ml Eisessig = 80 ml Fixativ

○ KCl 0,52%: $1\% = \frac{1\text{g}}{100\text{ml}}$

$\rightarrow 0,52\% = \frac{0,52\text{g}}{100\text{ml}}$

- Colcemid: fertige Lösung, Handelsname „Karyo Max®“ der Firma Life Technologies

6.1.4 G-Banden-Darstellung mit Trypsin (GTG-Bänderung)

benötigte Materialien:

- Färbeküvetten
- Pinzetten

benötigte Lösungen:

- 0,9% NaCl (9 g NaCl in 1000 ml A. dest.)
- 0,02% Trypsinlösung in 0,9% NaCl (37°C vorwärmen)
(1 ml Bacto-Trypsin in 70 ml 0,9% NaCl)
- 5%ige Giemsalösung:
 - 5 ml Giemsa
 - 30 ml Soerensen-Puffer
 - 65 ml A.dest. (filtrieren)
- Soerensen-Puffer:
 - Puffer₁: 5,935g Na₂HPO₄/500 ml A.dest.
 - Puffer₂: 4,536g KH₂PO₄/500 ml A.dest.

→ 233 ml Puffer₁ mit 267 ml Puffer₂ mischen.

Protokoll:

- 1) Objektträger mit aufgetropfter Zellsuspension 50-60 sec. in Trypsinlösung bei 37°C einstellen
- 2) Objektträger 2 x in 0,9% NaCl kurz schwenken
- 3) Objektträger für 5 min in einer 5%igen Giemsalösung färben
- 4) Objektträger 2 x kurz in Aqua dest. spülen und lufttrocknen lassen

- 5) Mikroskopieren
- 6) Eventuell Schritt 1-5 bei nicht zufriedenstellender Bänderung wiederholen, nachdem der Objektträger in absolutem Alkohol entfärbt und entölt wurde. Hierbei je nach Ergebnis der vorhergegangenen Färbung die Trypsin-Zeit variieren.

6.1.5 Nick-Translation

nach Arbeitsanweisung von Boehringer-Mannheim

verwendete Sonden:

- | | | | |
|---|-------------------|----------------------|------------------------|
| - | #7 Centromer-DNA | → Digoxigenin | Klon: pa771 |
| - | #8 Centromer-DNA | → Digoxigenin/Biotin | D8Z2 Klon: ATCC 59904 |
| - | #10 Centromer-DNA | → Biotin | D10Z1 Klon: ATCC 61396 |
| - | #12 Centromer-DNA | → Biotin | D12Z1 Klon: ATCC 61398 |

Konzentrationen der Sonden:

- | | | |
|------|-----------------------|-----------------|
| #7: | 840 µg/ml Stocklösung | → 1µg = 1,2 µl |
| #8: | 130 µg/ml Stocklösung | → 1µg = 7,7 µl |
| #10: | 318 µg/ml Stocklösung | → 1µg = 3,15 µl |
| #12: | 600 µg/ml Stocklösung | → 1µg = 1,7 µl |

Ansatz: Je 1 µg Sonde wird mit A. dest. steril auf 16 µl aufgefüllt. Dann werden je 4 µl Dig- bzw. Bio-Nick-Mix zugegeben.

- Dig-Nick #7:
 - 14,8 µl A. dest. steril
 - 1,2 µl DANN
 - 4 µl Dig-Nick-Mix

→ 20µl
- Dig-Nick #8:
 - 8,3 µl A. dest. steril
 - 7,7 µl DANN

-
- 4 μl Dig-Nick-Mix
→ 20 μl
 - Bio-Nick #8:
 - 8,3 μl A. dest. steril
 - 7,7 μl DNA
 - 4 μl Bio-Nick-Mix
 - 20 μl
 - Bio-Nick #10:
 - 12,85 μl A. dest. steril
 - 3,15 μl DANN
 - 4 μl Bio-Nick-Mix
 - 20 μl
 - Bio-Nick #12
 - 14,3 μl A. dest. steril
 - 1,7 μl DANN
 - 4 μl Bio-Nick-Mix
 - 20 μl
 - Enzyme auf Eis pipettieren, mischen, ↓ 15°C □ 90 min (Kühlwasserbad)
 - Reaktionsstop: □ 10 min in ↓ 65°C Wasserbad
 - Fällungsreaktion (Enzyminaktivierung): je Tube 20 μl Lösung mit 1 μg DNA
 - 1 μl COT1-DNA zugeben, Konz. 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
+ 1 μl Heringssperma-DNA, Konz. 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
→ 22 μl
 - 1/10 des Volumens V (V=22 μl) 3M Natriumacetat pH 5,2 zugeben = 2,2 μl
 - + 2,2 x des resultierenden Volumens V_r ($V_r=24,2$ μl) 96% Ethanol, ↓ -20°C vorgekühlt = 53,24 μl
 - bei ↓ -20°C □ über Nacht (mind. 2h)
-

nächster Tag:

- zentrifugieren in Kühlzentrifuge, 13.000 Umdrehungen/min, ↓ 4°C, □ 15 min
(vorkühlen bei 400 Umdrehungen/min, ca. 10 min)
→ DNA-Pellet
- Überstand ausrinnen lassen
- Waschen mit 200-300 µl 70% Ethanol pro Tube, ↓ -20°C vorgekühlt
- zentrifugieren in Kühlzentrifuge, □ 5 min, 4°C, 13.000 Umdrehungen/min
- vorsichtig dekantieren (abgießen)
- Pellet trocknen:
 - in Speed-vac (Vakuum-Zentrifuge), □ 10 min
 - oder: stehend bei ↓ 37°C im Wärmeschrank: umgekehrt stehen lassen →
Tropfen kann nicht zurücklaufen
- resuspendieren in 50 µl A. dest. steril

→ Endkonzentration der markierten Stocklösung: $20 \frac{ng}{\mu l}$

6.1.6 Dot Blot

Zum Test selbst markierter Sonden

$$c_{(\text{Sonde})} = 20 \text{ ng}/\mu\text{l}$$

- Verdünnungsreihe:
 - Man gibt auf Parafilm 6 Spots mit jeweils 9µl 6 x SSC.
 - Zu dem ersten Spot gibt man 1 µl Sonden-DNA und vermischt ihn.
 - Aus dem gemischten Spot wird jeweils 1 µl entnommen, in den nächsten Spot eingebracht und gemischt.
- Verdünnung der Spots:

2ng	200pg	20pg	2pg	200fg	20fg
-----	-------	------	-----	-------	------
- Nitrocellulosemembran 10 min in 6 x SSC in einer Küvette
- Membran zum Trocknen auf 3-lagiges Whatman-Papier ablegen.

- Auf die trockene Membran werden die Verdünnungsreihen der Sonden-DNA aufpipettiert.
Achtung: Eine Ecke der Membran kennzeichnen zur Lagekontrolle der Spots.
- DNA einziehen lassen.
- Membran für wenige Sekunden in den Cross-linker legen.
- Membran-Blockung:
 - in Dig1-Puffer + 1 % Magermilch
- Inkubation:
 - je nach Markierung der Sonden (Digoxigenin oder Biotin):
 - Dig → anti-Dig/alkalische Phosphatase 1:1000 in Dig1-Puffer
 - Bio → Avidin/ alkalische Phosphatase 1:1000 in Dig1-Puffer
 (jeweils ~ 3 ml Antikörperlösung herstellen: 3 µ Antikörper + 2,997 µl Dig1-Puffer)
 - 30 min
- 2 x 5 min mit Dig1-Puffer waschen
- 5 min Dig3-Puffer zum Äquilibrieren
- Färbung:
 - frisch ansetzen in abgedunkelten Bluecaps
 - 5,7 ml Dig3-Puffer
 - 33µl NBT
 - 25 µl BCIP
 - färben im Dunkeln, maximal 30 min

6.1.7 FISH-Hybridisierung für Lymphozyten

für 4-6 Objektträger

- Spülen mit 2 x SSC ⚗ Raumtemperatur □ 1-2 min



Pause möglich

- aufsteigende Ethanol-Reihe: 70% 90% 100% (in Küvette)
 - ⚗ Raumtemperatur oder 4°C, · je 2 min
- Objektträger trocknen (stehend auf Papier)



Pause möglich

- Denaturierungslösung: 100 µl pro Objektträger: 70% Formamid, 2 x SSC

Endkonzentration

→ chemische Denaturierung

blasenfrei mit Deckglas abdecken

HANDSCHUHE!!!

- □ 2 min ↓ 80°C Heizplatte □□ Zeitfaktor wichtig!

HANDSCHUHE!!!

- aufsteigende Ethanol-Reihe: 70% 90% 100% ↓ eiskalt!/-20°C

□ je 2 min

- trocknen



Pause möglich

- Hybridisierungsmix ansetzen: 10 µl pro Objektträger bzw. pro Spot

HANDSCHUHE!!! wegen DNase

(Zutaten 10 min vor Ansetzen aus Eisschrank nehmen!)

- 7 µl Mastermix: etwas erwärmen (Hand), gut mischen (enthält Dextransulfat)
enthält Formamid 50% (Endkonzentration)
- 1 µl Block-DNA:
 - 0,5 µl Heringssperma-DNA, c = 10 mg/ml
 - 0,5 µl humane COT1-DNA (repeat-DNA) c = 10 mg/ml
- 1 µl #7 (dig)
- 1 µl #10 (bio) #7 und #8 werden zuletzt zugegeben, wegen möglicher Verschmutzung der Stock-DNA. (immer neue Spitze!)
- Wasserbad ↓ >75°C □ 5 min im Schwimmer
- Sonde auftragen, 10 µl pro Spot, mit ½ Deckglas eindecken, mit Fixogum abdichten
- □ mind. 7h in Hybridisierungskammer ↓ 37°C im Brutschrank (oder über Nacht)

6.1.8 FISH-Hybridisierung für Haarwurzelzellen

(mit Pepsinverdau)

für 4-6 Objektträger

- 2 x SSC ↓ 37°C □30 min
- Pepsinverdau:

- 100 ml 0,01N HCl:
 - 1 ml 1N HC
 - 99 ml Aqua dest.
 - 50 µl 10% Pepsin (Stocklösung)
 → Endkonzentration: 0,005% Pepsin in 0,01 N HCl
 ⚗ 37°C (=Körpertemperatur) □15 min (Lösung vorwärmen)

- □5 min 1 x PBS
- Postfix in 0,1% FA/1 x PBS □10 min Raumtemperatur
- 1 x PBS □ 5 min Raumtemperatur
- Objektträger trocknen (stehend auf Papier)



Pause möglich

- Denaturierungslösung: 100 µl pro Objektträger: 70% Formamid, 2 x SSC
Endkonzentration
blasenfrei mit Deckglas abdecken
HANDSCHUHE!!!
- □ 2 min ⚗ 80°C Heizplatte
HANDSCHUHE!!! □ Zeitfaktor wichtig!
- aufsteigende Ethanol-Reihe: 70% 90% 100% ⚗ eiskalt!/-20°C
□ je 2 min
- trocknen



Pause möglich

- Hybridisierungsmix ansetzen: 10 µl pro Objektträger bzw. pro Spot
HANDSCHUHE!!! wegen DNase
(Zutaten 10 min vor Ansetzen aus Eisschrank nehmen!)
 - 7 µl Mastermix 2.1: etwas erwärmen (Hand), gut mischen (enthält Dextransulfat), enthält Formamid 50% (Endkonzentration)
 - 1 µl Block-DNA:
 - 0,5 µl Heringssperma-DNA, Konz. 10mg/ml
 - 0,5 µl humane COT1-DNA (repeat-DNA), Konz. 10mg/ml
 - 1 µl #7 (dig)

- 1 µl #10 (bio) #7 und #8 werden zuletzt zugegeben (immer neue Spitze!)
- Wasserbad $\uparrow > 75^{\circ}\text{C}$ \square 5 min im Schwimmer
- Sonde auftragen, 10 µl pro Spot, mit 1/2 Deckglas eindecken, mit Fixogum abdichten
- \square mind. 7h in Hybridisierungskammer $\uparrow 37^{\circ}\text{C}$ im Brutschrank (oder über Nacht)

6.1.9 FISH-Hybridisierung für Mundschleimhaut

(mit Pepsinverdau)

für 4-6 Objektträger

- 2 x SSC $\uparrow 37^{\circ}\text{C}$ \square 30 min
- Pepsinverdau:
 - 100 ml 0,01N HCl:
 - 1 ml 1N HCl
 - 99 ml Aqua dest.
 - 50 µl 10% Pepsin (Stocklösung)
 - Endkonzentration: 0,005% Pepsin in 0,01 N HCl
 - $\uparrow 37^{\circ}\text{C}$ (=Körpertemperatur) \square 25 min (Lösung vorwärmen)
- \square 5 min 1 x PBS
- Postfix in 0,1% FA/1 x PBS \square 10 min Raumtemperatur
- 1 x PBS \square 5 min Raumtemperatur
- Objektträger trocknen (stehend auf Papier)



Pause möglich

- Denaturierungslösung: 100 µl pro Objektträger: 70% Formamid, 2 x SSC
Endkonzentration
blasenfrei mit Deckglas abdecken
HANDSCHUHE!!!
- \square 2' $\uparrow 80^{\circ}\text{C}$ Heizplatte \square
HANDSCHUHE!!! Zeitfaktor wichtig!
- aufsteigende Ethanol-Reihe: 70% 90% 100% \uparrow eiskalt!/-20°C
 \square je 2 min

- trocknen



Pause möglich

- Hybridisierungsmix ansetzen: 10 µl pro Objektträger bzw. pro Spot
HANDSCHUHE!!! wegen DNase
(Zutaten 10 min vor Ansetzen aus Eisschrank nehmen!)
 - 7 µl Mastermix: etwas erwärmen (Hand), gut mischen (enthält Dextransulfat), enthält Formamid: 50% (Endkonzentration)
 - 1 µl Block-DNA:
 - 0,5 µl Heringssperma-DNA, Konz. 10mg/ml
 - 0,5 µl humane COT1-DNA (repeat-DNA), Konz. 10mg/ml
 - 1 µl #7 (dig)
 - 1 µl #10(bio) #7 und #8 werden zuletzt zugegeben (immer neue Spitze!)
- Wasserbad ⤵ > 75°C □ 5 min im Schwimmer
- Sonde auftragen, 10 µl pro Spot, mit 1/2 Deckglas eindecken, mit Fixogum abdichten
- □ mind. 7h in Hybridisierungskammer ⤵ 37°C im Brutschrank (oder über Nacht)

6.1.10 Stringente Waschung und Detektion nach FISH

(für Lymphozyten, Haarwurzelzellen und Mundschleimhauzellen)

- Fixogum von Objektträger abziehen, Deckglas in 2 x SSC ablösen
- □ 2 x 20 min in 50% FA / 2 x SSC ⤵ 42°C (I,II)
- □ 2 x 10 min in 2 x SSC / 0,1% Tween ⤵ 42°C
- □ 1-2 min in 4 x SSC / 0,1% Tween ⤵ Raumtemperatur
- Unterfläche abwischen, nicht trocknen lassen
- □ 15 min 100 µl/Objektträger 4 x SSC / 3% BSA, mit Folie abdecken, 37°C im Brutschrank, Hybridisierungskammer
- auf Papier abrinnen lassen, nicht trocknen, direkt mit Detektionsansatz überschichten

DUNKEL ARBEITEN !!!

- Detektionsagens ansetzen (dig + bio):

- 50 µl Avidin/FITC: Stocklösung: $2 \frac{mg}{ml}$ → 1:400 verdünnen

für 500 µl Ansatz:

- 1,25 µl Stock-Avidin/FITC
- 500 µl 4 x SSC / Tween / 1% BSA

- 50 µl α-Dig/cy3: Stocklösung: $2 \frac{mg}{ml}$ → 1:400 verdünnen

für 500 µl Ansatz:

- 1,25 µl Stock-αDig/cy3
- 500 µl 4 x SSC / Tween / 1% BSA

- pro Objektträger 100 µl mit Folie abdecken, □ 30-60 min bei ↓ 37°C in der Hybridisierungskammer, Brutschrank
 - □ 3 x 5 min in 4 x SSC ↓ 37°C
 - □ 1-2 min A. dest.
 - lufttrocknen
 - Eindecken mit DAPI/Antifade, 20 µl pro Objektträger
 - □ mind. 30 min bei ↓ 4°C, dunkel (Objektträger-Mappe)
- fertig zum Anschauen

6.2 Ergebnisse der zytogenetischen Analyse (detaillierte Aufführung)

Proband 5		
Karyotyp	Anzahl	Prozent
46,XX	3	100
Metaphasen gesamt	3	
Proband 6		
Karyotyp	Anzahl	Prozent
46,XX	6	100
Metaphasen gesamt	6	
Proband 7		
Karyotyp	Anzahl	Prozent
46,XX	12	80
48,XXXX	1	6,66666667
46,XX, inv(18q)	1	6,66666667
47,XX,+21	1	6,66666667
Metaphasen gesamt	15	
Proband 8		
Karyotyp	Anzahl	Prozent
46,XX	13	86,6666667
45,X0	1	6,66666667
47,XXX	1	6,66666667
Metaphasen gesamt	15	
Proband 9		
Karyotyp	Anzahl	Prozent
46,XX	12	80
45,XX,-10	1	6,66666667
45,XX,-4	1	6,66666667
47,XXX	1	6,66666667
Metaphasen gesamt	15	
Proband 10		
Karyotyp	Anzahl	Prozent
46,XY	14	93,3333333
47,XY,+2	1	6,66666667
Metaphasen gesamt	15	
Proband 11		
Karyotyp	Anzahl	Prozent
46,XX	10	66,6666667
47,-X,-X,+3mar	1	6,66666667
47,XX,+21	1	6,66666667
46,XX,-8	1	6,66666667
45,X0	1	6,66666667
45,XX,-9	1	6,66666667
Metaphasen gesamt	15	

Proband 12		
Karyotyp	Anzahl	Prozent
46,XX	13	86,6666667
47,XX,+mar	1	6,6666667
45,X0	1	6,6666667
Metaphasen gesamt	15	

Proband 13		
Karyotyp	Anzahl	Prozent
46,XY	14	93,3333333
45,XY,-21	1	6,6666667
Metaphasen gesamt	15	

Proband 14		
Karyotyp	Anzahl	Prozent
46,XY	4	100
Metaphasen gesamt	4	

Proband 15		
Karyotyp	Anzahl	Prozent
46,XX	13	86,6666667
47,XXX	1	6,6666667
46,XX,der(1p),der(10),der(11p)	1	6,6666667
Metaphasen gesamt	15	

Proband 16		
Karyotyp	Anzahl	Prozent
46,XY	11	73,3333333
46,XY,del(6p)	1	6,6666667
46,XY,?t(1q;19p)	1	6,6666667
46,XY,8q+,-17,+mar	1	6,6666667
46,XY,inv(13q)	1	6,6666667
Metaphasen gesamt	15	

Proband 17		
Karyotyp	Anzahl	Prozent
46,XY	11	73,3333333
45,XY,-21	1	6,6666667
47,XY,+22	1	6,6666667
46,XY,-14,+22?	1	6,6666667
45,X0	1	6,6666667
Metaphasen gesamt	15	

Proband 18		
Karyotyp	Anzahl	Prozent
46,XY	12	80
46,XY,t(2;12)(q11;q11)	1	6,6666667
46,XY,t(2;18),(p25;q21)	1	6,6666667
46,XY,del(9q)	1	6,6666667
Metaphasen gesamt	15	

Proband 19

Karyotyp	Anzahl	Prozent
45,X0,inv(6)(p22;q22),1qh+	1	6,66666667
46,XX,inv(6)(p22;q22),1qh+	14	93,33333333
Metaphasen gesamt	15	

Proband 20

Karyotyp	Anzahl	Prozent
46,XX	11	73,33333333
46,XX,t(6;7)(q23;q36)	1	6,66666667
47,XXX	1	6,66666667
45,X0	2	13,33333333
Metaphasen gesamt	15	

6.3 Ergebnisse der FISH

6.3.1 Proband Nr. 5

Chromosom	Blutlymphozyten			Haarwurzelszellen			Mundschleimhautzellen		
7	SA	n	%	SA	n	%	SA	n	%
	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	3	1,5	1	2	1	1	10	5
	2	196	98	2	192	96	2	188	94
	3	1	0,5	3	6	3	3	2	1
	4	0	0	4	0	0	4	0	0
	5	0	0	5	0	0	5	0	0
	Gn	200		Gn	200		Gn	200	
8	SA	n	%	SA	n	%	SA	n	%
	0	0	0	0	0	0	0	3	1,5
	1	2	1	1	2	1	1	9	4,5
	2	195	97,5	2	195	97,5	2	185	92,5
	3	2	1	3	3	1,5	3	3	1,5
	4	1	0,5	4	0	0	4	0	0
	5	0	0	5	0	0	5	0	0
	Gn	200		Gn	200		Gn	200	
10	SA	n	%	nicht auswertbar			nicht auswertbar		
	0	0	0						
	1	4	2						
	2	193	96,5						
	3	2	1						
	4	1	0,5						
	5	0	0						
Gn	200								
12	SA	n	%	nicht auswertbar			nicht auswertbar		
	0	0	0						
	1	4	2						
	2	193	96,5						
	3	2	1						
	4	1	0,5						
	5	0	0						
Gn	200								

SA = Signalanzahl pro Zelle

n = Anzahl der beobachteten Zellen je Signalanzahl

Gn = Gesamtzahl der analysierten Zellen

6.3.2 Proband Nr. 6

Chromosom	Blutlymphozyten			Haarwurzelzellen	Mundschleimhautzellen		
7	SA	n	%	nicht auswertbar	SA	n	%
	0	0	0		0	0	0
	1	4	2		1	8	4
	2	193	96,5		2	188	94
	3	2	1		3	4	2
	4	1	0,5		4	0	0
	5	0	0		5	0	0
	Gn	200			Gn	200	
8	SA	n	%	nicht auswertbar	SA	n	%
	0	0	0		0	1	0,5
	1	6	3		1	8	4
	2	193	96,5		2	185	92,5
	3	1	0,5		3	6	3
	4	0	0		4	0	0
	5	0	0		5	0	0
	Gn	200			Gn	200	
10	SA	n	%	nicht auswertbar	nicht auswertbar		
	0	0	0				
	1	2	1				
	2	195	97,5				
	3	3	1,5				
	4	0	0				
	5	0	0				
	Gn	200					
12	SA	n	%	nicht auswertbar	nicht auswertbar		
	0	0	0				
	1	2	1				
	2	197	98,5				
	3	1	0,5				
	4	0	0				
	5	0	0				
	Gn	200					

SA = Signalanzahl pro Zelle

n = Anzahl der beobachteten Zellen je Signalanzahl

Gn = Gesamtzahl der analysierten Zellen

6.3.3 Proband Nr. 7

Chromosom	Blutlymphozyten			Haarwurzelszellen			Mundschleimhautzellen
7	SA	n	%	SA	n	%	nicht auswertbar
	0	0	0	0	4	2	
	1	3	1,5	1	24	12	
	2	189	94,5	2	170	85	
	3	3	1,5	3	2	1	
	4	5	2,5	4	0	0	
	5	0	0	5	0	0	
	Gn	200		Gn	200		
8	SA	n	%	SA	n	%	nicht auswertbar
	0	0	0	0	2	1	
	1	0	0	1	11	5,5	
	2	200	100	2	185	92,5	
	3	0	0	3	1	0,5	
	4	0	0	4	1	0,5	
	5	0	0	5	0	0	
	Gn	200		Gn	200		
10	SA	n	%	nicht auswertbar			nicht auswertbar
	0	0	0				
	1	3	1,5				
	2	187	93,5				
	3	4	2				
	4	5	2,5				
	5	1	0,5				
	Gn	200					
12	SA	n	%	nicht auswertbar			nicht auswertbar
	0	0	0				
	1	2	1				
	2	196	98				
	3	1	0,5				
	4	1	0,5				
	5	0	0				
	Gn	200					

SA = Signalanzahl pro Zelle

n = Anzahl der beobachteten Zellen je Signalanzahl

Gn = Gesamtzahl der analysierten Zellen

6.3.4 Proband Nr. 8

Chromosom	Blutlymphozyten			Haarwurzelszellen			Mundschleimhautzellen
7	SA	n	%	nicht auswertbar!			nicht auswertbar!
	0	1	0,5				
	1	1	0,5				
	2	192	96				
	3	4	2				
	4	2	1				
	5	0	0				
	Gn	200					
8	SA	n	%	SA	n	%	nicht auswertbar
	0	7	3,5	0	19	9,5	
	1	27	13,5	1	42	21	
	2	160	80	2	139	69,5	
	3	5	2,5	3	0	0	
	4	1	0,5	4	0	0	
	5	0	0	5	0	0	
	Gn	200		Gn	200		
10	SA	n	%	nicht auswertbar!			nicht auswertbar
	0	0	0				
	1	3	1,5				
	2	190	95				
	3	4	2				
	4	1	0,5				
	5	2	1				
	Gn	200					
12	SA	n	%	SA	n	%	nicht auswertbar
	0	0	0	0	2	1	
	1	1	0,5	1	9	4,5	
	2	194	97	2	187	93,5	
	3	3	1,5	3	2	1	
	4	2	1	4	0	0	
	5	0	0	5	0	0	
	Gn	200		Gn	200		

SA = Signalanzahl pro Zelle

n = Anzahl der beobachteten Zellen je Signalanzahl

Gn = Gesamtzahl der analysierten Zellen

6.3.5 Proband Nr. 9

Chromosom	Blutlymphozyten			Haarwurzelzellen			Mundschleimhautzellen
7	SA	n	%	SA	n	%	nicht auswertbar
	0	0	0	0	3	1,5	
	1	6	3	1	28	14	
	2	191	95,5	2	165	82,5	
	3	3	1,5	3	4	2	
	4	0	0	4	0	0	
	5	0	0	5	0	0	
	Gn	200		Gn	200		
8	SA	n	%	SA	n	%	nicht auswertbar
	0	5	2,5	0	1	0,5	
	1	8	4	1	23	11,5	
	2	184	92	2	175	87,5	
	3	3	1,5	3	1	0,5	
	4	0	0	4	0	0	
	5	0	0	5	0	0	
	Gn	200		Gn	200		
10	SA	n	%	SA	n	%	nicht auswertbar
	0	0	0	0	1	0,5	
	1	3	1,5	1	25	12,5	
	2	196	98	2	171	85,5	
	3	1	0,5	3	3	1,5	
	4	0	0	4	0	0	
	5	0	0	5	0	0	
	Gn	200		Gn	200		
12	SA	n	%	SA	n	%	nicht auswertbar
	0	0	0	0	10	5	
	1	1	0,5	1	13	6,5	
	2	197	98,5	2	175	87,5	
	3	2	1	3	1	0,5	
	4	0	0	4	1	0,5	
	5	0	0	5	0	0	
	Gn	200		Gn	200		

SA = Signalanzahl pro Zelle

n = Anzahl der beobachteten Zellen je Signalanzahl

Gn = Gesamtzahl der analysierten Zellen

6.3.6 Proband Nr. 10

Chromosom	Blutlymphozyten			Haarwurzelszellen			Mundschleimhautzellen		
7	SA	n	%	SA	n	%	SA	n	%
	0	0	0	0	0	0	0	4	2
	1	4	2	1	1	0,5	1	10	5
	2	191	95,5	2	198	99	2	179	89,5
	3	4	2	3	1	0,5	3	7	3,5
	4	1	0,5	4	0	0	4	0	0
	5	0	0	5	0	0	5	0	0
	Gn	200		Gn	200		Gn	200	
8	SA	n	%	SA	n	%	SA	n	%
	0	3	1,5	0	3	1,5	0	1	0,5
	1	8	4	1	15	7,5	1	2	1
	2	188	94	2	180	90	2	196	98
	3	1	0,5	3	2	1	3	1	0,5
	4	0	0	4	0	0	4	0	0
	5	0	0	5	0	0	5	0	0
	Gn	200		Gn	200		Gn	200	
10	SA	n	%	SA	n	%	SA	n	%
	0	0	0	0	0	0	0	3	1,5
	1	1	0,5	1	2	1	1	6	3
	2	193	96,5	2	196	98	2	191	95,5
	3	5	2,5	3	2	1	3	0	0
	4	1	0,5	4	0	0	4	0	0
	5	0	0	5	0	0	5	0	0
	Gn	200		Gn	200		Gn	200	
12	SA	n	%	SA	n	%	nicht auswertbar		
	0	0	0	0	11	5,5			
	1	2	1	1	14	7			
	2	195	97,5	2	174	87			
	3	3	1,5	3	1	0,5			
	4	0	0	4	0	0			
	5	0	0	5	0	0			
	Gn	200		Gn	200				

SA = Signalanzahl pro Zelle

n = Anzahl der beobachteten Zellen je Signalanzahl

Gn = Gesamtzahl der analysierten Zellen

6.3.7 Proband Nr. 11

Chromosom	Blutlymphozyten			Haarwurzelzellen			Mundschleimhautzellen		
7	SA	n	%	SA	n	%	SA	n	%
	0	0	0	0	0	0	0	1	0,5
	1	0	0	1	1	0,5	1	6	3
	2	199	99,5	2	198	99	2	168	84
	3	1	0,5	3	1	0,5	3	25	12,5
	4	0	0	4	0	0	4	0	0
	5	0	0	5	0	0	5	0	0
	Gn	200		Gn	200		Gn	200	
8	SA	n	%	nicht auswertbar			SA	n	%
	0	0	0				0	0	0
	1	4	2				1	0	0
	2	193	96,5				2	199	99,5
	3	1	0,5				3	1	0,5
	4	1	0,5				4	0	0
	5	1	0,5				5	0	0
	Gn	200					Gn	200	
10	SA	n	%	SA	n	%	SA	n	%
	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	2	1	1	2	1	1	2	1
	2	197	98,5	2	197	98,5	2	196	98
	3	1	0,5	3	1	0,5	3	2	1
	4	0	0	4	0	0	4	0	0
	5	0	0	5	0	0	5	0	0
	Gn	200		Gn	200		Gn	200	
12	SA	n	%	nicht auswertbar			SA	n	%
	0	0	0				0	2	1
	1	0	0				1	6	3
	2	198	99				2	192	96
	3	0	0				3	0	0
	4	2	1				4	0	0
	5	0	0				5	0	0
	Gn	200					Gn	200	

SA = Signalanzahl pro Zelle

n = Anzahl der beobachteten Zellen je Signalanzahl

Gn = Gesamtzahl der analysierten Zellen

6.3.8 Proband Nr. 12

Chromosom	Blutlymphozyten			Haarwurzelszellen			Mundschleimhautzellen		
7	SA	n	%	SA	n	%	SA	n	%
	0	0	0	0	0	0	0	10	5
	1	0	0	1	1	0,5	1	12	6
	2	198	99	2	198	99	2	177	88,5
	3	2	1	3	1	0,5	3	1	0,5
	4	0	0	4	0	0	4	0	0
	5	0	0	5	0	0	5	0	0
	Gn	200		Gn	200		Gn	200	
8	SA	n	%	SA	n	%	SA	n	%
	0	1	0,5	0	10	6,54	0	0	0
	1	1	0,5	1	25	16,3	1	0	0
	2	193	96,5	2	118	77,1	2	200	100
	3	4	2	3	0	0	3	0	0
	4	1	0,5	4	0	0	4	0	0
	5	0	0	5	0	0	5	0	0
	Gn	200		Gn	153		Gn	200	
10	SA	n	%	SA	n	%	SA	n	%
	0	0	0	0	0	0	0	2	1
	1	1	0,5	1	0	0	1	10	5
	2	199	99,5	2	199	99,5	2	187	93,5
	3	0	0	3	1	0,5	3	1	0,5
	4	0	0	4	0	0	4	0	0
	5	0	0	5	0	0	5	0	0
	Gn	200		Gn	200		Gn	200	
12	SA	n	%	SA	n	%	nicht auswertbar		
	0	0	0	0	11	7,19			
	1	2	1	1	16	10,5			
	2	196	98	2	125	81,7			
	3	1	0,5	3	1	0,65			
	4	1	0,5	4	0	0			
	5	0	0	5	0	0			
	Gn	200		Gn	153				

SA = Signalanzahl pro Zelle

n = Anzahl der beobachteten Zellen je Signalanzahl

Gn = Gesamtzahl der analysierten Zellen

6.3.9 Proband Nr. 13

Chromosom	Blutlymphozyten			Haarwurzelszellen			Mundschleimhautzellen		
7	SA	n	%	SA	n	%	SA	n	%
	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	6	3	1	1	0,5	1	1	0,5
	2	193	96,5	2	199	99,5	2	197	98,5
	3	1	0,5	3	0	0	3	2	1
	4	0	0	4	0	0	4	0	0
	5	0	0	5	0	0	5	0	0
	Gn	200		Gn	200		Gn	200	
8	SA	n	%	SA	n	%	nicht auswertbar!		
	0	0	0	0	0	0			
	1	6	3	1	6	3			
	2	193	96,5	2	192	96			
	3	1	0,5	3	2	1			
	4	0	0	4	0	0			
	5	0	0	5	0	0			
	Gn	200		Gn	200				
10	SA	n	%	SA	n	%	SA	n	%
	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	3	1,5	1	3	1,5	1	2	1
	2	196	98	2	196	98	2	196	98
	3	1	0,5	3	1	0,5	3	2	1
	4	0	0	4	0	0	4	0	0
	5	0	0	5	0	0	5	0	0
	Gn	200		Gn	200		Gn	200	
12	SA	n	%	SA	n	%	nicht auswertbar		
	0	0	0	0	0	0			
	1	5	2,5	1	10	5			
	2	195	97,5	2	187	93,5			
	3	0	0	3	3	1,5			
	4	0	0	4	0	0			
	5	0	0	5	0	0			
	Gn	200		Gn	200				

SA = Signalanzahl pro Zelle

n = Anzahl der beobachteten Zellen je Signalanzahl

Gn = Gesamtzahl der analysierten Zellen

6.3.10 Proband Nr. 14

Chromosom	Blutlymphozyten			Haarwurzelszellen	Mundschleimhautzellen		
7	SA	n	%	nicht auswertbar	SA	n	%
	0	0	0		0	0	0
	1	3	1,5		1	1	0,5
	2	196	98		2	196	98
	3	1	0,5		3	3	1,5
	4	0	0		4	0	0
	5	0	0		5	0	0
	Gn	200		Gn	200		
8	SA	n	%	nicht auswertbar	SA	n	%
	0	0	0		0	0	0
	1	7	3,5		1	3	1,5
	2	192	96		2	197	98,5
	3	1	0,5		3	0	0
	4	0	0		4	0	0
	5	0	0		5	0	0
	Gn	200		Gn	200		
10	SA	n	%	nicht auswertbar	nicht auswertbar		
	0	0	0				
	1	1	0,5				
	2	199	99,5				
	3	0	0				
	4	0	0				
	5	0	0				
	Gn	200					
12	SA	n	%	nicht auswertbar	nicht auswertbar		
	0	0	0				
	1	3	1,5				
	2	196	98				
	3	1	0,5				
	4	0	0				
	5	0	0				
	Gn	200					

SA = Signalanzahl pro Zelle

n = Anzahl der beobachteten Zellen je Signalanzahl

Gn = Gesamtzahl der analysierten Zellen

6.3.11 Proband Nr. 15

Chromosom	Blutlymphozyten			Haarwurzelzellen	Mundschleimhautzellen		
7	SA	n	%	nicht auswertbar	SA	n	%
	0	0	0		0	7	3,5
	1	5	2,5		1	188	94
	2	195	97,5		2	4	2
	3	0	0		3	1	0,5
	4	0	0		4	0	0
	5	0	0		5	0	0
	Gn	200			Gn	200	
8	SA	n	%	nicht auswertbar	SA	n	%
	0	0	0		0	0	0
	1	5	2,5		1	2	1
	2	195	97,5		2	197	98,5
	3	0	0		3	1	0,5
	4	0	0		4	0	0
	5	0	0		5	0	0
	Gn	200			Gn	200	
10	SA	n	%	nicht auswertbar	SA	n	%
	0	0	0		0	0	0
	1	5	2,5		1	11	5,5
	2	195	97,5		2	188	94
	3	0	0		3	1	0,5
	4	0	0		4	0	0
	5	0	0		5	0	0
	Gn	200			Gn	200	
12	SA	n	%	nicht auswertbar	SA	n	%
	0	0	0		0	1	0,5
	1	4	2		1	4	2
	2	195	97,5		2	195	97,5
	3	1	0,5		3	0	0
	4	0	0		4	0	0
	5	0	0		5	0	0
	Gn	200			Gn	200	

SA = Signalanzahl pro Zelle

n = Anzahl der beobachteten Zellen je Signalanzahl

Gn = Gesamtzahl der analysierten Zellen

6.3.12 Proband Nr. 16

Chromosom	Blutlymphozyten			Haarwurzelszellen			Mundschleimhautzellen		
7	SA	n	%	SA	n	%	SA	n	%
	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	3	1,5	1	2	1	1	3	1,5
	2	195	97,5	2	195	97,5	2	195	97,5
	3	1	0,5	3	3	1,5	3	1	0,5
	4	1	0,5	4	0	0	4	1	0,5
	5	0	0	5	0	0	5	0	0
	Gn	200		Gn	200		Gn	200	
8	SA	n	%	SA	n	%	SA	n	%
	0	0	0	0	0	0	0	1	0,5
	1	2	1	1	2	1	1	5	2,5
	2	197	98,5	2	197	98,5	2	191	95,5
	3	0	0	3	1	0,5	3	3	1,5
	4	1	0,5	4	0	0	4	0	0
	5	0	0	5	0	0	5	0	0
	Gn	200		Gn	200		Gn	200	
10	SA	n	%	nicht auswertbar			SA	n	%
	0	0	0				0	2	1
	1	1	0,5				1	2	1
	2	197	98,5				2	193	96,5
	3	2	1				3	2	1
	4	0	0				4	1	0,5
	5	0	0				5	0	0
	Gn	200				Gn	200		
12	SA	n	%	nicht auswertbar			SA	n	%
	0	0	0				0	1	0,5
	1	0	0				1	1	0,5
	2	197	98,5				2	196	98
	3	2	1				3	2	1
	4	1	0,5				4	0	0
	5	0	0				5	0	0
	Gn	200				Gn	200		

SA = Signalanzahl pro Zelle

n = Anzahl der beobachteten Zellen je Signalanzahl

Gn = Gesamtzahl der analysierten Zellen

6.3.13 Proband Nr. 17

Chromosom	Blutlymphozyten			Haarwurzelszellen			Mundschleimhautzellen		
	SA	n	%	SA	n	%	SA	n	%
7	0	0	0	0	2	1	0	2	1
	1	5	2,5	1	23	11,5	1	12	6
	2	193	96,5	2	173	86,5	2	175	87,5
	3	2	1	3	2	1	3	11	5,5
	4	0	0	4	0	0	4	0	0
	5	0	0	5	0	0	5	0	0
	Gn	200		Gn	200		Gn	200	
8	0	0	0	0	2	1	0	0	0
	1	1	0,5	1	12	6	1	2	1
	2	196	98	2	184	92	2	198	99
	3	1	0,5	3	2	1	3	0	0
	4	2	1	4	0	0	4	0	0
	5	0	0	5	0	0	5	0	0
	Gn	200		Gn	200		Gn	200	
10	0	0	0	nicht auswertbar			0	7	3,5
	1	5	2,5				1	7	3,5
	2	194	97				2	185	92,5
	3	0	0				3	1	0,5
	4	1	0,5				4	0	0
	5	0	0				5	0	0
	Gn	200					Gn	200	
12	0	0	0	nicht auswertbar			0	0	0
	1	1	0,5				1	0	0
	2	194	97				2	199	99,5
	3	3	1,5				3	0	0
	4	2	1				4	1	0,5
	5	0	0				5	0	0
	Gn	200					Gn	200	

SA = Signalanzahl pro Zelle

n = Anzahl der beobachteten Zellen je Signalanzahl

Gn = Gesamtzahl der analysierten Zellen

6.3.14 Proband Nr. 18

Chromosom	Blutlymphozyten			Haarwurzelzellen			Mundschleimhautzellen		
7	SA	n	%	SA	n	%	SA	n	%
	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	3	1,5	1	2	1	1	4	2
	2	195	97,5	2	198	99	2	187	93,5
	3	2	1	3	0	0	3	9	4,5
	4	0	0	4	0	0	4	0	0
	5	0	0	5	0	0	5	0	0
	Gn	200		Gn	200		Gn	200	
8	SA	n	%	SA	n	%	SA	n	%
	0	0	0	0	2	1	0	0	0
	1	0	0	1	9	4,5	1	0	0
	2	197	98,5	2	189	94,5	2	198	99
	3	2	1	3	0	0	3	2	1
	4	1	0,5	4	0	0	4	0	0
	5	0	0	5	0	0	5	0	0
	Gn	200		Gn	200		Gn	200	
10	SA	n	%	nicht auswertbar			SA	n	%
	0	0	0				0	0	0
	1	2	1				1	3	1,5
	2	196	98				2	194	97
	3	1	0,5				3	3	1,5
	4	1	0,5				4	0	0
	5	0	0				5	0	0
	Gn	200				Gn	200		
12	SA	n	%	nicht auswertbar			SA	n	%
	0	0	0				0	0	0
	1	1	0,5				1	5	2,5
	2	196	98				2	195	97,5
	3	2	1				3	0	0
	4	1	0,5				4	0	0
	5	0	0				5	0	0
	Gn	200				Gn	200		

SA = Signalanzahl pro Zelle

n = Anzahl der beobachteten Zellen je Signalanzahl

Gn = Gesamtzahl der analysierten Zellen

6.3.15 Proband Nr. 19

Chromosom	Blutlymphozyten			Haarwurzelszellen			Mundschleimhautzellen		
7	SA	n	%	SA	n	%	SA	n	%
	0	0	0	0	2	1	0	0	0
	1	2	1	1	13	6,5	1	2	1
	2	197	98,5	2	182	91	2	174	87
	3	1	0,5	3	2	1	3	23	11,5
	4	0	0	4	1	0,5	4	1	0,5
	5	0	0	5	0	0	5	0	0
	Gn	200		Gn	200		Gn	200	
8	SA	n	%	nicht auswertbar			nicht auswertbar		
	0	0	0						
	1	6	3						
	2	191	95,5						
	3	2	1						
	4	1	0,5						
	5	0	0						
Gn	200								
10	SA	n	%	SA	n	%	SA	n	%
	0	0	0	0	1	0,5	0	3	1,5
	1	5	2,5	1	3	1,5	1	4	2
	2	195	97,5	2	192	96	2	191	95,5
	3	0	0	3	4	2	3	1	0,5
	4	0	0	4	0	0	4	0	0
	5	0	0	5	0	0	5	1	0,5
	Gn	200		Gn	200		Gn	200	
12	SA	n	%	nicht auswertbar			nicht auswertbar		
	0	1	0,5						
	1	1	0,5						
	2	197	98,5						
	3	1	0,5						
	4	0	0						
	5	0	0						
Gn	200								

SA = Signalanzahl pro Zelle

n = Anzahl der beobachteten Zellen je Signalanzahl

Gn = Gesamtzahl der analysierten Zellen

6.3.16 Proband Nr. 20

Chromosom	Blutlymphozyten			Haarwurzelzellen			Mundschleimhautzellen		
7	SA	n	%	SA	n	%	SA	n	%
	0	0	0	0	1	0,5	0	0	0
	1	3	1,5	1	15	7,5	1	2	1
	2	196	98	2	179	89,5	2	189	94,5
	3	1	0,5	3	5	2,5	3	9	4,5
	4	0	0	4	0	0	4	0	0
	5	0	0	5	0	0	5	0	0
	Gn	200		Gn	200		Gn	200	
8	SA	n	%	SA	n	%	SA	n	%
	0	0	0	0	4	2	0	0	0
	1	5	2,5	1	6	3	1	0	0
	2	195	97,5	2	181	90,5	2	200	100
	3	0	0	3	9	4,5	3	0	0
	4	0	0	4	0	0	4	0	0
	5	0	0	5	0	0	5	0	0
	Gn	200		Gn	200		Gn	200	
10	SA	n	%	nicht auswertbar			SA	n	%
	0	0	0				0	0	0
	1	1	0,5				1	2	1
	2	197	98,5				2	196	98
	3	2	1				3	2	1
	4	0	0				4	0	0
	5	0	0				5	0	0
	Gn	200				Gn	200		
12	SA	n	%	nicht auswertbar			SA	n	%
	0	0	0				0	0	0
	1	2	1				1	2	1
	2	197	98,5				2	197	98,5
	3	1	0,5				3	1	0,5
	4	0	0				4	0	0
	5	0	0				5	0	0
	Gn	200				Gn	200		

SA = Signalanzahl pro Zelle

n = Anzahl der beobachteten Zellen je Signalanzahl

Gn = Gesamtzahl der analysierten Zellen

6.4 Diagramme

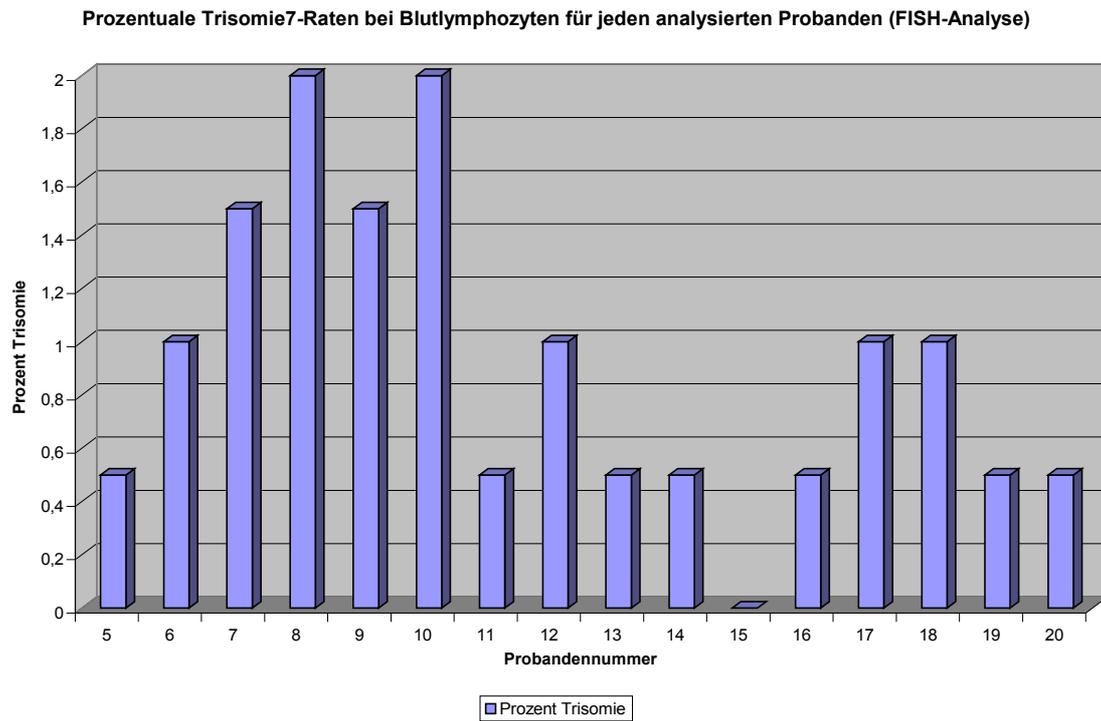


Diagramm 1: Prozentuale Trisomie7-Raten bei Blutlymphozyten für jeden analysierten Probanden (FISH-Analyse)

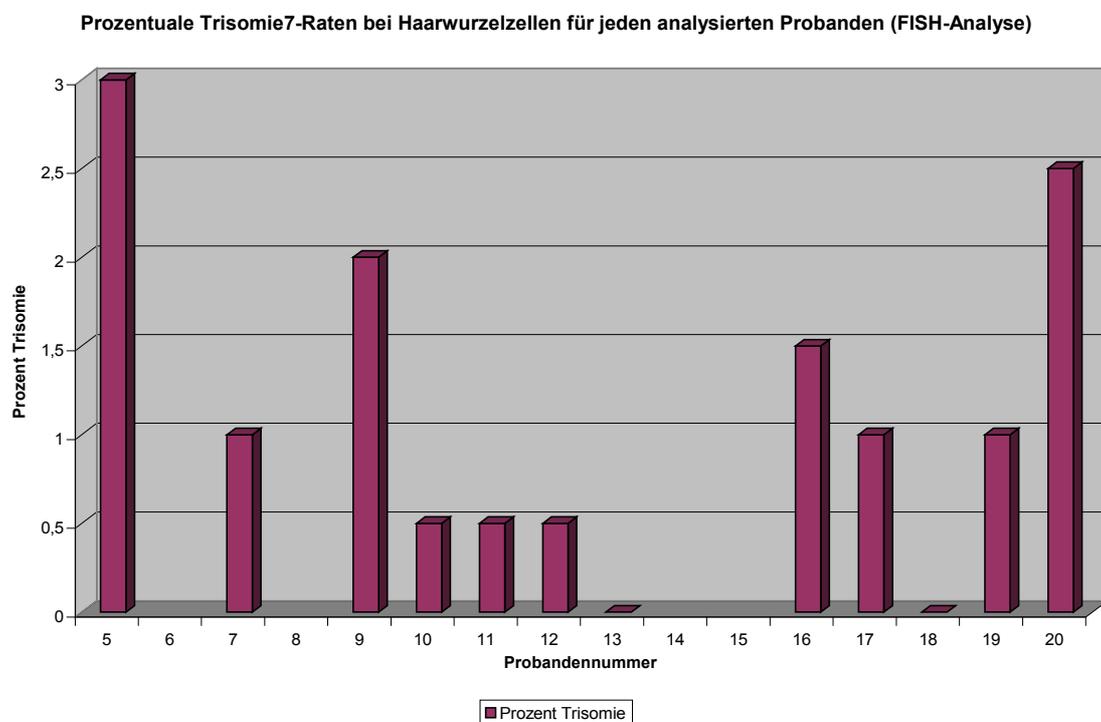


Diagramm 2: Prozentuale Trisomie7-Raten bei Haarwurzeln für jeden analysierten Probanden (FISH-Analyse)

Prozentuale Trisomie7-Raten bei Mundschleimhautzellen für jeden analysierten Probanden (FISH-Analyse)

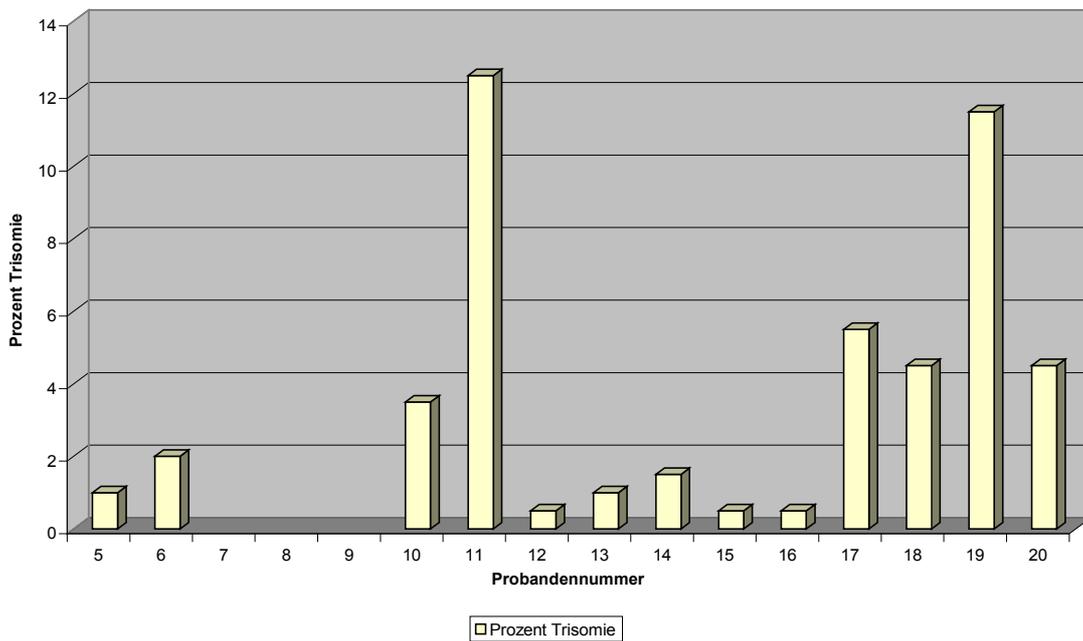


Diagramm 3: Prozentuale Trisomie7-Raten bei Mundschleimhautzellen für jeden analysierten Probanden (FISH-Analyse)

Prozentuale Trisomie7-Raten im Vergleich der drei Gewebetypen für jeden analysierten Probanden (FISH-Analyse)

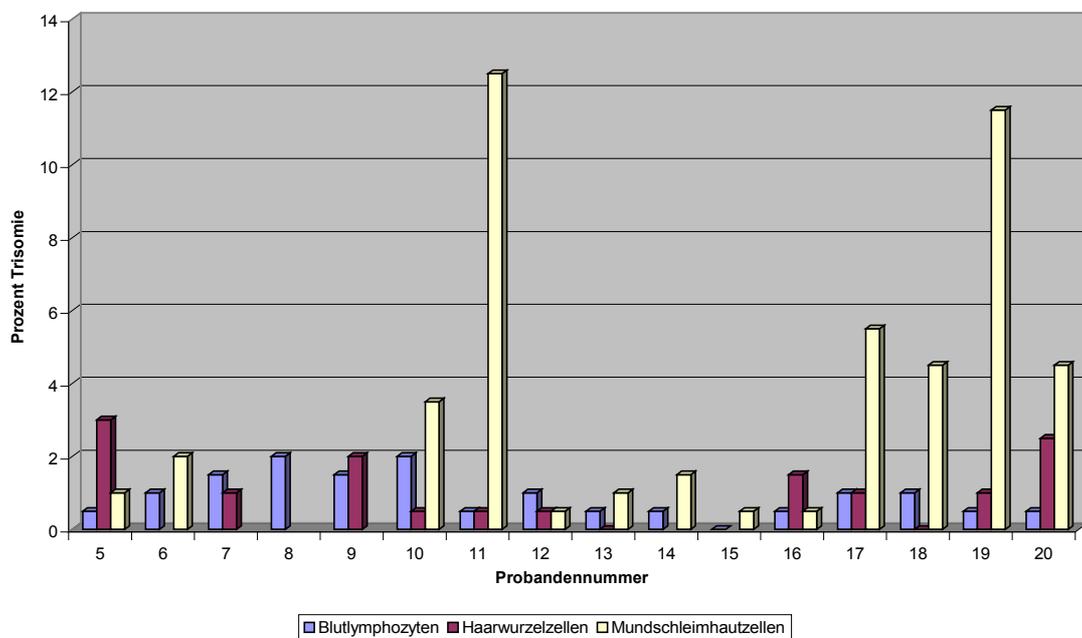


Diagramm 4: Prozentuale Trisomie7-Raten im Vergleich der drei Gewebetypen für jeden analysierten Probanden (FISH-Analyse)

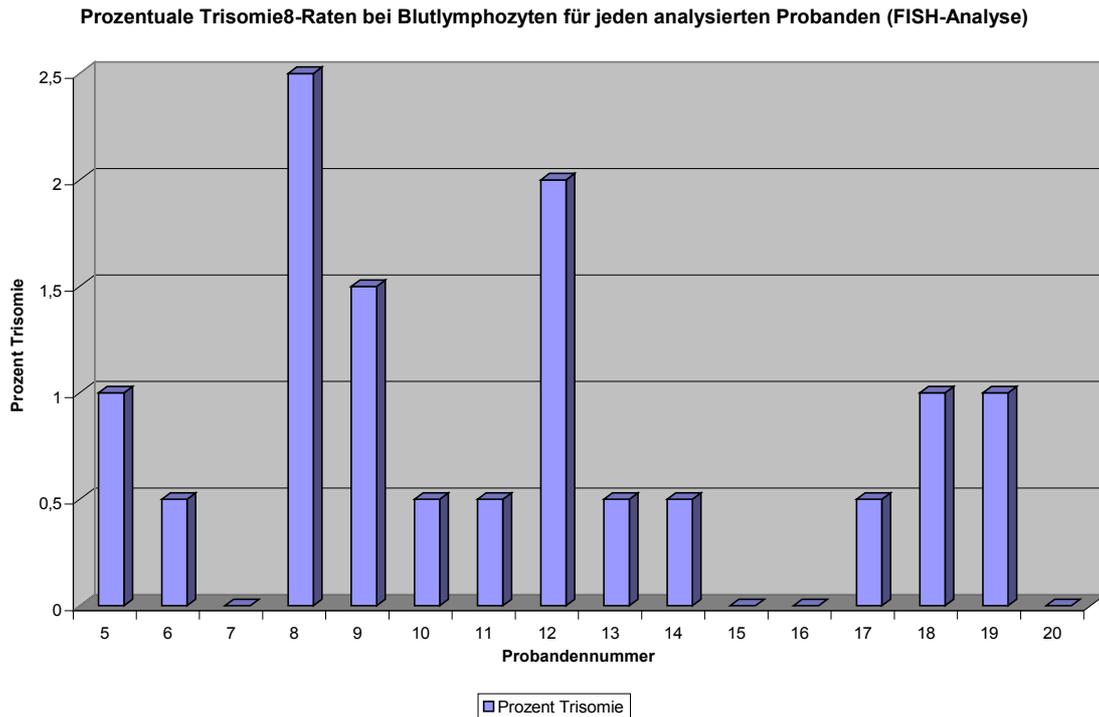


Diagramm 5: Prozentuale Trisomie8-Raten bei Blutlymphozyten für jeden analysierten Probanden (FISH-Analyse)

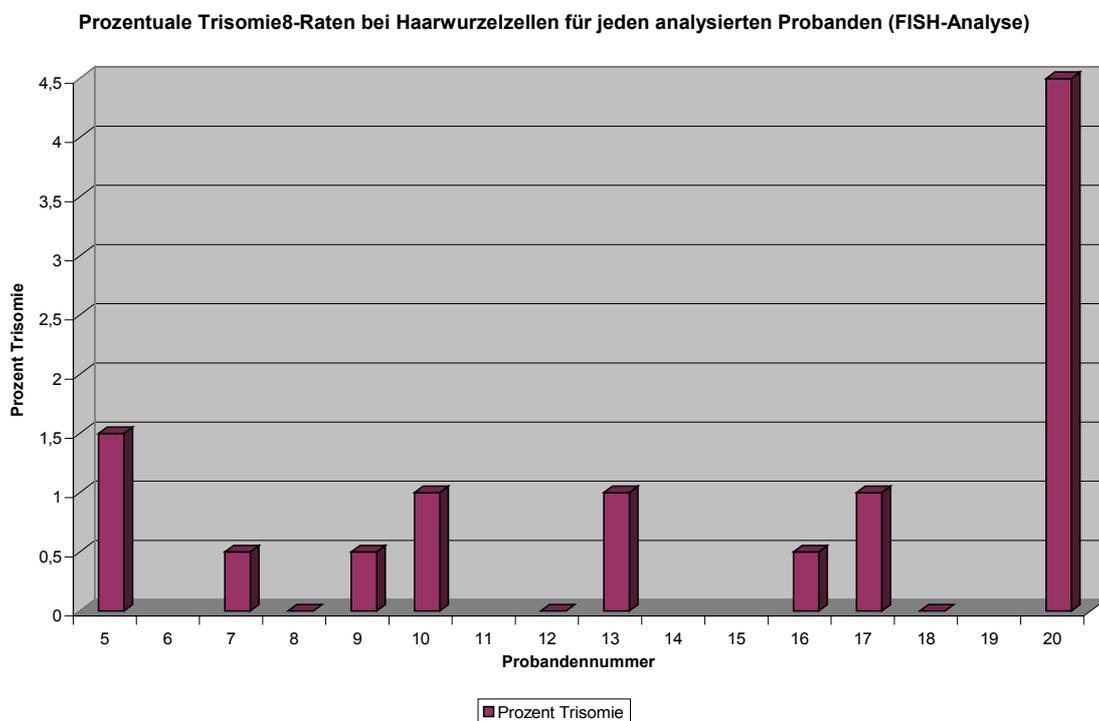


Diagramm 6: Prozentuale Trisomie8-Raten bei Haarwurzelnzellen für jeden analysierten Probanden (FISH-Analyse)

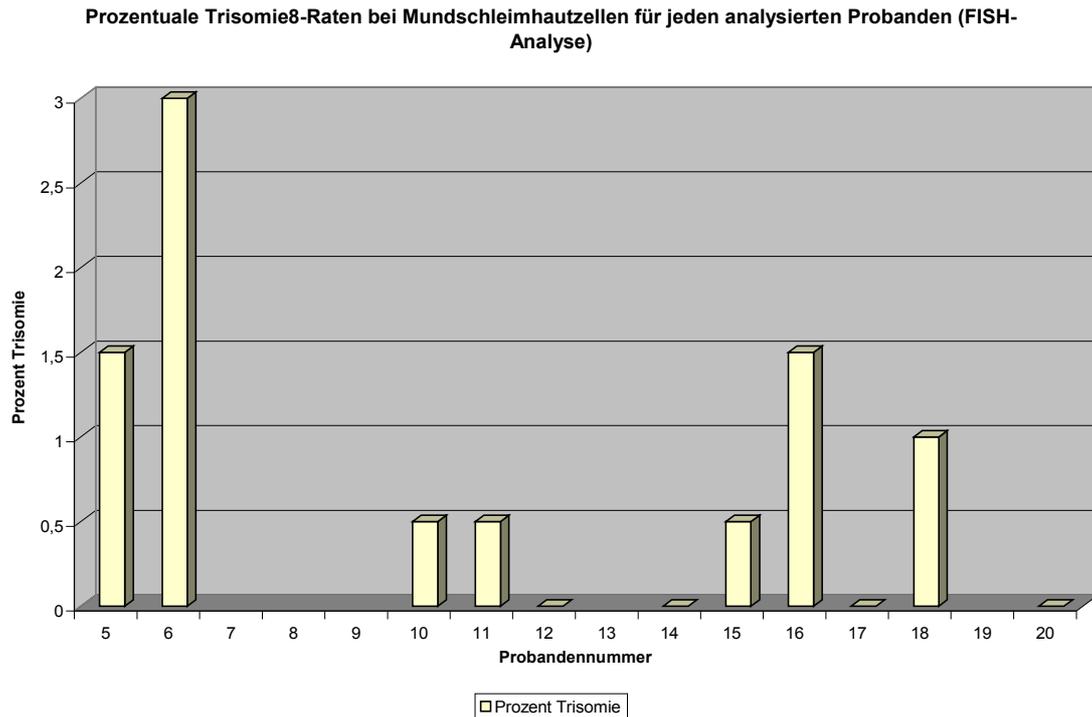


Diagramm 7: Prozentuale Trisomie8-Raten bei Mundschleimhautzellen für jeden analysierten Probanden (FISH-Analyse)

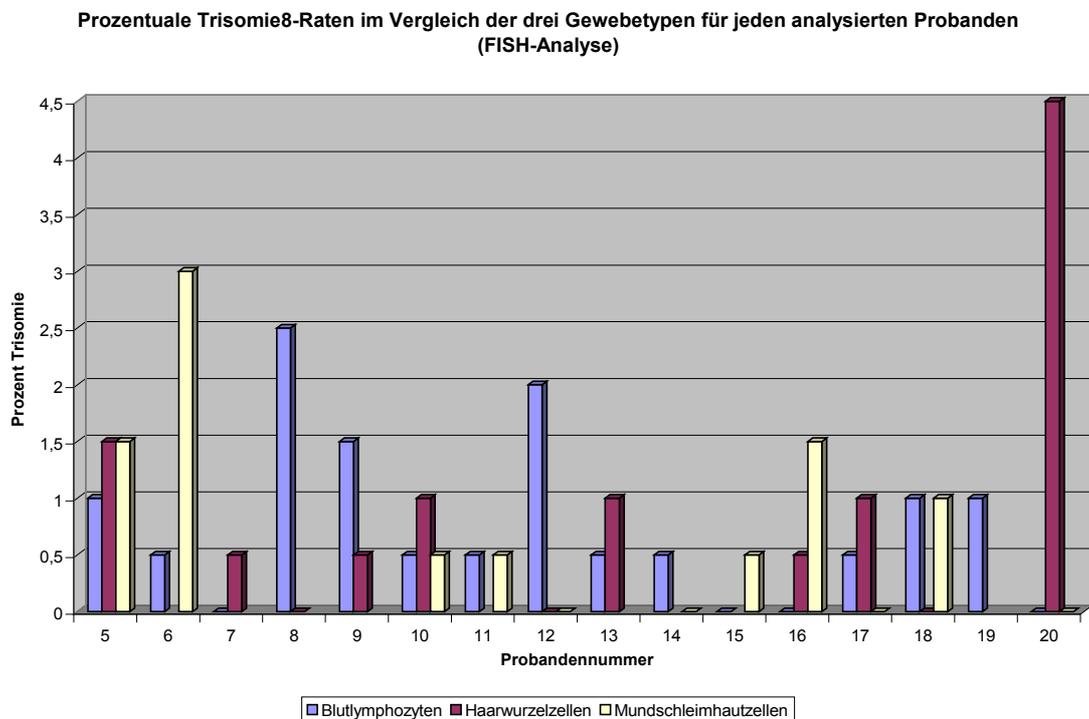


Diagramm 8: Prozentuale Trisomie8-Raten im Vergleich der drei Gewebetypen für jeden analysierten Probanden (FISH-Analyse)

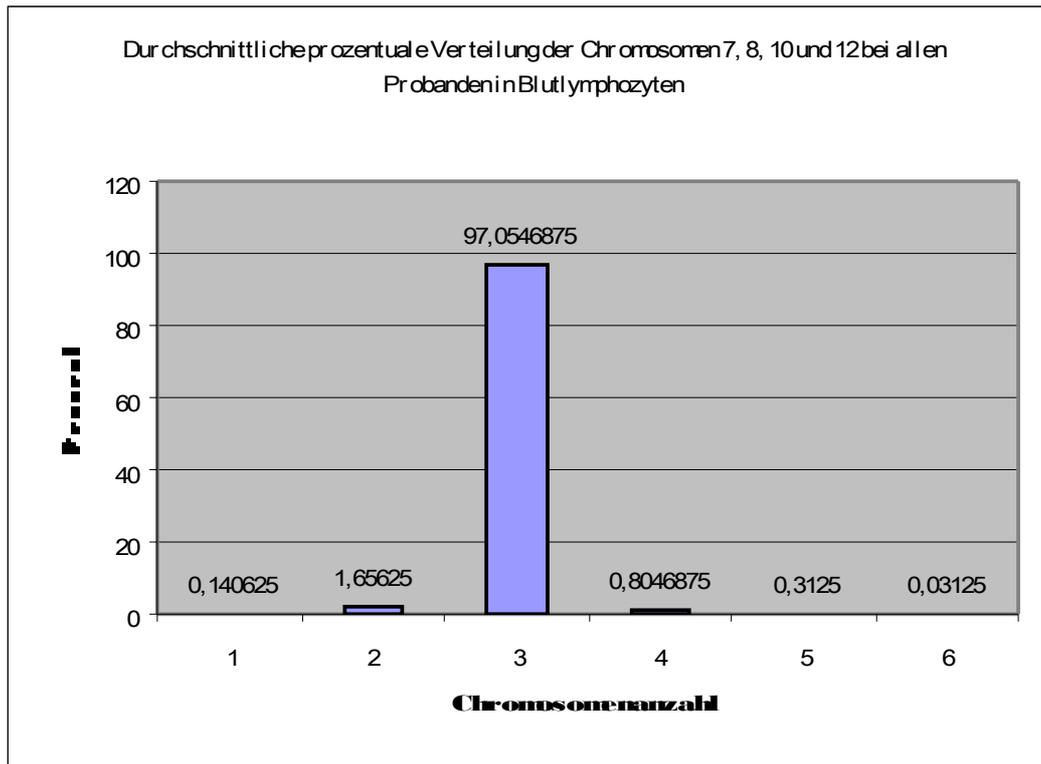


Diagramm 9: Durchschnittliche prozentuale Verteilung der Chromosomen 7, 8, 10 und 12 bei allen Probanden in Blutlymphozyten

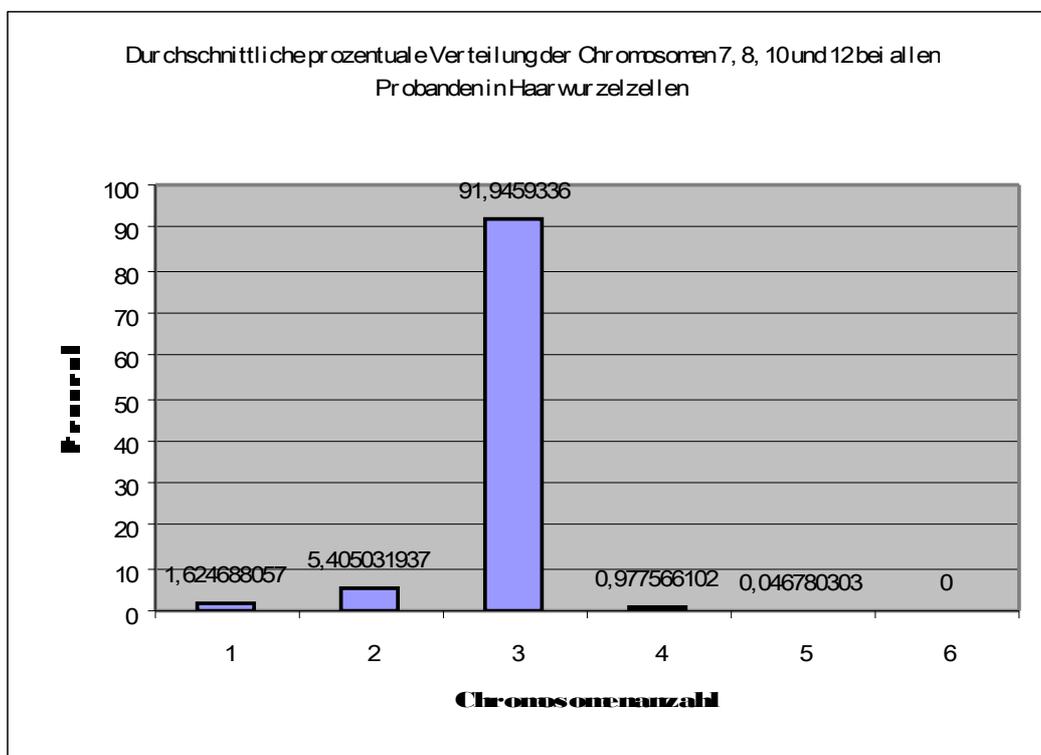


Diagramm 10: Durchschnittliche prozentuale Verteilung der Chromosomen 7, 8, 10 und 12 bei allen Probanden in Haarwurzelzellen

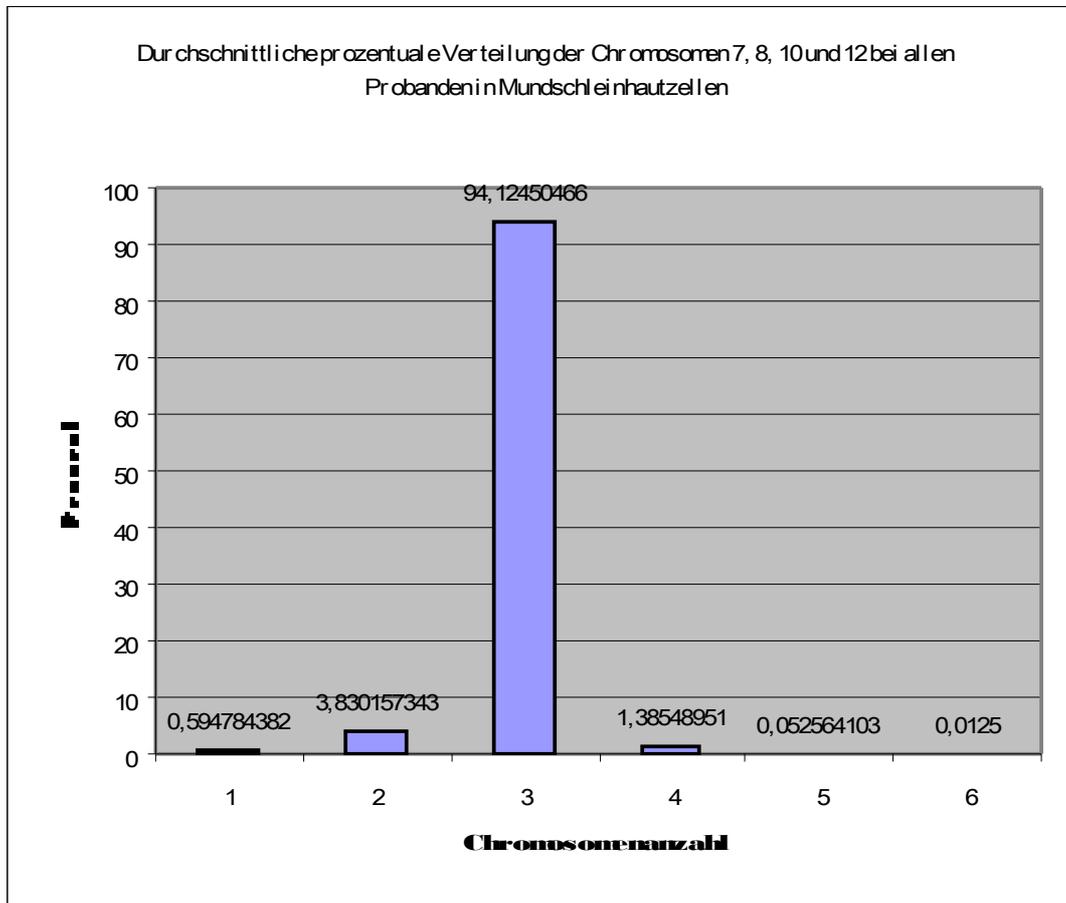


Diagramm 11: Durchschnittliche prozentuale Verteilung der Chromosomen 7, 8, 10 und 12 bei allen Probanden in Mundschleinhautzellen

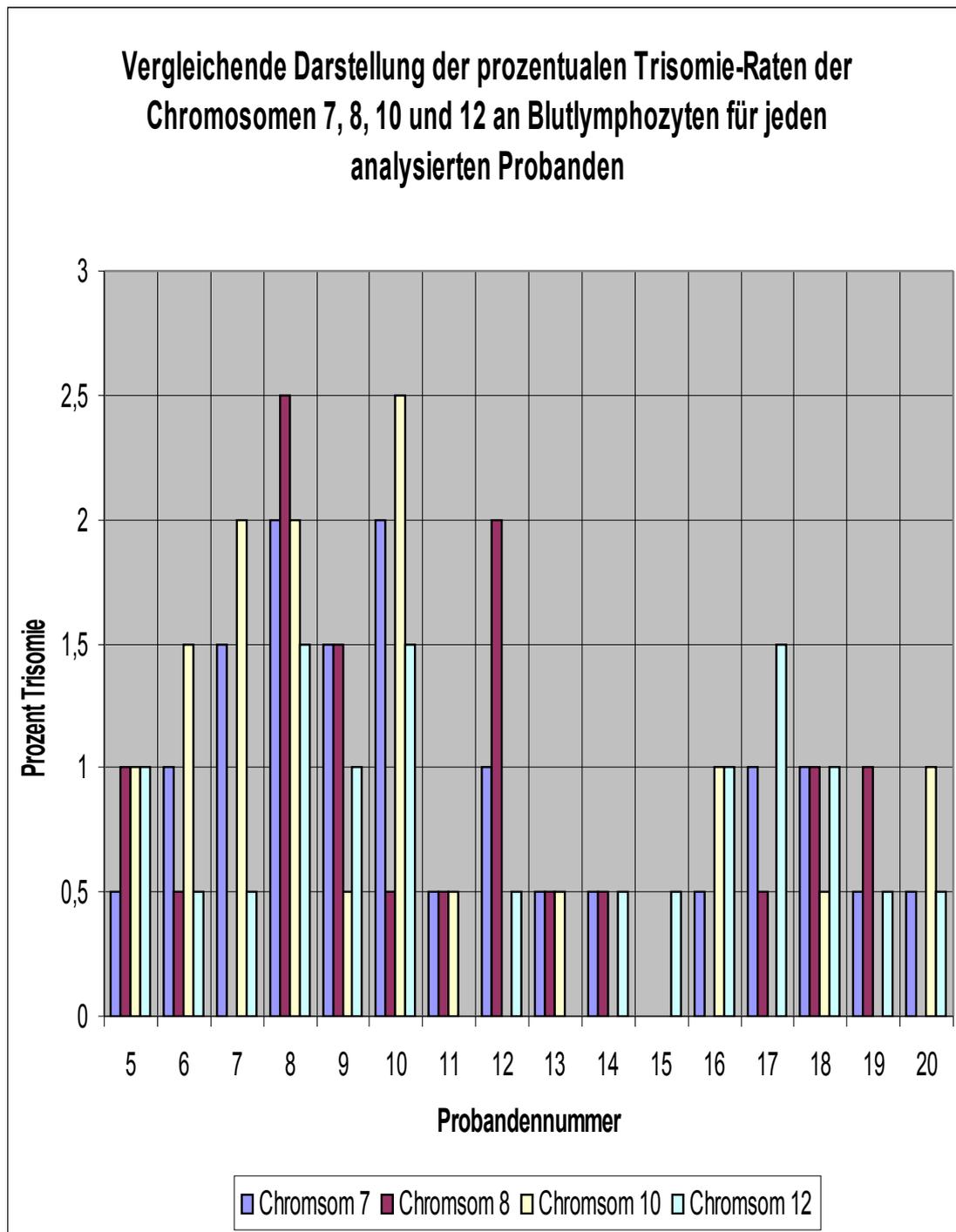


Diagramm 12: Vergleichende Darstellung der prozentualen Trisomie-Raten der Chromosomen 7, 8, 10 und 12 an Blutlymphozyten für jeden analysierten Probanden (FISH-Analyse)

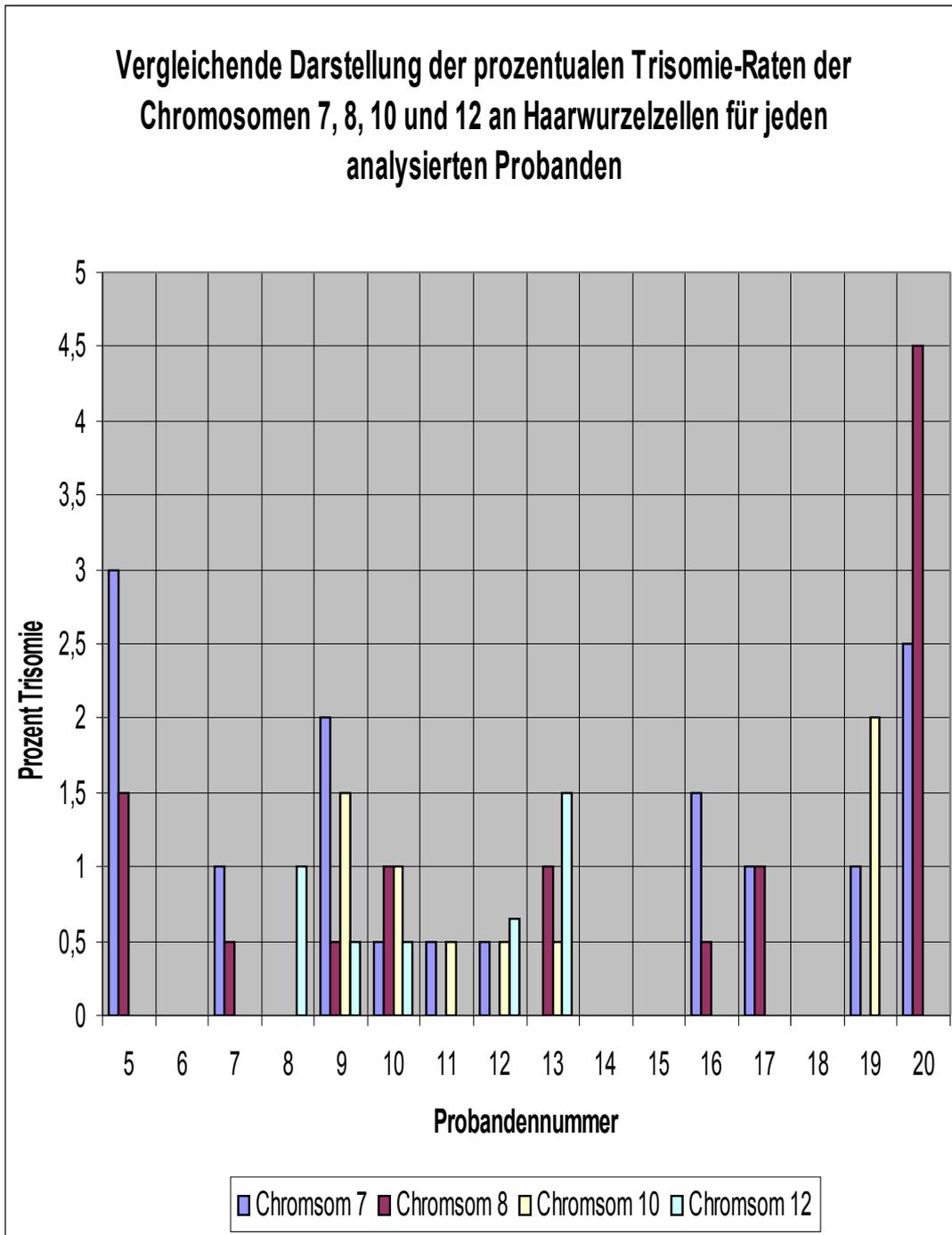


Diagramm 13: Vergleichende Darstellung der prozentualen Trisomie-Raten der Chromosomen 7, 8, 10 und 12 an Haarwurzelzellen für jeden analysierten Probanden (FISH-Analyse)

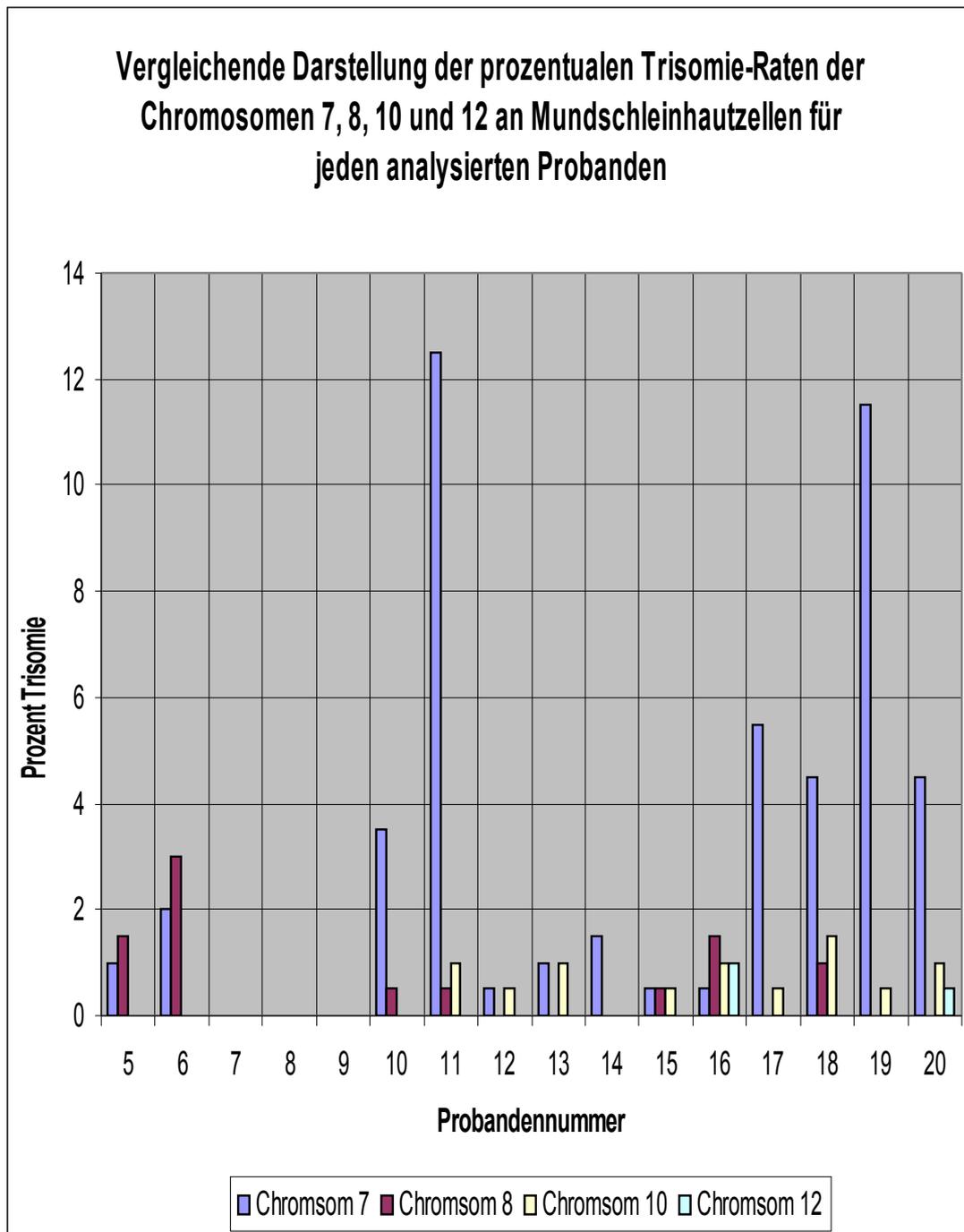


Diagramm 14: Vergleichende Darstellung der prozentualen Trisomie-Raten der Chromosomen 7, 8, 10 und 12 an Mundschleimhautzellen für jeden analysierten Probanden (FISH-Analyse)

7 Literaturverzeichnis

1. Adeyinka, A. et al. "A subgroup of breast carcinomas is cytogenetically characterized by trisomy 12." Cancer Genet.Cytogenet. 97.2 (1997): 119-21.
2. Afify, A., K. I. Bland, and H. F. Mark. "Fluorescent in situ hybridization assessment of chromosome 8 copy number in breast cancer." Breast Cancer Res.Treat. 38.2 (1996): 201-08.
3. Afify, A. and H. F. Mark. "Fluorescence in situ hybridization assessment of chromosome 8 copy number in stage I and stage II infiltrating ductal carcinoma of the breast." Cancer Genet.Cytogenet. 97.2 (1997): 101-05.
4. Afify, A. and H. F. Mark. "Trisomy 8 in embryonal rhabdomyosarcoma detected by fluorescence in situ hybridization." Cancer Genet.Cytogenet. 108.2 (1999): 127-32.
5. Amalfitano, G. et al. "Fluorescence in situ hybridization study of aneuploidy of chromosomes 7, 10, X, and Y in primary and secondary glioblastomas." Cancer Genet.Cytogenet. 116.1 (2000): 6-9.
6. Bardi, G. et al. "Trisomy 7 in short-term cultures of colorectal adenocarcinomas." Genes Chromosomes.Cancer 3.2 (1991): 149-52.
7. Bardi, G. et al. "Trisomy 7 as the sole cytogenetic aberration in the epithelial component of a colonic adenoma." Cancer Genet.Cytogenet. 82.1 (1995): 82-84.
8. Baty, B. J. et al. "Trisomy 20 mosaicism in two unrelated girls with skin hypopigmentation and normal intellectual development." Am.J.Med.Genet. 99.3 (2001): 210-16.
9. Belge, G. et al. "A characteristic sequence of trisomies starting with trisomy 7 in benign thyroid tumors." Hum.Genet. 94.2 (1994): 198-202.
10. Broberg, K. et al. "Polyclonal expansion of cells with trisomy 7 in synovia from patients with osteoarthritis." Cytogenet.Cell Genet. 83.1-2 (1998): 30-34.

11. Broberg, K. et al. "Trisomy 7 accumulates with age in solid tumors and non-neoplastic synovia." Genes Chromosomes.Cancer 30.3 (2001): 310-15.
12. Casalone, R. et al. "Cytogenetic analysis reveals clonal proliferation of smooth muscle cells in atherosclerotic plaques." Hum.Genet. 87.2 (1991): 139-43.
13. Castel, Y. et al. "[Association of trisomy 21 and gonosomal trisomy. Apropos of 2 cases]." Pediatrie. 38.4 (1983): 235-41.
14. Cuneo, A. et al. "Detection and monitoring of trisomy 8 by fluorescence in situ hybridization in acute myeloid leukemia: a multicentric study." Haematologica 83.1 (1998): 21-26.
15. Dahlen, A. et al. "Analysis of the distribution and frequency of trisomy 7 in vivo in synovia from patients with osteoarthritis and pigmented villonodular synovitis." Cancer Genet.Cytogenet. 131.1 (2001): 19-24.
16. Dal Cin, P. et al. "Trisomy 7 and trisomy 8 in dividing and non-dividing tumor cells in Dupuytren's disease." Cancer Genet.Cytogenet. 108.2 (1999): 137-40.
17. Dal Cin, P. et al. "Clonal chromosome abnormalities in a so-called Dupuytren's subungual exostosis." Genes Chromosomes.Cancer 24.2 (1999): 162-64.
18. Dunlap, S. S., M. A. Aziz, and K. N. Rosenbaum. "Comparative anatomical analysis of human trisomies 13, 18, and 21: I. The forelimb." Teratology 33.2 (1986): 159-86.
19. Elfving, P. et al. "Trisomy 7 in nonneoplastic epithelial kidney cells." Cytogenet.Cell Genet. 69.1-2 (1995): 90-96.
20. Ermis, A. et al. "Proliferation enhancement by spontaneous multiplication of chromosome 7 in rheumatic synovial cells in vitro." Hum.Genet. 96.6 (1995): 651-54.
21. Ermis, A. et al. "Clonal chromosome aberrations in cell cultures of synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis." Genes Chromosomes.Cancer 6.4 (1993): 232-34.

22. Fagioli, F. et al. "Heterogeneity of lineage involvement by trisomy 8 in myelodysplastic syndrome. A multiparameter analysis combining conventional cytogenetics, DNA in situ hybridization, and bone marrow culture studies." Cancer Genet.Cytogenet. 82.2 (1995): 116-22.
23. FitzPatrick, D. R. and E. Boyd. "Recurrences of trisomy 18 and trisomy 13 after trisomy 21." Hum.Genet. 82.3 (1989): 301.
24. Fryns, J. P. et al. "Partial trisomy 9q-in a polymalformed new-born infant. Karyotype: 47,XX, + del (9) (q33)." Acta Paediatr.Belg. 31.4 (1978): 237-40.
25. Garipidou, V. et al. "Trisomy 8 in acute lymphoblastic leukemia (ALL): a case report and update of the literature." Leukemia 4.10 (1990): 717-19.
26. Hara, S. et al. "A case of partial 5q trisomy associated with partial 7q monosomy." Br.J.Ophthalmol. 70.8 (1986): 630-33.
27. Harada, N. and N. Niikawa. "[Trisomy 13 syndrome (Patau syndrome), trisomy 18 syndrome (Edwards syndrome), Down syndrome (trisomy 21 syndrome), Turner syndrome (XO gonadal dysgenesis)]." Ryoikibetsu.Shokogun.Shirizu. 15 (1996): 198-201.
28. Heller, A. et al. "Trisomy 8 as the sole chromosomal aberration in myelocytic malignancies: a comprehensive molecular cytogenetic analysis reveals no cryptic aberrations." Cancer Genet.Cytogenet. 146.1 (2003): 81-83.
29. Jin, C. et al. "Clonal chromosome aberrations accumulate with age in upper aerodigestive tract mucosa." Mutat.Res. 374.1 (1997): 63-72.
30. John, H. A., M. L. Birnstiel, and K. W. Jones. "RNA-DNA hybrids at the cytological level." Nature 223.206 (1969): 582-87.
31. Kameoka, J. et al. "Clonal evolution from trisomy into tetrasomy of chromosome 8 associated with the development of acute myeloid leukemia from myelodysplastic syndrome." Cancer Genet.Cytogenet. 124.2 (2001): 159-64.
32. Kivirikko, S. et al. "Prenatally detected trisomy 7 mosaicism in a dysmorphic child." Prenat.Diagn. 22.7 (2002): 541-44.

33. Landegent, J. E. et al. "2-Acetylaminofluorene-modified probes for the indirect hybridocytochemical detection of specific nucleic acid sequences." Exp.Cell Res. 153.1 (1984): 61-72.
34. Lukusa, T. et al. "Proximal trisomy 13q and distal monosomy 8p in a dysmorphic and mentally retarded patient with an isodicentric chromosome 13q and a 13q/8p translocation chromosome." Ann.Genet. 42.4 (1999): 215-20.
35. Mark, H. F. et al. "Trisomy 8 in stage I and stage III ovarian cancer detected by fluorescence in situ hybridization." Exp.Mol.Pathol. 66.1 (1999): 76-81.
36. Mark, H. F. et al. "Trisomy 9 in a patient with secondary acute myelogenous leukemia detected by fluorescent in situ hybridization." Pathobiology 67.2 (1999): 111-14.
37. Mark, H. F. et al. "Stage I and stage II infiltrating ductal carcinoma of the breast analyzed for chromosome 8 copy number using fluorescent in situ hybridization." Pathobiology 65.4 (1997): 184-89.
38. Mark, J. et al. "Benign parotid oncocytoma with the chromosomal abnormality trisomy 7." Anticancer Res. 11.5 (1991): 1735-37.
39. Maturri, L. et al. "Cytogenetic aspects of cell proliferation in atherosclerotic plaques." Cardiologia 42.8 (1997): 833-36.
40. Maturri, L. et al. "Chromosomal alterations in atherosclerotic plaques." Atherosclerosis 154.3 (2001): 755-61.
41. Maturri, L. et al. "Inflammatory cells, apoptosis and Chlamydia pneumoniae infection in atherosclerosis." Int.J.Cardiol. 75.1 (2000): 23-33.
42. Mondello, C. et al. "Occurrence and expansion of trisomy 7 in a fibroblast strain from a centenarian individual." Exp.Gerontol. 34.5 (1999): 715-19.
43. Pardue, M. L. and J. G. Gall. "Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 64.2 (1969): 600-04.
44. Paulsson, K. et al. "Trisomy 8 as the sole chromosomal aberration in myelocytic malignancies: a multicolor and locus-specific fluorescence in situ hybridization study." Cancer Genet.Cytogenet. 140.1 (2003): 66-69.

45. Paulsson, K. et al. "Formation of trisomies and their parental origin in hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia." Blood 102.8 (2003): 3010-15.
46. Paulsson, K. et al. "The incidence of trisomy 8 as a sole chromosomal aberration in myeloid malignancies varies in relation to gender, age, prior iatrogenic genotoxic exposure, and morphology." Cancer Genet.Cytogenet. 130.2 (2001): 160-65.
47. Pinkel, D. et al. "Cytogenetic analysis by in situ hybridization with fluorescently labeled nucleic acid probes." Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol. 51 Pt 1 (1986): 151-57.
48. Pinkel, D., T. Straume, and J. W. Gray. "Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 83.9 (1986): 2934-38.
49. Rohen, C. et al. "Trisomy 8 and 18 as frequent clonal and single-cell aberrations in 185 primary breast carcinomas." Cancer Genet.Cytogenet. 80.1 (1995): 33-39.
50. Rohen, G. et al. "Trisomy 8 and 20 in desmoid tumors and breast cancer: more than a casual coincidence?" Cancer Genet.Cytogenet. 86.1 (1996): 92.
51. Sago, H. et al. "True trisomy 2 mosaicism in amniocytes and newborn liver associated with multiple system abnormalities." Am.J.Med.Genet. 72.3 (1997): 343-46.
52. Sinclair, E. J. et al. "Trisomy 15 associated with loss of the Y chromosome in bone marrow: a possible new aging effect." Cancer Genet.Cytogenet. 105.1 (1998): 20-23.
53. Smeets, E., L. Vandenbossche, and J. P. Fryns. "Partial distal trisomy 3p. A partial autosomal trisomy without major dysmorphic features." Genet.Couns. 12.1 (2001): 85-89.
54. Staals, J. E. et al. "Prenatal diagnosis of trisomy 12 mosaicism: normal development of a 3 years old female child." Genet.Couns. 14.2 (2003): 233-37.
55. Starke, H. et al. "First patient with trisomy 21 accompanied by an additional der(4)(:p11 --> q11:) plus partial uniparental disomy 4p15-16." Am.J.Med.Genet.A 116.1 (2003): 26-30.

56. Starke, H. et al. "Molecular cytogenetic characterization of a prenatally detected supernumerary minute marker chromosome 8." Prenat.Diagn. 19.12 (1999): 1169-74.
57. Swiger, R. R. and J. D. Tucker. "Fluorescence in situ hybridization: a brief review." Environ.Mol.Mutagen. 27.4 (1996): 245-54.
58. Van Der Burgt, C. J. et al. "Partial trisomy for 5q and monosomy for 12p in a liveborn child as a result of a complex five breakpoint chromosome rearrangement in a parent." J.Med.Genet. 29.10 (1992): 739-41.
59. Yamada, K. et al. "Chromosome studies in 70 brain tumors with special attention to sex chromosome loss and single autosomal trisomy." Cancer Genet.Cytogenet. 73.1 (1994): 46-52.
60. Yancey, M. K. et al. "Non-mosaic trisomy 16 in a third-trimester fetus." Obstet.Gynecol. 87.5 Pt 2 (1996): 856-60.
61. Zumkeller, W. et al. "Genotype/phenotype analysis in a patient with pure and complete trisomy 12p." Am.J.Med.Genet.A 129.3 (2004): 261-64.

8 Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: DURCHFÜHRUNG DES MUNDSCHLEIMHAUTABSTRICHES MITTELS HOLZSPATEL UND AUSSTREICHEN DER MUNDSCHLEIMHAUTZELLEN AUF DEN OBJEKTTRÄGER.....	21
ABBILDUNG 2: EINLEGEN DER HAARWURZEL IN 60%IGE ESSIGSÄURE FÜR 2 BIS 3 MINUTEN ZUM LOCKERN DER ZELLEN IM HAARWURZELBALG UND AUSSTREICHEN DER HAARWURZELZELLEN AUF DEN OBJEKTTRÄGER.....	22
ABBILDUNG 3: AUF PARAFILM AUFGETROPFTE SONDENLÖSUNGEN.....	30
ABBILDUNG 4: FARBREAKTION DER AUF NITROCELLULOSE-MEMBRAN AUFGEBRACHTEN SONDENLÖSUNG BEI OPTIMALER SONDENMARKIERUNG.....	32
ABBILDUNG 5: MÖGLICHE ERGEBNISSE DES DOT-BLOT.....	33
ABBILDUNG 6: FISH IN BLUTLYMPHOZYTEN: COHYBRIDISIERUNG MITTELS ZENTROMERSONDEN DER CHROMOSOMEN 7 (FITC) UND 10 (TEXAS RED); DISOMIE ZELLEN UND MITOSE.....	42
ABBILDUNG 7: FISH IN HAARWURZELZELLEN: COHYBRIDISIERUNG MITTELS ZENTROMERSONDEN DER CHROMOSOMEN 7 (FITC) UND 10 (TEXAS RED); DISOMIE FÜR CHROMOSOMEN 7 UND 10.....	43
ABBILDUNG 8: FISH IN HAARWURZELZELLEN: COHYBRIDISIERUNG MITTELS ZENTROMERSONDEN DER CHROMOSOMEN 7 (FITC) UND 10 (TEXAS RED); DISOMIE FÜR CHROMOSOMEN 7 UND 10.....	44
ABBILDUNG 9: FISH IN HAARWURZELZELLEN: COHYBRIDISIERUNG MITTELS ZENTROMERSONDEN DER CHROMOSOMEN 7 (FITC) UND 10 (TEXAS RED); EINZELZELLE MIT TRISOMIE 7 BEI DISOMIE DES KONTROLLCHROMOSOMS 10.....	44
ABBILDUNG 10: FISH IN HAARWURZELZELLEN: COHYBRIDISIERUNG MITTELS ZENTROMERSONDEN DER CHROMOSOMEN 7 (FITC) UND 8 (TEXAS RED); EINE ZELLE MIT DISOMIE FÜR CHROMOSOM 7 UND 8, ZWEI ZELLEN MIT TRISOMIE 7 BEI DISOMIE 8.....	44
ABBILDUNG 11: FISH IN MUNDSCHLEIMHAUTZELLEN: COHYBRIDISIERUNG MITTELS ZENTROMERSONDEN DER CHROMOSOMEN 7 (FITC) UND 10 (TEXAS RED); 3 ZELLEN MIT TRISOMIE 7 BEI DISOMIE 10.....	45
ABBILDUNG 12: FISH IN MUNDSCHLEIMHAUTZELLEN: COHYBRIDISIERUNG MITTELS ZENTROMERSONDEN DER CHROMOSOMEN 7 (FITC) UND 10 (TEXAS RED); EINE ZELLE MIT TRISOMIE 7 UND DISOMIE 10; EINE ZELLE MIT DISOMIE 7 UND 10.....	46
ABBILDUNG 13: FISH IN MUNDSCHLEIMHAUTZELLEN: COHYBRIDISIERUNG MITTELS ZENTROMERSONDEN DER CHROMOSOMEN 7 (FITC) UND 10 (TEXAS RED); EINE ZELLE MIT TRISOMIE 7 UND DISOMIE 10.....	46

ABBILDUNG 14: FISH IN MUNDSCHLEIMHAUTZELLEN: COHYBRIDISIERUNG MITTELS ZENTROMERSONDEN DER CHROMOSOMEN 7 (FITC) UND 10 (TEXAS RED); EINE ZELLE MIT TRISOMIE 7 UND DISOMIE 10.....	46
ABBILDUNG 15: FISH IN BLUTLYMPHOZYTEN: COHYBRIDISIERUNG MITTELS ZENTROMERSONDEN DER CHROMOSOMEN 8 (FITC) UND 12 (TEXAS RED); DISOMIE DER GEZEIGTEN ZELLEN UND MITOSEN.....	49
ABBILDUNG 16: NORMALE METAPHASE.....	59
ABBILDUNG 17: NORMALER MÄNNLICHER KARYOTYP: 46,XY.....	60
ABBILDUNG 18: WEIBLICHER KARYOTYP MIT EINER DURCHGEHENDEN INVERSION 6: 46,XX,INV6.....	60
ABBILDUNG 19: VERLUST EINES X-CHROMOSOMS: 45,X-X.....	61
ABBILDUNG 20: ZUGEWINN VON ZWEI X-CHROMOSOMEN: 48,XXXX.....	62
ABBILDUNG 21: STRUKTURELLE ABBERATION.....	63
ABBILDUNG 22: ZUGEWINN VON CHROMOSOM 21: 47,XX+21.....	63
ABBILDUNG 23: VERLUST VON CHROMOSOM 8: 45,XX-8.....	64

9 Dank

Ich danke Fr. P.D. Dr. Yasmin Mehraien und dem ehemaligen Institutsleiter Prof. Dr. Klaus D. Zang für das freundliche Überlassen des Themas. P.D. Dr. Mehraien gilt außerdem mein besonderer Dank für all die kleinen und großen Tipps und Tricks während der praktischen Arbeit im Labor und der folgenden schriftlichen Ausarbeitung.

Des Weiteren gilt mein Dank vor allem Dr. Sandra Ehlhardt für die Unterstützung im Labor und Fr. Ulrike Lindemann für die freundliche Hilfe bei der Durchführung der zytogenetischen Untersuchungen.

Zuletzt gilt mein besonderer Dank der Gemeinschaftspraxis Dr. G. Fromberg – Fr. D. Fromberg, durch deren Kooperation die Akquirierung der Probanden ermöglicht wurde.

10 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Carmen Fromberg
Staatsangehörigkeit: deutsch
Geburtsdatum: 26.09.1979
Geburtsort: Neunkirchen/Saar

Ausbildung

1985 – 1989 Grundschule St. Anna (St. Wendel)
1989 – 1998 Gymnasium Wendalinum (St. Wendel)
Abschluss Abitur
1998 – 2004 Universität des Saarlandes (Homburg/Saar)
Studium der Humanmedizin

Berufserfahrung

01/2005 – 10/2005 DRK-Krankenhaus Birkenfeld
Innere Medizin
01/2005 – 02/2008 Universitätsklinik des Saarlandes
Augenheilkunde
Seit 02/2008 Gemeinschaftspraxis Dr. G. Fromberg / D. Fromberg St. Wendel
Augenheilkunde