

Applikation Durchflusszytometrie

Flow Fish: *In situ* Messung der Telomerlänge

Untersuchungen der an den Enden linearer eukaryotischer Chromosomen lokalisierten Telomere werden in der Forschung im Kontext von Tumorentstehung, Altern, Infektionen und Immunerkrankungen durchgeführt. Standard-Methoden, wie z.B. Southern Blot, messen die terminale Restriktionsfragmentlänge (TRF) der Telomere, erfordern jedoch eine hohe Zellzahl, umfassen zahlreiche Präparationsschritte, sind oft wenig reproduzierbar und inakkurat. Unter Ausnutzung des Prinzips der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung kann die Telomerlänge unter Verwendung spezifischer, fluoreszenz-markierter Sonden durchflusszytometrisch im Hochdurchsatzverfahren untersucht werden. Diese Flow FISH genannte Technik basiert auf schematisch nachfolgend dargestellten Schritten:

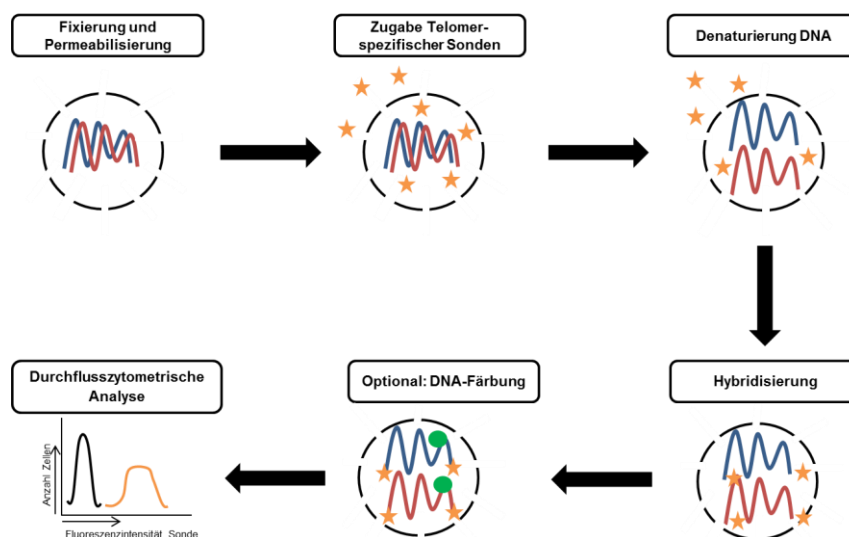


Abbildung 1: Schematischer Ablauf der Präparation von Zellen für die durchflusszytometrische Analyse der Telomerlängen.

Um zelluläre Strukturen zu erhalten, werden die Zellen zunächst fixiert und anschließend, in Abhängigkeit der Sondenwahl, permeabilisiert. Nach Zugabe der Sonden wird die DNA denaturiert, sodass die Sonden an einzelsträngige DNA hybridisieren kann. Eine Markierung der DNA für Zellzyklusanalysen oder eine Oberflächenmarkierung für die Bestimmung des Zellphänotyps ist optional und erfordert genaue Überlegungen, da nicht alle Farbstoffe bzw. Antikörper unter den harschen Bedingungen während der oben beschriebenen Prozedur zu verwenden sind. Am Durchflusszytometer wird die mediane Fluoreszenzintensität der Sonden der einzelnen Proben und einer Kontrolle mit bekanntem TRF-Wert gemessen. Der erhaltene MFI ist die Grundlage für die Berechnung der TRFs für die spezifischen Proben.

Weiterführende Literatur

- Lauzon et al.(2000): Flow Cytometric Measurement of Telomer Length: Cytometry 42:159-164.
- Baerlocher et al. (2006): Flow cytometry and FISH to measure the average length of telomeres (flow FISH): Nature Protocols 1: 2365-2376.
- Telomere PNA Kit/FITC for Flow Cytometry von Dako, Dänemark.