



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 698 29 860 T2** 2005.09.22

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 012 330 B1**

(51) Int Cl.<sup>7</sup>: **C12Q 1/68**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **698 29 860.8**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/IB98/00439**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **98 907 137.8**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 98/038333**

(86) PCT-Anmeldetag: **27.02.1998**

(87) Veröffentlichungstag  
der PCT-Anmeldung: **03.09.1998**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **28.06.2000**

(97) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: **20.04.2005**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **22.09.2005**

(30) Unionspriorität:  
**9704054 27.02.1997 GB**

(84) Benannte Vertragsstaaten:  
**AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI,  
LU, MC, NL, PT, SE**

(73) Patentinhaber:  
**Ferguson-Smith, Malcolm, Cambridge, GB**

(72) Erfinder:  
**FERGUSON-SMITH, A., Malcolm, Cambridge CB1  
3QT, GB; WIENBERG, Friederich, Johannes,  
D-83064 Reichenhart, DE; MULLER, Stefan,  
D-81543 Munich, DE**

(74) Vertreter:  
**Samson & Partner, Patentanwälte, 80538 München**

(54) Bezeichnung: **SPEZIES-ÜBERGREIFENDES ANFÄRBN VON CHROMOSOMEN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

**Beschreibung**

## Priorität

**[0001]** Diese Anmeldung beansprucht die Priorität der Britischen Patentanmeldung Nr. 9704054.7, die am 27. Februar 1997 eingereicht worden ist.

## Gebiet der Erfindung

**[0002]** Diese Erfindung betrifft einen Assay für den Nachweis und die Identifizierung von Chromosomenaberrationen.

## Hintergrund der Erfindung

**[0003]** Die Identifizierung und Analyse von Chromosomenpräparationen hing bislang von Anfärbemethoden, die charakteristische Chromosomenbandenfärbungsmuster, welche für jedes Chromosom einzigartig sind, erzeugen, ab. Die Auflösung der Methode ist gering und kleine Umlagerungen, einschließlich einiger Deletionen und Duplikationen, sind nicht nachweisbar. Dies hat zu der Einführung von Fluoreszenz-in situ-Hybridisierungs (FISH)-Techniken unter Verwendung von DNA-Sonden, die mit komplementären Sequenzen auf Chromosomen hybridisieren und folglich als spezifische Marker wirken können, geführt. Die auf diese Weise hybridisierten Sonden sind gewöhnlich durch Haptene markiert und werden indirekt durch fluoreszierende Antikörper nachgewiesen oder direkt durch Fluorochrome, die in die Sonde selbst eingebaut sind, nachgewiesen. Die Spezifität der Sonde hängt von ihrer DNA-Sequenz ab und die Größe des Signals hängt von der Länge der Sequenz ab. Viele Arten von DNR-Sonden werden in einem Plasmid, Cosmid, künstlichen Hefechromosom oder andersartigen Vektor kloniert.

**[0004]** Eine andere Klasse von DNA-Sonden verwendet gesamte genomische DNA aus entweder vollständiger nukleärer DNA oder aus Fraktionen von nukleärer DNA, die ausgehend von verschiedenen Quellen, einschließlich ganzer Zellen und spezieller Chromosomen, erzeugt werden können. Das übliche Verfahren zur Herstellung dieser komplexen Sonden erfolgt durch DNA-Amplifizierung unter Verwendung der Polymerasekettenreaktion (PCR) und von DNA-Primern mit zufälliger Sequenz („random“-DNA-Primer). Die Markierung wird während der Amplifizierungsprozedur oder durch Nick-Translation nach der Amplifizierung eingebaut. Die Hybridisierung von diesen Sonden mit Chromosomen resultiert in einer mehr oder weniger gleichförmigen Reihe von fluoreszierenden Signalen über die gesamte Länge des Chromosoms hinweg. Dies ist als „chromosome painting“ bezeichnet worden und die Sonden, die diesen Effekt erzeugen, sind als „chromosome paints“ bezeichnet worden.

**[0005]** „Paints“, die individuellen Chromosomen entsprechen (chromosomenspezifische „Paints“), können aus einer PCR-Amplifizierung von mittels Durchflusszytometrie sortierten Chromosomen hergestellt werden. Sie haben sich als nützlich bei dem Nachweis und der Identifizierung von Chromosomenaberrationen unterhalb der Auflösung von zytogenetischen Standard-Bandenfärbungsmethoden erwiesen. Es können mehrere Chromosomen-spezifische „Paints“ zusammen verwendet werden, um eine Mehrzahl von Zielchromosomen nachzuweisen vorausgesetzt, dass verschiedene Fluorochrome für die Markierung der Sonden, welche von verschiedenen Chromosomen abgeleitet sind, verwendet werden. Für eine detailliertere Beschreibung von modernen zytogenetischen Techniken siehe Ferguson-Smith und Andrews, 1996, „Cytogenetic Analysis“, Kapitel 12, in Emery & Rimoin's PRINCIPLES & PRACTICE OF MEDICAL GENETICS, herausgegeben von D.L. Rimoin et al., Churchill-Livingstone, London. Zusätzlich sind für humane Chromosomen spezifische „Paints“ verwendet worden, um Homologien in nicht-humanen Spezies durch vergleichende Genomanalyse zu identifizieren (Wienberg & Stanyon, 1995, Curr. Opin. Gen. & Dev. 5:792-97).

## Zusammenfassung der Erfindung

**[0006]** Unter einem Aspekt stellt die Erfindung ein Verfahren zum Nachweisen einer Chromosomenaberration in einem Tier bereit, indem wenigstens eine detektierbar markierte Chromosomen-spezifische Sonde aus einer ersten Tierspezies mit einem oder mehreren Chromosomen von einer zweiten Tierspezies hybridisiert wird; ein aus der Hybridisierung resultierendes Bandenfärbungsmuster detektiert wird; und das detektierte Bandenfärbungsmuster mit einem Bandenfärbungsmuster für das oder die entsprechende(n) nicht-aberrante(n) Chromosom(e) der zweiten Spezies verglichen wird. In einer Ausführungsform dieses Verfahrens wird eine Mehrzahl (wenigstens zwei) von detektierbar markierten Chromosomenspezifischen Sonden aus der ersten Tierspezies mit einem oder mehreren Chromosomen einer zweiten Tierspezies hybridisiert und wenigstens zwei der Chro-

mosomen-spezifischen Sonden sind unterschiedlich markiert.

**[0007]** In einer Ausführungsform der Erfindung sind beide Tierspezies Vertebraten. In verschiedenen Ausführungsformen ist die erste Tierspezies ein nicht-humaner Primat, beispielsweise ein nicht-humaner Primat aus der Gattung *Hylobates*, wie *Hylobates concolor* und/oder *Hylobates syndactylus*. In einer Ausführungsform der Erfindung ist die zweite Spezies ein Mensch. Die Hybridisierung kann mit dem vollständigen Karyotyp des zweiten Tiers erfolgen.

**[0008]** Die Sonden der Erfindung können detektierbar markierte Sonden mit einer oder mehreren Hapten-Spezies, einem Fluorochrom oder beidem sein. In bestimmten Ausführungsformen ist das Hapten Biotin, Digoxigenin oder Fluorescein-isothiocyanat (FITC). Beispiele von Fluorochromen sind FITC, Cyanin-2, Cyanin-3, Cyanin-3,5, Cyanin-5, Cyanin-7, Fluorescein, Texas red, Rhodamin, Lissamin und Phycoerythrin. Chromosomenspezifische Sonden der Erfindung können mit mehr als einer Markierung (z.B. 2, 3 oder mehr Haptenen, Fluorochrome oder Kombinationen von Haptenen und Fluorochromen) markiert sein.

**[0009]** Unter einem damit in Zusammenhang stehenden Aspekt ist die Erfindung auf Zusammensetzungen von detektierbar markierten Chromosomenspezifischen Sonden aus wenigstens zwei unterschiedlichen Tierspezies gerichtet. Die Spezies können Vertebraten, wie nicht-humane Primaten (z.B. Spezies aus der Gattung *Hylobates*, wie *Hylobates concolor* und *Hylobates syndactylus*), sein.

**[0010]** Unter einem anderen damit in Zusammenhang stehenden Aspekt stellt die Erfindung Kits bereit, die nützlich sind, um Chromosomenaberrationen nachzuweisen. In einer Ausführungsform enthält der Kit eine oder mehrere detektierbar markierte Chromosomen-spezifische Sonden aus einer nicht-humanen Tierspezies und eine Photographie oder eine Zeichnung eines normalen humanen Karyotyps, der mit den Sonden gefärbt ist. In einer Ausführungsform enthält der Kit der Erfindung detektierbar markierte Chromosomen-spezifische Sonden aus zwei unterschiedlichen Spezies in dem gleichen Behälter. In einer besonderen Ausführungsform sind beide Spezies nicht-humane Primaten, wie Primaten der Gattung *Hylobates*.

#### Kurze Beschreibung der Figuren

**[0011]** [Fig. 1](#) zeigt ein Idiogramm, welches die in situ-Hybridisierung an humane Chromosomen durch Chromosomen-spezifische Sonden aus *H. concolor* zusammenfasst.

**[0012]** [Fig. 2](#) zeigt bivariate (zweidimensionale) Durchflusszytometer-Karyotypen („bivariate flow karyotypes“) von (a) männlichen *Hylobates concolor*- und (b) weiblichen *H. syndactylus*-Chromosomen aus lymphoblastoiden Zellkulturen. Sonden, die durch mit degenerierten Oligonukleotiden als Primer gestartete PCR („degenerate oligonucleotide primed-PCR“; DOP-PCR) ausgehend von mittels Durchflusszytometrie sortierten Chromosomen und in situ-Hybridisierung von diesen Sonden an Gibbon-Metaphasen-Ausbreitungen erzeugt worden sind, ermöglichten die Zuordnung von jedem Peak zu einem Chromosom. Die Chromosomennummerierung folgte Koehler et al., 1995, *Genomics*, 30:287-292, und Koehler et al., 1995, *Am. J. Phys. Anthropol.*, 97:37-47. Für den männlichen *H. concolor* wurde ein Y-Chromosom aus der Nähe des Debris-Spikes sortiert (nicht gezeigt).

**[0013]** [Fig. 3](#) zeigt ein Idiogramm, welches in situ-Hybridisierungsexperimente zusammenfasst, welche humane Chromosomen mit Chromosomenspezifischen Sonden, welche von zwei unterschiedlichen Gibbon-Spezies (*H. concolor* und *H. syndactylus*) abgeleitet worden sind, in Form eines „Painting“ anfärben. Die Hybridisierungsstellen und die Anzahl der Gibbon-„Painting“-Sonden sind auf der linken Seite jedes Chromosoms für den *H. concolor*-Gibbon und auf der rechten Seite für den *H. syndactylus*-Gibbon angegeben.

**[0014]** [Fig. 4](#) zeigt verschiedene Gibbon-Einzelchromosom-Sonden, welche Subregionen des humanen Chromosoms **1** aus einem Patienten mit einer Transposition (46,XY,inv(1)(p36.1;p31p32) voneinander abgegrenzt sichtbar machen. Die Sonden stammten aus *H. concolor* (Concolor)-Gibbon-Chromosomen: (a) Chromosom **5**; (b) Chromosom **9**; (c) Chromosom **12**; und (d) Chromosom **24**. Das normale humane Chromosom befindet sich auf der linken Seite jedes Bilds. Eine mit der Gibbon-Chromosom 12-Sonde nicht markierte Bande in (c) in dem kurzen Arm entspricht dem mit einem Teil der Chromosom 5-Sonde in Form eines „Painting“ angefärbten Segment. Dieses Segment ist transponiert und nahe des Telomers (a) inseriert, wodurch das Signal der Gibbon-Chromosom 24-Sonde (d) zerstört wird.

**[0015]** [Fig. 5](#) zeigt eine Kreuz-Spezies-Farb-Bandenfärbung („cross-species color banding“; „CSC-banding“) unter Verwendung von für Gibbon-Chromosomen spezifischen „Paints“ an humanen Chromosomen. (a) Kary-

otyp von normalen humanen Chromosomen unter Verwendung des von H. syndactylus abgeleiteten Sonden-satzes. (b)-(c) Chromosomen-Umlagerungen aus Patienten, die durch CSC-Bandenfärbung („CSC-banding“) sichtbar gemacht wurden; (b) CSC-Bandenfärbung mit dem H. syndactylus (Siamang)-Sondensatz, welche eine Metaphase mit einer Translokation  $t(1;2)(g37;q42.3)$  zeigt. In der Metaphase sind die Chromosomen **1** und **2** durch Pfeilspitzen markiert. In dem umrahmten Feld werden umgelagerte Chromosomen durch Pfeile angegeben; (c) CSC-Bandenfärbung mit dem von H. concolor (Concolor)-Gibbon abgeleiteten Sonden-satz, welche eine Metaphase mit einer perizentrischen Inversion auf Chromosom **2** ( $inv(2)(p23g13)$ ) zeigt. Das normale Chromosom wird mit einer Pfeilspitze angegeben, während das aberrante Chromosom mit einem Pfeil markiert ist; (d) ausgewählte Prophase-Chromosomen aus einer Hybridisierung mit einer unterschiedlichen Farbkombination, welche für die Chromosomen-Markierung verwendet wird.

#### Beschreibung der Erfindung

**[0016]** Vor der Erfindung ist die Nützlichkeit des „chromosome painting“ für die Karyotypen-Analyse begrenzt gewesen. Obwohl ein herkömmliches „chromosome painting“ verwendet werden kann, um interchromosomale Umlagerungen, wie Translokationen, nachzuweisen, kann es keine intrachromosomalen Umlagerungen, wie Inversionen, Amplifikationen und Deletionen identifizieren. Dementsprechend würde ein Verfahren, das die Detektion von intrachromosomalen Umlagerungen vereinfacht, die Analyse von Chromosomen-Aberrationen stark verbessern. Eine andere Einschränkung von früheren Methoden des „chromosome painting“ ist die Kreuzhybridisierung, die zwischen bestimmten nicht-homologen Chromosomen aufgrund der Anwesenheit von verschiedenen Klassen von repetitiver DNA auftritt. Einige, aber nicht alle, der Kreuzhybridisierungen können beseitigt werden, indem mit Cot-1-DNA blockiert wird oder ermöglicht wird, dass man die Sonde mit sich selbst reassoziieren lässt, bevor sie mit der Chromosomen-Präparation hybridisiert wird (Wienberg et al., 1997, „Chromosome painting without competitor DNA“, Technical Tips Online (<http://www.elsevier.com/locate/tto>)). Bei einer Verwendung dieser Methoden wird jedoch bei Sonden, die von bestimmten Chromosomen abgeleitet sind, nach wie vor ein Hintergrund (Kreuzhybridisierung) beobachtet.

**[0017]** Die Erfindung stellt Verfahren und Reagenzien zum Nachweisen einer Chromosomen-Aberration in einem Tier unter Verwendung von Chromosomenspezifischen „Paints“ (z.B. hergestellt durch die unterschiedliche Markierung von Chromosomenarmen, -regionen und -subregionen), hergestellt aus Spezies, die sich hinsichtlich der repetitiven DNA auseinanderentwickelt haben, bereit. Zusätzlich wird eine Charakterisierung auf subregionaler Ebene erzielt, wenn Chromosomenumlagerungen während der Auseinanderentwicklung (Divergenz) aufgetreten sind. In einer Ausführungsform wird ein in situ-Hybridisierungs-FISH-System verwendet, um jede Chromosomen-spezifische Sonde mit einem unterschiedlichen Spektrum von Fluorochromen zu markieren. Dies wird erreicht, indem Fluorochrome in unterschiedlichen Kombinationen und Verhältnissen für jedes Chromosom kombiniert werden. Die Chromosomen-spezifischen Sonden werden zu einer Hybridisierungs-sondenmischung (die CSC-Bandenfärbungssonde) gepoolt und mit der Chromosomen-Präparation aus der Spezies, die sich davon weg entwickelt hat (Divergenz), hybridisiert. Abhängig von der Anzahl von Chromosomenumlagerungen, die während der Divergenz der beiden Spezies aufgetreten sind, wird sich unter dem Fluoreszenzmikroskop zeigen, dass jedes Zielchromosom aus einer Reihe von unterschiedlich gefärbten Blöcken von konservierter DNA zusammengesetzt ist. Diese unterschiedlich gefärbten Blöcke werden hier als „Banden“ bezeichnet und das Verfahren zur Herstellung von diesen wird als „Kreuz-Spezies-Farb-Bandenfärbung“ („cross-species color banding“) oder CSC-Bandenfärbung („CSC-banding“) bezeichnet. Durch Vergleichen des Bandenfärbungsmusters des untersuchten Chromosoms oder Karyotyps mit jenem eines normalen oder nicht-aberranten Chromosoms oder Karyotyps werden Chromosomen-Abnormalitäten identifiziert.

**[0018]** Das Verfahren und die neuen Reagenzien der Erfindung sind neben anderen Verwendungen für die Analyse von humanen Chromosomen-Aberrationen bei der klinischen Diagnose und bei der Krebs-Zytogenetik nützlich. Zusätzliche Anwendungen umfassen Untersuchungen im Rahmen der Tier-Zytogenetik und als biologisches Dosimeter für klastogene Agentien in Mutationsuntersuchungen unter Verwendung von Zellkulturen oder Tiermodellen. Das Verfahren hat gegenüber der herkömmlichen Bandenfärbung (z.B. durch 4,6-Diaminido-2-phenylindol [DAPI]-Färbung) oder herkömmlichen FISH-Methoden zahlreiche Vorteile, welche umfassen:

- 1) Intrachromosomale Umlagerungen können zusätzlich zu interchromosomalen Aberrationen und Aneuploidien identifiziert werden.
- 2) Die Kreuz-Hybridisierung zwischen nicht-homologen Chromosomen wird stark verringert, teilweise aufgrund der intensiven Divergenz von repetitiven DNA-Sequenzen zwischen den Spezies. DNR mit einzigartiger Sequenz ist auf der anderen Seite zwischen den Spezies konserviert. Die Verringerung der Kreuzhybridisierung ermöglicht eine verbesserte Spezifität, eine Voraussetzung für eine automatisierte Chromosomenanalyse.
- 3) Da stabile Quellen für Chromosomen-spezifische DNR-„Paint“-Sonden verwendet werden, ist das Ver-

fahren hochgradig reproduzierbar.

4) Das Verfahren kann in Verbindung mit vielen Techniken, einschließlich Standardfluoreszenzmikroskopie, kombinatorischer Multi-Fluoreszenz-FISH und mit spektraler Karyotypisierung, verwendet werden.

**[0019]** Die Erfindung wird jetzt noch detaillierter beschrieben.

## I. Definitionen

**[0020]** Der Ausdruck „Chromosomen-Bandenfärbung („chromosome banding“) bezieht sich auf eine unterschiedliche Färbung von Chromosomen, die in einem Muster von quer verlaufenden Banden von unterscheidbaren (z.B. unterschiedlich oder abwechselnd gefärbten) Regionen, das für das individuelle Chromosom oder die individuelle Chromosomenregion charakteristisch ist (d.h. das „Bandenfärbungsmuster“ („banding pattern“)), resultiert. Herkömmliche Bandenfärbungstechniken umfassen G-Bandenfärbung (Giemsa-Färbung), Q-Bandenfärbung (Quinacrin-Senf („Quinacrine mustard“)-Färbung), R-Bandenfärbung (Reverse Giemsa-Färbung) und C-Bandenfärbung (Zentromer-Bandenfärbung).

**[0021]** Der Ausdruck „Karyotyp“ bezieht sich auf die Chromosomencharakteristik einer individuellen Zelle oder Zelllinie einer gegebenen Spezies, die sowohl durch die Anzahl als auch die Morphologie der Chromosomen definiert wird. Typischerweise wird der Karyotyp als eine systematische Anordnung von Prophase- oder Metaphase- (oder auf andere Weise kondensierten) Chromosomen aus einer Mikrophotographie oder einem mittels Computer erzeugten Bild dargestellt. Alternativ können Interphase-Chromosomen als von Histonen befreite DNA-Fasern, die aus Interphase-Zellkernen freigesetzt worden sind, untersucht werden.

**[0022]** Wie hier verwendet, bezieht sich „Chromosomen-Aberration“ oder „Chromosomen-Abnormalität“ auf eine Abweichung zwischen der Struktur des untersuchten Chromosoms oder Karyotyps und einem normalen (d.h. „nicht-aberranten“) homologen Chromosom oder Karyotyp. Die Ausdrücke „normal“ oder „nicht-aberrant“, wenn sie sich auf Chromosomen oder Karyotypen beziehen, beziehen sich auf den vorherrschenden Karyotyp oder das vorherrschende Bandenfärbungsmuster, welcher bzw. welches bei gesunden Individuen einer bestimmten Spezies und Gattung gefunden wird. Chromosomen-Abnormalitäten können numerischer oder struktureller Natur sein und umfassen Aneuploidie, Polyploidie, Inversion, Translokation, Deletion, Duplikation und dergleichen. Chromosomen-Abnormalitäten können mit der Anwesenheit eines pathologischen Zustands (z.T. Trisomie 21 bei Down-Syndrom, Chromosom 5p-Deletion bei dem Cri-du-chat-Syndrom und eine große Vielzahl von unbalancierten Chromosomenumlagerungen, die zu Dismorphologie und mentalen Schädigungen führen) oder mit einer Veranlagung dafür, einen pathologischen Zustand zu entwickeln, korreliert sein.

**[0023]** „Chromosomen-spezifische Sonde“ oder „Chromosomen-spezifische „Paint““ bezieht sich auf eine Kombination von detektierbar markierten Polynukleotiden, die Sequenzen aufweisen, die den Sequenzen von DNA aus einem bestimmten Chromosom oder einer bestimmten subchromosomalen Region eines bestimmten Chromosoms (z.B. einem Chromosomarm) entsprechen (z.B. im wesentlichen die gleichen sind). Die Chromosomen-spezifische Sonde wird typischerweise durch Amplifizierung (z.B. unter Verwendung der Polymerasekettenreaktion) der entsprechenden chromosomalen DNA hergestellt. Eine Chromosomen-spezifische Sonde wird in einem im wesentlichen gleichförmigen Muster entlang des Chromosoms oder der subchromosomalen Region, von welchem bzw. von welcher sie abgeleitet ist, hybridisiert.

**[0024]** Der Ausdruck „CSC-Bandenfärbungssonde“ oder „CSC-Bandenfärbungs„Paint““ bezieht sich auf eine Mischung von Chromosomen-spezifischen Sonden. Die CSC-Bandenfärbungssonden der Erfindung umfassen typischerweise eine Mischung von wenigstens zwei, üblicherweise vielen Chromosomen-spezifischen Sonden.

**[0025]** Der Ausdruck „detektierbare Markierung“ bezieht sich in einem allgemeinen Sinne auf eine Gruppierung, wie ein radioaktives Isotop oder eine Gruppe, welche ein solches enthält, und auf Nicht-Isotopen-Markierungen, wie Enzyme, Biotin, Avidin, Streptavidin, Digoxigenin, lumineszierende Agentien, Farbstoffe, Haptene und dergleichen. Lumineszierende Agentien können abhängig von der Quelle der Anregungsenergie als radiolumineszierend, chemolumineszierend, biolumineszierend und photolumineszierend (einschließlich fluoreszierend und phosphoreszierend) klassifiziert werden. Der Ausdruck „fluoreszierend“ bezieht sich auf die Eigenschaft einer Substanz (wie eines Fluorophors), Licht zu erzeugen, während auf diese Strahlungsenergie, wie ultraviolettes Licht oder Röntgenstrahlen, einwirkt. Eine Sonde oder „Paint“ ist „detektierbar markiert“, wenn sie mit einer detektierbaren Markierung chemisch verknüpft oder assoziiert ist.

**[0026]** Der Ausdruck „direkt markiert“ bezeichnet eine Polynukleotidsonde mit einer detektierbaren Markie-

rung, die nach einer Hybridisierung mit einer Zielnukleinsäure ohne weitere reaktive Verarbeitung detektierbar ist. Ein Beispiel ist ein Polynukleotid, das mit Fluoresceinisothiocyanat konjugiertem dUTP markiert ist.

**[0027]** Der Ausdruck „indirekt markiert“ bezeichnet eine Polynukleotidsonde mit einer detektierbaren Markierung, die nach Hybridbildung mit einem Ziel im Rahmen einer nachfolgenden Verarbeitung weiter umgesetzt werden muss mit einem oder mehreren Reagenzien, damit eine oder mehrere Gruppierungen assoziiert werden, die schließlich in einer detektierbaren Struktur resultieren. Ein Beispiel ist ein Polynukleotid, das mit Digoxigenin-konjugiertem dUTP markiert ist, welches unter Verwendung eines mit einem Fluorochrom konjugierten anti-Digoxigenin-Antikörpers sichtbar gemacht werden kann.

**[0028]** Nukleinsäuresonden sind „abgeleitet“ von einem speziellen Chromosom oder einer speziellen Chromosomenregion, wenn die Sonden Nukleotidsequenzen aufweisen, die im wesentlichen die gleichen sind wie jene der DNA des Ausgangschromosoms oder der Ausgangschromosomenregion und die spezifisch mit der DNA des Chromosoms oder der Region hybridisieren.

**[0029]** Es versteht sich, dass hier Bezugnahmen auf „Hybridisieren einer Sonde oder „Paint“ mit einem Chromosom“ und dergleichen sich auf eine Hybridisierung oder ein Reassoziierenlassen von Nukleinsäuresonden an die DNA des Zielchromosoms beziehen.

## II. Kreuz-Spezies-Farb-Bandenfärbungs sonden

**[0030]** Die Kreuz-Spezies-Farb-Bandenfärbung („cross-species color banding“; „CSC-banding“) hat die Hybridisierung von detektierbar markierten Sonden (CSC-Bandenfärbungs sonden), welche von den Nukleinsäuren von einer oder mehreren Spezies abgeleitet sind, mit den Chromosomen (z.B. Metaphase-Ausbreitungen) einer unterschiedlichen Spezies zur Folge. Das oder die Chromosom(en), ausgehend von welchem bzw. welchen die Sonden abgeleitet werden, werden manchmal als „Ausgangschromosom(en)“ bezeichnet. Das Chromosom oder die Chromosomen, mit dem bzw. den die detektierbar markierten Sonden hybridisiert werden, werden manchmal als „Ziel“chromosome bezeichnet.

**[0031]** Die Herstellung von CSC-Bandenfärbungs sonden umfasst (1) die Auswahl von einer oder mehreren Spezies, ausgehend von welchen Chromosomenspezifische oder Subchromosomenregion-spezifische Sonden hergestellt werden sollen, (2) Isolierung von Chromosomen und differenzielle Markierung der von den Chromosomen abgeleiteten Chromosomen-spezifischen Sonden und (3) Kombinieren von zwei oder mehreren Chromosomenspezifischen Sonden, die von Chromosomen von einer oder mehreren Spezies abgeleitet sind, um die CSC-Bandenfärbungs sonden der Erfindung herzustellen.

**[0032]** Die CSC-Bandenfärbung kann ausgeführt werden unter Verwendung von Sonden und Zielchromosomen aus jeglichen geeigneten Kombinationen von Spezies. Aus Gründen der Klarheit konzentriert sich die folgende Beschreibung jedoch überwiegend auf die Verwendung von CSC-Bandenfärbungs sonden, die von Nukleinsäuren von einer oder mehreren nicht-humanen Spezies abgeleitet worden sind, um eine oder mehrere Chromosomen-Aberration(en) in Zielchromosomen aus einem Menschen nachzuweisen. Es versteht sich, dass nicht beabsichtigt ist, dass dies den Umfang der Erfindung, der durch die beigefügten Ansprüche definiert wird, beschränkt.

### A. Ausgangschromosomen für CSC-Bandenfärbungs sonden

**[0033]** Die CSC-Bandenfärbungs sonden der Erfindung werden ausgehend von anderen DNA-Quellen als jener der Zielchromosome hergestellt. Dementsprechend werden, wenn das Ziel darin besteht, eine Chromosomenabnormalität in einem humanen Chromosom oder Karyotyp nachzuweisen, die CSC-Bandenfärbungs sonden ausgehend von DNA aus einer nicht-humanen Spezies, wie einem nicht-humanen Tier (z.B. einem nicht-humanen Vertebraten), hergestellt. Die Sonden aus dem nicht-humanen Chromosom werden mit entsprechenden (homologen) nicht-repetitiven Sequenzen in den humanen Chromosomen hybridisieren. Wichtig ist, dass viele nicht-humane Chromosomen Umlagerungen von Chromosomenregionen bezogen auf die homologen Regionen von humanen Chromosomen aufweisen. So wird, wenn DNA-Sonden aus einem bestimmten nicht-humanen Chromosom gleichförmig markiert und mit einem oder mehreren humanen Chromosomen hybridisiert werden, ein nicht-gleichförmiges Hybridisierungsmuster resultieren (welches das Muster der Umlagerungen reflektiert), wodurch einem Praktiker erlaubt wird, zwischen verschiedenen Regionen des Zielchromosoms zu unterscheiden. Anders gesagt, wird eine Chromosomen-spezifische „Paint“ aus einem Chromosom einer nicht-humanen Spezies, das Umlagerungen bezogen auf das humane Chromosom aufweist, bei einer Hybridisierung mit dem humanen Karyotyp ein Bandenfärbungsmuster bei den humanen Chromosomen

erzeugen.

**[0034]** Eine gleichförmig markierte Sonde aus einem einzelnen Chromosom ermöglicht jedoch eine begrenzte Auflösung der Struktur des oder der humanen Chromosoms oder Chromosome und ist für die Diagnose oder Prognose von humanen Krankheiten von begrenzter Nützlichkeit. Die Auflösung wird beträchtlich verbessert durch Verwendung einer Mischung von Chromosomen-spezifischen Sonden, die von mehreren unterschiedlichen Chromosomen abgeleitet sind, von denen wenigstens einige unterschiedlich markiert sind. Zwei Chromosomen-spezifische Sonden sind bezogen aufeinander unterschiedlich markiert, wenn sie unterscheidbare detektierbare Markierungen, unterschiedliche Kombinationen von detektierbaren Markierungen, unterschiedliche Verhältnisse von detektierbaren Markierungen tragen oder ansonsten nach einer Hybridisierung mit dem oder den Zielchromosom(en) unterschieden werden können (z.B. aufgrund der Emission von unterschiedlichen Spektren). Techniken für die unterschiedliche Markierung sind in diesem Fachgebiet wohlbekannt (z.B. Speicher et al., 1996, Nature Genet. 12:368-75) und werden weiter unten weiter beschrieben.

**[0035]** So werden in einer Ausführungsform Chromosomen-spezifische Sonden, die jedem Chromosom einer nicht-humanen Spezies entsprechen, mit einer unterschiedlichen detektierbaren Markierung markiert und für eine CSC-Bandenfärbung an humanen Chromosomen verwendet. Häufiger wird weniger als der vollständige Satz von Chromosomen aus der nicht-humanen Spezies verwendet werden und zwei oder mehrere Chromosomen können die gleiche detektierbare Markierung tragen.

**[0036]** Mit der Maßgabe bestimmter Zielchromosomen (z.B. dem humanen Karyotyp) wird die Auswahl von bestimmten Kombinationen von Chromosomen (z.B. nicht-humanen Chromosomen), ausgehend von welchen geeignete Chromosomen-spezifische Sonden hergestellt werden sollen, die Kombination von Chromosomen-spezifischen Sonden und die Auswahl von bestimmten detektierbaren Markierungen von dem durch den Praktiker gewünschten Auflösungsausmaß abhängen. Geeignete Kombinationen von nicht-humanen Chromosomen, ausgehend von welchen Chromosomen-spezifische Sonden hergestellt werden sollen, können gemäß der Lehre der Beispiele I und II weiter unten identifiziert werden. Typischerweise werden im Falle von humanen Zielchromosomen für Sonden geeignete Chromosome identifiziert durch:

- (1) Isolierung von Chromosomen aus der nicht-humanen Spezies (z.B. unter Verwendung von durchflusszytometrischen Methoden, wie weiter unten beschrieben);
- (2) Herstellung von detektierbar markierten Sonden aus jedem isolierten Chromosom (z.B. unter Verwendung von DOP-PCR, wie weiter unten beschrieben);
- (3) Hybridisieren der markierten Sonden mit dem humanen Karyotyp, um Regionen mit Homologie zu identifizieren (z.B. unter Verwendung von Standard-in situ-Hybridisierungstechniken, wie weiter unten beschrieben);
- (4) Kartieren von Regionen mit Homologie zwischen dem Ziel-Karyotyp und den Chromosomen oder dem Karyotyp und den Ausgangschromosomen;
- (5) Identifizieren, welche Banden auf dem humanen Karyotyp jeder nicht-humanen Chromosomen-spezifischen Sonde entsprechen und
- (6) Auswählen von Kombinationen von Chromosomen-spezifischen Sonden, um die gewünschte Anzahl (z.B. üblicherweise wenigstens 40) und Verteilung von Banden auf den Zielchromosomen bereitzustellen.

**[0037]** Kombinationen von Chromosomen-spezifischen Sonden werden für ein Poolen ausgewählt, um die CSC-Bandenfärbungssonden der Erfindung herzustellen derart, dass mehrere unterschiedliche Abschnitte oder Regionen der (z.B. humanen) Zielchromosomen voneinander abgegrenzt sichtbar gemacht werden (unter der Annahme, dass jede Chromosomen-spezifische Sonde unterschiedlich markiert ist). Typischerweise werden wenigstens ungefähr 40 unterschiedliche Abschnitte voneinander abgegrenzt sichtbar gemacht, häufiger wenigstens ungefähr 70, noch häufiger wenigstens ungefähr 80 und sehr häufig wenigstens ungefähr 90 oder mehr unterschiedliche Abschnitte des Zielchromosoms (z.B. des humanen Karyotyps) voneinander abgegrenzt sichtbar gemacht. Es versteht sich, dass ein detaillierteres Bandenfärbungsmuster höhere Auflösungsausmaße ermöglicht und die Identifizierung von Chromosomenabnormalitäten vereinfacht.

**[0038]** In einer Ausführungsform der Erfindung enthalten die CSC-Bandenfärbungssonden Chromosomen-spezifische Sonden, die von einer nichthumanen Spezies (z.B. H. concolor) abgeleitet sind; in alternativen Ausführungsformen können Chromosomen-spezifische Sonden, die von mehr als einer nicht-humanen Spezies abgeleitet sind, kombiniert werden, wie in Beispiel II weiter unten beschrieben, um die Auflösung (Anzahl von unterscheidbaren Banden) nach einer Hybridisierung der CSC-Bandenfärbungssonden mit den Zielchromosomen zu erhöhen. So umfassen in verschiedenen Ausführungsformen die CSC-Bandenfärbungssonden der Erfindung eine Mischung von Nukleinsäuren oder Chromosomen-spezifischen Sonden aus mehr als einer, z.B. 2, 3, 4 oder mehr unterschiedlichen Spezies, von denen jede von der Spezies der Zielchromosome

verschieden ist (z.B. nicht-humane Spezies, wenn die Zielchromosomen human sind).

**[0039]** Wenn die Zielchromosomen human sind, umfassen geeignete nicht-humane Tiere für die Erzeugung von CSC-Bandenfärbungs sonden nicht-humane Primaten, andere Säugetiere, Reptilien, Amphibien, Vögel und Fische. In einer Ausführungsform ist das nicht-humane Tier ein nicht-humaner Primate, wie ein Affe (z.B. aus der Subfamilie Hylobatinae oder Ponginae), beispielsweise ein Gibbon (Gattung *Hylobates*), Orang-Utan (Gattung *Pongo*), Schimpanse (Gattung *Pan*, z.B. *Pan troglodytes*) und/oder Gorilla (Gattung *Gorilla*). In einer anderen Ausführungsform ist das nicht-humane Tier ein Altwelt-Affe (d.h. Familie Cercopithecidae, wie Paviane, Mandrills, Makaken, Meerkatzen, Mohrenaffen, Languren, Seidenaffen und die afrikanische grüne Meerkatze (*Cercopithecus aethiops*) oder ein Neuwelt-Affe, wie Krallenaffen, Brüllaffen, Klammeraffen, Kapuzineraffen, Nachtaffe und wollige Klammeraffen und andere.

**[0040]** Nicht-humane Primaten sind besonders gute Quellen für CSC-Bandenfärbungs sonden, da (1) sie mit Menschen ein hohes Ausmaß an Konservierung in kodierenden Sequenzen und ein hohes Ausmaß an Divergenz in nichtkodierenden Sequenzen gemeinsam haben und (2) viele zahlreiche Umlagerungen bezogen auf Menschen zeigen. Beispielsweise zeigen die Karyotypen von Gibbons (z.B. *H. hoolock*,  $2n=38$ ; *H. lar*,  $2n=44$ ; *H. syndactylus*,  $2n=50$  und *H. concolor*,  $2n=52$ ) umfassende Chromosomenreorganisationen (z.B. Translokationen) im Vergleich zu humanen Chromosomen. Ein anderes Beispiel für geeignete nicht-humane Primaten sind die *Cercopithecus*-Affen, bei denen Chromosomenspaltungen vorherrschen (Karyotypen variieren von  $2n = 48$  bis  $72$ ; siehe Dutrillaux et al., 1979, Hum. Genet. 48:251-314). So sind Sonden, die von den Chromosomen dieser Spezies abgeleitet sind, besonders nützlich, um für Chromosomenarme spezifische Sonden für die Analyse des humanen Karyotyps zu erzeugen.

**[0041]** Wie weiter oben angegeben, werden in einigen Ausführungsformen Chromosomen-spezifische Sonden aus zwei oder mehreren Spezies in den CSC-„Paints“ kombiniert, um zusätzliche Auflösung zu ermöglichen. So sind in einer Ausführungsform die CSC-Bandenfärbungs sonden eine Mischung von *Hylobates concolor*- und *H. syndactylus*-Sequenzen.

#### B. Isolation von spezifischen Chromosomensequenzen

**[0042]** Um Chromosomen-spezifische Sonden herzustellen, die unterschiedlich markiert sind, ist es erforderlich, DNA aus dem bzw. den zu markierenden Chromosom(en) in einer Weise von der DNA der anderen Chromosomen (d.h. jenen, die unmarkiert bleiben sollen oder andersartig markiert werden sollen) zu isolieren. In einer Ausführungsform der Erfindung werden individuelle Chromosomen durch Durchflusszytometrie unter Verwendung von wohletablierten Methoden isoliert (siehe z.B. Collins et al., 1991, Genomics 11:997-1006; Rabbitts et al., 1995, Nat. Genet. 9:369-75; und Ferguson-Smith, 1997, Europ. J. Hum. Genet. 5:253-65).

**[0043]** In anderen Ausführungsformen können die Chromosomen körperlich getrennt, fragmentiert und die Fragmente als Klone wie in Van Dilla et al., 1986, Bio/Technology 4:537-52, und Cox et al., 1990, Science 250:245-50 vermehrt werden. Alternativ kann ein vollständiges Chromosom körperlich von der Oberfläche eines Mikroskop-Objektträgers abgeschabt, fragmentiert und die Fragmente als Klone vermehrt werden (Ludeck et al., 1989, Nature 338:348-50) oder es können mikropräparierte Fragmente von Chromosomen verwendet werden (siehe z.B. Trautman et al., 1991, Hum. Genet. 87:495-97). Einzelne Chromosomen aus einer bestimmten Spezies können auch in somatischen Zellhybriden vermehrt und die Sequenzen des Chromosoms von Interesse unter Verwendung von Spezies-spezifischen PCR-Primern amplifiziert werden (z.B. unter Verwendung von Primer-Oligonukleotiden, die zu im Überfluss vorhandenen, polydispersen wiederholten DNA-Sequenzen, die in den Zielchromosomen, nicht aber in den Chromosomen der Wirtszelle vorhanden sind, komplementär sind (siehe z.B. Nelson et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:6686-90, welche die Amplifizierung von humanen Sequenzen aus Mensch-Nager-Zellhybriden unter Verwendung von Alu-spezifischen Primern beschreiben). Es versteht sich, dass die spezielle Methode zum Abtrennen von Chromosomen von Interesse von anderen für die Erfindung nicht kritisch ist und dass andere Methoden verwendet werden können.

**[0044]** Nach der Isolierung oder Reinigung von speziellen Chromosomenpräparationen (die z.B. ein oder einige wenige Chromosomen enthalten) können Chromosomen-spezifische Sonden ausgehend von chromosomaler DNA unter Verwendung von enzymatischen Amplifizierungsmethoden, wie der Polymerasekettenreaktion (z.B. mit degenerierten Oligonukleotiden als Primer gestartete PCR; Telenius et al., 1992, Genes, Chromosomes & Cancer 4:257-63) hergestellt werden. Ist einmal ein Satz von amplifizierten Nukleinsäuresonden (z.B. DOP-PCR-Fragmente) hergestellt, können die Sonden reamplifiziert werden. Typischerweise werden die Sonden (deren Länge z.B. vorzugsweise von ungefähr 400 bis ungefähr 1000 Basen reicht) während des Reamp-



lizierungsschritts markiert.

## C. Markierung von CSC-Bandenfärbungs sonden

### 1. Markierungsmethode

**[0045]** Die in den CSC-Bandenfärbungs sonden der Erfindung verwendeten Chromosomen-spezifischen Sonden werden mit einer oder einer Kombination von detektierbaren Markierungen markiert (z.B. kann die Sonde direkt markiert, indirekt markiert oder beides werden). Methoden zum Einbauen (Inkorporieren) von detektierbaren Markierungen in Nukleinsäuresonden sind wohlbekannt. Typischerweise werden detektierbare Markierungen (z.B. als Hapten- oder Fluorochrom-konjugierte Desoxyribonukleotide) in eine Polynukleotid-Sonde während eines Polymerisations- oder Amplifizierungsschritts eingebaut, z.B. durch PCR, Nick-Translation, Random-Primer-Markierung, Anfügung eines Schwanzes mittels einer terminalen Transferase und andere (siehe Ausubel et al., 1997, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York). Ein bevorzugtes Verfahren zum Erzeugen der markierten CSC-Bandenfärbungs sonden der Erfindung erfolgt durch mit degenerierten Oligonukleotiden als Primer gestartete PCR („degenerate oligonucleotide primed-PCR“; DOP-PCR) in Gegenwart eines markierten dNTP (z.B. Cy3-dUTP). Siehe Telenius et al., 1992, a.a.O. Gemäß diesem Verfahren wird ein degenerierter PCR-Primer für eine im wesentlichen zufallsgesteuerte Amplifizierung von Ziel-DNA aus einer beliebigen Quelle verwendet. Wie weiter oben angegeben, werden die detektierbar markierten Chromosomen-spezifischen Sonden der Erfindung typischerweise durch Reamplifizierung von isolierten Chromosomen-spezifischen Nukleinsäuren erzeugt.

**[0046]** In einer Ausführungsform werden die Sonden der Erfindung fluoreszierend markiert. Geeignete Fluorochrome für eine Markierung umfassen Fluoresceinisothiocyanat [FITC] (z.B. FITC-dUTP); Cyanin-Farbstoffe, z.B. Cy3 (z.B. Cy3-dUTP), Cy2, Cy3.5, Cy5, Cy5.5, Cy7 [Amersham]; Fluorescein, Texas red, Rhodamin, Lissamin, Phycoerythrin, F1uorX [Amersham], SyBR Green I & II [Molecular Probes], Spectrum Green (z.B. Spectrum-Green-dUTP), Spectrum Orange und dergleichen. Beispiele von indirekten Markierungen, die für die Detektion verwendet werden können, umfassen Haptene, wie Biotin (z.B. Biotin-dUTP); Digoxigenin (z.B. Digoxigenin-dUTP) und Fluoresceinisothiocyanat. Haptene können nach der Hybridisierung der CSC-Bandenfärbungs sonde mit den Zielchromosomen unter Verwendung eines markierten Anti-Haptens detektiert werden. Es wird beispielsweise Avidin verwendet, um Biotin-markierte Sonden zu detektieren (z.B. Avidin-Cy-5 [Amersham], Avidin-FITC, Avidin-C-3); Digoxigenin wird mit anti-Digoxigenin-Antikörpern detektiert (z.B. FITC-konjugierter anti-Digoxigenin-Antikörper; Rhodamin-anti-Digoxigenin-Antikörper, unmarkierter primärer Kaninchen-anti-FITC-Antikörper, der unter Verwendung eines sekundären FITC-konjugierten Ziege-anti-Kaninchen-Antikörpers detektiert wird) und dergleichen. Für die Fachleute auf diesem Gebiet werden zahlreiche Markierungssysteme ersichtlich sein.

**[0047]** Wenn eine gegebene Sonde (z.B. eine Chromosomen-spezifische Sonde) mit mehr als einer Markierung markiert wird, kann dies beispielsweise durch Amplifizieren der Sonde in Gegenwart von mehr als einem markierten Nukleotid (z.B. DOP-PCR in Gegenwart von Cy3-dUTP und FITC-dATP) bewerkstelligt werden. Häufiger wird jedoch die Markierung bewerkstelligt werden, indem die Chromosomen-spezifische Sonde in mehrere (z.B. 2) Abschnitte aufgeteilt wird, ein Abschnitt mit einer Markierung markiert wird (z.B. DOP-PCR in Gegenwart von Cy3-dUTP), der andere Abschnitt mit einer unterschiedlichen Markierung markiert wird (z.B. DOP-PCR in Gegenwart von FITC-dATP) und die beiden Markierungsreaktionsmischungen zusammengegeben werden, um eine mehrfach markierte Sonde herzustellen.

### 2. Kombinatorische Mehrfarb-FISH

**[0048]** Wie weiter oben angegeben, umfassen die CSC-Bandenfärbungs sonden der Erfindung eine Mehrzahl von Chromosomen-spezifischen Sonden (z.B. aus nicht-humanen Chromosomen), die unterschiedlich markiert sind (d.h. wenigstens zwei der Chromosomen-spezifischen Sonden sind unterschiedlich markiert). Dies erlaubt die Identifizierung von zahlreichen Chromosomen-Subregionen in einem einzigen FISH-Experiment. In einer Ausführungsform wird jedes Chromosom aus einem nicht-humanen Primaten verwendet, um eine einzigartig markierte Chromosomen-spezifische Sonde herzustellen, wobei jede Sonde eine unterschiedliche Farbe erzeugt, wenn sie mit den Ziel-Chromosomen hybridisiert wird (und geeignet behandelt wird, z.B. durch Hinzugeben eines Avidin-Fluorochrom-Konjugats zu hybridisierten Sonden, die eine Biotin-Markierung umfassen). Wie weiter oben angegeben und wie in den Beispielen nachfolgend veranschaulicht wird, wird häufiger weniger als der vollständige Satz von Chromosomen aus einer bestimmten nicht-humanen Spezies verwendet werden und zwei oder mehrere Chromosome können die gleiche detektierbare Markierung tragen. Zusätzlich

zu den in den Beispielen veranschaulichten Methoden sind im Stand der Technik verschiedene Ansätze für ein Mehrfarben-„chromosome painting“ beschrieben worden und können für die Erfindung adaptiert werden, indem den hier bereitgestellten Leitlinien gefolgt wird. Beispiele einer solchen differenziellen Markierung („multi-color FISH“) umfassen jene, die von Schröck et al., 1996, *Science* 273:494-97, und Speicher et al., 1996, *Nature Genet.* 12:368-75 beschrieben worden sind). Schröck et al., a.a.O., beschreiben eine spektrale Bildgebungsmethode, bei welcher Epifluoreszenzfiltersätze und Computersoftware verwendet werden, um eine Mehrzahl von unterschiedlich markierten DNA-Sonden, die gleichzeitig mit einem Zielchromosomensatz hybridisiert worden sind, zu detektieren und zwischen diesen zu unterscheiden. Speicher et al., a.a.O., beschreiben die Verwendung von verschiedenen Kombinationen von 5 Fluorochromen, um jedes der humanen Chromosome (oder Chromosomenarme) in einer 27-Farb-FISH, welche als „combinatorial multifluor-FISH“ bezeichnet wird) zu markieren. Es können auch andere geeignete Methoden verwendet werden (siehe z.B. Ried et al., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:1388-92).

**[0049]** Für die Fachleute auf diesem Gebiet versteht sich, dass die Farbauflösung des CSC-Bandenfärbungsmusters teilweise von der Anzahl von Markierungen oder Haptenen, die verwendet wird, abhängt. Eine Verwendung von drei Haptenen vereinfacht die Analyse des CSC-Bandenfärbungsmusters, da die Sonden in einem einfachen rot/grün/blau (RGB)-Format, welches für die meisten Fluoreszenzmikroskope und die übliche Bildverarbeitungscomputersoftware zugänglich ist, angezeigt werden können (Nederlof et al., 1990, *Cytometry* 11:126-31; Ried et al., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:1388-92). Dieses Arrangement verringert jedoch die Möglichkeit zur Identifizierung von kleinen telomeren Transpositionen aufgrund von Redundanz bei der Farbzuoordnung.

### III. In situ-Hybridisierung

**[0050]** Eine Hybridisierung der CSC-Bandenfärbungssonden der Erfindung an Zielchromosomensequenzen (z.B. Metaphasen-Ausbreitungen) erfolgt durch Standard-in situ-Hybridisierungs (ISH)-Techniken (siehe z.B. Gall und Pardue, 1981, *Meth. Enzym.* 21:470-80; Henderson, 1982, *Int. Review of Cytology* 76:1-46). Im Allgemeinen umfasst eine in situ-Hybridisierung die folgenden hauptsächlichen Schritte: (1) Fixierung der zu analysierenden biologischen Struktur (z.B. eine Metaphasen-Chromosomen-Ausbreitung), (2) Vorhybridisierungsbehandlung der biologischen Struktur, um die Zugänglichkeit von Ziel-DNA zu erhöhen (z.B. Denaturierung mit Wärme oder Alkali), (3) gegebenenfalls Vorhybridisierungsbehandlung, um eine nicht-spezifische Bindung zu verringern (z.B. durch Blockieren des Hybridisierungsvermögens von repetitiven Sequenzen, z.B. unter Verwendung von humaner genomischer DNA), (4) Hybridisierung der Mischung von Nukleinsäuren mit den Nukleinsäuren in der biologischen Struktur oder dem biologischen Gewebe, (5) Nachhybridisierungs-Waschen, um bei der Hybridisierung nicht gebundene Nukleinsäurefragmente zu entfernen, und (6) Detektion der hybridisierten Nukleinsäurefragmente. Die in jedem dieser Schritte verwendeten Reagenzien und ihre Verwendungsbedingungen variieren abhängig von der jeweiligen Situation. Ein beispielhaftes Protokoll für eine Hybridisierung von CSC-Bandenfärbungssonden wird in Beispiel III weiter unten bereitgestellt. Hybridisierungsbedingungen werden ebenfalls im U.S.-Patent Nr. 5,447,841 beschrieben. Es versteht sich, dass zahlreiche Variationen von in situ-Hybridisierungsprotokollen und -bedingungen bekannt sind und in Verbindung mit der Erfindung durch Praktiker, indem den hier bereitgestellten Leitlinien gefolgt wird, verwendet werden können.

**[0051]** Herkömmlicherweise wird eine Hybridisierung von „chromosome paints“ mit Chromosomen ausgeführt, indem ein Blockierungsschritt verwendet wird, z.B. eine Vorhybridisierung mit unmarkierter Kompetitor-DNA (z.B. Cot-1-DNA). Eine Hybridisierung in Abwesenheit von Kompetitor-DNA, aber unter Verwendung eines vorab erfolgenden Reassoziierungs- oder Annealingschritts ist von Wienberg et al., 1997, a.a.O., beschrieben worden. Wenn diese Methoden verwendet werden, wird bei Sonden, die von bestimmten Chromosomen (z.B. 13 und 21) abgeleitet sind, ein Hintergrund (Kreuzhybridisierung) beobachtet. Wenn jedoch die CSC-Bandenfärbungssonden der Erfindung verwendet werden, ist kein Cot-1-DNA- oder vorab erfolgender Reassoziierungsschritt erforderlich und die Kreuzhybridisierung ist für alle Chromosomen minimal. Ohne sich auf einen bestimmten Mechanismus festlegen zu wollen, wird angenommen, dass der primäre Faktor, der zu dem Fehlen von Hintergrund-Kreuzhybridisierung beiträgt, wenn CSC-Bandenfärbungssonden aus nicht-humanen Primaten in Abwesenheit von Kompetitor-DNA verwendet werden, die höhere evolutionsbedingte Sequenzdivergenz und höhere Variation der Kopienzahlen und chromosomalen Lagen von repetitiver DNA verglichen mit hochkonservierter Einzelkopie-DNA unter Tierspezies ist.

**[0052]** Die hier offenbarten in situ-Hybridisierungsmethoden der Erfindung zum Nachweisen von Chromosomenabnormalitäten (z.B. FISH) können an einem ganzen Spektrum von biologischen oder klinischen Proben, in Zellen in Mitose und Meiose oder in Interphase-Zellen ausgeführt werden. Beispiele umfassen alle Arten von Zellkulturen, Lymphozyten des peripheren Bluts, Bukkalabstriche, Berührungspräparate („touch preparati-

ons"), hergestellt aus unkultivierten primären Tumoren, Krebszellen, Knochenmark, aus Aspirationsbiopsie erhaltene Zellen oder Zellen in Körperflüssigkeiten (z.B. Blut, Harn, Sputum und dergleichen), Zellen aus Amnionflüssigkeit, Zellen aus mütterlichem Blut (z.B. fötale Zellen), Zellen aus Testes und Ovar und dergleichen.

#### IV. Detektion und Bildanalyse

**[0053]** Die verwendete(n) Detektionsmethode(n) werden von den jeweiligen detektierbaren Markierungen, die in der CSC-Bandenfärbungs-sonde verwendet wurden, abhängen. Wenn fluoreszierend markierte CSC-Bandenfärbungs-sonden verwendet werden, kann eine Fluoreszenzphotomikroskopie verwendet werden, um die Ergebnisse einer in situ-Hybridisierung unter Verwendung von Routinemethoden, die in diesem Fachgebiet bekannt sind, zu detektieren und aufzuzeichnen. Alternativ kann eine digitale (mittels Computer durchgeführte) Fluoreszenzmikroskopie mit Bildverarbeitungsvermögen verwendet werden.

**[0054]** In einer Ausführungsform werden Bilder der fluoreszierend markierten Chromosome detektiert und aufgezeichnet unter Verwendung eines computergestützten Bildgebungssystems, wie des Applied Imaging Corporation CytoVision System (Applied Imaging Corporation, Santa Clara, CA) mit Modifikationen (z.B. Software, Chroma 84000 Filtersatz und ein verstärkter Filterrevolver). Andere geeignete System umfassen ein computergestütztes Bildgebungssystem unter Verwendung einer gekühlten CCD-Kamera (Photometrics, NU200-Serie, ausgerüstet mit Kodak KAF 1400 CCD), gekoppelt mit einem Zeiss-Axiophot-Mikroskop, wobei Bilder verarbeitet werden, wie von Ried et al., 1992, Pro c. Natl. Acad. Sci. USA 89:1388-92 beschrieben). Andere geeignete Bildgebungs- und Analysensysteme werden von Schröck et al., 1996, Science 273:494-97, und Speicher et al., 1996, Nature Genet. 12:368-75 beschrieben.

#### V. Kits

**[0055]** Die CSC-Bandenfärbungs-sonden der Erfindung werden bequemerweise in Kitform bereitgestellt. In einer Ausführungsform umfasst der Kit einen Behälter, umfassend eines oder mehrere des Folgenden:

- (a) wenigstens ein Fläschchen oder wenigstens einen Behälter, welches bzw. welcher Chromosomen-spezifische Sonden (z.B. „Painting“-Sonden) aus einem nicht-humanen Tier (z.B. einem nicht-humane Primaten) umfasst, wobei die Sonden entweder detektierbar markiert oder nicht markiert sein können;
- (b) wenigstens ein Fläschchen oder wenigstens einen Behälter, welches bzw. welcher Chromosomen-spezifische Sonden (z.B. „Painting“-Sonden), die markiert oder unmarkiert sein können, aus zwei oder mehreren unterschiedlichen nicht-humanen Tieren (z.B. zwei oder mehreren unterschiedlichen nicht-humanen Primaten) umfasst;
- (c) wenigstens ein Fläschchen oder wenigstens einen Behälter, welches bzw. welcher Chromosomen-spezifische Sonden aus einem oder mehreren humanen Chromosomen umfasst;
- (d) wenigstens ein Fläschchen oder wenigstens einen Behälter, wie in (a)–(c) weiter oben beschrieben, welches bzw. welcher ferner Formamid umfasst;
- (e) wenigstens ein Fläschchen oder wenigstens einen Behälter, wie in (a)–(d) weiter oben beschrieben, welches bzw. welcher ferner NaCl und/oder Natriumcitrat umfasst;
- (f) ein separates Fläschchen, das wenigstens eines der folgenden Reagenzien umfasst: Formamid, 4,6-Diamidino-2-phenylindol (DRPI), einen anti-Hapten-Antikörper (z.B. anti-FITC-Antikörper), einen detektierbar markierten sekundären Antikörper gegen das anti-Hapten (z.B. anti-FITC)-Antikörper, Fluorochrom-konjugiertes Avidin, ein Fluoreszenz-Antiverblassungsreagens (z.B. Citifluor oder Vectasheild);
- (g) gedruckte Anweisungen zum Nachweisen einer Chromosomenaberration in einem humanen Chromosom durch CSC-Bandenfärbung;
- (h) eine Photographie oder eine Zeichnung eines normalen humanen Karyotyps, welcher mit den in dem Kit bereitgestellten Sonden (oder deren Äquivalent) angefärbt worden ist.

**[0056]** Für die Fachleute auf diesem Gebiet versteht sich, dass zahlreiche andere Reagenzien oder Zusammensetzungen und Kombinationen von Reagenzien oder Zusammensetzungen in Kitform bereitgestellt werden können.

#### VI. BEISPIELE

**[0057]** Die folgenden Beispiele sollen die Erfindung veranschaulichen und sie in keiner Weise beschränken.

##### Beispiel I

**[0058]** Metaphase-Ausbreitungen wurden ausgehend von Lymphozyten des peripheren Bluts und von lym-

phoblastoiden Zelllinien hergestellt und Blutproben wurden von einer normalen humanen männlichen Person und aus klinischen Fällen, die Chromosomen-Abnormalitäten zeigten, erhalten. Eine lymphoblastoide Zelllinie wurde von einem männlichen Concolor-Gibbon (*Hylobates concolor*,  $2n=52$ ) erhalten. Ein durchflusszytometrisches Sortieren von Concolor-Gibbon (HCO)-Chromosomen wurde an einem mit zwei Lasern ausgestatteten Laser-Zellsorter (FACStar Plus, Becton Dickinson ImmunoCytometry Systems) ausgeführt. Bivariate (zweidimensionale) Durchflusszytometrie lieferte 25 Peaks, die durch Vergleich von deren Hybridisierungsmustern mit Homologien, die durch für humane Chromosomen spezifische „Paints“ auf HCO-Chromosomen aufgedeckt worden waren, identifiziert wurden. Dies enthüllte, dass für einzelne Chromosomen spezifische „Paints“ aus 17 Chromosomen erhalten werden konnten (Tabelle 1). Vier Peaks enthielten zwei Chromosomen (HCO X + 5, HCO 9 + 11, HCO 12 + 15 und HCO 6 + 7). Die Chromosomennummerierung folgte jener von Koehler et al., 1995, *Genomics* 30:287-92. Dreihundert bis fünfhundert Chromosomen von jedem Typ wurden durch eine vorab erfolgende Runde von DOP-PCR amplifiziert, gefolgt von einer sekundären Amplifizierung, welche markiertes dUTP einbaute, wie in Telenius et al., 1992, *Genes, Chromosomes & Cancer*, 4:257-263, beschrieben.

**[0059]** Das Sondenmarkierungsschema zur Erzeugung der fluoreszierenden Sonden, die in den Mehrfarbexperimenten verwendet wurden, ist in Tabelle 1 weiter unten gezeigt. (Beispiele für alternative Markierungsschemata sind in den Tabellen 2 und 3 weiter unten gezeigt). In diesem Beispiel wurden drei Markierungen verwendet, nämlich Cy-3, FITC und Biotin. Hybridisierung und Detektion erfolgten unter Verwendung einer Modifikation der von Pinkel et al., 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:9138-42 beschriebenen Vorgehensweise. Jedoch wurden alle Hybridisierungen in Abwesenheit von unmarkierter Kompetitor-DNA (z.B. Cot-1-DNR) ausgeführt. Mehrfarb-in situ-Hybridisierungsexperimente erforderten 150 ng von jeder DNA-Sonde, die in Ethanol ausgefällt und in 15 µl Hybridisierungspuffer resuspendiert wurden. DNA-Sonden wurden bei 68°C 7 min denaturiert und man ließ sie durch Inkubation bei 37°C für 30 min vorab reassoziieren. Die Chromosomen-Präparationen wurden in 70% Formamid/2XSSC bei 68°C 1 min denaturiert und über Nacht mit der DNA-Sondenmischung bei 37° hybridisiert. Waschen nach der Hybridisierung umfassten 2 × 5 min in 50% Formamid/1 × SSC bei 45°C und 2 × 5 min in 2 × SSC bei 45°C. Biotinylierte Proben wurden durch Avidin-Cy5 detektiert. Metaphasen wurden mit der gekühlten CCD-Kamera (Photometrics NU2000, ausgestattet mit einem KAF1400-Chip), welche mit einem Fluoreszenzmikroskop gekoppelt war, analysiert. Kamerakontrolle und digitale Bilderfassung erfolgten, wie von Ried et al., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:1388-92, beschrieben. Das Zusammenfügen von Chromosomenbildern erfolgte unter Verwendung der Adobe PhotoShop 3.0-Software.

**[0060]** Wenn die HCO-Chromosomen-spezifische „Paint“-Mischung mit einer Probe von normalen humanen Metaphasen hybridisiert wurde, wurde das Chromosomenkomplement in 80 separat gefärbte Abschnitte differenziert, die mit früheren Einzelchromosom-„Painting“-Experimenten unter Verwendung von für humane Chromosomen spezifischen „Paints“ an Gibbon-Chromosomen (Koehler et al., 1995, a.a.O.) konsistent waren. Die Hybridisierungseffizienz und -reproduzierbarkeit waren vergleichbar mit jenen der für den Mensch spezifischen „Paints“. Abgesehen von den humanen Chromosomenregionen 4g27-gter, 22q und dem Y-Chromosom (homolog zu dem Gibbon-Chromosom 7 und Y, die in der Sondenmischung in diesen Beispiel nicht repräsentiert waren), wurden humane euchromatische Regionen in ihrer Gänze durch die HCO-Chromosomen-spezifische „Paint“-Mischung in Form eines „Painting“ angefärbt ([Fig. 1](#)). Die HCO-„Paints“ zeigten keine Kreuzhybridisierung mit heterochromatischen Regionen von unterschiedlichen menschlichen Chromosomen.

**[0061]** Mit Ausnahme der humanen Chromosomen **15, 18, 21, 22** und dem X wurde jedes humane Chromosom durch mehr als eines und bis zu sechs unterschiedliche Gibbon-Chromosome in Form eines „Painting“ angefärbt. Zusätzlich zeigten 9 humane Chromosomen (**1, 3, 7, 9, 10, 11, 14, 17** und **19**) zwei oder mehrere Signale, die sich von einem Gibbon-Chromosom ableiteten. Dies zeigt das Auftreten von sowohl Inversionen wie auch Translokationen während der Divergenz der humanen und der Gibbon-Spezies an.

TABELLE 1

Markierungsschema für für Gibbon-Chromosomen spezifische Sonden

Chromosom	1b	2	3	4	5	5/x	6+7	8	9	9/11	10	12/15
Cy3			x			x	x					
Biotin	x	x		x	x				x		x	
FITC				x			x	x		x		x

Chromosom	13	14	16	17	18	19	20	21	22b	23	24	25
Cy3	x	x	x			x		x		x		x
Biotin	x			x	x	x	x	x			x	
FITC	x			x	x	x	x				x	x

TABELLE 2

Markierungsschema für für Gibbon-Chromosomen spezifische Sonden

Chromosom	1b	2	3	4	5/X	6/7	8	9	10	11	12/15
FITC			x		x	x	x				
Cy3	x			x				x	x		
Cy5		x		x		x				x	x

Chromosom	13	14	16	17	18	19	20	21	22b	23	24	25	Y
FITC	x	x	x			x		x		x		x	x
Cy3	x		x	x	x	x	x	x			x	x	
Cy5	x			x	x	x	x		x		x		

TABELLE 3

Markierungsschema für für Gibbon-Chromosomen spezifische Sonden

Chromosom	1b	2	3	4	5/X	6/7	8	9	10	11	12/15
<b>FITC</b>		x	x		x	x	x				
<b>Cy3</b>	x			x				x	x		
<b>Cy5</b>				x		x				x	x

Chromosom	13	14	16	17	18	19	20	21	22b	23	24	25	Y
<b>FITC</b>	x	x	x	x	x	x		x		x		x	x
<b>Cy3</b>	x		x	x	x	x	x	x			x	x	
<b>Cy5</b>	x					x	x		x		x		

Beispiel II

## a) Herstellung und Charakterisierung von Chromosomen-spezifischen Sonden

**[0062]** Unter Verwendung von FACS und nachfolgender DOP-PCR wurden Chromosomen-spezifische Sonden aus *Hylobates concolor*- und *H. syndactylus*-Chromosomen hergestellt. Kurz zusammengefasst, wurden Gibbon-Chromosomen unter Verwendung eines durchflusszytometrischen Sortierungssystems mit zwei Lasern sortiert, wie für andere Spezies beschrieben (Rabbitts et al., 1995, *Nature Genet.* 9:369-75; Ferguson-Smith, 1997, *Europ. J. Hum. Genet.* 5 253-65). Chromosomen-spezifische Sonden wurden durch mit degenerierten Oligonukleotiden als Primer gestartete PCR („degenerate oligonucleotide primed PCR“; DOP-PCR) direkt ausgehend von den durch Durchflusszytometrie sortierten Chromosomen unter Verwendung von PCR-Primern und Amplifizierungsbedingungen, wie beschrieben (Telenius et al., 1992, *Genes, Chromosomes Cancer* 4:257-63), erzeugt.

**[0063]** Um den Inhalt jedes Peaks in dem Durchflusszytometrie-Karyotyp zu identifizieren, wurden mit Haptenen markierte Sonden, die von den individuellen Peaks abgeleitet worden waren, mit den mittels DAPI gefärbten Chromosomen der speziellen Spezies hybridisiert. [Fig. 2](#) zeigt den Durchflusszytometrie-Karyotyp der beiden Spezies. Viele Peaks enthielten nur einzelne Chromosomen, jedoch konnte, insbesondere bei *H. syndactylus*, eine Anzahl von Chromosomen nicht individuell aufgelöst werden, was zu zusammengesetzten Sonden führte. Es wurden die Gibbon-Sonden, die aus der primären Reaktion abgeleitet worden waren, und die gleichen Primer verwendet, um die „chromosome paints“ mit einem oder mehreren von Biotin-dUTP (Vector Laboratories), FITC-dUTP (Amersham) und Cy3-dUTP (Amersham), wie in Tabelle 4 gezeigt, in 50 µl-Standard-DOP-PCR-Reaktionen (Rabbitts et al., a.a.O.) zu markieren.

TABELLE 4

Fluoreszenzmarkierungsschema für für Gibbon-Chromosomen spezifische Sonden

(HCO=Hylobates concolor, HSY=H. syndactylus)

Biotin (Cy-5)	FITC-dUTP	Cy3-dUTP
HCO 2	HCO 8	HCO 1b
HCO 3	HCO 12	HCO 4
HCO 5	HCO 15	HCO 8
HCO 6	HCO 17	HCO 9
HCO 7	HCO 18	HCO 13
HCO 11	HCO 19	HCO 14
HCO 12	HCO 20	HCO 16
HCO 15	HCO 22b	HCO 18
HCO 16	HCO 25	HSY 13+14
HCO 17	HSY 3	HSY 22+24
HCO 21	HSY 12	
HCO 23	HSY 15	
HCO 24	HSY 17	
HCO X		

[0064] Die in situ-Hybridisierung von Sonden mit menschlichen und Gibbon-Chromosomen wurde ausgeführt, wie zuvor beschrieben (Rabbitts et al., 1995, a.a.O.). Es war keine Cot-1-DNA für eine Suppression notwendig, sowohl für die Hybridisierungen von Gibbon-Sonden an Gibbon-Chromosomen als auch von Gibbon an humane Chromosomen. Die mit Biotin markierten „chromosome paints“ wurden mit Avidin-Cy-5 (Amersham) detektiert. Digitale Bilder wurden unter Verwendung einer gekühlten CCD-Kamera (Photometrics NU200-Serie, ausgerüstet mit Kodak KAF 1400 CCD), gekoppelt mit einem Zeiss-Axiophot-Mikroskop erhalten. Kamerakontrolle und Erfassung des digitalen Bilds (8 Bit-Grauskala) setzten einen Apple Macintosh-Computer ein. Die Bilder wurden verarbeitet, wie beschrieben (Ried et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:1388-92). Photographien aus den Bildern wurden direkt aus dem Computer aufgenommen. Für jedes in Form von „Painting“ angefärbte Chromosom wurden wenigstens zehn Metaphasen ausgewertet, um die mit einer jeglichen speziellen Sonde hybridisierten Bereiche zu definieren.

[0065] Eine Hybridisierung von Gibbon-„Painting“-Sonden mit humanen Chromosomen zeigte, dass mit Ausnahme der humanen Chromosomen **15**, **18**, **21**, **22** und der Geschlechtschromosomen jedes Chromosom in wenigstens zwei und bis zu sechs Subregionen differenziert wurde. Einige humane Chromosomen zeigten nur schlechte subregionale Differenzierung mit Sonden, die von beiden Spezies abgeleitet worden waren, während andere humane Chromosomen hochgradig differenziert wurden. Insgesamt konnte der humane Karyotyp in 81 homologe Segmente mit Sonden, die von *H. concolor* abgeleitet worden sind, und 74 Segmente mit Sonden, die von *H. syndactylus* abgeleitet worden sind, differenziert werden. [Fig. 3](#) liefert eine Zusammenfassung der Ergebnisse in einem Idiogramm von humanen Chromosomen. Um zwischen identischen und lediglich ähnlichen Subregionen, die durch Sonden aus unterschiedlichen Gibbon-Spezies im Rahmen eines „Painting“ angefärbt werden, zu unterscheiden, wurden auch Hybridisierungen zwischen Gibbons ausgeführt. Dies zeigte beispielsweise, dass das auf dem humanen Chromosom **19** mit Sonden, die sowohl von *H. concolor* als auch *H. syndactylus* abgeleitet worden sind, erhaltene Muster identisch war ([Fig. 3](#)), wohingegen auf dem humanen Chromosom **17** die Hybridisierung zwischen den beiden Gibbons klar unterschiedliche Umlagerungen anzeigte.



b) Verwendung von für Gibbon-Chromosomen spezifischen Sonden, um humane Chromosomen-Aberrationen zu identifizieren

**[0066]** Für Gibbon-Chromosomen spezifische „Paints“ wurden als diagnostische Werkzeuge bei verschiedenen Patienten angewendet, um Chromosomenumlagerungen, einschließlich Inversionen, Transpositionen und Aneuploidien, zu identifizieren. Bei einem der Patienten identifizierten H. concolor-„Painting“-Sonden eine Umlagerung innerhalb des Chromosoms 1 ([Fig. 4](#)). Die Ergebnisse zeigen eine Transposition von Chromosom 1 p31 p32-Material in die Bande 1 p36.1 an. Bemerkenswerterweise fallen die Deletionsbruchstellen sowohl in 1 p31 und 1 p32 mit den Grenzen von H. concolor-Chromosom 5-Material, welches zu dieser Region homolog ist, zusammen, was auf ähnliche Bruchstellen sowohl bei der Entwicklung des Gibbon-Chromosoms als auch bei der humanen Pathologie hinweist.

c) Verwendung von CSC-Bandenfärbungssonden für die Karyotypen-Analyse

**[0067]** Für Gibbon-Chromosomen spezifische „Paints“ wurden nicht nur in Einzelhybridisierungsexperimenten, sondern auch in Pools, welche kombinatorisch markierte Sonden aus individuellen Spezies enthielten, verwendet. In einem Einzel-Experiment wurde der gesamte humane Karyotyp in einem Mehrfarb-Format abgrenzend sichtbar gemacht, was zu einem Bandenfärbungsmuster (d.h. Kreuz-Spezies-Farb-Bandenfärbung) führte. In diesen Experimenten wurden einzelne Gibbon-„Paints“ zu drei SONDENSÄTZEN (wie in den Tabellen 1–3), die mit entweder Cy-3-dUTP, FITC-dUTP, Biotin-cUTP (detektiert mit AvidinCy-5) oder Cy5-dUTP markiert waren und Falschfarben in rot, grün und blau (RGB) zeigten, gepoolt. Vier Mikroliter (enthaltend ungefähr 300 ng) von jeder individuellen Gibbon-Sonde wurden gepoolt, mittels Ethanol präzipitiert und in 15 µl 50% Formamid, 2 × SSC, 10% Dextransulfat resuspendiert. Die boolesche Kombination von diesen Sondenpools (Nederlof et al, 1990, Cytometry 11:126-31; Ried et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:1388-92) führte zu einem sieben Farben-CSC-Bandenfärbungsmuster. Regionen des humanen Karyotyps, mit welchen Chromosomen-spezifische Sonden, die in nur einem Pool vorhanden waren, hybridisierten, erschienen entweder rot, grün oder blau; Regionen, mit welchen Chromosomen-spezifische Sonden aus mehr als einem Pool hybridisierten, zeigten definierte gemischte Farben des RGB-Spektrums. Jedes humane Chromosom zeigte ein einzigartiges Bandenfärbungsmuster, das für den SONDENSATZ, welcher von den zwei Gibbon-Spezies abgeleitet worden war, unterschiedlich war. Das beobachtete CSC-Bandenfärbungsmuster entsprach jenem, das aufgrund der „Painting“-Daten unter Verwendung von individuellen Sonden ([Fig. 3](#)) erwartet worden war.

**[0068]** [Fig. 5a](#) zeigt einen humanen Karyotyp, der unter Verwendung von aus H. syndactylus-Chromosomen hergestellten Sonden gefärbt worden ist. In diesem Karyotyp wurden keine Chromosomenaberrationen detektiert. Klinische Fälle, die mit der CSC-Bandenfärbung analysiert wurden, sind in [Fig. 5b](#) und [Fig. 5c](#) gezeigt. [Fig. 5b](#) zeigt eine CSC-Bandenfärbung mit einem H. syndactylus-SONDENSATZ, welcher eine Metaphase mit einer Translokation (t(1;2)(g27;q42.3)) zeigt, und 5c zeigt eine CSC-Bandenfärbung mit einem SONDENSATZ, der von dem H. concolor-Gibbon abgeleitet worden ist, welche eine Metaphase mit einer perizentrischen Inversion auf Chromosom 2 (inv(2)(p23g13)) zeigt. Eine sogar noch differenziertere CSC-Bandenfärbung wurde erzielt, indem Sonden aus den beiden unterschiedlichen Spezies gemischt wurden (Tabelle 4 und [Fig. 3](#)). Dies verbesserte die Auflösung von Chromosomen-Subregionen über jene, die bei Verwendung einer einzigen Spezies erzielt wurde, hinaus.

Beispiel III

**[0069]** Dieses Beispiel beschreibt die Verwendung einer H. concolor-CSC-Bandenfärbungssonde bei der humanen Karyotypisierung. Die CSC-Bandenfärbungssonde wird hergestellt, wie in Beispiel 1 weiter oben beschrieben und wird gemäß dem Schema von Tabelle 2 markiert. Die Sonde wird suspendiert, typischerweise zu einer Konzentration von ungefähr 10–30 Nanogramm pro Mikroliter von jeder Chromosomen-spezifischen Sonde, in Formamid-Hybridisierungspuffer (50% Formamid, 10% Dextransulfat, 2 × SSC, 40 mM NaPO<sub>4</sub> (pH 7), 1 × Denhardt's Lösung (Ausubel et al., 1997, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York), 120 ng/µl Lachssperma-DNA).

**[0070]** Metaphase-Präparationen werden aus einer humanen Lymphozyten-Zellkultur unter Verwendung von Standardmethoden hergestellt. Die Zellsuspension wird sanft gemischt und ein Tropfen auf den Objektträger durch Auftropfen aus ungefähr einem Zoll oberhalb des Objektträgers aufgetragen. Ein Tropfen von frisch hergestelltem, bei 4°C befindlichem Methanol-Eisessig (3:1)-Fixiermittel wird hinzugefügt und man lässt den Objektträger an der Luft trocknen. Nach der Untersuchung der Metaphasen unter einem Phasenkontrastmikroskop lässt man die Objektträger über Nacht bei Raumtemperatur lufttrocknen.



**[0071]** Die Objektträger werden in einem 65°C-Ofen 1 h vor der Hybridisierung inkubiert. Sie werden dann in 100 Ethanol 5 min dehydratisiert und man lässt sie lufttrocknen. Um die Chromosomen zu denaturieren, werden die Objektträger in einem Coplin-Gefäß, welches Denaturierungslösung enthält, bei 65°C 90 s inkubiert. Die Denaturierungslösung wird hergestellt, indem 5 ml 20 × SSC, 10 ml gereinigtes Wasser und 35 ml Formamid gemischt werden und der pH auf 7,0 eingestellt wird. Die Objektträger werden dann durch Eintauchen in eiskaltes 70%-iges Ethanol für 2 min gequenchet. Die Proben werden in einer Ethanol-Reihe (70, 70, 90, 90, 100 Ethanol, jeweils 2 min) dehydratisiert.

**[0072]** Um die CSC-Bandenfärbungssonde zu denaturieren, wird sie bei 37°C 5 min erwärmt, durch sanftes Vortexen gemischt und zentrifugiert. 12 µl Sonde werden in ein 0,5 µl-Mikrozentrifugenröhrchen transferiert und durch Inkubieren bei 65°C für 10 min denaturiert. Die denaturierte Sonde wird auf 37°C gebracht und innerhalb von 2 h verwendet. Die denaturierte Sonde wird auf die Objektträger pipettiert und ein 22 mm × 22 mm-Deckgläschen wird darauf gelegt. Das Deckgläschen wird unter Verwendung von Kautschukzement versiegelt und der Objektträger wird über Nacht bei 37–42°C inkubiert.

**[0073]** Nach der Hybridisierung und ohne dass man die Objektträger auf irgendeiner Stufe austrocknen lässt, wird der Kautschukzement entfernt und die Deckgläschen werden durch Inkubieren des Objektträgers in einem Coplin-Gefäß, welches 2 × SSC enthält, für 5 min fortgeschwemmt (20 × SSC wird hergestellt, indem 175,3 g NaCl und 88,2 g Natriumcitrat in 800 ml gereinigtem Wasser gelöst werden, der pH auf 7,0 eingestellt wird und das Volumen auf 1 l eingestellt wird). Die Objektträger werden 2 × 5 min bei 45°C in 50% Formamid in 1 × SSC, 2 × 5 min in 2 × SSC bei der gleichen Temperatur gewaschen und 10 min bei 45°C in 4XT-Lösung (4 × SSC, 0,05% Tween-20) inkubiert.

**[0074]** 200 µl einer 1:200-Verdünnung von Kaninchen-anti-FITC in 4XT werden auf den Objektträger pipettiert, mit einem 25 mm × 40 mm-Parafilm-Deckgläschen und Parafilm bedeckt und in einer befeuchteten Kammer bei 37°C 20–30 min inkubiert. Nach Waschen für 3 × 5 min in 4XT bei 45°C werden 200 µl einer 1:200-Verdünnung einer 1:100-Verdünnung von Ziegeanti-Kaninchen-FITC in 4XT hinzugesetzt und der Objektträger wird in einer befeuchteten Kammer bei 37°C 20–30 min inkubiert und 3 × 5 min in 4XT bei 45°C gewaschen. (Beide Immunglobulin-Präparationen sollten bei Raumtemperatur inkubiert, bei 12000 Upm 10 min zentrifugiert und das Pellet vor der Verwendung verworfen werden.)

**[0075]** Die Objektträger werden dann in 2 × SSC, welches 0,1 µg/ml DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindol) enthält, wenigstens 2 min inkubiert, abtropfen gelassen, in Eindeckmedium (wie VectaShield) eingedeckt, trocken getupft und mit Nagellack versiegelt. Die FISH-Signale werden dann unter Verwendung eines Applied Imaging Corporation (AIC) CytoVision System (Kat.Nr. CKS1102 oder CUS1402), ergänzt mit geeigneter Software, einem Chroma 84000 Filtersatz und einem verstärkten Filterrevolver (z.B. dem AIC RxFISH CytoVision System) gemäß den Anweisungen des Herstellers untersucht. Der resultierende Karyotyp wird mit jenem einer normalen humanen Metaphase, die mit den gleichen Reagenzien (nicht notwendigerweise gleichzeitig) behandelt worden ist, verglichen und Chromosomenaberrationen in der untersuchten Metaphase werden aufgezeichnet.

**[0076]** Die Erfindung stellt neue Verfahren und Materialien, welche sich auf die Karyotypen-Analyse und die Diagnose und Behandlung von Krankheiten beziehen, bereit. Obwohl spezielle Beispiele bereitgestellt worden sind, dient die obige Beschreibung der Veranschaulichung und nicht der Beschränkung. Den Fachleuten auf diesem Gebiet werden nach der Prüfung dieser Unterlagen viele Variationen der Erfindung ersichtlich sein. Der Umfang der Erfindung sollte dementsprechend nicht unter Bezugnahme auf die obige Beschreibung bestimmt werden, sondern sollte stattdessen unter Bezugnahme auf die beigefügten Ansprüche bestimmt werden.

### Patentansprüche

1. Verfahren zum Nachweisen einer Chromosomenaberration in einer ersten Vertebratenspezies, umfassend:

- (a) in situ-Hybridisierung einer Mehrzahl von Chromosomenspezifischen Sonden aus einer zweiten Vertebratenspezies mit der ersten Vertebratenspezies, wobei die erste und die zweite Spezies unterschiedlich sind und die Sonden unterschiedliche detektierbare Markierungen tragen;
- (b) Detektieren eines Bandenmusters, welches aus der Hybridisierung resultiert; und
- (c) Vergleichen des detektierten Bandenmusters mit einem Bandenmuster für das entsprechende nicht-aberrante Chromosom der Vertebratenspezies.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die erste Vertebratenspezies human ist.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, wobei die zweite Vertebratenspezies ein nicht-humaner Primat ist.
4. Verfahren nach Anspruch 3, wobei der nicht-humane Primat *Hylobates concolor* ist.
5. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, wobei die Anzahl von unterschiedlichen Markierungen 3 ist.
6. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, wobei die Markierungen aus Biotin, Cyanin-3 und Fluoresceinisothiocyanat ausgewählt werden.

Es folgen 5 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

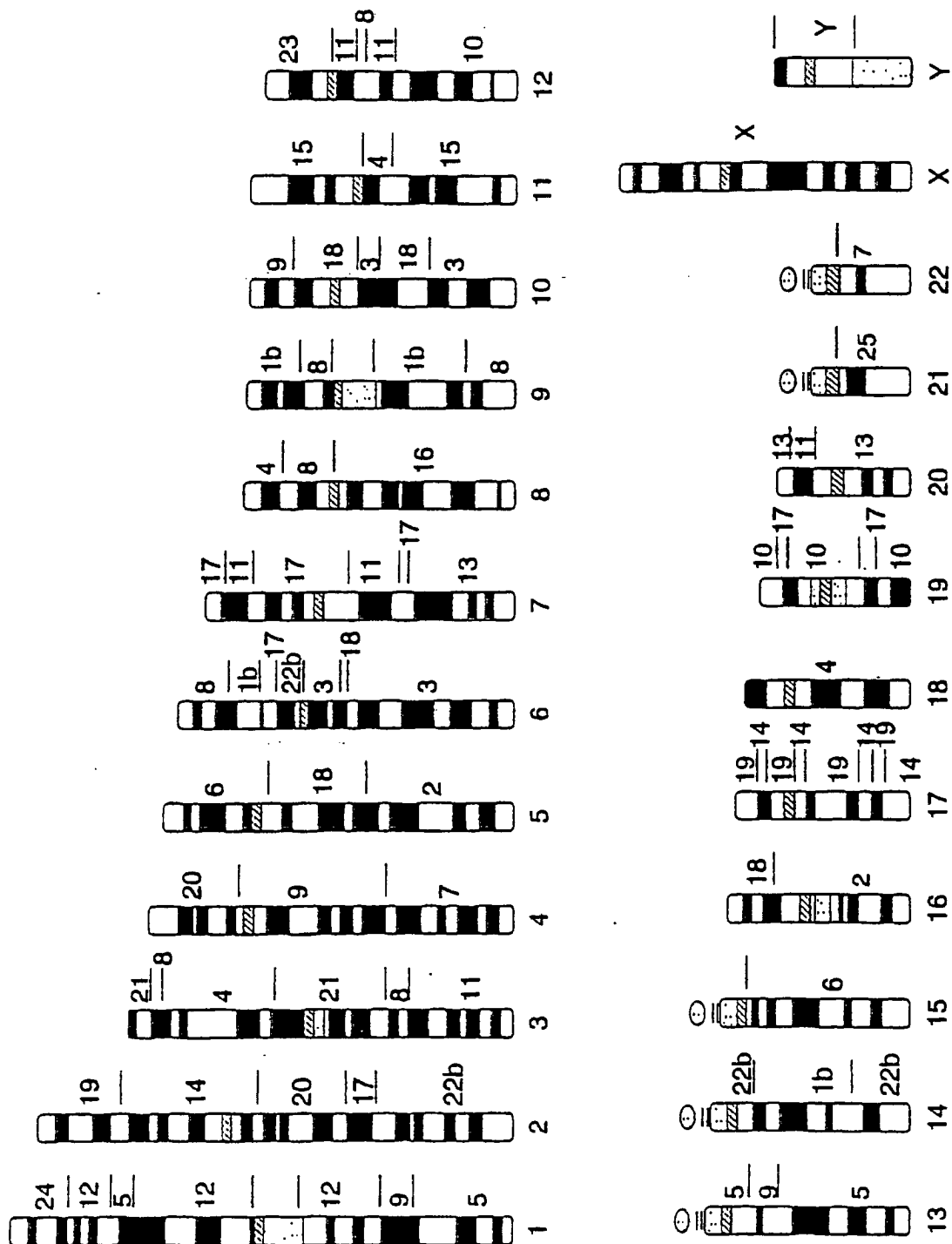


FIG. 1

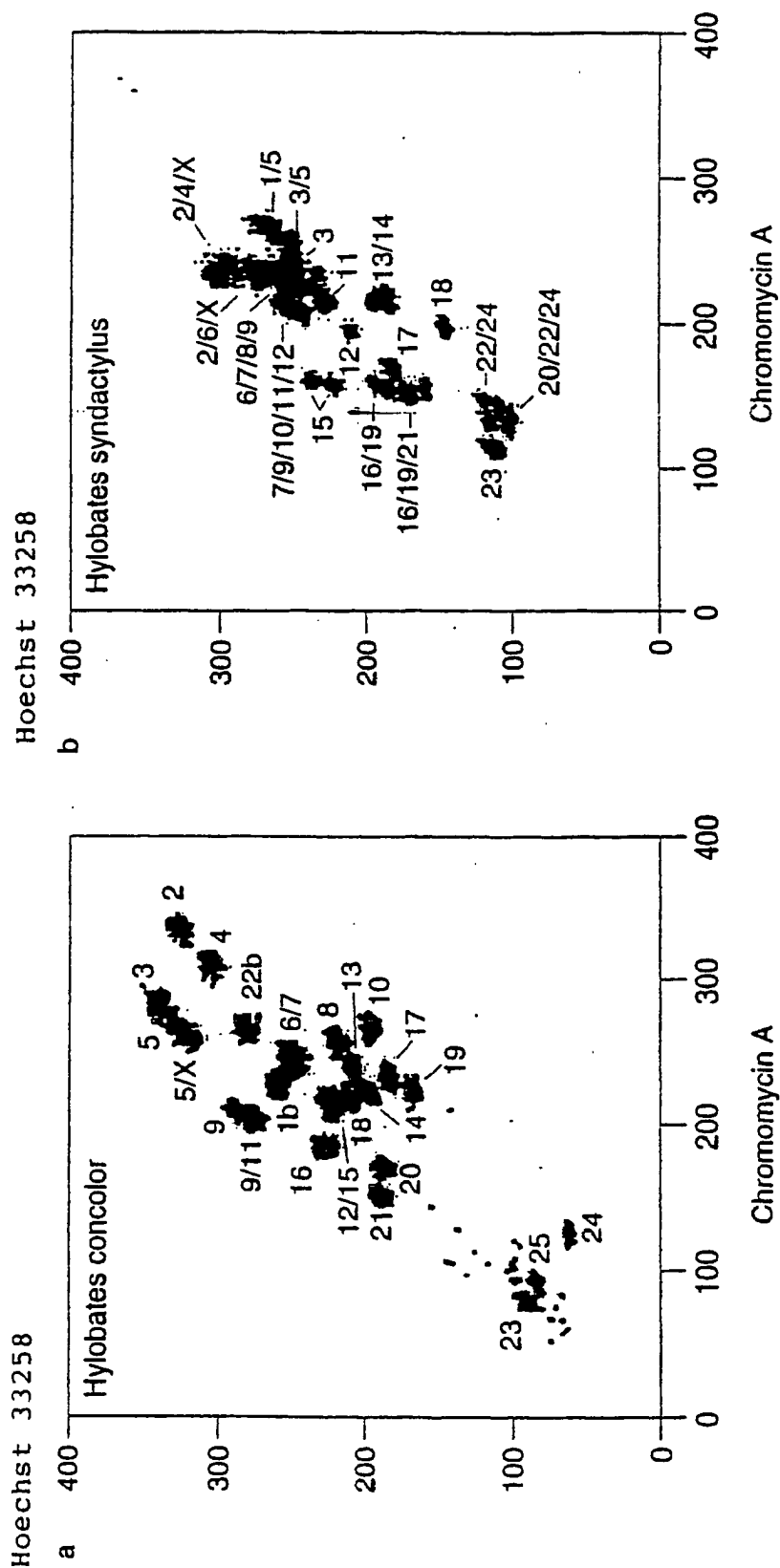


FIG. 2A

FIG. 2B

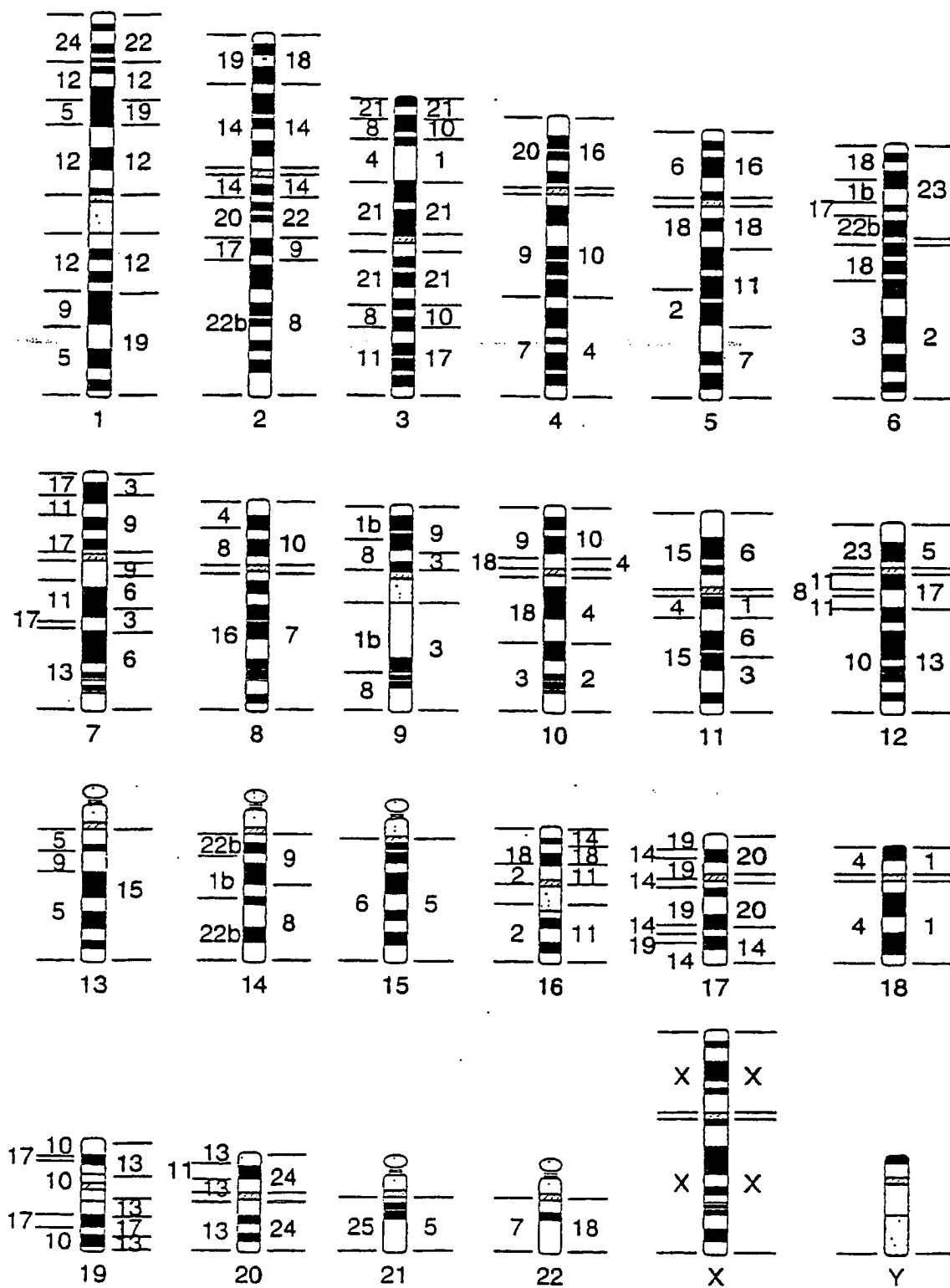


FIG. 3

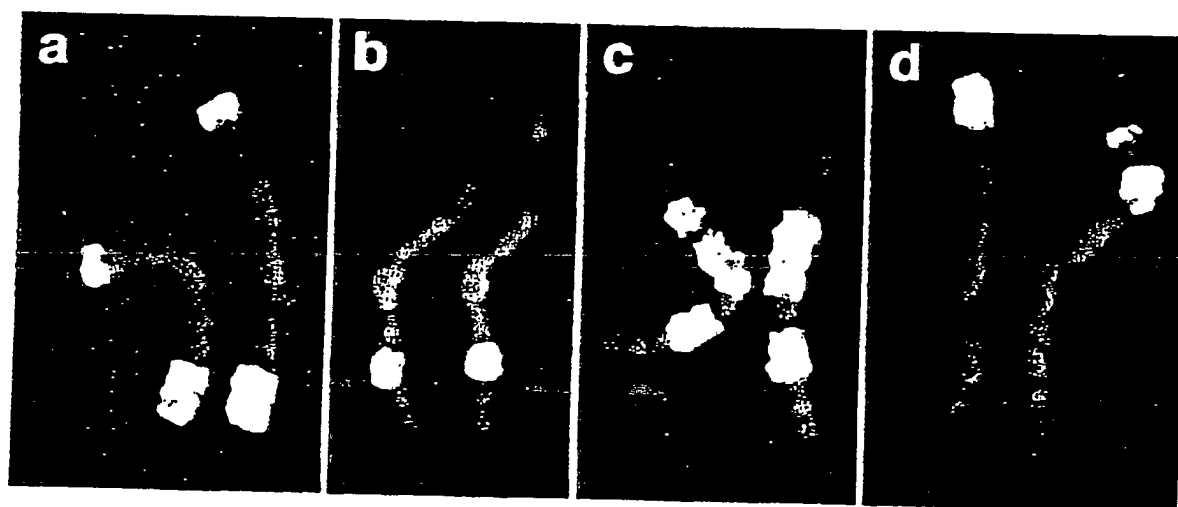


FIG. 4A

FIG. 4B

FIG. 4C

FIG. 4D

FIG. 4

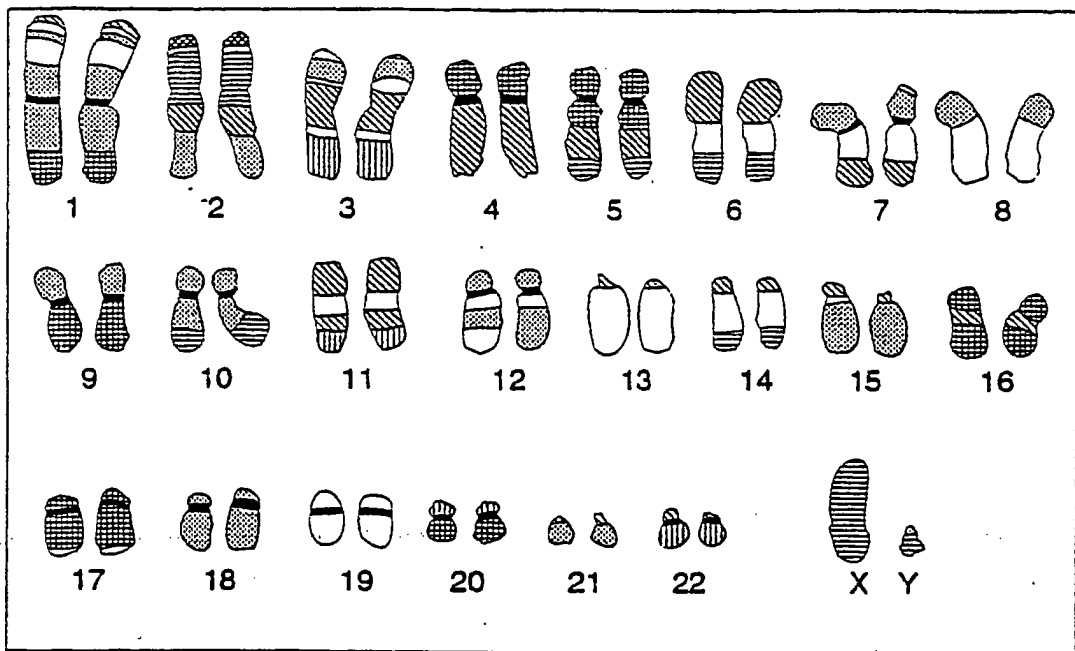


Fig. 5A

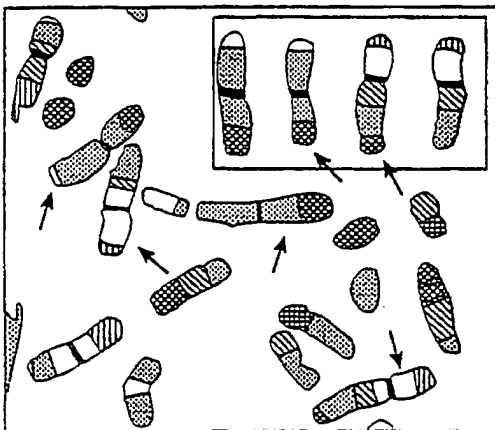


Fig. 5B

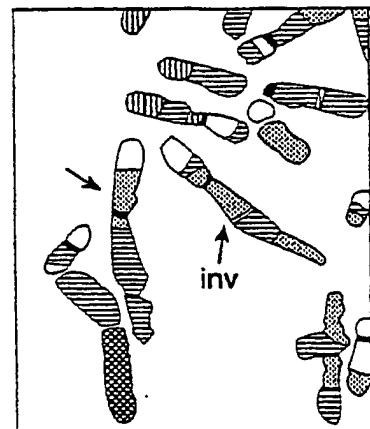


Fig. 5C

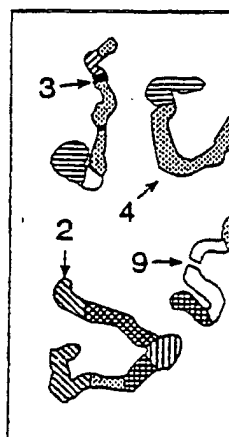


Fig. 5D