

Dietrich Arndt, Günter Obe (Hrsg.)

# **Zytogenetische Methoden**

Im Rahmen des Populationsmonitorings

**MMV Medizin Verlag München**

## INHALT

<b>Vorwort</b> .....	4	<b>Retrospektive Ermittlung der Strahlenbelastung von Patienten einer orthopädischen Praxis mit Hilfe der biologischen Dosimetrie</b> I. Schmitz-Feuerhake, B. Dannheim, I. Grell-Büchtmann, A. Heimers, W. Hoffmann, A. Nahrman, H. Schröder, P. Tomalik, H. Ziggel:.....	48
<b>Eröffnung und Begrüßung</b> D. Arndt.....	5	<b>Zur Bedeutung von Schwesterchromatid austauschen (SCE) als Indikator für mutagene Belastungen im Populationsmonitoring</b> G. Speit, A. Hartmann:.....	52
<b>Chromosomenaberrationen in menschlichen peripheren Lymphozyten und ihre Bedeutung für das zytogenetische Populationsmonitoring</b> G. Ober:.....	6	<b>Chromosomenanalytische Untersuchungen nach chemischer Exposition: Methodische Aspekte: Eine kritische Bewertung von Literaturdaten</b> G. Wolf:.....	58
<b>Einfluß von Kulturmedium und Serum auf die Induktion von Chromosomenaberrationen in einmalig und fraktioniert bestrahlten menschlichen Lymphozyten</b> P. Virsik-Peuckert:.....	10	<b>Genotoxische Endpunkte als Indikatoren einer beruflich bedingten Chemoexposition</b> E. Hüttner:.....	65
<b>Methodische Gesichtspunkte bei Untersuchungen zur biologischen Dosimetrie</b> W. Scheid, J. Weber, H. Traut:.....	15	<b>Chromosomenanalytische Untersuchungen bei Textileinigern: Vergleich von Literaturdaten und eigenen Untersuchungen unter besonderer Berücksichtigung methodischer Aspekte</b> H. Fender:.....	71
<b>Stabile Chromosomenaberrationen: Definition, Entstehung, Screening und Relevanz für das Biomonitoring</b> B. Heinze:.....	18	<b>Aussagefähigkeit der Frequenz von Chromosomenaberrationen, Schwesterchromatid austauschen und Mikrokernen im Vergleich zur Häufigkeit von HPRT-Mutanten und Hämoglobin-Addukten bei Exposition mit Ethylenoxid (EO)</b> T. Grummt:.....	77
<b>Analyse von Strahlenschäden in menschlichen Metaphasechromosomen nach Fluoreszenz in situ Hybridisierung</b> C. Cremer, M. Hausmann, S. Popp, T. Cremer:....	27	<b>Über das Spektrum möglicher statistischer Methoden für die Analyse zytogenetischer Parameter</b> W.-D. Heller, E. Sennewald:.....	82
<b>Die Quantifizierung von Strahlenexpositionen mit Hilfe der Chromosomenanalyse</b> M. Bauchinger:.....	33	<b>Verzeichnis der Teilnehmer</b> .....	88
<b>Mikronuklei in Lymphozyten als biologisches Dosimetrie-System</b> W.-U. Müller, C. Streffer, K. Wuttke, S. Dietl, W. Boecker:.....	39		
<b>Zytogenetisches Populationsmonitoring im Zusammenhang mit dem Reaktorunfall in Tschernobyl</b> G. Stephan, U. Oestreicher:.....	43		

## Analyse von Strahlenschäden in menschlichen Metaphasechromosomen nach Fluoreszenz in situ Hybridisierung

C. Cremer, M. Hausmann, S. Popp, T. Cremer

### 1 Problemstellung

Die zytogenetische Analyse von strahleninduzierten Chromosomenaberrationen in menschlichen Zellen erlaubt eine Dosisabschätzung, insbesondere in solchen Fällen, in denen zuverlässige Messungen der physikalischen Dosis nicht erhältlich sind ("biologische Dosimetrie" im allgemeinen Sinn, vgl. (29)). Für Routinezwecke ist derzeit die mikroskopische Analyse dizentrischer Chromosomen (biologische Dosimetrie im engeren Sinn) nach homogener Färbung (Absorption) fest etabliert; die Anwendung automatischer Bildanalyseverfahren zur Detektion solcher Aberrationen hat in den letzten Jahren große Fortschritte gemacht.

Methoden zur raschen, möglichst automatischen, Erkennung von Translokationen könnten den Anwendungsbereich der zytogenetischen Analyse von Strahlenschäden erheblich erweitern. Stammzellen ohne dizentrische Chromosomen, aber mit strahleninduzierten reziproken Translokationen haben vermutlich meist ein normales oder ein wesentlich weniger reduziertes Proliferations- und Differenzierungsvermögen als Zellen mit dizentrischen Chromosomen. Translokationen könnten somit besonders nützlich sein zur Abschätzung einer Einzeldosis viele Jahre später oder auch zur Analyse kumulativer Wirkungen von langfristigen multiplen oder chronischen Expositionen. Aufgrund der statistischen Erfordernisse sind Verfahren zur visuellen Translokationsanalyse von gebänderten Chromosomen für Routineerfordernisse wenig brauchbar. Die Entwicklung automatischer Bildanalysemethoden zum Nachweis strahleninduzierter Translokationen an gebänderten Chromosomen ist immer noch mit ganz erheblichen Problemen verbunden.

### 2 Neuer Ansatz: Fluoreszenz in situ Hybridisierung

Die in den letzten Jahren rasch vorangeschrittene Entwicklung nicht-radioaktiver in situ Hybridisierungstechniken, insbesondere die Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH), erlaubt einen vielversprechenden neuen Ansatz für die rasche, eventuell automatische Erkennung von Aberrationen, insbesondere auch von Translokationsereignissen. Diese neue Strategie der Chromosomenanalyse basiert auf der spezifischen Markierung der interessierenden Chromosomen oder Chromosomenregionen mit geeigneten

DNS-Proben (Übersichten siehe 3 und 20).

Dabei werden geeignete DNS-Sequenzen markiert, etwa mit Biotin oder Digoxigenin, oder es werden Nukleotide in die Sequenzen eingebaut, die direkt fluorochromiert sind, etwa mit Fluorescein (FITC). Diese DNS-Proben werden spezifisch in situ an das interessierende Chromosomenmaterial hybridisiert; die DNS-Proben binden spezifisch an die zu ihnen komplementären DNS-Abschnitte („Targets“). Die Hybridisierungsorte können mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern sichtbar gemacht werden, im Falle der Direktmarkierung der DNS-Proben auch unmittelbar. Die gleichzeitige Verwendung von verschiedenen markierten DNS-Proben erlaubt die Vielfarben-Fluoreszenzmarkierung verschiedener Targets in derselben Zelle (23, 25, 28, 31, 34, 36).

Im Jahre 1986 zeigten Pinkel et al. (33), daß die FISH-Technik einen raschen visuellen Nachweis von strahleninduzierten Translokationen in Metaphasen von Nager-Mensch Hybridzellen ermöglichte. Die FISH-Markierung der menschlichen Chromosomen in diesen Hybridzellen erfolgte mit menschlicher gesamt-genomischer DNS als Probenmaterial. Ein Interspezies-Translokationschromosom war anhand eines Zweifarbenmusters leicht zu identifizieren. Hybridzellen wurden verwendet, weil damals eine geeignete FISH-Färbung spezifischer Chromosomen in menschlichen Zellen noch nicht möglich war. Eine visuelle Analyse strahleninduzierter Translokationen in menschlichen Zellen mit der Fluoreszenzhybridisierung repetitiver DNS-Proben (*zentromer-telomern*-nahe Region von Chromosom 1) wurde von Lucas et al. 1989 (26) durchgeführt.

Im Hinblick auf eine erweiterte (beliebige Chromosomen) und vereinfachte (visuell klarere, leichter automatisierbare) Translokationsanalyse erschien es wünschenswert, mit der FISH-Technik spezifische Chromosomen in menschlichen Zellen entlang ihrer ganzen Länge markieren zu können. Dieses Ziel konnte mit DNS-Bibliotheken einzelner menschlicher Chromosomen realisiert werden. Diese werden erhalten, indem Chromosomen eines bestimmten Typs mit Laser-fluoreszenzaktivierten Sortierungsverfahren (Übersicht siehe (4, 5)) fraktioniert und deren DNS amplifiziert werden (6, 12, 13). Derartige spezifische DNS-Bibliotheken sind jetzt für alle menschlichen Chromosomen kommerziell erhältlich.

Für die Durchführung der FISH werden Mischungen der DNS-Sequenzen aus der gewünschten Bibliothek wie oben beschrieben markiert und hybridisiert. Dabei ist jedoch zu beachten, daß chromosomenspezi-

fische DNS-Bibliotheken viele repetitive DNS-Sequenzen enthalten, die auch an komplementäre Stellen anderer als der Target-Chromosomen binden. In-situ-Suppressions (CISS-) Hybridisierungsprotokolle („Chromosome Painting“) erlaubten es, die Signale solcher repetitiver Sequenzen wirksam zu unterdrücken (9, 21, 22, 32). Auf diesem Wege ist es möglich geworden, in menschlichen Zellen ganze Chromosomen oder beliebige chromosomale Subregionen bis hinunter zu einzelnen Genen und intragenischen Regionen spezifisch anzufärben (11, 20).

### 3 Anwendung von „Chromosome Painting“-Verfahren zur Detektion strahleninduzierter Translokationen

„Chromosome Painting“-Verfahren zum Nachweis strahleninduzierter Translokationsereignisse in menschlichen Zellen sind in den letzten Jahren von verschiedenen Gruppen angewandt worden (10, 16, 23, 29, 35, 38). Als Beispiel sei näher auf die Untersuchungen von Cremer et al. (1990) (10) eingegangen: Hier wurde eine CISS-Hybridisierung von biotinylierten DNS-Sequenzen der chromosomenspezifischen DNS-Bibliotheken von Chromosom 1 und 7 verwendet, um Aberrationen (insbesondere Translokationen) dieser Chromosomen in Co-60-Gamma bestrahlten menschlichen Lymphozyten des peripheren Blutes nachzuweisen. Eine zentromer-nahe repetitive DNS-Probe (pUC 1.77; Bindung an 1q12) wurde zusätzlich zur Detektion von dizentrischen Chromosomen eingesetzt.

Die Bestrahlung (Dosis = 0, 2, 4, 8 Gy) erfolgte 5 h nach Stimulation mit Phytohämagglutinin; die Analyse der Metaphaseplatten wurde nach weiteren 67 h Kulturdauer durchgeführt. Die visuelle mikroskopische Analyse (FITC-Fluoreszenz der markierten Regionen; Gegenfärbung mit Propidiumjodid) ergab (im Rahmen der Auswertegenauigkeit) einen linearen Anstieg des Prozentsatzes an spezifisch markierten aberranten Chromosomen 1 und 7 mit dem Quadrat der Dosis (Abbildung 1).

Bemerkenswert ist der beobachtete erhebliche Unterschied zwischen dem Prozentsatz an Translokationen und dem Prozentsatz an dizentrischen Chromosomen (Anstieg der Ausgleichsgeraden in Abb. 1: für Translokationen = Kurve 2: 0.58; für dizentrische Chromosomen = Kurve 4: 0.16). Dieser Unterschied erscheint hoch, auch wenn man die relativ lange Kulturdauer (insgesamt 72 h) berücksichtigt, denn bei den verwendeten hohen Dosen ist eine erhebliche Verlängerung der Zyklusdauer zu erwarten (siehe 37). Analoge Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen an in vitro bestrahlten menschlichen Lymphozyten ergaben ebenfalls eine erheblich höhere Rate an Translokationen im Vergleich zu dizentrischen Chromosomen, obwohl die Kulturdauer hier nur 46

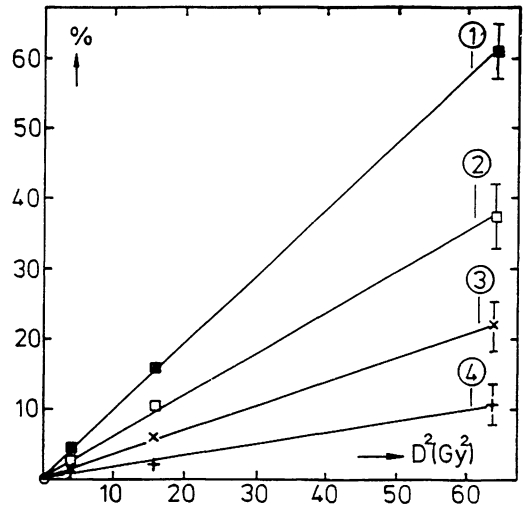


Abb. 1:

Dosis-Effekt-Beziehungen für Co-60-Gamma-Strahlen induzierte Aberrationen von FISH gefärbten Metaphasechromosomen von Lymphozyten. [aus (10)]  
 Abszisse: Quadrat der Dosis  $D$  [Gy<sup>2</sup>]; Ordinate: Akkumulierte Prozentsätze (Anzahl der FISH-markierten Chromosomen mit Aberrationen / Gesamtzahl der FISH-markierten Chromosomen \* 100 %)

Kurve 1 = alle Typen von aberranten Chromosomen (Markierung von Chromosom 1, 7 und der Region 1q12)

Kurve 2 = monozentrische Chromosomen mit Translokationen und Insertionen (markiertes Material von Chromosom 1 und 7)

Kurve 3 = Deletionen und Fragmente (Markierung von Chromosom 1, 7 und der Region 1q12)

Kurve 4 = dizentrische Chromosomen (Markierung von Chromosom 1, 7 und der Region 1q12)

oder 48 h betrug (29, 38) „Chromosome Painting“-Verfahren scheinen demnach eine im Vergleich zu der Analyse von dizentrischen Chromosomen erhöhte Sensitivität zu besitzen, und sie werden auch aus diesem Grunde als weiterer Endpunkt in der biologischen Dosimetrie empfohlen (29).

Eine nähere Untersuchung der Gründe für diese Unterschiede erscheint wünschenswert. Protokolle zur Mehrfarbenfluoreszenz *in situ* Hybridisierung könnten die gleichzeitige, sichere Detektion von stabilen (Translokationen) und instabilen (dizentrische Chromosomen) Aberrationen erheblich verbessern. Auch die Sensitivität könnte auf diese Weise gesteigert werden, denn es können mehr Chromosomen pro Zelle in die Analyse einbezogen werden (25, 34). Bei viele Jahre zurückliegenden Expositionen (oder bei chronischen Expositionen, bei denen der größte Teil der akkumulierten Dosis lange Zeit zurückliegt) ist eine fortschreitende Eliminierung von Zellen mit di-

zentrischen Chromosomen zu erwarten. Eine simultane Analyse von „stabilen“ und „instabilen“ Chromosomenaberrationen dürfte insbesondere nützlich sein, um die Höhe von Strahlenexpositionen auch dann abzuschätzen, wenn die Exposition bereits lange zurückliegt oder wenn der Zeitpunkt oder der Zeitraum einer solchen Exposition unklar ist. Aus dem Verhältnis von „stabilen“ und „instabilen“ Chromosomenaberrationen lassen sich gegebenenfalls Rückschlüsse über Zeitraum und Höhe auch lange zurückliegender Strahlenexpositionen gewinnen. Eine solche erweiterte Analyse dürfte insbesondere bei der Untersuchung akuter Expositionen von Bedeutung sein.

Als erste Anwendung der FISH-Methode zur kumulativen Erfassung von Strahlenschäden *in vivo* (35) wurden Chromosomenaberrationen in Lymphozyten von zwei Patienten gemessen, die vor 42 und 47 Jahren mit dem das radioaktive Nuklid Th-232 enthaltenden Röntgenkontrastmittel Thorotrast behandelt worden waren (Ablagerungen hauptsächlich in Leber, Milz und Knochenmark). Die aufgrund von Ganzkörpermessungen (Tl-208) abgeschätzten Dosisleistungen betragen etwa 4 cGy pro Jahr.

Zur Kontrolle dienten Lymphozyten von nicht-Thorotrast-exponierten, etwa gleichaltrigen Patienten, die in demselben Krankenhaus zur selben Zeit behandelt worden waren. Die mikroskopische Analyse von über 8000 spezifisch markierten Metaphasechromosomen (CISS-Hybridisierung von Chromosom 1 bis 5) ergab für die Thorotrast-Patienten einen signifikant erhöhten Prozentsatz von aberranten Chromosomen insgesamt sowie von Translokationen (Abb. 2).

In einer weiteren Anwendung wurden Lymphozyten von Überlebenden des Atombombenabwurfes auf Hiroshima untersucht (K. Tanaka, S. Popp, T. Cremer, unveröffentlichte Ergebnisse). Dabei wurden verschiedene Chromosomentypen in verschiedenen Fluoreszenzfarben mittels CISS-Hybridisierung markiert, wobei direkt fluorochromierte kommerziell erhältliche Proben aus chromosomen-spezifischen DNA-Bibliotheken verwendet worden waren.

#### 4 Ansätze zur Automatisierung

##### 4.1 „Chromosome Painting“ mit einer Fluoreszenzfarbe

Bei dem „Chromosome Painting“ Ansatz beruht das Auswertungsprinzip (im Falle von nur einem FISH-markierten Chromosomentyp) darauf, daß eine normale Metaphaseplatte zwei FISH-markierte Flächen zeigt, während in einer Metaphaseplatte mit Translokationen von FISH-markiertem Chromosomenmaterial drei oder mehr solcher markierter Flächen sichtbar sind.

Demnach kann eine Zelle aufgrund der Anzahl der markierten Targets als „normal“ oder „aberrant“

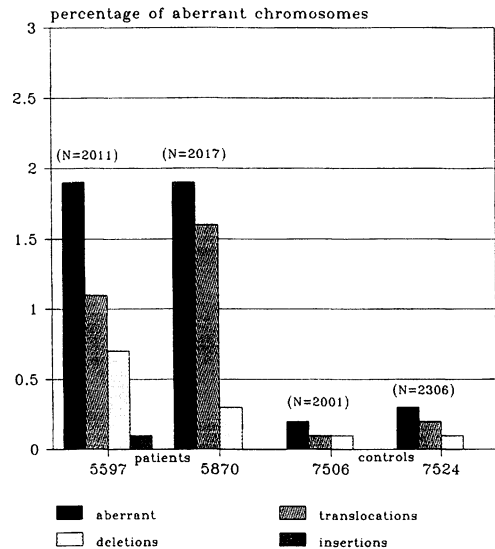


Abb. 2:

Prozentsätze von FISH-markierten aberranten Chromosomen (Anzahl der FISH-markierten Chromosomen mit Aberrationen / Gesamtzahl der FISH-markierten Chromosomen \* 100 %) von zwei Thorotrast-Patienten (Nr. 5597 und Nr. 5870) und zwei Kontrollpersonen (Nr. 7506 und Nr. 7524) (N: Anzahl der jeweils klassifizierten FISH-markierten Chromosomen) [aus (35)]

klassifiziert werden. Für eine automatische Bildanalyse hat dieser Ansatz gegenüber früheren den wesentlichen Vorteil, daß statt 46 (oder mehr) Objekten pro Zelle mit jeweils komplexer Morphologie (gebänderte Chromosomen) jetzt nur noch sehr wenige Objekte mit sehr einfacher Morphologie (gefärbte Flächen) segmentiert und bildanalytisch klassifiziert werden müssen (Abb. 3).

Dies kann mit relativ einfachen (und daher schnellen) Algorithmen erreicht werden, wie etwa mit individuell angepaßten Schwellwerten aufgrund der in einer Zelle registrierten Grauwertkontraste, mit Laplace-Filtern, mit Intensitätsanalysen oder mit Analysen der lokalen Krümmung. Bei einer automatischen Bildanalyse fotografischer Aufnahmen von Metaphaseplatten mit gut markierten Chromosomen („Chromosome Painting“ eines Chromosomentyps) konnte eine Korrektur-Klassifikationsrate von besser als 90 % erreicht werden (7). Die pro Zelle benötigten Rechenzeiten auf einem Personal Computer betragen hierbei wenige Sekunden.

Für die praktische Anwendbarkeit von automatischen Analyseverfahren sind direkte Aufnahme- und Digitalisierungsverfahren erforderlich. Unserer Erfahrung nach geeignete Systeme sind gekühlte CCD-Kameras

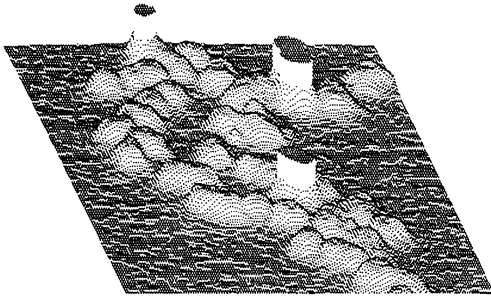


Abb. 3:  
Pseudo-3D-Darstellung einer Lymphozyten-Metaphasenplatte mit einer Translokation von Material von Chromosom 1, nach „chromosome painting“ mit einer DNA-Bibliothek von Chromosom 1 und Hervorhebung („Tafelberge“) der FISH markierten Regionen durch bildanalytische Verfahren im digitalisierten Mikroskopbild [aus (11)]

(etwa Photometrics oder Kappa), bei denen die Bildaufnahme von Zellen mit FISH-markierten Chromosomen innerhalb einiger Sekunden abgeschlossen werden kann.

Bei der automatischen Analyse der Bilder ist zu beachten, daß die Intensität von Markierungen in verschiedenen Zellen stark variieren kann (etwa um eine Größenordnung); in derselben Zelle sind die Intensitätsunterschiede homologer Markierungen jedoch vergleichsweise gering, so daß die Quotienten der Fluoreszenzintensitäten (nach Hintergrundkorrektur) nahe an 1 liegen (30) (Abb. 4). Dies läßt auch einfache Algorithmen (s.o.) erfolgversprechend erscheinen.

#### 4.2 „Chromosome Painting“ mit mehreren Farben

Eine automatische Analyse von Zellen mit verschiedenfarbigen FISH-markierten Targets setzt eine automatische Identifizierung aufgrund von Farbinformation voraus. Bei reinen Farben (etwa blaue AMCA-Fluoreszenz für Target No. 1; grüne FITC-Fluoreszenz für Target No. 2; rote TRITC-Fluoreszenz für Target No. 3) ist dies etwa mit geeigneten Filtern im Strahlengang erreichbar. Für jedes Objekt werden blaue, grüne und rote Fluoreszenz-Intensitäten direkt als getrennte Information aufgenommen und diese drei verschiedene Targettypen können identifiziert werden. Sollen mehr als drei Targettypen separat allein aufgrund von Farbinformation identifizierbar sein, so sind Vielfarben-FISH-Protokolle anzuwenden. Diese beruhen etwa auf der geeigneten Mischung von verschiedenen fluorochromierten DNS-Proben (Mischungsverhältnis  $p$ ) für dasselbe Target. Das gemessene Verhältnis  $r$  der Fluoreszenzintensitäten (etwa FITC-Fluoreszenz/AMCA-Fluoreszenz) dient dann der Zuord-

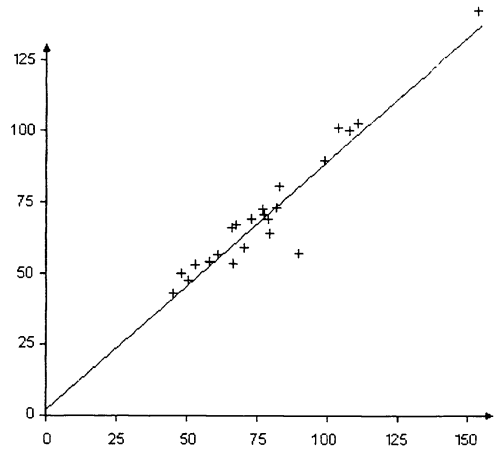


Abb. 4:  
Beispiel für die direkte Intensitätsmessung einer FISH-markierten Region (1q12) in 23 nicht selektierten Metaphaseplatten von menschlichen Lymphozyten (DNA-Probe pUC 1.77) mithilfe einer gekühlten Farb-CCD Kamera (Kappa). Abszisse: Intensität  $h_1$  (willkürliche Einheiten) der hellsten 1q12-Markierung einer Zelle (nach interaktiver Subtraktion der Hintergrundfluoreszenz analog zu (30)); Ordinate: Intensität  $h_2$  (willkürliche Einheiten) der zweithellsten 1q12-Markierung einer Zelle (nach interaktiver Subtraktion der Hintergrundfluoreszenz analog zu (30)). Ein Punkt stellt das Meßergebnis der beiden homologen Chromosomen in derselben Zelle dar. Mittelwert von  $h_1/h_2$ :  $1.12 \pm 0.14$  (SD); Variationskoeffizient  $CV = SD/\text{Mittelwert}$ : 12,5 % [K. Aldinger, D. Celeda, F.M. Haar, M. Durm, M. Hausmann, C. Cremer, unveröffentlichte Ergebnisse]

nung eines fluoreszierenden Objektes zu einem bestimmten Chromosomentyp (oder einer bestimmten DNS-Sequenz). Quantitative Messungen von Fluoreszenzverhältniswerten  $r$  von FISH-markierten Chromosomen nach „Chromosome Painting“ mit verschiedenen  $p$ -Werten ergab, daß bei FITC/TRITC-Markierung eine eindeutige Identifizierung von  $N=5$  verschiedenen Targettypen pro Zelle aufgrund der gemessenen Zweifarben  $r$ -Werte möglich ist (28). Ganz ähnliche Ergebnisse ( $N=5$ ) wurden bei mikrofluorimetrischen Messungen an AMCA/FITC-markierten Chromosomen erzielt (T. Vollweiler, M. Hausmann, R. Nobiling, C. Cremer, unveröffentlichte Ergebnisse). Demnach erscheint es grundsätzlich möglich, durch geeignete Kombination von Dreifarbenmarkierungen (etwa AMCA/FITC/TRITC) bis zu  $N = 25$  verschiedene Targettypen in derselben Zelle aufgrund quantitativer Messungen unterscheiden zu können. Eine automatische Bildanalyse könnte somit so ablaufen, daß die Bilder für die verschiedenen  $r$ -Werte getrennt abgespeichert und nach den oben beschriebenen Grundideen evaluiert werden.

## 5 Ausblick

Die Kombination von „Chromosome Painting“-Verfahren mit einer oder mehreren Farben, schneller automatischer Aufsuche von Metaphaseplatten (27), Registrierung des Fluoreszenzbildes mit hochsensitiven, gekühlten CCD-Kameras, und schnellen Bildanalyseprozeduren (falls erforderlich mit Multiprozessorsystemen) sollte es möglich machen, eine automatische Klassifizierung von strahleninduzierten Translokationen sowie anderen durch „Chromosome Painting“-Verfahren erkennbaren strukturellen und numerischen Aberrationen durchzuführen. Nach den bisher gesammelten Erfahrungen scheint ein Zeitbedarf (pro Zelle) von 5 sec für das Auffinden, 3 sec für die Aufnahme und Digitalisierung des Bildes (mit einer Farb-CCD-Kamera), sowie 2 sec für die automatische Klassifikation der betreffenden Metaphaseplatte als „normal“, „aberrant“, oder „nicht auswertbar“, realisierbar zu sein. Ein derartiges System sollte demnach pro Tag (8 h Betriebsdauer) etwa 3000 Metaphaseplatten auswerten können. Zur Verminderung der Anzahl an „falsch positiven“ Zellen, sollten die als „aberrant“ klassifizierte Zellen von einem erfahrenen Zytogenetiker noch einmal visuell klassifiziert werden. Bei einer hohen Richtig-Klassifikationsrate sollte insbesondere im Bereich niedriger Dosen die damit verbundene menschliche Arbeit parallel zu der automatischen Klassifikation durchgeführt werden können. Geht man von einem Zeitbedarf von etwa 10 min für eine klassische Bänderungsanalyse aus, so würde eine Translokationsanalyse von 3000 Metaphaseplatten, etwa 500 Arbeitsstunden erfordern.

Eine darüber hinaus gehende, wesentliche weitere Beschleunigung der Translokationsanalyse von Metaphasechromosomen peripherer Lymphozyten könnte durch fluoreszenzaktivierte slit-scan flußphotometrische Verfahren angestrebt werden (5, 18, 24). Bei diesem Verfahren werden mitotische Zellen mechanisch aufgebrochen, die Chromosomen werden in Suspension geeignet fluoreszenzgefärbt und im Slit-Scan-Flußphotometer in einem hydrodynamisch fokussierten Flüssigkeitsstrahl nacheinander durch den Fokus eines bandförmig auf wenige  $\mu\text{m}$  Breite fokussierten Laserstrahls vorbeigeleitet. Aufgrund der hydrodynamischen Fokussierung werden die Chromosomen mit ihrer Längsachse in Richtung des Flüssigkeitsstrahls und senkrecht zu dem abtastenden Laserstrahl orientiert. Die lokal längs der Chromosomenachse angeregte Fluoreszenz wird durch Photomultiplier registriert und führt zu einem zeitlich aufgelösten Slit-Scan-Profil, das der lokalen Fluoreszenzverteilung auf dem Chromosom entspricht.

Im Heidelberger Slit-Scan-Flußphotometer (14, 17) passieren die Chromosomen den Laserstrahl mit einer Geschwindigkeit von etwa 10 m/sec. Somit können bis zu mehreren hundert Chromosomen pro Sekunde registriert werden. Die Breite des Laserprofils

am Kreuzungspunkt mit den Chromosomen wurde zu etwa 2  $\mu\text{m}$  berechnet. Messungen mit Fluoreszenzbeads (3  $\mu\text{m}$  Durchmesser) ergaben eine experimentelle Auflösungsgrenze bei etwa 3  $\mu\text{m}$ . Simulationsrechnungen zeigten, daß dies für eine Erfassung von Zentromerindex (DNS-Fluoreszenzfärbung), dizentrischen Chromosomen sowie von größeren Translokationen („Chromosome Painting“) ausreichend sein sollte, sofern die präparativ bedingte Objektlänge im Bereich von 10  $\mu\text{m}$  liegt.

Die erhaltenen Profile können mit einem PC-Programm mit einer Rechenzeit von weniger als 1 Millisekunde klassifiziert werden (19). Dies würde im Prinzip eine Analyserate von mehreren hundert Chromosomen pro Sekunde erlauben, entsprechend einem Äquivalent von mehreren 10.000 Zellen pro Stunde. Zur Steigerung der Zuverlässigkeit der Slit-Scan-Analyse, ist beabsichtigt, das Heidelberger Slit-Scan-Flußzytometer zu einem Slit-Scan-Sorter weiterzuentwickeln. Dies würde es erlauben, aufgrund ihres Slit-Scan-Profiles als aberrant klassifizierte Chromosomen für eine nachfolgende mikroskopische Analyse auf Objektträger zu sortieren (3).

Eine wichtige Voraussetzung für eine Anwendung von Slit-Scan-Verfahren auf die Analyse FISH-markierter Chromosomen ist die Verbesserung der Fluoreszenzhybridisierung in Suspension (15, 18). Insbesondere muß hier die Zahl der Waschschriffe während der Präparation verringert werden, denn diese erfordern bei Chromosomen in Suspension jeweils Zentrifugationen, die leicht zur Aggregation und somit zu erheblichen Materialverlusten führen. Hybridisierungsverfahren ohne denaturierende chemische Agentien (1) haben hier zu ermutigenden Ergebnissen geführt (2).

Ein grundsätzlicher Nachteil von Slit-Scan-Methoden liegt darin, daß die zu analysierenden Chromosomen nicht mehr im Zellverband vorliegen. Demnach läßt sich hier lediglich der Prozentsatz an aberranten Chromosomen (= Zahl der aberranten Chromosomen / Gesamtzahl der analysierten Chromosomen  $\times$  100 %; siehe Abb. 1 und 2) insgesamt ermitteln. Derartige Verfahren werden daher vorzugsweise dort einsetzbar sein, wo andere Methoden (wie Bildanalyse von Metaphaseplatten) erst in zweiter Linie indiziert erscheinen (etwa als Vorscreeningtest bei Untersuchungen des zytogenetischen Populationsmonitorings).

Metaphaseplatten und isolierte Chromosomen lassen sich in großer Zahl aus Lymphozytenkulturen gewinnen. Eine Detektion von Strahlenschäden in menschlichen Interphasezellen nach Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung ist jedoch ebenfalls möglich, entweder direkt in den Zellkernen (10), oder mit „Chromosome Painting“ nach Induktion von PCC (premature chromosome condensation) in den zu untersuchenden Interphasezellen (16). Derartige Methoden einer Interphasezytogenetik (8) könnten von erheblichem Interesse dort sein, wo Lymphozytenkulturen nicht praktikabel sind.

## Literatur

1. Celeda, D., U. Bettag and C. Cremer (1992). A simplified combination of DNA probe preparation and fluorescence in situ hybridization. *Z. Naturforsch.*, 47c:739-747.
2. Celeda, D., U. Bettag and C. Cremer (1992). Fluorescence in situ hybridization of a repetitive DNA probe to human chromosomes in suspension. In: *Nonradioactive in situ Hybridization Application Manual*, Boehringer Mannheim, Mannheim, pp. 33-35.
3. Cremer, C., and T. Cremer (1992). Analysis of chromosomes in molecular tumor and radiation cytogenetics: approaches, applications, perspectives. *Eur. J. Histochem.*, 36:15-25.
4. Cremer, C., J. Dölle, M. Hausmann, F.F. Bier and P. Rohwer (1989). *Laser in cytometry: Applications in cytogenetics*. Ber. Bunsenges. Phys. Chem., 93:327-335.
5. Cremer, C., M. Hausmann, P. Zuse, J.A. Aten, J. Barths and H.-J. Bühring (1989). *Flow cytometry of chromosomes: Principles and applications in medicine and molecular biology*. *Optik*, 82:9-18.
6. Cremer, C., G. Rappold, J.W. Gray, C.A. Müller and H.H. Ropers (1984). Preparative dual beam sorting of the human Y chromosome and in situ hybridization of cloned DNA probes. *Cytometry*, 5:572-579.
7. Cremer, C., B. Remm, A. Bischoff and T. Vollweiler (1992). Automated detection of radiation-induced chromosome aberrations following fluorescence in situ hybridization. *J. Radiat. Res. (Japan)*, 33 (Suppl.):189-205.
8. Cremer, T., J.E. Landegent, H. Brückner, H.P. Scholl, M. Schardin, H.D. Hager, P. Devilec, P.L. Pearson and M. Van der Ploeg (1986). Detection of chromosome aberrations in the human interphase nucleus by visualization of specific target DNAs with radioactive and non-radioactive in situ hybridization techniques. *Diagnosis of trisomy 18 with probe L1.84*. *Hum. Genet.*, 74:346-352.
9. Cremer, T., P. Lichter, J. Borden, D.C. Ward and L. Manuclidis (1988). Detection of chromosome aberrations in metaphase and interphase tumor cells by in situ hybridization using chromosome specific library probes. *Hum. Genet.*, 80:235-246.
10. Cremer, T., S. Popp, P. Emmerich, P. Lichter and C. Cremer (1990). Rapid metaphase and interphase detection of radiation-induced chromosome aberrations in human lymphocytes by chromosomal suppression in situ hybridization. *Cytometry* 11:110-118.
11. Cremer, T., B. Remm, I. Kharboush, A. Jauch, J. Wienberg, E. Stelzer and C. Cremer (1991). Non-isotopic in situ hybridization and digital image analysis of chromosome in mitotic and interphase cells. *Rev. Eur. Technol. Biomed.*, 13:50-54.
12. Davies, K., B. Young, R. Elles, M. Hill and R. Williamson (1981). Cloning of a representative genomic library of the human X chromosome after sorting by flow cytometry. *Nature*, 293:374-376.
13. Van Dilla, M.A., and L.L. Deaven (1990). Construction of gene libraries for each human chromosome. *Cytometry*, 11:208-218.
14. Dölle, J., M. Hausmann and C. Cremer (1992). Nimmt in kurzer Folge Signale auf: VMEbus Rechner in der Chromosomenanalyse. *VMEbus*, 8/92:76-79.
15. Dudin, G., T. Cremer, M. Schardin, M. Hausmann, F. Bier and C. Cremer (1987). A method for nucleic acid hybridization to isolated chromosomes in suspension. *Hum. Genet.*, 76:290-292.
16. Evans, J.W., J.A. Chang, A.J. Giaccia, D. Pinkel and J.M. Brown (1991). The use of fluorescence in situ hybridization combined with premature chromosome condensation for the identification of chromosome damage. *Br. J. Cancer*, 63:517-521.
17. Hausmann, M., J. Dölle, A. Arnold, B. Stepanow, B. Wickert, J. Boscher, P.C. Popsu and C. Cremer (1992). Development of a two-parameter slit-scan flow cytometer for screening of normal and aberrant chromosomes: application to a karyotype of *Sus scrofa domestica* (pig). *Opt. Eng.*, 31:1463-1469.
18. Hausmann, M., G. Dudin, J.A. Aten, R. Heilig, E. Diaz and C. Cremer (1991). Slit scan flow cytometry of isolated chromosomes following fluorescence hybridization: An approach for on-line screening for specific chromosomes and chromosome translocations. *Z. Naturforsch.*, 46c:433-441.
19. Heilig, R., M. Hausmann, W. Rens, J.A. Aten and C. Cremer (1993). Time optimized analysis of slit scan profiles on a general purpose personal computer. *Comput. Appl. Biosc.* (in press).
20. Lichter, P., A.L. Boyle, T. Cremer and D. C. Ward (1991). Analysis of genes and chromosomes by non-isotopic in situ hybridization. *Genet. Anal. Techn. Appl.*, 8:24-35.
21. Lichter, P., T. Cremer, J. Borden, L. Manuclidis and D.C. Ward (1988). Delineation of individual human chromosomes in metaphase and interphase cells by in situ suppression hybridization using recombinant DNA libraries. *Hum. Genet.*, 80:224-234.
22. Lichter, P., T. Cremer, C.C. Tang, P.C. Watkins, L. Manuclidis and D.C. Ward (1988). Rapid detection of human chromosome 21 aberrations by in situ hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:9664-9668.
23. Lucas, J.N., A. Awa, T. Straume, M. Poggensee, Y. Kodama, M. Nakano, K. Ohtaki, H.-U. Weier, D. Pinkel, J.W. Gray and G. Littlefield (1992). Rapid translocation frequency analysis in human decades after exposure to ionizing radiation. *Int. J. Radiat. Biol.*, 61:830-835.
24. Lucas, J.N., J.C. Mullikin and J.W. Gray (1991). Dicentric chromosome frequency analysis using slit-scan flow cytometry. *Cytometry*, 12:316-322.
25. Lucas, J.N., M. Poggensee and T. Straume (1993). Translocations between two specific human chromosomes detected by three-color „chromosome painting“. *Cytogenet. Cell Genet.*, 62:11-12.
26. Lucas, J.N., T. Tenjin, T. Straume, D. Pinkel, D. Moore II, M. Litt and J.W. Gray (1989). Rapid human chromosome aberration analysis using fluorescence in situ hybridization. *Int. J. Radiat. Biol.*, 56:35-44.
27. Lundsteen, C., and J. Piper (eds.) (1989). *Automation of Cytogenetics*, Springer-Verlag, Berlin.
28. du Manoir, S., M.R. Speicher, S. Joos, E. Schröck, S. Popp, H. Döhner, G. Kovacs, M. Robert-Nicoud, P. Lichter and T. Cremer (1993). Detection of complete and partial chromosome gains and losses by comparative genomic in situ hybridization. *Hum. Genet.*, 90:590-610.
29. Natarajan, A.T., R.C. Vyas, F. Darroudi and S. Vermeulen (1992). Frequencies of X-ray-induced chromosome translocations in human peripheral lymphocytes as detected by in situ hybridization using chromosome-specific DNA libraries. *Int. J. Radiat. Biol.*, 61:199-203.
30. Nederlof, P.M., S. Van der Flier, A.K. Raap and H.J. Tanke (1992). Quantification of inter- and intra-nuclear variation of fluorescence in situ hybridization signals. *Cytometry*, 13:831-838.
31. Nederlof, P.M., S. Van der Flier, J. Wiegant, A.K. Raap, H.J. Tanke, J.S. Ploem and M. Van der Ploeg (1990). Multiple fluorescence in situ hybridization. *Cytometry*, 11:126-131.
32. Pinkel, D., J. Landegent, C. Collings, J. Fuscoe, R. Segraves, J. Lucas and J.W. Gray (1988). Fluorescence in situ hybridization with human chromosome-specific libraries. Detection of trisomy 21 and translocations of chromosome 4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:9138-9142.
33. Pinkel, D., T. Straume and J.W. Gray (1986). Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitive, fluorescence in situ hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83:2934-2938.
34. Popp, S., and T. Cremer (1992). Development of a biological dosimeter for translocation scoring based on two color fluorescence in situ hybridization of chromosome subsets. *J. Radiat. Res. (Japan)*, 33 (Suppl.):61-70.
35. Popp, S., B. Remm, M. Hausmann, H. Lührs, G. Van Kaick, T. Cremer and C. Cremer (1990). Towards a cumulative biological dosimeter based on chromosome painting and digital image analysis. *Kerntechnik*, 55:204-210.
36. Ried, T., A. Baldini, T.C. Rand and D.C. Ward (1992). Simultaneous visualization of seven different DNA probes by in situ hybridization using combinatorial fluorescence and digital microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:1388-1392.
37. Schreiber, G.A., W. Beisker, H. Braselmann, M. Bauchinger, K.W. Bögl and M. Nüsse (1992). An automated flow cytometric micronucleus assay for human lymphocytes. *Int. J. Radiat. Biol.*, 62:695-709.
38. Schmid, E., H. Zitzelsberger, H. Braselmann, J.W. Gray, and M. Bauchinger (1992). Radiation induced chromosome aberrations analysed by fluorescence in situ hybridization with a triple combination of composite whole chromosome-specific DNA probes. *Int. J. Radiat. Biol.* 6:673-678.