

***Neue molekularzytogenetische Strategien für die Analyse
seltener Zellen***

Dissertation

aus dem Department Biologie II
Molekulare Zytogenetik
Ludwig- Maximilians- Universität München

vorgelegt von

Rainer Gangnus
aus München

Oktober 2002

1. Gutachter: Prof. Thomas Cremer
2. Gutachter: Prof. Heinrich Leonhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 6.Juni 2003

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
Inhaltsverzeichnis	1
Abkürzungen	6
1. EINLEITUNG	7
1.1. Zugang zu essentiellen biologischen Informationen durch die Analyse auf Einzelzellniveau	7
1.2. Diagnostik und Charakterisierung von disseminierten Tumorzellen: Paradigma für die Notwendigkeit von Einzelzellanalysen	8
1.3. Methodische Ansätze zur Einzelzellanalyse am Beispiel disseminierter Tumorzellen	9
1.3.1. Charakterisierung von disseminierten Tumorzellen mittels Antikörpern	9
1.3.2. Einzelzellanalyse von disseminierten Tumorzellen durch FISH mit regionenspezifischen Sonden	10
1.3.3. Isolierung einzelner Zellen durch Mikrodissektion	11
1.3.4. Amplifikation des Genoms einer einzelnen Zelle	12
1.3.5. Einzelzell CGH zur Analyse von disseminierten Tumorzellen	13
1.3.6. Expansion von disseminierten Tumorzellen in Kultur	16
1.4. Wissensstand über disseminierte Tumorzellen	16
1.5. Aufgabenstellung und Zielsetzung der Doktorarbeit	18
2. MATERIAL UND METHODEN	20
2.1. Chromosomenpräparation	20
2.1.1. Herstellung von Metaphasenpräparaten	20
2.1.2. RNase- / Pepsin-Behandlung und Denaturierung der Präparate	22
2.2. Adapter-Linker PCR für die Einzelzell CGH	24
2.2.1. Abgeändertes Protokoll mit neuen Primern nach: Stöcklein et al. 2002	24
2.2.1.1. Isolation von einzelnen Zellen	25
2.2.1.2. Proteinase K Verdau	25
2.2.1.3. MseI-Verdau	26
2.2.1.4. Preannealing der Adapter	26
2.2.1.5. Ligation	27
2.2.1.6. Primäre PCR	28
2.2.1.7. Methoden zur Markierung der DNA	31
2.2.1.8. Abtrennen der Primer	38
2.2.1.9. Fällung und Ansetzen des Hybridisierungsmix	39
2.2.1.10. Nachweis	40
2.2.2. Protokoll aus C. Klein et al. PNAS 96, pp.4494-4499, April 1999	42
2.2.2.1. Isolation von einzelnen Zellen	42
2.2.2.2. Proteinase K Verdau	42
2.2.2.3. MseI-Verdau	42
2.2.2.4. Preannealing der Adapter	43

2.2.2.5.	Ligation	43
2.2.2.6.	Primäre PCR	43
2.2.2.7.	Methoden zur Markierung der DNA	44
2.2.2.8.	Abtrennen der Primer	45
2.2.2.9.	Fällung und Ansetzen des Hybridisierungsmix	45
2.2.2.10	Nachweis	45
2.2.3.	Protokoll zur Analyse von disseminierten Tumorzellen	46
2.2.3.1.	Vorbereiten der Objektträger	47
2.2.3.2.	Isolation von einzelnen Zellen mit dem PALM MicroBeam System	47
2.2.3.3.	Proteinase K Verdau	48
2.2.3.4.	MseI-Verdau	49
2.2.3.5.	Preannealing der Adapter	49
2.2.3.6.	Ligation	50
2.2.3.7.	Primäre PCR	50
2.2.3.8.	Verschiedene Methoden zur Markierung der DNA	52
2.2.3.9.	Abtrennen der Primer	55
2.2.3.10.	Fällung und Ansetzen des Hybridisierungsmix	55
2.2.3.11.	Nachweis	56
2.2.4.	Mikroskopie und Auswertung	57
2.2.4.1.	Benutzung der Leica Software für Mikroskopie und Auswertung	57
2.2.4.2.	Benutzung des Metasystems System für Mikroskopie und Auswertung	58
2.3.	Analyse disseminierter Tumorzellen im Knochenmark mittels FISH nach Antikörperfärbung	59
2.3.1.	Anreicherung disseminierter Tumorzellen im Knochenmark	59
2.3.1.1.	Anreicherung über Ficoll-Hypaque Gradient (R. Riesenberg et al. 1993)	59
2.3.1.2.	Anreicherung über Depletion mit Dynabeads M-450 CD45 (R. Zigeuner et al. 2000)	60
2.3.2.	Identifikation der disseminierten Tumorzellen	61
2.3.2.1.	Antikörpernachweis mit Neufuchsin, Fast Blue und NBT/BCIP	61
2.3.2.2.	Markierung der disseminierten Tumorzellen mit A45 B/B3 -Cy3 konjugiertem Antikörper	62
2.3.2.3.	Ansatz für zwei negativ Kontrollen für A45 B/B3 -Cy3 konjugiertem Antikörper auf einen Patienten Zytopsin	64
2.3.2.4.	Markierung der disseminierten Tumorzellen mit A45 B/B3 -FluorX konjugiertem Antikörper	64
2.3.2.4.1.	Konjugieren von FluorX an A45 B/B3	64
2.3.2.4.2.	Markieren der disseminierten Zellen	64
2.3.3.	Vorbehandlung der gefärbten Zytopsin und Hybridisierung mit Zentromersonden	65
2.3.3.1.	Herstellung geeigneter Zentromersonden zur Hybridisierung	65
2.3.3.1.1.	Amplifikation der Zentromersonden über Insert-PCR	66
2.3.3.1.2.	Markierung der Zentromersonden durch Nicktranslation	68
2.3.3.1.3.	Fällung und Hybridisierung	68
2.3.3.1.4.	Nachweis der indirektmarkierten Sonden	69
2.3.4.	Vorbehandlung der gefärbten Zytopsin und Hybridisierung mit zentromernahen YAC-Sonden	70
2.3.4.1.	Verschiedene Protokolle zu Verdau und Fixierung der Zytopsin	71
2.3.4.2.	Herstellung geeigneter zentromernaher YAC-Sonden zur Hybridisierung	73
2.3.4.2.1.	Herstellung der Ansätze und Markierung	74
2.3.4.2.2.	Fällung, Hybridisierung und Nachweis	75
2.4.	Analyse disseminierter Tumorzellen ins Knochenmark von fünf Mammakarzinom Patientinnen	78

2.4.1.	Identifikation der disseminierten Tumorzellen im Knochenmark	78
2.4.2.	Analyse des Genoms einzelner disseminierter Tumorzellen mittels Einzelzell CGH	79
2.4.2.1.	Isolation von einzelnen Zellen mit dem PALM MicroBeam System	80
2.4.2.2.	Proteinase K Verdau	80
2.4.2.3.	Msel-Verdau	81
2.4.2.4.	Preannealing der Adapter	81
2.4.2.5.	Ligation	82
2.4.2.6.	Primäre PCR	82
2.4.2.7.	Methode zur Markierung der DNA	84
2.4.2.8.	Abtrennen der Primer	85
2.4.2.9.	Fällung und Ansetzen des Hybridisierungsmix	85
2.4.2.10.	Nachweis	85
2.4.2.11.	Mikroskopie und Auswertung	86
2.4.3.	Analyse einzelner disseminierter Tumorzellen mittels Interphase Zytogenetik	87
2.4.4.	Analyse der Primärtumoren mittels Einzelzell CGH	88
3.	ERGEBNISSE	89
3.1.	Adapter-Linker PCR für die Einzelzell CGH	89
3.1.1.	M-FISH und CGH Ergebnisse aus RCC-26 p45	89
3.1.2.	Einzelzell CGH nach N. Stoecklein et al. 2002 und C. Klein et al. 1999	92
3.1.3.	Abwandlungen des Protokolls für die Einzelzell CGH	96
3.1.3.1.	Verlängerung der Elongation in der Primär-PCR (nach Thomas et al. 1999)	96
3.1.3.2.	Zugabe von Formamid in die Primär-PCR	98
3.1.4.	Reproduzierbarkeit des Einzelzell CGH Protokolls mit Formamid bei der Analyse von Einzelzellen aus der Zelllinie RCC-26 p75	99
3.1.5.	Analyse der Zelllinie RCC-26 mittels Einzelzell CGH unter Verwendung des PALM MicroBeam Systems	103
3.1.5.1.	Ergebnis der klassischen CGH aus RCC-26	104
3.1.5.2.	Ergebnisse mit der POL-Folie	104
3.1.5.3.	Ergebnisse mit der PEN-Folie	105
3.1.5.4.	Vergleich der unterschiedlichen Markierungsmethoden anhand eines Primär-PCR Produktes einer Einzelzelle von RCC-26	106
3.2.	Analyse disseminierter Tumorzellen mittels Interphase Zytogenetik	108
3.2.1.	Anwendung verschiedener Nachweismethoden für den A45 B/B3 Antikörper bei gleichzeitiger Hybridisierung von Zentromersonden	108
3.2.1.1.	Austesten verschiedener Nachweissysteme in Blindversuchen	108
3.2.1.2.	Austesten verschiedener Nachweissysteme in Bezug auf eine Hybridisierungseffizienz	111
3.2.2.	Austesten der zentromernahen YAC-Sonden auf normalen 46,XY Metaphasen und der Zelllinie RCC 26	114
3.2.3.	Hybridisierung von zentromernahen YAC-Sonden auf A45 B/B3-Cy3 positiven disseminierten Tumorzellen	116
3.2.3.1.	Simultane Hybridisierung der Zentromernahen YAC-Sonden auf A45 B/B3-Cy3 positive disseminierte Tumorzellen	116
3.2.3.2.	Protokoll 1: Orientierung an Vorbehandlung von Metaphase Präparaten	117
3.2.3.3.	Protokoll 2: Fixierung der Zytospins nach dem Pepsin Verdau	120
3.2.3.4.	Protokoll 3: Proteinase K Verdau	125
3.2.3.5.	Protokoll 4: Markierung der disseminierten Tumorzellen mit A45 B/B3-FluorX	127

3.2.4.	Hybridisierung des Zentromer Sondensatzes dT-Mix auf Zytospins	128
3.2.4.1.	Hybridisierung des Zentromer Sondensatzes dT-Mix auf A45 B/B3-positive disseminierte Tumorzellen	128
3.2.4.2.	Hybridisierung des Zentromer Sondensatzes dT-Mix auf nicht gefärbte disseminierte Tumorzellen	129
3.2.5.	Der Fall „Ob-2006“	131
3.3.	Analyse kultivierter disseminierter Tumorzellen von fünf Mammakarzinom Patientinnen	135
3.3.1.	Patientin 1125	137
3.3.1.1.	Tumorbefund und Kulturverlauf der Zellen	137
3.3.1.2.	Analyse des Primärtumors	137
3.3.1.3.	Analyse von kultivierten disseminierten Tumorzellen mittels Einzelzell CGH	138
3.3.1.4.	Analyse von kultivierten disseminierten Tumorzellen mittels Interphase FISH	140
3.3.2.	Patientin 1153/54	142
3.3.2.1.	Tumorbefund und Kulturverlauf der Zellen	142
3.3.2.2.	Analyse des Primärtumors	142
3.3.2.3.	Analyse von kultivierten disseminierten Tumorzellen mittels Einzelzell CGH	143
3.3.2.4.	Analyse von kultivierten disseminierten Tumorzellen mittels Interphase FISH	145
3.3.3.	Patientin 1157/58	147
3.3.3.1.	Tumorbefund und Kulturverlauf der Zellen	147
3.3.3.2.	Analyse des Primärtumors	147
3.3.3.3.	Analyse von kultivierten disseminierten Tumorzellen mittels Einzelzell CGH	148
3.3.3.4.	Analyse von kultivierten disseminierten Tumorzellen mittels Interphase FISH	150
3.3.4.	Patientin 1186/87	152
3.3.4.1.	Tumorbefund und Kulturverlauf der Zellen	152
3.3.4.2.	Analyse des Primärtumors	152
3.3.4.3.	Analyse von kultivierten disseminierten Tumorzellen mittels Einzelzell CGH	155
3.3.4.4.	Analyse von kultivierten disseminierten Tumorzellen mittels Interphase FISH	157
3.3.5.	Patientin 1192/93	158
3.3.5.1.	Tumorbefund und Kulturverlauf der Zellen	158
3.3.5.2.	Analyse des Primärtumors	159
3.3.5.3.	Analyse von kultivierten disseminierten Tumorzellen mittels Einzelzell CGH	161
3.3.5.4.	Analyse von kultivierten disseminierten Tumorzellen mittels Interphase FISH	163
4.	DISKUSSION	165
4.1.	Analyse von disseminierten Tumorzellen mittels Adapter-Linker PCR - Testsystem für eine neue Analysemethode	165
4.1.1.	Anwendung der Adapter-Linker PCR nach C. Klein et al.1999	165
4.1.1.1.	Adapter-Linker PCR nach C. Klein et al. 1999 und N. Stöcklein et al. 2002	165
4.1.1.2.	Adapter-Linker PCR mit der Zugabe von Formamid	167
4.1.2.	Analyse von Einzelzellen der Zelllinie RCC-26 als Testsystem	168
4.1.3.	Analyse von Einzelzellen der Zelllinie RCC-26 - Mikromanipulation mit dem PALM MicroBeam System	170
4.1.3.1.	Vergleich verschiedener Protokolle	170
4.1.3.2.	Analyse der Reproduzierbarkeit unter Verwendung des MicroBeam Systems	172
4.1.4.	Analyse von Einzelzellen mittels Adapter-Linker PCR - Zusammenfassung	173
4.2.	Analyse von disseminierten Tumorzellen mittels Interphase Zytogenetik	174

4.2.1.	Austesten der verschiedenen Nachweissysteme für pan-Zytokeratin positive Zellen im Knochenmark	174
4.2.1.1.	Austesten der verschiedenen Nachweissysteme	174
4.2.1.2.	Austesten der verschiedenen Nachweissysteme in Hinblick auf eine ausreichende Hybridisierungseffizienz	175
4.2.1.3.	Zusammenfassung der Ergebnisse der verschiedenen Nachweissysteme	176
4.2.2.	Hybridisieren von verschiedenen regionenspezifischen YAC-Sonden auf pan-Zytokeratin positive Zellen im Knochenmark	177
4.2.2.1.	Austesten der eingesetzten SONDENSÄTZE	177
4.2.2.2.	Hybridisierung der Zentromernahen YAC-Sonden auf A45 B/B3-Cy3 gefärbte Knochenmarkspräparate	178
4.2.2.3.	Hybridisierung der Zentromernahen YAC-Sonden auf A45 B/B3-FluorX gefärbte Knochenmarkspräparate	183
4.2.2.4.	Hybridisierung der Zentromernahen YAC-Sonden - Zusammenfassung	183
4.2.3.	Hybridisierung des Zentromer SONDENSATZES dT-Mix auf pan-Zytokeratin positive Zellen im Knochenmark	184
4.2.3.1.	Hybridisierung der Zentromersonden auf Cy3 positive Präparate von Nierentumorpatienten	184
4.2.3.2.	Hybridisierung der Zentromersonden auf nicht gefärbte Präparate	185
4.2.3.3.	Hybridisierung der Zentromersonden auf den Fall „Ob-2006“	187
4.2.4.	Analyse von disseminierten Tumorzellen mittels Interphase Zytogenetik - Zusammenfassung	189
4.3.	Analyse von kultivierten disseminierten Tumorzellen bei fünf Mammakarzinom Patientinnen	191
4.3.1.	Einzelzell CGH und Interphase FISH	191
4.3.1.1.	Anwendung der Einzelzell CGH bei disseminierten Tumorzellen von Mammakarzinom Patientinnen	191
4.3.1.2.	Anwendung der Interphase FISH bei disseminierten Tumorzellen von Mammakarzinom Patientinnen	193
4.3.2.	Analyse der Ergebnisse im Vergleich der angewandten Methoden	194
4.3.2.1.	Vergleich der Einzelzell CGH Daten der disseminierten Tumorzellen mit den Ergebnissen aus der Primärtumor Analyse	194
4.3.2.2.	Interpretation der Ergebnisse aller fünf Patienten	201
4.3.2.3.	Einbringen der Ergebnisse aus dem Interphase Ansatz	204
4.4.	Allgemeines Fazit zur Analyse von Einzelzellen	205
4.5.	Ausblick	205
5.	ZUSAMMENFASSUNG	208
6.	LITERATURVERZEICHNIS	210
7.	ANHANG	216
8.	PUBLIKATIONEN	218
9.	LEBENS LAUF	219
10.	DANKSAGUNG	220

Abkürzungen

°	Grad	M-FISH	Multiplex FISH
`	Minuten	M	Mol/l
``	Sekunden	mAb	monoklonaler Antikörper
A	Adenin	min	Minuten
Bio	Biotin	Mio	Millionen
BSA	bovines Serumalbumin	mg	Milligramm
bp	base pair (Basenpaar)	MgCl ₂	Magnesiumchlorid
bzw	beziehungsweise	ml	Milliliter
CCD	charged coupled device (hochsensitive digitale Kamera)	mM	Millimolar
CGH	comparative genomic hybridization (Vergleichende Genomische Hybridisierung)	mm	Millimeter
CK	Zytokeratin	MPC	magnetic particle concentrator
Cy	Cyanin-Farbstoff	NaCl	Natriumchlorid
C	Cytosin	NaOAc	Natriumacetat
DAPI	4'-6- Diamidino-2-Phenylindol	nm	Nanometer
Dig	Digoxigenin	nmol	Nanomol
DNA	desoxyribonucleic acid	p	Passage
DOP-PCR	degenerate oligonucleotide-primed PCR	PBS	phosphatgepufferte Saline
d.h.	das heißt	PCR	Polymerase Kettenreaktion
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	PEN	Polyethylen-Naphtalat
EtOH	Ethanol	POL	Polyester
FISH	Fluoreszenz <i>in-situ</i> Hybridisierung	RCC	Nierenzellkarzinom (renal cell carcinoma)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat	RT	Raumtemperatur
FKS	Fetales Kälberserum	RNA	ribonucleic acid
G	Guanin	SCID	schwere kombinierte Immundefizienz
g	Gramm	sek	Sekunden
HCl	Salzsäure	SSC	Natriumchlorid / Natriumcitrat
kb	Kilobasen	Std.	Stunde
KCl	Kaliumchlorid	T	Thymin
KM	Knochenmark	TAE	Tris-Acetat-EDTA Puffer
l	Liter	TE	Tris-EDTA Puffer
LPC	laser pressure catapult	Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3- Propandiol
µg	Mikrogramm	u	units
µl	Mikroliter	U/min	Umdrehungen pro Minute
µM	Mikromol	UV	Ultraviolett
µmol	Mikromolar	Vol	Volumen
mb	Megabasen	WWW	world wide web

International System for Human Cytogenetic Nomenclature ISCN:

cp composite (aus mehreren Metaphasen zusammengesetzten Karyotyp)
 del Deletion
 der derivatives Chromosom
 i Isochromosom
 ter terminal

1. EINLEITUNG

1.1. Zugang zu essentiellen biologischen Informationen durch die Analyse auf Einzelzellniveau

Die molekulargenetische Untersuchung von einzelnen Zellen ist bis zum heutigen Zeitpunkt selten durchgeführt worden. Die Gründe hierfür liegen an den aufwendigen und schwierigen Verfahren zur Isolierung bestimmter einzelner Zellen und den fehlenden Methoden für ihre Analyse.

In den meisten Fällen bezieht sich eine DNA oder RNA Untersuchung auf eine Vielzahl von extrahierten Zellen aus einem Zellverband, wie zum Beispiel aus Tumorgewebe. Ohne Zweifel gibt es aber wichtige Fragestellungen, die nur durch eine Analyse auf Einzelzellniveau bearbeitet werden können.

Zum einen ist bekannt, dass während der Kanzerogenese die Zellen in ihrem Verband zu einer genetischen Heterogenität neigen. Um die beteiligten molekularen Mechanismen zu verstehen, ist eine Analyse im Einzelzellstadium notwendig.

Zweitens wird aufgrund der Tumorerheterogenität die Aussagekraft von Expressionsanalysen vermindert. Wenn es möglich wäre, durch eine vorhergehende molekulargenetische Untersuchung möglichst aggressive Tumoreareale zu identifizieren, könnte eine Expressionsanalyse mit RNA gezielt aus diesem Tumorbereich durchgeführt werden. Dies würde ein spezifischeres Ergebnis ohne „Verunreinigung“ von anderen Tumorearealen ergeben.

Ein weiterer Anwendungsbereich für Einzelzellanalysen ist das Aufspüren von Mosaiken in bestimmten Geweben, die sich genetisch vom umgebenden Gewebe unterscheiden. Solche Mosaikzellen könnten die Ursache für einen Prozentsatz häufiger Erkrankungen wie Unfruchtbarkeit, Autismus und der Alzheimer Krankheit sein (H. Potter et al. 1996; L. Migliore et al. 1999; L.N. Geller et al. 1999; K.K. Sangha et al. 1999). Die Identifizierung dieser genetisch verschiedenen Gewebe kann nur durch Einzelzellanalysen erreicht werden.

Die Analyse einzelner Zellen ist für den Bereich der seltenen Zellen (so genannte „rare cell events“) von entscheidender Bedeutung. Hierzu zählt sowohl die Analyse von fetalen Zellen im mütterlichen Blut, die frühen Läsionen bei Neoplasien sowie die minimale residuale Tumorerkrankung der soliden epithelialen Tumoren, auf die noch genauer eingegangen wird, da sie für diese Doktorarbeit einen Schwerpunkt darstellt.

1.2. Diagnostik und Charakterisierung von disseminierten Tumorzellen: Paradigma für die Notwendigkeit von Einzelzellanalysen

Trotz vermeintlich kurativer Resektion des Primärtumors kommt es bei vielen Krebspatienten im weiteren Verlauf zu einem Tumorrezidiv, das wahrscheinlich auf eine frühe Tumorzelldisseminierung zurückzuführen ist. Für die meisten epithelialen Tumoren beginnt die Disseminierung der Tumorzellen bald nach Vaskularisation des Primärtumors. Für das Mammakarzinom gibt es beispielsweise Schätzungen, die besagen, dass die Tumorzelldisseminierung bereits bei einer Größe des Primärtumors von weniger als 0.125 cm³ anfangen kann (Liotta et al. 1974).

Einige epitheliale Tumorentitäten metastasieren bevorzugt in das Skelett. Da es sich hier um ein leicht zugängliches Kompartiment handelt, kann man durch Knochenmarksaspiration an die disseminierten Tumorzellen gelangen. Ebenso wichtig ist die lymphogene Disseminierung und damit die Untersuchung der Lymphknoten auf minimale Tumorzelldisseminierung.

Die Identifikation einzelner Tumorzellen im Knochenmark ist zytologisch äußerst schwierig, allerdings konnte der Nachweis mittels sensitiver immunzytochemischer und molekularer Methoden ermöglicht werden (Übersicht in: K. Pantel et al. 1999; MP Osborne et al. 1994). Als vielversprechend erwiesen sich Zytokeratine (CK) als integrale Bestandteile des Zytoskeletts epithelialer Zellen. Sie werden auch von Tumorzellen stabil exprimiert und können mit spezifischen monoklonalen Antikörpern nachgewiesen werden.

Im Durchschnitt finden sich beispielsweise einzelne epitheliale Zellen im Knochenmark bei etwa 30% der untersuchten Patienten mit Mamma- und Kolorektalkarzinom ohne klinisch nachweisbare Metastasierung (d.h. TNM-Stadium M₀). Demnach scheint die Neigung der einzelnen Karzinomarten zur frühen Disseminierung im Stadium M₀ trotz ihres unterschiedlichen Metastasenmusters ähnlich stark ausgeprägt zu sein. Im Verlauf der postoperativen Tumorprogression reagieren diese Tumorzellen jedoch unterschiedlich auf das neue Milieu im Knochenmark. Hierbei ist anzunehmen, dass sich Zellen verschiedener Karzinome unterschiedlich auf diese neuen „Environment“-Bedingungen einstellen und somit ein unterschiedliches Überlebens- und/oder Wachstumspotential besitzen. Diese Hypothese mag erklären, warum ins Knochenmark disseminierte Zytokeratin (CK) -positive Zellen so unterschiedlich maligne Phänotypen besitzen.

Einen limitierenden Einfluss auf die Analyse disseminierter Tumorzellen hat die Tatsache, dass in 10⁵ bis 10⁶ Zellen des Knochenmarks nur eine Tumorzelle zu finden ist. Die biologische Signifikanz dieser Zellen ist aber per se nicht bekannt, da das Färbeverhalten von CK positiven Zellen nichts über das maligne Potential aussagt. Disseminierte

Tumorzellen stellen ein Paradigma für die Notwendigkeit detaillierter Einzelzellanalysen dar. Diese Analysen erlauben Aussagen über die frühesten Veränderungen die zur Disseminierung oder Metastasierung führen. Zusätzlich besitzen sie das Potential, neue diagnostische oder prognostische Faktoren zu liefern.

1.3. Methodische Ansätze zur Einzelzellanalyse am Beispiel disseminierter Tumorzellen

Die Analyse von Einzelzellen ist schwer und hat sich bis heute als Routineanwendung kaum durchgesetzt. Die Ansätze stützen sich auf Fluoreszenz-in-situ Hybridisierungen (FISH) mit regionenspezifischen Sonden, die Analyse vereinzelter Zellen zur phenotypischen oder genotypischen Charakterisierung, die Amplifikation des Genoms einer einzelnen Zelle und die Expansion von disseminierten Tumorzellen in Kultur.

Einen weiteren limitierenden Faktor stellt die immunhistochemische Identifizierung dieser seltenen Zellen in Blut, Knochenmark und Lymphknoten dar.

1.3.1. Charakterisierung von disseminierten Tumorzellen mittels Antikörpern

Die Identifikation einzelner Tumorzellen im Knochenmark erfolgt mittels sensitiver immunzytochemischer Methoden (K. Pantel et al. 1999; M. P. Osborne et al. 1994). Als vielversprechend erwiesen sich Zytokeratine (CK) als integrale Bestandteile des Zytoskeletts epithelialer Zellen, da sie mit spezifischen monoklonalen Antikörpern nachgewiesen werden können.

Besonders das CK 18 eignet sich, um disseminierte Tumorzellen in Blut oder Knochenmark nachzuweisen. Es gab verschiedene Studien für Kolorektal-, Magen- und Bronchialkarzinome, in denen dieser monoklonale Antikörper zur Bestimmung eingesetzt wurde (Zusammenfassung in: J.R. Izbicki et al. 2000). Häufig eingesetzt wird auch der Antikörper A45 B/B3, der sich gegen die Zytokeratine 8, 18 und 19 richtet.

Um den monoklonalen Antikörper nachzuweisen, können verschiedene Farbstoffe eingesetzt werden. Mit am häufigsten werden NBT/BCIP und Neufuchsin verwendet, da sie im Durchlicht leicht auswertbar sind. Aber auch die Konjugation mit Fluoreszenzfarbstoffen wie Cy3 und FluorX ist möglich.

1.3.2. Einzelzellanalyse von disseminierten Tumorzellen durch FISH mit regionenspezifischen Sonden

Die meisten Arbeiten zur Untersuchung von disseminierten Tumorzellen mittels Interphase-FISH beschreiben die Verwendung von zwei bis drei simultan hybridisierten Sonden (P. Müller et al. 1996; P. Müller et al. 1998; A. Forus et al. 1999).

Die Auswahl der Sonden bezieht sich oft auf bereits bekannte Veränderungen der untersuchten Tumoren. So z.B. beschreiben P. Müller et al. 1996 die Untersuchung von disseminierten Tumorzellen von Brusttumor Patientinnen mit einer Zentromer Sonde für Chromosom 17 und einer genspezifischen Sonde für Her-2/neu, lokalisiert auf Chromosom 17. Eine Amplifikation von Her-2/neu ist bei Mammakarzinomen mit einer schlechten Prognose assoziiert.

Eine weitere Arbeit von P. Müller et al. 1998 befasst sich mit der Analyse von disseminierten Tumorzellen aus Prostata Karzinomen. Er zeigte, dass bei 70-75% der analysierten Zellen numerische Veränderungen in Chromosom 7 und 8 zu beobachten waren und 42% der Zellen ein Zugewinn an Chromosom 1 Material hatten. Bei einigen Patienten konnte auch eine Heterogenität in den Signalmustern zwischen verschiedenen Tumorzellen erkannt werden.

A. Forus et al. 1998 verwendeten zur Anreicherung disseminierter Tumorzellen „Magnetic beads“, die gekoppelt an spezifische Tumorerflächenmarker eine Selektion ermöglichen. Im Vergleich zwischen Primärtumor und disseminierten Zellen ins Knochenmark aus Brusttumoren konnte gezeigt werden, dass nicht nur im Primärtumor sondern auch in den ausgewanderten Zellen erbB2 und int2 Amplifikationen auftreten.

Zwei Publikationen beschreiben einen Vielfarben Ansatz mit mehr als drei Soden für die Untersuchung von seltenen Zellen.

J.I. Martin-Subero et al. 2002 hybridisierten bei hämatologischen Neoplasien (B-Zell non-Hodgkin's Lymphoma und Anaplastic large cell Lymphoma) fünf bzw. vier regionenspezifische Sonden. Zusätzlich wurden die untersuchten Einzelzellen mit spezifischen Oberflächenmarkern analysiert und konnten so von den Restzellen unterschieden werden. Die tumorspezifischen Veränderungen dieser Neoplasien, wie die Translokationsereignisse zwischen Chromosom 8 und 11 [t(8;14)], t(11;14), t(14;18) und t(3;14) konnten so nachgewiesen werden.

Bei der Untersuchung von kultivierten disseminierten Tumorzellen von Brusttumor Patientinnen zeigte die simultane Hybridisierung von fünf Zentromersonden, dass diese

Zellen starke genetische Heterogenität aufweisen (O. Solakoglu et al. 2002). Numerische Chromosomenveränderungen konnten in 19 - 61% der kultivierten Zellen erkannt werden.

1.3.3. Isolierung einzelner Zellen durch Mikrodissektion

Zur Mikrodissektion von einzelnen Zellen wurde im Zuge dieser Doktorarbeit auf das PALM MicroBeam System der Firma P.A.L.M. Microlaser Technologies AG (Bernried) zurückgegriffen (Schütze und Lahr et al. 1998). Gegenüber der Mikrodissektion mit einer Nadel zeigt dieses Gerät diverse Vorteile.

Aufgrund eines gepulsten Stickstofflasers (Wellenlänge 337 nm, UV-a) erfolgt eine berührungslose Mikrodissektion mit anschließender Überführung des Probenmaterials in ein Reaktionsgefäß. Zusätzlich ist es durch den Gebrauch eines herkömmlichen Forschungsmikroskops mit Fluoreszenzeinheiten möglich, fluoreszenzmarkierte Zellen zu suchen und in ein Reaktionsgefäß zu überführen.

Durch die computergesteuerte Software wird die Bedienung der gesamten Einheit vereinfacht und ist wenig zeitintensiv.

Zum PALM MicroBeam System

Das Prinzip der Laser Mikrochirurgie mit einem gepulsten UV-a Laser basiert auf der sogenannten kalten Ablation, bei der aufgrund einer enormen Photonendichte im Laserfokus biologisches Material in einzelne Atome und Moleküle zerlegt wird. Durch diesen photolytischen Prozess wird das angrenzende Material nicht beeinträchtigt, da keine Erhitzung stattfindet. Auch die Beschädigung der DNA durch kurzweilige UV Strahlung ist ausgeschlossen, da der benutzte UV-a Laser (337 nm) im Spektrum weit vom schädigenden UV-c (200-290 nm) liegt. Neben der Mikrodissektion von Zellarealen oder einzelnen Zellen können kleinste Öffnungen in Zellmembranen oder Organellen geschnitten, aber auch Chromosomen oder Teilstücke von Chromosomen gewonnen werden.

Nach dem das Probenmaterial mit dem Laser ausgeschnitten wurde erfolgt die Gewinnung z.B. einer einzelnen Zelle ebenfalls berührungslos durch das Laserkatapultieren (Laser Pressure Catapulting, LPC).

Wie in Abbildung Abb.1.1. dargestellt, treibt der Laser die Probe aus der Objektebene mit hoher Geschwindigkeit in den Deckel eines Reaktionsgefäßes, der mit Puffer gefüllt ist.

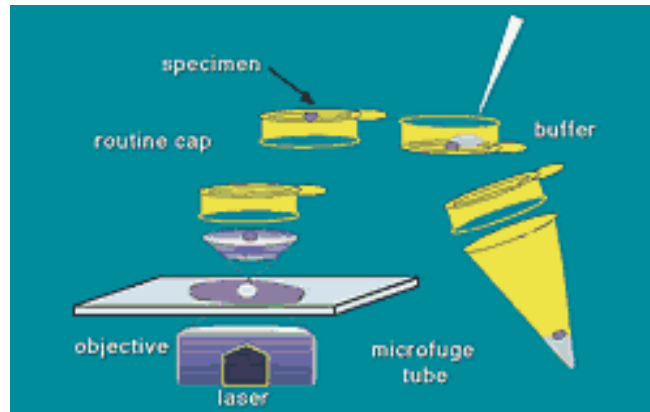


Abb.1.1. Schematische Darstellung des Laserkatapultierens (LPC)
Abbildung aus der PALM Mikrolaser Technologies AG Internetseite:
http://www.palm-mikrolaser.com/about_us_technology_lpc.html

Dies geschieht aufgrund des hohen Photonendrucks, der sich aufgrund des extrem fokussierten Laserstrahls unterhalb der ausgewählten Probe aufbaut.

1.3.4. Amplifikation des Genoms einer einzelnen Zelle

Ein neues Protokoll zur Amplifikation des Genoms aus einer einzelnen Zelle durch eine Adapter-Linker PCR wurde 1999 von C. Klein et al (1999) beschrieben. Diese Methode lässt es erstmals zu, dass nach anschließender Vergleichender Genomischer Hybridisierung (Comparative Genomic Hybridization, CGH) numerische Veränderungen einer Einzelzelle erkannt werden können (genauer siehe Kapitel 1.3.5. Seite 13).

Bei einem Vergleich der Einzelzell CGH mit Interphase-FISH für Präimplantationsdiagnostik bei embryonalen Blastomeren zeigten H. Malmgren et al (2002), dass die CGH Analysen nach C. Klein et al vergleichbare Ergebnisse lieferten. Allerdings kam es in 4 der 15 untersuchten Embryonen auch zu unterschiedlichen Ergebnissen beider Methoden. H. Malmgren et al kamen zu dem Schluss, dass die Einzelzell CGH für Patienten mit numerischen Anomalien eine gute Alternative zur Interphase-FISH für Präimplantationsdiagnostik darstellt. Allerdings können Veränderungen, die kleiner als 10 bis 20 Mb sind, übersehen werden.

Ausgehend von einer Amplifikation durch DOP-PCR (degenerate oligonucleotide-primed PCR, Telenius et al. 1992) mit anschließender CGH beschrieben L. Voullaire et al (1999) ebenfalls eine Möglichkeit, DNA einer einzelnen Zelle zu analysieren.

Wells und Delhanty et al. 1999 versuchten anhand verschiedener Amplifikationstechniken DNA einer einzelnen Zelle zu vermehren, um anschließend eine CGH durchzuführen. Dabei zeigte sich, dass eine DOP-PCR mit verlängerten Zyklen eine homogene Amplifikation

ermöglichte. Aus Einzelzellen des Fruchtwassers konnten verschiedenste Trisomien in CGH Experimenten gezeigt werden.

Anhand der publizierten CGH-Profile und aufgrund eigener Erfahrung ist der Amplifikationsansatz nach Klein et al (1999) der beste (siehe Ergebnisse und Diskussion).

1.3.5. Einzelzell CGH zur Analyse von disseminierten Tumorzellen

Das Prinzip der Einzelzell CGH nach C. Klein et al. 1999 stützt sich auf die Analyse von genomischer DNA aus mehreren Zellen durch die „klassische“ CGH (Kallioniemi et al.1992; du Manoir et al. 1993; Joos et al. 1993). Die Amplifikation der DNA einer einzelnen Zelle erfolgt mittels Ligation von spezifischen Primern an die DNA.

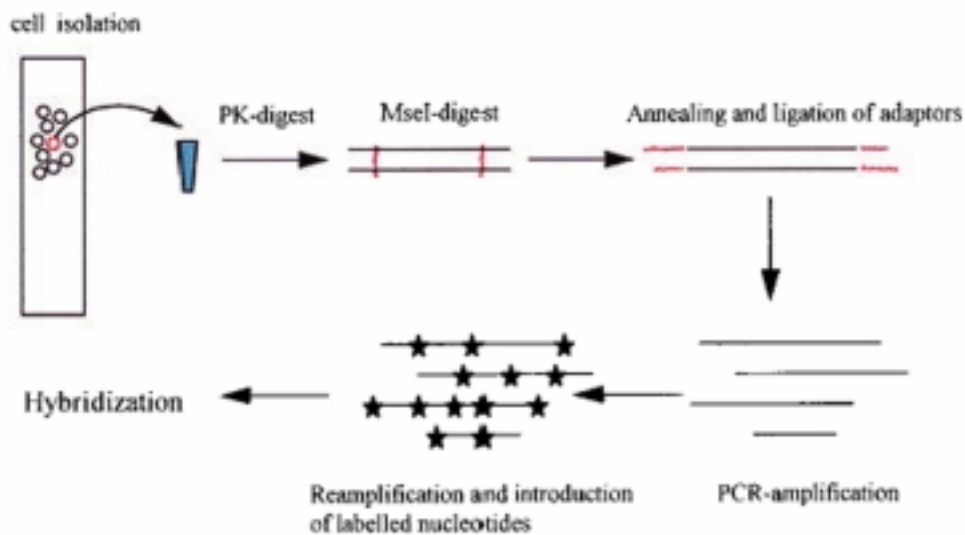


Abb.1.2. Schematische Darstellung der Einzelzell CGH
 aus: C. Klein et al. PNAS, Vol. 96, S. 4494-4499, April 1999 (Fig. 1)

Wie in Abbildung Abb.1.2. schematisch dargestellt, wird die Zelle nach dem Proteinase K Verdau mit dem Restriktionsenzym MseI geschnitten, um die optimale Länge für die später folgende Hybridisierung der DNA zu erhalten. Das Restriktionsenzym MseI schneidet die Sequenz TTAA nach dem ersten Thymin mit einem überhängenden Ende. Anschließend erfolgt die Ligation der spezifischen Primer. An das 3'-Ende wird der Primer LIB1 ligiert, an das 5'-Ende der Primer ddMSE11. Mit der Primär-PCR wird das Genom einer einzelnen Zelle vermehrt und die Kontrolle auf einem Agarose Gel zeigt einen DNA Schmier zwischen 100 und 800 bp.

Die zweite PCR dient der Markierung der DNA mit Fluorochromen, um anschließend ein CGH Experiment durchzuführen.

Zur Vergleichenden Genomischen Hybridisierung (CGH)

Die Analyse der mit dem Protokoll der Einzelzell CGH markierten DNA erfolgt genau wie bei der „klassischen“ CGH.

Sie beruht auf der Kombination von Fluoreszenzmikroskopie und digitaler Bildanalyse.

Bei diesem Verfahren werden zwei Fluorochrome benötigt, z.B. das Fluorochrom Fluoresceinisothiocyanat (FITC, Anregungsmax.: 490 nm; Emissionsmax.: 520 nm) mit dem die Tumor-DNA markiert wird und Cy3.5 (Anregungsmaximum: 581 nm; Emissionsmaximum: 588 nm) für die Markierung genomischer Referenz-DNA. Die markierte Tumor- und Referenz-DNA werden auf normale Metaphasechromosomen hybridisiert.

Durch vergleichende Analyse der Fluorochromintensitäten entlang der Chromosomenachse können unbalancierte chromosomale Aberrationen identifiziert werden (siehe schematische Darstellung in Abbildung Abb.1.3.)

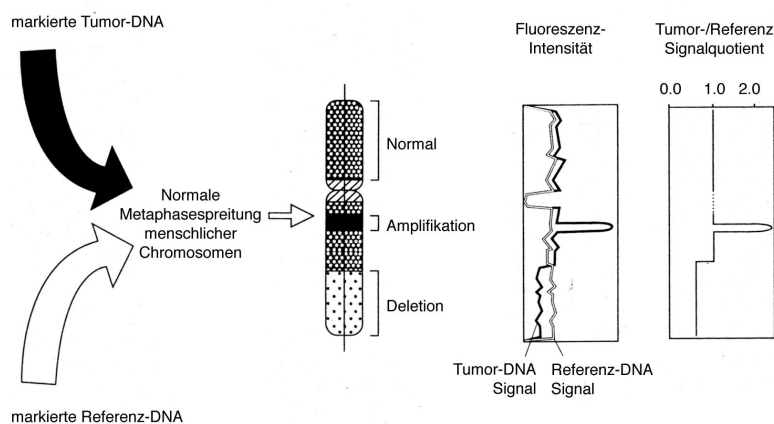


Abb.1.3. Schematische Darstellung der CGH

Unterschiedlich markierte Tumor-DNA (schwarz) und Referenz-DNA (weiß) werden in gleicher Menge auf normale Metaphasenpräparate hybridisiert. Regionen der Tumor-DNA, die einen Gewinn vorweisen, zeigen eine Erhöhung der Fluoreszenzintensität, während Regionen mit einem Verlust an DNA eine Verminderung der Fluoreszenzintensität zeigen. Der berechnete Tumor-/Referenz Signalquotient entspricht dem aus der Bildanalyse entstandenen Profil.

Vor- und Nachteile der CGH

Mit der wichtigste Vorteil der CGH ist, dass keine Tumor-Metaphasenpräparate gemacht werden müssen. Dieser oft schwierige und mühsame Schritt entfällt.

Ein Nachteil der CGH liegt darin, dass keine balancierten Veränderungen nachgewiesen werden können. Der Ploidiegrad kann mittels CGH nicht bestimmt werden. Auch das Auflösungsvermögen für niedrige Gewinne oder Verluste (10 Mb) (Kallioniemi et al. 1992; du Manoir et al. 1995) und für Amplifikationen (2Mb) (Joos et al. 1992; Piper et al. 1995) ist ein limitierender Faktor.

Man erhält relative Änderungen der Kopienzahl, die durch Definition von Schwellwerten entweder als Gewinn oder als Verlust angezeigt werden (Abbildung Abb.1.4.). Bei einem polyploiden Genom müssen die Schwellwerte verändert werden. Zum Beispiel verändert sich der Schwellwert für pseudotriploide Chromosomensätze auf 0,83/1,17, für pseudotetraploide auf 0,88/1,12 (du Manoir et al. 1995). Die Schwellwerte für diploide Chromosomensätze liegen bei 0,75/1,25. Der Ploidiegrad eines Tumors kann beispielsweise durch eine Interphase-FISH-Analyse oder auch anhand von Literaturwerten abgeschätzt werden.

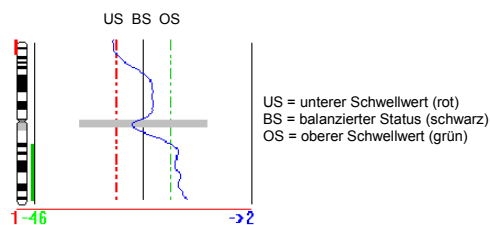


Abb.1.4. CGH-Profil von Chromosom 1 aus der Zelllinie RCC-26

Alle Werte, die links des unteren Schwellwertes (rot) liegen, deuten auf einen Verlust an Chromosomenmaterial hin; die Werte rechts des oberen Schwellwertes (grün) auf einen Gewinn.

Der Erfolg der „klassischen“ CGH spiegelt sich in der großen Anzahl der Publikationen wider (Forozan et al. 1997).

In der Krebsforschung kann man durch die CGH sogenannte ‚hot spots‘ bestimmen, die z.B. Hinweise auf tumorrelevante Genloci liefern oder für die Analyse von Progression und klonaler Evolution der Tumoren entscheidend beitragen.

1.3.6. Expansion von disseminierten Tumorzellen in Kultur

Häufigstes Problem bei der Analyse von seltenen Zellen ist ihre geringe Anzahl.

K. Pantel et al. 1995 etablierten ein Protokoll, das es ermöglicht, Zelllinien von disseminierten Tumorzellen anzulegen. Damit kann die Anzahl der zu untersuchenden Zellen erhöht werden.

Dass diese kultivierten Zellen ihren Ursprung tatsächlich aus Tumorgewebe haben, wurde durch eine weitere Untersuchung dieser Zelllinien aus verschiedenen Tumoren bestätigt (E. Putz et al. 1999). Dabei zeigte die Analyse der Oberflächenmarker, Gene der MAGE Familie und Integrine als wichtiger Faktor der Metastasierung deutlich den Tumorcharakter dieser expandierten disseminierten Tumorzellen.

S. Hosch et al. 2000 konnten ebenfalls mit der Kultivierung von Tumorzellen aus Lymphgewebe bei 126 Esophaguskarzinomen den malignen Charakter von disseminierten Tumorzellen zeigen. Die M-FISH und p53 Analysen einer Zelllinie, etabliert aus einem histologisch negativen Lymphknoten, zeigten Gemeinsamkeiten mit dem Primärtumor.

Weitere Untersuchungen weisen darauf hin, dass eine statistisch signifikante Beziehung zwischen dem proliferativen Potential kultivierter disseminierter Tumorzellen und dem Krankheitsverlauf nach Tumorresektion besteht (O. Solakoglu et al. 2002).

1.4. Wissensstand über disseminierte Tumorzellen

Verschiedene Studien ergaben Hinweise, dass CK positive Zellen proliferatives und malignes Potential haben. Für das Mammakarzinom wurde der Anteil erbB2 positiver und MHC Klasse I negativer Tumorzellen als relevante Marker zur Beurteilung des Malignitätsgrades beschrieben (Pantel et al. 1993; Pantel et al. 1991).

Mit Hilfe molekularzytogenetischer Techniken konnten Chromosomenveränderungen identifiziert werden, die typischerweise bei der entsprechenden Tumorentität auftraten oder auch im dazugehörenden Primärtumor beobachtet wurden. Dies belegt, dass CK positive Zellen tatsächlich vom Primärtumor abstammen (P. Müller et al. 1996; C. Klein et al. 1999; S. Hosch et al. 2000).

Aus Zellkulturexperimenten konnte ein zeitlich limitiertes proliferatives Potential dieser ins Knochenmark disseminierten Tumorzellen gezeigt werden. Dieser Latenzzustand - auch „dormancy“ genannt - zeichnet sich durch eine niedrige Frequenz von Tumorzellen, die Proliferationsmarker (Ki-67, p120) exprimieren, aus (K. Pantel et al. 1993a; K. Pantel et al.

1993b). K. Pantel et al (1995 und 1999) beschrieben eine Möglichkeit, disseminierte Tumorzellen zu kultivieren und somit die Anzahl der Zellen zu erhöhen.

An einem Beispiel des Ösophaguskarzinoms konnte das tumorogene und metastatische Potential CK positiver Zellen nachgewiesen werden (P. Scheunemann et al. 1999; S. Hosch et al. 2000). Aus einem histopathologisch tumorfreien Lymphknoten konnten mittels spezifischer monoklonaler Antikörper Tumorzellen identifiziert und daraus eine permanente Zelllinie etabliert werden. Diese Zelllinie führte nach subkutaner Injektion in immundefizienten SCID Mäusen sowohl zu einer lokalen Tumorbildung als auch zu einer Fernmetastasierung in Sekundärorgane.

Zusätzlich wiesen zytogenetische Analysen von kultivierten Tumorzellen und Primärtumoren auf gemeinsame Veränderungen hin.

Neben mehreren Studien, die zeigten, dass diese Zellen tumoralen Ursprungs sind, konnten Ö. Solakoglu et al (2002) die Bedeutung des Wachstumspotentials von CK positiven Zellen als unabhängigen prognostischen Marker belegen.

Patienten, bei denen weniger als 2015 CK positive Zellen pro Kulturflasche gefunden wurden, zeigten eine signifikant geringere tumorbezogene Todesrate als Patienten mit mehr als 2015 CK positiven Zellen.

1.5. Aufgabenstellung und Zielsetzung der Doktorarbeit

- **Identifizierung eines geeigneten Nachweissystems epithelialer Zellen, das mit zytogenetischen Methoden kombiniert werden kann:**

Zuerst erfolgte die Ermittlung eines geeigneten Nachweissystems für disseminierte Tumorzellen ins Knochenmark. Da epitheliale Tumorzellen Zytokeratin positiv sind, kann man sie anhand eines spezifischen monoklonalen Antikörpers A45 B/B3 im Knochenmark identifizieren. Als Nachweissysteme wurden fünf verschiedene Farbstoffe ausgetestet. Es handelt sich um zwei Fluoreszenzfarbstoffe (FluorX und Cy3) und drei Farbstoffe (NBT/BCIP, Neufuchsin und FastBlue), die im Durchlicht zu erkennen sind. Dabei spielte der Aspekt der Effektivität der Färbung und die Möglichkeit einer Hybridisierung von regionenspezifischen Sonden bei gleichzeitiger Antikörperfärbung eine Rolle.

Für diese Untersuchungen wurde auf mehrere Testsysteme zurückgegriffen. Sowohl das Beimischen von Zytokeratin positiven Zellen aus Zelllinien in das Knochenmark oder peripheres Blut, als auch bereits analysierte Knochenmarkspräparationen dienten zur Untersuchung der Effektivität der Farbstoffe.

- **Etablierung und Optimierung der Einzelzell CGH:**

Anhand der zytogenetisch gut charakterisierten Zelllinie RCC-26 wurde das Einzelzell CGH Protokoll nach C. Klein et al 1999 etabliert. Diese Zelllinie eignet sich aufgrund der Stabilität der genetischen Veränderungen während der Kultivierung. Ziel war neben der Optimierung des Protokolls auch, neue Mikrodissektionssysteme für die Analyse von einzelnen Zellen mittels CGH zu etablieren. Neben dem PALM MicroBeam System kam auch das PixCell Laser Capture Microdissection System der Firma Arcturus (Mountain View, California USA) zum Einsatz.

- **Kombination aus Nachweisverfahren für CK positive Zellen und Vielfarben-Interphase FISH:**

Zur Ermittlung der optimalen Hybridisierungsbedingungen für regionenspezifische Sonden wurde auf disseminierte Tumorzellen von Nierentumoren zurückgegriffen. Hierbei wurden sowohl Zentromersonden, als auch zentromernahe YAC-Sonden hybridisiert.

Beide SONDENSÄTZE zeichnen sich durch unterschiedliche Vorbehandlungsstrategien der Knochenmarkspräparate aus, die im Zusammenhang der Kombination mit der Antikörperfärbung CK positiver Zellen ausgetestet wurden.

- **Anwendung:**

An fünf Mammakarzinom Patientinnen wurde modellhaft die Einsatzmöglichkeit von zwei zytogenetischen Analyseverfahren von disseminierten Tumorzellen ins Knochenmark durchgeführt. Der Einsatz der Einzelzell CGH und der Hybridisierung von regionenspezifischen Sonden bei kultivierten disseminierten Tumorzellen zeigte im Vergleich mit der zytogenetischen Charakterisierung des Primärtumors der Patientinnen die Abstammung der disseminierten Zellen aus dem Primärtumorgewebe.

Nach der genomischen Analyse von Zytokeratin positiven Zellen durch die Einzelzell CGH kann ein spezifischer Zentromersondensatz zusammengestellt werden, der die Ergebnisse aus der Genomanalyse berücksichtigt. Durch die Hybridisierung des Sondensatzes kann man eine Vielzahl von Zellen mit einem Hybridisierungsansatz analysieren und somit Informationen über eine mögliche Heterogenität dieser Populationen erhalten.

Zusätzlich kann der Vergleich beider Analysetechniken mit den Daten aus der CGH der Primärtumoren Aufschlüsse über eine mögliche tumorspezifische Herkunft der Zytokeratin positiven Zellen liefern.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Chromosomenpräparation

Für die Hybridisierung der markierten Einzelzell CGH DNA und genomischer DNA aus Primärtumoren oder Zelllinien werden männliche Metaphasenpräparate benötigt, deren Herstellung im Folgenden beschrieben wird.

2.1.1. Herstellung von Metaphasenpräparaten

Reagenzien:

RPMI 1640 Medium (Gibco) mit folgenden Zusätzen:
Phytohemagglutinin 1:50 (Murex HA 15 oder Biochrom KG)
Penicillin 5000 u/ml / Streptomycin 5000µg/ml 1:100 (ICN Biochemicals)
FBS (20%)
Colcemid 10 µg/ml (Gibco)
0,075 M KCl (Merck)
Fixativ: Methanol/Eisessig, 3:1, Vol:Vol (Merck)

Blutabnahme:

- Aus 2 ml heparinisiertem Blut werden 8 Tropfen (ca. 0,3 ml) in 10 ml Medium gegeben und für 69 - 72 Std. bei 37 °C in einem Brutschrank inkubiert.

Colcemid-Behandlung:

- Es folgt die Zugabe von 100 µl Colcemid für 30 - 60 Min. bei 37 °C.
- Nach dem Colcemid werden die Zellen in ein 15-ml-Falconröhrchen überführt, bei 1000 U/Min. für 10 Min. abzentrifugiert und der Überstand abgesaugt.

Hypotonie:

- Pellet mit Glaspipette kurz resuspendieren.
- 5-6 ml 0,075M KCl – vorgewärmt bei 37 °C - zugeben und Pellet mit Glaspipette vorsichtig aufnehmen.
- Falconröhrchen für 8-15 Min. in einem 37 °C-Brutschrank inkubieren lassen und bei 800 U/Min. für 10 Min. abzentrifugieren.
- Überstand absaugen.

Fixierung:

- Ca. 1 ml Fixativ - auf 4°C gekühlt - zugeben und vorsichtig mit der Pipette resuspendieren.
- Auf 4 ml auffüllen, durchmischen und bei 1000 U/Min. 10 Min. zentrifugieren.
- Fixativ bis auf ca. 1 ml absaugen und Pellet erneut resuspendieren.
- Mit frischem Fixativ auf 3 ml auffüllen und diesen Vorgang 3-4 mal wiederholen.
- Nach dem letzten Waschschrift wird das Falconröhrchen 20-30 Min. im Kühlschrank gelagert, bevor die Suspension aufgetropft wird.

Auftropfen und Lagerung:

- Die Objektträger werden über Nacht in 100 % Ethanol gewaschen und in Aqua bidest am nächsten Tag auf Eis oder im Kühlschrank gelagert.
- Das Zell-Fixativ-Gemisch wird nun auf feuchte Objektträger aufgetropft und auf einer 37 °C- Wärmeplatte, die mit feuchten Tüchern ausgelegt ist, getrocknet.

Die Chromosomenpräparate sollten vor der Hybridisierung altern. Dafür stellt man sie in 70 % Ethanol bei 4 °C in den Kühlschrank.

2.1.2. RNase- / Pepsin-Behandlung und Denaturierung der Präparate

Bei zu hohem Anteil an Zytoplasma werden die Präparate einem Pepsinverdau unterzogen. Die RNase-Behandlung reduziert das Auftreten von unspezifisch gefärbten Hintergrund.

Reagenzien:

RNase-Behandlung:

RNase A Stock: 10 mg/ml in 10 mM Tris-HCl (pH 7,5) + 15 mM NaCl (Roche)

Pepsin-Verdau:

10% Pepsin Stock in 0,01M HCl pH 2,3: (Sigma)

Denaturierung:

Formamid (reinst): 70% Formamid, 1x SSC (Merck)

PBS

SSC

RNase-Behandlung:

- Präparate kurz in 2x SSC aufnehmen.
- z.B. für ein 200 µl Volumen 1:200 verdünnt: 1 µl RNase Stock in 199 µl 2x SSC
- 200 µl RNase auf Präparate geben und für 1 Stunde bei 37 °C in feuchter Kammer inkubieren.
- 3 x 5 Min. in 2x SSC auf Schüttler bei RT waschen.

Pepsin-Verdau:

- Z.B. für ein 50 ml Volumen 49,5 ml Aqua bidest. + 0,5 ml 1N HCl + 15 µl Pepsin
- Stocklösung bei 37 °C vorwärmen.
- Je nach Anteil von Zytoplasma Präparate für 3-5 Min. in Pepsin-Ansatz bei 37 °C inkubieren.
- 2 x 5 Min. in 1x PBS bei RT waschen.
- In aufsteigende Ethanolreihe (70%, 90%, 100%) je 3 Min. geben (auf 4 °C gekühlt).
- Präparate lufttrocknen und unter Mikroskop Resultat der Vorbehandlung kontrollieren.

Nach der Vorbehandlung können die Präparate für längere Zeit in 70% Ethanol gelagert werden.

Denaturierung:

- Z.B. für ein 50 ml Volumen 35 ml Formamid in 15 ml 2x SSC, pH 7,0 einstellen.
- Präparate in Denaturierungslösung für 1 Minute, 35 Sek. bei 72 °C denaturieren.
- Anschließend aufsteigende Ethanolreihe (70%, 90%, 100%) je 3 Min. (auf -20 °C gekühlt) und Präparate lufttrocknen.

2.2. Adapter-Linker PCR für die Einzelzell CGH

(nach C. Klein et al. PNAS 96, pp.4494-4499, April 1999)

Ziel war es, diese neue Methode anhand einer zytogenetisch ausreichend charakterisierten Zelllinie (RCC-26) auszutesten und anschließend für die Analyse disseminierter Tumorzellen heranzuziehen. Die Zelllinie RCC-26 wurde mit M-FISH (Speicher et al., 1996; Eils et al., 1998) und CGH (Kallioniemi et al.1992; du Manoir et al. 1993; Joos et al. 1993) charakterisiert, anschließend wurden die Ergebnisse aller drei Verfahren verglichen.

Im Folgenden werden 3 Protokolle in abgewandelter Form beschrieben, die während dieser Arbeit ausgetestet wurden. Jeweils zu Anfang dieser Protokolle soll eine schematische Darstellung die verschiedenen Arbeitsschritte erläutern.

2.2.1. Abgeändertes Protokoll mit neuen Primern

nach: Stöcklein et al. 2002

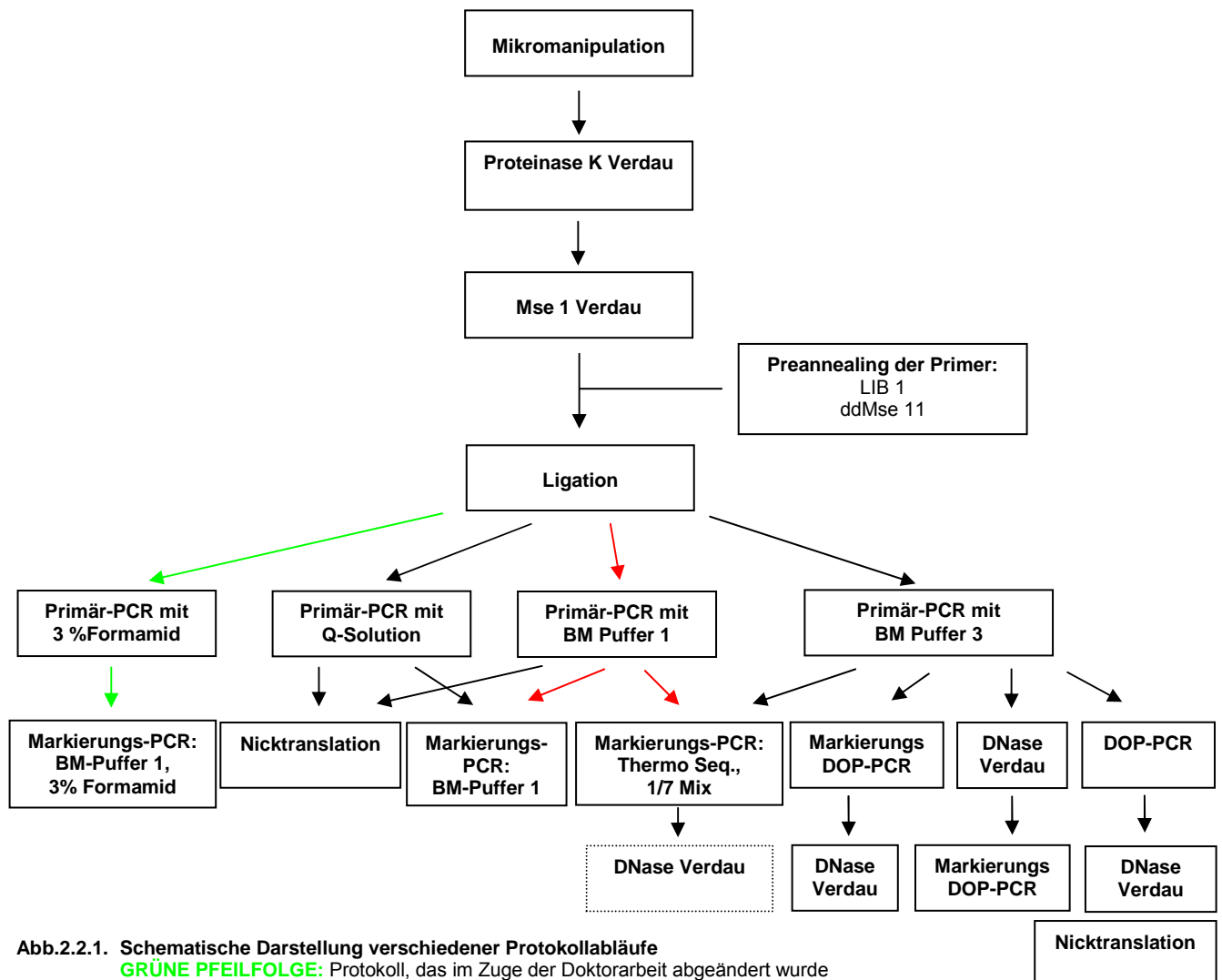


Abb.2.2.1. Schematische Darstellung verschiedener Protokollabläufe

GRÜNE PFEILFOLGE: Protokoll, das im Zuge der Doktorarbeit abgeändert wurde

ROTE PFEILFOLGE: Protokoll nach N. Stöcklein et al. 2002

2.2.1.1. Isolation von einzelnen Zellen

Die Isolation erfolgte aus einer Zellsuspension durch Mikromanipulation mit einer Nadel.

Reagenzien:

Igepal CA 630 (Sigma)

PBS

Die Suspension wurde auf einem Objektträger aufgebracht, und mittels Glaspipette eine einzelne Zelle in 1x PBS / 0,5% Igepal überführt. Unter Sichtkontrolle wurde die Zelle in einem 1 µl Volumen in ein PCR-Reaktionsgefäß überführt.

2.2.1.2. Proteinase K Verdau

Reagenzien:

10x OFA (One-Phor-All Buffer PLUS, Amersham Pharmacia Biotech)

Tween 20 (Merck)

Igepal CA 630 (Sigma)

Proteinase K, 10mg/ml (Roche)

10x Ansatz

2 µl OFA (One-Phor-All Buffer)

1,3 µl Tween 10%-ig (in H₂O)

1,3 µl Igepal 10%-ig (in H₂O)

2,6 µl Proteinase K 10 mg/ml

12,8 µl H₂O

- 2 µl des Ansatz zu PCR-Reaktionsgefäß mit Einzelzelle geben.
- Proteinase K-Verdau in einem Wasserbad bei 42 °C für 10 h oder über Nacht durchführen.
- Proteinase K-Inaktivierung in einem Wasserbad bei 80 °C für 10 Min.

2.2.1.3. MseI-Verdau

Reagenzien:

10x OFA (One-Phor-All Buffer PLUS, Amersham Pharmacia Biotech)

Restriktionsenzym MseI (50.000 u/ml, New England Biolabs)

Plazenta-DNA als Referenz-DNA; 225 ng/ μ l

<u>1x Ansatz für Einzelzelle</u>	<u>1x Ansatz für Referenz-DNA</u>
0,2 μ l OFA	0,5 μ l OFA
0,5 μ l MseI	0,5 μ l MseI
1,3 μ l H ₂ O	3 μ l H ₂ O
	1 μ l DNA

- 2 μ l zu Proteinase K-verdauten Zellen hinzu pipettieren.
- MseI-Verdau in einem Wasserbad bei 37 °C für 3 h.
- MseI-Inaktivierung in einem Wasserbad bei 65 °C für 5 Min.

2.2.1.4. Preannealing der Adapter

Reagenzien:

10x OFA (One-Phor-All Buffer PLUS, Amersham Pharmacia Biotech)

LIB 1, 100 μ M (5'-AGT GGG ATT CCT GCT GTC AGT- 3')

ddMse 11, 100 μ M (5'-TAA CTG ACA GCdd- 3')

PCR-Gerät:

OmniGene, Temperature Cycler (HYBAID)

alternativ: MJ Research PTC-225, Version 4.0 (Biozym)

<u>1x Ansatz</u>	<u>1x Ansatz</u>
0,5 μ l OFA	0,5 μ l OFA
0,5 μ l MseLig 21 100 μ M	0,5 μ l LIB1 100 μ M
0,5 μ l MseLig 12 100 μ M	0,5 μ l ddMse 11 100 μ M
1,5 μ l H ₂ O	1,5 μ l H ₂ O

Das Annealing wird in einer PCR-Maschine mit einem speziellen Annealing-Programm durchgeführt. Dabei wird die Temperatur um 1 °C / Minute von 65 °C auf 15 °C reduziert.

2.2.1.5. Ligation

Reagenzien:

ATP 10mM (Roche)

T4-DNA-Ligase, 2.000.000 u/ml (New England Biolabs)

PCR-Gerät:

OmniGene, Temperature Cycler (HYBAID)

alternativ: MJ Research PTC-225, Version 4.0 (Biozym)

- Zu den 3 µl preannealten Adaptern wird
1 µl 10 mM ATP
1 µl T4-DNA-Ligase zugegeben.
- 5 µl der Ligationslösung zu MseI verdauten Zellen geben
- bei 15 °C über Nacht in PCR-Gerät ligieren

2.2.1.6. Primäre PCR

Im Folgenden werden drei verschiedene Ansätze (A-C) für die Primäre PCR beschrieben.

Reagenzien:

Aus Expand Long Template PCR System (Roche):

10x BM-Puffer1 mit 17,5 mM MgCl₂, 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 100mM KCl,
1mM dithiothreitol, 0,1 mM EDTA, 0,5% Tween 20, 0,5% Nonidet P40,
50% Glycerol

10x BM-Puffer3 mit 22,5 mM MgCl₂ und Detergenzien

Pol-Mix, 3.5 u, Polymerase-Mix aus Taq und Pwo Polymerase

d`NTP`s 10mM (Roche)

deionisiertes Formamid (Sigma)

5x Q-Solution (Qiagen)

Agarosegel:

100 Base-Pair Ladder (1 µg/µl in TE-Puffer, pH 7,5) (New England Biolabs o. Amersham)

Loading Buffer: 1% Bromphenolblau; 1% Xylencyanol; Glycerol (40%)

Ethidium Bromid (Merck)

Agarose (Roth)

50x TAE: 0,04M Tris HCl, 0,002 M EDTA

PCR-Gerät:

OmniGene, Temperature Cycller (HYBAID)

alternativ: MJ Research PTC-225, Version 4.0 (Biozym)

Ansatz A

_____ 1x Ansatz _____

3 µl BM Puffer1

2 µl dNTP`s 10mM

1 µl Pol-Mix

34 µl H₂O

- 40 µl PCR-Mix zu Ligations-Produkt zugeben.

Ansatz B (Sarkar et al. 1990 und Zhang et al. 1991):

Jeweils ein 1x Ansatz in µl:

Reagenzien	1,25% Formamid Ansatz	2.5% Formamid Ansatz	3% Formamid Ansatz	1x Q-Solution Ansatz
BM Puffer1	3	3	3	3
dNTP's 10mM	2	2	2	2
x % Formamid	0,63	1,25	1,5	-
1x Q-Solution	-	-	-	10
Pol-Mix	1	1	1	1
H ₂ O	33,37	32,75	32,5	24

- 40 µl PCR-Mix zu Ligations-Produkt zugeben
- PCR-Programm für Ansatz A und B:
Die Reaktionsgefäße werden erst nach dem Erreichen der 68 °C in das Gerät gestellt (hot start).

1x		14x		8x		22x		1x			
68°C	3'	94°C	40"	94°C	40"	94°C	40"	68°C	3'40"	4°C	∞
		57°C	30"	57°C + 1°C / Zyklus	30"	65°C	30"				
		68°C + 1" / Zyklus	1'30"	68°C + 1" / Zyklus	1'45"	68°C + 1" / Zyklus	1'53"				

- Je 1/10 Volumen der PCR-Produkte wird auf einem 1%-igen Agarosegel getestet.
 - **Gel-Ansatz:** 0.5g Agarose + 50 ml 1x TAE + 1 µl EthBr
 - **Gel-Auftragsvolumen:** 2 µl Loading Buffer + 5µl aus PCR-Produkt
 - **Marker:** 8 µl 100 Base-Pair Ladder–Stock
+ 8 µl Loading Buffer
+ 64 µl 1x TAE
-> 3 µl des Markeransatzes einsetzen

Ansatz C: (übernommen aus Thomas et al. 1999)

1x Ansatz

- 3 µl BM Puffer3
- 2 µl dNTP's 10mM
- 1 µl Pol-Mix
- 34 µl H₂O

- 40 µl PCR-Mix zu Ligations-Produkt zugeben
- PCR-Programm für Ansatz C:
Die Reaktionsgefäße werden erst nach dem Erreichen der 68 °C in das Gerät gestellt (hot start), nach dem 3', 68°C Schritt wurde zu jedem Reaktionsansatz 1 µl des Pol-Mixes zugegeben, abzentrifugiert und die PCR fortgeführt.

1x		14x		30x		1x			
		94°C	40"	94°C	40"				
68°C	3'	57°C	30"	57°C	30"	68°C	7'	4°C	∞
		68°C	12'	68°C + 20" / Zyklus					

- Je 1/10 Volumen der PCR-Produkte wird auf einem 1%-igen Agarosegel getestet (siehe Ansatz A und B, PCR-Programm).

2.2.1.7. Methoden zur Markierung der DNA

Aufgrund der verschiedenen Ansätze für die Primäre PCR wurden auch verschiedene Ansätze für die Markierung der DNA ausgetestet (Ansätze A-D), die teilweise untereinander kombiniert wurden. Eine Übersicht zu den einzelnen Versuchsansätzen erhält man in Abbildung Abb.2.2.1.

Ansatz A:

Reagenzien:

10x ThermoSeq buffer (Amersham)

10x BM-Puffer1 mit 17,5 mM MgCl₂, 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 100mM KCl,
1mM dithiothreitol, 0,1 mM EDTA, 0,5% Tween 20, 0,5% Nonidet P40,
50% Glycerol

1/7 Nukleotid-Mix (Roche) Ansatz:

100mM dTTP	4,3 µl
100mM dATP	5 µl
100mM dCTP	5 µl
100mM dGTP	5 µl
H ₂ O	30,7 µl

LIB 1, 100µM (5'-AGT GGG ATT CCT GCT GTC AGT- 3')

Biotin-16-dUTP, 50 nmol (Roche)

Digoxigenin-11-dUTP, 125 nmol (Roche)

Taq-Polymerase 5U/µl (GIBCO BRL)

Thermo Sequenase, 13 u (Amersham)

PCR-Gerät:

OmniGene, Temperature Cyclers (HYBAID)

alternativ: MJ Research PTC-225, Version 4.0 (Biozym)

- Es wurden zwei Ansätze für Test- und Referenz-DNA verwendet:

Ansatz 1	
1x Ansatz (30 µl)	in µl
ThermoSeq buffer	3
100 µM LIB1	3
1/7 Nukleotid-Mix	1,05
bio / dig	1,5
Thermo Sequenase	2
H ₂ O	18,95

Ansatz 2	
1x Ansatz (30µl)	in µl
ThermoSeq buffer	3
100 µM LIB1	0,5
1/7 Nukleotid-Mix	1
bio / dig	1,3
Thermo Sequenase	0,4
H ₂ O	23,3

- Für die Referenz-DNA wurde ein weiteres Protokoll verwendet:

Ausschließlich Referenz-DNA

1x Ansatz (30µl)	in µl
BM Puffer 1	3
100 µM LIB 1	0,5
1/7 Nukleotid-Mix	1
dig-dUTP	1,3
Taq Polymerase	0,4
H ₂ O	23,3

- 0,5 µl aus Primär-PCR Produkt zu Ansatz zugeben
- PCR-Programm:

1x		14x		9x		1x		
94°C	2'	94°C	40"	94°C	40"	94°C	40"	
65°C	30"	65°C	30"	65°C	30"	65°C	30"	15°C ∞
72°C	2'	72°C	1'30"	72°C	2'	72°C	5'	

- Je 1/10 Volumen der PCR-Produkte wird auf einem 1%-igem Agarosegel getestet (siehe Kapitel 2.2.1.6. Seite 28).

Ansatz B:

Reagenzien:

10x BM-Puffer1 mit 17,5 mM MgCl₂, 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 100mM KCl,
1mM dithiothreitol, 0,1 mM EDTA, 0,5% Tween 20, 0,5% Nonidet P40,
50% Glycerol

7/8 Nukleotid-Mix (Roche) Ansatz:

100mM dTTP	4,375 µl
100mM dATP	5 µl
100mM dCTP	5 µl
100mM dGTP	5 µl
H ₂ O	30,625 µl

LIB 1, 100µM (5'-AGT GGG ATT CCT GCT GTC AGT- 3')

Biotin-16-dUTP, 50 nmol (Roche)

Digoxigenin-11-dUTP, 125 nmol (Roche)

Taq-Polymerase 5U/µl (GIBCO BRL)

deionisiertes Formamid (Sigma)

1x Q-Solution (

PCR-Gerät:

OmniGene, Temperature Cyclers (HYBAID)

alternativ: MJ Research PTC-225, Version 4.0 (Biozym)

• Basis-Ansatz:

Die Markierung der Test-DNA wurde sowohl mit Biotin als auch mit Digoxigenin durchgeführt (jeweils alternierend wurde die Referenz-DNA markiert). Dies gilt auch für die nachfolgenden abgewandelten Protokolle.

Test-DNA	
1x Ansatz (40 µl)	in µl
BM Puffer1	4
100µM LIB 1	6
7/8 Mix	1,4
Bio / Dig	1,75
Taq-Polymerase	0,5
H ₂ O	25,85

Referenz-DNA	
1x Ansatz (40 µl)	in µl
BM Puffer1	4
100µM LIB 1	6
7/8 Mix	1,4
Dig / Bio	1,75
Taq-Polymerase	0,5
H ₂ O	25,85

- 0,5 µl oder 1 µl aus Primär-PCR Produkt zu Ansatz zugeben

• Abgewandelte Ansätze

Reagenzien	1,25% Formamid Ansatz (40 µl)	2.5% Formamid Ansatz (40 µl)	3% Formamid Ansatz (40 µl)	1x Q-Solution Ansatz (40 µl)
BM Puffer1	6	6	6	6
100µM LIB 1	4	4	4	4
7/8 Mix	1,4	1,4	1,4	1,4
Bio / Dig	1,75	1,75	1,75	1,75
x % Formamid	0,5	1	1,2	-
1x Q-Solution	-	-	-	8
Taq-Polymerase	0,5	0,5	0,5	0,5
H ₂ O	25,35	24,85	24,65	17,85

- 0,5 µl oder 1 µl aus Primär-PCR Produkt zu Ansatz zugeben.
- Für die Referenz-DNA wurden die gleichen Veränderungen durchgeführt.

• PCR-Programme:

Über den Zeitraum dieser Anwendungen wurde ein weiteres PCR-Markierungsprogramm etabliert.

Programm A:

1x		14x		9x		1x			
94°C	2'	94°C	40"	94°C	40"	94°C	40"		
65°C	30"	65°C	30"	65°C	30"	65°C	30"	15°C	∞
72°C	2'	72°C	1'30"	72°C	2'	72°C	5'		

Programm B:

1x		10x			
94°C	1'	94°C	30"		
60°C	30"	60°C	30"	15°C	∞
72°C	2'	72°C	2'		
			+20" / Zyklus		

- Je 1/10 Volumen der PCR-Produkte wird auf einem 1%-igem Agarosegel getestet (siehe Kapitel 2.2.1.6. Seite 28)

Ansatz C:

Außerdem wurden weitere PCR-Ansätze und alternative Markierungs-Protokolle ausgetestet. Diese werden im Folgenden beschrieben.

DOP-PCR (degenerate oligonucleotide-primed PCR; Telenius et al. 1992)

Eine weitere Amplifikation des Primär-PCR Produkts wird mittels DOP-PCR (degenerate oligonucleotide-primed PCR; Telenius et al. 1992) durchgeführt. Diese PCR amplifiziert homogen die eingesetzte DNA durch Einsatz eines degenerierten Primers, der ein Binden an den DNA-Strang ungefähr alle 4 kb zulässt. Diese PCR kann in abgewandelter Form auch als Markierungs-PCR (label-DOP) dienen und wird ebenfalls beschrieben:

Reagenzien:

DOP-PCR:

10x PCR-Puffer: 200 mM Tris-HCl (pH 8,4) + 500 mM KCl (GIBCO BRL)

50 mM MgCl₂ (GIBCO BRL)

5 mM dNTP's: aus je 100 mM dATP, dGTP, dTTP und dCTP (Roche)

5 mM AGC: aus je 100 mM dATP, dGTP und dCTP (Roche)

5 mM dTTP: aus 100 mM dTTP (Roche)

Primer: 100 µM 6MW (5' – CCG ACT CGA GNN NNN NAT GTG G – 3')

Biotin-16-dUTP, 50 nmol (Roche)

Digoxigenin-11-dUTP, 125 nmol (Roche)

Taq-Polymerase 5U/µl: (GIBCO BRL)

DNase Verdau:

10x Nick-Translationspuffer: 0.5 M Tris-HCl (pH 8,0), 50 mM MgCl₂, 0,5 mg/ml BSA

DNase I-Stock, 3 mg/ml (Roche)

PCR-Gerät:

OmniGene, Temperature Cyclers (HYBAID)

Ansatz für DOP-PCR:

Stocklösung	Ansatz in μl
10x PCR Puffer	2.5
50 mM MgCl_2	1
5 mM dNTP's	1
100 μM 6MW	0.5
Aqua bidest	18.8
Taq-Polymerase	0.2
DNA-Pool	1

Die Ansätze werden mit ausreichend Mineralöl überschichtet und nach folgendem PCR-Programm in dem oben erwähnten Gerät amplifiziert:

1x		5x		35x		1x	
		95°C	1'	95°C	1'		
95°C	5'	30°C	1'30"			72°C	5'
		0,2°C pro sec. bis auf 72°C ansteigend		62°C	1'30"		
		72°C	4'	72°C	3'		
				+1" / Zyklus			
						4°C	∞

Ansatz für label-DOP:

Stocklösung	Ansatz in μl
10x PCR Puffer	2.5
50 mM MgCl_2	1
5 mM AGC	1
5 mM dTTP	0.75
1 mM Bio o. Dig	1.25
100 μM 6MW	0.5
Aqua bidest	16.8
Taq-Polymerase	0.2
DNA-Pool	1

PCR-Programm:

	1x		30x		1x			
			94°C	1'				
94°C	3'		56°C	1'	72°C	20'	4C	∞
			72°C	4'				

Ansatz für DNase Verdau:

- Dieser Verdau ermöglicht es, die für die CGH ideale DNA Länge von 500 – 1200 bp zu erreichen.

- Zu jedem PCR-Produkt wird zugegeben:

5 µl 10x Nicktranslationspuffer
 8-15 µl 1:10000 verd. DNase I
 ad 50 µl Aqua bidest

- Die Ansätze werden für ca. 1-2 Stunden in ein 15 °C Wasserbad gegeben.
- Danach wird mit 1/10 Volumen aus den Ansätzen durch ein 1%-iges Agarosegel (siehe Kapitel 2.2.1.6. Seite 28) die Länge der Fragmente getestet. Während des Gellaufs stehen die Ansätze auf Eis. Ist die optimale Länge (zwischen 500 und 1200 bp) erreicht, wird der Ansatz bei -20°C eingefroren.

Markieren der DNA durch Nicktranslation

Durch die Zugabe von 1:10000 verd. DNase wird die DNA auf die für CGH ideale Länge von 500 – 1200 bp verdaut und gleichzeitig mit Biotin / Digoxigenin markiert.

Reagenzien:

10x Nick-Translationspuffer: 0.5 M Tris-HCl (pH 8,0), 50 mM MgCl₂, 0,5 mg/ml BSA
 0.1M Mercaptoethanol
 0,5 mM AGC: aus je 100 mM dATP, dGTP und dCTP (Roche)
 Biotin-16-dUTP, 50 nmol (Roche)
 Digoxigenin-11-dUTP, 125 nmol (Roche)
 DNA-Polymerase I, 5 U/µl (Roche)
 DNase I, 3mg/ml (Roche)

Ansatz:

Stocklösung	Ansatz in μl
10x NT Puffer	5
0.1 M Mercapto-EtOH	5
0.5 mM AGC	5
1 mM Bio	1
Polymerase I	1
1:10.000 DNase	5
DNA aus Primär-PCR	20
Aqua bidest	8

Für die Referenz-DNA wurde der gleiche Ansatz verwendet allerdings erfolgte die Markierung mit Digoxigenin.

- Je 1/10 Volumen des Nicktranslations-Produktes wird auf einem 1%-igem Agarosegel getestet (siehe Kapitel 2.2.1.6 Seite 28)

2.2.1.8. Abtrennen der Primer

Reagenzien:

Puffer R (MBI Fermentas)

Tru 1 (MBI Fermentas)

PCR-Gerät:

OmniGene, Temperature Cycler (HYBAID)

alternativ: MJ Research PTC-225, Version 4.0 (Biozym)

- Zu markiertem PCR-Produkt 1 μl PufferR und 1 μl Tru I zugeben
- bei 65°C 2-3 h inkubieren

Ab einem bestimmten Zeitpunkt wurde auf das Abtrennen der Primer verzichtet.

2.2.1.9. Fällung und Ansetzen des Hybridisierungsmix

Reagenzien:

Cot-1 DNA (GIBCO BRL)
 Salmon testis-DNA (Sigma)
 3M NaOAc, pH 5,2
 100% Ethanol

Ethanol-Fällung:

Es verändert sich das eingesetzte Volumen in die Fällung von Test- bzw. Referenz-DNA je nach gewähltem Markierungs-Protokoll aus Kapitel 2.2.1.7. (Seite 31):

Ansatz A:

DNA-Pool	Volumen in μl	Cot-1 DNA in μl	Salmon testis-DNA in μl	Σ	3M NaOAc (1/10 Vol.) in μl	100% EtOH (x 2,5 Vol.) in μl
Referenz-DNA	25	50	2	102	10,2	280
Test-DNA	25					

Ansatz B:

DNA-Pool	Volumen in μl	Cot-1 DNA in μl	Salmon testis-DNA in μl	Σ	3M NaOAc (1/10 Vol.) in μl	100% EtOH (x 2,5 Vol.) in μl
Referenz-DNA	40	50	2	132	13,2	363
Test-DNA	40					

Ansatz C:

DNA-Pool	Volumen in μl	Cot-1 DNA in μl	Salmon testis-DNA in μl	Σ	3M NaOAc (1/10 Vol.) in μl	100% EtOH (x 2,5 Vol.) in μl
Referenz-DNA	50	50	2	127	12,7	350
Test-DNA	25					

- Der Fällungsmix wird bei -20 °C über Nacht aufbewahrt.
- Nach der Fällung wird der Mix bei 4 °C für 30 Min. bei 13000 U/Min. abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pelett mit 70 % Ethanol für 10 Min. bei 13000 U/Min. Min.destens zweimal gewaschen und das Pellet luftgetrocknet.

Hybridisierungsmix und Hybridisierung:

Reagenzien:

deionisiertes Formamid (Sigma)

Mastermix: 30% Dextransulfat in 4x SSC (Sigma)

Fixogum Rubber Cement (Marabu)

- Nach dem Trocknen wird das Pellet in 3µl deionisiertem Formamid bei 37 °C schüttelnd für ca. 2 Stunden gelöst.
In dieser Form sind die markierten DNA-Fragmente lange haltbar, so dass man diesen Mix einfrieren und nach Bedarf die benötigte Menge für eine Hybridisierung herauspipettieren kann.
- Zu dem Formamid-Ansatz gibt man das gleiche Volumen 30% Dextran Sulfat (3 µl), denaturiert den Mix bei 75 °C für 7 Min. und lässt ihn für 30 Min. bei 37 °C vorhybridisieren.
- Der Hybridisierungsmix (6 µl) wird dann auf ein Chromosomenpräparat (Vorbehandlung siehe Kapitel. 2.1.9. Seite 39) aufgetragen, mit einem passenden Deckglas 15x15 mm versehen und mit Fixogum luftdicht verschlossen.
- Hybridisiert wird über ein Wochenende oder drei Nächte in einer Hybridisierungsbox in einem 37 °C Wasserbad.

2.2.1.10. Nachweis

Bei diesem Schritt werden Biotin und Digoxigenin mit den Fluorochromen FITC und Rhodamin nachgewiesen.

Reagenzien:

3% BSA (PAA Laboratories GmbH) in 4x SSC/0,2% Tween-20 (Merck)

Antifade: p-PhenylendiaMin.dihydrochlorid (100 mg in 10 ml PBS)

DAPI-Stocklösung: 4',6-Diamidino-2-phenylindole, 0,2 mg/ml Aqua bidest

Nachweis für Markierung der Test-DNA mit Biotin:

Avidin-FITC: Vector 1 mg/ml

Biotinyliertes Goat-Anti-Avidin: Vector 0,5 mg/ml

Anti-Digoxigenin-Rhodamin: Boehringer Mannheim

Nachweis für Markierung der Test-DNA mit Digoxigenin:

Sheep anti-digoxigenin FITC (Roche)

Avidin-Cy3.5 (Rockland)

- Abziehen von Fixogum, Objektträger gut in 4x SSC/0,2% Tween-20 schwenken.
- 3x 5 Min. bei 42 °C in 4x SSC/0,2% Tween-20 waschen.
- 3x 5 Min. bei 60 °C in 1x SSC waschen.
- Kurz in 4x SSC/0,2% Tween-20 geben.
- 1 ml 3% BSA auf Objektträger geben, 30 Min. bei 37 °C in feuchter Kammer blocken.

Nachweis für Markierung der Test-DNA mit Digoxigenin:

- Kurz in 4x SSC/0,2% Tween-20 geben.
- 150 µl sheep anti-dig FITC (1:200 verd. in 4x SSC/Tween-20 und 1% BSA) und avidin Cy3.5 (1:300 verd. in 4x SSC/Tween-20 und 1% BSA) für 45 Min. bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubieren.
- 3x 5 Min. bei 42 °C in 4x SSC/0,2% Tween-20 waschen.
- 1 ml DAPI (1:10000 verd.) 3 Min. bei RT inkubieren.
- Mit Leitungswasser abspülen und lufttrocknen.
- Mit ausreichend Antifade eindeckeln.

Nachweis für Markierung der Test-DNA mit Biotin:

- Kurz in 4x SSC/0,2% Tween-20 geben.
- 150 µl Avidin-FITC (1:200 verd. in 4x SSC/Tween-20 und 1% BSA) für 45 Min. bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubieren.
- 3x 5 Min. bei 42 °C in 4x SSC/0,2% Tween-20 waschen.
- 150 µl biotinyliertes Goat-Anti-Avidin (1:200 verd. in 4x SSC/Tween-20 und 1% BSA) für 45 Min. bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubieren.
- 3x 5 Min. bei 42 °C in 4x SSC/0,2% Tween-20 waschen.
- 150 µl Avidin-FITC (1:200 verd. in 4x SSC/Tween-20 und 1% BSA) und Anti-Digoxigenin-Rhodamin (1:400 verd. in 4x SSC/Tween-20 und 1% BSA) für 45 Min. bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubieren.
- 3x 5 Min. bei 42 °C in 4x SSC/0,2% Tween-20 waschen.
- 3x 5 Min. bei 42 °C in 4x SSC/0,2% Tween-20 waschen.
- 1 ml DAPI (1:10000 verd.) 3 Min. bei RT inkubieren.
- Mit Leitungswasser abspülen und lufttrocknen.
- Mit ausreichend Antifade eindeckeln.

2.2.2. Protokoll aus C. Klein et al. PNAS 96, pp.4494-4499, April 1999

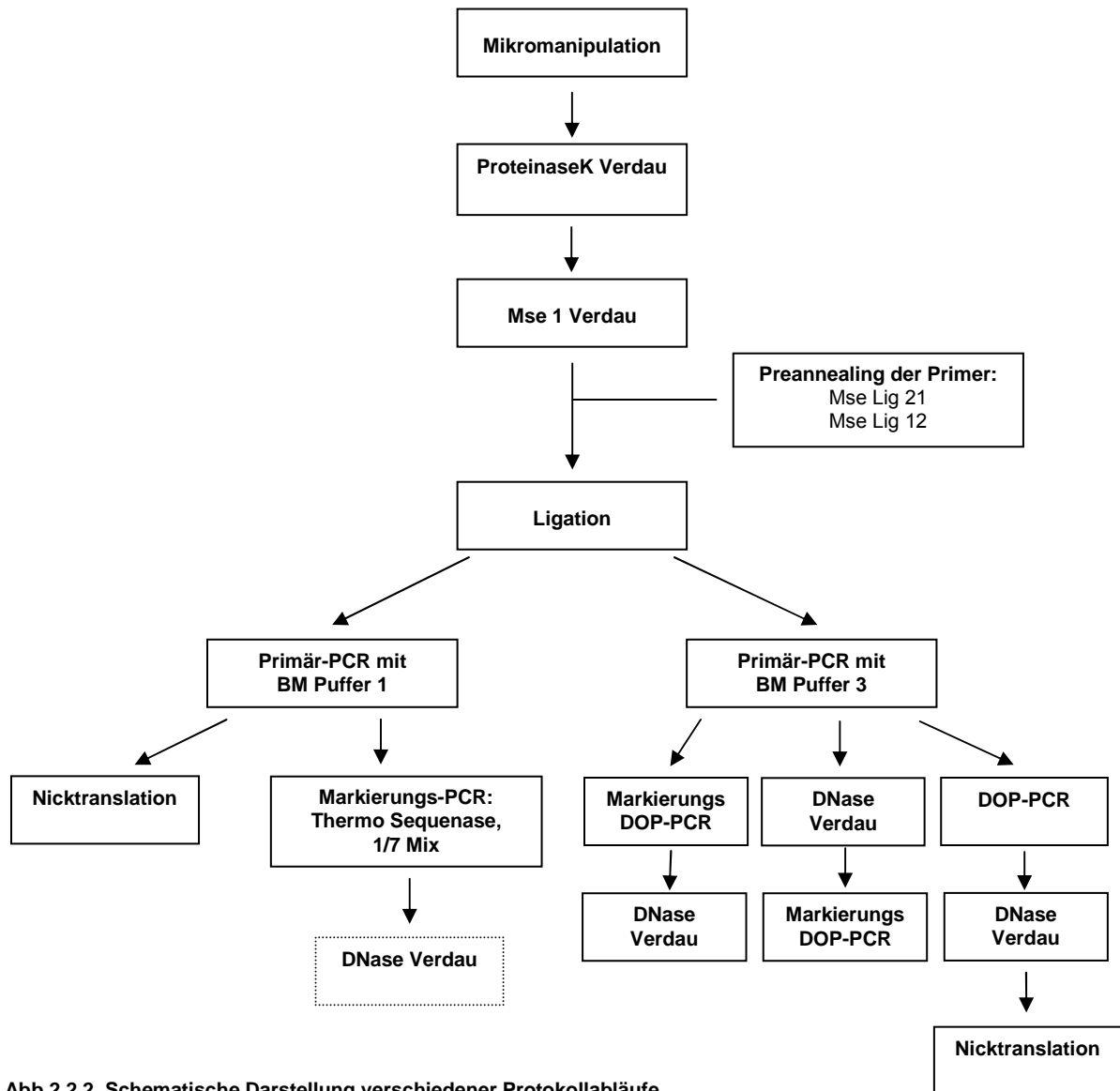


Abb.2.2.2. Schematische Darstellung verschiedener Protokollabläufe

Von der Isolation bis zum Mse1-Verdau entspricht dieses Protokoll dem vorangegangenen.

2.2.2.1. Isolation von einzelnen Zellen (siehe Kapitel 2.2.1.1. Seite 25)

2.2.2.2. Proteinase K Verdau (siehe Kapitel 2.2.1.2. Seite 25)

2.2.2.3. MseI-Verdau (siehe Kapitel 2.2.1.3. Seite 26)

2.2.2.4. Preannealing der Adapter

Reagenzien:

10x OFA (One-Phor-All Buffer PLUS, Amersham Pharmacia Biotech)

MseLig 21, 100 µM (5`-AGT GGG ATT CCG CAT GCT AGT- 3`)

MseLig 12, 100µM (5`-TAA CTA GCA TGC -3`)

PCR-Gerät:

OmniGene, Temperature Cycler (HYBAID)

alternativ: MJ Research PTC-225, Version 4.0 (Biozym)

1x Ansatz

0,5 µl OFA

0,5 µl MseLig 21 100 µM

0,5 µl MseLig 12 100 µM

1,5 µl H₂O

Das Annealing wird in einer PCR-Maschine mit einem speziellen Annealing-Programm durchgeführt. Dabei wird die Temperatur um 1 °C / Minute von 65 °C auf 15 °C reduziert.

2.2.2.5. Ligation

Dieser Abschnitt des Protokolls entspricht dem Kapitel 2.2.1.5 (Seite 27).

2.2.2.6. Primäre PCR

Dieser Abschnitt des Protokolls entspricht dem Kapitel 2.2.1.6. (Seite 28) in den Ansätzen A und C. Ansatz C wurde komplett übernommen, bei Ansatz A ändert sich das PCR-Programm:

- PCR-Programm Ansatz A:

1x		14x		9x		1x			
94°C	2'	94°C	40"	94°C	40"	94°C	40"		
65°C	30"	65°C	30"	65°C	30"	65°C	30"	15°C	∞
72°C	2'	72°C	1'30"	72°C	2'	72°C	5'		

2.2.2.7. Methoden zur Markierung der DNA

Dieser Abschnitt des Protokolls entspricht dem Kapitel 2.2.1.7 (Seite 31).

Es wurden nur 2 Ansätze in abgewandelter Form übernommen:

Reagenzien:

10x ThermoSeq buffer (Amersham)

10x BM-Puffer1 mit 17,5 mM MgCl₂, 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 100mM KCl,
1mM dithiothreitol, 0,1 mM EDTA, 0,5% Tween 20, 0,5% Nonidet P40,
50% Glycerol

1/7 Nukleotid-Mix (Roche) Ansatz:

100mM dTTP	4,3 µl
100mM dATP	5 µl
100mM dCTP	5 µl
100mM dGTP	5 µl
H ₂ O	30,7 µl

LIB 1, 100µM (5'-AGT GGG ATT CCT GCT GTC AGT- 3')

MseLig 21, 100 µM (5'-AGT GGG ATT CCG CAT GCT AGT- 3')

Biotin-16-dUTP, 50 nmol (Roche)

Digoxigenin-11-dUTP, 125 nmol (Roche)

Taq-Polymerase 5U/µl (GIBCO BRL)

Thermo Sequenase, 13 u (Amersham)

PCR-Gerät:

OmniGene, Temperature Cycler (HYBAID)

alternativ: MJ Research PTC-225, Version 4.0 (Biozym)

Ansatz A mit PCR Programm A

Test- & Referenz-DNA	
1x Ansatz (30 µl)	in µl
ThermoSeq buffer	3
100 µM Mse Lig 21	0,5
1/7 Nukleotid-Mix	1
bio-dUTP	1,3
Thermo Sequenase	0,4
H ₂ O	23,3

2. Ansatz für Referenz-DNA	
1x Ansatz (30µl)	in µl
BM Puffer 1	3
100 µM LIB 1	0,5
1/7 Nukleotid-Mix	1
dig-dUTP	1,3
Taq Polymerase	0,4
H ₂ O	23,3

- Es werden 0,5 µl DNA aus der Primär-PCR zugegeben.

Ansatz C entspricht dem Protokoll aus Kapitel 2.2.1.7 (Seite 31).

2.2.2.8. Abtrennen der Primer

Dieser Abschnitt des Protokolls entspricht dem Kapitel 2.2.1.8 (Seite 38).

2.2.2.9. Fällung und Ansetzen des Hybridisierungsmix

Dieser Abschnitt des Protokolls entspricht dem Kapitel 2.2.1.9 (Seite 39).

Anwendung fanden die Fällungs-Ansätze A und C.

2.2.2.10. Nachweis

Dieser Abschnitt des Protokolls entspricht dem Kapitel 2.2.1.10. (Seite 40).

Für diese Anwendungen wurde die Test-DNA ausschließlich mit Biotin markiert, daher wird nur auf dieses Nachweissystem aus Kapitel 2.2.1.10. (Seite 40) verwiesen.

2.2.3. Protokoll zur Analyse von disseminierten Tumorzellen

Dieses Protokoll wurde speziell für das Katapultieren der disseminierten Tumorzellen ausgetestet und wird daher nochmals ausführlich beschrieben. Der Unterschied besteht darin, dass Knochenmarks Präparate von Tumorpatienten mittels Zytospin auf Objektträger aufgebracht werden. Um einzelne Zellen aus dem Knochenmark zu isolieren, wurde auf das PALM MicroBeam System der Firma P.A.L.M. Microlaser Technologies AG (Bernried) (Schütze und Lahr et al. 1998) zurückgegriffen. Hierfür ist es notwendig, dass die Zellen auf einer Folie aufgebracht werden. Als Testsystem wurde erneut auf die Zelllinie RCC-26 zurückgegriffen.

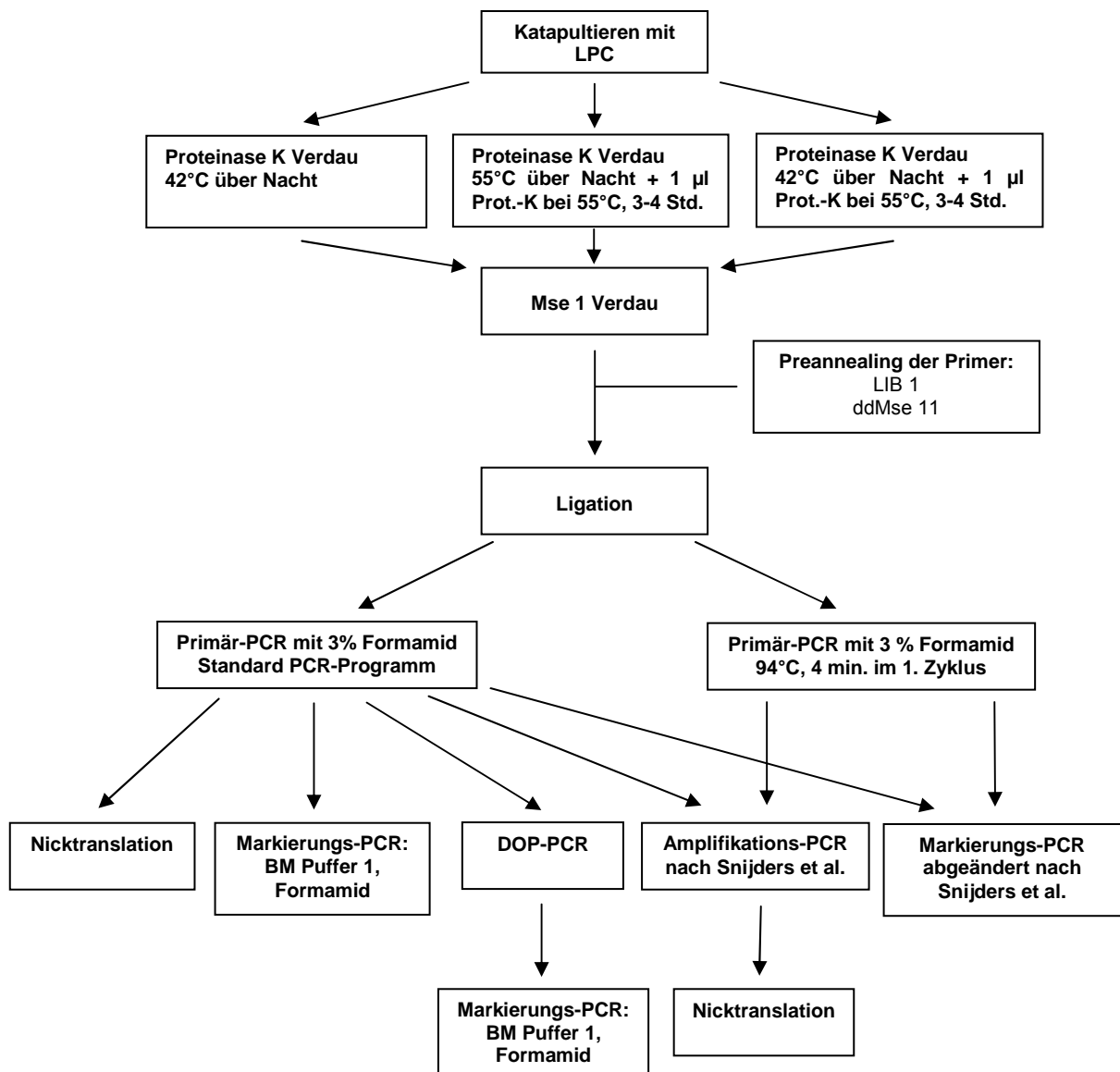


Abb.2.2.3. Schematische Darstellung verschiedener Protokollabläufe

2.2.3.1. Vorbereiten der Objektträger

Materialien:

Glasobjektträger (Menzel Glaser)
1,35 µm PEN-Folie (Polyethlen-Naphtalat)
0,9 µm POL-Folie (Polyester)
Nagellack (F. Cosmetics, Spain)
70% Ethanol (EtOH)

- Objektträger mit 70% EtOH und unter UV-Strahlung (260 nm) reinigen.
- Folie in benötigte Größe schneiden und auf EtOH-benetzten Objektträger aufziehen.
- Objektträger mit Folie erneut für 10 Min. unter UV-Strahlung (260 nm) reinigen.
- Nach dem Trocknen und Reinigen die Ränder der Folie mit Nagellack versiegeln und trocknen lassen.
- Die folienbeschichteten Objektträger sind nun einsatzfähig.

2.2.3.2. Isolation von einzelnen Zellen mit dem PALM MicroBeam System

Reagenzien:

Igepal CA 630 (Sigma)
PBS (siehe Anhang)
PALM MicroBeam System (P.A.L.M. Microlaser Technologies AG, Bernried)

Bei den benötigten PCR-Reaktionsgefäßen wird der Deckel vom Gefäß getrennt. Beide werden separat für 30 Min. unter UV-Bestrahlung (260nm) von DNA gereinigt.

Die einzelne Zelle wird in die Innenseite des Deckels, der mit 3 µl 1x PBS / 0,5% Igepal gefüllt ist, katapultiert. Nach dem Entfernen des Reaktionsgefäßes aus der Halterung des PALM MicroBeam Systems (Schütze und Lahr et al. 1998) wird der Deckel vorsichtig auf das Reaktionsgefäß gegeben und kopfüber auf Eis aufbewahrt. Nachdem ausreichend Zellen katapultiert wurden, zentrifugiert man die Reaktionsgefäße für 10 Min. bei 13000 U/Min., so dass die Zelle im Puffer auf den Boden gelangt. Anschließend wird mit dem Proteinase K Verdau begonnen.

2.2.3.3. Proteinase K Verdau

Reagenzien:

10x OFA (One-Phor-All Buffer PLUS, Amersham Pharmacia Biotech)

Tween 20 (Merck)

Igepal CA 630 (Sigma)

Proteinase K (10mg/ml, Roche)

PCR-Gerät:

MJ Research PTC-225, Version 4.0 (Biozym)

10x Ansatz

2 µl OFA (One-Phor-All Buffer)

1,3 µl Tween 10%-ig (in H₂O)

1,3 µl Igepal 10%-ig (in H₂O)

2,6 µl Proteinase K 10 mg/ml

12,8 µl H₂O

- 2 µl des Ansatzes zu PCR-Reaktionsgefäß mit Einzelzelle geben.
- Im Folgenden werden vier verschiedenen Abläufe beschrieben, die ausgetestet wurden:
 - A) Proteinase K Verdau in PCR-Maschine bei 42 °C über Nacht durchführen.
 - B) Proteinase K Verdau in PCR-Maschine bei 42 °C über Nacht durchführen. Am nächsten Tag zusätzlich 1µl Proteinase K zugeben und weitere 3-4 Std. inkubieren.
 - C) Proteinase K Verdau in PCR-Maschine bei 55 °C über Nacht durchführen. Am nächsten Tag zusätzlich 1µl Proteinase K zugeben und weitere 3-4 Std. inkubieren.
 - D) Proteinase K Verdau in PCR-Maschine bei 55 °C über Nacht durchführen. Am nächsten Tag weitere 3-5 Std. inkubieren.
- Proteinase K-Inaktivierung in PCR-Maschine bei 80 °C für 10 Min.

2.2.3.4. MseI-Verdau

Reagenzien:

10x OFA (One-Phor-All Buffer PLUS, Amersham Pharmacia Biotech)

Restriktionsenzym Mse1 (50.000 u/ml, New England Biolabs)

Plazenta-DNA als Referenz-DNA; 225 ng/ μ l

PCR-Gerät:

MJ Research PTC-225, Version 4.0 (Biozym)

<u>1x Ansatz für Einzelzelle</u>	<u>1x Ansatz für Referenz-DNA</u>
0,2 μ l OFA	0,5 μ l OFA
0,5 μ l MseI	0,5 μ l MseI
1,3 μ l H ₂ O	3 μ l H ₂ O
	1 μ l DNA

- 2 μ l zu Proteinase K-verdauten Zellen hinzu pipettieren.
- MseI-Verdau in PCR-Maschine bei 37 °C für 3 Std.
- MseI-Inaktivierung in PCR-Maschine bei 65 °C für 5 Min.

2.2.3.5. Preannealing der Adapter

Reagenzien:

10x OFA (One-Phor-All Buffer PLUS, Amersham Pharmacia Biotech)

LIB 1, 100 μ M (5'-AGT GGG ATT CCT GCT GTC AGT- 3')

ddMse 11, 100 μ M (5'-TAA CTG ACA GCdd- 3')

PCR-Gerät:

MJ Research PTC-225, Version 4.0 (Biozym)

<u>1x Ansatz</u>
0,5 μ l OFA
0,5 μ l LIB 1 100 μ M
0,5 μ l ddMse 11 100 μ M
1,5 μ l H ₂ O

Das Annealing wird in einer PCR-Maschine mit einem speziellen Annealing-Programm durchgeführt. Dabei wird die Temperatur um 1 °C / Minute von 65 °C auf 15 °C reduziert.

2.2.3.6. Ligation

Reagenzien:

ATP 10mM (Roche)

T4-DNA-Ligase, 2.000.000 u/ml (New England Biolabs)

PCR-Gerät:

MJ Research PTC-225, Version 4.0 (Biozym)

- Zu den 3 µl preannealten Adaptern wird
1 µl 10 mM ATP
1 µl T4-DNA-Ligase zugegeben.
- 5 µl der Ligationlösung zu MseI verdauten Zellen geben.
- bei 15 °C über Nacht in PCR-Gerät ligieren.

2.2.3.7. Primäre PCR

Reagenzien:

Aus Expand Long Template PCR System (Roche):

10x BM-Puffer1 mit 17,5 mM MgCl₂, 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 100mM KCl,
1mM dithiothreitol, 0,1 mM EDTA, 0,5% Tween 20, 0,5% Nonidet P40,
50% Glycerol

Pol-Mix, 3.5 u, Polymerase-Mix aus Taq und Pwo Polymerase

d`NTP`s 10mM (Roche)

deionisiertes Formamid (Sigma)

PCR-Gerät:

MJ Research PTC-225, Version 4.0 (Biozym)

1x Ansatz

- 3 µl BM Puffer1
- 2 µl dNTP`s 10mM
- 1,5 µl deionisiertes Formamid
- 1 µl Pol-Mix
- 32,5 µl H₂O

- 40 µl PCR-Mix zu Ligations-Produkt zugeben.

- PCR-Programm:
 Die Reaktionsgefäße werden erst nach dem Erreichen der 68 °C in das Gerät gestellt (hot start).

	1x	14x	8x	22x	1x	
68°C 3'		94°C 40"	94°C 40"	94°C 40"		
		57°C 30"	57°C 30" + 1°C / Zyklus	65°C 30"	68°C 3'40"	4°C ∞
		68°C 1'30" + 1" / Zyklus	68°C 1'45" + 1" / Zyklus	68°C 1'53" + 1" / Zyklus		

- Je 1/10 Volumen der PCR-Produkte wird auf einem 1%-igem Agarosegel getestet (siehe Kapitel 2.2.1.6. (Seite 28).

2.2.3.8. Verschiedene Methoden zur Markierung der DNA

Auch hier wurden drei verschiedene Methodenansätze zur Markierung ausgetestet.

Ansatz A:

Reagenzien:

Aus Expand Long Template PCR System (Roche):

10x BM-Puffer1 mit 17,5 mM MgCl₂, 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 100mM KCl,
1mM dithiothreitol, 0,1 mM EDTA, 0,5% Tween 20, 0,5% Nonidet P40,
50% Glycerol

7/8 Nukleotid-Mix (Roche) Ansatz:

100mM dTTP	4,375 µl
100mM dATP	5 µl
100mM dCTP	5 µl
100mM dGTP	5 µl
H ₂ O	30,625 µl

LIB 1, 100µM (5'-AGT GGG ATT CCT GCT GTC AGT- 3')

Biotin-16-dUTP, 50 nmol (Roche)

Digoxigenin-11-dUTP, 125 nmol (Roche)

Taq-Polymerase 5U/µl (GIBCO BRL)

deionisiertes Formamid (Sigma)

PCR-Gerät:

MJ Research PTC-225, Version 4.0 (Biozym)

Die Markierung der Test-DNA wurde sowohl mit Biotin als auch mit Digoxigenin durchgeführt (jeweils alternierend wurde die Referenz-DNA markiert).

Test-DNA	
1x Ansatz (40 µl)	in µl
BM Puffer1	4
100µM LIB 1	6
7/8 Mix	1,4
3% Formamid	1,2
Bio / Dig	1,75
Taq-Polymerase	0,5
H ₂ O	24,15

Referenz-DNA	
1x Ansatz (40 µl)	in µl
BM Puffer1	4
100µM LIB 1	6
7/8 Mix	1,4
3% Formamid	1,2
Dig / Bio	1,75
Taq-Polymerase	0,5
H ₂ O	24,15

- 0,5 µl oder 1 µl aus Primär-PCR Produkt zu Ansatz zugeben

- PCR-Programme:

Über den Zeitraum dieser Anwendungen kamen die unter Kapitel 2.2.1.7. Ansatz B (Seite 33) aufgeführten PCR-Programme zu Einsatz.

Programm A:

1x		14x		9x		1x			
94°C	2'	94°C	40"	94°C	40"	94°C	40"	15°C	∞
65°C	30"	65°C	30"	65°C	30"	65°C	30"		
72°C	2'	72°C	1'30"	72°C	2'	72°C	5'		

Programm B:

1x		10x	
94°C	1'	94°C	30"
60°C	30"	60°C	30"
72°C	2'	72°C	2' +20" / Zyklus

- Je 1/10 Volumen der PCR-Produkte kann auf einem 1%-igem Agarosegel getestet werden (siehe Kapitel 2.2.1.6. Seite 28)

Ansatz B:

Zusätzlich wurde eine weitere Amplifikations-PCR nach A.M. Snijders et al. 2001 ausgetestet. Diese PCR wurde sowohl als Amplifikations- als auch Markierungs-PCR eingesetzt. Dabei wurde die Test-DNA ausschließlich mit Digoxigenin markiert.

Reagenzien:

Aus Expand Long Template PCR System (Roche):

10x BM-Puffer2 mit 22,5 mM MgCl₂, 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 100mM KCl,
1mM dithiothreitol, 0,1 mM EDTA, 0,5% Tween 20, 0,5% Nonidet P40,
50% Glycerol

50 mM MgCl₂

5 mM dNTP's: aus je 100 mM dATP, dGTP, dTTP und dCTP

5 mM AGC: aus je 100 mM dATP, dGTP und dCTP

5 mM dTTP: aus 100 mM dTTP

LIB 1, 100µM (5'-AGT GGG ATT CCT GCT GTC AGT- 3')

Biotin-16-dUTP, 50 nmol (Roche)

Digoxigenin-11-dUTP, 125 nmol (Roche)

Taq-Polymerase 5U/µl (GIBCO BRL)

deionisiertes Formamid (Sigma)

PCR-Gerät:

MJ Research PTC-225, Version 4.0 (Biozym)

Amplifikations-PCR:

Test- / Referenz-DNA

1x Ansatz (50 µl)	in µl
BM Puffer2	5
50 mM MgCl ₂	2,25
100µM LIB 1	2
5 mM dNTP's	2
3% Formamid	1,5
Taq-Polymerase	0,5
H ₂ O	31,75
DNA aus Primär-PCR	5

Markierungs-PCR:

Test- / Referenz-DNA

1x Ansatz (25 µl)	in µl
BM Puffer2	2,5
50 mM MgCl ₂	1
5 mM AGC	1
5 mM dTTP	0,5
Dig / Bio	2,5
100µM LIB 1	1
3% Formamid	0,75
Taq-Polymerase	0,25
H ₂ O	13
DNA aus Primär-PCR	2,5

PCR-Program:

1x		45x		1x			
		95°C	30"				
95°C	10'	50°C	30"	72°C	7'	4°C	∞
		72°C	2'				

- Je 1/10 Volumen der PCR-Produkte kann auf einem 1%-igem Agarosegel getestet werden (siehe Kapitel 2.2.1.6. Seite 28).
- An die Amplifikations-PCR wurde eine Nicktranslation (siehe Kapitel 2.2.1.7 Ansatz C Seite 35) angeschlossen. Hierbei wurden 17 µl aus der Amplifikations-PCR eingesetzt und für 2 Std. bei 2µl 1:5000 DNase I Verdünnung verdaut.
Je 1/10 Volumen des Nicktranslations-Produktes wird auf einem 1%-igem Agarosegel getestet (siehe Kapitel 2.2.1.6. Seite 28).

2.2.3.9. Abtrennen der Primer

Das Abtrennen der Primer wurde zu diesem Zeitpunkt nicht mehr durchgeführt.

2.2.3.10. Fällung und Ansetzen des Hybridisierungsmix

Ethanol-Fällung und Hybridisierung:

Dieser Abschnitt des Protokolls entspricht dem Kapitel 2.2.1.9. (Seite 39).

Allerdings verändert sich das eingesetzte Volumen in die Fällung von Test- bzw. Referenz-DNA je nach gewähltem Markierungs-Protokoll aus Kapitel 2.2.3.8. (Seite 53):

Ansatz A:

DNA-Pool	Volumen in µl	Cot-1 DNA in µl	Salmon testis-DNA in µl	Σ	3M NaOAc (1/10 Vol.) in µl	100% EtOH (x 2,5 Vol.) in µl
Referenz-DNA	40	50	5	135	13,5	370
Test-DNA	40					

Ansatz B (Amplifikation + Nicktranslation):

DNA-Pool	Volumen in µl	Cot-1 DNA in µl	Salmon testis-DNA in µl	Σ	3M NaOAc (1/10 Vol.) in µl	100% EtOH (x 2,5 Vol.) in µl
Referenz-DNA	45	50	5	125	12,5	345
Test-DNA	25					

Ansatz B (Markierungs-PCR):

DNA-Pool	Volumen in μl	Cot-1 DNA in μl	Salmon testis-DNA in μl	Σ	3M NaOAc (1/10 Vol.) in μl	100% EtOH (x 2,5 Vol.) in μl
Referenz-DNA	25	50	5	105	10,5	290
Test-DNA	25					

2.2.3.11. Nachweis

Dieser Abschnitt des Protokolls entspricht dem Kapitel 2.2.1.10. (Seite 40).

Allerdings wurden je nach Art der Markierung zwei verschiedene Nachweissysteme verwendet:

<p><u>Reagenzien:</u></p> <p><u>Nachweis für Markierung der Test-DNA mit Biotin:</u> Avidin-FITC, 1 mg/ml (Vector) Biotinyliertes Goat-Anti-Avidin, 0,5 mg/ml (Vector) Anti-Digoxigenin-Rhodamin, 200 μg (Boehringer Mannheim)</p> <p><u>Nachweis für Markierung der Test-DNA mit Digoxigenin:</u> Sheep anti digoxigenin-FITC, 200μg (Roche) Avidin-Cy3.5, 1mg/ml (Rockland)</p>
--

Nachweis für Markierung der Test-DNA mit Digoxigenin:

- Kurz in 4x SSC/0,2% Tween-20 geben.
- 150 μl sheep anti-dig FITC (1:200 verd. in 4x SSC/Tween-20 und 1% BSA) und avidin Cy3.5 (1:300 verd. in 4x SSC/Tween-20 und 1% BSA) für 45 Min. bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubieren.
- 3x 5 Min. bei 42 °C in 4x SSC/0,2% Tween-20 waschen.

Nachweis für Markierung der Test-DNA mit Biotin:

- Kurz in 4x SSC/0,2% Tween-20 geben.
- 150 μl Avidin-FITC (1:200 verd. in 4x SSC/Tween-20 und 1% BSA) für 45 Min. bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubieren.
- 3x 5 Min. bei 42 °C in 4x SSC/0,2% Tween-20 waschen.

- 150 µl biotinyliertes Goat-Anti-Avidin (1:200 verd. in 4x SSC/Tween-20 und 1% BSA) für 45 Min. bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubieren.
- 3x 5 Min. bei 42 °C in 4x SSC/0,2% Tween-20 waschen.
- 150 µl Avidin-FITC (1:200 verd. in 4x SSC/Tween-20 und 1% BSA) und Anti-Digoxigenin-Rhodamin (1:400 verd. in 4x SSC/Tween-20 und 1% BSA) für 45 Min. bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubieren.
- 3x 5 Min. bei 42 °C in 4x SSC/0,2% Tween-20 waschen.

2.2.4. Mikroskopie und Auswertung

2.2.4.1. Benutzung der Leica Software für Mikroskopie und Auswertung

Die Detektion der Fluorochrome erfolgt mit einem, in z-Richtung motorisiertem Epifluoreszenz Mikroskop der Firma Leica DMRXA-RF8 (Leica Microsystems). Das Mikroskop ist mit einem 8-Filterrad sowie hochspezifischen Filtern ausgestattet, die es ermöglichen, jedes Fluorochrom mit einem separaten Anregungs-, Teilungs- und Emissionsfilter zu analysieren. Mit einer Photometrics Sensys CCD (charge coupled device) Kamera werden die Fluorochrome als skalierbare 2-dimensionale Grauwertbilder aufgenommen, denen dann eine bestimmte Farbe zugeordnet werden kann. Mikroskop und Kamera werden über eine Software gesteuert (Leica: Leica QFISH, Leica Microsystems Imaging Solutions Ltd., Cambridge, UK).

Zur Auswertung wurde das Computerprogramm ‚Leica QCGH‘ (Leica Microsystems Imaging Solutions Ltd., Cambridge, UK) verwendet.

Das Prinzip der CGH Auswertung wurde bereits in vielen Publikationen ausführlich beschrieben (Kallioniemi et al.1992; du Manoir et al. 1993; Joos et al. 1993; als Übersicht: Forozan et al.1997).

In Kürze: die Fluoreszenzintensitäten werden im grünen und roten Kanal entlang der Chromosomen gemessen und verglichen. Das Verhältnis dieser Intensitätswerte zueinander zeigt, ob Regionen z.B. im Tumorgenom unter- oder überrepräsentiert sind.

2.2.4.2. Benutzung des Metasystems System für Mikroskopie und Auswertung

Neben Leica wurde ein weiteres System der MetaSystems GmbH, Altlußheim zur Aufnahme und Auswertung herangezogen.

Die Detektion der Fluorochrome erfolgt mit einem Zeiss Axioplan II Imaging -Mikroskop, das ebenfalls über separate Anregungs-, Teilungs- und Emissionsfilter verfügt. Mit einer Axiocam-MRm CCD Kamera (Carl Zeiss Jena GmbH, Jena) werden die Fluorochrome als Grauwertbilder aufgenommen, denen dann eine bestimmte Farbe zugeordnet werden kann. Mikroskop und Kamera werden ebenfalls über eine Software gesteuert. Dabei kann mit der MSearch Funktion aus dem Computerprogramm *Metafer* (Version 1.80, MetaSystems GmbH, Altlußheim) nach Metaphasen gesucht werden. Nach Auswahl geeigneter Metaphasen werden die einzelnen Fluorochrom-Kanäle über das Programm *Isis* (Version V3.4.0, MetaSystems GmbH, Altlußheim) aufgenommen und mit der integrierten Software ausgewertet.

Das Prinzip wurde bereits in Kapitel 2.2.4.1. (Seite 57) erläutert.

2.3. Analyse disseminierter Tumorzellen im Knochenmark mittels FISH nach Antikörperfärbung

Anhand von Knochenmarkspräparaten aus dem Labor für Tumorimmunologie in Großhadern erfolgte das Austesten der optimalen Bedingungen für eine Hybridisierung regionenspezifischer Sonden bei gleichzeitiger Markierung der disseminierten Tumorzellen. Dabei konnte sowohl auf ein umfangreiches Kollektiv von Patienten, als auch auf neu verarbeitetes Material von Nierentumor Patienten zurückgegriffen werden.

Im Folgenden werden die Techniken zur Anreicherung, zur Markierung von disseminierten Tumorzellen über spezifische Oberflächenmarker, die Herstellung der regionenspezifischen Sonden und die Hybridisierung beschrieben.

2.3.1. Anreicherung disseminierter Tumorzellen im Knochenmark

Die Anreicherung wurde im Labor für Tumorimmunologie (Klinikum Großhadern) von Dr. Rainer Riesenberg durchgeführt, um das Knochenmark direkt nach der Operation des Patienten aufzuarbeiten. Neben der Ficoll-Hypaque Gradienten Anreicherung (Loos und Roos et al. 1974) kam auch die Depletion mit Dynabeads M-450 CD45 zum Einsatz. Diese beiden Verfahren sind detailliert in R. Riesenberg et al. Histochemistry (1993) 99, pp 62-66 und R. Zigeuner et al., Journal of Urology (2000) 164, pp1834-1837 beschrieben. Daher werden an dieser Stelle nur Kurzbeschreibungen verfasst.

2.3.1.1. Anreicherung über Ficoll-Hypaque Gradient (R. Riesenberg et al. 1993)

Diese Anreicherungs-methode wurde erstmals 1974 (Loos und Roos et al. 1974) beschrieben. Für die zytogenetische Untersuchung des Knochenmarks wurde das 1993 veröffentlichte Protokoll zur Anreicherung verwendet:

- Heparinisiertes Blut zu gleichen Teilen auf 2 Falconröhrchen aufteilen.
- Blut (ca. 4-5 ml) mit gleicher Menge Hanks-Lösung mischen.
- Gleiche Menge Ficoll-Hypaque (4-5 ml) in ein neues Falconröhrchen vorlegen und Blut/Hanks-Gemisch vorsichtig darüberschichten.
- Zentrifugation 30 Min. bei Raumtemperatur und 400x g.
- Obere Phase (Plasma und Thrombozyten) absaugen.
- Mittlere Phase (milchig-weiße Farbe) in ein neues Falconröhrchen überführen und

untere Phase (Erythrocyten) verwerfen.

- Zellen mit 1x PBS auf 10 ml auffüllen und 10 Min. bei 700x g zentrifugieren.
- Waschschrift 2-3x wiederholen.
- Pellet in ca. 2 ml 1x PBS aufnehmen (die Suspension sollte leicht milchig sein).
- 200 µl Zellsuspension auf Spin geben, Röhrchen mit 100 µl Waschpuffer pro Spin auswaschen und zu Spin geben.
- Klebeschilder mit Bleistift beschriften und Objektträger gut trocknen lassen.

2.3.1.2. Anreicherung über Depletion mit Dynabeads M-450 CD45 (R. Zigeuner et al. 2000)

Zellen vorbereiten

- KM in ca. 5 ml Portionen mit Hanks Lösung. auf 20 ml auffüllen und 10 Min. bei 1000 U/Min. zentrifugieren, Überstand vorsichtig absaugen, Pellet resuspendieren und mit 37 °C erwärmten Erylysepuffer (Verhältnis 10:1 zu KM-Volumen) auf 50 ml auffüllen, Röhrchen für 30 Min. in 37 °C Wasserbad stellen.
- 10 Min. bei 1500 U/Min. zentrifugieren resuspendieren, mit PBS auf 50 ml auffüllen und erneut zentrifugieren, resuspendieren, Pellets wieder zusammenführen in insgesamt 20 ml PBS/2% FKS.
- Zellen zählen und zentrifugieren.

Dynabeads vorbereiten

- Dynabeads gründlich resuspendieren.
- Benötigte Menge Dynabeads (5 beads / Zielzelle; 10 Mio. = 25 µl, 20 Mio. = 50 µl, etc.) in ein Glasröhrchen geben, für 2 Min. auf MPC (magnetic particle concentrator), dann Überstand abpipettieren.
- Röhrchen vom Magneten nehmen, 1-2 ml Waschpuffer zugeben (= PBS mit entweder 2% FKS oder 0,1% BSA), resuspendieren.
- Glasröhrchen wieder auf MPC für 2 Min., dann Überstand abpipettieren.
- Röhrchen vom Magneten nehmen, Beads resuspendieren mit dem vorher entfernten Volumen Waschpuffer.

Anreicherung

- Zu vorbereiteten Dynabeads Suspension aus A hinzufügen, gut mixen.
- 20 Min. bei 2-8 °C auf Dynal Sample Mixer (speed:18) inkubieren.
- Mit Waschpuffer auf 5-10 ml auffüllen.
- Röhrchen für 2-3 Min. auf MPC.

- Überstand in separates Röhrchen geben.
- Mit Waschpuffer auf 30 ml auffüllen, und 10 Min. bei 1500 U/Min. zentrifugieren (2-8 °C).
- Überstand entfernen, resuspendieren mit 200 µl Waschpuffer pro benötigten Zytospin.
- 200 µl Zellsuspension auf Spin geben, Röhrchen mit 100 µl Waschpuffer pro Spin auswaschen und zu Spin geben.
- Klebeschilder mit Bleistift beschriften und Objektträger gut trocknen lassen.

2.3.2. Identifikation der disseminierten Tumorzellen

Disseminierte Tumorzellen können über Zytokeratine mit Hilfe eines primären Antikörpers identifiziert werden. Der verwendete Antikörper A45 B/B3 (pan-Zytokeratin Antikörper) richtet sich gegen die Zytokeratine 8, 18 und 19.

2.3.2.1. Antikörpernachweis mit Neufuchsin, Fast Blue und NBT/BCIP

Reagenzien:

EPIMET Epithelial Cell Detection Kit mit Neufuchsin: EPIMET-Kit (Baxter)

BCIP/NBT Substrat System (DAKO Corporation)

Fast Blue Ansatz:

20 mg Naphthol AS MX-Phosphat in 2 ml Dimethylformamid mischen mit:

24 mg Levamisol, 100 mg Fast Blue BB Salt, 98 ml Trispuffer 0,1 M, pH 8,2 (alle Sigma)

PBS

Dieser Nachweis basiert auf dem Protokoll der Firma Baxter bezüglich dem EPIMET Kit und wird daher übersichtsweise beschrieben:

- 5 Min. permeabilisieren des Zytospins mit Lösung A.
- 10 Min. fixieren mit Lösung B (37% Formaldehyd-Lösung).
- 45 Min. Antikörper Inkubation.
- Färben der Zytospins:
 - A) *Neufuchsin*:
10 Min. Inkubation mit Neufuchsin Lösung.
 - B) *Fast Blue*
10-30 Min. Inkubation mit Fast Blue Ansatz.

C) *NBT/BCIP*

10 Min. Inkubation mit NBT/BCIP Lösung.

- Die Auswertung der Zytospins erfolgt unter einem Lichtmikroskop (Zeiss Standard 20)

2.3.2.2. Markierung der disseminierten Tumorzellen mit A45 B/B3 -Cy3 konjugiertem Antikörper

Bei diesem Protokoll wurden mehrere Veränderungen ausgetestet. Daher wird zuerst das Standard-Protokoll gezeigt und anschließend auf die Veränderungen eingegangen. Hinzuzufügen ist, dass die meisten Veränderungen in diesem Protokoll aufgrund der mangelnden Hybridisierung der Sonden, aber auch teilweise wegen des störend hohen Hintergrunds auf den Präparaten erfolgten:

Standard-Protokoll:

Reagenzien:

A45 B/B3 - Cy3 konjugiert (Micromet, Martinsried)

Solution B aus EPIMET-Kit (siehe Kapitel 2.3.2.1. Seite 61)

37% Formaldehyd (Merck)

10% AB-Serum, (Biotest)

Antikörperverdünnungsmedium, hintergrundsreduzierend (DAKO Corporation)

DAPI-Stocklösung: 4',6-Diamidino-2-phenylindole, 0,2 mg/ml Aqua bidest

Alternativen:

Fixativ: Methanol/Eisessig, 3:1, Vol:Vol (Merck)

Ethanol vergällt (EtOH)

3% BSA in 4x SSC/0,2% Tween-20

Antikörperverdünnungsmedium, hintergrundsreduzierend (DAKO Corporation)

Solution D aus EPIMET-Kit

PBS

- Zytospin 10 Min. in 1,35% Formaldehyd / 1xPBS (60 ml Volumen) fixieren.
- 3x3 Min. in 1x PBS waschen.
- 20-30 Min. in 10% (v/v) AB-Serum / 1xPBS bei 37 °C in einer feuchten Kammer blocken.
- Inkubation mit A45-B/B3 – Cy3 (2 µg/ml) in 1x PBS (1:500 verd.) für 45 Min. bei 37 °C in einer feuchten Kammer.

- 3x3 Min. in 1x PBS waschen.
- Mit 1 ml DAPI (1:10000 verd. in 4x SSC/0,2% Tween-20) 3 Min. bei RT inkubieren.

Abgewandelte Protokolle:

Anwenden verschiedener Fixierungen, alternativ zu 10' in 1,35% Formaldehyd / 1xPBS:

- A) 10-20 Min. in Fixativ auf $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt.
- B) 1 Std. in 4% Formaldehyd / 1xPBS bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$
- C) 10 Min. in 85% EtOH
- D) ohne jegliche Fixierung

Anwenden verschiedener Blockversuche, alternativ zu 10% (v/v) AB-Serum / 1xPBS:

- A) 30 Min. blocken in 3% BSA bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$
- B) 30 Min. blocken in 10% / 20% / 30% (v/v) AB-Serum / 1xPBS bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$
- C) 30 Min. blocken in 10% (v/v) AB-Serum / 3% BSA bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$

Anwenden verschiedener Antikörperverdünnungen und Verdünnungslösungen, alternativ zur Verdünnung 1:500 in 1x PBS:

- A) A45-B/B3 – Cy3 (2 $\mu\text{g/ml}$) in 1x PBS (1:750 und 1:1000)
- B) A45-B/B3 – Cy3 (2 $\mu\text{g/ml}$) in Solution D (1:1000)
- C) A45-B/B3 – Cy3 (2 $\mu\text{g/ml}$) in Antikörperverdünnungsmedium (DAKO) (1:500)

2.3.2.3. Ansatz für zwei negativ Kontrollen für A45 B/B3 -Cy3 konjugiertem Antikörper auf einen Patienten Zytospin

Reagenzien:

anti-digoxigenin Cy3, 1,7 mg/ml (Dianova)

goat-anti-rat Cy3, 1,5 mg/ml (Dianova)

Dieser Versuch erfolgte nach dem Standard-Protokoll für die A45 B/B3-Cy3 Färbung (siehe Kapitel 2.3.2.2. Seite 62).

In zwei Ansätzen wurden anstelle des A45 Antikörpers jeweils die Antikörper anti-digoxigenin Cy3 (1:200 in 1x PBS verdünnt) und goat-anti-rat Cy3 (1:100 in 1x PBS verdünnt) eingesetzt.

2.3.2.4. Markierung der disseminierten Tumorzellen mit A45 B/B3 -FluorX konjugiertem Antikörper

Zusätzlich wurde ein weiterer direkt konjugierter A45 B/B3 Antikörper, der an FluorX gekoppelt ist, verwendet.

2.3.2.4.1. Konjugieren von FluorX an A45 B/B3

Reagenzien:

A45 B/B3 unkonjugiert (Micromet, Martinsried)

FluorX™ mAb Labelling Kit (Amersham Pharmacia)

Ultrafree - 0.5 Centrifugal Filter & Tube, UFV5BTK25 (Millipore)

PBS

Der gelieferte Antikörper A45 B/B3 wurde mit den Millipore-Filtereinheiten auf die Konzentration von 0,1 mg in 100 µl 50mM PBS nach Vorschrift eingestellt. Anschließend erfolgte die Konjugation von FluorX nach beiliegender Anleitung von Amersham Pharmacia.

2.3.2.4.2. Markieren der disseminierten Zellen

Die Markierung mit A45 B/B3 -FluorX entspricht dem Standard-Protokoll von Kapitel 2.3.2.2 Seite 62.

2.3.3. Vorbehandlung der gefärbten Zytospins und Hybridisierung mit Zentromersonden

Da Zentromersonden sehr starke Signale geben, ist es möglich eine Hybridisierung bei gleichzeitiger A45 B/B3-Cy3 Markierung zu machen:

Reagenzien:

Formamid (reinst): 70% Formamid, 2x SSC, pH 7,0 (Merck)

PBS

SSC

- 2 x 5 Min. in 1x PBS bei RT waschen.
- 1 Std in 2x SSC bei RT inkubieren.
- 2 x 5 Min. in 1x PBS bei RT waschen.
- In aufsteigende Ethanolreihe (70%, 90%, 100%) je 3 Min. geben (auf 4 °C gekühlt).
- Präparate lufttrocknen und unter Mikroskop Resultat der Vorbehandlung kontrollieren.

Denaturierung:

- Z.B. für ein 50 ml Volumen 35 ml Formamid in 15 ml 2x SSC, pH 7,0 einstellen.
- Präparate in Denaturierungslösung für 1 Minute, 35 Sek. bei 72 °C denaturieren.
- Anschließend aufsteigende Ethanolreihe (70%, 90%, 100%) je 3 Min. (auf -20 °C gekühlt) und Präparate lufttrocknen.

2.3.3.1. Herstellung geeigneter Zentromersonden zur Hybridisierung

Während der Doktorarbeit kamen zwei verschiedene Zentromersondensätze zum Einsatz. Zum einen wurde die Hybridisierungseffizienz der verschiedenen Nachweismethoden für A45 B/B3 mit dem Zentromer-Testmix durchgeführt. Dieser Mix beinhaltet verschiedene Sonden, die mit insgesamt 6 Fluorochromen markiert wurden und starke Signale bei der Identifizierung ergeben. Diese Zusammenstellung wird im Folgenden als Testmix bezeichnet. Der zweite Sondensatz ergab sich aus den Ergebnissen der Einzelzell CGH aus kultivierten disseminierten Tumorzellen von 5 Mammakarzinom Patientinnen. Dieser Sondensatz wird als dT-Mix (disseminierte Tumorzellen) bezeichnet.

dT-Mix:

Sonde / Chromosom	Region	Markierung
7	pZ7.6B	Cy5
12	pRB12	dig / s-adig-FITC
16	pZ16A	TAMRA
17	pZ17-14	bio / avi-Cy3.5
X	pDMX1	DNP / rab- α -DNP / α -rab-Cy5.5
Y	pLAY5.5	DEAC

Test-Mix:

Sonde / Chromosom	Region	Markierung
2	pBS4D	DEAC
7	pZ7.6B	Cy3
8	pZ8.4	dig / s-adig-FITC
11	pRB11	Cy5
18	2Xba	Estradiol - Cy5.5
20	pZ20	bio / avi-Cy3.5

Tab.2.3.1. Markierungsschema für zwei Zentromersondensätze (dT-Mix und Test-Mix)

2.3.3.1.1. Amplifikation der Zentromersonden über Insert-PCR

Die Amplifikation der Sonden erfolgt über eine Insert-PCR aus der Minipräparation (Vergleiche dazu die Diplomarbeit von Monika Grabowski, 1999).

Reagenzien:

10x PCR-Puffer: 200 mM Tris-HCl (pH 8,4) + 500 mM KCl (GIBCO BRL)

50 mM MgCl₂ (GIBCO BRL)

W1, 1% (GIBCO BRL)

5 mM dNTP's: aus je 100 mM dATP, dGTP, dTTP und dCTP (Roche)

Primer: 10 μ M pUC forward (5' – CCC AGT CAC GAC GTT GTA AAA CG – 3')

10 μ M pUC reverse (5' – AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GG – 3')

Taq-Polymerase 5U/ μ l: (GIBCO BRL)

PCR-Gerät:

MJ Research PTC-225, Version 4.0 (Biozym)

Ansatz:

Die PCR wird in einem Volumen von 20 μ l angesetzt. Bei jeder PCR wird eine Negativ-Kontrolle mitgeführt.

Das Pipettierschema lautet wie folgt:

Stocklösung	Ansatz in μl	Endkonzentration
10x PCR Puffer	2	1x
50 mM MgCl_2	0,6	1,5 mM
5 mM dNTP's	1	250 μM
W1 (1%)	1	0,05%
pUC forward (10 μM)	0,4	0,2 μM
pUC reverse (10 μM)	0,4	0,2 μM
Aqua bidest	14.4	
Taq-Polymerase	0.2	0,05 U/ μl
DNA-Pool	2	

Tab.2.3.2. Ansatz für die Amplifikation der Zentromer-Sonden mittels Insert-PCR

PCR-Programm zur Insert-PCR:

1x		30x		1x			
		95°C	45"				
95°C	5'	66°C	45"	72°C	5'	4°C	∞
		72°C	1'				

- Je 1/10 Volumen der PCR-Produkte wird auf einem 1%-igen Agarosegel getestet (siehe Kapitel 2.2.1.6. Seite 28).

2.3.3.1.2. Markierung der Zentromersonden durch Nicktranslation

Reagenzien:

beide Mixe:

Biotin-16-dUTP, 50 nmol (Roche)

Digoxigenin-11-dUTP, 125 nmol (Roche)

DEAC-5-dUTP, 25 nmol (Perkin Elmer)

Cy5-dUTP, 25 nmol (Amersham Pharmacia)

dT-Mix:

TAMRA-dUTP, 12 nmol (Applied Biosystems)

DNP-11-dUTP, 1,0 mM (NEN)

Test-Mix:

Cy3-dUTP, 25nmol (Amersham Pharmacia)

Estradiol-15-dUTP, 25 nmol (Roche)

Die Nicktranslation wurde bereits in Kapitel 2.2.1.7. (Seite 31) besprochen. Aus dem Insert-PCR Produkt werden 17µl in die Nicktranslation eingesetzt und für 2 Std. verdaut. Danach wird aus dem Nicktranslationsprodukt für alle Sonden eine 1:50 Verdünnung mit Wasser hergestellt. Einzig die Y-Sonde wird 1:25 verdünnt.

2.3.3.1.3. Fällung und Hybridisierung

Reagenzien:

Cot-1 DNA (GIBCO BRL)

Hybridisierungsmix (7 µl):

deionisiertes Formamid (Sigma) 4,55 µl

20x SSC 0,7 µ

5% Dextransulfat in 4x SSC (Sigma) 0,7 µl

Aqua bidest. 1,05 µl

Fixogum Rubber Cement (Marabu)

Vakuumgerät:

Christ RVC 2-18

Aus den Verdünnungen wird folgender Fällungsmix zusammengestellt:

dT-Mix:

Sonde	Markierung	eingesetzte Menge in μl
7	Cy5	8
12	dig - FITC	5
16	TAMRA	8
17	bio - Cy3.5	5
X	DNP - Cy5.5	8
Y	DEAC	10
Cot-1 DNA		5

Test-Mix:

Sonde	Markierung	eingesetzte Menge in μl
2	DEAC	6
7	Cy3	1
8	dig / s-adig-FITC	0.5
11	Cy5	4
18	Estradiol - Cy5.5	0.5
20	bio / avi-Cy3.5	1

Tab.2.3.3. Zusammenstellung des Fällungsmix für die Zentromeransätze dT-Mix und Test-Mix

- Dieser Mix wird unter Rotation, Wärme und Vakuum in einer Vakuumpumpe für ca. 45 Min. eingedampft.
- Anschließend werden die Sonden in 7 μl Hybridisierungsmix für ca. 30 Min. resuspendiert.
- Sonden bei 78 °C für 7 Min. denaturieren und anschließend auf den vorbehandelten Zytopsin auftragen und mit einem 18x18 mm Deckglas und Fixogum luftdicht abschließen.

2.3.3.1.4. Nachweis der indirektmarkierten Sonden

Reagenzien:

beide Mixe:

Sheep anti-digoxigenin FITC (Roche)

Avidin-Cy3.5, 1,0 mg/ml (Rockland)

Anti-rabbit Cy5.5 1,0 mg/ml (Rockland)

dT-Mix:

Anti DNP from rabbit, 1,2 mg/ml (Sigma)

Test-Mix:

anti-Estradiol-IgG, 200 $\mu\text{g/ml}$ (Roche)

Dieser Abschnitt des Protokolls entspricht dem Kapitel 2.2.1.10. (Seite 40).

Allerdings erfolgt der Nachweis der indirekt markierten Sonden nach einem anderen Schema:

dT-Mix:

- Kurz in 4x SSC/0,2% Tween-20 geben.
- 150 µl anti-rabbit-DNP (1:200 verd. in 4x SSC/Tween-20 und 1% BSA) für 45 Min. bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubieren.
- 3x 5 Min. bei 42 °C in 4x SSC/0,2% Tween-20 waschen.
- 150 µl sheep anti-dig FITC (1:200 verd. in 4x SSC/Tween-20 und 1% BSA), avidin-Cy3.5 (1:300 verd. in 4x SSC/Tween-20 und 1% BSA) und anti-rabbit Cy5.5 (1:400 verd. in 4x SSC/Tween-20 und 1% BSA) für 45 Min. bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubieren.
- 3x 5 Min. bei 42 °C in 4x SSC/0,2% Tween-20 waschen.

Test-Mix:

- Kurz in 4x SSC/0,2% Tween-20 geben.
- 150 µl anti-Estradiol-IgG (1:200 verd. in 4x SSC/Tween-20 und 1% BSA) für 45 Min. bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubieren.
- 3x 5 Min. bei 42 °C in 4x SSC/0,2% Tween-20 waschen.
- 150 µl anti-rabbit Cy5.5 (1:400 verd. in 4x SSC/Tween-20 und 1% BSA), avidin-Cy3.5 (1:300 verd. in 4x SSC/Tween-20 und 1% BSA) und sheep-anti-dig FITC (1:200 verd. in 4x SSC/Tween-20 und 1% BSA) für 45 Min. bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubieren.
- 3x 5 Min. bei 42 °C in 4x SSC/0,2% Tween-20 waschen.

Die Aufnahme am Mikroskop erfolgte wie in Kapitel 2.2.4. (Seite 57) beschrieben.

2.3.4. Vorbehandlung der gefärbten Zytospins und Hybridisierung mit zentromernahen YAC-Sonden

YAC-Sonden ergeben nur dann gute Signale, wenn die Präparate mit Pepsin verdaut werden und zusätzlich Methanol/Eisessig fixiert sind.

Diese Art der Vorbehandlung zerstört allerdings die Antikörperbindung von A45 B/B3-Cy3 an die Zellen, so dass eine simultane Hybridisierung nicht möglich war. Hierfür wurden nach der Antikörperfärbung der Zytospins mit Hilfe des Systems *Metafer* der Firma MetaSystems GmbH (Altlußheim) unter der Funktion *RCDetect* die markierten Zellen gesucht und nach der Hybridisierung über gespeicherte Koordinaten wiedergefunden.

2.3.4.1. Verschiedene Protokolle zu Verdau und Fixierung der Zytospins

Hier trat das Problem auf, dass der A45 B/B3-Antikörper nicht vollständig abgetrennt werden konnte und somit die Hybridisierung störte. Daher wurden mehrere Protokolle erarbeitet, die im Einzelnen im Ergebnisteil besprochen werden. Im Folgenden wird nur ein Standardablauf beschrieben:

Reagenzien:

Antifade: p-PhenylendiaMin.dihydrochlorid (100 mg in 10 ml PBS)

Verdau:

10% Pepsin Stock in 0,01M HCl pH 2,3: (Roche)

Proteinase K, 10mg/ml (Roche)

Postfixierung:

1% Formaldehyd (Min.d. 37%) in 1x PBS + 50 mM MgCl₂ (Merck)

Denaturierung:

Formamid (reinst): 70% Formamid, 1x SSC (Merck)

Fixativ: Methanol/Eisessig, 3:1, Vol:Vol (Merck)

20% SDS

PBS

SSC

- A) Zur automatischen Suche der Cy3 positiven Zellen wurden die Präparate in zwei verschiedenen Medien eingebettet. Dazu ergibt sich eine unterschiedliche Vorbereitung auf den Verdau:

Eindeckelmedium Antifade:

- 3x 5 Min. bei 42 °C in 4x SSC/0,2% Tween-20 Antifade auswaschen.
- Kurz in 1x PBS geben.

Eindeckelmedium 1x PBS:

- 1x 5 Min. in 1x PBS Deckglas abwaschen.

- B) Für den Verdau wurden zwei verschiedene Enzyme verwendet, die in gesonderten Protokollen erklärt werden.

Pepsin-Verdau:

- Z.B. für ein 60 ml Volumen 59,4 ml Aqua bidest. + 0,6 ml 1N HCl + 25 - 100 µl Pepsin Stocklösung bei 37 °C vorwärmen.

- Je nach Intensität der Cy3- oder FluorX-Färbung für 3-60 Min. in Pepsin-Ansatz bei 37 °C inkubieren.
- 2 x 5 Min. in 1x PBS bei RT waschen.
- In aufsteigende Ethanolreihe (70%, 90%, 100%) je 3 Min. geben (auf 4 °C gekühlt).
- Präparate lufttrocknen.

Proteinase K-Verdau:

- Z.B. für ein 150 µl Volumen:
 - 10 - 50 µl Proteinase K Stocklösung
 - + gleiches Volumen 20% SDS
 - Auffüllen auf 150 µl Aqua bidest.
- Je nach Intensität der Cy3- oder FluorX-Färbung für 1-20 Min. in feuchter Kammer bei 37 °C inkubieren.
- 2 x 5 Min. in 1x PBS bei RT waschen.
- In aufsteigende Ethanolreihe (70%, 90%, 100%) je 3 Min. geben (auf 4 °C gekühlt).
- Präparate lufttrocknen.

Nach Pepsin- und Proteinase K-Verdau manchmal versucht:

- Postfixierung: z.B. für ein 50 ml Volumen 3,25 ml Formaldehyd in 57 ml 1x PBS/50 mM MgCl₂.
- 20 Min. in Postfixierungsansatz bei RT inkubieren.
- 1 x 5 Min. in 1x PBS bei RT waschen.
- In aufsteigende Ethanolreihe (70%, 90%, 100%) je 3 Min. geben (auf 4 °C gekühlt).
- Präparate lufttrocknen.

C) Nach dem Verdau erfolgte meist ein weiterer Fixierungsschritt

- 10-20 Min. in Fixativ - auf -20 °C gekühlt.
- Präparate lufttrocknen.

D) Denaturierung:

- Z.B. für ein 50 ml Volumen 35 ml Formamid in 15 ml 2x SSC, pH 7,0 einstellen.
- Präparate in Denaturierungslösung für 1,35 - 2,15 Min. bei 72 °C denaturieren.
- Anschließend aufsteigende Ethanolreihe (70%, 90%, 100%) je 3 Min. (auf -20 °C gekühlt) und Präparate lufttrocknen.

2.3.4.2. Herstellung geeigneter zentromerener YAC-Sonden zur Hybridisierung

Reagenzien:

Biotin-16-dUTP, 50 nmol (Roche)
 Digoxigenin-11-dUTP, 125 nmol (Roche)
 TexasRed-12-dUTP, 1 mM (Molecular Probes)
 TAMRA-dUTP, 12 nmol (Applied Biosystems)
 Cy5-dUTP, 25 nmol (Amersham Pharmacia)

Die Auswahl der Sonden erfolgte nach Literaturangaben (E. van den Berg und A.H. van der Hout et al. 1993; G. Kovacs et al. 1994; S. Heim und F. Mitelman et al. 1995) über bekannte Veränderungen bei Nierenzelltumoren. Es wurden zwei verschiedene SONDENSÄTZE hergestellt (3 Sonden und 7 Sonden pro Hybridisierungsansatz), wobei jede Sonde mit zwei Fluorochromen markiert wurde. Damit können spezifische Hybridisierungen leichter von unspezifischen unterschieden werden.

Zu Anfang der Doktorarbeit wurde noch ein einfach markierter 3 SONDENSATZ verwendet, der dieselben Sonden beinhaltet wie der kombinatorisch markierte 3-er SONDENSATZ, sich aber in der Markierung mit einem Fluorochrom unterschied.

Daher wird im Folgenden auf drei SONDENSÄTZE verwiesen:

- a) 7-er Pool: 7 kombinatorisch markierte Sonden
- b) 3-er Pool: 3 kombinatorisch markierte Sonden
- c) 3-er Pool einfach: 3 einfach markierte Sonden

7-er Pool:

YAC-Name	Region	Dig-FITC	TAMRA	Texas Red (TR)	Cy5	Bio-Cy5.5
906e08	1q	x	x			
915c09	2p			x		x
951f08	3p	x		x		
946h08	7p	x				x
971c05	8p	x			x	
807a07	14q		x			x
784f11	17q		x		x	

Tab.2.3.4. Markierungsschema des 7-er Pool für zentromerene YAC-Sonden

3-er Pool:

YAC-Name	Region	TAMRA	Dig-FITC	Cy5
906e08	2p	x	x	
915c09	3p		x	x
951f08	17q	x		x

Tab.2.3.5. Markierungsschema des 3-er Pool für zentromer-nahe YAC-Sonden

3-er Pool einfach:

YAC-Name	Region	TAMRA	Texas Red (TR)	Cy5
906e08	2p	x		
915c09	3p		x	
951f08	17q			x

Tab.2.3.6. Markierungsschema des 3-er Pool einfach für zentromer-nahe YAC-Sonden

Die verwendeten YAC-Klone stammen aus dem Labor von Thomas Haaf.

2.3.4.2.1. Herstellung der Ansätze und Markierung

Die einzelnen Sonden wurden nach folgenden Schemen pipettiert:

7-er Pool:

Dig-FITC-Pool		TAMRA-Pool		Texas Red-Pool		Cy5-Pool		Bio-Cy5.5-Pool	
1q	1 µl	1q	2 µl	2p	2 µl	8p	3 µl	2p	1 µl
3p	0,5 µl	14q	2 µl	3p	2 µl	17q	3 µl	7p	2 µl
7p	2 µl	17q	2 µl					14q	2,5 µl
8p	3 µl								

Tab.2.3.7. Zusammensetzung des 7-er Pool für zentromer-nahe YAC-Sonden

3-er Pool:

TAMRA-Pool		Dig-FITC-Pool		Cy5-Pool	
2p	1,5 µl	2p	1,5 µl	3p	1,5 µl
17q	2 µl	3p	1,5 µl	17q	2 µl

Tab.2.3.8. Zusammensetzung des 3-er Pool für zentromer-nahe YAC-Sonden

Anschließend wurden aus den Ansätzen 2µl in eine Telenius-DOP PCR (siehe Kapitel 2.2.1.7. Ansatz C, DOP-PCR; Seite 35) gegeben und in einer weiteren Markierungs-PCR (siehe Kapitel 2.2.1.7. Ansatz C, label-DOP; Seite 36) mit dem jeweiligen Fluorochrom markiert.

3-er Pool einfach:

1 µl der Sonden für Chromosom 2p, 3p und 17q wurden direkt in eine Markierungs-PCR (siehe Kapitel 2.2.1.7. Ansatz C, label-DOP, Seite 36) gegeben und mit dem jeweiligen Fluorochrom markiert.

2.3.4.2.2. Fällung, Hybridisierung und Nachweis

Nach dem DNase Verdau (siehe Kapitel 2.2.1.7. Ansatz C, DNase Verdau; Seite 37) erfolgt die Fällung (siehe Kapitel 2.2.1.9. Seite 39):

7-er Pool:

DNA-Pool	Volumen in µl	Cot-1 DNA in µl	Salmon testis-DNA in µl	Σ	3M NaOAc (1/10 Vol.) in µl	100% EtOH (x 2,5 Vol.) in µl
Dig-FITC-Pool	10	50	5	125	12,5	345
TAMRA-Pool	20					
Texas Red-Pool	10					
Cy5-Pool	20					
Bio-Cy5.5-Pool	10					

Tab.2.3.9. Ansatz für den Fällungsmix zum 7-er Pool

3-er Pool:

DNA-Pool	Volumen in μl	Cot-1 DNA in μl	Salmon testis-DNA in μl	Σ	3M NaOAc (1/10 Vol.) in μl	100% EtOH (x 2,5 Vol.) in μl
Dig-FITC-Pool	15	50	5	110	11,0	305
TAMRA-Pool	20					
Cy5-Pool	20					

Tab.2.3.10. Ansatz für den Fällungsmix zum 3-er Pool

3-er Pool einfach:

DNA-Pool	Volumen in μl	Cot-1 DNA in μl	Salmon testis-DNA in μl	Σ	3M NaOAc (1/10 Vol.) in μl	100% EtOH (x 2,5 Vol.) in μl
2p (TAMRA)	8	25	5	53	5,3	145
3p (TR)	5					
17q (Cy5)	10					

Tab.2.3.11. Ansatz für den Fällungsmix zum 3-er Pool einfach

Nach dem Lösen in Formamid wird das gleiche Volumen 40% Dextran Sulfat zugegeben.

Nachweis:

<p><u>Reagenzien:</u> Sheep anti-digoxigenin FITC (Roche) Avidin-Cy5.5, 1,0 mg/ml (Rockland)</p>
--

Der Nachweis erfolgt nach dem selben Schema, wie in Kapitel 2.2.1.10 (Seite 40) beschrieben, allerdings mit anderen Nachweisen für die indirekt markierten Sonden (bio und dig):

7er-pool:

- Kurz in 4x SSC/0,2% Tween-20 geben.
- 150 μl sheep anti-dig FITC (1:200 verd. in 4x SSC/Tween-20 und 1% BSA) und avidin Cy5.5 (1:200 verd. in 4x SSC/Tween-20 und 1% BSA) für 45 Min. bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubieren.
- 3x 5 Min. bei 42 °C in 4x SSC/0,2% Tween-20 waschen.

3er-pool:

- Kurz in 4x SSC/0,2% Tween-20 geben.
- 150 µl sheep anti-dig FITC (1:200 verd. in 4x SSC/Tween-20 und 1% BSA) für 45 Min. bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubieren.
- 3x 5 Min. bei 42 °C in 4x SSC/0,2% Tween-20 waschen.

3er-pool einfach:

Da hier alle Sonden direkt markiert wurden, wird der Nachweis nach dem 1x SSC, 60°C - Schritt mit der DAPI-Färbung abgeschlossen.

Die Aufnahme am Mikroskop erfolgte wie in Kapitel 2.2.4. (Seite 57) beschrieben.

2.4. Analyse disseminierter Tumorzellen ins Knochenmark von fünf Mammakarzinom Patientinnen

Am Institut für Tumorbiologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf wurde von fünf Mammakarzinom Patientinnen Knochenmark entnommen und dieses nach K. Pantel et al. 1995 und O. Solakoglu et al. 2002 unter spezifischen Kulturbedingungen angereichert. Anschließend wurden Zytospins angefertigt und uns zur Analyse zur Verfügung gestellt. Außerdem konnte auf Material der Primärtumoren zurückgegriffen werden. Im Folgenden wird auf die verwendeten Protokolle eingegangen, die für die Analyse der disseminierten Tumorzellen aus Mammakarzinom Patientinnen verwendet wurden.

2.4.1. Identifikation der disseminierten Tumorzellen im Knochenmark

Die Identifikation der Zellen über den monoklonalen Antikörper A45 B/B3 konjugiert mit Cy3 gilt sowohl für die Zytospinpräparation auf normale Objektträger als auch auf folienbeschichtete Objektträger.

Sie wurde nach dem Standard Protokoll aus Kapitel 2.3.2.2. (Seite 62) durchgeführt.

2.4.2. Analyse des Genoms einzelner disseminierter Tumorzellen mittels Einzelzell CGH

Das PALM MicroBeam System wurde erstmals eingesetzt, als schon Erfahrungen mit den oben beschriebenen Protokollen existierten. Deshalb entspricht das verwendete Protokoll nahezu dem Protokoll aus Kapitel 2.2.3. (Seite 46).

Trotzdem wird die Übersicht erneut gezeigt, da es sich in einzelnen Punkten unterscheidet.

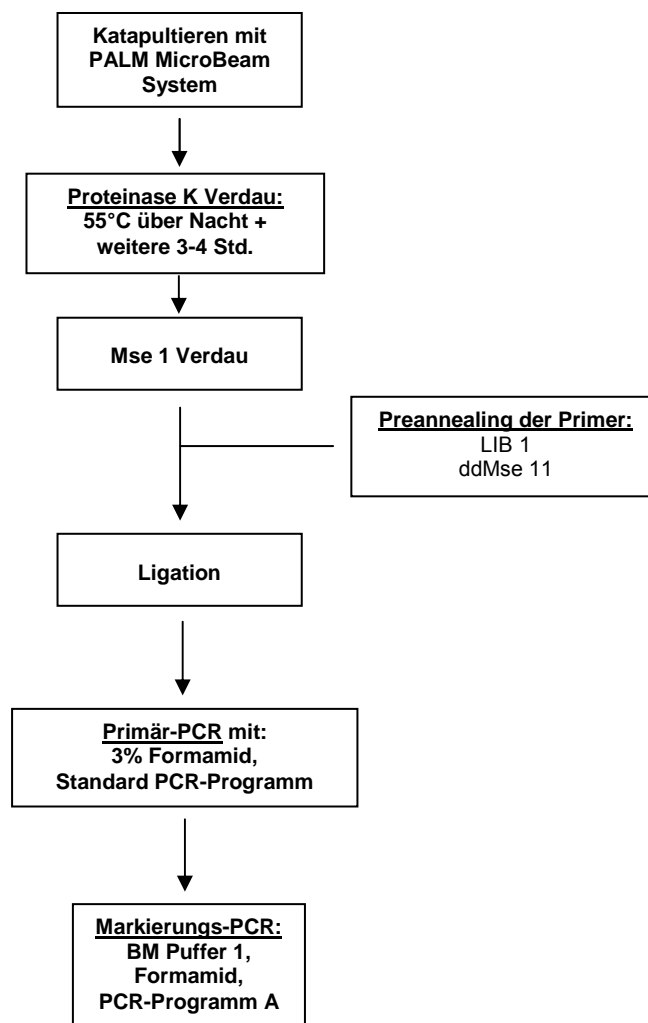


Abb.2.4.1. Schematische Darstellung des Protokolls zur Analyse von disseminierten Tumorzellen von Mammakarzinom Patientinnen

2.4.2.1. Isolation von einzelnen Zellen mit dem PALM MicroBeam System

Reagenzien:

Igepal CA 630 (Sigma)

PBS (siehe Anhang)

PALM MicroBeam System (P.A.L.M. Microlaser Technologies AG, Bernried)

Bei den benötigten PCR-Reaktionsgefäßen wird der Deckel vom Gefäß getrennt. Beide werden separat für 30 Min. unter UV-Bestrahlung (260nm) von DNA gereinigt.

Die Identifikation der A45 B/B3-Cy3 positiven Zellen erfolgt über den Rhodamin Fluoreszenzfilter der Fluoreszenzeinheit am PALM MicroBeam Systems. Die Zelle wird im Durchlichtkanal markiert und mit dem Laser ausgeschnitten.

Die einzelne Zelle wird in die Innenseite des Deckels, der mit 3 µl 1x PBS / 0,5% Igepal gefüllt ist, katapultiert. Nach dem Entfernen des Reaktionsgefäßes aus der Halterung des PALM MicroBeam Systems wird der Deckel vorsichtig auf das Reaktionsgefäß gegeben und kopfüber auf Eis aufbewahrt. Nachdem ausreichend Zellen katapultiert wurden, zentrifugiert man die Reaktionsgefäße für 10 Min. bei 13000 U/Min., so dass die Zelle im Puffer auf den Boden gelangt. Anschließend wird mit dem Proteinase K Verdau begonnen.

2.4.2.2. Proteinase K Verdau

Reagenzien:

10x OFA (One-Phor-All Buffer PLUS, Amersham Pharmacia Biotech)

Tween 20 (Merck)

Igepal CA 630 (Sigma)

Proteinase K (10mg/ml, Roche)

PCR-Gerät:

MJ Research PTC-225, Version 4.0 (Biozym)

10x Ansatz

2 µl OFA (One-Phor-All Buffer)

1,3 µl Tween 10%-ig (in H₂O)

1,3 µl Igepal 10%-ig (in H₂O)

2,6 µl Proteinase K 10 mg/ml

12,8 µl H₂O

- 2 µl des Ansatzes zu PCR-Reaktionsgefäß mit Einzelzelle geben.
- Proteinase K Verdau in PCR-Maschine bei 55 °C über Nacht durchführen.
Am nächsten Tag weitere 3-4 Std. inkubieren.
- Proteinase K-Inaktivierung in PCR-Maschine bei 80 °C für 10 Min.

2.4.2.3. MseI-Verdau

Reagenzien:

10x OFA (One-Phor-All Buffer PLUS, Amersham Pharmacia Biotech)

Restriktionsenzym Mse1 (50.000 u/ml, New England Biolabs)

Plazenta-DNA als Referenz-DNA; 225 ng/µl

PCR-Gerät:

MJ Research PTC-225, Version 4.0 (Biozym)

<u>1x Ansatz für Einzelzelle</u>	<u>1x Ansatz für Referenz-DNA</u>
0,2 µl OFA	0,5 µl OFA
0,5 µl MseI	0,5 µl MseI
1,3 µl H ₂ O	3 µl H ₂ O
	1 µl DNA

- 2 µl zu Proteinase K-verdauten Zellen zu pipettieren.
- MseI-Verdau in PCR-Maschine bei 37 °C für 3 h.
- MseI-Inaktivierung in PCR-Maschine bei 65 °C für 5 Min.

2.4.2.4. Preannealing der Adapter

Reagenzien:

10x OFA (One-Phor-All Buffer PLUS, Amersham Pharmacia Biotech)

LIB 1, 100µM (5`-AGT GGG ATT CCT GCT GTC AGT- 3`)

ddMse 11, 100µM (5`-TAA CTG ACA GCdd- 3`)

PCR-Gerät:

MJ Research PTC-225, Version 4.0 (Biozym)

1x Ansatz

0,5 µl OFA
0,5 µl LIB 1 100 µM
0,5 µl ddMse 11 100 µM
1,5 µl H₂O

Das Annealing wird in einer PCR-Maschine mit einem speziellen Annealing-Programm durchgeführt. Dabei wird die Temperatur um 1 °C / Minute von 65 °C auf 15 °C reduziert.

2.4.2.5. Ligation

Reagenzien:

ATP 10mM (Roche)
T4-DNA-Ligase, 2.000.000 u/ml (New England Biolabs)

PCR-Gerät:

MJ Research PTC-225, Version 4.0 (Biozym)

- Zu den 3 µl preannealten Adaptern wird
1 µl 10 mM ATP
1 µl T4-DNA-Ligase zugegeben.
- 5 µl der Ligationlösung zu MseI verdauten Zellen geben.
- Bei 15 °C über Nacht in PCR-Gerät ligieren.

2.4.2.6. Primäre PCR

Reagenzien:

Aus Expand Long Template PCR System (Roche):

10x BM-Puffer1 mit 17,5 mM MgCl₂, 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 100mM KCl,
1mM dithiothreitol, 0,1 mM EDTA, 0,5% Tween 20, 0,5% Nonidet P40,
50% Glycerol

Pol-Mix, 3,5 u, Polymerase-Mix aus Taq und Pwo Polymerase

d`NTP`s 10mM (Roche)

deionisiertes Formamid (Sigma)

PCR-Gerät:

MJ Research PTC-225, Version 4.0 (Biozym)

1x Ansatz

- 3 µl BM Puffer1
- 2 µl dNTP`s 10mM
- 1,5 µl deionisiertes Formamid
- 1 µl Pol-Mix
- 32,5 µl H₂O

- 40 µl PCR-Mix zu Ligations-Produkt zugeben
- PCR-Programm:
Die Reaktionsgefäße werden erst nach dem Erreichen der 68 °C in das Gerät gestellt (hot start).

1x		14x		8x		22x		1x		
		94°C	40"	94°C	40"	94°C	40"			
68°C	3'	57°C	30"	57°C + 1°C / Zyklus	30"	65°C	30"	68°C	3'40"	4°C ∞
		68°C + 1" / Zyklus	1'30"	68°C + 1" / Zyklus	1'45"	68°C + 1" / Zyklus	1'53"			

- Je 1/10 Volumen der PCR-Produkte wird auf einem 1%-igem Agarosegel getestet (siehe Kapitel 2.2.1.6. (Seite 28))

2.4.2.7. Methode zur Markierung der DNA

Die Markierung der Test-DNA wurde mit Digoxigenin durchgeführt, die der Referenz-DNA mit Biotin.

Reagenzien:

Aus Expand Long Template PCR System (Roche):

10x BM-Puffer1 mit 17,5 mM MgCl₂, 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 100mM KCl, 1mM dithiothreitol, 0,1 mM EDTA, 0,5% Tween 20, 0,5% Nonidet P40, 50% Glycerol

7/8 Nukleotid-Mix (Roche) Ansatz:

100mM dTTP	4,375 µl
100mM dATP	5 µl
100mM dCTP	5 µl
100mM dGTP	5 µl
H ₂ O	30,625 µl

LIB 1, 100µM (5`-AGT GGG ATT CCT GCT GTC AGT- 3`)

Biotin-16-dUTP, 50 nmol (Roche)

Digoxigenin-11-dUTP, 125 nmol (Roche)

Taq-Polymerase 5U/µl (GIBCO BRL)

deionisiertes Formamid (Sigma)

PCR-Gerät:

MJ Research PTC-225, Version 4.0 (Biozym)

Test-DNA

1x Ansatz (40 µl)	in µl
BM Puffer1	4
100µM LIB 1	6
7/8 Mix	1,4
3% Formamid	1,2
Dig	1,75
Taq-Polymerase	0,5
H ₂ O	20,15
DNA aus Primär-PCR Produkt	5

Referenz-DNA

1x Ansatz (40 µl)	in µl
BM Puffer1	4
100µM LIB 1	6
7/8 Mix	1,4
3% Formamid	1,2
Bio	1,75
Taq-Polymerase	0,5
H ₂ O	24,15
DNA aus Primär-PCR Produkt	1

• PCR-Programm:

1x		14x		9x		1x			
94°C	2'	94°C	40"	94°C	40"	94°C	40"		
65°C	30"	65°C	30"	65°C	30"	65°C	30"	15°C	∞
72°C	2'	72°C	1'30"	72°C	2'	72°C	5'		

2.4.2.8. Abtrennen der Primer

Das Abtrennen der Primer wurde zu diesem Zeitpunkt nicht mehr durchgeführt.

2.4.2.9. Fällung und Ansetzen des Hybridisierungsmix

Ethanol-Fällung und Hybridisierungsmix und Hybridisierung:

Dieser Abschnitt des Protokolls entspricht dem Kapitel 2.2.1.9. (Seite 39).

Allerdings verändert sich das eingesetzte Volumen in die Fällung von Test- bzw. Referenz-DNA je nach gewähltem Markierungs-Protokoll aus Kapitel 2.2.3.8. (Seite 52):

DNA-Pool	Volumen in μl	Cot-1 DNA in μl	Salmon testis-DNA in μl	Σ	3M NaOAc (1/10 Vol.) in μl	100% EtOH (x 2,5 Vol.) in μl
Referenz-DNA	40	50	5	135	13,5	380
Test-DNA	40					

2.4.2.10. Nachweis

Dieser Abschnitt des Protokolls entspricht dem Kapitel 2.2.1.10 (Seite 40).

<p><u>Reagenzien:</u></p> <p>Sheep anti digoxigenin-FITC, 200μg (Roche)</p> <p>Avidin-Cy3.5, 1mg/ml (Rockland)</p>
--

- Kurz in 4x SSC/0,2% Tween-20 geben.
- 150 µl sheep anti-dig FITC (1:200 verd. in 4x SSC/Tween-20 und 1% BSA) und avidin Cy3.5 (1:300 verd. in 4x SSC/Tween-20 und 1% BSA) für 45 Min. bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubieren.
- 3x 5 Min. bei 42 °C in 4x SSC/0,2% Tween-20 waschen.

2.4.2.11. Mikroskopie und Auswertung

Das Prinzip wurde bereits in Kapitel 2.2.4. (Seite 57) erläutert.

2.4.3. Analyse einzelner disseminierter Tumorzellen mittels Interphase Zytogenetik

Die Herstellung des dT-Mixes zur Analyse von disseminierten Tumorzellen und die Hybridisierung entspricht dem Kapitel 2.3.3.1. (Seite 65). Dabei wurde auf die Sonde für Chromosom Y (DEAC markiert) verzichtet.

Allerdings musste die Vorbehandlung der Zytospinpräparate wegen des Auftretens von Zytoplasma abgeändert werden:

Reagenzien:

RNase-Behandlung:

RNase A Stock: 10 mg/ml in 10 mM Tris-HCl (pH 7,5) + 15 mM NaCl (Roche)

Pepsin-Verdau:

10% Pepsin Stock in 0,01M HCl pH 2,3: (Sigma)

Denaturierung:

Formamid (reinst): 70% Formamid, 1x SSC (Merck)

PBS

SSC

RNase-Behandlung:

- Präparate kurz in 2x SSC aufnehmen.
- Z.B. für ein 200 µl Volumen 1:200 verdünnt: 1 µl RNase Stock in 199 µl 2x SSC
- 200 µl RNase auf Präparate geben und für 30 Min. bei 37 °C in feuchter Kammer inkubieren.
- 3 x 5 Min. in 2x SSC auf Schüttler bei RT waschen.

Pepsin-Verdau:

- Z.B. für ein 50 ml Volumen 49,5 ml Aqua bidest. + 0,5 ml 1N HCl + 50 µl Pepsin
- Stocklösung bei 37 °C vorwärmen.
- Je nach Anteil von Zytoplasma Präparate für 10 Min. in Pepsin-Ansatz bei 37 °C inkubieren.
- 2 x 5 Min. in 1x PBS bei RT waschen.
- In aufsteigende Ethanolreihe (70%, 90%, 100%) je 3 Min. geben (auf 4 °C gekühlt).
- Präparate lufttrocknen und unter dem Mikroskop Resultat der Vorbehandlung kontrollieren.

Denaturierung:

- Z.B. für ein 50 ml Volumen 35 ml Formamid in 15 ml 2x SSC, pH 7,0 einstellen.
- Präparate in Denaturierungslösung für 2 Min., 15 Sek. bei 72 °C denaturieren.
- Anschließend aufsteigende Ethanolreihe (70%, 90%, 100%) je 3 Min. (auf -20 °C gekühlt) und Präparate lufttrocknen.

2.4.4. Analyse der Primärtumoren mittels Einzelzell CGH

Am Institut für Tumorbiologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf wurden von Frau Dr. Elisabeth Breit 5 µm Parafinschnitte von den Primärtumoren der Patientinnen angefertigt, auf PEN folienbeschichtete Objektträger gebracht und mit Hämalaun gefärbt. Daher wird nur eine Kurzbeschreibung der Färbung gegeben:

- Präparate bei 56 °C über Nacht in den Trockenschrank.
- 3 x 15 Min. mit Xylol behandeln.
- In absteigende Ethanolreihe (100%, 96%, 70%) je 1 Min. geben.
- In 50% Hämalaun in H₂O verdünnt geben, ca. 10 Min.
- 2-3 sec. in 96% Ethanol/HCl geben.
- 2 Min. unter fließendes Wasser geben.
- In aufsteigende Ethanolreihe (70%, 90%, 100%) je 1 Min. geben.
- Über Nacht trocknen (wahlweise bei 56 °C).

Anschließend erfolgte die Isolation von Tumorgewebe am PALM MicroBeam System (PALM Microlaser Technologies AG, Bernried).

Die Aufarbeitung der DNA erfolgte einmal mehr nach dem Protokoll der Einzelzell CGH und richtet sich nach Kapitel 2.4.2. (Seite 79).

3. ERGEBNISSE

3.1. Adapter-Linker PCR für die Einzelzell CGH

In den folgenden Abschnitten werden die Ergebnisse der verschiedenen angewandten Protokolle zur Analyse von einzelnen Zellen mittels Einzelzell CGH vorgestellt. Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit dieser Methode wurde auf eine zytogenetisch ausreichend charakterisierte weibliche Nierentumorzelllinie (RCC-26) zurückgegriffen, die zuerst mit M-FISH und klassischer CGH analysiert wurde. Anschließend erfolgte die Untersuchung einzelner Zellen aus der Zellkultur mit Einzelzell CGH.

3.1.1. M-FISH und CGH Ergebnisse aus RCC-26 p45

Die Ergebnisse der M-FISH Untersuchungen werden neben der Bilddokumentation in der allgemein gebräuchlichen ISCN-Nomenklatur (International System for Human Cytogenetic Nomenclature 1995, ISCN 1995) beschrieben.

Da in der Tumorzytogenetik einzelne Metaphasen z.T. deutliche Unterschiede aufweisen können, wird häufig die Beschreibung als `composite karyotype`, also als zusammengesetzter Karyotyp gewählt. Dies wird durch `cp` am Ende angezeigt. Diese Nomenklatur wird anhand eines fiktiven Karyotyps kurz erläutert:

41~45, XX, +del(1)(:1q10->1qter) [17], -1 [20],[cp 20]

Die Nomenklatur kann in einer kurzen und einer langen Schreibweise angegeben werden. Bei der kurzen Schreibweise werden die Chromosomen angegeben, die an der Aberration beteiligt sind und - gegebenenfalls - deren Bruchpunkte. Im Gegensatz dazu erklärt die lange Schreibweise die gesamte Struktur des aberranten Chromosoms.

Generell geht diese Nomenklatur von dem vorher bestimmten Ploidiegrad aus (Bsp.: Bei einer triploiden Zelllinie werden drei Chromosomen pro Typ als Maßstab genommen):

- 41~45 beschreibt die Anzahl der Chromosomen aus den ausgewerteten Metaphasen, indem die kleinste und größte Chromosomenanzahl genannt wird.
- Ein Plus bedeutet, dass das entsprechende Chromosom in Bezug auf den Ploidiegrad zusätzlich vorhanden ist; ein Minus entsprechend ein Verlust.
- del, der, etc. beschreibt die Art der Veränderung; z.B. ‚del‘ für Deletion (siehe Abkürzungen).

- Der Doppelpunkt markiert einen Bruchpunkt und die angeführten Chromosomenbereiche beschreiben die noch vorhandenen Bruchstücke.
- Hinter jeder Veränderung wird in eckigen Klammern die Anzahl der Chromosomen gezeigt, die diese Veränderung haben.
- Am Ende wird in eckigen Klammern neben dem zusammengesetzten Karyotyp auch die Anzahl der Metaphasen angegeben.

In dem zusammengesetzten Karyotyp von RCC26 wurden nur Veränderungen aufgenommen, die klonal auftreten, d. h. in mehr als einer Metaphase zu finden sind.

Die Zelllinie RCC-26 wurde bereits zu einem früheren Zeitpunkt ausreichend mit M-FISH und klassischer CGH charakterisiert (siehe Diplomarbeit Rainer Gangnus). Dabei stellte sich heraus, dass sie äußerst stabil in ihren Veränderungen ist und somit ein ideales Testsystem für die Einzelzell CGH bedeutet. Selbst in der Analyse verschiedener Passagen aus der Zellkultur blieb diese Zelllinie nahezu stabil.

Neben einem Verlust von Chromosom 14 liegt ein Translokationsereignis von Chromosom 3q- und 8q-Material (siehe Abbildung Abb. 3.1.1.) in allen untersuchten Metaphasen vor. Dieses Ergebnis zeigt sich auch in der klassischen CGH Analyse in einem Verlust des kurzen Arms von Chromosom 3 und 8, sowie den Verlust des gesamten Chromosoms 14 (siehe Abbildung Abb. 3.1.2.).

Im Folgenden wird der zusammengesetzte Karyotyp für die Zelllinie RCC-26 aus der Passage 45 (RCC-26 p45) beschrieben:

75~88, XXXX, i(1)(1qter→1q10::1q10→1qter)[8],-2[9],
+der(3;8)(8qter→8q10::3q10→3qter)[7],
+der(3;8)(8qter→8q10::3q10→3qter)x2[3], -3-3[10], -4[7], -8-8[10],
del(9)(:9p10→9qter)[7],
del(9)(:9p10→9qter)[3], -9[6], -14-14[10], -15[7], -18[6], -20[2], -22[6], [cp10]

Aufgrund dieser Stabilität erwartet man für die Einzelzell CGH in allen analysierten Zellen ähnliche Ergebnisse wie sie in den M-FISH und CGH Daten gezeigt wurden.

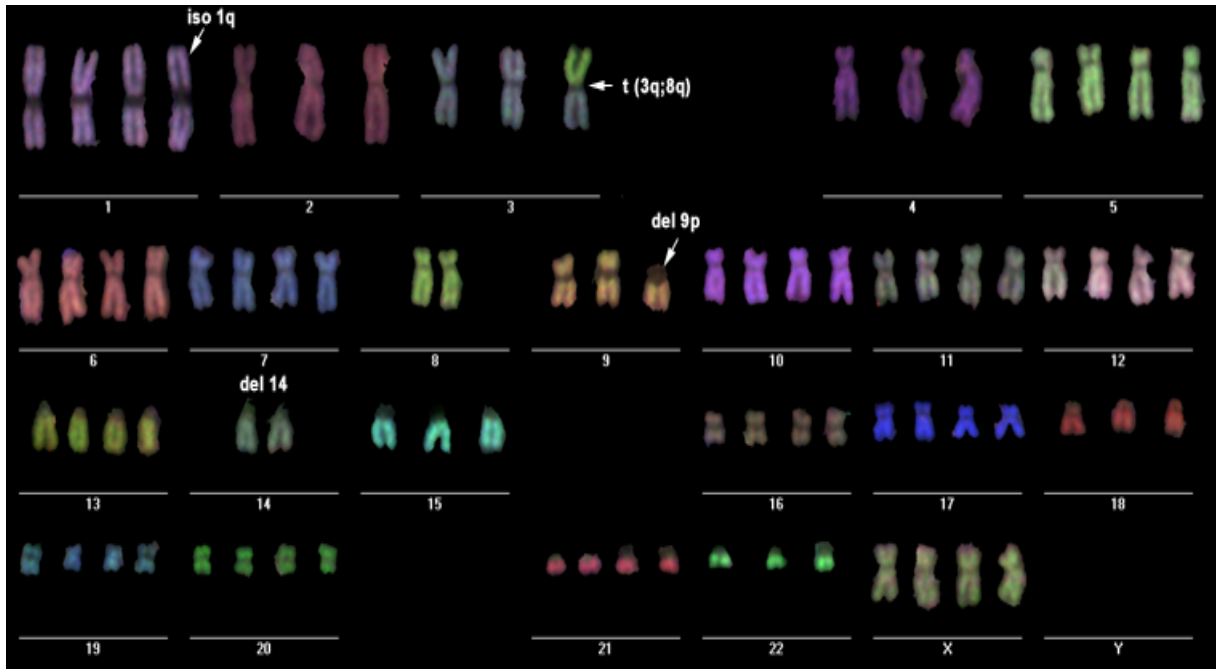


Abb.3.1.1. M-FISH Analyse einer Metaphase der Zelllinie RCC-26 p45 in sogenannter „Echtfarben“-Darstellung:
Zu erkennen sind die im zusammengesetzten Karyotyp am häufigsten aufgetretenen Veränderungen

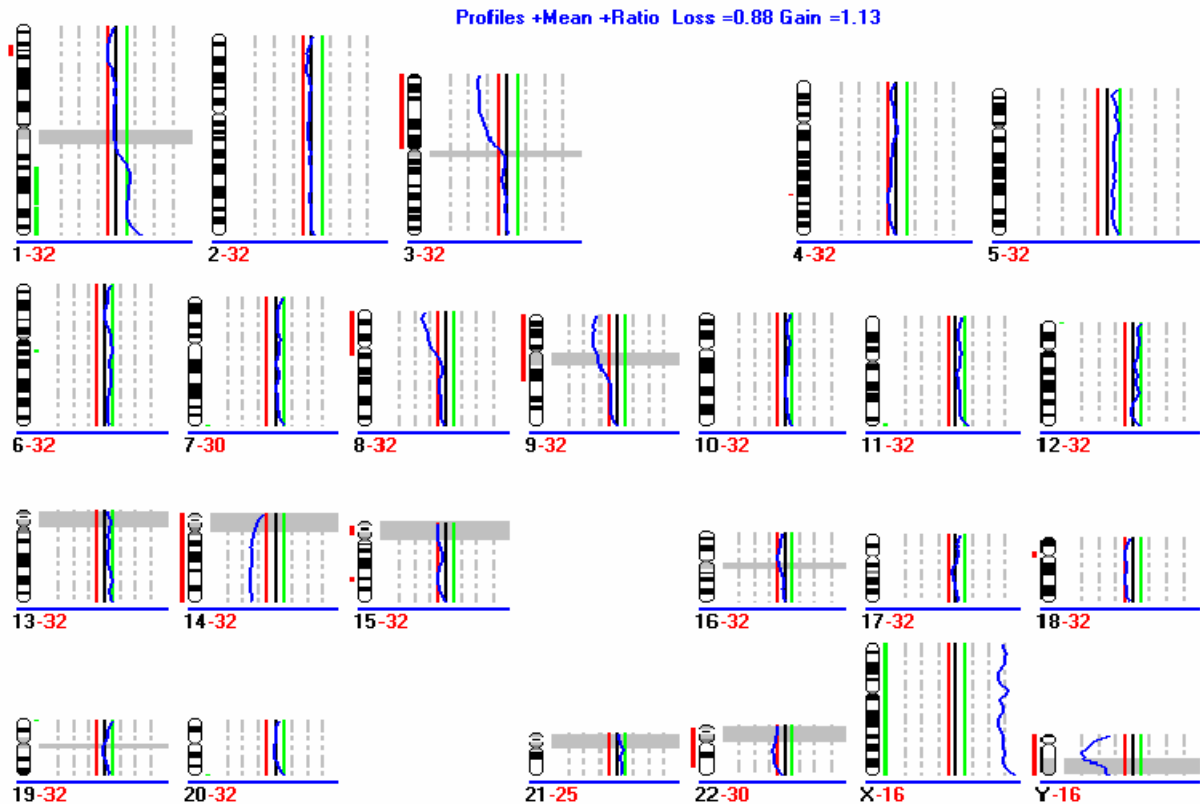


Abb.3.1.2. CGH-Profil der Zelllinie RCC-26 p45:
Aufgrund der Tetraploidie der Zellen wird der Schwellwert auf 0,88 für einen Verlust und 1,13 für einen Gewinn an Chromosomenmaterial gesetzt

Das CGH-Profil zeigt einen Verlust der Chromosomenarme 3p, 8p, 9p, 14q und 22q, sowie einen Gewinn für Chromosomenarm 1q.

Aufgrund der Tatsache, dass Chromosom X überrepräsentiert und Chromosom Y unterrepräsentiert ist, lässt sich das weibliche Geschlecht der Zelllinie ersehen (Referenz-DNA ist männlich und hat nur ein X Chromosom aber ein Y Chromosom; die Test-DNA ist weiblich und hat zwei X Chromosomen aber kein Y Chromosom; d.h. in der CGH äußert sich dies durch ein überrepräsentiertes X Chromosomen Profil und ein unterrepräsentiertes Y Chromosomen Profil).

3.1.2. Einzelzell CGH nach N. Stoecklein et al. 2002 und C. Klein et al. 1999

Am Institut für Immunologie, LMU München wurde das Protokoll aus der Publikation nach C. Klein et al. 1999 abgeändert und mit neuen Primern durchgeführt (siehe Kapitel 2.2.1. Seite 24).

Die Analyse der Zelllinie RCC-26 p45 erfolgte mit einzelnen Zellen.

Wie in Abbildung Abb.3.1.3. zu erkennen ist, unterscheidet sich das CGH-Profil der Einzelzellen von dem der klassischen CGH (siehe Abbildung Abb.3.1.2.). Neben den zu erwartenden Verlusten von Chromosom 3p, 8p, 9p und 14 und dem Zugewinn von Chromosom 1q traten zusätzliche Veränderungen in den Chromosomen 5, 6, 7, 11, 12 und 13 auf.

Ebenfalls auffällig ist der „kurvige“ Verlauf einzelner Profile, besonders bei Chromosom 1q, 11 und 12.

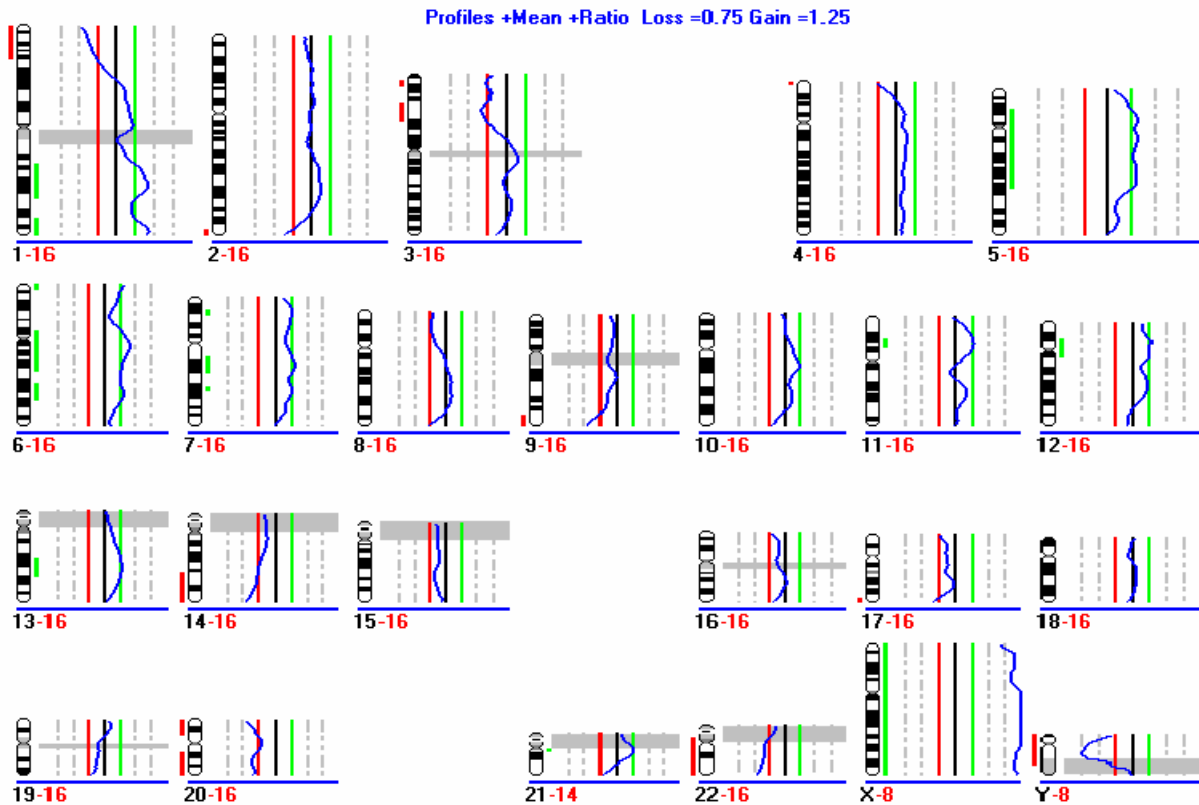


Abb.3.1.3. CGH-Profil einer einzelnen Zelle (Z4), aufgearbeitet nach N. Stoecklein et al. 2002

Ähnliche Profilmuster wurden in 9 weiteren Einzelzellanalysen trotz Protokollvariationen beobachtet. In Tabelle Tab.3.1.1. wird eine Aufstellung aller analysierten Zellen mit den verwendeten Protokollveränderungen gezeigt:

Zeile	Zelle	PCR Maschine	hot start	Verwendete Primer in Primär PCR	Markierungsart der Referenz-DNA	Ergebnis
1	Z1	Omnigene	ohne	LIB1 & ddMse11	Nicktranslation	„kurviger“ Verlauf des Profils
2	Z2	Omnigene	ohne	LIB1 & ddMse11	Nicktranslation	„kurviger“ Verlauf des Profils
3	Z3	Omnigene	ohne	LIB1 & ddMse11	Nicktranslation	„kurviger“ Verlauf des Profils
4	Z4	MJ Research	ohne	LIB1 & ddMse11	Nicktranslation	„kurviger“ Verlauf des Profils
5	Z5	MJ Research	ohne	LIB1 & ddMse11	Nicktranslation	„kurviger“ Verlauf des Profils
6	Z6	Omnigene	ohne	LIB1 & ddMse11	LIB1	„kurviger“ Verlauf des Profils
7	Z9	Omnigene	mit	LIB1 & ddMse11	LIB1	„kurviger“ Verlauf des Profils
8	Z12 1. Versuch	Omnigene	mit	LIB1 & ddMse11	LIB1	„kurviger“ Verlauf des Profils
9	Z12 2.Versuch	Omnigene	mit	LIB1 & ddMse11	LigMse21	„kurviger“ Verlauf des Profils

Tab.3.1.1. Ergebnis von 9 analysierten Einzelzellen der Zelllinie RCC-26 p45 nach N. Stoecklein et al. 2002

Nach dem ersten Auftreten dieses Musters war die Überlegung, es könnte an der PCR Maschine liegen, da für die Omnigene PCR Maschine die Proben mit Öl überlagert werden mussten. Allerdings trat bei der MJ Research PCR Maschine, die über eine Deckelheizung verfügt (siehe Tabelle Tab.3.1.1. Zeile 4 und 5), dasselbe Muster im Profil auf.

Als nächstes wurde die Markierung der Referenz-DNA überprüft. Sowohl die Markierung der Referenz-DNA mittels Nicktranslation (siehe Tabelle Tab.3.1.1. Zeile 1 bis 5) als auch die Markierung über die Adapter-Linker PCR nach C. Klein et al. 1999 (siehe Tab.3.1.1. Zeile 6 bis 9) führte zu keinem zufriedenstellenden Ergebnis.

Ein Vergleich dieses Protokolls mit dem Protokoll aus C. Klein et al. 1999 ergab ein ähnliches Ergebnis (siehe Tabelle Tab.3.1.2.). Das 1999 publizierte Protokoll unterscheidet sich in der Verwendung der Primer und der Markierungs PCR (siehe Kapitel 2.2.2. Seite 42).

Es stellte sich heraus, dass auch hier der kurvige Verlauf auftrat.

<u>Zeile</u>	<u>Zelle</u>	<u>PCR Maschine</u>	<u>hot start</u>	<u>Verwendete Primer in Primär-PCR</u>	<u>Markierungsart der Referenz-DNA</u>	<u>Ergebnis</u>
1	Z8	Omnigene	mit	LigMse12 & 21	LigMse21	„kurviger“ Verlauf des Profils
2	Z13	Omnigene	mit	LigMse12 & 21	LIB1	„kurviger“ Verlauf des Profils

Tab.3.1.2. Ergebnis von 2 analysierten Einzelzellen der Zelllinie RCC-26 p45 nach C. Klein et al. 1999

Zusätzlich zu den RCC-26 Zellen wurde ein Experiment mit einer Lymphozytenzelle durchgeführt. Das Profil zeigte ebenfalls den „kurvigen“ Verlauf.

Um auszuschließen, dass die Referenz-DNA für diesen „kurvigen“ Verlauf verantwortlich ist, wurden drei Experimente durchgeführt, die in Tabelle Tab.3.1.3. gezeigt werden. Dabei wurde dieselbe Plazenta DNA mit unterschiedlichen Protokollen bearbeitet und dann als Test-DNA gegen eine Referenz-DNA hybridisiert, die mit Nicktranslation markiert wurde und in vielen CGH Experimenten als Referenz diente.

Zeile	Test-DNA	Referenz-DNA	Ergebnis
1	Markieren der Plazenta DNA mit Biotin nach Adapter Linker Protokoll Primer: LIB1 & ddMse11	Markieren der Plazenta DNA mit Digoxigenin nach Nicktranslation	Tendenz zu „kurvigen“ Muster an Chr. 3, 4, 5, 6
2	Markieren der Plazenta DNA mit Digoxigenin nach Adapter Linker Protokoll Primer: LIB1 & ddMse11	Markieren der Plazenta DNA mit Biotin nach Nicktranslation	unauffälliges Profil
3	Markieren der Plazenta DNA mit Biotin nach Adapter Linker Protokoll Primer: MseLig12 & 21	Markieren der Plazenta DNA mit Digoxigenin nach Adapter Linker Protokoll Primer: LIB1 & ddMse11	unauffälliges Profil

Tab.3.1.3. Darstellung verschiedener Versuchsansätze zur Markierung der Test-DNA aus Plazenta Gewebe
Spalte 1 beschreibt die Markierung der Test-DNA, Spalte 2 die der Referenz-DNA
Zeile 1 bis 3 beschreiben die verschiedenen Hybridisierungsansätze

Zu erwähnen ist noch, dass die verwendete Referenz-DNA aus Plazenta mittels CGH nach dem klassischen Protokoll (nach Kallioniemi et al.1992; du Manoir et al. 1993; Joos et al. 1993) überprüft wurde und ein unauffälliges Profil zeigte.

Wie in Zeile 1 beschrieben wird, zeigt die Markierung der Plazenta DNA mit Biotin nach der Adapter-Linker Methode eine Tendenz zum „kurvigen“ Verlauf, wohingegen beim selben Versuchsansatz aber der Markierung der Plazenta DNA nach der Adapter-Linker Methode mit Digoxigenin diese Tendenz nicht zu sehen ist.

Dieser Wechsel der Markierung wurde an zwei Einzelzellen versucht, bei Zelle 12 war eine Verbesserung der Profile zu sehen, bei Zelle 6 nicht. Auszugsweise wird in Abbildung Abb.3.1.4. für die Chromosomen 5 und 12 das Profil der beiden Zellen gezeigt.

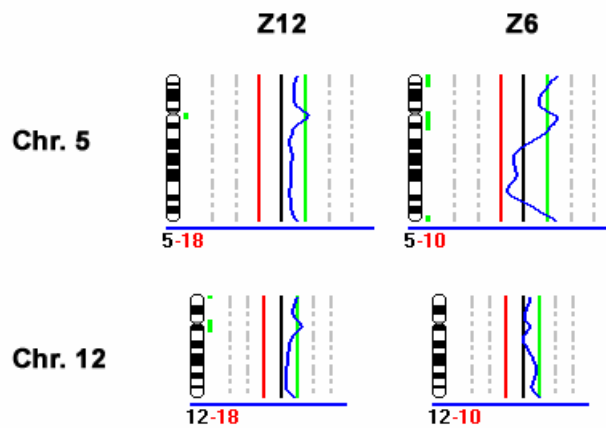


Abb.3.1.4. Darstellung der Chromosomen 5 und 12 der Zellen Z6 und Z12
 Beide Test-DNA's wurden mit Digoxigenin markiert

3.1.3. Abwandlungen des Protokolls für die Einzelzell CGH

3.1.3.1. Verlängerung der Elongation in der Primär-PCR (nach Thomas et al. 1999) (vergleiche Kapitel 2.2.1.6. Ansatz C; Seite 30)

Der erste Unterschied zwischen dem Standard Protokoll nach N. Stoecklein et al. 2002 und dem Protokoll mit einer verlängerten Elongationszeit nach Thomas et al. 1999, zeigte sich bereits nach der Primär-PCR am Agarose Gel (siehe Abbildung Abb.3.1.5.).

Der „Gelschmier“ der DNA-Produkte (hier beispielhaft L1 und L2) nach Standard Protokoll liegt immer zwischen 200 und 800 bp Länge (Abb.3.1.5. Reihe 4 und 5). Wohingegen nach der Verlängerung der Elongationszeit (hier beispielhaft Z21 und Z22) der „Gelschmier“ deutlich höher liegt und auch stärker erscheint (Abb.3.1.5. Reihe 2 und 3).

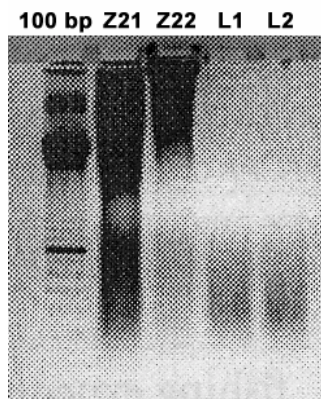


Abb.3.1.5. 1% Agarose Gel nach der Primär-PCR
1. Reihe: 100 base pair Ladder stock;
2. & 3. Reihe: 2 Primär-PCR Produkte (Z21 & Z22) aus Ansatz mit verlängerter Elongationszeit
4. & 5. Reihe: 2 Primär-PCR Produkte (L1 & L2) aus Standard Ansatz

Die Markierung der DNA nach dem Einzelzell Protokoll zeigte erneut einen unruhigen Verlauf (siehe Abbildung Abb.3.1.6. A).

Eine Verbesserung stellte sich erst ein, nachdem das Primär-PCR Produkt mittels DOP PCR erneut amplifiziert wurde und anschließend eine Markierung durch Nicktranslation erfolgte (Abb.3.1.6. B).

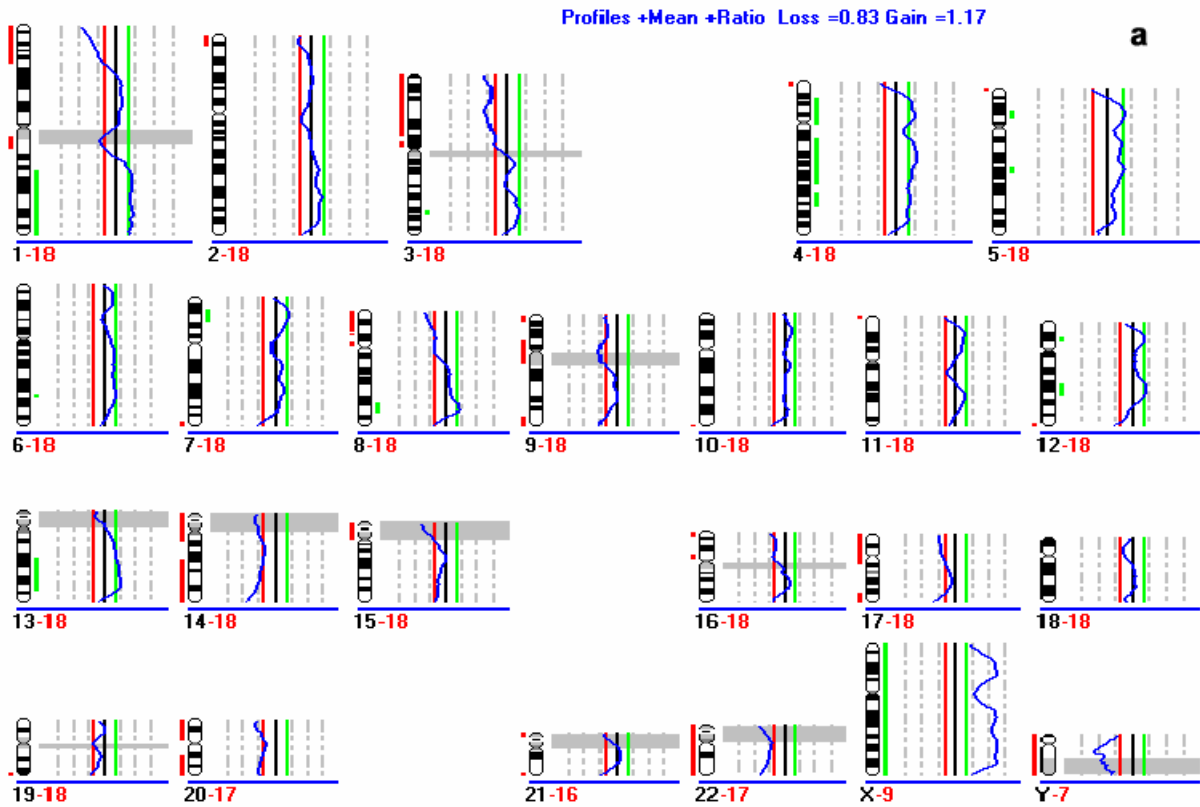


Abb.3.1.6. A Zelle Z22 amplifiziert mit verlängerter Elongationszeit nach Thomas et al. 1999
Markieren der DNA nach Einzelzell Protokoll

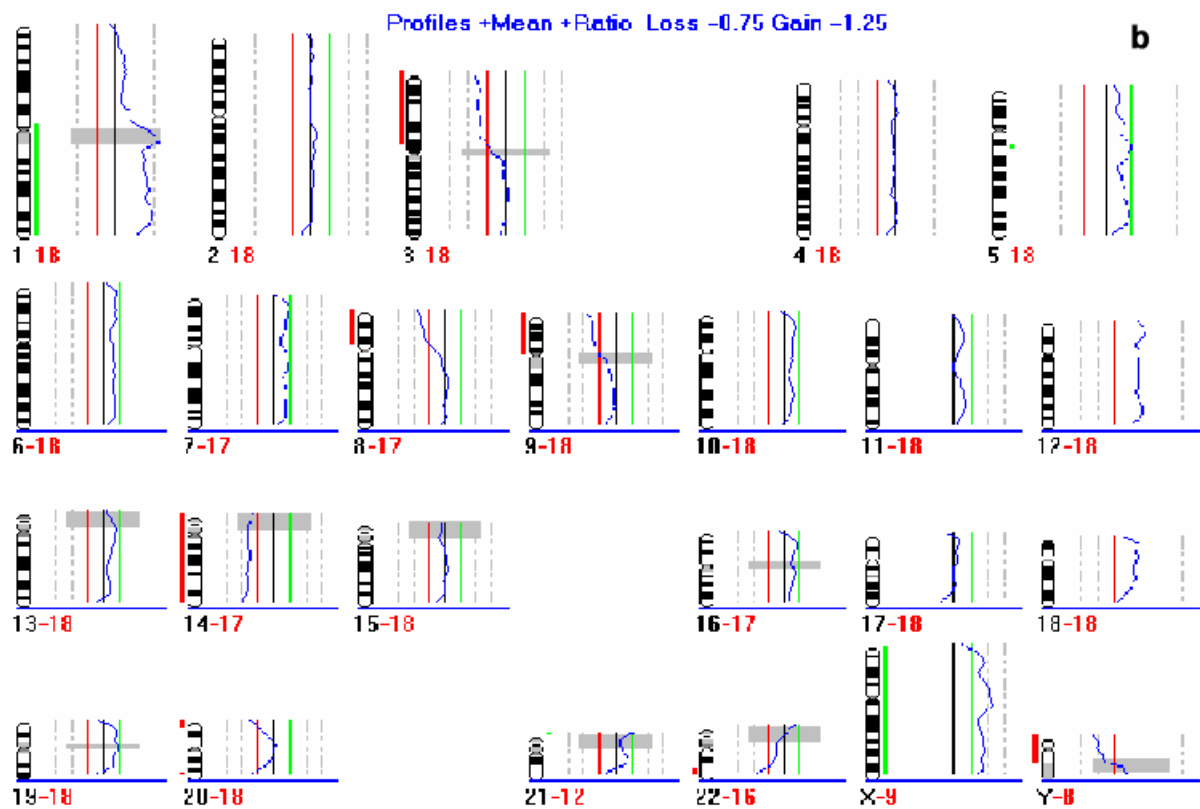


Abb.3.1.6. B Zelle Z22 amplifiziert mit verlängerter Elongationszeit nach Thomas et al. 1999
Markieren der DNA mit Nicktranslation nach vorangegangener DOP-PCR des Primär-PCR Produktes

3.1.3.2. Zugabe von Formamid in die Primär-PCR (vergleiche Kapitel 2.2.1.6. Ansatz B; Seite 29)

An den „kurvigen“ Profilen war zu erkennen, dass die unerwarteten Veränderungen eng mit den R-Banden korrelieren. Diese Experimente erweckten den Eindruck, dass das Einzelzell-PCR Protokoll bestimmte Banden präferentiell amplifizieren könnte (genauer siehe Diskussion Kapitel 4.1.1.2. Seite 167).

Eine Überlegung war nun, dass durch die Zugabe von Formamid eine homogenere Vermehrung der DNA gewährleistet wird.

Bei drei Einzelzellen (Z23-25) wurden verschiedene Mengen an Formamid in die Primär und Markierungs-PCR gegeben (vergleiche Kapitel 2.2.1.6. B; Seite 29 und 2.2.1.7. B; Seite 34). Abbildung Abb.3.1.7. zeigt für die Chromosomen 3,5, und 12 die jeweiligen Profile.

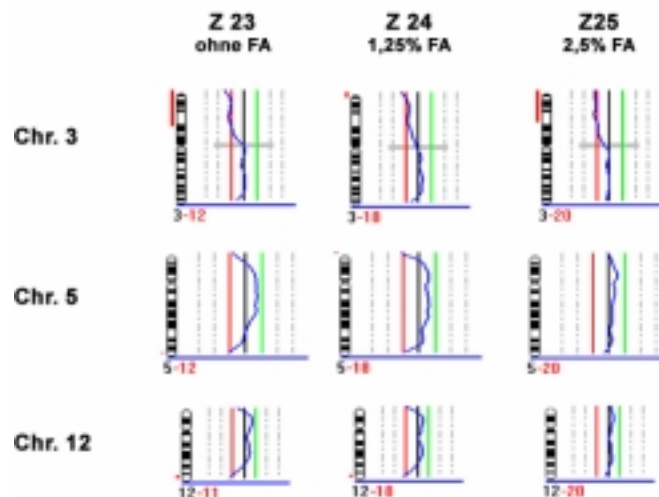


Abb.3.1.7. Vergleich der Einzelzell CGH-Profile bei unterschiedlicher Zugabe von Formamid in die Primär- und Markierungs PCR
Profile für Chromosom 3 (Zeile 1), Chromosom 5 (Zeile 2), Chromosom 12 (Zeile 3)
Profile für Zelle 23 ohne Formamid (Spalte 1); für Zelle 24 1,25% Formamid (Spalte 2) und Zelle 25 2,5% Formamid (Spalte 3)

Durch die Zugabe von 2,5 % Formamid in die beiden PCR-Ansätze konnte ein Profil errechnet werden, dass mit dem klassischen CGH-Profil übereinstimmte und den „kurvigen“ Verlauf nicht mehr zeigte. Wie in Abbildung Abb.3.1.8. zu erkennen ist, zeigt diese einzelne Zelle den erwarteten 3p, 8p, 9p, 14-er und 22-er Verlust.

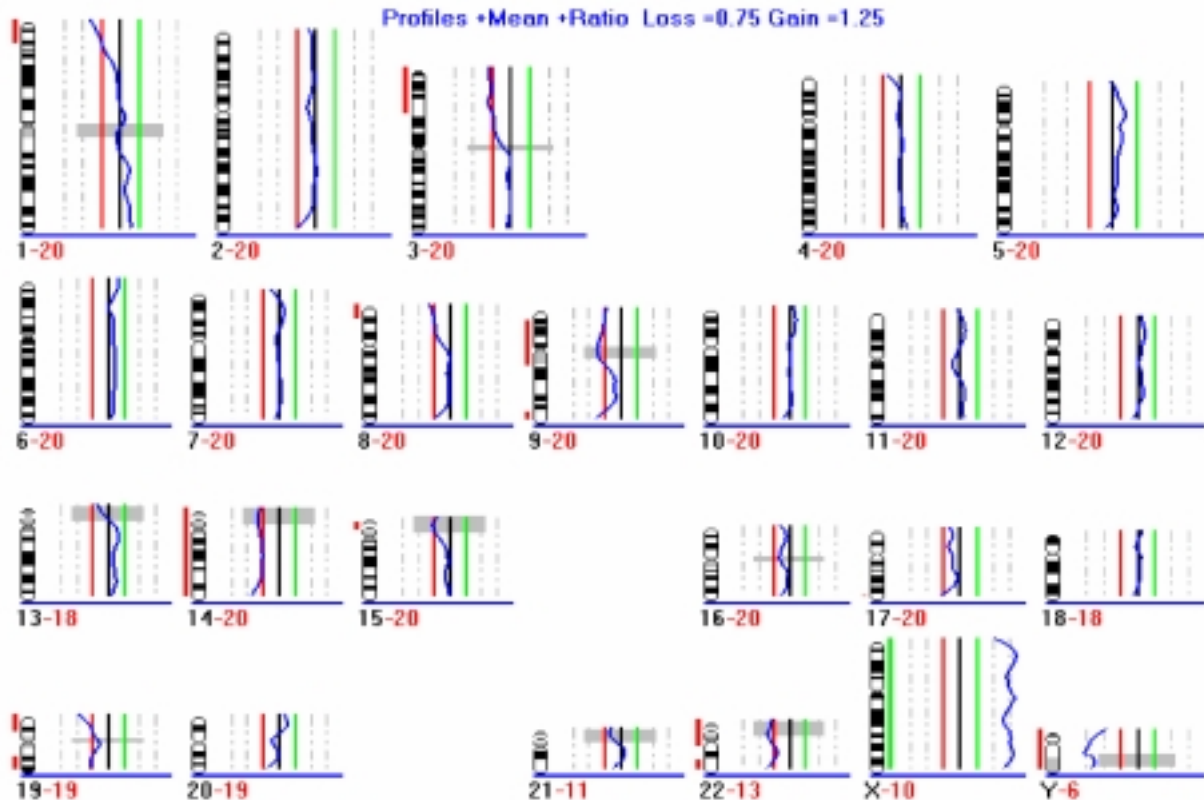


Abb.3.1.8. Profil einer Einzelzelle nach Zugabe von 2,5% Formamid in die Primär und Markierungs PCR
 Zu erkennen: Verlust von 3p, 8p, 9p, 14 und 22, überrepräsentiertes X und unterrepräsentiertes Y bestätigen das weibliche Geschlecht

Im Folgenden sollte anhand der Zelllinie RCC-26 die Reproduzierbarkeit dieses neuen Protokolls gezeigt werden.

3.1.4. Reproduzierbarkeit des Einzelzell CGH Protokolls mit Formamid bei der Analyse von Einzelzellen aus der Zelllinie RCC-26 p75

Für diese Untersuchung wurde die Zelllinie RCC-26 aus der Passage 75 mit M-FISH und CGH analysiert, anschließend wurden 16 Zellen durch Mikromanipulation vereinzelt.

Das M-FISH Ergebnis wird in einem zusammengefassten Karyotyp dargestellt, und zeigt das diese Zelllinie in dieser Passage 75 hypertriploid ist:

73~79, XXXX, der(1):(1p31→1q?:1q?→1?)x2[9],-1[4], +1[5],
 +der(3;8)(8qter→8q11::3q11→3qter)[9], -3[9],
 +der(4?)[4], -4[1], +5[6], +7[9], -8[8],
 i(9p)(9pter→9p11::9p11→9pter)[9], del(9):(9p1→9qter)[1],
 del(9):(9p1→9qter)x2[8], +10[9], -13[1], -14[8], -14-14[1], +16[9], -17[1],
 +17[6], -18[9], +19[8], +19+19[1], +20[7], +20+20[1], +21[8], +22[8], [cp9]

Das CGH Ergebnis zeigt Verluste der Chromosomen 3p, 8p, 9p, 14, 18 und Y. Überrepräsentierte Bereiche sind bei Chromosom 1, 5, 7, 16, 17, 19, 22 und X zu finden (siehe Abbildung Abb.3.1.9.)

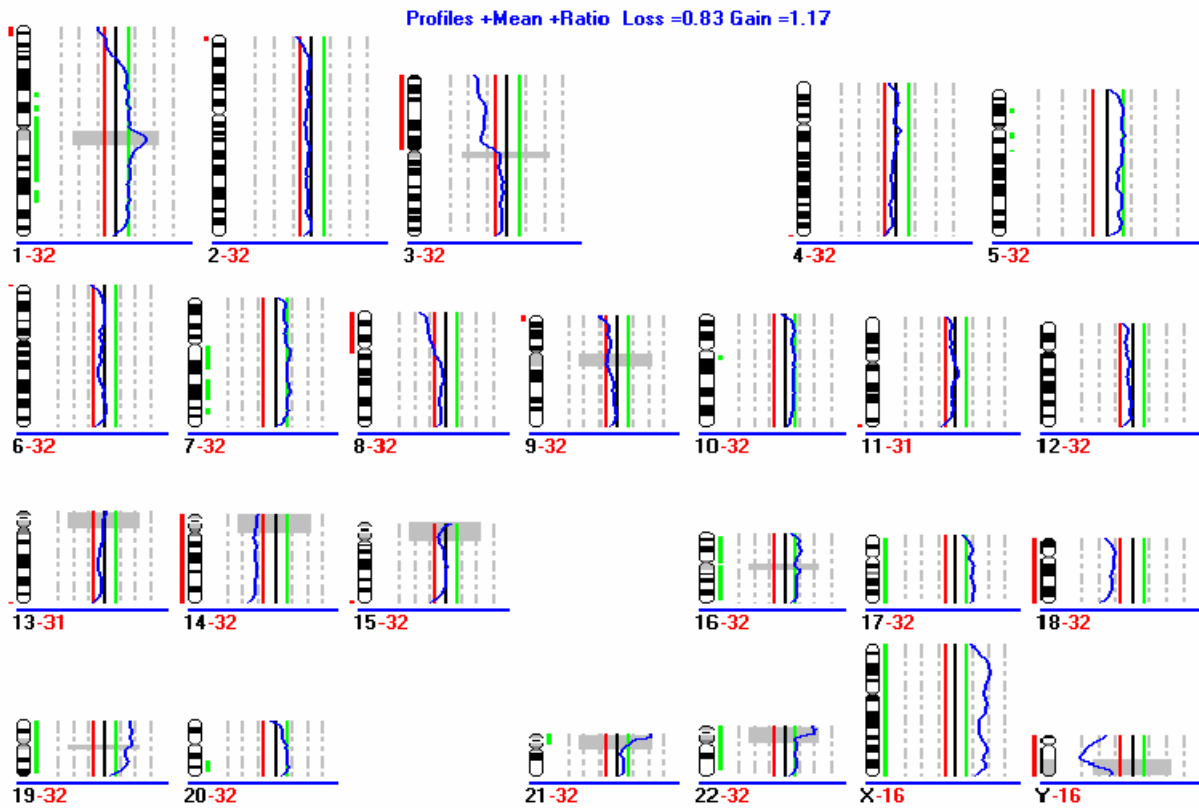


Abb.3.1.9. Profil einer klassischen CGH der Zelllinie RCC-26 p75
 Zu erkennen: Verlust von 3p, 8p, 9p, 14 und 18, Amplifikation von 1q, 5, 7, 10, 16, 17, 19, 20, und 22
 überrepräsentiertes X und unterrepräsentiertes Y bestätigen das weibliche Geschlecht

Von den 16 vereinzelt Zellen haben 10 Zellen das erwartete Profil aus der Einzelzell CGH ergeben (62,5%).

Dabei wurde die Test-DNA mit Digoxigenin markiert, die Referenz mit Biotin.

Das Ergebnis der 10 Zellen wird in einem zusammengefassten Profil, das nur die Gewinne und Verluste zeigt, dargestellt (Abbildung Abb.3.1.10.).

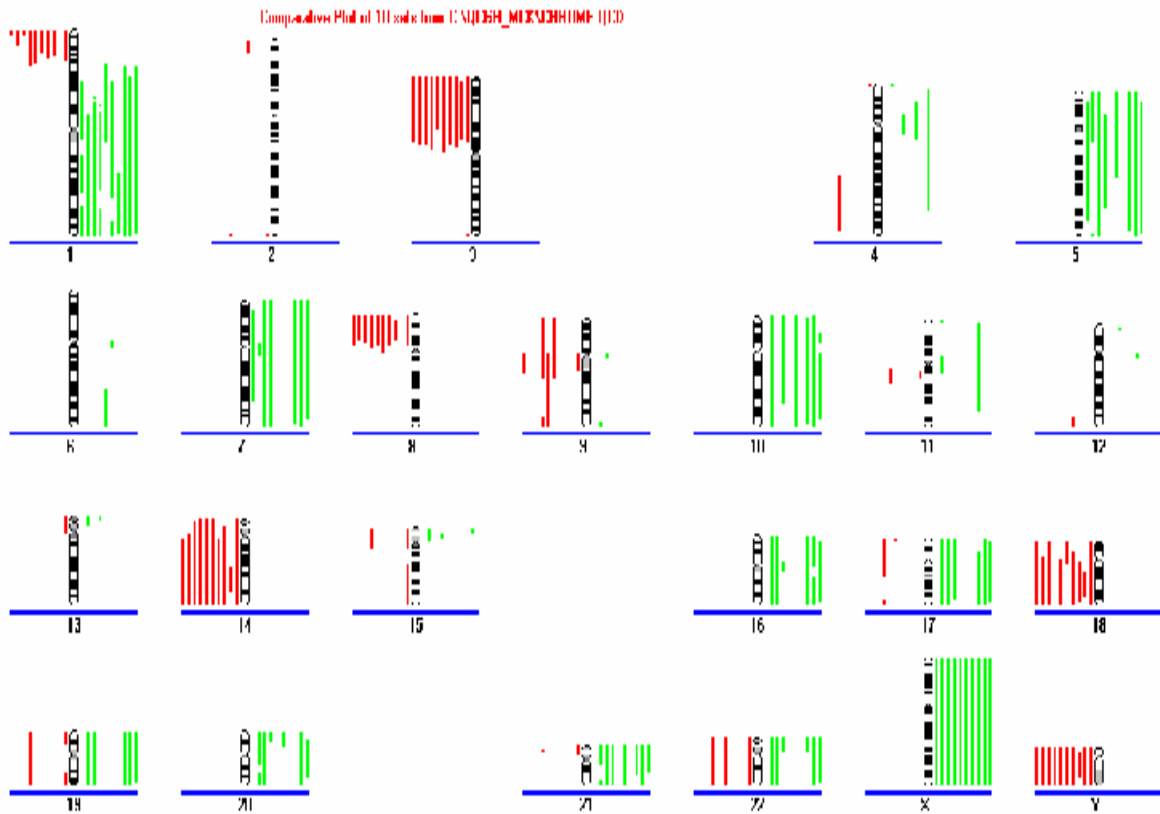


Abb.3.1.10. Zusammengefasstes Profil von 10 CGH Ergebnissen aus Einzelzellen der Zelllinie RCC-26 p75
Die Zellen wurden mit einer Nadel des Mikromanipulators vereinzelt

Bei den Profilen der sechs Zellen, die nicht das erwartete Ergebnis vorwiesen, konnten ebenfalls Unterschiede gesehen werden. Zwei analysierte Zellen zeigten zusätzlich zu den erwarteten Veränderungen ein „kurviges“ Profil, wie bereits vorher beschrieben. Die anderen vier zeigten ein männliches Profil, so dass hier von einer Kontamination ausgegangen werden kann.

Um zu zeigen, dass dieses System von der Art der Markierung (ob Biotin oder Digoxigenin) unabhängig ist, wurden 3 Zellen mit Biotin und Digoxigenin markiert und analysiert. Exemplarisch wird das Biotin und das Digoxigenin von Z7 gezeigt (siehe Abbildung Abb.3.1.11.).

In den Fällen Z25 und Z1 konnten ähnliche Profile erzeugt werden.

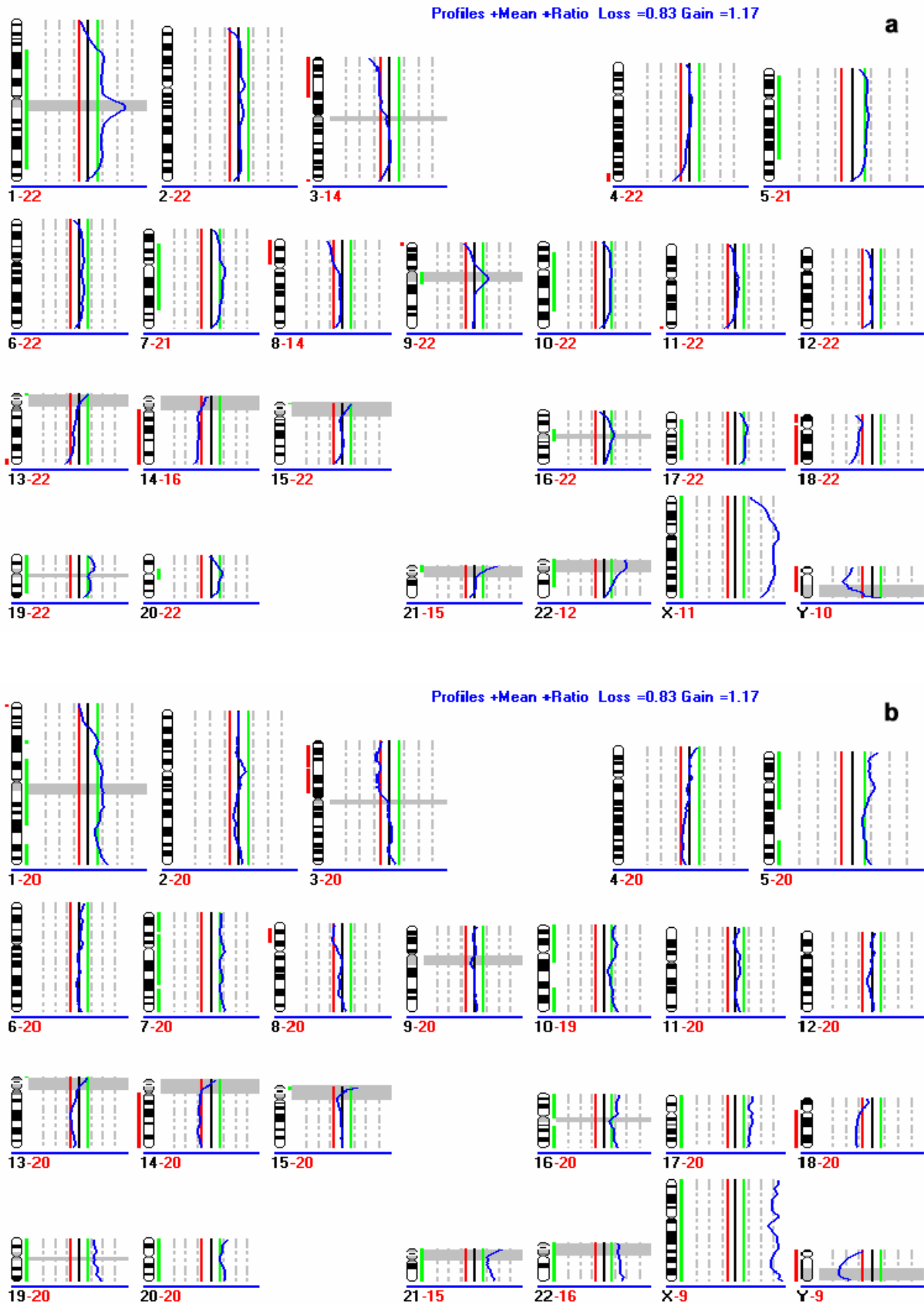


Abb.3.1.11. Profile der Einzelzelle Z7 der Zelllinie RCC-26 p75
 Bild a) Test-DNA mit Biotin markiert, Referenz mit Digoxigenin
 Bild b) Test-DNA mit Digoxigenin markiert, Referenz mit Biotin

3.1.5. Analyse der Zelllinie RCC-26 mittels Einzelzell CGH unter Verwendung des PALM MicroBeam Systems

Um Zellen mit dem PALM MicroBeam System aus einem Verbund zu lösen, wird auf den Objektträger eine Folie gespannt, und darauf die Zellen gegeben.

Die Firma P.A.L.M. Mikrolaser Technologies AG bietet hierzu zwei Fabrikate an, die POL- und PEN-Folie.

Die Zellen wurden mittels Zytopsin Zentrifugation auf die Folien gebracht. Dafür wurde aus dem Institut für Tumormunologie eine neue RCC-26 Kultur organisiert, deren Passagezahl nicht eindeutig festgelegt werden konnte. Allerdings reichte das Material nicht für eine M-FISH Analyse aus.

Aus diesem Grund musste der Ploidiegrad dieser Passage anhand der Interphase Daten mit den Zentromernahen YAC-Sonden ermittelt werden (Ergebnis siehe Kapitel 3.2.2. Seite 114).

In dieser Interphase Analyse zeigte die Sonde für 2p in 13 von 14 Fällen 3 Signale.

Aufgrund vorangegangener zahlreicher Analysen dieser Zelllinie konnte gezeigt werden, dass Chromosom 2 keinerlei strukturelle, noch numerische Veränderungen aufweist, so dass anzunehmen ist, dass diese Passage triploid ist.

Daher werden im Folgenden die Schwellwerte für die CGH-Profile auf 0,87 für einen Verlust und 1,17 für einen Gewinn gesetzt.

3.1.5.1. Ergebnis der klassischen CGH aus RCC-26

Ebenso wie in den vorangegangenen Passagen zeigte die CGH der RCC-26 DNA die erwarteten Veränderungen (siehe Abbildung Abb.3.1.12.)

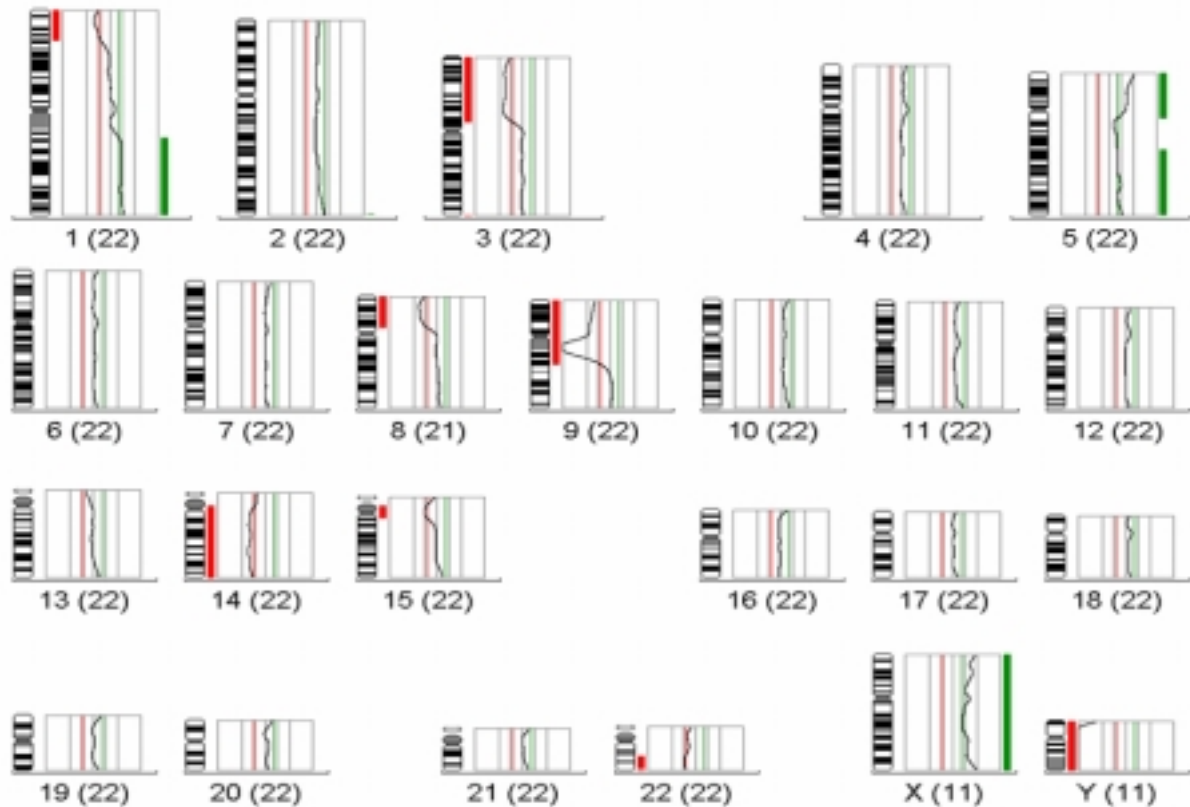


Abb.3.1.12. Profil der Zelllinie RCC-26 aus klassischer CGH

3.1.5.2. Ergebnisse mit der POL-Folie

Insgesamt wurden 21 einzelne Zellen und zweimal je fünf und zehn Zellen katapultiert und nach den unter Kapitel 2.2.3. (Seite 46) aufgeführten Protokollen aufgearbeitet.

In keinem dieser Fälle kam es zu einem positiven Hybridisierungsergebnis, obwohl nach der Primär-PCR auf dem Agarose Gel ein Produkt zu sehen war.

3.1.5.3. Ergebnisse mit der PEN-Folie

Die ersten Versuche mit der PEN-Folie ergaben aus acht katapultierten einzelnen Zellen bei zwei Zellen das RCC-26 spezifische Profil, bei drei Zellen ein männliches Profil, bei einer eine unspezifische Hybridisierung mit nicht „RCC-spezifischen“ Veränderungen und zwei wurden nicht hybridisiert.

Allerdings sollte erwähnt werden, dass dabei der Deckel der PCR-Gefäße nicht vollständig mit Puffer gefüllt war (siehe Diskussion Kapitel 4.1.3. Seite 170).

Nachdem dieser Fehler behoben war, wurden vermehrt Profile errechnet, die männlich waren und somit die Wahrscheinlichkeit einer Kontamination bestand.

Daraufhin wurden die benutzten PCR-Gefäße vor dem Katapultieren für 30 Minuten unter UV-Licht von DNA gereinigt.

Unter diesen Bedingungen wurden 16 vereinzelte Zellen verarbeitet und hybridisiert. Davon zeigten zehn Profile ein „RCC-spezifisches“ Muster (62,5%), zwei ein weibliches, aber nicht die zu erwartenden Veränderungen, eines ein „RCC-spezifisches“ mit kurvigen Profilverlauf und drei mit männlichem Profil (Y Chromosom auf der Mittellinie).

In Abbildung Abb.3.1.13. wird ein zusammengefasstes Karyogramm von 10 Einzelzellen dargestellt.

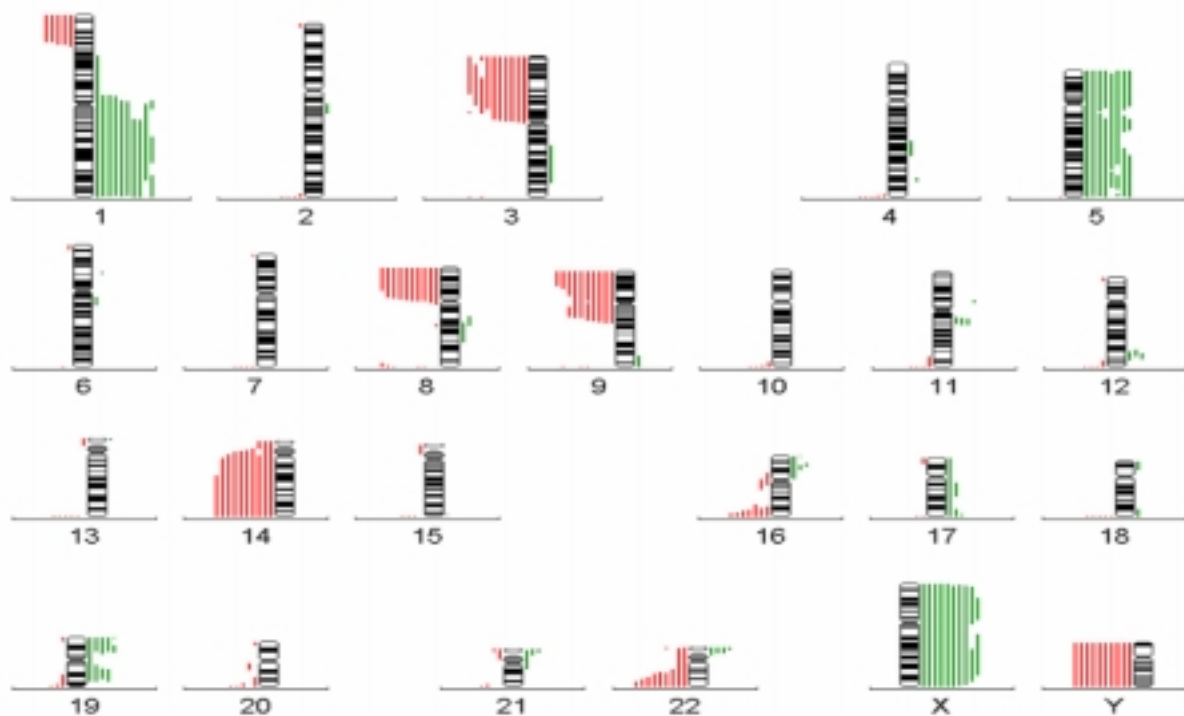


Abb.3.1.13. Zusammengefasstes Profil von 10 CGH Ergebnissen aus Einzelzellen der Zelllinie RCC-26 p75.
Die Zellen wurden einzeln mit dem LPC-System der Firma P.A.L.M. Mikrolaser katapultiert

3.1.5.4. Vergleich der unterschiedlichen Markierungsmethoden anhand eines Primär PCR Produktes einer Einzelzelle von RCC-26

Der Ansatz „1PEN_weit1“ wurde mit drei verschiedenen Markierungsansätzen hybridisiert. Dies waren die Markierungen:

- Nach Einzelzell Protokoll (Kapitel 2.2.3.8. Ansatz A; Seite 52), Abbildung Abb.3.1.14. A
- Amplifikation nach Snijder et al. 2001 (Kapitel 2.2.3.8. Ansatz B; Seite 53) mit anschließender Markierung durch Nicktranslation, Abbildung Abb.3.1.14. B
- Amplifikation nach Snijder et al. 2001 als Markierungs PCR (Kapitel 2.2.3.8. Ansatz B; Seite 53), Abbildung Abb.3.1.14. C

Die Profile aller drei Markierungsarten zeigten ähnliche Ergebnisse:

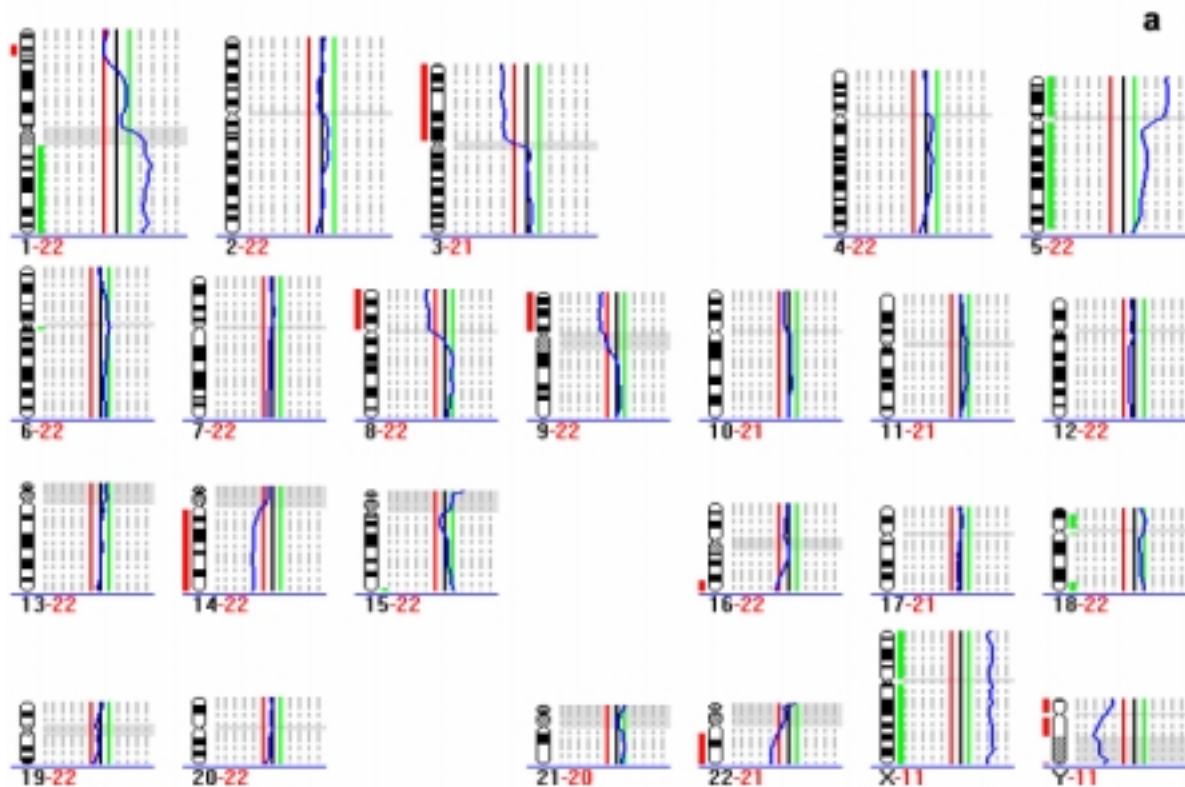


Abb.3.1.14.A Einzelzell CGH-Profil von „1PEN_weit1“
Die Zelle wurde nach dem Einzelzell Protokoll markiert (siehe Kapitel 2.2.3.8. Ansatz A; Seite 52)

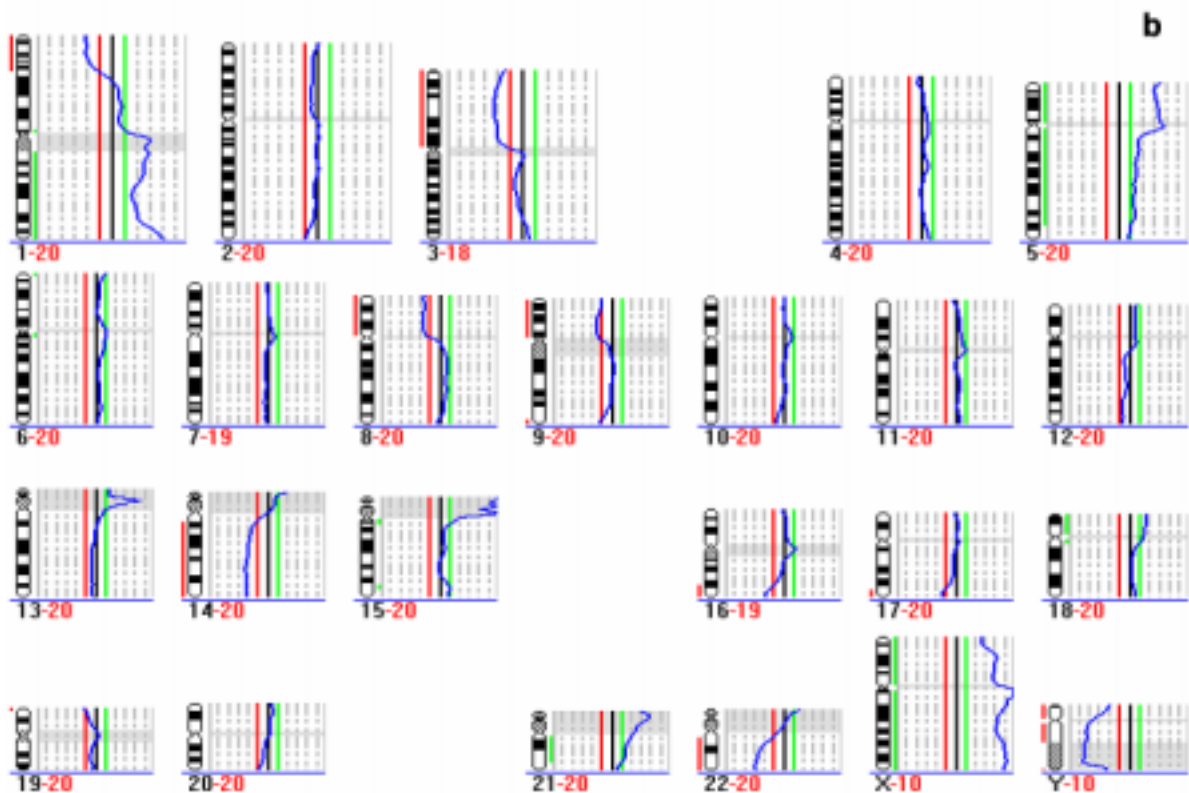


Abb.3.1.14.B Einzelzell CGH-Profil von „1PEN_weit1“
 Amplifikation nach Snijder et al. 2001 mit anschließender Markierung durch Nicktranslation
 (Kapitel 2.2.3.8. Ansatz B; Seite 53)

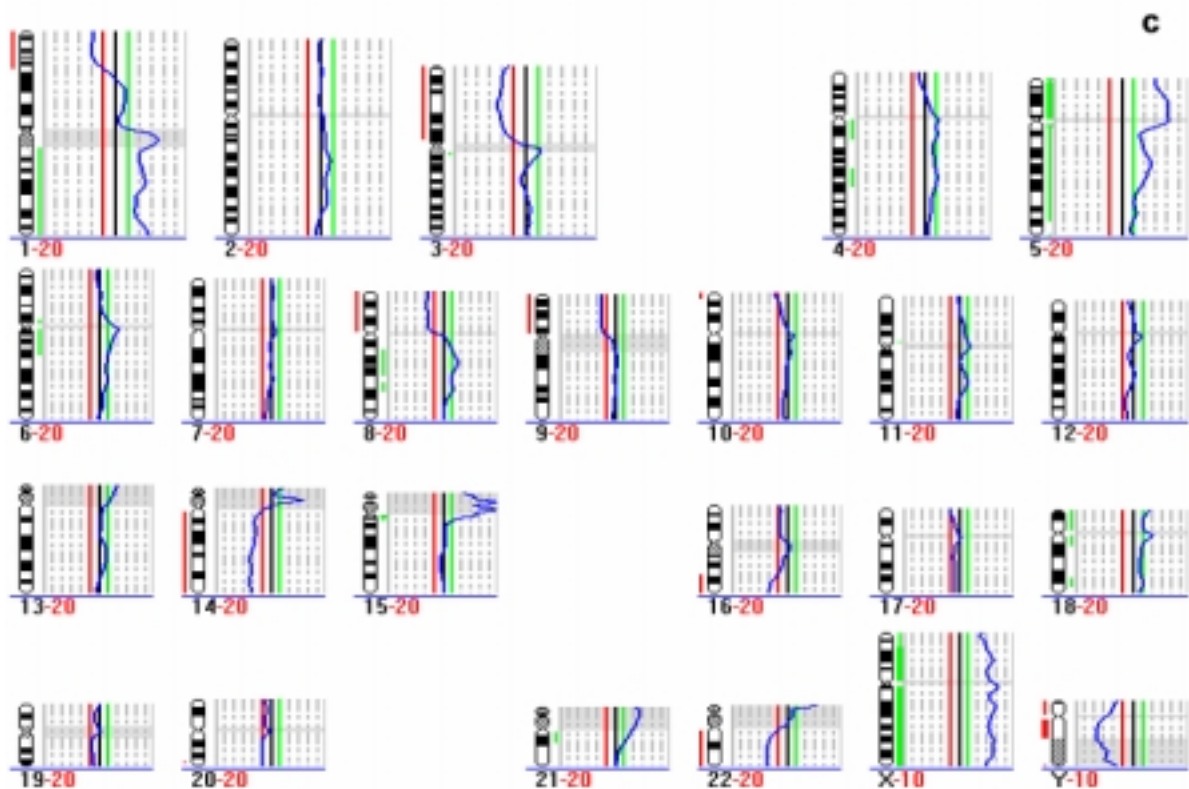


Abb.3.1.14.C Einzelzell CGH-Profil von „1PEN_weit1“
 Amplifikation nach Snijder et al. 2001 als Markierungs PCR (Kapitel 2.2.3.8. Ansatz B; Seite 53)

3.2. Analyse disseminierter Tumorzellen mittels Interphase Zytogenetik

3.2.1. Anwendung verschiedener Nachweismethoden für den A45 B/B3 Antikörper bei gleichzeitiger Hybridisierung von Zentromersonden

Vor der Hybridisierung der regionenspezifischen Sonden auf positiv-gefärbte disseminierte Tumorzellen wurden verschiedene Nachweismethoden für den pan-Zytokeratin Antikörper A45 B/B3 ausgetestet.

Dabei wurde neben der Genauigkeit der Färbung auch die Möglichkeit einer simultanen Hybridisierung von Zentromersonden bei jeder Nachweisart untersucht.

Hierfür wurden in Zusammenarbeit mit dem Institut für Tumorimmunologie, Großhadern mehrere „Blindversuche“ durchgeführt, um die Effizienz der Färbungen zu testen.

Die Hybridisierung erfolgte mit einem im Labor angefertigten Zentromer-Sondensatz (Zentromer-Testmix), dessen Herstellung in Kapitel 2.3.3.1. (Seite 65) beschrieben wird.

3.2.1.1. Austesten verschiedener Nachweissysteme in Blindversuchen

A) Unterschiedliche Nachweissysteme an einem Patienten ausgetestet

Bei diesem Versuch wurden drei Zytospins desselben Patienten mit NBT/BCIP, Neufuchsin und Fast Blue analysiert. Ein Zytospin wurde ohne vorherige Antikörperinkubation mit NBT/BCIP gefärbt.

Zuvor ergab die Analyse am Institut für Tumorimmunologie in Großhadern, dass der Patient „Bi-2041“ (Ild. Nummer 2041) negativ für A45 B/B3 war.

In Tab.3.2.1. werden die Ergebnisse dargestellt:

Cytospin (Pat. „Bi-2041“)	Färbung	Ergebnis
1	NBT/BCIP mit Antikörperinkubation	25 positive Zellen
2	NBT/BCIP ohne Antikörperinkubation	10 positive Zellen
3	Neufuchsin mit Antikörperinkubation	keine positive Zelle
4	Fast Blue mit Antikörperinkubation	keine positive Zelle

Tab.3.2.1. Analyse eines Patienten mit 3 verschiedenen Nachweissystemen

B) Analyse von Knochenmark mit sechs verschiedenen Anzahlen an beigemischten Zytokeratin positiven Zellen (HT-29)

Am Institut für Tumormimmunologie wurden sechs verschiedene Verdünnungen an HT-29 Zellen in Patientenknochenmark untergemischt. Die verschiedenen Zytospinpräparate wurden mit Buchstaben gekennzeichnet und zu uns geschickt, ohne Kenntnis über die beigemischte Anzahl. HT-29 ist eine Prostatakarzinom-Zelllinie, die Zytokeratin positiv ist und daher bei der Inkubation mit A45 B/B3 positive Ergebnisse liefert.

Es folgte die A45 B/B3 Antikörperinkubation und der anschließende Nachweis mit NBT/BCIP, Neufuchsin und dem direkt konjugierten A45 B/B3-Cy3.

Tabelle Tab.3.2.2. zeigt das Ergebnis:

	ca. 100 HT-29 beigemischt	ca. 25 HT-29 beigemischt	ca. 300 HT-29 beigemischt	ca. 50 HT-29 beigemischt	ca. 400 HT-29 beigemischt	ca. 200 HT-29 beigemischt
NBT/BCIP	> 273	> 123	> 187	> 136	> 168	> 201
Neufuchsin	24	4	166	15	> 179	> 73
A45-Cy3	n.n.	n.n.	269	54	n.n.	137

Tab.3.2.2. Blindversuch mit verschiedenen Mengen an untergemischten HT-29 Zellen ins Knochenmark
n.n.: aufgrund zu starken Hintergrunds konnte keine Auswertung erfolgen

Diese Ergebnisse zeigen, dass NBT/BCIP stets eine zu hohe, Neufuchsin eine zu niedrige Zellzahl ergab. A45-Cy3 hingegen scheint die geringste Anzahl an falsch Positiven bzw. Negativen zu haben.

C) Analyse von peripherem Blut mit drei verschiedenen Mengen an beigemischten Zytokeratin positiven Zellen (HT-29)

Dieser Versuch entsprach dem Versuch aus Punkt B. Nur wurden diesmal unterschiedliche Mengen an HT-29 Zellen in peripheres Blut gegeben und anschließend analysiert (siehe Tab.3.2.3.).

	ca. 25 HT-29	ca. 50 HT-29	ca. 100 HT-29
NBT/BCIP	14	12	45
Neufuchsin	2	0	8
A45 B/B3-Cy3	36	82	87
A45 B/B3-FluorX	32	39	104

Tab.3.2.3. Blindversuch mit verschiedenen Mengen an untergemischten HT-29 Zellen in peripherem Blut

Hier ist das Ergebnis von NBT/BCIP überraschend, da im Vergleich zu den anderen Versuchen zu wenige positive Zellen vorkommen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die direkt markierten Antikörper die genauesten Ergebnisse ergeben haben.

D) Durchführung zweier negativ Kontrollen für A45 B/B3-Cy3

Um möglicherweise unspezifische „falsch-positive“ Ergebnisse aus der Markierung mit A45 B/B3-Cy3 auszuschließen, wurden zwei negativ Kontrollen mit den Antikörpern anti digoxigenin Cy3 und goat anti rat Cy3 anstelle des A45 B/B3-Cy3 Antikörpers durchgeführt. Dabei wurde je ein Zytospin des Patienten Fi_2046 mit den Antikörpern anti digoxigenin Cy3 und goat anti rat Cy3 inkubiert, zwei Zytospins mit A45 B/B3-Cy3. Dabei kamen Zytospins zum Einsatz, die keine untergemischten Zellen aus Zelllinien hatten. Tabelle Tab.3.2.4. zeigt das Ergebnis:

Eingesetzter Antikörper	Zahl der Cy3 positiven Zellen
A45 B/B3-Cy3 (1:500)	147
anti digoxigenin Cy3 (1:200)	16
A45 B/B3-Cy3 (1:500)	35
goat anti rat Cy3 (1:100)	19

Tab.3.2.4. Ergebnis zu Versuch "negativ Kontrollen"

Diese Ergebnisse zeigen, dass eine gewisse Anfälligkeit bei diesen Knochenmarkspräparaten zu falsch-positiven Ergebnissen vorhanden ist.

3.2.1.2. Austesten verschiedener Nachweissysteme in Bezug auf eine Hybridisierungseffizienz

A) Hybridisieren des Zentromer-Testmixes auf NBT/BCIP positive Zellen

Diese Untersuchung wurde an drei verschiedenen Zytospins bei ca. 30 NBT/BCIP positiven Zellen durchgeführt.

Die Hybridisierung des Testmixes zeigte in keinem Fluorochromkanal zufriedenstellende Ergebnisse (siehe Abbildung Abb.3.2.1.). In manchen NBT/BCIP positiven Zellen konnte nur in den indirekt markierten Kanälen (FITC, Cy3.5 und Cy5.5) Signale erkannt werden, wohingegen in den direkt markierten Fluorochromen (DEAC, Cy3 und Cy5) nie Signale zu sehen waren. Zusätzlich zeigte das NBT/BCIP System eine starke Autofluoreszenz im Cy5-Kanal (siehe Abbildung Abb.3.2.1.).

Ebenso schwierig erwies sich die Analyse von NBT/BCIP negativen Zellen. Auch hier konnte selten ein Signal erkannt werden.

Die Umstellung der Vorbehandlung der Präparate nach dem Nachweis der A45 B/B3 positiven Zellen zeigte keine Verbesserung der Hybridisierung. Sowohl ein verlängerter Pepsin-Verdau in einer höheren Konzentration, als auch ein Proteinase K Verdau konnten die Ergebnisse nicht verbessern. Teilweise waren alle umliegenden Zellen bereits vom Verdau stark angegriffen, wohingegen sich die NBT/BCIP Färbung nicht veränderte.

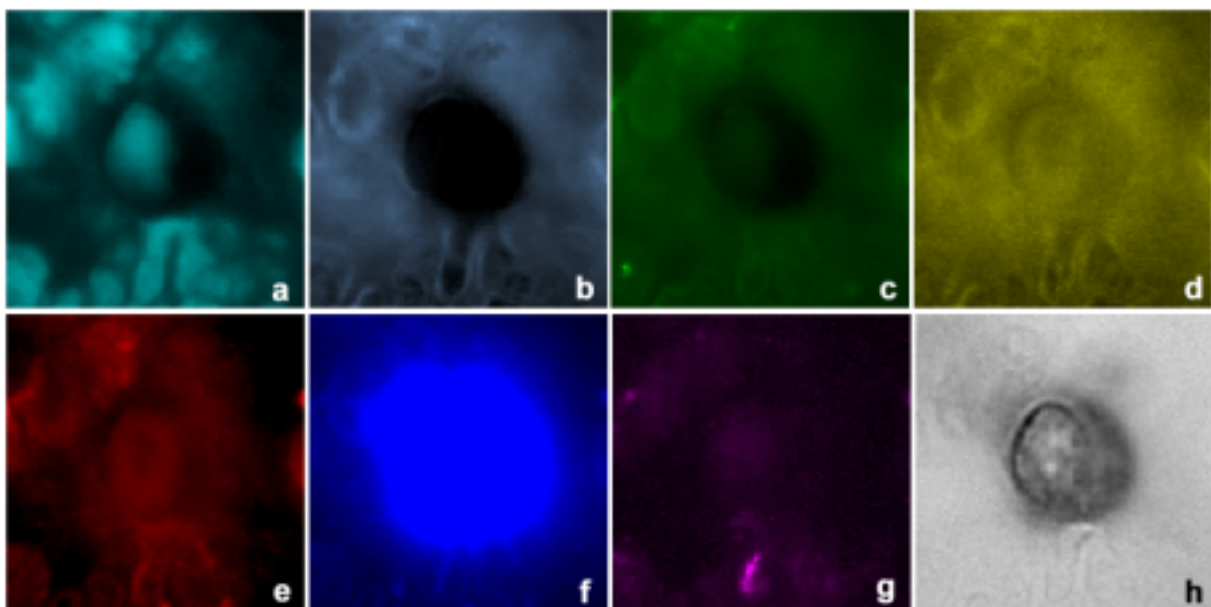


Abb.3.2.1. NBT/BCIP positive Zelle nach der Hybridisierung des Zentromer-Testmixes:
a) DAPI, b) DEAC, c) FITC, d) Cy3, e) Cy3.5, f) Cy5, g) Cy5.5, h) Aufnahme im Durchlicht

B) Hybridisieren des Zentromer-Testmixes auf Neufuchsin positive Zellen

Neben der Standardvorbehandlung für die Hybridisierung von Zentromersonden erfolgte der Pepsin- und Proteinase K- Verdau ebenfalls in unterschiedlichen Konzentrationen und Längen.

Zusätzlich wurden ausgewählte Zytospins in geringeren Neufuchsin Konzentrationen markiert, so dass die Analyse von insgesamt 15 Zytospins mit ca. 50 positiven Zellen erfolgte.

Die Hybridisierungsergebnisse waren in allen Ansätzen für eine ausreichende zytogenetische Untersuchung unzureichend.

Ähnlich zum Nachweissystem NBT/BCIP konnten in den direkt markierten Fluorochromen keine Signale beobachtet werden, ebenso verhielt es sich mit den indirekt markierten Sonden. Außer im Kanal für Cy5.5 konnten keine Signale erkannt werden (siehe Abbildung Abb.3.2.2.). Die von Neufuchsin ausgehende Autofluoreszenz ist in allen Kanälen zu erkennen und macht eine Analyse der Sonden unmöglich.

Auch bei ungefärbten Zellen war teilweise eine Autofluoreszenz zu sehen, die eine Untersuchung der Sonden behinderte.

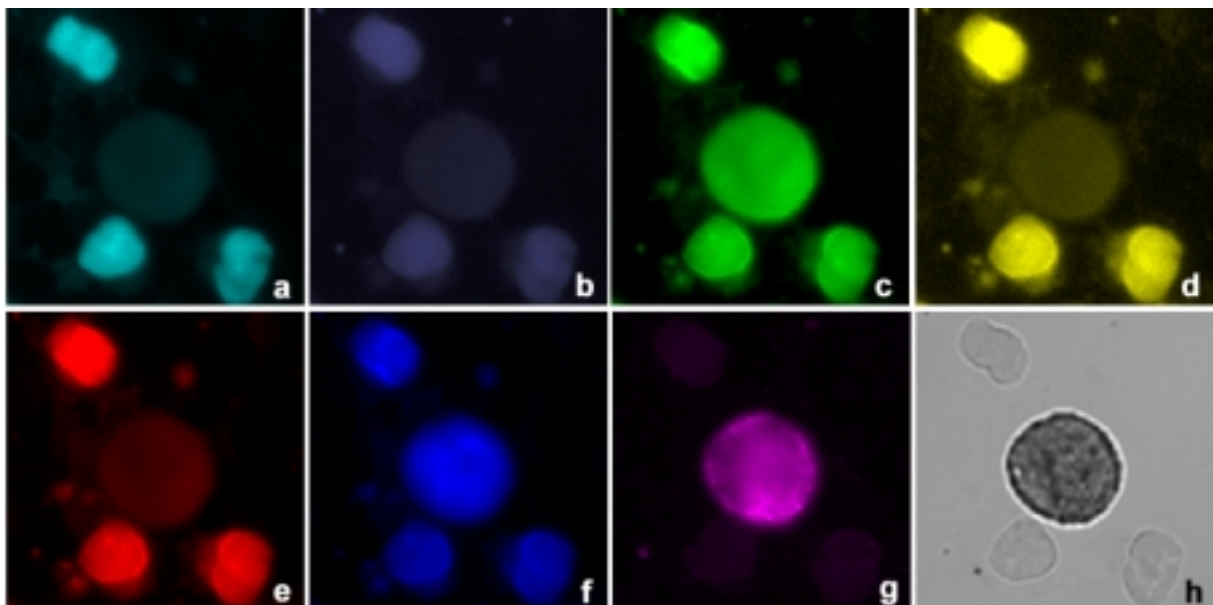


Abb.3.2.2. Neufuchsin positive Zelle nach der Hybridisierung des Zentromer-Testmixes, umgeben von nicht positiven die ebenfalls starke Autofluoreszenz in den Kanälen zeigen:
a) DAPI, b) DEAC, c) FITC, d) Cy3, e) Cy3.5, f) Cy5, g) Cy5.5, h) Aufnahme im Durchlicht

C) Hybridisieren des Zentromer-Testmixes auf Cy3 positive Zellen

Die simultane Hybridisierung von Zentromersonden auf Cy3 markierte A45 B/B3 positive Zellen zeigte unterschiedliche Ergebnisse. Auffällig war, dass die Cy3 Färbung verschiedene Arten von Markierungsmustern ergab (siehe Abbildung Abb.3.2.3.).

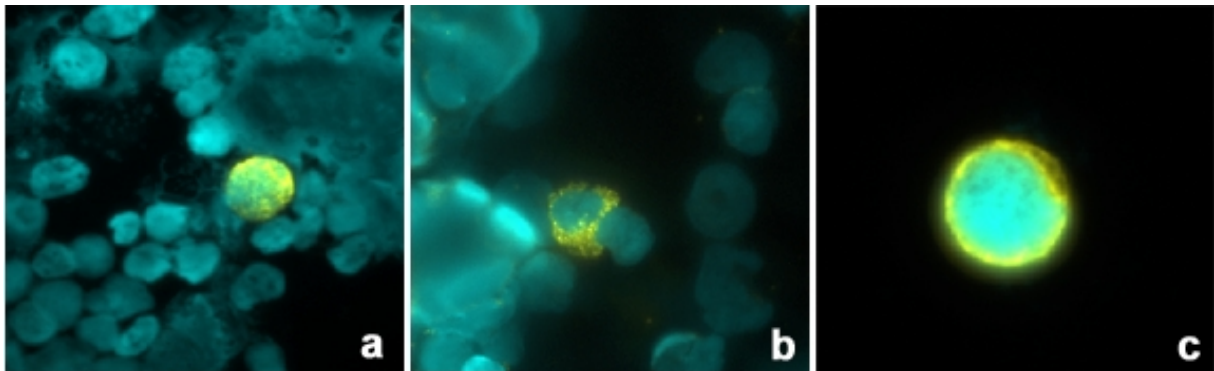


Abb.3.2.3. Verschiedene Färbemuster resultierend aus der A45B/B3-Cy3 Markierung

- a) CY3 Färbung überdeckt den Zellkern
- b) granuläre Cy3 Färbung um den Zellkern
- c) homogene kreisrunde Cy3 Färbung um den Zellkern

Während die in Abbildung Abb.3.2.3. a und b gezeigten inhomogenen Markierungsmuster nur erschwert Sonden erkennen ließen, konnten gute Hybridisierungssignale in homogen oder kreisrund markierten Zellen (Abbildung Abb.3.2.3. c) erzielt werden.

Beispielhaft wird in Abbildung Abb.3.2.4. eine simultane Hybridisierung des Testmixes auf eine Cy3 positive Zelle gezeigt.

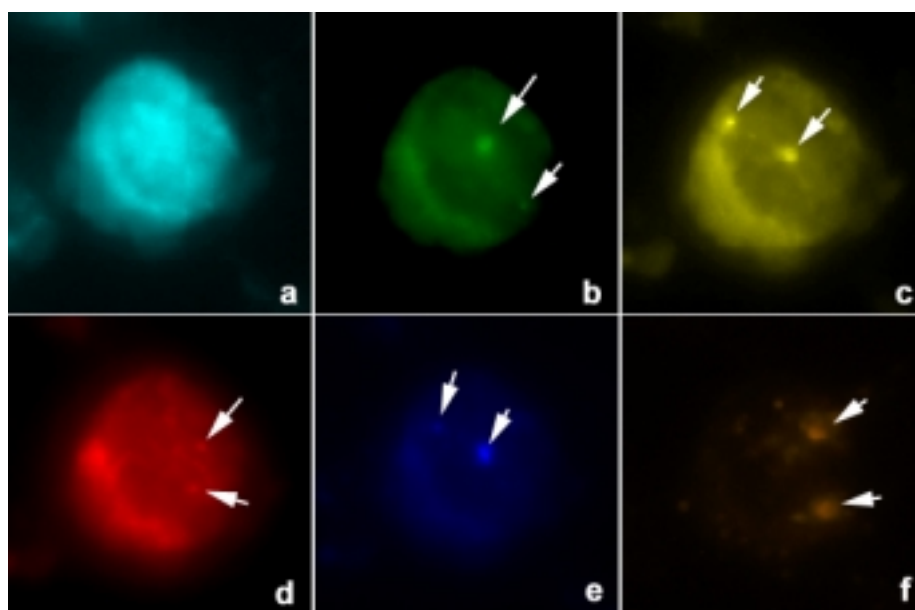


Abb.3.2.4. Cy3 positive Zelle nach der Hybridisierung des Zentromer Testmixes:

- a) DAPI, b) FITC, c) Cy3, d) Cy3.5 (Signale nur erschwert sichtbar), e) Cy5, f) Cy5.5
- Pfeile (weiß) zeigen auf Signale

Um ein ähnliches Ergebnis bei den „inhomogen“ gefärbten Zellen zu erhalten wurde ein Pepsin Verdau bei geringer Konzentration durchgeführt. Dabei war zu erkennen, dass sich bei den „inhomogen“ -gefärbten Zellen die Cy3 Markierung nur unwesentlich abschwächte, so dass eine Hybridisierung ebenfalls nicht das gewünschte Ergebnis erzielte. Zusätzlich konnte man die homogen gefärbten Zellen nicht mehr hundertprozentig identifizieren, da diese ihre Cy3 Färbung verloren hatten.

Aufgrund der Tatsache, dass nur bei den direkt konjugierten A45 B/B3 Antikörpern mit Cy3 oder FluorX ein zufriedenstellendes Ergebnis in den Blindtests erzielt wurde und zusätzlich nur in den Cy3 markierten Zellen eine Hybridisierung des Zentromer Test-Mixes möglich war, fiel die Entscheidung die Analyse von disseminierten Tumorzellen mit dem Antikörper A 45 B/B3-Cy3 konjugiert durchzuführen. Ferner konnten diese Ergebnisse an Pleura Exsudaten und disseminierten Tumorzellen in Mammakarzinomen (siehe Doktorarbeit Christine Maierhofer, LMU München, 2003) bestätigt werden.

Der Antikörper A45 B/B3-FluorX konjugiert wurde erst zu einem späteren Zeitpunkt eingesetzt und daher in diesem Punkt nicht berücksichtigt.

3.2.2. Austesten der zentromernahen YAC-Sonden auf normalen 46,XY Metaphasen und der Zelllinie RCC 26

Für die Hybridisierung von zentromernahen YAC-Sonden kamen zwei verschiedene Ansätze zum Einsatz (7-er Pool und 3-er Pool, siehe Kapitel 2.3.4.2. Seite 73). Während der 3-er Pool zum Austesten verschiedener Protokolle diente, sollte der 7-er Pool die präzise Analyse von disseminierten Tumorzellen ermöglichen.

Zuerst wurden beide Ansätze an normalen 46,XY Metaphasenpräparate ausgetestet. In Abbildung Abb.3.2.5. A wird ein Karyogramm für den 7-er Pool gezeigt, für den 3-er Pool werden nur die beteiligten Chromosomen dargestellt.

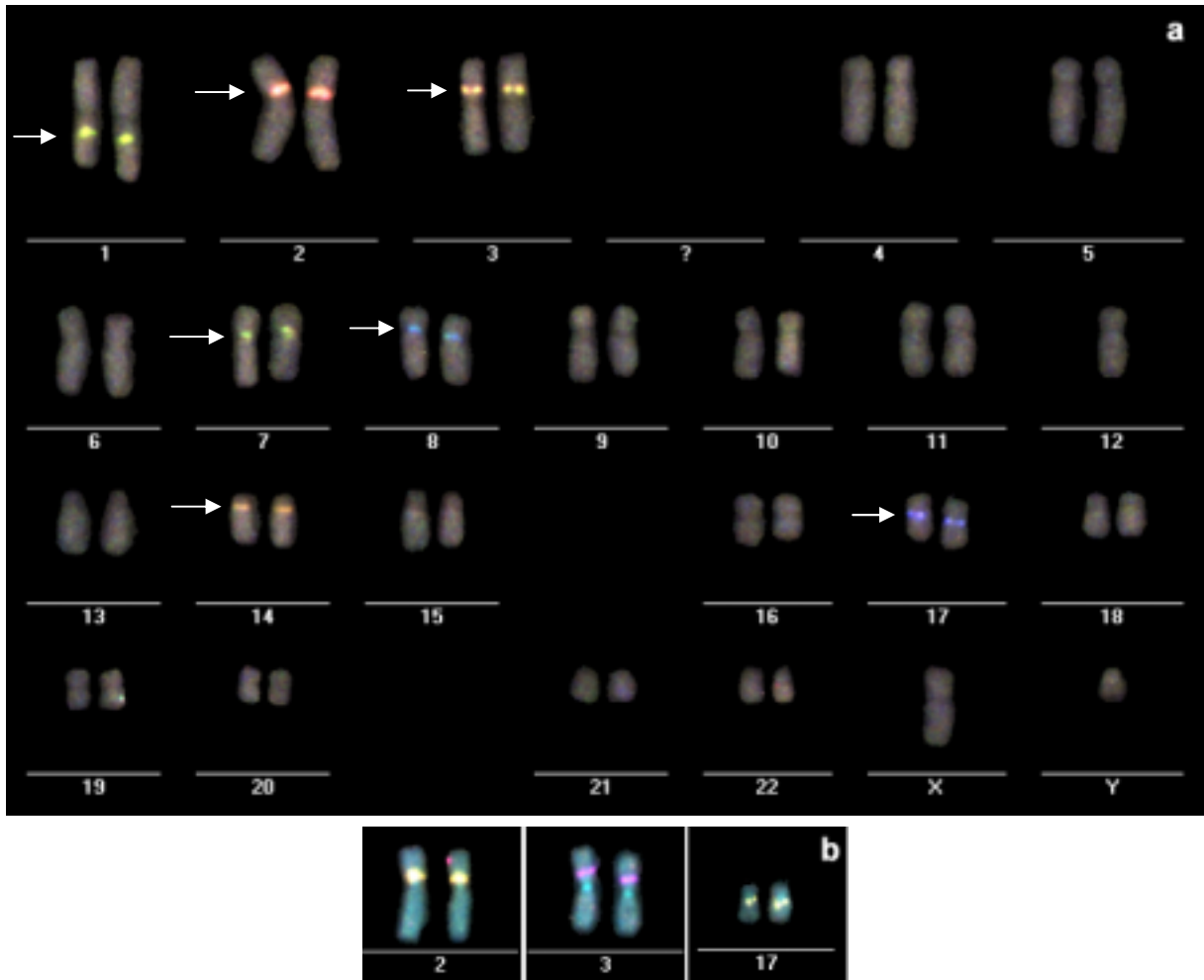


Abb.3.2.5. Darstellung der zentromernahen YAC-Sonden auf 46, XY Präparaten:

a) Karyogramm einer 46, XY Metaphase, 7-er Pool hybridisiert

b) Auszug aus Karyogramm der Chromosomen 2, 3 und 17, 3er-Pool hybridisiert

Pfeile zeigen auf Signale

Um zu überprüfen, ob erwartete Veränderungen an Chromosomenmaterial in Tumorzellen mit diesen Sonden erkannt werden, erfolgte die Hybridisierung auf die Zelllinie RCC-26 p75. Diese Zelllinie diente bereits als Modell bei der Optimierung der Einzelzell CGH und ihre spezifischen Veränderungen sind bekannt. So erwartet man für den 3-er Pool einen Verlust von Chromosomenmaterial des kurzen Arms von Chromosom 3 (d.h. die Sonde zeigt nur ein oder zwei Signale, da die Zelllinie in dieser Passage 75 triploid war), für die Sonde 17q in manchen Zellen ein Verlust (diese Beobachtung wurde aus den M-FISH und Einzelzell CGH Daten ersichtlich) und für die Sonde 2p keine Veränderung (d.h. es sind drei Signale zu sehen).

In Abbildung Abb.3.2.6. wird beispielhaft ein Hybridisierungsergebnis gezeigt.

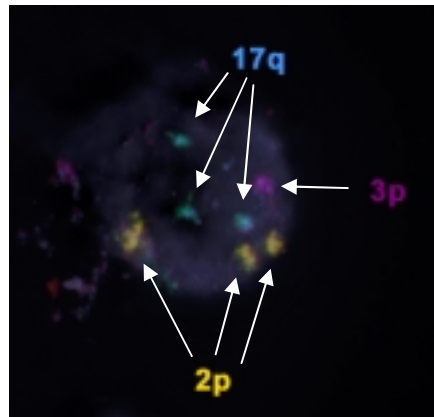


Abb.3.2.6. 3-er Pool hybridisiert auf RCC-26 p75 (triploid):
 Es sind drei Sonden für die Region 2p (gelb) und 17q (blau),
 sowie nur ein Signal für die Region 3p (violett) zu sehen

In Tabelle Tab.3.2.5. wird das Ergebnis von 14 ausgezählten RCC-26 Zellen dargestellt.

RCC-26 p75 Zellzahl 14			
Signalzahl pro Sonde	2p TAMRA/FITC	3p FITC/Cy5	17q TAMRA/Cy5
0	0	0	0
1	0	7	0
2	1	7	6
3	13	0	8

Tab.3.2.5. Ausgezählte Signalzahl bei RCC-26 p75 bei hybridisiertem 3-er Pool

Der 7-er Pool wurde nicht auf RCC-26 hybridisiert, da dieser Pool nicht mehr zur Analyse der disseminierten Zellen herangezogen wurde. Die Gründe hierfür ergeben sich aus den folgenden Kapiteln.

3.2.3. Hybridisierung von zentromernahen YAC-Sonden auf A45 B/B3-Cy3 positiven disseminierten Tumorzellen

3.2.3.1. Simultane Hybridisierung der zentromernahen YAC-Sonden auf A45 B/B3-Cy3 positive disseminierte Tumorzellen

Ähnlich zu der Hybridisierung von Zentromersonden sollten die YAC-Sonden simultan mit der Cy3 Färbung analysiert werden. Dies hätte den Vorteil, dass neben dem Erkennen der disseminierten Tumorzellen gleichzeitig eine zytogenetische Analyse erfolgen könnte.

Es war nicht möglich, die Sonden bei diesem Ansatz zu detektieren, da sie zu schwache Intensitäten in den Fluorochromkanälen zeigten.

Um die Sondenpenetration in die Zellen zu gewährleisten und damit die Intensität zu erhöhen, muss vor der Hybridisierung ein Zytoplasma Verdau und eine Fixierung der Zellen erfolgen. Das wiederum bedeutet aber, dass die disseminierten Tumorzellen ihre Cy3 Färbung verlieren und somit ein Auffinden der Zellen nach einer Hybridisierung unmöglich ist.

Dieses Problem des „Zellenwiederfindens“ konnte mit dem Software Programm *Metafer* der Firma MetaSystems GmbH gelöst werden.

Es wurde folgende Strategie verfolgt:

Zuerst werden die Zytospins der Patienten mit dem Antikörper A45 B/B3-Cy3 inkubiert, anschließend erfolgt die Suche der Cy3 positiven Zellen mit dem Programm *Metafer*.

Die Zytospins werden nun einem Verdau und einer Fixierung unterzogen, die Sonden hybridisiert und nachgewiesen. Anhand der gespeicherten Koordinaten erfolgt dann das Relokalisieren der vormals Cy3 positiven Zellen am Mikroskop. Als letzter Schritt werden die einzelnen Sonden in den jeweiligen Fluorochromkanälen aufgenommen und analysiert.

Im Folgenden werden verschiedenste Testprotokolle mit ihren Ergebnissen vorgestellt.

Zu erwähnen ist noch, dass das Zellsuchprogramm *Metafer* erst zu einem späteren Zeitpunkt zur Verfügung stand und die meisten Versuche ohne Möglichkeit eines Wiederfindens von Zellen erfolgte.

3.2.3.2. Protokoll 1: Orientierung an Vorbehandlung von Metaphase Präparaten

Das erste angewandte Protokoll orientiert sich an der Standard-Vorbehandlung von Metaphase Präparaten (siehe Kapitel 2.1.2. Seite 22). Ein schematischer Ablauf wird in Abbildung Abb.3.2.7. dargestellt.

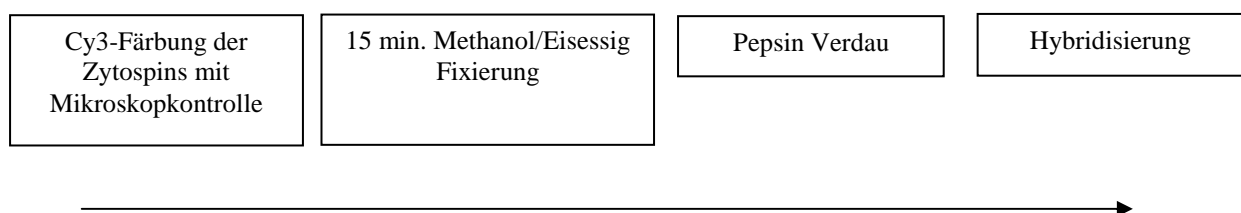


Abb.3.2.7. Übersicht zu Protokoll 1

Nach der Färbung der Zytospins (siehe Kapitel 2.3.2.2. Standard-Protokoll, Seite 62) wird zuerst am Mikroskop kontrolliert wie viele Cy3 positive Zellen vorhanden sind. Anschließend findet eine Fixierung mit Methanol/Eisessig für 15 Minuten statt. Begonnen wurde mit einem drei Minuten Pepsin Verdau (25µl in einem 60 ml Ansatz). Genauere Angaben sind dem Kapitel 2.3.4. (Seite 70) zu entnehmen.

Wie in Abbildung Abb.3.2.8. zu erkennen ist, konnte die Cy3 Färbung nicht entfernt werden. Zusätzlich zeigte sich in jedem Fluorochromkanal eine Autofluoreszenz, die durch den Cy3 Antikörper ausgelöst wurde. Basierend auf diesem Hintergrund waren die Signale nicht zu erkennen. Das gleiche Ergebnis erhält man bei der Hybridisierung des 3er-pools.

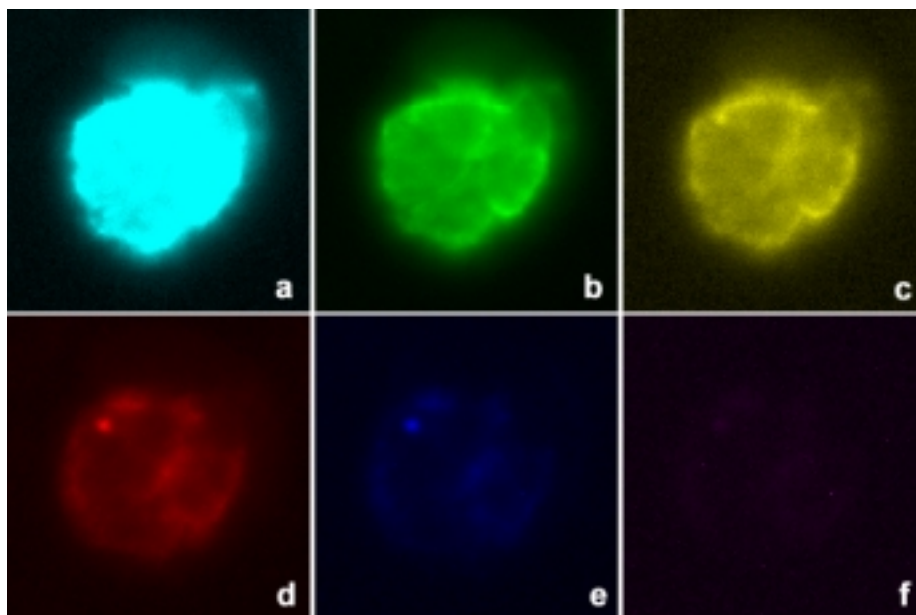


Abb.3.2.8. Cy3 positive Zelle nach der Hybridisierung des 7er-Pools:
a) DAPI, b) FITC, c) Cy3, d) Cy3.5, e) Cy5, f) Cy5.5

In den nächsten Schritten wurde der Pepsin Verdau in 5 Minuten-Schritten erhöht. Ziel war es, den Einfluss von Pepsin auf die Zellmorphologie ohne Rücksicht auf das Verhalten der Cy3 Färbung zu untersuchen. Unter Sichtkontrolle wurde das DAPI-Muster beobachtet. In Tabelle Tab.3.2.6. wird das Ergebnis zusammengefasst. Dabei wird in den beiden Anreicherungsmethoden Erylyse/Depletion (Kapitel 2.3.1.2. Seite 60) und Erylyse/Ficol Gradient (Kapitel 2.3.1.1. Seite 59) unterschieden:

	Erylyse/Depletion	Erylyse/Ficol Gradient
vor Pepsin	keine homogene DAPI Färbung Zytoplasma leicht granulär	teilweise inhomogene DAPI Färbung Zytoplasma flächig verteilt
5' Pepsin	Zellen von Verdau angegriffen Zytoplasma bleibt granulär	Heller Rand um Zellen Zytoplasma bleibt flächig
10' Pepsin	Zellen stark angegriffen Zytoplasma granulär	Rand weiterhin vorhanden Zytoplasma unverändert
15' Pepsin	Zellen unverändert Zytoplasma „netzbildend“	Rand weiterhin vorhanden Zytoplasma unverändert
20' Pepsin	Sehr schwache DAPI Färbung Zytoplasma: Netz wird granulär	Sehr schwache DAPI Färbung Zytoplasma unverändert

Tab.3.2.6. Beobachtung der Zellmorphologie und des Zytoplasmas bei unterschiedlichen Verdau Zeiten

Zusammenfassend ist zu erwähnen, dass die Zellmorphologie bereits nach fünf Minuten Verdau angegriffen ist und das Zytoplasma nicht vollständig verdaut wird.

In Abbildung Abb.3.2.9. werden für beide Anreicherungsverfahren Beispiele für „vor dem Verdau“ und „20 min. Verdau“ dargestellt.

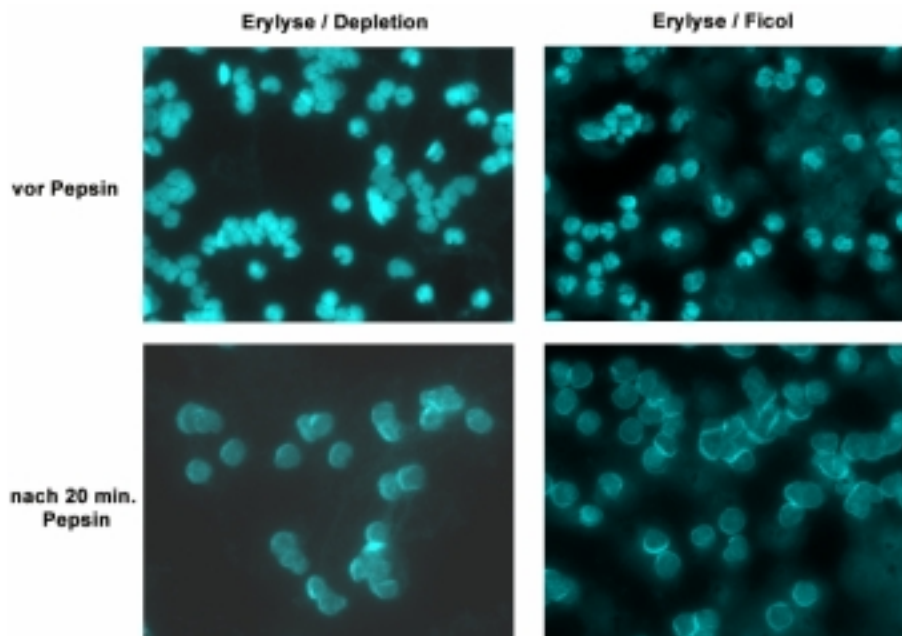


Abb.3.2.9. Beobachtung der Zellmorphologie und des Zytoplasmas bei unterschiedlichen Verdau Zeiten
Linke Spalte: Anreicherung Erylyse / Depletion, Rechte Spalt: Anreicherung mit Erylyse / Ficol
Obere Zeile: Zellen vor dem Pepsin Verdau, Untere Spalte: nach 20 Minuten Pepsin Verdau
Es ist zu erwähnen, dass es sich bei allen vier Bildern um unterschiedliche Bildausschnitte handelt.

Bei der Hybridisierung des Sondenmixes konnten keine Signale erkannt werden, daher wird auf eine Darstellung verzichtet. Wie in Abbildung Abb.3.2.8. schon gezeigt, war die Cy3 Färbung nicht vollständig verdaut und überstrahlte die Signale der Sonden, obwohl die Verdauzeiten deutlich länger waren als 3 Minuten.

Zu einem ähnlichen Ergebnis führte die Erhöhung der Pepsinkonzentration. Das Zytoplasma konnte nicht verdaut werden, obwohl die Zellen in ihrer Morphologie stark angegriffen aussahen. Auch die Hybridisierung des Sondenmixes führte zu keinem befriedigenden Ergebnis. Auch bei nicht positiven Zellen auf den Zytospins waren die Sonden nur vereinzelt zu erkennen.

Aufgrund dieser Stabilität des Zytoplasmas und der Cy3 Färbung wurde das Protokoll umgestellt. Erst nach dem Verdau mit Pepsin wurde die Fixierung mit Methanol/Eisessig durchgeführt, in der Hoffnung eine höhere Wirksamkeit des Pepsins zu erzielen.

3.2.3.3. Protokoll 2: Fixierung der Zytospins nach dem Pepsin Verdau

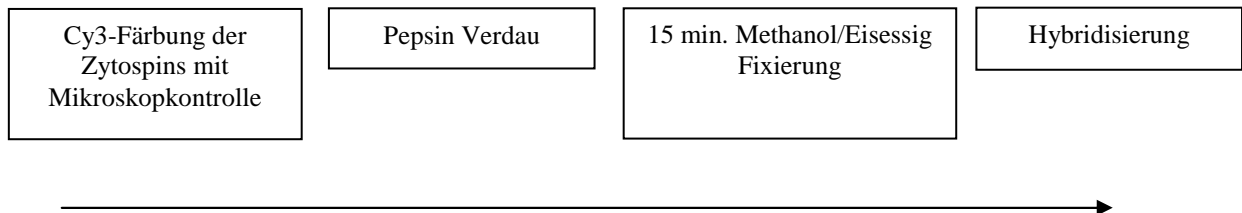


Abb.3.2.10. Übersicht zu Protokoll 2

Die Umstellung des Protokolls führte zu dem Erfolg, dass Cy3 nicht positive Zellen eines gefärbten Zytospins deutliche Signale aufwiesen. So konnten auf Erylyse/Ficol Gradienten Präparaten mit dem „3er Pool einfach“ gute Hybridisierungen erzielt werden (siehe Abbildung Abb.3.2.11.).

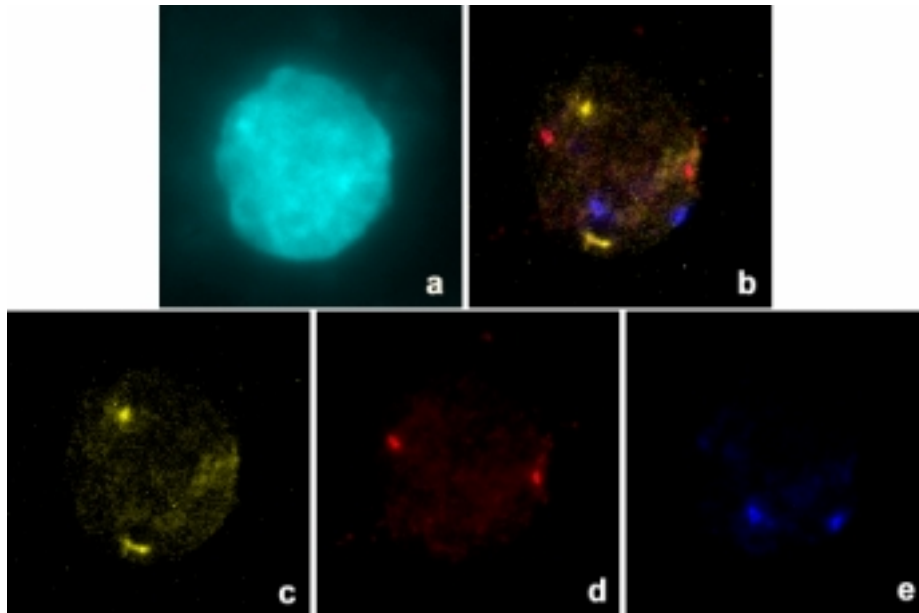


Abb.3.2.11. Nicht positive Zelle eines gefärbten Erylyse / Ficol angereicherten Zytospins nach der Hybridisierung des 3er-Pools einfach:
a) DAPI, b) Überlagerungsbild, c) TAMRA, d) Texas Red, e) Cy5

Auf Erylyse/Depletions Präparaten waren die Sonden ebenfalls zu erkennen, allerdings zeigte sich um die Zellen ein Hintergrund in allen Fluorochromkanälen.

Bei Vergleich mit dem DAPI Bild erkennt man, dass dieser Hintergrund mit dem granulären Zytoplasma übereinstimmt (siehe Abbildung Abb.3.2.12.), auf das in Kapitel 3.2.3.2. (Seite 117) bereits hingewiesen wurde.

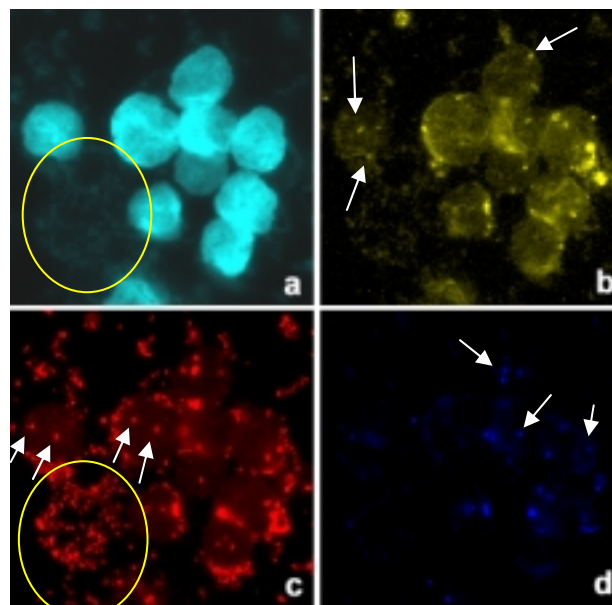


Abb.3.2.12. Nicht positive Zellen eines gefärbten Erylyse / Depletions angereicherten Zytospins nach der Hybridisierung des 3er-Pools einfach:
a) DAPI, b) TAMRA, c) Texas Red, d) Cy5
Die Pfeile markieren beispielhaft Signale der jeweiligen Sonden; in Bild a) und c) ist der unspezifische Hintergrund durch den gelben Kreis markiert

Bei allen folgenden Versuchen wurde nun speziell auf die Hybridisierungseffizienz bei Cy3 positiven Zellen fokussiert, denn ab diesem Zeitpunkt konnte auf das System *Metafer* der Firma MetaSystems GmbH (Altlußheim) zurückgegriffen werden. Somit war die Möglichkeit einer Relokalisierung von Zellen gegeben.

Dabei konnte festgestellt werden, dass die Cy3 Färbung nach der Pepsin Vorbehandlung weiterhin vorhanden war und somit das Erkennen von Sonden nach der Hybridisierung unmöglich machte.

Ziel war es nun, die Cy3 Färbung durch einen langen Pepsin Verdau zu entfernen. Dies wurde exemplarisch bei Patient Fi_2046 durchgeführt. Nachstehende Versuche wurden angewandt:

Versuch	Ergebnis
100µl Pepsin in 60 ml 1x PBS für 15'	Cy3 vorhanden
100µl Pepsin in 60 ml 1x PBS für 15'	Cy3 vorhanden
200µl Pepsin in 60 ml 1x PBS für 25'	Cy3 schwächer, aber vorhanden
200µl Pepsin in 60 ml 1x PBS für 10'	Cy3 weg

Tab.3.2.7. Beobachtung der Cy3 Färbung bei langem Pepsin Verdau

Anschließend erfolgte für 15 Minuten die Fixierung und die Hybridisierung des 3-er Pools und 7-er Pools.

Auswertung:

Wie Abbildung Abb.3.2.13. zeigt, konnten keine Sonden identifiziert werden, da nach Fixierung und Hybridisierung die Cy3 Färbung völlig unerwartet wieder auftrat und stark in alle Fluorochromkanäle einstrahlte.

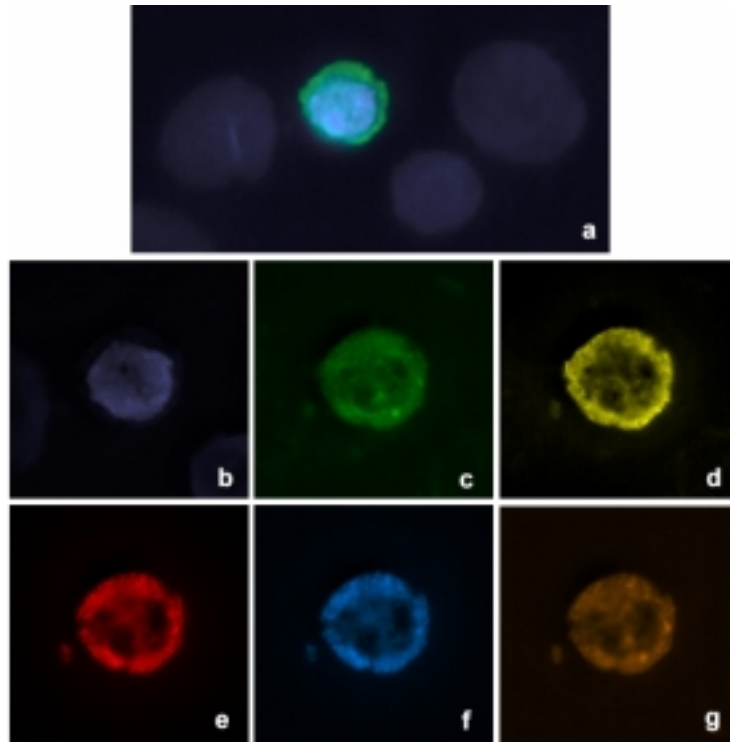


Abb.3.2.13. A45 B/B3-Cy3 positive Zelle mit hybridisiertem 7-er Pool:

- a) Cy3 positive Zelle vor dem Pepsin Verdau, Überlagerungsbild der Kanäle DAPI und Cy3
 b)-g) Gleiche Zelle nach dem Pepsin Verdau und der Hybridisierung, in den einzelnen Fluorochromkanälen dargestellt: b) DAPI, c) FITC, d) TAMRA, e) Texas Red, f) Cy5, g) Cy5.5,

Zur Ursachenforschung für dieses Wiederauftreten wurden verschiedene Abwandlungen des Protokolls ausgetestet:

- a) Vergleiche Kapitel 2.3.2.2. (Seite 62) und 2.3.4.1. (Seite 71)

Die Sichtkontrolle der Präparate nach Fixierung mit Methanol/Eisessig zeigte, dass eine Verstärkung der Cy3 Färbung durch diese Fixierungsart auftrat. So wurden alternativ Fixierungen sowohl vor der Cy3 Färbung als auch nach dem Pepsin Verdau ausgetestet.

Versuchsansätze:

Fixierung vor Cy3 Färbung	Fixierung nach Pepsin Verdau	Ergebnis Cy3 Färbung nach Hybridisierung	Ergebnis Hybridisierung
1 Std. in 4% Formaldehyd / 1xPBS bei 4°C	-	Cy3 weiterhin vorhanden	Keine Sonden erkennbar, Cy3 strahlt in alle Kanäle ein
10 min. in 85% ETOH	-	Cy3 weiterhin vorhanden	Keine Sonden erkennbar, Cy3 strahlt in alle Kanäle ein
ohne jegliche Fixierung	-	Keine Hybridisierung, da Zellen sich ablösten	Keine Sonden erkennbar, Cy3 strahlt in alle Kanäle ein
10 min. in 1,35% Formaldehyd / 1xPBS	3,25 ml Formaldehyd in 57 ml 1x PBS/50 mM MgCl ₂	Cy3 weiterhin vorhanden	Keine Sonden erkennbar, Cy3 strahlt in alle Kanäle ein
10 min. in 1,35% Formaldehyd / 1xPBS	-	Cy3 weiterhin vorhanden	Keine Sonden erkennbar, Cy3 strahlt in alle Kanäle ein

Tab.3.2.8. Anwendung verschiedener Fixierungsarten bei Pepsin Verdau

Zusammenfassendes Ergebnis:

Wird auf die Methanol/Eisessig Fixierung verzichtet, ist eine Verstärkung der Cy3 Färbung nicht erkennbar. Dennoch ist nach der Hybridisierung der Sondenätze keine Analyse möglich, da die Cy3 Färbung weiterhin auftritt.

b) Vergleiche Kapitel 2.3.2.2. (Seite 62)

Auch die in Kapitel 2.3.2.2. beschriebenen veränderten Antikörper Konzentrationen und Verdünnungsmittel konnten die Cy3 Färbung nicht abschwächen. Auch hier war die Cy3 Färbung weiterhin vorhanden und somit die Auswertung von Sonden unmöglich.

c) Vergleiche Kapitel 2.3.2.2. (Seite 62)

Die Abwandlung des Blockschrittes führte zu demselben Ergebnis wie unter b) beschrieben. Zusätzlich traten bei der Suche nach positiven Zellen vermehrt unspezifische Hintergrundfärbungen auf.

Ein Versuch, die Cy3 Färbung nach der Suche mit dem *Metafer* System auszubleichen, schlug fehl. Zwei Wochen nach der Färbung und Lagerung bei Sonnenlicht war die Cy3 Färbung genauso stark wie direkt nach der Antikörperdetektion.

Des Weiteren wurde für die Zellsuche im *Metafer* Programm das Eindeckelmedium Antifade durch 1x PBS ersetzt. Auch durch diese Maßnahme konnten keine besseren Ergebnisse erzielt werden.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass obwohl die Zellen bereits durch den Pepsin Verdau stark angegriffen aber die Cy3 Färbung nach der Hybridisierung noch deutlich vorhanden war, keine Möglichkeit existierte die Sonden zu analysieren.

3.2.3.4. Protokoll 3: Proteinase K Verdau

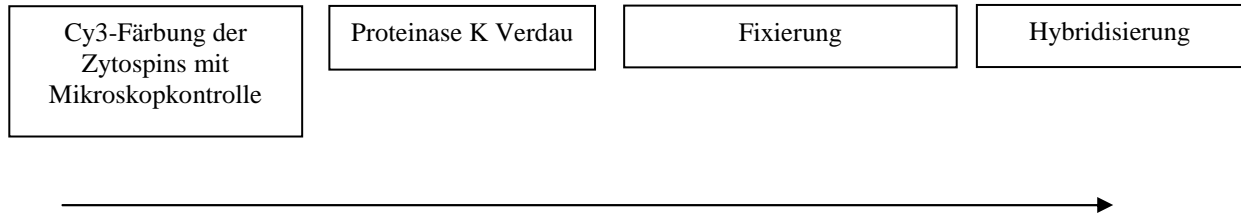


Abb.3.2.14. Übersicht zu Protokoll 3

Nachdem der Pepsin Verdau zu keinem Erfolg führte, wurde der Versuch unternommen, die Cy3 Färbung mit Proteinase K zu entfernen (vergleiche Kapitel 2.3.4.1. Seite 71).

Die Färbung der Zytospins wurde nach dem Standard Protokoll durchgeführt. Anschließend folgte ein 20-minütiger Verdau mit Proteinase K (15µl Proteinase K und 15 µl 20% SDS auf 300 ml). Nach der DAPI Färbung und der Relokalisierung der positiven Zellen war zu erkennen, dass die Cy3 Färbung entfernt werden konnte. Außerdem war die DAPI Färbung sehr schwach.

In den nächsten Versuchen wurde die Dauer des Verdau reduziert. Dabei stellte sich heraus, dass sich die Zellen regelmäßig vom Objektträger lösten, und die DAPI-Färbung nur mehr einen „Hof“ an der Stelle zeigte, wo vormals die Zellen waren (siehe Abbildung Abb.3.2.15.).

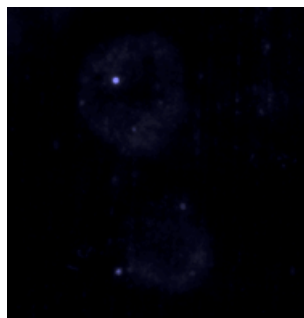


Abb.3.2.15. Zwei Zellen mit DAPI gefärbt, nach dem Proteinase K Verdau:
Es ist nur mehr ein „Hof“ zu sehen, nachdem sich die Zellen vom Objektträger abgelöst haben.

In der folgenden Tabelle Tab.3.2.9. werden die weiteren Veränderungen des Protokolls und ihre Ergebnisse dargestellt:

Protokoll Veränderung nach Cy3 Färbung und Zellsuche	Ergebnis nach Proteinase K Verdau	Hybridisierungsergebnis
20% SDS aus Proteinase K Ansatz herausnehmen	Zellen lösen sich ab	Nicht durchgeführt
2-10 Minuten Methanol/Eisessig Fixierung vor Proteinase K Verdau	Zellen lösen sich ab	Nicht durchgeführt
15-30 Minuten Methanol/Eisessig Fixierung vor Proteinase K Verdau	Zellen bleiben auf Präparat, lösen sich allerdings nach dem Denaturieren ab	Nicht durchgeführt
30 Minuten Methanol/Eisessig - Proteinase K Verdau - 20 Minuten Postfixierung vergleiche Kapitel 2.3.4.1. Pkt. B (Seite 71)	Zellen bleiben auch nach der Denaturierung auf dem Objektträger	Cy3 Färbung immer noch vorhanden, keine Sondendetektion möglich (siehe Abbildung Abb.3.2.16.)

Tab.3.2.9. Anwendung verschiedener Fixierungsarten bei Proteinase K Verdau

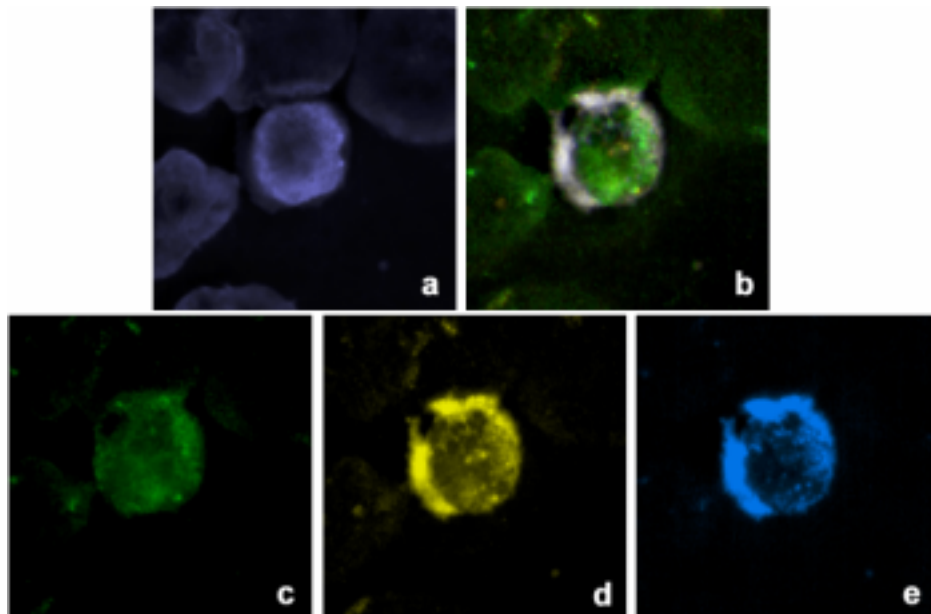


Abb.3.2.16. A45 B/B3-Cy3 positive Zelle, nach Proteinase K Verdau mit hybridisiertem 3-er Pool:
a) DAPI, b) Überlagerungsbild aller Kanäle, c) FITC, d) TAMRA, e) Cy5

Auch hier verhielt es sich ähnlich zum Pepsin Verdau.

Die Cy3 Färbung war offensichtlich nach dem Verdau entfernt worden, allerdings nach der Hybridisierung wieder aufgetreten und das in verstärktem Maße, so dass eine Detektion der Zellen nicht möglich war. Hinzu kam, dass sich die Zellen vom Objektträger ablösen.

Erwähnt sei an dieser Stelle nur der Versuch, eine Kombination aus Proteinase K und Pepsin Verdau durchzuführen. Allerdings konnte auch hier kein Verhältnis gefunden werden, um die Cy3 Färbung zu entfernen.

3.2.3.5. Protokoll 4: Markierung der disseminierten Tumorzellen mit A45 B/B3-FluorX

Dem Wechsel auf den Antikörper A45 B/B3-FluorX liegt die Überlegung zu Grunde, dass die Probleme, die Antikörperfärbung zu entfernen, durch das Fluorochrom verursacht sein könnten.

Aus diesem Grund wurden weitere Versuchsreihen durchgeführt, die in Tabelle Tab.3.2.10. zusammengefasst sind.

Protokoll Veränderung nach FluorX Färbung und Zellsuche	Ergebnis nach Vorbehandlung	Hybridisierungsergebnis
10 Min. 50 µl Pepsin ein 60 ml Volumen	FluorX nicht sichtbar	Färbung wieder vorhanden, Sondendetektion nicht möglich
30 Min. Methanol/Eisessig Fixierung - 2 Min. Proteinase K Verdau 5 Min. Pepsin	Fluor X vorhanden	Keine Hybridisierung
15-30 Minuten Pepsin Verdau	FluorX vorhanden, Zellen von Verdau stark angegriffen	Färbung wieder vorhanden, Sondendetektion nicht möglich

Tab.3.2.10. Zusammenfassung der FluorX gefärbten Zytospins mit anschließender Vorbehandlung und Hybridisierung

Auch dieser Antikörperwechsel löste das Problem des Einstrahlens in andere Fluorochromkanäle nicht. Die schwächere Fluoreszenzintensität des FluorX (siehe Abbildung Abb.3.2.17.) ließ eine Detektion der hybridisierten Sonden nicht zu.

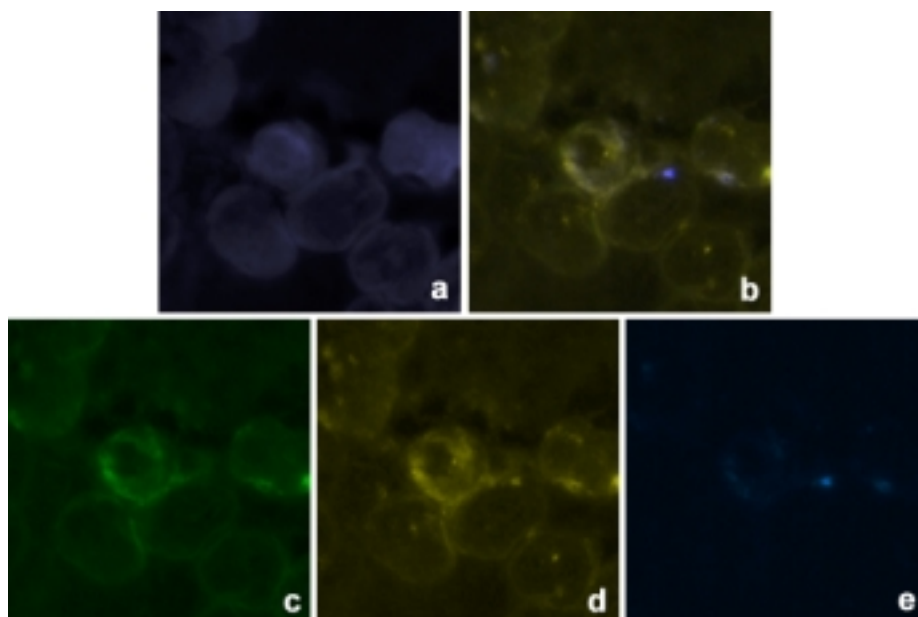


Abb.3.2.17. A45 B/B3-FluorX positive Zelle, nach Pepsin Verdau mit hybridisiertem 3-er Pools: a) DAPI, b) Überlagerungsbild aller Kanäle, c) FITC, d) TAMRA, e) Cy5

Aus diesem Grund wurde die Hybridisierung von zentromernahen YAC-Sonden auf disseminierte Tumorzellen eingestellt.

Das Ziel war nun, mittels eines geeigneten Zentromer Sondensatzes eine Analyse dieser Zellen zu ermöglichen.

3.2.4. Hybridisierung des Zentromer Sondensatzes dT-Mix auf Zytospins

3.2.4.1. Hybridisierung des Zentromer Sondensatzes dT-Mix auf A45 B/B3-positive disseminierte Tumorzellen

Ziel dieses Ansatzes war es, den Sondensatz dT-Mix (siehe Kapitel 2.3.3.1. Seite 65) auszutesten. Dazu wurden erneut Zytospinpräparate von Nierentumorpatienten verwendet, da die Anzahl der vorhandenen Zytospins von Mammakarzinompatientinnen zu gering war. In diesen Fällen wurde die Zentromersonde für Chromosom Y mitaufgenommen, um die Hybridisierungsergebnisse anhand der Geschlechtertrennung zu überprüfen. Im Ansatz für die Mammakarzinome wird diese Sonde gestrichen.

Häufig strahlten die mit Cy5.5 markierten Sonden in den Cy5 Kanal ein. In diesen Fällen wurden die Cy5.5 Sonden wie doppelt markierte Sonden (Cy5 und Cy5.5) ausgewertet.

Sowohl die Standard Vorbehandlung für Zentromer Sonden als auch der Versuch eines Pepsin Verdau zeigen unbefriedigende Hybridisierungsergebnisse (siehe Abbildung Abb.3.2.18.).

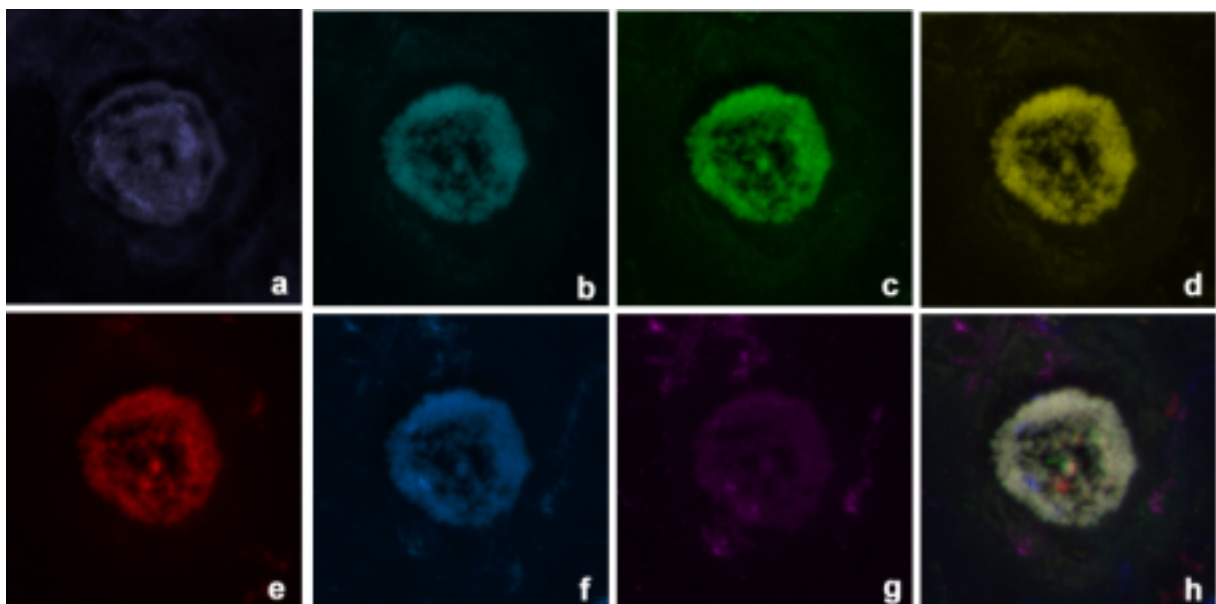


Abb.3.2.18. A45 B/B3-Cy3 positive Zelle mit hybridisiertem dT-Mix:
a) DAPI, b) DEAC, c) FITC, d) TAMRA, e) Cy3.5, f) Cy5, g) Cy5.5, h) Überlagerungsbild aller Kanäle

Wie bereits zuvor beschrieben, zeigte sich eine deutlich granuläre Färbung der Cy3 positiven Zellen. Auffällig war außerdem, dass die DAPI Färbung der Zellen bereits nach dem A45 B/B3 Antikörper teilweise unförmige Zellkerne zeigte.

Diese granuläre Färbestruktur trat wohl aufgrund einer Dehydrierung der Zellen während der Vorbehandlung auf. Aufgrund dieser Vermutung wurden die Zellen vor der Cy3 Färbung für 15 bis 30 Minuten einer KCl Behandlung unterzogen. Das Ergebnis wurde unter dem Lichtmikroskop kontrolliert.

Dabei stellte sich heraus, dass die granuläre Struktur bereits vor dem ersten Färbeprozess auf den Zytospins zu sehen war.

Bei einer weiteren Kontrolle zeigte sich, dass diese Struktur sich in allen Cy3 gefärbten Zytospins anfärbt (siehe Abbildung Abb.3.2.19.).

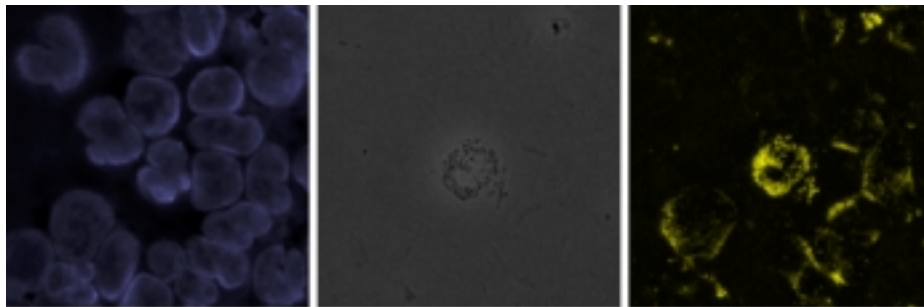


Abb.3.2.19. Granuläre Zelle färbt sich mit A45 B/B3-Cy3:
a) DAPI, b) Aufnahme im Durchlicht, c) TAMRA

Dies zeigte sich ebenso bei FluorX gefärbten Zellen.

3.2.4.2. Hybridisierung des Zentromer Sondensatzes dT-Mix auf nicht gefärbte disseminierte Tumorzellen

Aufgrund der oben beschriebenen Beobachtungen wurden die Zellen unterteilt in solche mit und ohne granulärem Muster. Um zu testen, ob dieses granuläre Muster ein Artefakt darstellt oder eine biologische Relevanz hat, wurde eine vergleichende Interphase Untersuchung durchgeführt.

Nach folgendem, in Kurzform gehaltenen Protokoll, erfolgte die Hybridisierung:

- a) Keine Färbung mit A45 B/B3
- b) 15 Min. Formalin Fixierung
- c) 1 Std. 2x SCC bei Raumtemperatur
- d) Denaturieren für 1 Min. 45 Sec.
- e) Hybridisieren des dT Mixes

Wie in Abbildung Abb.3.2.20. zu sehen ist, färbt sich der granuläre Rand der Zellen unspezifisch in den Fluorochromkanälen DEAC, FITC und TAMRA stärker und in Cy3.5 und Cy5 schwächer an.

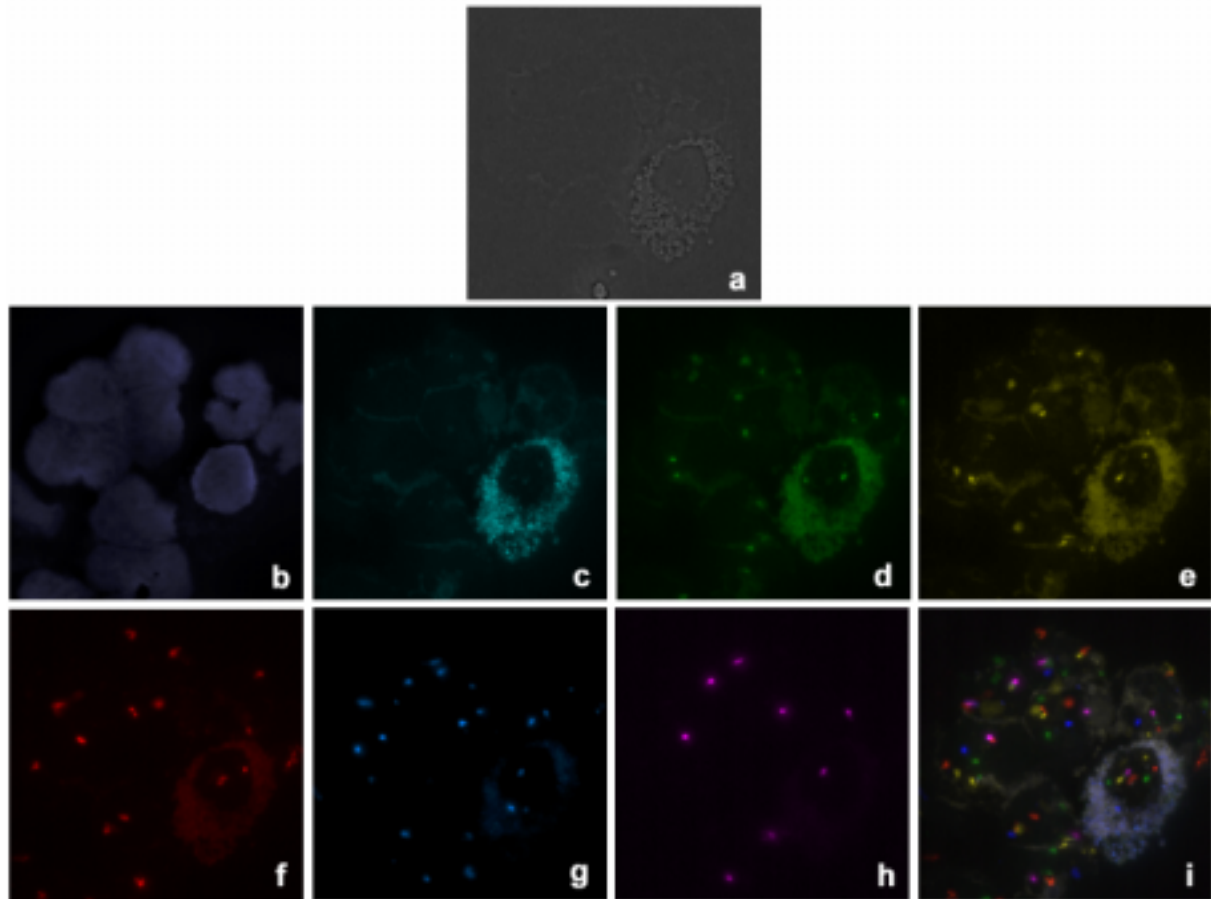


Abb.3.2.20. Granuläre Zelle des Patienten „Schm“ mit hybridisiertem dT-Mix, ohne A45 B/B3-Cy3 Färbung:
a) Aufnahme im Durchlicht, b) DAPI, c) DEAC, d) FITC, e) TAMRA, f) Cy3.5, g) Cy5, h) Cy5.5,
i) Überlagerungsbild aller Kanäle

Bei Patient „Schm“ wurden 24 nicht-granuläre Zellen (als Kontrolle der Hybridisierungseffizienz der Zentromersonden) und 12 granuläre Zellen ausgewertet, bei Patient „Ora“ waren es 30 nicht-granuläre Zellen und 13 granuläre Zellen. Das Ergebnis ist in den Tabellen Tab.3.2.11. A, B und Tab.3.2.12. A, B dargestellt:

Auszählen der Signale bei granulären Zellen für Zytospin „Schm“

„Schm“ (männlich) Zellzahl 12						
Signalzahl pro Sonde	Y DEAC	12 FITC	16 TAMRA	17 Cy3.5	7 Cy5	X Cy5.5
0	5	0	0	0	0	0
1	7	0	2	0	1	12
2	0	12	10	12	11	0

Tab.3.2.11.A Ausgezählte Signalzahl bei granulären Zellen für Zytospin „Schm“

Auszählen der Signale bei nicht-granulären Zellen für Zytospin „Schm“

„Schm“ (männlich) Zellzahl 24						
Signalzahl pro Sonde	Y DEAC	12 FITC	16 TAMRA	17 Cy3.5	7 Cy5	X Cy5.5
0	6	0	0	0	0	1
1	18	0	1	0	6	22
2	0	24	23	24	20	1

Tab.3.2.11.B Ausgezählte Signalzahl bei nicht granulären Zellen für Zytospin „Schm“

Auszählen der Signale bei granulären Zellen für Zytospin „Ora“

„Ora“ (weiblich) Zellzahl 13						
Signalzahl pro Sonde	Y DEAC	12 FITC	16 TAMRA	17 Cy3.5	7 Cy5	X Cy5.5
0	13	0	0	0	0	0
1	0	5	3	2	2	3
2	0	6	9	10	11	10
3	0	2	1	1	0	0

Tab.3.2.12.A Ausgezählte Signalzahl bei granulären Zellen für Zytospin „Ora“

Auszählen der Signale bei nicht-granulären Zellen für Zytospin „Ora“

„Ora“ (weiblich) Zellzahl 30						
Signalzahl pro Sonde	Y DEAC	12 FITC	16 TAMRA	17 Cy3.5	7 Cy5	X Cy5.5
0	30	0	0	0	0	0
1	0	2	2	2	6	2
2	0	28	28	28	24	28
3	0	0	0	0	0	0

Tab.3.2.12.B Ausgezählte Signalzahl bei nicht granulären Zellen für Zytospin „Ora“

Das Hybridisierungsmuster unterschied sich nicht signifikant zwischen granulären und nicht granulären Zellen. Somit müsste dieses Muster am ehesten einem Artefakt entsprechen, das die simultane Antikörperfärbung aber drastisch erschwert, da der Antikörper sich mit hoher Affinität an diese Strukturen anlegt.

3.2.5. Der Fall „Ob-2006“

Der histologische Befund zu dieser Patientin beschrieb ein klarzelliges Nierenzellkarzinom im Tumorstadium T1 N0 M0 G2.

Hier konnten viele Cy3 positive Zellen entdeckt werden, und wie in Abbildung Abb.3.2.21 dargestellt, unterscheidet sich diese Färbung zu vorangegangenen Patienten.

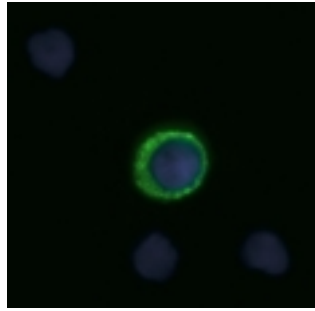


Abb.3.2.21. A45 B/B3-Cy3 positive Zelle des Falls „Ob-2006“
Cy3 positive Zelle umgeben von drei nicht gefärbten Zellen

Die Färbung ist kreisrund und sehr homogen. In diesem Fall war auch die Hybridisierung des dT-Mixes unproblematisch (siehe Abbildung Abb.3.2.22.).

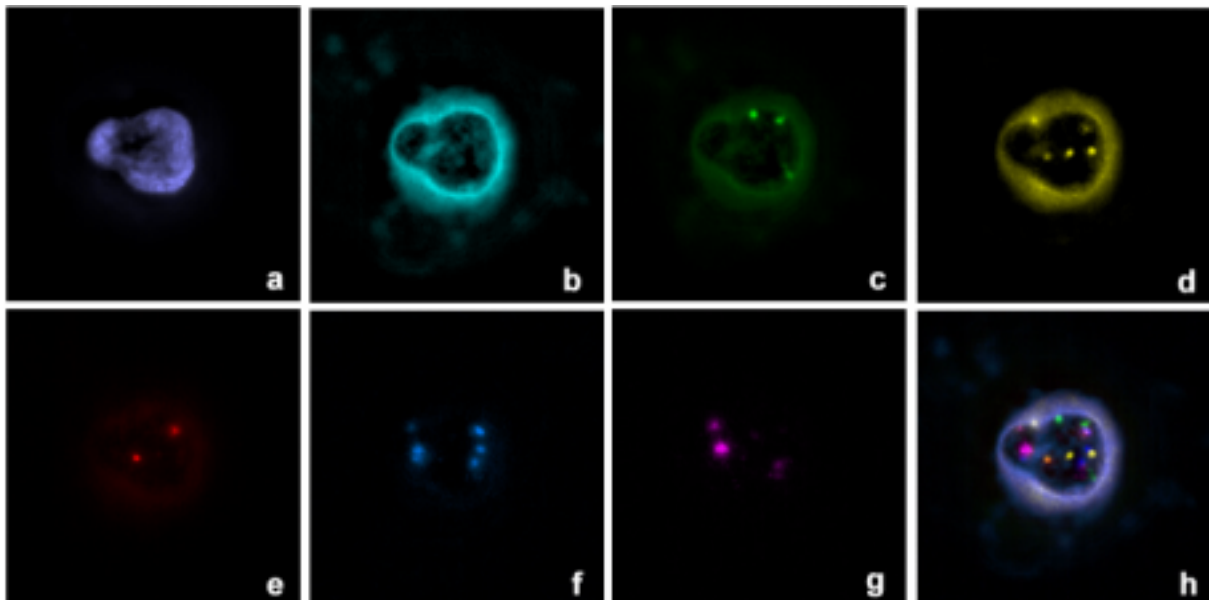


Abb.3.2.22. A45 B/B3-Cy3 positive Zelle des Falls „Ob-2006“ mit hybridisiertem dT-Mix:
a) DAPI, b) DEAC, c) FITC, d) TAMRA, e) Cy3.5, f) Cy5, g) Cy5.5, h) Überlagerungsbild aller Kanäle

Die Auswertung eines Zytospins ergab 40 positive Zellen, bei allen wurde der dT-Mix ausgewertet. Dieses Ergebnis sowie das von 47 nicht Cy3 positiven Zellen (als Kontrolle) wird in Tabelle Tab.3.2.13. A und B dargestellt.

Auszählen der Signale bei nicht Cy3 positiven Zellen für Zytospin „Ob-2006“

„Ob-2006“ (weiblich) Zellzahl 47						
Signalzahl pro Sonde	Y DEAC	12 FITC	16 TAMRA	17 Cy3.5	7 Cy5	X Cy5.5
0	47	0	0	1	0	1
1	0	2	6	3	12	4
2	0	45	41	43	35	42
3	0	0	0	0	0	0

Tab.3.2.13.A Ausgezählte Signalzahl bei nicht Cy3 positiven Zellen für Zytospin “Ob-2006”

Auszählen der Signale bei Cy3 positiven Zellen für Zytospin „Ob-2006“

„Ob-2006“ (weiblich)Zellzahl 40						
Signalzahl pro Sonde	Y DEAC	12 FITC	16 TAMRA	17 Cy3.5	7 Cy5	X Cy5.5
0	40	0	4	0	0	0
1	0	2	6	2	1	1
2	0	10	17	18	5	16
3	0	27	11	19	18	22
4	0	1	2	1	16	1

Tab.3.2.13.B Ausgezählte Signalzahl bei Cy3 positiven Zellen für Zytospin “Ob-2006”

Auffällig war, dass sich die Muster der Veränderungen bei jeder positiven Zelle unterschieden. Eine bestimmte Kombination an Veränderungen zeigte sich nicht vermehrt.

Um diese Daten mit dem primären Tumor zu vergleichen, wurden zwei CGH-Profile aus unterschiedlichen Regionen des Primärtumors berechnet.

Beide Profile zeigten jedoch ein unauffälliges Muster ohne Veränderungen.

Das Profil des zweiten Areals wird in Abbildung Abb.3.2.23. dargestellt.

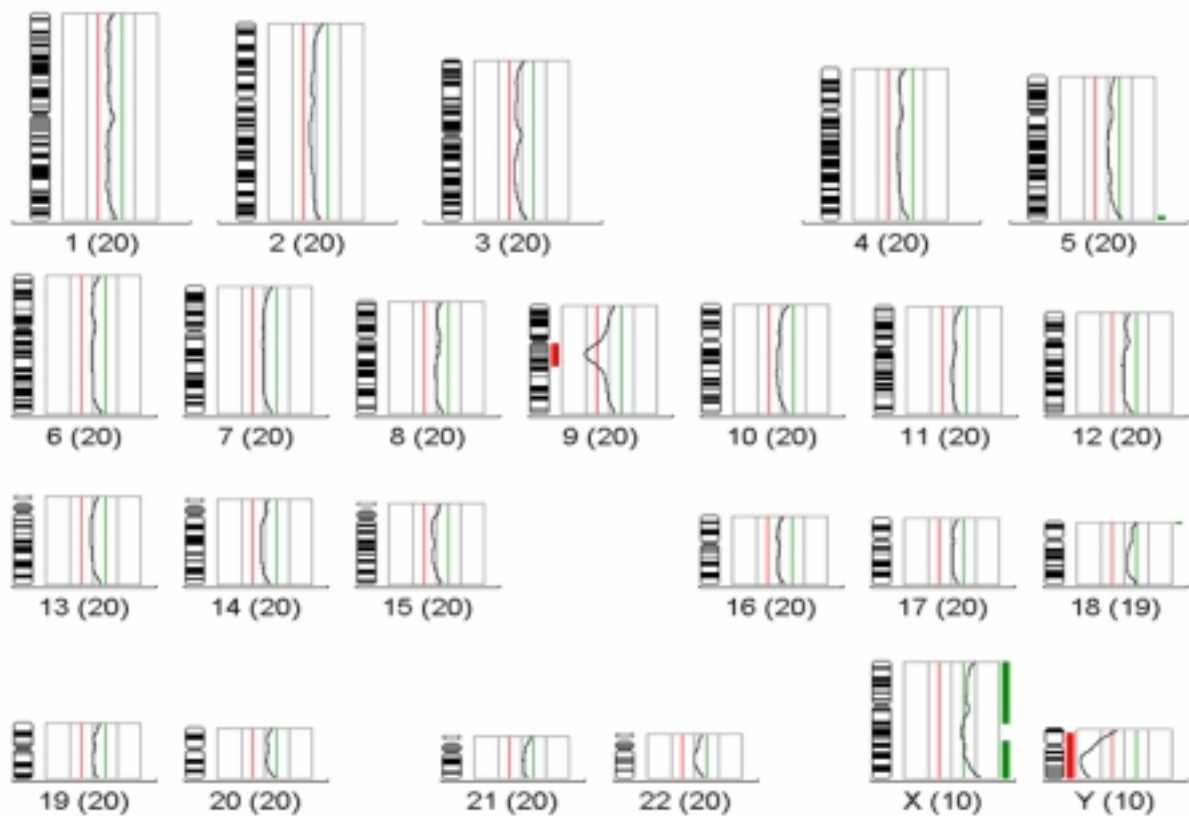


Abb.3.2.23. CGH-Profil der Primärtumor DNA des Falls „Ob-2006“, 2. Areal

Auch hier wurde von Normalgewebe der Niere ein Kontroll Experiment angefertigt, das CGH-Profil war - wie zu erwarten - unauffällig und wird daher nicht gezeigt.

Da das CGH-Profil an den beiden Geschlechtschromosomen das weibliche Geschlecht korrekt anzeigte, hätten numerische Veränderungen an den Autosomen gesehen werden müssen. Das Fehlen solcher Veränderungen könnte durch eine hohe „Kontamination“ mit normalen Zellen erklärt werden.

3.3. Analyse kultivierter disseminierter Tumorzellen von fünf Mammakarzinom Patientinnen

Mit der Analyse von fünf Mammakarzinom Patientinnen sollten die getesteten neuen Methoden angewendet werden. Hierzu wurden neben den jeweiligen Primärtumoren auch unter speziellen Bedingungen kultivierte disseminierte Tumorzellen mittels Einzelzell CGH und Interphase FISH analysiert. Die Kultivierung der Zellen und die Aufarbeitung für die Analyse wurden am Institut für Tumorbologie (UKE Hamburg) von Frau Dr. Elisabeth Breit durchgeführt.

Die Markierung der pan-Zytokeratin positiven Zellen erfolgte über den Antikörper A45 B/B3-Cy3. Diese markierten Zellen wurden am PALM MicroBeam System im Rhodamin Filter gesucht, anschließend mit dem Laser ausgeschnitten und in ein PCR-Reaktionsgefäß katapultiert. Nach dem Durchlaufen des optimierten Einzelzell CGH Protokolls konnte für diese Zellen ein Profil berechnet werden. Abbildung Abb.3.1.1. zeigt schematisch diesen Ablauf.

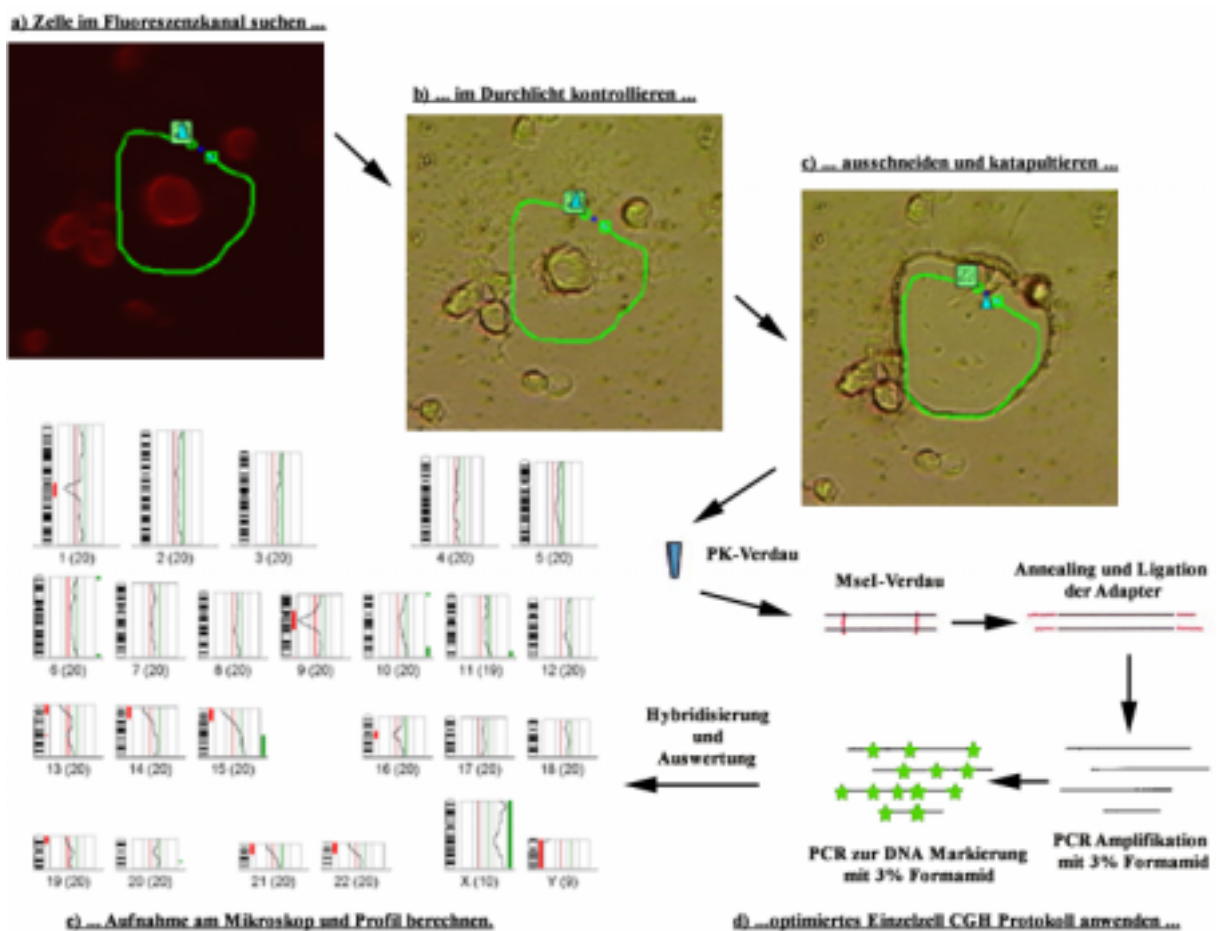


Abb.3.3.1. schematische Darstellung der Gewinnung und Verarbeitung von disseminierten Tumorzellen

Es wurden sowohl positive (Pos) als auch negative Einzelzellen als Kontrollen (K) katapultiert. Zusätzlich wurde auf Cy3 markierte Zellcluster geachtet (Cluster, Cl). Als Cluster wurden mehrere Zellen, die unmittelbar aneinander lagen, definiert.

In Abbildung Abb.3.3.2.werden für alle drei Zelltypen Beispielabbildungen im Durchlicht und im Rhodaminkanal gegeben.

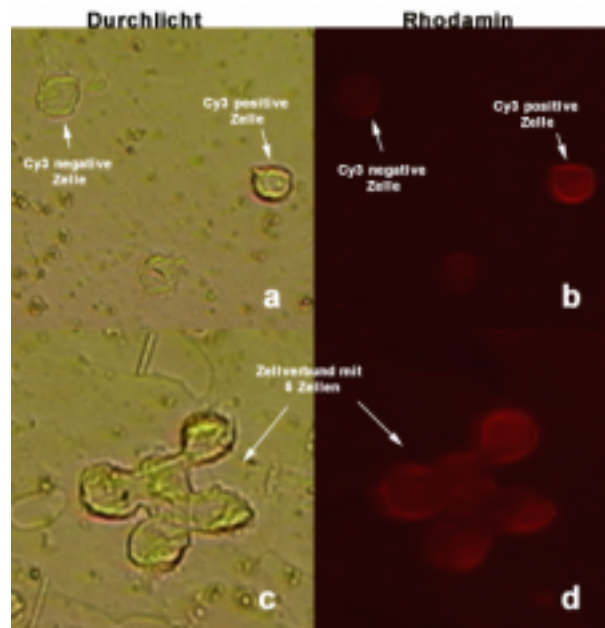


Abb.3.3.2. Darstellung der verschieden angefärbten Zelltypen

Abb. a & b Cy3 positive (Pos) und negative Zelle (K), im Durchlicht (a) und Rhodamin Filter (b)

Abb. c & d Cy3 positiver Zellverbund (Cl), im Durchlicht (c) und Rhodamin Filter (d)

Im Folgenden werden die Ergebnisse der einzelnen Analysen dargestellt.

Die Festsetzung der Schwellwerte für die CGH-Profile orientierte sich an der Auswertung der Interphase Versuche. Speziell die Signale der Sonde für Chromosom X wurden für die Ermittlung des Ploidiegrades herangezogen. Genauere Angaben hierzu werden in der Diskussion (siehe Kapitel 4.3.2.3. Seite 204) angeführt.

Zu berücksichtigen ist ebenso, dass bei der Hybridisierung der Zentromersonden auf die Superfrost*/Plus Präparate kultivierte Zellen verwendet wurden, die bereits mindestens eine Passage älter waren als die Zellen der Einzelzell CGH. Der Grund lag in der Benutzung von beschichteten Objektträgern am Institut für Tumorbologie am UKE Hamburg bei der Präparation der kultivierten Zellen für die Interphase FISH. Diese Objektträger sind allerdings für eine Hybridisierung ungeeignet, so dass eine neue Präparation „älterer“ Zellen auf geeignete Objektträger (SuperFrost*/Plus, Firma Menzel-Gläser) nötig war.

3.3.1. Patientin 1125

3.3.1.1. Tumorbefund und Kulturverlauf der Zellen

Die Pathologie in Hamburg beschrieb das Mammakarzinom dieser Patientin als invasives duktales Karzinom im Tumorstadium pT1c, G III.

Die Kultur wurde nach der dritten Passage (P) verarbeitet und nach München zur molekularen Analyse geschickt. Abbildung Abb.3.3.3. beschreibt den genauen Kulturverlauf mit den Zeitpunkten des Aufteilens in neue Kulturflaschen (Split).

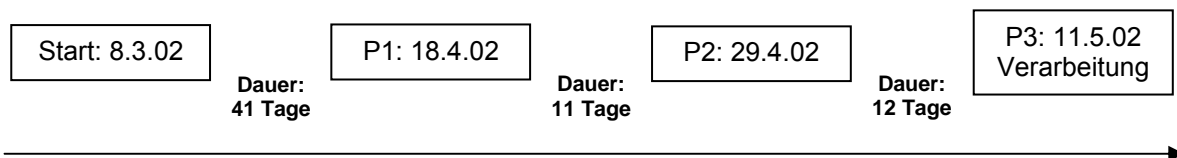


Abb.3.3.3. Schematische Darstellung des Kulturverlaufs

Der eingerahmter Bereich beschreibt das Datum des Splits der Kultur und die laufende Nummer der Passage P
Die Dauer beschreibt die Anzahl der Tage bis zum Split

3.3.1.2. Analyse des Primärtumors

Zur Analyse des Primärtumors wurde aus zwei Arealen von Parafin eingebetteten Tumorschnitten mehrere Zellen mit dem PALM MicroBeam System in ein Reaktionsgefäß katapultiert und mit dem Einzelzell CGH Protokoll (siehe Kapitel 2.4.2. und 2.4.4. Seiten 79 und 88) analysiert. Diese Vorgehensweise wurde für alle Primärtumoren verwendet.

Das Ergebnis des ersten Areals zeigte ein normales weibliches Profil (X überrepräsentiert, Y unterrepräsentiert) ohne Veränderungen. Daher wird auf eine Darstellung verzichtet.

Das zweite Areal wies folgende Veränderungen auf:

Verlust des vollständigen Chromosoms 13

Tendenz zum Verlust des vollständigen Chromosoms 22

Eine Zunahme an Material ist bei drei Teilbereichen zu erkennen:

Zunahme an Chromosom 1 im terminalen Abschnitt

Zunahme an Chromosom 8 im Abschnitt 8q11 bis 8qter

Tendenz zur Zunahme an Chromosom 17 im Abschnitt 17q11 bis 17qter

Das Profil wird in Abbildung Abb.3.3.4. gezeigt.

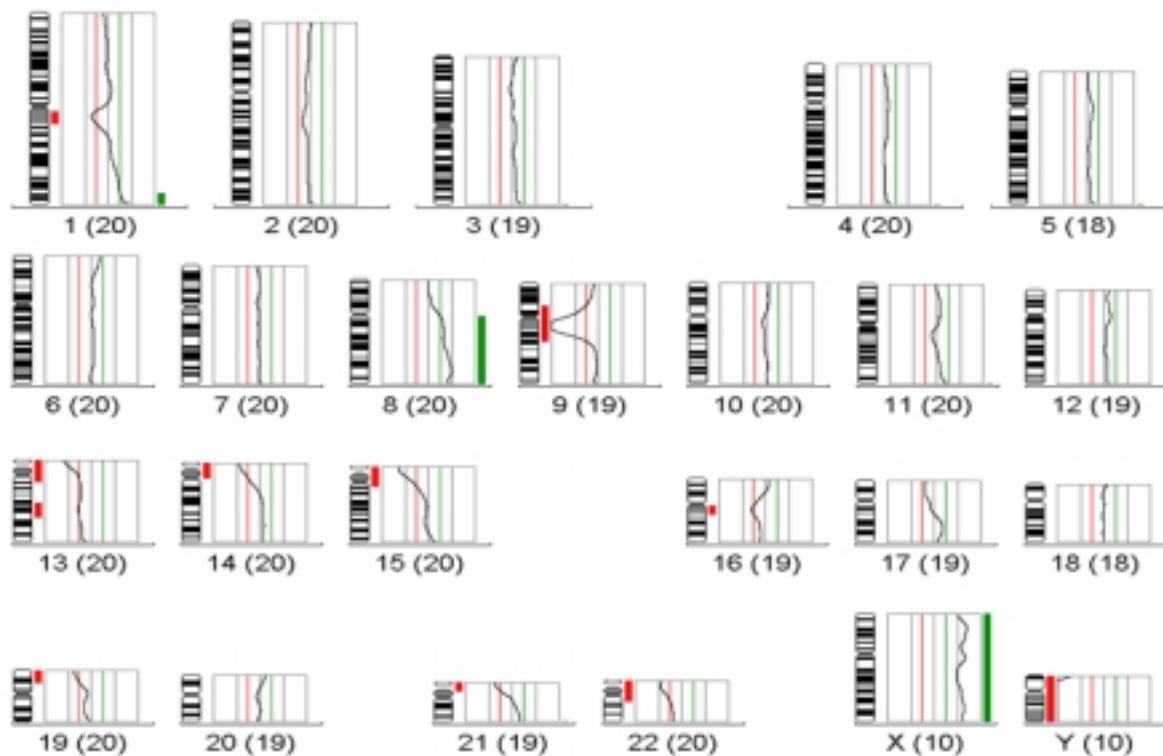


Abb.3.3.4. CGH-Profil des Primärtumors von Patientin 1125, 2. Areal
 Es wurden 10 Metaphasen ausgewertet und zu diesem Profil berechnet

3.3.1.3. Analyse von kultivierten disseminierten Tumorzellen mittels Einzelzell CGH

Es wurden insgesamt acht pan-Zytokeratin positive Einzelzellen (Pos) analysiert, 3 von ihnen (Pos 2, 3 und 6) zeigten kein weibliches Profil, so dass sie von der Analyse ausgeschlossen wurden.

Bei zwei nicht pan-Zytokeratin positiven Zellen erfolgte als Kontrollen (K) eine Auswertung. Beide zeigten ein unauffälliges Profil (siehe Abbildung Abb.3.3.5. A).

Zusätzlich konnte ein pan-Zytokeratin positiver Zellverbund (CI) mit 4 Zellen analysiert werden.

Die Schwellwerte wurden für alle Zelltypen auf den diploiden Wert (0,75 und 1,25) gesetzt.

Exemplarisch erfolgt die Darstellung von zwei Profilen - von einer Kontrolle (siehe Abbildung Abb.3.3.5. A) und einer positiven Zelle (siehe Abbildung Abb.3.3.5. B).

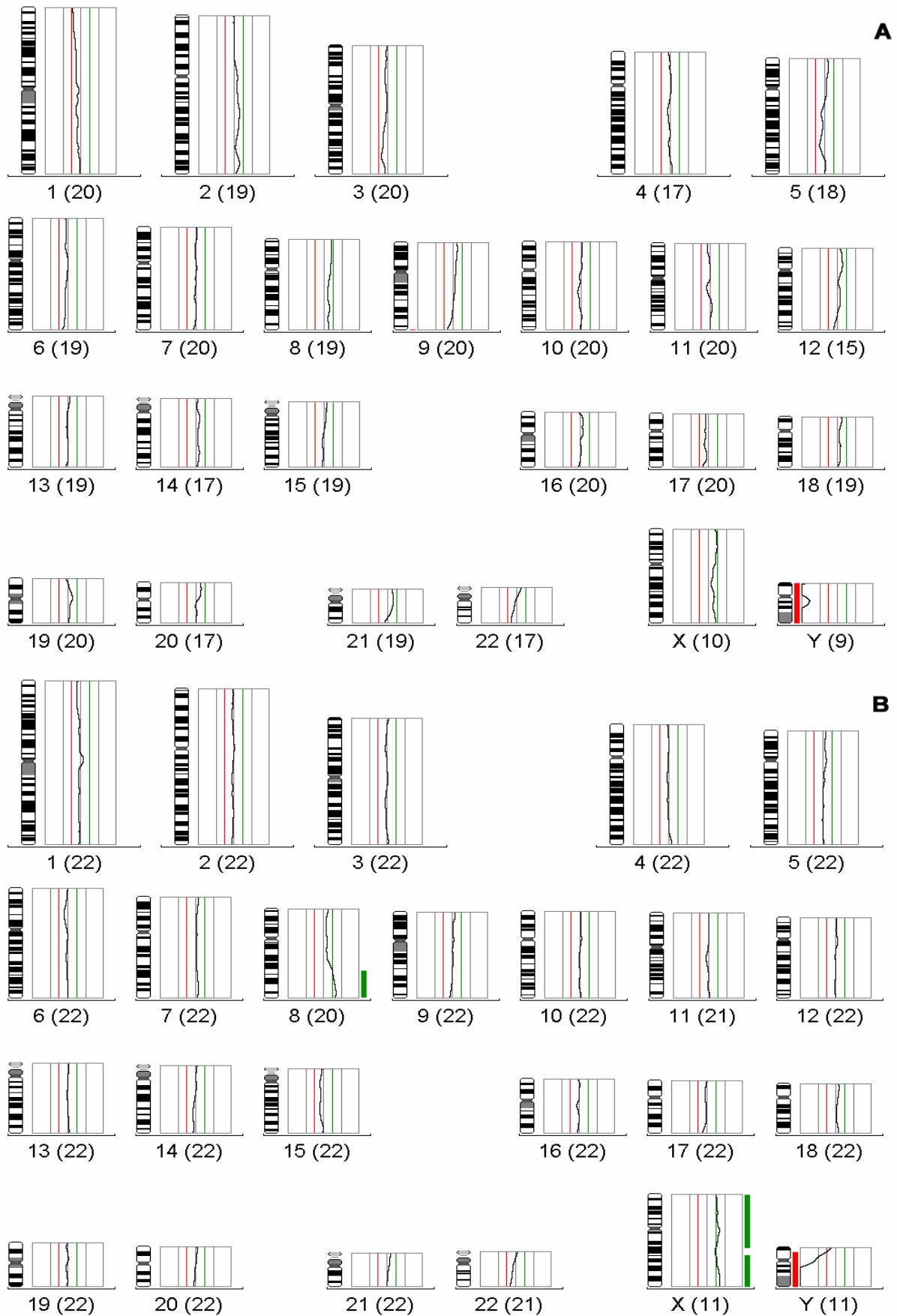


Abb.3.3.5. CGH-Profil der Patientin 1125, Einzelzellen

Bild A: Zytokeratin negative Zelle, als Kontrolle (K1), mit diploiden Schwellwerten

Bild B: Zytokeratin positive Zelle (Pos 1), mit diploiden Schwellwerten

Das Ergebnis aller Versuche wird in Tabelle Tab. 3.3.1. dargestellt.

	Gewinne an Chromosomenmaterial	Verluste an Chromosomenmaterial
Zelle Pos1	Chr. 8q21.3 - 8qter	
Zelle Pos4		Tendenz bei Chr. 17
Zelle Pos5	Chr. 19pter - 19p11	Tendenz bei Chr. 13
Zelle Pos7	Chr. 19pter - 19p11	
Zelle Pos8		Tendenz bei Chr. X
Cluster Cl1		Tendenz bei Chr. 19 und 22

Tab.3.3.1. Tabellarische Darstellung der Ergebnisse der Einzelzellanalyse mittels CGH von Patientin 1125
 Spalte 2 beschreibt die beobachteten Gewinne, Spalte 3 die Verluste an Chromosomenmaterial
 Die Zeilen 2-7 verweist auf die analysierten Zellen

3.3.1.4. Analyse von kultivierten disseminierten Tumorzellen mittels Interphase FISH

Die Hybridisierung des dT-Mixes mit Zentromersonden erfolgte auf einen Zytospin mit kultivierten disseminierten Tumorzellen.

Die verwendeten Objektträger (HistoBond der Firma Marienfeld) sind mit einer Schicht überlagert, die der besseren Haftung von Gewebe dienen soll. Diese Schicht bereitet allerdings bei der Hybridisierung der Sonden immense Probleme, so dass nur das X Chromosom ausgewertet werden konnte (siehe Abbildung Abb.3.3.6.). Die Signale im Fluorochromkanal Cy5 traten in den positiven Zellen nur sporadisch auf, so dass von einer Auswertung abgesehen wurde. In allen anderen Fluorochromkanälen waren keine Signale zu erkennen und somit eine eindeutige Auswertung nicht möglich.

In Hamburg stand von dieser Patientin kein weiteres Material an kultivierten Zellen zur Verfügung, so dass dieser Versuch auf anderen geeigneten Objektträgern (SuperFrost Plus, Firma Menzel Gläser) nicht wiederholt werden konnte.

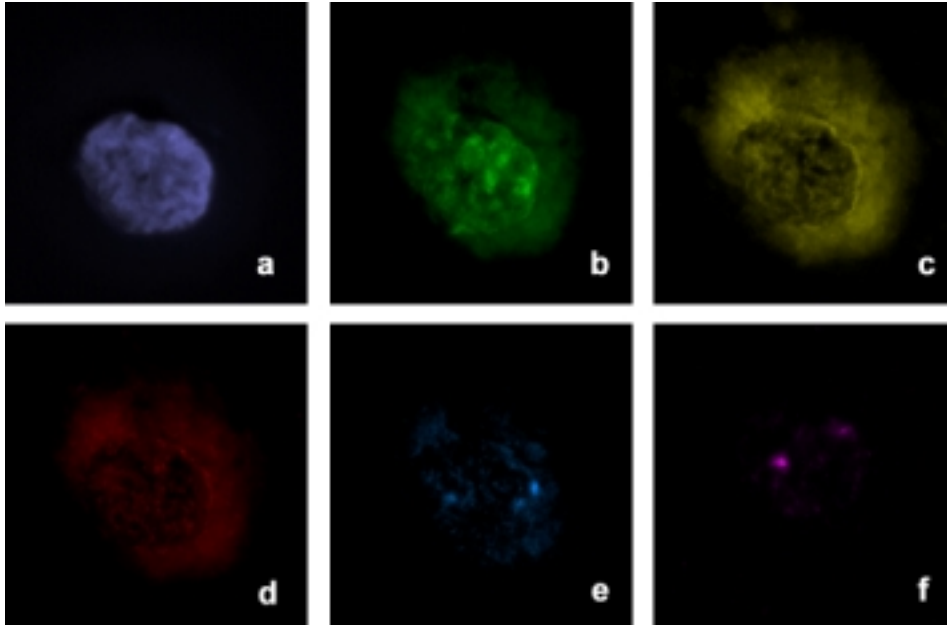


Abb.3.3.6. Kultivierte Knochenmarkszelle der Patientin 1125 auf einem beschichteten Objektträger
Abb. a)-f) Cy3 positive Zelle mit hybridisiertem dT-Mix,
in den einzelnen Fluorochromkanälen dargestellt:
a) DAPI, b) FITC, c) TAMRA, d) Cy3.5, e) Cy5, f) Cy5.5

Die Auswertung von zehn pan-Zytokeratin positiven Zellen ergab folgendes Ergebnis:

Ein Signal für Chromosom X in 4 Zellen

Zwei Signale für Chromosom X in 4 Zellen

Vier Signale für Chromosom X in 2 Zellen.

3.3.2. Patientin 1153/54

3.3.2.1. Tumorbefund und Kulturverlauf der Zellen

Das Mammakarzinom dieser Patientin wurde als lateral randständiges, invasives duktales Karzinom im Tumorstadium pT1c, Malignitätsgrad II beschrieben.

Die Kultur wurde nach der dritten Passage (P) verarbeitet. In Kultur wurden 2.2×10^7 Zellen genommen. Abbildung Abb.3.3.7. beschreibt den genauen Kulturverlauf mit den Zeitpunkten des Aufteilens in neue Kulturflaschen (Split).

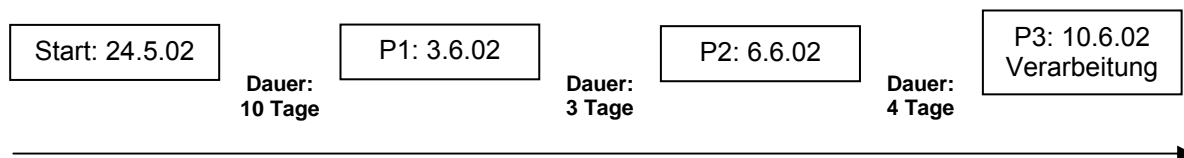


Abb.3.3.7. Schematische Darstellung des Kulturverlaufs

Der eingerahmter Bereich beschreibt das Datum des Splits der Kultur und die laufende Nummer der Passage P. Die Dauer beschreibt die Anzahl der Tage bis zum Split.

3.3.2.2. Analyse des Primärtumors

Das Ergebnis beider Areale zeigte dieselben Veränderungen. Daher wird nur ein Profil in Abbildung Abb.3.3.8. gezeigt.

Nur ein Verlust von Chromosom 19 konnte gezeigt werden. Ansonsten ist das Profil in beiden Fällen unauffällig.

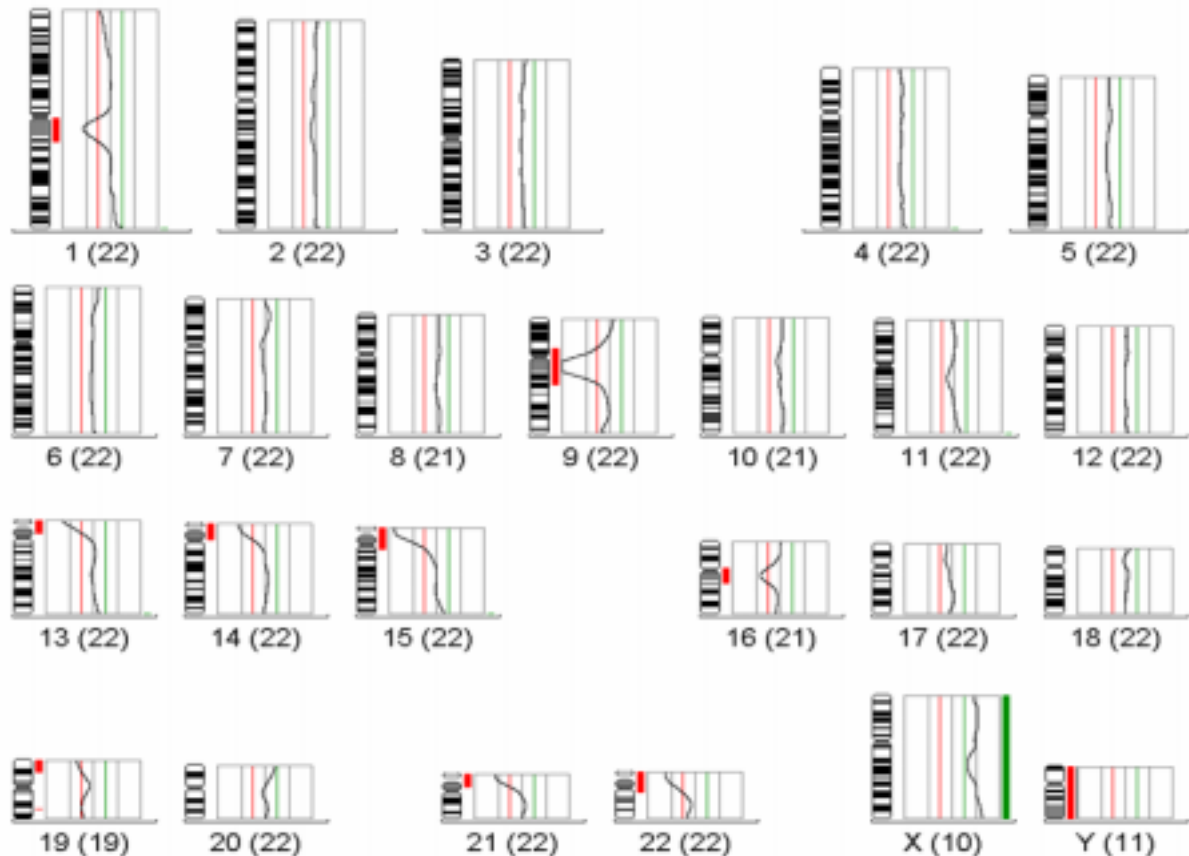


Abb.3.3.8. CGH-Profil des Primärtumors von Patientin 1153/54, 2. Areal
 Es wurden 11 Metaphasen ausgewertet und zu diesem Profil berechnet

3.3.2.3. Analyse von kultivierten disseminierten Tumorzellen mittels Einzelzell CGH

Es wurden insgesamt 12 pan-Zytokeratin positive Einzelzellen (Pos) analysiert, 6 von ihnen (Pos1, 4, 6, 9, 10 und 16) zeigten kein weibliches Profil.

Auch hier zeigten die beiden Kontrollen unauffällige CGH-Profile.

Die Zellverbände hatten folgende Zellzahlen: Pos3 und C13 mit 3 Zellen, C11 mit 5 Zellen.

Die Schwellwerte wurden für die positiven Zellen und die Zellverbände auf 0,83 und 1,17 gesetzt, dies entspricht einem triploiden Karyotyp.

Auch hier die Darstellung zweier repräsentativer CGH-Profile (siehe Abbildung Abb.3.3.9. A und B)

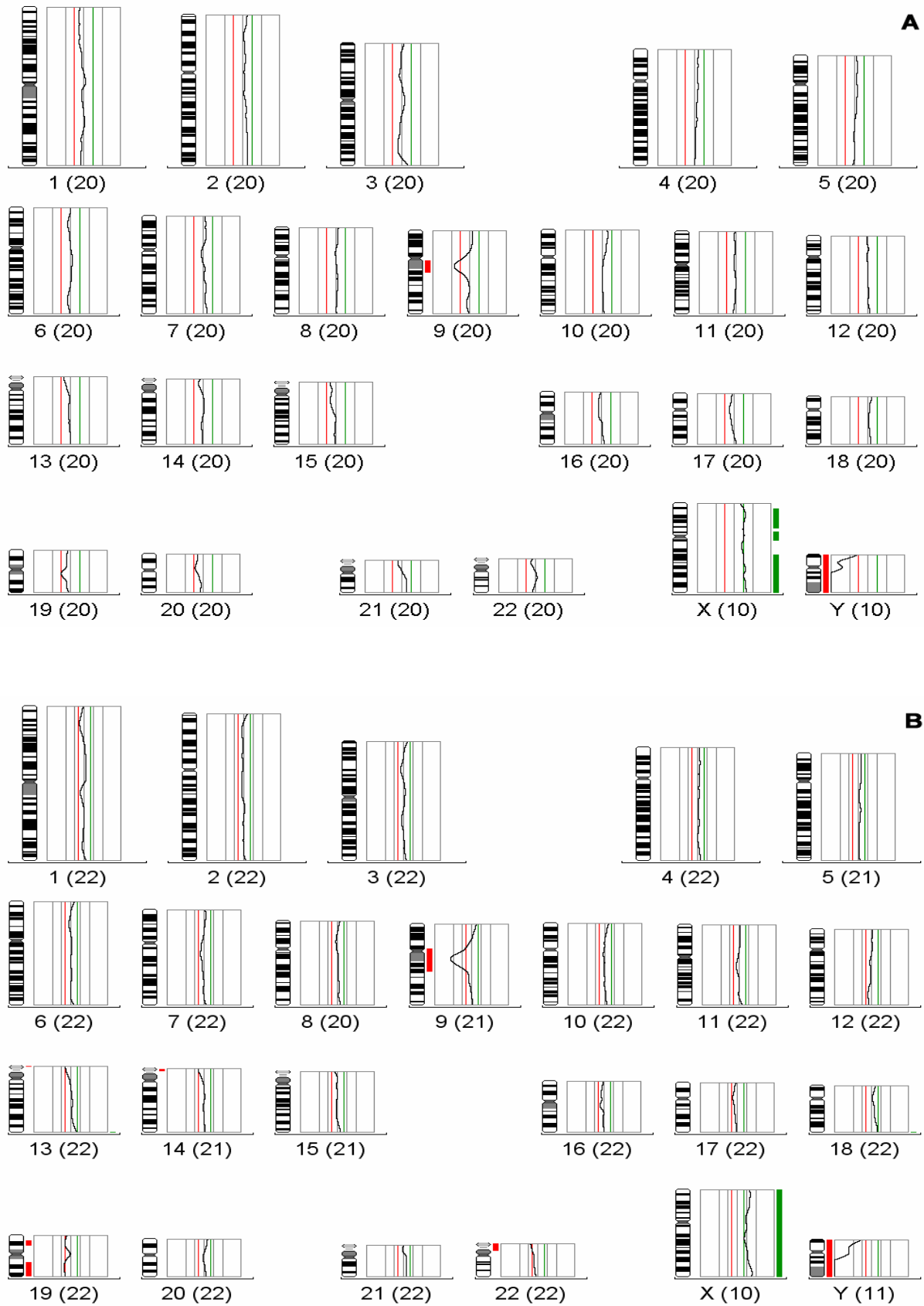


Abb.3.3.9. CGH-Profile der Patientin 1153/54, Einzelzellen

Bild A: Zytokeratin negative Zelle, als Kontrolle (K1); mit diploiden Schwellwerten

Bild B: Zytokeratin positiver Zellverbund (CI 1); mit triploiden Schwellwerten

Das Ergebnis aller Versuche wird in Tabelle Tab. 3.3.2. dargestellt.

	Gewinne an Chromosomenmaterial	Verluste an Chromosomenmaterial
Zelle Pos2	Tendenz bei Chr. 4q	19q und 22q Tendenz bei Chr. 17
Zelle Pos7		Chr. X
Zelle Pos8		Chr. 19
Zelle Pos11	Chr. 5q11 - 5q31 Tendenz bei Chr. 7 und 9p	Chr. 19, 20, 22q und X Tendenz bei Chr.15q terminal
Zelle Pos17	Chr. 20q Tendenz bei Chr.11q und 12q terminal	Tendenz bei Chr.13q21.1 bis 13q22
Zelle Pos18	Chr. 20q Tendenz bei Chr.11q und 12q terminal	Tendenz bei Chr. 13q21.1 bis 13q22
Cluster Pos 3		Chr. 17, 19 und 22 Tendenz bei Chr. 15 und 20
Cluster CI1		Chr. 19 Tendenz bei Chr. 22
Cluster CI3		Chr. X

Tab.3.3.2. Tabellarische Darstellung der Ergebnisse der Einzelzellanalyse mittels CGH von Patientin 1153/54
Spalte 2 beschreibt die beobachteten Gewinne, Spalte 3 die Verluste an Chromosomenmaterial.
Die Zeilen 2-7 verweist auf die analysierten Zellen.

3.3.2.4. Analyse von kultivierten disseminierten Tumorzellen mittels Interphase FISH

Die Hybridisierung des dT-Mixes mit Zentromersonden auf die beschichteten Objektträger konnte nicht ausgewertet werden. Festzuhalten ist allerdings, dass 5 pan-Zytokeratin positive Zellen gefunden wurden.

In Hamburg stand von dieser Patientin weiteres Material an kultivierten Zellen zur Verfügung, so dass dieser Versuch auf SpuerFrost Plus Objektträgern erneut durchgeführt werden konnte.

Aufgrund einer hohen Autofluoreszenz war die Auswertung nur für die Fluorochrome Cy3.5 für Chromosom 17, Cy5 für Chromosom 7 und Cy5.5 für das X Chromosom möglich (siehe Abbildung Abb.3.3.10.). Allerdings konnten keine eindeutig pan-Zytokeratin positiven Zellen erkannt werden.

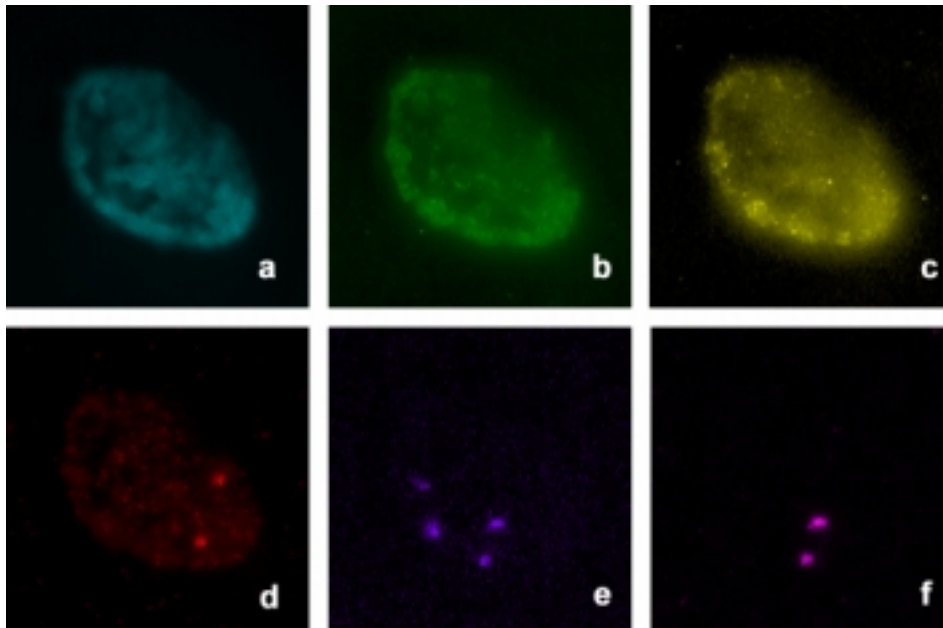


Abb.3.3.10. Kultivierte Knochenmarkszelle der Patientin 1153/54 auf einem nicht beschichteten Objektträger
 Abb. a)-f) Zelle mit hybridisiertem dT-Mix, in den einzelnen Fluorochromkanälen dargestellt:
 a) DAPI, b) FITC, c) TAMRA, d) Cy3.5, e) Cy5, f) Cy5.5

Daher wurden willkürlich 49 Zellen anhand der Signale für die Chromosomen 7, 17 und X ausgewertet (siehe Tabelle Tab.3.3.3.).

Patientin 1153/54, ausgewertete Zellzahl 49					
Signalzahl pro Sonde	12 FITC	16 TAMRA	17 Cy3.5	7 Cy5	X Cy5.5
n.a.	49	49	8	1	0
0	0	0	0	0	0
1	0	0	8	6	8
2	0	0	30	39	34
3	0	0	3	3	5
4	0	0	0	0	2

Tab.3.3.3. Tabellarische Darstellung der Ergebnisse der Einzelzellanalyse mittels Interphase FISH von Patientin 1153/54
 n.a.: nicht auswertbar
 Spalten 2-6: verwendete chromosomenspezifische Zentromersonden
 Zeilen 3-8: Anzahl der Signale pro Sonde

3.3.3. Patientin 1157/58

3.3.3.1. Tumorbefund und Kulturverlauf der Zellen

Das Mammakarzinom dieser Patientin wurde als infiltrierendes lobuläres Mammakarzinom im Tumorstadium pT2, G II beschrieben.

Die Kultur wurde nach der zweiten Passage (P) verarbeitet. Abbildung Abb.3.3.11. beschreibt den genauen Kulturverlauf mit den Zeitpunkten des Aufteilens in neue Kulturflaschen (Split).

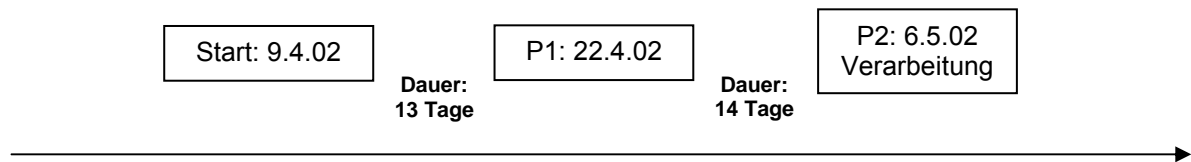


Abb.3.3.11. Schematische Darstellung des Kulturverlaufs

Der eingerahmter Bereich beschreibt das Datum des Splits der Kultur und die laufende Nummer der Passage P. Die Dauer beschreibt die Anzahl der Tage bis zum Split.

3.3.3.2. Analyse des Primärtumors

Das Ergebnis beider Areale zeigte dieselben Veränderungen. Daher wird wiederum nur ein Profil in Abbildung Abb.3.3.12. gezeigt.

Nur ein Verlust des langen Arms von Chromosom 16 konnte gezeigt werden. Ansonsten fiel nur die Tendenz zu einer Überrepräsentierung des langen Arms von Chromosom 1 auf.

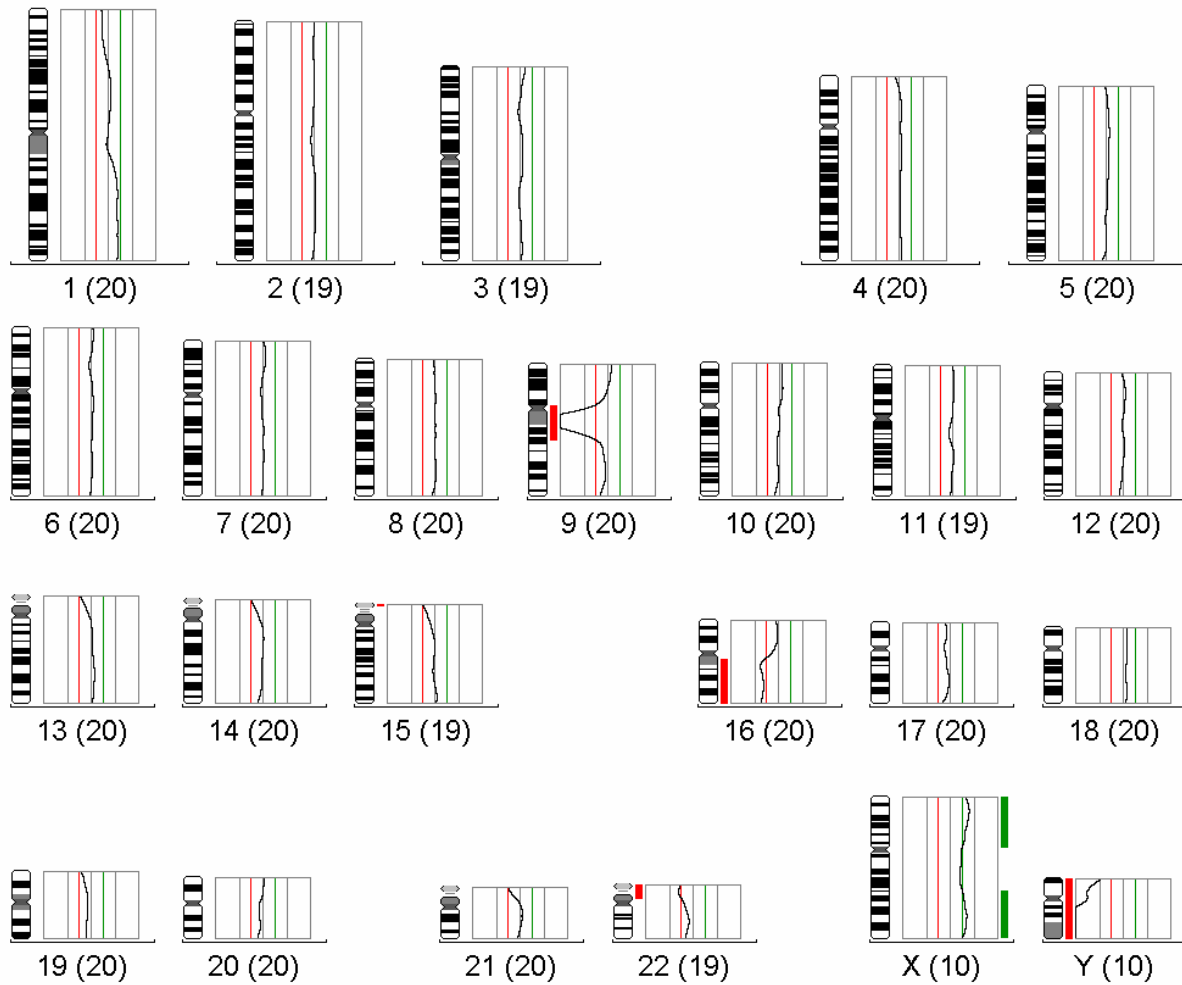


Abb.3.3.12. CGH-Profil des Primärtumors von Patientin 1157/58, 2. Areal
 Es wurden 10 Metaphasen ausgewertet und zu diesem Profil berechnet.

3.3.3.3. Analyse von kultivierten disseminierten Tumorzellen mittels Einzelzell CGH

Es wurden insgesamt sieben pan-Zytokeratin positive Einzelzellen (Pos) analysiert, zwei von ihnen (Pos1 und 2) zeigten keine Hybridisierungssignale.

Weiterhin wurden zwei nicht pan-Zytokeratin positive Zellen als Kontrollen (K) ausgewertet, sie zeigten unauffällige Profile. Zellverbunde konnten nicht gefunden werden.

Die Schwellwerte folgten einem triploiden Karyotyp.

Auch hier die Darstellung zweier repräsentativer CGH-Profile (siehe Abbildung Abb.3.3.13. A und B)

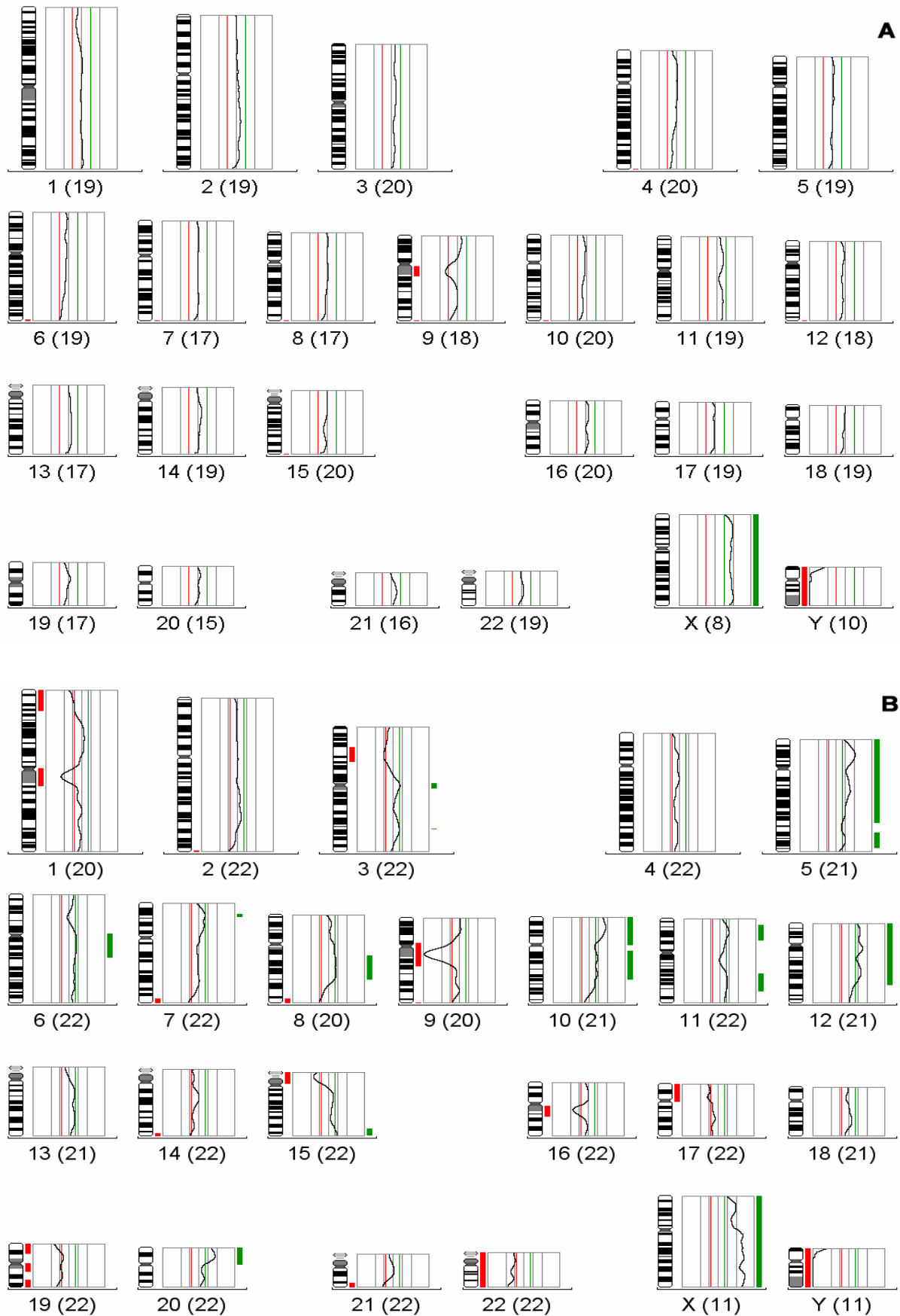


Abb.3.3.13. CGH-Profil der Patientin 1157/58, Einzelzellen
Bild A: Zytokeratin negative Zelle, als Kontrolle (K1); mit diploiden Schwellwerten
Bild B: Zytokeratin positive Zelle (Pos3); mit triploiden Schwellwerten

Das Ergebnis aller Versuche wird in Tabelle Tab. 3.3.4. dargestellt.

	Gewinne an Chromosomenmaterial	Verluste an Chromosomenmaterial
Zelle Pos3	Chr. 5, 10, 11, 12, Chr. 8q11 - 8q22.2 Tendenz bei Chr. 6, 7p, 13 und 15	Chr. 3p, 17, 19 und 22, sowie 1p terminal Tendenz bei Chr. 14
Zelle Pos4	Chr. 12q24 - 12qter Tendenz bei Chr. 1p, 10p, 15 und 22	Chr. 18q Tendenz bei Chr. 6q und 13q
Zelle Pos5	Chr. 19	
Zelle Pos6	Chr. 11q terminal Tendenz bei Chr. 12q terminal	Tendenz bei Chr. 4q, 5q und 13q
Zelle Pos7	Chr. 1pter - 1p33 Chr. 17, 19 und 22, Tendenz bei Chr. 16p und 12q terminal	Tendenz bei Chr. 13 und 18

Tab.3.3.4. Tabellarische Darstellung der Ergebnisse der Einzelzellanalyse mittels CGH von Patientin 1157/58
Spalte 2 beschreibt die beobachteten Gewinne, Spalte 3 die Verluste an Chromosomenmaterial
Die Zeilen 2-7 verweist auf die analysierten Zellen

3.3.3.4. Analyse von kultivierten disseminierten Tumorzellen mittels Interphase FISH

Auf den beschichteten Objektträgern wurden 13 pan-Zytokeratin positive Zellen gefunden, aber auch hier war keine Analyse der Sonden möglich.

Dieser Versuch wurde erneut auf anderen Objektträgern durchgeführt, doch auch hier konnten nicht alle Fluorochromkanäle ausgewertet werden (siehe Abbildung Abb.3.3.14.).

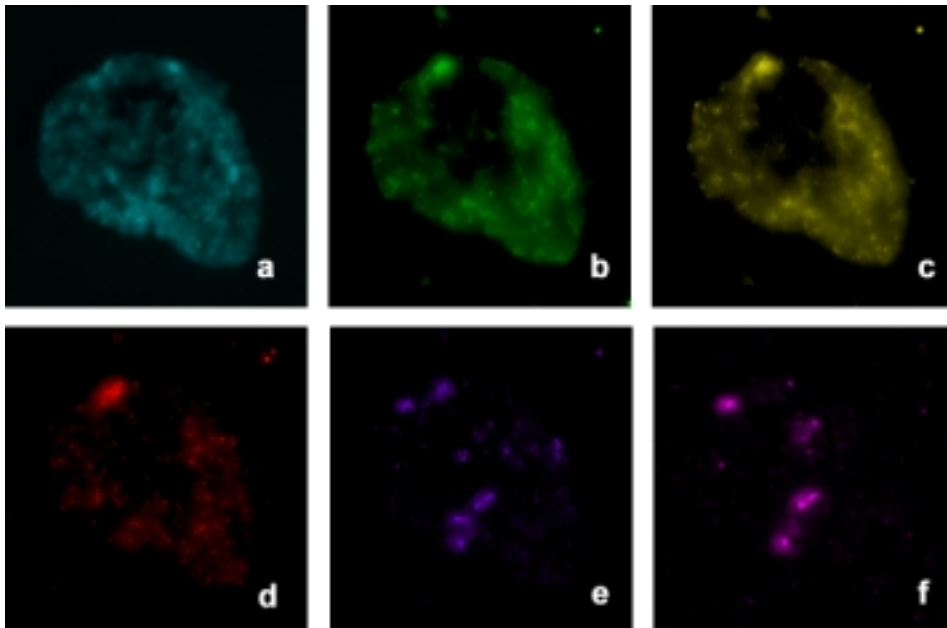


Abb.3.3.14. Kultivierte Knochenmarkszelle der Patientin 1157/58 auf einem nicht beschichteten Objektträger
 Abb. a)-f) Zelle mit hybridisiertem dT-Mix, in den einzelnen Fluorochromkanälen dargestellt:
 a) DAPI, b) FITC, c) TAMRA, d) Cy3.5, e) Cy5, f) Cy5.5

Die Auswertung bezieht sich nur auf die Fluorochrome Cy5 für Chromosom 7 und Cy5.5 für das X Chromosom. Zusätzlich konnten keine eindeutig pan-Zytokeratin positiven Zellen erkannt werden.

Die Auswertung erfolgte mit 52 Zellen für die Chromosomen 17 und X (siehe Tabelle Tab.3.3.5.).

Patientin 1157/58, ausgewertete Zellzahl 52					
Signalzahl pro Sonde	12 FITC	16 TAMRA	17 Cy3.5	7 Cy5	X Cy5.5
n.a.	52	52	52	1	0
0	0	0	0	3	0
1	0	0	0	11	1
2	0	0	0	31	37
3	0	0	0	3	5
4	0	0	0	3	8
5	0	0	0	0	1

Tab.3.3.5. Tabellarische Darstellung der Ergebnisse der Einzelzellanalyse mittels Interphase FISH von Patientin 1157/58

n.a.: nicht auswertbar

Spalten 2-6: verwendete chromosomenspezifische Zentromersonden

Zeilen 3-8: Anzahl der Signale pro Sonde

3.3.4. Patientin 1186/87

3.3.4.1. Tumorbefund und Kulturverlauf der Zellen

Das Mammakarzinom dieser Patientin wurde als invasives duktales Mammakarzinom im Tumorstadium pT1c, G II beschrieben.

Die Kultur wurde nach der dritten Passage (P) verarbeitet. Abbildung Abb.3.3.15. beschreibt den genauen Kulturverlauf mit den Zeitpunkten des Aufteilens in neue Kulturflaschen (Split).

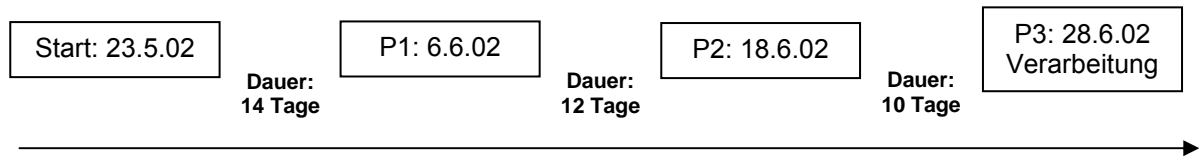


Abb.3.3.15. Schematische Darstellung des Kulturverlaufs

Der eingerahmter Bereich beschreibt das Datum des Splits der Kultur und die laufende Nummer der Passage P.
Die Dauer beschreibt die Anzahl der Tage bis zum Split.

3.3.4.2. Analyse des Primärtumors

Das Ergebnis beider Areale zeigte leicht voneinander abweichende Veränderungen. Daher werden beide Profile in Abbildung Abb.3.3.16. gezeigt.

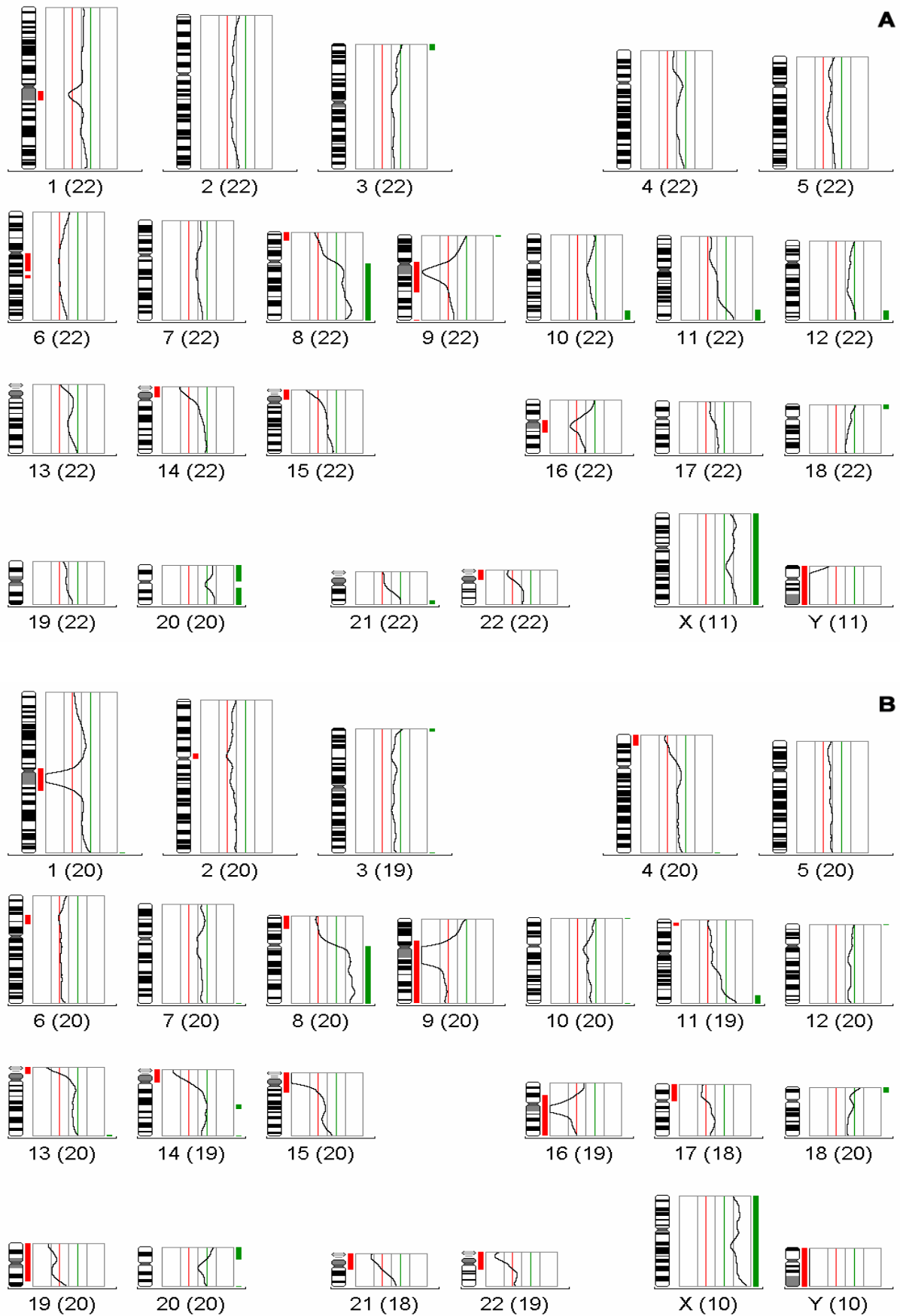


Abb.3.3.16. 2 CGH-Profile des Primärtumors von Patientin 1186/87 aus verschiedenen Arealen A und B
A: es wurden 11 Metaphasen ausgewertet
B: es wurden 10 Metaphasen ausgewertet

Die CGH aus Areal A ergab folgendes Ergebnis:

- Verlust im Chromosomenbereich 6p1 - 6q22
- Verlust im Chromosomenbereich 8pter - 8p23

Eine Zunahme an Material ist in mehreren Teilbereichen zu erkennen:

- Zunahme im Chromosomenabschnitt 8q11 - 8qter
- Zunahme im Chromosomenabschnitt 10q25 - 10qter
- Zunahme im Chromosomenabschnitt 11q23.2 - 11qter
- Zunahme im Chromosomenabschnitt 12q24 - 12qter
- Zunahme bei Chromosom 20
- Tendenz zur Zunahme bei Chromosom 14

Die CGH aus Areal B ergab folgendes Ergebnis:

- Verlust im Chromosomenbereich 4pter - 4p15
- Verlust im Chromosomenbereich 8pter - 8p22
- Verlust im Chromosomenbereich 9q11 - 9qter
- Verlust im Chromosomenbereich 16q11 - 16qter
- Verlust im Chromosomenbereich 17pter - 17p11
- Verlust des Chromosoms 19
- Tendenz zum Verlust bei Chromosom 6

Eine Zunahme an Material ist ebenso in mehreren Teilbereichen zu erkennen:

- Zunahme im Chromosomenabschnitt 8q11 - 8qter
- Zunahme im Chromosomenabschnitt 11q24 - 11qter
- Zunahme bei Chromosom 20p
- Tendenz zur Zunahme bei Chromosom 12, 14 und 20q

3.3.4.3. Analyse von kultivierten disseminierten Tumorzellen mittels Einzelzell CGH

Es wurden insgesamt fünf pan-Zytokeratin positive Einzelzellen (Pos) analysiert.

Weiterhin wurden zwei nicht pan-Zytokeratin positive Zellen als Kontrollen (K) ausgewertet. Sie zeigten keine Veränderungen. Die Zellverbunde C11-3 enthielten 5, 9 und 4 pan-Zytokeratin positive Zellen. Die Schwellwerte bleiben diploid, da keine Interphase Auswertung möglich war.

Auch hier die Darstellung zweier repräsentativer CGH-Profile (siehe Abbildung Abb.3.3.17. A und B)

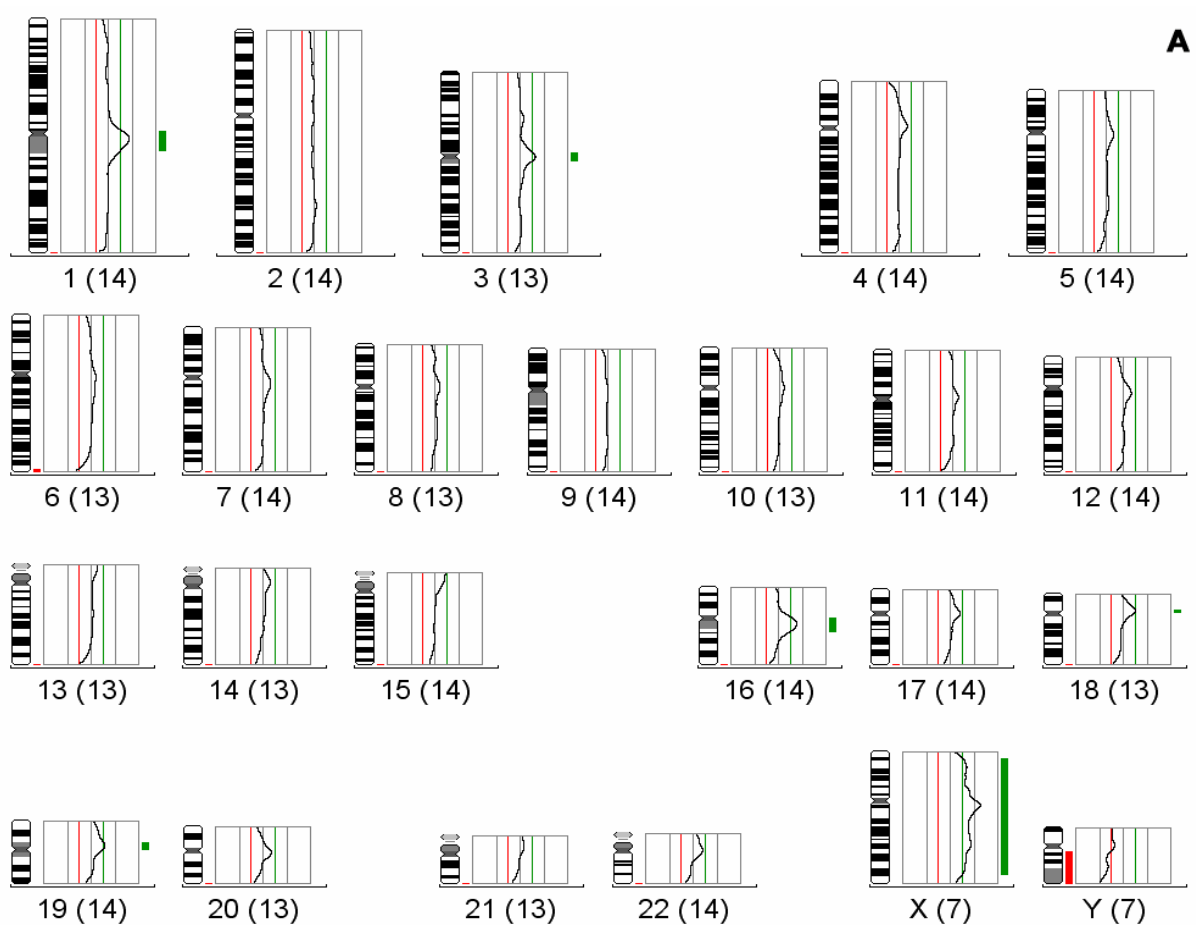


Abb.3.3.17. A CGH-Profile der Patientin 1186/87, Einzelzellen
Zytokeratin negative Zelle, als Kontrolle (K1); mit diploiden Schwellwerten

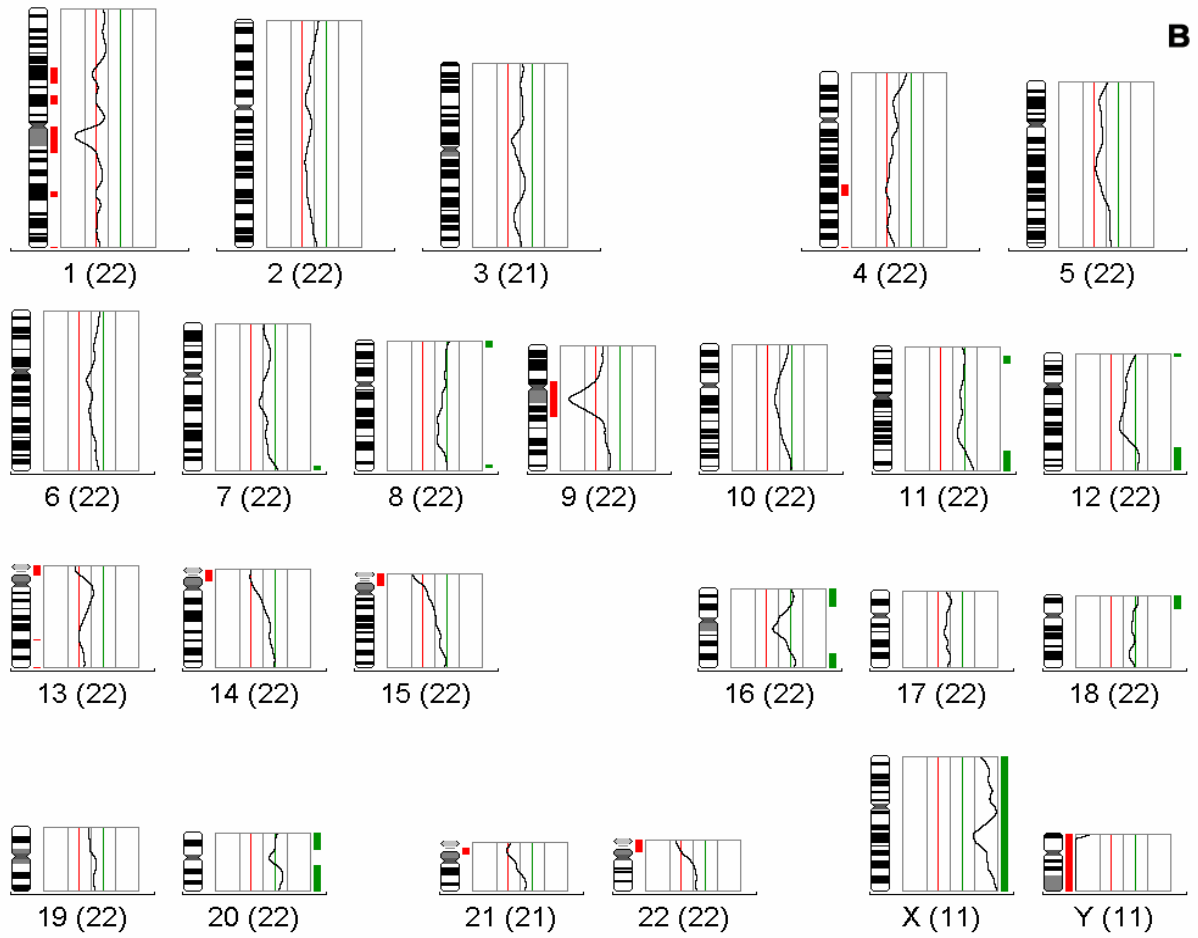


Abb.3.3.17. B CGH-Profil der Patientin 1186/87, Einzelzellen
 Zytokeratin positive Zelle (Pos1); mit diploiden Schwellwerten

Das Ergebnis aller Versuche wird in Tabelle Tab. 3.3.6. dargestellt.

	Gewinne an Chromosomenmaterial	Verluste an Chromosomenmaterial
Zelle Pos1	Chr. 11 Chr. 12q24 - 12qter Chr. 16 und 20 Tendenz Chr. bei 8, 14, 15 und 18 Tendenz bei Chr. 10q25 - 10qter	Chr. 1p31 - 1qter, Tendenz bei Chr. 4q und 13
Zelle Pos2	Chr. 15q22.1 - 15qter Tendenz bei Chr. 10q25 - 10qter, 11q24 - 11qter, 12q24 - 12qter und Chr. 20	Tendenz bei Chr. 4q und 13q
Zelle Pos3	Tendenz bei Chromosom 19p	
Zelle Pos4	Tendenz bei Chr. 10q25- 10qter, 11q24 - 11qter und 12q24 - 12qter Tendenz bei Chr. 15q26 - 15qter	Tendenz bei Chr. 19p
Zelle Pos5	Chr. 19p	
Cluster C11	Chr. 11q23 - 11qter, Chr. 20 Chr. 10q25 - 10qter und 12q24 - 12qter Tendenz bei 14q, 15q und 22	Chr. 4q, 13q21 - 13q22 Tendenz bei Chr. 9p
Cluster C12	Chr. 1pter - 1q24, Chr. 11p, Chr. 12q24-12qter Chr. 13q11 - 13q14 und 13q terminal, Chr. 16p, 19 und 22 Tendenz bei Chr. 6q, 17p und 20	Chr. 9p terminal Tendenz bei Chr. 5 und 7p
Cluster C13	Chr. 19 Tendenz bei Chr. 12q24 - 12qter und Chr. 20	

Tab.3.3.6. Tabellarische Darstellung der Ergebnisse der Einzelzellanalyse mittels CGH von Patientin 1186/87
Spalte 2 beschreibt die beobachteten Gewinne, Spalte 3 die Verluste an Chromosomenmaterial.
Die Zeilen 2-7 verweisen auf die analysierten Zellen.

3.3.4.4. Analyse von kultivierten disseminierten Tumorzellen mittels Interphase FISH

Auf den beschichteten Objektträgern wurden 7 pan-Zytokeratin positive Zellen gefunden, aber es war keine Analyse der Sonden möglich. Die Sonde für das X Chromosom (Cy5.5) zeigte in nur wenigen Fällen eine Hybridisierung, so dass kein repräsentatives Ergebnis zustande kam (siehe Abbildung Abb.3.3.18.).

Dieser Versuch konnte auch nicht mit neuen Objektträgern wiederholt werden, da kein Zellmaterial mehr zur Verfügung stand.

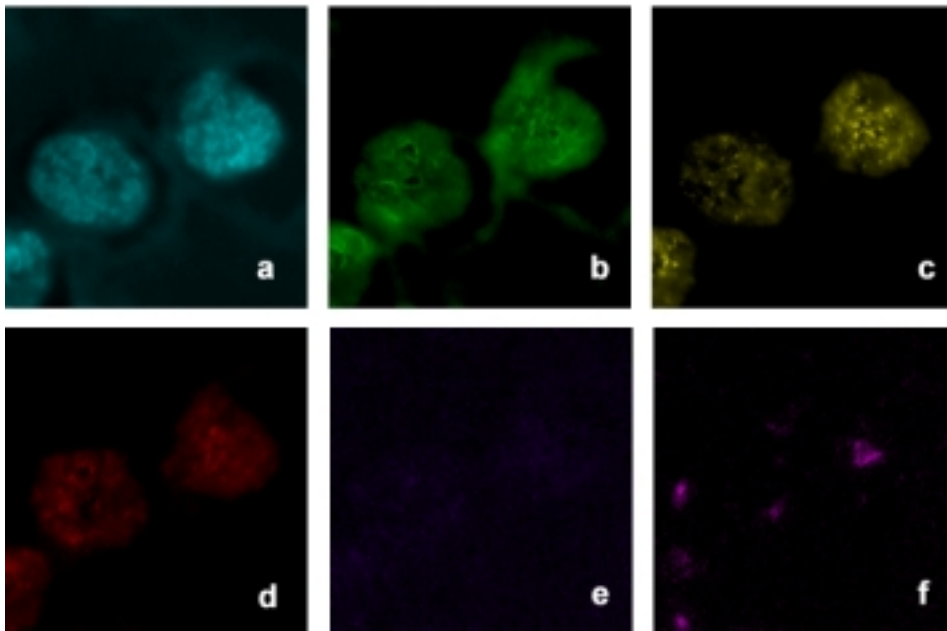


Abb.3.3.18. kultivierte Knochenmarkszelle der Patientin 1186/87 auf einem beschichteten Objektträger
 Abb. a)-f) Zelle mit hybridisiertem dT-Mix, in den einzelnen Fluorochromkanälen dargestellt:
 a) DAPI, b) FITC, c) TAMRA, d) Cy3.5, e) Cy5, f) Cy5.5

3.3.5. Patientin 1192/93

3.3.5.1. Tumorbefund und Kulturverlauf der Zellen

Der Tumorbefund beschreibt ein invasives solides Karzinom im Tumorstadium pT1c mit dem Malignitätsgrad III.

Die Kultur wurde nach der dritten Passage (P) verarbeitet. In Kultur wurden 2.2×10^7 Zellen genommen. Abbildung Abb.3.3.19. beschreibt den genauen Kulturverlauf mit den Zeitpunkten des Aufteilens in neue Kulturflaschen (Split).

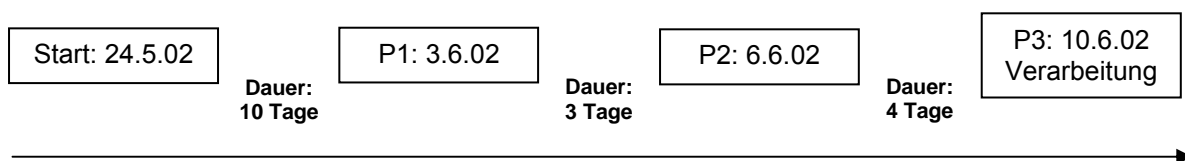


Abb.3.3.19. Schematische Darstellung des Kulturverlaufs

Der eingerahmter Bereich beschreibt das Datum des Splits der Kultur und die laufende Nummer der Passage P.
 Die Dauer beschreibt die Anzahl der Tage bis zum Split.

3.3.5.2. Analyse des Primärtumors

Erneut wurden zwei verschiedene Areale nach Mikrodissektion untersucht.

Das Ergebnis beider Areale zeigte leicht voneinander abweichende Veränderungen. Daher werden beide Profile in Abbildung Abb.3.3.20. gezeigt.

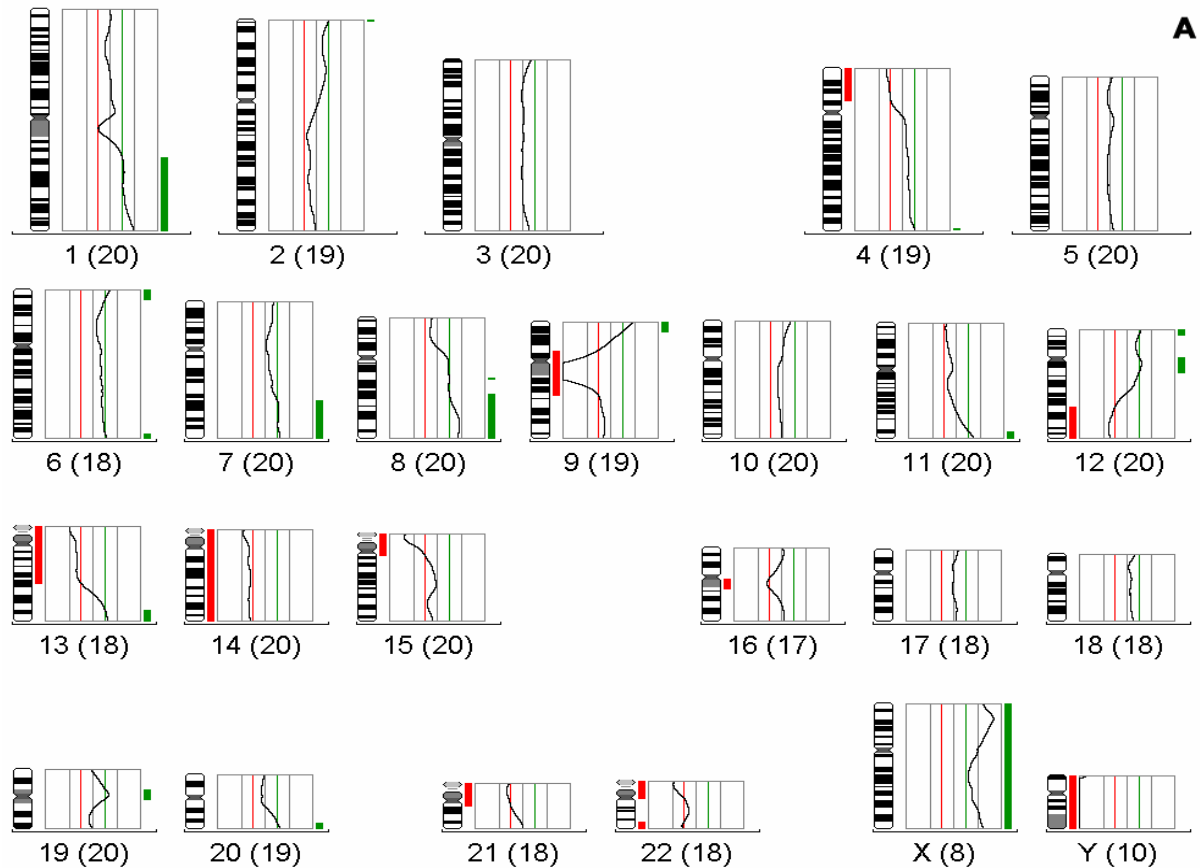


Abb.3.3.20. A 2 CGH-Profile des Primärtumors von Patientin 1192/93 aus verschiedenen Arealen A und B
es wurden 10 Metaphasen ausgewertet

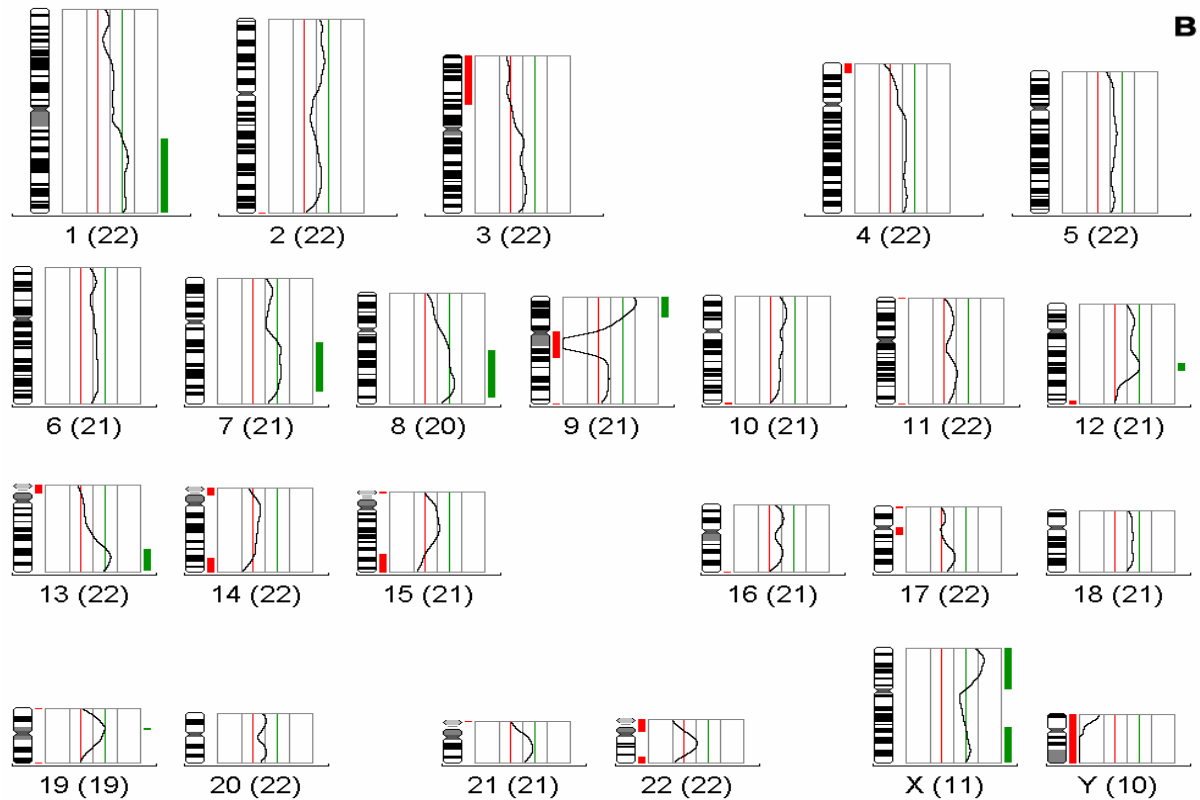


Abb.3.3.20. B 2 CGH-Profile des Primärtumors von Patientin 1192/93 aus verschiedenen Arealen A und B es wurden 11 Metaphasen ausgewertet

Die CGH aus Areal A ergab folgendes Ergebnis:

- Verlust im Chromosomenbereich 4p
- Verlust im Chromosomenbereich 12q22 - 12qter
- Verlust im Chromosomenbereich 13pter - 13q21.3
- Verlust des Chromosoms 14
- Verlust des Chromosoms 22
- Tendenz zum Verlust im Chromosomenbereich 8p und 11p

Eine Zunahme an Material ist in mehreren Teilbereichen zu erkennen:

- Zunahme im Chromosomenabschnitt 1q11 - 1qter
- Zunahme im Chromosomenabschnitt 7q31.2 - 7qter
- Zunahme im Chromosomenabschnitt 8q
- Zunahme im Chromosomenabschnitt 12pter - 12p11
- Zunahme im Chromosomenabschnitt 13q32 - 13qter
- Tendenz zur Zunahme bei Chromosom 6

Die CGH aus Areal B ergab folgendes Ergebnis:

- Verlust im Chromosomenbereich 3p
- Verlust im Chromosomenbereich 12q24 - 12qter
- Verlust von Chromosom14
- Verlust des Chromosoms 15q24 - 15qter
- Tendenz zum Verlust im Chromosomenbereich 4p und 17p

Eine Zunahme an Material ist in mehreren Teilbereichen zu erkennen:

- Zunahme im Chromosomenabschnitt 1q11 - 1qter
- Zunahme im Chromosomenabschnitt 7q21 - 7qter
- Zunahme im Chromosomenabschnitt 8q13 - 8qter
- Zunahme im Chromosomenabschnitt 9pter - 9p21
- Zunahme im Chromosomenabschnitt 12q15 - 12q21.3
- Zunahme im Chromosomenabschnitt 13q31 - 13qter

3.3.5.3. Analyse von kultivierten disseminierten Tumorzellen mittels Einzelzell CGH

Es wurden insgesamt 8 pan-Zytokeratin positive Einzelzellen (Pos) analysiert, eine von ihnen (Pos2) zeigte kein weibliches Profil.

Weiterhin ergab die Analyse von zwei nicht pan-Zytokeratin positive Zellen unauffällige Profile.

Die sechs Zellcluster setzten sich aus einer unterschiedlichen Anzahl von Zellen zusammen. Cl1 beinhaltete 4 Zellen, Cl2 8, Cl3 6, ClA 5, ClB 6 und ClC 4Zellen.

Auch hier die Darstellung zweier repräsentativer CGH-Profile mit einem triploiden Schwellwert für alle positiven Zellen (siehe Abbildung Abb.3.3.21. A und B).

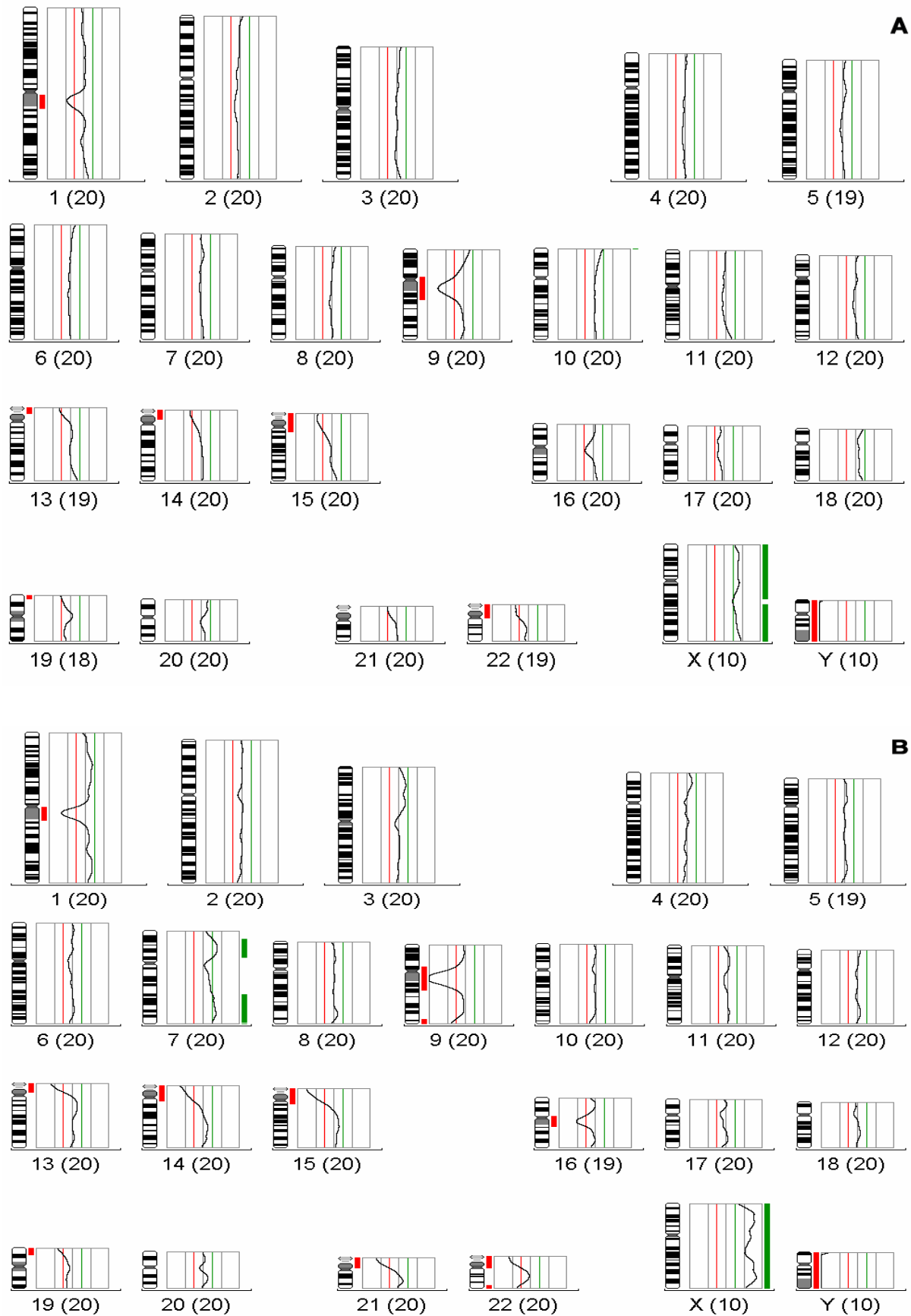


Abb.3.3.21. CGH-Profile der Patientin 1192/93, Einzelzellen
Bild A: Zytokeratin negative Zelle, als Kontrolle (K2); mit diploiden Schwellwerten
Bild B: Zytokeratin positiver Zellverbund (Pos3); mit triploiden Schwellwerten

Das Ergebnis aller Versuche wird in Tabelle Tab. 3.3.2. dargestellt.

	Gewinne an Chromosomenmaterial	Verluste an Chromosomenmaterial
Zelle Pos1	Chr. 19 und 22 Tendenz bei Chr. 16 und 17	
Zelle Pos3	Chr. 1p32 - 1qter, Chr. 3p und 7	Tendenz bei Chr. 19
Zelle Pos4	Chr. 19p	
Zelle Pos5	Chr. 19p	
Zelle Pos6	Chr. 1pter - 1p34.2, Chr. 19p und 22 Tendenz bei Chr. 16 und 17	
Zelle PosD	Chr. 4q22- 4qter, Chr. 5, 7, 10p, 11, 12, 13 und 14	Chr. 1pter - 1p33 und 1q32 - 1qter Chr. 8q24 - 8qter Tendenz bei Chr. 4p,17, 19 und 20
Zelle Pos E	Chr. 3, 4, 10p, 11 und 12	Chr. 14q31 - 14qter Chromosom 17p, 18, 20 und 22 Tendenz bei Chr. 19
Cluster CI1	Chromosom 19p	
Cluster CI2	Chromosom 19 und 22 Tendenz bei Chr. 1pter - 1p34 und 16p	Tendenz bei Chr. 13
Cluster CI3		Tendenz bei Chr. 13
Cluster CIA	Chr. 14pter - 14q21 Chromosom 19 und 22 Tendenz bei Chr. 17	Chromosom X
Cluster CIB	Chr. 13q21 - 13qter Chr. 15q22 - 15q24	Chr. 1pter - 1p33 Chr. 14q23 - 14qter Chr. 19 und 22 Tendenz bei Chr. 3p und 17
Cluster CIC		Tendenz bei Chr. 1pter - 1p33

Tab.3.3.7. Tabellarische Darstellung der Ergebnisse der Einzelzellanalyse mittels CGH von Patientin 1153/54
Spalte 2 beschreibt die beobachteten Gewinne, Spalte 3 die Verluste an Chromosomenmaterial.
Die Zeilen 2-7 verweist auf die analysierten Zellen.

3.3.5.4. Analyse von kultivierten disseminierten Tumorzellen mittels Interphase FISH

11 pan-Zytokeratin positive Zellen konnten auf den beschichteten Objektträgern gefunden werden. Die Auswertung der Hybridisierung war nur mit den neuen Objektträgern möglich.

Auch hier konnte aufgrund der Autofluoreszenz der FITC und TAMRA Kanal nicht ausgewertet werden (siehe Abbildung Abb.3.3.22.).

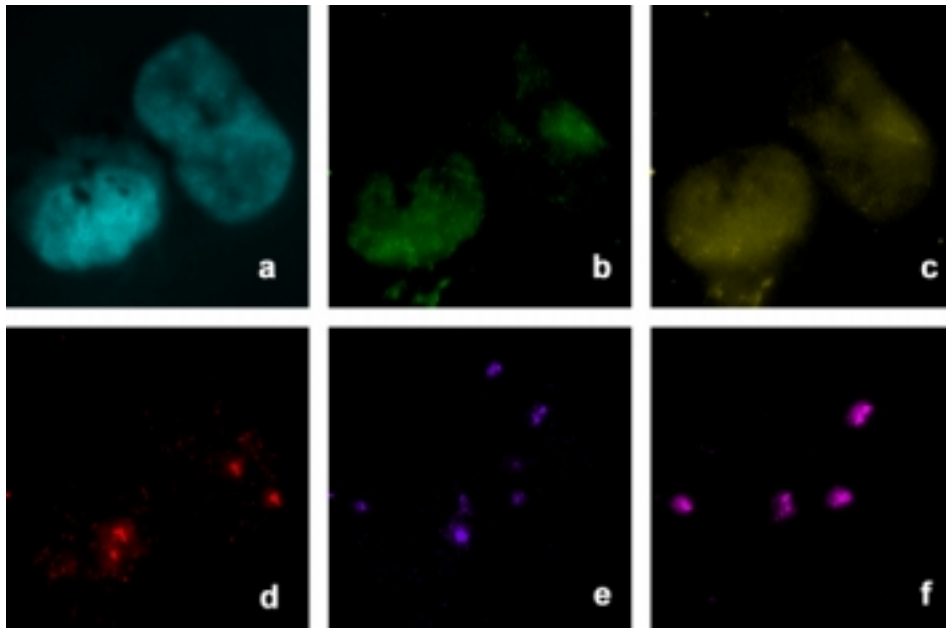


Abb.3.3.22. Kultivierte Knochenmarkszelle der Patientin 1192/93 auf einem nicht beschichteten Objektträger
 Abb. a)-f) Zelle mit hybridisiertem dT-Mix, in den einzelnen Fluorochromkanälen dargestellt:
 a) DAPI, b) FITC, c) TAMRA, d) Cy3.5, e) Cy5, f) Cy5.5

Die Auswertung erfolgte für die Chromosomen 7, 17 und X an 70 Zellen (siehe Tabelle Tab.3.3.8.).

Patientin 1192/93, ausgewertete Zellzahl 70					
Signalzahl pro Sonde	12 FITC	16 TAMRA	17 Cy3.5	7 Cy5	X Cy5.5
n.a.	70	70	7	0	0
0	0	0	0	2	1
1	0	0	5	7	12
2	0	0	51	56	52
3	0	0	7	5	5

Tab.3.3.3. Tabellarische Darstellung der Ergebnisse der Einzelzellanalyse mittels Interphase FISH von Patientin 1192/93
 n.a.: nicht auswertbar
 Spalten 2-6: verwendete chromosomenspezifische Zentromersonden
 Zeilen 3-7: Anzahl der Signale pro Sonde

4. DISKUSSION

4.1. Analyse von disseminierten Tumorzellen mittels Adapter-Linker PCR - Testsystem für eine neue Analysemethode

Die hier eingesetzte Adapter-Linker PCR wurde 1999 zum ersten Mal von C. Klein et al beschrieben. Es handelt sich dabei um ein Protokoll, das die DNA einer einzelnen Zelle so homogen amplifiziert, dass anhand einer anschließenden CGH die Gewinne und Verluste an Chromosomenmaterial einer einzigen Zelle identifiziert werden können.

Das Ziel dieser Doktorarbeit war es, diese Methode im Labor zu etablieren, seine Reproduzierbarkeit anhand einer stabilen Zelllinie auszutesten und anschließend bei disseminierten Tumorzellen anzuwenden.

4.1.1. Anwendung der Adapter-Linker PCR nach C. Klein et al. 1999

4.1.1.1. Adapter-Linker PCR nach C. Klein et al. 1999 und N. Stöcklein et al. 2002

Wie in Kapitel 3.1.1. (Seite 89) gezeigt, wurde die Zelllinie RCC-26 in verschiedenen Passagen als Testsystem für die Adapter-Linker PCR gewählt. Der zusammengesetzte Karyotyp aus zehn ausgewerteten M-FISH Metaphasen belegt die Stabilität der Zelllinie. So sind die Verluste des kurzen Arms der Chromosomen 3 und 8, sowie der Verlust des gesamten Chromosoms 14 charakteristisch und wurden in allen analysierten Metaphasen beobachtet. Die Analyse der DNA mittels CGH bestätigte die Beobachtungen des M-FISH Ergebnisses.

Betrachtet man diese Daten, ist zu erwarten, dass die Analyse von verschiedenen einzelnen RCC-26 Zellen aus der Zellkultur mittels Adapter-Linker PCR annähernd zu den gleichen Profilen führt, die in der klassischen CGH gezeigt werden konnte.

Die ersten Versuche wurden mit einem Protokoll durchgeführt, das leicht von dem ursprünglich publizierten abweicht. In Zusammenarbeit mit Herrn Dipl. Biol. Schmidt-Kittler und Herrn Dr. Klein aus dem Institut für Immunologie, LMU München konnte auf das Protokoll schon vor der Veröffentlichung zurückgegriffen werden (siehe Kapitel 2.2.1. Abbildung Abb.2.2.1. Seite 24, rote Pfeilfolge). Mittlerweile wurde dieses Protokoll publiziert (N. Stöcklein et al. 2002).

Die ersten Profile zeigten die zu erwartenden Verluste an Chromosom 3, 8 und 14. Allerdings traten zusätzliche Veränderungen an den Chromosomen 5, 6, 7, 11, 12 und 13 auf, die mit den klassischen CGH und M-FISH Daten nicht zu erklären waren (siehe Abbildung Abb.3.1.3. Seite 93). Auffällig waren auch die Muster der Profile. Diese waren unruhig und bauchförmig, wie sie bei einem CGH Experiment mit nicht amplifizierter genomischer DNA nicht auftreten. Dieses spezifische Muster war unabhängig von der verwendeten PCR-Maschine.

Als erster Schritt in der Fehleranalyse wurde die Bearbeitung der Plazenta DNA als Referenz-DNA umgestellt. Neben der Verwendung von nicktranslationsmarkierter DNA (dies entspricht der Markierungsart der klassischen CGH), wurde die Referenz-DNA nach dem Protokoll der Adapter-Linker PCR amplifiziert, markiert und hybridisiert. Die Verwendung der unterschiedlich verarbeiteten Referenz-DNA führte zu keiner Verbesserung der Profile.

Um Unregelmäßigkeiten in der verwendeten Referenz-DNA auszuschließen, wurden drei Versuchsansätze durchgeführt, die verschiedene Markierungen der Plazenta DNA beinhalteten. Dabei konnte gezeigt werden, dass die DNA -amplifiziert nach dem Adapter-Linker Protokoll und mit Biotin markiert- Tendenzen zum unregelmäßigen Profilverlauf aufwies, wohingegen die Digoxigenin markierte Plazenta DNA ein unauffälliges Profil zeigte. Das führte zur Vermutung, dass die Markierung der DNA mit verantwortlich für das auffällige Profil war. Bestätigt wurde dies mit dem Versuch, zwei einzelne RCC-26 Zellen mit Digoxigenin zu markieren. Auch hier war im Vergleich zur Markierung mit Biotin ein unauffälligeres Profil zu erkennen.

Die Ergebnisse aus der klassischen CGH (Kallioniemi et al.1992; du Manoir et al. 1993 und Joos et al. 1993) sind von der Art der Markierung unabhängig. Diese Tatsache ist außerordentlich wichtig, da sie entscheidend dazu beitragen kann, Artefakte von tatsächlichen numerischen Veränderungen zu unterscheiden. Bei der array CGH werden unterschiedlich markierte Test-DNAs zur Kontrolle mehrfach hybridisiert. Deshalb wurde nach effizienteren Lösungen für dieses Problem gesucht.

Da das bis dahin verwendete Protokoll nicht dem der ersten Publikation von C. Klein et al. 1999 entsprach, erfolgte als nächster Schritt die Umstellung zur Originalpublikation unter Verwendung der im Material und Methoden Teil beschriebenen Primer und Markierungs PCR. Dieses Protokoll zeigte ebenfalls das CGH-Profil mit dem unruhigen Verlauf. Daraus ist zu schließen, dass die jeweiligen verwendeten Primerpaare nicht für diese Muster verantwortlich sind.

Dennoch wurde die Primäre PCR als Ursache in Betracht gezogen. Eine Überlegung war, ob die Elongationszeit in der PCR für die längeren DNA Sequenzen aus dem Restriktionsenzym Verdau nicht ausreichte, um die DNA homogen zu amplifizieren. Thomas et al. 1999 verwendeten die Methode der „Long-Range PCR“ um längere DNA Fragmente zu

amplifizieren. Anlehnend an diesem Ansatz wurde die Elongationszeit der Primär-PCR auf 12 Minuten pro Zyklus verlängert. Bereits das Kontrollgel der Primär-PCR zeigte Unterschiede zwischen der herkömmlichen Primär-PCR und der veränderten PCR. Während der DNA-Schmier der herkömmlichen Primär-PCR zwischen 200 und 800 bp liegt, war der DNA-Schmier aus der veränderten PCR bis in den Kilobasenbereich zu sehen.

Die Markierung der „Long-Range PCR“ DNA nach dem Adapter-Linker Protokoll führte aber ebenfalls zu dem unruhigen Profil in der CGH Analyse und zeigte somit keine Verbesserung. Zeitgleich mit diesem Ansatz lief der Versuch das „Long-Range PCR“ Produkt mittels DOP-PCR erneut zu amplifizieren, um genügend DNA für eine Markierung mit Nicktranslation zu bekommen. Diese nicktranslationsmarkierte Long-Range PCR DNA zeigte eine deutliche Verbesserung im Profilverlauf im Vergleich zu den vorherigen Ergebnissen. Neben dem vergleichsweise ruhigen Verlauf der Profile konnten auch die erwarteten Verluste, wie z.B. der Verlust des kurzen Arms von Chromosom 3 erkannt werden.

Nicht zufriedenstellend an diesem Ansatz ist allerdings das äußerst lange Protokoll und die benutzte doppelte Amplifikation der DNA aus der „Long-Range PCR“ und der anschließenden DOP PCR.

4.1.1.2. Adapter-Linker PCR mit der Zugabe von Formamid

Bei der Betrachtung des „kurvigen“ Verlaufs der Profile fiel auf, dass die unerwarteten Veränderungen eng mit den R-Banden korrelierten. Helle AT reiche Banden zeigen eine Tendenz zur Überrepräsentierung, dunkle Banden sind eher im Normbereich (siehe Abbildung Abb.4.1.1.):

Diese Experimente erweckten den Eindruck, dass das Einzelzell PCR Protokoll bestimmte Banden präferenziell amplifizieren könnte.

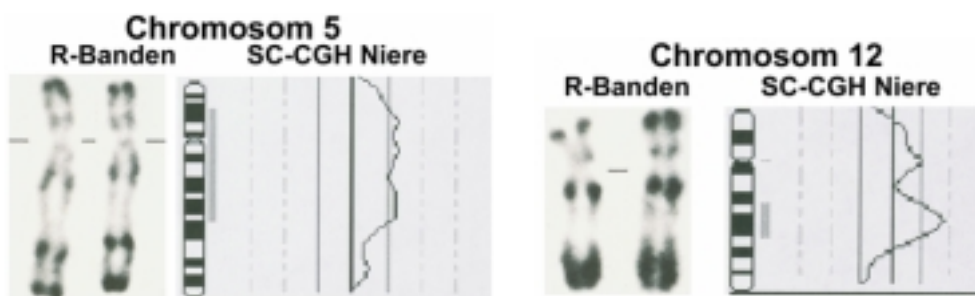


Abb.4.1.1. Vergleich der Einzelzell CGH-Profile mit den jeweiligen R-Banden Mustern der Chromosomen 5 und 12
linker Bildabschnitt: r-Banden Muster, rechter Bildabschnitt: CGH-Profil

Eine Überlegung war, dass die GC reichen dunklen Banden nicht ausreichend in den Primär-PCR amplifiziert würden. Die unterschiedliche Amplifikation von GC- oder AT-reichen Sequenzen unter bestimmten PCR-Bedingungen ist ein seit langem bekanntes Problem. Aus den Publikationen von Sarkar et al. 1990 und Zhang et al. 1991 war zu entnehmen, dass die Zugabe von Formamid die Amplifikation von GC reichen Sequenzen verbessern würde. Hintergrund hierfür ist die Überlegung, dass GC-reiche Sequenzen starke sekundäre Strukturen ausbilden und zusätzlich nach erfolgter Trennung der DNA Doppelstränge sich schnell wieder zusammenschließen. Durch die Zugabe von Formamid tritt eine Schwächung der hydrogenen Bindungen auf, so dass die Trennung der Doppelstränge erleichtert wird. Während die Zugabe von 1,25% Formamid in die Primär-PCR noch ohne Erfolg verlief, konnte bei der Zugabe von 2,5% Formamid in den Ansatz eine deutliche Verbesserung der Profilmuster erreicht werden. Die zuvor aufgetretenen unregelmäßigen Profilläufe waren nicht mehr zu erkennen und die zu erwartenden RCC-26 spezifischen Veränderungen konnten mit diesem Ansatz nachgewiesen werden. Andere Lösungen hingegen, wie die Zugabe von Q-Solution, zeigten sich für unsere Bedingungen als ungeeignet, da sie die homogene Amplifikation behinderten.

Im Folgenden wurde das Protokoll in solcher Weise abgeändert, dass in die Primär-PCR und in die Markierungs PCR 2,5% bzw. 3% Formamid gegeben wurden (siehe Kapitel 2.2.1. Abbildung Abb.2.2.1. Seite 24, grüne Pfeilfolge).

Um die Reproduzierbarkeit dieses Protokolls zu testen, wurde anhand der Zelllinie RCC-26 ein Vergleich zwischen M-FISH und CGH Daten mit der CGH Analysen von Einzelzellen durchgeführt.

4.1.2. Analyse von Einzelzellen der Zelllinie RCC-26 als Testsystem

Zu diesem Zweck wurden jeweils 16 einzelne RCC-26 Zellen mittels Nadelmikromanipulation in ein PCR Reaktionsgefäß gegeben. Nach der M-FISH Analyse war die Zelllinie RCC-26 in der Passage 75 hypertriploid. Die Schwellwerte für die CGH Analyse wurden dementsprechend angeglichen.

Bei der Analyse der 16 Zellen konnte bei zehn Zellen (62,5%) das erwartete RCC-26 spezifische Profil errechnet werden

Bei vier Zellen war das Profil bei allen Chromosomen (Autosomen und Gonosomen) auf der Mittellinie, entsprach also einem männlichen Profil. Eine mögliche Erklärung dafür wäre die Kontamination mit männlichen Zellen. Da das Profil die bekannten numerischen Veränderungen nicht einmal ansatzweise gezeigt hat, müsste eine Kontamination mit zahlreichen männlichen Zellen vorliegen. Dies ist aber aufgrund der Arbeitsbedingungen

relativ unwahrscheinlich. Eine unzureichende Suppression bei der Hybridisierung scheidet als Ursache aus, da die Heterochromatinblöcke keine Signale zeigten. Da verschiedene Hybridisierungen mit diesem Amplifikationsprotokoll stets die gleichen geraden Profile ergaben, ist die Ursache am ehesten bei der PCR zu suchen. Die Amplifikation des gesamten Genoms aus einer Zelle ist aufgrund der geringen Ausgangsmenge sehr fehleranfällig, so dass manchmal ein völlig unspezifisches Produkt entstehen kann. Die Sensibilität der PCR zeigt sich auch darin, dass trotz Formamid in zwei Fällen das zuvor beschriebene Strukturmuster auftrat.

In allen zehn erfolgreich analysierten Einzelzellen konnte der Verlust des kurzen Arms von Chromosom 3 und 8, sowie der Verlust des Chromosoms 14 nachgewiesen werden. Dies deckte sich mit M-FISH Ergebnissen. Auch hier war in allen Metaphasen der Verlust von 3p und 8p zu erkennen, der aus dem Translokationsereignis $der(3;8)(8qter \rightarrow 8q11::3q11 \rightarrow 3qter)$ entsteht, und Chromosom 14 zeigte in allen Metaphasen einen Verlust von mindestens einem Chromosom.

In den numerischen Anomalien anderer Chromosomen zeigte sich ein ähnliches Bild. Der Verlust von mindestens einer Kopie von Chromosom 18 zeigte sich in allen Fällen der M-FISH Analyse und in neun Fällen der Einzelzell CGH (90%). Für den langen Arm von Chromosom 1 ergaben beide Analysen in 100% der Fälle eine Überrepräsentation dieses Bereichs.

Auch bei Chromosom 5 zeigten beide Analysemethoden Übereinstimmungen. In sieben von zehn Fällen (70%) in der CGH war eine Kopie mehr vorhanden, bei M-FISH zeigte sich dieses Bild in sechs von neun Fällen (66%).

Aber auch Abweichungen zwischen beiden Analysemethoden waren zu erkennen. Ein Beispiel ist Chromosom 7: In 100% der Metaphasen war eine Kopie mehr vorhanden als der Ploidiegrad aussagt, wohingegen das Profil der Einzelzell CGH nur in sechs Fällen (60%) über den Schwellwert für eine Amplifikation ging. Ähnliches ist bei den Chromosomen 18 und 22 zu erkennen.

Zu erwähnen ist noch, dass zur Bestätigung der Unabhängigkeit dieses Protokolls von der Art der Markierung die DNA von jeweils drei Zellen mit Biotin markiert wurden. Sie zeigten die gleichen RCC-26 spezifischen Veränderungen wie alle zehn Digoxigenin markierten Einzelzellen.

Somit konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von Formamid die Spezifität der Adapter-Linker PCR erhöht.

Durch die Auswahl einer in ihren Veränderungen homogenen und stabilen Zelllinie wurde danach die Reproduzierbarkeit dieser Technik demonstriert und im Vergleich mit anderen zytogenetischen Methoden, wie der M-FISH Technik oder der CGH kam es zu übereinstimmenden Ergebnissen.

4.1.3. Analyse von Einzelzellen der Zelllinie RCC-26 - Mikromanipulation mit dem PALM MicroBeam System

Der Einsatz des PALM MicroBeam Systems der Firma P.A.L.M. Mikrolaser Technologies AG, Bernried zur Gewinnung von einzelnen Zellen hat mehrere Vorteile.

Durch die Möglichkeit der kontaktfreien Zellgewinnung aufgrund der Laserfunktion ist die Gefahr einer Kontamination durch Fremdgewebe reduziert. Bei der Nadelmikromanipulation ist der direkte Kontakt zwischen Zelle und Nadel unvermeidbar, so dass eine Kontamination hier leichter möglich ist.

Ein weiterer Vorteil ist die Schnelligkeit mit der die zu analysierende Probe in das PCR Reaktionsgefäß gebracht wird. Der vollautomatisierte Mechanismus schneidet die Probe aus und katapultiert sie in den Deckel des Gefäßes. Im Vergleich dazu wird bei der herkömmlichen Methode der Mikromanipulation die Zelle erst in einem Puffer abgelegt, um anschließend mit einer Pipette aufgenommen zu werden.

Zusätzlich ist es möglich die disseminierten Tumorzellen mit dem ausgetesteten Antikörper A45 B/B3-Cy3 zu markieren, da an das MicroBeam System eine Fluoreszenzeinheit gekoppelt ist.

Einen Nachteil bringt das Verwenden einer Folie, die auf den Objektträger gespannt ist. Sie dient als Unterlage unter der Probe, um dem Laser eine Grundlage zum Schneiden zu geben und die Probe auf einer Art Tablett in den Deckel des PCR Gefäßes zu transportieren.

Es ist bekannt, dass bei größeren DNA Mengen die Folie nicht die weitere Verarbeitung stört, allerdings gab es bis zu diesem Zeitpunkt keine Informationen zur Verarbeitung einer einzelnen Zelle.

Auch hier diente die Zelllinie RCC-26 als Testsystem. Allerdings konnte von dieser Passage keine Metaphasenanalyse mit M-FISH gemacht werden. Der Ploidiegrad wurde über Interphase Daten ermittelt, so dass auch hier die Schwellwerte richtig gesetzt werden konnten.

4.1.3.1. Vergleich verschiedener Protokolle

Von P.A.L.M. Mikrolaser werden zwei verschiedene Folien angeboten. Es handelt sich um eine Polyethlen-Naphtalat Folie (PEN) und eine Polyester Folie (POL).

Mit der POL-Folie wurden 21 einzelne Zellen und 2 mal je fünf und zehn Zellen in ein PCR Gefäß katapultiert. Nach der Primär-PCR war ein Gelschmier an DNA zu erkennen, wie er aus vorangegangenen PCR's bekannt war. Allerdings war keine der Hybridisierungen

erfolgreich. Die DNA der Einzelzellen zeigte keine Signale im FITC Kanal, wohingegen die Referenz-DNA im Cy3.5 Kanal deutliche Signale ergab.

Acht katapultierte Zellen aus der PEN-Folie wiesen hingegen in sechs Fällen ein Hybridisierungssignal, allerdings in nur zwei Fällen ein RCC-26 spezifisches Profil auf.

Da aber in den meisten Fällen nach der Primär-PCR ein Gelschmier zu erkennen war, wurden, um die Markierung als Ursache auszuschliessen, weitere Protokolle ausgetestet.

Bei Snijder et al. 2001 wurde die gleiche Adapter-Linker PCR verwendet, um die DNA aus BAC-Klonen zu amplifizieren, anschließend an die Primäre PCR wurde eine weitere PCR zur Vermehrung der DNA durchgeführt. An dieses Protokoll anlehnend wurden zwei weitere Markierungswege versucht. Zum einen erfolgte die Markierung der Primär-PCR Produkte in der weiteren PCR nach Snijders et al durch die Zugabe von Digoxigenin in den Ansatz (siehe Kapitel 2.2.3.8. Ansatz B, Seite 52), zum anderen wurde sie als weitere Amplifikations PCR eingesetzt, um die Markierung mit Nicktranslation zu ermöglichen (siehe Kapitel 2.2.3.8. Ansatz B, Seite 52). Die Hybridisierung der DNA aus diesen Ansätzen schlug trotz mehrmaligem Einsatz ebenfalls fehl.

Um auszuschließen, dass diese neuen Markierungsarten generell nicht geeignet sind, wurde eine Zelle, die auf PEN-Folie aufgebracht war, mit allen drei Markierungsarten (Amplifikation nach Snijder et al. 2001 mit anschließender Markierung durch Nicktranslation; Amplifikation nach Snijder et al. 2001 als Markierungs PCR; nach dem Einzelzell CGH Protokoll markiert) verarbeitet und hybridisiert. In diesem Ansatz zeigten plötzlich alle drei Profile die RCC-spezifischen Veränderungen und waren gleich (siehe Kapitel 3.1.5.4. Seite 107).

Als mögliche Ursache für die oben genannten Probleme kommt ein Detail aus dem experimentellen Ansatz in Frage, das anfänglich nicht beachtet worden war. Da bei der Adapter-Linker PCR das Anfangsvolumen sehr klein ist, wurde in den ersten Experimenten nicht der gesamte Deckel sondern nur die Mitte mit Puffer bedeckt. Nach Herstellerangabe liegt die Wahrscheinlichkeit, dass eine Zelle tatsächlich irgendwo im Deckel ankommt über 98%, die Wahrscheinlichkeit aber, dass sie jedoch genau in der Mitte ankommt, ist eher gering. Zellen die außerhalb des Puffers landen sind jedoch sehr anfällig für Artefakte, oder ...

Aufgrund dieser Tatsache wäre die Aussage, dass die Adapter-Linker PCR nur mit der PEN-Folie funktioniert, voreilig. Allerdings ist auffällig, dass 21 einzelne Zellen mit der POL-Folie kein Hybridisierungssignal zeigten.

Die chemischen Eigenschaften der beiden Folien lässt eher vermuten, dass die Benutzung der PEN-Folie problematischer sein müsste. Das Polyethlen-Naphtalat ist im Vergleich zum Polyester hydrophob. Allein das Naphtalat verleiht der Folie einen hydrophileren Charakter. Aufgrund dieser wasserabweisenden Eigenschaft kommt es zu einem grenzflächen Phänomen zwischen der hydrophilen Proteinase K und der hydrophoben Folie. Das

bedeutet, die Einwirkzeit von Proteinase K auf die PEN-Folie müsste länger sein, um einen ausreichenden Verdau der Zelle zu erreichen. Andererseits dürfte die Benutzung der POL-Folie unproblematisch sein, da sie aufgrund der hydrophilen Eigenschaften den Proteinase K Verdau erleichtert.

Die aufgetretenen Probleme bei der Benutzung der POL-Folie haben daher an anderer Stelle des Protokolls ihren Ursprung oder traten nur aufgrund des anfänglich unausgereiften Protokolls auf.

Um genauere Angaben über den Einsatz der POL-Folie machen zu können, müssten mit dem unter Kapitel 2.4.2. (Seite 79) beschriebenen Protokoll weitere Versuche unternommen werden.

Da die PEN-Folie erste Erfolge zeigte, wurde die Weiterentwicklung geeigneter Protokolle für die Benutzung des MicroBeam Systems mit dieser Folie weiterverfolgt.

Aufgrund der oben beschriebenen Wechselwirkungen zwischen Folie und Reagenzien, wurden ebenfalls mehrere Ansätze für einen Verdau mit Proteinase K ausgetestet. Am geeignetsten erschien der Ansatz mit 55 °C über Nacht und anschließend weiteren 3-5 Stunden Inkubation.

Von einer weiteren Zugabe von 1 µl Proteinase K am nächsten Tag wurde abgesehen, da der zusätzliche Pipettierschritt die Möglichkeit einer Kontamination erhöht hätte.

Aus der Beobachtung, dass nach dem Standard Protokoll (42°C über Nacht) offensichtlich seltener Hybridisierungserfolge erzielt werden konnten, wird der Einfluss der Folie auf den Verdau deutlich.

Eine weitere Veränderung des Protokolls führte zu besseren Ergebnissen bei der Hybridisierung. Durch die Bestrahlung der Reaktionsgefäße und Deckel mit UV Licht konnte die Kontaminationsrate deutlich gesenkt werden. So stellte sich heraus, dass das Arbeiten unter einer Sterilbank beim Ansetzen des Verdaus und der Vorbereitung für das Katapultieren absolut nötig sind. Ist der Verdau abgeschlossen, so ist das weitere Vorgehen nicht zwingend unter der Sterilbank nötig.

4.1.3.2. Analyse der Reproduzierbarkeit unter Verwendung des MicroBeam Systems

Bei der Analyse von 16 vereinzelt Zellen aus der RCC-26 Zellkultur, zeigten 10 Zellen ein RCC-spezifisches Profil (62,5%).

Drei dieser 16 Zellen wiesen ein klar weibliches Profil auf, zeigten aber nicht die RCC-spezifischen Veränderungen. Dies lässt vermuten, dass in manchen Fällen entweder ein unzureichender Verdau oder Unregelmäßigkeiten in der Primär-PCR auftraten. Die

Änderung des Markierungsprotokolls führte zu keinem anderen Ergebnis in der Auswertung dieser Profile.

Vergleicht man die 10 erfolgreichen Hybridisierungen mit dem Ergebnis der klassischen CGH, so ist eine deutliche Übereinstimmung zu erkennen. Die Veränderungen an Chromosom 1, 3, 5, 8, 9, 14 und 22 aus der klassischen CGH sind in mindestens 8 von 10 Einzelzell Versuchen für das jeweilige Chromosom zu erkennen.

Es wurde gezeigt, dass mit dem Einsatz des PALM MicroBeam Systems und der PEN-Folie die Analyse einer einzelnen Zelle mit CGH möglich ist. Auch die Reproduzierbarkeit unter Verwendung des abgeänderten Protokolls wurde dargestellt.

4.1.4. Analyse von Einzelzellen mittels Adapter-Linker PCR - Zusammenfassung

Als Testsystem für die Adapter-Linker PCR (C. Klein et al. 1999 und N. Stöcklein et al. 2002) wurde eine stabile Zellkultur (RCC-26) ausgewählt. Ziel war die Analyse von Einzelzellen aus RCC-26 mittels Einzelzell CGH im Vergleich mit anderen zytogenetischen Methoden, wie M-FISH oder der klassischen CGH.

Bei der Verwendung der veröffentlichten Protokolle wurden neben den erwarteten Veränderungen Profilabweichungen in den GC-reichen Regionen beobachtet, die mit M-FISH oder klassischer CGH nicht gezeigt werden konnten. Nach mehreren Protokollveränderungen konnte durch die Zugabe von 3% Formamid in die Primär- und Markierungs PCR eine Erhöhung der Spezifität des Systems erreicht werden. Mit der Auswertung mehrerer Einzelzellen ließ sich ebenfalls die Reproduzierbarkeit dieses Protokolls zeigen.

Des Weiteren ist es möglich, die Zellvereinzelnung anhand des PALM MicroBeam Systems durchzuführen, um anschließend eine Analyse der Zellen mit der Einzelzell CGH zu ermöglichen. Auch hier konnte die Reproduzierbarkeit anhand der RCC-26 Zelllinie gezeigt werden.

4.2. Analyse von disseminierten Tumorzellen mittels Interphase Zytogenetik

In diesem Kapitel wird die Auswahl eines geeigneten Nachweissystems für epitheliale Zellen diskutiert. Hierfür wurden verschiedene Färbemethoden analysiert und auf die Möglichkeit einer Hybridisierung hin getestet. Ziel war es, disseminierte Tumorzellen mit einem geeigneten Nachweissystem zu markieren und anschließend eine Analyse mittels Interphase Zytogenetik und geeigneten Sonden zu ermöglichen.

4.2.1. Austesten der verschiedenen Nachweissysteme für pan-Zytokeratin positive Zellen im Knochenmark

4.2.1.1. Austesten der verschiedenen Nachweissysteme

Im ersten Testansatz für Nachweismethoden des pan-Zytokeratin Antikörpers A45 B/B3 kamen drei Farbstoffe (Neufuchsin, FastBlue und NBT/BCIP) zum Einsatz. Die Analyse erfolgte an einem Patienten, der zuvor bereits am Institut für Tumorummunologie, Großhadern über das Nachweissystem Neufuchsin negativ getestet wurde.

Aus den Ergebnissen ist ersichtlich (siehe Kapitel 3.2.1.1. A, Seite 108), dass der negative Status mit den Farbstoffen FastBlue und Neufuchsin bestätigt werden konnte.

Nur der Farbstoff NBT/BCIP zeigte positive Zellen an. Da jedoch positive Zellen auch im Ansatz ohne vorheriger Inkubation beobachtet wurden, handelt es sich wahrscheinlich um eine falsch positive Anfärbung.

Die positiven NBT/BCIP Zellen könnten durch eine erhöhte Bereitschaft zur Oxidation von NBT/BCIP an Luft entstanden sein.

Zu diesem Zeitpunkt konnte nicht eindeutig festgestellt werden, welches Nachweissystem - NBT/BCIP oder die Nachweise über Neufuchsin und FastBlue - korrekte Ergebnisse über das Vorhandensein von pan-Zytokeratin positiven Zellen in Knochenmark lieferten.

Deswegen wurde ein Blindversuch durchgeführt, in dem verschiedene Mengen an pan-Zytokeratin positiven Zellen in Knochenmark eingemischt wurden. Dabei kam auch der direkt konjugierte Antikörper A45 B/B3-Cy3 zum Einsatz (siehe Kapitel 3.2.1.1. B, Seite 109).

Aus den sechs Ansätzen mit verschiedenen Mischungsverhältnissen an pan-Zytokeratin positiven Zellen zeigt sich, dass das Nachweissystem NBT/BCIP zwischen 3 bis fünf mal mehr positive Zellen zeigte, als anzunehmen war. Dies bestätigt die oben erwähnte Vermutung, dass dieses Nachweissystem in einem hohen Prozentsatz zur unspezifischen

Anfärbung von Zellen neigt. Im Gegensatz dazu färbt sich teilweise nur ein Viertel der pan-Zytokeratin positiven Zellen mit Neufuchsin an.

Der direkt konjugierte Antikörper ergab das beste Resultat. In den drei ausgewerteten Ansätzen wurde nahezu die Anzahl an positiven Zellen gezählt, die zu erwarten war.

Mit diesem Versuchsansatz konnte gezeigt werden, dass der indirekte Nachweis von A45 B/B3 zu falschen Ergebnissen führt. Entweder wurden zu wenige pan-Zytokeratin positive Zellen angezeigt (Neufuchsin/FastBlue) oder es färbten sich deutlich zu viele Zellen an (NBT/BCIP).

Der direkt konjugierte Antikörper A45 B/B3-Cy3 zeigte die besten Ergebnisse.

Dies bestätigte auch der dritte Versuch, in dem der direktkonjugierte A45 B/B3-FluorX Antikörper ebenso die nahezu richtige Anzahl an pan-Zytokeratin positiven Zellen anzeigte (siehe Kapitel 3.2.1.1. C, Seite 109). Direkt konjugierte Antikörper unterliegen nicht der Möglichkeit einer Oxidation an Luft und sind nicht direkt abhängig von der Inkubationszeit eines Farbstoffes.

Um bei der Verwendung der direkt konjugierten Antikörper falsch positive Zellen auszuschließen, wurde auch hier eine Negativkontrolle mit den Antikörpern anti digoxigenin Cy3 und goat anti rat Cy3 im direkten Vergleich mit A45 B/B3-Cy3 durchgeführt.

Beide Antikörper zeigten eine geringe Anzahl an positiven Zellen, die sich anfärbten. Als Grund wird vermutet, dass die eingesetzten Kontrollantikörper sich zusammenlagern und in diesem Zustand leichter unspezifische Bindungen mit dem Zytoplasma eingehen (Prof. W. Zimmermann, Institut für Tumorummunologie, persönliche Mitteilung).

4.2.1.2. Austesten der verschiedenen Nachweissysteme in Hinblick auf eine ausreichende Hybridisierungseffizienz

Ziel in diesem Ansatz war es, die Möglichkeit einer Hybridisierung mit Zentromersonden bei gleichzeitiger Färbung der pan-Zytokeratin positiven Zellen auszutesten.

Dabei konnte festgestellt werden, dass die indirekten Nachweissysteme NBT/BCIP und Neufuchsin eine Analyse der Signale der Zentromersonden nicht ausreichend ermöglichten. Nur gelegentlich konnten im Infrarotbereich Signale erkannt werden. Zusätzlich war zu beobachten, dass die umliegenden nicht gefärbten Zellen ebenso wenig ausgewertet werden konnten.

In allen Farbkanälen verhinderte eine Autofluoreszenz der Farbstoffe Neufuchsin oder NBT/BCIP weitgehend die Signalauswertung.

Der Versuch einen Pepsin- bzw. Proteinase K Verdau vor der Hybridisierung der Sonden zu machen, führte zu keinem verbesserten Ergebnis. Die Färbung der positiven Zellen zeigte immer noch dieselbe Intensität, womit eine Auswertung der Sonden nicht möglich war.

Der Einsatz des direkt konjugierten Antikörpers A45 B/B3-Cy3 zeigte verschiedene Ergebnisse. Zuerst war zu beobachten, dass es verschiedene Färbemuster gab, die mit der Hybridisierungseffizienz der Sonden korrelierten.

Lag die Färbung über der Zelle oder war sie granulär um die Zelle verteilt, konnten die Sonden nur schwer erkannt werden. Auch die Aufnahme in unterschiedlichen Ebenen eines Zellkerns ermöglichte den Nachweis der Sonden nicht. In den meisten Fluorochromkanälen war die Cy3-Färbung so dominant, dass die Sonden nicht herausgefiltert werden konnten. Trat eine granuläre Färbung auf, konnte keine Unterscheidung zwischen granulärem Muster und Sonde gemacht werden.

Bei vorhergehendem Verdau des Zytoplasmas konnte entweder die Färbung nicht abgeschwächt werden, um damit den Sondennachweis zu ermöglichen, oder die Färbung war nicht mehr sichtbar, so dass die positiven Zellen nicht mehr relokalisiert werden konnten. Die dritte Variante zeigte eine kreisrunde homogene Färbung, die eine Analyse der Zentromersonden in allen Kanälen ermöglichte. Dabei war zu erkennen, dass die Färbung des Antikörpers schwächer war, und somit die Unterscheidung zu den Sonden ohne Probleme stattfinden konnte.

4.2.1.3. Zusammenfassung der Ergebnisse der verschiedenen Nachweissysteme

Es wurde gezeigt, dass die direkt konjugierten Antikörper sowohl in der Erkennung von pan-Zytokeratin positiven Zellen als auch in der Möglichkeit eines zufriedenstellenden Nachweises von Zentromersonden die besten Ergebnisse lieferten.

Der Antikörper A45 B/B3-Cy3 markierte in den Blindversuchen annähernd die Anzahl an positiven Zellen, die in den Ansätzen untergemischt waren. Neufuchsin und NBT/BCIP zeigten entweder zu wenig oder zu viele positive Zellen an.

Bei der Hybridisierung des Zentromer-Testmixes konnte nur in den A45 B/B3-Cy3 gefärbten Zellen ein zufriedenstellendes Ergebnis erreicht werden.

Aufgrund dieser Versuchsergebnisse wurden die weiteren Analysen mit den direkt konjugierten Antikörper A45 B/B3-Cy3 und zu einem späteren Zeitpunkt auch mit A45 B/B3-FluorX durchgeführt.

4.2.2. Hybridisieren von verschiedenen regionenspezifischen YAC-Sonden auf pan-Zytokeratin positive Zellen im Knochenmark

Bei der Auswahl des geeigneten Antikörpers zur Erkennung von pan-Zytokeratin positiven Zellen konnte gezeigt werden, dass die Hybridisierung von Zentromersonden bei direkt markierten Antikörpern möglich ist. Im Folgenden werden die verschiedenen Protokolle diskutiert, die zur erfolgreichen Hybridisierung von zentromernahen YAC-Sonden führen sollten. Dabei wurden drei verschiedenen SONDENSÄTZE erstellt. Der SONDENSATZ „3-er Pool einfach“ enthält drei Sonden, die in Regionen mit häufigen numerischen Veränderungen bei Nierenzellkarzinomen kartieren. Die Sonden sind jeweils mit nur einem Fluorochrom markiert. Der Unterschied zu dem zweiten „3-er Pool“ liegt in der Markierung der Sonden mit Fluorochromen. Der „3-er Pool“ wurde kombinatorisch markiert, indem jede Sonde mit unterschiedlichen Kombinationen aus zwei Fluorochromen versehen wurde. Dies sollte dazu führen, dass die Erkennung der spezifischen Signale bei starkem Hintergrund erleichtert wird, da nur die Signale ausgewertet werden, die in beiden Kanälen auftreten (siehe Abbildung Abb.4.2.1.).

Dieses Konzept wurde auch bei dem „7-er Pool“ verfolgt.

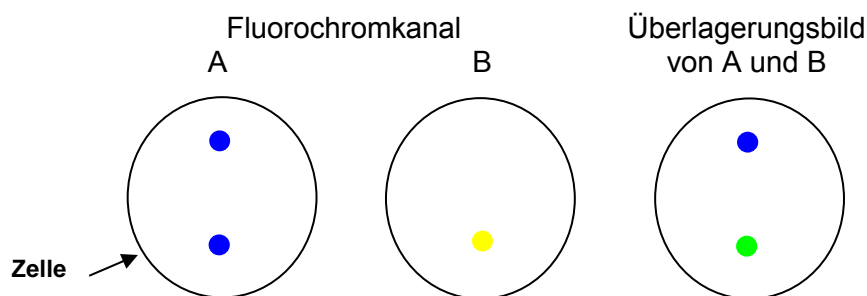


Abb.4.2.1. Schematische Darstellung der kombinatorischen Markierung

Das Signal wird nur gewertet, wenn es sowohl in Kanal A (blau) als auch in Kanal B (gelb) zu sehen ist. Bei der Überlagerung sollte daher eine Mischfarbe entstehen (grün). Daraus ergibt sich für diese schematische Darstellung, dass das obere Signal als unspezifische Hintergrundfärbung gewertet wird, das untere Signal aber als wirkliches Signal gilt und daher auch gezählt wird.

4.2.2.1. Austesten der eingesetzten SONDENSÄTZE

Um die allgemeine Hybridisierungseffizienz der drei SONDENSÄTZE zu ermitteln, sind zwei Testversuche gemacht worden. Zum einen wurden der 7-er Pool und der 3-er Pool auf normale 46,XY Metaphasen hybridisiert. Dieser Versuchsansatz diente der Ermittlung der bestmöglichen Hybridisierungsbedingungen, wie die optimale Konzentration der Sonden

aber auch der Überprüfung von möglichen Kreuzhybridisierungen an andere Positionen im Genom.

Ein weiterer Versuch sollte zeigen, ob die eingesetzten Sondenätze auch die erwarteten Veränderungen in einer Zelle anzeigen. Dazu wurde der 3-er Pool auf die zytogenetisch gut charakterisierte Zelllinie RCC-26 hybridisiert. Diese triploide Zelllinie wurde vorab mit M-FISH und CGH analysiert. Die hohe Übereinstimmung zwischen Interphase, M-FISH und CGH wird beispielsweise durch die Sonde 2q dokumentiert, die in 13 von 14 Zellkernen drei Signale zeigte.

Bei Chromosom 3 zeigte sich in allen analysierten Metaphasen ein Verlust des kurzen Arms. Die in dem 3-er Pool enthaltene Sonde für den kurzen Arm von Chromosom 3 wies diesen Verlust in allen untersuchten Zellen nach.

Chromosom 17 hingegen zeigte in der Metaphasenanalyse nur teilweise einen Verlust einer Kopie. Dies zeigte sich auch in den Zellkernen. Dabei wurde in 6 Fällen ein Verlust bemerkt und in 8 Zellen waren drei Signale zu erkennen.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde zur Analyse von disseminierten Tumorzellen auf diese drei Sondenätze zurückgegriffen. Neben der Ermittlung von geeigneten Hybridisierungsbedingungen für YAC-Sonden sollten sie zugleich erste Erkenntnisse über die Genetik von disseminierten Tumorzellen bei Nierentumoren liefern.

4.2.2.2. Hybridisierung der Zentromernahen YAC-Sonden auf A45 B/B3-Cy3 gefärbte Knochenmarkspräparate

In Anlehnung an das Protokoll zur Hybridisierung von Zentromersonden erfolgte der Versuch einer Hybridisierung der YAC-Sonden bei gleichzeitiger A45 B/B3-Cy3 Färbung der pan-Zytokeratin positiven Zellen. Wie schon oben beschrieben, konnte allerdings keine der Sonden identifiziert und somit kein positives Ergebnis erzielt werden. Vorangegangene Versuche mit Metaphasepräparaten und anderen Zellkernsystemen hatten gezeigt, dass die regionenspezifischen YAC-Sonden nur unter bestimmten Bedingungen auswertbar sind. Zum einen muss zur erfolgreichen Probenpenetration in den Zellkern das Zytoplasma der Zelle verdaut werden. Zum zweiten verstärkt das Fixieren der Zellen mit Methanol/Eisessig die Fluorochromintensität der Sonden bzw. auch des Antikörpers.

Allerdings bewirken beide Zusätze, dass die Cy3 Färbung der disseminierten Tumorzellen aufgrund des Zytoplasma Verlusts verschwindet. Somit ist eine spezifische Erkennung von Tumorzellen bei gleichzeitiger Auswertung der Sonden nicht mehr möglich.

In einer neu gewählten Strategie sollten die disseminierten Zellen zuerst über den pan-Zytokeratin Antikörper gesucht werden, um anschließend die Vorbehandlung und

Hybridisierung der Sonden durchzuführen. Aufgrund der festgelegten Koordinaten können die dann nicht mehr Cy3-positiven Zellen relokaliert und analysiert werden. Zu Anfang bestand keine Möglichkeit diese Zellen systematisch anhand der Koordinaten im Anschluss an die Hybridisierung wiederzufinden. Diese Strategie konnte erst später mit dem *Metafer* System der Firma MetaSystems GmbH, Altlußheim verwirklicht werden.

A) Zytoplasma Verdau ohne systematische Suche nach Cy3 positiven Zellen

Bei den ersten Hybridisierungsversuchen wurden Bedingungen ausgetestet, die einen allgemeinen Sondennachweis ermöglichen sollten, unabhängig davon, ob Zellen CK positiv sind oder nicht. Diese Untersuchungen waren insbesondere deshalb wichtig, da sich die Knochenmarkszellen in ihrem Hybridisierungsverhalten deutlich von Lymphozyten unterscheiden. Neben der Zellart könnten Präparationsschritte für diese Unterschiede verantwortlich sein.

Nach dem ersten Protokoll wurden die Zellen im Anschluss an die Cy3 Färbung mit Methanol/Eisessig fixiert und zu unterschiedlich langen Zeiten mit Pepsin verdaut. Zu berücksichtigen ist, dass für die Anreicherung der Knochenmarkszellen zwei verschiedene Systeme verwendet wurden (Erylyse/Ficol und Erylyse/Depletion). Diese beiden Systeme zeigten auch Unterschiede im Verhalten beim Pepsinverdau. Die Erhöhung der Verdauzeit in 5 Minuten Schritten zeigte bei Depletionspräparaten eine Granularisierung des den Zellkern umgebenden Zytoplasmas, wohingegen die Ficolpräparate ein flächig vernetztes Zytoplasma zeigten. Nach 20-minütigem Verdau mit Pepsin zeigte sich in beiden Fällen deutlich, dass die Zellkerne bereits angegriffen waren, das Zytoplasma aber immer noch vorhanden war. Auch die Hybridisierung der YAC-Sonden auf diese Präparate zeigten keine auswertbaren Signale in den Zellkernen. Überraschend war auch, dass die Cy3 Färbung bei manchen Zellen nicht entfernt wurde.

Auch die Erhöhung der Pepsinkonzentration führte weder bei Depletions- noch bei Ficolpräparaten zu besseren Ergebnissen.

Eine Möglichkeit für den erschwerten Verdau des Zytoplasmas könnte im Fixierungsschritt liegen. Die Methanol/Eisessig Behandlung der Präparate vor dem Verdau macht das Zytoplasma durch eine weitere Fixierung für das Pepsin erschwert zugänglich. Diese zusätzliche Fixierung und dabei auftretende Dehydrierung der Präparate könnte auch der Grund für die fortbestehende Cy3 Färbung um die Zellkerne sein.

Im Folgenden wurde die Fixierung der Zellen im Anschluss an den Pepsin Verdau gestellt. Der Erfolg dieses Protokolls zeigte sich sowohl in der Reduzierung der Verdauzeit auf 5 bis

10 Minuten, als auch in der erfolgreichen Hybridisierung des „3-er Pools einfach“ bei nicht Cy3 positiven Zellen.

Auffällig war, dass bei Depletionspräparaten in den Fluorochromkanälen eine unspezifische Färbung auftrat, die mit dem granulären Zytoplasma übereinstimmte. Die unspezifische Färbung erschwerte die Analyse der Sonden in dem Maße, dass die Unterscheidung zwischen Signal und Hintergrund nicht eindeutig möglich war.

Außerdem wurden vereinzelt Cy3 positive Zellen gefunden.

Zusammenfassend ist zu erwähnen, dass zu diesem Zeitpunkt der Arbeit die Präparate mit Ficolanreicherung bevorzugt für weitere Untersuchungen herangezogen wurden. Die Ursachenforschung für das auftretende granuläre Muster bei Depletionspräparaten wurde zurückgestellt, da eine systematische Analyse von Cy3 positiven Zellen nicht möglich war. Aufgrund des Auftretens von drei verschiedenen Färbemustern der A45 B/B3-Cy3 Färbung (zellüberdeckend, granulär und homogen) war die Überlegung, dass die nach dem Pepsinverdau weiterhin vorhandene Cy3 Färbung den zellüberdeckenden- und granulärgefärbten Zellen zugeordnet werden kann.

B) Zytoplasma Verdau mit Pepsin und anschließender systematischer Suche nach Cy3 positiven Zellen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Hybridisierung von zentromernahen YAC-Sonden auf nicht Cy3 positive Zellen mit dem beschriebenen Protokoll erfolgreich war, sollte im Folgenden auf die spezifisch mit Cy3 angefärbten Zellen fokussiert werden.

Um die Zellen nach dem Verdau des Zytoplasmas wieder zu finden, wurde auf die Software *Metafer* der Firma MetaSystems GmbH zurückgegriffen. Diese ermöglicht die Relokalisation der vormals Cy3 positiven Zellen.

Wie bereits vorher erwähnt, konnte die Cy3 Färbung durch einen 10 minütigen Verdau nicht entfernt werden. Dies bedeutet ebenso, dass keine Sonden bei der Bildanalyse zu erkennen waren.

Die erste Änderung des Protokolls erfolgte in einer Verlängerung der Verdauzeit mit Pepsin bei einer gleichzeitigen Erhöhung der Konzentration. Unter Mikroskopkontrolle wurde der Status der Cy3 Färbung überprüft. Erst nach einem 55 minütigen Verdau der Präparate konnte eine Abschwächung der Cy3 Färbung erkannt werden. Allerdings zeigten die umliegenden nicht positiven Zellen bereits deutliche Kernmembranschädigungen durch den aggressiven Verdau.

Nach der anschließenden Hybridisierung der YAC-Sonden war die Cy3 Färbung bei der Bildaufnahme am Mikroskop aber wieder sichtbar, so dass nur in den Farbkanälen Cy5 und Cy5.5 Signale vermutet werden konnten. Als ein Grund für die bestehende Cy3 Färbung wurde das Fixieren mit Methanol/Eisessig erkannt. Bei der Sichtkontrolle im Mikroskop zeigte sich deutlich eine Verstärkung der Cy3 Markierung nach der Fixierung, was mit dem dehydrierenden Effekt der Fixierung erklärt werden kann. Durch diesen Schritt wird Wasser aus dem Präparat und somit aus den Zellen gezogen. Dies wiederum führt zu einem Schrumpfen der Zellen und zu einer Konzentration des Cy3 Antikörpers.

Verschiedenste Abänderungen der Fixierungsarten im Protokoll der Vorbehandlung der Präparate - sowohl vor der Cy3, als auch nach der Cy3 Färbung - zeigten keinerlei Verbesserungen. Die Färbung zeigte sich nach der Hybridisierung der Sonden in den meisten Fluorochromkanälen und die Signale konnten nicht erkannt werden.

Eine Reduzierung der Cy3 Intensität stellte sich allein beim Versuch ein, die Fixierung mit Methanol/Eisessig herauszunehmen. Aber auch hier war die auftretende Cy3 Färbung bei der Aufnahme der Signale noch so störend, dass die Möglichkeit einer vollständigen Auswertung nicht bestand.

Da die Veränderung in der Fixierung keinen deutlichen Erfolg brachte, wurde das Markierungsprotokoll der A45 B/B3-Cy3 Antikörperinkubation abgeändert. Die Reduzierung der Konzentration des Antikörpers sollte zu dem Ziel führen, den Antikörper bei einem Verdau abzulösen. Außerdem wurde das Protokoll bei dem Schritt des Abblockens von unspezifischen Bindungsstellen abgeändert. Beide Schritte führten nicht zu dem gewünschten Ziel und zeigten auch keine Verbesserung bei der Sondenauswertung.

Zusammenfassend ist zu bemerken, dass eine Verlängerung des Zytoplasmaverdaus mit Pepsin die Cy3 Färbung abschwächt, dieser Effekt aber durch die Fixierung wieder aufgehoben wird, so dass nach der Hybridisierung YAC-Sonden nicht zu erkennen sind. Einzig durch das Aussparen der Fixierung nach dem Verdau kann das Ergebnis der Hybridisierung leicht verbessert werden. Die Signale der Fluorochrome Cy5 und Cy5.5 können in einzelnen Zellen erkannt werden. Abänderungen im Protokoll bezüglich der Antikörperfärbung mit A45 B/B3-Cy3 führten zu keiner weiteren Verbesserung der Hybridisierungsergebnisse.

Diese Erkenntnisse führten zu der Annahme, dass das Enzym Pepsin für diese Anwendung nicht das geeignete Mittel ist, um die Färbung aufzulösen.

C) Zytoplasma Verdau mit Proteinase K und anschließender systematischer Suche nach Cy3 positiven Zellen

Nachdem der Verdau des Zytoplasmas mit Pepsin nicht zum Erfolg führte, wurde der Verdau mit Proteinase K versucht.

Die ersten Versuche zeigten, dass sich die Zellen auf den Zytospins während des Verdaus ablösten. Für die nächsten Versuche wurde aus dem Ansatz das 20% SDS herausgenommen. SDS ist ein Detergenz, das Proteinbindungen leichter aufbrechen soll, allerdings wirkt es auch „seifenartig“. Dies führt zum Ablösen der Zellen auf dem Zytospin. Auch ein Wiedereinführen der Fixierung mit Methanol/Eisessig vor dem Verdau zeigte zunächst keinen Erfolg. Die Zellen lösten sich weiterhin ab, teilweise aber erst nach der Denaturierung bei 72°C.

Dies war der Grund für die Einführung eines weiteren Fixierungsschritts nach dem Proteinase K Verdau. Durch eine 20 minütige Postfixierung mit Formaldehyd bleiben die Zellen auf dem Objektträger haften.

Nach der Hybridisierung der Sonden stellte sich heraus, dass die Cy3 Färbung wieder sichtbar und somit eine Auswertung der Sonden unmöglich war. Auffällig war die granuläre unregelmäßige Struktur der Färbung, die eine Unterscheidung zwischen Signal einer Sonde oder Hintergrundfärbung durch Cy3 unmöglich machte.

Auch eine Kombination der beiden Enzyme Pepsin und Proteinase K wurde ausgetestet. Sie führte aber zu den gleichen Ergebnissen. Aufgrund einer wieder auftretenden Färbung mit Cy3 war es nicht möglich die YAC Sonden auszuwerten.

D) Zytoplasma Verdau und systematische Suche nach Cy3 positiven Zellen - Zusammenfassung

Die Ausgangsannahme war, dass der Zytokeratin Antikörper A45 B/B3-Cy3 nach einem Verdau so entfernt werden kann, dass das Fluorochrom nach einer Hybridisierung nicht mehr störend auf die Auswertung der YAC Sonden wirkt.

Sowohl ein Pepsin Verdau, ein Proteinase K Verdau, als auch die Kombination aus beiden konnten in verschiedensten Protokollansätzen den Cy3 markierten Antikörper nicht auflösen oder abschwächen. Auffällig war die deutliche granuläre und unregelmäßige Färbestruktur des Antikörpers.

Ebenso überraschend war die Tatsache, dass der Antikörper direkt nach dem Verdau deutlich abgeschwächt erschien, aber nach einer Hybridisierung erneut eine äußerst starke Fluoreszenz zeigte. Eine Überlegung zu diesem Phänomen war die Erklärung einer auftretenden Dehydrierung, die zu einer erneuten Konzentration des Antikörpers führen

könnte. Nach dem Verdau der Zytospins werden diese bis zur Aufnahme am Mikroskop zweimal mit der Ethanolreihe entwässert. Dies könnte zur Folge haben, dass der Antikörper aufkonzentriert wird, somit erneut auftritt und die Aufnahme der YAC Sonden stört.

Eine weitere Erklärung bezieht sich erneut auf den Antikörper. Wenn der Verdau nicht vollständig erfolgt ist, könnten die Reste an der Zelle zu unspezifischen Bindungen für die YAC-Sonden werden. Dies würde bedeuten, dass der Zellrand erneut „markiert“ wird, und zusätzlich nicht ausreichend Sondenmaterial für die DNA vorhanden ist, bzw. im Vergleich zum Zellrand die Intensität der Färbung deutlich geringer ist. Der Antikörper könnte zu einer „Versiegelung“ des Zellkerns führen. Entsprechend waren die Antikörper positiven Zellen immer schwerer zu verdauen als die Antikörper negativen Zellen.

4.2.2.3. Hybridisierung der Zentromernahen YAC-Sonden auf A45 B/B3-FluorX gefärbte Knochenmarkspräparate

Die Konjugation des A45 B/B3 Antikörpers mit FluorX wurde aufgrund der instabileren Eigenschaften des Fluorochroms ausgetestet. Es ist bekannt, dass FluorX relativ schnell ausbleicht, wenn es längere Zeit unter Lichteinfluss steht.

Doch auch hier zeigte sich ein ähnliches Bild zu den Cy3 markierten Zellen aus dem Knochenmark. Nach der Hybridisierung der Sonden trat die Färbung der Zelle erneut auf, zeigte die bekannte granuläre und unregelmäßige Struktur. Obwohl die Färbungsintensität geringer war als bei Cy3, konnten keine Sonden zufriedenstellend ausgewertet werden.

4.2.2.4. Hybridisierung der Zentromernahen YAC-Sonden - Zusammenfassung

Die Hybridisierung von regionenspezifischen zentromernahen YAC-Sonden auf Knochenmarkspräparate konnte ohne simultane Antikörperfärbung durchgeführt werden. Dabei zeigte sich ein Unterschied der Hybridisierungsqualität zwischen Präparaten, die mit Ficol oder Depletion angereichert wurden. Die Depletionspräparate zeigten nach dem Verdau mit Pepsin unspezifisch angefärbten Hintergrund, der sich auf die Auswertung der Sonden störend auswirken könnte. Bei den Ficolpräparaten war die Hybridisierung der Sonden sehr gut auszuwerten.

Nicht möglich war hingegen die Auswertung der Sonden bei Cy3 positiven Zellen. Aufgrund der Tatsache, dass die Cy3 Färbung nach der Hybridisierung weiterhin vorhanden war oder wieder auftrat, konnten die YAC-Sonden nicht ausgewertet werden.

Trotz mehrerer Protokollwechsel und eines Wechsel des Nachweissystems für A45 B/B3-Cy3 zu FluorX, war eine auswertbare Hybridisierung der SONDENSÄTZE nicht möglich. Nicht

nur das Vorhandensein des Antikörpers, sondern auch die aufgetretene granuläre und unregelmäßige Struktur der Färbung machte eine Unterscheidung zwischen Signal und Hintergrund nicht mehr möglich.

Ein Grund für die Resistenz des Antikörpers gegen alle Verdauenzyme ist zum einen die Aufkonzentrierung des Antikörpers durch eine Entwässerung der Präparate aufgrund des Hybridisierungsprotokolls, aber auch die hohe Stabilität des Cy3 markierten Antikörpers gegenüber Enzymen.

Aufgrund der bisherigen Ergebnisse erfolgte die Entscheidung, die Analyse der disseminierten Tumorzellen ins Knochenmark beim Mammakarzinom ausschließlich mit Zentromersonden durchzuführen. Vorangegangene Versuche hatten gezeigt, dass eine Hybridisierung dieser Sonden auf A45 B/B3-Cy3 markierte Zellen möglich ist.

4.2.3. Hybridisierung des Zentromer Sondensatzes dT-Mix auf pan-Zytokeratin positive Zellen im Knochenmark

Ziel dieses Ansatzes war es, den Sondensatz dT-Mix auszutesten. Dazu wurden erneut Zytospinpräparate von Nierentumorpatienten verwendet, da die Anzahl der vorhandenen Zytospins von Mammakarzinompatientinnen zu gering war.

4.2.3.1. Hybridisierung der Zentromersonden auf Cy3 positive Präparate von Nierentumorpatienten

Wie in Kapitel 3.2.4.1. (Seite 128) beschrieben, trat auch hier die granuläre und unregelmäßige Färbung der A45 B/B3-Cy3 positiven Zellen auf, die eine zufriedenstellende Hybridisierung verhinderte. Zusätzlich zeigte sich vor der Hybridisierung der Zentromersonden bereits eine unförmige Färbung des Zellkerns mit DAPI.

Als Ursache für dieses Muster der Zellkerne kam erneut der Wasserverlust durch die Vorbehandlung der Präparate in Betracht. Eine Kontrolle der Präparate mit Durchlicht zeigte bereits vor der Vorbehandlung deutlich unförmige Strukturen der Zellkerne.

Daraufhin wurde beschlossen in die Vorbehandlung Kaliumchlorid aufzunehmen. Dadurch sollte erreicht werden, dass die Zellkerne sich mit Wasser füllen, bevor oder nachdem sie durch die Vorbehandlung entwässert wurden.

Beim Austesten der optimalen Bedingungen für eine Kaliumchlorid Behandlung konnte eine weitere Beobachtung gemacht werden. Im Durchlicht war bei einigen Zellen eine granuläre

Struktur zu erkennen, die in ihrer Form und Granularität dem bekannten Muster der Cy3 Färbung entsprach (siehe Kapitel 3.2.4.1; Abbildung Abb. 3.2.19.; Seite 129).

Ziel war es nun, den Einfluss dieser granulären Zellen bei einer Hybridisierung zu ermitteln.

Dazu wurden die Zentromersonden ohne vorhergehende Färbung mit A45 B/B3-Cy3 durchgeführt. Dabei zeigte sich neben den Signalen eine zusätzliche unspezifische Färbung in den Fluorochromkanälen DEAC, FITC, TAMRA, Cy3.5 und Cy5, die eine Auswertung der Zentromersonden beeinträchtigte.

Dieser granuläre Rand um die Zellkerne trat sowohl bei Erylyse/Ficol als auch bei Erylyse/Depletions Präparaten auf. Daher ist davon auszugehen, dass die Art der Aufarbeitung des Knochenmarks nicht zu den erwähnten Strukturen führt. Da die meisten Präparate zur Lagerung bei -20 °C eingefroren wurden, könnte hier ein Zusammenhang mit dem Auftreten dieser Struktur bestehen. Es konnten keine frischen Präparate ohne Lagerung untersucht werden, um einen Vergleich anzustellen.

4.2.3.2. Hybridisierung der Zentromersonden auf nicht gefärbte Präparate

Um zu ermitteln, ob es sich bei diesen Zellen unter Umständen um disseminierte Tumorzellen handelt, wurde bei zwei Patienten eine Analyse mit dem dT-Mix durchgeführt.

Bei Patient „Schm“ zeigten die 12 ausgewerteten granulären Zellen in 83 bis 100% der verwendeten Sonden zwei Signale. Dieses Ergebnis deckt sich mit der Analyse von 24 nicht-granulären Zellen.

Einzig die Sonde für Chromosom Y konnte in 42 % der Fälle nicht entdeckt werden, so dass man hier einen Verlust des Chromosoms interpretieren könnte. Wahrscheinlich ist aber dieser Verlust durch die Auswahl des Fluorochroms DEAC zu erklären. Zum einen handelt es sich hier um ein sehr schwaches Fluorochrom und zum anderen trat in diesem Kanal die unspezifische Färbung des granulären Musters am stärksten auf. Diese Tatsachen verhinderten eine genaue Auswertung dieses Ergebnisses. Unterstützt wird dieses Argument durch die Analyse der nicht-granulären Zellen. Hier wurde das Y Chromosom in 25 % der Fälle nicht identifiziert.

Die Auswertung des zweiten Falls (Ora) wies nur bedingt auf eine stärkere Differenz zwischen granulären und nicht-granulären Zellen hin (siehe Abbildung Abb.4.2.2.).

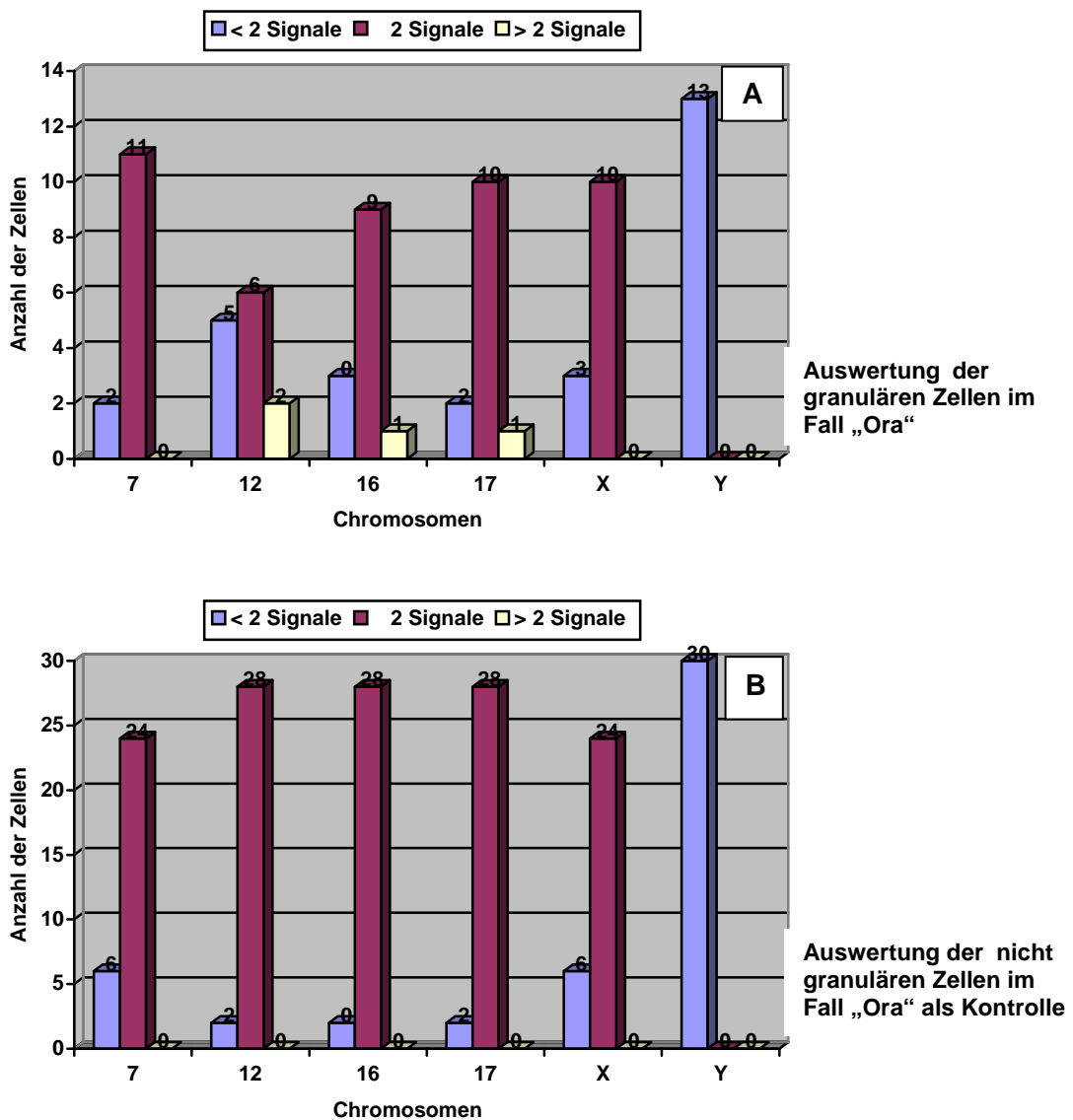


Abb.4.2.2. Grafische Darstellung der Auswertung des Falls „Ora“
 X-Achse: beschreibt das ausgewertete Chromosom
 Y-Achse: beschreibt die Anzahl der Zellen mit jeweiliger Signalzahl
 Balken: beschreiben jeweilige Signalzahl kleiner 2 (blau), gleich 2 (rot) oder größer 2 (gelb) pro Zelle
 Abb. A: Auswertung der granulären Zellen
 Abb. B: Auswertung der nicht granulären Zellen

Allein die Sonde für Chromosom 12 zeigte in 54 % der 13 Fälle ein Abweichen von 2 Signalen pro Zellkern auf. Allerdings wurde diese Sonde mit Cy5 markiert und hier ist die Auswertung des Öfteren problematisch. Zusätzlich ist Chromosom 12 für die Nierenzellkarzinome von geringer Bedeutung.

Die Interpretation dieses Ergebnisses ist durch mehrere auftretende Faktoren beeinflusst. Deutlich erschwert wurde die Auswertung der Hybridisierung durch das dichte Aneinanderliegen der Zellen. Dadurch war eine aggressive Vorbehandlung der Präparate

nötig, was wiederum zur Folge hatte, dass die Zellen in ihrer Morphologie stark angegriffen waren.

Außerdem lässt die geringe Anzahl der ausgewerteten Zellen nur eine Vermutung über den Stellenwert dieser Zellen zu. Eine größere Anzahl von Zellen bei unterschiedlichen Patienten müssten untersucht werden. Der Vergleich der Ergebnisse der granulären Zellen mit dem Primärtumor könnte dann zu einem handfesteren Ergebnis führen.

Die Interpretation der Ergebnisse zu diesem Zeitpunkt lässt eher den Schluss zu, dass es sich um Artefakte handelt, die eine Auswertung unmöglich machen.

Die Analyse der granulären Zellen wurde zu diesem Zeitpunkt eingestellt Da die Artefakte am wahrscheinlichsten durch Lagerbedingungen entstanden sind, wurde auf frisch hergestellte Präparate (Mammakarzinome) bzw. auf eines ohne diese Artefaktbildung (Ob-2006) fokussiert.

4.2.3.3. Hybridisierung der Zentromersonden auf den Fall „Ob-2006“

Dieser Fall zeigte im Vergleich mit anderen Patienten als einziger A45 B/B3-Cy3 markierte Zellen, die keinen granulären Zellrand aufwiesen. Zudem war die Anzahl an positiven Zellen im Knochenmark mit 40 pro Zytospin deutlich höher als auf anderen Patientenpräparaten.

Der histologische Befund beschreibt einen klarzelligen Subtyp der Nierentumoren im Stadium T1 N0 M0 G2.

Abbildung Abb.4.2.3. veranschaulicht in einem Diagramm die aufgetretenen Veränderungen in 40 ausgezählten Cy3 positiven Zellen gegenüber 47 nicht positiven Zellen.

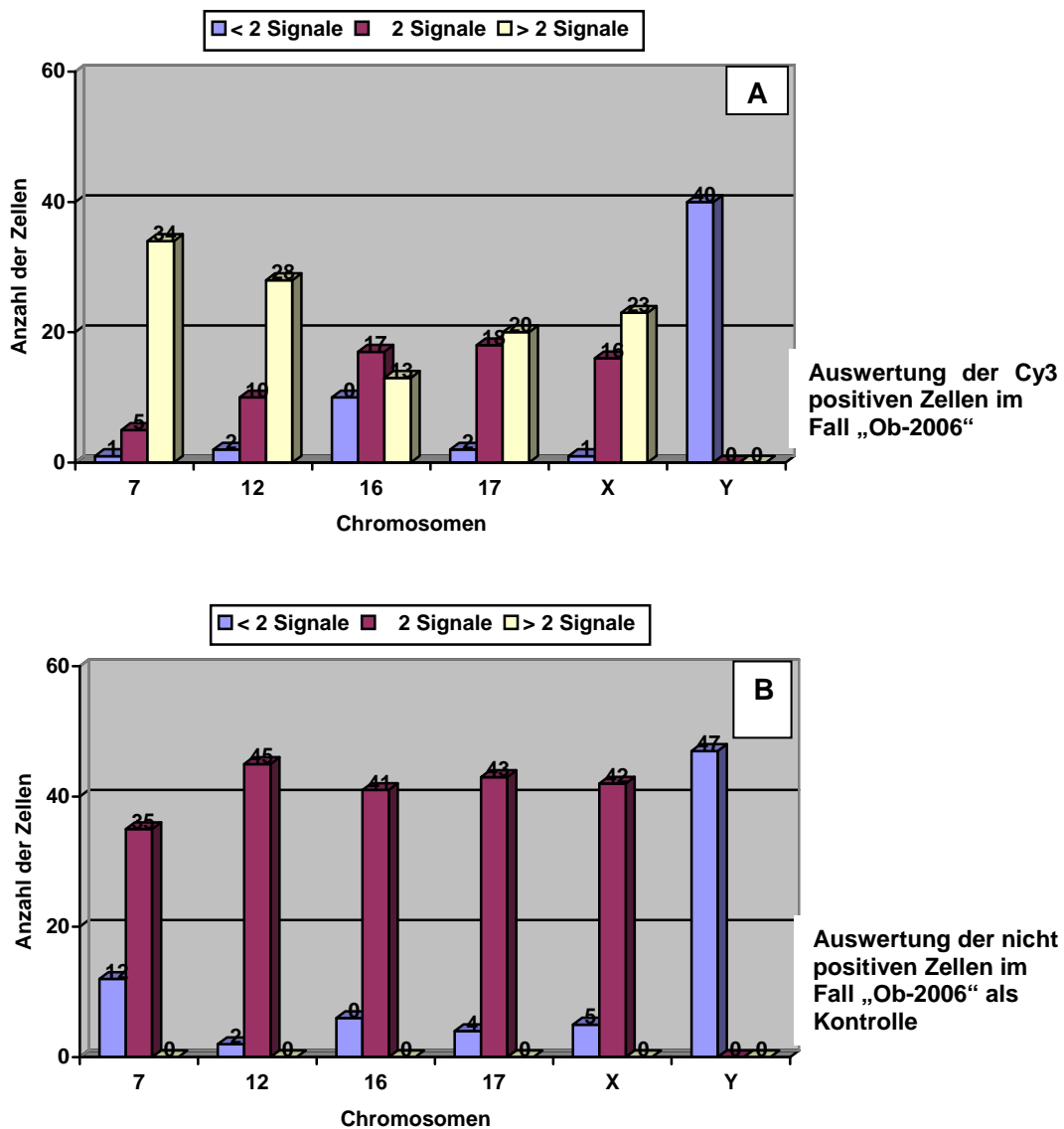


Abb.4.2.3. Grafische Darstellung der Auswertung des Falls „Ob-2006“

X-Achse: beschreibt das ausgewertete Chromosom

Y-Achse: beschreibt die Anzahl der Zellen mit jeweiliger Signalzahl

Balken: beschreiben jeweilige Signalzahl kleiner 2 (blau), gleich 2 (rot), größer 2 (gelb) pro Zelle

Abb. A: Auswertung der Cy3 positiven Zellen

Abb. B: Auswertung der nicht positiven Zellen

Aus dem Vergleich der Diagramme ist zu erkennen, dass bei den Cy3 positiven Zellen die Signalzahl pro Chromosom deutlich variiert. Die einzelnen positiven Zellen weisen somit eine starke Heterogenität auf. Ein bestimmtes Muster konnte aber nicht beobachtet werden. Zusätzlich wurde der 3-er SONDENSATZ der zentromernahen YAC-Sonden hybridisiert (im Ergebnisteil nicht gezeigt). Es sei nur kurz erwähnt, dass die Sonden kein auswertbares Ergebnis zeigten. Sie waren zu schwach und konnten weder in den positiven noch in den nicht positiven Zellen zufriedenstellende Ergebnisse liefern.

Um die Bedeutung dieser Veränderungen einordnen zu können, wurde von zwei Arealen des Primärtumors DNA gewonnen, um eine CGH Analyse durchzuführen. Dabei sollten mögliche gemeinsame Veränderungen die Interpretation der Analyse der positiven Zellen erleichtern.

Die CGH-Profile der DNA aus Primärtumoren waren allerdings unauffällig, so dass keine Zusatzinformation über die genetischen Veränderungen erhalten werden konnte.

Eine Erklärung für diese Profile könnte in der Gewebestruktur der Primärtumoren liegen. Ist das Tumorgewebe zu stark mit Normalgewebe durchsetzt, werden die Veränderungen des Tumors in der CGH nicht angezeigt.

Da kein anderes Primärtumormaterial für eine Analyse nach Mikrodissektion zur Verfügung stand, wurde zu diesem Zeitpunkt keine weitere Strategie verfolgt, um aussagekräftigere Analysen zu diesem Fall zu erhalten.

Allerdings bestätigte der Fall Ob-2006, dass Cy3 positive Zellen mit Zentromersonden analysiert werden können, wenn keine granulären Strukturen um die Zelle auftreten. Die Analyse mit zentromernahen YAC-Sonden hingegen ist deutlich erschwert aufgrund der schwachen Intensitäten der Sonden.

4.2.4. Analyse von disseminierten Tumorzellen mittels Interphase Zytogenetik - Zusammenfassung

Ziel bei der Analyse von disseminierten Tumorzellen mit Interphase Zytogenetik war das Austesten der geeigneten Antikörperfärbung von disseminierten Tumorzellen als pan-Zytokeratin positive Zellen im Knochenmark. Der Antikörpernachweis sollte so gewählt werden, dass eine anschließende Hybridisierung von regionenspezifischen Sonden zur genetischen Analyse der Zellen möglich ist. Als Testsystem für diese Untersuchungen wurde auf das Patientenkollektiv von Nierentumorpatienten des Klinikums Großhadern zurückgegriffen. Hier war eine ausreichende Anzahl an Knochenmarkspräparaten vorhanden.

Als geeignetes Nachweissystem für pan-Zytokeratin positive Zellen erwies sich der Antikörper A45 B/B3 konjugiert mit Cy3 oder FluorX. In den Mischversuchen von Zelllinien und Knochenmark wurden die besten Ergebnisse mit den direkt konjugierten Antikörpern erreicht. Zusätzlich war eine auswertbare Hybridisierung von Zentromersonden möglich.

Im Folgenden wird erörtert, welche regionenspezifischen Sonden für eine Analyse der disseminierten Tumorzellen geeignet sind. Der Einsatz von zentromernahen YAC-Sonden stellte sich als äußerst schwierig heraus. Es ist nötig, die Antikörperfärbung zur Identifikation

der Tumorzellen zu entfernen und die Zellen nach der Hybridisierung der YAC-Sonden mittels eines Computerprogramms wiederzufinden, welches die Koordinaten der vormals positiven Zellen speichert.

Auch das Auftreten einer granulären Struktur um vereinzelte Zellen im Knochenmark der Nierentumorpatienten erwies sich als hindernd in der Auswertung. Diese Struktur förderte eine unspezifische Färbung der betroffenen Zellen, so dass zum einen eine Differenzierung zwischen spezifisch positiven Zellen und unspezifischen Zellen unmöglich war. Zum zweiten konnten die Hybridisierungen nicht ausgewertet werden. Mehrere Protokollvariationen führten zu keiner Verbesserung der Ergebnisse.

Offenbar sind die bislang verwendeten Standardpräparations- bzw. Lagerungsbedingungen sehr anfällig für die Entwicklung unerwarteter Strukturen, die die FISH behindern bzw. unmöglich machen. Damit ist die retrospektive Untersuchung von archiviertem Material unmöglich.

Aus zwei Gründen erfolgte anschließend der Entschluss, die Analyse des kultivierten Knochenmarks von Mammakarzinom Patientinnen mit einem spezifischen Zentromersondensatz durchzuführen.

Zentromersonden zeigen mit die stärksten Signale bei einer Hybridisierung auf Knochenmarksmaterial. Außerdem konnte die granuläre Struktur, die bei den Testpräparaten auftrat, nicht gesehen werden. Diese Struktur wird aber für die erschwerte Analyse der Testpräparate mit verantwortlich gemacht.

4.3. Analyse von kultivierten disseminierten Tumorzellen bei fünf Mammakarzinom Patientinnen

Ziel der Analyse der Mammakarzinome war die Anwendung der Einzelzell CGH und der Interphase FISH auf disseminierte Tumorzellen, die mit einem spezifischen Oberflächenmarker kenntlich gemacht wurden. Dabei sollte die Einzelzell CGH Aufschlüsse über die häufigsten chromosomalen Veränderungen dieser disseminierten Zellen geben. Nach anschließender Auswertung der Daten wurde ein Zentromersonden Mix zusammengestellt, um weitere Zellen auf spezifische numerische Veränderungen hin zu analysieren.

Es erfolgt die Diskussion der Ergebnisse aus beiden Einzelzellanalysen im Vergleich zu den Daten aus dem Primärtumor pro Patient und zwischen den Patientinnen.

4.3.1. Einzelzell CGH und Interphase FISH

4.3.1.1. Anwendung der Einzelzell CGH bei disseminierten Tumorzellen von Mammakarzinom Patientinnen

Insgesamt wurden mit dem PALM MicroBeam System 67 Einzelzellen oder Cluster katapultiert. Bei der anschließenden Analyse dieser Zellen mit der Einzelzell CGH konnte bei 51 Zellen (76,1%) ein spezifisches Profil errechnet werden. Waren auch Signale am Y Chromosom vorhanden (12 Zellen, 17,9%) oder keine Hybridisierung erfolgt (2 Zellen, 3%), so wurde das Ergebnis als nicht auswertbar angesehen.

In zwei Fällen (3%) konnte das Ergebnis nicht eingeordnet werden. Der erste Fall (Zelle 1125 Pos3) zeigte nur eine Tendenz des Y Chromosoms zu einem Verlust. Dies könnte an der Hybridisierungseffizienz auf die Metaphasen liegen. Werden die Metaphasen nicht ausreichend vorbehandelt, kann es zu unspezifischen Markierungen kommen, die die Berechnung des Profils der CGH beeinflussen. Da bei einer zweiten Hybridisierung das Profil ähnlich verlief, wurde diese Zelle nicht zur Auswertung herangezogen. Der zweite Fall 1153 Pos1 zeigte in der ersten Hybridisierung ein weibliches Profil, allerdings war der Verlauf der Profile äußerst unruhig und für eine eindeutige Auswertung von Gewinnen und Verlusten nicht geeignet. Zwei weitere Hybridisierungen zeigten dann Signale auf dem Y Chromosom. Eine weitere Beobachtung wurde bei der Hybridisierungseffizienz der amplifizierten DNA gemacht.

Von den 51 auswertbaren Zellen zeigten 24 relativ niedrigere Fluoreszenzintensität (Bsp. siehe Abbildung Abb.4.3.1.a).

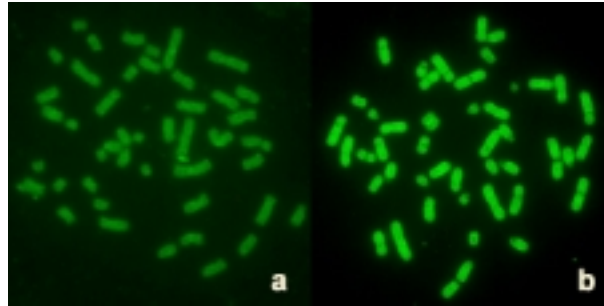


Abb.4.3.1. Darstellung zweier unterschiedlicher Fluoreszenzintensitäten aus dem FITC Kanal der Einzelzell CGH
a) Zelle 1125 Pos7 mit schwacher Intensität
b) Zelle 1125 Cl1 mit optimaler Intensität

Die Zellen mit relativ schwacher Fluoreszenzintensität waren auswertbar, jedoch wurde in 10 Experimenten ein spezielles Profilmuster an Chromosom 19 entdeckt (siehe Abbildung Abb.4.3.2.) und in weiteren 4 hybridisierten Zellen war eine Tendenz zu diesem Muster zu sehen.

Chromosom 19

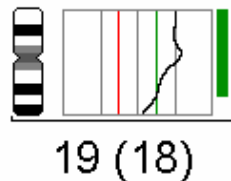


Abb.4.3.2. Spezifisches CGH-Profilmuster bei schwach hybridisierten Tumorzellen
entnommen aus der Auswertung der Zelle 1125 Pos7

Da dieses Muster in nur einer Zelle mit hoher Fluoreszenzintensität beobachtet wurde, ist ein Artefakt wahrscheinlich. Chromosom 19 ist aufgrund des hohen Anteils an repetitiven Sequenzen bei CGH Experimenten bekanntlich sehr artefaktanfällig (O.P. Kallioniemi et al. 1994; R. Karhu et al. 1997). Diese Artefaktanfälligkeit nahm in den Experimenten mit niedriger Fluoreszenzintensität zu.

Allgemein ist zu erwähnen, dass die Erfolgsrate der Einzelzell CGH sich auf 76,1% erhöht hat. Bei dem Testsystem der Zelllinie RCC-26 lag sie noch bei 62,5%, allerdings wurde nur mit 16 Zellen gearbeitet.

Diese Steigerung ist ein weiterer Beleg für die Stabilität dieses Protokolls. Auch die Verwendung des PALM MicroBeam Systems zur Gewinnung von Einzelzellen und anschließender Analyse durch die Einzelzell CGH ist möglich.

4.3.1.2. Anwendung der Interphase FISH bei disseminierten Tumorzellen von Mammakarzinom Patientinnen

Die Hybridisierung des dT-Mixes auf kultivierte disseminierte Tumorzellen erwies sich als problematisch. Bei den ersten Präparaten, die auf HistoBond Adhäsions-Objektträgern der Firma Marienfeld aufgebracht waren, konnte nur in einigen Fällen das Fluorochrom Cy5.5 ausgewertet werden. Die Beschichtung auf den Objektträgern, die der Anheftung von Gewebeschnitten dienen soll, macht eine Hybridisierung von regionenspezifischen Sonden so gut wie unmöglich. Ähnliche Ergebnisse ergaben sich mit beschichteten Objektträgern anderer Firmen, auch bei anderen Geweben oder Anwendungen.

Die Umstellung auf nicht beschichtete Objektträger konnte nur bei drei Patientinnen erfolgen. Die erste Hybridisierung der Sonden führte zu dem gleichen Ergebnis wie mit den beschichteten Objektträgern. Nur die Fluorochrome im Infrarotbereich konnten ausgewertet werden. Dieses Mal lag der Grund an einer auftretenden Autofluoreszenz der Präparate. Diese Fluoreszenz konnte durch einen zehnmütigen Pepsinverdau reduziert, aber nicht vollständig aufgelöst werden. Eine Verlängerung des Verdaus hätte zur Zerstörung der Zellkerne geführt.

Bei der anschließenden Hybridisierung des dT-Mixes konnten die Signale der Fluorochrome FITC, TAMRA und teilweise Cy3.5 nicht von auftretendem Hintergrund unterschieden werden, bzw. ein Hybridisierungssignal der Sonden war nicht zu erkennen.

Da die Präparate bereits vor der Vorbehandlung für eine Hybridisierung diese Autofluoreszenz zeigten, könnte die Ursache in der Kultivierung der Zellen liegen. Möglich wäre, dass durch eine bestimmte Kulturreagenz diese Autofluoreszenz verursacht wird. Auch die Analyse von kultiviertem Knochenmark eines Pankreatitis Patienten, das unter den selben Bedingungen kultiviert wurde, zeigte die Autofluoreszenz. Wohingegen nicht kultivierte Knochenmarkszellen von Nierentumorpatienten keine Autofluoreszenz zeigten.

Um die Ursache für dieses Auftreten zu finden, wurden mehrere Kultursysteme mit verschiedenen Zellen verglichen.

Ebenso auffällig war das Auffinden von Cy3 positiven Zellen auf den HistBond Präparaten, wohingegen auf den SuperFrost*/Plus Präparaten bei keinem Patienten eine positive Zelle gefunden werden konnte.

Der Grund hierfür könnte in der weitergeführten Kultur liegen. Die zweite Präparation auf die SuperFrost*/Plus Präparate wurde mit Zellen aus der folgenden Passage gemacht. Bereits in der Doktorarbeit von Christiane Reindl, 2002 konnte eine ähnliche Beobachtung gemacht werden, dass die disseminierten Tumorzellen je länger sie in Kultur waren keine Cy3 Färbung mehr zeigten. In der Doktorarbeit wurde diskutiert, ob über den Zeitraum der Kultur

das Zytokeratin in den Zellen runterreguliert würde. Auch nach den Kollegen in Hamburg ist dies ein häufig beobachtetes Phänomen (Prof. K. Pantel, Dr. E. Breit, persönliche Mitteilung).

Da insgesamt nur 2 bis 3 Sonden pro Tumorpatient ausgewertet werden konnten und zusätzlich keine genaue Identifizierung von disseminierten Tumorzellen über den pan-Zytokeratin Antikörper möglich war, ist die Interpretation der Interphase FISH Ergebnisse nur als Anhaltspunkt zu verstehen.

4.3.2. Analyse der Ergebnisse im Vergleich der angewandten Methoden

In dem folgenden Kapitel sollen die Analysen der Tumor- und disseminierten Zellen der fünf Patientinnen mit Mammakarzinom gegenübergestellt werden. Hierbei werden die Ergebnisse der disseminierten Tumorzellen mit denen der Primärtumoren verglichen. Ergänzend wird die Interphase FISH angeschlossen.

4.3.2.1. Vergleich der Einzelzell CGH Daten der disseminierten Tumorzellen mit den Ergebnissen aus der Primärtumor Analyse

Zur besseren Übersicht werden die Ergebnisse des Primärtumors und der Einzelzellen für jede Patientin in einer Tabelle veranschaulicht. Dabei werden Gewinne an Chromosomenmaterial mit einem grün ausgefüllten Kästchen markiert, Verluste an Chromosomenmaterial mit einem roten. Wird zusätzlich der Buchstabe p angegeben, liegt die numerische Veränderung nur am kurzen Arm, beim Buchstaben q entsprechend nur am langen Arm vor. Zusätzlich soll durch ein helleres Grün bzw. Rot die Tendenz zu einem Gewinn oder Verlust angezeigt werden. Da bei den weiblichen Patientinnen das Chromosom X überrepräsentiert und das Y unterrepräsentiert ist, ist der normal Zustand für X ein grünes Kästchen und für Y ein rotes Kästchen.

Abbildung Abb.4.3.3. zeigt beispielhaft drei Kästchen. Kästchen A beschreibt den Zustand „Gewinn an Chromosomenmaterial des gesamten Chromosoms“, Kästchen B den „Verlust an Chromosomenmaterial des langen Arms q“ und Kästchen C die „Tendenz zu einem Verlust an Chromosomenmaterial des kurzen Arms p“.

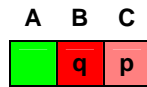


Abb.4.3.3. Beispiel für die tabellarische Darstellung der Ergebnisse aus der Einzelzell CGH

- A) Gewinn an Chromosomenmaterial des gesamten Chromosoms
- B) Verlust an Chromosomenmaterial des langen Arms q
- C) Tendenz zu einem Verlust an Chromosomenmaterial des kurzen Arms p

Eine Tendenz wird dann vermutet, wenn das Profil der CGH nicht über den gesetzten Schwellwerten liegt, aber sich in dessen Nähe befindet. Entscheidend ist zusätzlich, dass die Profile der anderen Chromosomen annähernd entlang der Mittellinie verlaufen. In Abbildung Abb.4.3.4. wird zur Veranschaulichung ein Beispiel für eine Tendenz zu einem Verlust an Chromosom 17 gezeigt.

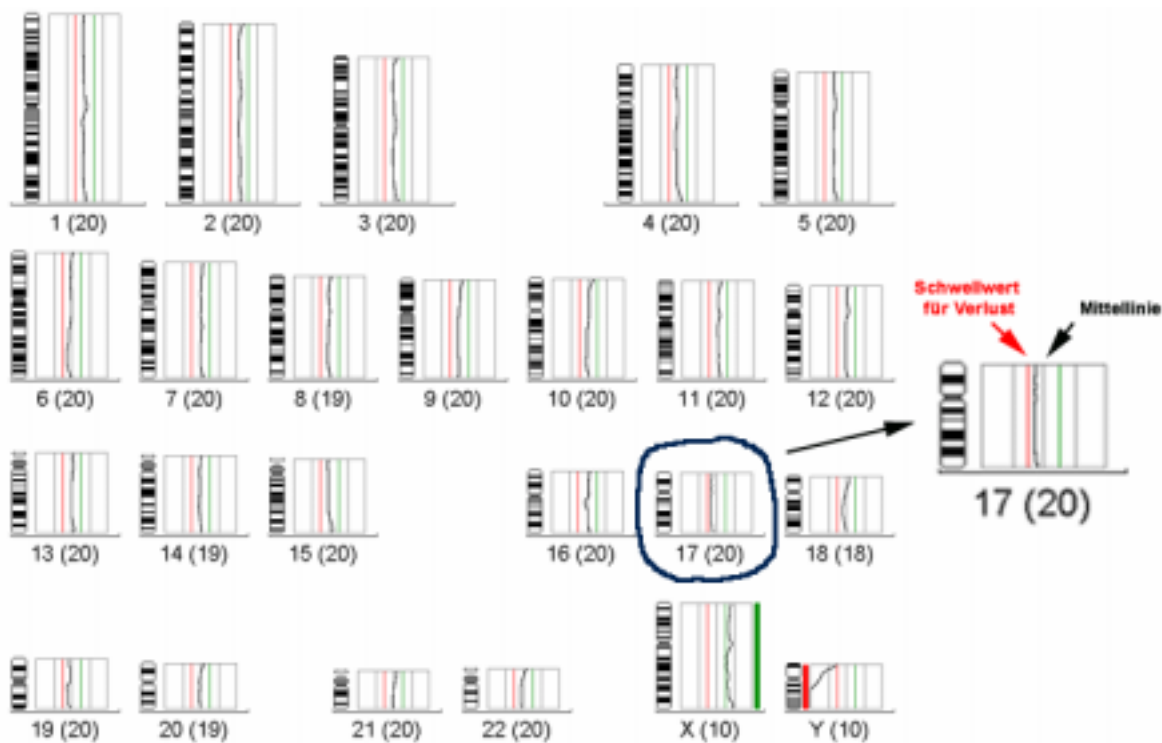


Abb.4.3.4. CGH-Profil von der Einzelzelle 1125 Pos4 mit der Tendenz zu einem Verlust bei Chromosom 17
 Das Profil befindet sich in der Nähe des Schwellwertes, überschreitet ihn aber nicht. Die anderen Profile verlaufen auf der Mittellinie.

Dieses Profil zeigt deutlich den Verlauf auf der Mittellinie, außer bei Chromosom 17. Dort orientiert sich das Profil in Richtung eines Verlusts. Da die Bestimmung der Schwellwerte für Einzelzellen schwierig ist, werden bei der Diskussion der Ergebnisse aus Einzelzell CGH und Primärtumor CGH diese Tendenzen mit herangezogen.

Eine mögliche Erklärung für diese „tendenzielle“ Profilverchiebung kann im Ploidiegrad liegen. Dieser wurde konservativ für diploide Zellen definiert. Die Festlegung der Ploidiegrad-abhängigen Schwellwerte wird in Kapitel 4.3.2.3. (Seite 204) diskutiert.

disseminierten Tumorzellen aus dem Knochenmark der Patientin 1153/54 von dem Primärtumorgewebe abstammen.

Bei Patientin 1157/58 wurde kein Zellcluster gefunden. In der gemeinsamen Ergebnisdarstellung (siehe Tabelle Tab.4.3.3.) werden neben den beiden Kontrollen und den Primärtumoren fünf Einzelzellen (Pos3-7) gezeigt.

	Chromosomen																						X	Y
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22		
K1																								
K2																								
Pos3	p		p				p	q																
Pos4	p						q			p		q	q						q					
Pos5																								
Pos6				q	q						q	q	q											
Pos7	p											q				p								
PT A	q															q								
PT B	q															q								

Tab.4.3.3. Tabellarische Darstellung der Verluste und Gewinne an Chromosomenmaterial bei Patientin 1157/58

Spalten 2-25 beschreibt die Chromosomen, die Zeilen 3-12 die ausgewertete Zelle oder den Primärtumor
Grünes Kästchen: Gewinn an Chromosomenmaterial, **Rotes Kästchen:** Verlust an Material
Hellgrünes Kästchen: Tendenz zu Gewinn an Material, **Hellrotes Kästchen:** Tendenz zu Verlust
p: kurzer Arm eines Chromosoms, **q:** langer Arm eines Chromosoms,
Kästchen ohne Beschriftung: Bezug auf gesamtes Chromosom

Die Muster der einzelnen Veränderungen zeigen auch hier eine äußerst heterogene Verteilung. Die Chromosomen 12 und 13 sind am häufigsten beteiligt. Im Primärtumor zeigten diese beiden Chromosomen aber keine Veränderung. Umgekehrt war der überrepräsentierte Bereich im Primärtumor bei 16q in keiner disseminierten Tumorzelle zu finden. Auch die Amplifikation von 1q trat bei den Einzelzellen nicht auf. Nur der terminale Bereich 1p zeigt sich zweimal als überrepräsentiert und einmal als unterrepräsentiert. Diese Region ist aber bei der CGH Artefakt anfällig, da sich dort viele repetitive Sequenzen befinden. Selbst bei Kontrollexperimenten mit normalen Zellen traten in dieser Region häufig Veränderungen auf.

Bei der Patientin ist ein deutlicher Unterschied zwischen Primärtumor und disseminierten Tumorzellen zu erkennen.

Die Erklärung hierfür könnte in der Methode der CGH liegen. Da mehrere Zellen zur Analyse in einem Experiment zusammengefasst werden, ist eine mögliche Heterogenität in den einzelnen Zellen des Primärtumors nicht zu erkennen. Die CGH bietet einen Querschnitt der

Veränderungen im Tumor. Nur die Veränderungen werden angezeigt, die in mehr als 50% der Zellen auftreten, die für die CGH herangezogen werden. Eine Hybridisierung von regionenspezifischen Sonden auf die Areale des Primärtumors könnten solch eine Heterogenität und damit auch mögliche Gemeinsamkeiten mit den disseminierten Tumorzellen zeigen.

Bei der Patientin 1186/87 werden fünf Einzelzellen (Pos1-5) und drei Zellcluster (CI1-3) den beiden Primärtumorarealen gegenübergestellt (siehe Tabelle Tab.4.3.4.).

	Chromosomen																								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	X	Y	
K1																									
K2																									
Pos1				q						q	q	q													
Pos2				q						q	q	q			q										
Pos3																			p						
Pos4										q	q	q			q				p						
Pos5																			p						
CI1									p	q	q	q		q	q										
CI2	p					q	p				p	q	q			p	p								
CI3											q														

PT A						q			p		q	q	q												
PT B				p					p	q		q					q	p							

Tab.4.3.4. Tabellarische Darstellung der Verluste und Gewinne an Chromosomenmaterial bei Patientin 1186/87

Spalten 2-25 beschreibt die Chromosomen, die Zeilen 3-12 die ausgewertete Zelle oder den Primärtumor
Grünes Kästchen: Gewinn an Chromosomenmaterial, **Rotes Kästchen:** Verlust an Material
Hellgrünes Kästchen: Tendenz zu Gewinn an Material, **Hellrotes Kästchen:** Tendenz zu Verlust
p: kurzer Arm eines Chromosoms, **q:** langer Arm eines Chromosoms,
Kästchen ohne Beschriftung: Bezug auf gesamtes Chromosom

Hier zeigen sich sowohl in den disseminierten Tumorzellen als auch in den Primärtumorzellen viele Veränderungen. Äußerst auffällig ist das Auftreten der Amplifikation an den Chromosomenenden 10q, 11q und 12q. Sowohl in den Einzelzellen und den Zellclustern, als auch in den beiden Arealen des Primärtumors sind diese Veränderungen zu erkennen. Der Bereich der Amplifikation ist auch annähernd der gleiche.

Für Chromosom 10 ist dies der Bereich 10q25 -> 10qter und tritt bei den Zellen Pos1,2,4 und CI1 auf. Der Chromosomenabschnitt 11q24 -> 11qter zeigt sich bei Pos 2,4 und CI1 und der Bereich 12q24 -> 12qter bei Pos1, 2, 4 und CI1-3 als Gewinn.

Dieses gehäufte Auftreten gemeinsamer Veränderungen weist auf den Ursprung der disseminierten Tumorzellen aus dem Primärtumor hin.

Auch bei der Patientin 1192/93 werden die Ergebnisse in einer Tabelle (Tab 4.3.5.) verglichen.

	Chromosomen																								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	X	Y	
K1																									
K2																									
Pos1																									
Pos3																									
Pos4																									
Pos5																									
Pos6																									
PosD																									
PosE																									
CI1																									
CI2																									
CI3																									
CIA																									
CIB																									
CIC																									

PT A																									
PT B																									

Tab.4.3.5. Tabellarische Darstellung der Verluste und Gewinne an Chromosomenmaterial bei Patientin 1192/93

Spalten 2-25 beschreibt die Chromosomen, die Zeilen 3-12 die ausgewertete Zelle oder den Primärtumor
Grünes Kästchen: Gewinn an Chromosomenmaterial, **Rotes Kästchen:** Verlust an Material
Hellgrünes Kästchen: Tendenz zu Gewinn an Material, **Hellrotes Kästchen:** Tendenz zu Verlust
p: kurzer Arm eines Chromosoms, **q:** langer Arm eines Chromosoms,
Kästchen ohne Beschriftung: Bezug auf gesamtes Chromosom

Besonders interessant ist, dass das CGH-Profil der Chromosomen 12 und 13 in den Primärtumoren jeweils sowohl Gewinne (PT A: 12p und 13q, PT B: 12q und 13) als auch Verluste (PT A: 12q und 13q, PT B: 12q) zeigte.

Auch hier bestätigt sich die heterogene Verteilung der Veränderungen bei den disseminierten Tumorzellen. Allein die Zellen PosD und E zeigen Gemeinsamkeiten in ihren Veränderungen.

Beim Vergleich zwischen Primärtumor und Einzelzellen gibt es Gemeinsamkeiten bei den Chromosomen 7 (Pos3 und D), 12 (PosD und E), 13 (PosD, CIA und B), 14 (PosE und CIB) und bei Chromosom 22 (PosE und CIB). Weitere Chromosomen sind bei Veränderungen beteiligt, allerdings in unterschiedlicher Art. Zum Beispiel wird bei Chromosom 4 im Primärtumor eher ein Verlust gezeigt, in den disseminierten Tumorzellen aber in zwei Fällen eine Überrepräsentierung und in einem Fall nur ein Verlust von 4p, der sich aber im zweiten Areal des Primärtumors ebenso zeigt.

Deutlich wird in diesem Fall, wie komplex der Primärtumor und die analysierten disseminierten Tumorzellen in ihren Veränderungen sein können.

4.3.2.2. Interpretation der Ergebnisse aller fünf Patienten

Betrachtet man die Ergebnisse der Einzelzell CGH bei kultivierten disseminierten Tumorzellen, so sind deutliche Musterunterschiede in ihren Veränderungen zu erkennen. Zum Teil zeigten einige Zellen gemeinsame Gewinn- und Verlustmuster wie bei Patientin 1153 (Einzelzellen Pos17 und 18) oder bei Patientin 1192 (Zellen PosD und E).

Die Heterogenität metastasierender Zellen ist bereits seit den 70-iger Jahren bekannt (I.J. Fidler et al. 1977; I.J. Fidler et al. 1982). Vielfarben Interphase FISH Verfahren stellen einen weiteren attraktiven Ansatz dar, diese Heterogenität zu analysieren. Erste Arbeiten haben die Heterogenität durch Interphase FISH belegt (O. Solakoglu et al. 2002).

Erwartungsgemäß gab es in den kultivierten disseminierten Tumorzellen auch gemeinsame Gewinne und Verluste. Besonders interessant in diesem Zusammenhang ist die Analyse der Zellcluster.

Hier wurden zwischen drei bis zehn Zellen pro Zellverbund für eine Analyse zusammengefasst. Das bedeutet, dass auftretende Veränderungen in mehr als 50% der Zellen zu finden sind, ansonsten würde das CGH-Profil den Verlust nicht anzeigen. Interpretieren kann man diese gemeinsamen Veränderungen als Indiz für eine Abstammung untereinander, d.h. sie könnten Tochterzellen sein. Dies lässt wiederum die Vermutung zu, dass die Zellen aufgrund der Teilungsaktivität in der Kultur einen erhöhten proliferativen Charakter besitzen. K. Pantel et al. 1993 vermutet, dass solche Zellen für eine Metastasierung des Tumors entscheidend sind, die prognostische Relevanz des proliferativen Verhaltens wurde später belegt (O. Solakoglu et al. 2002).

Zu berücksichtigen ist, dass die Zellen per Zytospin auf die Objektträger aufgeschleudert wurden. Eine zufällige Anordnung dieser Zellen kann somit nicht eindeutig ausgeschlossen werden. Auch das Ablösen der Zellen aus der Kulturflasche könnte für die Interpretation der

Zellcluster eine Rolle spielen. Als Reagenz wurde Akutase verwendet. Dies ist im Gegensatz zu Trypsin weniger aggressiv und kann das gemeinsame Ablösen der Zellen erleichtern. Um genauere Informationen über die Zellcluster zu erhalten, sollte erneut die Interphase FISH weitere Erkenntnisse liefern.

Vergleicht man die Ergebnisse aller fünf Patientinnen fallen zwei Gruppen auf.

Die Ergebnisse der Patientinnen 1153/54 und 1157/58 zeigen jeweils wenige Veränderungen im Primärtumor, wohingegen bei den disseminierten Tumorzellen besonders bei Patientin 1157/58 viele chromosomale Veränderungen auftreten. Den Grund für diesen Unterschied könnte man in der CGH der Primärtumoren suchen. Wie bereits erwähnt gibt das Profil der CGH nur einen Mittelwert aller in die Untersuchung aufgenommener Zellen wieder. Eine mögliche heterogene Verteilung von Veränderungen in einzelnen Zellen des Primärtumors, die in weniger als der Hälfte der Zellen auftreten, könnte die CGH nicht anzeigen.

Die hohe Heterogenität in Tumorgewebe ist seit längerem bekannt. Mittels Interphase-FISH an dicken (30µm) Gewebeschnitten konnten wir beim Ovarialkarzinom eine unerwartet hohe Heterogenität feststellen (siehe Doktorarbeit C. Maierhofer, LMU München, 2003). Dies könnte sich bei Mammakarzinomen ähnlich verhalten.

Als weiteren Grund könnten die beobachteten heterogenen Veränderungen das Stadium reflektieren, zu dem die Zellen während der Tumorevolution disseminiert sind.

Die zweite Gruppe ergibt sich aus Patientin 1186/87 und 1192/93. Hier zeigen die Primärtumoren ein komplexes Muster an Veränderungen. Deutlich wird dies durch die Unterschiede bei den jeweiligen Primärtumorealen. Betrachtet man die Ergebnisse der Einzelzell CGH, so ist auch hier ein äußerst komplexes Muster an Veränderungen zu erkennen.

Stellt man die Ergebnisse von Patientin 1153/54, 1157/58 und 1186/87 gegenüber zeigt sich in den Veränderungen an den Chromosomen 10, 11 und 12 eine große Übereinstimmung. Die Bereiche 10q25 -> 10qter, 11q24 -> 11qter und 12q24 -> 12qter treten gehäuft in diesen Patientendaten auf. Zusätzlich ist in einem der Primärtumoren (1186/87) dieses Muster in beiden Arealen vertreten.

Der Vergleich der Ergebnisse mit Literaturdaten stützt sich auf zwei Publikationen (A. Kallioniemi et al. 1994; R. Roylance et al. 1999), die zur Analyse von Brusttumoren ebenfalls die CGH heranzogen. Beide zeigten, dass eine Amplifikation der Chromosomenbereiche 1q, 8q, 16p, 17q und 20q, sowie der Verlust in Chromosomenbereich 16q bei 33 bzw. 40 analysierten Primärtumoren gehäuft auftritt und somit spezifische Veränderungen der Mammakarzinome darstellen.

Tabelle Tab.4.3.6. zeigt die Anzahl der Veränderungen in den Einzelzell Experimenten bezüglich der Literaturwerte.

Häufige Veränderungen nach Literaturangaben	Einzelzelle
1q Amplifikation	1192/93 Pos3
8q Amplifikation	1125 Pos1 1157/58 Pos3 1186/87 Pos1
16p Amplifikation	1157/58 Pos7 1186/87 Pos1 und cl2 1192/93 Pos1,6 und Cl2
17q Amplifikation	1157/58 Pos7 1192/93 Pos1,6 und ClA
20q Amplifikation	1153/54 Pos17 und 18 1186/87 Pos1,2 und Cl1,2
16q Verlust	-

Tab.4.3.6. Tabellarischer Vergleich der häufigsten Mammakarzinom Veränderungen aus Literaturangaben (A. Kallioniemi et al. 1994; R. Roylance et al. 1999) mit den Ergebnissen der Einzelzell CGH aus fünf Mammakarzinomen

Der Vergleich mit Literaturdaten zeigt, dass auch in den disseminierten Tumorzellen Veränderungen auftreten, die häufig beim Mammakarzinom beschrieben wurden.

Auch die für das Mammakarzinom bekannten Onkogene erbB2 (17q12) und c-myc (8q24) liegen in Bereichen, die auch in den disseminierten Tumorzellen mit einer Amplifikation von 8q und 17q auftreten.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass mit der Analyse der fünf Mammakarzinome gezeigt werden konnte, dass zwischen den kultivierten disseminierten Tumorzellen und ihren Primärtumoren in den chromosomalen Veränderungen Gemeinsamkeiten existieren.

Dies lässt vermuten, dass die in Kultur gebrachten Tumorzellen aus dem Knochenmark ihren Ursprung im Primärtumorgewebe haben.

Ebenso konnte im Rahmen der geringen Fallzahl gezeigt werden, dass ein deutlich heterogenes Muster bei den disseminierten Tumorzellen innerhalb eines Patienten zu erkennen ist.

Vergleicht man die Ergebnisse mit den Tumorstadien der Patientinnen, so ist keine Auffälligkeit zu erkennen. Der Tumor der Patientin 1157/58 wurde als pTc2 eingestuft, es konnten aber keine speziellen Unterschiede zu den anderen Tumoren (alle pTc1) festgestellt werden.

4.3.2.3. Einbringen der Ergebnisse aus dem Interphase Ansatz

Die Auswahl der Zentromersonden wurde nach den ersten Ergebnissen der Einzelzell CGH vorgenommen. Dabei zeigten sich in den Chromosomen 7, 12, 16, 17 und X vermehrt Veränderungen. Die oben genannten Zentromersonden zeigten auf normalen Metaphasepräparaten gute Signale, auch deswegen wurden sie für die Interphaseanalyse ausgewählt.

Aufgrund der bereits besprochenen Probleme bei der Hybridisierung lassen die Ergebnisse keine weiteren Aussagen über die Heterogenität zu, erlauben aber teilweise Aussagen zum Ploidiegrad, der für die Definition der CGH-Schwellwerte wichtig war. Eine Möglichkeit wäre die Berechnung des Modalwertes. Aufgrund der geringen Zellzahl und der wenigen hybridisierten Sonden ist dieser aber schwer festzulegen. Zusätzlich waren häufig zwei Signale pro Sonde in den Zellen zu erkennen. Die Zellen, die Veränderungen zeigten, hatten ein sehr heterogenes Muster.

Daher entschied ich mich für eine konservative Vorgehensweise, um nur wirkliche Veränderungen korrekt zu beurteilen. Das Risiko, einige Veränderungen zu verpassen, wurde in Kauf genommen bzw. über das Einbringen von Tendenzen relativiert. In drei Fällen wurde daher der Schwellwert für triploide Zellen gesetzt, da die Mehrheit der Signale in den Zellen, die eine Veränderung zeigten über zwei lag.

Allgemein ist zu sagen, dass bei der Analyse der Interphaseergebnisse auch eine große Heterogenität in den veränderten Zellen zu finden war. Ein spezifisches Muster trat aber nicht hervor.

Es zeigt sich auch, dass in den drei Fällen bei denen die Interphaseanalyse möglich war, zwischen 45 und 55 Prozent der ausgewerteten Zellen chromosomale Veränderungen auftraten. Offen bleibt, inwiefern diese Veränderungen tumorspezifisch sind und welchen Einfluss Kulturbedingungen spielen. Da jedoch das Wachstumsverhalten dieser Kulturbedingungen eng mit der Prognose korreliert (O. Solakoglu et al. 2002), reflektieren die beobachteten Veränderungen eher tumorrelevante Ereignisse.

4.4. Allgemeines Fazit zur Analyse von Einzelzellen

Durch die Analyse von fünf Mammakarzinomen konnte die Eignung der beiden zuvor ausgetesteten Methoden der Einzelzell CGH und Interphase FISH zur Untersuchung von seltenen Zellen dargestellt werden.

Anhand der Einzelzell CGH von pan-Zytokeratin positiven Zellen konnten Gemeinsamkeiten mit dem Primärtumor aufgezeigt werden.

Probleme gab es beim Einsatz spezifischer Antikörper zur Analyse von disseminierten Tumorzellen.

Besonders bei der Interphase Zytogenetik ist der Einsatz von fluoreszenzmarkierten Antikörpern stark von der Auswahl des zu untersuchenden Gewebes oder von deren Aufarbeitung abhängig. Hier kann es zu Problemen kommen, die auch in dieser Doktorarbeit auftraten.

Für die Einzelzell CGH stellt dieser Antikörper keine Probleme dar.

Da es sich bei Einzelzellanalysen immer um sehr diffizile Untersuchungen handelt, ist der Prozentsatz an nicht erfolgreichen Experimenten relativ hoch. Hier konnte die Einzelzell CGH in 76% der Fälle erfolgreich durchgeführt werden.

Die Kombination beider Methoden und die Information aus den Primärtumoren ermöglicht eine umfangreiche Analyse von Primärtumor und disseminierten Tumorzellen bei epithelialen Tumoren.

4.5. Ausblick

Die Analyse von disseminierten Tumorzellen ist äußerst schwierig, da in 10^5 - 10^6 Zellen des Knochenmarks nur eine Tumorzelle zu finden ist.

Die Einzelzell CGH bietet die Möglichkeit das gesamte Genom dieser seltenen Zellen ohne Kultivierung zu untersuchen. Hier wurden Zellen untersucht, die kurzfristig in Kultur genommen wurden, so dass zusätzlich Aussagen über ihr proliferatives Wachstumsverhalten gemacht werden können. Dieses wurde vor kurzem als wichtiger prognostischer Faktor identifiziert. Unter diesen kurzfristigen Kulturbedingungen werden die Zellen etwas angereichert, sie repräsentieren aber immer noch seltene Zellen.

Auch die Verwendung von fluoreszenzmarkierten Antikörpern zur Identifizierung der Tumorzellen muss weiter ausgetestet werden. Hier könnten noch mehrere Fluoreszenzfarbstoffe auf ihre Tauglichkeit hin geprüft werden. Dies könnte den Einsatz der simultanen Markierung der Tumorzellen bei gleichzeitiger Hybridisierung mehrerer Sonden ermöglichen. Um mehr Informationen aus den Tumorzellen mittels Interphase FISH zu

erhalten, wäre der Einsatz von kombinatorisch markierten Sonden denkbar. Ferner könnte die Analyse durch neuere 3D-Dekonvolutions Aufnahmetechniken erleichtert werden.

Möglich wäre, zuerst eine Interphase FISH durchzuführen, und anschließend die Analyse von interessanten Zellen mit Einzelzell CGH zu erweitern. Ein limitierender Faktor ist die Hybridisierung auf folienbeschichtete Objektträger. Genauere Ergebnisse hierzu können in der Doktorarbeit von Frau Sabine Langer (LMU München) nachgelesen werden.

In dieser Doktorarbeit wurde die Analyse von fünf Mammakarzinomen durchgeführt, um in erster Linie die Nutzbarkeit der beiden Methoden zu zeigen. Alle Daten die hier ermittelt wurden zeigten Hinweise, dass kultivierte disseminierte Tumorzellen ähnliche genetische Veränderungen aufweisen, wie ihr Primärtumor.

Durch eine umfangreiche Analyse von Primärtumor, disseminierten Tumorzellen und wenn möglich Metastasen könnte es gelingen, in den disseminierten Tumorzellen einen weiteren prognostischen Faktor zu etablieren.

Eine geeignete Strategie zur molekulargenetischen Analyse von disseminierten Tumorzellen ins Knochenmark könnte daher folgende sein:

Nach der Markierung der disseminierten Tumorzellen mit geeigneten Antikörpern erfolgt die Analyse des gesamten Genoms einer positiven Zelle anhand der Einzelzell CGH. Aus mehreren Analysen von einzelnen pan-Zytokeratin positiven Zellen könnten Daten über gehäuft auftretende Veränderungen anfallen, die zur Entwicklung eines geeigneten SONDENSATZES für die Interphase Zytogenetik dienen. Die Etablierung eines spezifischen SONDENSATZES für Vielfarben Interphase auf disseminierten Tumorzellen würde die Analyse deutlich beschleunigen, da die Einzelzell CGH ein relativ zeitaufwendiges Verfahren darstellt. Vergleicht man nun Daten der disseminierten Zellen, des Primärtumors und der Metastasen, so wird es möglich werden, genetisch relevante Ereignisse abzuleiten, die für die Metastasierung von Tumorzellen entscheidend ist.

Ein weiteres Einsatzgebiet der Analyse seltener Zellen mittels Einzelzell CGH stellt die Untersuchung von fetalen Zellen im mütterlichen Blut dar. Der limitierende Faktor ist hier ein Antikörper der eindeutig zwischen maternalen und fetalen Zellen unterscheiden kann. Zur Schwangerschaftsberatung ist diese Methode für die häufigsten Fragestellungen noch nicht geeignet.

Eine drastische Verbesserung der Auflösung der Einzelzell CGH kann durch eine Hybridisierung auf DNA Chips (D. Pinkel et al. 1998; S Solinas-Toldo et al. 1999; J.R. Pollack et al. 1999) erreicht werden. Hierzu liefen bereits mit der Arbeitsgruppe von Dr. Nigel Carter am Sanger Center (Cambridge, UK) erste Versuche, allerdings konnten noch keine zufriedenstellenden Ergebnisse erzielt werden. In Abbildung Abb.4.5.1. werden exemplarisch

die Ergebnisse der DNA Chip Hybridisierung für Chromosom 3 und 14 dargestellt. Man kann erkennen, dass der erwartete Chromosom 3p und 14 Verlust in der DNA Chip Analyse nicht angezeigt wird.

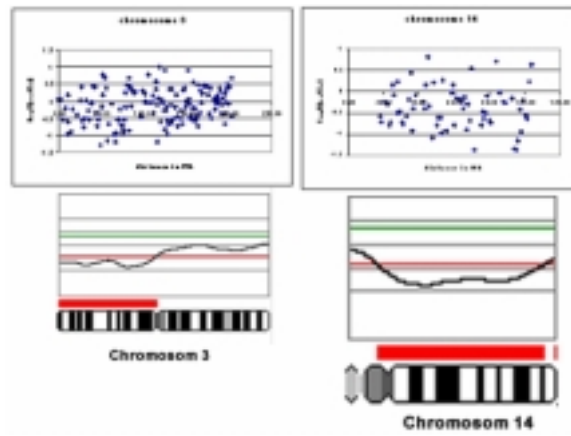


Abb.4.5.1. Vergleich der Ergebnisse zwischen DNA Chip und CGH Ergebnis einer Einzelzelle der Zelllinie RCC-26, repräsentativ Chromosom 3 und 14
 obere Zeile: Ergebnis des DNA Chips, untere Zeile: Ergebnis der Einzelzell CGH
 erste Spalte: Chromosom 3, zweite Spalte: Chromosom 14

5. ZUSAMMENFASSUNG

Aufgrund fehlender Methoden wurde bis zum heutigen Zeitpunkt nur selten eine molekulargenetische Analyse von Einzelzellen durchgeführt. In vielen Bereichen aber, wie beispielsweise den Tumoren, ist sie von entscheidender Bedeutung. Das Auftreten eines genetisch heterogenen Musters in einem Tumor könnte die Suche nach krankheitsauslösenden oder -fördernden Veränderungen erschweren. Auch bei der Untersuchung von seltenen Zellen (so genannte „rare cell events“), z.B. bei einer minimalen residualen Tumorerkrankung sind geeignete Methoden zur Einzelzellanalyse notwendig, da nur wenig Material zur Verfügung steht. Ziel dieser Doktorarbeit war es, zwei molekulargenetische Analysemethoden zu etablieren, weiterzuentwickeln und in einer geeigneten Strategie bei der Untersuchung von disseminierten Tumorzellen bei fünf Mammakarzinomen einzusetzen.

Im ersten Teil der Doktorarbeit erfolgte die Auswahl eines geeigneten Markierungssystems für die Identifizierung disseminierter Tumorzellen im Knochenmark. Die Benutzung des pan-Zytokeratin Antikörpers A45 B/B3 direkt konjugiert mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3 oder FluorX zeigte in verschiedenen Testsystemen die besten Ergebnisse. Sowohl seine Spezifität als auch die Durchführbarkeit einer Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) war möglich.

Anhand disseminierter Tumorzellen von Nierentumoren wurde die Möglichkeit einer Untersuchung mittels zweier Interphase FISH Ansätze überprüft. Die Hybridisierung der Zentromernahen YAC Sonden konnte auf dem Knochenmarksgewebe bei pan-Zytokeratin positiven Zellen nach Erproben mehrerer Protokolle nicht durchgeführt werden, allerdings war die Hybridisierung von Zentromersonden erfolgreich.

Die Optimierung des veröffentlichten Protokolls zur Einzelzell CGH (C. Klein et al. 1999; N. Stöcklein et al. 2002) war das zweite Ziel der Arbeit. Diese Optimierung war notwendig, weil sich das ursprünglich publizierte Protokoll als Artefakt anfällig herausstellte. Durch die in dieser Arbeit beschriebenen Protokollveränderungen konnte die für Einzelzell Analysen notwendige Reproduzierbarkeit erreicht werden. Als Testsystem wurde eine molekulargenetisch ausreichend charakterisierte und in ihren Veränderungen stabile Zelllinie gewählt (RCC-26). Die ersten Versuche zur Einzelzellanalyse zeigten Veränderungen in der Zelllinie, die in allen vorangegangenen Analysen mit etablierten Techniken (M-FISH und CGH) nicht gezeigt werden konnten. Eine Optimierung des Protokolls führte zu

übereinstimmenden Ergebnissen von Einzelzell CGH, CGH und M-FISH. Anschließend konnte die Reproduzierbarkeit dieser Methode anhand der Zelllinie RCC-26 gezeigt werden.

Die Anwendung beider Methoden zur Analyse von seltenen Zellen wurde mit der Untersuchung von fünf Mammakarzinomen dargelegt. Der Vergleich von Primärtumor und kultivierten disseminierten Tumorzellen ins Knochenmark zeigte im Rahmen der untersuchten Fälle gemeinsame molekulargenetische Veränderungen beider Tumorentitäten. Mit der Anwendung dieser neuen Methoden ist es möglich detaillierte Informationen über seltene Zellen zu erhalten und diese in den biologischen Kontext einzuordnen.

6. LITERATURVERZEICHNIS

du Manoir S., Schröck E., Bentz M., Speicher M.R., Joos S., Ried T., Lichter P., Cremer T. (1995)

Quantitative analysis of comparative genomic hybridization.
Cytometrie 19: 27-41

du Manoir S., Speicher M.R., Joos S., Schröck E., Popp S., Dohner H., Kovacs G., Robert Nicoud M., Lichter P., Cremer T. (1993)

Detection of complete and partial chromosome gains and losses by comparative *in situ* hybridization.
Hum Genet 90: 590-610

Eils R., Uhrig S., Saracoglu K., Sätzler K., Bolzer A., Petersen I., Chessery J.M., Ganser M., Speicher M.R. (1998)

An optimized, fully automated system for fast and accurate identification of chromosomal rearrangements by multiplex-FISH (M-FISH).
Cytogenet Cell Genet 82: 160-171

Fidler IJ, Kripke ML (1977)

Metastasis results from pre-existing variant cells within a malignant tumor.
Science 197:893

Fidler IJ, Hart IR (1982)

Biologic diversity in metastatic neoplasms-origins and implications.
Science 217:998-1001

Forozan F., Karhu R., Kononen J., Kallioniemi A., Kallioniemi O.P. (1997)

Genome screening by comparative genomic hybridization.
Trends in Genetics 13: 405-409

Forus A., Hoifodt H.K., Overli G.E.T. Myklebost O., Fodstad O. (1999)

Sensitive fluorescent *in situ* hybridisation method for the characterisation of breast cancer cells in bone marrow aspirates.
J Clin Pathol: Mol Pathol 52: 68-74

Geller, L.N. & Potter, H. (1999)

Chromosome missegregation and trisomy 21 mosaicism in Alzheimer's disease.
Neurobiol. Dis. 6:167-179.

Hosch S., Kraus J., Scheunemann P., Izbicki J.R., Schneider C., Schumacher U., Witter K., Speicher M.R., Pantel K. (2000)

Malignant potential and cytogenetic characteristics of occult disseminated tumor cells in esophageal cancer.
Cancer Res 60: 6836-6840

Izbicki J.R., Hosch S.B., Hossfeld D.K., Pantel K. (2000)

Minimale residuale Tumorerkrankung bei soliden epithelialen Tumoren.
Deutsches Ärzteblatt 97: 1526-1532

- Joos S., Scherthan H., Speicher M.R., Schlegel J., Cremer T., Lichter P. (1993)*
Detection of amplified DNA sequences by reverse chromosome painting using genomic tumor DNA as probe.
Hum Genet 90: 584-9
- Joos S., Haluska F.G., Falk M.H., Henglein B., Hameister H., Croce C.M., Bornkamm G.W. (1992)*
Mapping chromosomal breakpoints of Burkitt's t(8;14) translokations far upstream of c-myc.
Cancer Res 52: 6547-52
- Karhu R., Kähkönen M., Kuukasjärvi T., Pennanen S., Tirkkonen M., Kallioniemi O. (1997)*
Quality control of CGH: Impact of metaphase chromosomes and the dynamic range of hybridization.
Cytometry 28: 198-205
- Kallioniemi A., Kallioniemi O.P., Sudar D., Rutovitz D., Gray J.W., Waldman F., Pinkel D. (1992)*
Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors.
Science 258: 818-21
- Kallioniemi A., Kallioniemi O.P., Piper J., Tanner M., Stokke T., Chen L., Smit H.S., Pinkel D. Gray J.W., Waldman F.M. (1994)*
Detection and mapping of amplified DNA sequences in breast cancer by comparative genomic hybridization.
PNAS 91: 2156-2160
- Kallioniemi O.P., Kallioniemi A., Piper J., Isola J., Waldman F.M., Gray J.W., Pinkel D. (1994)*
Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors.
Gen Chrom Can 10: 231-243
- Klein C.A., Schmidt-Kittler O., Schardt J., Pantel K., Speicher M.R., Riethmüller G. (1999)*
Comparative genomic hybridization, loss of heterozygosity, and DNA sequence analysis of single cells.
Proc Natl Acad Sci USA 96:4494-4499
- Kovacs G. (1994)*
The value of molecular genetic analysis in the diagnosis and prognosis of renal cell tumours.
World J Urol 12: 64-68
- Liotta L., Kleinerman J., Saidel G. (1974)*
Quantitative relationships of intravascular tumor cells, tumor vessels and pulmonary metastases following tumor implantation.
Cancer Res 34:997-1004
- Loos J.A., Roos D. (1974)*
Ficoll-Isopaque gradients for the determination of density distributions of human blood lymphocytes and other reticulo-endothelial cells.
Exp Cell Res 86: 333

Malmgren H., Sahlen S., Inzunza J., Aho M., Rosenlund B., Fridström M., Hovatta O., Åhrlund-Richter L., Nordenskjöld M., Blennow E. (2002)

Single cell CGH analysis reveals a high degree of mosaicism in human embryos from patients with balanced structural chromosome aberrations.

Mol Hum Reprod 8: 502-510

Martin-Subero J.I., Chudoba I., Harder L., Gesk S., Grote W., Novo F.J., Calasanz M.J., Siebert R. (2002)

Multicolor-FICTION Expanding the possibilities of combined morphologic, immunophenotypic and genetic single cell analyses.

Am J Pathol 161: 413-420

Migliore, L. et al. (1999)

Preferential occurrence of chromosome 21 malsegregation in peripheral blood lymphocytes of Alzheimer disease patients.

Cytogenet. Cell Genet. 87: 41-46

Müller P., Weckermann D., Riethmüller G., Schlimok G. (1996)

Detection of genetic alterations in micrometastatic cells in bone marrow of cancer patients by fluorescence in situ hybridization.

Cancer Genet Cytogenet 88: 8-16

Müller P., Carroll P., Bowers E, Moore II D., Cher M., Presti J., Wessman M., Pallavicini M.G. (1998)

Low frequency epithelial cells in bone marrow aspirates from prostate carcinoma patients are cytogenetically aberrant.

Cancer 83: 538-546

Osborne M.P., Rosen P.P. (1994)

Detection and management of bone marrow micrometastases in breast cancer.

Oncology 8: 25

Pantel K., Schlimok G., Kutter D., Schaller G., Genz T., Wiebecke B., Backmann R., Funke I., Riethmüller G. (1991)

Frequent down-regulation of major histocompatibility class I antigen expression on individual micrometastatic carcinoma cells.

Cancer Res 51:4712-4715

Pantel K., Izbicki J.R., Angstwurm M., Braun S., Passlick B., Karg O., Thetter O., Riethmüller G. (1993a)

Immunocytological detection of bone marrow micrometastasis in operable non-small cell lung cancer.

Cancer Res 53:1027-1031

Pantel K., Schlimok G., Braun S., Kutter D., Schaller G., Funke I., Izbicki J., Riethmüller G. (1993b)

Differential expression of proliferation-associated molecules in individual micrometastatic carcinoma cells.

J Natl Cancer Inst 85:1419-1424

Pantel K., Dickmanns A., Zippelius A., Klein C., Hoechtlen-Vollmar W., Schlimok G., Weckermann D., Oberneder R., Shi J., Fanning E., Riethmüller G. (1995)
Establishment of carcinoma cell lines from bone marrow of patients with minimal residual cancer: A novel source of tumor cell vaccines.
J Natl Cancer Inst 87:1160-1168

Pantel K., Cote R., Forstad O. (1999)
Detection and clinical relevance of micrometastatic disease.
J Natl Cancer Inst 91: 1113-1124

Pinkel D, Se Graves R, Sudar D, Clark S, Poole I, Kowbel D, Collins C, Kuo WL, Chen C, Zhai Y, Dairkee SH, Ljung BM, Gray JW, Albertson DG (1998)
High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays.
Nat Genet 20:207–211

Piper J., Rutovitz D., Sudar D., Kallioniemi A., Kallioniemi O.P., Waldman F.M., Gray J.W., Pinkel D. (1995)
Computer image analysis of comparative genomic hybridization.
Cytometrie 19: 10-26

Pollack JR, Perou CM, Alizadeh AA, Eisen MB, Pergamenschikov A, Williams CF, Jeffrey SS, Botstein D, Brown PO (1999)
Genome-wide analysis of DNA copy-number changes using cDNA microarrays.
Nat Genet 23:41–46

Potter, H. & Geller, L.N. (1996)
Alzheimer's disease, Down's syndrome, and chromosome segregation.
Lancet 348: 66

Putz E., Witter K., Offner S., Stosiek P., Zippelius A., Johnson J., Zahn R., Riethmüller G., Pantel K. (1999)
Phenotypic characteristics of cell lines derived from disseminated cancer cells in bone marrow of patients with solid epithelial tumors: establishment of working models for human micrometastases.
Can Res 59: 241-248

Riesenberg R., Oberneder R., Kriegmair M., Epp M., Bitzer U., Hofstetter A., Braun S., Riethmüller G., Pantel K. (1993)
Immunocytochemical double staining of cytokeratin and prostate specific antigen in individual prostatic tumour cells.
Histochemistry 99: 61-66

Roylance R., Gorman P., Harris W., Liebmann R., Barnes D., Hanby A., Sheer D. (1999)
Comparative genomic hybridization of breast tumors stratified by histological grade reveals new insights into the biological progression of breast cancer.
Can Res 59: 1433-1436

Sangha, K.K., Stephenson, M.D., Brown, C.J. & Robinson, W.P. (1999) Extremely skewed X-chromosome inactivation is increased in women with recurrent spontaneous abortion. Am. J. Hum. Genet. 65: 913-917

Sarkar G., Kapelner S., Sommer S.S. (1990)

Formamide can dramatically improve the specificity of PCR.
Nucl Acids Res 18: 7465

Scheunemann P., Izbicki J.R., Kubuschok B. (1999)

Tumorigenic potential of apparently tumor-free lymphnodes.
N Engl J Med 340: 1687

Schütze K., Lahr G. (1998)

Identification of expressed genes by laser-mediated manipulation of single cells.
Nat Biotechnol 16: 737-742

Snijders A.M., Nowak N., Segraves R., Blackwood S., Brown N., Conroy J., Hamilton G., Hindle A.K., Huey B., Kimura K., Law S., Myambo K., Palmer J., Ylstra B., Yue J.P., Gray J.W., Jain A.N., Pinkel D., Albertson D.G. (2001)

Assembly of microarrays for genome-wide measurement of DNA copy number.
Nat Genet 29: 263- 264

Solakoglu O., Maierhofer C., Lahr G., Breit E., Scheunemann P., Heumos I., Pichelmeier U. Schlimok G., Oberneder R., Köllermann M.W., Köllermann J., Speicher M.R., Pantel K. (2002)

Heterogeneous proliferative potential of occult metastatic cells in bone marrow of patients with solid epithelial tumors.
PNAS 99, No. 4: 2246-2251

Solinas-Toldo S, Lampel S, Stilgenbauer S, Nickolenko J, Benner A, Dohner H, Cremer, T Lichter P (1997)

Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances.
Genes Chromosom Cancer 20:399–407

Stöcklein N.H., Erbersdobler A., Schmidt-Kittler O., Diebold J., Schardt J.A., Izbicki J.R., Klein C.A. (2002)

SCOMP is superior to degenerated oligonucleotide primed-polymerase chain reaction for global amplification of minute amounts of DNA from microdissected archival tissue samples.
Am J Pathol 161: 43-51

Thomas R., McConnell R., Whittacker J., Kirkpatrick P., Bradley J., Sandford R. (1999)

Identification of mutations in the repeated part of the autosomal dominant polycystic kidney disease type 1 gene, PKD1, by long-range PCR.
Am J Hum Genet 65: 39-49

van den Berg E., van der Hout A.H., Oosterhuis J.W., Störkel S., Dijkhuizen T., Dam A., Zweers H.M.M., Mensink H.J.A., Buys C.H.C.M., de Jong B. (1993)

Cytogenetic Analysis of Epithelial Renal-Cell Tumors: Relationship With a New Histopathological Classification.
Int J Cancer 55: 223-7

Voullaire L., Wilton L., Slater H., Williamson R. (1999)

Detection of aneuploidy in single cells using comparative genomic hybridization.
Prenat Diagn 19: 846-851

Wells D., Sherlock J.K., Handyside A.H., Delhanty J.D.A. (1999)

Detailed chromosomal and molecular genetic analysis of single cells by whole genome amplification and comparative genomic hybridization.
Nuc Acids Res 27: 1214-1218

Zigeuner R.E., Riesenberg R., Pohla H., Hofstetter A., Oberneder R. (2000)
Immunomagnetic cell enrichment detects more disseminated cancer cells than
immunocytochemistry in vitro.
J Urol 164: 1834-1837

Zhang W., Hu G., Deisseroth A. (1991)
Improvement of PCR sequencing by formamide.
Nucl Acids Res 19: 6649

Diplomarbeit Rainer Gangnus 1999 (LMU München)

Diplomarbeit Monika Grabowski 1999 (LMU München)

Doktorarbeit Sabine Langer 2002 (LMU München)

Doktorarbeit von Christiane Reindl 2002 (LMU München)

Doktorarbeit Christine Maierhofer 2003 (LMU München)

Heim S., Mitelman F.; Cancer Cytogenetics; Wiley-Liss, Inc.; 1995

ISCN 1995: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature, Mitelman F (ed.);
S. Karger, Basel, 1995

7. ANHANG

Verwendete Reagenzien

SSC (20×): Natriumchlorid/Sodiumcitrat

3 M Natriumchlorid

0,3 M Natriumcitrat

Ansatz für 1 Liter:

175,3 g NaCl

88,2 g Natriumcitrat

mit Aqua bidest ad 1 Liter auffüllen

Lösung auf pH 7 einstellen

daraus wird 1×, 2× und 4× SSC hergestellt

4× SSC/ 0,2% Tween 20

Ansatz für 1 Liter:

200 ml 20× SSC

798 ml Aqua bidest

2 ml Tween

Lösung auf pH 7 einstellen

PBS (10×): Phosphate Buffered Saline

137 mM Natriumchlorid

2,7 mM Kaliumchlorid

4,3 mM Na₂HPO₄ × 7 H₂O

1,4 mM KH₂PO₄

Ansatz für 1 Liter:

80 g NaCl

2 g KCl

14,5 g Na₂HPO₄ × 7 H₂O

2,4 g KH₂PO₄

mit Aqua bidest auf 1 Liter auffüllen

Lösung auf pH 7 einstellen

daraus wird 1× PBS hergestellt

TAE- Puffer (50×): Tris/ Acetat/ EDTA

40 mM Tris Acetat

2 mM EDTA

daraus wird 1× TAE hergestellt

8. PUBLIKATIONEN

Langer S., Jentsch I., Gangnus R., Yan H., Lengauer C., Speicher M.R. (2001)

Facilitating haplotype analysis by fully automated analysis of all chromosomes in human-mouse hybrid cell lines.

Cytogenet Cell Genet 93: 11- 15

Maierhofer C., Gangnus R., Diebold J., Speicher M.R.

Multicolor deconvolution microscopy of thick biological specimens.

Am J Pathol, eingereicht (im 2. Gutachterverfahren)

9. LEBENS LAUF

Rainer Gangnus

Diplom Biologe Univ.
geboren am 11.06.1971 in Bad Aibling
ledig

Schul Ausbildung

1977 - 1981	Grundschule in Vagen
1981 - 1982	Hauptschule Feldkirchen-Westerham
1982 - 1992	Gymnasium in Bad Aibling; Abschluss: Abitur

Wehr- / Ersatzdienst

07/ 92 - 09/ 93	Zivildienst an der Landesschule für Blinde in München
-----------------	---

Studium

1993 - 1996	Studium der Biologie an der TU München (5 Semester)
1995	Vordiplom an der TU München
1996 - 1999	Hauptstudium der Biologie an der LMU München
1998	Diplomprüfungen mit anschließender Diplomarbeit im Fach Humangenetik
1999	Abschluss des Studiums als Diplom Biologe Univ.
seit 1999	Doktorarbeit am Institut für Anthropologie und Humangenetik der LMU München und Institut für Humangenetik, TU München

10. DANKSAGUNG

Bei Herrn Prof. Thomas Cremer möchte ich mich für die Möglichkeit, an seinem Institut die Doktorarbeit anzufertigen, bedanken und außerdem für die Übernahme des Gutachtens.

Ganz herzlich danke ich Herrn PD Dr. Michael Speicher für seine zahlreichen Anregungen bei der Durchführung der Experimente, beim Schreiben der Doktorarbeit und für sein „offenes Ohr“ bei Problembewältigungen.

Herrn Dr. Rainer Riesenberg, Dr. Alexander Buchner, Prof. Wolfgang Zimmermann und Roswitha Fischer danke ich für die gute Zusammenarbeit bei der Herstellung der Zytospins und ihrer weiteren Verarbeitung. Ebenso hilfreich waren die zahlreichen Diskussionen über mögliche Strategien zur Etablierung eines Markierungs- und Hybridisierungsprotokolls für Zytospins.

Für die Bereitstellung der Knochenmarkspräparate von Nierentumorpatienten bedanke ich mich bei OA Dr. Ralph Oberneder und Prof. Alfons Hofstätter.

Für die Bereitstellung der Primärtumoren und der expandierten Knochenmarkszellen von Mammakarzinomen gilt mein Dank der „Hamburger Gruppe“ um Herrn Prof. Klaus Pantel, dabei insbesondere Frau Dr. Elisabeth Breit für die Ausarbeitung und Kultivierung der Zellen.

Vielen Dank an Herrn Dr. Stefan Thalhammer für seine gute Betreuung bei der Einarbeitung mit dem PALM- System.

Herrn Dr. Christoph Klein und Oleg Schmidt-Kittler danke ich für die Bereitstellung des Einzelzell CGH Protokolls.

Sabine Langer danke ich für die Unterstützung in der Optimierung der Einzelzell- CGH, Dr. Christine Fauth für ihre stetige Hilfe bei verschiedensten Fragen und Problemen, Christine Maierhofer für ihre Einführung in die Aufnahme von Z-Stapeln.

Für die praktische Hilfe in der Zellkultur möchte ich Corinna Keri und Gaby Lederer danken. (Auch für die Gummibärchen.)

Für die gute Zusammenarbeit und die schöne gemeinsame Zeit im Labor danke ich außerdem Dr. Jürgen Kraus, Isabell Jentsch, Nina Weiland, Doris Sollacher, Carmen Meyer und Melanie Odenigbo.

Nicht zu vergessen sind vor allem die Freunde und Mitarbeiter der ersten Jahre Dr. Sabine Uhrig, Andreas Bolzer, Julia Schleypen, Marion „Malu“ von Geldern, Steffi Harabacz und Burgis Cleve.