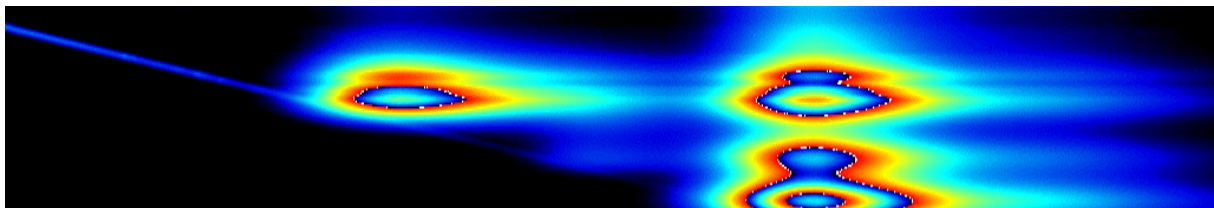


Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer basierter spezifischer Nachweis von mRNA *in vitro* und *in situ*



Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
Dr. rer. nat.

Fakultät für Biologie
Universität Bielefeld

vorgelegt von
Ralf Palmisano
aus München

im Dezember 2003

Die vorliegende Arbeit wurde am Lehrstuhl für Entwicklungsbiologie & Molekulare Pathologie der Universität Bielefeld angefertigt.

Herrn Privatdozent Dr. Thomas Schmitt-John, unter dessen Leitung diese Arbeit entstand, danke ich für die Bereitstellung des Themas, als auch seine freundliche Unterstützung und jederzeitige Hilfestellung während des Fortschreitens der Arbeit.

Frau Professorin Dr. Katharina Kohse-Höinghaus (Leiterin des Arbeitskreises Physikalische Chemie I) danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens und die gute Kooperation.

Mein besonderer Dank geht an Frau Dr. Regina Plessow für ihre kompetente Unterstützung, große Hilfsbereitschaft und das wir alles heile gelassen haben. Vielen Dank an Cand. Dr. rer. nat. Frau Dipl. Chemikerin Kirsten Lotte für all die Aufmunterung und überhaupt, was soll das heißen,... Danke an Herrn Privatdozent Dr. Andreas Brockhinke für die stete Diskussionsbereitschaft. Auch die überaus freundliche Aufnahme, durch alle anderen Mitglieder der Gruppe in der PC I, als „der Quotenbiologe“ war in jeder Hinsicht anspornend.

Frau Dr. Stefanie Leuchtenberger - Danke für die schöne gemeinsame Zeit in all den Dunkelkammern dieser Welt, wo auch immer sie sein mögen und die besten Kaffee Gespräche.

Frau Dipl. Ingenieurin Angela Perz danke ich besonders für ihre tatkräftige Unterstützung und die Weitergabe ihres grandiosen Erfahrungsschatzes. Frau Sandra Heising und Melanie Ronsiek danke ich ausdrücklich für die hochqualifizierte fachliche Unterstützung und ihre herzliche Zuneigung, die immer im entscheidenden Moment das Blatt wendete.

Ebenso herzlich danke ich Frau Dr. Daniela Ehling für die drei Jahre zusammen wohnens im Eck und die klaren deutschen Hauptsätze.

Bei Herrn Privatdozent Dr. Jörg Bartsch bedanke ich mich für seine selbstlose und großartige Hilfe in allen Lagen.

Nicht unterschlagen möchte ich die freundlichen Menschen mit den vielen Haustieren, die mich einfach so aufgenommen haben – Danke schön.

Allen anderen Mitgliedern der Abteilung danke ich, mehr oder weniger, für ihre Hilfsbereitschaft und oft sogar freundschaftliche Haltung. Danke auch an Flan Lapromas! Der Firma Praenadia danke ich für die finanzielle Unterstützung, ohne die diese Arbeit so nicht möglich gewesen wäre. Dem Team von Praenadia danke ich für die konstruktive Zusammenarbeit, besonders Dr. Uwe Schlomann und den anderen Separatisten!

Günter Oberschelps wohlwollende Begleitung war sicherlich immer ein ganz eigener - Event?

Doch ohne meine unglaubliche und geliebte Mutter Ursula Palmisano wäre das alles hier nichts und es wäre schön gewesen, wenn mein ebenso geliebter Vater Erich Palmisano hätte dabeisein können.

Meine liebste Julischka – ohne Dich und dein Lachen und das alles, was sollte ich da machen? Das wäre kein schönes Schiff. Danke, daß Du es ausgehalten hast!

»Glaubst auch Du, daß der Sinn des Lebens einzig in der Leidenschaft besteht, die eines Tages in unsere Herzen, Seelen und Körper fährt und dann auf ewig? Was immer zwischendurch geschehen mag? « [...] »Denn die Leidenschaft begründet sich nicht aus der Vernunft. Der Leidenschaft ist es völlig gleichgültig, was sie zurückbekommt, sie will sich ausdrücken, sich ganz ausleben, auch dann, wenn sie dafür nur sanfte Gefühle, Höflichkeit, Freundschaft oder Geduld erhält. Jede große Leidenschaft ist hoffnungslos, sonst wäre sie keine Leidenschaft, sondern eine klug berechnete Übereinkunft, ein Tauschhandel mit lauwarmen Interessen. « [...] »Und wenn wir die Leidenschaft erlebt haben, haben wir dann vielleicht doch nicht umsonst gelebt? Ist die Leidenschaft so tief, so grausam, so großartig, so unmenschlich? «

(20. Jahrhundert)

aus:

Sandor Márai

Die Glut - »A gyertyák csonkig égnek«

1	EINLEITUNG	1
1.1	Pränatale Diagnostik	1
1.2	Detektion fötaler Zellen im maternalen Blutkreislauf.....	3
1.3	Ablauf der Hämoglobinsynthese in der Ontogenese.....	6
1.4	Nucleinsäuren als fluoreszenzspektroskopische Werkzeuge	8
1.5	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer.....	9
1.6	Ziel dieser Arbeit	15
2	MATERIAL & METHODEN.....	16
2.1	Material.....	16
2.1.1	Zelllinien	16
2.1.2	Blutproben.....	16
2.1.3	Oligonucleotide	17
2.1.4	Extrinsische Fluorophore	19
2.1.5	PCR-Primer	21
2.1.6	DNA-Fragmentlängenmarker.....	22
2.1.7	Enzyme	22
2.1.8	Antibiotika.....	22
2.1.9	Nährmedien.....	22
2.1.10	Microinjektion.....	23
2.1.11	Transfektionsagenzien.....	23
2.1.12	Mikrobiologische Systeme	23
2.1.13	Bildgebende Systeme	24
2.1.14	Physikalische Komponenten.....	24
2.1.15	Datenbanken.....	26
2.2	Methoden.....	28
2.2.1	Handhabung und Aufbereitung von Zelllinien.....	28
2.2.2	Lagerung von Zellkulturen.....	28
2.2.3	Kultivierung von Zellen.....	28

2.2.4 Kulturansatz K-562-, Hel92.1.7- und JurkatE6.1-Zellen.....	29
2.2.5 Anreicherung von Blutzellen aus Nabelschnurblut.....	29
2.2.6 Reinigung der nucleierten Erythrozyten.....	30
2.2.7 Behandlung der maternalen Blutproben.....	30
2.2.8 RNA Extraktion aus Zellkultur (Qiagen).....	30
2.2.9 Reverse Transkription.....	31
2.2.10 Amplifizierung der cDNA (PCR).....	32
2.2.11 Agarose Gel-Elektrophorese.....	33
2.2.12 Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren.....	35
2.2.13 Äquilibrierung der fluoreszenzmarkierten DNA Oligonucleotide.....	35
2.2.14 Stimulierung der Globinexpression mit Hemin.....	36
2.2.15 Transfektionsmethoden.....	37
2.2.16 Mikroinjection in K-562 Zellen.....	39
2.2.17 Elektroporation.....	40
2.2.18 PFA/Eisessig Fixierung nach Mikroinjection.....	40
2.2.19 Tween-20 Transfektion mit praefixierten Zellen.....	41
2.2.20 Transfection mit Oligofectamin und Plus-Reagenz.....	41
2.2.21 Transfection mit Rotifect.....	42
2.2.22 Transfection mit Rotifect - über Nacht.....	43
2.2.23 Transfection mit Metafect.....	44
2.2.24 Transfection mit Oligofectamin für Confokale Präparate.....	44
2.2.25 Berechnung der FRET-Effizienz aus den confokalen Bildaufnahmen.....	45
2.2.26 Anregungs-Emissions-Spektroskopie.....	46
2.2.27 Aufbau des Meßsystems.....	47
2.2.28 Erstellung eines Anregungs-Emissions-Spektrums.....	49
2.2.29 Darstellung der Meßpunkte zur Auswertung der AE-Spektren.....	51
2.2.30 DNA - RNA <i>in vitro</i> Hybridisierung.....	53
2.2.31 Bildnachbearbeitung.....	54
3 ERGEBNISSE.....	55
3.1 AES-Messungen.....	55
3.1.1 Untersuchung des AE-Spektrums des SSC-Puffers.....	55
3.1.2 Kontrollmessungen zur Primerkonzentration.....	56
3.1.3 Korrelation von Temperatur und GC-Gehalt.....	58

3.1.4 Einfluß der Primerlänge auf den Energietransfer	61
3.1.5 Fluorescein mit unterschiedlichen Akzeptor-Fluorophoren.....	62
3.1.6 Doppelt Fluorescein markierte Donor Primer	66
3.1.7 Texas-Red mit unterschiedlichen Donor-Fluorophoren.....	69
3.1.8 Vergleich von interner und endständiger Markierung mit Fluorophoren.....	72
3.1.9 5' - 3' Markierung kurzkettiger DNA-Oligonucleotide	74
3.1.10 Loop-Struktur DNA-Oligonucleotide	75
3.1.11 Hybridisierung extrahierter G- γ -Globin mRNA mit DNA-Oligonucleotiden.....	78
3.2 Zellkultur	80
3.2.1 Elektroporation von K-562 Zellen	80
3.2.2 Vergleich verschiedener Zellkulturmedien.....	81
3.2.3 Induktion der Globinsynthese in K-562 Zellen.....	83
3.3 <i>In situ</i> Hybridisierungen.....	85
3.3.1 Transfektionen von Blutproben.....	85
3.3.2 Transfektion von maternalem Blut.....	86
3.3.3 Transfektion mit Molecular Beacons	88
3.3.4 Elektroporation von K-562 Zellen	89
3.3.5 Permeabilisierung von Zellen mit Tween20 und Triton-X 100	91
3.3.6 Vergleich der Transfektion mit verschiedenen Liposomenformulierungen	95
3.3.7 Darstellung der Membranbarriere für PTA modifizierte Primer	97
3.3.8 Microinjektion zur <i>in situ</i> DNA-RNA Hybridisierung	100
3.3.9 Liposomentransfektion zur <i>in situ</i> DNA-RNA Hybridisierung	102
4 DISKUSSION & AUSBLICK.....	108
4.1 Diskussion der AES Ergebnisse.....	108
4.1.1 Strategie zur Erzeugung eines FRET-Signals durch DNA-RNA <i>in situ</i> Hybridisierung	108
4.1.2 Kontrolluntersuchung zur Fluorophorkonzentration.....	109
4.1.3 Betrachtung unterschiedlicher Oligonucleotidlängen.....	113
4.1.4 Vergleich unterschiedlicher Akzeptor-Fluorophore für das Donor-Fluorophor Fluorescein und den optimalen Abstand der Fluorophore zueinander.....	114
4.1.5 Vergleich unterschiedlicher Donor-Fluorophore für den Akzeptor-Fluorophor Texas- Red	117

4.1.6 Betrachtung doppelt Fluorescein markierter Donor-Oligonucleotide.....	118
4.1.7 Wellenlängen Verschiebung nach Fluoreszenzlöschung durch Dabcyl	119
4.1.8 Überlegung zur Umgehung des stöchiometrischen Problems.....	120
4.1.9 Hybridisierung fluoreszenzmarkierter DNA-Oligonucleotide an native mRNA.....	122
4.2 Diskussion der <i>in situ</i> Untersuchungen.....	122
4.2.1 Zellkultur Untersuchungen.....	122
4.2.2 Untersuchung von maternalen und fötalen Blutproben.....	125
4.2.3 Beurteilung von Molecular Beacons als Hybridisierungssonden.....	127
4.2.4 Elektroporation von K-562 Zellen mit und ohne Liposomen Unterstützung.....	127
4.2.5 Vergleich von PTA modifizierten und unmodifizierten fluoreszenzmarkierten Oligonucleotiden bei Tween Transfektion.....	128
4.2.6 Vergleich der Transfektionseffizienz von K-562 Zellen durch verschiedene Liposomenformulierungen.....	129
4.2.7 Durchtrittsdauer PTA-modifizierter Oligonucleotide durch die Zellmembran.....	130
4.2.8 Microinjektion von γ -Globin Antisense-Primern in K-562 Zellen.....	131
4.2.9 <i>In situ</i> Detektion von mRNA durch FRET.....	132
4.3 Zusammenfassende Betrachtung und Ausblick	133
5 LITERATUR	135
6 ANHANG.....	I
6.1 Abkürzungen.....	I
6.2 Sequenzen.....	III

Zusammenfassung

In den letzten Jahren sind große Fortschritte auf dem Gebiet der molekularen Diagnostik erzielt worden. Die molekulargenetischen Grundlagen vieler *de novo* oder erblich auftretender Erkrankungen bei Föten konnten eingegrenzt oder aufgeklärt werden. Dies hat zu verbesserter und aussagekräftigerer vorgeburtlicher Befundung in der Folge nicht-invasiver und invasiver Diagnostik geführt. Unbefriedigend ist die derzeitige Situation, daß keine risikofreie nicht-invasive Routine zur Erlangung fötalen Zellmaterials zur Verfügung steht. Bei der Separation humaner Zelltypen spielt die Bindung von fluoreszenzmarkierten Antikörpern oder Liganden und anschließende Fluoreszenz aktivierte Zellsortierung eine wichtige Rolle. Diese Markierungen sind jedoch nicht in jedem Falle von ausreichender Spezifität und damit Selektivität hinsichtlich der gesuchten Zellen. Eine andere Möglichkeit der selektiven Identifikation einer Zelle bestimmter Herkunft kann der Expressionsstatus ausgewählter Gene sein. Die Korrelation der Aktivität eines spezifischen Gens mit Herkunft und Typ der Zelle muß zweifelsfrei und einzigartig sein. Wenn sich dieses Transkriptionsprodukt *in situ* eindeutig nachweisen ließe, hätte man eine Methode die hochspezifisch wäre, wenn gleichzeitig falsch positive Signale ausgeschlossen werden können. Eine Methode die aufgrund ihrer Wirkungsweise dafür geeignet scheint ist die Transfektion mit fluoreszenzmarkierten Antisense Oligonucleotiden, welche nach Hybridisierung an die Ziel mRNA einen Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET) erzeugen können.

In dieser Arbeit wird untersucht, ob durch eine solche *in situ* Hybridisierung von DNA-Oligonucleotiden an mRNA ein FRET-Signal erzeugt werden kann, daß außerhalb der Zelle detektierbar ist. Daher teilt sich die Arbeit in zwei Schwerpunkte auf.

In dem einen Teil wurden fluoreszenzmarkierte DNA-Oligonucleotide hinsichtlich der optimalen Parameter für einen FRET untersucht, der im sichtbaren Wellenlängenbereich detektierbar sein muß. Diese Untersuchungen wurden mit Hilfe der Anregungs-Emissions-Spektroskopie durchgeführt, die eine zweidimensionale Aufnahme von Fluoreszenzspektren ermöglicht. Hierbei wurde gezeigt, daß die Kombination der beiden Fluorophore Bodipy493/503 und Texas-Red den stärksten FRET aus einer untersuchten Gruppe von jeweils fünf verschiedenen Donor- und Akzeptor-Fluorophoren erzeugt. Es wurde auch gezeigt, daß geeignete DNA-Oligonucleotide jeweils eine Länge von mindestens 25 Nucleotiden und einen hohen GC-Gehalt aufweisen sollten, um die Stabilität der Hybridisierung zu gewährleisten, als auch Sequenzhomologien die zu Fehlpaarungen führen auszuschließen. Es wurde des weiteren gezeigt, daß sich Phosphothioat-modifizierte DNA-Oligonucleotide in ihren spektroskopischen Eigenschaften nicht von unmodifizierten unterscheiden.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden die Möglichkeiten der Transfektion von Zellen mit Antisense-Oligonucleotiden untersucht. Es wurden verschiedene physikalische und chemische Transfektionsmethoden verglichen und nach einer geeigneten Fixierungsmethode gesucht, welche die Zellen für weitere Untersuchungen stabilisiert. Als Modellsystem wurde die chronisch myelogene Leukämie Zelllinie K-562 ausgewählt, die nach Induktion stabil die fötalen ϵ - und γ -Globin Gene exprimiert. Als beste Methode hat sich die Transfektion der Zellen mit Phosphothioat-modifizierten Oligonucleotiden und dem kationischen Transfektionsmittel Oligofectamine sowie nachfolgender Paraformaldehyd/Eisessig Fixierung herausgestellt. Die Zellen wurden mit einem Confokalen Laser Scanning Mikroskop untersucht und der FRET in den Zellen durch „Akzeptor-Bleichung“ nachgewiesen und quantifiziert. Als Negativkontrollen dienten zum einen Sense-Oligonucleotide der jeweiligen Sequenzen und eine zweite Zelllinie die keine Globin Gene exprimiert und mit den Antisense-Oligonucleotiden transfiziert wurde.

1 Einleitung

1.1 Pränatale Diagnostik

Mit der nunmehr verkündeten, fast vollständigen Entzifferung des menschlichen Genoms (VENTER ET AL., 2001) ist die humanbiologische Forschung ins breite Rampenlicht der Öffentlichkeit zurückgekehrt. Dies wirkt sich auch auf den Bereich der pränatalen Diagnostik aus. Die Erwartungshaltung an die biologisch-medizinische Forschung ist mit dieser Präsenz in der öffentlichen Diskussion ebenfalls gestiegen.

Bisher veranlaßten vor allem folgende Faktoren die werdenden Eltern eine pränatale Diagnostik durchführen zu lassen, um mögliche Schäden und Erkrankungen an der Leibesfrucht frühzeitig zu erkennen, die sogenannte Altersindikation (Mutter >35 Jahre), erhöhtes Risiko unbalancierter und struktureller Chromosomenanomalien, familiäre Chromosomenaberrationen oder bereits in der Familie aufgetretene Neuraldefekte (z.B. *Spina bifida*). Zur Erlangung solcher Informationen bedient sich die pränatale Diagnostik zweier Arten von etablierten Untersuchungen, der invasiven und der nicht-invasiven Diagnostik. In der Regel steht in der zeitlichen Abfolge zuerst die nicht-invasive Diagnostik als routinemäßiges Verfahren. Die nicht-invasive Diagnostik stellt, da sie eines operativen Eingriffs nicht bedarf, keine Gefahr für Mutter und Kind dar. Prominenteste Vertreter dieser Methoden sind hier bildgebende Verfahren mittels Ultraschall und die Bestimmung von Serumparametern, dem sogenannten Serumscreening. Auffällige Sonographiebefunde, unterstützt von einem ungünstigen Befund der Hautdickenmessung des fötalen Nackenbereichs („nuchal translucency“) (SNIJDERS UND NICOLAIDES, 1996), als auch der Ossifikation des Nasenknochens („nasal bone“) (VIORA ET AL., 2003) können eine weitergehende Abklärung erforderlich werden lassen. Das Standard Verfahren beim Serumscreening (WALD ET AL., 1995) ist der sog. Triple-Test bei dem die Konzentration der folgenden drei Eiweiße, humanes Choriongonadotropin (hCG), α -Fetoprotein (AFP) und unkonjugiertes Östriol (uE_3), im mütterlichen Blut festgestellt wird. Mittlerweile werden aber auch andere Proteine zur Risikoabschätzung herangezogen. Im Serum sind dies unter anderem das β -hCG, das Schwangerschafts assoziierte Plasma Protein-A (PAPP-A) und Inhibin-A. Außerdem können Titerabweichungen von β -hCG, hCG und dem invasiven Trophoblast Antigen (hyperglycosylated hCG) auch im Urin gemessen werden (WALD ET AL., 2003).

Beide nicht-invasiven Verfahren geben vor allem Aufschluß über numerische Chromosomenaberrationen (Trisomie 13, 18 und 21). Erhöhtes α -Fetoprotein kann auch ein Hinweis auf eine *Spina bifida* sein. Dem Vorteil der unmittelbaren Risikofreiheit stehen abhängig von der Methode aber auch Nachteile gegenüber. Die Beurteilung sonographischer Bilder setzt ein hohes Maß an Können und Erfahrung voraus. Beim Serumscreening, das erst ab der 15. Woche der Gestation möglich ist, steht einer Entdeckungsrate chromosomaler Anomalien von 70 % eine falsch-positive Rate von 6 % gegenüber (TORRICELLI & PESCUCCI, 2001). Daher müssen pathologische Befunde in der Regel durch eine invasive Methode bestätigt werden. Außerhalb der Eingangs genannten medizinischen Indikationen ist eine invasive pränatale Diagnostik derzeit nicht zulässig (WISSENSCHAFTLICHER BEIRAT DER BUNDESÄRZTEKAMMER, 1998). Somit bleiben bei unauffälligen Befunden durch nicht-invasive Diagnostik 75 % aller Aneuploidien, gemessen am Anteil aller Neugeborenen, unentdeckt (MINY ET AL., 1999).

Derzeit sind drei verschiedene invasive Verfahren in der pränatalen Diagnostik etabliert. Allen drei Verfahren liegt dieselbe Vorgehensweise zugrunde. Eine Punktion durch die Bauchdecke der Schwangeren, in der Regel durch den Bauchnabel. Unter Ultraschallkontrolle wird eine Punktionsnadel zum Ziel innerhalb der Fruchtblase geführt. Das Ziel innerhalb der Fruchtblase hängt vom Zeitpunkt der Untersuchung ab. Sinn und Zweck sind zelluläres Material des Fötus zu erhalten. Die frühestmögliche Untersuchungsmethode ist die Chorionzottenbiopsie. Hierbei werden fötale Zellen aus dem Choriongewebe, welches sich durch Ausbildung von Zotten in die Gebärmutterschleimhaut eingesenkt hat, entnommen. Das Risiko eines Aborts in Folge dieses Eingriffs liegt derzeit bei 2-3 %. Die Entnahme ist im ersten Trimenon von der 11. bis zur 14. Schwangerschaftswoche (SSW) möglich.

Die Amniozentese, die auf die Gewinnung von Amnionflüssigkeit und in dieser befindlichen fötalen Zellen abzielt, ist derzeit das hauptsächlich verwendete invasive Verfahren. Hierbei werden 15 - 20 ml Fruchtwasser entnommen. Eine Untersuchung des Eiweißtiters in der Fruchtwasserprobe ist Standardverfahren. Die Fruchtwasserentnahme findet in der 15. bis 18. Woche statt. Die Frühamniozentese hat sich als zu anspruchsvoll erwiesen und aufgrund des deutlich erhöhten Risikos eines Spontanabortes nicht etabliert (EIBEN ET AL., 1997). Das Risiko eines Spontanabortes im Umfeld des Eingriffs ist mittlerweile auf 0,5 - 1 % gesunken (TORRICELLI & PESCUCCI, 2001). Bei beiden Eingriffen ist die Gefahr einer Kontamination der Probe mit maternalem Gewebe gegeben. Direkte Untersuchungen an dem gewonnenen Material müssen daher zwingend durch Untersuchungen von Langzeitkulturen aus derselben Probenentnahme validiert werden. Daher liegen zwischen Untersuchung und Befundung in

der Regel 2 bis 3 Wochen. Die invasiv erhaltenen fötalen Zellen werden zu verschiedenen Untersuchungen herangezogen, welche im sogenannten „Goldstandard“ zusammengefaßt sind. Dieser sieht eine mikroskopgestützte Karyotypisierung, eine cytogenetische Untersuchung der Chromosomen nach G-Banden Färbung und eine computerunterstützte Überprüfung der strukturellen Integrität der Chromosomen vor. Außerdem können die fötalen Zellen, standardisierten FISH-Schnelltests (Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung) unterworfen werden, welche numerische Veränderungen der Chromosomen 13, 18 und 21, als auch der Gonosomen einfach und zuverlässig detektieren. In klinischen Studien konnte die zuverlässige Anwendung des FISH-Schnelltests für die in ihrer Gesamtheit am häufigsten (80-95%) auftretenden Aneuploidien der Chromosomen 13, 18, 21, X und Y gezeigt werden (PERGAMENT ET AL., 2000). Diese Untersuchungsmethodik hat die diagnostischen Möglichkeiten erweitert und FISH-Sonden auch für andere chromosomale Anomalien werden sicher bald ihren Weg in die pränatale Routinediagnostik finden.

Das dritte Verfahren hat eine Entnahme fötalen Blutes aus der Nabelschnur zum Ziel. Die Cordozentese wird ab der 20. Woche angewandt und das Ergebnis der Chromosomenanalyse liegt in der Regel nach 5 Tagen vor. Hier beträgt das Risiko einer durch die Punktion ausgelösten Fehlgeburt 0,5 - 1 % (MURKEN, S. 172).

Auch wenn durch die Fortschritte der minimalinvasiven Chirurgie der Eingriff selbst nur ein geringes Risiko für die Patientin darstellt, bleibt neben des Risikos von Spontanaborten, auch die Gefahr der mechanischen Schädigung des Fötus. Diese Problematiken erfordern eine äußerst gewissenhafte Abwägung eines solchen Eingriffs.

Unabhängig von diesen Faktoren besteht die unbefriedigende Situation, daß eine Indikation für eine Schwangerschaftsunterbrechung frühestens in der Mitte des zweiten Trimenons erfolgen kann. Dies führt zu einer erheblichen psychischen Belastung sowohl des klinischen Personals, als auch der Eltern. Um diese Nachteile der invasiven Verfahren zu umgehen, wird seit langem versucht fötale Zellen, welche ins maternale Blutgefäßsystem gelangt sind, zu identifizieren und einer Diagnostik zugänglich zu machen.

1.2 Detektion fötaler Zellen im maternalen Blutkreislauf

An dem Problem, nucleierte fötale Zellen aus maternalem Blut zu gewinnen, wird seit dem Nachweis des fötal-maternalen Transfers von Lymphozyten durch Walknowska (WALKNOWSKA ET AL., 1969) intensiv gearbeitet. Verschiedene Wege, um an im maternalen Gefäßsystem zirkulierenden Zellen zu gelangen, sind Gegenstand der Forschung in den

letzten Jahren und zielen auf unterschiedliche Merkmale, wie morphologische und physiologische Besonderheiten oder zellspezifische intra- oder extrazelluläre Marker. Zu nennen sind die Ansätze über Dichtegradientenzentrifugation eine Fraktion rein fötaler Zellen zu erhalten oder die selektive Lyse der maternalen roten Blutkörperchen durch einen Ammoniumchloridpuffer. Andere Ansätze sind die Mikromanipulation (*cell picking*) und die Kultivierung und Anreicherung fötaler Erythroblasten. Einen breiten Raum nimmt die Zellmarkierung mit anschließender Sortierung durch verschiedene physikalische Methoden ein. Nach Kopplung von Eisen (TROEGER ET AL, 1999) oder Fluorophoren (SEKIZAWA, 1999) an geeignete Sonden, wie Antikörper oder Liganden für zelluläre Marker, wird eine magnetisch oder fluoreszenz aktivierte Zellsortierung (MACS oder FACS) durchgeführt. Neben diesen zellbasierten Methoden wird auch nach fötaler DNA im maternalen Blut gesucht, seit Lo und Kollegen 1997 der Nachweis ebensolcher mittels einer Y-Chromosom spezifischen Polymerasen Ketten Reaktion (PCR) gelang (LO ET AL, 1997).

Bei der Suche nach fötalen Zellen stellt sich auch die Frage welcher Zelltyp der geeignetste hinsichtlich Erreichbarkeit ist. Endovaskuläre Trophoblasten des Fötus ersetzen maternale Endothelzellen in den Gefäßen des Uterus, um eine sichere und konstante Versorgung des Fötus zu gewährleisten. Dies hat zur Folge, daß diese Zellen durch Ablösung in das Blut der Mutter gelangen und damit dort nachweisbar sind (WIJK ET AL, 2001). Ihre wohl nur geringe Anzahl (BENIRSCHKE ET AL, 1994), häufige Mehrkernigkeit und der Nachweis von Mosaikzuständen (HENDERSON ET AL, 1996), lassen Trophoblasten nicht sehr geeignet erscheinen.

Fötale Lymphozyten wurden zuerst von Herzenberg und Kollegen mittels Durchflußcytometrie nachgewiesen (HERZENBERG ET AL, 1979). Allerdings setzt dieses Verfahren ein genetisch polymorphes Elternpaar und die mit Sicherheit zutreffende Vaterschaft voraus. Außerdem konnte die Gruppe um Bianchi zeigen, daß diese Zellen bis zu 27 Jahre im maternalen Blut persistieren können (BIANCHI ET AL, 1996). Damit scheidet dieser Zelltyp aus weiteren Betrachtungen aus.

Die dritte Gruppe fötaler Zellen die sicher im maternalen Blut nachgewiesen werden konnte sind die fötalen Erythroblasten. Hinsichtlich ihrer durchschnittlichen Lebensdauer von 90 Tagen ist eine Persistenz aus einer vorherigen Schwangerschaft praktisch ausgeschlossen. Im Gegensatz zu den Lymphozyten ist die Entwicklung der fötalen Erythroblasten schon im ersten Trimenon weit fortgeschritten (BIANCHI, 1998). Allerdings fällt ihr Anteil im Fötus nach 19 Wochen auf 0,5 % (TORRICELLI & PESCUCCI, 2001). Hinzu kommt die Möglichkeit von geringen Mengen nucleierter roter Blutkörperchen (NRBCs) maternalen Ursprungs

(SLUNGA-TALLBERG, 1996). Dies sind nicht die einzigen Gründe dafür, daß es noch keine Routinemethode gibt, um nucleierte fötale Zellen aus maternalem Blut zu isolieren (BIANCHI, 1999). Die stark schwankende Anzahl der zu erwartenden fötalen Erythroblasten stellt einen weiteren wesentlichen Faktor dar. Die Anzahl schwankt sowohl unter dem Einfluß individueller Faktoren, als auch des Zeitpunktes der Schwangerschaft stark (HAMADA ET AL., 1993). Die Bandbreite für die Anzahl von NRBCs fötalen Ursprungs zu maternalen NRBCs im mütterlichen Blut reicht derzeit von $1 : 10^5$ bis $1 : 10^9$ (GOLDBERG ET AL., 1997; BIANCHI, 1995). Da der technisch bedingte Verlust von Zellen im Zuge einer Zellanreicherung nur schwer quantifizier- und vor allem vergleichbar ist, lassen sich die unterschiedlichen Studien nur schwer miteinander vergleichen. Während Hamada eine Frequenz von $1 : 10^5$ bis $1 : 10^4$ über den Gesamtverlauf der Gestation angibt (HAMADA ET AL., 1993), kommen andere Studien auf Werte von 3 bis 74 fötale Zellen in 15 bis 40 ml maternalen Blutes (ELIAS ET AL., 1992; HAWES ET AL., 1994; READING ET AL., 1995; TAKABAYASHI ET AL., 1995; WESSMAN ET AL., 1992). Mit einer mikroskopgestützten Methode hat Krabchi (KRABCHI ET AL., 2001) eine Anzahl von 2 bis 6 fötalen NRBCs auf 1 ml Blut ermittelt. Hierbei wurden die Zellen durch der PRINS-Technik (*primed in situ labeling*) markiert und dann unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgezählt.

Neben diesem grundsätzlichen Problem die Anzahl der zu erwartenden Zellen nicht zweifelsfrei zu kennen, tritt noch die Schwierigkeit einen ausschließlich auf fötale Zellen passenden Marker zu finden. Der Standard Marker für nucleierte Erythroblasten ist der gegen den Transferrin-Rezeptor CD-71 gerichtete Antikörper, der allerdings nicht in gewünschtem Maße zellspezifisch, sondern generell auf Zellen zu finden ist, die Eisen aufnehmen (MARTIN ET AL., 1998). Auch andere Antikörper, wie Anti-Glycophorin A (LEWIS ET AL., 1996; PRICE ET AL., 1991) oder die intra-cytoplasmatische Anfärbung des fötalen Hämoglobins durch einen Antikörper, zeigen nicht die gewünschte hochspezifische Bindungsfähigkeit. Ein anderer Ansatz ist der Einsatz von Liganden. Diese sollten aufgrund ihres langen evolutionären Prozesses eine noch höhere Spezifität für ihre Rezeptoren besitzen und damit die Wahrscheinlichkeit von Kreuzreaktionen weiter minimieren (SERLACHIUS ET AL., 2000). Die Unterscheidung hinsichtlich des unterschiedlichen Hämoglobinprofils adulter und fötaler erythroider Vorläuferzellen aus maternalem peripherem Blut wird von der Gruppe um Bohmer verfolgt. Hier wird schon auf die Unterscheidung hinsichtlich der an der Synthese beteiligten Hämoglobinproteine (Hb) abgezielt (BOHMER ET AL., 1998). Letztlich handelt es sich auch hier um fluoreszenzmarkierte Antikörper, nämlich PE-anti-HbF (Phycoerythrin) und FITC-anti-HbA (Fluorescein-Isothiocyante).

1.3 Ablauf der Hämoglobinsynthese in der Ontogenese

Die vorher beschriebenen Methoden, die sich auf die Markierung des Hämoglobins beziehen, um fötale Zellen einer automatisierten Separation zugänglich zu machen basieren auf der Erkennung des funktionalen Produktes. Die in der Ontogenese zeitlich gestaffelten, sich überschneidenden Synthese mehrerer unterschiedlicher Hämoglobinvarianten. Das β -Globingen-Cluster ist eines der beiden Multigen-Cluster (EFSTRATIADIS, 1980) welches, zusammen mit dem α -Globingen-Cluster (MORRISON ET AL, 1997), das auf Chromosom 16 lokalisiert ist, an der Bildung des humanen Hämoglobins (DICKERSON, 1983) beteiligt ist. Das β -Globingen-Cluster erstreckt sich über mehr als 50 kB auf dem Chromosom 11 und enthält 6 Gene (Abb. 1-1), die in der Reihenfolge ihrer zeitlichen Aktivität während der Ontogenese angeordnet sind. Auf das ϵ -Gen folgen die beiden Varianten des γ -Gens $G\gamma$ und $A\gamma$. Danach lokalisiert das $\psi\beta$ -Pseudogen, woran sich das δ -Gen anschließt. Das Cluster wird durch das β -Gen beendet. Diese Gene werden durch eine strangaufwärts (5000 - 16000 bp) liegende „Locus-Control-Region“ (LCR) im zeitlichen Verlauf (Abb. 1-2) der Ontogenese an- und abgeschaltet (WIJGERDE, 1995). Alle Gene der beiden Globin-Cluster enthalten drei Exons und zwei Introns. Daher muß die transkribierte prä-mRNA erst gespleißt werden, um dann als translatierbare mRNA an Ribosomen abgelesen zu werden. Die Synthese der verschiedenen Genprodukte findet, korrelierend mit der zeitlichen Abfolge, an unterschiedlichen Blutbildungsorten (ORKIN, 1996) statt.



Abb. 1-1 Karte des Gen-Clusters der β -Typ-Kette des humanen Hämoglobins.

Das ϵ -Globin wird im Dottersack, dem primären Ort der Blutbildung produziert. Die beiden Gene $G\gamma$ und $A\gamma$ werden ebenso wie das β -Gen in der Leber und der Milz, den sekundären und tertiären Orten der Blutbildung, des Fötus exprimiert. Das β -Gen wird ab dem vierten Monat, mit Beginn der Proliferation der Retikulocyten, auch im Knochenmark, das der endgültige Ort der Blutbildung ist, synthetisiert. Die Synthese nimmt dort zum Ende der Schwangerschaft in dem Maße zu, wie die Produktion des β -Gens und die des γ -Globins in Leber und Milz abnimmt. Im siebten Monat kommt in geringer Menge (2,5 %) das δ -Globin hinzu, welches ausschließlich im Knochenmarkstroma produziert wird.

Beim Hämoglobin handelt es sich um ein Tetramer, welches sich aus 2 gleichen Untereinheiten des α - und des β -Typs und je einem Häm als prosthetische Gruppe zusammensetzt.

Das Proteinprodukt des ϵ -Gens bildet zusammen mit dem des ξ -Gen das embryonale Hämoglobin (Hb Gower 1) $\xi_2\epsilon_2$ und wird bis zum dritten Monat der Entwicklung produziert. Die einzigen Marker, welche tatsächlich spezifisch für fötale Zellen zu sein scheinen, sind embryonales Hämoglobin Epsilon (ϵ) und Zeta (ζ) (MESKER ET AL., 1998). Allerdings werden diese Marker nur in geringen Mengen in nucleierten fötalen Erythroblasten exprimiert. Um die sechste Lebenswoche beginnt der Embryo mit der Synthese von α_1 , α_2 , $G\gamma$ und $A\gamma$ -Globin. In demselben Maße wie jetzt die Produktion des fötalen Hämoglobins (Hb F) $\alpha_2\gamma_2$ einsetzt, nimmt die des embryonalen Hämoglobins ab, bis schließlich am Ende des dritten Monats nur noch das fötale Hämoglobin produziert wird. In der Übergangsphase vom embryonalen zum fötalen Hämoglobin kommt es in geringem Umfang auch zu Kombinationen von ξ -Globin und γ -Globin zu $\xi_2\gamma_2$ (HB Portland) und von α -Globin und ϵ -Globin zu $\alpha_2\epsilon_2$ (HB Gower 2). Diese Produkte sind jedoch mit Einstellung der jeweiligen Globinproduktion (ξ , ϵ) wieder verschwunden.

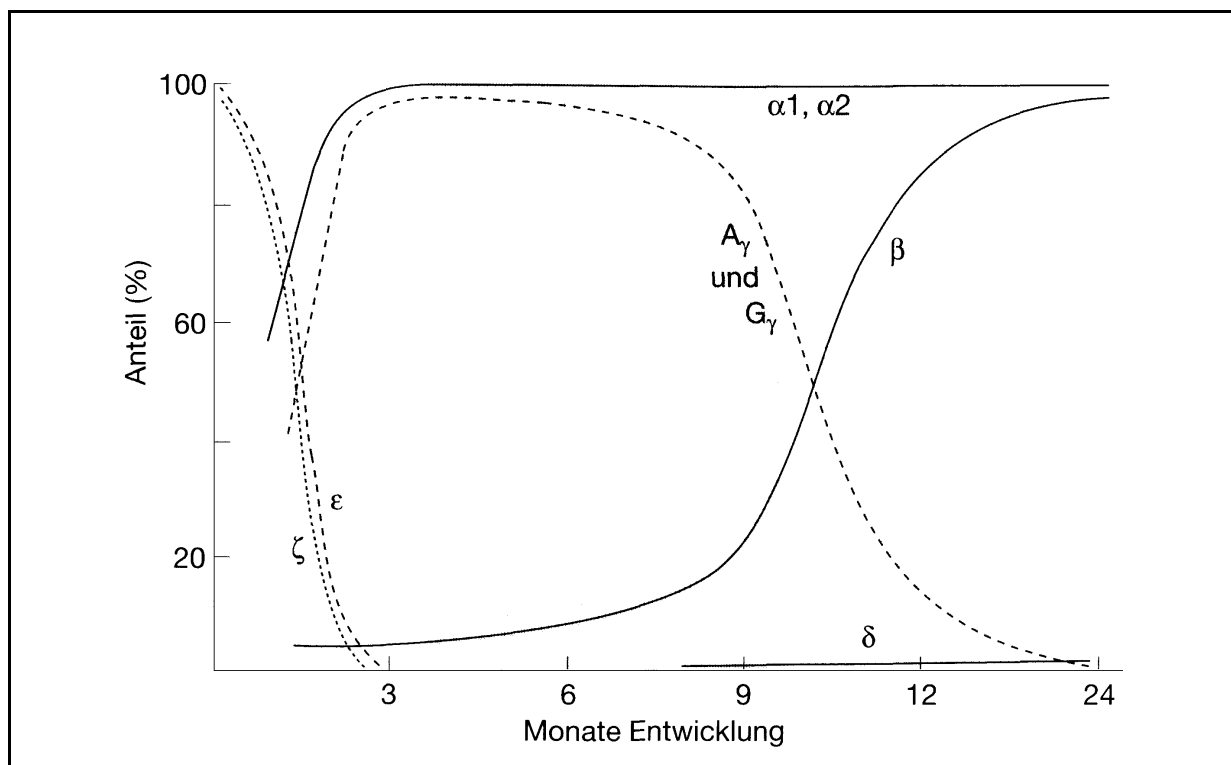


Abb. 1-2 Das entwicklungspezifische Expressionsmuster der Globinketten.

Im adulten Blut tauchen dann noch 3 Varianten des Hämoglobins auf. Mit 97% stellt dann $\alpha_2\beta_2$ (Hb A₁), das Produkt aus α -Globin und β -Globin, den größten Anteil. Zu einem kleinen Teil (2,5 %) wird auch weiterhin das $\alpha_2\delta_2$ -Hämoglobin (Hb A₂) gebildet. Ebenso bleibt die Hb F Synthese aktiv und fötales Hämoglobin im adulten Blut nachweisbar (PEMBREY ET AL., 1973), dessen Anteil an der Gesamthämoglobinmenge bei 0,5 % liegt.

1.4 Nucleinsäuren als fluoreszenzspektroskopische Werkzeuge

Träger der Erbinformation des uns bekannten Lebens sind die Nucleinsäuren Ribonucleinsäure (RNA) und Desoxyribonucleinsäure (DNA). Nucleinsäuren sind Heteropolymere aus aneinandergelagerten Nucleotiden. Jedes Monomer besteht aus drei verschiedenen Einheiten, einer Phosphatgruppe, einem Monosaccharid (Pentose) und einer von 5 verschiedenen stickstoffhaltigen Nucleobasen. Diese Nucleobasen sind die Purine Adenin und Guanin und die Pyrimidine Cytosin, Thymin, und Uracil. RNA und DNA tragen ihre Namen aufgrund der unterschiedlichen Zuckerkomponente, einer 2'-Desoxyribose bei DNA und einer Ribose bei RNA. Die strukturellen Eigenschaften werden überwiegend durch das Zucker-Phosphat-Rückgrat bestimmt, während die Stickstoffbasen entscheidend für die Informationsspeicherung und Übertragung sind. Das hydrophile Zucker-Phosphat-Rückgrat liegt außen und die Stickstoffbasen zeigen nach innen. Nur die Verknüpfung eines Purins mit einem Pyrimidin ergibt eine befriedigende Anordnung. In der RNA wird das Thymin durch Uracil ersetzt. Zwischen Adenin und Thymin/Uracil wird eine zweifach und zwischen Guanin und Cytosin eine dreifach Wasserstoffbrückenbindung ausgebildet. Die Orientierung wird durch die 5'-3'Phosphodiesterbindung, über welche die Nucleotide verknüpft sind, festgelegt. Diese führt auch dazu, daß die Stränge sich antiparallel zueinander anordnen. Die DNA liegt normalerweise als rechtsgängige Doppelhelix vor. Diese sogenannte B-Form wurde von Watson und Crick aufgeklärt und wird auch Watson-Crick Paarung genannt (WATSON & CRICK, 1953). In der B-Form beträgt die Höhe eines Basenstapels $\approx 3,4 \text{ \AA}$ und ihr Durchmesser $\approx 20,5 \text{ \AA}$. Beim Menschen werden 20 Aminosäuren codiert und zwar jeweils durch 3 aufeinanderfolgende Nucleotide (NIRENBERG, 1963), sogenannten Triplets. Von der DNA wird durch Transkription die RNA abgelesen, die als Transportform die Erbinformation zu den Orten der Proteinbiosynthese, außerhalb des Zellkerns, bringt.

Die chemische Nucleinsäuresynthese ist mittlerweile ein Routineverfahren, wird kommerziell angeboten und kann auch mit der Kopplung von Fluorophoren an fast beliebiger Stelle einer Sequenz verbunden werden. Die Anzahl an extrinischen Fluorophoren mit deutlich

verbesserten Eigenschaften, wie erhöhter Photostabilität, größerer Extinktion oder je nach Einsatzgebiet sehr geringem oder großem Stokes-Shift, als auch der Sensitivität hinsichtlich der physiologischen Umgebung, ist in den letzten Jahren sprunghaft gewachsen. So markierte Oligonucleotide finden je nach ihren individuellen Eigenschaften mannigfache Anwendung. In der molekularen Genetik haben sich verschiedene Methoden fest etabliert. Für die DNA-Sequenzierung werden fast ausschließlich nur noch Fluorophore zur Markierung verwendet (FRANCA ET AL., 2002). Die Methode der FISH etablierte sich, sowohl in der Forschung, als auch in der klinischen Diagnostik (ADINOLFI & CROLLA, 1994). Die Real-time PCR ermöglicht es online die Vervielfältigung eines Templates zu beobachten (AARSKOG ET AL., 2000). Molecular Beacons werden neben ihrer Verwendung in der Real-time PCR zur Detektion von single nucleotide polymorphisms (SNPs) oder anderen Mutationen herangezogen. Die *in situ* Hybridisierung von Molecular Beacons an RNA (SOKOL ET AL., 1998) konnte ebenso wie die Hybridisierung an einzelne RNA-Transkripte gezeigt werden (FEMINO ET AL., 1998). Die Zellsortierung ist ohne Fluoreszenzfarbstoffe praktisch nicht denkbar (DAVEY ET AL., 1996; FRIESEBERG ET AL., 2001). All diese Anwendungen fluoreszenzspektroskopischer Techniken (LAKOWICZ, 2000) erweisen sich nicht nur als leistungsfähig, sondern bieten auch noch den Vorteil des zerstörungsfreien Untersuchens biologischer Objekte oder Systeme. Eine weitere Steigerung, der diesen Systemen schon eigenen Empfindlichkeit, auf der molekularen Ebene läßt sich durch die Kopplung zweier verschiedener Fluorophore erreichen, die unter bestimmten Voraussetzungen strahlungsfrei miteinander interagieren können, dem Förster-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) (FÖRSTER, 1946; FÖRSTER, 1965). Damit lassen sich sogar die Beschränkungen lichtmikroskopischer Systeme hinsichtlich ihres Auflösungsvermögens, in Abhängigkeit von der verwendeten Anregungswellenlänge, überwinden und molekulare Prozesse beobachten, die sonst nur mit anderen Techniken, wie z. B. Elektronen- oder Transmissionsmikroskopie, aufgeklärt werden konnten.

1.5 Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer

Innerhalb von Femtosekunden (10^{-15} s) kann ein Molekül, durch die Absorption von Strahlung, von einem Zustand niedriger Energie E in einen Zustand höherer Energie E^* gebracht werden. Die Differenz zwischen den Energieniveaus ist dabei der Frequenz der eingestrahnten Photonen proportional (Gl. 1.1). Die Energiedifferenz wird für die Änderung des Schwingungs- und Rotationszustandes und die Elektronenübergänge verwendet.

$$E^* - E = h \cdot \nu \quad (\text{Gl. 1.1})$$

E^* : Energie im angeregtem Zustand

E : Energie im Grundzustand

h : Plank'sches Wirkungsquantum

ν : Wellenlänge

Für die Absorption A bzw. die Intensitätsabnahme dI monochromatischer Strahlung beim Durchtritt durch eine verdünnte Lösung in einem völlig durchlässigen Lösungsmittel, ohne Sättigung des angeregten Zustandes, gilt das *Lambert-Beersche Gesetz* (Gl. 1.3):

$$-dI = k \cdot I \cdot dx \quad (\text{Gl. 1.2})$$

$$\Rightarrow A = \log_{10} \frac{I_0}{I} = \epsilon \cdot c \cdot d \quad (\text{Gl. 1.3})$$

ϵ : molarer Absorptionskoeffizient

c : Konzentration der Lösung

d : Schichtdicke der Probe

k : Proportionalitätskonstante, $k = 2,303 \cdot \epsilon$

Als Transmission T wird dabei das Verhältnis der Intensität nach und vor dem Probendurchgang bezeichnet I / I_0 . Für die Intensität der Übergänge gilt das Franck-Condon-Prinzip, das besagt, daß die Änderung des Elektronenzustandes viel schneller erfolgt, als die Änderung des Kernabstandes und sich die Lage der Atomkerne beim Strahlungsübergang kaum ändert. Ein so angeregtes Molekül kann über unterschiedliche Wege in den Grundzustand zurückkehren. Große Moleküle geben, innerhalb von Picosekunden (10^{-12} s), Schwingungsenergie durch Stöße an ihre Umgebung ab. Durch diesen, als *internal conversion* bezeichneten Prozeß, gelangen sie in den Schwingungsgrundzustand des angeregten Zustands S_1 . Das Erreichen des Schwingungsgrundzustandes S_0 kann über verschiedene Wege erfolgen. Wird die restliche Energie durch Stöße an die Umgebung übertragen, spricht man von strahlungsloser Deaktivierung (*quenching*). Das Aussenden eines Photons bezeichnet man als Lumineszenz. Erfolgt die Aussendung nach einem spinverbotenen Übergang aus dem elektronisch angeregten Singulettzustand in den Triplettzustand, und dem Übergang vom

Tripletzustand T_1 in den elektronischen Grundzustand S_0 spricht man von Phosphoreszenz. Dieser Vorgang dauert, wegen des spinverbotenen Übergangs deutlich länger ($10^{-4} - 10^{-2}$ s), als bei der Fluoreszenz (10^{-8} s). Bei der Fluoreszenz resultiert die Aussendung eines Photons aus dem direkten Übergang aus dem Schwingungsgrundzustand des angeregten Zustands S_1 auf den elektronischen Grundzustand S_0 und dauert typischerweise nur Nanosekunden. Im Jablonski-Termschema verdeutlicht dies die linke Seite. (Abb. 1-3).

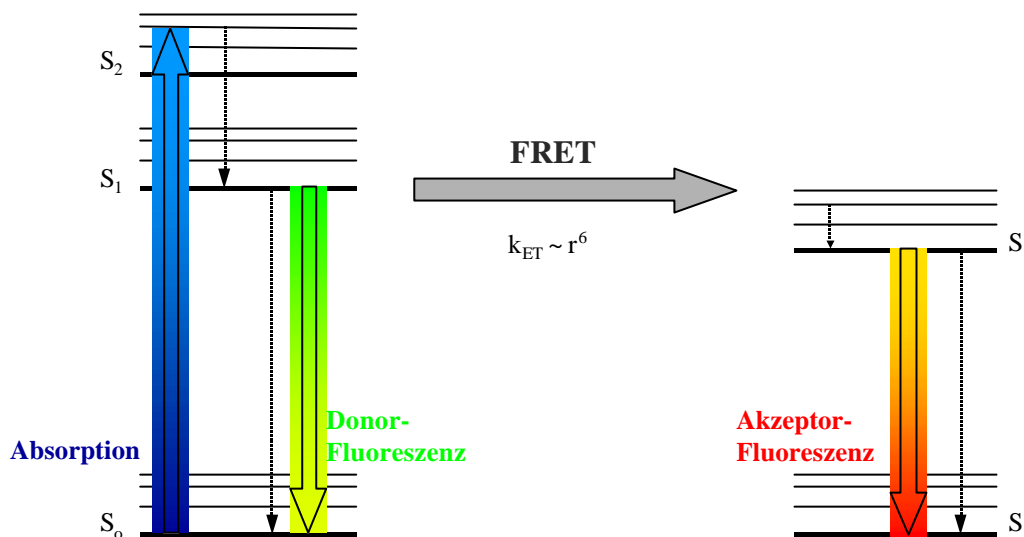


Abb. 1-3 Jablonski-Termschema. Strahlende Übergänge sind mit farbigen Pfeilen und strahlungslose mit gestrichelten Pfeilen markiert. Der strahlungslose FRET ist mit grauem Pfeil markiert.

Strahlungslose Übergänge sind gestrichelt dargestellt. Der strahlungslose Energieübertrag zwischen den Systemen ist durch den grauen Pfeil symbolisiert. Die Farben der Pfeile entsprechen ansonsten der Tendenz der Wellenlängen der jeweiligen Strahlungen.

Aus dem Verhältnis der emittierten zu den absorbierten Photonen läßt sich die Quantenausbeute f der Fluoreszenz berechnen.

$$f = \frac{I_E}{I_A} = \frac{k}{k + \Gamma} \tag{Gl. 1.4}$$

ϕ : Quantenausbeute

I_E : Intensität der emittierten Photonen

I_A : Intensität der absorbierten Photonen

G : Emissionsrate des Fluorophors

k : Geschwindigkeitskonstante für die strahlungslose Deaktivierung

Die Quantenausbeute f wird durch die Geschwindigkeitskonstante, welche selbst stark von der Umgebung des Fluorophores abhängig ist, beeinflusst. Der Wert für f liegt somit zwischen Null und Eins (Gl. 1.4). Je größer dieser Wert ist, um so geringer ist der Anteil der strahlungslosen Deaktivierung. Quenching liegt also vor wenn Prozesse ablaufen die zu einer niedrigeren Quantenausbeute führen, weil sich aufgrund einer Erhöhung der strahlungslosen Aktivität, die Fluoreszenzintensität verringert. Diesen Effekt der strahlungslosen Deaktivierung kann man gezielt in einem System herbeiführen.

Der Fluoreszenz (Förster)-Resonanz-Energie-Transfer (FRET), basiert genau auf diesem Effekt der strahlungslosen Deaktivierung eines Fluorophores. Primär ist ein FRET das Ergebnis einer schwachen induzierten Dipol - Dipol Wechselwirkung, die über eine Distanz von mehreren Moleküldurchmessern erfolgen kann. Durch die resonante Übertragung der Energie eines Donorfluorophors auf ein geeignetes Akzeptorfluorophor wird formal die Emission des Donors gequencht. Die Fluoreszenz des Donors verringert sich und die des Akzeptors erhöht sich. Es gibt zwei notwendige Kriterien für die Effizienz des strahlungslosen Energietransfers. Den räumlichen Abstand zwischen den beiden Fluorophoren und die Überlappung des Emissionsspektrums des Donors mit dem Anregungsspektrum des Akzeptors der beteiligten Fluorophore. Der Abstand zwischen Donor und Akzeptor, bei dem genau 50 % der Strahlungsenergie des Donors auf den Akzeptor übertragen wird, ist als Förster-Abstand R_0 definiert (FÖRSTER, 1946). Die Rate des Energietransfers k_T ist durch den Abstand R von Donor und Akzeptor bestimmt und wird ausgedrückt durch folgende Gleichung:

$$k_T = \frac{1}{\tau_D} \left(\frac{R_0}{R} \right)^6 \quad (\text{Gl. 1.5})$$

R_0 : Förster-Radius

R : Abstand Donor-Akzeptor

τ_D = Lebenszeit Donor ohne Akzeptor

Verschiedene Faktoren beeinflussen den Förster-Abstand R_0 : Der Brechungsindex des Lösungsmittels n , die Quantenausbeute f_D des Donors ohne den Akzeptor, das Überlappungsintegral zwischen dem Donor und dem Akzeptor und die jeweilige Orientierung der Übergangsdipolmomente, die durch den Faktor k^2 ausgedrückt werden. Bei freier Verteilung und Beweglichkeit der beteiligten Fluorophore kann für k^2 der Wert 2/3 eingesetzt werden.

$$R_0^6 = \frac{k^2 f_D J_{DA}}{n^4} \tag{Gl. 1.6}$$

k^2 : Orientierung der Dipolmomente

ϕ_D : Quantenausbeute Donor ohne Akzeptor

J_{DA} : Überlappungsintegral Donor-Akzeptor

n : Brechungsindex des Lösungsmittels

Damit bestimmen nur noch der Förster-Abstand R_0 und der Abstand R der beteiligten Fluorophore die Effizienz E des Energietransfers.

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + R^6} \tag{Gl. 1.7}$$

Die Abhängigkeit des Energietransfers E dargestellt am Beispiel des Donors Fluorescein und des Akzeptors Rhodamin mit dem berechneten Förster-Radius R_0 (Å) = 55 ist in Abb. 1-4 dargestellt.

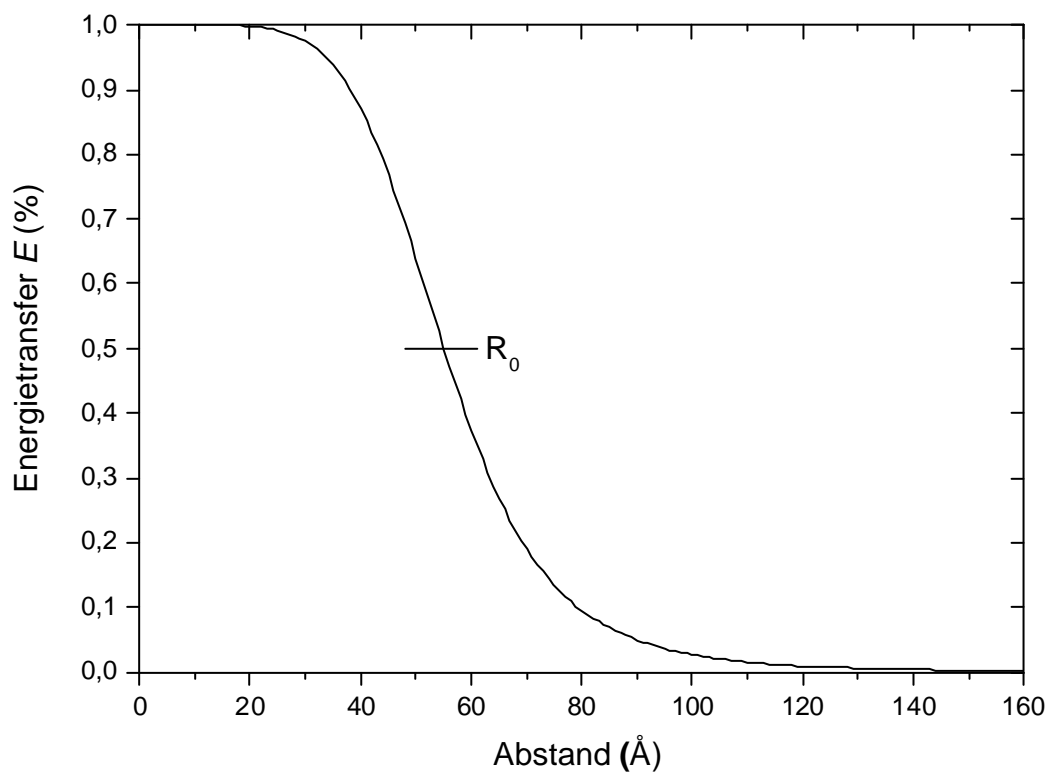


Abb. 1-4 Abstandsabhängigkeit der FRET-Effizienz. Berechnet für R_0 (Å) = 55.

Die Abstandsabhängigkeit von der 6. Potenz des Förster-Radius und des Abstands des FRET-Paares macht deutlich, daß eine sinnvolle Bestimmung von Abständen zwischen Molekülen mit dieser Methode nur für Abstandsmessungen im Bereich von $\approx 0,5 - 1,5 R_0$ Sinn machen. Dies bedeutet praktisch eine Größenordnung, abhängig vom verwendeten FRET-Paar, von 10 - 120 Å (WU & BRAND, 1994). Andernfalls sind die zu messenden Änderungen beim Energietransfer zu gering.

Das das Emissionsspektrum großer Moleküle gegenüber dem Absorptionsspektrum hin zu größeren Wellenlängen (Abb. 1-5), mithin also geringerer Energie verschoben ist, hängt zum einen mit dem schnellen Verlust von Schwingungsenergie (*internal conversion*) bei gelösten Molekülen zusammen. Dies hat Stokes 1852 als erster beschrieben und daher heißt dieser Effekt nach ihm benannt Stokes-Shift (STOKES, 1852). Außerdem kann der Einfluß des Lösungsmittels über den Effekt der Lösungsmittel-Relaxation zu einer weiteren Verschiebung sorgen. Heute verwendete Fluorophore decken Bandbreiten eines Stokes-Shifts von 13 - 30 nm ab. Der Stokes-Shift ermöglicht erst die Überlappung des Emissionsspektrums eines Donors mit dem Absorptionsspektrum eines anderen Akzeptors.

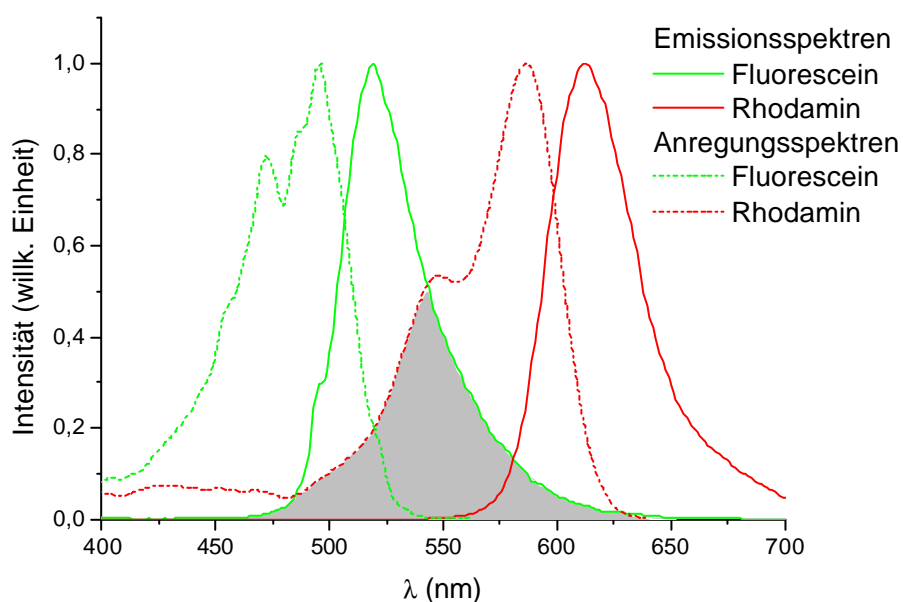


Abb. 1-5 Die spektrale Überlappung zwischen Fluorescein und Texas-Red.

Das sogenannte Überlappungsspektrum der Fluorophore Fluorescein und Texas-Red wird durch die grau unterlegte Fläche markiert (Abb. 1-5). Grundsätzlich ist der Energieübertrag auch von der Größe des Überlappungsintegrals abhängig. Neben der Untersuchung von Konformationsänderungen und Abstandsbestimmungen bei Proteinen (FRIEDRICH, 1988; XIA & LIU, 2001) läßt sich die Methode auch zur Sequenzierung (JU ET AL., 1995) und

Analyse von DNA einsetzen. Durch das Koppeln eines Fluorophors an eine bekannte DNA-Sequenz und das Markieren eines komplementären Strangs mit einem geeigneten zweiten Fluorophor und anschließender Hybridisierung dieser Stränge läßt sich nach Anregung ein FRET erzeugen (DENIZ ET AL., 1999). Indem die Abstände der Fluorophore durch Anbringen des zweiten Fluorophors an verschiedenen Basen des komplementären Strangs variiert wird, kann man Aussagen über die Transfereffizienz des FRET treffen. Mittlerweile steht fest, daß Abstände zwischen den beiden Fluorophoren von 4 bis 16 Bp zu deutlich sichtbarem FRET führen. Als geeignete Donoren für FRET-Untersuchungen haben sich Fluorescein und seine Derivate und als Akzeptoren Rhodamin und dessen Derivate etabliert (GLAZER ET AL., 1997).

1.6 Ziel dieser Arbeit

In dieser Arbeit soll versucht werden in Zellen, durch eine *in situ* Hybridisierung, eine spezifische mRNA, mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten Antisense DNA-Oligonucleotiden nachzuweisen. Der Nachweis soll durch die Erzeugung eines Fluoreszenz Resonanz Energie Transfers zwischen den beiden an die mRNA hybridisierten DNA-Sonden über die Zunahme der Akzeptorfluoreszenz erfolgen. Durch diese Markierung sollen die Zellen zweifelsfrei von solche Zellen mit unterschiedlichem Expressionsmuster identifizierbar sein.

2 Material & Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zelllinien

K-562

K-562 (Chronische myelogene Leukämie, human) ist eine Zelllinie die von einer 53 Jahre alten Frau, die an chronischer myelogener Leukämie erkrankt war, stammt. Isoliert wurden die Zellen aus einer pleuralen Effusion (LOZZIO UND LOZZIO, 1975). In diesen Zellen wird fötales Hämoglobin (Hb F) hochexprimiert. Die Zelllinie kann von American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, USA bezogen werden.

JurkatE6.1

Jurkat (T-Zell Leukämie, human) ist eine Zelllinie die aus der Jurkat FHCRC Zelllinie isoliert wurde. Die Zellen produzieren in abnormen Maße Interleukin-2 und humanes Alpha Interferon. Eine Expression eines der Globin-Gene konnte noch nicht, auch nach Induktion mit Hemin oder Natrium Butyrat beobachtet werden. Die Zelllinie kann von American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, USA bezogen werden.

Hel92.1.7

Hel92.1.7 (akute myelogene Leukämie, human) ist eine Zelllinie die von einem weißen Kaukasier stammt. Mehr Informationen dazu liegen nicht vor. Diese Zellen können induziert werden und dann fakultativ alle Globine exprimieren. Die Zelllinie kann von American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, USA bezogen werden.

2.1.2 Blutproben

Die verwendeten Nabelschnurblutproben waren frisch von Neonaten und bis zum Meßzeitpunkt nicht älter als maximal 24 Stunden. Das Geschlecht des Säuglings, von dem die Probe stammte, war immer bekannt. Die Blutproben waren zur Gerinnungshemmung mit Kalium-EDTA versetzt. Diese Blutproben wurden apparativ aufgereinigt. Sie enthielten zu

über 90 % nucleierte erythroide Zellen. Außerdem wurden zwei Proben maternalen Blutes verwendet. Die Patientinnen waren zum Zeitpunkt der Probenentnahme 28 und 33 Jahre alt und in den Gestationswochen ~ 13 und ~ 17. Die Proben wurden in Monovetten, mit vorgelegtem Kalium-EDTA, im Rahmen routinemäßiger Untersuchungen aus der Armvene entnommen.

2.1.3 Oligonucleotide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonucleotide, bis auf das Molecular Beacon wurden nach Vorgabe von der Firma MWG-Biotech AG, Ebersberg, Deutschland synthetisiert und entsprechend mit Fluorophoren gekoppelt.

Name	Länge	Sequenz	GC %	Tm	Markierung-5'	Markierung-3'
Exon2-DNA	39	gaagtgctgacttcttgggagatgc cataaagcacctg	51	> 72		
Ex2-fluor	15	gaagtcagcaccttc	53	43	Fluorescein	
Ex2-tex-1	10	catctcccaa	50	30		TexRed
Ex2-tex-2	10	gcatctccca	60	32		TexRed
Ex2-tex-3	10	ggcatctccc	70	34		TexRed
Ex2-tex-4	10	tggcatctcc	60	32		TexRed
Ex2-tex-5	10	atggcatctc	50	30		TexRed
Ex2-tex-6	10	tatggcatct	40	28		TexRed
Ex2-tex-7	10	ttatggcatc	40	28		TexRed
Ex2-tex-8	10	tttatggcat	30	26		TexRed
Ex2-tex-9	10	ctttatggca	40	28		TexRed
Ex2-tex-10	10	gctttatggc	50	30		TexRed
Ex2-tex-11	10	tgctttatgg	40	28		TexRed
Ex2-tex-12	10	gtgctttatg	40	28		TexRed
Ex2-tex-13	10	ggtgctttat	40	28		TexRed
Ex2-tex-14	10	aggtgcttta	40	28		TexRed
Ex2-tex-15	10	caggtgcttt	50	30		TexRed
DD-Fluorescein	15	ccaggtgctttat(ct)g	47	45		2 x Fluorescein
D-Fluorescein	14	ccaggtgctttatg	50	42		Fluorescein
DD-Ori-DNA-Oligo	46	aaaaatgctgacttccttgggagatg ccataaagcacctggaaaaa	41	72		
DD-Red-5	10	tccaaggaa	50	30	TexRed	
DD-Rox-5	10	tccaaggaa	50	30	ROX	
DD-Rho-5	10	tccaaggaa	50	30	RhodRed	
DD-Cy5.5-5	10	tccaaggaa	50	30	Cy5.5	

Name	Länge	Sequenz	GC %	Tm	Markierung-5'	Markierung-3'
DD-Red-6	10	cccaaggaag	60	32	TexRed	
DD-Rox-6	10	cccaaggaag	60	32	ROX	
DD-Rho-6	10	cccaaggaag	60	32	RhodRed	
DD-Cy5.5-6	10	cccaaggaag	60	32	Cy5.5	
DD-Red-7	10	ccaaggaagt	50	30	TexRed	
DD-Rox-7	10	ccaaggaagt	50	30	ROX	
DD-Rho-7	10	ccaaggaagt	50	30	RhodRed	
DD-Cy5.5-7	10	ccaaggaagt	50	30	Cy5.5	
DD-Red-8	10	caaggaagtc	50	30	TexRed	
DD-Rox-8	10	caaggaagtc	50	30	ROX	
DD-Rho-8	10	caaggaagtc	50	30	RhodRed	
DD-Cy5.5-8	10	caaggaagtc	50	30	Cy5.5	
DD-Red-9	10	aaggaagtca	40	28	TexRed	
DD-Rox-9	10	aaggaagtca	40	28	ROX	
DD-Rho-9	10	aaggaagtca	40	28	RhodRed	
DD-Cy5.5-9	10	aaggaagtca	40	28	Cy5.5	
DD-Red-10	10	aggaagtcag	50	30	TexRed	
DD-Rox-10	10	aggaagtcag	50	30	ROX	
DD-Rho-10	10	aggaagtcag	50	30	RhodRed	
DD-Cy5.5-10	10	aggaagtcag	50	30	Cy5.5	
CD59-Fluor	12	atgtgagagagg	50	36		Fluorescein
CD59-TexRed	12	atatactcctgc	41	34	TexRed	
6-mer	6	gagagg	67	20	Dabcyl	Fluorescein
7-mer	7	agagagg	57	22	Dabcyl	Fluorescein
6/7-mer Akzeptor 1	12	gctcatatact	33		TexasRed	
6/7-mer Akzeptor 5	12	catatactcctg	42		TexasRed	
Template 6/7-mer	32	gggcaggagtatatgagcctcctctc tcacat	50			
Ex3-DNA	41	gggcctgaggtgcaggcttctggc agaagatggtgacggg	66	>75		
ex3-fluor-ph	15	agcctgcacctcagg	67	53	Fluorescein	
ex3-tex-5bp-ph	15	gtcaccatcttctgc	53	49		TexRed
2G-DNA	68	aaaaaagcaagaaggtgctgacttc cttgggagatgccataaagcacctgg atgatctcaagaaaaa	41	>75		
2G-Flu	25	cttgagatcatccaggtgctttatg	44	61		Fluorescein
2G-Tex-1bp	25	catctccaaggaagtcagcacct	52	65	TexRed	
2G-Tex-5bp	25	cccaaggaagtcagcaccttcttgc	56	66	TexRed	
2G-Flu-Pho	25	cttgagatcatccaggtgctttatg	44	61		Fluorescein
2G-Tex-1bp-Pho	25	catctccaaggaagtcagcacct	52	65	TexRed	

Name	Länge	Sequenz	GC %	Tm	Markierung-5'	Markierung-3'
2G-TeX-5bp-Pho	25	cccaaggaagtcagcaccttctgc	56	66	TexRed	
2G-TeX-0bp	26	gcattcccccaaggaagtcagcacctt	54	66	TexRed	
2G-TeX-0bp-Pho	26	gcattcccccaaggaagtcagcacctt	54	66	TexRed	
ex3-fluor-ph	15	agcctgcacctcagg	67	53	Fluorescein	
ex3-tex-0bp-ph	16	ccattcttctgccagga	56	52		TexRed
Ex2-TeX	19	aggtgctttatggcatctc	47	54		TexRed
Ex2-Rox	15	gctttatggcatctc	47	45		ROX
Ex2-21-mer	21	aggtgctttatggcatctccc	52	60		TexRed
int-2G-TeX-5bp	26	gcattcccccaaggaagtcagcacct	54	66	TexRed	
2G-Bodi-493/503	25	cttgagatcatccaggtgctttatg	44	61		Bodipy493
2G-OregonGreen	25	cttgagatcatccaggtgctttatg	44	61		OregonGreen
2G-Alexa488	25	cttgagatcatccaggtgctttatg	44	61		Alexa488
2G-RhodaminGreen	25	cttgagatcatccaggtgctttatg	44	61		RhoGreen
DNA-GAPDH	61	tgctttaactctggtaaagtggatatt gttgccatcaatgaccttcattgac ctcaac	41	>75		
1-FRET Flu-GAPDH	25	ttgaggtcaatgaaggggtcattga	44	61		Fluorescein
1-FRET-TeX-GAPDH	25	acaatatccactttaccagagttaa	32	56	TexRed	
Loop-DNA-GAPDH	46	actctggtaaagtggatattgtgcca tcaatgaccttcattga	41	72		
Loop-5xT-GAPDH	45	atgaaggggtcattgatggctttttaa caatatccactttaccag	34	63	Fluorescein	TexRed
Loop-10xT-GAPDH	50	atgaaggggtcattgatggcttttttt taacaatatccactttaccag	31	64	Fluorescein	TexRed
Loop-15xT-GAPDH	55	atgaaggggtcattgatggcttttttt tttttaacaatatccactttaccag	28	65	Fluorescein	TexRed
Loop-20xT-GAPDH	60	atgaaggggtcattgatggcttttttt tttttttaacaatatccactttaccag	26	65	Fluorescein	TexRed
2G-Flu-Pho-sense	25	aaggtgctgactccttgggatg	52	64		Fluorescein
2G-TeX-Pho-sense	25	cataaagcacctggatgctcaag	44	61	TexRed	
Ex3-TeX-Pho-sense	15	cctgaggtgcaggct	67	53		TexRed
Ex3-Flu-Pho-sense	16	tcctggcagaagatgg	56	52	Fluorescein	

Tabelle 2-1 Sequenzen der verwendeten DNA-Oligonucleotide.

Molecular Beacon FAM-Dabcyl 32-mer 100pmol/μl.

2.1.4 Extrinsische Fluorophore

Die an die Oligonucleotide gekoppelten Fluorophore haben folgende spektroskopische Eigenschaften:

Fluorophor	λ (ex)	λ (em)	Extinktions Coeffizient Max	Extinktions Coeffizient 260 nm	Farbe
Fluorescein	495	520	73000	20960	Grün-Gelb
Alexa 488	495	519	71000	20400	Grün-Gelb
Oregon Green	496	516	76000	19266	Grün-Gelb
Bodipy 492/503	500	509	79000	21330	Grün
Rhodamin Green	503	528	74000	19650	Grün-Gelb
Rhodamin Red	570	590	129000	34830	Gelb-Orange
Rhodamin- X	575	603	82000	22140	Orange
Texas-Red	595	615	116000	22950	Orange
Cy 5	643	667	250000	50000	Rot
Cy 5.5	675	694	250000	67500	Rot

Tabelle 2-2 Spektroskopische Werte der eingesetzten Fluorophore.

In Abb. 2-1 und Abb. 2-2 sind die Anregungs- und Emissionsspektren der verwendeten Fluorophore dargestellt.

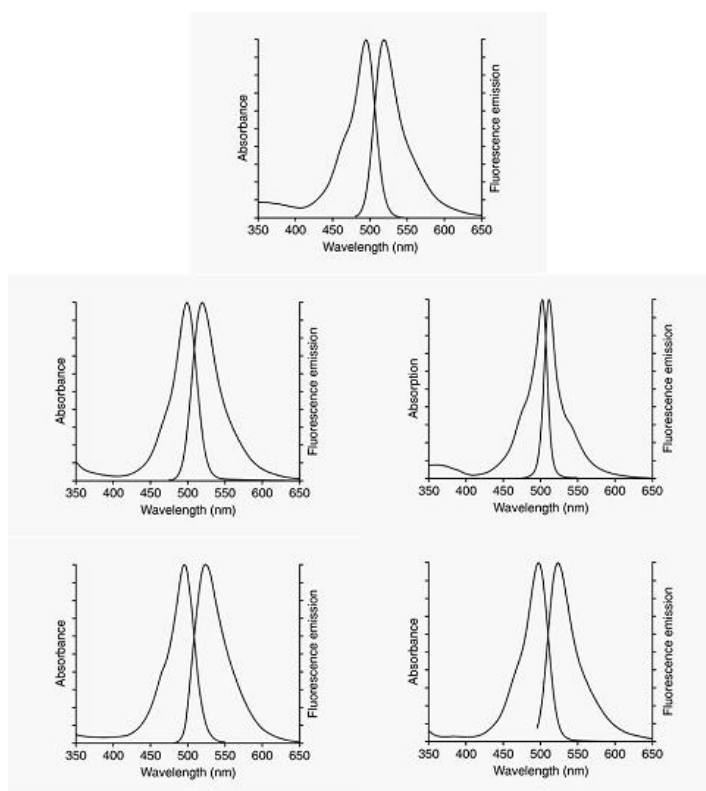


Abb. 2-1 Anregungs- und Emissionsspektren der Donor-Fluorophore. Von oben nach unten und links nach rechts: Fluorescein, Alexa 488, Bodipy 493/503, Oregon Green, Rhodamin Green.

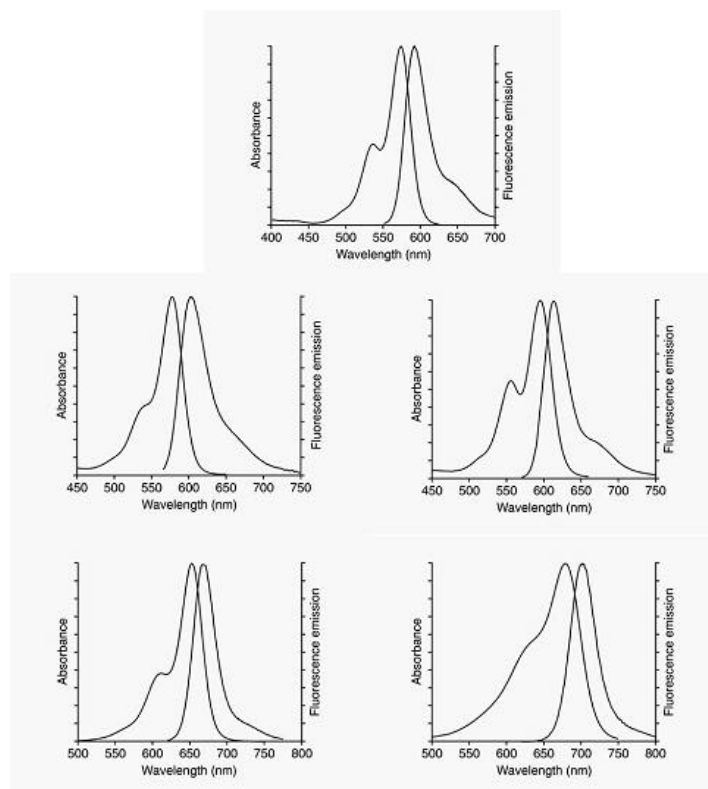


Abb. 2-2 Anregungs- und Emissionsspektren der Akzeptor-Fluorophore. Von oben nach unten und links nach rechts: Rhodamin-Red, Rhodamin-X, Texas-Red, Cy 5, Cy 5.5.

2.1.5 PCR-Primer

Die eingesetzten PCR-Primer sind mit dem Programm Genefisher von F. Meyer und C. Schleiermacher berechnet worden.

	Sequenz	Annealing	Fragment
γ -Gamma	ggttgtctacccatggaccaga tgcacatcatgggcagtgagctca	63°C	343 bp
Epsilon	gagcctcaggatccagcaca gaaggctttctctcaacgcaa	61°C	752 bp
hL7	tgtacagaactgaaattcgaatggc agagatcgagcaatcaaagcgttat	65°C	345 bp
hAdam8	atctgcatcgtggatgtgtg gctttgcggtagagcatgat	61°C	350 bp

Tabelle 2-3 Sequenzen der verwendeten PCR-Primer.

2.1.6 DNA-Fragmentlängenmarker

Der verwendete Marker entsprach in seiner Auflösung der Größe der jeweils zu erwartenden Fragmente, des ϵ - und γ -Gamma Globin Gens und des hL7 und hAdam8 Produktes nach RT-PCR.

100 bp DNA-Ladder, äquimolar (Roth, Karlsruhe): 100 – 1000 bp

2.1.7 Enzyme

Enzym	Hersteller
DNase – Rnase frei	Promega, Madison WI, USA
RNase A	Promega, Madison WI, USA
Taq DNA-Polymerase (5U/ μ l)	Promega, Madison WI, USA

Tabelle 2-4 Verwendete Enzyme der RT-PCR.

2.1.8 Antibiotika

Den Nährmedien zur Kultur der verschiedenen Zelllinien wurden bei Bedarf folgende Antibiotika zugesetzt:

Gentamicin (100 μ g/ml Endkonzentration im Nährmedium)
 Penicillin-Streptomycin (PenStrep) (100 μ g/ml Endkonzentration im Nährmedium)

2.1.9 Nährmedien

RPMI 1640, BioWhittaker, Verviers, Belgien

FCS, PAA Laboratories, Cölbe

nichtessentielle Aminosäuren, Biochrom AG, Berlin

Q-007, PAA Laboratories, Cölbe

Q-263, PAA Laboratories, Cölbe

Optimem, GibcoBRL, Eggenstein

DMEM, BioWhittaker, Verviers, Belgien

Einfriermedium DMSO, GibcoBRL, Eggenstein

2.1.10 Microinjektion

Die Microinjektionen wurden mit folgenden Geräten durchgeführt:

Eppendorf Microinjektor 5242

Eppendorf Transfer Man

Zeiss Mikroskop Axiovert 35 M

2.1.11 Transfektionsagenzien

Es wurden die in Tabelle 2-5 aufgeführten Transfektionsagenzien und Detergenzien zur Transfektion der Zellen eingesetzt:

Bezeichnung	Hersteller
Rotifect	Roth, Karlsruhe
Metafectene	Biontex, München
Tfx50	Promega, Mannheim
Transfectam	Promega, Mannheim
Lipofectamine	Invitrogen, Karlsruhe
Oligofectamine	Invitrogen, Karlsruhe
Tween 20	Roche, Penzberg
Triton-X 100	Roche, Penzberg

Tabelle 2-5 Auflistung der eingesetzten Transfektionsmittel.

2.1.12 Mikrobiologische Systeme

In dieser Arbeit werden die in Tabelle 2-6 aufgeführten Komplettsysteme (Kits) eingesetzt:

Bezeichnung Kits	Eingesetzt für	Hersteller
RNeasy Mini Kit	RNA-Extraktion	Qiagen GmbH, Hilden
Qiagen Omniscript	Reverse Transcription	Qiagen GmbH, Hilden

Tabelle 2-6 Verwendete Komplet-Kits für RNA Extraktion und reverse Transcription.

2.1.13 Bildgebende Systeme

Die confokalen Aufnahmen wurden mit dem Leica Confokal Mikroskop DM RE und dem Scanhead TCS SP2 gemacht.

Eingesetzte Objektive: HC PL APO CS 20.0 x 0.70 IMM/CORR
 HCX PL APO CS 40.0 x 1.25 OIL UV
 HCX PL APO CS 63.0 x 1.32 OIL UV

Es wurden Deckgläser der Firma H. Saur, Reutlingen verwendet, die auf 0,15 mm Dicke geeicht waren. Das Immersionsöl nach DIN 58884/ISO 8036/1 der Firma Leica, Wetzlar hatte einen Index $n_e = 1,518$.

Für die Verarbeitung wurde das Programm von Leica Microsystems mit der Versionsnummer 2.00 Build 0871 verwendet.

Alle anderen Aufnahmen wurden mit dem Fluoreszenz-Mikroskop Olympus BX51 und der Video-Kamera Hamamatsu Digital Kamera C4742-95-12NRB gemacht. Für die Verarbeitung wurde das Programm ISIS von Meta Systems mit der Versionsnummer Version V99/4.6) verwendet.

Verwendete Filtereinstellung: RGB

R: Grünanregungs-Filterset (Cy3,Alexa 532 etc)

Anregungsfilter: 545/30, Sperrfilter610/75

G: Filterset für FITC (U-MWIBA2 TERMODUL)

Anregungsfilter: 475/30, Sperrfilter: 530/40

B: UV-Anregungs-Filterset (DAPI, Hoechst, AMCA, C-Blue) Anregungsfilter: 360/40, Sperrfilter: 460/50

Es wurde eine feste Belichtungszeit von 2s gewählt. Alle Filter stammten von der Firma AHF.

2.1.14 Physikalische Komponenten

Hier werden die Komponenten des Meßsystems zur Aufnahme der Anregungs-Emissionsspektren, welches von dem Arbeitskreis Physikalische Chemie I (PC I) von Frau Prof. Dr. K. Kohse-Höinghaus bereitgestellt wurde, beschrieben.

Gerät	Spezifikation	Hersteller
Lichtquelle	Ozonfreie 75W-Xenon-Bogenlampe	L.O.T. Oriol (Modell 6262)
Anregungs-Monochromator	Plangitter mit 2400 Linien/mm, Blazewellenlänge 240 nm, spektrale Dispersion am Austritt 2,7 nm/mm	Acton Research (Modell SpectraPro-150)
Spiegeloptik	Hohlspiegel	Sopra
Quarz-Präzisionsküvetten	5 x 5 mm ² oder 10 x 10 mm ²	Hellma (Modelle 111.057-QS und 111-QS)
Probenhalter	In drei Achsen justierbar	Selbstanfertigung
temperierbarer Küvettenhalter	Thermostat DC50-K40	Haake
Eingangsoptik	Hohl- und Zylinderspiegel	Sopra
Detektions-Monochromator	Geblaste Gitter: 500 nm mit 150 Linien/mm und Dispersion 24nm/mm, 300 nm mit 300 Linien/mm und Dispersion 12 nm/mm	Acton Research (Modell SpectraPro-275)
Kamera	SpectruMM:250B	Princeton Instruments
CCD-Sensor	1024 x 250 Pixel mit der Fläche 24,6 x 6,0 mm ²	Hamamatsu
System Kontroller	MicroMax ST-133-Controller	Princeton Instruments
Software	WinSpec	Roper Scientific

Tabelle 2-7 Gerätehersteller der Komponenten der AES Anlage.

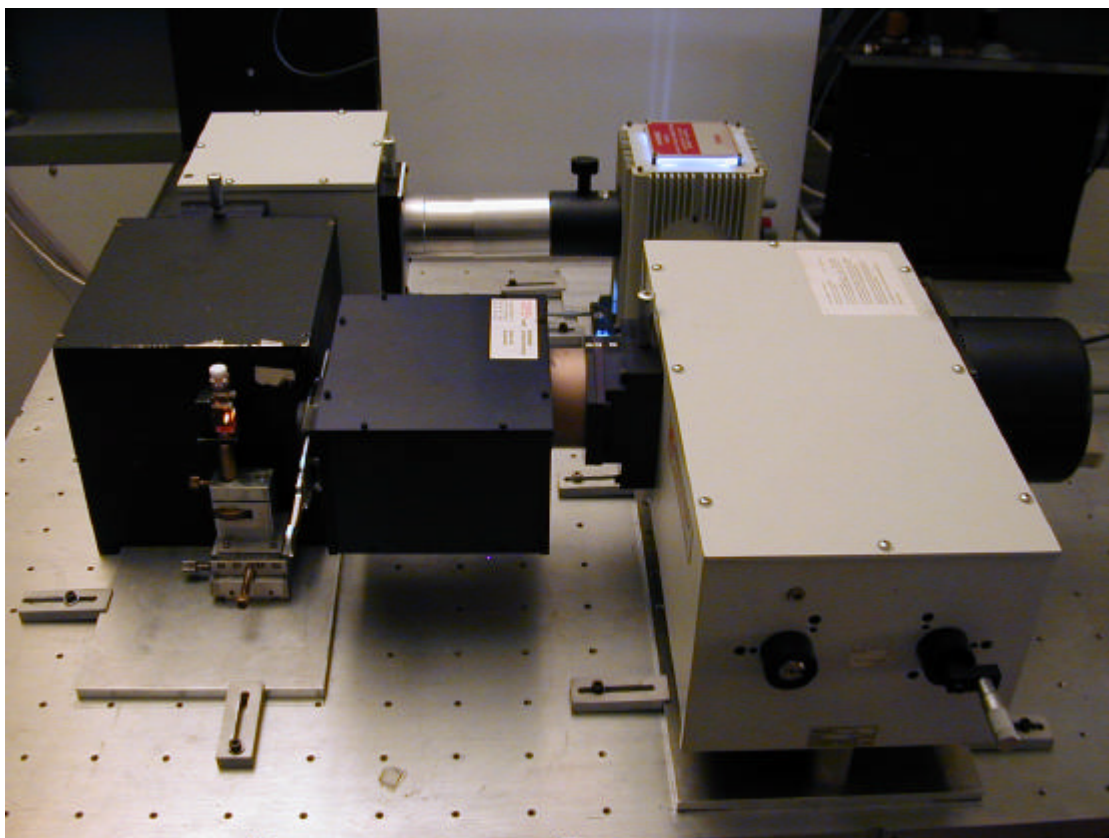


Abb. 2-3 Photo der Anlage für die AES-Messungen. Vorne links der nicht abgedeckte Probenständer.

2.1.15 Datenbanken

Es wurden folgende Datenbanken und Programme genutzt:

Bezeichnung	Verwendung	Adresse
GenBank	Gensequenzen	www.ncbi.nlm.nih.gov/
PubMed	Literaturrecherche	www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/
Blast	Vergleich von Sequenzen	www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/
PCR-Primer	Design von PCR-Primern	http://bibiserv.techfak.uni-kl.de/~bibiserv/pcrprimer/
DigiBib	Literaturrecherche	http://www.digibib.net/
BMBF	Patente	www.patente.bmbf.de/
PloS	Online-Publikationen	www.plosbiology.org/
Mfold	RNA-Faltung	www.bioinfo.rpi.edu/
Origin 6.0	Datenverarbeitung	www.originlab.com

Tabelle 2-8 Datenbanken und Programme die benutzt wurden.

Die Werte für die spektroskopischen Eigenschaften stammen von den Internetseiten der folgenden Hersteller: Molecular Probes (www.probes.com), Synthegen (www.synthegen.com), MWG-Biotech (www.mwg-biotech.de) und Atto-Tec GmbH (www.atto-tec.com).

2.2 Methoden

2.2.1 Handhabung und Aufbereitung von Zelllinien

2.2.2 Lagerung von Zellkulturen

Das Standardverfahren für die Gebrauchslagerung von Zelllinien sieht vor, die Zellen in geeigneten Medien, wie zum Beispiel DMSO bei - 70°C vorzuhalten. Hierzu legt man in ein Kryoröhrchen 100 µl DMSO (10%) vor. Anschließend werden 900 µl Zellkultur in Nährmedium ohne Antibiotikum in dieses Gefäß überführt. Idealerweise hat man durch Auszählung einen Titer von $1 - 5 \times 10^6$ Zellen bestimmt. Die Durchmischung wird durch vorsichtiges pipettieren sichergestellt. Anschließend überführt man das Kryoröhrchen in eine Einfrier-Hilfe, welche mit Iso-Propanol gefüllt ist. Dieses wird dann über Nacht in eine - 70°C Kühltruhe gestellt. Durch dieses definierte Gefrieren unter Einfluß des DMSO wird eine Kristallisierung des intrazellulären Wassers minimiert. Nach 24 Stunden werden die Zellen dann in ein Gefäß mit flüssigem Stickstoff gegeben und anschließend in einem geeigneten Stickstofftank bei - 196°C gelagert.

2.2.3 Kultivierung von Zellen

Alle Arbeiten mit den Zell- und Blutkulturen wurden in einer sterilen Klasse-II-Reinraumwerkbank (SterilGuard, Fa. Baker, USA) ausgeführt. Die Zellkulturen in Wachstumsmedium werden in Inkubatoren bei 37°C und bei einem CO₂-Gehalt von 7,5% gehalten. Abhängig von der Zelldichte erfolgt der Mediumwechsel alle 2 - 4 Tage.

2.2.4 Kulturansatz K-562-, Hel92.1.7- und JurkatE6.1-Zellen

Alle drei Zelllinien werden in suspensorischer Kultur gehalten. Sie können sowohl in beschichteten als auch unbeschichteten Zellkulturflaschen wachsen. Als Wachstumsmedium dient RPMI-1640 Medium. Dieses Medium wurde später durch das Medium Q007 ersetzt.

Das Wachstumsmedium RPMI-1640 setzt wie folgt zusammen:

10,43 g	RPMI 1649 Pulver
2 g	NaHCO ₃
10 ml	stabiles Glutamin
10 ml	100x nicht essentielle Aminosäuren

dann mit 900 ml Millipore H₂O auffüllen.

Es werden 100 ml FCS (Fetal calf serum) dazu gegeben und vorsichtig invertiert (schäumt sonst !)

Das Medium wird steril filtriert und aliquotiert und kann dann bei 4°C gelagert werden. Bei Bedarf wird mit Gentamycin auf 100 µg pro ml Wachstumsmedium eingestellt und im Brutschrank bei 37° C und 7,5% CO₂ inkubiert.

2.2.5 Anreicherung von Blutzellen aus Nabelschnurblut

Die Nabelschnurblutproben werden wie folgt angereichert und aufbereitet. Zur Anreicherung der einzelnen Zelltypen wird das Histopak 11/19 der Firma Sigma verwendet. Nach Präparation der Probe, wie vom Hersteller vorgeschrieben, wird eine Zentrifugation der Probe bei 500 x g für 15 Minuten durchgeführt. Anschließend erhält man folgenden absteigenden Gradienten:

Blutserum
Lymphozyten
Nucleierte Erythrozyten
Histopaklösung
Kernlose Erythrozyten

2.2.6 Reinigung der nucleierten Erythrozyten

Nach der Zentrifugation entnimmt man die Phase mit den nucleierten Erythrozyten und überführt sie in ein neues Reaktionsgefäß. In dieses wird ein dem Rezeptor CD-45 spezifischer und magnetisch markierter Antikörper gegeben. Dieser bindet an die entsprechenden Rezeptoren der noch vorhandenen Lymphozyten. Die Lösung wird über eine Säule geschickt, in welcher die magnetisch markierten Lymphozyten hängenbleiben, so daß man ein sehr reines Eluat (< 90%) an nucleierten Erythrozyten erhält.

2.2.7 Behandlung der maternalen Blutproben

Die Monovetten werden mit 500 g für 10 Minuten bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Anschließend werden sie einmal mit 2x HBS Lösung gewaschen und resuspendiert.

Der 2 x HBS-Puffer setzt sich wie folgt zusammen:

2 x HBS (HEPES-Buffered Saline):

50 mM HEPES, pH 7,1

280 mM NaCl

1,5 mM Na₂HPO₄

Der pH-Wert soll am Ende 7,1 betragen.

2.2.8 RNA Extraktion aus Zellkultur (Qiagen)

Zur Extraktion der gesamten RNA aus einer definierten Zellmenge wird das RNeasy Mini Kit verwendet. Alle Reagenzien werden nach Vorschrift präpariert. 5×10^6 Zellen werden ausgezählt und 5 Minuten mit 300 x g in einer Hettich Zentrifuge pelletiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet durch klopfen gelöst und mit 10 ml PBS - Puffer resuspendiert und dann erneut mit 300 x g für 5 Minuten pelletiert. Der Waschschrift wird noch einmal ausgeführt. Der Überstand nach der Zentrifugation wird verworfen. Das Pellet wird in der Restphase gelöst und in eine Eppendorf Tube überführt. Es dürfen keine Zellklumpen sichtbar sein, diese durch pipettieren oder vortexen auflösen. Nun werden 600 µl RLT Puffer, welcher β-Mercaptoethanol enthält dazu gegeben. Mehrmals durch pipettieren durchmischen. Daran anschließend wird die Lösung für 60 Sekunden mit einem Rotor-Stator Homogenisierer homogenisiert. Die homogenisierte Lösung wird nun mit dem gleichen Volumen 70% Ethanol

versetzt und durch wiederholtes pipettieren gemischt. Die gesamte Lösung wird nun in eine RNeasy Zentrifugier-Säule gegeben. Diese wird in ein Eppendorf Reaktionsgefäß gestellt und 15 Sekunden mit $> 8.000 \times g$ zentrifugiert. Das Eluat wird verworfen und die Säule mit 700 μl des Waschpuffers RW1 gefüllt. Erneut wird mit $> 8.000 \times g$ zentrifugiert. Das Eluat verwerfen und den Waschschrift wiederholen. Die gewaschene Säule in ein neues Eppendorf Reaktionsgefäß stellen mit 500 μl des RPE Puffers füllen. Das Eluat nach Zentrifugation mit $> 8.000 \times g$ verwerfen und den Schritt noch einmal wiederholen. Die Säule in ein neues Eppendorf Reaktionsgefäß überführen und mindestens 1 Minute mit $> 8.000 \times g$ zentrifugieren um sicherzustellen, daß kein RPE Puffer mehr anwesend ist. Die Säule in ein RNase freies Eppendorf Reaktionsgefäß geben und mit 30 - 50 μl RNase freiem Wasser die an die Matrix gebundene RNA aus der Säule eluieren, indem mindestens 1 Minute mit $> 8.000 \times g$ zentrifugiert wird. Die Konzentrationsbestimmung des Eluats erfolgt mit einem Eppendorf Photometer. Das Eluat kann bei -70°C aufbewahrt werden.

Der 1 x PBS-Puffer (Phosphate Buffered Saline) setzt sich wie folgt zusammen:

137 mM	NaCL
2,7 mM	KCl
4,3 mM	Na_2HPO_4
1,47 mM	KH_2PO_4

Der pH-Wert soll 7,1 betragen.

2.2.9 Reverse Transkription

Bei der reversen Transkription wird von der extrahierten RNA einer Zellfraktion durch das Enzym reverse Transkriptase, einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, eine DNA Kopie erstellt, die sogenannte c(opy)DNA. Hierzu wird die Gesamtausbeute an RNA nach der Extraktion photometrisch bestimmt und es kommen 2 μg der RNA pro Reaktionsansatz zum Einsatz.

2 μg RNA werden in 10 μl H_2O eluiert und 5 Minuten bei 65°C inkubiert, um die Tertiär- und Sekundärstrukturen aufzulösen. Das erhöht die Effizienz der reversen Transkriptase beträchtlich. In einem Eppendorf Gefäß werden 10 μl Mastermix vorgelegt. Der Mastermix besteht aus folgenden Komponenten:

10 x RT-Puffer	2 µl
dNTP-Mix (5 mM)	2 µl
Oligo dT-Primer (0,5 µg/µl)	0,5 µl
Rnase (100U/µl)	1 µl
Omniscript (4 U/µl)	1 µl
DEPC-H ₂ O	3,5 µl

Beide Lösungen werden vereinigt und über Nacht bei Raumtemperatur kultiviert. Wenn keine große Transkripte erwartet oder erwünscht sind, kann auch bei 37 °C für ~ 1 Stunde inkubiert werden. Dieses Prozedere erhöht aber auch die Fehlerzahl bei den Kopien der RNA. Es kommt zu häufigerem Koppeln einer falschen Base oder zu Abbrüchen in der Synthese der cDNA. Die erhaltene Kopie stellt nun eine stabile transportfähige Form der RNA einer Zellfraktion dar.

2.2.10 Amplifizierung der cDNA (PCR)

Die von K. Mullis erkannte Möglichkeit mit Hilfe einer DNA-Polymerase, in einer zyklischen Reaktion, die DNA amplifizieren zu können, stellt einen Meilenstein der Molekularbiologischen Methodik dar und ist aus zu einem unverzichtbaren Werkzeug geworden (MULLIS ET AL, 1987). Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) wird auch eingesetzt um die aus einer reversen Transkription erhaltene cDNA zu amplifizieren. Die Vervielfältigung eines DNA-Abschnittes zwischen zwei flankierenden Oligonucleotid-Primern wird durch die DNA-Polymerase ermöglicht. Nach aufschmelzen der doppelsträngigen DNA lagern sich die Primer an und werden von der DNA-Polymerase durch anhängen freier Nucleotide an das 3'-OH Ende verlängert (Elongation). Durch Erhitzen auf 94°C wird die doppelsträngige DNA wieder denaturiert (Denaturierung). Das Optimum der Polymerase zur Verlängerung der Primer liegt bei 72°C. Die Polymerase stammt aus dem thermophilen Bakterium *Thermophilus aquaticus*. Die Anlagerung der Primer (Annealing) findet bei einer spezifischen Temperatur statt, für die die Berechnung der Schmelztemperatur (T_m) dient.

Die 2 + 4 Regel gibt einen guten Anhaltswert zur Schmelztemperaturberechnung und bezieht die Anzahl und das Verhältnis der vier Nucleotide (G + C, A + T) ein.

$$T_m = (4x (G + C) + (2x (A + T))) \text{ °C} \quad (\text{Gl. 2.1})$$

Bei dieser Temperatur dissoziieren die Primer-Template Hybride. Die optimale Anlagerungstemperatur liegt 2°C bis 4°C niedriger. Dieser zyklische Vorgang von

Annealing, Elongation und Denaturierung geschieht mittlerweile automatisiert in Geräten, den Thermozyklern, die alle benötigten Temperaturwechsel vornehmen. Zum Schluß wird die Temperatur für 10 Minuten beim Optimum der Polymerase belassen, damit alle Verlängerungen sicher abgeschlossen werden. Bis zur Entnahme der Proben wird der Ansatz im Gerät auf 10°C gehalten.

Temperatur	Zeit	Schritt
94°C	5 min	Denaturieren
92°C	30 s – 1 min	Denaturieren
55-65°C	30 s – 1 min 35 Zyklen	Annealing
73°C	30 s – 1 min	Elongation
72°C	10 min	Abschließende Elongation
10°C	Hold	

Tabelle 2-9 Programmeinstellungen und Zyklenanzahl für die PCR im Thermocycler.

Die so amplifizierte DNA kann durch Gelelektrophorese ihrer Fragmentlänge nach aufgetrennt und durch anschließende Färbung der Banden diese im UV-Licht sichtbar gemacht werden.

2.2.11 Agarose Gel-Elektrophorese

Mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese werden DNA-Fragmente der Größe nach aufgetrennt und anschließend angefärbt um sie sichtbar zu machen (SAMBROCK et al., 2001).

Die DNA wandert, aufgrund der negativ geladenen Phosphordiesterbrücken, in einem elektrischen Gleichspannungsfeld von der Kathode zur Anode. In einer Gelmatrix wandern die Moleküle entsprechend ihrer Größe mit unterschiedlichen Laufgeschwindigkeiten und trennen sich so auf. Abhängig von der zu erwartenden Größe der Fragmente verwendet man verschiedene Agarose-Konzentration in einem Gel.

Konzentration (w/v)	Fragmentgrößen (bp)	Spannung (V)	Laufzeit
0,8%	30.000 - 500	100	3 – 6 h
1,0%	2000 - 500	100	3 – 6 h
2,0%	1000 - 100	80	30 – 45 min

Tabelle 2-10 Die Kenngrößen für die Agarose Gel-Elektrophorese.

Zur Herstellung eines Gels wird die der gewünschten Konzentration entsprechende Menge an Agarose in 1 x TBE eingewogen und aufgekocht. Nach Abkühlung gießt man das Gel in eine Gelkammer gewünschter Größe und setzt einen Kamm mit erforderlicher Zahnung ein. Nach Abkühlung des Gels wird mit 1 x TBE überschichtet und der Kamm gezogen. Die mit BPB-Probenpuffer versetzten DNA-Proben werden in die Geltaschen pipettiert und das Gel an einen Spannungsgeber angeschlossen. Wenn die BPB-Bande nur noch 1 Zentimeter vom Rand entfernt ist wird der Gellauf beendet und das Gel zum Anfärben für 10 - 20 Minuten in ein Ethidiumbromid-Bad gegeben. Dabei interkaliert das Ethidiumbromid in die DNA und kann als Fluoreszenzfarbstoff nach Anregung mit UV-Licht von 302 nm auf einem Transilluminator sichtbar gemacht und fotografiert werden.

Die Lösungen setzen sich wie folgt zusammen:

1 x TBE-Puffer:	0,089 M TrisCl pH 8,0 0,089 M Borsäure 20 mM EDTA
BPB-Probenpuffer:	6 x Puffer 0,025% Bromphenolblau 0,025% Xylen Cyanol 40% (w/v) Saccharose in H ₂ O
EtBr-Lösung:	1 µg/ml EtBr in 1 x TBE

2.2.12 Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren

Fluorophor	$I_{\text{ex}}^{\text{max}}$ (nm)	$I_{\text{em}}^{\text{max}}$ (nm)
AMP	260	312
polyA		325
CMP	272	330
polyC		343
GMP	251	340
polyG		342
TMP	268	330
poly dT		328

Tabelle 2-11 Fluoreszenzeigenschaften von Nucleotiden und Nucleinsäuren.

Die Konzentration von Nucleinsäuren wird durch photometrische Bestimmung der Absorption einer Lösung (OD) bei 260 nm und 280 nm gemessen. Um 260 nm haben Nucleinsäuren ihre jeweiligen Absorptionsmaxima (Tabelle 2-11). Bei einer Schichtdicke der Küvette von 1 cm entspricht eine Extinktion (OD) von 1 einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA und 40 µg/ml RNA oder einzelsträngiger DNA (SAMBROCK ET AL., 2001).

Die Konzentration berechnet sich folgendermaßen:

$$\text{DNA}_{\text{konz.}} = 50 \times \text{gemessene Absorption} \times \text{Verdünnungsfaktor} (\mu\text{g/ml})$$

$$\text{RNA}_{\text{konz.}} = 40 \times \text{gemessene Absorption} \times \text{Verdünnungsfaktor} (\mu\text{g/ml})$$

Die Messung bei 280 nm dient der Kontrolle des Reinheitsgrades, denn hier haben Proteine ihr Absorptionsmaximum. Durch die Bestimmung des Quotienten der OD₂₆₀ zu OD₂₈₀ kann man dann den Reinheitsgrad bestimmen. Bei Werten von 1,8 – 2,0 hat man sehr reine DNA vorliegen. Geringere Werte zeigen eine Verschmutzung mit Protein oder Phenol an.

2.2.13 Äquilibrierung der fluoreszenzmarkierten DNA Oligonucleotide

Die Konzentration der synthetisierten und mit Fluorophoren gekoppelten DNA Oligonucleotide muß über die OD photometrisch nachbestimmt werden. Dies ist notwendig, da zur Konzentrationsberechnung vom Hersteller, bedingt durch die

Automatisierung des Syntheseprozesses, nur die DNA-Absorption herangezogen wird. Bei Oligonucleotiden die kürzer als 50 Basenpaare sind und an die ein Fluorophor gekoppelt ist, muß jedoch auch die Absorption des Fluorophors mitberücksichtigt werden. Sonst können Fehler bis hin zum Faktor 2 hinsichtlich der Konzentration auftreten. Für die *in vitro* Messungen müssen jedoch alle Primer äquimolar vorliegen. Andernfalls würden die Ergebnisse zu falschen Schlußfolgerungen führen. Die Primer werden nach Maßgabe des Herstellers auf 100 pmol eingestellt. Zur wahren Konzentrationsbestimmung werden 5 µl der Stammlösung in 150 µl 1 x SSC Puffer gegeben und gut gemischt. Die OD wird dann in einem UVIKON Gerät photometrisch bestimmt. Unter Berücksichtigung der jeweiligen Extinktionskoeffizienten der DNA und der Fluorophore bei 260 nm wird dann die echte Konzentration des markierten Primers bestimmt. Alle Primer werden anschließend auf eine Konzentration von 20 µM eingestellt, aliquotiert und bei - 20°C gelagert.

2.2.14 Stimulierung der Globinexpression mit Hemin

Um sicherzustellen, daß die als Modellsystem eingesetzten Zellen der chronisch myelogenen Leukämie auch einen entsprechenden Expressionsstatus, hinsichtlich der ε- und γ-Globin Transkripte aufweisen, müssen sie induziert werden. Wada konnte 1988 zeigen, daß die Zugabe von Hemin zu K-562 Zellen differentiell nur die Transkription der ε- und γ-Globin Gene initiiert, nicht jedoch die der übrigen β-Globin Gene (WADA & NOGUCHI, 1988). Die besten Effekte wurden mit einer Endkonzentration von 20 µM im Zellkultur Ansatz erzielt. In dieser Arbeit sind die Zellen jeweils einen Tag für den Transfektionen durch Zugabe von Hemin induziert worden. Die Hemin Stocklösung wird durch auflösen von Hemin in 0,1 M NaOH erzielt. Hemin ist in polaren Lösungsmitteln fast unlöslich. Die Lösung in NaOH stellt die einzige Möglichkeit dar, ohne unpolare Lösungsmittel, die immer giftig auf die Zellen wirken, auszukommen. Hier wurde eine 1,5mM Stammlösung erstellt.

2.2.15 Transfektionsmethoden

Im folgenden werden die Protokolle der verschiedenen Transfektionsmethoden dargestellt. Insgesamt kamen in dieser Arbeit folgende Zelllinien zur Verwendung: K-562-, HEL92.1.7-, JurkatE6.1- und Blutzellen. Die genaue Angabe der verwendeten Oligonucleotide erfolgt der Übersichtlichkeit halber jeweils bei den Ergebnissen, ebenso werden dort die jeweiligen Transfektionszeiträume der entsprechenden Versuche genannt. Bei den Versuchen die zur Optimierung der Transfektion gemacht wurden, sind in der Regel fluoreszenzmarkierte DNA-Oligonucleotide verwendet worden, die keinen FRET erzeugen können. Entweder weil es keine Zielsequenzen gab, die komplementär zu denen der DNA-Oligonucleotide waren oder weil die Fluorophore an den äußeren Enden der eingesetzten Primer gekoppelt und damit viel zu weit voneinander entfernt waren um ein detektierbares FRET-Signal zu erzeugen. Da in diesen Versuchen die Beurteilung der Transfektionseffizienz vorrangig war, sollten die Signale nicht durch möglichen FRET abgeschwächt sein. Die hierfür verwendeten Primer entsprachen aber in der Länge und in den verwendeten Farbstoffen den DNA-Oligonucleotiden, die für FRET Hybridisierungen eingesetzt wurden.

Zur Anwendung kamen diverse Abwandlungen von 3 prinzipiell unterschiedlichen Verfahren, außerdem wurden DNA-Oligonucleotide über Mikromanipulation in Zellen injiziert. Insgesamt wurden 21 verschiedene Protokolle eingesetzt. Hier werden nur die Protokolle aufgeführt, deren Ergebnisse zu einer relevanten Aussage führten.

Zum einen wurden Versuche zur Aufnahmefähigkeit von fluoreszenzmarkierten DNA-Oligonucleotiden, im weiteren werden diese „markierte Primer“ genannt, durch Elektroporation unternommen. Die wichtigsten Bedingungen stellen die Kapazität, die Stromspannung und die Dauer des Impulses, zusammengefaßt in der Bezeichnung Ladungsstrom, dar. Dieser Ladungsstrom seinerseits permeabilisiert wahrscheinlich kurzfristig die Zellmembran und ermöglicht somit den Eintritt der Oligonucleotide in die Zelle. Ob der Eintritt der DNA in die Zelle ausschließlich durch Diffusion erfolgt, oder ob auch eine Transport durch das mitwandern im elektrischen Feld erfolgt ist in der Literatur noch nicht entschieden. Es ist bekannt, daß unterschiedliche Zellentypen (Bakterien, Zellkulturen, Hefen etc.) verschieden auf die eingesetzte Spannung (Volt) und Kapazität (μFD) und die daraus resultierende Dauer des Impulses reagieren. Es muß also für jeden Zelltyp erst die optimale Korrelation von Spannung und Kapazität gefunden werden. Dies ist

bedeutsam, da der Verlust von Zellen nach Elektroporation sonst sehr groß werden kann und die Effizienz stark herabgesetzt ist.

Es wurden des weiteren Versuche mit der Permeabilisierung von Zellen durch bekannte Lösungsdetergenzien wie Triton-X (hier nicht dargestellt) und Tween vorgenommen. Diese beiden Detergenzien gehören zur Klasse der nicht-ionischen Detergenzien. Denen gegenüber stehen die ionischen Detergenzien, deren bekanntester Vertreter das Natrium Dodecyl Sulfat (SDS) sein dürfte. Die Solubilisierung der Membranproteine erfolgt durch die Oxyethylen Gruppen. Alle diese Detergenzien können zur Lyse der Zellmembran führen. In geeigneter geringer Konzentration verwendet, kann man damit Zellmembranen durchgängig machen, ohne die Zellen als Ganzes zu lysieren. Durch die so entstandenen Eintrittspforten können die Oligonucleotide, aufgrund des Konzentrationsgefälles, passiv in die Zellen gelangen.

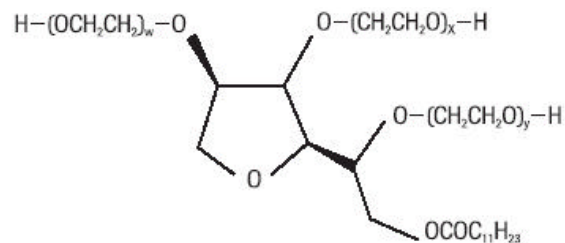


Abb. 2-4 Strukturformel des Tween 20.

Tween20 ist des weiteren auch als Lebensmittelzusatzstoff zugelassen und unter der Kennzeichnung E 432 vielen Lebensmitteln zugesetzt.

Die dritte Möglichkeit Oligonucleotide in Zellen zu transferieren ist die Benutzung von Liposomen. Hier handelt es sich um zumeist um kationische Lipide. Diese nichtviralen synthetischen Vektoren dienen dem DNA-Transfer in lebende Zellen und stellen eine einfache methodische Verbesserung, insbesondere wegen ihrer leichten Synthetisierbarkeit. Die kationischen Lipide bilden in polaren Lösungen Vesikel aus. Diese bestehen entweder aus monomolekularen (Monolayer) oder aus einer bimolekularen (Bilayer) Liposomen. Die hydrophile Gruppe ist dem Wasser zugewandt und die hydrophoben Kohlenwasserstoffketten zeigen ins Innere des Vesikels. Die meisten kommerziellen Liposomenformulierungen erzeugen Bilayer Vesikel. In diese Doppelmembranen sind die hydrophoben Seitenketten einander zugewandt. Somit ist der Hohlraum des Vesikel von der positiv geladenen Gruppe der Liposomen begrenzt. Die Interaktion mit der negativ geladenen Phosphodiesterbrücke der DNA sorgt für einen effizienten Einschluß der Oligonucleotide in die Transportvesikel. Diese integrieren mit der Zellmembran und schützen die DNA außerdem vor lysosomaler

Degradierung (SCHOFIELD & CASKEY, 1995). In der Regel müssen die Transfektionen Serumfrei vorgenommen werden, da die in den Seren enthaltenen Proteine den Reifungsprozess des DNA-Liposomen-Komplexes blockieren und die zelluläre Aufnahme des Lipoplexes behindern. (YANG & HUANG, 1998).

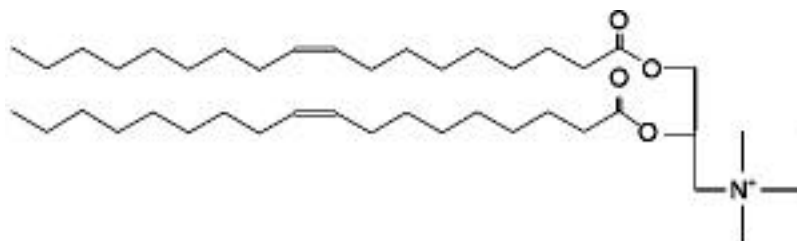


Abb. 2-5 Strukturformel eines typischen Vertreters der Klasse der kationischen Lipide.

Für alle Protokolle gilt: Jeweils einen Tag vor der Transfektion wird eine angemessene Menge Zellen in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen pro Milliliter in neues Nährmedium umgesetzt, um sicherzustellen, daß die Kultur sich in der Wachstumsphase befindet. Am Versuchstag wird die zur Verwendung kommende Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer unter dem Mikroskop ausgezählt. Die benötigte Menge an Zellsuspension wird der Kultur entnommen und in einer Hettich-Zentrifuge bei $500 \times g$ abzentrifugiert. Anschließend werden die Zellen mit 5 ml PBS-Puffer resuspendiert und gewaschen. Dann wird erneut abzentrifugiert und der Waschschritt mit PBS-Puffer noch einmal wiederholt. Das Zellpellet wird in dem jeweils verbleibenden Tropfen durch Klopfen resuspendiert.

2.2.16 Mikroinjection in K-562 Zellen

Zur Mikromanipulation wurde 1 ml K-562 Zellsuspension in einer Konzentration 1×10^6 Zellen/ml einmal vorsichtig mit PBS-Puffer gewaschen und abzentrifugiert und anschließend in 1 ml Optimem aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in einem Eppendorfgefäß auf Eis gelagert. Der zur Verfügung stehende Mikromanipulator arbeitet mit einem konstanten leichten Druck auf die Injektionskapillare, um ein Eindringen von Suspensionsmedium in die Kapillare zu verhindern. Wenn die Injektionsnadel in eine Zelle eingedrungen ist, wird der Druck auf die Kapillare erhöht und die Transfektionslösung wird in die Zelle gebracht. Wenn ein Volumenzuwachs der Zelle zu beobachten ist, wird die Injektion beendet. Die Zellen werden anschließend 15 min bei RT inkubiert und dann mit PFA/Eisessig fixiert.

2.2.17 Elektroporation

Zur Elektroporation wird die gewünschte Zellanzahl von 1 bis 5×10^6 Zellen zweimal in jeweils 0,5 ml PBS gewaschen und anschließend in 800 μ l serumfreiem RPMI-1640 aufgenommen und bis zur Elektroporation auf Eis gestellt. Die Elektroporation ohne zusätzliche Liposomenformulierung wird nach Zugabe von je 2 μ l Donor- und Akzeptor Primer mit den entsprechend im Ergebnisteil angegebenen Einstellungen durchgeführt. Danach werden die Zellen mit der Elektroporationsküvette noch 3 Minuten auf Eis weiter inkubiert und erst dann in 24 Multiwell-Schalen mit 3 ml RPMI-1640 Wachstumsmedium (mit FCS) für 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Bei den Elektroporationen mit Liposomen Unterstützung werden die jeweiligen Primer getrennt folgendermaßen präpariert. Je 2 μ l Primer in 60 μ l serumfreies RPMI-1640 und 10 μ l Rotifect in 120 μ l serumfreiem RPMI-1640 vorlegen. Jeweils die Hälfte der Liposomenlösung zu den Primern geben und vorsichtig mischen. 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren. Diese Ansätze werden erst unmittelbar vor der Elektroporation zu den vorbereiteten Zellen gegeben und vorsichtig durchmischt. Dann wird mit den individuellen Einstellungen elektroporiert und genauso weiter verfahren wie oben beschrieben.

2.2.18 PFA/Eisessig Fixierung nach Microinjection

Die Fixierungsmethode hat entscheidenden Einfluß auf die *in situ* Hybridisierung (TBAKHI ET AL., 1998). Daher wurden hier verschiedene Methoden der Pre- und Post-Fixierung untersucht. Die entscheidende Methode basiert auf einer Paraformaldehyd/Eisessig Post-Fixierung. Die Zellen werden in 1 ml 4 % PFA / 5 % Eisessig aufgenommen und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 5 Minuten mit 300 g abzentrifugiert. Dann wird mit TBST (TBS mit 0,1 % Tween) gewaschen und erneut 5 Minuten abzentrifugiert. Die Zellen in 50 μ l PBS resuspendieren, auf einem Adhäsiv-Objektträger austreichen und auf einer Heizplatte bei 37°C und abgedunkelt trocknen lassen. Zum Schluß werden die Objektträger mit einem Tropfen Vectashield Mounting Medium mit Dapi und geeichten Deckgläsern (definiert auf 0,15 mm Dicke) eingedeckelt.

2.2.19 Tween-20 Transfektion mit praefixierten Zellen

Für einen 50 µl Ansatz werden folgende Agenzien in einem Eppendorfgesäß in dieser Reihenfolge zusammenpipettiert:

31,55 µl Optimem

5 µl Donor (20 µM)

5 µl Akzeptor (20 µM)

1,25 µl 1 % Tween-20 (1:100 in PBS)

In einem zweiten Eppendorf Reaktionsgefäß werden 5×10^5 Zellen vorgelegt, abzentrifugiert und das Zellpellet nach Verwerfen des Überstandes in 50 µl Optimem resuspendiert. Zur Fixierung der Zellen werden 50 µl 2 % Formaldehyd zugegeben und die Suspension durch mehrmaliges pipettieren gemischt und anschließend bei Raumtemperatur (RT) 10 Minuten inkubiert. Die Zellen abzentrifugieren und das Zellpellet in 500 µl Optimem resuspendieren und erneut abzentrifugieren. Den Überstand absaugen. Das Zellpellet wird mit den 50 µl der Transfektionslösung aus dem ersten Eppendorf Reaktionsgefäß resuspendiert und dann für 30 Minuten in einem Eppendorf Thermoschüttler bei 37°C und Stufe 10 geschüttelt. Das Gerät wird mit Alufolie abgedeckt. Danach werden 500 µl Optimem zugegeben und der Ansatz wieder abzentrifugiert. Den Überstand absaugen und das Zellpellet in 100 µl 2 % Formaldehyd resuspendieren, 5 Minuten bei RT inkubieren und dann mit einer Pipettenspitze auf einem Adhäsiv-Objektträger ausstreichen. Ca. 15 Minuten auf einer Heizplatte bei 37°C trocknen. Mit einem Kasten die Objektträger abdunkeln. Zum Schluß werden die Objektträger mit einem Tropfen Vectashield Mounting Medium mit Dapi und geeichten Deckgläsern (definiert auf 0,15 mm Dicke) eingedeckelt.

2.2.20 Transfection mit Oligofectamin und Plus-Reagenz

Für jeden Transfektionsansatz werden 3 Eppendorf Reaktionsgefäß bereitgestellt. In die ersten beiden Reaktionsgefäße werden folgende Agenzien zusammenpipettiert:

5 µl Donor (20 µM)

oder

5 µl Akzeptor (20 µM) je Reaktionsgefäß

36 μl Optimem
4 μl Plus-Reagenz

Durch auf und ab pipettieren wird der Lösungsansatz gemischt und dunkel gestellt. In das dritte Reaktionsgefäß werden 60 μl Oligofectamin und 30 μl Optimem zusammenpipettiert und 10 Minuten bei RT inkubiert. Jetzt werden jeweils 45 μl aus dem dritten Reaktionsgefäß in die ersten beiden Reaktionsgefäße gegeben und durch vorsichtiges auf und ab pipettieren vermischt. Die beiden Ansätze werden im Dunkeln bei RT für 20 Minuten inkubiert. In der Zwischenzeit werden pro Ansatz 2×10^6 Zellen in 200 μl Optimem aufgenommen und in die Kammern einer 24x Multiwellschale pipettiert. Die erste Liposomen Formulierung wird dazu gegeben und vorsichtig durch pipettieren gemischt. Nach 30 Minuten im Inkubator wird die zweite Liposomen Formulierung dazu gegeben und für weitere 4 Stunden bei 37°C im Inkubator inkubiert. Danach werden 500 μl Optimem zugegeben und der Ansatz wieder abzentrifugiert. Den Überstand absaugen und das Zellpellet in 100 μl 2 % Formaldehyd resuspendieren, 5 Minuten bei RT inkubieren und dann mit einer Pipettenspitze auf einem Adhäsiv-Objektträger ausstreichen. Ca. 15 Minuten auf einer Heizplatte bei 37°C trocknen. Mit einem Kasten die Objektträger abdunkeln. Zum Schluß werden die Objektträger mit einem Tropfen Vectashield Mounting Medium mit Dapi und geeichten Deckgläsern (definiert auf 0,15 mm Dicke) eingedeckelt.

2.2.21 Transfection mit Rotifect

Für jeden Transfektionsansatz werden 3 Eppendorf Reaktionsgefäß bereitgestellt. In die ersten beiden Reaktionsgefäße werden folgende Agenzien zusammenpipettiert:

5 μl Donor (20 μM)
oder
5 μl Akzeptor (20 μM) je Reaktionsgefäß
60 μl Optimem

In das dritte Reaktionsgefäß werden 120 μl Optimem mit 20 μl Rotifect gegeben und durchmischt. Jeweils die Hälfte der Lösung aus dem dritten Reaktionsgefäß (70 μl) wird mit den beiden anderen Reaktionsgefäße vereinigt und vorsichtig vermischt. Zur Komplexbildung werden die Reaktionsgefäße bei RT für 30 Minuten dunkel gestellt. In der Zwischenzeit

werden pro Ansatz 2×10^6 Zellen in 200 μl Optimem aufgenommen und in die Kammern einer 24 x Multiwellschale pipettiert. Die erste Liposomen Formulierung wird dazu gegeben und vorsichtig durch pipettieren gemischt. Nach 30 Minuten im Inkubator wird die zweite Liposomen Formulierung dazu gegeben und für weitere 3 Stunden bei 37°C im Inkubator inkubiert. Danach werden 500 μl Optimem zugegeben und der Ansatz wieder abzentrifugiert. Den Überstand absaugen und das Zellpellet in 100 μl 2 % Formaldehyd resuspendieren, 5 Minuten bei RT inkubieren und dann mit einer Pipettenspitze auf einem Adhäsiv-Objektträger ausstreichen. Ca. 15 Minuten auf einer Heizplatte bei 37°C trocknen. Mit einem Kasten die Objektträger abdunkeln. Zum Schluß werden die Objektträger mit einem Tropfen Vectashield Mounting Medium mit Dapi und geeichten Deckgläsern (definiert auf 0,15 mm Dicke) eingedeckelt.

2.2.22 Transfection mit Rotifect - über Nacht

Für jeden Transfektionsansatz werden 3 Eppendorf Reaktionsgefäß bereitgestellt. In die ersten beiden Reaktionsgefäße werden folgende Agenzien zusammenpipettiert:

5 μl Donor (20 μM)

oder

5 μl Akzeptor (20 μM) je Reaktionsgefäß

60 μl Optimem

In das dritte Reaktionsgefäß werden 120 μl Optimem mit 20 μl Rotifect gegeben und durchmischt. Jeweils die Hälfte der Lösung aus dem dritten Reaktionsgefäß (70 μl) wird mit den beiden anderen Reaktionsgefäße vereinigt und vorsichtig vermischt. Zur Komplexbildung werden die Reaktionsgefäße bei RT für 30 Minuten dunkel gestellt. In der Zwischenzeit werden pro Ansatz 2×10^6 Zellen in 200 μl Optimem aufgenommen und in die Kammern einer 24x Multiwellschale pipettiert. Die erste Liposomen Formulierung wird dazu gegeben und vorsichtig durch pipettieren gemischt. Nach 30 Minuten im Inkubator wird die zweite Liposomen Formulierung dazu gegeben und für weitere 3 Stunden bei 37°C im Inkubator inkubiert. Nach dieser Zeit wird nach Zugabe von 500 μl Nährmedium des jeweiligen Zelltyps ohne FCS und Antibiotika über Nacht (> 12 h) weiter inkubiert. Danach werden 500 μl Optimem zugegeben und der Ansatz wieder abzentrifugiert. Den Überstand absaugen und das Zellpellet in 100 μl 2 % Formaldehyd resuspendieren, 5 Minuten bei RT inkubieren und

dann mit einer Pipettenspitze auf einem Adhäsiv-Objektträger ausstreichen. Ca. 15 Minuten auf einer Heizplatte bei 37°C trocknen. Mit einem Kasten die Objektträger abdunkeln. Zum Schluß werden die Objektträger mit einem Tropfen Vectashield Mounting Medium mit Dapi und geeichten Deckgläsern (definiert auf 0,15 mm Dicke) eingedeckelt.

2.2.23 Transfection mit Metafect

Für jeden Transfektionsansatz werden 3 Eppendorf Reaktionsgefäß bereitgestellt. In die ersten beiden Reaktionsgefäße werden folgende Agenzien zusammenpipettiert:

5 µl Donor (20 µM)

oder

5 µl Akzeptor (20 µM) je Reaktionsgefäß

60 µl Optimem

In das dritte Reaktionsgefäß werden 120 µl Optimem mit 20 µl Rotifect gegeben und durchmischt. Jeweils die Hälfte der Lösung aus dem dritten Reaktionsgefäß (70 µl) wird mit den beiden anderen Lösungen vereinigt und vorsichtig vermischt. Zur Komplexbildung werden die Reaktionsgefäße bei RT für 30 Minuten dunkel gestellt. In der Zwischenzeit werden pro Ansatz 2×10^6 Zellen in 200 µl Optimem aufgenommen und in die Kammern einer 24x Multiwellschale pipettiert. Die erste Liposomen Formulierung wird dazu gegeben und vorsichtig durch pipettieren gemischt. Nach 30 Minuten im Inkubator wird die zweite Liposomen Formulierung dazu gegeben und für weitere 3 Stunden bei 37°C im Inkubator inkubiert. Danach werden 500 µl Optimem zugegeben und der Ansatz wieder abzentrifugiert. Den Überstand absaugen und das Zellpellet in 100 µl 2 % Formaldehyd resuspendieren, 5 Minuten bei RT inkubieren und dann mit einer Pipettenspitze auf einem Adhäsiv-Objektträger ausstreichen. Ca. 15 Minuten auf einer Heizplatte bei 37°C trocknen. Mit einem Kasten die Objektträger abdunkeln. Zum Schluß werden die Objektträger mit einem Tropfen Vectashield Mounting Medium mit Dapi und geeichten Deckgläsern (definiert auf 0,15 mm Dicke) eingedeckelt.

2.2.24 Transfection mit Oligofectamin für Confokale Präparate

Die K-562 Zellen werden einen Tag vor der Transfektion mit Hemin induziert, die JurkatE6.1 Zellen werden nur in frisches Medium überführt. Am Transfektionstag wird die gewünschte

Zellmenge bei 300 x g abzentrifugiert und mit 5 ml Optimum Medium resuspendiert. Dann wird der Waschschrift wiederholt. Anschließend werden die Zellen in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen pro 200 μ l Optimum resuspendiert und in eine 24 Multiwellschale pipettiert.

Die Donor und Akzeptor Primer werden getrennt präpariert. Je 6 μ l der beiden Primer, es kann auch jeweils ein Gemisch von gegen verschiedene Sequenzen gerichtete Primer sein, werden mit 40 μ l Optimum vereinigt. 14 μ l Oligofectamine werden mit 1 μ l Optimum zusammengeführt. Die Ansätze 10 Minuten dunkel bei Raumtemperatur stehen lassen. Dann wird jeweils die Hälfte der Liposomenlösung zu den Primerlösungen gegeben und im Dunkeln für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.

Der Ansatz mit den Donor Primern wird zu den Zellen gegeben und vorsichtig gemischt. Die Zellen werden bei 37°C im CO₂-Brutschrank weiter inkubiert. Nach einer Stunde werden die Akzeptor Primer ebenfalls zu den Zellen gegeben und noch einmal vorsichtig durchmischt. Anschließend werden 150 μ l RPMI-1640 Wachstumsmedium (mit FCS) zugegeben und die Ansätze über Nacht weiter inkubiert. In der Regel wurde die Transfektion nach 16 Stunden unterbrochen. Die Zellen werden in 1 ml 4 % PFA / 5 % Eisessig aufgenommen und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 5 Minuten mit 300 g abzentrifugiert. Dann wird mit TBST (TBS mit 0,1 % Tween) gewaschen und erneut 5 Minuten abzentrifugiert. Die Zellen in 50 μ l PBS resuspendieren, auf einem Adhäsiv-Objektträger ausstreichen und auf einer Heizplatte bei 37°C und abgedunkelt trocknen lassen. Zum Schluß werden die Objektträger mit einem Tropfen Vectashield Mounting Medium mit Dapi und geeichten Deckgläsern (definiert auf 0,15 mm Dicke) eingedeckelt.

2.2.25 Berechnung der FRET-Effizienz aus den confokalen Bildaufnahmen

Es gibt verschiedene Möglichkeiten einen FRET über ein Laser Scanning Mikroskop zu quantifizieren. Es kann die Lebenszeit des Donors (*time-resolved*), oder die Abnahme der Donor Fluoreszenz oder die Zunahme der Akzeptor Fluoreszenz (*steady-state*) bestimmt werden. Die Lebenszeitbestimmung hat den Vorteil unabhängig von der Konzentration der eingesetzten Fluorophore einen FRET bestimmen zu können. Die beiden anderen Methoden haben den Vorteil ein zeitlich stabiles Signal zu erzeugen, daß länger detektierbar ist. Zur quantitativen Auswertung eines FRET bei diesen beiden Methode kommt es letztlich darauf an, daß Verhältnis der vom Donor absorbierten Quanten gegenüber den vom Donor zum Akzeptor übertragenen Quanten zu bestimmen (CLEGG, 1995). In dieser Arbeit wird die

Methode des Ausbleichens des Akzeptors, daß *Akzeptor bleaching* benutzt. Zuerst werden die entsprechenden Bereiche des zu bleichenden Präparats bestimmt. Dann wird jeweils eine Aufnahme der zu untersuchenden Bereiche bei der Anregungswellenlänge des Donor- und Akzeptor-Fluorophors und den dazugehörigen Emissionswellenlängenbereichen gemacht. Dann werden die gewählten Bereiche mit maximaler Intensität bei der Akzeptor Anregungswellenlänge mehrmals angeregt, bis dieser ausbleicht. Darauf werden in diesen Bereichen noch einmal, jetzt wieder für jedes Fluorophor separat, die Intensitäten nach Anregung mit der jeweils spezifischen Wellenlänge, mit denselben Einstellungen wie vor dem Bleichen aufgenommen. Es wird also bei den fünf Schritten nur einmal die Anregungsstärke für den Akzeptor geändert. Alles andere muß identisch eingestellt bleiben. Danach wird überprüft, ob die Aufnahmen bei Anregung des Donors, nach dem Bleichen des Akzeptors, eine größere Intensität als vorher aufweisen und ob die Aufnahmen des Akzeptors nach dem bleichen eine geringere Intensität als vorher aufweisen. Nur wenn diese beiden Bedingungen erfüllt sind, darf eine FRET-Effizienz nach folgender Formel (Gl. 2.1) aus dem Anstieg der Donor-Emission berechnet werden. Bei dieser Methode muß weder der Dunkelstrom des Photo-Multipliers, noch die Untergrundfluoreszenz der Probe berücksichtigt werden, weil durch dieselben Einstellungen jeder Ort seinen eigenen internen Standard bildet.

$$FRET_{Eff} \% = \frac{D_{post} - D_{pre}}{D_{post}} * 100 \quad (\text{Gl. 2-1})$$

D_{pre} : Donor Fluoreszenz vor dem Bleichen.

D_{post} : Donor Fluoreszenz nach dem Bleichen.

2.2.26 Anregungs-Emissions-Spektroskopie

In diesem Kapitel wird der Aufbau der AES-Anlage, die Datengewinnung und deren Weiterverarbeitung und die Auswertung detailliert beschreiben. Die Anregungs-Emissions-Spektroskopie ist eine Fortführung und Erweiterung der etablierten statischen Fluoreszenz-Spektroskopie. Bei der AES wird beim Durchlaufen eines gewünschten Wellenlängenbereichs zur Anregung eines Fluorophors gleichzeitig für jede Anregungswellenlänge ein Emissionsspektrum im gewünschten Wellenlängenbereich aufgenommen. Die AE-Spektren enthalten wesentlich mehr Information über die statischen Fluoreszenzeigenschaften, als herkömmliche Fluoreszenz-Spektren. Bei Wahl zweier geeigneter Fluorophore lassen sich

damit die Wechselwirkungen beider Fluorophore in einem System bei Anregung erkennen und dadurch auch inter- und intramolekulare Wechselwirkungen beobachten. Ein Spezialfall hiervon ist der Förster-Resonanz-Energie-Transfer, bei dem Energie eines Donors strahlungslos auf einen Akzeptor übertragen wird. Nachfolgend wird das von der Abteilung Physikalische Chemie I zur Verfügung gestellte Meßsystem beschrieben. Noch wesentlich detailliertere Informationen sind sehr gut in der Doktorarbeit von Dr. Regina Plessow (Plessow, 2003) und Dipl. Chemikerin Kirsten Lotte (LOTTE, 1999), Mitarbeiterinnen in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Kohse-Höinghaus, dargestellt. Ziel der Arbeit ist es ein möglichst starkes Signal bei der Akzeptorfluoreszenz zu erhalten.

2.2.27 Aufbau des Meßsystems

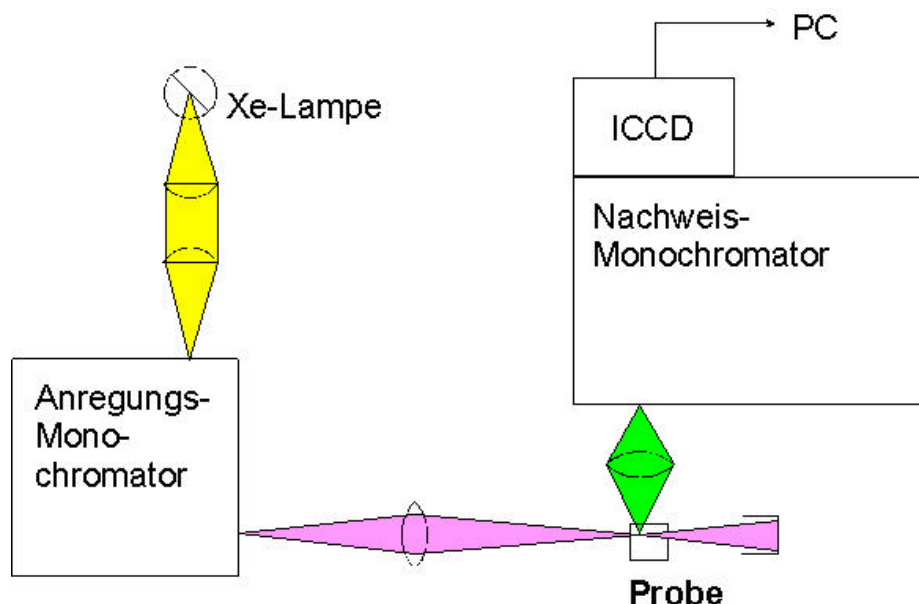


Abb. 2-6 Schematischer Aufbau der AES-Anlage zur Aufnahme der zweidimensionalen Bilder.

Der dieser Arbeit zugrunde liegende Aufbau des Meßsystems ist in Abb. 2-6 dargestellt. Der gesamte Versuchsablauf findet in einem stark abgedunkelten Raum statt. Das Anregungslicht wird von einer 75 Watt Xenon-Bogenlampe, die im Anregungsbereich von 250 – 650 nm ein kontinuierliches Spektrum liefert erzeugt (Abb. 2-7). Die Intensität steigt bis 300 nm stetig an und bleibt dann ziemlich konstant. Die Intensität wird durch einen Reflektor hinter der Lampe weiter erhöht und das Anregungslicht, wird mit Hilfe von zwei Sammellinsen auf den Eingangsspalt des Anregungsmonochromators fokussiert. Das Dispersionsgitter mit 2400 Linien/mm ist bei 240 nm *geblazed* und spektrale Aufspaltung des auf den Ausgangsspalt fokussierten Lichts beträgt 2,7 nm/mm. Die spektrale Spaltöffnung kann im Bereich von

0 - 3 nm verändert und darüber gleichzeitig Auflösung und Intensität beeinflusst werden. Das Anregungslicht wird anschließend über eine Spiegeloptik aus Hohlspiegeln auf die Probe fokussiert. Durch die Hohlspiegel vermeidet man chromatische Abberationen von Linsen, die durch den wellenlängenabhängigen Brechungsindex verursacht werden. Der Fokus des Anregungslichtes befindet sich also unabhängig von dessen Wellenlänge immer an derselben Stelle. Die Präzisionsküvetten stehen in speziell gefertigten Probenhaltern. Der Probenhalter ist in allen drei Achsen durch Mikrometerschrauben feinjustierbar. Die Probe wird dabei so justiert, daß das Anregungslicht am äußeren Rand der Küvette eintritt. Das Emissionslicht wird dabei so dicht wie möglich an der Eintrittsseite detektiert. Damit sollen Intensitätsverluste des Anregungslichts und Reabsorbtionseffekte des Emissionslichts vermieden werden. Bei Bedarf kann die Probe durch einen temperierbaren Probenhalter unabhängig von der Raumtemperatur vermessen werden.

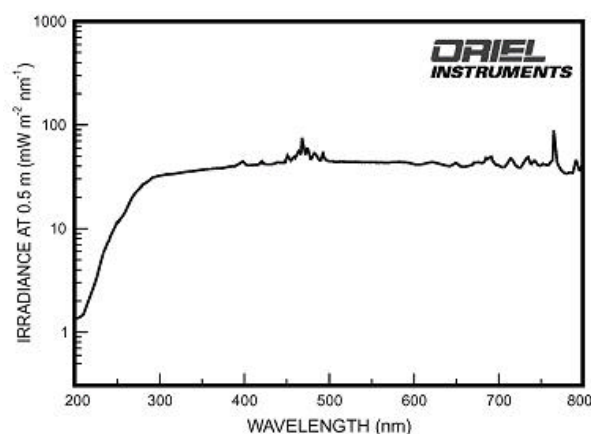


Abb. 2-7 Spektrum der Xenon-Bogenlampe

Die Detektion des emittierten Lichts erfolgt rechtwinklig zum eintretenden Lichtstrahl. Durch eine Eingangsoptik aus je zwei Hohl- und Zylinderspiegeln wird das Licht gesammelt und es werden die astigmatischen Effekte des Monochromators korrigiert. Dadurch entsteht ein ort- und wellenlängenscharfes Bild in der Austrittsebene des Nachweismonochromators. Der Monochromator enthält verschiedene Gitter von denen in dieser Arbeit nur das mit 300 Linien/mm und einer Dispersion von 12 nm/mm (Blaze-Wellenlänge = 300 nm), welches zu einem spektralen Sichtbereich von 290 nm führt, verwendet. Das Emissionslicht wird an der Austrittsebene durch eine CCD-Kamera aufgenommen. Der CCD-Sensor von Hamamatsu weist eine Pixelanzahl von 1024 x 250 Punkten auf. Die CCD-Sensor wird auf - 30°C gekühlt. Die wellenlängeabhängige Detektionseffizienz ist in Abb. 2-8 dargestellt und zeigt, daß das System für den hier untersuchten Bereich sehr gut geeignet ist.

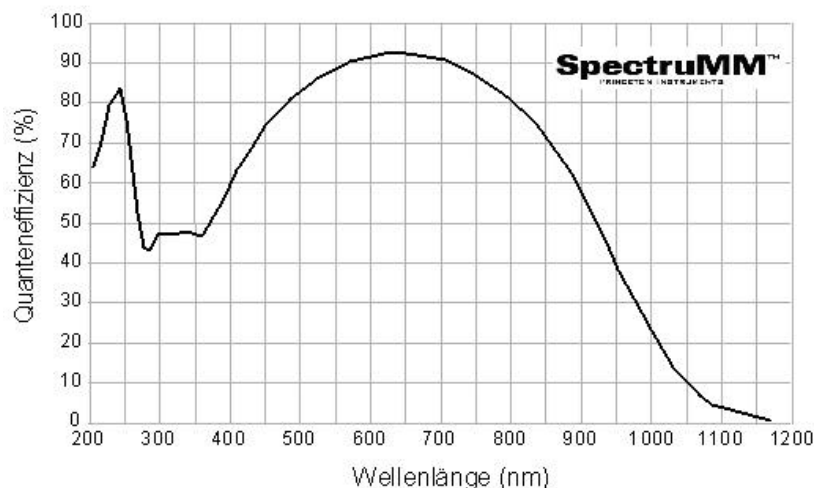


Abb. 2-8 Wellenlängenabhängige Detektionseffizienz des Kamerasystems von Princeton Instruments (SpectruMM:250B) und dem CCD-Sensor von Hamamatsu mit 1024 x 250 Bildpunkten.

2.2.28 Erstellung eines Anregungs-Emissions-Spektrums

Die Kamera wird durch den PC mit dem Programm WinSpec über einen Kontroller gesteuert. Die Bilder werden mit dem Programm WinSpec von Roper Scientific aufgenommen. In der Abb. 2-9 sind 2 Rohdatenbilder dargestellt, die eine Auflösung von 1024 x 252 Pixeln haben, wobei der Sichtbereich der Ortsachse 6 mm mit 42 Pixel = 1 mm entspricht.

Durch die Aneinanderreihung der gemittelten Werte aus den einzelnen Bildern der Emissionswellenlängen bei verschiedenen Anregungswellenlänge ergibt sich ein Anregungs-Emissions-Spektrum (Abb. 2-9). Das AE-Spektrum ist ein dreidimensionales Spektrum, welches die Informationen über das Anregungsspektrum, das Emissionsspektrum und die Intensität enthält. Ein Pixel entspricht 0,28384 nm bei den in dieser Arbeit verwendeten Einstellungen des Gitters von 300 Linien/mm und $\lambda_{em} = 550$ nm. Der Sichtbereich geht damit von 423,352 nm bis 713,88 nm bei den verwendeten Einstellungen. Die Abbildung zeigt eine Gittereinstellung von 600 nm, daher hat die Emissionswellenlänge einen anderen Bereich.

Durch das Programm AES-Control (LETZGUS, 2003) wird die Aufnahme der Bilder automatisch gesteuert. Es triggert die Datenaufnahme und die Selektion der Anregungswellenlänge. Hier hatte die Anregungswellenlänge ein Intervall von 2 nm. Dies ergibt einen guten Überblick über die Fluoreszenzeigenschaften und erlaubt eine Auswertung der Probe auf die jeweiligen Anteile der verschiedenen Fluorophore an der Gesamtfluoreszenz.

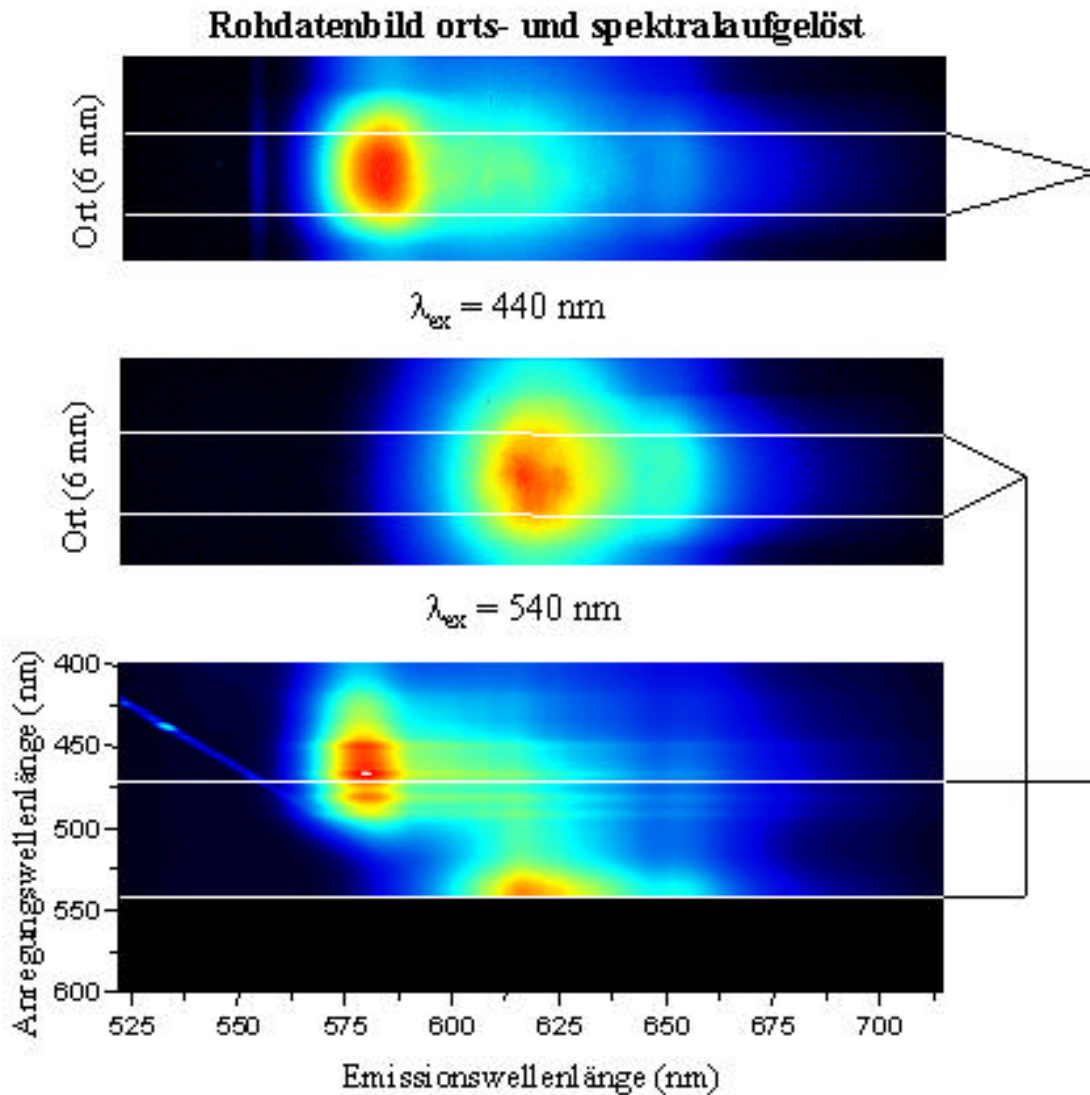


Abb. 2-9 Aufbau eines Anregungs-Emissions-Spektrums. Die Ortsauflösung bei den beiden oberen Bildern beträgt 6 mm bei den Anregungswellenlängen 440 nm und 540 nm. Der Bereich zwischen den weißen Linien wird gemittelt und die Mittelwerte zeilenweise in das Anregungs-Emissionspektrum, daß sich im unteren Bild aufbaut, eingefügt.

Zur Weiterbearbeitung wird mit Hilfe des Programms AES-Eval (BÜLTER ET AL., 2003) ein Dunkelbild von den AE-Spektren abgezogen. Der Abzug des Dunkelbildes eliminiert die Einflüsse des Dunkelstroms der CCD-Kamera und etwaiges Restlicht aus der Umgebung. Zu jeder Aufnahmeserie wird ein zugehöriges Dunkelbild genommen.

Die AES-Untersuchungen wurden mit folgenden Einstellungen vorgenommen:

Gitter 3 mit $\lambda_{\text{em}} 550 \text{ nm}$

Belichtungszeit 10 Sekunden

10,2 nm/Min 101 Bilder

Anregungswellenlänge 400 – 600 nm

Nur für die AE-Spektren der Cyan-Farbstoffe wurde das Gitter des Nachweismonochromators auf λ_{em} 600 nm eingestellt.

2.2.29 Darstellung der Meßpunkte zur Auswertung der AE-Spektren

Das Ziel dieser Arbeit liegt darin, FRET-Sonden zu etablieren, mit denen sich in lebenden Zellen ein stabiles Akzeptorsignal erzeugen läßt, daß von entsprechenden Geräten optisch erkannt wird und zu einer Unterscheidung von Zellen mit und ohne dieses Signal ausreicht. Daher ist hier nicht die Abnahme der Donorfluoreszenz von Interesse, sondern die Zunahme des Akzeptorsignals. Dazu muß sichergestellt sein, daß die beim Emissionsmaximum des Akzeptors detektierte Fluoreszenz ausschließlich von dem FRET stammt und keine anderen Anteile enthält. Die Separation der Spektren ist aufgrund des sehr geringen Stokes-Shifts praktisch nicht möglich. Auch wird sich der Akzeptor immer bei der Anregung des Donors mit anregen lassen. Außerdem reicht das Intervall der Emissionswellenlängen des Donors bis in den Bereich der Emissionswellenlänge des Akzeptors hinein, auch Crosstalk oder durchbluten genannt. Daher wurde eine zusätzliche Methode zur Auswertung des FRET eingeführt. Hierzu wird jeweils ein AE-Spektrum jedes Fluorophors als Referenz aufgenommen (Abb. 2-10). Damit hat man die spektrale Form der Fluoreszenz für jedes Fluorophor ermittelt. Dieses Spektrum ist spezifisch für jeden Farbstoff.

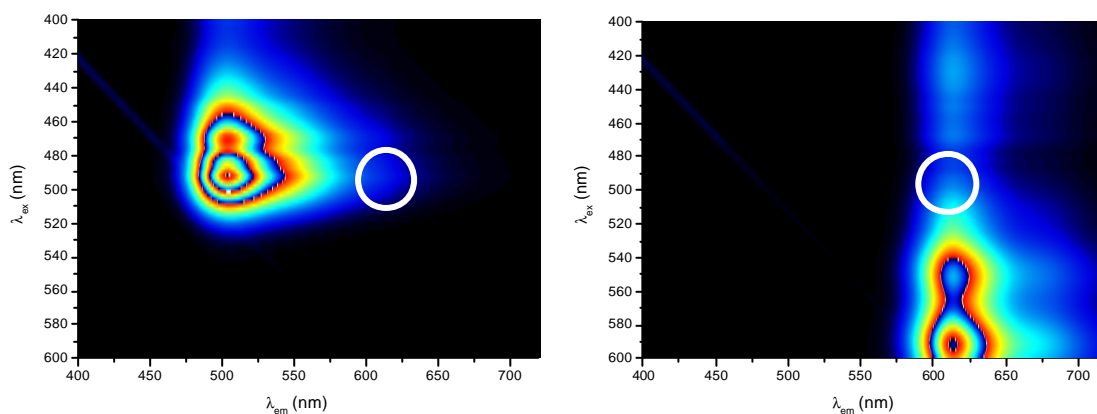


Abb. 2-10 AE-Spektren für Fluorescein und Texas-Red als Referenz für die quantitative FRET-Berechnung. Links das AE-Spektrum für Fluorescein und rechts das für Texas-Red. Der weiße Kreis markiert die referenzierten Orte.

Man erkennt sehr gut, daß das Fluorescein bei Anregung mit Licht der Wellenlänge 488 nm bis in den Emissionsbereich des Texas-Red bei ~ 615 nm hineinstrahlt. Bei Texas-Red

erkennt man, daß dieses sich ebenfalls signifikant bei 488 nm anregen läßt. In Abb. 2-11 sind diese beiden Einzelspektren mit dem Programm AES-Eval addiert worden.

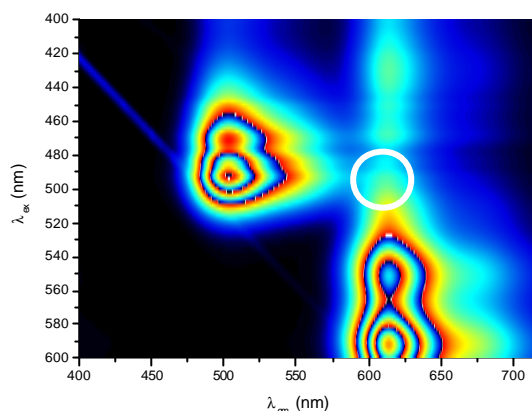


Abb. 2-11 Berechnetes AE-Spektrum aus den beiden Einzelspektren von Fluorescein und Texas-Red in der Abbildung 2-7. Der weiße Kreis markiert den Überlappungsbereich.

Deutlich erkennt man den beschriebenen Zusammenhang, daß Überlappen des Emissionsspektrum von Fluorescein mit dem Anregungsspektrum des Texas-Red und die daraus erhöhte Intensität am Detektionspunkt. In Abb. 2-12 ist ein aufgenommenes AE-Spektrum einer Probe die einen FRET hoher Intensität zeigt dargestellt.

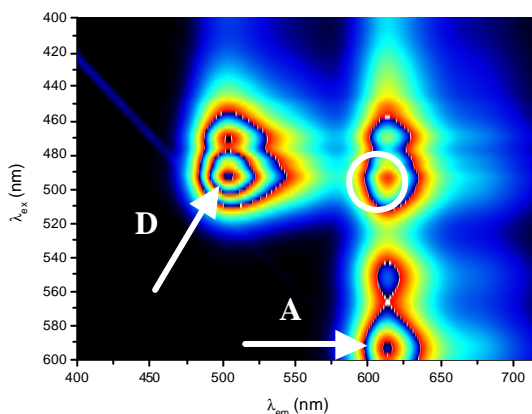


Abb. 2-12 AE-Spektrum einer Probe die einen FRET mit hoher Intensität zeigt. Der weiße Kreis markiert die besprochene Detektionsstelle. Die Pfeile markieren die beiden anderen Meßpunkte.

Wenn man von einem solchen Spektrum die beiden Einzelspektren aus Abb. 2-10 abzieht, erhält man ein von Untergrundfluoreszenz bereinigtes Spektrum des reinen FRET-Anteils an der Gesamt-Fluoreszenz beim Detektionspunkt wie es in der Abb. 2-13 dargestellt ist. Am Meßpunkt D ist die Fluoreszenz im Bereich λ_{em} 500 – 550 nm ausschließlich auf den Donor zurückzuführen. Am Meßpunkt A erkennt man, daß ab einer Anregungswellenlänge von λ_{ex}

540 nm nur noch der Akzeptor fluoresziert. Der weiße Kreis gibt den Bereich an, für den die jeweiligen Anteile der Fluoreszenz berechnet werden.

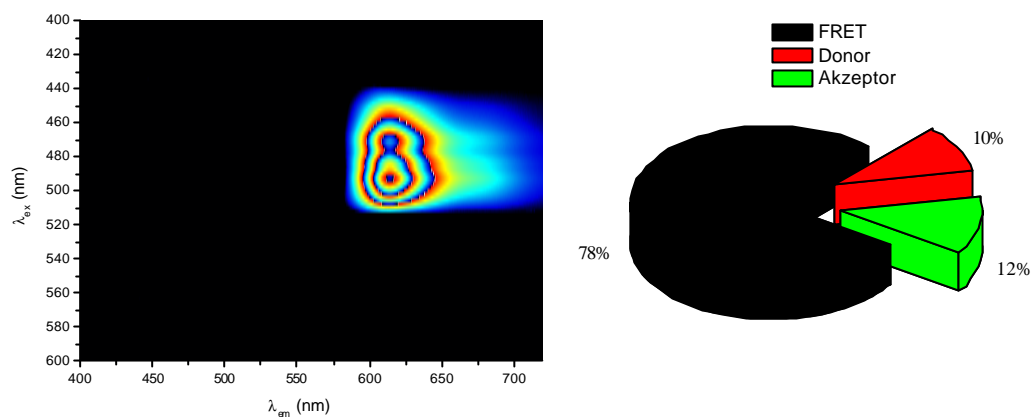


Abb. 2-13 AE-Spektrum des reinen FRET-Anteils, durch Abzug der reinen AE-Spektren der beteiligten Fluorophore. Die Grafik rechts zeigt die einzelnen Anteile der Fluoreszenz am Detektionspunkt exemplarisch aufgeschlüsselt.

Man kann also aus nur drei Meßpunkten quantitativ den Anteil der FRET-Fluoreszenz am Gesamtsignal beim Detektionspunkt herausrechnen. Die prozentuale Verteilung der jeweiligen Fluoreszenz-Anteile ist exemplarisch in der rechten Grafik in Abb. 2-13 dargestellt. Der große Vorteil der Methode ist, daß damit auch sehr geringe FRET-Anteile am Detektionspunkt herausgerechnet werden können. Bei der Beurteilung eines FRET-Paares müssen also immer sowohl der jeweilige FRET-Anteil als auch die Gesamtintensität, am Emissionsmaximum des Akzeptor-Fluorophors, betrachtet und gegeneinander abgewogen werden.

2.2.30 DNA - RNA *in vitro* Hybridisierung

Zur Hybridisierung wird ein 1 x SSC Puffer verwendet. Es ist außerordentlich wichtig den pH-Wert exakt auf 7,1 pH zu halten. Ein niedrigerer Wert würde zur Protonierung zweier Sauerstoffatome im Fluorescein Molekül führen und dessen Fluoreszenz verringert sich dadurch deutlich. Diese Puffer wird nach Maßgabe RNase frei gemacht. Es wird mit DEPC behandeltes und autoklaviertes Wasser eingesetzt.

Der 1 x SSC-Puffer setzt sich wie folgt zusammen:

3,0 M NaCl

0,3 M $\text{Na}_3[\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7]$

mit 14 N HCl
pH 7,1 einstellen

Der 1 x SSC-Puffer wird unter anderem als Hybridisierungspuffer gewählt, weil dieser Puffer in vielen Publikationen ebenfalls benutzt wird. Das verhindert Interpretationsfragen bei Vergleichen. Außerdem hat der SSC-Puffer den Vorteil, daß er in dem gesamten Spektrum das untersucht wurde keine intrinsische Fluoreszenz zeigte. Alle Primer sind auf 20 µM eingestellt bevor sie zur Verwendung kommen. In ein Eppendorfgefäß werden folgende Komponenten zügig vereinigt:

5 µl des DNA-Templates (20 µM)
5 µl des Donor-Primers (20 µM)
5 µl des Akzeptor-Primers (20 µM)

150 µl 1xSSC-Puffer

Es ist wichtig, beim pipettieren darauf zu achten, daß keine Tropfen in der Pipettenspitze oder an der Gefäßwand hängenbleiben. Es soll so zügig wie möglich gearbeitet werden, da konzentrierte DNA leicht an der Gefäßwand denaturiert. Der 1 x SSC-Puffer sollte nur mit einer 1 ml Spitze pipettiert werden. Hier ist der Fehler, der durch eine Schwankung entsteht, am geringsten in Bezug auf das Ergebnis. Durch die große Spitzenöffnung ist jedoch sichergestellt, daß die eingesetzte DNA beim mischen nicht durch Scherkräfte zerstört wird. Der gesamte Ansatz wird dann in eine Quarzküvette überführt. Dann wird die Quarzküvette in einen Eppendorf-Thermoschüttler (Thermomixer 5436) überführt. Alle Proben werden dann für 10 Minuten auf 94°C erhitzt. Der Thermoschüttler wird dann auf die gewünschte Meßtemperatur heruntergeregelt. Wenn nicht anders erwähnt, wurde immer bei 20°C gemessen. Nach Erreichen der Meßtemperatur werden die Proben noch 30 Minuten ruhen gelassen, bevor die Fluoreszenz gemessen wird. Alle Arbeiten werden in einem dunklen Labor ausgeführt, nur die Pipettierschritte finden bei schwachem Licht statt.

2.2.31 Bildnachbearbeitung

Einige Mikroskop-Bilder sind mit Adobe Photoshop (Version 6.0) nachbearbeitet worden. Es sind jedoch keine Veränderungen an Pixeln durchgeführt worden.

3 Ergebnisse

3.1 AES-Messungen

Ziel der hier dargestellten Untersuchungen war es, eine oder sogar mehrere optimierte FRET DNA-Sonden zu entwickeln. Hierzu sollten entsprechende FRET DNA-Sonden Paare an komplementäre DNA Sequenzen hybridisiert werden (Abb. 3-1).



Abb. 3-1 Schema der Hybridisierung von DNA-Oligonucleotiden an eine komplementäre Sequenz. Links ungebundene Sonden, bei Anregung des Donors emittiert der Donor Fluoreszenz-Strahlung. Rechts gebundene Sonden, bei Anregung des Donors emittiert der Akzeptor Fluoreszenz-Strahlung.

Die Sequenzen wurden so gewählt, daß sie mit Abschnitten aus der gesuchten RNA übereinstimmen. Bei vorliegen geeigneter Paare sollen diese dann *in situ* an die Ziel-RNA hybridisieren. In dieser Arbeit wurden Zielsequenzen der γ -Globin, GAPDH und CD-59 mRNA als Motive eingesetzt. Obwohl theoretische Berechnungen voraussagen, daß ein FRET in dem hier zu untersuchenden mikromolaren Konzentrationsbereich nicht ohne Hybridisierung an eine Zielsequenz auftreten kann, wurden zur Sicherheit Kontrollversuche durchgeführt.

3.1.1 Untersuchung des AE-Spektrums des SSC-Puffers

Um sicherzustellen, daß der bei den *in vitro* Hybridisierungen verwendete SSC-Puffer nicht störende spektroskopische Eigenschaften aufweist, wurde ein AE-Spektrum (Abb. 3-2) zur Kontrolle erstellt.

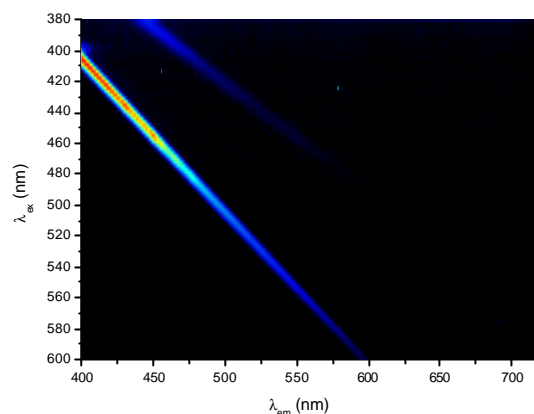


Abb. 3-2 A E-Spektrum von SSC-Puffer.

Abgesehen vom Rayleigh-Licht und der schwachen Raman-Strahlung ist zu sehen, daß der SSC-Puffer keine intrinsische Fluoreszenz im Bereich der zu untersuchenden AE-Spektren zeigte.

3.1.2 Kontrollmessungen zur Primerkonzentration

Zur Bestätigung, daß kein falsch-positiver FRET in den zu messenden Proben auftrat, wurden die synthetisierten Primer in einer Verdünnungsreihe vermessen. Dies wurde sowohl mit den nicht modifizierten Fluorophor markierten Primern, als auch mit den Phosphothioate (PTA) modifizierten Primern untersucht. Als Referenz wurde auch je ein Standardansatz der modifizierten und unmodifizierten Primer vermessen.

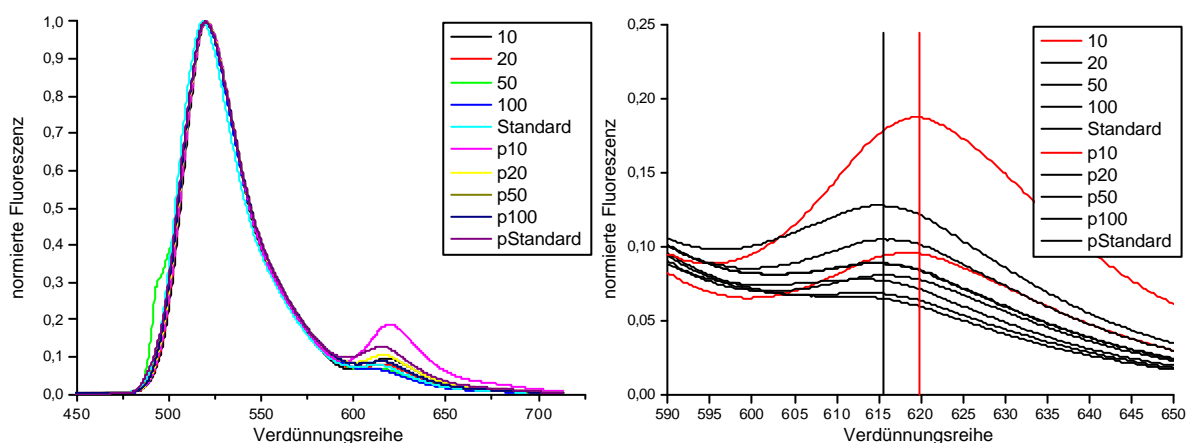


Abb. 3-3 Auftragung der Verdünnungsreihe von Donor-Akzeptor Oligonucleotiden. Links die auf die Fluorescein normierte Darstellung, rechts der Ausschnitt aus dem Bereich der Akzeptor-Fluoreszenz von 590 - 650 nm. Die p-Indizes kennzeichnen die PTA-modifizierten Primer. Standard entspricht der Menge von Primern in den Versuchsansätzen.

In Abb. 3-3 sind in der linken Graphik die auf Fluorescein normierten Graphen der Verdünnungsreihe für die Verdünnungen von 1:10 bis 1:100 aufgetragen. Es ist zu erkennen, daß bei den jeweiligen Verdünnungsstufen kein FRET auftritt, sowohl bei den unmodifizierten, als auch bei den modifizierten Primern. In der rechten Graphik ist der Bereich von 590 - 650 nm vergrößert dargestellt. Deutlich ist eine Verschiebung der Emissionswellenlänge bei den beiden 1:10 Verdünnungen (rot gekennzeichnet) zu erkennen. Diese Verschiebung ist noch stärker auch auf den Rohdatenbildern der AE-Spektren, für die ersten drei Verdünnungsansätze, zu erkennen. In (Abb. 3-4) ist das AE-Spektrum für den 1:1 Ansatz der unmodifizierten Primer zu sehen. Bei dem 1:1 Ansatz scheint das Fluorescein vollständig ausgelöscht, während dessen Intensität bei dem 1:2 Ansatz (Abb. 3-4) wieder zunimmt. Auffallend ist auch, daß das Anregungsspektrum des Texas-Red ganz anders verläuft als normal. Hier scheint das Anregungsmaximum der Emission bei 545 nm zu liegen. Das für Texas-Red typische dreigeteilte AE-Spektrum ist kaum zu erkennen. Auch die Emissionswellenlänge ist, gegenüber dem Referenzspektrum, deutlich in den langwelligen Bereich verschoben. Ebenfalls zeigen die Bilder eine Schwankung bei der Intensität des Raleigh-Lichts.

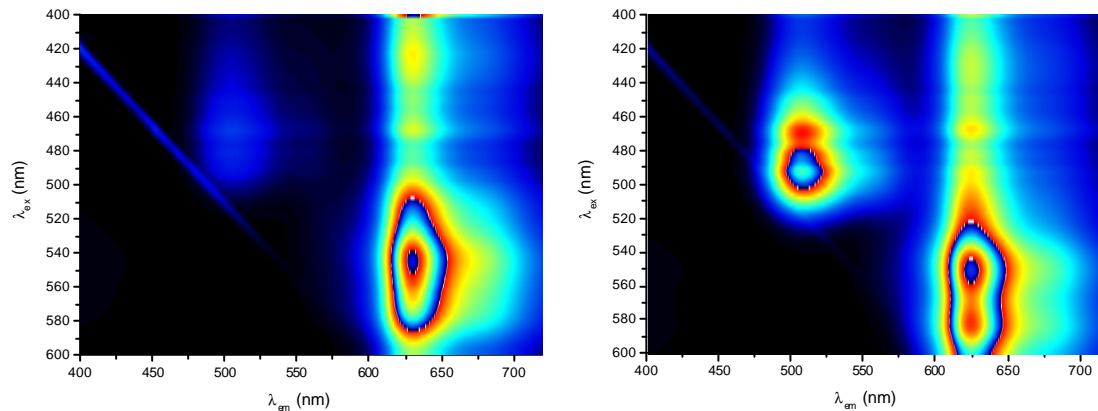


Abb. 3-4 AE-Spektren der zwei Verdünnungsstufen von Primer:SSC-Puffer von 1:1 (links) und von 1:2 (rechts).

Trotz der Auslöschung des Fluoresceins handelt es sich hier nicht um einen FRET. Dazu müßte die Emission des Texas-Reds bei der Anregungswellenlänge des Fluoresceins (496 nm) ansteigen, was sie nicht tut. Verantwortlich für diese ungewöhnlichen Spektren ist die Konzentration der Primer. Die Proben sind optisch dicht, daß heißt die Absorption ist so hoch, daß es fast zu keiner Anregung mehr kommt. In der 1:2 Verdünnung nimmt die Durchlässigkeit der Probe schon wieder zu. Dort ist eine Anregung des Fluorescein Primers, als auch des Texas-Red Primers, wenn auch noch schwach zu erkennen. Das Gleiche gilt auch

für die 1:5 Verdünnung (hier nicht dargestellt). Ab den 1:10 Verdünnungen ist die Absorption wieder soweit gesunken, daß die Anregung der Fluorophore nicht mehr vermindert wird.

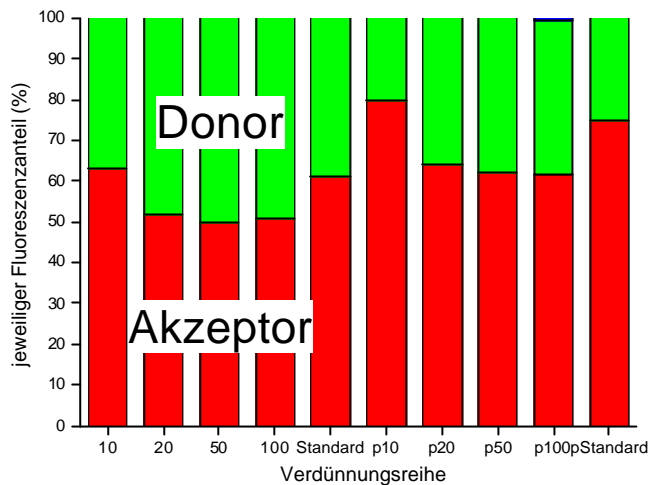


Abb. 3-5 Anteile der jeweiligen Fluorophore an der Fluoreszenz der Verdünnungsreihe. Die Werte der Ordinate beziehen sich auf das Volumenverhältnis zum SSC-Puffer. Standard bezieht sich auf die Mengenverhältnisse des Standardansatzes. Das p-Indizes bezeichnet die PTA-Primer.

In dem Balkendiagramm (Abb. 3-5) ist die rechnerische Auswertung der jeweiligen Fluoreszenzanteile beim Emissionsmaximum des Texas-Red für alle Verdünnungsstufen ab 1:10 dargestellt. Sowohl für die nichtmodifizierten Primer, die modifizierten Primer und die beiden Standardansätze. Die Auswertung bestätigt den optischen Eindruck aus der Darstellung der auf Fluorescein normierten Graphen in Abb. 3-3. In keiner Verdünnungsstufe kommt es zu einem Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) und somit zu keinem falsch positiven FRET-Signal.

3.1.3 Korrelation von Temperatur und GC-Gehalt

Die Temperaturabhängigkeit bei der Hybridisierung (selbst-) komplementärer Abschnitte von Nucleinsäuren ist hinlänglich bekannt und erforscht. Die Ausbildung einer Doppelhelix erfolgt unter Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindung. Die Stabilität der Doppelhelix wird maßgeblich durch die Länge der hybridisierten Stränge und den GC-Gehalt beeinflusst. Durch ein Erhöhen der Temperatur werden die Wasserstoffbrückenbindungen zerstört und das Gleichgewicht verschiebt sich in Richtung der einzelsträngigen Nucleinsäurestränge. Der Prozeß der Hybridisierung verläuft in zwei unterschiedlich schnellen Schritten. Das Zusammentreffen zweier Stränge ist um so wahrscheinlicher, je höher die Temperatur und damit Häufigkeit der zufälligen Zusammenstöße ist. Im Verhältnis zur dann folgenden Paarung der restlichen Basen ist der erste Schritt aber immer der Langsamere. Je dichter

jedoch die Temperatur an den Schmelzpunkt heranrückt, desto mehr steigt die Zerfallsrate des Doppelstranges an. Der Schmelzpunkt (T_m) gibt die Temperatur an, bei welcher doppelsträngige DNA in die Einzelstränge übergeht und hängt vom GC-Gehalt, der Länge der Sequenz und der chemischen Umgebung ab. Die Länge der DNA-Sonden die in dieser Arbeit gesucht wurden, sollte voraussichtlich zwischen 10 und 25 Basen liegen. Hinsichtlich einer späteren Verwendung in lebenden Zellen und dem Umstand, daß diese normalerweise unter standardisierten Bedingung von 37°C gehalten werden, sollte die Temperatursensitivität des Energietransfers beispielhaft betrachtet werden. Hierzu wurden drei Meßreihen, bei unterschiedlicher Temperatur, an einem FRET-Paar, das einem Abschnitt im Exon 2 des G-Gamma-Globin-Gens komplementär ist, untersucht. Die Länge der Fluorescein markierten Donor-DNA betrug 15 Basen und die Länge aller Texas-Red markierten Akzeptorprimer betrug 10 Basen. Die DNA-Matrize ist 40 Basen lang. Alle Versuchsreihen wurden mehrmals durchgeführt. Der Abstand zwischen dem Donor-Primer und den jeweiligen Akzeptor-Primern variierte von einer Base bis hin zu fünfzehn Basen Distanz. Die Abbildung (Abb. 3-6) zeigt die gemittelten Werte der Meßreihen für die Temperaturen 20, 30 und 40°C.

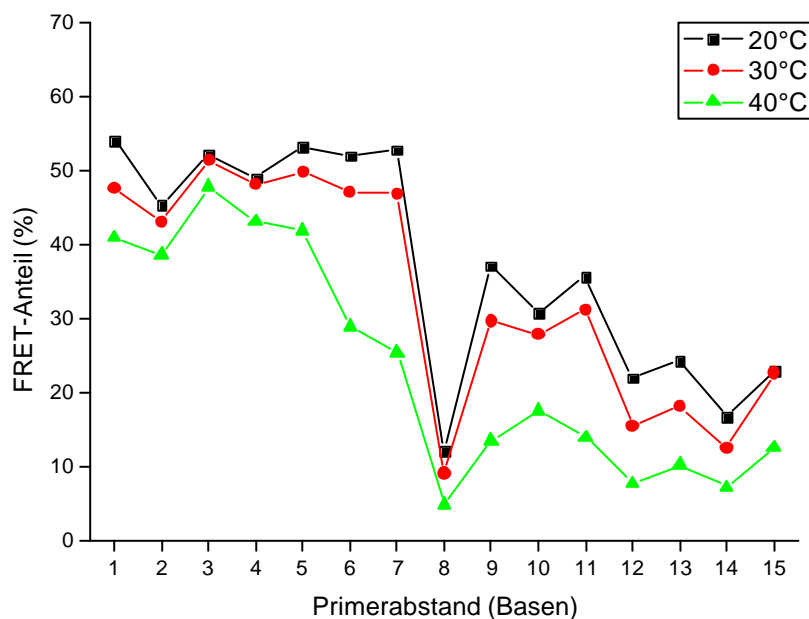


Abb. 3-6 Temperatur- und Abstandsabhängigkeit des FRET-Anteils. Aufgetragen ist der Primerabstand gegen den FRET-Anteil bei $\lambda_{ex} = 492$ nm und $\lambda_{em} = 615$ nm für alle 3 Temperaturen.

In der grafischen Darstellung kann man den Trend zur Abnahme des FRET-Anteils an der Gesamtfluoreszenz am Detektionspunkt $\lambda_{em} = 615$ nm, bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda_{ex} = 492$ nm bei allen drei Temperaturen beobachten. Für Fluorescein und Rhodamine liegt der Försterradius R_0 zwischen 40 – 60 Å. Das entspricht bei der Ausbildung einer

Doppelhelix einer Abnahme des Energietransfers von ~ 10% bei einer Distanzerhöhung von 0 auf 9 bis 13 Basen, je nach verwendetem Fluorescein-Rhodamin-Paar. Alle drei Temperaturkurven zeigen den erwarteten sigmoiden Verlauf. Bei der höchsten Temperatur 40°C nimmt der FRET-Anteil am Signal am stärksten ab. Dort sind die wenigsten Oligonucleotide an das DNA Komplement gebunden.

Der Einbruch des FRET-Anteils für den Primerabstand von 8 Nucleotiden läßt sich wahrscheinlich auf den GC-Gehalt zurückführen. Legt man unter die Temperaturkurve den jeweiligen GC-Gehalt (Abb. 3-7) der Akzeptor-Primer erkennt man, daß der Primer 8 als einziger nur 3 GC-Basenpaarungen ausbildet. Der Schmelzpunkt für diesen Primer beträgt 26°C. Dies legt nahe, daß fast alle Moleküle ungebunden in der Lösung bleiben. Auffallend ist, daß auch die Hybridisierungen bei 20 und 30°C praktisch ergebnislos hinsichtlich eines Energietransfers bleiben.

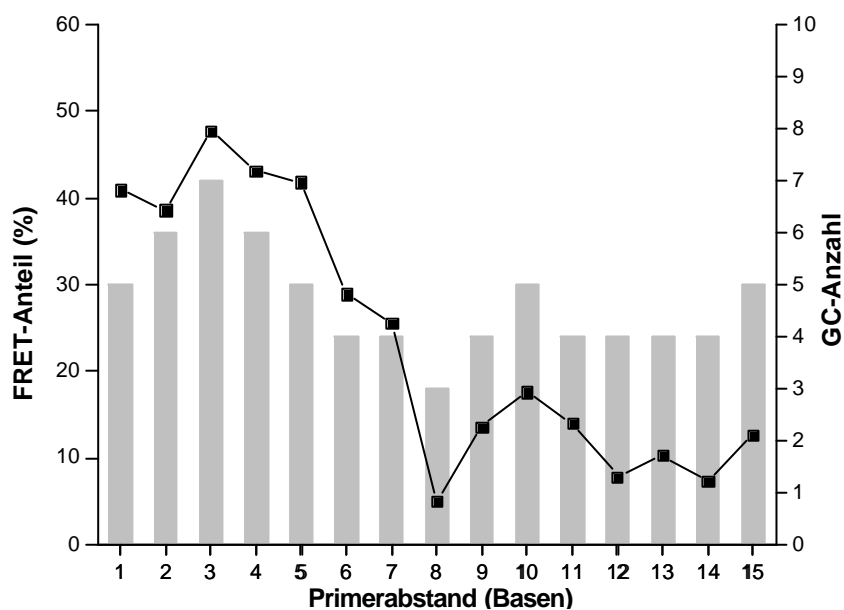


Abb. 3-7 Einfluß des GC-Gehalts auf den FRET -Anteil. Dargestellt ist der Primerabstand gegen den FRET-Anteil und den korrelierenden GC-Gehalt, für die Abstände 1 bis 15 Nucleotide.

Die Vorhersage für die Abnahme der FRET-Effizienz bei der Zunahme des Abstandes zwischen den beiden Primern wurde bestätigt. Die gemachten Beobachtungen führen zu dem Schluß, daß die Abstände zwischen den Primern eines FRET Paares zwischen 5 und 10 Basen liegen und das der GC-Gehalt mindestens 50 % der jeweiligen Primersequenz ausmachen sollte. Die Auswertung der Temperaturversuche legte nahe, den Einfluß der Primerlänge auf den Energietransfer ebenfalls zu untersuchen.

3.1.4 Einfluß der Primerlänge auf den Energietransfer

Durch eine Zunahme der Primerlänge erhöht sich automatisch auch die Schmelztemperatur der DNA-Primer und damit sollte sich das Verhältnis von unhybridisierten zu hybridisierten DNA-Primern in Richtung der Hybridisierung verbessern. Daher wurden auch längere Fluorescein - Texas-Red Primer-Paare synthetisiert und vermessen. Die verwendeten Sequenzen für die jeweiligen Donor- und Akzeptor-Primer waren so gewählt, daß der Abstand zwischen den beiden immer 5 Basen betrug. Die des weiteren untersuchten Sequenzen waren 10-, 12-, 21-, 25- und 26-Basen lang. Die geeichten und auf das Fluorescein normierten Emissionspektren sind in Abbildung (Abb. 3-8) dargestellt.

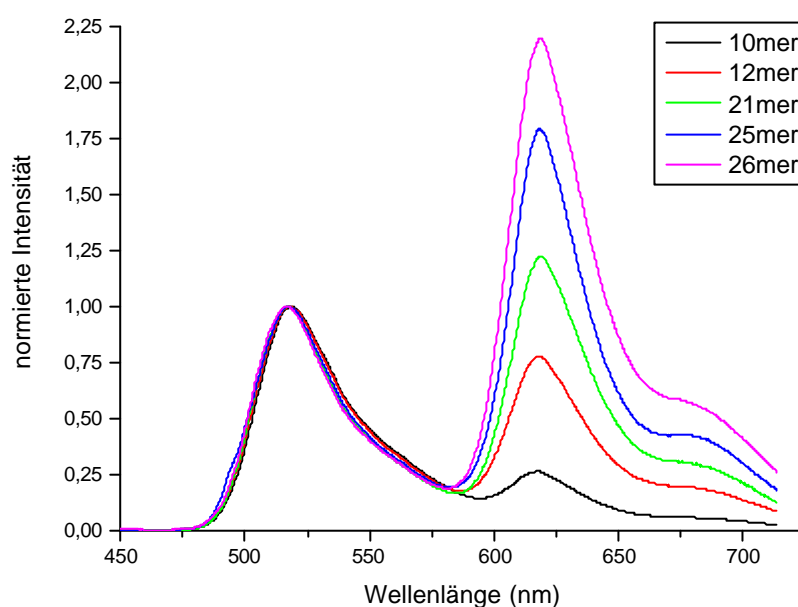


Abb. 3-8 Energietransfer in Abhängigkeit der Primerlänge. Dargestellt sind die auf Fluorescein normierten Emissionspektren bei der Anregungswellenlänge $\lambda_{ex} = 492$ nm.

Die Emissionspektren der verschieden langen Primer zeigen einen Zuwachs der Akzeptorfluoreszenz in Abhängigkeit von der ansteigenden Primerlänge. Der FRET-Anteil an der Gesamtfluoreszenz am Detektionspunkt beträgt für das 10-mer 50 % und steigt über 84 % und 85 % bei dem 12- und 21-mer auf 87 % bei den beiden längsten Primern an. Damit einher geht die Zunahme der FRET-Effizienz von 13 % beim kürzesten Primer über 30, 73 und 78 % bis auf 82 % beim längsten Primer mit 26 Basen. Eine Verlängerung der Primer erhöht die FRET-Effizienz deutlich.

3.1.5 Fluorescein mit unterschiedlichen Akzeptor-Fluorophoren

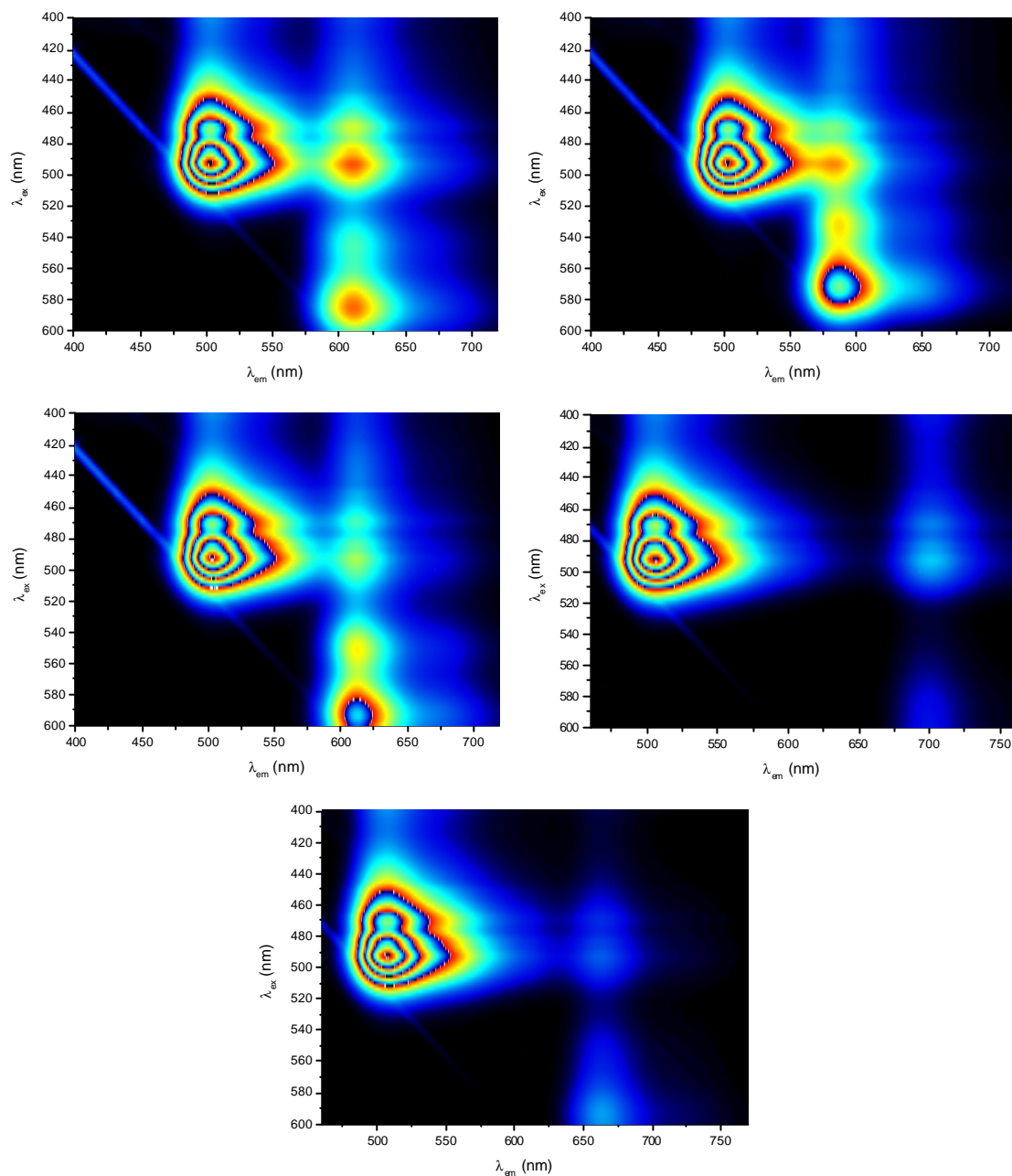


Abb. 3-9 AE-Spektren der verschiedenen Primer nach Bindung an das DNA-Komplement. Dargestellt sind von links oben nach rechts unten: Rhodamin-X, Rhodamin-Red, Texas-Red, Cy 5.5 und Cy 5. Die Aufnahmen sind auf die Fluorescein-Intensität normiert und für die beiden Cy-Farbstoffe wurde der Detektionsbereich erweitert.

Aus verschiedenen Gründen schien es ratsam auch andere Akzeptor-Fluorophore, hinsichtlich ihrer Eignung als FRET-Partner, für Fluorescein zu testen (Abb. 3-9). Texas-Red wurde für die ersten Versuche gewählt, weil dessen Emissionsmaximum genau in die Absorptionslücke des Hämoglobins fällt, gleichzeitig aber noch ein großes Überlappungsspektrum mit Fluorescein hat.

Es wurden zwei weitere Rhodamin-Derivate, Rhodamin-Red und Rhodamin-X, gewählt, deren Absorptionsspektren dichter am Emissionsspektrum des Fluoresceins liegen. Außerdem wurden zwei Fluorophore (Cy5 und Cy5.5) mit deutlich in den langwelligen Rotbereich verschobenen Absorptions- und Emissionsspektren gewählt. Alle Akzeptor-Primer variieren in den Abständen zum Donor-Primer von 5 bis 10 Nucleotiden und entsprachen einander in den jeweiligen Sequenzen. Das DNA-Komplement zur Hybridisierung der FRET-Primer ist 45 Basen und der Fluorescein markierte Primer 14 Basen lang. Somit waren alle Messungen abgesehen von dem jeweils zum Einsatz kommenden Akzeptor-Fluorophor identisch. Zur Verdeutlichung sind in (Abb. 3-9) die AE-Spektren für jeweils einen Akzeptor dargestellt. Auf allen Bildern ist ein FRET zu erkennen. Des weiteren lassen sich die unterschiedlichen Anregungsspektren der verschiedenen Akzeptoren deutlich voneinander unterscheiden (vertikale Achse beim jeweiligen Emissionsmaximum). Ebenso deutlich sind die Verschiebungen der Emissionswellenlänge für die einzelnen Akzeptor-Fluorophore zu erkennen. Das wird auch bei der graphischen Auftragung der Emissionsspektren für die einzelnen Fluorophore bei der Anregungswellenlänge des Fluoresceins ($\lambda_{\text{ex}} = 496 \text{ nm}$) deutlich. In den AE-Spektren ist auch gut die Abnahme der Überschneidung des Emissionsspektrums des Fluoresceins mit den Anregungsspektren der verschiedenen Akzeptoren zu sehen. Die Integrale der Überlappungsspektren nehmen in dieser Reihenfolge ab: Rhodamin-Red, Rhodamin-X, Texas-Red, Cy 5, Cy 5.5.

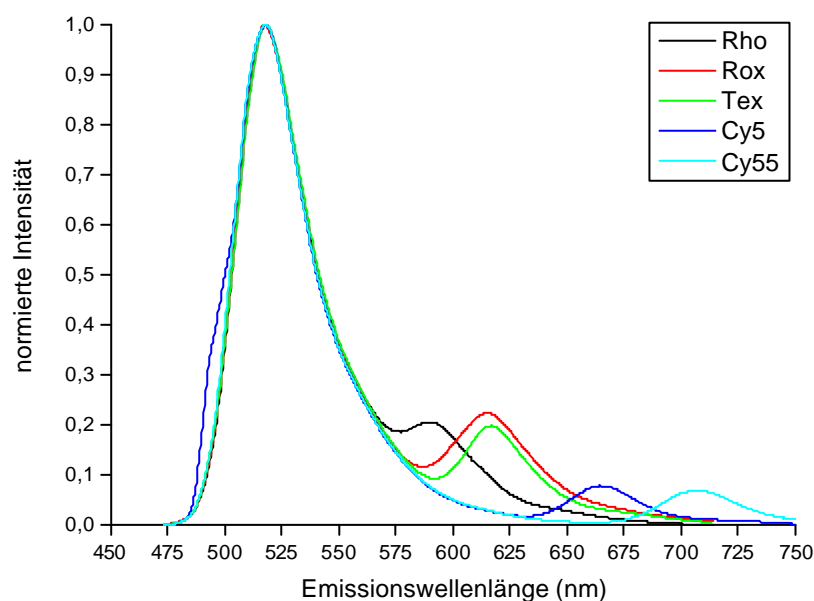


Abb. 3-10 Emissionsspektren der 5 verschiedenen Akzeptor-Primer, normiert auf die Fluorescein-Intensität bei der Anregungswellenlänge $\lambda_{\text{ex}} = 492 \text{ nm}$.

Wie in Kapitel Methoden beschrieben, wird aus dem Emissionsspektrum und dem Anregungsspektrum, der Anteil des FRET an der Gesamtfluoreszenz bei der Detektionsstelle bestimmt. Die grafische Auftragung ist in (Abb. 3-11) dargestellt.

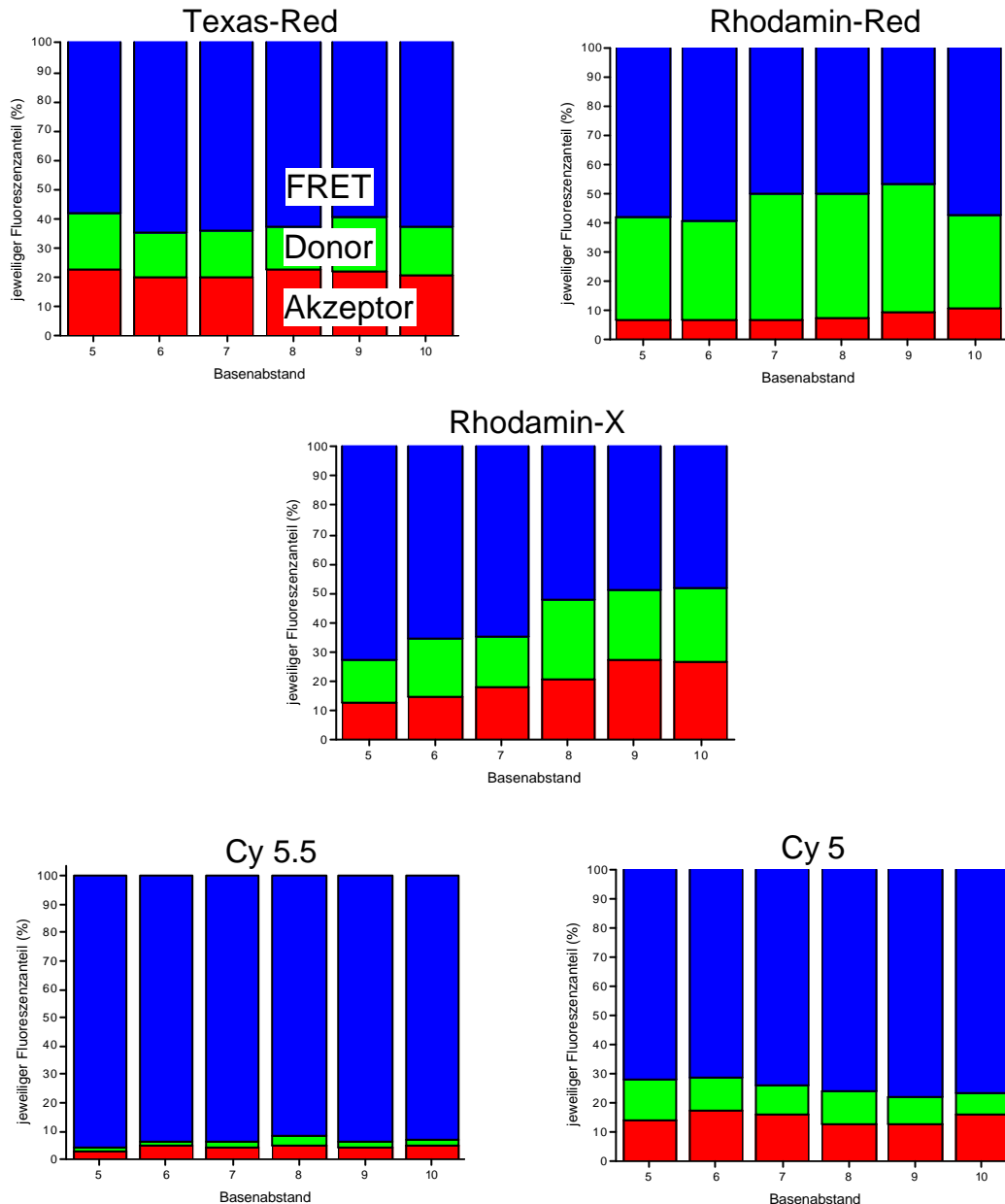


Abb. 3-11 Darstellung der Intensitätsanteile für Donor-, Akzeptor- und FRET-Fluoreszenz bei $\lambda_{ex} = 492$ nm und $\lambda_{em} = 615$ nm mit dem D-Fluorescein als Donor, für alle 5 verschiedenen Akzeptoren und für die Abstände von 5 bis 10 Nucleotiden.

Bei der Betrachtung erkennt man, daß beim Rhodamin-Red durchschnittlich fast 40 % der Fluoreszenzintensität am Detektionspunkt vom Fluorescein stammt. Die direkte Akzeptoranregung hingegen ist mit ≈ 10 % sehr gering. Der große Anteil der Donor-Fluoreszenz rührt von dem geringen Abstand zur Fluoresceinemission her. Für Rhodamin-X

und Texas-Red schwankt der Anteil der reinen Donor- und Akzeptorfluoreszenz im Mittel um $\approx 20\%$. Bei Cy 5 sinkt der Anteil der Donorfluoreszenz auf durchschnittlich $\approx 12\%$ ab. Der deutliche Abstand zur Fluoresceinmission des Farbstoffes wird hier sichtbar. Der Anteil der Donor- und Akzeptorfluoreszenz beim Cy5.5 liegt in der Summe der beiden nur noch bei $\approx 7\%$. Durch die große Nähe zum Spektrum des Fluoresceins war das Rhodamin-Red als FRET-Akzeptor nicht gut geeignet. Cy5.5 zeigte den größten FRET-Anteil an der Intensität, aber ist in der Gesamtintensität des Signals am Detektionspunkt so schwach, daß es ebenfalls ungeeignet war. Cy 5 zeigt nach Cy5.5 den geringsten Anteil an direkter Fluoreszenz des Donor- und Akzeptor-Primers. Doch auch hier ist die Gesamtintensität am Detektionspunkt deutlich geringer als bei Rhodamin-X und Texas-Red.

Die gesonderte Betrachtung der Anteile des FRET an der Gesamtintensität am Detektionspunkt zeigt für alle Abstände zwischen Donor und Akzeptor von 5 - 10 Basen des jeweiligen Primers nur wenig Schwankung (Abb. 3-12).

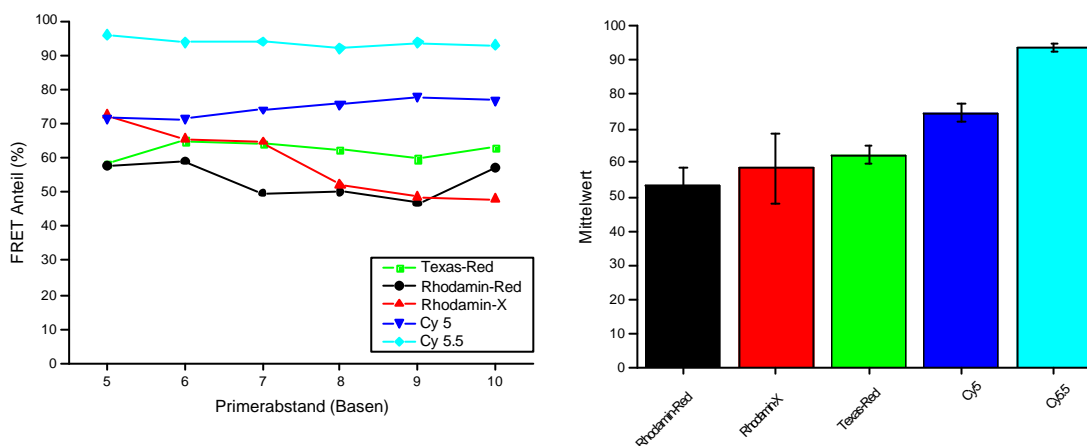


Abb. 3-12 Prozentualer FRET-Anteil der Gesamtintensität am Detektionspunkt der 5 verschiedenen Donor-Akzeptor Paare. Links: FRET-Anteil bezogen auf den Abstand von Donor und Akzeptor. Rechts: Darstellung der Mittelwerte, mit Standardabweichung

Die Darstellung der Mittelwerte des prozentualen FRET-Anteils am Gesamtsignal gegen die zunehmende Distanz der jeweiligen Akzeptorspektren der Primer zum Fluoresceinspektrum, bestätigt die positive Korrelation der beiden Parameter. Während die Rhodamin-Derivate alle einen ähnlichen prozentualen FRET-Anteil von $\approx 53\%$ beim Rhodamin-Red, $\approx 59\%$ beim Rhodamin-X und $\approx 62\%$ beim Texas-Red aufweisen, unterscheiden sich die beiden Cy-Farbstoffe davon, als auch untereinander deutlich. Cy 5 mit $\approx 75\%$ und Cy 5.5 mit $\approx 94\%$ Anteil des FRET-Signals an der Gesamtintensität.

Zur vollständigen Beurteilung muß auch die absolute Intensität der Signale berücksichtigt werden. Für die Akzeptoren ist dies vernachlässigbar, da diese bei der gewählten Anregungswellenlänge nicht signifikant angeregt werden. Dies gilt jedoch nicht für das Fluorescein. Darum wurde aus den gemessenen AE-Spektren auch das Verhältnis der Maximalintensität von Fluorescein zum FRET-Signal, nach der Gleichung (Gl. 3.1) berechnet.

$$R_{Donor} = \frac{I((FRET - Donor) bei I_{ex}^{492} und I_{em}^{Akz})}{I(I_{max}^{Donor})} \times 100\% \quad (\text{Gl. 3.1})$$

I: Intensität

R_{Donor} ist für Cy 5.5 = 5 % und für Cy 5 = 5,1 %, für Rhodamin-Red = 11,3 %, für Rhodamin-X = 12,4 % und für Texas-Red = 13 %. Somit ergibt sich für die Rhodamin-Derivate ein durchschnittliches Verhältnis R_{Donor} von 12,2 % und für die Cy-Farbstoffe von 5 %.

3.1.6 Doppelt Fluorescein markierte Donor Primer

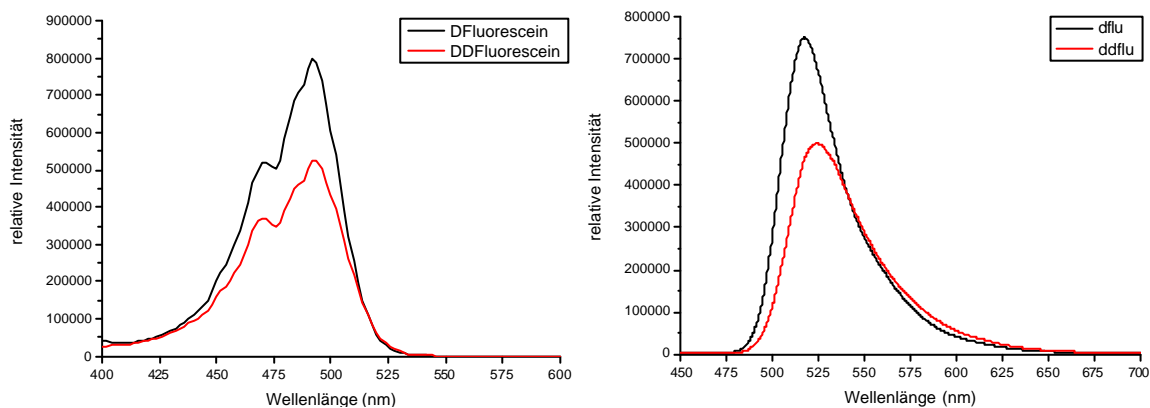


Abb. 3-13 Emissionsspektrum (links) und Anregungsspektrum (rechts) im Vergleich des D- und DD-Fluoresceins. Anregungswellenlänge $\lambda_{ex} = 492$ nm.

Nicht nur die absolute Intensität und der Anteil des FRET-Signals daran sind Parameter die optimiert werden können. Doppelt Fluorescein markierte Donor-Sonden zeigen andere spektroskopische Eigenschaften als einfach markierte Sonden. Dies kann dazu führen, daß die Akzeptorintensität gegenüber einem einfach markierten Donor deutlich ansteigt und sich damit das Signal- / Rauschverhältnis noch verbessert (Abb. 3-14). Zu diesem Zweck wurde ein Donor synthetisiert, dessen Sequenz identisch ist, mit der des einfach markierten Donors

aus den Versuchen mit verschiedenen Akzeptor-Fluorophoren. Der Unterschied bestand darin, daß der Donor am 3'-Ende, über einen entsprechenden Linker, mit 2 Fluorescein Molekülen pro DNA-Oligonucleotid markiert war.



Abb. 3-14 Doppelt Fluorescein markierte Donor-Sonde. Links ungebundene Sonden, bei Anregung des Donors emittiert dieser durch Selbstquenching weniger Fluoreszenz-Strahlung als ein einfach markierter Primer. Rechts gebundene Sonden, bei Anregung des Donors emittiert der Akzeptor Fluoreszenz-Strahlung.

Die AE-Spektren für das D-Fluorescein (ein Fluorescein gekoppelt) und das DD-Fluorescein (zwei Fluoresceine gekoppelt) zeigen, daß das Maximum des Emissionsspektrums sich von dem ursprünglichen Wert von 517 nm nach 524 nm verschoben hat. Bei Betrachtung des Anregungsspektrums erkennt man auch eine Änderung in Form und Intensität des Anregungsspektrums.

Die Auswertung der AE-Spektren zeigt hinsichtlich der Gesamtintensität am Detektionspunkt keine signifikanten Unterschiede zu den Ergebnissen mit dem einfach markierten Donor-Oligonucleotid. Bei der Betrachtung, der prozentualen Anteile der Intensität die vom Donor, Akzeptor und FRET am Detektionspunkt stammen, zeigen sich unterschiedliche Auswirkungen. Bei Rhodamin-Red als Akzeptor ist die vom Donor stammende Fluoreszenz stärker und der Anteil aus dem FRET-Signal schwächer geworden. Beim Rhodamin-X hat der Anteil der FRET-Fluoreszenz zugenommen und der Anteil der Donor-Fluoreszenz ist vermindert. Bei Texas-Red scheint der FRET-Anteil an der Gesamtfluoreszenz ebenfalls leicht zurückzugehen. Bei beiden Cy-Fluorophoren hat sich nur das Verhältnis der Anteile von Donor und Akzeptor geändert, der prozentuale Anteil der FRET-Intensität hingegen nicht.

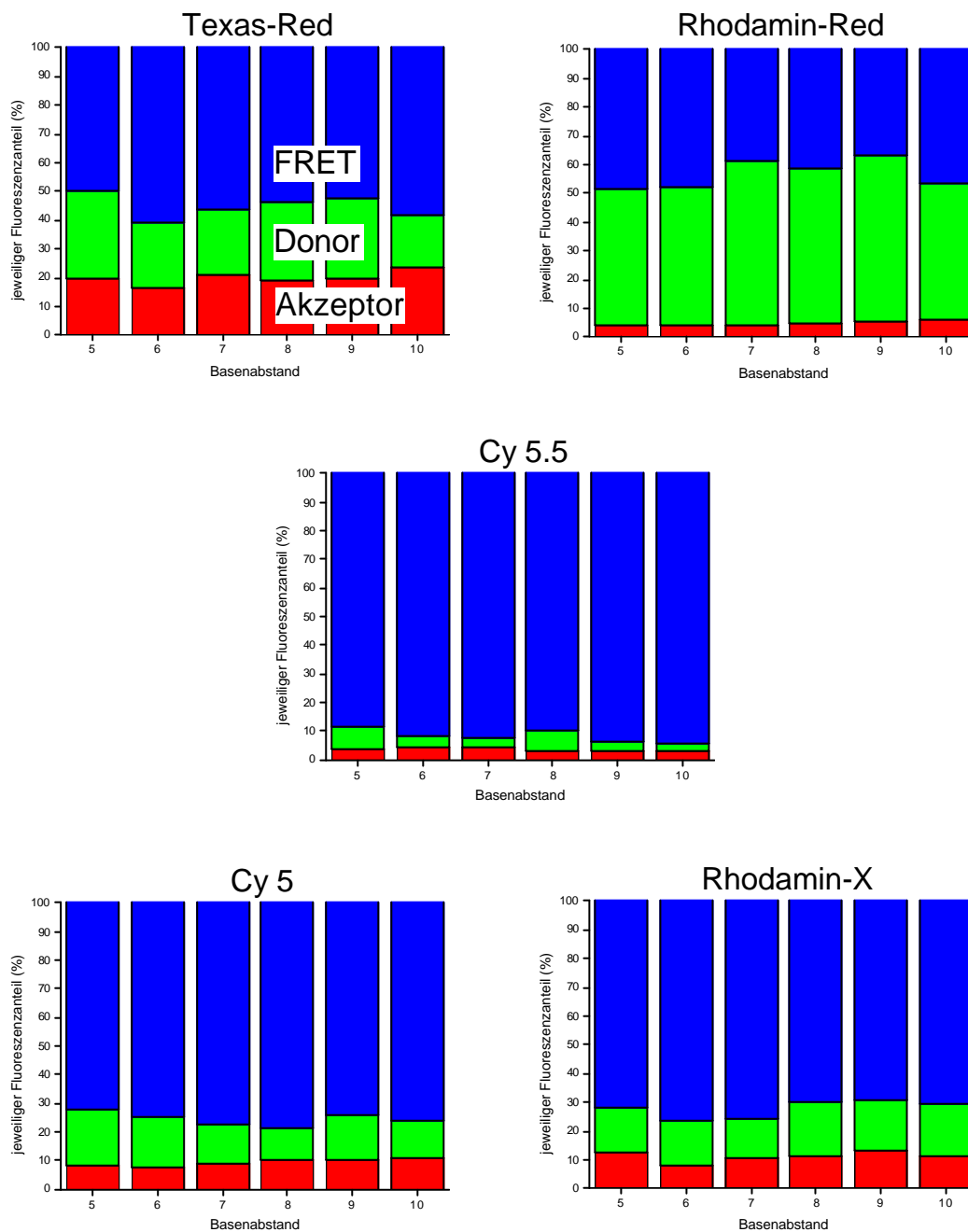


Abb. 3-15 Darstellung der Intensitätsanteile für Donor-, Akzeptor- und FRET-Fluoreszenz bei $\lambda_{ex} = 492$ nm und $\lambda_{em} = 615$ nm mit dem DD-Fluorescein als Donor, für alle 5 verschiedenen Akzeptoren und für die Abstände von 5 bis 10 Nucleotiden.

Wenn man die über 6 Basenabstände gemittelten Werte, des prozentualen Anteils der FRET-Fluoreszenz, für jedes Donor- / Akzeptor-Paar mit D- und DD-Fluorescein als jeweiligem Donor gegeneinander aufträgt, werden die Änderungen der Verhältnisse zueinander deutlich (Abb. 3-16). Das Rhodamin-Red hat einen signifikant (≈ 20 %) verminderten FRET-Anteil an der Gesamtintensität beim DD-Fluorescein Donor gegenüber dem D-Fluorescein Donor. Auch der FRET-Anteil beim Texas-Red Akzeptor nimmt bei Anregung durch den DD-Fluorescein Donor signifikant (≈ 12 %) ab. Das Rhodamin-X verhält sich nicht so, sondern

dort steigt der Anteil der FRET-Intensität bei dem doppelt markierten Donor-Oligonucleotid deutlich ($\approx 24\%$) an. Die beiden Cy-Fluorophore Cy5 und Cy5.5 zeigen keine Änderung des FRET-Anteils an der Gesamtintensität. Dort ändert sich nur das Verhältnis der direkten Donor und Akzeptor Fluoreszenz, ohne das dies sich in der Summe auswirkt.

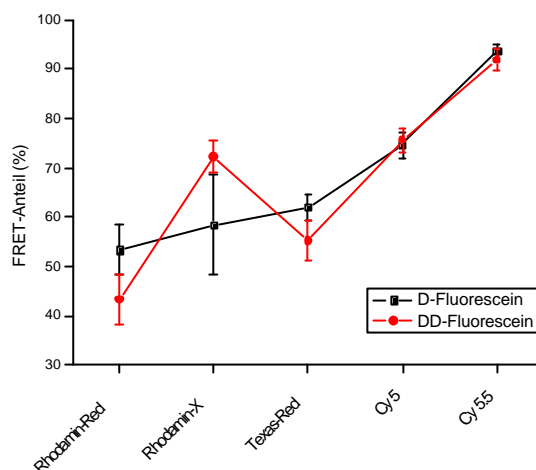


Abb. 3-16 Darstellung der, über die 6 Basenabstände jedes Donor/Akzeptor Paares, gemittelten Werte mit Standardabweichung. Aufgetragen ist der prozentuale FRET-Anteil an der Gesamtintensität.

Die erwartete Effizienzerhöhung des FRET-Signals am Detektionspunkt hat sich für die Kombination zweier Fluorescein-Fluorophore als doppelt markierter Donor nicht eingestellt. Nur das Rhodamin-X zeigt eine signifikante Zunahme.

3.1.7 Texas-Red mit unterschiedlichen Donor-Fluorophoren

Bei fluoreszenzspektroskopischen Anwendungen ist die Gefahr des Ausbleichens (*Photo bleaching*) der Fluorophore in der Regel immer gegeben und häufig limitiert sie eine experimentelle Fragestellung oder verhindert die Überprüfung sogar. Da Fluorescein zu den Fluorophoren gehört die relativ schnell ausbleichen, sollten auch noch Donor-Fluorophore die in der Praxis eine größere Toleranz, gegenüber einer intensiven Anregung oder langen Exposition zeigen, ausprobiert werden. Zu diesen gehört vor allem Alexa 488. Es wurden außerdem noch 3 weitere Fluorophore hinsichtlich ihrer Eigenschaften als Donor in einem FRET Paar mit Texas-Red als Akzeptor Fluorophor eingesetzt: Bodipy 493/503, Oregon-Green, Rhodamin-Green und als Vergleich auch wieder Fluorescein. Notwendige Bedingung für alle 4 Fluorophore ist außerdem, daß sie ihr Anregungsmaximum wie auch Fluorescein dicht bei der Laserkennlinie eines Argonlasers von 488 nm haben.

Alle 5 Donor-Primer haben dieselbe Sequenz und sind 25 Nucleotide lang. Die Kopplung erfolgte am 3'-Ende. Der Akzeptor-Primer ist gegenüberliegend am 5'-Ende mit Texas-Red gekoppelt und ebenfalls 25 Nucleotide lang. Der Abstand zwischen dem Donor- und Akzeptor-Primer beträgt jeweils 5 Nucleotide. Das DNA-Komplement war 68 Nucleotide lang. Hinsichtlich ihres Extinktionskoeffizienten unterschieden sich alle 5 Fluorophore nicht sehr stark. Alexa 488 hat mit 71.000 den geringsten und Bodipy 493/503 mit 79.000 den größten Koeffizienten.

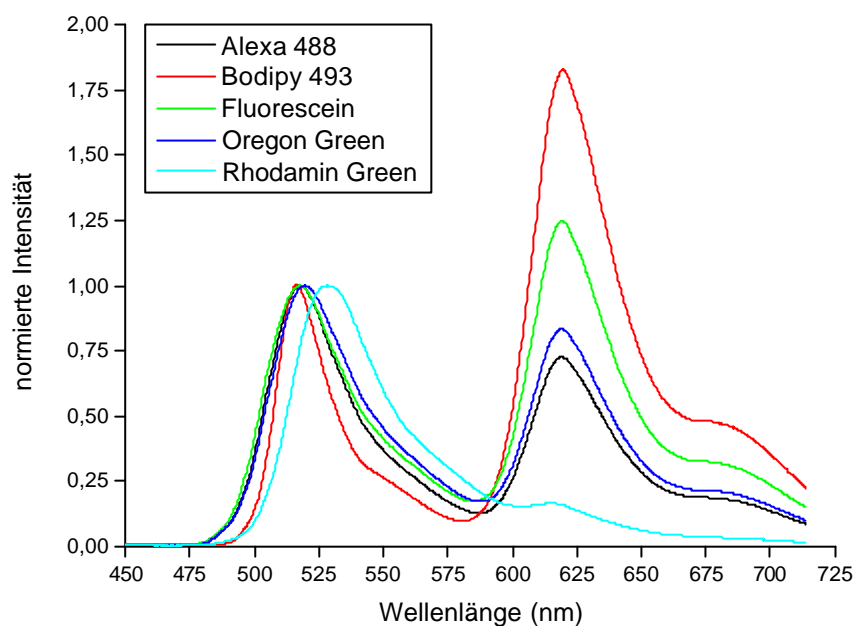


Abb. 3-17 Emissionsspektren der jeweiligen Donor-Primer, normiert auf die Fluorescein-Intensität bei der Anregungswellenlänge $\lambda_{ex} = 492$ nm.

Die auf Fluorescein normierten Emissionsspektren (Abb. 3-17) der 5 verschiedenen Donor-Fluorophore zeigen, bis auf das Emissionsspektrum mit dem Rhodamin-Green als Donor, ein FRET-Signal. Bei Betrachtung der Emissionsmaxima der jeweiligen Donor-Fluorophore erkennt man die deutliche Verschiebung des Maximums beim Rhodamin-Green. Außerdem ist zu erkennen, daß der Anstieg und Abfall des Signals von Bodipy 493 steiler sind als der aller anderen Fluorophore. Das FRET-Signal mit der höchsten Intensität wird vom Bodipy 493 Donor erzeugt. Fluorescein erzeugt die zweithöchste Intensität und Alexa 488 und Oregon Green zeigen eine ähnliche Intensität des FRET-Signals am Detektionspunkt. Zur Verdeutlichung sind die auf Fluorescein normierten AE-Spektren dargestellt (Abb. 3-18). In allen Bildern ist deutlich das Raleigh-Licht zu erkennen. In der vertikalen Betrachtung bei den jeweiligen Emissionswellenlängen erschließen sich die Anregungsspektren der jeweiligen Fluorophore und auch hier erkennt man die Verschiebung, hin zu größeren Wellenlängen, des

Rhodamin-Green im Gegensatz zu den 4 anderen Donor-Fluorophoren. Der steile An- und Abstieg am Maximum der Anregungswellenlänge von Bodipy493 bildet sich in dieser zweidimensionalen Abbildung als kleinere Fläche verglichen mit denen der anderen 4 Donor-Fluorophoren ab.

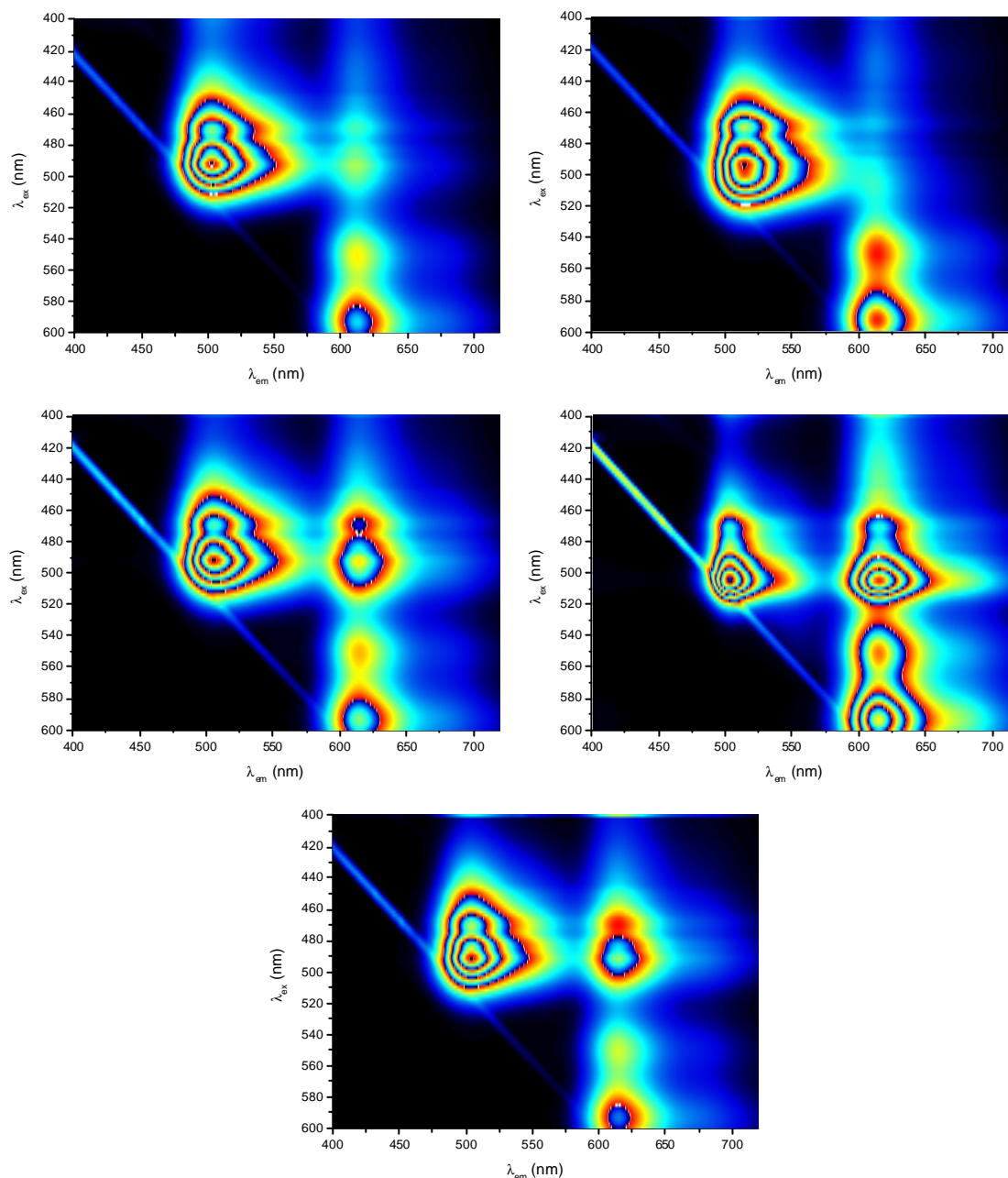


Abb. 3-18 AE-Spektren der verschiedenen Donor-Primer, mit Texas-Red als Akzeptor, nach Bindung an das DNA-Komplement. Dargestellt sind von links oben nach rechts unten: Alexa 488, Rhodamin-Green, Fluorescein, Bodipy 493 und Oregon Green. Die Aufnahmen sind auf die Fluorescein Intensität normiert.

Die grafische Auftragung der jeweiligen Intensitätsanteile an der Gesamtfluoreszenz ist in (Abb. 3-19) dargestellt. Bei der Betrachtung der prozentualen Anteile der Herkunft der

jeweiligen Fluoreszenz erkennt man, daß beim Rhodamin-Green $\approx 78\%$ der Gesamtintensität der Fluoreszenz am Detektionspunkt vom Donor und Akzeptor und nur $\approx 22\%$ vom FRET-Signal stammen. Die Effizienz ist entsprechend $\approx 5\%$ sehr gering. Bei Alexa 488 stammen $\approx 72\%$ der Intensität aus dem FRET-Signal und die FRET-Effizienz beträgt $\approx 30\%$. Das Fluorescein zeigt einen prozentualen FRET-Anteil von $\approx 82\%$ bei einer FRET-Effizienz von $\approx 62\%$. Den höchsten FRET-Anteil am Signal beim Detektionspunkt weisen Oregon-Green mit $\approx 87\%$ und Bodipy 493 mit $\approx 88\%$ auf. Die FRET-Effizienz unterscheidet sich jedoch bei beiden erheblich, wie die stark verschiedene Intensität an der Detektionswellenlänge schon andeutet. Oregon Green erreicht eine FRET-Effizienz von $\approx 42\%$ und Bodipy 493 von $\approx 93\%$. Damit zeigt Bodipy 493 eine bessere FRET-Effizienz, bei ansonsten vollkommen identischen Bedingung, als Fluorescein.

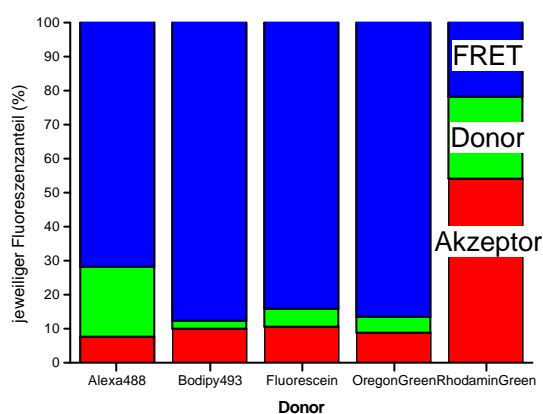


Abb. 3-19 Darstellung der Intensitätsanteile für Donor-, Akzeptor- und FRET-Fluoreszenz bei $\lambda_{ex} = \text{Max}$. Donor und $\lambda_{em} = 615 \text{ nm}$ mit Texas-Red als terminal markierter Akzeptor für die jeweiligen Fluorophore.

3.1.8 Vergleich von interner und endständiger Markierung mit Fluorophoren

Mit denselben Donor-Fluorophoren markierte DNA-Oligonucleotide, wurden auch daraufhin untersucht, ob sich das FRET-Signal verändert, wenn das Akzeptor-Oligonucleotid so gewählt wird, daß zwischen Donor und Akzeptor nur eine Base fehlt und nicht hybridisiert und das Akzeptor-Oligonucleotid intern 5 Basen von dem Donor-Oligonucleotid entfernt mit dem Akzeptor-Fluorophor markiert wird. Es wurde also nur das Akzeptor-Oligonucleotid gegenüber dem vorherigen Versuch verändert. In der Darstellung der prozentualen Anteile der Herkunft der Fluoreszenz (Abb. 3-20) erkennt man für alle 5 Donor-Fluorophore eine

Erhöhung des FRET-Anteils am Gesamtsignal an der Detektionsstelle. Diese Zunahme geht bei allen mit einer Verminderung des Anteils der Donor-Fluoreszenz einher. Bei Bodipy493 erhöht sich allerdings der Anteil der Akzeptor-Fluoreszenz. Es sollte daher auch bei den FRET-Effizienzen zu einer Zunahme kommen.

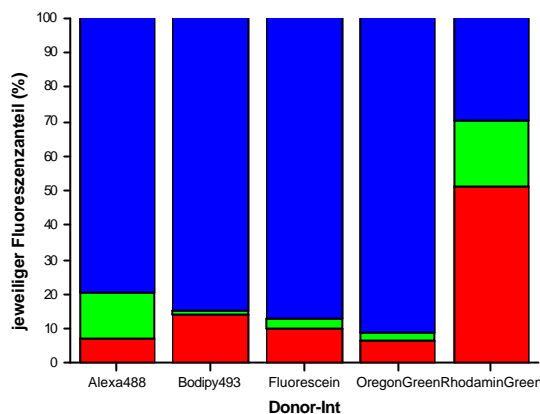


Abb. 3-20 Darstellung der Intensitätsanteile für Donor-, Akzeptor- und FRET-Fluoreszenz bei $\lambda_{ex} = \text{Max}$. Donor und $\lambda_{em} = 615 \text{ nm}$ mit Texas-Red als intern markierter Akzeptor für die jeweiligen Fluorophore.

Betrachtet man die prozentualen Werte des FRET-Anteils gegen die Werte der nicht intern markierten Primer, dann steigt die FRET-Effizienz geringfügig, im Mittel um $\approx 3 \%$, (Abb. 3-21).

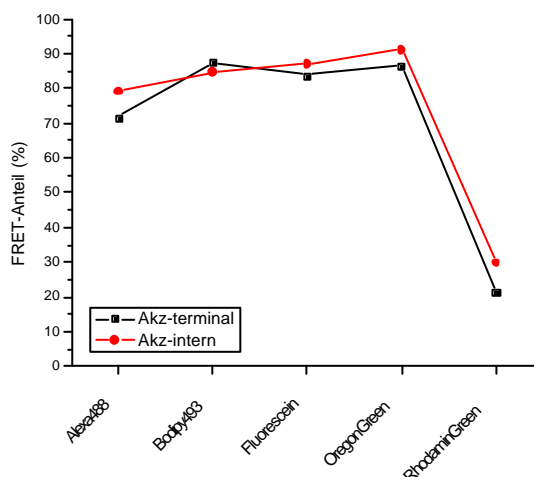


Abb. 3-21 Aufgetragen sind die prozentualen Anteile des FRET-Signals, bei verschiedenen Donor-Fluorophoren, gegen den intern und den terminal mit Texas-Red markierten Akzeptor.

Bis auf den Bodipy 493 Donor steigt bei den intern markierten Oligonucleotiden der FRET-Anteil an der Gesamtintensität des Signals am Detektionspunkt um $\approx 3 \%$ an. Dieser Anstieg ist allerdings nicht signifikant.

3.1.9 5' - 3' Markierung kurzketziger DNA-Oligonucleotide

Dabcyl wird als sogenannter Schwarz-Quencher, unter anderem für Fluorescein eingesetzt, weil es die aufgenommene übertragene Energie als Wärmestrahlung an die Umgebung abgibt, aber die Donor-Fluoreszenz fast vollständig löschen kann. Daher wurden zwei sehr kurze DNA-Oligonucleotide (6- und 7-Basenpaare lang) synthetisiert, welche endständig mit Fluorescein (3'-Ende) und Dabcyl (5'-Ende) gekoppelt sind (Abb. 3-22).



Abb. 3-22 Kurzketzige Fluorescein / Dabcyl markierte Donor-Sonde. Links ungebundene Sonden, bei Anregung des Donors emittiert dieser fast keine Fluoreszenz-Strahlung. Rechts gebundene Sonden, bei Anregung des Donors geht der Energie Transfer aufgrund der geringeren Distanz in Richtung des Akzeptor-Fluorophors.

Wenn ein weiterer Quencher für das Fluorescein dichter an dieses herangelangt, als der erste Quencher, sagt die Theorie, daß der Energieübertrag jetzt zwischen den beiden dichter beieinander liegenden Fluorophoren stattfindet.

Die Intensität der beiden jeweils endständig mit Dabcyl und Fluorescein gekoppelten Oligonucleotide ist am Emissionsmaximum des Fluorescein sehr niedrig (Abb. 3-23). Im Vergleich mit dem gemessenen Maximum eines nur mit Fluorescein markierten Oligonucleotids ist die absolute Intensität um den Faktor $\approx 7,2$ beim 7-mer und 8,8 bei dem 6-mer geringer. Der Donor wird also sehr stark ausgelöscht. Nach Zugabe des DNA-Komplements und der Akzeptor-Primer, die mit Texas-Red markiert sind, ändern sich die Emissionsspektren. Wenn der Abstand zum Texas-Red Akzeptor-Oligonucleotid nur 1 Base beträgt, sinkt die Fluoresceinintensität bei beiden noch etwas ab. Wenn der Abstand zum Texas-Red Akzeptor-Oligonucleotid jedoch 5 Basen beträgt, steigt die Fluoresceinintensität bei beiden leicht an. Auffallend ist bei allen vier Tests mit dem Akzeptor-Oligonucleotid die Emission im Bereich des Maximums des Texas-Red. Der Vergleich mit dem an derselben Stelle gemessenen Emissionsspektrum eines nur mit Texas-Red markierten Oligonucleotids

offenbart jedoch, daß es sich bei dem Signal nicht um einen FRET handelt, sondern um die direkte Anregung des Texas-Red, bei der Anregungswellenlänge des Fluoresceins.

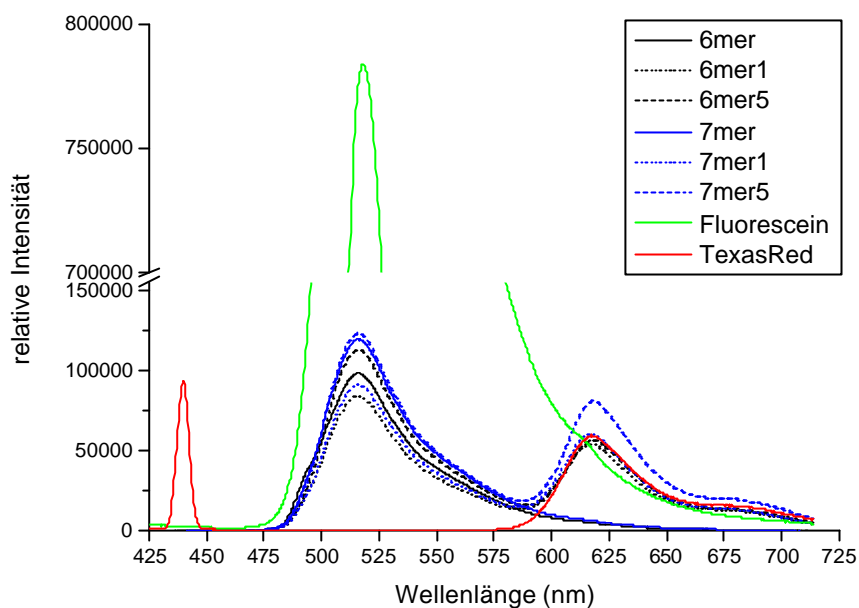


Abb. 3-23 Dargestellt sind die Emissionsspektren für die doppelt terminal markierten Oligonucleotide mit und ohne zweites Quencher Fluorophor Texas-Red. Ebenfalls aufgetragen sind die Emissionsspektren von Fluorescein und Texas-Red. Alle Bilder sind bei der Anregungswellenlänge $\lambda_{ex} = 492$ nm aufgenommen. Zur besseren Übersichtlichkeit ist die Ordinate zwischen 150.000 und 700.000 unterbrochen.

3.1.10 Loop-Struktur DNA-Oligonucleotide

Um das stöchiometrische Problem der ungleichen Verteilung, welches immer auftritt, wenn zwei Komponenten in einem System eingesetzt werden, zu umgehen, wurden auch einzelsträngige Oligonucleotide synthetisiert, diese sind intern mit Fluorescein und Texas-Red markiert (Abb. 3-24).



Abb. 3-24 Loop-Sonde intern mit Fluorescein / Texas-Red markiert. Links ungebundene Sonden, bei Anregung des Donors emittiert dieser Fluoreszenz-Strahlung. Rechts gebundene Sonden, bei Anregung des Donors geht der Energie Transfer aufgrund der geringeren Distanz in Richtung des Akzeptor-Fluorophors.

Dabei hybridisieren die nach auswärts gerichteten Sequenzen, an eine komplementäre Sequenz. Zwischen den beiden Fluorophoren wurde nur Thymin eingesetzt, dieser Bereich bildet dann den Loop, wenn das Oligonucleotid an eine komplementäre Sequenz bindet. Dadurch kommen die beiden Fluorophore jetzt in räumliche Nähe und ein FRET ist möglich. Die Länge dieses internen Bereichs wurde variiert und zwar in den Abständen 5, 10, 15 und 20 Nucleotide. Das DNA-Komplement ist 46 Oligonucleotide lang und die jeweiligen Loop-Oligonucleotide sind 45, 50, 55 und 60 Basen lang.

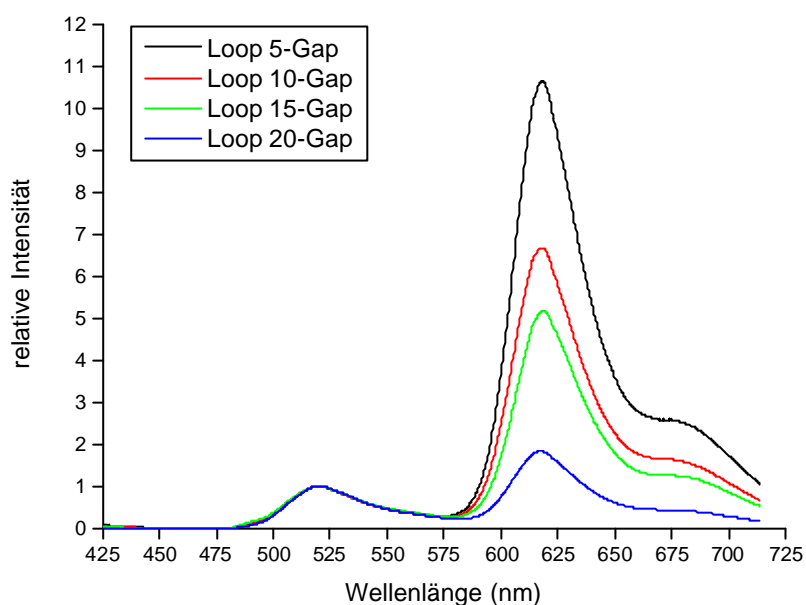


Abb. 3-25 Darstellung der auf Fluorescein normierten Emissionsspektren der Loop-Primer, die bei der Anregungswellenlänge $\lambda_{\text{ex}} = 492$ nm aufgenommen wurden.

Die Darstellung der Emissionsspektren (Abb. 3-25), bei der Anregungswellenlänge $\lambda_{\text{ex}} = 492$ nm, der Loop-Primer ohne DNA-Komplement zeigt für alle 4 Loop-Primer einen sehr großen FRET. Die Intensität des FRET-Signals fällt dabei mit der zunehmenden Entfernung zwischen den beiden Fluorophoren ab und ist bei dem Oligonucleotid mit 20 Basen Abstand am geringsten.

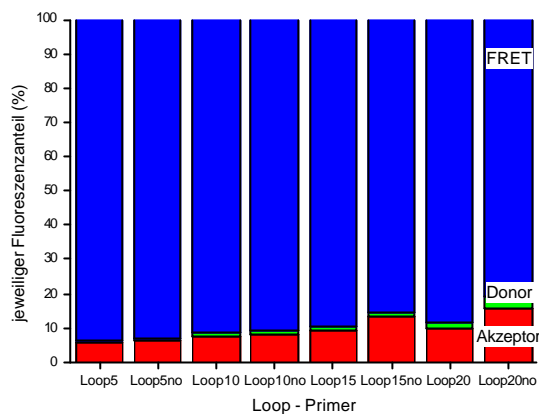


Abb. 3-26 Darstellung des prozentualen Anteils der Herkunft der Fluoreszenz bei $\lambda_{ex} = 492$ nm und $\lambda_{em} = 615$ nm.

Bei der Betrachtung der prozentualen Anteile von Donor-, Akzeptor- und FRET-Fluoreszenz am Detektionspunkt (Abb. 3-26) sieht man, daß sowohl bei den reinen Loop-Primern, als auch bei denen mit DNA-Komplement der Anteil des FRET am Gesamtsignal nie unter 84 % fällt. Es zeigt sich ein Trend, daß der Anteil der direkten Donor und Akzeptor Fluoreszenz mit der wachsenden Entfernung der beiden Fluorophore leicht zunimmt. Bei dem kürzesten Loop-Primer liegt dieser Anteil bei 6% und steigt auf 16% bei dem allein vermessenen längsten Loop-Primer. Das zeigt, daß selbst bei einer Separation der beiden beteiligten Fluorophore von 20 Basen eine gute FRET-Effizienz erzielt wird. Daher ist eine Betrachtung des Verhältnisses der Intensität zwischen dem jeweiligen Loop-Primer mit und ohne DNA-Komplement sinnvoll. Dazu werden aus den auf Fluorescein normierten Spektren (Abb. 3-25) die am Detektionspunkt $\lambda_{em} = 615$ nm ermittelten Werte der Intensität für alle Loop-Primer mit und ohne DNA-Komplement gegeneinander aufgetragen (Abb. 3-27).

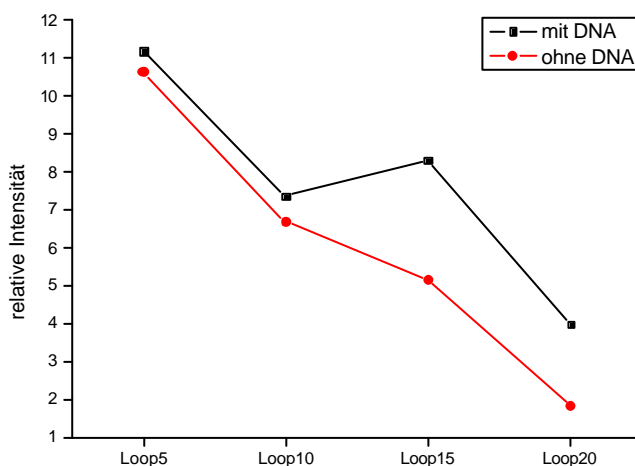


Abb. 3-27 Dargestellt sind die Werte der normierten Spektren der Loop-Primer, mit und ohne DNA-Komplement am Detektionspunkt $\lambda_{em} = 615$ nm und der Anregungswellenlänge $\lambda_{ex} = 492$ nm.

Für alle Loop-Primer ohne DNA-Komplement ist die Abstandsabhängigkeit der FRET-Effizienz gut zu sehen. Der Trend in der Abnahme entspricht dem zu erwartenden Verlauf der sigmoidalen Kurve für das FRET-Paar Fluorescein/Texas-Red bei den untersuchten Abständen. Die Auftragung der Loop-Primer mit DNA-Komplement zeigt für alle vier Hybridisierungen eine größere Intensität als bei den Loop-Primern alleine. Für die Loop-Primer mit den 15 und 20 Basen Abstand ist eine deutliche Erhöhung der Intensität, gegenüber den nicht hybridisierten Proben festzustellen.

3.1.11 Hybridisierung extrahierter G-g-Globin mRNA mit DNA-Oligonucleotiden

Nach der Extraktion von RNA aus K-562-Zellen wurden die 2G-Gamma-Globin Primer in Hybridisierungen mit dieser zellulären RNA Fraktion eingesetzt. Dies geschah nach Überprüfung durch RT-PCR auf das Ziel, die mRNA des G-Gamma-Globins. Da keine Quantifizierung der mRNA durchgeführt worden ist, wurden Verdünnungsreihen angesetzt. Die eingesetzten Oligonucleotide waren als Donor mit Fluorescein (3'-Ende) und als Akzeptor einmal mit Texas-Red (5'-Ende) und einmal mit Rhodamin-X (5'-Ende) markiert. Alle 3 markierten Oligonucleotide sind 25 Basen lang. In der Darstellung (Abb. 3-28) der Emissionsspektren bei der Anregungswellenlänge $\lambda_{ex} = 492$ nm erkennt man bei den dargestellten 3 Proben einen FRET. Erwartungsgemäß ist die Intensität des FRET-Signals bei der Probe mit dem Rhodamin-X Fluorophor am größten.

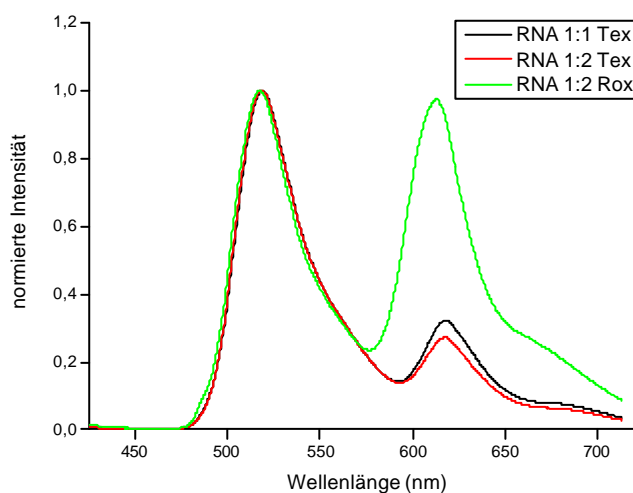


Abb. 3-28 Darstellung der auf Fluorescein normierten Emissionsspektren der mRNA Markierung mit Texas-Red und Rhodamin-X Primern, die einer Sequenz im Exon 2 des G-Gamma-Globins komplementär sind, bei der Anregungswellenlänge $\lambda_{ex} = 492$ nm.

Bei den beiden verschiedenen Verdünnungen mit dem Texas-Red Fluorophor erkennt man bei der Probe in der nur halb soviel RNA eingesetzt wurde einen leichten Rückgang der Intensität des FRET-Signals.

Die Auswertung der AE-Spektren (Abb. 3-29), hinsichtlich der Anteile der jeweiligen Fluoreszenz, die vom Donor, Akzeptor oder FRET am Detektionspunkt $\lambda_{ex} = 492$ nm und $\lambda_{em} = 615$ nm herrührt, zeigt, daß beim Rhodamin-X 39 % an der Gesamtintensität aus dem FRET resultieren. Der Anteil bei den beiden Texas-Red Proben liegt für die 1:1 Verdünnung bei 64 % und für die 1:2 Verdünnung bei 60 %. Rechnet man den Untergrund durch Donor und Akzeptor für Texas-Red und Rhodamin-X heraus, erhält man eine normierte Intensität des FRET-Signals von 0,21 für Texas-Red und 0,39 für Rhodamin-X.

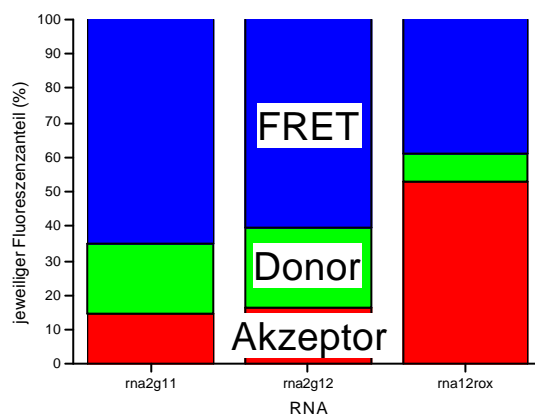


Abb. 3-29 Darstellung des prozentualen Anteils der Herkunft der Fluoreszenz bei $\lambda_{ex} = 492$ nm und $\lambda_{em} = 615$ nm. Dargestellt sind die Verhältnisse für die beiden Proben mit dem Texas-Red Akzeptor (links 1:1, Mitte 1:2) und die Probe mit dem Rhodamin-X Akzeptor (rechts, 1:2).

3.2 Zellkultur

Im Laufe der Hybridisierungsversuche wurden auch einige allgemeine Zellkultur-Untersuchungen die hier von besonderem Interesse waren durchgeführt. Davon werden hier einige Ergebnisse dargestellt.

3.2.1 Elektroporation von K-562 Zellen

Es wurde untersucht wie K-562 Zellen auf eine Elektroporation reagieren, um eine Bestimmung der optimalen Geräteeinstellungen für die Elektroporation, hinsichtlich der Stromspannung (V) und der Kapazität (μFD) zu bekommen.

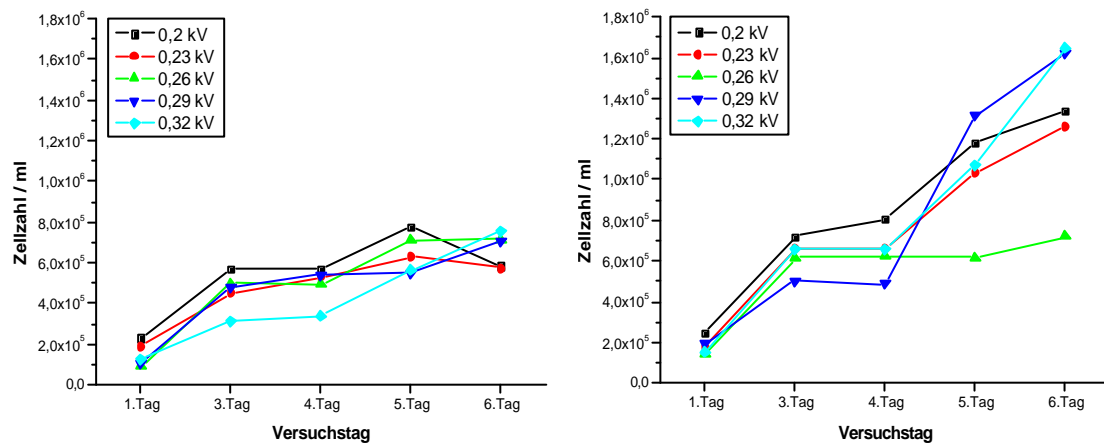


Abb. 3-30 Dargestellt sind die Wachstumskurven der K-562 Zellen nach Elektroporation. Links beträgt die voreingestellte Kapazität 250 μFD für alle Stromspannungen und rechts ist 500 μFD als Kapazität bei allen Stromspannungen eingestellt.

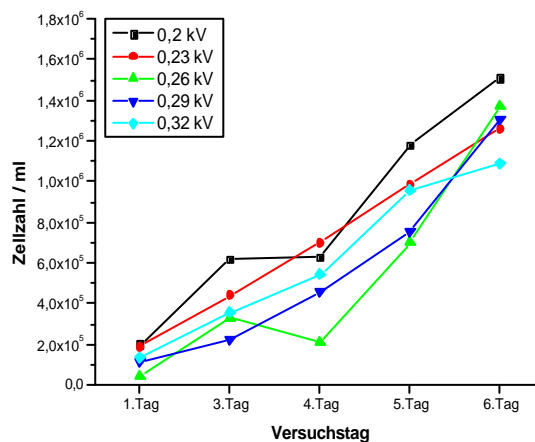


Abb. 3-31 Dargestellt sind die Wachstumskurven der K-562 Zellen nach Elektroporation. In diesen Versuchsreihen ist die Kapazität auf 960 μFD für alle Stromspannungen eingestellt.

Zur besseren Vergleichbarkeit sind die Abzissen bei den einzelnen Darstellungen auf die gleiche Größenordnung eingestellt (Abb. 3-30 und Abb. 3-31). Eingesetzt wurden 2×10^5 Zellen/ml pro Versuch. Bis auf die 3 Versuchsreihen in denen, unabhängig von der Kapazität, die Stromspannung 0,2 kV betrug, lag die Zellzahl/ml am ersten Tag der Zählung unter der Ausgangskonzentration von 2×10^5 Zellen/ml. Betrachtet man erst einmal nur die generellen Wachstumsraten der drei Versuchsreihen, nach Behandlung mit unterschiedlicher Kapazität, unabhängig von der eingesetzten Stromspannung, ist zu erkennen, daß die mit 250 μ FD elektroporierten Zellen in allen 5 Versuchsreihen nur sehr schlecht wieder anwachsen. Die Plateauphase wird nach 6 Tagen erreicht und die Zellzahl steigt auch nach über 14 Tagen der Weiterkultivierung nicht mehr auf den normalen Wert von $\approx 5 \times 10^6$ Zellen/ml Medium. Bei den beiden Versuchsreihen mit 500 μ FD und 960 μ FD Kapazität ähnelt sich der Verlauf der Wachstumskurven. In beiden Versuchsreihen werden nach 6 Tagen ähnliche Werte von $\approx 1,2 - 1,6 \times 10^6$ Zellen/ml erreicht. Diese Kulturen erreichen nach ungefähr 9 Tagen dann ihre Plateauphase von $\approx 5 \times 10^6$ Zellen/ml. Um diesen Wert schwankt die Zellzahl dann mit einer Variationsbreite von ungefähr 10 %. Der einzige Ausreißer ist die Kultur die mit 0,26 kV bei einer Kapazität von 500 μ Fd elektroporiert wurde. Auch diese Kultur erholte sich nicht mehr vollständig. Alle Versuchsreihen wurden zweimal durchgeführt und zeigten im Trend dieselben Ergebnisse. Eine Kontamination mit Bakterien, Hefen oder Pilzen wurde in keinem Fall beobachtet. Alle Kulturen machten während der Versuche einen vitalen Eindruck, bei den Kontrollen im Zuge der Zellzahlbestimmung. Unabhängig von der Kapazität scheint ein Strom mit einer Spannung von 0,2 kV optimal zu sein. Insgesamt scheint eine Kapazität von 500 μ FD zu der geringsten Mortalität nach Elektroporation zu führen und die Zellen am wenigsten zu schädigen.

3.2.2 Vergleich verschiedener Zellkulturmedien

Das für eine Zellkultur eingesetzte Medium ist in der Regel das Ergebnis eines langen Ausleseprozesses und darum optimal an die Bedürfnisse der jeweiligen Zelllinie angepaßt. Es gibt unter normalen Laborbedingungen keinen Grund ein anderes Medium für eine Routinekultivierung einer Zelllinie einzusetzen. Wenn allerdings ein Einsatz im großen Maßstab im Vordergrund steht, kann es zur Kostenbegrenzung von Vorteil sein, auch andere Medien zu testen. Hier wurden zwei serumfreie Medien (Q-007 und Q-263) gegen das Standardmedium RPMI-1640 (mit fötalem Kälberserum) für die Kultivierung von K-562 Zellen untersucht.

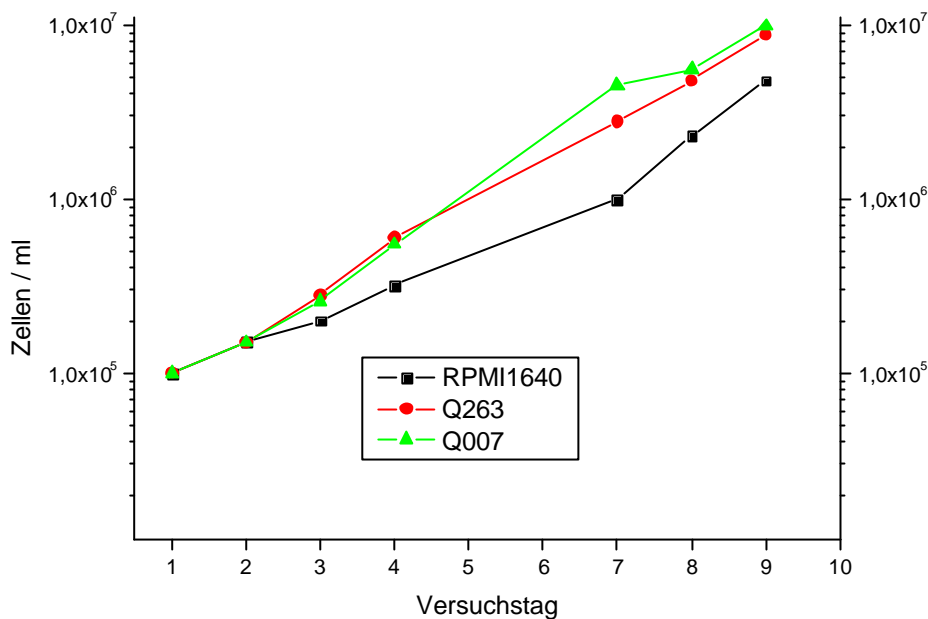


Abb. 3-32 Dargestellt ist die Wachstumsrate von K-562 Zellen in den 3 verschiedenen Medien (Q-007, Q-263 und RPMI-1640) bis zum Erreichen der Plateauphase ab Tag 9 in logarithmischer Auftragung.

Die logarithmische Auftragung zeigt in allen Versuchen die zu erwartende Gerade für das Wachstum einer Zellkultur. Die Zellen erreichen die Plateauphase am Tag 9 und die Zellzahl schwankt dann nur noch um den jeweiligen Plateauwert. Es ist zu erkennen, daß die Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen in RPMI-1640 Medium ab dem dritten Versuchstag nicht mehr so hoch ist wie in den beiden Q-Medien. In den beiden Q-Medien scheinen die Zellen schneller zu wachsen und die Bedingungen somit besser zu sein. Sie erreichen die Konzentration von 5×10^6 Zellen/ml schon am 8ten Versuchstag. Außerdem erreichen sie insgesamt eine höhere Zelldichte von 1×10^7 Zellen/ml in Q-007 und 8×10^6 Zellen/ml in Q-263 Medium, als die Kultur in RPMI-1640 mit 5×10^6 Zellen/ml. Bei der Weiterkultivierung bestätigte sich, daß die absolute Zellzahl in den Q-Medien dauerhaft höher ist. Die Zellkulturen reagieren allerdings bei den beiden Q-Medien empfindlicher auf unregelmäßige Medienwechsel. Die Zellen müssen spätestens nach 72 Stunden mit neuem Medium versorgt werden. Die Toleranz ist bei RPMI-1640 Medium deutlich größer. Sie beträgt dort ungefähr 96 Stunden. Um eine stabile Kultur mit vitalen und morphologisch unauffälligen Zellen zu erhalten, müssen die Zellen bei allen 3 Medien im 2-Tagesrhythmus passagiert werden.

3.2.3 Induktion der Globinsynthese in K-562 Zellen

In Zellkultur exprimieren K-562 und Hel92.1.7 Zellen fakultativ verschiedene Globine (Epsilon-Globin, G- oder A-Gamma-Globin). Durch Induktion mit Hemin kann sichergestellt werden, daß die Zellen auf jeden Fall Gamma-Globin und Epsilon-Globin exprimieren. Für die Überprüfung wurden K-562 und Hel92.1.7 Zellen mit Hemin in einer Endkonzentration von 20 µM induziert und 3 Tage in Kultur gehalten.

	Hel92.1.7	Hel92.1.7	K-562	K-562
	Kontrolle	Hemin	Kontrolle	Hemin
Endkonzentration in Kultur	-	20 µM	-	100 µM

Tabelle 3-1 Induzierung der Zellkulturen mit Hemin.

Die Zellen der induzierten Kulturen sahen morphologisch nicht anders aus, als die aus den nicht induzierten Kulturen. Zum Nachweis, daß die entsprechenden Gene exprimiert wurden, wurde die RNA aus induzierten Kulturen extrahiert, revers transkribiert und mit PCR-Primern für die entsprechenden Sequenzen die Produkte amplifiziert. Durch eine Gelelektrophorese werden die Produkte ihrer Länge nach aufgetrennt und durch Färbung die Banden sichtbar gemacht. Die Extraktion von 5×10^6 Zellen erfolgte mit dem RNeasy Kit (Qiagen) und die RNA wurde in 20 µl H₂O eluiert. Die Bestimmung der Konzentration erfolgte in einem Eppendorf BioPhotometer bei der Verdünnung von 2 µl des RNA Eluats mit 98 µl H₂O. Die reverse Transkription wurde nach dem Qiagen Omniscript Protokoll mit folgenden Parametern durchgeführt (Tabelle 3-2).

RNA	H ₂ O	10x Puffer	5 mM dNTPs	500 µg/ml Oligo (dT) ₁₂₋₁₈ Primer	RNasin	Omniscript
1 µg	3 µl	2 µl	2 µl	1 µl	1 µl	1 µl

Tabelle 3-2 Eingesetzte Mengen für die reverse Transkription.

Die so erhaltene cDNA wurde im Verhältnis 1:10 verdünnt für die PCR eingesetzt. In der PCR kamen Primerpaare für folgende Proteine zum Einsatz: Epsilon-Globin, Gamma-Globin, hL7 und hJAdam8. Bei den beiden letztgenannten handelt sich um ubiquitäre Proteine die zur

Kontrolle der reversen Transkription und der PCR, als auch der Größenabschätzung dienen sollen.

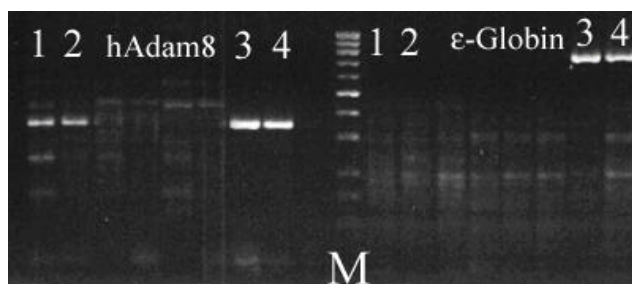


Abb. 3-33 Banden der elektrophoretischen Aufspaltung der PCR-Produkte für hADAM8 (350 bp) und ϵ -Globin (752 bp). Spur 1-4 links mit ADAM8 PCR-Primer: 1) Hel92.1.7 ohne 2) mit Hemin Induktion 3) K-562 ohne 4) mit Hemin Induktion. Spur 1-4 rechts mit ϵ -Globin PCR-Primern: 1) Hel92.1.7 ohne 2) mit Hemin Induktion 3) K-562 ohne 4) mit Hemin Induktion. M = Längemarker.

Das Photo (Abb. 3-33) zeigt, daß das hADAM8-Gen (links) in allen 4 Zellkulturen exprimiert wird. Die Expression ist in den K-562 Zellen deutlich stärker als in den Hel92.1.7 Zellen. Die Bande liegt auf der zu erwartenden Höhe von 350 Basenpaaren des verwendeten Markers. Das ϵ -Globin (Bande bei 752 Basenpaaren, rechts) wird trotz Stimulierung nur in den K-562 Zellen exprimiert, aber nicht in den Hel92.1.7 Zellen. Die Kontrolle (€) ist negativ. Im zweiten Photo (Abb. 3-34), der Gelauftragung der PCR-Produkte, sind die Banden von γ -Globin und hL7 zu sehen. γ -Globin wird in allen 4 Zellkulturen exprimiert. Es ist auf dem Gel kein quantitativer Unterschied in der Expressionstärke zu sehen. Die Banden liegen wie erwartet bei 350 Basenpaaren des verwendeten Markers. Das hL7 wird ebenfalls in allen Zellkulturen exprimiert und entspricht auch der erwarteten Fragmentlänge von 345 Basenpaaren.

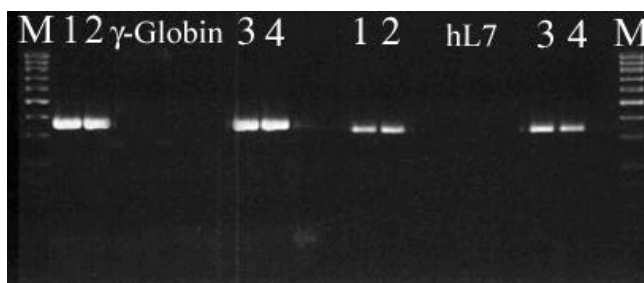


Abb. 3-34 Banden der elektrophoretischen Aufspaltung der PCR-Produkte für γ -Globin (343 bp) und hL7 (345 bp). Spur 1-4 links mit γ -Globin PCR-Primer: 1) Hel92.1.7 ohne 2) mit Hemin Induktion 3) K-562 ohne 4) mit Hemin Induktion. Spur 1-4 rechts mit L7 PCR-Primern: 1) Hel92.1.7 ohne 2) mit Hemin Induktion 3) K-562 ohne 4) mit Hemin Induktion. M = Längemarker.

Zur Sicherstellung, daß in den verwendeten Zellen γ -Globin exprimiert wird, werden die Zellkulturen vor allen Experimenten mit Hemin induziert.

3.3 *In situ* Hybridisierungen

3.3.1 Transfektionen von Blutproben

Die Schwierigkeiten der Untersuchung von Blutproben liegen an der starken Streuung durch die zellulären Blutbestandteile und die Absorption durch den roten Blutfarbstoff Hämoglobin. In der Abbildung ist eine Verdünnungsreihe von Blutserum dargestellt (Abb. 3-35). Dazu sedimentierten die zellulären Bestandteile bei Raumtemperatur und es wurde die Absorption des Überstands, der leicht rosafarben und nicht ganz klar war, gemessen.

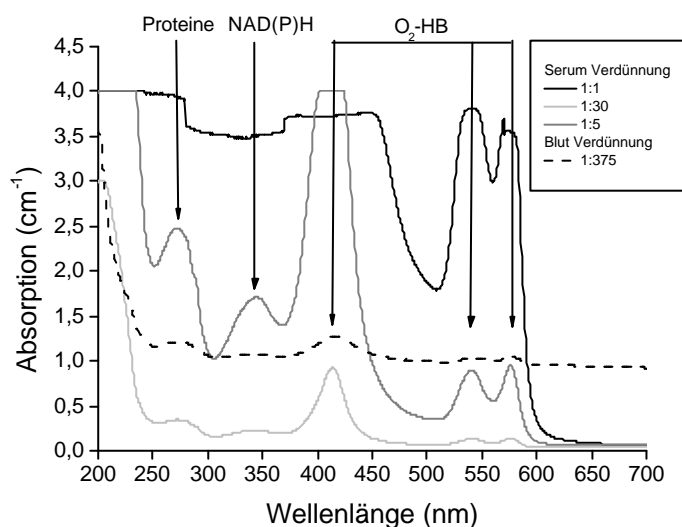


Abb. 3-35 Absorptionsspektrum von human Blut. Es sind drei Verdünnungsstufen des Blutserums und eine Verdünnung von Vollblut dargestellt. Markiert sind die klar erkennbaren Absorptionsbanden der Proteine, des NAD(P)H und des oxygenierten Blutes.

In der 1:1 Verdünnung ist die Absorption bis auf den Wellenlängenbereich von 460 - 520 nm extrem hoch. Sie fällt erst bei 600 nm fast auf Null ab. Erst bei den Verdünnungen von 1:5 und 1:30 bilden sich Absorptionsbanden aus, weil die Absorption insgesamt gesunken ist. Man erkennt die Absorptionsbande der Proteine bei 280 nm, die Absorptionsbande des reduzierten NAD(P)H und die 3 charakteristischen Absorptionsbanden des oxygenierten Hämoglobins (414, 541 und 577 nm). Als Vergleich ist eine um den Faktor 375 verdünnte

Vollblutprobe dargestellt. Das Vollblut wurde mit HBS-Puffer verdünnt. Die sich in dieser Lösung befindlichen Zellen verursachen die direkte wellenlängenabhängige Streustrahlung, so daß der Eindruck einer starken Untergrundabsorption entsteht. Schwach sind die Absorptionsbanden der Proteine, des NAD(P)H und des oxygenierten Hämoglobins zu erkennen. In der Summe führen die beiden beschriebenen Effekte dazu, daß höherkonzentrierte Proben optisch dicht sind. Daher werden die Blutproben hier nur mikroskopisch untersucht.

3.3.2 Transfektion von maternalem Blut

Das Blut für diesen Versuch stammt von einer Patientin die zum Zeitpunkt der Entnahme der Blutprobe in der 13 Woche der Gestation war. Zwischen Blutentnahme und Transfektion vergingen \approx 3 Stunden. Es wurden 0,5 ml von 1:10 mit PBS verdünntem Vollblut für die Transfektionen eingesetzt. Die eingesetzten DNA-Oligonucleotide sind komplementär zu einer Sequenz der G-Gamma-Globin mRNA im Exon2 und haben einen Abstand von 10 Basen zueinander. Transfiziert wurde mit Rotifect nach dem Standardprotokoll für 6 Stunden, wobei ein Ansatz auch über Nacht kultiviert wurde (Tabelle 3-3).

	6 Stunden	Kontrolle Fluorescein	Kontrolle Rhodamin- X	Über Nacht
Fluorescein [μ l]	4	4	-	4
Rhodamin- X [μ l]	4	-	4	4
Rotifect [μ l]	20	10	10	20
Medium [μ l]	180	120	120	180

Tabelle 3-3 Darstellung der eingesetzten Mengen für die Transfektion maternalen Blutes mit Rotifect.

Es konnte in keiner Probe ein FRET detektiert werden. Es waren nur sehr wenig Zellen überhaupt angefärbt (Abb. 3-36 links). Bei den angefärbten Zellen handelte es praktisch immer um kernhaltige Zellen. Dies war sowohl bei der 6 Stunden, als auch nach der über Nacht Kultivierung der Fall. Vereinzelt zeigte nach der 6-stündigen Transfektion eine kernhaltige Zelle Fluoreszenzsignale. Bei Anregung mit 488 nm und Detektion von 605 - 625 nm konnten keine zweifelsfreien Signale beobachtet werden. Zellen die bei Anregung mit 488 nm im Emissionspektrum des Akzeptors starke Signale zeigten (Abb. 3-36 rechts), waren immer nur extrem mit Akzeptor-Primern transfiziert. Es handelt sich um unspezifische

Anregung. Die Detailaufnahme ist ein optischer Schnitt durch den Median der Zelle, daraus läßt sich schließen, daß die Signale wirklich aus dem Zellinneren stammen.

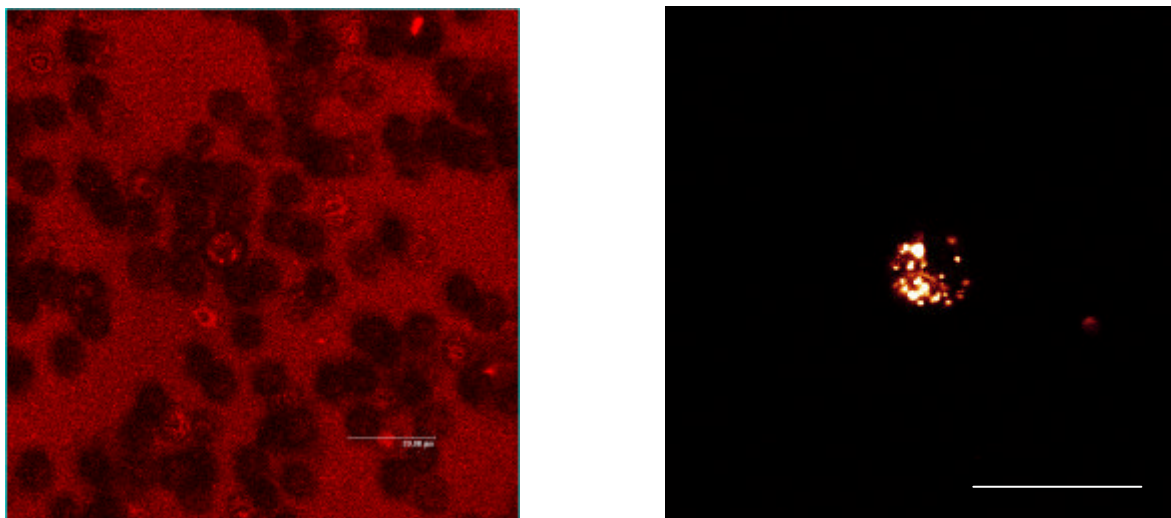


Abb. 3-36 Confokale Aufnahme von transfiziertem maternalen Blut nach 6 Stunden. $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{em}} = 605 - 625 \text{ nm}$. Links ein Überblick, rechts eine Zelle die distinkte Signale zeigt. Schnittebene ist in der Mitte der Zelle. (Maßstab = $20 \mu\text{m}$)

Es wurden auch Versuche mit Nabelschnurblut gemacht. Da die Nabelschnurblutproben aus einer Klinik in Coesfeld stammten, vergingen bis zu 24 Stunden, bevor diese verarbeitet werden konnten. Dieses Blut wurde unmittelbar nach der Geburt aus der Nabelschnur abgezogen, wobei darauf geachtet wurde, daß keine Wharton - Sulze (gallertiges, embryonales Bindegewebe aus wenig mesenchymalen Zellen und vielen Mukopolysacchariden) im Nabelstrang, in die Probe gelangte. Zwischen Entnahme und Transfektion der Probe vergingen ≈ 13 Stunden. Es wurden $0,5 \text{ ml}$ von $1:10$ mit PBS verdünntes Nabelschnurblut für die Transfektionen eingesetzt. Die eingesetzten DNA-Oligonucleotide sind komplementär zu einer Sequenz der G-Gamma-Globin mRNA im Exon2 und haben einen Abstand von 10 Basen zueinander. Transfiziert wurde mit Rotifect nach dem Standardprotokoll, wobei die Ansätze über Nacht kultiviert wurden (Tabelle 3-4).

	Über Nacht	Kontrolle Fluorescein	Kontrolle Rhodamin-X
Fluorescein [μl]	4	4	-
Rhodamin-X [μl]	4	-	4
Rotifect [μl]	20	10	10
Medium [μl]	180	120	120

Tabelle 3-4 Darstellung der eingesetzten Mengen für die Transfektion von Nabelschnurblut mit Rotifect.

Es konnte kein FRET detektiert werden. Im Gegensatz zu der Probe maternalen Blutes waren aber sehr viele Zellen, dem Überblick nach ungefähr 20 %, mit den Fluoreszenz-Primern transfiziert (Abb. 3-37 links). Auffallend ist auch, daß nicht nur kernhaltige Zellen, sondern auch überaus viele Erythrozyten große Mengen an Farbstoff aufgenommen haben. Die große Konzentration an fluoreszierenden Oligonucleotiden in den Zellen führt dazu, daß keine distinkten Signale zu erkennen sind, sondern die ganze Zelle, vor allem bei den Erythrozyten, oder nur das Cytoplasma, bei den kernhaltigen Zellen, diffus strahlt.

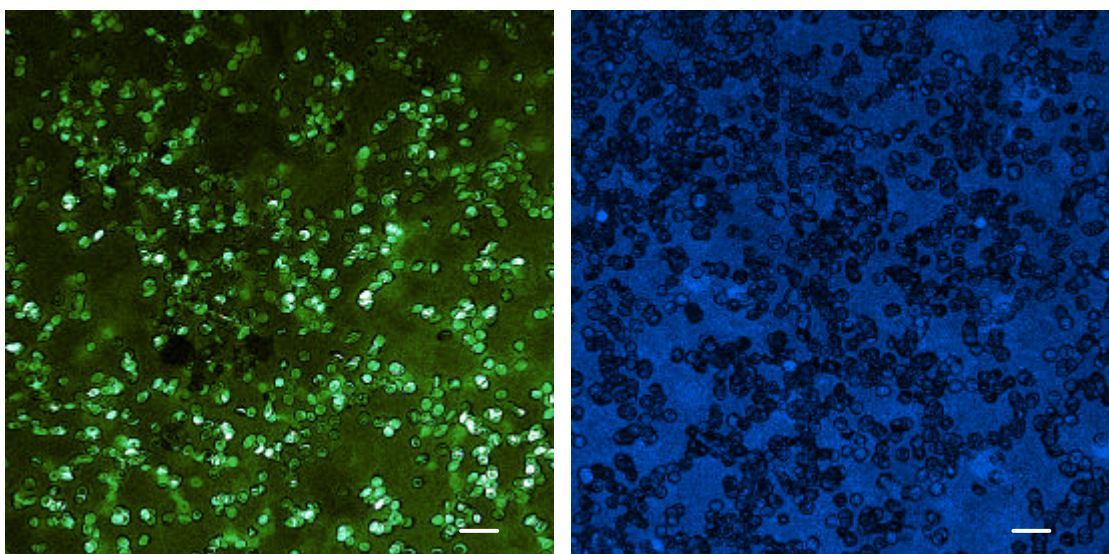


Abb. 3-37 Confokale Aufnahme von transfiziertem Nabelschnurblut Blut nach 16 Stunden. Links ein Überblick, angeregt bei $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$ und mit dem Detektionsbereich des Fluoresceins $\lambda_{\text{em}} = 509 - 529 \text{ nm}$, rechts ein Überblick nach DAPI-Färbung. (Maßstab = $20 \mu\text{m}$)

Die rechte Aufnahme zeigt einen Überblick über die Blutprobe nach DAPI-Färbung. Bei der Mehrzahl der Zellen handelt es sich um kernlose Erythrozyten. Dagegen heben sich einige, mehr oder weniger stark angefärbte Zellen ab. Hier handelt es sich um kernhaltige Blutzellen verschiedener Zugehörigkeit. Die Transfektion von Blut, egal ob maternalen oder fötalen Ursprungs wurde nach diesen Experimenten ausgesetzt und es wurde eine Zelllinie benutzt, die definierte Bedingungen bietet.

3.3.3 Transfektion mit Molecular Beacons

Es wurde versucht die K-562 Zellen mit einem Molecular Beacon zu transfizieren (Abb. 3-38). Das Molecular Beacon wurde von Dr. Heiko Wiebusch (Firma Praenadia) zur Verfügung gestellt und sollte gegen eine Sequenz der γ -Globin RNA komplementär sein. Es wurde mit Rotifect nach dem Standardprotokoll für 16 Stunden transfiziert. Das Molecular

Beacon ist 32 Basen lang und endständig mit Fam (Fluorescein-Derivat) und Dabcyl markiert. Bei geschlossenem Stamm (Stem) ist es dunkel und erst wenn es sich öffnet, wird die Fluoreszenz des Donors FAM sichtbar. Das Molecular Beacon kann nach Anregung des FAM, mit Licht der Wellenlänge von 488 nm, detektiert werden. Es sind keine Signale der Molecular Beacons aus den Zellen zu erkennen. In einigen Fällen sieht man Signale die an die Zellmembranen assoziiert sind, wobei es sich nach der Intensität um Cluster von mehreren Molekülen der Molecular Beacons handeln muß. Diese haben sich offensichtlich unspezifisch geöffnet.

	über Nacht	Kontrolle
Molecular Beacon [μ l]	2	-
Rotifect [μ l]	10	10
Medium [μ l]	120	60

Tabelle 3-5 Eingesetzte Menge bei der Transfektion von K-562 Zellen mit Molecular Beacons und Rotifect.

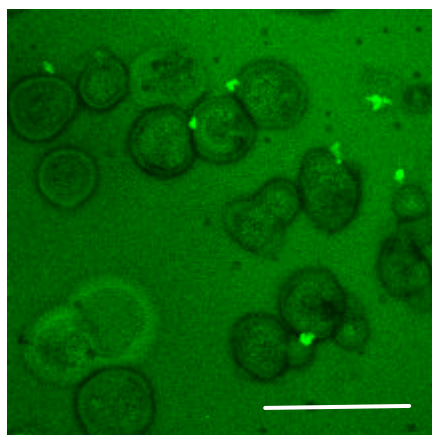


Abb. 3-38 Confokale Aufnahme von transfizierten K562 Zellen mit Molecular Beacon nach 16 Stunden. Anregung bei $\lambda_{ex} = 488$ nm und Detektion des Fluoresceins bei $\lambda_{em} = 509 - 529$ nm. (Maßstab = 20 μ m).

Auch Wiederholungen der Versuche zeigten keine wesentlichen Änderungen, so daß die Transfektion mit Molecular Beacons nicht weiterverfolgt wurde.

3.3.4 Elektroporation von K-562 Zellen

Nach der Bestimmung der optimalen Einstellungen zur Elektroporation von K-562 Zellen wurden Versuche zur Transfektion mit reinen DNA-Oligonucleotiden unternommen. Die DNA-Oligonucleotide waren einer Sequenz im Exon 2 der γ -Globin mRNA komplementär

und die Distanz zwischen Donor- und Akzeptor-Primer betrug 5 Basen (Tabelle 3-6). Es wurden auch Versuche unternommen, bei denen die DNA-Oligonucleotide zuerst mit einer Liposomenlösung, hier Rotifect, vereinigt wurden und diese Vesikel dann zur Elektroporation benutzt wurden. Es wurde nach dem Protokoll für Elektroporation und mit Hemin induzierten Zellen gearbeitet. Für den Ansatz mit der Liposomenformulierung wurden die DNA-Oligonucleotide nach dem Rotifect Protokoll vorbereitet. Donor- und Akzeptoransatz wurden erst unmittelbar vor der Elektroporation mit den Zellen vermischt. Dann wurden die Zellen elektroporiert und nach drei minütiger Inkubation auf Eis direkt in vorbereitete Kulturschalen mit Medium gegeben und für 3 Stunden bei 37°C inkubiert, bevor sie untersucht wurden.

	Elektroporation ohne Rotifect	Elektroporation mit Rotifect
Fluorescein [μl]	2	2
Rhodamin-X [μl]	2	2
Rotifect [μl]	-	10
RPMI-1640 [μl]	-	120
Spannung [kV]	0,23	0,23
Kapazität [μFD]	500	500

Tabelle 3-6 Elektroporation, mit und ohne Rotifect von K-562 Zellen.

Exemplarisch ist jeweils eine K-562 Zelle nach Elektroporation, mit und ohne Liposomen, dargestellt (Abb. 3-39).

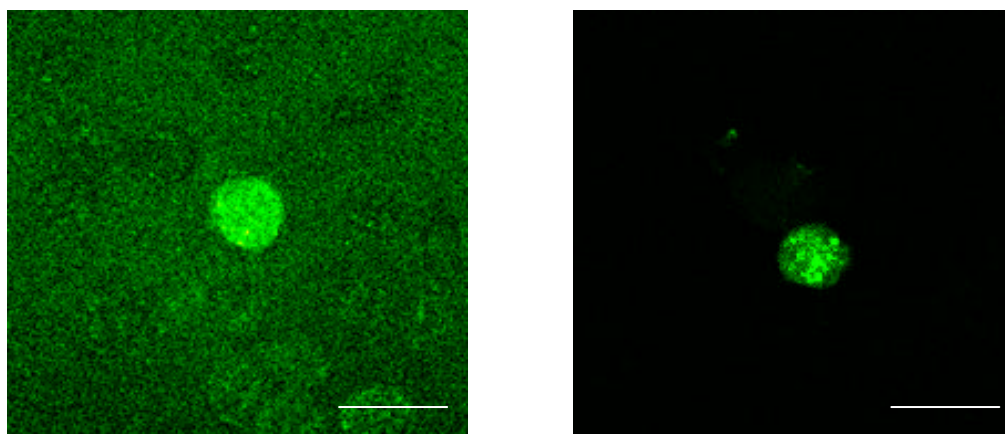


Abb. 3-39 Confokale Aufnahmen der Elektroporation von K-562 Zellen ohne (links) und mit Liposomen Unterstützung (rechts). Anregung bei $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$ und Detektion im Bereich von $\lambda_{\text{em}} = 509 - 529 \text{ nm}$ (Maßstab = 20 μm).

In beiden Ansätzen zeigten weniger als 5 % aller Zellen überhaupt Fluoreszenzsignale bei Anregung des jeweiligen Fluorophors. In dem Ansatz der ohne Liposomen elektroporiert wurde, waren die Zellen, welche bei Anregung Signale zeigten, durchweg nur schwach, aber sehr homogen am fluoreszieren. Dies ist in der Abbildung links zu sehen (Abb. 3-39). Deutlich wird die schwache Fluoreszenz auch am geringen Signal/Rauschverhältnis zwischen Zelle und Umgebung. In der Zelle sind keine distinkten Signale zu erkennen und es scheint sich um eine diffuse Verteilung der Oligonucleotide im Cytoplasma zu handeln. Die Zellen, die einer Elektroporation mit Liposomen unterzogen wurden und transfiziert waren, zeigten ein starkes Leuchten und räumlich unterscheidbare Signale innerhalb der Zellen. Dies ist im rechten Bild zu erkennen (Abb. 3-39). Das Signal/Rauschverhältnis ist deutlich größer. Die Fluoreszenzsignale sind in der Zelle als distinkte Punkte verteilt zu erkennen. Es ist aber hier wie auch in den nur elektroporierten Zellen kein FRET zu detektieren gewesen. Auffallend waren auch die offensichtlich durch die Elektroporation geschädigten Zellen. Dies zeigte sich in einer großen Zahl von zerstörten oder morphologisch auffälligen Zellen in beiden Versuchen. Da die Ergebnisse auch nach Wiederholung der Versuche nicht anders aussahen, wurde die Elektroporation zur Einbringung der DNA-Oligonucleotide in Zellen nicht weiterverfolgt.

3.3.5 Permeabilisierung von Zellen mit Tween 20 und Triton-X 100

Die Permeabilisierung der Zellmembran kann sowohl, wie im vorherigen Kapitel beschrieben, durch Elektroporation, als auch mit Hilfe chemischer Detergenzien herbeigeführt werden. Triton und Tween sind zwei der bekanntesten Vertreter dieser Gruppe von Stoffen mit die Zellmembran auflösenden Eigenschaften. Je nach Konzentration kann man Zellen damit waschen, also Oberflächenproteine ablösen oder auch gezielt die gesamte Zellmembran entfernen, nachdem man eine solcherart zu behandelnde Zelle fixiert hat, und damit das Zellinnere zugänglich machen. Bei diesen Versuchen wurde untersucht, ob es möglich ist, die Zellen einerseits zu permeabilisieren, andererseits aber die Zellmembran nicht vollständig zu zerstören. Es wurden sowohl die beiden Detergenzien hinsichtlich ihrer Wirkung verglichen, als auch die Wirkung mit unmodifizierten und PTA modifizierten Primern. Diese Arbeiten wurden innerhalb der Arbeitsgruppe zusammen mit Dr. Uwe Schlomann durchgeführt. In der Abbildung sieht man eine Transfektion mit Tween und Fluorescein markierten, PTA modifizierten Primern an He192.1.7. Die Transfektion dauerte 60 Minuten bei Raumtemperatur. Eingesetzt wurde ein mit Fluorescein markierter, PTA modifizierter Primer.

Man sieht eine große Anzahl stark leuchtender Zellen (Abb. 3-40). Die meisten dieser Zellen zeigen keinen Zellkern mehr, sind also möglicherweise apoptotisch. Nicht transfizierte Zellen erscheinen nur mit ihrem blau angefärbten Zellkern. Bei den mit Triton X transfizierten ist die Anzahl der angefärbten Zellen (hier nicht gezeigt) mit $\approx 43\%$ geringer als bei den mit Tween angefärbten Zellen bei denen ungefähr $\approx 55\%$ angefärbt sind. Es wurde des weiteren überprüft, ob es einen Unterschied hinsichtlich der Modifikation des verwendeten Primers gibt. Die Ergebnisse der Tween Transfektion mit PTA modifizierten Primern und mit nicht modifizierten Primern zeigten keinen qualitativen Unterschied zueinander.

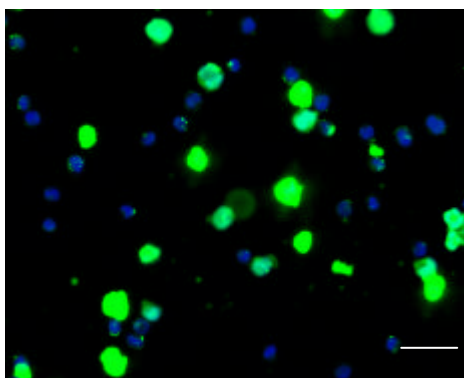


Abb. 3-40 Aufnahme von HeL92.1.7 Zellen nach Transfektion mit Tween und einem Fluorescein markierten PTA modifizierten Primer. Verwendet wurde ein RGB-Filter mit FITC, TRITC und DAPI Anregungs- und Sperrfilterset (Maßstab = 20 μm).

Die Untersuchung, ob eine Fixierung der Zellen eine Verbesserung bringen würde, zeigte eine deutliche Verschlechterung der Transfektion für die mit Formaldehyd behandelten Zellen. Bei diesen Fixierungen wurde das Fixationsmittel jedoch zusammen mit den Primern und dem Tween zu den zu transfizierenden Zellen gegeben. Alle diese Versuche führen zu keinem befriedigenden Ergebnis.

	1	2	3	4	5	6
Fluor-Phos-Primer (2,2 μg) [μl]	5	5	5	5	5	5
Texas-Phos-Primer (2,2 μg) [μl]	12,2	12,2	12,2	12,2	12,2	12,2
OPTIMEM [μl]	36,05	36,05	11,56	11,56	11,56	50
2x Oligofectamine [μl]	-	-	20	20	20	-
1% Tween-20 [μl]	1,25	1,25	1,25	1,25	-	-
Transfektionszeit [min]	30	30	30	30	30	30
prä. Fixierung	-	+	-	+	-	+

Tabelle 3-7 Transfektionsschema für Tween Transfektion mit und ohne Oligofectamine für präfixierte und nicht fixierte K-562 Zellen.

In weiteren Versuchen mit dem Tween Detergenz wurde auch Oligofectamine als Cotransfaktor benutzt und es wurde überprüft ob eine Fixierung der Zellen vor der Transfektion sinnvoll sein kann. Die eine Hälfte der 6 Versuche wurde mit präfixierten Zellen durchgeführt. Benutzt wurde 2 % Formaldehyd mit dem die Zellen 10 Minuten bei Raumtemperatur fixiert und anschließend gewaschen weiterverwendet wurden.

Alle 6 Ansätze wurden dann entsprechend dem Schema (Tabelle 3-7) mit den jeweils vorbereiteten Transfektionslösungen versetzt und bei 37°C in einem Eppendorf Thermoschüttler mit 1000 rpm/min für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurden alle Ansätze mit Formaldehyd fixiert und mit einem Olympus Fluoreszenz Mikroskop untersucht. Alle Bilder wurden wieder mit dem RGB Filterset des Mikroskops gemacht. Alle Maßstäbe = 20 µm.

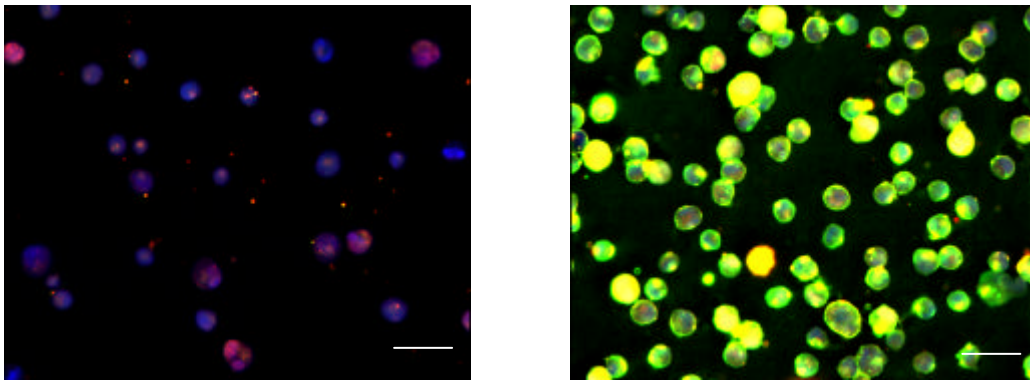


Abb. 3-41 K-562 Zellen transfiziert mit beiden Primern und Tween.

Abb. 3-42 K-562 Zellen transfiziert mit beiden Primern und Oligofectamine.

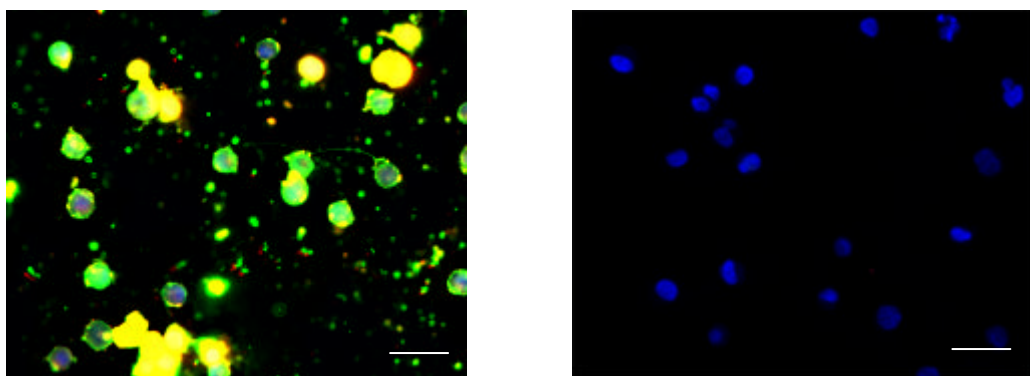


Abb. 3-43 K-562 Zellen transfiziert mit beiden Primern, Oligofectamine und Tween.

Abb. 3-44 K-562 Zellen nur präfixiert und ohne Primer.

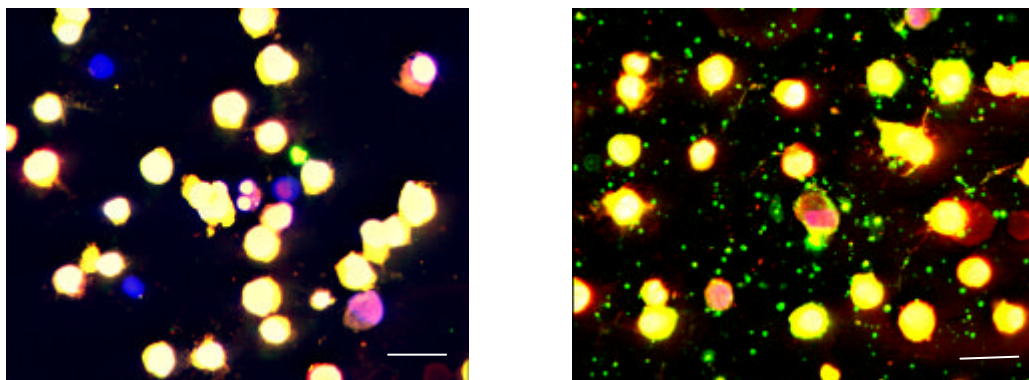


Abb. 3-45 Präfixierte K-562 Zellen transfiziert mit beiden Primern und Tween.

Abb. 3-46 Präfixierte K-562 Zellen transfiziert mit beiden Primern, Oligofectamine und Tween.

Die mit Tween und beiden Primern transfizierten Zellen (Abb. 3-41) zeigen nicht sehr starke Signale und die Zellen, welche Signale zeigen scheinen nur im Zellkern zu leuchten. Im Cytoplasma ist fast keine Fluoreszenz zu beobachten. Die Kerne sind durch die Dapi-Färbung gut auszumachen. Die beiden präfixierten und mit Primern transfizierten Ansätze zeigen eine starke Färbung des Großteils der Zellen (Abb. 3-45, Abb. 3-46). Diese sind durchgängig gefärbt, wobei der Zellkern noch stärker leuchtet als das Cytoplasma. Im präfixierten Ansatz ohne Oligofectamine sind nicht alle Zellen angefärbt. Die präfixierte Kontrolle ohne Primer zeigt keinerlei auffällige Färbung (Abb. 3-44). Die Transfektion der nicht präfixierten Zellen mit Oligofectamine (Abb. 3-2) zeigt eine Färbung aller Zellen. Hier ist die Fluoreszenz überwiegend im Cytoplasma, aber nicht im Zellkern lokalisiert. Bei der Transfektion mit Tween und Oligofectamine (Abb. 3-43) treten zwei Formen auf, Zellen die nur im Cytoplasma leuchten und Zellen die zusätzlich auch stark im Zellkern fluoreszieren.

Nur der Ansatz mit Tween mit Primern und Oligofectamine mit Primern wurde zum Vergleich nach demselben Protokoll transfiziert und auch mit dem Confokalen Mikroskop untersucht. Die Aufnahme der Transfektion mit Tween und den beiden Primern zeigt im Überblick das gleiche Bild (nicht dargestellt) wie im Epifluoreszenzmikroskop. Wenn die Zellen leuchten, dann erscheint die Fluoreszenz aus dem Zellkern. Die Betrachtung einer Aufnahme (Abb. 3-47), bei der die optische Schnittebene der Betrachtung in der Mitte der meisten dargestellten Zellen liegt enthüllt, daß in der Tat die Zellkerne selektiv die Fluorophore aufgenommen haben. Man erkennt die für diese myelogene Zelllinie typischen stab- und segmentförmigen Zellkerne, die sich scharf gegen das Cytoplasma abgrenzen, welches nicht leuchtet.

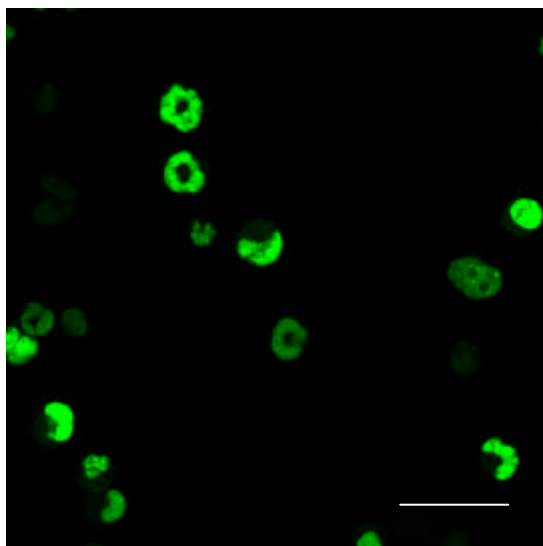


Abb. 3-47 Confokale Aufnahme von mit Tween transfizierten K-562 Zellen. Anregung bei $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$ und Detektion im Bereich von $\lambda_{\text{em}} = 509 - 529 \text{ nm}$ (Maßstab = $20 \mu\text{m}$).

3.3.6 Vergleich der Transfektion mit verschiedenen Liposomenformulierungen

Es wurden auch Vergleiche hinsichtlich der Qualität und der Quantität der Transfektion von K-562 Zellen mit kationischen Lipiden verschiedener Hersteller durchgeführt (Tfx-50, Lipofectamine, Transfectam, Metafectene, Rotifect und Oligofectamine). Die Transfektionen wurden standardisiert für alle Liposomenformulierungen durchgeführt. Die Liposomenformulierungen Lipofectamine, Tfx-50, Transfectam und Metafectene zeigten entweder eine sehr geringe Transfektionseffizienz oder aber eine wenig disperse Verteilung in den Zellen. Daher wurden diese Liposomenformulierungen nicht weiter benutzt. Es wurden die unmodifizierten fluorophor markierten Primer Fluor-Ex2 und TexRed-Ex2-5bp, die für einen Abschnitt im Exon 2 der γ -Globin mRNA komplementär sind und bei Vorliegen des mRNA Gegenstrangs mit einer Distanz von 5 Basen zwischen den beiden Fluorophoren hybridisieren. Die Primerstammlösungen waren 1:10 verdünnt auf eine Konzentration von $2 \mu\text{M}$. Hier nicht dargestellte Untersuchungen haben gezeigt, daß die vorher benutzten Stammlösungen mit $20 \mu\text{M}$ zu hoch konzentriert waren und zu viele fluoreszierende Primer in der Lösung, an den Zellmembranen oder innerhalb der Zellen für schlecht aufzulösende Signale sorgten. Es wurden standardmäßig jeweils $4,5 \mu\text{l}$ ($\approx 0,23 \mu\text{g}$ DNA) der Primerstammlösungen eingesetzt und nach Vorgabe der verschiedenen Herstellerangaben die Verhältnisse von Primer zu Liposomen variiert. Es wurden jeweils 1×10^6 mit Hemin stimulierte K-562 Zellen transfiziert. Die Transfektion dauerte jeweils 3 Stunden und die

getrennt hergestellten Transfektionsansätze für die Donor und Akzeptor Primer wurden mit 30 Minuten Abstand zu den Zellen gegeben. Alle Proben wurden nach der Transfektion mit 2 % Formaldehyd fixiert. Die Ansätze für die Transfektionen mit Rotifect und Oligofectamine von K-562 Zellen enthielten folgende eingesetzte Mengen.

	Rotifect	Rotifect	Oligofectamine	Oligofectamine
Fluor-Ex2 [μl]	4,5	4,5	4,5	4,5
Tex-Ex2-5bp [μl]	4,5	4,5	4,5	4,5
Optimem [μl]	240	240	102	102
2x Rotifect [μl]	2,5	10	-	-
2x Oligofectamine [μl]	-	-	15	30
Plus-Reagenz [μl]	-	-	2	4

Tabelle 3-8 Transfektionsschema für K-562 Zellen mit Rotifect und Oligofectamine mit unmodifizierten Primern.

Dargestellt ist jeweils eine Übersichtsaufnahme und eine einzelne Zelle der Transfektionen durch Rotifect im Verhältnis DNA : Liposomenagens von 4,5 zu 10 (Abb. 3-48) und Oligofectamine von 4,5 zu 15 (Abb. 3-49), für die Anregung mit 488 nm und der Detektion beim Emissionsmaximum des Fluoresceins von 509 - 529 nm.

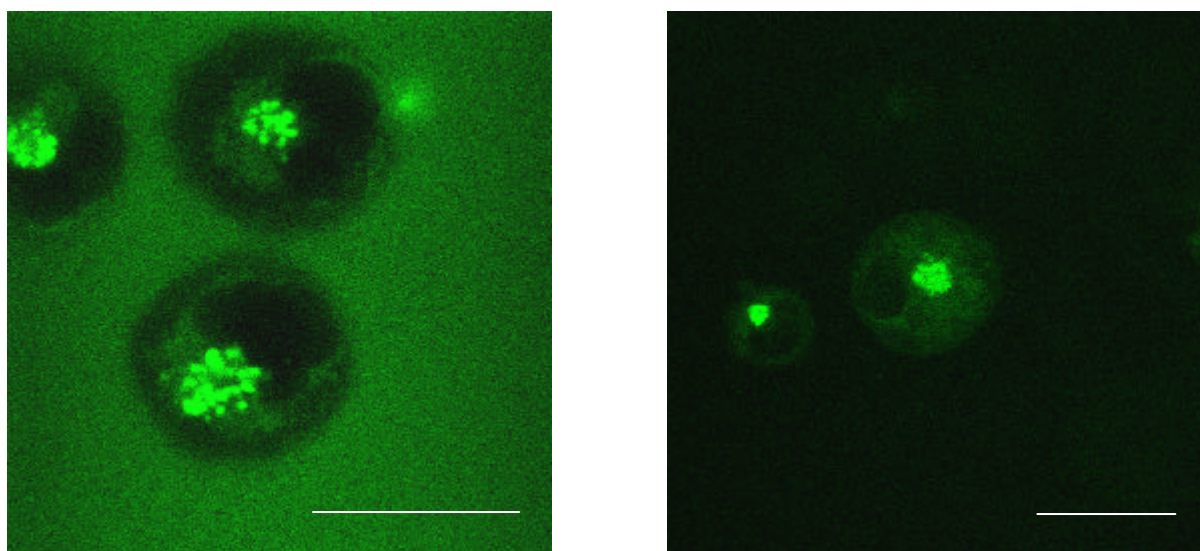


Abb. 3-48 Confokale Aufnahme von mit Rotifect transfizierten K-562 Zellen. Links Überblick, rechts Einzelzelle. Anregung bei $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$ und Detektion im Bereich von $\lambda_{\text{em}} = 509 - 529 \text{ nm}$ (Maßstab = 10 μm).

Die durch Rotifect transfizierten Zellen zeigen räumlich unterscheidbare Signale aus dem Cytoplasma. Es gibt zu diesem Zeitpunkt keinen Übertritt der Primer in die Zellkerne, die als

dunkle Schatten zu erkennen sind. Die optische Schnittebene liegt ungefähr in der Mitte der dargestellten Zellen. Die Verteilung der Primer ist im Cytoplasma nicht homogen, es gibt Ansammlungen von Primern in Teilen der Zellen, in anderen Bereichen sind kaum Signale zu detektieren. Das Signal/Rauschverhältnis ist gut. Die Transfektionseffizienz ist hoch, ungefähr 2/3 aller Zellen zeigen Signale aus dem Cytoplasma.

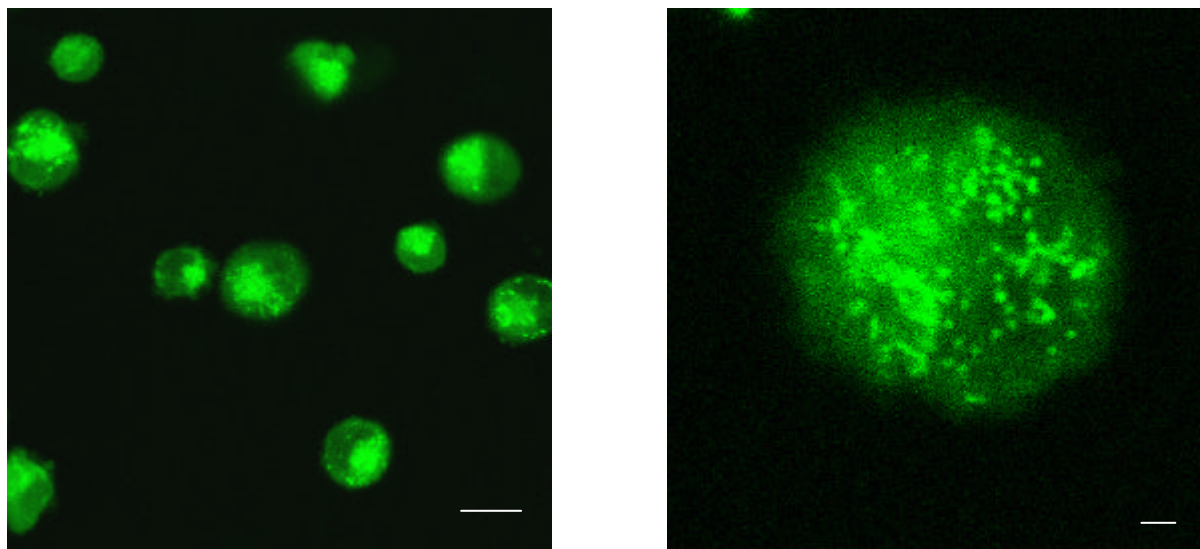


Abb. 3-49 Confokale Aufnahme von mit Oligofectamine transfizierten K-562 Zellen. Links Überblick (Maßstab = 10 μm), rechts Einzelzelle (Maßstab = 1 μm). Anregung bei $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$ und Detektion im Bereich von $\lambda_{\text{em}} = 509 - 529 \text{ nm}$.

Die Transfektion der Zellen durch Oligofectamine zeigt ebenfalls eine hohe Transfektionsrate von $\approx 70 \%$ transfizierten Zellen. Auch hier ist das Signal/Rauschverhältnis gut. Die Verteilung in den Zellen ist aber anders. Die Signale sind in ihrer Ausdehnung kleiner, dafür aber homogener im Cytoplasma verteilt. Die Zellkerne sind auch hier als dunkle Schatten zu erkennen, allerdings scheinen auch Signale aus den Zellkernen zu kommen, wie in der Einzelaufnahme zu sehen ist. Dort ist der angeschnittene Zellkern in der rechten Hälfte zu erahnen. Die Transfektion mit Rotifect und dem Verhältnis von 4,5 zu 2,5 zeigte eine schlechtere Transfektionsrate und insgesamt viel schwächere Signale aus den Zellen. Bei den mit Oligofectamine im Verhältnis 4,5 zu 30 transfizierten Zellen waren die Signale weniger homogen in den Zellen verteilt und ihre Ausdehnung war deutlich größer.

3.3.7 Darstellung der Membranbarriere für PTA modifizierte Primer

Wurden am Anfang dieser Arbeit nur DNA-Oligonucleotide eingesetzt, die außer der Markierung mit Fluorophoren keine Modifikation aufwiesen, wurden später auch am

Pentoserückrad modifizierte Oligonucleotide eingesetzt. Dies wurde gemacht, um der Degradation der Oligonucleotide, durch Enzyme in der vitalen Zelle, vorzubeugen und damit die Lebenszeit der Primer zu erhöhen. Die ersten Versuche mit PTA-Primern verliefen enttäuschend. Es waren kaum Signale in den Zellen zu detektieren. Darum wurde untersucht, wie sich die modifizierten Oligonucleotide bei der Transfektion verhalten. Es wurden die PTA-Primer 2G-Fluor-Ph und 2G-Tex-5bp-Ph verwendet (2 μ M Stammlösung). Die Primer hybridisieren in einer Distanz von 5 Basen zueinander, wenn die entsprechend komplementäre Sequenz vorhanden ist. Es wurden 4 Ansätze mit Rotifect als Transfektionsmittel untersucht (Tabelle 3-9). Die Transfektionen wurden nach 30 Minuten, 60 Minuten, 3 Stunden und 16 Stunden (über Nacht) unterbrochen und nach Fixierung mit 1 % Formaldehyd untersucht.

	30 Minuten	60 Minuten	3 Stunden	16 Stunden
2G-Fluor-Ph [μ l]	4	4	4	4
2G-Tex-5bp-Ph [μ l]	4	4	4	4
Rotifect [μ l]	10	10	10	10
Optimem [μ l]	240	240	240	240

Tabelle 3-9 Transfektionsschema für K-562 Zellen mit PTA-Primern und variabler Transfektionsdauer.

Die Aufnahmen der 4 Ansätze zeigen einen zeitlichen Verlauf des Eindringens der Oligonucleotide in die Zellen (Abb. 3-50, Abb. 3-51). Bei der nach 30 Minuten beendeten Transfektion sieht man deutlich, daß die Liposomen offensichtlich erst in die Zellmembran integrieren. Großflächige Signale mit einer scharfen Grenze sind bei ungefähr 20 % der Zellen zu erkennen. Die Grenze ist nicht nur zum Interzellularraum scharf, sondern auch gegenüber dem Cytoplasma. Es sieht so aus, als ob die Zellmembran an diesen Stellen durch die eindringenden Vesikel aufgebläht ist (Abb. 3-50, linkes Bild). Bei der nach 60 Minuten beendeten Transfektion zeigen ungefähr 45 % aller Zellen eine Adhäsion von Vesikeln an oder in die Zellmembran. Es gibt eine heterogene Mischung von Zellen die noch scharfe abgegrenzte große Kompartimente an und in der Zellmembran zeigen und solche, bei denen die Signale schon diffuser sind und sich nicht mehr scharf gegen das Cytoplasma abgrenzen lassen (Abb. 3-50, rechtes Bild).

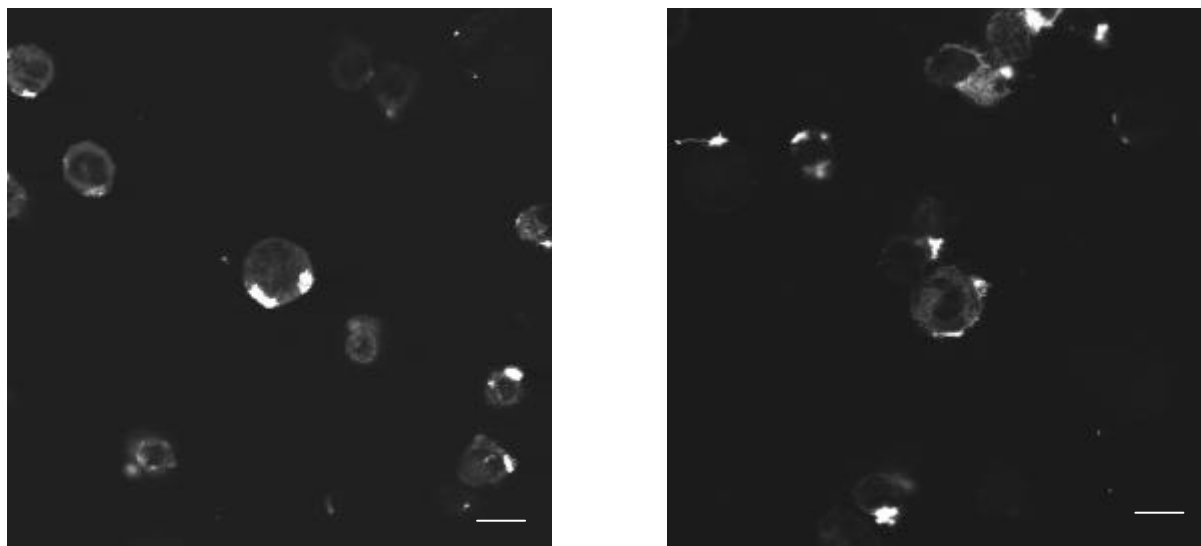


Abb. 3-50 Confokale Aufnahme von mit Rotifect transfizierten K-562 Zellen mit PTA-Primern. Links Transfektionsdauer 30 Minuten, rechts Transfektionsdauer 60 Minuten. Anregung bei $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$ und Detektion im Bereich von $\lambda_{\text{em}} = 509 - 529 \text{ nm}$ (Maßstab = $10 \mu\text{m}$).

Das Bild der nach 3 Stunden beendeten Transfektion unterscheidet sich deutlich von den beiden vorherigen. Fast $2/3$ aller Zellen zeigen mit der Zellmembran assoziierte Signale. Diese sind jetzt aber nicht mehr auf einen Abschnitt der Membran beschränkt oder abgegrenzt, sondern die Membranen zeigen sich häufig als strahlender Kranz um das Cytoplasma der Zellen (Abb. 3-51, linkes Bild). Die Oligonucleotide haben sich offensichtlich diffus in den Membranen verteilt. Es sind aber noch keine deutlichen Fluoreszenzsignale aus dem Cytoplasma zu beobachten. Die Transfektion, die über Nacht kultiviert und erst nach 16 Stunden beendet wurde, zeigt eine distinkte Verteilung der Oligonucleotide im Cytoplasma der Zellen (Abb. 3-51, rechtes Bild). Dieses Bild entspricht im Prinzip den Transfektionsbildern der Zellen, die mit Rotifect und normalen Oligonucleotiden nach 3 Stunden Transfektionszeit zu erwarten sind. Die Inkorporation der PTA modifizierten Oligonucleotide dauert viel länger. Die Modifikation schützt die Primer offensichtlich vor der Degeneration durch Restriktionsenzyme in der Zelle. Die nicht modifizierten Primer sind nach Kultivierung von 16 Stunden fast vollständig degeneriert und kaum noch in den Zellen detektierbar. Alle zukünftigen Transfektionen mit PTA modifizierten Oligonucleotiden werden daher über Nacht kultiviert.

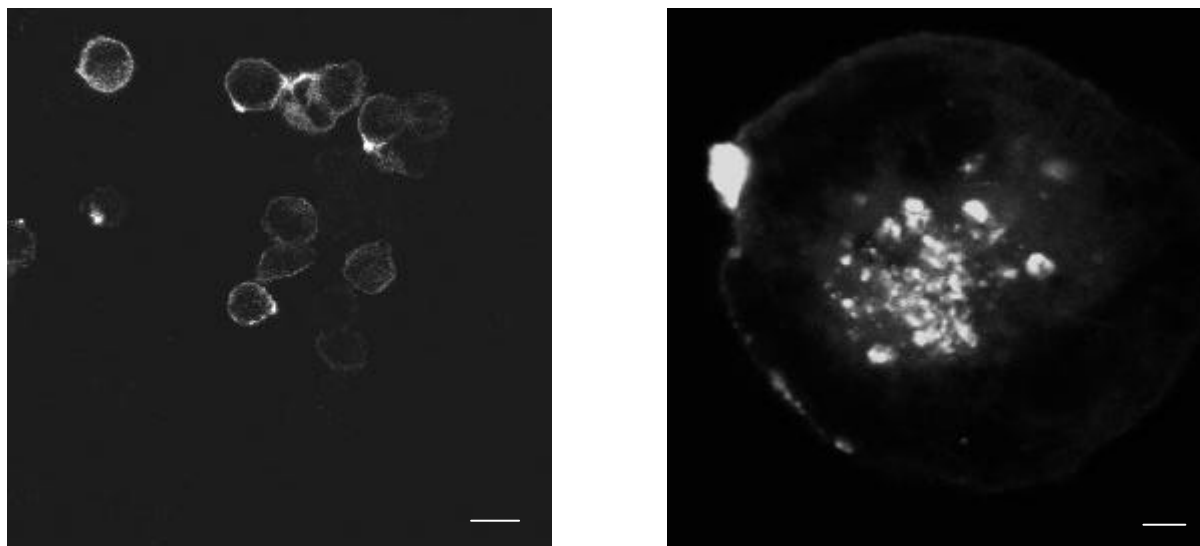


Abb. 3-51 Confokale Aufnahme von mit Rotifect transfizierten K-562 Zellen mit PTA-Primern. Links Transfektionsdauer 3 Stunden (Maßstab = 10 μm), rechts Transfektionsdauer 16 Stunden. Anregung bei $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$ und Detektion im Bereich von $\lambda_{\text{em}} = 509 - 529 \text{ nm}$ (Maßstab = 1 μm).

3.3.8 Microinjektion zur *in situ* DNA-RNA Hybridisierung

Bisherige Nachweise zur *in situ* Hybridisierung von RNA durch fluoreszenzmarkierte DNA-Oligonucleotide wurden ausschließlich durch Microinjektion erzielt (TSUJI ET AL, 2000). Als Überprüfung wurde daher diese Technik verwendet, um die Primer direkt in die Zellen einzubringen. Es wurden die *in vitro* mit der AE-Spektroskopie überprüften Primer für GAPDH benutzt. Diese Primer waren unmodifiziert und hatten eine Länge von jeweils 25 Basen. Der Donor-Primer (1-Flu-GAPDH) war 3'-Fluorescein und der Akzeptor-Primer (1-Tex-GAPDH-5bp) 5'-Texas-Red markiert. Zur Injektion wurden die beiden Primer 1:100 verdünnt und hatten damit eine Konzentration von 0,2 μM . Jede Injektionskapillare wurde mit je 1 μl von beiden Primerlösungen befüllt. Somit lagen die Primer in einer Konzentration von 0,1 μM vor. Im Durchschnitt gelangen pro Injektion zwischen 2 und 4 nl in die Zelle. Die Zellen wurden danach 15 Minuten ruhen gelassen und anschließend mit PFA/Eisessig fixiert und der FRET über die Methode des Akzeptor-Photo-Bleaching mit dem Confokalen Laser Scanning Mikroskop bestimmt. In der Abbildung (Abb. 3-52) ist eine Zelle mit inkorporierten Primern zu sehen. Die Signale sind homogen im Cytoplasma der Zelle verteilt. In den Zellkern sind weniger Oligonucleotide gelangt als in das Cytoplasma, aber deutlich mehr als bei den Liposomen-Transfektionen. Dies wird auf den gedruckten Bildern nicht so deutlich, kann aber im Mikroskop klar beurteilt werden. Zur Bestimmung des FRET wurden jeweils 4 Aufnahmen gemacht, nachdem zuvor die zu untersuchenden Bereiche als, sogenannte Regions of Interest (ROI's), markiert wurden.

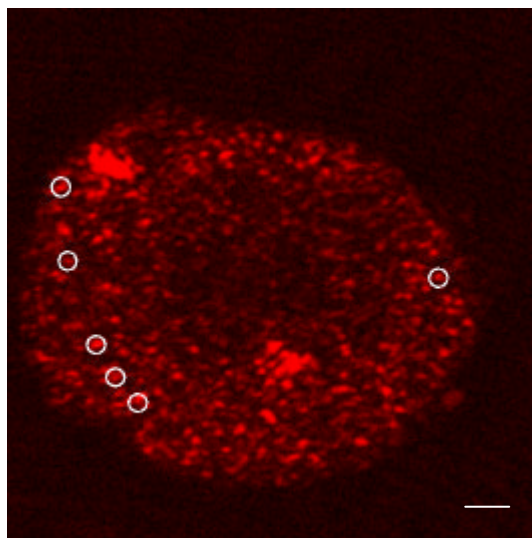


Abb. 3-52 Confokale Aufnahme der Microinjektion an K562 Zellen mit GAPDH-Primern und Akzeptor-Bleichung zur FRET Detektion. Das Bild zeigt eine Zelle bei Anregung mit $\lambda_{ex} = 543$ nm und Detektion im Bereich von $\lambda_{em} = 548 - 671$ nm. Die weißen Kreise markieren die gemessenen ROI's. Im Uhrzeigersinn von rechts nach links Nummer 1 - 6 (Maßstab = 1 μ m).

Das Bild gibt die Zelle aufgenommen bei Anregung mit der Akzeptor-Wellenlänge mit $\lambda_{ex} = 543$ nm und dem entsprechenden Detektionsbereich $\lambda_{em} = 548 - 671$ nm wieder. Die optische Ebene liegt ungefähr in der Mitte der Zelle. Es werden also die durch Akzeptor-Primer erzeugten Signale dargestellt. In den ROI's wird vor dem bleichen jeweils die Intensität des Donors bei spezifischer Anregung (488 nm) und die Intensität des Akzeptors bei spezifischer Anregung gemessen. Dann wurde der Akzeptor in den ROI's durch wiederholtes Anregen mit höchster Energie, hier 40 mal mit 100 % Laserleistung bei 543 nm, gebleicht. Daran anschließend wurden erneut die Intensitäten in den ROI's bei spezifischer Anregung des Donors und des Akzeptors gemessen. Mit Hilfe der so ermittelten Werte wird die FRET-Effizienz an der gemessenen Stelle bestimmt. Dies geschieht nach der Formel:

$$E_{FRET} \% = \frac{Donor_{post} - Donor_{pre}}{Donor_{post}} * 100 \quad (Gl. 3.2)$$

für alle ROI's in denen gilt: $Donor_{post} > Donor_{pre}$ und $Akzeptor_{post} < Akzeptor_{pre}$. Die Begriffe Pre und Post beziehen sich auf den Zeitpunkt der Ausbleichung des Akzeptors.

Die verwendeten Geräteeinstellungen stehen in Tabelle 3-10.

	Leistung 488 nm	Leistung 543 nm	Detektion Donor	Detektion Akzeptor
Donor Pre/Post	50 %	-	495 – 540 nm	-
Akzeptor Pre/Post	-	50 %	-	548 – 671nm

Tabelle 3-10 Geräteeinstellungen für die FRET Messung nach Microinjektion.

Die Tabelle gibt die ermittelten Werte für die ROI's in Abb. 3-52 an. Es sind nur die ROI's in denen die notwendigen Bedingungen hinsichtlich der Pre- und Post-Werte erfüllt waren und ein FRET gemessen wurde markiert (Tabelle 3-11). Es wurde ein FRET mit signifikanter Effizienz an 6 Orten in der K-562 Zelle detektiert. Es hat nicht an allen Stellen an denen Donor und Akzeptor Oligonucleotide kolokalisiert sind FRET stattgefunden.

	ROI_1	ROI_2	ROI_3	ROI_4	ROI_5	ROI_6
Donor _{pre}	75,00	118,80	47,00	85,00	57,00	79,08
Donor _{post}	85,06	137,40	116,00	92,69	66,29	86,77
Akzeptor _{pre}	167,78	177,10	166,00	221,69	137,57	138,23
Akzeptor _{post}	90,89	121,00	124,00	180,31	82,00	102,92
FRET Eff. (%)	11,82	13,54	59,48	8,30	14,01	8,87

Tabelle 3-11 Intensitätswerte der Pre/Post Messung der Akzeptor Bleichung und die daraus berechnete FRET Effizienz, nach Microinjektion der Primer.

3.3.9 Liposomentransfektion zur *in situ* DNA-RNA Hybridisierung

Die PFA/Eisessig Fixierung hat sich als geeignet erwiesen transfizierte Zellen unter geringer Beeinträchtigung der Strukturen zu fixieren. Daher wurden die folgenden Transfektionen, mit dem optimierten Transfektionsprotokoll, mit Oligofectamine und anschließender PFA/Eisessig Fixierung durchgeführt. Zur Transfektion wurden Hemin induzierte K-562 Zellen und eine Mischung aus jeweils 3 Primerpaaren, welche jeweils für verschiedene Sequenzbereiche der γ -Globin mRNA komplementär waren, eingesetzt. Zwei Paare waren modifizierte PTA-Primer und ein Primerpaar war unmodifiziert. Als Kontrollversuche wurden zum einen γ -Globin Sense Primer in K-562 Zellen und zum anderen die Antisense-Primer in JurkatE6.1-Zellen, die kein γ -Globin exprimieren können, transfiziert.

Alle verwendeten Primerpaare haben bei Hybridisierung einen Abstand von 5 Basen zwischen Donor- und Akzeptor-Primer. Zwei Primerpaare hybridisierten an komplementäre

Sequenzen im Bereich des Exons 2 (Ex2-Fluor/Tex und 2G-Fluor/Tex-Ph) und das dritte Primerpaar (Ex3-Fluor/Tex-Ph) im Bereich des Exons 3 der γ - Globin mRNA. Ein Primer für das Exon 2 und der Primer für das Exon 3 waren modifizierte PTA-Primer. Diese PTA-Primer waren je 25 Basen lang, während der Ex2-Fluor Primer eine Länge von 15 Nucleotiden und der Ex2-Tex Primer eine Länge von 18 Nucleotiden aufwies. Als Sense-Primer wurden die komplementären Primer für die Paare 2G-Fluor/Tex-Ph und Ex3-Fluor/Tex-Ph benutzt. Diese waren ebenfalls 25 Nucleotide lang und PTA modifizierte Primer. Die K-562 Zellen waren mit Hemin induziert und es wurden pro Ansatz 1×10^6 Zellen, sowohl der K-562 Zellen, als auch der JurkatE6.1 Zellen, transfiziert. Die Transfektionsdauer betrug 16 Stunden.

	K-562 Antisense	K-562 Sense	JurkatE6.1
Donor Oligonucleotide [μ l] Ex2-Fluor, 2G-Fluor-Ph, Ex3-Fluor-Ph	je 2	-	je 2
Akzeptor Oligonucleotide [μ l] Ex2-Tex, 2G-Tex-Ph, Ex3-Tex-Ph	je 2	-	je 2
Donor Oligonucleotide Sense [μ l] 2G-Fluor-Ph, Ex3-Fluor-Ph	-	je 2	-
Akzeptor Oligonucleotide Sense [μ l] 2G-Tex-Ph, Ex3-Tex-Ph	-	je 2	-
Oligofectamine [μ l]	7	7	7
Optimem [μ l]	40,5	40,5	40,5

Tabelle 3-12 Transfektion von K-562 und JurkatE6.1 Zellen mit PTA modifizierten und nicht modifizierten Oligonucleotiden.

Die Abbildung der K-562 Zellen die mit den Antisense Primern transfiziert wurden zeigten nach spezifischer Anregung sowohl Signale bei dem Emissionsspektrum des Fluoresceins, als auch bei dem des Texas-Red Fluorophors. Es sind in beiden Zellen distinkte Signale zu sehen (Abb. 3-53), die von der Anregung mit der Akzeptor-Wellenlänge $\lambda_{ex} = 543$ nm und dem entsprechenden Detektionsbereich $\lambda_{em} = 582 - 650$ nm stammen. Die Geräteeinstellungen stehen in Tabelle 3-13. Zur Akzeptor Bleichung wurden die ROI's 40 mal mit voller Intensität bestrahlt. Es wurden wieder vorher und hinterher die Intensitäten bei spezifischer Anregung für beide Fluorophore bestimmt, um daraus die FRET Effizienz ermitteln zu können.

	Leistung 488 nm	Leistung 543 nm	Detektion Donor	Detektion Akzeptor
Donor Pre/Post	50 %	-	495 – 540 nm	-
Akzeptor Pre/Post	-	50 %	-	582 – 650nm

Tabelle 3-13 Geräteeinstellungen für die FRET Messung der K-562- und JurkarE6.1-Zellen nach Transfektion mit Oligofectamine.

Die in beiden Zellen durch weiße Kreise markierten ROI's zeigten nach der Berechnung (Tabelle 3-14) der Intensitäten für Donor und Akzeptor das dort FRET stattgefunden hat. Die optische Ebene liegt ungefähr in der Mitte der Zellen. Es hat nicht an allen Stellen an denen Donor und Akzeptor Oligonucleotide kolokalisiert waren ein FRET stattgefunden. Die Größenordnung der Intensitäten ist ähnlich derjenigen die bei der Microinjektion auch gemessen wurden. Die FRET-Effizienzen liegen bei der Liposomen gestützten Transfektion durchschnittlich um die Hälfte niedriger.

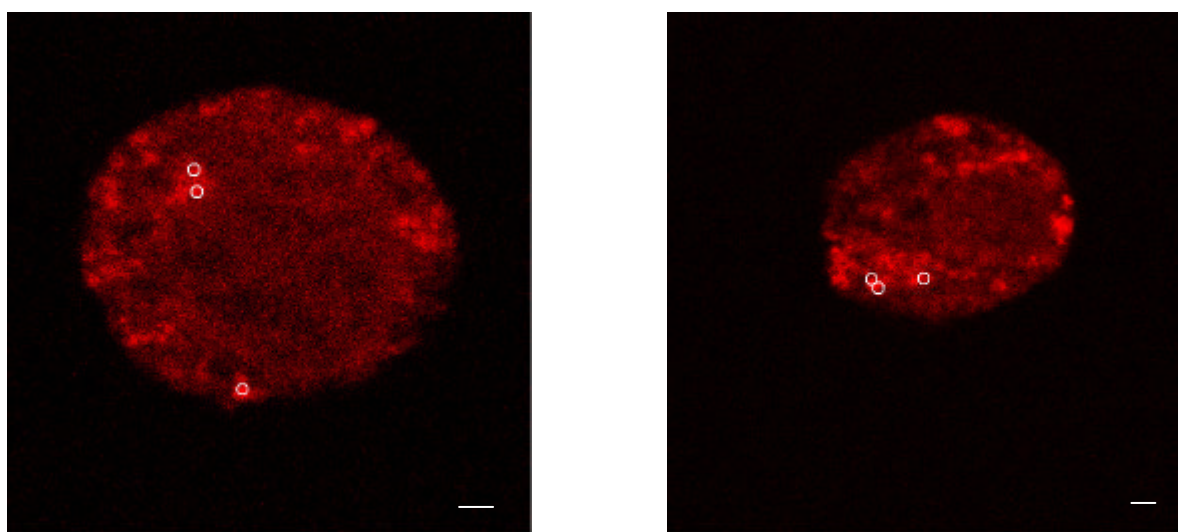


Abb. 3-53 Confokale Aufnahme der Oligofectamine Transfektion von K-562 Zellen mit dem Gemisch der γ -Globin Primer und Akzeptor-Bleichung zur FRET Detektion. Die Bilder zeigen zwei Zellen desselben Ansatzes bei Anregung mit $\lambda_{ex} = 543$ nm und Detektion im Bereich von $\lambda_{em} = 582 - 650$ nm. Die weißen Kreise markieren die gemessenen ROI's. Links von unten nach oben 1–3 und rechts von links nach rechts 4–6 Maßstab = 1 μ m).

	ROI_1	ROI_2	ROI_3	ROI_4	ROI_5	ROI_6
Donor _{pre}	174,92	110,83	95,92	175,44	138,13	139,91
Donor _{post}	193,67	117,67	102,42	183,78	159,75	149,27
Akzeptor _{pre}	197,25	124,50	122,33	164,89	168,75	121,64

	ROI_1	ROI_2	ROI_3	ROI_4	ROI_5	ROI_6
Akzeptor _{post}	192,17	117,75	105,75	141,33	117,00	102,55
FRET Eff. (%)	4,76	5,81	6,35	4,53	13,54	6,27

Tabelle 3-14 Intensitätswerte der Pre/Post Messung der Akzeptor Bleichung in K-562 und die daraus berechnete FRET Effizienz.

Die Kontrolluntersuchungen, bei denen die γ -Globin Primer in die JurkatE6.1 Zellen eingebracht wurden, sind mit denselben Geräteeinstellungen (Tabelle 3-13) und Transfektionsbedingungen durchgeführt worden. Es wurde 40 mal mit 100 % Intensität bei 543 nm gebleicht. Die Zellen sahen nach der Transfektion anders gefärbt aus, als die K-562 Zellen. Bei ungefähr einem Drittel des Ansatzes sind die Primer offensichtlich immer noch überwiegend in oder an der Zellmembran assoziiert (Abb. 3-54, linkes Bild). Bei den restlichen Zellen, die Signale aus dem Cytoplasma zeigten, war die Verteilung diffuser als bei den K-562 Zellen (Abb. 3-54, rechtes Bild). Unabhängig von der Lokalisation wurde nirgendwo, weder in oder an der Membran, noch intrazellulär ein FRET detektiert.

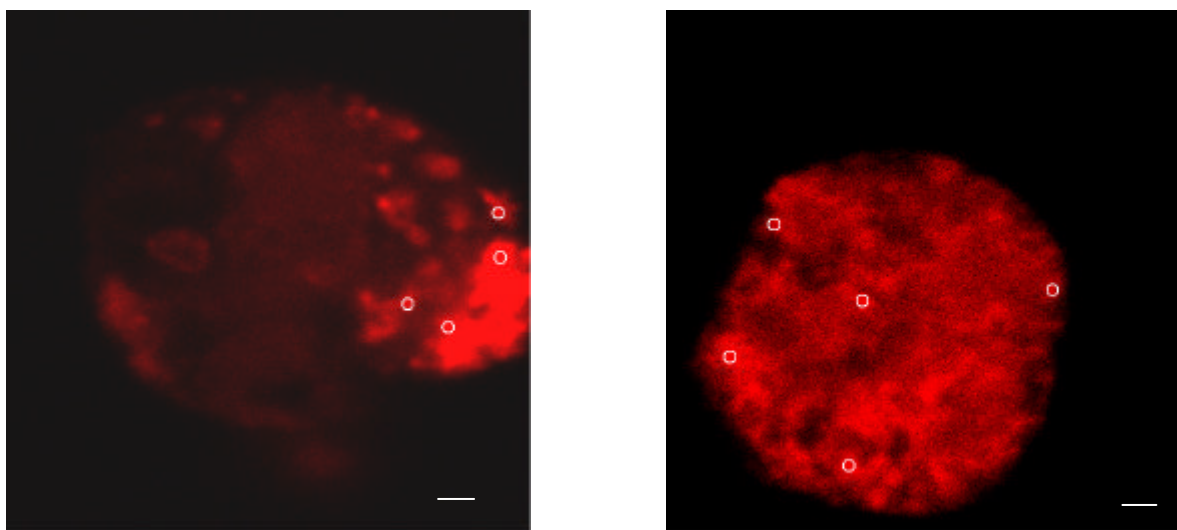


Abb. 3-54 Confokale Aufnahme der Oligofectamine Transfektion von JurkatE6.1 Zellen mit dem Gemisch der γ -Globin Primer und Akzeptor-Bleichung zur FRET Detektion. Die Bilder zeigen zwei Zellen desselben Ansatzes bei Anregung mit $\lambda_{\text{ex}} = 543 \text{ nm}$ und Detektion im Bereich von $\lambda_{\text{em}} = 582 - 650 \text{ nm}$. Die weißen Kreise markieren die gemessenen ROI's. Links von unten nach oben 1–4 und rechts von links nach rechts 5–9 (Maßstab = 1 μm).

Die Bestimmung der Intensitäten in den einzelnen ROI's und die Berechnungen daraus sind in Tabelle 3-15 dargestellt.

	ROI_1	ROI_2	ROI_3	ROI_4	ROI_5	ROI_6	ROI_7	ROI_8	ROI_9
Donor _{pre}	153,47	59,02	181,63	58,14	66,33	52,18	67,33	84,13	46,90
Donor _{post}	132,24	46,91	121,07	47,32	47,81	43,50	55,23	63,67	32,67
Akzeptor _{pre}	246,24	134,39	253,39	129,74	202,19	152,50	178,03	185,77	144,67
Akzeptor _{post}	240,05	119,61	243,28	113,98	191,12	143,32	170,26	176,77	132,83
FRET Eff. (%)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Tabelle 3-15 Intensitätswerte der Pre/Post Messung der Akzeptor Bleichung in der Kontrolle mit JurkatE6.1 Zellen.

Die Kontrolluntersuchungen, bei denen die γ -Globin Sense-Primer in die K-562 Zellen eingebracht wurden, sind mit denselben Geräteeinstellungen (Tabelle 3-13) und unter denselben Transfektionsbedingungen durchgeführt worden. Es wurde 40 mal mit 100 % Intensität bei 543 nm gebleicht. Die Signale kommen vorwiegend aus dem Cytoplasma der Zelle (Abb. 3-55). Insgesamt machen die Signale aus diesen Zellen auch einen diffuseren Eindruck als bei den Zellen mit den Antisense-Primern, allerdings sind trotzdem klar umrissene Bereiche zu erkennen, die Fluoreszenz zeigen. Auch scheinen von diesen Sense-Primern einige in den Zellkern eingedrungen zu sein. Die Tabelle 3-16 gibt die gemessenen Intensitäten in den ROI's und die damit ermittelten Werte wieder. Es konnte kein FRET in diesen Zellen detektiert werden

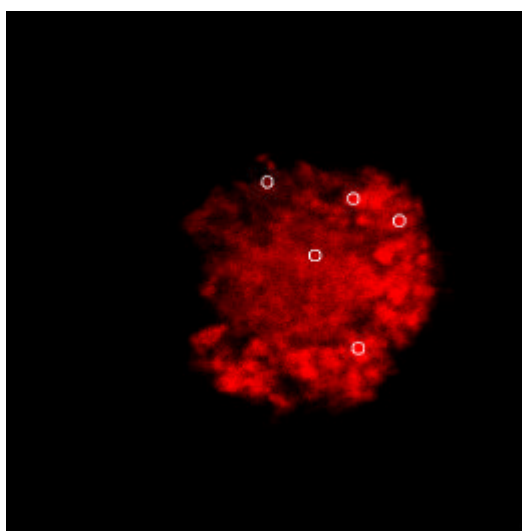


Abb. 3-55 Confokale Aufnahme der Oligofectamine Transfektion von K-562 Zellen mit dem Gemisch der γ -Globin Sense-Primer und Akzeptor-Bleichung zur FRET Detektion. Das Bild zeigt eine Zelle des Ansatzes bei Anregung mit $\lambda_{ex} = 543$ nm und Detektion im Bereich von $\lambda_{em} = 582 - 650$ nm. Die weißen Kreise markieren die gemessenen ROI's. Von unten nach oben 1 - 5.

	ROI_1	ROI_2	ROI_3	ROI_4	ROI_5
Donor _{pre}	65,21	63,91	54,63	64,88	37,29
Donor _{post}	57,35	49,98	46,86	56,46	30,81
Akzeptor _{pre}	171,47	136,20	186,74	195,83	122,21
Akzeptor _{post}	152,73	122,31	166,40	178,17	103,08
FRET Eff. (%)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Tabelle 3-16 Intensitätswerte der Pre/Post Messung der Akzeptor Bleichung in der Kontrolle mit K-562 Zellen.

Es wurde zum ersten Mal gezeigt, daß es möglich ist, durch eine liposomal vermittelte Transfektion, geeigneter fluorophor markierter DNA-Oligonucleotide, in Zellen einer Kultur einen Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer, nach *in situ* Hybridisierung von DNA-Oligonucleotiden an eine komplementäre Sequenz einer mRNA, nachzuweisen.

4 Diskussion & Ausblick

4.1 Diskussion der AES Ergebnisse

4.1.1 Strategie zur Erzeugung eines FRET-Signals durch DNA-RNA *in situ*

Hybridisierung

Diese Arbeit fußt auf den Ergebnissen der Diplomarbeit von R. Palmisano (PALMISANO, 2001) und dem daraus resultierenden Patent (PALMISANO ET AL., 2001) zur Markierung von RNA durch *in situ* Hybridisierung mit fluoreszenzmarkierten DNA-Oligonucleotiden und daraus resultierendem FRET-Signal. Durch strahlungslosen Energie Transfer soll, nach Anregung eines Donor-Fluorophors, die Emission eines geeigneten Akzeptor-Fluorophors detektiert werden. Als Ziel für die an in ihrer Sequenz unterschiedliche DNA-Oligonucleotide gekoppelten Fluorophore, soll eine komplementäre Sequenz einer mRNA *in situ* dienen. Die Sequenzen der beiden Oligonucleotide wurden so gewählt sein, daß der Abstand zwischen Donor- und Akzeptor-Fluorophor nach Hybridisierung optimal für einen maximalen FRET ist, der durch Anregung des Donor-Fluorophors induziert werden kann. Die Markierung und Detektion von RNA *in status nascendi* mit Fluorophoren und die anschließende Detektion mit einem Fluoreszenzmikroskop konnte die Gruppe um Femino 1998 zeigen (FEMINO ET AL., 1998). Die Beobachtung von Energieübertrag an Subpopulationen von in Lösung befindlichen DNA-Oligonucleotiden, durch deren Markierung mit Fluorophoren, wurde 1999 von Deniz und anderen gezeigt (DENIZ ET AL., 1999). Die ebenfalls aussagekräftigen Voruntersuchungen (PALMISANO, 2001) veranlaßten eine Weiterführung dieses Projekts.

Basierend auf den vorliegenden Erkenntnissen sollte folgende Strategie eingesetzt werden. Die Optimierung von Fluorophor gekoppelten DNA-Oligonucleotiden, mit Hilfe der Anregungs-Emissions-Spektroskopie. Dies insbesondere hinsichtlich der Frage eines geeigneten Akzeptors, in bezug auf die Separation der Signale von Donor und Akzeptor. Außerdem sollten die Oligonucleotide hinsichtlich ihrer physikalisch-chemischen Eigenschaften und der biologisch notwendigen Länge einerseits und einer Kostenabwägung andererseits optimiert werden. Die bisher in der Literatur dargestellten *in situ* Hybridisierungen basieren alle auf Mikromanipulation einzelner Zellen. Um die Methode

unter Routinebedingungen in größerem Maßstab einsetzen zu können, ist es aber erforderlich die fluoreszenzmarkierten DNA-Oligonucleotide auf einem einfacheren Weg in große Zellproben, wie zum Beispiel Zellkulturen oder Blutproben einzubringen. Außerdem sollen die Zellen hinterher einer Zellsortierung und danach weitergehenden Untersuchungen durch bildgebende Verfahren wie die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH), zum Beispiel für eine Molekular-Cytogenetische Beurteilung, zugänglich sein. Um die Frage der Transfektionsmöglichkeit zu untersuchen, wurde ein Modellsystem etabliert. Es handelt sich um eine entartete Blutzelllinie, die unter anderem das gewünschte Zielgen (γ -Globin) exprimiert, aber das funktionelle Protein nicht bildet. Somit scheidet eine Beeinträchtigung durch die Absorption des Hämoglobins aus. Mit den Untersuchungen verschiedener Transfektionsmöglichkeiten gekoppelt, wurde auch die Frage nach einer geeigneten Fixierung der Zellen untersucht.

4.1.2 Kontrolluntersuchung zur Fluorophorkonzentration

Bei den *in vitro* Untersuchungen von Fluorophoren in Lösung, mit der Methode der AE-Spektroskopie, ist es zur Beurteilung der Ergebnisse unerlässlich sicherzustellen, daß kein falsch positiver FRET aufgrund zu hoher Konzentration der Fluorophore zustande kommt. Wenn die Konzentration steigt nimmt die Wahrscheinlichkeit, daß zwei Fluorophore sich dicht genug kommen und FRET erzeugen, zu. Theoretische Berechnungen (PLESSOW, 1998) führen zu dem Ergebnis, daß die Konzentration zweier Fluorophore im molaren Bereich liegen muß, wenn ein FRET zustande kommen soll. Obwohl in dieser Arbeit die Konzentration bei den *in vitro* Messungen in der Größenordnung von 2 μ M lag sind Verdünnungsstufen für die markierten DNA-Oligonucleotide durchgeführt worden. Die ersten 3 Verdünnungsstufen (1:1, 1:2, 1:5) zeigen durchaus bemerkenswerte AE-Bilder. Nur auf den ersten Blick scheint bei den Proben ein FRET stattzufinden. Das Fluoreszenzsignal des Fluoresceins ist nicht infolge der Auslöschung durch Energietransfer verschwunden, sondern die Proben sind aufgrund der hohen Konzentration an Fluorophoren optisch dicht. Dies ist ansatzweise auch am Signal des Raleigh-Lichtes zu erkennen. Dieses verschwindet ebenfalls zum Teil aufgrund der hohen Absorption. Außerdem ist bei hohen Konzentrationen der Anstieg der Fluoreszenz nicht mehr proportional zur Konzentration. Das Anregungsspektrum des Texas-Red zeigt des weiteren, im Bereich des Anregungsmaximums des Fluoresceins, keinen Anstieg der Fluoreszenz beim Texas-Red. Dies ist ein Vorteil der zweidimensionalen Auftragung durch die AE-Spektroskopie, es ist sofort zu erkennen woher die Anregung für

eine Emission des Akzeptors stammt. Ab der Verdünnung von 1:10 sind wieder die vollständigen Spektren beider Fluorophore zu erkennen und es ist kein FRET zu detektieren. In der normierten Darstellung erkennt man auch den Zusammenhang von abnehmender Konzentration der Fluorophore in der Probe und damit einhergehender Abnahme der Intensität wie er zu erwarten wäre. Die zum Vergleich ebenfalls vermessene Probe, die dem Standardmischungsverhältnis bei den AES-Messungen entspricht, würde einer Verdünnung von 1:37 entsprechen. Damit ist gezeigt, daß es keinen falsch positiven FRET in dem hier untersuchten Konzentrationsbereich geben kann. Die Untersuchung des verwendeten Hybridisierungspuffers SSC zeigt, daß dieser im untersuchten Wellenlängenbereich keine intrinsische Fluoreszenz zeigt. Die Vergleichbarkeit der Messungen wird auch dadurch sichergestellt, daß der pH Wert des SSC-Puffers bei 7,1 liegt. Dies ist notwendig, weil das Fluorescein und seine Derivate in den beiden äußeren Ringen Sauerstoffatome besitzen, welche in das System der konjugierten Doppelbindungen eingeschlossen sind. Die Protonierung dieser Gruppe führt zu einer Fluoreszenzlöschung des Fluorescein und damit zu einer Abnahme der Donor-Fluoreszenz, die nicht durch FRET hervorgerufen wird. Auch die Eignung zum Energieübertrag wird dadurch herabgesetzt. Die Rhodamin Derivate haben an diesen Stellen Stickstoffatome und die Cy-Farbstoffe bestehen aus zwei Indiocyanin-Gruppen die durch konjugierte Doppelbindungen zusammengehalten werden. Diese Fluorophore verhalten sich daher wesentlich toleranter gegenüber pH-Wert Änderungen. Des weiteren wird der SSC-Puffer in der Literatur häufig als die verwendete Hybridisierungslösung angegeben und somit ist die Vergleichbarkeit mit anderen *in vitro* Arbeiten gewährleistet. Die Überprüfung der in der Theorie vorhergesagten Abstandsabhängigkeit zeigt sich durch die Untersuchung an 15 FRET-Paaren, mit steigender Distanz der Donor-Akzeptor Oligonucleotide zueinander, deutlich. Der sigmoide Verlauf der zu erwarten ist wurde gezeigt. Es kommt jedoch in der untersuchten Sequenz zu einem Ausreißer bei der Distanz von 8 Nucleotiden zwischen Donor und Akzeptor. Der FRET-Anteil fällt hier bei allen drei Temperaturreihen überproportional stark ab. Diese geringe FRET-Effizienz ist wahrscheinlich auf den geringen GC-Gehalt zurückzuführen. Die Ausbildung von Doppelsträngen erfolgt durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den einander komplementären Basen, wobei Guanin und Cytosin drei Wasserstoffbrücken ($G = C$) und Adenin und Thymin (Uracil) zwei Wasserstoffbrücken ($A = T$) ausbilden. Neben der Gesamtlänge der Sequenz hat vor allem die Anzahl von Guanin und Cytosin entscheidenden Einfluß auf die Schmelztemperatur, die angibt wann die Doppelstränge sich wieder voneinander trennen und ein gutes Maß für die Stabilität der Hybride ist. Je höher der G/C Gehalt desto stärker steigt die Schmelztemperatur.

Der Prozeß der Hybridisierung zweier Nucleinsäurestränge läuft zeitlich nicht linear ab, sondern in zwei Phasen. Die erste Phase bestimmt die Geschwindigkeit der Gesamtreaktion. Hier müssen sich die komplementären Stränge durch zufällige Zusammenstöße finden. Daher steigert eine Erhöhung der Konzentration und der Temperatur die Wahrscheinlichkeit und damit die Geschwindigkeit. Wird jedoch die Schmelztemperatur überschritten, trennen sich, in Abhängigkeit von der Konzentration, die Doppelstränge wieder. Liegt die Hybridisierungstemperatur deutlich unter der Schmelztemperatur läuft die Reaktion sehr langsam ab und außerdem trennen sich auch falsch gepaarte Stränge schlechter, wobei eine Fehlpaarungsrate von 1 % die Schmelztemperatur um 1°C senkt. Nachdem sich zwei Stränge zu einem Teil zusammengelagert haben, verläuft die Polymerisierung zur Ausbildung einer Doppelhelix zwischen den restlichen Basen sehr schnell. Es ist daher für stringente Bedingungen, sinnvoll die Temperatur nicht zu weit unterhalb des Schmelzpunktes und eine angemessene Konzentration zu wählen, weil man damit Fehlpaarungen zwischen nicht vollständig komplementären Strängen minimiert. Die Auftragung von GC-Gehalt gegen den FRET-Anteil macht deutlich, daß bei so kurzen Oligonucleotiden der GC-Gehalt einen sehr starken Einfluß auf das Verhältnis der ungebundenen zu gebundenen Primern hat. Es scheint sogar so zu sein, daß ein Anteil von drei G/C Paarungen, bei einer Gesamtlänge des Primers von zehn Oligonucleotiden, nicht einmal mehr bei sehr wenig stringenten Bedingungen ausreicht um eine befriedigende Ausbeute an Heteroduplices zu erhalten. Bei Überschreiten der Schmelztemperatur, die für dieses Oligonucleotid bei 26°C liegt, fällt die FRET-Effizienz unter 10 % und für die 40°C Hybridisierung sogar fast schon auf 0 %. Der Einfluß des GC-Gehalts ist bei so kurzen Primern also überproportional stark. Er kann im umgekehrten Fall, allerdings nicht so drastisch, beobachtet werden. Das FRET-Paar mit dem 10 bp Abstand hat einen Schmelzpunkt von 30°C gegenüber dem von 28°C bei dem FRET-Paar mit der Neuner-Distanz und liegt daher in der Effizienz höher als die beiden einander näher liegenden Fluorophore. Es sind also mehr Heteroduplices bei dem Zehner-Abstand als bei dem Neuner-Abstand entstanden. Die Zunahme der Temperatur bei dem generellen Verlauf der drei Hybridisierungsreihen zeigt, daß die FRET-Effizienz mit steigender Temperatur abnimmt (GELFAND ET AL., 1999). Die meisten der eingesetzten Oligonucleotide haben eine Schmelztemperatur zwischen 28°C und 32°C, daher fällt der Verlauf der FRET-Effizienz bei 30°C gegenüber den Messungen bei 20°C nur etwas niedriger aus. Die durchschnittliche FRET-Effizienz bei der 40°C Meßreihe ist im Vergleich hingegen, aufgrund der beschriebenen Effekte, deutlich geringer.

Die hier durchgeführten Messungen wurden alle, bis auf die Temperaturkurven, bei 20°C durchgeführt. Die Bedingungen hätten stringenter sein können, da jedoch zu Beginn dieser Arbeit noch kein temperierbarer Probenhalter zur Verfügung stand, konnte die Raumtemperatur nur durch eine Klimaanlage auf 20°C konstant gehalten werden. Im Verlauf der Zeitdauer dieser Arbeit stand dann ein speziell angefertigter temperierbarer Probenhalter zur Verfügung. Es wurde dann aber um die Vergleichbarkeit zu gewährleisten standardmäßig weiter bei 20°C gemessen. Es ist daher damit zu rechnen, daß sich die Stringens bei Hybridisierungen in lebenden Zellen weiter erhöhen wird, weil die Temperatur dann in der Regel 37°C beträgt. Dies ist natürlich von Vorteil, um Fehlpaarungen zu unterdrücken. Die *in vitro* Untersuchungen wurden generell mit synthetisierten fluoreszenzmarkierten DNA Oligonucleotiden und den ebenfalls als DNA synthetisierten komplementären Strängen durchgeführt. Zum einen, weil RNase freies Arbeiten bei der großen Anzahl, es wurden ca. 800 Messungen durchgeführt, extrem aufwendig gewesen wären und außerdem die Quarzküvetten, welche zur Messung benutzt wurden, geklebt sind und daher nicht autoklaviert werden dürfen. Daher hätte nie sichergestellt werden können, daß die Ziel RNA noch in der zu messenden Probe vorliegt. Dies wurde bei Versuchen mit aus Zellen extrahierter RNA leider dann auch beobachtet. Obwohl die RT-PCR das Zielprodukt nachwies, die photometrische Bestimmung nach RNA Extraktion eine große Gesamtausbeute zeigte, gab es oft überhaupt keinen FRET bei den *in vitro* Messungen mit dieser RNA. Wurde die untersuchte Lösung dann noch einmal photometrisch auf den RNA Gehalt überprüft, stellte sich heraus, daß von der ursprünglichen Konzentration an Gesamt-RNA nicht einmal mehr 10% in der Probe vorhanden war, der Rest war offensichtlich degradiert. Der zweite Grund, die *in vitro* Messungen mit synthetisierten DNA-Komplementen durchzuführen war, daß der Anteil der Ziel-RNA am Gesamt Extrakt von extrahierter RNA immer schwankte und nicht genau zu bestimmen war. Es ist aber für die Beurteilung und den Vergleich der Ergebnisse aus den *in vitro* Messungen zwingend notwendig, daß die eingesetzten Stoffmengen der drei an der Hybridisierung beteiligten Oligonucleotide, Donor-Strang, Akzeptor-Strang und das DNA-Komplement, äquimolar vorliegen. Um dies zu gewährleisten sind alle synthetisierten Primer nach Erhalt noch einmal photometrisch vermessen worden und die Konzentration wurde auch in bezug auf die Absorption der Fluorophore bei 260 nm exakt errechnet. Bei kurzen Oligonucleotiden kann diese zusätzliche Absorption bei 260 nm die aus der OD der DNA bei 260 nm berechnete Konzentration um die Faktoren 0,5 bis 2 verfälschen. Standardmäßig werden die Konzentrationen bei den industriellen Herstellern, als Folge der automatisierten Synthese nur für die Absorptionskoeffizienten der DNA berechnet.

Dies hatte zur Folge, daß anfängliche Messungen schwer zu erklärende Ergebnisse zeigten. Nachdem dieses Problem aufgedeckt war, wurden alle verwendeten Primer nach der exakten Konzentrationsbestimmung auf 20 μM als Stammlösung eingestellt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen legen nahe die Länge der Oligonucleotide zu vergrößern, um die Stabilität der Heteroduplices zu erhöhen und damit die zu erwartende FRET-Effizienz zu steigern.

4.1.3 Betrachtung unterschiedlicher Oligonucleotidlängen

Der Einfluß der Primerlänge wurde aufgrund der Ergebnisse einer weiteren Betrachtung unterzogen. Hierzu wurden Oligonucleotide mit variierenden Längen synthetisiert und untersucht. Es wäre einfach gewesen ein Primerpaar mit einer Länge von 30 Oligonucleotiden für jedes Oligonucleotid zu synthetisieren. Dem stehen aber zwei gewichtige Argumente gegenüber. Je größer ein Oligonucleotid ist, desto schwerer ist es dieses aus dem extrazellulären Raum, durch die Zellmembran, in das Cytoplasma zu schleusen. Des weiteren steigen die Synthesekosten mit jeder weiteren Kopplung und in großem Maßstab muß auch die Wirtschaftlichkeit gewährleistet sein. Außerdem steigt auch das Risiko, daß sich Haarnadelstrukturen ausbilden, die ihrerseits die Hybridisierung erschweren (OTA ET AL., 1998). Auch die Gefahr, daß die beiden fluoreszenzmarkierten Primer ungewollte Homoduplices oder Heteroduplices bilden, steigt mit der Länge der Oligonucleotide an, weil die Wahrscheinlichkeit, daß es zu komplementären Sequenzhomologien innerhalb der Oligonucleotide kommt mit der Längenzunahme wächst (LILLEY ET AL., 2000). Nicht übersehen werden darf auch die Spezifität der Sequenzen im Hinblick auf das gesuchte Ziel. Sind die Sonden zu kurz, gibt es möglicherweise mehr als eine komplementäre RNA-Sequenz in den transfizierten Zellen. Dies führt dann zu unspezifischer Hybridisierung eines Teils der Primer an eine falsche Sequenz. Das hätte wiederum eine Abschwächung und im Extremfall das Ausbleiben der Signale zur Folge, führte also zu einem falsch negativen Ergebnis hinsichtlich der Aussage ob eine Zelle die gesuchte RNA exprimiert. Der schlimmste Fall wäre der, daß es zu einer falschen Hybridisierung beider Primer dergestalt kommt, daß ein falsch positives Signal erzeugt wird. Dies darf unter keinen Umständen entstehen. Darum sind die verwendeten Sequenzen über eine BLAST Suche geprüft worden. Ab einer Länge von 20 Oligonucleotiden treten keine Sequenzhomologien zu anderen RNAs in humanen Zellen auf. Natürlich finden sich jedoch Übereinstimmungen zu den Sequenzen, insbesondere beim Hämoglobin, bei den anderen Vertretern der Primaten. Die Ergebnisse der Messungen zur Effizienz, in Abhängigkeit der Oligonucleotidlänge, bestätigen die Erwartung der Zunahme

der FRET-Effizienz bei längeren Primern. Mit zunehmender Länge verschiebt sich das Gleichgewicht von ungebundenen hin zu gebundenen Primern. Dadurch steigt dann nicht nur der Anteil der FRET-Intensität am Gesamtsignal am Detektionspunkt, sondern auch die absolute Intensität nimmt gegenüber der Donor-Fluoreszenz deutlich zu. Das Signal zu Rauschverhältnis, welches für eine spätere Detektion wesentliche Bedeutung hat, verbessert sich stark zugunsten der Akzeptor-Emission. Der verhältnismäßig starke Anstieg der FRET-Effizienz zwischen dem 25- und dem 26-Nucleotide langen Akzeptor-Primern läßt sich nicht alleine durch das eine Nucleotid mehr erklären. Der Unterschied besteht bei beiden Akzeptorsonden ja auch darin, daß das 25-Polymer den Fluorophor endständig markiert hat und die Lücke von fünf Oligonucleotiden zwischen diesem und dem gegenüberliegenden Donor-Fluorophor frei ist. Das 26-Polymer hat nur eine Lücke von einem Nucleotid zum Donor-Strang, wobei die Distanz der beiden Fluorophore trotzdem fünf Nucleotide, durch die jetzt interne Kopplung des Akzeptor-Fluorophors, beträgt. Es ist anzunehmen, daß der fast vollständige Lückenschluß zwischen beiden Oligonucleotiden die Struktur der Doppelhelix stabilisiert. Dies führt dann wahrscheinlich dazu, daß die Orientierung der Fluorophore, die bei der Berechnung als Faktor k einfließt, nicht mehr so stark schwankt und die FRET-Effizienz dadurch noch einmal deutlich verbessert wird. Da die Effizienz des FRET bei dem 26 Nucleotide langen Primern schon bei 82 % liegt wurde auf eine weitere Verlängerung verzichtet, da hier für die Untersuchungen erst einmal ein guter Kompromiß für alle geforderten Bedingungen gefunden scheint.

4.1.4 Vergleich unterschiedlicher Akzeptor-Fluorophore für das Donor-Fluorophor Fluorescein und den optimalen Abstand der Fluorophore zueinander

Neben den grundlegenden Parametern für die Hybridisierungsstabilität der Oligonucleotide spielt natürlich der Abstand der Donor-Akzeptor Fluorophore eine prominente Rolle, ebenso wie die Auswahl des effizientesten Fluorophore-Paares für das Zustandekommen eines FRET-Signals. In einer Arbeit von Hung werden verschiedene Kombinationen von Fluorophoren als Donor und Akzeptor untersucht (HUNG ET AL, 1998). Allerdings werden dort an ein einziges Oligonucleotid gekoppelte Fluorophore beschrieben und es werden im heutigen Standardsyntheseverfahren zum Teil nicht mehr übliche Linker zur Kopplung der Fluorophore an die Basen benutzt. Daher waren die Ergebnisse dieser Untersuchungen für die

hier bearbeitete Frage nur von geringer Hilfe. Eine Anforderung an das FRET System ist die, daß die Signale im sichtbaren Bereich detektierbar sein müssen, um bei der späteren Verwendung der optischen Kontrolle durch Fachpersonal zugänglich zu sein. Als Donor-Fluorophore empfehlen sich solche, die durch einen Argonlaser gut angeregt werden können. Argonlaser weisen derzeit das beste Preis / Leistungsverhältnis hinsichtlich der Höhe der Anregungsintensität auf. Außerdem erfolgt die Emission der meisten bei ~ 488 nm angeregten Fluorophore durch einen Stokes-Shift zwischen 13 – 30 nm im grünen Bereich des sichtbaren Spektrums. Dadurch sind dann die in Frage kommenden Akzeptor-Fluorophore schon in ihren wichtigsten Eigenschaften festgelegt. Sie müssen ein Anregungsspektrum haben, daß sich noch genügend mit dem Emissionsspektrum des Donors überlappt. Die Größe des Intergrals der Überlappung zwischen den beiden Spektren limitiert die maximal mögliche FRET-Effizienz. Dem gegenüber steht der Anspruch einer möglichst großen Separation der beiden Emissionsspektren. Der „Crosstalk“ genannte Effekt, daß bei Anregung des Donor-Fluorophors dessen Emission auch in das Emissionsspektrum des Akzeptors reicht, ist unerwünscht. Desgleichen gilt für die Anregbarkeit des Akzeptors bei dem Anregungsmaximum des Donors. Insbesondere die Rhodaminderivate zeigen im UV-Bereich auch eine gute Anregbarkeit, die zu einer Emission des Akzeptors durch direkte Anregung führen kann. Von diesen beiden Effekten ist hier der Crosstalk der signifikante und die direkte Anregung des Akzeptor-Fluorophors ist im Verhältnis zu dessen maximal erreichbarer Intensität vernachlässigbar. Die Anteile der FRET-Intensität am Gesamtsignal am Detektionspunkt läßt die Cyan-Farbstoffe am geeignetsten erscheinen. Dies verwundert allerdings nicht, denn die Separation zwischen deren Spektren und dem Spektrum des Fluoresceins ist so groß, daß ein nur extrem geringer Crosstalk zu erwarten war. Dazu kommt, daß die Cyan-Farbstoffe im langwelligen UV-Bereich keine starke Anregung aufweisen. Der Nachteil der Cyan-Farbstoffe gegenüber den Rhodaminderivaten ist ihre sehr geringe Intensität bei der Detektionswellenlänge. Dies resultiert aus dem nur noch sehr kleinen Integral der Überlappung des Donor-Emissions- mit dem Cyan-Anregungsspektrum. Dieses Integral ist bei den Rhodaminen deutlich größer und daher ist deren Gesamtintensität viel stärker. Dies kommt auch zum Ausdruck, wenn man das quantitative Verhältnis des FRET-Signals zur maximalen Intensität des Fluoresceins setzt. Dies ist für Texas-Red und Rhodamin-X um den Faktor 2,6 besser als bei den Cyanen. Da bei den späteren *in situ* Anwendungen auch noch viele Donor-Oligonucleotide ungebunden vorliegen werden, wird sich dieses Verhältnis sicher noch verschlechtern. Daher scheiden die Cyan-Farbstoffe trotz ihrer sehr guten Signal Separation als geeignete Akzeptoren für diese Anwendungen aus.

Beim Rhodamin-Red ist die spektrale Trennung der Donor- und Akzeptor-Signale wegen des geringsten Abstands der beiden Spektren am schlechtesten und es zeigt auch ein um $\sim 15\%$ schlechteres Verhältnis der maximalen Fluoreszenz-Intensität zum FRET-Signal. Da der Anteil des FRET-Signals an dem Gesamtsignal beim Detektionspunkt mit durchschnittlich nur 53% am schlechtesten von allen Akzeptor-Fluorophoren ist und dieses Verhältnis später auch den Schwellenwert mitbestimmt, den eine Auswertungs-Anlage berücksichtigen muß, wird auch das Rhodamin-Red als wenig geeignet angesehen. Die Auswirkung des Abstands zwischen den Fluorophoren auf die FRET-Effizienz wurde sehr deutlich bei den Messungen über die ersten 15 Basen Abstände beobachtet. Die Schwankungen bei den Abständen der Primer zwischen einer und bis zu vier Basen sind wahrscheinlich auf sterische Effekte zurückzuführen. Die Fluorophore sind in ihrer räumlichen Ausdehnung, mit den zur Kopplung benutzten Linkern, fast doppelt so lang ($\sim 6 \text{ \AA}$) wie ein Basenstapel ($\sim 3,4 \text{ \AA}$) hoch ist. Das führt sicherlich zu spontanen Zusammenstößen bei der Anlagerung. Zusammenstöße zwischen den hybridisierten Fluorophoren können ebenfalls zu Quenching-Effekten führen. Da die Abnahme der FRET-Effizienz, bei der Ausbildung einer Doppelhelix, ungefähr 10% , bei einer Distanzvergrößerung von 0 auf 9 ($\sim 30,6 \text{ \AA}$) bis 13 ($\sim 44,2 \text{ \AA}$), beträgt, wurden bei den Untersuchungen der verschiedenen Akzeptoren die Abstände von 5 - 10 Nucleotiden zwischen den Fluorophoren untersucht. Für das Texas-Red konnten auch erwartungsgemäß keine signifikanten Unterschiede bei der FRET-Effizienz zwischen den verschiedenen Abständen beobachtet werden. Beim Rhodamin-X scheint die Intensität schon ab dem 8 Basen Abstand deutlich dem Einfluß der Abstandsabhängigkeit zu unterliegen. Allerdings kann die überproportionale Abnahme zwischen dem 7 und 8 Basen Abstand auch durch geometrische Änderung der helicalen Struktur verursacht sein (MERGNY ET AL., 1994). Durch die jeweilige Orientierung der Fluorophore abhängig von den Linkern und der relativen Position in bezug auf die große und kleine Furche einer Helix kann es ebenfalls zu Abweichungen vom idealen Verlauf der Abstandskurve kommen (CLEGG ET AL., 1993). Als optimale Entfernung für diese beiden Akzeptor-Fluorophore wird der 5 Basen Abstand ausgewählt, als bester Kompromiß zwischen größtmöglicher Nähe und damit FRET-Effizienz und geringer sterischer Hinderung bei der Hybridisierung. Die weiteren Untersuchungen wurden mit Texas-Red als Akzeptor durchgeführt, da es sein Emissionsmaximum noch etwas weiter im langwelligen Rot-Bereich, bei ansonsten gleichen Qualitäten wie das Rhodamin-X hat und damit deutlich in den Bereich der geringen Absorption durch das Hämoglobin fällt.

4.1.5 Vergleich unterschiedlicher Donor-Fluorophore für den Akzeptor-Fluorophor Texas-Red

Die große Sensibilität des Fluoresceins auf hohe Intensität führt zu einem schnellen ausbleichen (*photo bleaching*). Bei bestimmten Anwendungen wird diese Eigenschaft benötigt, zum Beispiel bei sogenannten FRAP Experimenten (FRAP = *Fluorescence Recovery after Photo bleaching*). Bei der hier untersuchten Methode wird jedoch eine gute Photostabilität des Donors erwartet, damit das FRET-Signal nicht wegen des Ausbleichens des Donor-Fluorophors zu früh zusammenbricht. Daher wurden, nachdem ein geeigneter Akzeptor mit dem Texas-Red feststand, auch Versuche zur Optimierung auf Seiten des Donor-Fluorophors vorgenommen. Zur Auswahl stand eine Reihe von kommerziell erhältlichen Fluorophoren, die ihr Anregungsmaximum alle dicht bei 488 nm, einer der Laserkennlinie des Argonlasers haben, dies mußte die notwendige Voraussetzung sein. Oregon-Green, Rhodamin-Green und Alexa 488 wurden ausgewählt, weil ihre Photostabilität größer ist als die von Fluorescein (MOLECULAR PROBES, 2003). Bodipy 493 zeichnet sich neben seiner Photostabilität zusätzlich noch durch seine hohe pH-Unabhängigkeit aus. Es ändert somit seine spektroskopischen Eigenschaften in dem physiologischen Milieu, daß in Zellen lokalen Schwankungen unterliegt, nur gering. Die Ergebnisse aus diesen Untersuchungen sind unerwartet heterogen und am überraschendsten ist sicherlich die schlechte FRET-Effizienz der Kombination Rhodamin-Green mit Texas-Red. Das Überlappungsintegral zwischen diesen beiden Fluorophoren hat den größten Wert aller untersuchten Kombinationen, zu erkennen an dem am weitesten im langwelligen Bereich liegenden Emissionsmaximum bei 528 nm. Das sind durchschnittlich 10 nm mehr als bei den anderen vier Donor-Fluorophoren. Der Extinktionskoeffizient bewegt sich mit 75.000 ungefähr in der Mitte zwischen dem niedrigsten von Alexa 488 mit 71.000 und Bodipy 493 mit 79.000. Trotz dieser nicht ungewöhnlichen spektroskopischen Eigenschaften kommt fast kein FRET zustande, die FRET-Effizienz liegt unter 5% und auch der Anteil des FRET-Signals am Gesamtsignal ist mit 22 % sehr niedrig. Wiederholung der Messungen haben kein anderes Ergebnis geliefert. Das AE-Spektrum des reinen Donor-Oligonucleotids zeigte ebenfalls keine Auffälligkeiten hinsichtlich Anregungs- und Emissionsspektrum und der Intensität, die darauf hätten schließen lassen, daß die Kopplung wenig effizient oder das Fluorophor in anderer Weise beeinträchtigt gewesen wäre. Da es sich auch chemisch nicht sonderlich von den anderen unterscheidet, Rhodamin-Green ist das nicht-sulfonierte Analogon von Alexa 488, fällt eine Beurteilung dieses Ergebnisses schwer. Eine Möglichkeit

könnte sein, daß die Kopplung an den Linker die Bewegungsfreiheit in diesem besonderen Fall stark einschränkt und dadurch die Dipol-Dipol Wechselwirkung zwischen beiden Fluorophoren, aufgrund einer fast senkrechten Lage der Schwingungsebenen zueinander den Orientierungsfaktor k gegen Null gehen läßt. Das hätte den Effekt, daß kein FRET zustande kommt. Hierzu könnten sicherlich weitere Untersuchungen gemacht werden. Die gute FRET-Effizienz des Bodipy493 mit Texas-Red als Akzeptor-Fluorophor ist hingegen die positive Überraschung. Es wird eine FRET-Effizienz von 93 % erzielt und der Anteil des FRET-Signals am Gesamtsignal beim Detektionspunkt ist mit 88 % ebenfalls der höchste aller gemessenen Werte. Bodipy493 weicht in seiner chemischen Struktur am deutlichsten von den anderen vier Fluorophoren ab. Das zentrale Sauerstoffatom des Xanthen ist nicht nur durch das Halbmetall Bor ersetzt und die flankierenden Kohlenstoffatome durch Stickstoff substituiert worden, es ist außerdem durch 6 Fluoratome extrem stark halogeniert. Die Kopplung des modifizierten Benzolrings erfolgt nicht wie bei den anderen Fluorophoren gegenüber dem zentralen Sauerstoffatom, hier Bor-Atom, sondern an einem Außenring des Moleküls. Auffallend am Anregungsspektrum des Bodipy493 sind die im Vergleich zu den anderen Fluorophoren sehr steilen Flanken. Eine Möglichkeit warum die FRET-Effizienz dieses FRET-Paares so hoch ist, könnte in der größeren Rotationsfreiheit des Moleküls durch die andere Bindung des liegen. Außerdem ist es wesentlich unpolarer als die anderen 4 Fluorophore, dies könnte ebenfalls vorteilhaft sein, weil damit weniger Wechselwirkung mit den angrenzenden Ladungen der Oligonucleotide auftreten. Das Oregon-Green und das Alexa 488 sind um den Faktor $\sim 2,0$ und $\sim 1,6$ schlechter in der Intensität des FRET-Signals. Der Vorteil höherer Photostabilität würde also durch einen signifikant schlechteren FRET und ein deutlich schlechteres Signal/Rauschverhältnis wahrscheinlich wieder zunichte gemacht. Die Photostabilität des Bodipy493 ist ebenfalls höher als die von Fluorescein und damit stellt dieses Fluorophor eine sehr gute Alternative zum Fluorescein darstellen. Unglücklicherweise ist dieses Ergebnis erst durch Untersuchungen am Ende des Zeitraumes dieser Arbeit herausgekommen.

4.1.6 Betrachtung doppelt Fluorescein markierter Donor-Oligonucleotide

Da die Optimierung des FRET-Signals einen großen Raum dieser Arbeit einnimmt, wurde versucht auch verschiedene Optimierungsmöglichkeiten, die jenseits der hier schon besprochen liegen auszuprobieren. Eine interessante Alternative wird durch die Arbeit von Okamura aufgezeigt (OKAMURA ET AL, 2000). Dort sind zwei Fluorescein-Fluorophore an

benachbarten Basen endständig an das Donor-Oligonucleotid gekoppelt worden. Diese doppelte Markierung soll einerseits zu einer Erhöhung der FRET-Effizienz führen und gleichzeitig die Intensität des Donor-Signals bei ungebundenen Oligonucleotiden verringern. Die Verringerung der Donor-Fluoreszenz in Abwesenheit eines Akzeptor ist für das Fluorescein auf seine Eigenschaften als Quencher für sich selbst zurückzuführen. Fluorescein hat als Donor-Akzeptor Paar einen Förster Radius von $R_0 = 44 \text{ \AA}$. Warum die doppelte Markierung zu einer Erhöhung des FRET-Signals führt ist noch nicht hinreichend geklärt. Die Untersuchungen mit den doppelt Fluorescein markierten Donor-Oligonucleotiden wurden für alle fünf vorhandenen Akzeptor-Fluorophore durchgeführt. Die Verschiebung des Anregungsspektrums des doppelt markierten Donor-Oligonucleotids und die Abnahme der reinen Donor-Fluoreszenz dieses Primers konnten bestätigt werden. Leider ist es nicht gelungen den erwarteten Anstieg der FRET-Effizienz nachzuvollziehen. Bis auf das FRET-Paar Fluorescein/Rhodamin-X konnte keine signifikante Erhöhung der FRET-Effizienz oder des Anteils des FRET-Signals an der Gesamtintensität am Detektionspunkt festgestellt werden. Für die beiden Cyan-Fluorophore zeigte sich überhaupt kein Unterschied zwischen doppelt und einfach markiertem Donor, was sicherlich auf die große spektrale Distanz und das ohnehin nur schwache FRET-Signal zurückzuführen ist. Mit Texas-Red und Rhodamin-Red als Akzeptor-Fluorophor sank die Effizienz sogar signifikant. Dies läßt sich vielleicht dadurch erklären, daß der Abstand zwischen den beiden Fluorescein-Fluorophoren geringer war, als der zwischen diesen beiden und dem jeweiligen Akzeptor-Fluorophor. Das bedeutet, daß ein Teil der Energie aufgrund der geringeren Distanz den schnelleren Weg zum zweiten Donor-Fluorescein nimmt und damit für den Transfer auf den Akzeptor nicht mehr zur Verfügung steht (TYAGI ET AL., 2000). Für das Fluorescein/Rhodamin-X Paar konnte zumindest eine deutliche Zunahme des FRET-Anteils am Gesamtsignal beim Detektionspunkt festgestellt werden, obwohl die Intensität sich auch nicht signifikant gegenüber dem einfach markierten Donor geändert hat. Obwohl auch diese Versuche wiederholt durchgeführt wurden änderten die Ergebnisse sich nicht. Die fluoreszenzmarkierten Oligonucleotide scheiden als Fehlerquelle aus, da sie ansonsten hinsichtlich ihrer Fluoreszenz und ihrer FRET-Effizienz mit dem Standard Donor-Oligonucleotid normale, erwartungsgemäße Ergebnisse zeigten.

4.1.7 Wellenlängen Verschiebung nach Fluoreszenzlöschung durch Dabcyl

Bei den sogenannten Molecular Beacons die unter anderem für Real Time PCR eingesetzt werden, aber auch zur Detektion frei in Lösung befindlicher komplementärer Sequenzen

(TYAGI ET AL, 1996), macht man sich den Effekt des „Wavelength shifting“ schon länger zu nutze. Ein Beacon ist sowohl mit zwei verschiedenen Fluorophoren, von denen der eine als Donor und der andere als Akzeptor fungieren kann, markiert, als auch mit einem nicht fluoreszierenden Quencher (Schwarzquencher), wie zum Beispiel Dabcyl. Solange das Molecular Beacon geschlossen ist, wird die Emission des Donors von dem Dabcyl gequencht und in langwellige Wärmestrahlung umgewandelt. Erst wenn sich das Beacon öffnet, findet der Energietransfer vom Donor zum fluoreszierenden Quencher statt. Die Erklärung hierfür ist das die Energie die vom Donor nach Anregung übertragen werden kann, auf den jeweils am nächsten stehenden Quencher übergeht. Dabei ist die Distanz das entscheidende Kriterium. In dieser Arbeit wurde versucht diesen Effekt dafür auszunutzen, um das Signal/Rauschverhältnis zu verbessern. Jedoch nicht indem ein Molecular Beacon eingesetzt wird, dessen Synthese aufgrund der zu entrichtenden Lizenzgebühren unverhältnismäßig teuer ist, sondern durch den Einsatz zweier markierter Oligonucleotide. Das Donor-Oligonucleotid ist hierbei sehr kurz, 6 und 7 Oligonucleotide lang, und jeweils endständig mit Fluorescein und Dabcyl als Schwarzquencher markiert. Die Untersuchung dieser Oligonucleotide bestätigte die Erwartung betreffend der Abnahme der Fluoreszenz des Donors. In Abhängigkeit von der Distanz wird die Intensität des Fluoresceins bei Anregung sehr stark reduziert. Nach Zugabe des Matrizenstrangs und des Akzeptors steigt die Donor-Fluoreszenz und es ist eine Zunahme der Emission bei der Detektionswellenlänge zu beobachten. Die Zunahme resultiert jedoch nicht aus der Übertragung der Anregungsenergie auf den Akzeptor sondern besteht ausschließlich aus der Emission des direkt angeregten Texas-Red Fluorophors, wie nach Abzug der Spektren deutlich wird. Ganz offensichtlich ist der Unterschied des Abstandes von Donor zu Dabcyl und Donor zu Texas-Red nicht groß genug, um die Übertragung der Anregungsenergie auf das Texas-Red umzulenken. Ein weiterer Aspekt ist, daß der Energieübertrag innerhalb von kurzen Oligonucleotiden auch über die π -Orbitale der Kohlenstoff-Bindungen stattfinden kann. Eine Verlängerung des Abstandes zwischen Fluorescein und Dabcyl durch einfügen weiterer Oligonucleotide führt schnell zu einem Anstieg der Fluorescein Fluoreszenz führt. Trotzdem sollten entsprechend modellierte Primer noch untersucht werden.

4.1.8 Überlegung zur Umgehung des stöchiometrischen Problems

Die früher schon erwähnte Notwendigkeit äquimolarer Stoffmengen zur Beurteilung der Ergebnisse ist bei den *in vitro* Untersuchungen mit wenig Aufwand sicher zu stellen.

Sorgfältige Äquilibrierung der Primer und ein sorgfältiges Arbeiten reichen dazu aus. Anders stellt sich dieses Problem bei der Transfektion von Zellen in Kultur und bei der Untersuchung von aus Zellen extrahierter RNA dar. Zwar ist die Zellzahl der zu transfizierenden Zellen noch relativ genau zu bestimmen und die Oligonucleotide können in definierten Mengen zugegeben werden, aber wieviel von welchem der beiden Oligonucleotiden letztlich in einer Zelle vorhanden ist unterliegt einer zufälligen Verteilung. Daher wurde auch untersucht, ob dieses stöchiometrische Problem gelöst werden kann, indem beide Fluorophore an denselben Oligonucleotidstrang gekoppelt werden. Durch Hybridisierung an eine komplementäre Sequenz würde sich ein Loop zwischen den Fluorophoren bilden und diese dadurch in räumliche Nähe gerückt und ein FRET wäre möglich. Das die FRET-Effizienz mit steigender Entfernung zwischen den beiden Fluorophoren abnimmt bestätigt die theoretische Vorhersage. Das die Abnahme der FRET-Effizienz bei Erhöhung der Distanz zwischen den Fluorophoren von 10 auf 20 Oligonucleotide nicht um ~ 85 % , sondern nur bei ~ 76 % liegt möglicherweise an dem beschriebenen Effekt der Energieübertragung über die Pi-Bindungen. Die andere Möglichkeit besteht darin, daß der DNA-Strang in Lösung natürlich sein Konformation ständig ändert und es zu zufälligen Annäherungen der beiden Fluorophore kommt. Die Bewegungsfreiheit in Lösung ist durch die Kopplung an denselben Strang geringer als wenn es sich um zwei Stränge handeln würde und damit steigt die Wahrscheinlichkeit zufälliger Annäherung stärker an, als es bei gleicher Konzentration von zwei Oligonucleotiden der Fall wäre (GOHLKE ET AL., 1994). Eine Selbstfaltung ist unwahrscheinlich, da die Sequenz zwischen den Fluorophoren ausschließlich aus Thymin Basen besteht und die äußeren Sequenzen keine komplementären Abfolgen besitzen, die länger als 3 Basen sind. Die Ergebnisse mit zugegebener komplementärer Matrize sind nicht ganz eindeutig, zeigen aber einen Trend. Für die fünfer und zehner Distanz ist nur eine sehr geringe Zunahme des FRET-Signals zu erkennen. Erst mit einer Distanz von 15 Nucleotiden steigt die Intensität des FRET-Signals deutlich an und ist circa um den Faktor 1,5 größer als der Einzelstrang und steigt bei dem Abstand von 20 Nucleotiden schon auf den Faktor 2,3 an. Eine weitere Verlängerung der Distanz zwischen den beiden Fluorophoren könnte das Signalverhältnis von ungebundenem zu gebundenem Strang wahrscheinlich noch weiter verbessern. Dies würde allerdings die Synthesekosten weiter steigen lassen, weil die Ausbeute bei so großen fluoreszenzmarkierten Oligonucleotiden deutlich schlechter wird und die Länge des Oligonucleotids würde so groß (~ 100 Nucleotide), daß die Transfektionseffizienz wahrscheinlich auch sinkt.

4.1.9 Hybridisierung fluoreszenzmarkierter DNA-Oligonucleotide an native mRNA

Zur Überprüfung sind Untersuchungen zum Nachweis der Tauglichkeit der FRET-Sonden durch Hybridisierung an aus Zellen extrahierter mRNA erfolgreich durchgeführt worden. Die Effizienzen der getesteten fluoreszenzmarkierten Oligonucleotide, nach Hybridisierung an die mRNA, sind geringer als bei den entsprechenden *in vitro* Messungen. Dies liegt zum einen daran, daß die Stoffmenge von mRNA zu den FRET-Sonden nicht äquimolar ist. Die Verdünnungsreihen, die von der jeweils extrahierten Gesamt-RNA aus den Zellen gemacht wurden, sollten dieses Problem abschwächen. Da die Größenordnung durch Bestimmung der Gesamtkonzentration eingegrenzt war, kam es in einer der Verdünnungsstufen dann zu deutlichem FRET und damit dem Nachweis, daß die gesuchte γ -Globin RNA tatsächlich in der Lösung vorhanden war. Aufgrund der eingesetzten Mengen muß man aber davon ausgehen, daß schon relativ geringe Abweichung von der Äquimolarität zu deutlichen Einbußen bei der FRET-Effizienzen führen. Wenn zuwenig mRNA vorhanden ist, ist das Signal/Rauschverhältnis aufgrund vieler ungebundener Primer schlecht. Wenn die mRNA im Überschuß vorhanden ist, kommt es zu nur von einem Primer besetzten mRNA Zielsträngen und damit auch zu einer geringen FRET-Intensität. Außerdem bildet RNA viel stärker sekundäre und tertiäre Strukturen aus als DNA und diese Strukturen behindern die Hybridisierung der Primer ebenfalls, obwohl die zu untersuchenden Lösungen zur Auflösung dieser Konformationen vorher 10 Minuten auf 90°C erhitzt wurden. Diese Untersuchung zeigt, daß es möglich ist die Ergebnisse aus den DNA – DNA Hybridisierungen grundsätzlich auf die DNA – RNA Hybridisierung zu übertragen und einen FRET mit diesen Primern auch in den Zielzellen zu erzeugen und detektieren.

4.2 Diskussion der *in situ* Untersuchungen

4.2.1 Zellkultur Untersuchungen

Bei der Bearbeitung der Ziele dieser Untersuchung mußten auch diverse Aspekte abgeklärt werden, die genereller Natur waren. Die Ergebnisse von zwei dieser Untersuchungen sind von allgemeinerem Interesse als der Rahmen dieser Arbeit und sollen daher mit vorgestellt und besprochen werden. Obwohl bekannt ist, daß bei der Elektroporation von Zellen der Verlust

von 50 % der ursprünglich eingesetzten Zellen als Standard anzusehen ist (BAUM ET AL, 1994), wurden Versuche unternommen, die fluoreszenzmarkierten Oligonucleotide mittels der Elektroporation in die Zellen zu bringen. Hintergrund dieser Bestrebung war der Gedanke, daß die Elektroporation leicht automatisiert innerhalb geschlossener System durchgeführt werden kann. Der andere Grund ist ihre konkurrenzlos günstige Anwendung im Vergleich zu jeder Liposomen basierten Transfektion und das einfache Prozedere, da keine besonderen Transfektionslösungen vorgehalten werden müssen. Allerdings muß für jeden Zelltyp die optimale Einstellung der elektrischen Parameter ermittelt werden. Da die als Modellsystem gewählte K-562 Zelllinie morphologisch und physiologisch den möglichen späteren Zielzellen, den humanen Erythroblasten, sehr ähnlich ist und je nach Differenzierung auch in diesen Kulturen Erythroblasten auftreten, wurde die sinnvolle Übertragbarkeit der Ergebnisse auf das spätere Ziel als sehr wahrscheinlich angesehen. Nach Elektroporation einer definierten Zellzahl ohne Primer wurden die Zellen wieder in Kultur genommen und über mehrer Tage der Zelltiter der Lösung ausgezählt. So sollte nicht nur eine Abschätzung hinsichtlich der Überlebensrate nach der Elektroporation gewonnen werden, sondern auch eine tendenzielle Aussage darüber getroffen werden können, in welchem Zustand die überlebenden Zellen sich befinden. Die Ergebnisse sind eindeutig gewesen. Die morphologisch dem Erythroblasten - Typ zuzurechnenden Zellen bevorzugten eine möglichst niedrige Spannung (0,2 kV) und eine mittlere bis hohe Kapazität (500 oder 900 μ FD). Es wird angenommen, daß abhängig von der Größe der Zelle und Dicke der Zellmembran der auftretende Strom nur bei bestimmten Spannungen eine Resonanz erzeugt und die Zellen dann die größte Überlebens- und Transfektionsrate aufweisen. Außerdem beeinflußt das Anlegen der Spannung und die Größe der Kapazität die Zellen durch die auftretende Hitzeentwicklung der Lösung und hier reagieren Zellen ebenfalls sehr unterschiedlich. Manche Zelltypen vertragen kurze Impulse mit hoher Kapazität, die zu einem starken, aber kurzzeitigen Anstieg der Temperatur führen besser. Andere Zellen reagieren auf einen langen schwachen Impuls mit entsprechend verlängerter schwacher Wärme toleranter. Die Effizienz der Permeabilisierung ist hingegen eine Korrelation von Membrandicke zu angelegter Spannung. Bei den in Frage kommenden Ergebnissen haben die Zellkulturen nach einem Tag wieder die Ausgangsmenge an Zellen vor der Elektroporation von 2×10^5 Zellen/ml erreicht. Diese Kulturen zeigten auch weiterhin ein normales Wachstum und daraus kann geschlossen werden, daß die verbliebenen Zellen keine Defekte aufweisen. Bei einigen Versuchseinstellungen fiel auf, daß die Kulturen zwar scheinbar vitale Zellen enthielten, aber es kaum eine Zunahme der Zellzahl im

Versuchszeitraum gab. Diese Zellen müssen in irgendeiner Weise, die mikroskopisch nicht sichtbar war beeinträchtigt gewesen sein.

Ein anderer Punkt der untersucht wurde, war der Vergleich zwischen dem Standardwachstumsmedium RPMI-1640 und zugesetztem fötalen Kälberserum (FCS) für humane Blutzelllinien gegen zwei, im Untersuchungszeitraum neu auf den Markt gekommene, serumfreie Medien, die ebenfalls für humane Blutzellkulturen geeignet sein sollten. Der Vergleich hinsichtlich der Kosten für das Standardmedium plus FCS gegen die beiden neuen Medien fiel zugunsten der neuen Medien aus, so daß entschieden wurde diese mit dem Standardmedium zu vergleichen. Die Ergebnisse sprachen auch nach der Untersuchung für die neuen Kulturmedien. Die Zellkulturen erreichten die Plateauphase nicht nur schneller, sondern die Zelldichte war auch fast doppelt so groß. Allerdings verhielten sich die Zellen in den beiden neuen Medien gegenüber dem Mediumwechsel wesentlich intoleranter. Es kann nur spekuliert werden, ob das an dem Verbrauch des zugesetzten Puffers liegt und dann die Stoffwechselprodukte das Milieu so verändern, daß die Zellen absterben oder ob es andere Gründe gibt. Interessant ist sicher auch die Frage, was das Wachstum der Zellen nicht nur so stark gegenüber dem herkömmlichen Wachstumsmedium, sondern generell bewirkt. Denn die Wachstumshormone befinden sich normalerweise in dem zugesetzten FCS. Aus patentrechtlichen Gründen, gibt PAA nicht die vollständige Zusammensetzung der Medien an. Trotz dieser ungeklärten Fragen wurde die Zellkultur aufgrund der besseren Ökonomie und der größeren Ausbeute auf das Medium Q-007 umgestellt.

Für den erfolgreichen Nachweis eines FRET müssen in die Zielzellen nicht nur die fluoreszenzmarkierten Oligonucleotide eingebracht werden, sondern es muß auch die Ziel mRNA vorhanden sein. Die K-562 Zellen können spontan und uninduziert differenzieren und die fötalen Untereinheiten des Beta-Globin Gen-Clusters das γ -Globin und ϵ -Globin, nicht aber das adulte β -Globin, exprimieren. Um jedoch sicher zu sein, daß zu jedem Zeitpunkt in den Zellen das gesuchte Transkriptionsprodukt, nämlich die γ -Globin mRNA, vorliegt kann man die Zellen stimulieren. Es sind verschiedene Induktoren bekannt. Natrium-Butyrat läßt K-562 Zellen in die Spätform der Erythroblasten differenzieren und diese haben die Fähigkeit die fötalen Globine des Beta-Globin Gen-Clusters zu exprimieren und Hämoglobin zu synthetisieren (DAVIS ET AL., 2000). Hemin ist ebenfalls als Induktor bekannt. Seine Wirkung ist jedoch weniger spezifisch im Hinblick auf die Differenzierung der Zellen als viel mehr auf den Start der Transkription der fötalen Globin-Gene. Es steigert offenbar gezielt die unter transkriptionaler Kontrolle stehende Produktion der fötalen Globine des Beta-Globin Gen-Clusters (WADA ET AL., 1988). Da die Transkription der, zur funktionsfähigen

Zusammensetzung benötigten Untereinheiten des Alpha-Globin Gen-Clusters jedoch nicht aktiviert werden, gibt es kein funktionales Proteinendprodukt. Die Ergebnisse der induzierten Zellen auf den Nachweis des fötalen γ - und ε -Globins bestätigen die Erwartungen. Die Induktion mit Hemin stellt sicher, daß die chronisch myelogenen Leukämiezellen der Kultur die gewünschte mRNA produzieren. Im Laufe der Arbeit wurde auch festgestellt, daß die Zellen fast immer auch in uninduzierten Kulturen die fötalen Globin-Gene exprimieren, allerdings ist die Expression in der Regel schwächer.

4.2.2 Untersuchung von maternalen und fötalen Blutproben

Bevor die Untersuchungen von Blutproben durchgeführt wurden, ist das Absorptionsverhalten von Serum und Blutzellen einer genaueren Betrachtung unterzogen worden. Die Untersuchung von Blutserum, daß nach abzentrifugieren der zellulären Bestandteile des Blutes erhalten wurde, war erst nach dessen Verdünnung möglich. Naturgemäß ist der Überstand nach Zentrifugation nicht klar, sondern eine hellgelbe, leicht trübe Flüssigkeit. Diese enthält beim gesunden Menschen ungefähr 44 g/Liter an gelösten Stoffen, von denen vor allem die folgenden für die Trübung verantwortlich sind, Gerinnungsproteine, Immunglobuline, Albumine, und Fette. Die rötliche Farbe wird durch gelöstes Hämoglobin hervorgerufen. Das Absorptionsspektrum der Blutzellen enthaltenden Probe scheint eine starke Untergrundabsorption aufzuweisen. Die gleichen Absorptionsbanden wie im Serum sind aber auch hier zu erkennen. Es handelt sich jedoch nicht um Absorption, sondern um eine wellenlängenabhängige direkte Streustrahlung verursacht durch die Blutzellen, die das Spektrum überlagert. Die im UV-Bereich sichtbare Extinktion im Serum stammt bei 280 nm von den aromatischen Aminosäuren der Proteine und die Extinktion bei 340 nm rührt von vom reduzierten NAD(P)H her. Die im Bereich der sichtbaren Wellenlängen stark absorbierende Häm-Gruppe fluoresziert selbst aber nicht, so daß in dem zu untersuchenden Detektionsbereich keine Eigenfluoreszenz zu erwarten ist. Die Addierung der Absorption und der Streustrahlung bei hohen Konzentrationen führt jedoch dazu, daß die Blutproben dann im gesamten Wellenlängenbereich optisch dicht sind. Dies wurde auch bei Versuchen mit der AE-Spektroskopie beobachtet. Das Anregungslicht wird beim Eintritt in die Probe stark abgeschwächt, was zu weniger Emission führt und das Emissionslicht wird beim Austritt nochmals weiter abgeschwächt. Diese Einflüsse der Absorption führen dann sogar dazu, daß bei hohen Konzentrationen nicht einmal mehr Streulicht detektiert werden kann. Dies macht eine Messung von Blutproben mit der AE-Spektroskopie unmöglich, da dort die Zellen nicht

einzelnen, sondern nur in einem ausgedehnten Volumen in den Anregungsstrahl gebracht werden können. Da eine Eigenfluoreszenz des Blutes im Detektionsbereich nicht zu erwarten ist, muß diese beim Signal/Rauschverhältnis auch nicht berücksichtigt werden. Der Abfall der Absorption der Häm-Gruppe bei 595 nm auf einen OD-Wert unter 0,2 läßt als Akzeptor-Fluorophore alle mit einem Emissionsmaximum jenseits von 600 nm geeignet erscheinen. Wichtig für die Anregung des Donor-Fluorophors ist auch, daß die Absorption zwischen dem ersten und zweiten Maximum, sowohl des oxygenierten und desoxygenierten Hämoglobins eine Lücke zwischen ~ 480 und 500 nm aufweist, so daß eine effiziente Anregung mit 488 nm möglich ist.

Die Transfektion von Blut einer schwangeren Frau in der 13. Woche der Gestation und damit am Übergang vom ersten in das zweite Trimenon zeigt ein unauffälliges Bild hinsichtlich des Verhältnisses von nucleierten Blutzellen verschiedener Typen, wie eosino-, baso- und neutrophiler Granulozyten und Lymphozyten sowie Monozyten, die als Gruppe auch als Leukozyten zusammengefaßt werden, gegenüber den nicht nucleierten Erythrozyten. Das die Erythrozyten keine Signale durch aufgenommene Fluoreszenz-Oligonucleotide zeigen ist nicht verwunderlich. Es ist bekannt, daß die physiologische Aktivität sich weitestgehend auf die Aufnahme und Abgabe von Sauerstoff beschränkt und die Zellen nur noch sehr wenig strukturiert sind, weil die meisten Zellorganellen degeneriert sind, da die Erythrozyten während ihrer 90 – 120 Tage dauernden Lebenszeit im Serum fast ausschließlich mit Hämoglobin beladen sind (STRYER, 1988). Der hohe Turgor der Zellen beeinflußt einen passiven Eintritt von größeren Molekülen durch die Zellmembran ebenfalls ungünstig. Es konnte aber an den nucleierten Zellen, die Fluoreszenzsignale emittierten, gezeigt werden, daß auch eine prinzipielle Transfektion, mit Liposomen als Carrier für die DNA-Oligonucleotide, möglich ist. Die Signale die, mit Hilfe der Confokal Mikroskopie, eindeutig dem Cytoplasma der transfizierten Zellen zugeordnet werden können, sind aber in ihrer Ausdehnung so groß, daß von einer dispersen Verteilung, wie sie für eine gezielte Hybridisierung an mRNA nötig wäre, nicht gesprochen werden kann. Die Transfektion von Nabelschnurblut zeigt in der mikroskopischen Betrachtung ein verschobenes Verhältnis von nicht nucleierten zu nucleierten Zellen. Das ist jedoch normal, da der Anteil an Leukozyten bei neonatem Blut durchschnittlich doppelt so hoch ist und sich erst nach circa sechs Wochen auf den Pegel von kindlichen und adulten Blut absenkt (THEML, 1998). Der gewichtige Unterschied nach der Transfektion des Nabelschnurblutes war jedoch der Befund, daß augenscheinlich auch Erythrozyten transfiziert wurden. Dies konnte nicht an der Physiologie der neonaten Erythrozyten liegen, die sich nicht von der adulter Erythrozyten unterscheidet,

sondern ist wohl darauf zurückzuführen, daß das Nabelschnurblut durchschnittlich 12 - 16 Stunden alt war und die Erythrozyten sich teilweise schon im Stadium der Auflösung befanden. Diese Annahme wurde, nach abzentrifugieren der Zellbestandteile, auch durch das deutlich stärker rot gefärbte Serum untermauert.

4.2.3 Beurteilung von Molecular Beacons als Hybridisierungs sonden

Molecular Beacons haben sich als nützliche FRET-Sonden in PCR Anwendungen etabliert. Zum Beispiel bei Real-time oder Multicolor PCR (DIDENKO, 2001). Mit Molecular Beacons ist die *in situ* Hybridisierung von RNA auch schon gelungen (SOKOL ET AL, 1998). Die Molecular Beacons sind dort allerdings über Microinjektion in die Zellen eingebracht worden. In dieser Arbeit ist versucht worden die Molecular Beacons durch Liposomen Transfektion in die Zellen einzuschleusen. Um eine interne Kontrolle zu haben handelte es sich um ein Fluorescein/Dabcyl markiertes Beacon. In geschlossenem Zustand emittiert es also bei Anregung des Fluoresceins kein Signal, weil das FRET-Signal in langwellige Wärmestrahlung umgewandelt wird. Die Untersuchungen zeigen keine Fluoreszenzsignale aus den Zellen, aber Signale die an der Zellmembran assoziiert sind. Es kann also nicht beurteilt werden, ob es gelungen ist, Molecular Beacons in die Zellen zu schleusen. Die Fluoreszenzsignale von und aus den Zellmembranen können nur von unspezifischer Öffnung, dem sogenannten *breathing*, stammen. Wenn sich die Molecular Beacons schon dort geöffnet haben, dann unterstützt dies die Ansicht, daß keine Beacons bis in das Cytoplasma vorgedrungen sind, weil es wahrscheinlich wäre, daß diese sich auch dort unspezifisch öffnen können. Warum die Molecular Beacons nicht in die Zelle gelangt sind ist nicht ersichtlich. Die Größe dieser Beacons unterscheidet sich nicht signifikant von der Größe der fluoreszenzmarkierten Oligonucleotide, dies kann also nicht dafür verantwortlich sein.

4.2.4 Elektroporation von K-562 Zellen mit und ohne Liposomen

Unterstützung

Der Versuch die fluoreszenzmarkierten Oligonucleotide nicht nur durch gewöhnliche Elektroporation in die K-562 Zellen, sondern auch mit gleichzeitigem Einschluß der Primer in liposomale Vesikel, einzubringen, zeigte sehr schlechte Transfektionseffizienzen für beide Methoden. Die Verteilung der Primer in den transfizierten Zellen des nur elektroporierten Ansatzes ist sehr homogen, aber die Gesamtintensität ist gering. Dies wird auch durch das

starke Hintergrundrauschen der Aufnahme deutlich. Wenn man die Verlustrate von 50 % mit einbezieht, erreicht man offensichtlich nur 2,5 % aller Zellen des Ansatzes und das ist indiskutabel. Interessanter ist das Bild bei dem Versuch liposomal verpackte Oligonucleotide durch die Elektroporation in die Zellen einzubringen. Hinsichtlich der Transfektionseffizienz, in bezug auf die erreichten Zellen, ist das Ergebnis genauso schlecht, aber die Verteilung der Primer in den transfizierten Zellen sieht ganz anders aus. Es kommt zu lokalen Anhäufungen im Cytoplasma, die von der Feinverteilung her ähnlich der einer rein liposomal vermittelten Transfektion aussieht. Wenn also die Ausbeute an transfizierten Zellen unkritisch ist, würde diese Kopplung von Elektroporation und Transfektion die Inkubationsdauer gegenüber einer rein chemischen Transfektion drastisch senken können.

4.2.5 Vergleich von PTA modifizierten und unmodifizierten fluoreszenzmarkierten Oligonucleotiden bei Tween Transfektion

Anstelle von Strom zur Permeabilisierung der Zellmembran kann man auch chemische Reagenzien benutzen. Zwei dieser Reagenzien sind Triton X-100 und Tween 20, die beide zur Gruppe der nicht-ionischen Detergenzien gehören. Der Vergleich beider Stoffe bei kontrollierter Permeabilisierung der Zellmembran, damit die Oligonucleotide in das Zellinnere diffundieren können, zeigte bessere Ergebnisse für das Tween 20 gegenüber dem Triton X-100. Bei der Untersuchung ob es sich auf die Transfektionseffizienz bei Permeabilisierung mit Tween 20 auswirkt, ob die Oligonucleotide PTA (Phosphothioat) modifiziert sind oder nicht, war kein Unterschied zu erkennen. Offensichtlich sind die entstandenen Löcher in der Zellmembran so groß, daß die Unpolarität oder Polarität der Oligonucleotide keinen Einfluß mehr auf die Passierfähigkeit ausübt. Unerfreulicherweise führt diese Art der Permeabilisierung der Zellen jedoch auch dazu, daß die Zellen welche Primer aufnehmen, davon gewissermaßen überschwemmt werden und nur noch als einheitlich leuchtende Masse zu sehen sind. Hierbei ist es auch egal gewesen, ob man vorher oder bei der Transfektion fixiert hat oder nicht. Es wurde darum genauer untersucht, ob es Sinn macht die Zellen, welche einer chemischen Permeabilisierung unterworfen werden sollten, vorher zu fixieren. Außerdem wurde als Test überprüft, ob eine Unterstützung durch liposomal verpackte Oligonucleotide bessere Ergebnisse bringt. Da die präfixierten Zellen die nur mit Oligonucleotiden transfiziert wurden gar keine Signale zeigen ist zu erwarten gewesen. Die Zellen sind durch die Fixierung so vernetzt, daß die Oligonucleotide nicht eindringen können. Bei den nichtfixierten Zellen mit Tween 20 und Primern sind alle Oligonucleotide wohl durch

den Waschschrift wieder aus dem Cytoplasma entfernt worden. Das aus den Zellkernen eine schwache Fluoreszenz dringt, dürfte an einer Behinderung des Auswaschens der Oligonucleotide durch die Kernmembran liegen. Die Akkumulation von Primern im Zellkern konnte dann auch im Confokalen Mikroskop deutlich belegt werden. Mit längerem Waschen würden sicher auch diese Signale verschwinden. Die beiden präfixierten und nur mit Tween20 oder mit Tween20 und Oligofectamine transfizierten Proben zeigen extrem stark leuchtende Zellen, der Begriff Scheinwerfer beschreibt am deutlichsten den Eindruck. In solchen Zellen wurde nie ein distinktes Signal entdeckt. Warum die präfixierten Zellen so derartig stark fluoreszieren ist nicht klar. Die Kontrolle leuchtete schließlich überhaupt nicht. Da die nicht präfixierten Zellen dieses Leuchten nicht zeigen, scheint es zu einer Reaktion zwischen den beteiligten Reagenzien und dem Formaldehyd zu kommen, die diese starke Fluoreszenz erzeugt. Die nur mit Oligofectamine transfizierten und nicht präfixierten Zellen zeigen das typische Bild einer solchen Transfektion. Die Primer sind in das Cytoplasma eingedrungen, aber nicht in den Zellkern, weil die Transfektionsdauer dafür zu kurz war. Das Protokoll für die Oligofectamine Transfektion war zu diesem Zeitpunkt noch nicht optimiert, daher ist die Konzentration der eingesetzten Primer viel zu hoch gewesen und viele Zellen leuchten sehr stark. Die Probe der nicht fixierten und mit Tween20 und Oligofectamine transfizierten Zellen zeigte eine Mischung aus Zellen des Typs der reinen Oligofectamine Transfektion und des Typs der bei der reinen Tween20 Transfektion zu sehen war. Es kommt hier offensichtlich nicht zu einem synergetischen Effekt, sondern nur zu einer entweder oder Transfektion pro Zelle. Das Fazit ist, daß auch die Methode der chemischen Permeabilisierung, egal ob mit oder ohne Präfixierung oder mit Oligofectamine, schlechtere Ergebnisse zeigt als eine rein liposomale Transfektion. Die in diesem Kapitel diskutierten Untersuchungen wurden gemeinsam mit Dr. Uwe Schlomann durchgeführt.

4.2.6 Vergleich der Transfektionseffizienz von K-562 Zellen durch verschiedene Liposomenformulierungen

Bei dem Vergleich von sechs verschiedenen kommerziell erhältlichen Liposomenformulierungen, zeigten nur Rotifect und Oligofectamine gute Ergebnisse hinsichtlich der Transfektionseffizienz und der Art der Verteilung der Oligonucleotide, nach Aufnahme durch die Zellen, im Cytoplasma. Dies waren die beiden Kriterien auf die optimiert werden mußte. Die Unterschiede zwischen beiden Transfektionsmitteln sind nur in der Verteilung der Oligonucleotide festzumachen. Die ist bei der Transfektion mit

Oligofectamine sehr gleichmäßig im ganzen Cytoplasma und es kommt auch zum Durchtritt durch die Kernporen in den Zellkern. Die Verteilung bei der Rotifect Transfektion ist nicht ganz so homogen wie beim Oligofectamine und die etwas größeren Signale lassen darauf schließen, daß die Freisetzung aus den liposomalen Vesikeln mehr Zeit in Anspruch nimmt. Dafür spricht auch, daß überhaupt keine Fluoreszenzsignale aus dem Zellkern zu detektieren sind. Für den routinemäßigen Gebrauch im Laboralltag, bei dem es nicht auf eine perfekte Optimierung ankommt, scheint aber das Rotifect angezeigt zu sein, da sein Preis pro Standardtransfektion viermal niedriger ist als der von Oligofectamine.

4.2.7 Durchtrittsdauer PTA-modifizierter Oligonucleotide durch die Zellmembran

Im Laufe der Untersuchungen wurde die Frage aufgeworfen, ob es nicht sinnvoller ist, modifizierte Oligonucleotide zu verwenden. Nicht modifizierte Oligonucleotide unterliegen in Zellen verschiedenen degenerativen Prozessen. Erkennt eine Zelle fremde DNA-Sequenzen wird diese DNA durch Exo- oder Endonucleasen verdaut. Vermuteter Mechanismus der Erkennung ist eine falsche oder fehlende Methylierungs-Sequenz an der eingeschleusten DNA. Es gibt jedoch verschiedene Möglichkeiten die DNA chemisch zu modifizieren und damit vor enzymatischem Abbau in der Zelle zu schützen. Eine gut geeignete Stelle für Modifikationen von DNA-Oligonucleotiden ist die Phosphatgruppe, welche die beiden Ribosen zweier Nucleotide verknüpft. Am einfachsten sind Substitutionen an den beiden nicht an der Verknüpfung beteiligten Sauerstoffatome der Phosphatgruppe. Wird das nur einfach gebundene Sauerstoffatom durch Schwefel ersetzt, kann an dieser Stelle keine Nuclease mehr angreifen und das Oligonucleotid ist gegen Abbau geschützt. Zugleich bewirkt diese Modifikation allerdings eine schlechtere Löslichkeit des DNA-Oligonucleotids und dies muß bei der Verwendung berücksichtigt werden. Während die Transfektionsansätze mit nicht modifizierten Oligonucleotiden standardmäßig nur 3 - 6 Stunden inkubiert wurde, was für den Eintritt der Oligonucleotide in das Zellinnere ausreichend war, zeigten die ersten Versuche mit PTA modifizierten Primern sehr schlechte Ergebnisse dergestalt, daß deutlich weniger Fluoreszenzsignale aus dem Cytoplasma der Zellen kamen, als bei denselben Transfektionsbedingungen nur mit unmodifizierten Primern. Darum wurde das Durchtrittsverhalten von PTA modifizierten Oligonucleotiden durch die Zellmembran zeitaufgelöst untersucht. Obwohl sich formal an der Ladung der Phosphatgruppe nichts ändert, verschlechtert sich das Lösungsverhalten der modifizierten Oligonucleotide in polaren

Lösungsmitteln. Dies scheint der Grund für die Beobachtung zu sein, daß die Primer sehr lange in der Zellmembran, die, aufgrund der nach innen gerichteten Kohlenwasserstoffketten, zwischen den beiden Lipidschichten unpolar ist, verweilen. Die confokalen Aufnahmen zeigen diesen Effekt anschaulich. Zuerst die Anlagerung und das Verschmelzen der Liposomen an und in die Zellmembran. Dies führt dazu, daß die Oligonucleotide nach der Integration offenbar intra-membranär festgehalten sind. Dort verteilen sie sich, wahrscheinlich durch Diffusion, im weiteren zeitlichen Verlauf ganz offensichtlich homogen. Erst wenn diese homogene Verteilung erreicht ist treten sie in das Cytoplasma der Zelle ein. Der zugrundeliegende Mechanismus könnte das Konzentrationsgefälles sein. Unterstützend dürfte außerdem wirken, daß die extrazelluläre Umgebung, die ja letztlich nichts anderes als eine wässrige Salzlösung ist, sich insgesamt polarer verhält als das Cytoplasma. Dies hatte zur Folge, daß Transfektionen von Zellen mit PTA modifizierten Oligonucleotiden immer über Nacht (~ 16 Stunden) kultiviert wurden.

4.2.8 Microinjektion von g-Globin Antisense-Primern in K-562 Zellen

Es ist in den letzten Jahren gelungen RNA durch *in situ* Hybridisierung, mit fluoreszenzmarkierten Sonden und anschließende FRET Detektion, nachzuweisen (SEI-LIDA ET AL., 2000). Die fluoreszenzmarkierten Oligonucleotide wurden dabei jedoch durch Mikromanipulation in die Zelle gebracht. Um zu überprüfen, ob die hier entwickelten Primer auch *in situ* hybridisieren wurden diese ebenfalls per *Microinjektion* in K-562 Zellen injiziert. Zur Quantifizierung eines FRET wurde die Methode der Akzeptor Bleichung verwendet. Es müssen also vier mal die Intensitäten derselben Region bestimmt werden. Je zweimal vor und nach dem Bleichen, wobei die Intensität für Donor und Akzeptor jeweils bei ihrem Emissionsmaximum und nach separater Anregung gemessen wird. Das elegante an dieser Methode ist, daß man die Intensitäten der beiden Donorbilder Pixel für Pixel direkt voneinander abziehen kann, ohne Faktoren wie Dunkelstrom des Photomultipliers oder die eingestrahlte Energie des Lasers für jedes Bild separiert berechnen zu müssen. Diese Werte sind bei unveränderter Einstellung am Gerät gleich und die Bilder sind ihre eigene Referenz. Aus dem Unterschied der Intensitäten der Donor-Fluoreszenz vor und nach dem Bleichen des Akzeptors kann dann die Effizienz des Energietransfers berechnet werden. Wenn die Bedingungen das die Donor-Fluoreszenz nachher größer sein muß als vorher und die Akzeptor-Fluoreszenz nach dem Bleichen abgenommen hat, erfüllt ist, hat man einen FRET zweifelsfrei nachgewiesen. Die manipulierten Zellen sind nach der Injektion der Primer und

einer kurzen Hybridisierungsphase mit einem Protokoll nach Larsen (LARSEN ET AL., 2003) durch eine PFA/Eisessig Behandlung fixiert worden. Damit wird auch sichergestellt, daß es intrazellulär zu keinen Migrationen der Oligonucleotide kommen kann und dies zu falschen Intensitätswerten führt, weil die Moleküle in den Meßbereichen fluktuieren. Mit dieser Methode konnte an unterschiedlichen Stellen, in allen induzierten Zellen der chronisch myelogenen Leukämiezelllinie, die mit Primern transfiziert wurden FRET nachgewiesen werden. Die Schlußfolgerung aus den nachgewiesenen FRET-Signalen ist, daß an diesen Stellen im Cytoplasma der Zellen eine Hybridisierung von γ -Globin mRNA mit den fluoreszenzmarkierten Oligonucleotiden stattgefunden hat.

4.2.9 *In situ* Detektion von mRNA durch FRET

Nachdem ein FRET durch *in situ* Hybridisierung nach Microinjektion von geeigneten fluoreszenzmarkierten Oligonucleotiden gezeigt werden konnte, sollten diese Primer nun auch, durch liposomal vermittelte Transfektion einer Zellkultur, in die Zielzellen eingebracht werden. Damit die Beurteilung der Ergebnisse zweifelsfrei ist, also wirklich ausgeschlossen werden kann, daß irgendein nicht erkanntes Phänomen zu einem falsch positiven FRET-Signal führt, wurden entsprechende Negativ-Kontrollen durchgeführt. Diese bestanden einerseits darin, daß in die JurkatE6.1 Zelllinie, die sicher kein γ -Globin exprimiert die gleichen Antisense-Primer nach demselben Protokoll transfiziert wurden und andererseits Sense-Primer, zu den hier verwendeten Antisense-Primern, in einem zweiten Ansatz nach demselben Protokoll in die induzierten K-562 Zellen transfiziert wurden. Alle untersuchten Ansätze wurden mit PFA/Eisessig fixiert. In der Kultur von induzierten K-562 Zellen konnte in mehreren Zellen nach liposomal vermittelter Transfektion mit den Antisense-Primern FRET detektiert werden. Sowohl in der Sense Kontrolle, als auch in den JurkatE6.1 Zellen konnten zwar Fluoreszenzsignale beider verwendeter Fluorophore detektiert werden, es ist jedoch nirgendwo ein FRET nachzuweisen gewesen. Das die Intensitäten der FRET Signale geringer sind als in der durch Microinjektion transfizierten Zelle wird zum einen sicherlich daran liegen, daß bei der Liposomen vermittelten Transfektion das stöchiometrische Problem in den Vordergrund tritt. Es sind keine äquimolaren Stoffmengen der Primer in einer Zelle zu erwarten. Zusätzlich schwankt die Intensität, weil sicher auch jede der transfizierten Zellen eine unterschiedlich hohe Konzentration an Ziel mRNA Molekülen aufweist. Den größten Einfluß im Hinblick auf die erzielten Effizienzen dürfte aber die nicht optimale Anregung des Texas-Red durch den Helium Neon Laser mit der Kennlinie 543 nm haben. Das hatte auch

zur Folge, daß es sehr schwierig war den Akzeptor effektiv zu bleichen, da Texas-Red sein Absorptionsmaximum bei 595 nm hat und außerdem sehr photostabil ist. Dadurch nahm die Akzeptorfluoreszenz selbst nach 40maliger Anregung mit maximaler Intensität meist nur um durchschnittlich 10 % ab. Zum Vergleich, Rhodamin Red mit einer Anregungswellenlänge von 570 nm läßt sich mit bei 20maliger Anregung mit maximaler Intensität schon fast vollständig bleichen. Verglichen mit den publizierten Ergebnissen des FRET nach Microinjektion von Oligonucleotiden (SEI-LIDA ET AL., 2000) oder Molecular Beacons (SOKOL ET AL., 1998) und deren *in situ* Hybridisierung an RNA, ist die Effizienz bei den hier dargestellten Versuchen nur ein wenig geringer. Wobei weder Sei-lida, noch Sokol quantitative Werte angeben, sondern nur Kurven der Emission oder Verhältniswerte der Akzeptor Fluoreszenz ohne und mit FRET Signal zeigen. Das Verhältnis der Peaks der Intensität der beiden Fluorophore ist, äquimolare Mengen vorausgesetzt, bei Sei-lida sehr ähnlich den hier erzielten Werten wie sie für die *in vitro* hybridisierten Primer an extrahierter RNA gemessen wurden. Die Änderung der Verhältnisse der Intensität gibt Sokol nur in Bezug auf den Hintergrund an und somit läßt sich über die erzielte Effizienz keine quantitative Aussage zum Vergleich treffen.

Diese eindeutigen Ergebnisse zeigen zum ersten Mal, daß es möglich ist durch liposomal vermittelte Transfektion Zellen mit geeigneten FRET-Sonden zu transfizieren und so zu fixieren, daß anschließend über die Detektion eines FRET-Signals das Vorhandensein einer komplementären RNA-Sequenz *in situ* zweifelsfrei nachgewiesen werden kann.

4.3 Zusammenfassende Betrachtung und Ausblick

Für das Design zukünftiger FRET-geeigneter fluoreszenzmarkierter Oligonucleotide kann folgendes gesagt werden. Die Länge sollte 25 Nucleotide nicht unterschreiten, optimal scheint eine Länge von 30 - 40 Nucleotiden, der GC-Gehalt sollte möglichst hoch sein. Der Abstand zwischen den Fluorophoren sollte nach Hybridisierung zwischen 5 und 10 Basen liegen, wenn es sich um ein System aus Fluoresceinderivat oder Bodipy 493/503 und einem Rhodaminderivat als Akzeptor handelt. Es konnten nicht alle Ergebnisse der Untersuchung zur Optimierung eines FRET-Oligonucleotid Paares in den *in situ* Versuchen umgesetzt werden. Die Kombination von Bodipy493/503 und Texas-Red, die sich als vielversprechend gezeigt hat, sollte, mit entsprechend langen Primer von 30 Nucleotiden, auf jeden Fall untersucht werden. Des weiteren würde ein Vergleich an einem System, mit dem das Texas-Red effektiver geblichen werden kann sicher bessere Effizienzwerte liefern. Die

PFA/Eisessig Fixierung hat sich als gut geeignet erwiesen, um die Zellen sicher und mit wenig Beeinträchtigung ihrer Struktur zu stabilisieren und einer Untersuchung zugänglich zu machen. Erste Untersuchungen von Mitarbeitern der Firma Praenadia haben gezeigt, daß das FRET-Signal aus so markierten Zellen mit einem FACS-Gerät detektierbar ist. Unabhängig von einer möglichen kommerziellen Verwertung könnte dieses Verfahren, RNA *in situ* zu hybridisieren durch die einfache Methodik und den geringen apparativen Aufwand, abgesehen von dem Confokal Mikroskop, auch für Untersuchungen zur Lokalisation von Transkriptionsprodukten geeignet sein. Durch zusätzliche Antikörper Färbung gegen Strukturproteine der Zelle erhalte man weitere Ortsinformationen für die Transkripte. Die Aussage hinsichtlich der Lokalisation nach Mikroinjektion ist begrenzt, da es durch die große Volumenänderung sicherlich zur Delokalisation von Zellstrukturen und Kompartimenten kommt.

5 Literatur

Aarskog, N. K., and Vedeler, C. A. (2000). Real-time quantitative polymerase chain reaction. A new method that detects both the peripheral myelin protein 22 duplication in Charcot-Marie-Tooth type 1A disease and the peripheral myelin protein 22 deletion in hereditary neuropathy with liability to pressure palsies. *Hum Genet* 107, 494-498.

Adinolfi, M., and Crolla, J. (1994). Nonisotopic in situ hybridization. Clinical cytogenetics and gene mapping applications. *Adv Hum Genet* 22, 187-255.

Baum, C., Forster, P., Hegewisch-Becker, S., and Harbers, K. (1994). An optimized electroporation protocol applicable to a wide range of cell lines. *Biotechniques* 17, 1058-1062.

Benirschke, K. (1994). Anatomical relationship between fetus and mother. *Ann N Y Acad Sci* 731, 9-20.

Bianchi, D. W. (1995). Prenatal diagnosis by analysis of fetal cells in maternal blood. *J Pediatr* 127, 847-856.

Bianchi, D. W. (1998). Current knowledge about fetal blood cells in the maternal circulation. *J Perinat Med* 26, 175-185.

Bianchi, D. W., Yih, M. C., Zickwolf, G. K., and Flint, A. F. (1994). Transferrin receptor (CD71) expression on circulating mononuclear cells during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 170, 202-206.

Bianchi, D. W., Zickwolf, G. K., Weil, G. J., Sylvester, S., and DeMaria, M. A. (1996). Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 705-708.

Bohmer, R. M. (1998). Fetal cells from maternal blood: purpose, biological questions, technical challenges. *Intervirology* 41, 226-231.

Bohmer, R. M., Zhen, D., and Bianchi, D. W. (1998). Differential development of fetal and adult haemoglobin profiles in colony culture: isolation of fetal nucleated red cells by two-colour fluorescence labelling. *Br J Haematol* 103, 351-360.

Bülter, A. and Brockhinke, A. (2003). AES-Eval Programm zur Bearbeitung von Spektren des Meßprogramms WinSpec.

Clegg, R. M. (1995). Fluorescence resonance energy transfer. *Curr Opin Biotechnol* 6, 103-110.

Clegg, R. M., Murchie, A. I., Zechel, A., and Lilley, D. M. (1993). Observing the helical geometry of double-stranded DNA in solution by fluorescence resonance energy transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 2994-2998.

- Davey, H. M., and Kell, D. B. (1996). Flow cytometry and cell sorting of heterogeneous microbial populations: the importance of single-cell analyses. *Microbiol Rev* *60*, 641-696.
- Davis, M. G., Kawai, Y., and Arinze, I. J. (2000). Involvement of Gialpha2 in sodium butyrate-induced erythroblastic differentiation of K562 cells. *Biochem J* *346 Pt 2*, 455-461.
- Deniz, A. A., Dahan, M., Grunwell, J. R., Ha, T., Faulhaber, A. E., Chemla, D. S., Weiss, S., and Schultz, P. G. (1999). Single-pair fluorescence resonance energy transfer on freely diffusing molecules: observation of Forster distance dependence and subpopulations. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 3670-3675.
- Didenko, V. V. (2001). DNA probes using fluorescence resonance energy transfer (FRET): designs and applications. *Biotechniques* *31*, 1106-1116, 1118, 1120-1101.
- Efstratiadis, A., Posakony, J. W., Maniatis, T., Lawn, R. M., O'Connell, C., Spritz, R. A., DeRiel, J. K., Forget, B. G., Weissman, S. M., Slightom, J. L., *et al.* (1980). The structure and evolution of the human beta-globin gene family. *Cell* *21*, 653-668.
- Eiben, B., Hammans, W., Hansen, S., Trawicki, W., Osthelder, B., Stelzer, A., Jaspers, K. D., and Goebel, R. (1997). On the complication risk of early amniocentesis versus standard amniocentesis. *Fetal Diagn Ther* *12*, 140-144.
- Elias, S., Price, J., Dockter, M., Wachtel, S., Tharapel, A., Simpson, J. L., and Klinger, K. W. (1992). First trimester prenatal diagnosis of trisomy 21 in fetal cells from maternal blood. *Lancet* *340*, 1033.
- Femino, A. M., Fay, F. S., Fogarty, K., and Singer, R. H. (1998). Visualization of single RNA transcripts in situ. *Science* *280*, 585-590.
- Franca, L. T., Carrilho, E., and Kist, T. B. (2002). A review of DNA sequencing techniques. *Q Rev Biophys* *35*, 169-200.
- Friedrich, K., Woolley, P., and Steinhauser, K. G. (1988). Fluorimetric distance determination by resonance energy transfer. Ribosome-bound transfer RNA. *Eur Biophys J* *16*, 45-51.
- Gelfand, C. A., Plum, G. E., Mielewczyk, S., Remeta, D. P., and Breslauer, K. J. (1999). A quantitative method for evaluating the stabilities of nucleic acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 6113-6118.
- Glazer, A. N., and Mathies, R. A. (1997). Energy-transfer fluorescent reagents for DNA analyses. *Curr Opin Biotechnol* *8*, 94-102.
- Gohlke, C., Murchie, A. I., Lilley, D. M., and Clegg, R. M. (1994). Kinking of DNA and RNA helices by bulged nucleotides observed by fluorescence resonance energy transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* *91*, 11660-11664.
- Goldberg, J. D. (1997). Fetal cells in maternal circulation: progress in analysis of a rare event. *Am J Hum Genet* *61*, 806-809.

Hamada, H., Arinami, T., Kubo, T., Hamaguchi, H., and Iwasaki, H. (1993). Fetal nucleated cells in maternal peripheral blood: frequency and relationship to gestational age. *Hum Genet* 91, 427-432.

Hawes, C., Kalionis, B., and Jones, W. (1994). Isolating fetal trophoblast cells for prenatal genetic diagnosis. *Jama* 271, 1079-1080.

Henderson, K. G., Shaw, T. E., Barrett, I. J., Telenius, A. H., Wilson, R. D., and Kalousek, D. K. (1996). Distribution of mosaicism in human placentae. *Hum Genet* 97, 650-654.

Herzenberg, L. A., Bianchi, D. W., Schroder, J., Cann, H. M., and Iverson, G. M. (1979). Fetal cells in the blood of pregnant women: detection and enrichment by fluorescence-activated cell sorting. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 1453-1455.

Hung, S. C., Mathies, R. A., and Glazer, A. N. (1998). Comparison of fluorescence energy transfer primers with different donor-acceptor dye combinations. *Anal Biochem* 255, 32-38.

Ju, J., Kheterpal, I., Scherer, J. R., Ruan, C., Fuller, C. W., Glazer, A. N., and Mathies, R. A. (1995). Design and synthesis of fluorescence energy transfer dye-labeled primers and their application for DNA sequencing and analysis. *Anal Biochem* 231, 131-140.

Krabchi, K., Gros-Louis, F., Yan, J., Bronsard, M., Masse, J., Forest, J. C., and Drouin, R. (2001). Quantification of all fetal nucleated cells in maternal blood between the 18th and 22nd weeks of pregnancy using molecular cytogenetic techniques. *Clin Genet* 60, 145-150.

Larsen, R. D., Schonau, A., Thisted, M., Petersen, K. H., Lohse, J., Christensen, B., Philip, J., and Pluzek, K. J. (2003). Detection of gamma-globin mRNA in fetal nucleated red blood cells by PNA fluorescence in situ hybridization. *Prenat Diagn* 23, 52-59.

Letzgus, M (2003). AES-Steuerprogramm – Programm zur automatisierten Aufnahme von AES-Bildern.

Lewis, D. E., Schober, W., Murrell, S., Nguyen, D., Scott, J., Boinoff, J., Simpson, J. L., Bischoff, F. Z., and Elias, S. (1996). Rare event selection of fetal nucleated erythrocytes in maternal blood by flow cytometry. *Cytometry* 23, 218-227.

Lilley, D. M., and Wilson, T. J. (2000). Fluorescence resonance energy transfer as a structural tool for nucleic acids. *Curr Opin Chem Biol* 4, 507-517.

Lo, Y. M., Corbetta, N., Chamberlain, P. F., Rai, V., Sargent, I. L., Redman, C. W., and Wainscoat, J. S. (1997). Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 350, 485-487.

L.O.T.-Oriel GmbH (2003). <http://www.oriel.com>

Lotte, K. (1999). Anregungs-Emissions-Spektroskopie und zeitaufgelöste Laser induzierte Fluoreszenz an synthetischen Peptiden. Universität Bielefeld, Diplomarbeit.

Martin, W. L., Durrant, L. G., and Liu, D. T. (1998). Non-invasive fetal cell isolation from maternal blood. *Br J Obstet Gynaecol* 105, 576-583.

- Mergny, J. L., Boutorine, A. S., Garestier, T., Belloc, F., Rougee, M., Bulychev, N. V., Koshkin, A. A., Bourson, J., Lebedev, A. V., Valeur, B., and et al. (1994). Fluorescence energy transfer as a probe for nucleic acid structures and sequences. *Nucleic Acids Res* 22, 920-928.
- Mesker, W. E., Ouwerkerk-van Velzen, M. C., Oosterwijk, J. C., Bernini, L. F., Golbus, M. S., Kanhai, H. H., Van Ommen, G. J., and Tanke, H. J. (1998). Two-colour immunocytochemical staining of gamma (gamma) and epsilon (epsilon) type haemoglobin in fetal red cells. *Prenat Diagn* 18, 1131-1137.
- Morrison, S. J., Shah, N. M., and Anderson, D. J. (1997). Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell* 88, 287-298.
- Mullis, K. B., and Faloona, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155, 335-350.
- Murken, J. and Cleve, H., (1996). *Humangenetik*. 6. Auflage, S. 169 ff.
- Nirenberg, M. W. (1963). The genetic code. II. *Sci Am* 208, 80-94.
- OriginLab Corporation (1991-2002) OriginPro 6.0 – Programm zur Analyse und grafischen Darstellung von Daten. <http://www.originlab.com>
- Okamura, Y., Kondo, S., Sase, I., Suga, T., Mise, K., Furusawa, I., Kawakami, S., and Watanabe, Y. (2000). Double-labeled donor probe can enhance the signal of fluorescence resonance energy transfer (FRET) in detection of nucleic acid hybridization. *Nucleic Acids Res* 28, E107.
- Orkin, S. H. (1996). Development of the hematopoietic system. *Curr Opin Genet Dev* 6, 597-602.
- Ota, N., Hirano, K., Warashina, M., Andrus, A., Mullah, B., Hatanaka, K., and Taira, K. (1998). Determination of interactions between structured nucleic acids by fluorescence resonance energy transfer (FRET): selection of target sites for functional nucleic acids. *Nucleic Acids Res* 26, 735-743.
- Palmisano, R. (2001). Förster-Resonanz-Energie-Transfer zum spezifischen Nachweis von Nucleinsäuren in lebenden Zellen.
- Palmisano, R., Schmitt-John, Th., Plessow, R., Brockhinke, A., and Weidner, J. (2001). Förster-Resonanz-Energie-Transfer zur spezifischen Detektion von mRNA in Zellen. Patent Nr.:101 33 308.0
- Pembrey, M. E., Weatherall, D. J., and Clegg, J. B. (1973). Maternal synthesis of haemoglobin F in pregnancy. *Lancet* 1, 1350-1354.
- Pergament, E., Chen, P. X., Thangavelu, M., and Fiddler, M. (2000). The clinical application of interphase FISH in prenatal diagnosis. *Prenat Diagn* 20, 215-220.

Plessow, R. (2003). Entwicklung und Charakterisierung einer Methode zur Untersuchung von Makromolekülen mit Hilfe zeitaufgelöster Laser induzierter Fluoreszenz und Anregungs-Emissions-Spektroskopie.

Price, J. O., Elias, S., Wachtel, S. S., Klinger, K., Dockter, M., Tharapel, A., Shulman, L. P., Phillips, O. P., Meyers, C. M., Shook, D., and et al. (1991). Prenatal diagnosis with fetal cells isolated from maternal blood by multiparameter flow cytometry. *Am J Obstet Gynecol* 165, 1731-1737.

Reading, J. P., Huffman, J. L., Wu, J. C., Palmer, F. T., Harton, G. L., Sisson, M. E., Keyvanfar, K., Gresinger, T. H., Cochrane, W. J., Fallon, L. A., and et al. (1995). Nucleated erythrocytes in maternal blood: quantity and quality of fetal cells in enriched populations. *Hum Reprod* 10, 2510-2515.

Rieseberg, M., Kasper, C., Reardon, K. F., and Scheper, T. (2001). Flow cytometry in biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol* 56, 350-360.

Roper Scientific (2003), Manual, <http://www.roperscientific.com>

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, second Ed.. Anonymous Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory.

Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T.: *Molecular cloning: A laboratory manual*. Third edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York

Schofield, J. P., and Caskey, C. T. (1995). Non-viral approaches to gene therapy. *Br Med Bull* 51, 56-71.

Sei-Iida, Y., Koshimoto, H., Kondo, S., and Tsuji, A. (2000). Real-time monitoring of *in vitro* transcriptional RNA synthesis using fluorescence resonance energy transfer. *Nucleic Acids Res* 28, E59.

Sekizawa, A., Farina, A., Zhen, D. K., Wang, J. Y., Falco, V. M., Elmes, S., and Bianchi, D. W. (1999). Improvement of fetal cell recovery from maternal blood: suitable density gradient for FACS separation. *Fetal Diagn Ther* 14, 229-233.

Serlachius, M., Von Koskull, H., Wessman, M., and Schroder, J. (2000). The use of transferrin for enrichment of fetal cells from maternal blood. *Prenat Diagn* 20, 407-410.

Slunga-Tallberg, A., el-Rifai, W., Keinanen, M., Ylinen, K., Kurki, T., Klinger, K., Ylikorkala, O., Larramendy, M. L., and Knuutila, S. (1996). Maternal origin of transferrin receptor positive cells in venous blood of pregnant women. *Clin Genet* 49, 196-199.

Snijders, R. J., Johnson, S., Sebire, N. J., Noble, P. L., and Nicolaides, K. H. (1996). First-trimester ultrasound screening for chromosomal defects. *Ultrasound Obstet Gynecol* 7, 216-226.

Sokol, D. L., Zhang, X., Lu, P., and Gewirtz, A. M. (1998). Real time detection of DNA:RNA hybridization in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 11538-11543.

Stryer, L., (1988). *Biochemie*. Spektrum akademischer Verlag.

Takabayashi, H., Kuwabara, S., Ukita, T., Ikawa, K., Yamafuji, K., and Igarashi, T. (1995). Development of non-invasive fetal DNA diagnosis from maternal blood. *Prenat Diagn* 15, 74-77.

Tbakhi, A., Totos, G., Hauser-Kronberger, C., Pettay, J., Baunoch, D., Hacker, G. W., and Tubbs, R. R. (1998). Fixation conditions for DNA and RNA in situ hybridization: a reassessment of molecular morphology dogma. *Am J Pathol* 152, 35-41.

Theml, H (1998). Taschenatlas der Hämatologie. S. 17 ff.

Torricelli, F., and Pescucci, C. (2001). Isolation of fetal cells from the maternal circulation: prospects for the non-invasive prenatal diagnosis. *Clin Chem Lab Med* 39, 494-500.

Troeger, C., Holzgreve, W., and Hahn, S. (1999). A comparison of different density gradients and antibodies for enrichment of fetal erythroblasts by MACS. *Prenat Diagn* 19, 521-526.

Tsuji, A., Koshimoto, H., Sato, Y., Hirano, M., Sei-Iida, Y., Kondo, S., and Ishibashi, K. (2000). Direct observation of specific messenger RNA in a single living cell under a fluorescence microscope. *Biophys J* 78, 3260-3274.

Tyagi, S., and Kramer, F. R. (1996). Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nat Biotechnol* 14, 303-308.

Tyagi, S., Marras, S. A., and Kramer, F. R. (2000). Wavelength-shifting molecular beacons. *Nat Biotechnol* 18, 1191-1196.

Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W., Li, P. W., Mural, R. J., Sutton, G. G., Smith, H. O., Yandell, M., Evans, C. A., Holt, R. A., *et al.* (2001). The sequence of the human genome. *Science* 291, 1304-1351.

Viora, E., Masturzo, B., Errante, G., Sciarrone, A., Bastonero, S., and Campogrande, M. (2003). Ultrasound evaluation of fetal nasal bone at 11 to 14 weeks in a consecutive series of 1906 fetuses. *Prenat Diagn* 23, 784-787.

Wada, Y., and Noguchi, C. T. (1988). *In vitro* differential expression of human globin genes. *J Biol Chem* 263, 12142-12146.

Wald, N. J., Kennard, A., and Hackshaw, A. K. (1995). First trimester serum screening for Down's syndrome. *Prenat Diagn* 15, 1227-1240.

Wald, N. J., Rodeck, C., Hackshaw, A. K., Walters, J., Chitty, L., and Mackinson, A. M. (2003). First and second trimester antenatal screening for Down's syndrome: the results of the Serum, Urine and Ultrasound Screening Study (SURUSS). *Health Technol Assess* 7, 1-77.

Walknowska, J., Conte, F. A., and Grumbach, M. M. (1969). Practical and theoretical implications of fetal-maternal lymphocyte transfer. *Lancet* 1, 1119-1122.

Watson, J. D., and Crick, F. H. (1953). The structure of DNA. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 18, 123-131.

Wessman, M., Ylinen, K., and Knuutila, S. (1992). Fetal granulocytes in maternal venous blood detected by in situ hybridization. *Prenat Diagn* 12, 993-1000.

Wijgerde, M., Grosveld, F., and Fraser, P. (1995). Transcription complex stability and chromatin dynamics in vivo. *Nature* 377, 209-213.

Wu, P., and Brand, L. (1994). Resonance energy transfer: methods and applications. *Anal Biochem* 218, 1-13.

Xia, Z., and Liu, Y. (2001). Reliable and global measurement of fluorescence resonance energy transfer using fluorescence microscopes. *Biophys J* 81, 2395-2402.

Yang, J. P., and Huang, L. (1997). Overcoming the inhibitory effect of serum on lipofection by increasing the charge ratio of cationic liposome to DNA. *Gene Ther* 4, 950-960.

6 Anhang

6.1 Abkürzungen

°C	Grad Celsius
μ	Mikro
Å	Angström
A	Adenin
A	Absorption
Abb.	Abbildung
AES	Anregungs-Emissions-Spektroskopie
AFP	? -Fetoprotein
AMP	Adeninmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
C	Cytosin
CDNA	Copy DNA
CMP	Cytosinmonophosphat
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxiribonucleinsäure
DNase	Desoxyribonuclease
dNTP	Desoxy -Nucleosidtriphosphat
<i>E</i>	Energie
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtBr	Ethidiumbromid
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FCS	Fetal calf serum
FD	Farad [Kapazität]
FISH	Fluorescence <i>in situ</i> Hybridization
FITC	Fluorescein-Isothiocyanate
FRET	Fluoreszenz-(Förster)-Resonanz-Energie-Transfer
G	Guanin
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
GAPDH	GlycerAldehyde-3-Phosphate DeHydrogenase
GMP	Guaninmonophosphat
h	human

h	Stunde
Hb	Hämoglobin
HbA	Adultes Hämoglobin
HbF	Fötales Hämoglobin
HBS	HEPES Buffered Saline
hCG	humanes Choriongonadotropin
ICCD	Internal charge coupled device
IMM	Immersionsobjektiv
kb	Kilobasen
l	Liter
LCR	Locus-Control-Region
m	Milli
M	Molar
MACS	Magnetic Activated Cell Sorting
MgCL ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
mRNA	messenger RNA
N	Normal
n	Nano
NaOH	Natriumhydrogencarbonat
NCBI	National Center for Biology and Information
NRBCs	nucleierte rote Blutkörperchen
OD	Optische Dichte
p	Pico
PAPP-A	Schwangerschafts assoziierte Plasma Protein-A
PBS	Phosphate Buffered Salin
PCR	Polymerase chain reaction
PE	Phycoerythrin
pH	<i>pondus hydrogenii</i>
PRINS	primed <i>in situ</i> labeling
RNA	Ribonucleinsäure
RNase	Ribonuclease
Rpm	Rounds per minute, Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SNP	Single nucleotid polymorphism
SSW	Schwangerschaftswoche
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBST	Tris-buffered-saline Tween

TMP	Thyminmonophosphat
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Uracil
U	Unit (Enzymeinheit)
uE ₃	unkonjugiertes Östriol
Ü.N.	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
VS	Verstärkerstufe

6.2 Sequenzen

Die Accession Nummer erlaubt das direkte Erreichen der relevanten Sequenz-Informationen in der PubMed Datenbank. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>

mRNA human GAPDH

Accession M33197

```
gttcgacagtcagccgcatctcttttgcgtgccagccgagccacatcgcctcagacaccatggggaaggtgaaggtcggagtcacaggatttgctgattgggc
gcctggtcaccagggtgcttttaactctgtaaaagtggatattgttgcacatgacccctcattgacctcaactacatggtttacatgttccaatatgattccaccat
ggcaaatccatggcaccgtcaaggctgagaacgggaagctgtcatcaatggaaatccatcaccatcttccaggagcggagatccctccaaatcaagtggggc
gatgctggcgtgagtacgtctggagtcactggcgtctcaccacatggagaaggtctgggctcatttgcagggggagccaaagggtcatcatctctgcc
ccctctgctgatgccccatgttcgcatgggtgtgaacctgagaagtatgacaacagcctcaagatcatcagaatgctcctgaccaccaactgcttagcacc
ctggcaaggtcatccatgacaactttggtatctggaaggactcatgaccacagtcacatcactgccaccagaagactgtggatggccccccgggaaac
tgtggcgtgatggccgcgggctctccagaacatcatccttgccttactggcgtccaaggctgtgggcaaggctcatccctgagctgaacgggaagctcactg
gcatggccttccgtgccccactgccaacgtgtcagtggtggacctgacctgctctgaaaaacctgccaatatgatgacatcaagaaggtggtgaagcaggc
ctgggagggccccctcaaggcatcctgggtactgagcaccaggtggtctcctctgactcaacagcgacaccactctccacctttgacgctggggctgg
c
```

mRNA human CD 59 antigen 18-20

Accession NM_000611

```
ggcacgaggagagatcctgggcgccccaggtctgtggacaatcacaatgggaatccaaggagggtctgtcctgttcgggctgctgctcctgctgtcttc
tgccattcaggtcatagcctgagctgctacaactgtcctaaccaactgctgactgcaaaacagccgcaattgttcatctgatttggatgctgtctcattaccaagct
gggttacaaggtataacaagtgttggagtttgagcattgcaatttcaacgagctcacaaccgcttggggaaaatgagctaacgtactactgctcaagaagga
cctgtgtaactttaacgaacagcttgaatggtgggacatcctatcagagaaaacagttctctgctggtgactccatttctggcagcagcctggagccttcatcct
aagtcaacaccaggagagcttctccaaactccccgttctgctgtagtccgttctctgctgccacatttaaggcttgatatttccaaatggatcctgttgggaaa
gaataaattagcttgagcaacctggtaagatagagggcctgtggagacttgaagaccagctctgttgcagggaagccccacttgaaggaaagacttaaga
gtgaagtaggtgtgacttgaactagattgcatgcttctccttctgttgggagaccagcttgcagtgacagcttgagtggttctctgacccctcagattatttct
ctctggctccttggatgtagtcagttagcatcattgacatcttggagggtggggcaggagtagatgagcactctctcaccatggaacgcttcataaaactcaggg
atccctgttggcatggaggcatgcaaatgttccatattggtgtgtcagtcagggaacaagaatccttaatgcagagctagaggacttctggcagggaaagtggg
gaaggttccagatagcaggcatgaaaacttagagaggtacaagtggtgaaatcgagtttctctgtctttaaatttatatggccttgttatcttccactggaaa
agtgtaatgacatacatcaatggtgtttaaagctatttcttgcctttttttattggaatggtagatatttggcttggccacacacagttacagagtgaaacttacta
catgtgactggcagtaataagtgcttattttaaattgtactggtagaaggcagttcaggtatgtgtatataatgaaatgagtgaggacacccttgggttacag
ttgagacttccaaaggtcatccttaataacaacagatctgcaggggtatgtttaccatctgcatccagcctctgtaactcctagctgactcagcatagattgataaa
ataccttgaacggctcttagcacactcagatgttggagcttccagaagcttcttaaaaaatgatacacaccttccacaagggaacttttcttcttccctgtgtat
tctagtgaatgaatcgaatcagtagacctaataacattgtattttatgatcttggctgtatttaatggcataggctgacttttgcagatggaggaatttctgattaatg
ttgaaaaaaacccttgattactctgttgacaaccagtgcaatgaatgatgcttttctgaaaaatgaaatataacaagtggtgaaatgtgttatggccgaaaag
```


atatgcagtatgcttaatgtagcaactgaagaagacatcctgagcagtgccagctttctctgtgatgccgttccctgaacataggaaaatagaacttgcttatca
aaactt

mRNA human G-γ-Globin

Accession M000184

acactcgcttctgg aacgtctgaggttatcaataagctcctagtcagacgccatgggtcatttcacagaggaggacaaggctactatcacaagcctgtgggcaag
gtgaatgtggaagatctggaggagaaccctgggaaggctcctggtgtctaccatggaccagagggtctttgacagctttggcaacctgtcctctgctctgcc
atcatgggcaaccccaagtcaggcacatggcaagaaggtgctgacttcttggagatgccataaagcacctggatgatcacaaggcacctttgccagctga
gtgaactgcaactgtgacaagctgcatgtgatcctgagaactcaagctcctgggaatgtgctggtagccgtttggcaatcatttcggcaagaattcacctga
ggtgcaggctcctggcagaagatggtgactggagtgccagtgccctgtcctccagataccactgagctcactgcccctgatgcagagctttcaagataggcttt
attctgcaagcaatcaataataatctattctgctaagagatcac

mRNA human e-Globin

Accession NM_005330

caacaaaaagagcctcaggatccagcacacattatcacaacttagtgcattccatcactgctgacccctccggacctgactccaccctgagggacacaggtc
agccttgaccaatgacttttaagtaccatggagaacaggggagcaactcggcagtaagaataaaaggccagacagagaggcagcagcacatctgcttccg
acacagctgcaatcactagcaagctctcagcctggcatcatggtgcatcttactgctgagagaaaggctgccgtcactgacctgtggagcaagatgaatgtgaa
gaggctggaggtgaagccttggcagactcctgctgtttaccctggaccagagatttttgacagctttggaacctgtctctccctgcccctgctggcaacc
ccaaggtcaagggccatggcaagaaggtgctgacttcttggagatgctataaaacatggacaacctcaagcccgccttgcctaagctgagtgagctgcaactgt
gacaagctgcatgtggatcctgagaactcaagctcctggtaacgtgatggtgattattctggctactcactttggcaaggagttcacccctgaagtgaggctgct
ggcagaagctggtgctgctgctgccattgcccctggccataagtaaccactgagttcttccagtttgagggtttcctgtgacctgacacccctcttctgcatagg
ggactgggcttggccttgagagaagccttctgttaataaagtacattttctcagtaata

mRNA human L7 Ribosomal Protein

Accession BC008850

agagaactagtctcaggtttttttttttttttccggctggaacctggagggtgtagaagagaagaagaaggaggttctgctgctgccaagaaccttaagaaaaag
cgaaggaaattcgagagctgaagatcaagcgcctgagaagaagttgcccaaaagatgcttcgaaaggcaaggaggaagcttatctatgaaaaagcaaaagca
ctatcacaaaggaatatagccagatgtacagaactgaaattcaatggcgagatggcaagaaagctggcaacttctatgtacctgcagaacccaaattggcgtttg
tcatcagaatcagaggtatcaatggagtgagcccaagggtcgaaggtgtgtagcttctcgccttcgtaaatctcaatggaacctttgtgaagctcaacaaggc
ttcgatfaacatgctgaggtatgtagccatattgcatgggggtacccaatctgaagtcagtaaatgaaactaatctacaagcgtggttatggcaaatcaataag
aagcgaattgcttgacagataacgctttgattgctgcatcttggtaataacggcatcatctgcatggaggattgattcatgagatctatactgttggaaaacgctca
aagaggcaataactcctgtggccctcaaatgtcttccacgaggtggaatgaagaaaaagaccaccattttgtagaaggtggagatgctggcaacagggag
gaccagatcaacagcctattagaagaatgaaactaaggtgtctaccatgatttttttaagctggttggtaataaacagtacctgctctcaaatgaaaaaaaaaaaa
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

mRNA human ADAM8 A Disintegrin And Metalloprotease

Accession NM_001109

gaccggccatgcgcgctcgggctctggctgctgggctgatgatgctcctgcattgccccagccggcctgggcccctatgagcagatgaggtcgt
gttgcgcgcgctctgccagccccagctccgccagctctgccctcccacttggcctgcacccagagagggtgagctacgtccttggggccacaggggcac
aacttcacctccacctgcggaagaacagggacctgctgggttccggctacacagagacctatacggctgccaatggctccgaggtgacggagcagcctcgcgg
gcaggaccactgcttataccaggccacgtagaggggtaccggactcagccgccagcctcagcacctgtccggcctcaggggtttctccaggtggggctcag
acctgacctgatcagcccctggatgaaggtggcagggcggacggcagcctgtgaccaggctgagcacctgctgacagcggccggacctgcccgggctca
ggcagcagcctgggagcctcctggaccgggagggcagccgctctcagggcctggcccggggactctgcccactcccagagaccccgtacgtggagct
gtatgtgtcgtggacaatgcagagttccagatgctggggagcgaagcagcctgctgctcaggggtgctggaggtggtgaaacagctggcaagctatatacagaa
actcaactcctgtgtgctcctggtggcctggagatttgaatagtcaggacaggttccacgtcagccccgacccaggtgacactgggaaacctcctgacctgg
caggcacggaacggacagcggcgcacctgcatgacaactacagctcatcacgggtgctgacttcaccgggactactgtggggttggccagggtgtccgccat
gtgctcccacagctcaggggctgtgaaccaggaccacagcaagaacccctggggctggcctgacacatggcccagatggggccacaacctgggcatgga
ccatgatgagaactccagggtcggctgcccaggaaacgcttcaggccggcggctgcatcatggcagggcagcattggctccagttccccaggatgttcagtg
ctgcagccaggcctacctggagagctttttgagcggccgcagctgggtgtgctcgcacaacggcctgacctcagccacctgtggggcggccccgtgtgtgga
acctgtttgtgagcgtggggagcagtgcgactcggccccccggaggactgccggaaccgctgctgcaactctaccacctgcccagctggctgagggggccca
gtgtgcgcaggtacctgctgccaggatgcaaggtgaagccggctggtgagctgtgcccgtccaagaaggacatgtgtgacctcagggagttctgtgacggcc

ggcacctgagtgcccgaagacgccttcaggagaacggcacgcctgtccgggggctactgctacaacggggcctgtcccactggcccagcagtgcc
aggccttctgggggcccaggtgggcaggctgccgaggagtctgtctcctatgacatcctaccaggctgcaaggccagccggtacagggctgacatgtgtggc
gttctgcagtgaaggggtggcagcagcccctggggcgtgccatctgcatcgtggatgtgtccacgcgctaccacagaggatggcactcgtatgaaccagt
gcccgagggcaccgggtgtggaccagagaagggttctggaaaggacgttgcaggacttacacgtttacagatccagcaactgctctgccagtccacaacca
tgggggtgtcaaccacaagcaggagtgccactgccacgcgggctgggccccgcccactgcggaagctgctgactgaggtgcacgcagcgtccgggagcct
ccccgtcctcgtggtggttctggtgctcctggcagttgtctggtcaccctggcagggateatcgttaccgcaagcccggagccgcatcctgagcaggaac
gtggtccaagaccacaatggggcgtccaacccctgttccaccaggctgccagccgctgcccggccaagggcggggctccagccccatccaggggcccc
caagagctggtccccaccaccaccgggcccagccccgacaccggcctcctcgggtgctctgaagaggccgccccctgctcctccggctactgtgtcca
gcccaccctcccagttcctgtctacaccggcaggcaccaaaagcaggtcatcaagccaacgttcgacccccagtccccagtcaaacccggggctggtgcg
gccaacctggtccagctgaggggtgtgtggccaaaaggttgcctgaagcccccatccagaggaagcaaggagccggagctcccacagcaccctagggg
ggcacctgcgctgtgtggaatttgagaagtggcagagaagccatgctccagcctccacgggtccagctagtccgctcagccctagaccctgactttg
caggctcagctgctgttaacctcagtaatgcatctacctgagaggctcctgctgtccacgcctcagccaattccttccccgcttggccacgtgtagccccagc
tgtctgcaggcaccaggctgggatgagctgtgtccttggggcgtgtgtgtgtacgtgtctccaggtggccgctggtctcccgtgtgttcaggaggccacatat
acagcccccccagccacacctgcccctgctctggggcctgctgagccggctgccctgggcacccgggtccagggcagcagacgtggggcctccccagaaag
actccatcccagaccaggtccccctcgtgctcttcgagagggtgtagtgagcagactgcacccaagctcccactccaggtcccctgatcttgggcctgttc
ccatggattcaagagggacagccccagcttgtgtgtttaaagcttaggaatgcccttatggaagggtatgtgggagagtcagctatctgtctggtttcttga
gaccicagatgtgttcagcagggctgaaagctttattcttaataatgagaatgtatatttactaataaattattgaccgagttctgtagattctgttaga

Für mich!

Ducunt volentem fata, nolentem trahunt.

(Zeitenwende)

aus:

Lucius Annaeus Seneca
»EPISTULAE MORALES« 107, 11

Erklärung:

Ich erkläre, daß ich die vorliegende Arbeit zur Erlangung des Dokortitels selbständig und nur mit den hier aufgeführten Materialien und Quellen angefertigt habe.

Bielefeld, den 16.12.2003

Gedruckt auf alterungsbeständigem Papier (ISO 9706)