

Thomas R. Klett
Dr. sc. hum.

Quantitative Chromatincharakterisierung. DNA-Thermodenaturierungskinetiken fluorochromierter Zellen im Durchflusszytrophotometer

Geboren am 13. 01. 1060 in Neumünster / Holstein
Diplom Biologie am 30. 11. 1984 an der Justus-Liebig-Universität Gießen

Promotionsfach: Pathologie
Doktorvater: Prof. Dr. K. Goertler

Die Standardmethode zur Chromatinstrukturuntersuchung (Schmelzkurven bei 260nm) ist für zytometrische Anwendung und klinische Diagnostik ungeeignet: die nötige, aufwendige DNA- und Chromatinpräparation führt zur Zerstörung der Chromatinstruktur oberhalb der Nucleosom-Ebene und dazu, dass die Ergebnisse nur Mischwerte von Millionen von Zellen darstellen können; Unterschiede zwischen Teilpopulationen, die gerade für Tumorproben aus somatischen und verschiedenen Tumorzellen relevant sind, sind nicht eruierbar. Wird statt der UV-Absorption aber die Fluoreszenz DNA-spezifischer, quantitativer Fluorochrome in Abhängigkeit von der Temperatur gemessen, können flow-zytometrische Thermodenaturierungskinetiken mit minimalem präparatorischen Aufwand Chromatinstrukturuntersuchungen erlauben und u.U. Subpopulationen unterscheiden. Dazu wurden in vivo transplantierte EAT-, WALKER 256- und L1210-Tumorzellen als leukozytenhaltige Einzelzellsuspensionen in absolutem Ethanol fixiert, in 180mM Tris-Puffer suspendiert und mit den für die quantitative DNA-Analyse verwendeten Fluorochromen DAPI, HÖCHST 33258, Propidium Iodid (5 μ M), Chromomycin A3 (10 μ M) sowie mit den Farbstoffkombinationen DAPI-CA3, HÖCHST-CA3, und DAPI-PI gefärbt. Die Zellsuspensionen werden im Wasserbad in 10° Schritten erhitzt und, abwechselnd mit Kontrollmessungen der unerhitzten Probe, im ORTHO 30L Cytofluorograf gemessen. Zur Interpretation der dabei auftretenden Effekte wurde zunächst das Temperaturverhalten der DNA-Fluorochrome in Kunststoff und verschiedenen Lösungen mit und ohne DNA untersucht:

- 1) Die Fluoreszenz in Kunststoff dispergierter Fluorochrome geht proportional zur absoluten Temperatur zurück (Entropieeffekt)
- 2) Die Fluoreszenz der Farbstoffe in freier Lösung ist stark viskositätsabhängig; sie geht mit der Viskosität des Mediums stark zurück, vor allem für DAPI-Tris-Puffer (180mM) quencht die Fluoreszenz ungebundener Moleküle schon in der Kälte stark, die Fluoreszenz geht dann nur noch ohne spektrale Verschiebungen mit T^{-1} zurück. DAPI zeigt sich in Tris im Gegensatz zu Wasser thermisch stabil.
- 3) CA3 dagegen wird vor allem in freier Lösung thermisch zersetzt (zunehmender Fluoreszenzrückgang mit spektraler Verschiebung und Verflachung), mit gelöster DNA weniger, mit gefärbten Zellen erst bei 90°C: starke, in <1min reversible Reduktion der Quantenausbeute und irreversible thermische Dekomposition bei längerer Erhitzung.
- 4) Mit gelöster DNA zeigt die Fluoreszenz einen geringeren, konstanten Rückgang mit der Temperatur, der auch für DAPI keine Parallelität zur temperaturbedingten Viskositätsabnahme mehr erkennen lässt. Dem überlagert sich ein zusätzlicher, d.h. stärkerer Fluoreszenzrückgang parallel zur Abnahme der Transmission bei 263 nm (DNA-Denaturierung) für HÖCHST 33258, mit DAPI ist sie um 5 bis 10°C zu höheren Temperaturen hin verschoben, mit PI um über 20°C.
- 5) Ethanolfixierte, gefärbte Zellsuspensionen zeigen mit allen untersuchten Farbstoffen zunächst eine Zunahme der Fluoreszenz: Für DAPI und HÖCHST 33258 bis 60°C um weniger als 10%, danach langsam zunehmender Fluoreszenzrückgang bis 100°C für DAPI bzw. deutli-

chem Fluoreszenzrückgang um 80° für HÖCHST 33258. Für CA3 ergibt sich etwa eine Fluoreszenzverdopplung bis ca. 70°C. Die PI-Fluoreszenz steigt um etwa 50% und bleibt bis 100°C deutlich über dem Kontrollwert bei Raumtemperatur.

Die Viskositätsabhängigkeit der Fluoreszenz der untersuchten Farbstoffe in freier Lösung erklärt sich mit der Bedeutung der Stoßdeaktivierung (Stokes-Einstein) für die niedrige Quantenausbeute der freien Fluorochrome. Sie nimmt mit der temperaturabhängigen Abnahme der Viskosität des Mediums zu. Bindung an gelöste DNA führt zur teilweisen Abschirmung der Farbstoffe, die DNA bietet eine hohe Microviskosität, zugleich werden Bewegungsfreiheitsgrade der Farbstoffmoleküle eingeschränkt, die Quantenausbeute steigt drastisch an. Im Kernchromatin schließlich spielt Stoßdeaktivierung keine Rolle mehr; vielmehr kommt es zur Freisetzung von Kernproteinen (vor allem Histonen) und dadurch von zusätzlichen Bindungsstellen für DNA-Fluorochrome bei 50 bis 70°C. Das Ausmaß des dadurch bedingten Fluoreszenzanstiegs steigt mit der Größe der untersuchten Farbstoffmoleküle; die PI-Fluoreszenz steigt auch aufgrund hitzinduzierter Strangbrüche. Für gelöstes Chromatin kommt es zur Überlagerung mit dem beschriebenen konstanten temperaturabhängigem Fluoreszenzrückgang. Zunehmende Denaturierung der DNA und damit Freisetzung von Fluorochromen schließlich reduzieren die Fluoreszenz, der Fluoreszenz-Temperaturverlauf von HÖCHST 33258 – gefärbter DNA spiegelt ihre Standardschmelzkurve wieder. DAPI stabilisiert DNA und Chromatin in Lösung und in situ gegen thermische Denaturierung, PI sogar in noch größerem Ausmaß. Mit 2 Farbstoffen gefärbte Zellen zeigen bei stärkerem Anstieg der CA3-oder PI-Fluoreszenz einen leichten Rückgang der DAPI- und HÖCHST 33258-Eigenfluoreszenz und umgekehrt, aufgrund von Energietransfer(ET), der getrennt acquiriert und durch Abzug des überlappenden langwelligen Anteils der Donorfluoreszenz korrigiert wurde. Um ein verlässliches Maß für die Bindung des Donors (DAPI bzw. HÖCHST) unter ET-Bedingungen zu erhalten, wurde der energietransferbedingte Verlust der Donor-Fluoreszenz ermittelt und durch Addition des entsprechenden ET wieder kompensiert. Somit konnte gezeigt werden:

- 1) Der Temperaturverlauf der CA3-und PI-Fluoreszenz bleibt nach Doppelfärbung unverändert.
- 2) Die DAPI-oder HÖCHST-Bindung (blaue Fluoreszenz + ET) steigt bei Doppelfärbung auf weit höhere Werte und fällt erst bei höheren Temperaturen unter den Kontrollwert, vor allem mit CA3, das Chromatin auch für DAPI- und HÖCHST-Bindung (thermisch) stabilisiert.
- 3) Erhitzung der Zellen ohne Fluorochrome und Färbung bis zum Gleichgewicht bei der Endtemperatur zeigt wesentlich geringere Stabilisierungseffekte.

Pepsinierung und Zitronensäure/Tween-Behandlung zur Präparation von Kernsuspensionen aus soliden Proben führt zu stark veränderten Farbstoffbindungs-, aber zu ähnlichem Temperaturverhalten der Fluoreszenz, nur um 10°C zu niedrigen Temperaturen verschoben und ohne Fluoreszenzzunahme. Destabilisierung der Chromatinstruktur und weitgehende Entfernung von Kernproteinen durch die Präparation sind dafür verantwortlich. Der Anteil somatischer Zellen in allen untersuchten EAT, WALKER 256 und L1210-Ascitesproben wurde durch Pepsinierung um über 50% reduziert, Erhitzung führt zu weiterer Verflachung ihres Peaks im DNA-Histogramm.

Unterschiedliche Chromatinstruktur verschiedener Tumorzellen, G₁, G₂- und somatischer Zellen führt auch zu unterschiedlichen Fluoreszenz-Temperaturprofilen:

G₂-Zellen zeigen mit der Erhitzung geringere Fluoreszenzzunahmen mit CA3 und PI und stärkeren Rückgang bei niedrigen Temperaturen. (geringere Proteinstabilisierung des Chromatins)

Der DNA-Index (= Fluoreszenzverhältnis der G₁-Tumor ÷ somatischen Zellen) ist farbstoffabhängig und zeigt außerdem einen ausgeprägten Temperaturgang: für EAT- und L1210-Zellen mit CA3 und PI ist er um 0,1 niedriger als mit DAPI oder HÖCHST, steigt aber mit der Temperatur stark an, für CA3 um 0,2 bis 0,25. Mit DAPI und HÖCHST erhöht sich der DNA-Index deutlich, sobald der Hauptteil des Leukozytenchromatins um 90°C denaturiert. HÖCHST-CA3 und DAPI-PI-Doppelfärbung erhöhen die Differenz für die verbleibende blaue Fluoreszenz. Der zytometrisch standardmäßig bestimmte DNA-Index gibt also nicht unbedingt das Verhältnis der DNA-Mengen in pg, noch das AT÷CG-Verhältnis an, sondern hängt von der unterschiedlichen Zugänglichkeit der Bindungsstellen für die Fluorochrome, also der Chromatinstruktur ab. Die

untersuchten L1210-Tumorzellen lassen sich aufgrund ihrer CA3-Fluoreszenz nur nach Erhitzung als aneuploid erkennen. Bei geringen Unterschieden zwischen den untersuchten Zelllinien, EAT-Zellen zeigen etwas höhere Chromatinstabilität, zeigen alle dieselbe starke Erhöhung des gemessenen DNA-Index mit Erhitzung, und zwar mit allen verwendeten quantitativen DNA-Fluorochromen, was durch DAPI-PI und HÖCHST-CA3-Kombination durch Energietransfer messtechnisch noch verstärkt wird. Das stimmt mit der in anderen Arbeiten vermuteten höheren Sensitivität kondensierten Chromatins ruhender Zellen verglichen mit proliferierenden (Tumor)zellen überein und lässt Fluoreszenz-Thermodenaturierungskinetiken auch zur zytometrischen Differenzierung diploider Tumor- von somatischen Zellen aussichtsreich erscheinen.