

# In situ Hybridisierung

eine Methode zum direkten und spezifischen Nachweis von Nukleinsäuren (DNA und RNA) in Gewebe, Zellen, Zellkompartimenten und Chromosomen

# Was kann damit erreicht werden?

- direkte Lokalisation von Genen und anderen DNA-Sequenzen in Chromosomen
- direkter Nachweis von RNA (und damit Genexpression) in Geweben und Zellen
- Nachweis von Krankheitserregern (z. B. Viren) in Geweben und Zellen
- Identifizierung von Chromosomen durch spezifische „Anfärbung“ („painting“)

# Voraussetzungen:

- gute Chromosomen- oder Gewebspräparate
- markierte DNA/RNA ( z. B. radioaktiv oder mit Fluoreszenzfarbstoffen)
- Nukleinsäure im Gewebe muss noch erhalten sein
- DNA muss denaturiert sein
- histologische Strukturen dürfen nicht zerstört sein

# Markierung:

- die Markierung erfolgt im Allgemeinen durch Einbau modifizierter (deoxy)-Nukleotide
- direkte Markierung durch chemische Kopplung möglich

# Markierung:

- **radioaktiv:** H3, S35, P32, C14

Nachteil: Nachweise nur mittelbar durch Überziehen mit Film möglich

Vorteil: durch Wahl der Expositionszeit kann die Nachweisempfindlichkeit bestimmt werden

# In situ Hybridisierung mit radioaktiv markierter Satelliten DNA



**Figure 12-9** Autoradiographic localization of simple-sequence mouse DNA to the centromeres. A radioactive probe for simple-sequence DNA was added to chromosomes whose DNA had been denatured. (Note that all mouse chromosomes have their centromeres at one end.) (From M. L. Pardue and J. G. Gall, *Science* 168, 1970, 1356.)

# Markierung:

- **nicht-radioaktiv:** z. B. Biotin oder Digoxigenin

Nachteil: begrenzte Nachweisempfindlichkeit

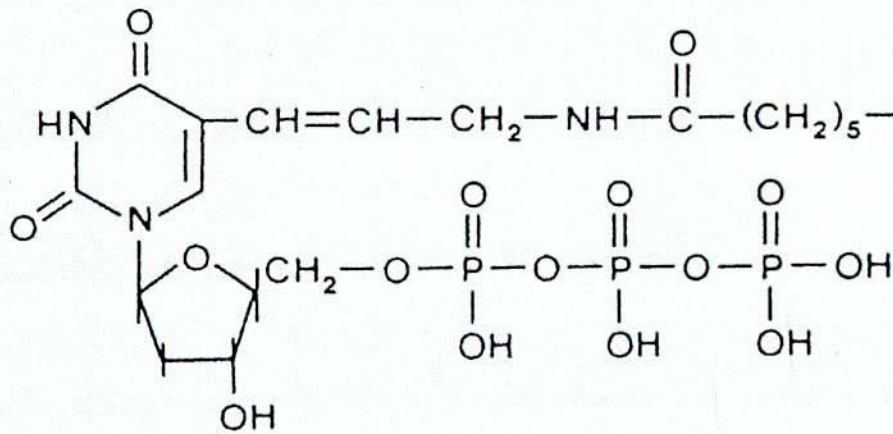
Vorteil: „direkte“ Nachweismöglichkeit  
z. B. durch Antikörper

# Fluoreszenz in situ Hybridisierung „FISH“

- schnell
- empfindlich
- direkter Nachweis der markierten Sonde
- nur mit relativ teurem  
Fluoreszenzmikroskop möglich

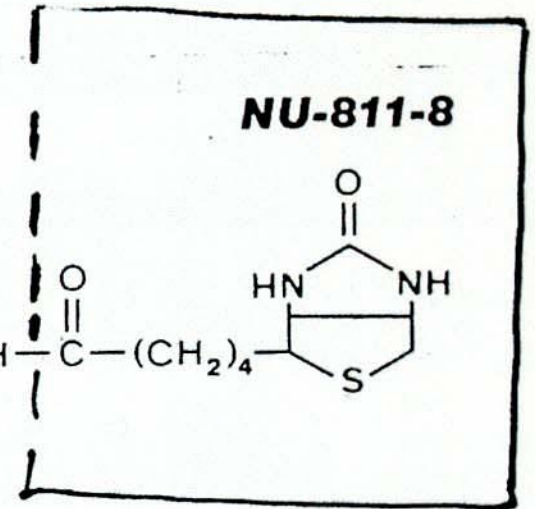
# Markierung durch Einbau modifizierter dNTPs: mit Biotin

**Bio-16-dUTP**



Biotin

**NU-811-8**

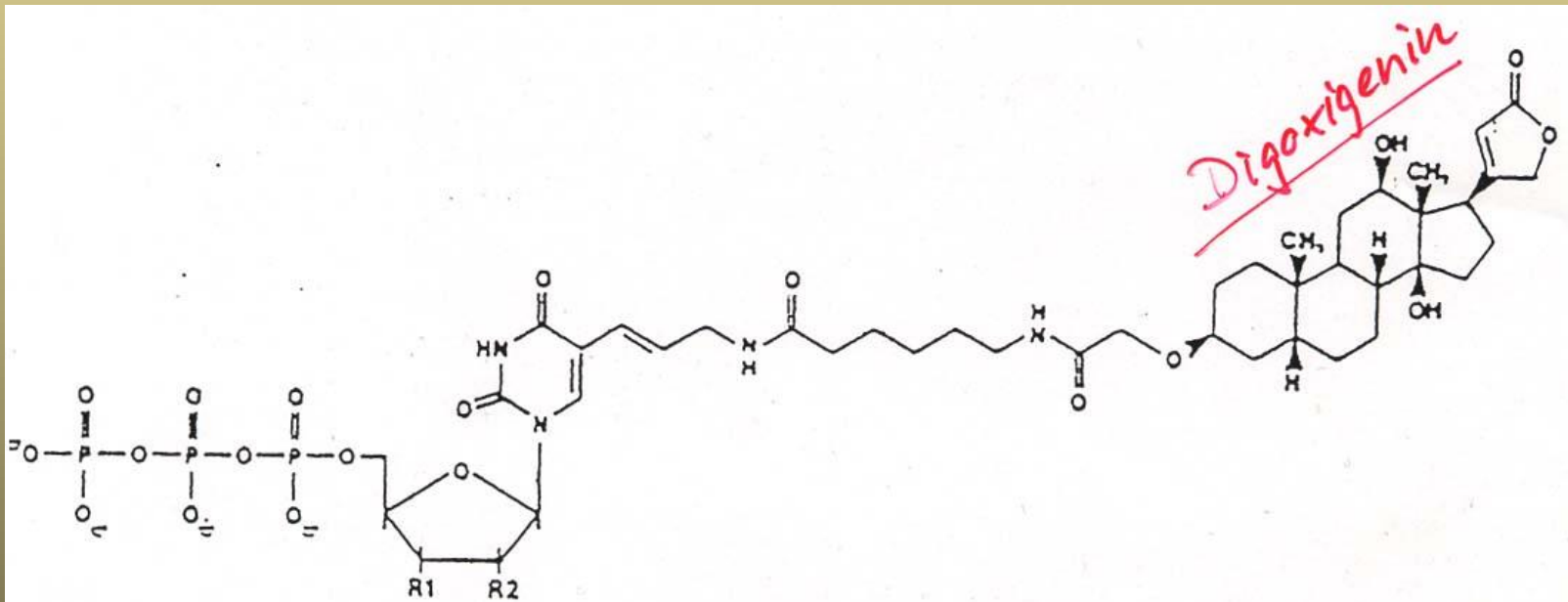


5-[N-[N-(biotinyl-ε-aminocaproyl)-γ-aminobutyryl]-3-aminoallyl]-deoxyuridine triphosphate

Molecular weight: 945

Formula: C<sub>33</sub> H<sub>54</sub> N<sub>7</sub> O<sub>18</sub> P<sub>3</sub> S (free acid)

# Markierung durch Einbau modifizierter dNTPs: Digoxigenin



DIG-UTP (R1 = OH, R2 = OH)

DIG-dUTP (R1 = OH, R2 = H)

DIG-ddUTP (R1 = H, R2 = H)

# Markierung:

- **Fluoreszenzmarkierung:** z. B. Fluorescein, Rhodamin, Cy5, Cy3, Alexa  
Nachteil: begrenzte Nachweisempfindlichkeit  
Vorteil: unmittelbar durch Fluoreszenzmikroskopie nachweisbar



# Labeling dyes

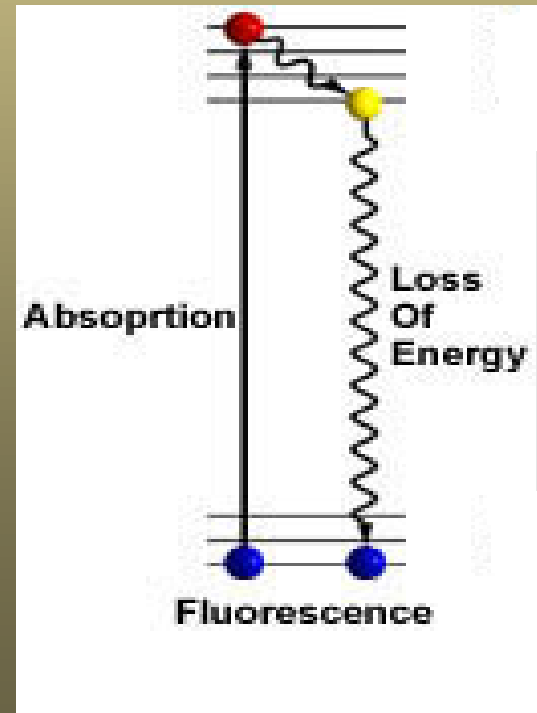
## and their properties

The two most common flour dyes used are:

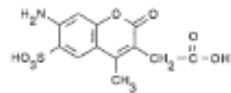
Cyanine3 (cy3, absorption = 554, emission = 568)

Cyanine5 (cy5, absorption = 650, emission = 672)

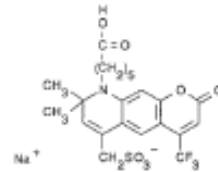
But Alexa dyes are also becoming popular



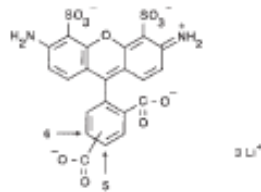
# Alexa Fluoreszenzfarbstoffe



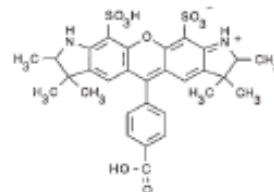
Alexa 350



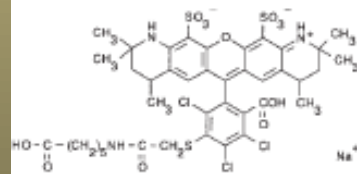
Alexa 430



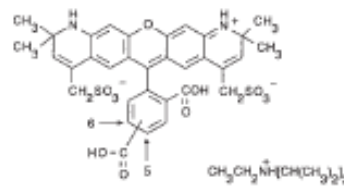
Alexa 488



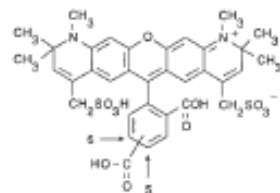
Alexa 532



Alexa 546



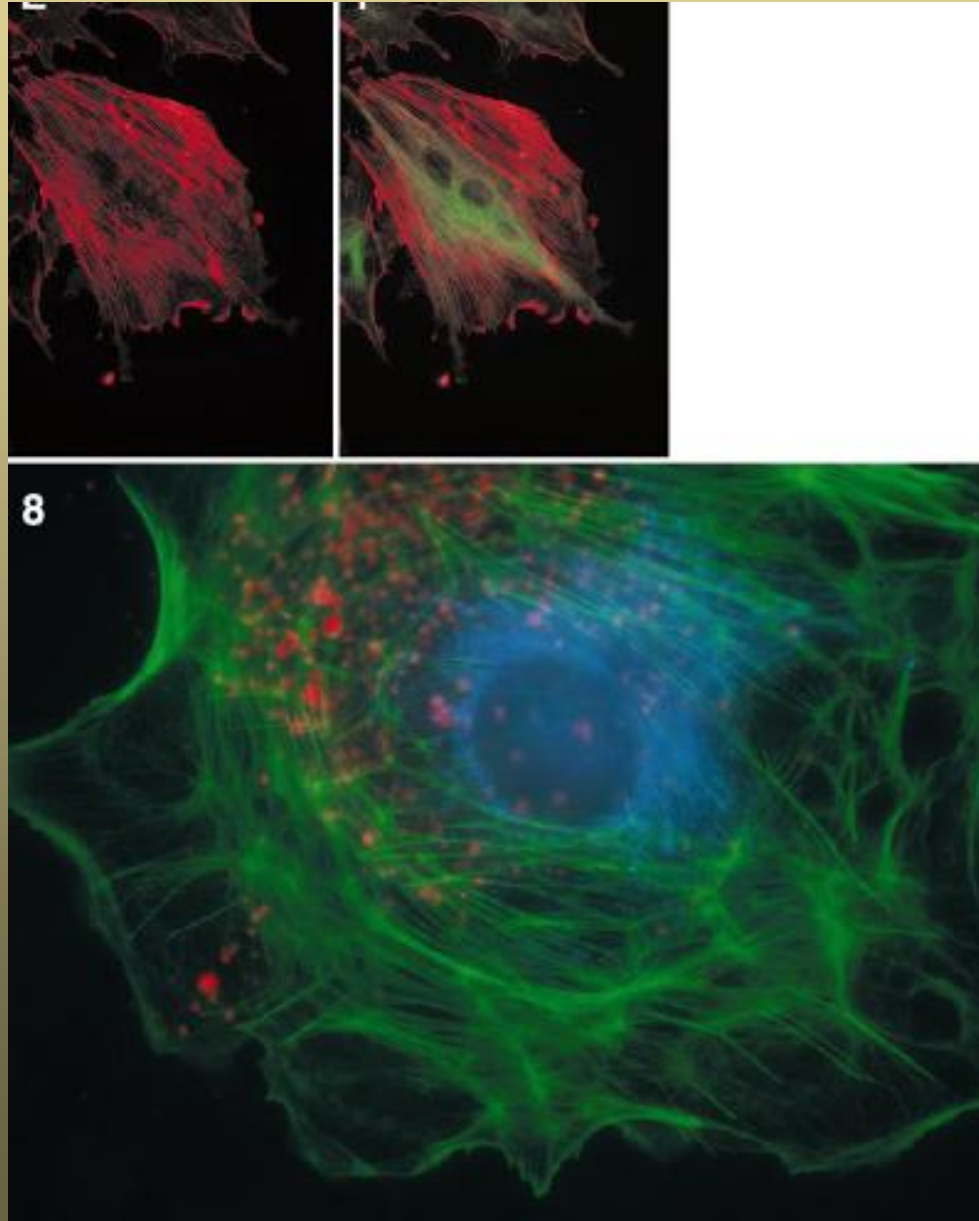
Alexa 568



Alexa 594

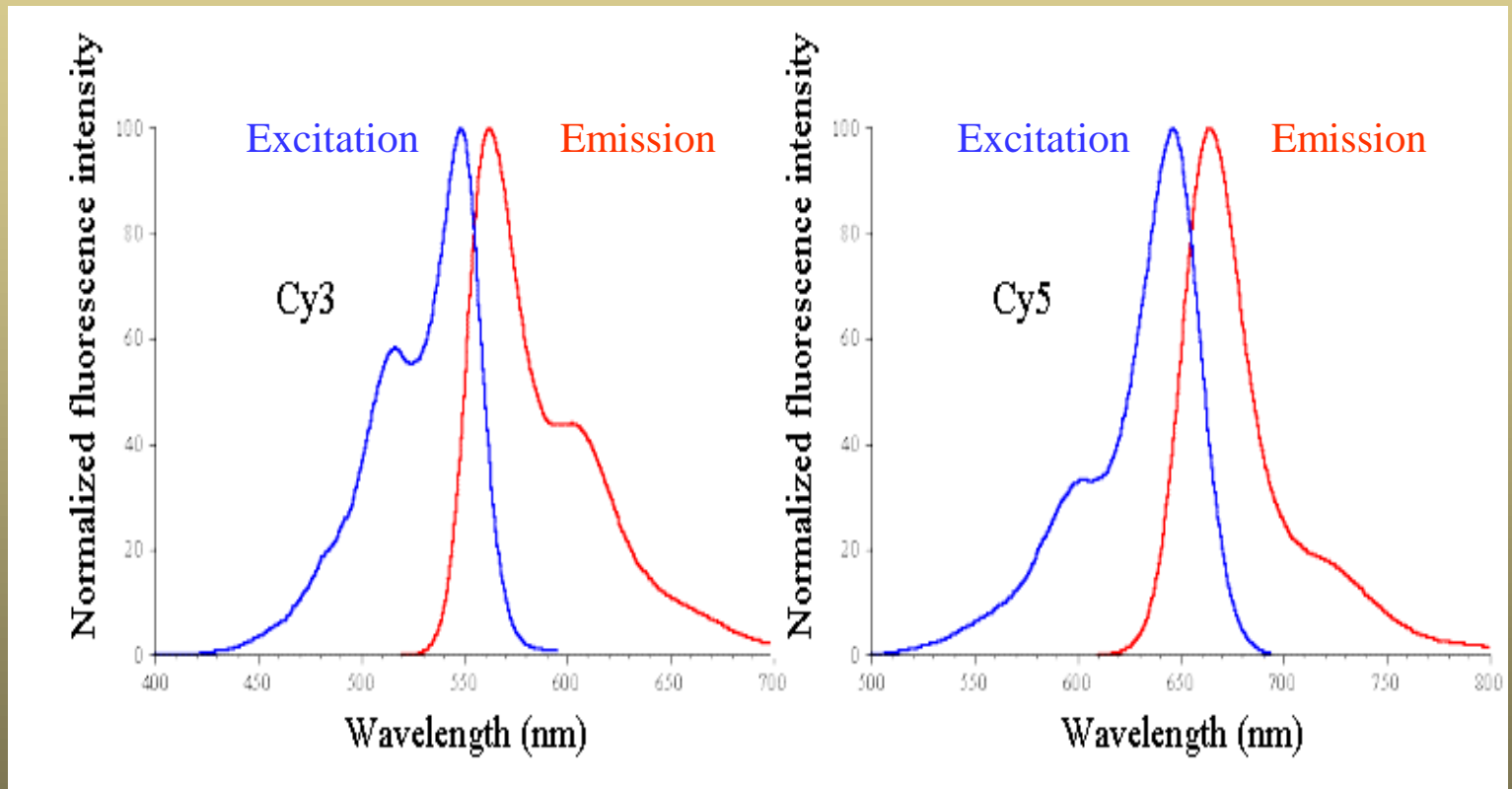
Figure 1 Chemical structures of the Alexa dyes.

# Alexa-Farbstoffe in situ

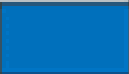
















# Cyanine dye spectra

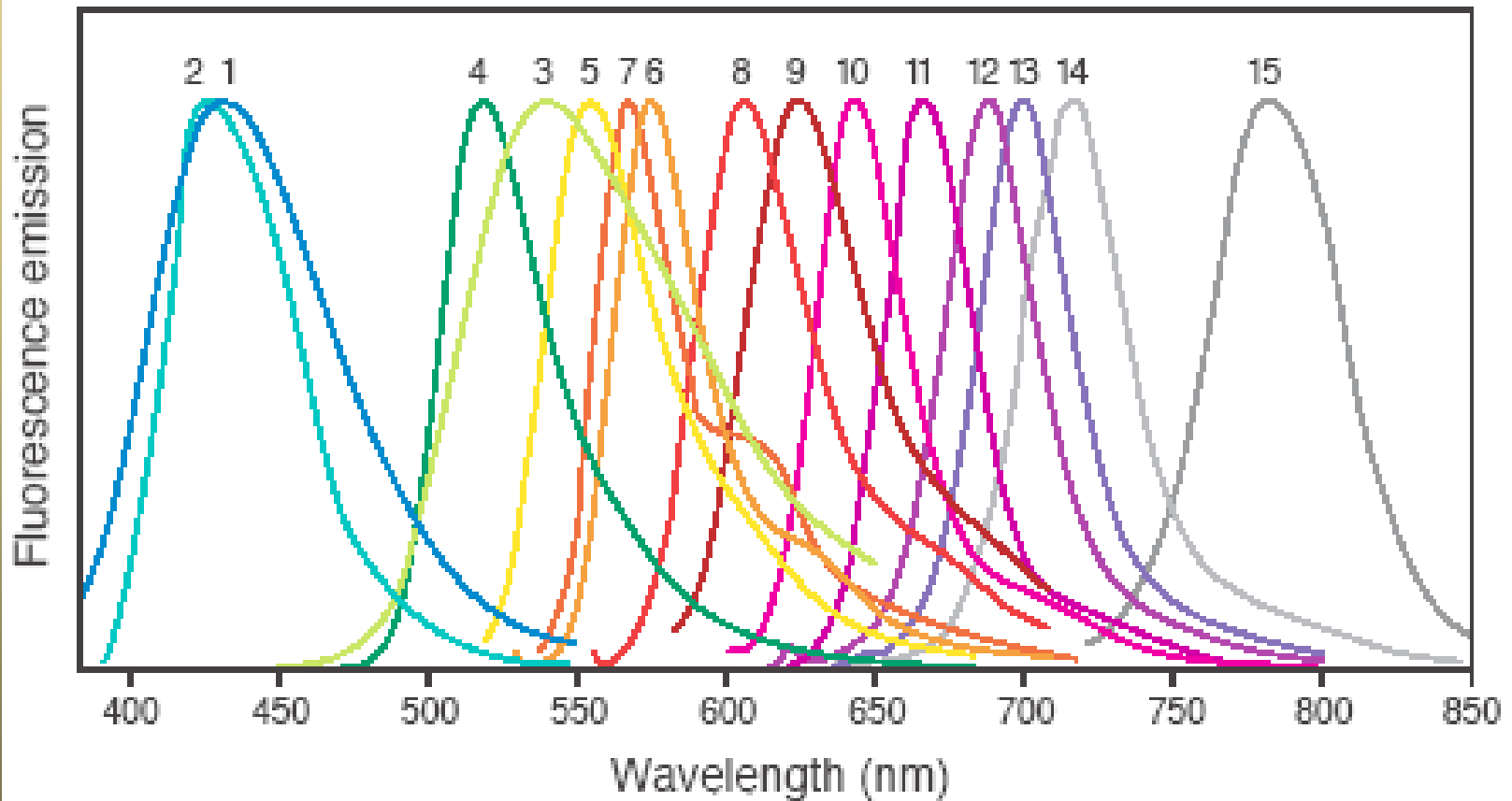
## excitation and emission



# Alexa-Farben

Color	Alexa Fluor Dye	Abs *	Em *	Extinction Coefficient †	
1		Alexa Fluor 350	346	442	19,000
2		Alexa Fluor 405	401	421	34,000
3		Alexa Fluor 430	433	541	16,000
4		Alexa Fluor 488	495	519	71,000
5		Alexa Fluor 532	532	553	81,000
6		Alexa Fluor 546	556	573	104,000
7		Alexa Fluor 555	555	565	150,000
8		Alexa Fluor 568	578	603	91,300
9		Alexa Fluor 594	590	617	73,000
10		Alexa Fluor 633	632	647‡	100,000
11		Alexa Fluor 647	650	665‡	239,000
12		Alexa Fluor 660	663	690‡	132,000
13		Alexa Fluor 680	679	702‡	184,000
14		Alexa Fluor 700	702	723‡	192,000
15		Alexa Fluor 750	749	775‡	240,000

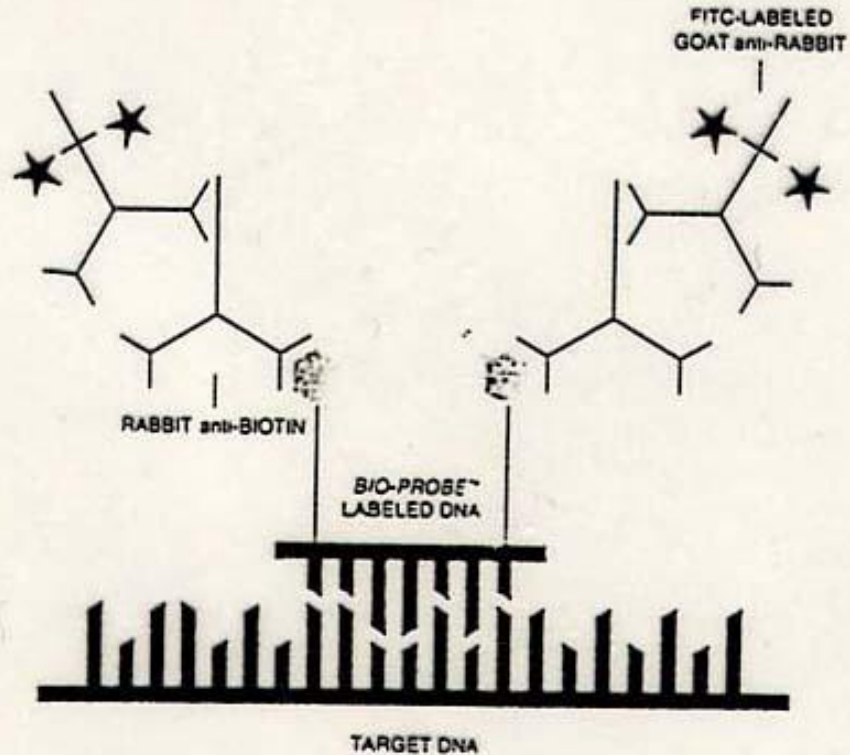
# Alexa-Farben



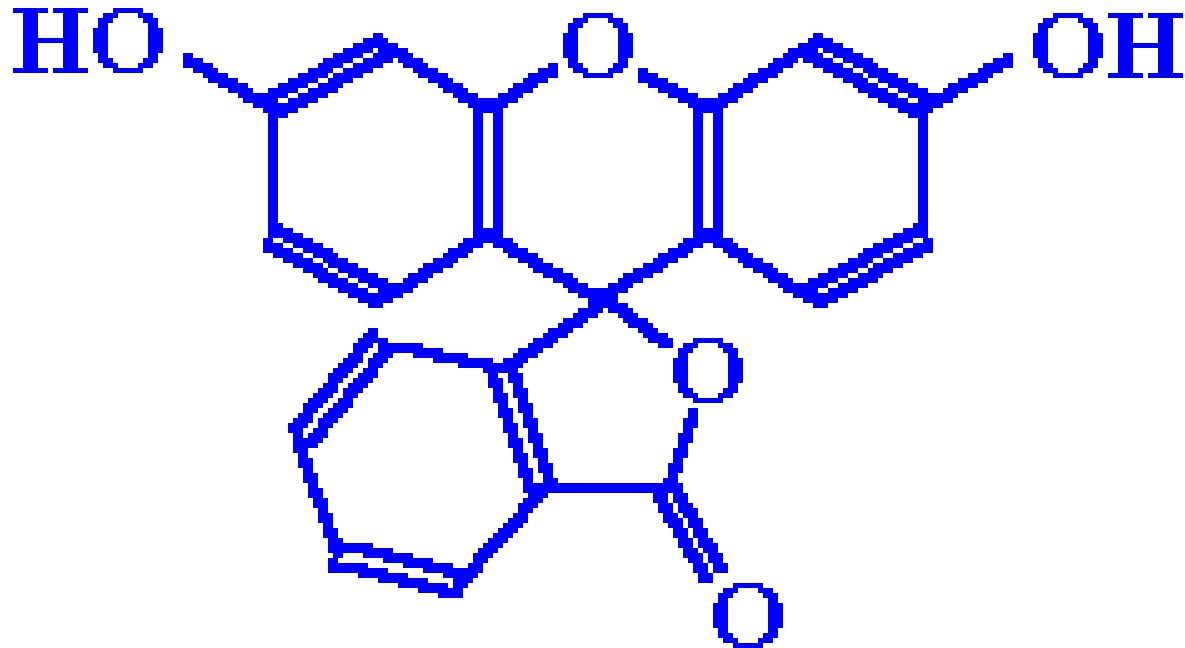
**Figure 1.** Emission spectra for the Alexa Fluor dye series.

# typische „FISH“ („Sandwich“-Methode:

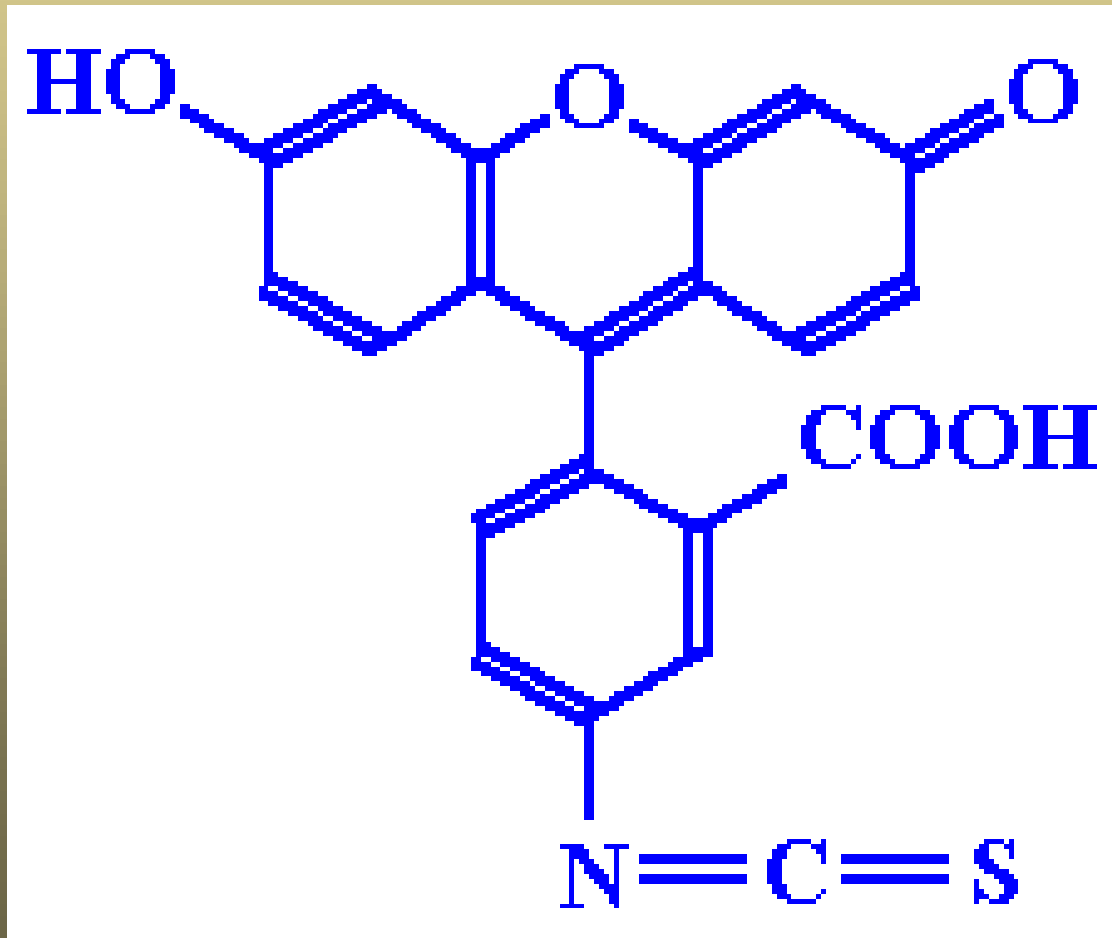
## Double Antibody Fluorescent Detection



# Fluorescein

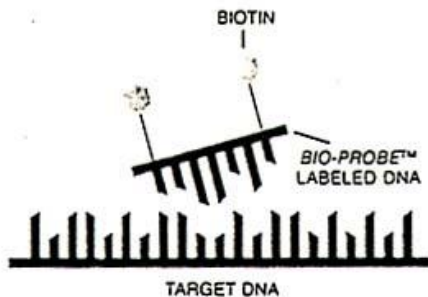


# Fluoresceinisothiocyanat (FITC)



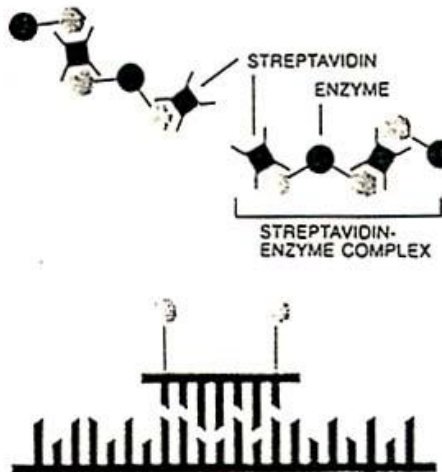
# Statt Fluoreszenz: Nachweis durch Farbreaktion mit gekoppelten Enzymen

## 1. Hybridization



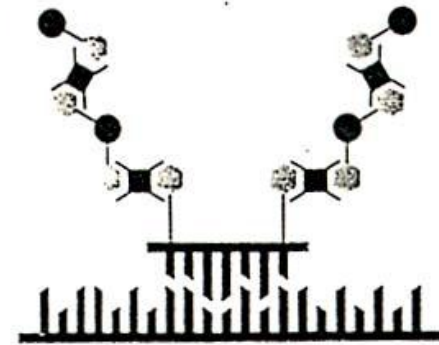
The biotinylated DNA probe is hybridized to "target" DNA sequences.

## 2. Addition of Complex



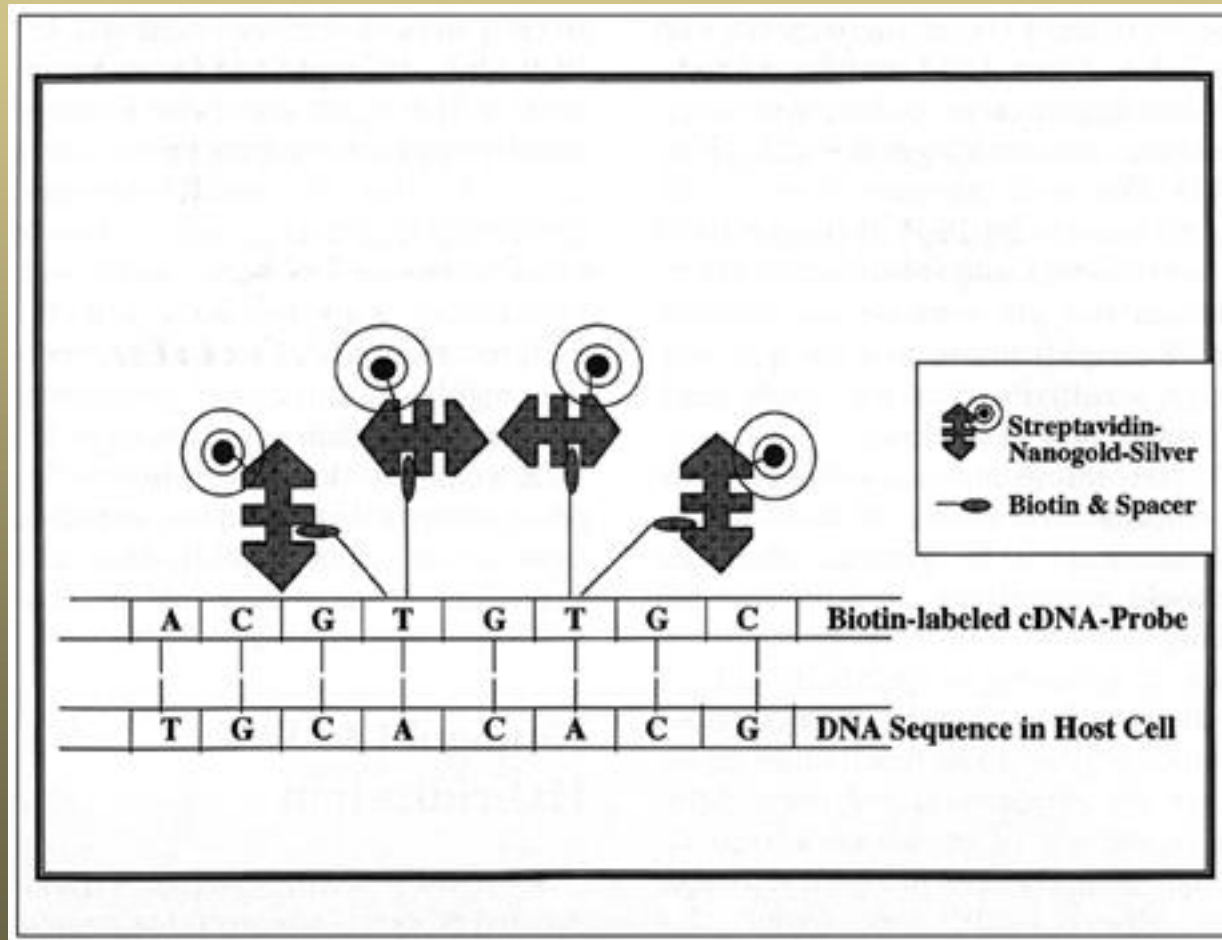
After hybridization a pre-formed streptavidin-enzyme complex is added.

## 3. Visualization

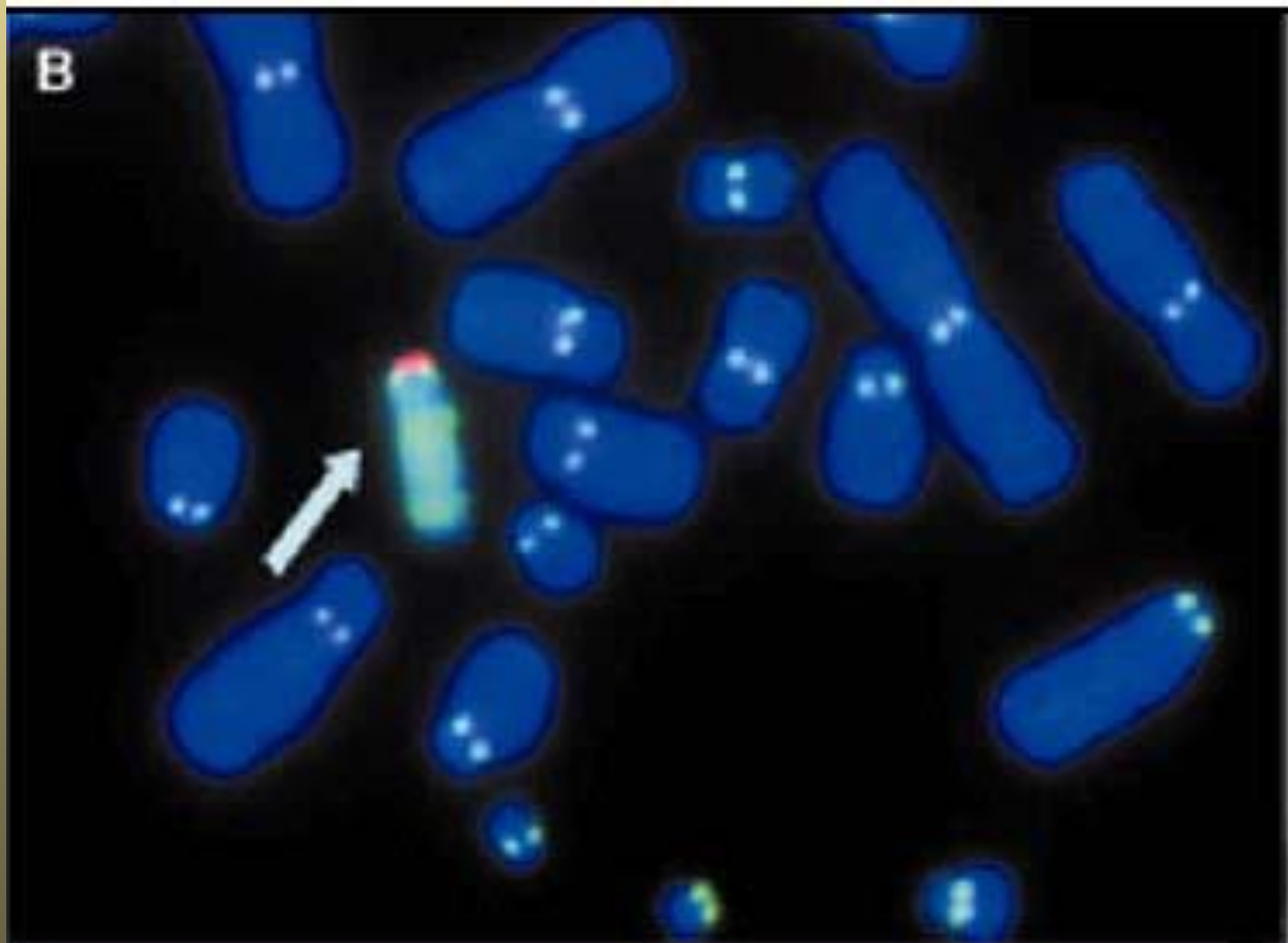


The biotin-binding sites on the streptavidin molecule bind to the biotin on the hybridized probe. Hybridized probe is then detected using a standard histochemical enzyme assay.

# Nachweis mit Gold-Streptavidin



# FISH von Satelliten DNA an menschliche Chromosomen



Chrom 21  
sequence



Interphase  
Nucleus

A light micrograph of a cell. On the left, a large, roughly spherical interphase nucleus is visible, containing a dense nucleolus. On the right, a metaphase plate is formed by numerous condensed chromosomes aligned in a row. Several dark, circular spots on the chromosomes are indicated by white arrows, representing centromeres labeled with a DNA probe. The overall background is a light blue color.

Metaphase chromosomes  
labeled with DNA probe (arrows) for  
centromere of chromosome 1.

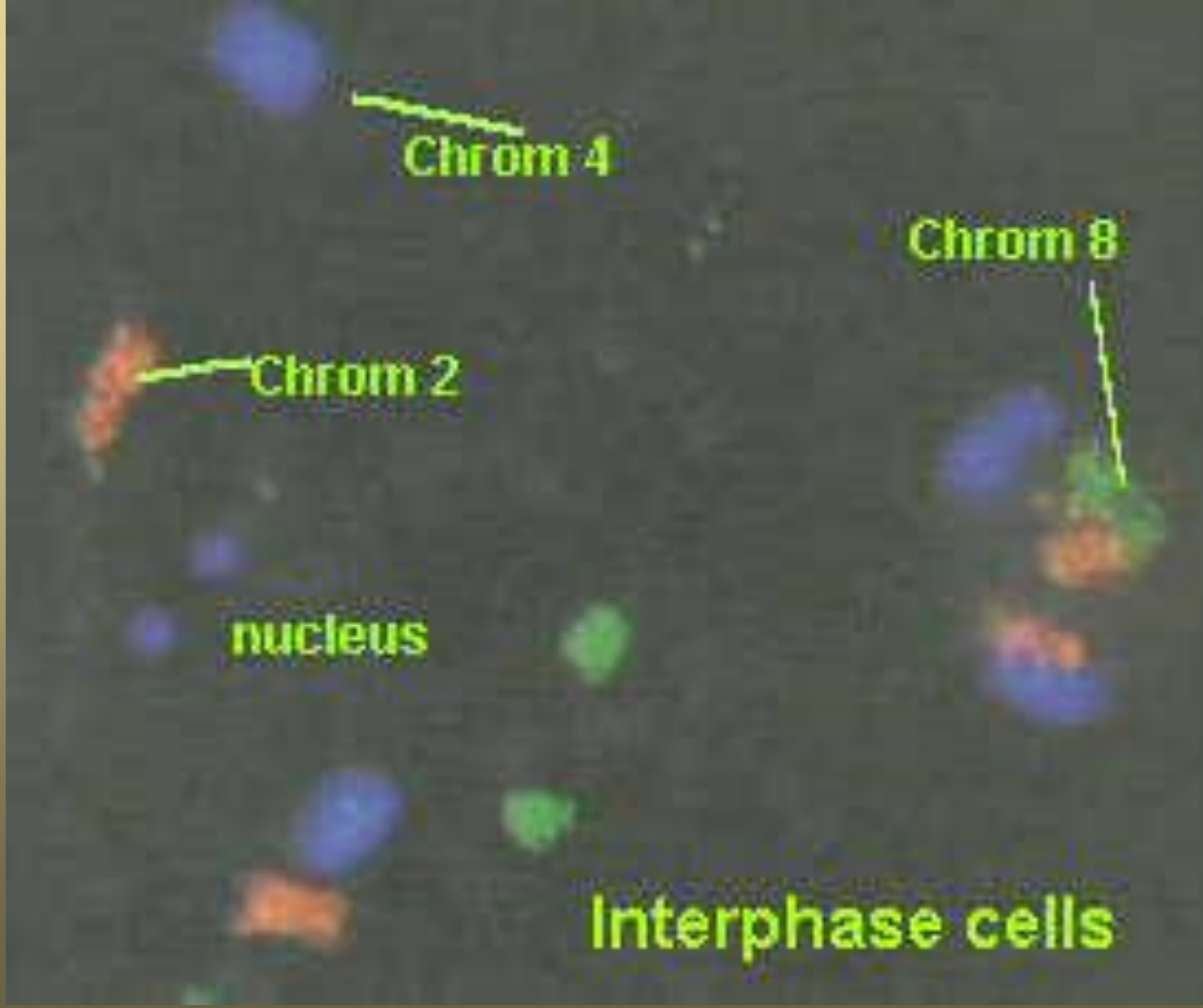
Chrom 4

Chrom 8

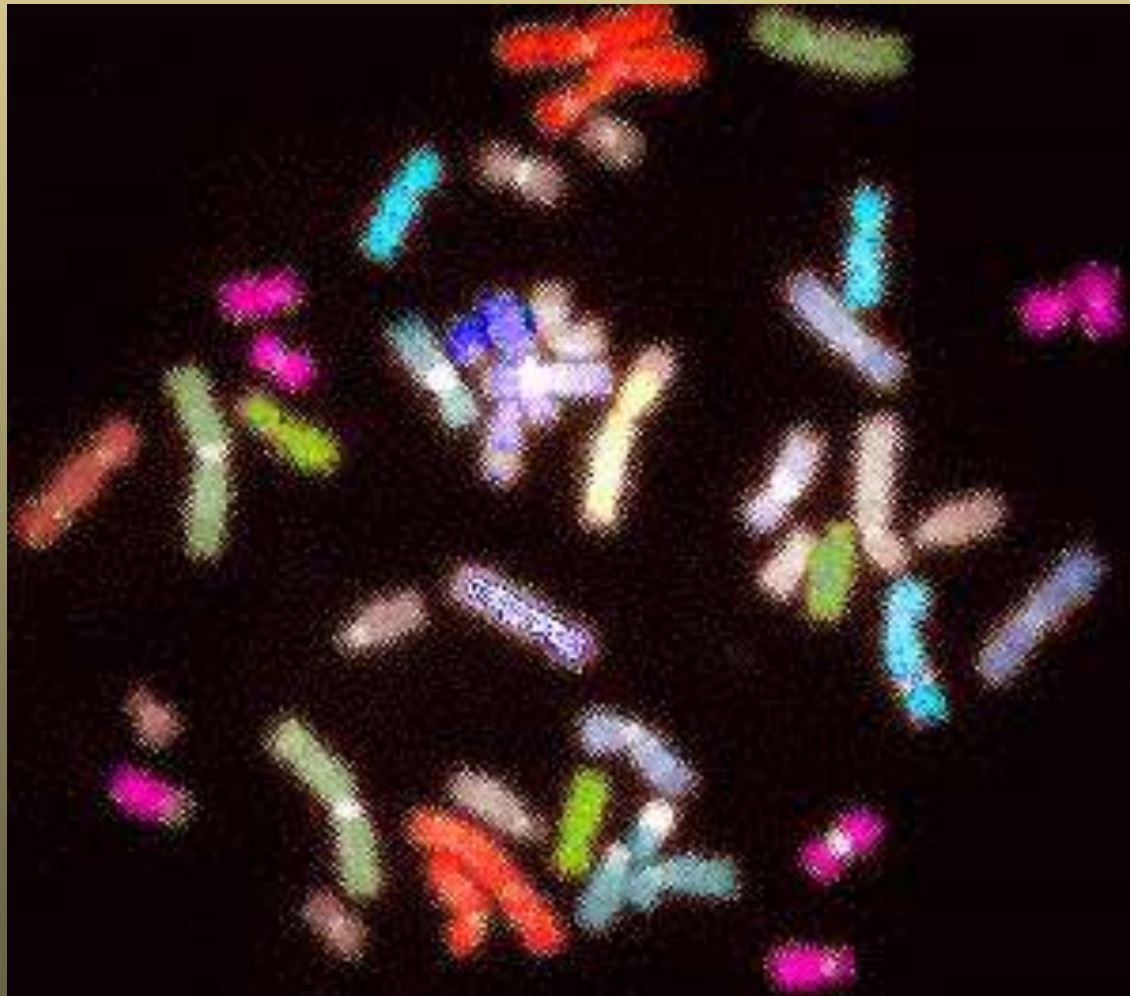
Chrom 2

nucleus

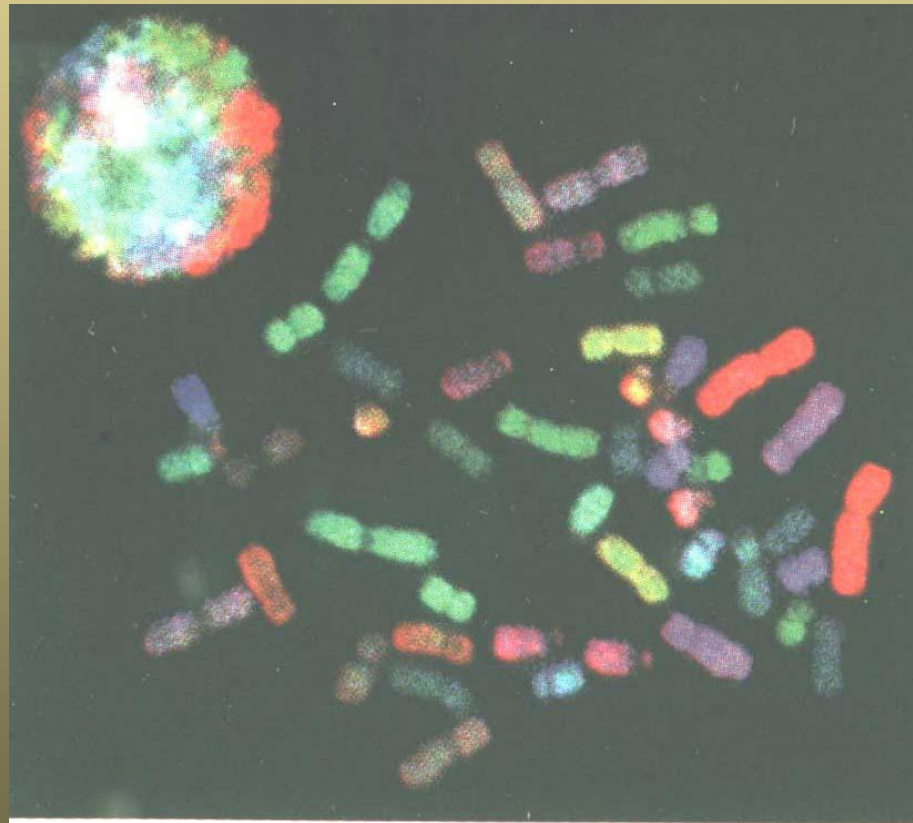
Interphase cells



# Chromosomen-“Painting“

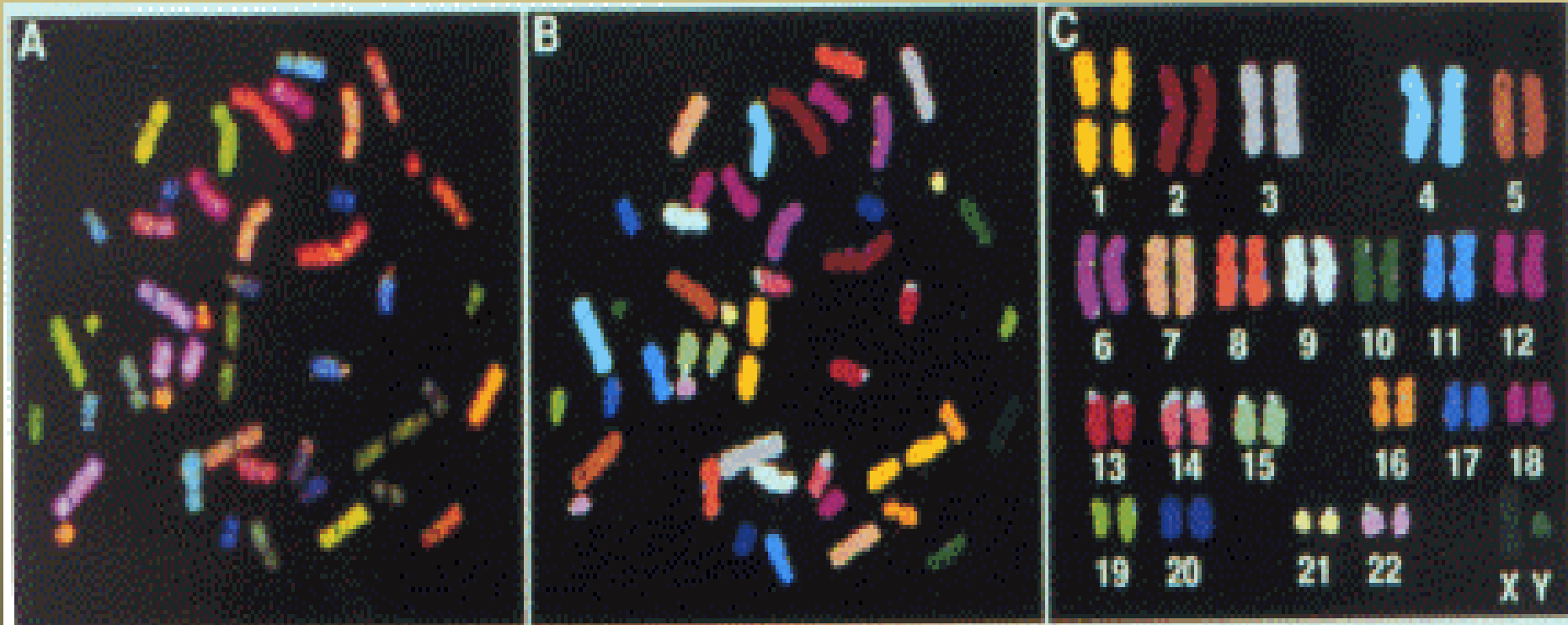


# Chromosomen-Painting

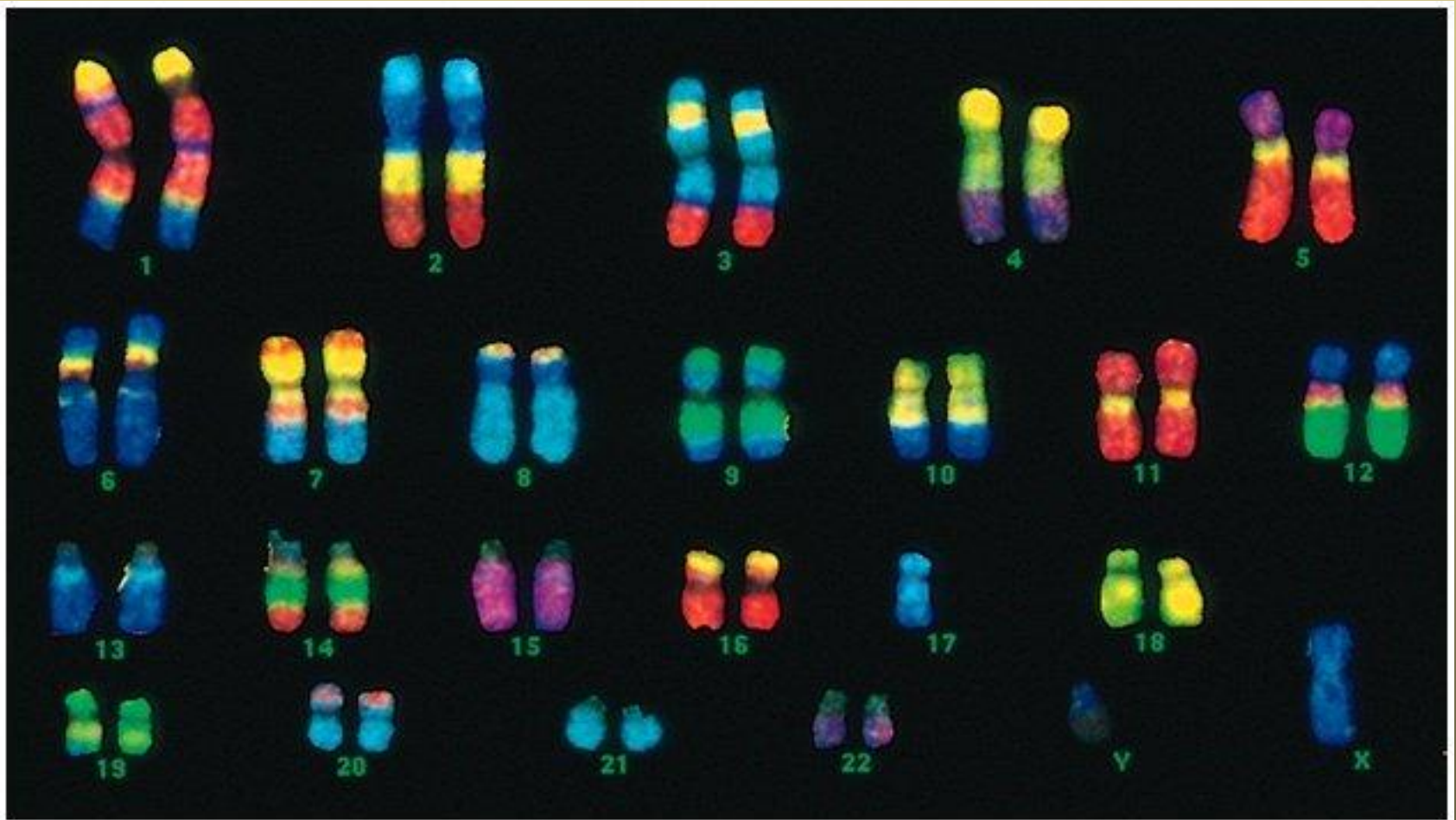


**in living color.** The micrograph shows combinatorily stained human chromosomes; at upper left is a nucleus with the chromosomes in a more extended configuration.

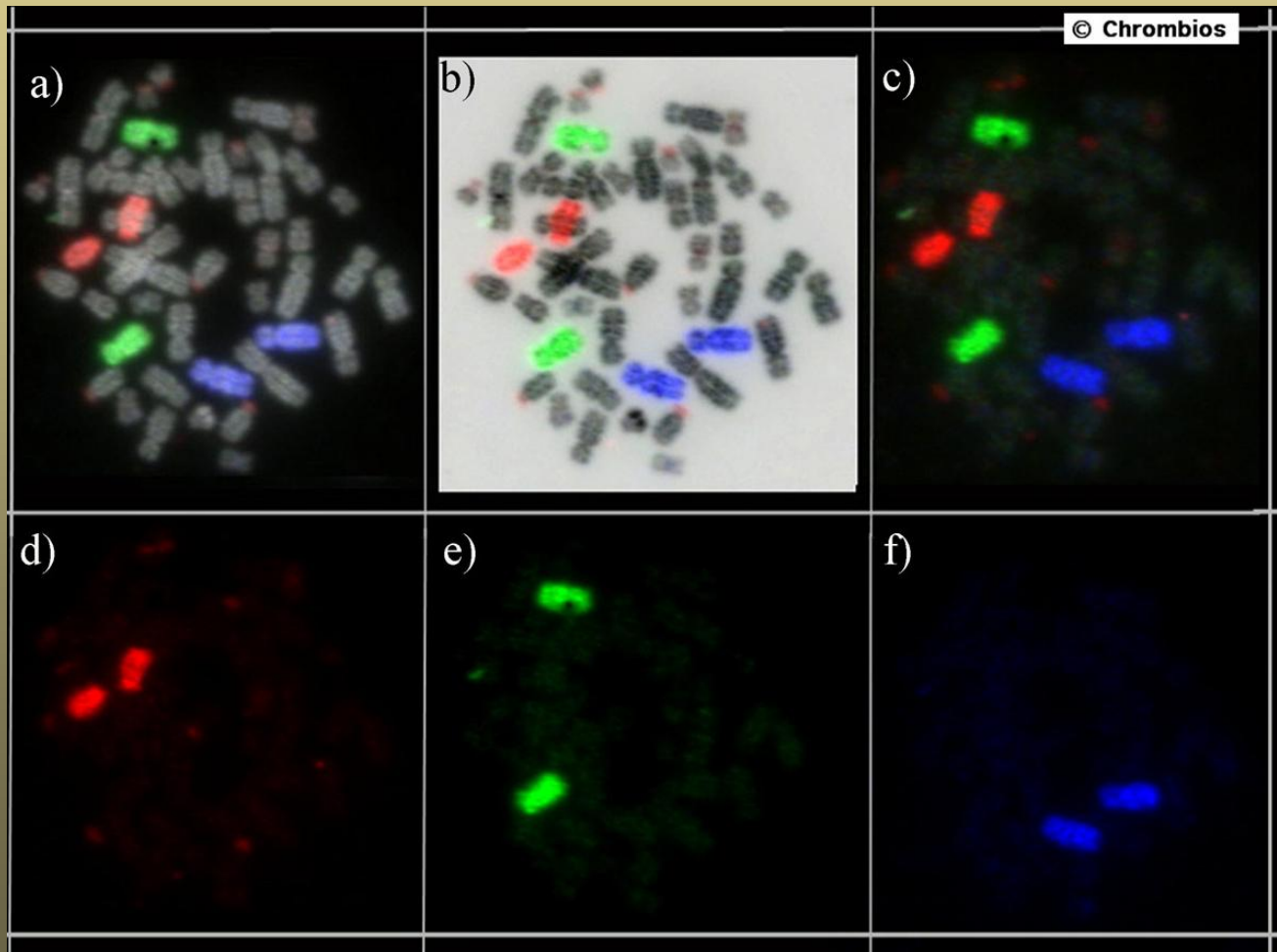
# Individueller Chromosomennachweis



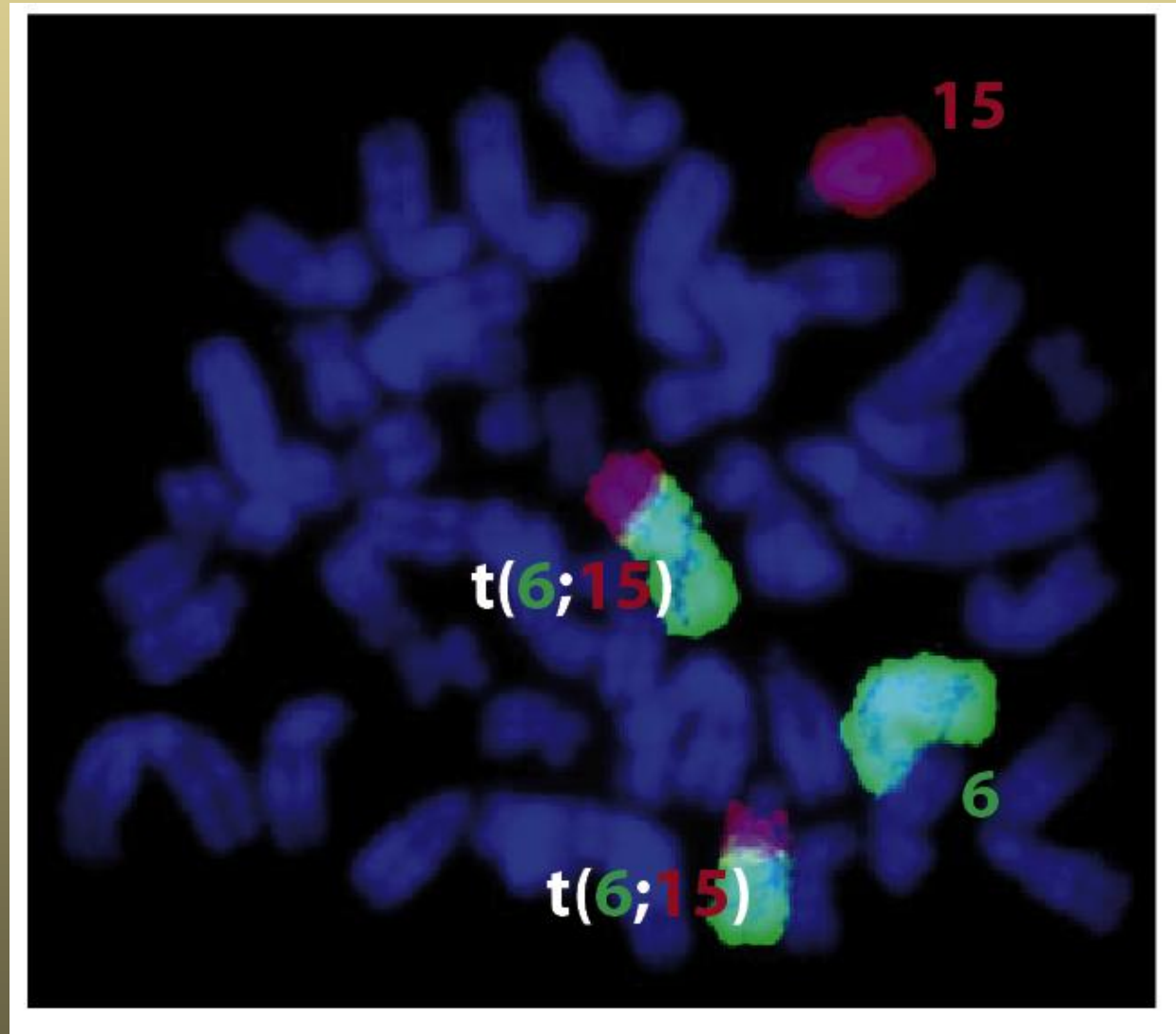
# Differentielles Painting zur Chromosomendiagnostik



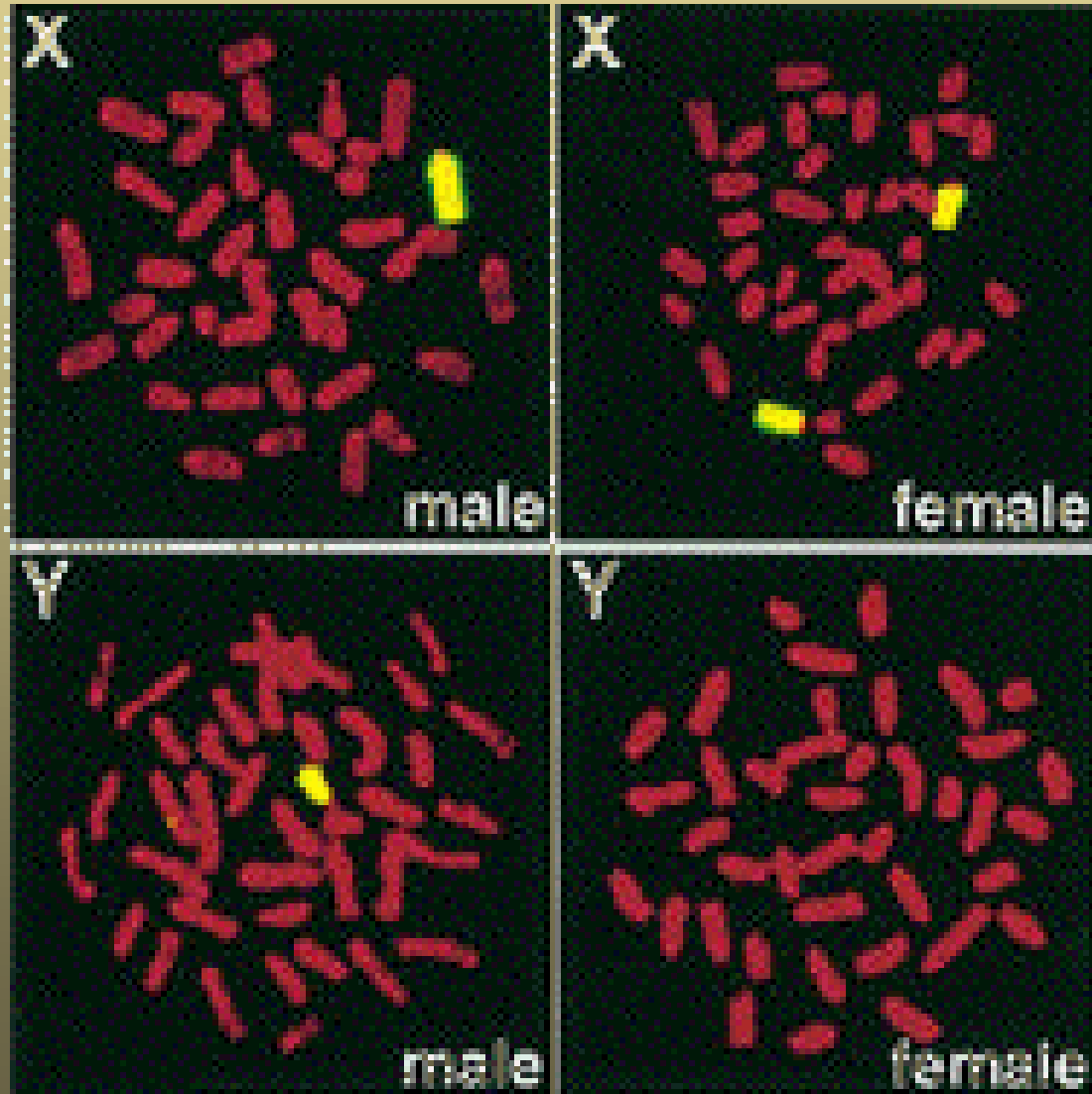
# Triple colour hybridization chromosome 15, 8 and 5



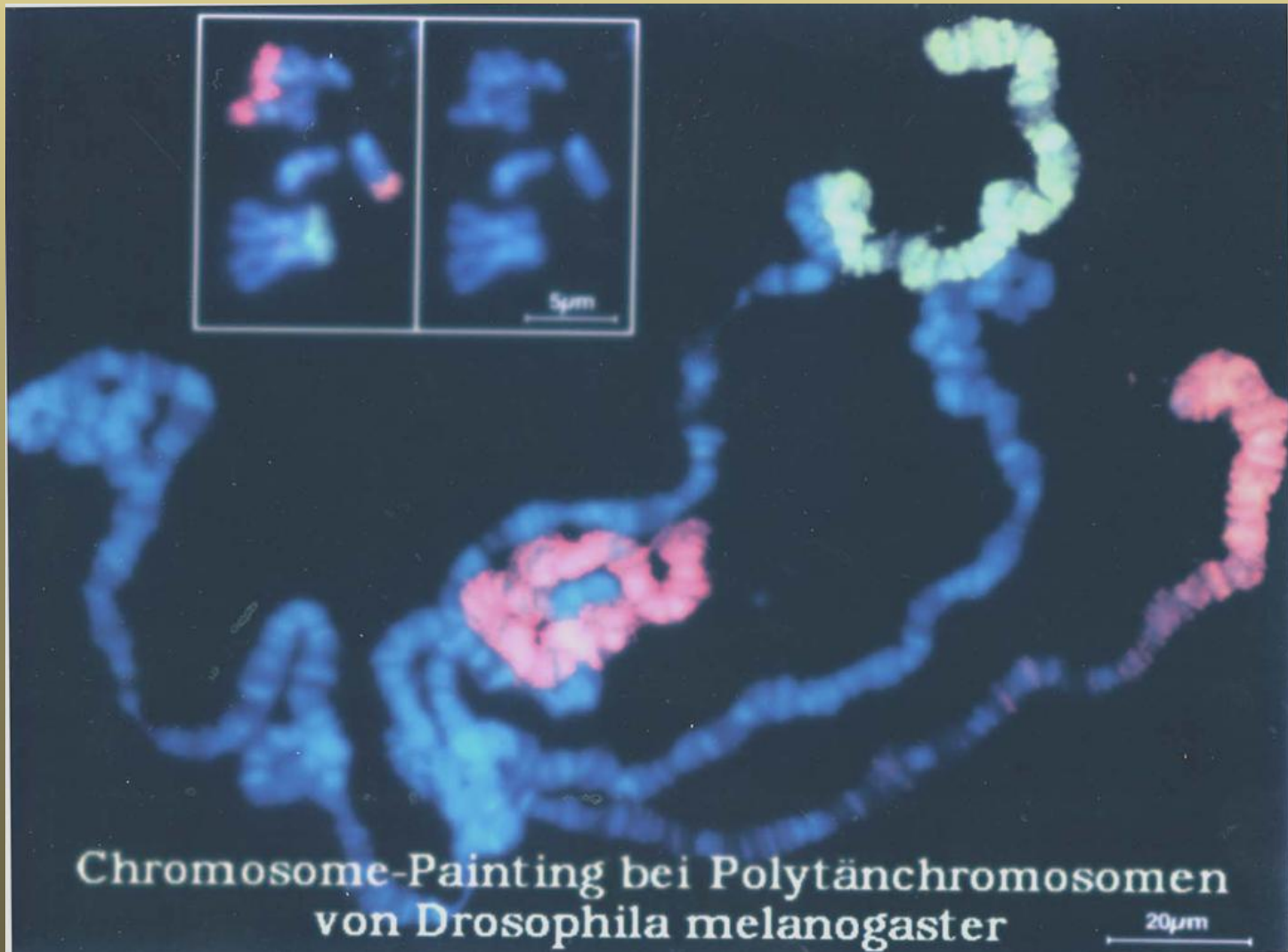
# Chromosome painting zum Nachweis von Translokationen



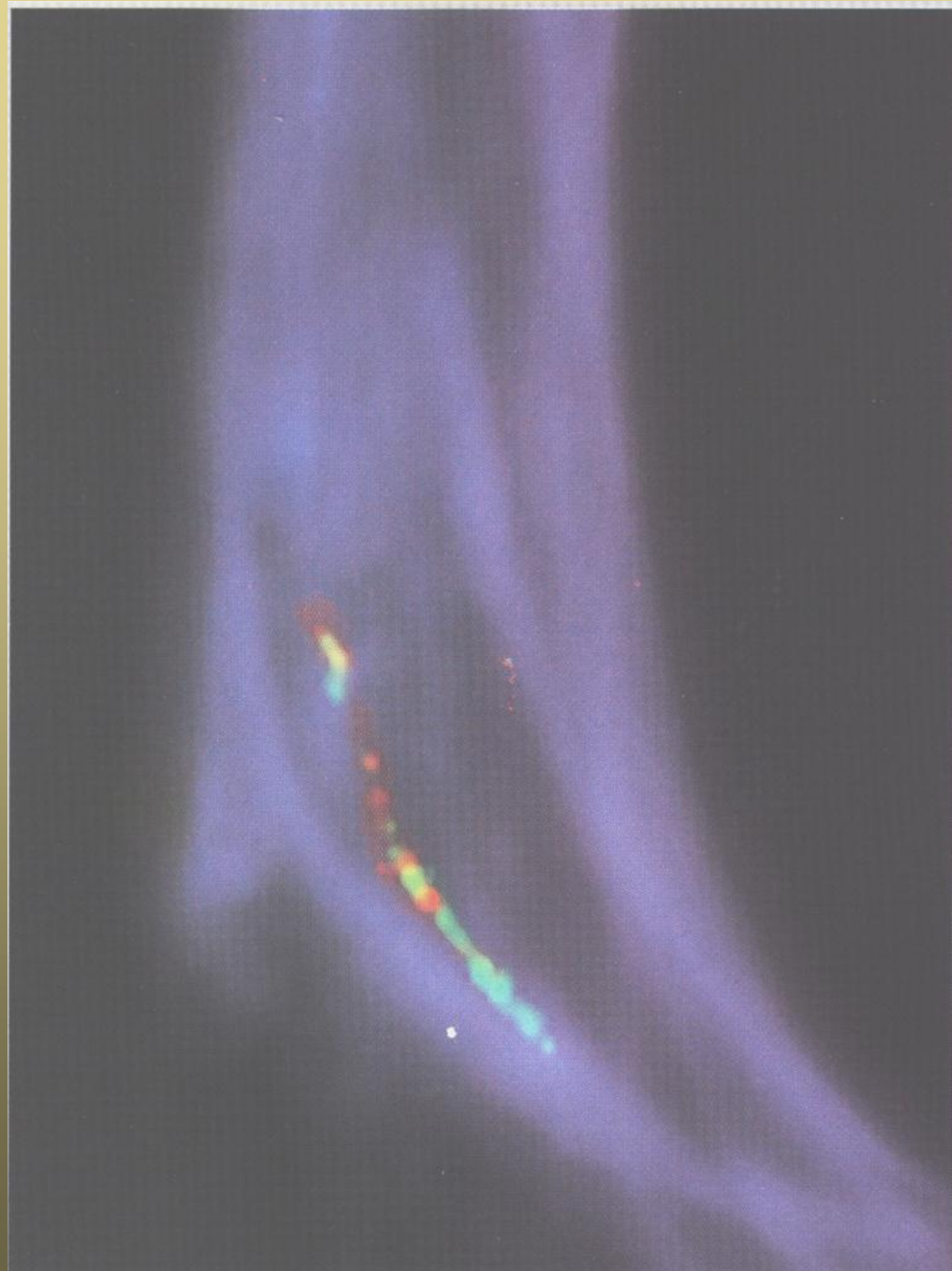
# Automatische Identifizierung einzelner Chromosomen z.B. zur Geschlechtsbestimmung



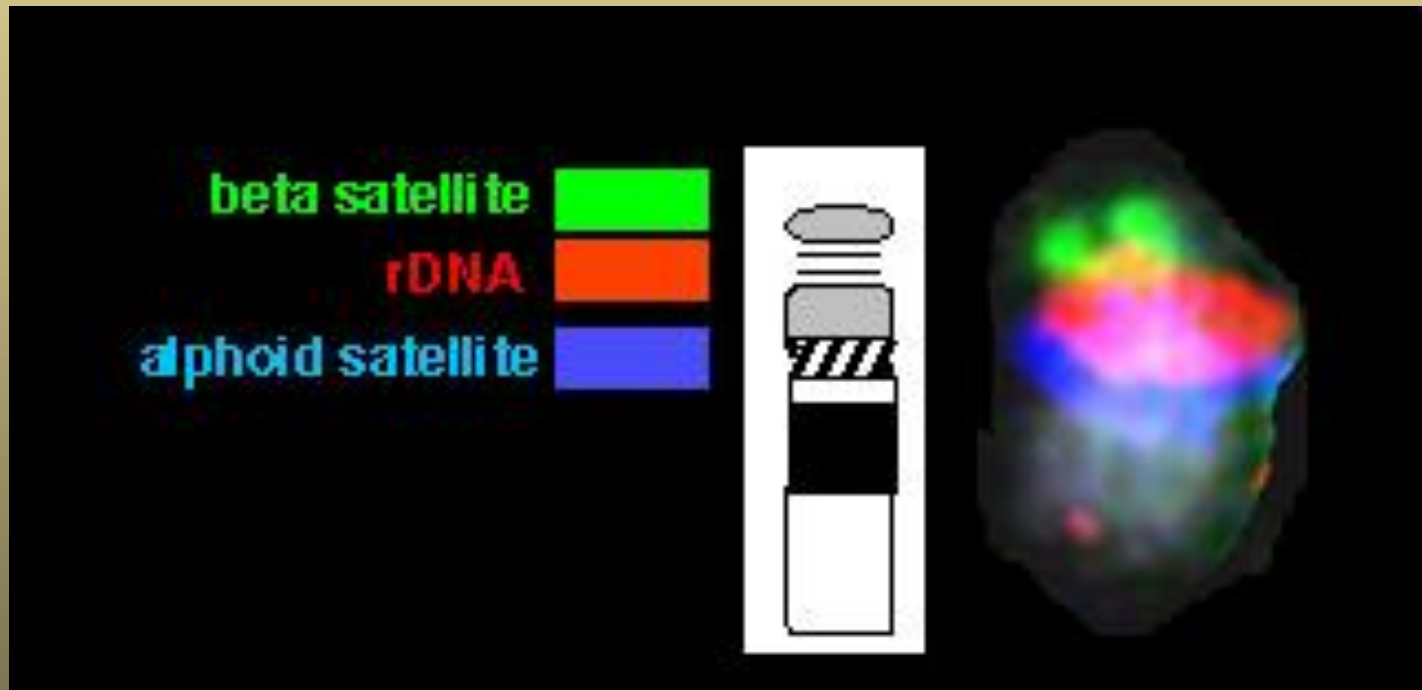
# Chromosomen-Painting bei *Drosophila*



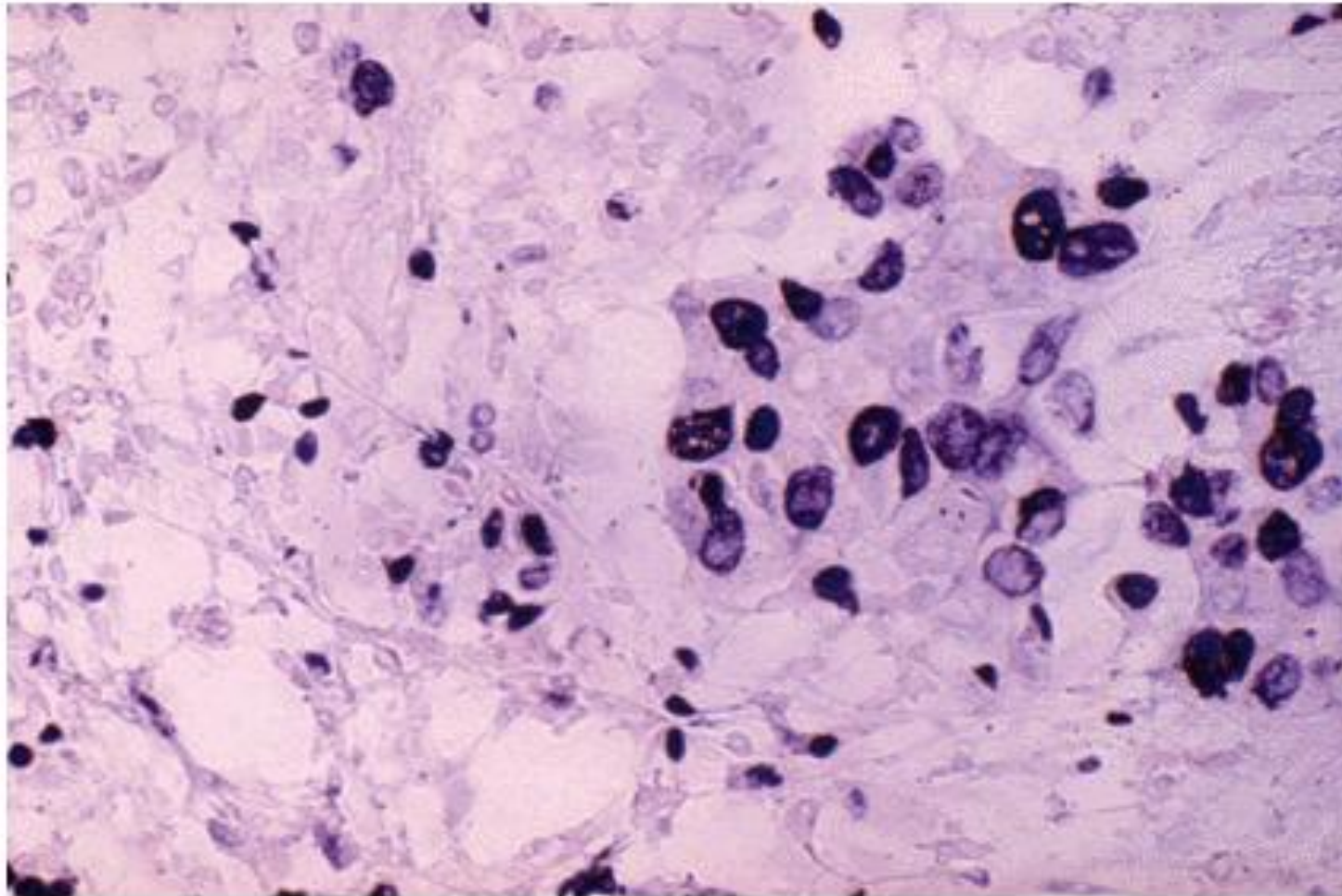
Hochauflösende  
FISH:  
Organisation  
der  
Centromere



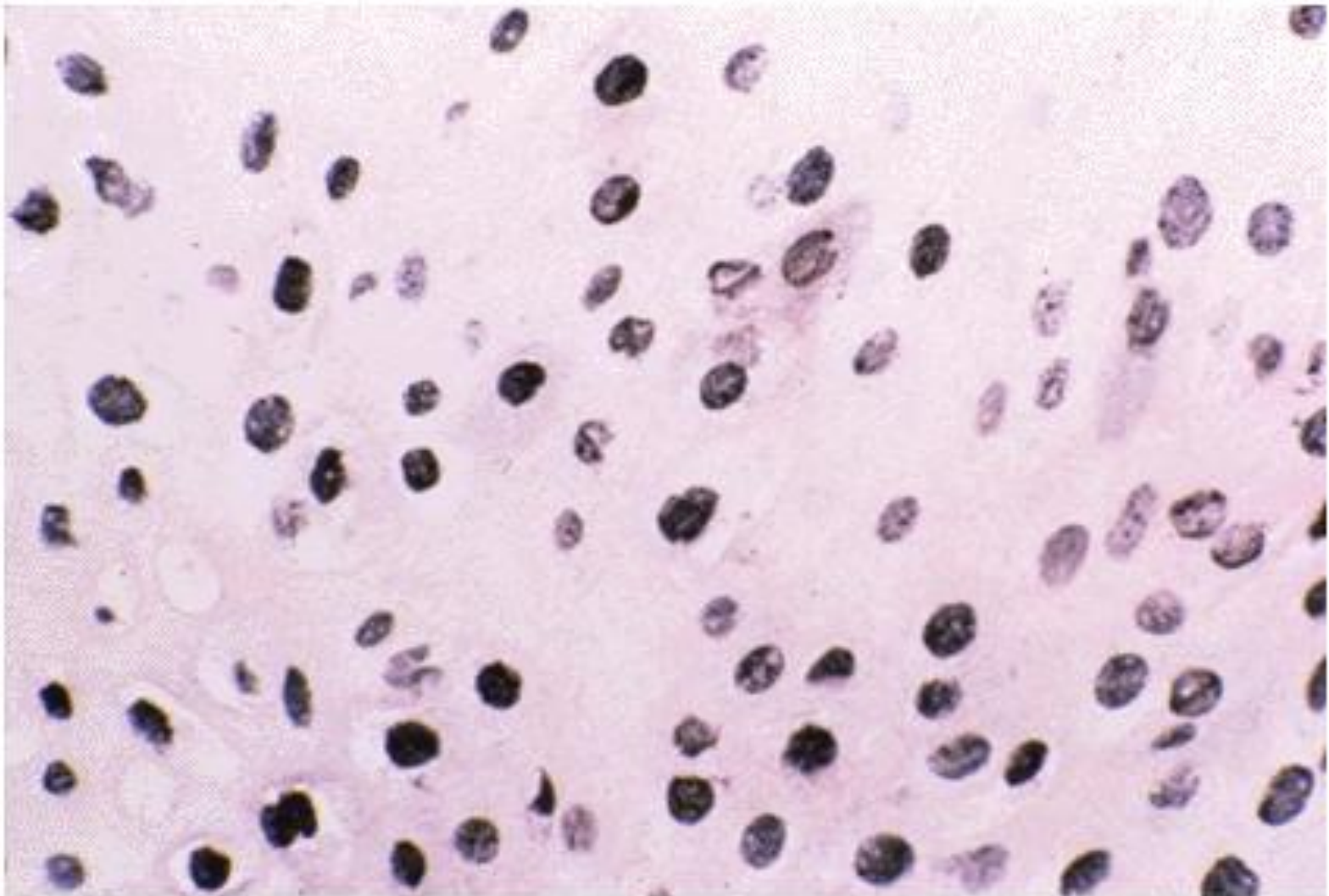
# Human chromosome 21



# Nachweis einer Vireninfection: in situ Hybridisierung mit RNA



# Nachweis einer Vireninfektion



# Nachweis von HPV 16 in Condylom-Zellen

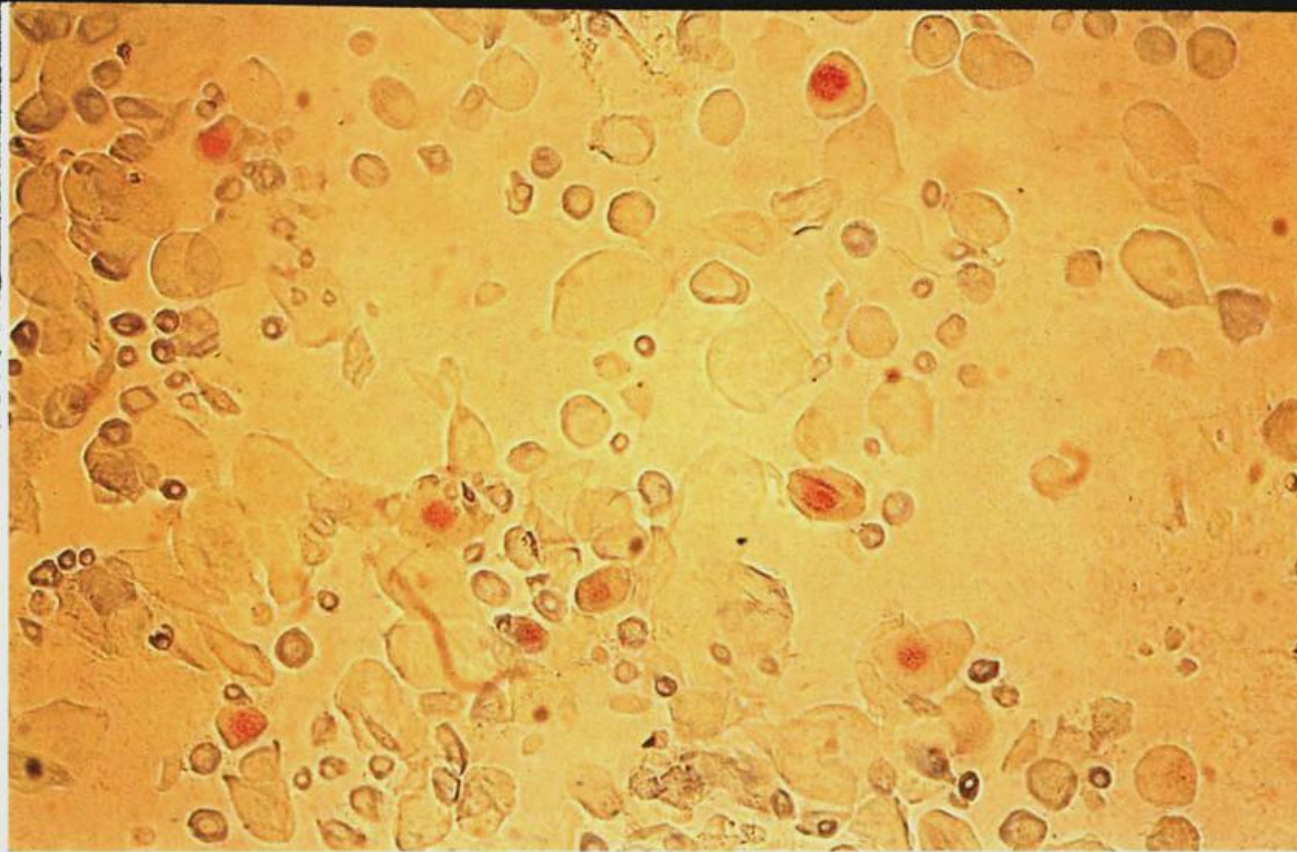
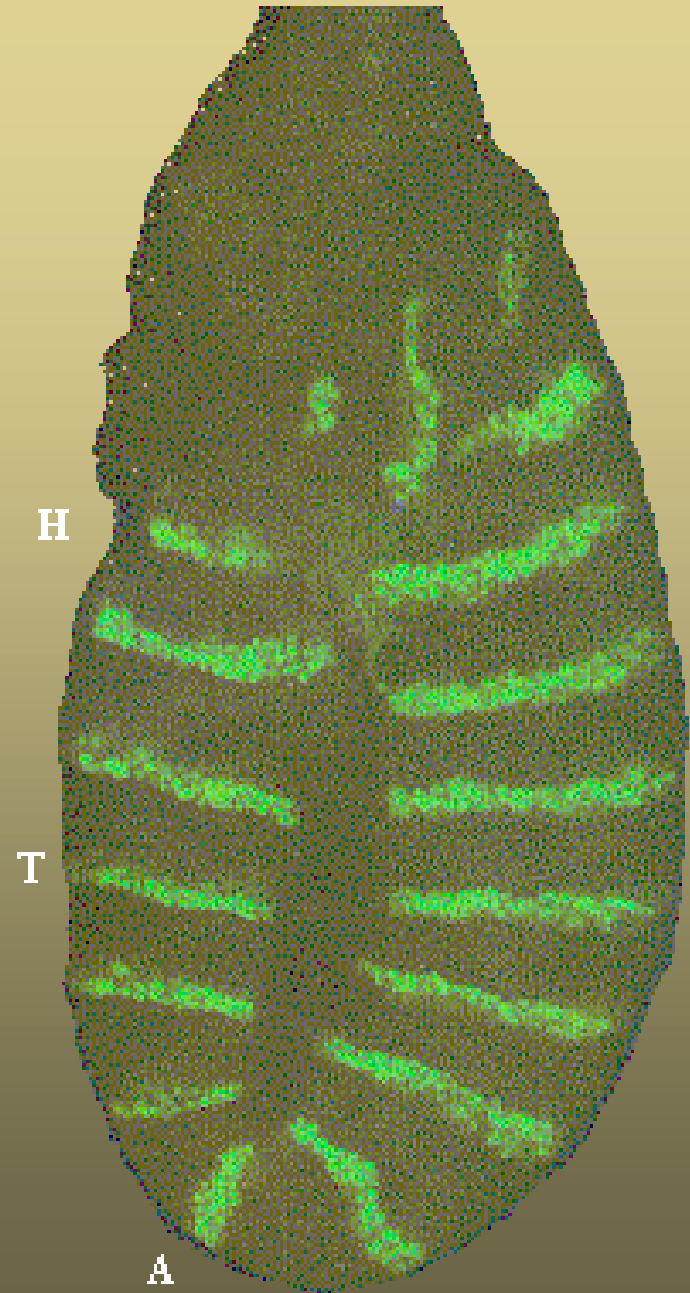
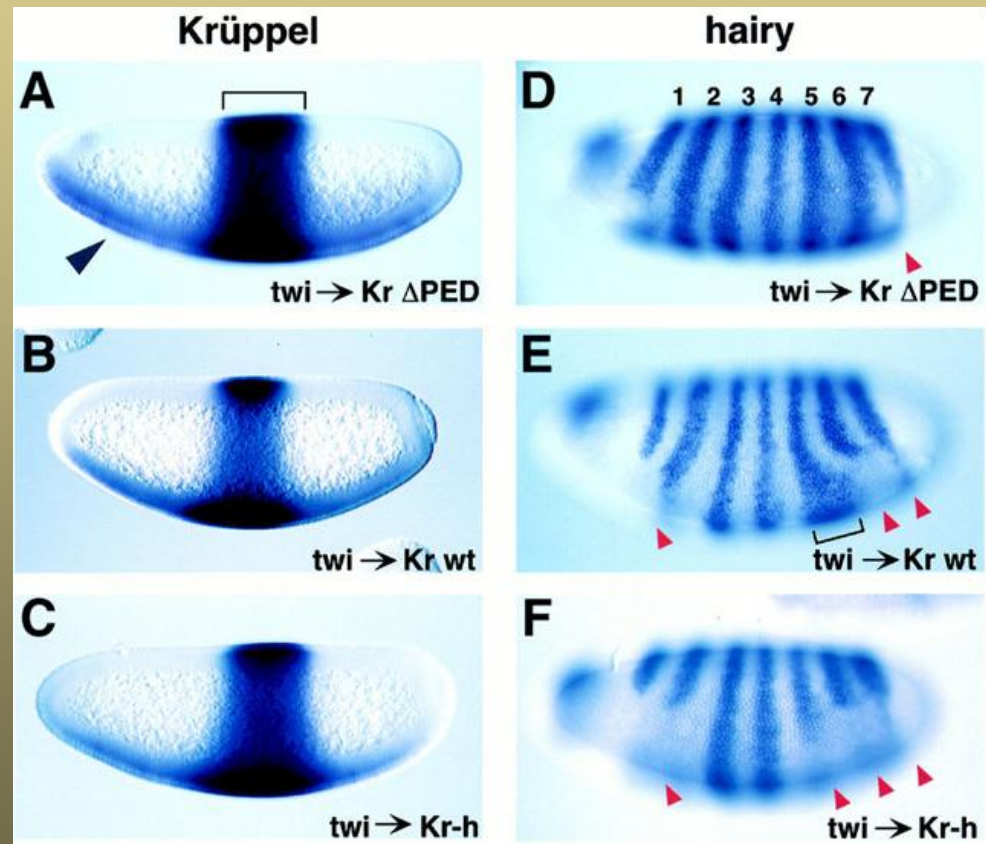
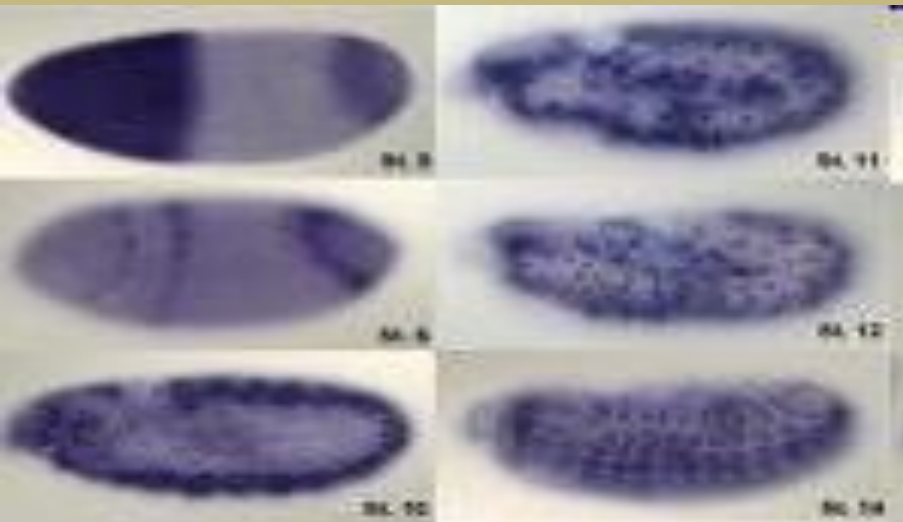


Abb. 2: Nachweis von HPV 16 DNS in einem endozervikalen Zellausstrich  
(Vergrößerung: 400fach)

# RNA-Nachweis in Drosophila- Embryo



# Hunchback und Krüppel

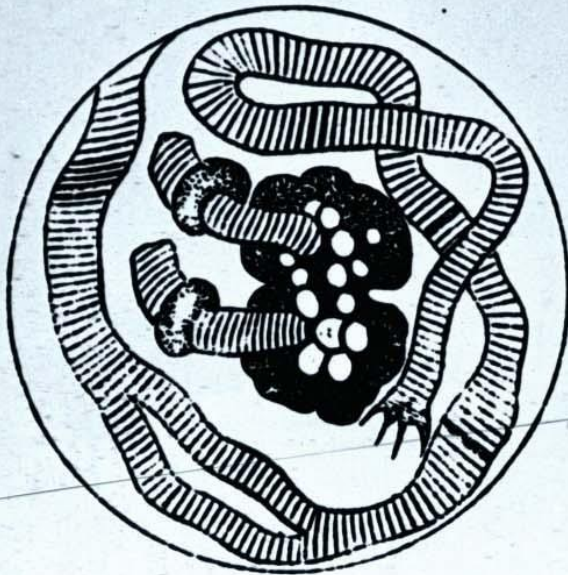


# DNA-Lokalisation durch situ Hybridisierung an „Riesenchromosomen“

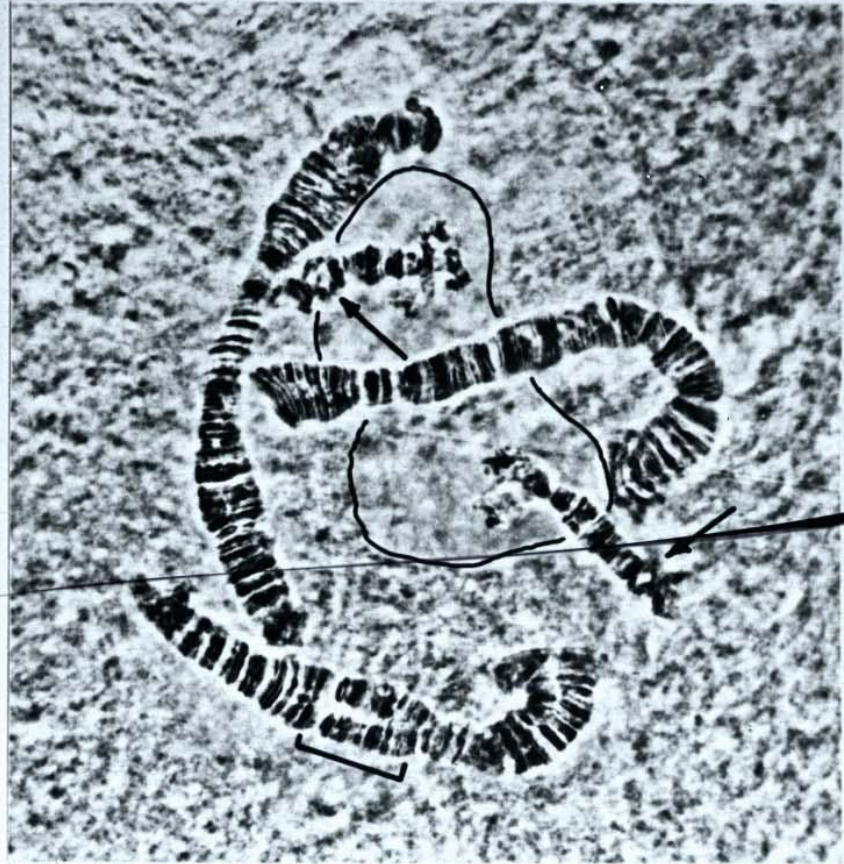
- Chromosomenpräparate sind leicht herzustellen
- Chromosomen sind für Anfänger leicht mikroskopisch zu analysieren
- Chromosomen zeigen strukturell interessante Details
- Nachweisempfindlichkeit ist mind. um Faktor 1000 höher als bei normalen Metaphase-C.
- Es handelt sich um Interphase-C., d. h. die Gene sind aktiv

# Riesenchromosomen: „Kernfäden“ entdeckt 1881 von Balbiani an Chironomus Larven

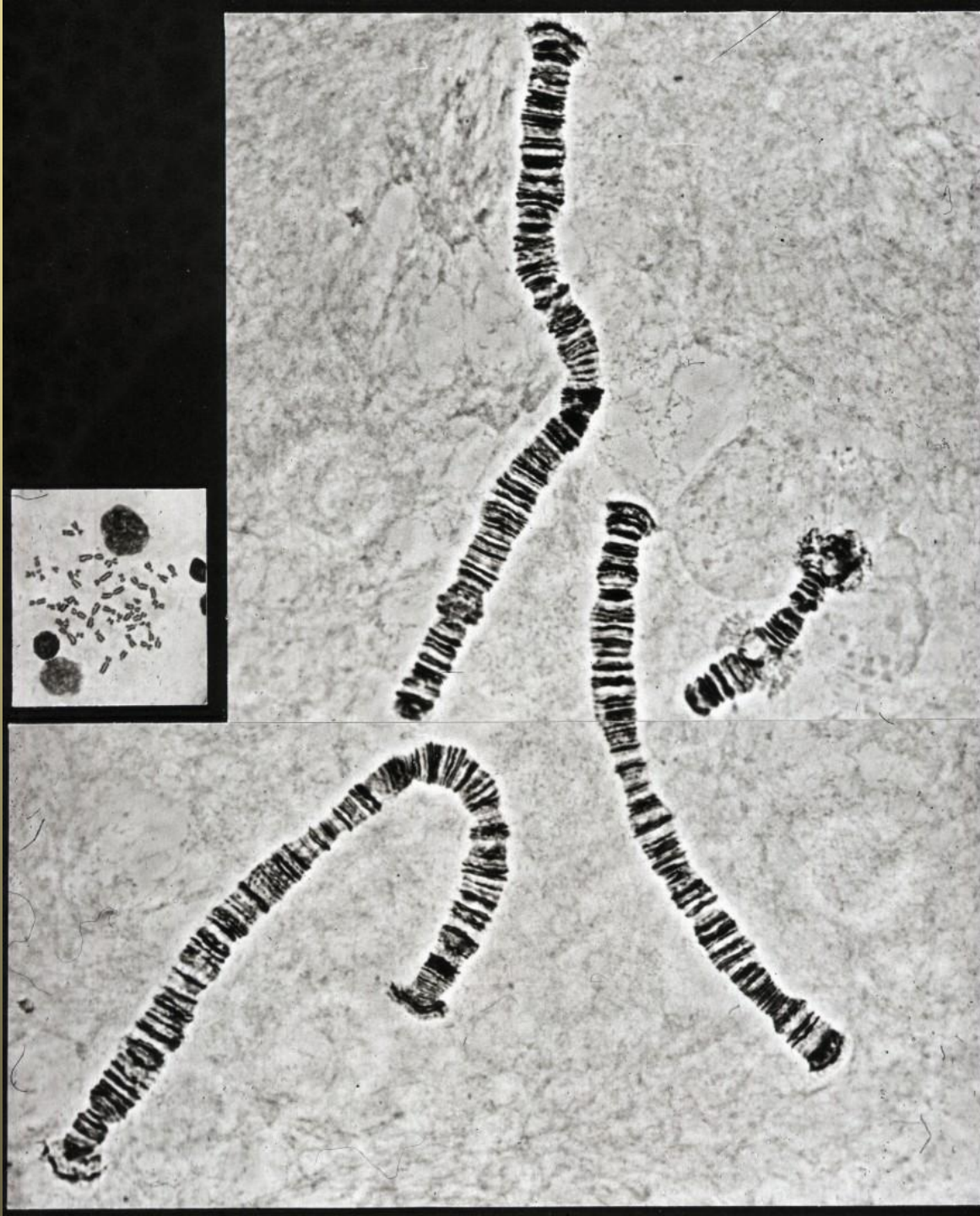
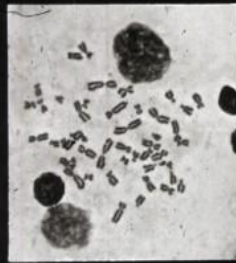
Balbiani 1881



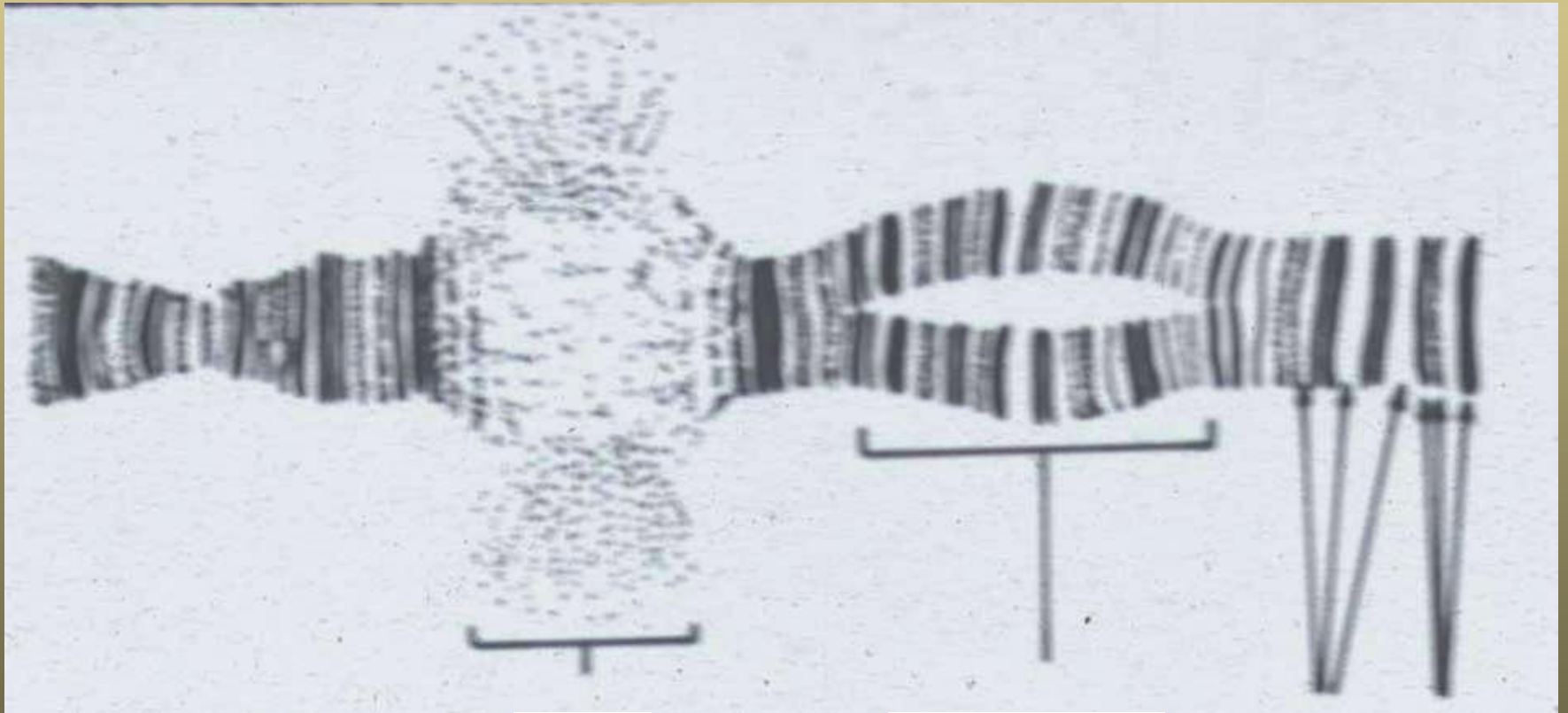
**Fig. 4.**



Polytän-  
chromo-  
somen  
sind  
„riesig“



# Aufbau von Polytänchromosomen



**Puff**

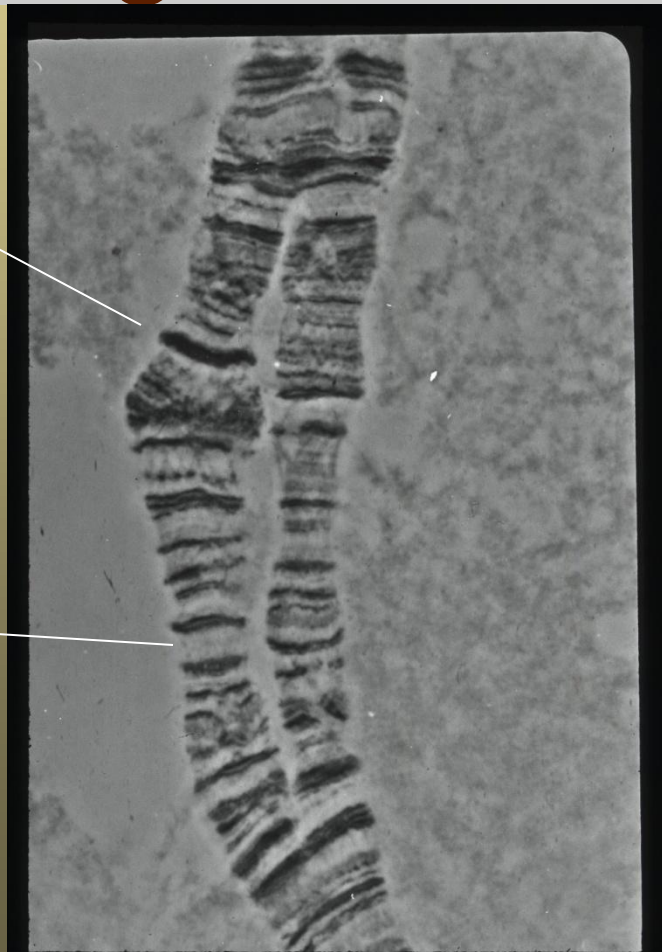
**Asynapsis**

**Interbanden/  
Banden**

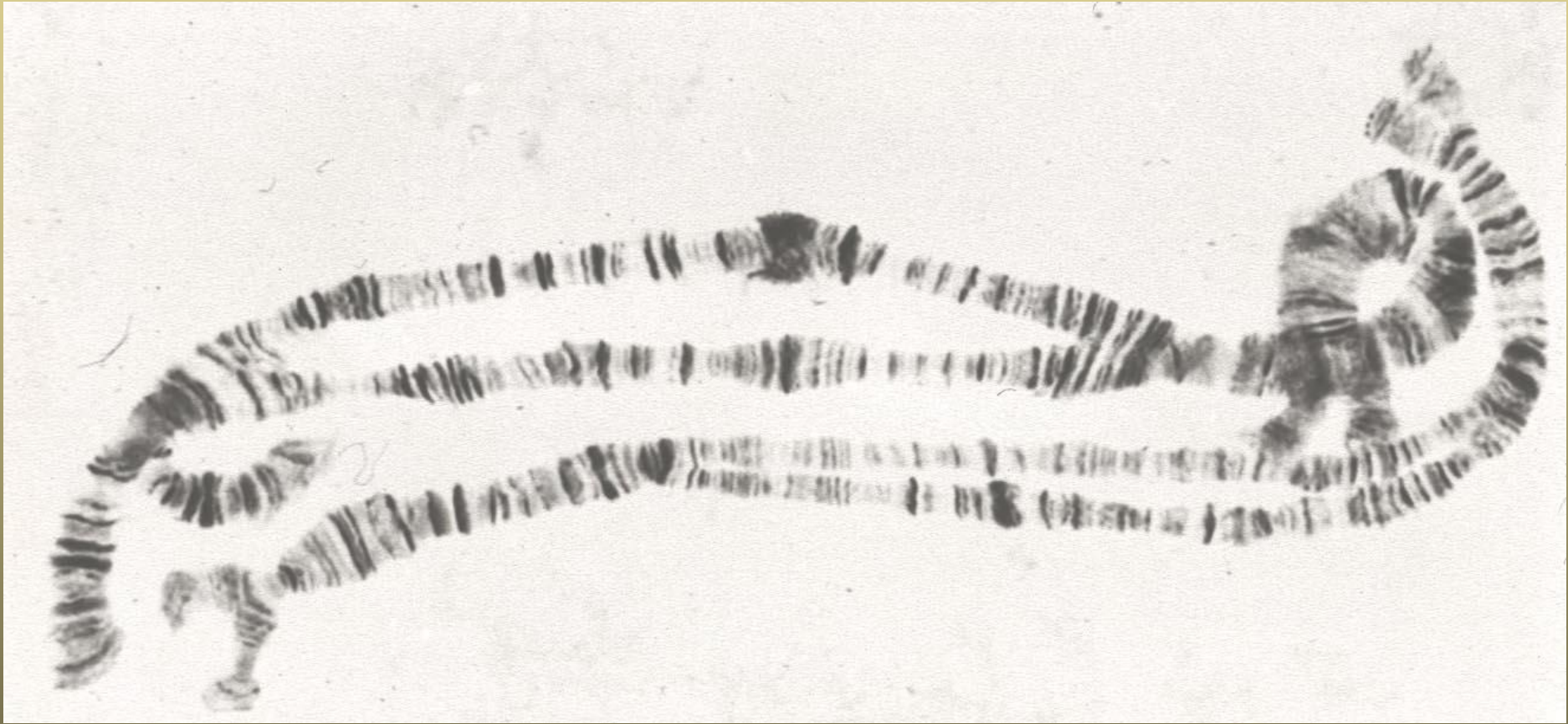
Polytänchromosomen bestehen aus vielen Chromatiden und zwei homologen Chromosomen

**Banden**

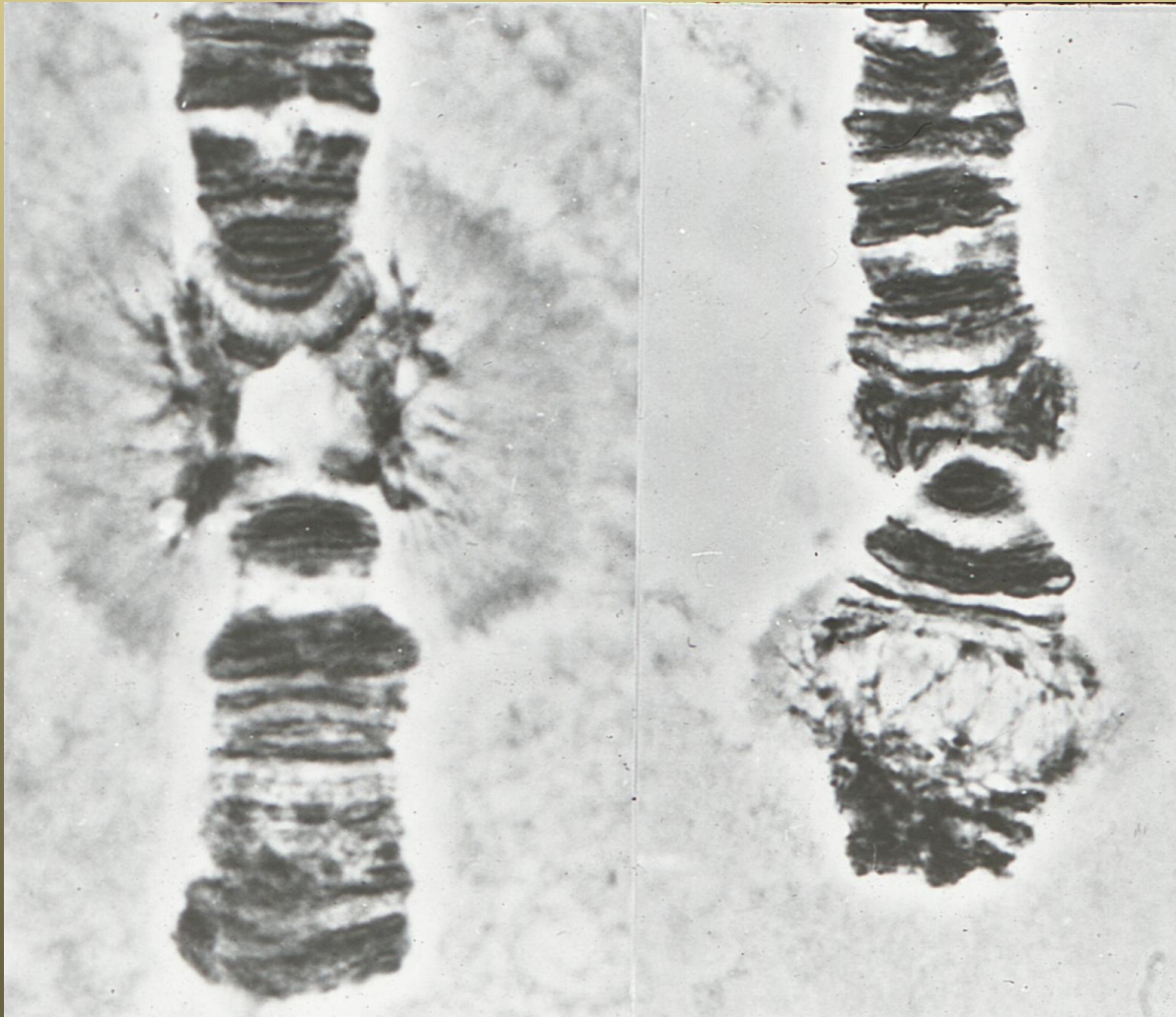
**Interbanden**



Chromsomen eines F1-Hybrids aus *C. thummi* x *C. piger*

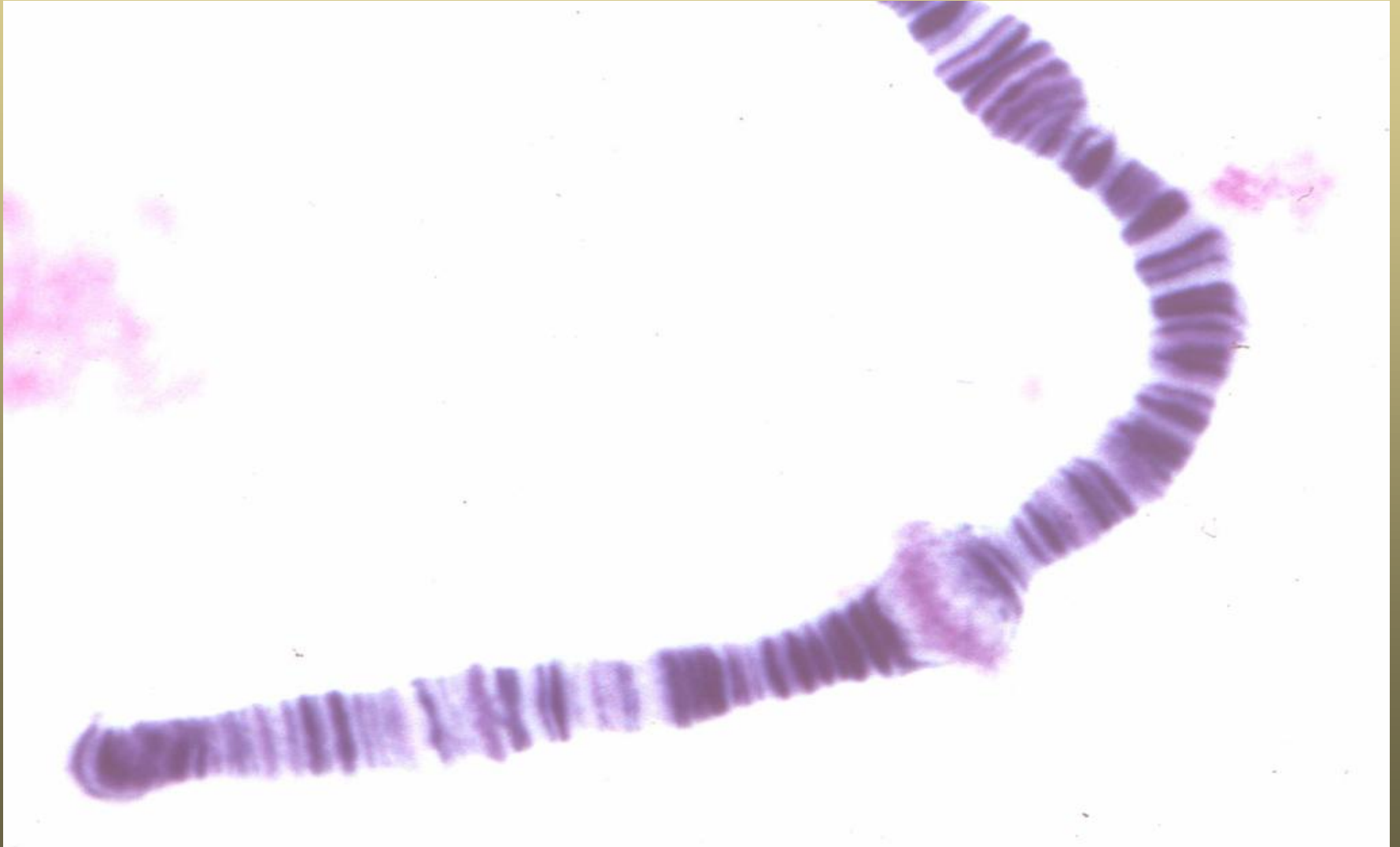


# Riesen-/Polytänchromosomen mit Balbiani-Ringen

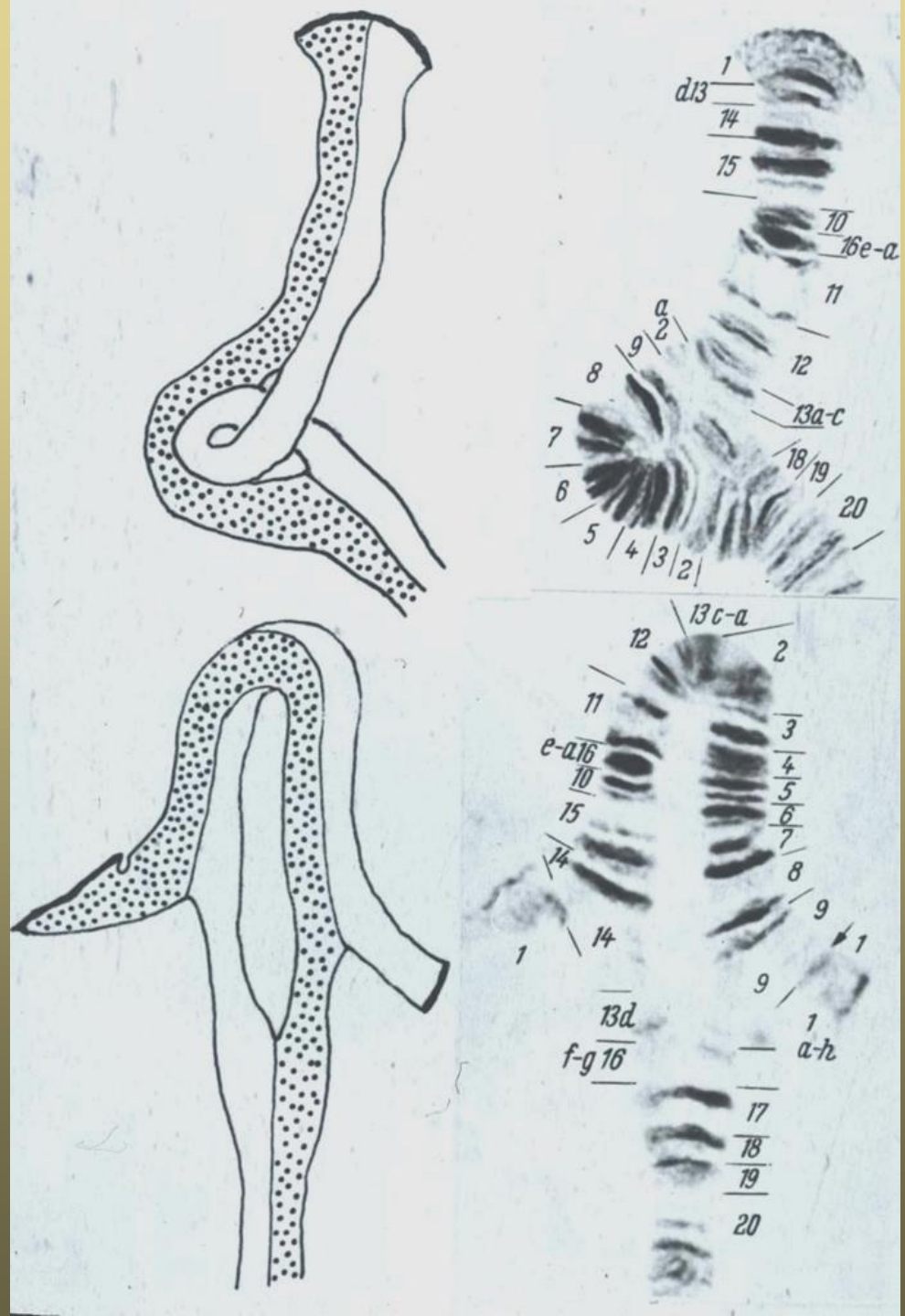


# Differenzielle Färbung zeigt aktive Gene

Methylgrün(DNA blau)/Pyronin (RNA rot)

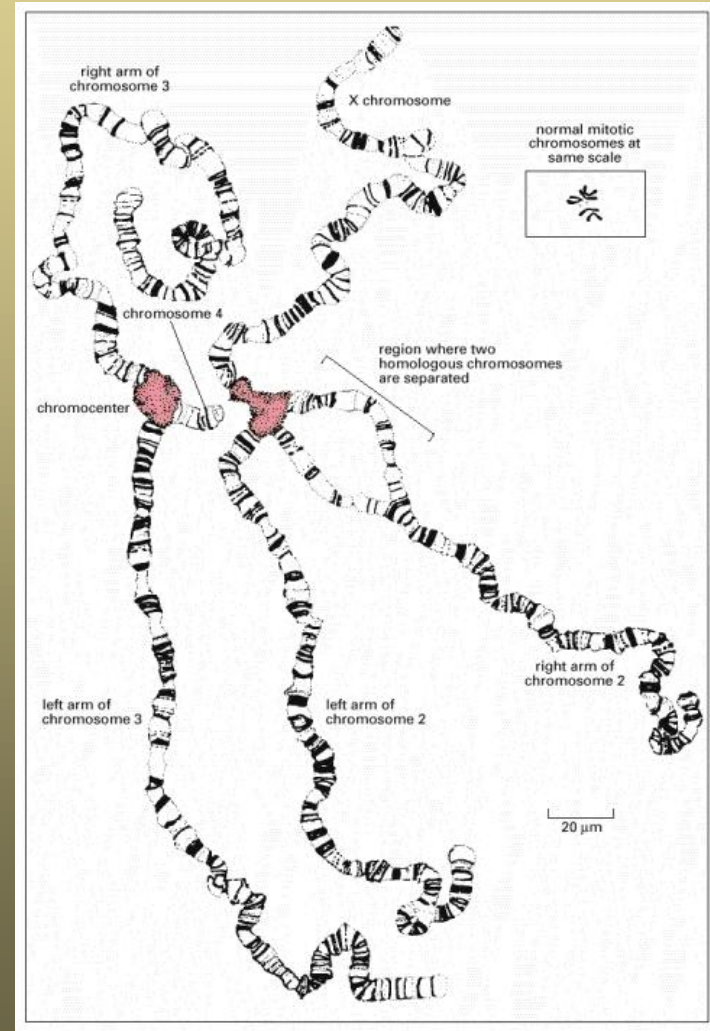
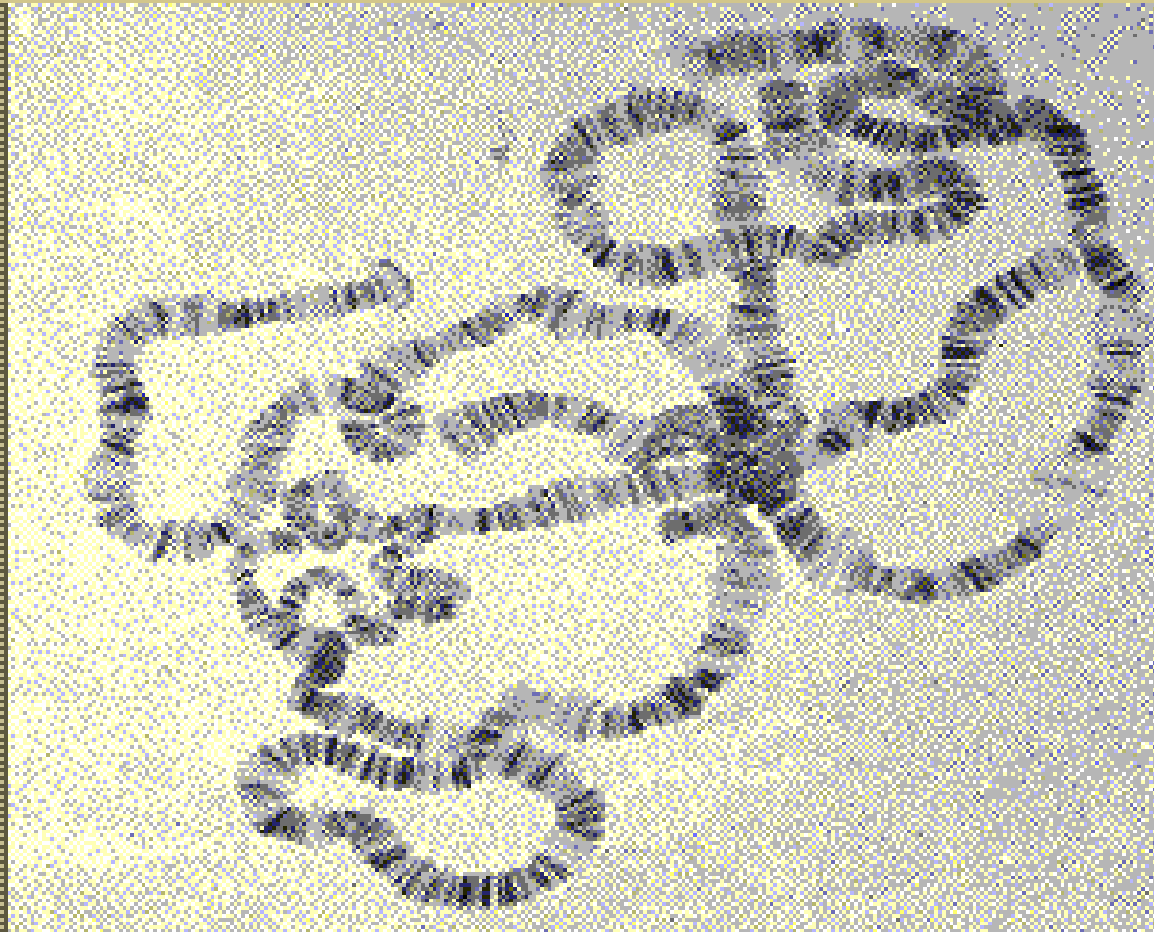


Chromosomen  
mutationen  
sind leicht zu  
erkennen:  
z. B.  
Inversions-  
heterozygote

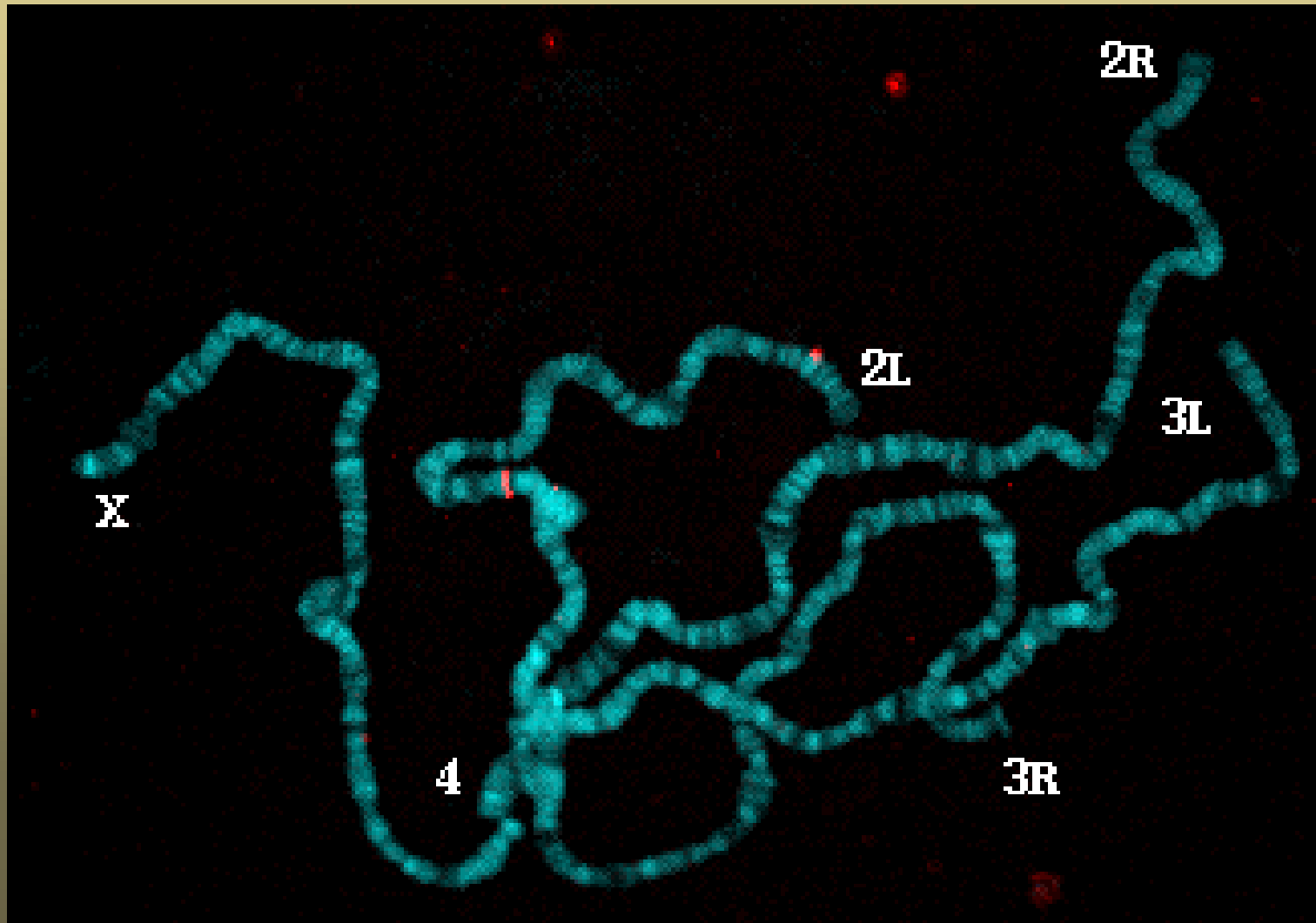


# Drosophila melanogaster

## Polytänchromosomen



# In situ Hybridisierung („FISH“)

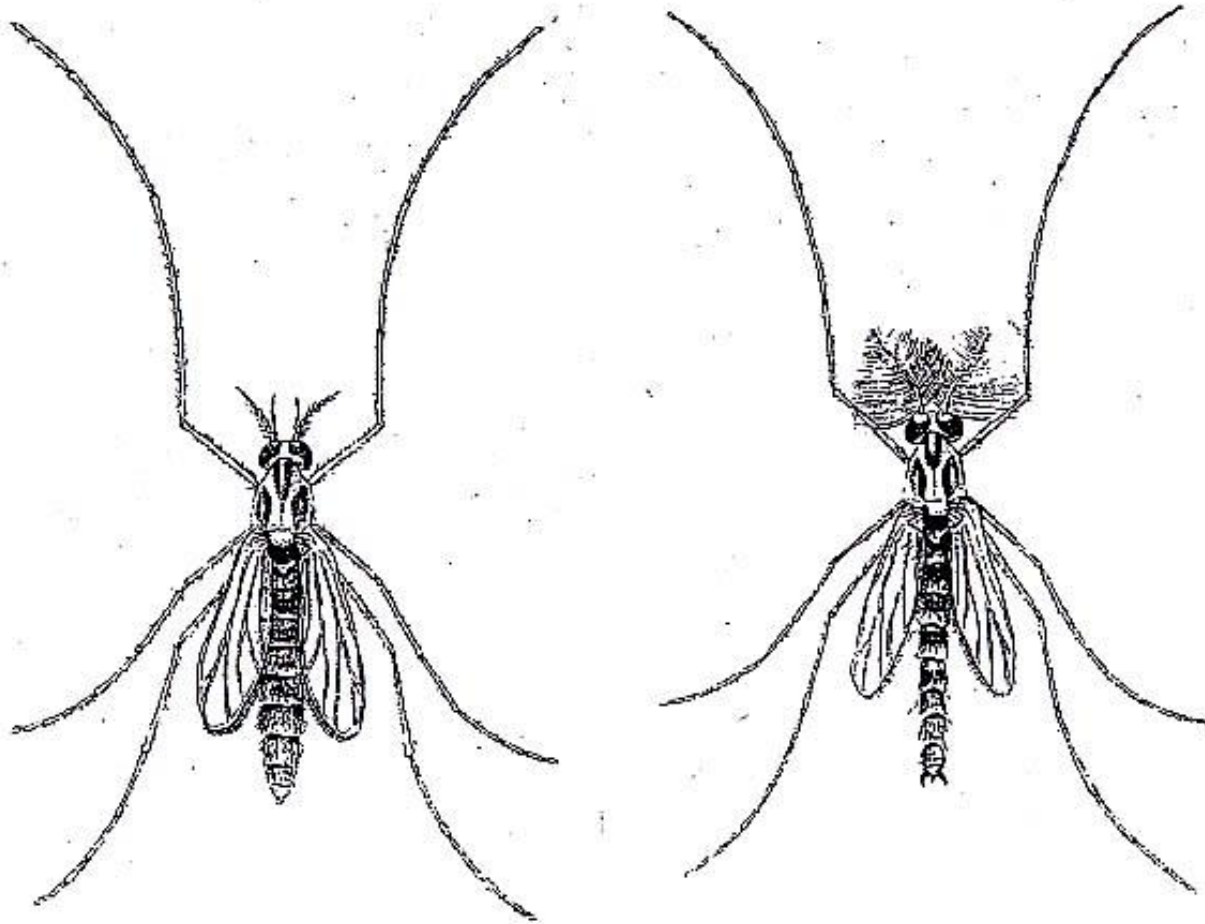


# Herstellung der Chromosomenpräparate:

- Präparate von Riesenchromosomen
- aus Speicheldrüsen von Dipterenlarven
- unser Organismus:  
Chironomus/Zuckmücken  
auch bekannt unter „rote Mückenlarven“  
(für Aquarienfrende beliebtes Fishfutter)

# Chironomus thummi- Imago:

*Chironomus thummi thummi*

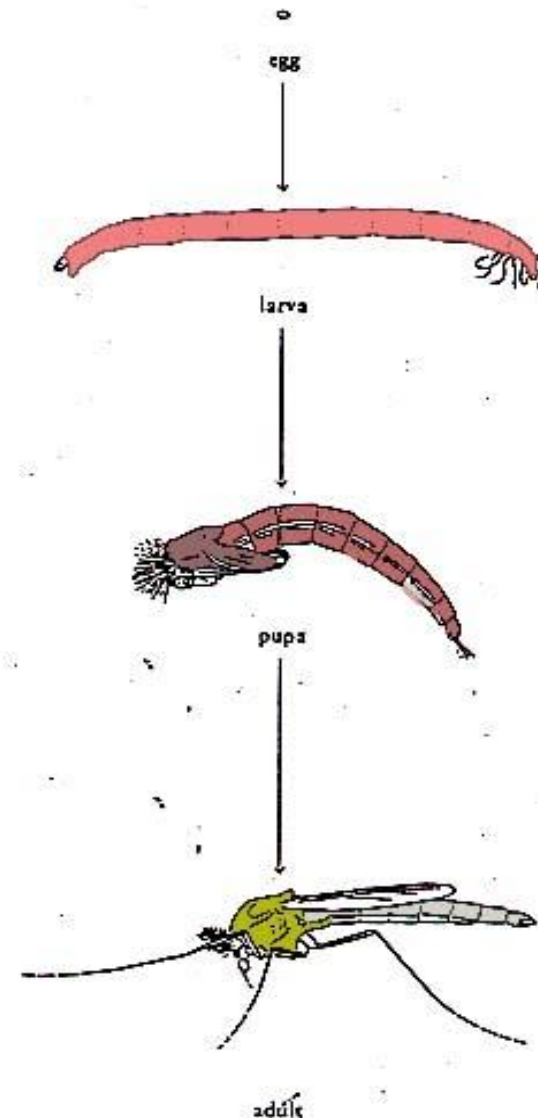


drawn by *Valeyeva Flöra*, Novosibirsk

# Chironomus thummi: Lebenszyklus

## 2.2 Life Cycle

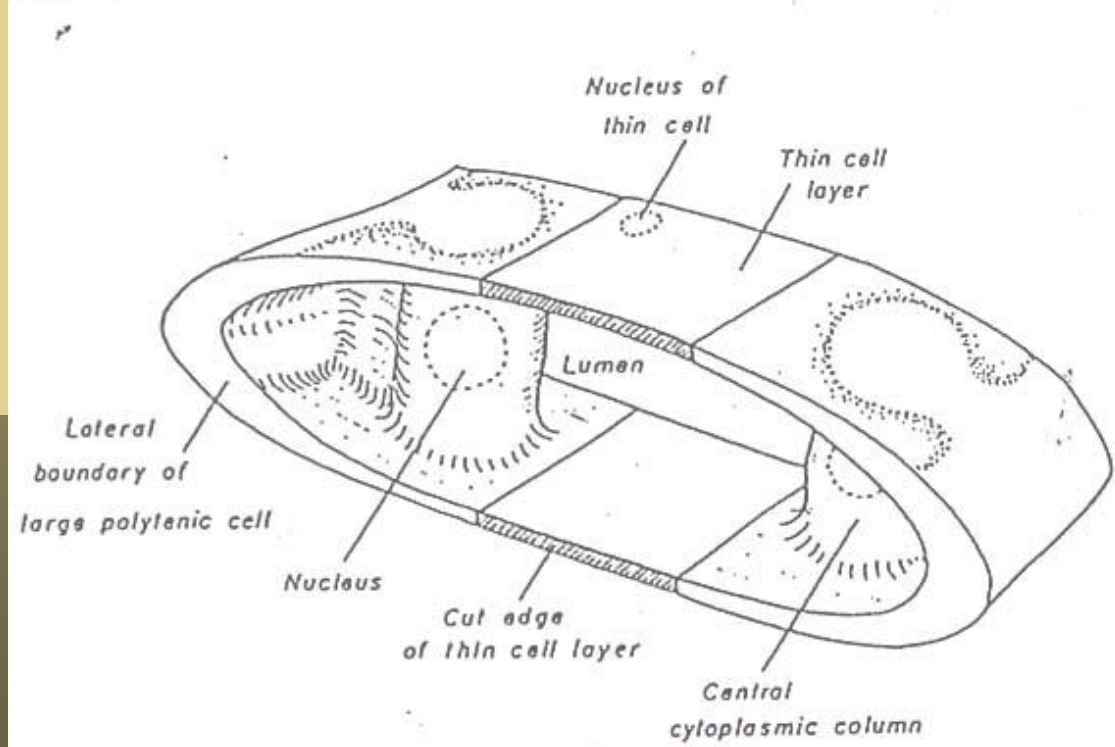
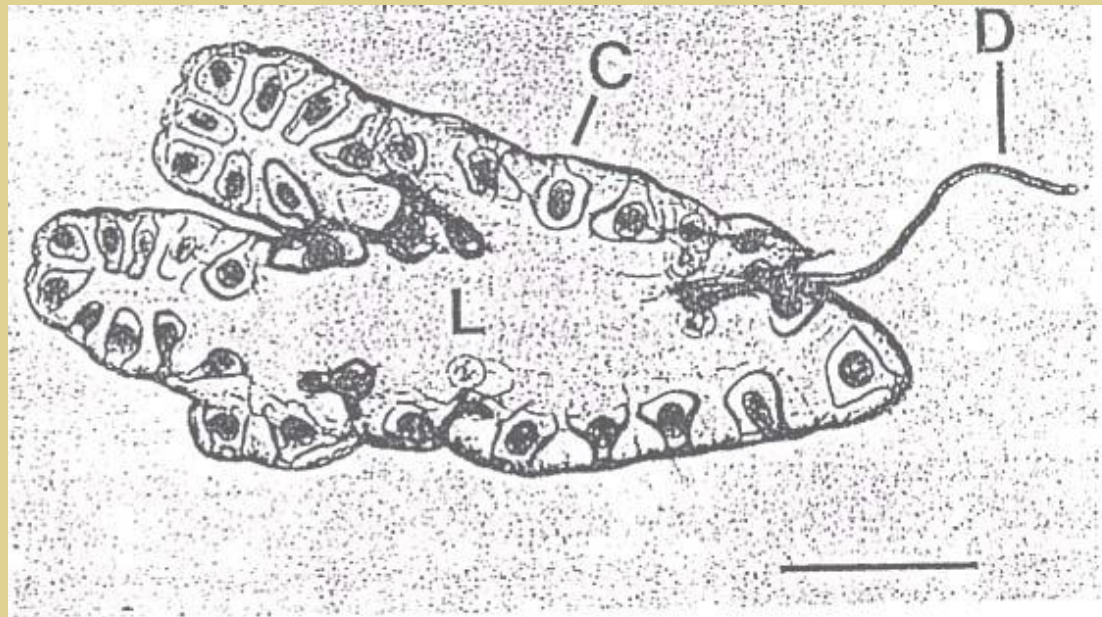
There are four basic stages in the life cycle of *Chironomus*: egg, larva, pupa, and adult (Fig. 1). The first three stages are aquatic whereas the adult stage is nonaquatic. The time required for growth and development varies from 4 to 8



# „Quetschpräparate“:

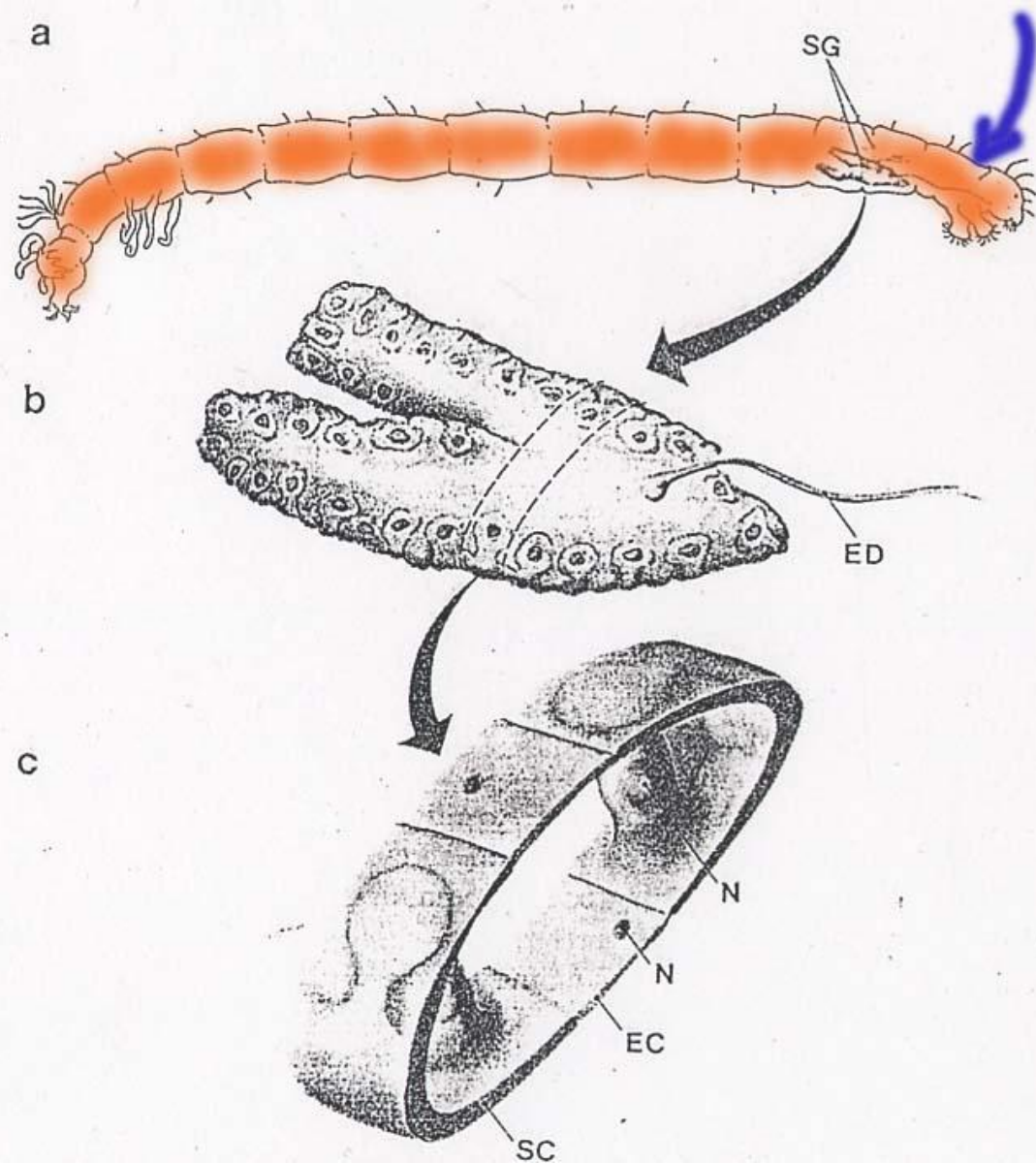
- Speicheldrüse identifizieren und auf Objektträger bringen
- ein Tropfen 40-50%iger Essigsäure auftropfen
- Deckglas auflegen
- Deckglas leicht anpressen
- unter Mikroskop kontrollieren

Chironomus thummi:  
die Speicheldrüsen



# Chironomus thummi:

## Präparation der Speicheldrüsen



# Ablauf der Chromosomenpräparation

- Chironomus Larve auf Eis(wasser) betäuben
- Larve auf Objektträger mit Präpariernadeln „dekapitieren“
- Entweder rutschen Speicheldrüsen spontan aus dem Larvenkörper oder durch leichten Druck mit der Nadel herausdrücken
- Drüsen liegen paarig links und rechts des Vorderdarms
- Auftropfen von Essigsäure hilft beim Identifizieren der Drüsen
- Reste der Larve von den Drüsen und vom Objektträger entfernen
- Drüsen leicht mit Präpariernadeln in Essigsäure „zerzupfen“ (nicht eintrocknen lassen!)
- Deckglas auflegen und andrücken; dabei werden Drüsenzellen gequetscht („Quetschpräparate“); Zellen und Zellkerne platzen dabei und Chromsomen werden gestreckt
- Ergebnis unter Mikroskop kontrollieren
- Bei Erfolg (gute Chromosomen) Präparat mit Deckglas nach unten auf Trockeneis einfrieren
- Deckglas mit Skalpell/Rasierklinge absprengen und Objektträger unverzüglich in Isopropanol/Ethanol stellen