

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät

der

Ruprecht - Karls - Universität Heidelberg

vorgelegt von

Diplom-Biologe Patrick Müller

aus Böhl-Iggelheim

Tag der mündlichen Prüfung:

**Molekularbiologische Analyse von Her2/neu-Nanostrukturen
in unterschiedlichen Brustkrebszelllinien auf Gen- und Proteinebene
basierend auf hochaufgelösten fluoreszenzmikroskopischen Darstellungen**

**Gutachter: Prof. Dr. Dr. Christoph Cremer
Prof. Dr. Michael Hausmann**

**Diese Arbeit widme ich meinen verstorbenen Eltern,
meiner Frau und meiner ganzen Familie.**

Erklärungen gemäß § 8 (3) b) und c) der Promotionsordnung:

a) ich erkläre hiermit, dass ich die vorgelegte Dissertation selbst verfasst und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

b) ich erkläre hiermit, dass ich an keiner anderen Stelle ein Prüfungsverfahren beantragt bzw. die Dissertation in dieser oder anderer Form bereits anderweitig als Prüfungsarbeit verwendet oder einer anderen Fakultät als Dissertation vorgelegt habe.

Ort und Datum

Unterschrift des Doktoranden

Inhaltsverzeichnis:

I) Kurzfassung	4
II) Abstract	5
III) Einleitung	6
IV) Abbildungsverzeichnis:	8
V) Tabellenverzeichnis:	10
1. Grundlagen:	11
A) Biologische Grundlagen:	11
1.1 Krebs und Krebsentstehung	11
1.2 Epidemiologie des Brustkrebses	13
1.3 Ätiologie des Brustkrebses	13
1.3.1 Genetisches Risiko	14
1.3.2 Hormonelle Risikofaktoren	15
1.3.3 Exogene Risikofaktoren	15
1.4 Humaner epidermaler Wachstumsrezeptor 2 (Her2/neu)	15
1.5 GRB7 Adaptor Protein	18
1.6 Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung (FISH)	19
1.6.1 Prinzip der Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung	19
1.7 Kombinatorische Oligonukleotid FISH (COMBO-FISH)	20
1.7.1 Konfiguration der Sondensets	21
1.7.2 Vergleich von COMBO-FISH-Sonden mit BAC-Sonden	21
1.7.3 Bindung von PNA-COMBO-FISH-Sonden an DNA und RNA	22
1.8 Peptid-Nukleinsäure (PNA)	23
1.9 PNA-Synthese	25
VI) Zielsetzung PNA COMBO-FISH	28
B) Physikalische Grundlagen:	30
1.10 Mikroskopische Auflösung	30
1.11 Fluoreszenz	31
1.11.1 Geschichtliche Entwicklung der Fluoreszenz	31
1.11.2 Prinzip der Fluoreszenz	32
1.11.3 Anregung.....	32
1.11.4 Anregungs-Lebensdauer	32
1.11.5 Fluoreszenz-Emission.....	33
1.12 Fluorophore	35
1.12.1 Exogene Fluorophore.....	36
1.12.2 Endogene Fluorophore.....	37
1.12.3 Hintergrund zum Blinkverhalten von Fluoreszenzfarbstoffen.....	38
1.13 Fluoreszenzmikroskopie	39
1.13.1 Weitfeld-Mikroskopie	39
1.13.2 Epifluoreszenz	39
1.14 Hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie	40
1.14.1 Konfokale Mikroskopie	40
1.14.2 Strukturierte Beleuchtung	42
1.14.3 Lokalisations-Mikroskopie.....	43
VII) Zielsetzung Lokalisationsmikroskopie	46

2. Material und Methoden	47
2.1 Material	47
2.2 Verwendete Zelllinien	47
2.3 Zellkultur von adhärenenten Zellen	49
2.3.1 Auftauen von Zellen	50
2.3.2 Einfrieren von Zellen	51
2.3.3 Austausch des Zellkulturmediums.....	52
2.3.4 Passagieren von Zellen	53
2.3.5 Zellzahlbestimmung und Vitalitätstest (Neubauer-Zählkammer).....	56
2.3.6 Aussäen von Zellen	57
2.4 Molekularbiologische Arbeiten mit Zellen	59
2.4.1 Vorbehandlung von Objektträgern und Deckgläsern	59
2.4.2 Fixierung von Zellen auf Objektträgern oder Deckgläsern	60
2.5 Molekularbiologische Arbeiten mit Blutlymphozyten	61
2.5.1 Isolierung von peripheren Blutlymphozyten (Ficoll™ Gradienten)	61
2.5.2 Kultivierung und Fixierung von peripheren Blutlymphozyten.....	62
2.5.3 Metaphasen-Präparation	64
2.5.4 Präparation von Metaphase-Spreitungen durch Auftropfen.....	65
2.5.5 Präparation von Metaphase-Spreitungen mittels Zytospin	66
2.6 Molekularbiologische Methoden	66
2.6.1 Diffusion	66
2.6.2 MATra	67
2.6.3 Mikroinjektion	69
2.6.4 FISH und COMBO-FISH	72
2.6.5 Immunfärbung.....	76
2.6.6 Organelle/Cellular Lights™	78
2.6.7 Durchflusszytometrie (FACS).....	80
2.7 Verwendete Sondensets	81
2.7.1 Repetitive Zentromer 9 PNA-Sonde	81
2.7.2 Genspezifisches PNA-Sondenset für <i>Her2/neu</i>	82
2.7.3 Genspezifische PNA-Sondensets für <i>Her2/neu</i> und <i>GRB7</i>	82
2.7.4 Genspezifisches TINA-modifiziertes-Sondenset für <i>bcr</i>	84
2.7.5 Genspezifisches TINA-modifiziertes-Sondenset für <i>Her2/neu</i>	86
2.8 Verwendete Hybridisierungspuffer	87
2.9 Verwendete Antikörper	88
2.10 Verwendete Mikroskopiesysteme	89
2.10.1 Konfokale Spinning Disk Mikroskopie	89
2.10.2 Räumlich strukturierte Beleuchtung (SMI).....	90
2.10.3 Lokalisationsmikroskopie.....	91
3. Ergebnisse.....	93
3.1 COMBO-FISH mit repetitiver Zentromer 9 PNA-Sonde.....	93
3.2 Spezifitätsnachweis der repetitiven Zentromer 9 PNA-Sonde	95
3.3 Diffusionsexperiment mit repetitiver Zentromer 9 PNA-Sonde.....	96
3.4 MATra mit repetitiver Zentromer 9 PNA-Sonde.....	97
3.5 Mikroinjektion von Antikörpern und repetitiver Zentromer 9 PNA-Sonde..	98
3.6 COMBO-FISH mit genspezifischem PNA-Sondeset für <i>Her2/neu</i>.....	100
3.7 COMBO-FISH mit genspezifischen PNA-Sondesets für <i>Her2/neu</i> und <i>GRB7</i>	104
3.8 COMBO-FISH mit TINA-modifizierten PNA-Sondeset für <i>bcr</i>.....	106
3.9 COMBO-FISH mit TINA-modifizierten PNA-Sondeset für <i>Her2/neu</i>.....	107
3.10 Analyse der Plasmamembran von Cal-51-Zellen mittels	109
Lokalisationsmikroskopie	109
3.11 m164-Protein-Verteilung nach Virusinfektion (mCMV).....	110
3.12 Histon H2B-Verteilung in stabil transfizierten HeLa-Zellen	115

3.13 Unmarkierte intrazelluläre Strukturen	119
3.14 Bleichverhalten Alexa-markierter Antikörper in verschiedenen Einbettmedien	123
3.15 Analyse von Her2/neu-Membranproteincluster in Brustkrebs-Zellen.....	125
3.16 Cluster-Analysen von Her3-Rezeptoren	135
3.17 Zweifarben-Markierungen von Her-Rezeptoren	138
3.18 Mehrfach-Epitop-Markierung von Her2/neu-Rezeptoren	140
3.19 Lokalisationsmikroskopie in Verbindung mit COMBO-FISH	142
4. Diskussion und Ausblick.....	145
VIII) Literaturverzeichnis.....	165
IX) Abkürzungsverzeichnis	180
X) Anhang.....	184
XI) Liste der bereits publizierten Ergebnisse.....	191
Danksagung.....	198

I) Kurzfassung

Untersuchungen zur Her2/neu-Amplifikation und -Expression, die im Zusammenhang mit der Entstehung von Brustkrebs und seiner Diagnostik stehen, sind für eine zusätzliche Verfeinerung der Diagnoseparameter und damit einer Verbesserung der Therapieansätze von enormer Bedeutung. In dieser Arbeit wurden durch hochauflösende lichtmikroskopische Verfahren grundlegende Untersuchungen zu Her2/neu sowohl auf Gen-, als auch auf Proteinebene durchgeführt, um neue und unterstützende Ansätze für einen besseren Therapieerfolg bei Brustkrebspatienten zu erhalten. Eine genaue Auszählung der *Her2/neu*-Genkopien mit herkömmlichen Markierungsmethoden (z.B. Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung) ist momentan durch die Sondengrößen und die konventionelle mikroskopische Auflösung nur unzureichend möglich. Die molekularbiologische Methode der kombinatorischen Oligonukleotid-Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung in Verbindung mit sensitiver hochauflösender Lichtmikroskopie bietet aufgrund der kleinen Sonden und der verbesserten Auflösung einen neuen Ansatzpunkt der eine eindeutigere Zuordnung der einzelnen *Her2/neu*-Genkopien ermöglicht und somit eine genauere Auszählung der Fluoreszenzsignale zulässt. Erstmals werden für diese Untersuchungen Peptid-Nukleinsäure (PNA)-Oligosonden eingesetzt, da diese große Vorteile in der Lebendzellmarkierung zeigen (z.B. Nukleasen-, Peptidasen- und Proteasenresistenz, höhere chemische Stabilität als DNA / RNA, Anlagerung an den nativen DNA-Strang, etc.). Die Modifikation dieser kleinen Fluoreszenzsonden mit Twisted Intercalating Nucleic Acids (TINA) verbessern die Anlagerung der PNAs an den nativen DNA-Strang. Diese schonende Hybridisierung ermöglicht Abläufe innerhalb der Genomorganisation ohne destruktive Strukturveränderung zu beobachten. Das in der Arbeit etablierte und optimierte COMBO-FISH-Protokoll für fluoreszenzmarkierte PNA-Oligosequenzen führte zu erfolgreichen Hybridisierungen mit repetitiven Zentromer- und genspezifischen Sonden. Die TINA-modifizierten-PNA-Sonden zeigten bei der Lebendzellmarkierung ebenfalls gute Hybridisierungs-Effizienzen. Weiterhin konnte man an Brustkrebszellen mit unauffälligem Genotyp die Spezifität des *Her2/neu*-Sondensets bestätigen. Abschließend konnte gezeigt werden, dass durch die Kombination hochauflösender Lokalisationsmikroskopie mit COMBO-FISH-Sonden eine effektive optische Auflösung in biologischen Präparaten bis zu einigen wenigen Nanometern erreicht werden kann, um Untersuchung von struktur-abhängigen Genomfunktionen oder Fehlfunktionen durchführen zu können. Die Etablierung der Lokalisationsmikroskopie führte zu vielen biologischen Grundlagenexperimenten. Es wurden Präparate mit fluoreszenten Proteinen, organischen Farbstoffen und Alexa konjugierten Antikörpern untersucht. Diese Untersuchungen führten zu einer optimalen Auswahl an Farbstoffmolekülen für weiterführende Experimente. Zusätzlich wurden unterschiedliche Markierungsmethoden verwendet und Experimente mit unterschiedlichen Einbettmedien realisiert, die Aufschluss über das Blinkverhalten der Fluoreszenzfarbstoffe in der jeweiligen Umgebung gaben. Die durchgeführten Untersuchungen der Her2/neu-Rezeptorcluster und ihrer Nanostruktur auf der Zelloberfläche mittels Lokalisationsmikroskopie ermöglichen eine neue Korrelation zwischen Genkopienzahl, Überexpression und molekularer Rezeptorstrukturen. Anhand von Her2/neu Cluster-Analysen konnten klare Expressionsmuster für unterschiedliche Brustkrebszelllinien erarbeitet werden. Diese Expressionsanalysen lassen eine klare Diskriminierung zwischen gesunden und kranken Zellen sowie zwischen Brustkrebszelllinien untereinander zu. Diese verfeinerten Erkenntnisse könnten zu einer verbesserten Diagnostik beitragen, die es beispielsweise erlaubt, eine verbesserte Prognose zum Therapieerfolg zu geben. Weiterhin wurde Her2/neu-Her3-Heterodimere untersucht, die über Neuregulin-1 als Ligand induziert wurden. Die Dimerisierungen setzen mehrere wichtige Signaltransduktionswege des Zellwachstums und der Zelldifferenzierung in Gang. Die dadurch resultierende Deregulation der Zelle kann folglich zu einer starken Zellproliferation führen und somit zur Tumorgenese beitragen. Ein Versuchsansatz mit einer Vielzahl von Antikörpern gegen den selben Rezeptor könnte die Fluoreszenzsaubere bei den Lokalisationsmessungen um ein vielfaches verbessern und kann zukünftig genutzt werden, um noch feinere Expressionsmusteranalysen durchführen zu können.

II) Abstract

Studies of Her2/neu amplification which are associated with the development of breast cancer and its diagnosis are of great importance for a further refinement of the diagnostic parameters and can thereby improve therapeutic approaches. In this work fundamental studies based on high-resolution light microscopy both on gene as well as on protein level of Her2/neu were performed, to obtain new and supportive approaches for an improved therapeutic success in breast cancer patients. Due to the probe size and the microscopic resolution an accurate count of the *Her2/neu* gene copies using conventional labelling methods (FISH = fluorescence in situ hybridization) is not sufficiently feasible. COMBO-FISH (combinatorial oligonucleotide FISH) in combination with sensitive high-resolution light microscopy, allows a clear identification of each *Her2/neu* gene copy and thus a more accurate count of the fluorescence signals. This is due to the small probe size and the improved resolution. In this investigations peptide nucleic acids (PNA) were used as they have great advantages in labeling of live cells (e.g. nuclease- and protease resistance, higher chemical stability than DNA / RNA, binding to the native DNA strand). The modification of these small fluorescent probes with Twisted Intercalating Nucleic Acids (TINA) further improves the binding of PNAs to the native DNA strand. This gentle hybridisation allows to observe processes within the genome organisation without introducing destructive structural changes. The in this work established and optimised COMBO-FISH protocol for fluorescence labeled PNA oligo sequences led to successful hybridisations with repetitive centromere and gene specific probes. The TINA modified PNA probes showed also improved hybridisation and labeling efficiencies in live cell experiments. Furthermore, the specificity of the new synthesised Her2/neu probeset was confirmed. This was done by using breast cancer cells with an normal genotype. Finally, it was shown that the combination of high-resolution localisation microscopy with COMBO-FISH probes allowed an optical resolution in biological specimen down to a few nanometers. This result facilitates investigations of structure dependent genome functions or dysfunction. The new development of the localisation microscopy led to various fundamental biological experiments. Therefore specimen with fluorescent proteins, organic dyes and Alexa conjugated antibodies were examined. This first verifications allowed choosing the optimal dye molecules for further experiments. In addition, different labeling methods were used and experiments with different embedding medias were realised, revealing the blinking behaviour of the fluorescent dyes within the respective environments. The further investigations of Her2/neu receptor cluster and their nanostructure on the cell surface using localisation microscopy facilitates a new correlation between gene copy number, overexpression and molecular receptor structures. Based on this Her2/neu cluster analysis, a distinctive characterisation of the expression patterns of different breast cancer cell lines was gained. These expression studies permit a clear discrimination between healthy and diseased cells as well as between different breast cancer cell lines. This refined results could improve diagnosis and may lead to a better prognosis for therapeutic success. Furthermore ligand (neuregulin-1) induced Her2/neu-Her3 heterodimeres were examined. The dimerisations activate several important transduction pathways of cell growth and cell differentiation. This deregulation of the cells and the resulting strong cell proliferation can lead to tumorigenesis. Using a variety of antibodies against the same receptor could enhance the fluorescence yield in the localisation measurements. This enhancement can be used in future to analyse the protein expression patterns even preciser.

III) Einleitung

Versuche mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung wurden vor ca. 30 Jahren erstmals durchgeführt und markierten eine neue Ära in den Lebenswissenschaften. Durch die schnelle Entwicklung der Methode, die auf die Hybridisierung einer fluoreszenzmarkierten Nukleinsäure-Sonde an die komplementäre Ziel-DNA im Zellkern oder auf Metaphasechromosomen beruht, wurde sie zu einer Routinetechnik in der heutigen Forschung. Die ausgeprägten Variationsmöglichkeiten der Sonden und ihr breites Spektrum an kommerziell erhältlichen Kits machte sie hauptsächlich in den Bereichen der allgemeinen klinischen und biologischen Forschung, sowie speziell in der Pränatal- und Karzinomdiagnostik von besonderer Bedeutung.

Die hier vorliegende Promotionsarbeit beschäftigt sich zum einen mit der Etablierung der Methode der Peptid-Nukleinsäure kombinatorische Oligonukleotid Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (= PNA-COMBO-FISH). Dabei sollen neben unterschiedlichen molekularbiologischen Markierungsmethoden auch PNA-Sonden ausgetestet werden, die eine Lebendzellmarkierung von Zellen ermöglicht.

Aufbauend auf ersten Grundlagenexperimenten mit einer repetitiven PNA-Sonde für das Zentromer von Chromosom 9 sollten die bei Brustkrebs relevanten Onkogene *Her2/neu* und *GRB7* untersucht werden, da diese bei einer Krebserkrankung meist vervielfacht (amplifiziert) vorliegen und somit zu einem schlechteren Krankheitsverlauf beitragen. In der medizinischen Diagnostik stützen sich die Therapiemaßnahmen zum Teil auf diese Untersuchungen mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung.

Nicht nur die Weiterentwicklung der FISH in ihrer Sensitivität und Spezifität sind von enormer Bedeutung, sondern auch die Optimierung der Mikroskopie. Die Fortschritte der letzten Jahre in der Fluoreszenz-Mikroskopie und in der digitalen Bildverarbeitung führten zusätzlich zu einem besseren Verständnis von zellulären Strukturen und Vorgänge. Diese Nanostrukturanalysen von Chromatin oder Proteinen auf Einzelzellniveau können mittels der in den letzten Jahren entwickelten Lokalisationsmikroskopie durchgeführt werden. Die Lokalisationsmikroskopie ist eine neue lichtoptische Möglichkeit die Beugungsgrenze zu umgehen und ermöglicht somit eine Nanometergenaue Auflösung von Zellulären Strukturen. Die hier angewendete Lokalisationsmikroskopie nutzt konventionelle Fluorophore. Sie erreicht die optische Isolation der Fluoreszenzsignale durch photophysikalische Veränderungen, die auf reversiblen Photobleichen dieser Farbstoffe beruht.

Es sollten daher erste Grundlagenexperimente zur Lokalisationsmikroskopie mit konventionellen Fluorophoren durchgeführt werden, um weitere biologische Präparationen erfolgreich gestalten zu können. Aufbauend auf diesen Erkenntnissen konnte eine erste Anwendung dieser Mikroskopie auf eine biologische Fragestellung hinsichtlich des Expressionsmusters der Her2/neu-Rezeptoren bei unterschiedlichen Brustkrebszelllinien gezeigt werden. Die Erforschung der Biologie von Her2/neu auf Gen- und Proteinebene ist besonders von klinischem Interesse, um prognostische und prädiktive Informationen zu erhalten und somit eine optimale Behandlung des Patienten zu gewährleisten.

Weitere Untersuchungen sollten an dem verwandten Her3-Rezeptor vorgenommen werden, der wie Her2/neu auch eine wichtige Rolle bei der Signalweiterleitung von Brustkrebszellen spielt. Neben diesen 2D-Darstellungen sollten auch 3D-Darstellungen erarbeitet werden, die in weiterführenden biologischen Fragestellungen von enormer Bedeutung sein können. Auch sollte geprüft werden, ob die COMBO-FISH-Methode mit der Lokalisationsmikroskopie zu verbesserten und eindeutigen Ergebnissen führt.

IV) Abbildungsverzeichnis:

Abbildung 1: Mutationen, die Protoonkogene zu Onkogenen machen.....	12
Abbildung 2: Prozentualer Anteil ausgewählter Tumorlokalisationen.....	13
Abbildung 3: Signalwege der EGFR-Familie und von Her2-Her3-Dimeren.....	16
Abbildung 4: Dimerisierungsprozess von Tyrosinkinase-Rezeptoren	17
Abbildung 5: Grundprinzip der Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung.....	20
Abbildung 6: Vergleich BAC-Sonde mit PNA-COMBO-FISH-Sonde.....	22
Abbildung 7: Strukturaufbau der PNA im Vergleich zu Proteinen und DNA.....	23
Abbildung 8: Tripelhelix-bildende Oligonukleotide	24
Abbildung 9: PNA-Synthesezyklus	27
Abbildung 10: Jablonski- und Franck-Condon-Diagramm	33
Abbildung 11: Reversibles und irreversibles Photobleichen	38
Abbildung 12: Mikroskopischer Aufbau des Vertico-SMI.....	45
Abbildung 13: Giemsa-Färbungen von AG11132, Cal-51 und SKBr3	48
Abbildung 14: Neubauer Zählkammer und vergrößertes Zählfeld	57
Abbildung 15: Prinzip der Magnet Assisted Transfection (MATra).....	68
Abbildung 16: Bedieneroberfläche der Mikroinjektionsanlage.....	70
Abbildung 17: Prinzip von Organelle/Cellular Lights TM	78
Abbildung 18: Twisted Intercalating Nucleic Acid (TINA).....	84
Abbildung 19: COMBO-FISH mit Zentromer 9 PNA-Sonden.....	94
Abbildung 20: COMBO-FISH und Standard-FISH	95
Abbildung 21: Diffusionsexperiment mit Zentromer 9 PNA-Sonde	97
Abbildung 22: MATra mit Zentromer 9 PNA-Sonde.....	98
Abbildung 23: Mikroinjektion von Antikörpern & Zentromer 9 PNA-Sonde.....	99
Abbildung 24: COMBO-FISH mit <i>Her2/neu</i> PNA-Sondeset.....	103
Abbildung 25: 3D-COMBO-FISH mit <i>Her2/neu</i> PNA-Sondeset	104
Abbildung 26: COMBO-FISH mit <i>Her2/neu</i> - und <i>GRB7</i> PNA-Sondesets	105
Abbildung 27: COMBO-FISH mit unspezifischer Anlagerung.....	106
Abbildung 28: COMBO-FISH mit TINA-PNA-Sondeset für <i>bcr</i>	107
Abbildung 29: COMBO-FISH mit dem TINA-PNA-Sondeset für <i>Her2/neu</i>	108
Abbildung 30: Lokalisationsbild der Plasmamembran einer Cal-51-Zelle.....	110
Abbildung 31: m164-Protein-Verteilung nach Virusinfektion (mCMV).....	111
Abbildung 32: Verteilung der Distanzen zum nächsten Nachbarn (m164)	112
Abbildung 33: Anzahl von m164 in einem Radius von 250 nm	113
Abbildung 34: Anzahl von m164 in einem Radius von 60 nm	114
Abbildung 35: Histon H2B-Verteilung bei HeLa-Zellen	116
Abbildung 36: Histogramme zu den Histon H2B-Verteilungen	117
Abbildung 37: Vergleich von Histon H2B-Verteilungen auf Metaphasen	118

IV) Abbildungsverzeichnis

Abbildung 38: Unmarkierte SKBr3-Zelle angeregt mit 488 und 568 nm	120
Abbildung 39: Histogramme der SPDM-Messungen für 488 und 568 nm.....	121
Abbildung 40: Strukturelle Charakterisierung unmarkierter SKBr3-Zellen	122
Abbildung 41: Immunfärbungen und Eigenfluoreszenz der Zelle	123
Abbildung 42: Analyse verschiedener Einbettmedien.....	124
Abbildung 43: FACS-Analyse für Her2/neu.....	126
Abbildung 44: Her2/neu Cluster auf der Membran einer SKBr3-Zelle	128
Abbildung 45: Histogramm der Her2/neu-Clustergrößen.....	130
Abbildung 46: Vergleich auf Einzel-Molekül-Ebene	132
Abbildung 47: Zweifarben-3D-Rekonstruktion von Her2/neu und Her3.....	133
Abbildung 48: Her2/neu-P in unstimulierten/stimulierten Zustand	135
Abbildung 49: Vergleich von Her3-Rezeptoren (AG11132, SKBr3, Cal-51).....	136
Abbildung 50: Vergleich von un- und stimulierten Her3-Rezeptoren	137
Abbildung 51: Extra- und intrazelluläre Her2/neu-Markierung	138
Abbildung 52: Markierung von Her2/neu- und Her3-Rezeptoren	139
Abbildung 53: Unterschiedliche Epitop-Markierungen von Her2/neu	141
Abbildung 54: Vergleich mehrerer unterschiedlicher Epitop-Markierungen mit EXR	142
Abbildung 55: Lokalisationsbild von Zentromer 9 PNA-Sonde.....	143
Abbildung 56: Histogramme über die Lokalisationsgenauigkeit	144

V) Tabellenverzeichnis:

Tabelle 1: Verschiedene Testverfahren zur Bestimmung des Her2/neu-Status	18
Tabelle 2: Schmelztemperaturen verschiedener Hybride.....	24
Tabelle 3: verwendete Zelllinien mit Herkunft und Zytogenetik	47
Tabelle 4: verwendete Zelllinien	49
Tabelle 5: Repetitive Zentromer 9 PNA-Sonde	81
Tabelle 6: Fluorophore der unterschiedlichen Zentromer 9 PNA-Sonden.....	81
Tabelle 7: Genspezifisches PNA-Sondenset für <i>Her2/neu</i>	82
Tabelle 8: Genspezifische PNA-Sondensets für <i>Her2/neu</i> und <i>GRB7</i>	83
Tabelle 9: Genspezifisches TINA-modifiziertes-Sondenset für <i>bcr</i>	85
Tabelle 10: Genspezifisches TINA-modifiziertes-Sondenset für <i>Her2/neu</i>	86
Tabelle 11: Verwendete Hybridisierungspuffer	87
Tabelle 12: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper	88
Tabelle 13: PNA-COMBO-FISH Protokollentwicklung.....	102
Tabelle 14: Ergebnisse der FACS-Analyse für Her2/neu	126

1. Grundlagen:

A) Biologische Grundlagen:

1.1 Krebs und Krebsentstehung

Krebs umfasst eine große Gruppe von Erkrankungen mit unterschiedlichsten Formen und Ausprägungen, die oftmals einen schwerwiegenden Verlauf aufweisen. Alle Krebserkrankungen verbindet eine unkontrollierte Teilung von Zellen eines Gewebes oder Organs, welche letztendlich zu der Entwicklung eines Geschwulstes (Tumors) oder der Entartung von Gewebe führt. Eine Einteilung von Tumoren findet nach biologischem Verhalten und Entwicklungsstufen statt. So kommt es zur Unterscheidung von gutartigen (benignen) Tumoren bestehend aus langsam wachsenden, weitgehend differenzierten Zellen und bösartigen (malignen) Tumoren, welche ein schnelles, invasives Wachstum zeigen und zur Bildung von Tochtergeschwülsten (Metastasen) neigen. In der Medizin spricht man meist von Krebs, wenn ein bösartiger Tumor diagnostiziert wurde.

Die ca. 40 Billionen Zellen des menschlichen Körpers stehen normalerweise unter strikter Wachstums-, Teilungs- und Überlebens-Kontrolle. Jede Zelle besitzt somit eine genaue Aufgabe und eine festgelegte Entwicklung. Kommt es zur Störung oder Aufhebung dieser Kontrollmechanismen kann eine normale kontrollierte Zelle sich in eine unkontrollierte Krebszelle entwickeln, welches als Transformation bezeichnet wird. Dieser Transformationsprozess vollzieht sich in mehreren Schritten. Der Beginn eines Tumors startet praktisch mit der Schädigung bzw. Veränderung des Erbmateri- als (DNA) einer einzelnen Körperzelle. Man spricht hier von einer Tumorentstehung. Es kommt zum Stabilitätsverlust der DNA, was eine Veränderung oder Mutation zur Folge hat. Dieser nicht wieder zu reparierende genetische Defekt wird fast immer durch ein Zusammenwirken aus vielen inneren (z.B. Fehler bei der Zellteilung, Keimbahnmutation) und äußeren Faktoren (Karzinogene: chemische Substanzen, Strahlen oder Viren) ausgelöst und führt zu einem Versagen der Steuerung vom Wachstum, Teilung oder Überlebenszeit einer Zelle. Defekte von Proto-Onkogenen, die das Zellwachstum fördern, oder der Verlust von Anti-Onkogenen (Tumor-Suppressor-Genen), die das Zellwachstum unterdrücken, sind die entscheidenden Gründe für einen Transformationsprozess (siehe Abbildung 1). Weiterhin spielen Veränderungen von Reperaturgenen, die genetische Defekte erkennen und eliminieren, eine entscheidende Rolle bei der Transformation. Wird eine Zelle durch einen oben aufgeführten Grund,

geschädigt kommt es zu einer unkontrollierten Vermehrung, die durch Promotoren stark beschleunigt werden kann (Tumorpromotion). Die Tumorprogression führt schließlich zu einem makroskopisch sichtbaren Tumor, der in das umliegende Gewebe wächst und es zerstört. Ein Ablösen von Krebszellen aus dem Zellverband des Tumors führt zu so genannten Metastasen, die sowohl über das Blut, als auch über die Lymphbahnen in andere Körperregionen gelangen können. Solide Tumore siedeln sich unabhängig vom Ursprungsort des Tumors, auch in anderen Körperteilen an.

Um eine solche Krebsentstehung zu vermeiden besitzt unser Körper zahlreiche Kontrollsysteme, die diese entarteten Zellen, deren genetischer Schaden nicht repariert werden konnte, schnellstmöglich erkennen und sie zum Absterben bringen. Man spricht hier vom programmierten Zelltod oder Apoptose. Die Apoptose verhindert somit eine Weitergabe des genetischen Schadens bei den folgenden Zellteilungen. Wie bereits oben erwähnt kann jedoch auch bei diesem System ein genetischer Schaden vorliegen und dies als Schutz gegen eine Krebserkrankung ausschalten. Ein Grund für die erhöhte Erkrankungszahl mit zunehmendem Alter liegt in der Abnahme dieses Erkennungs- und Schutzmechanismus.

Die hier vorliegende Doktorarbeit beschäftigt sich mit Untersuchungen zur Her2/neu Überexpression auf DNA- und Proteinebene, die insbesondere im Zusammenhang mit der Entstehung von Brustkrebs und seiner Diagnostik von Bedeutung sind. Daher erfolgt in den nächsten Abschnitten ein näherer Einblick über Brustkrebs mit den diagnostisch relevanten Genen *Her2/neu* und *GRB7*, sowie Erläuterungen zur Signaltransduktion und Proteinexpression der Her-Familie.

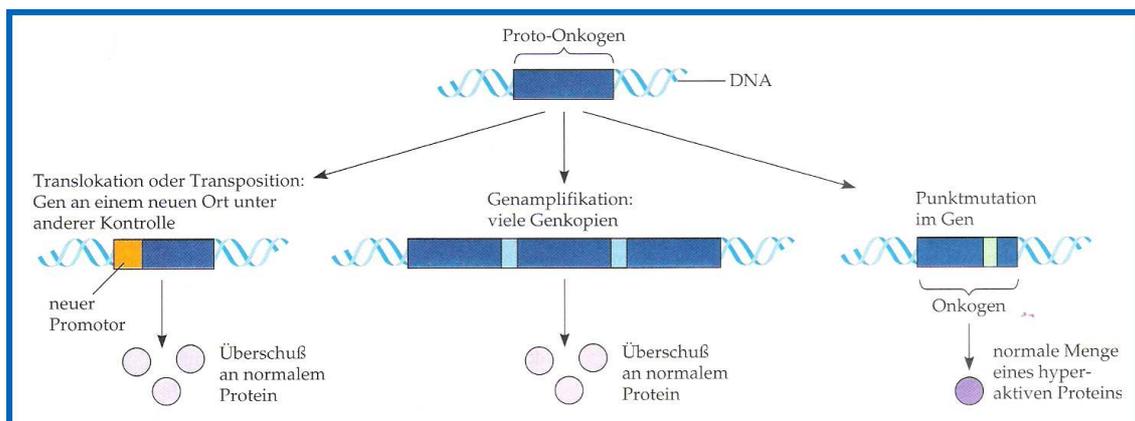


Abbildung 1: Mutationen, die Protoonkogene zu Onkogenen machen

(Quelle Bild und Text: [Campbell 1997])

1.2 Epidemiologie des Brustkrebses

Die häufigste Krebsneuerkrankung unter den bösartigen Tumoren bei Frauen ist der Brustkrebs (med. Mammakarzinom, engl. mamma carcinoma). Jährlich erkranken in Deutschland über 57000 Frauen an Brustkrebs. Die Erkrankung der Brustdrüse ist für 27,8 % aller Krebserkrankungen bei Frauen und für deutlich mehr als ein Drittel aller Krebsneuerkrankungen bei Frauen unter 60 Jahre verantwortlich (siehe Abbildung 2). Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 63 Jahren und damit sechs Jahre unter dem mittleren Erkrankungsalter aller Krebserkrankungen. Brustkrebs bei Männern dagegen ist eine recht seltene Erkrankung. In Deutschland steigt seit den 80er Jahren die Brustkrebsinzidenz stetig an, während die Mortalität seit Mitte der 90er Jahren leicht sinkt.

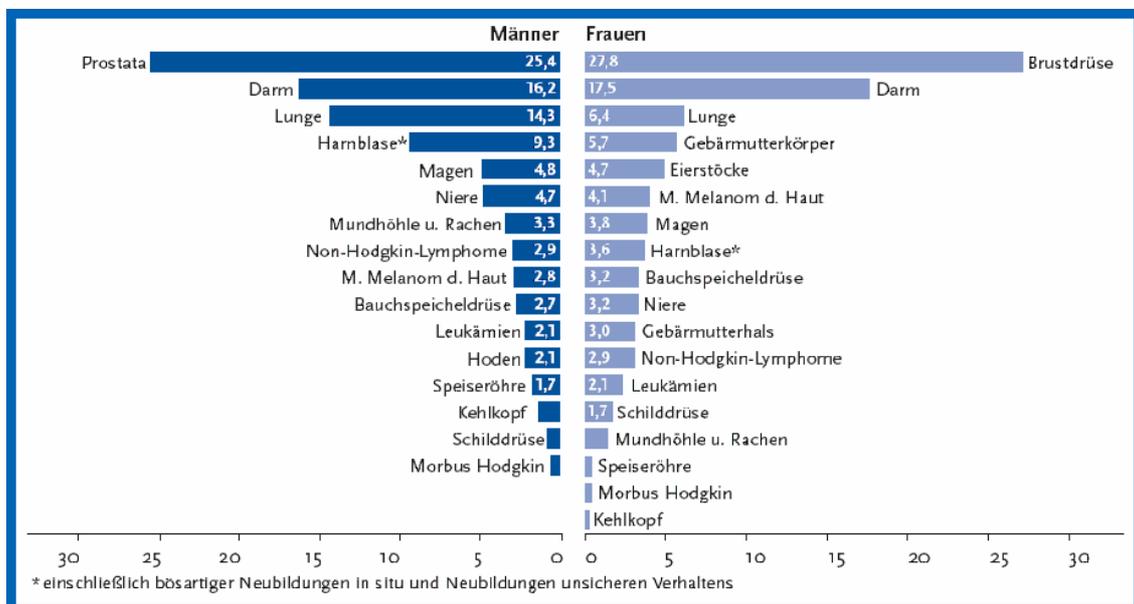


Abbildung 2: Prozentualer Anteil ausgewählter Tumorlokalisationen

Prozentualer Anteil ausgewählter Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen ohne nicht-melanotischen Hautkrebs in Deutschland 2004 [Robert Koch-Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister 2008].

1.3 Ätiologie des Brustkrebses

Bei den meisten Brustkrebserkrankungen lässt sich kein bestimmter Risikofaktor als sicherer Auslöser nachweisen, da die genauen Ursachen für die Entstehung des Mammakarzinoms weitgehend noch unbekannt sind. Die Genese des Mammakarzinoms ist multifaktoriell, d.h. mehrere Risikofaktoren sind in unterschiedlichem Ausmaß bei der Entstehung von Brustkrebs beteiligt.

Folgende Faktoren können das Brustkrebs-Risiko erhöhen:

- genetisches Risiko durch Brustkrebsgene
- hormonelle Risikofaktoren
- exogene Faktoren

1.3.1 Genetisches Risiko

Bei den vererbbaeren Krebsarten spielt der Brustkrebs eine große Rolle. Schätzungsweise sind 5% aller Brustkrebserkrankungen auf eine erbliche Veranlagung zurückzuführen. Gerade bei Frauen, bei denen eine Brustkrebserkrankung in vorherigen Generationen aufgetreten ist, sollten sich einer regelmäßigen Vorsorgeuntersuchung unterziehen.

In der Forschung wurden zwei Gene (breast cancer 1 = BRCA1 und breast cancer 2 = BRCA2) identifiziert, die bei erblich bedingtem Brustkrebs das Erkrankungsrisiko erhöhen. Häufig erkranken Frauen aus solchen Brustkrebsfamilie schon vor dem 40. oder 50. Lebensjahr und das Risiko für eine Brustkrebserkrankung vor dem 85. Lebensjahr steigt auf bis zu 80 %. Wurde eine Genmutation in einer Brust diagnostiziert, liegt das Tumorrisiko in der anderen Brust bei über 60 %. Die Vererbung einer Genmutation ist unabhängig vom Geschlecht, was zur Folge hat, dass auch Männer bei dieser Erbgutveränderung ein erhöhtes Brustkrebsrisiko besitzen.

Gentests erweisen sich in der heutigen Zeit noch als sehr aufwendig und teuer. Folgende Bedingungen müssen zutreffen, damit ein Gentest durchgeführt wird [Brustkrebsmagazin 2009]:

- In der Familie existieren zwei miteinander verwandte Frauen (z. B. Mutter und Schwester) mit Brust- und/oder Eierstockkrebs, von denen mindestens eine vor dem 50. Lebensjahr erkrankt ist.
- Eine Verwandte ersten Grades ist vor dem 30. Lebensjahr an einseitigem Brustkrebs erkrankt.
- Eine Verwandte ersten Grades ist vor dem 40. Lebensjahr an beidseitigem Brustkrebs erkrankt.
- Eine Verwandte ersten Grades ist vor dem 40. Lebensjahr an Eierstockkrebs erkrankt.

1.3.2 Hormonelle Risikofaktoren

Bei den hormonellen Risikofaktoren zeigen die weiblichen Geschlechtshormone Östrogen und Gestagen einen Einfluss auf die Entstehung von Brustkrebs. Weiterhin wirken sich eine frühe erste Regelblutung, späte letzte Regelblutung und Kinderlosigkeit negativ auf eine Erkrankung aus. Die Einnahme der Pille als potentieller Risikofaktor konnte noch nicht gezeigt und bestätigt werden.

1.3.3 Exogene Risikofaktoren

Der Zusammenhang zwischen Ernährung und Gewicht in Bezug auf eine Brustkrebserkrankung ist derzeit noch nicht eindeutig geklärt. Es lässt sich jedoch nachweisen, dass regelmäßiger Alkoholkonsum, da er den Östrogenspiegel im Körper steigert, mit einer erhöhten Erkrankungswahrscheinlichkeit verbunden ist. Ob Rauchen ein weiterer exogener Risikofaktor bei Brustkrebs ist konnte bisher noch nicht zweifelsfrei belegt werden.

1.4 Humaner epidermaler Wachstumsrezeptor 2 (Her2/neu)

Her2 ist das Akronym für human epidermal growth factor receptor 2. Meist werden in der Forschung Bezeichnungen wie „neu“, „Her2/neu“ und „c-erbB-2“ (= cellular erythroplastic leukemia viral oncogene homologue 2) synonym verwendet. Erstmals wurde das neu-Gen (= neuroblastoma glioblastoma oncogene) aus Neuroglioblastomen der Ratte isoliert [Coussens et al. 1985]. Untersuchungen an Hühnern zur Pathogenese der Erythroblastose, bei denen das Homolog der *Her2*-Gens beschrieben wurde, sind für die Abkürzung c-erbB-2 verantwortlich [Vennström und Bishop 1982].

Her2/neu zählt zu den so genannten Protoonkogenen, die eine Vorstufe der Onkogene darstellen. Die Genprodukte von Protoonkogenen kontrollieren und steuern Wachstums-, Teilungs- und Differenzierungsprozesse der Zelle. Durch Mutationen (z.B. Translokationen, Punktmutationen, Promoterinsertionen von integrierten Retroviren, Inaktivierung von Suppressorgenen oder Genamplifikation) kann das normale Wachstumsverhalten der Zelle gestört werden, so dass es zu einem unkontrollierten Tumorwachstum kommt (siehe Abbildung 1).

Das *Her2/neu* Gen ist auf dem langen Arm des Chromosom 17 (17q 12-21.32 / 35.1 - 35.14 Mb) lokalisiert und kodiert einen 185 kDa großen transmembranen

Glykoproteinrezeptor mit intrinsischer Tyrosinkinase Aktivität d.h. die intrazelluläre Domäne besitzt eine enzymatische Aktivität, die Phosphatgruppen an Tyrosinreste der intrazellulären Effektormoleküle koppelt [Akiyama et al. 1986] [Cousens et al. 1985] [King et al. 1985] [Popescu et al. 1989] [Schechter et al. 1984] [Stern et al. 1986]. Transmembranöse Rezeptoren vom Tyrosinkinase-Typ vermitteln Wachstums- und Differenzierungssignale. HER2/neu stimuliert die Zellproliferation über den RAS-MAP-Kinase-Weg (Abbildung 2) und hemmt den programmierten Zelltod (Apoptose) [Heldin 1995].

Her2/neu gehört zur Familie der „epidermal growth factor receptors“ (EGFR), die sich aus insgesamt vier Rezeptoren zusammensetzt (EGFR = Her1 = erbB1; Her2/neu = erbB2; Her3 = erbB3; Her4 = erbB4) [Yarden und Sliwkowski 2001] [Warren und Landgraf 2006].

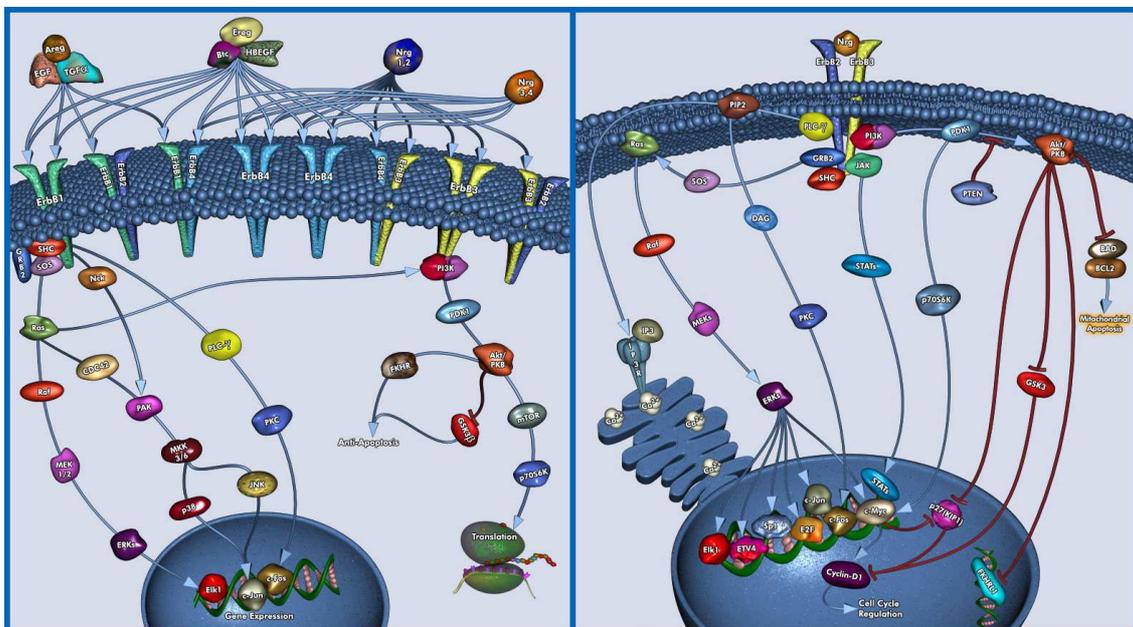


Abbildung 3: Signalwege der EGFR-Familie und von Her2-Her3-Dimeren

[QIAGEN, Hilden, Deutschland]

Frühere Forschungsarbeiten konnten zeigen, dass eine Überexpression des Her2/neu-Rezeptors in unterschiedlichen Krebsarten vorliegt [Albanell und Baselga 1999] [Bacus et al. 2002]. In 20 - 30% aller Mammakarzinome (Brustkrebs) wird Her2/neu überexprimiert was mit einer schlechteren Überlebenschance korreliert [Slamon et al. 1987] [Slamon et al. 1989] [Elledge et al. 1992]. Meist beruht diese Überexpression auf einer Amplifikation (Vervielfältigung) des *Her2/neu*-Gens.

Gesunde Zellen besitzen zwei Genkopien des Her2/neu-Gens und codieren ungefähr zehntausend dieser transmembranösen Rezeptoren. Tumorzellen hingegen besitzen

meist eine erhöhte Anzahl von Genkopien was zu einer Überexpression um das zehnbis hundertfache dieser Rezeptoren führt.

Verschiedene Auswirkungen der Überexpression können zu einer verstärkten und zeitlich verlängerten intrazellulären Signaltransduktion oder zur Aktivierung und Unterdrückung zahlreicher Signaltransduktionswege führen (siehe Abbildung 3). Dies kann die Entwicklung und das Wachstum von Tumoren beeinflussen (siehe Abbildung 4). Eine weitere Problematik kann die ligangenunabhängige Rezeptoraktivierung durch eine zu hohe Expression von Rezeptoren auf der Zelloberfläche sein, da diese zu einer verstärkten Zellproliferation führen kann.

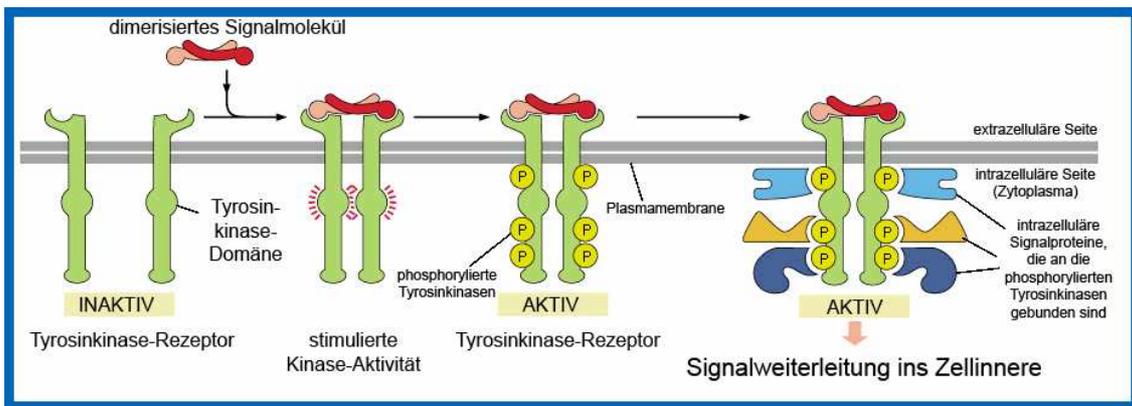


Abbildung 4: Dimerisierungsprozess von Tyrosinkinase-Rezeptoren

Die Abbildung zeigt neben dem Dimerisierungsprozess von Tyrosinkinase-Rezeptoren auch die Aktivierung der unterschiedlichen intrazellulären Bindungsdomänen, die dann zur Signalweiterleitung ins Zellinnere führen [Alberts et al. 1999].

Her2/neu-positive Patientinnen können von einer Therapie mit einem humanen Antikörper (Trastuzumab, Handelsname Herceptin®) profitieren der gegen den extrazellulären Teil des Her2/neu-Rezeptors gerichtet ist [Nagy et al. 1999]. Vor einer Therapie mit Trastuzumab wird zunächst mittels Immunhistochemie (IHC) getestet ob das *Her2/neu*-Gen amplifiziert und überexprimiert ist. Nur ein dreifach positives Ergebnis in der immunhistochemischen Untersuchung des Tumorgewebes, im Sinne einer besonders deutlichen Überexpression, gilt als ausreichend die Indikation zur Therapie mit dem Antikörper zu stellen. Als Bestätigungstest steht in Zweifelsfällen die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) zur Verfügung, die das Patientenmaterial nochmals auf Genebene untersucht. Die Kombination aus IHC und FISH werden zurzeit für Routinetestungen empfohlen.

Weitere Testverfahren auf Protein- und Genebene sind in Tabelle 1 aufgelistet:

Proteinebene	Genebene
Immunohistochemie (IHC) Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) Western Blot	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung (FISH) chromogene <i>in situ</i> Hybridisierung (CISH) Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)
	Southern Blot

Tabelle 1: Verschiedene Testverfahren zur Bestimmung des Her2/neu-Status

1.5 GRB7 Adaptor Protein

GRB7 ist ein Gen auf dem langen Arm des Chromosoms 17 (17q 12 / 35.15 - 35.16 Mb), das in direkter Nachbarschaft zu *Her2/neu* liegt. Es codiert das gleichnamige Protein GRB7 (engl. growth factor receptor-bound protein 7). Das Genprodukt gehört zu einer kleinen Familie von Adaptorproteinen. GRB7 ist ein Adaptorprotein mit einer SH2-Domäne, welches mit mehr als 20 Adaptormolekülen (z.B. Tyrosinkinase-Rezeptoren wie Her 1 oder Her 2) interagieren kann [Stein et al. 1994] [Shen und Guan 2004].

Dabei kommt es zu einer direkten Interaktion zwischen der SH2 Domäne und der Phosphotyrosin enthaltende Peptidsequenz innerhalb des Rezeptors [Moran et al. 1990] [Margolis et al. 1990]. Durch diese Interaktion werden weitere Proteine aktiviert und es wird eine Phosphorylierungskaskade in Gang gesetzt, die zu einer Veränderung in der Proteinaktivität oder Genexpression führt.

GRB7 wird bei unterschiedlichen Brustkrebs-Zelllinien amplifiziert und überexprimiert. Es wurde eine enge Korrelation zwischen *GRB7* und *Her2/neu* Expression gefunden, was meist auf eine co-Amplifikation und / oder co-Expression dieser beiden Gene hindeutet. Weiterhin konnte man zeigen, dass eine starke Assoziation zwischen Tyrosin-phosphorylierten Her2/neu und GRB7 besteht [Stein et al. 1994] [Kauraniemi et al. 2001] [Kauraniemi et al. 2003] [Kauraniemi und Kallioniemi 2006] [Luoh 2002].

GRB7 besitzt wichtige zelluläre und physiologische Funktionen hinsichtlich der Signaltransduktion, Zell-Möbilität und Tumor-Entwicklung und ist daher sehr interessant für weitere Untersuchungen.

GRB7 besitzt von außen nach innen folgende funktionellen Gruppen: prolin-reicher N-Terminus, PH Domäne (C-Terminus), SH2 Domäne (C-Terminus).

1.6 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH)

Unabhängig voneinander beschrieben Pardue und Gall [Pardue und Gall 1969], sowie John et al. im Jahre 1969 [John et al. 1969] die Technik der *in situ* Hybridisierung. Diese Methode ermöglicht den Nachweis von Nukleinsäuren (DNA, RNA) in der Zelle, im Zellkern, im Gewebe und in Chromosomen direkt vor Ort (lat. *in situ* = am natürlichen Ort; in üblicher Lage). Das Prinzip basiert auf der spezifischen Anlagerung von einzelsträngigen Nukleinsäuren an deren komplementäre DNA-Sequenz.

Eine wichtige methodische Weiterentwicklung ist die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung. Diese Methode wurde erstmals 1986 am menschlichen Chromosom durchgeführt und publiziert. Die bis dahin etablierte radioaktive Markierung der Sonde wurde durch eine Markierung mittels Fluoreszenzfarbstoff ersetzt [Pinkel et al. 1986]. Im Jahre 1988 wurde die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung für Gen-Kartierungen eingesetzt [Lawrence 1988] und das Chromosomenpainting entwickelt [Cremer¹ et al. 1988] [Cremer² et al. 1988] [Lichter¹ et al. 1988] [Lichter² et al. 1988] [Pinkel et al. 1988]. Basierend auf diesen Grundlagen entwickelte sich die gegenwärtige spezifische Fluoreszenz *in situ* Hybridisierungstechnologie. Diese Technik wird durch ihre Variationsmöglichkeit hauptsächlich in den Bereichen der allgemeinen klinischen und biologischen Forschung angewandt, sowie speziell in der Pränatal- und Karzinomdiagnostik. Es ist möglich, durch die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung chromosomale, numerische und strukturelle Abberationen festzustellen. Zusätzlich lässt sich die Organisation der Chromosomen bzw. Genen im Interphasezellkern darstellen. Größenmessungen von Genregionen können durch die Markierung mittels FISH ebenfalls vorgenommen werden.

1.6.1 Prinzip der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung

Als Voraussetzung der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (siehe Abbildung 5) muss die Ziel-DNA thermisch oder chemisch denaturiert werden. Durch Erhöhung der Temperatur und Zugabe von Reagenzien (wie z.B. Formamid) werden die Wasserstoffbrückenbindungen der Watson-Crick-Basenpaare aufgebrochen und die doppelsträngige Ziel-DNA in ihre beiden Einzelstränge zerlegt [Rauch et al. 2000]. Das Vorliegen der DNA-Einzelstränge ermöglicht der einzelsträngigen fluorchromierten Sonde (DNA oder PNA) an diese rekombinant zu binden. Bei diesem Vorgang der Doppelstrangbildung spricht man von Hybridisierung. Ein Überschuss an Sondenmaterial gewährleistet sowohl die Anlagerung der markierten Sonde an die

zelluläre Ziel-DNA, als auch die Verhinderung der Rückbildung des Originalstranges. Spezielle Waschschrte, die in ihrer Salzkonzentration oder Temperatur variieren, entfernen den Überschuss des Sondenmaterials und lösen gleichzeitig unspezifische Bindungen. Es bleiben lediglich die spezifisch an die komplementäre Ziel-DNA gebundenen Sonden zurück.

Der Nachweis einer Hybridisierung erfolgt mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopen und bildverstärkenden Methoden.

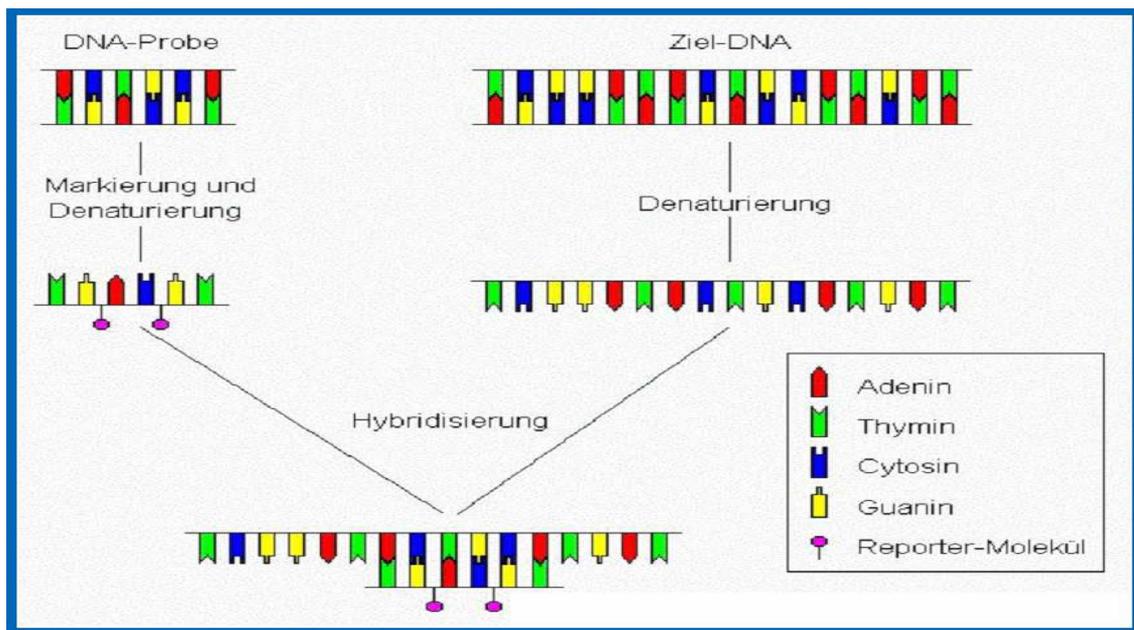


Abbildung 5: Grundprinzip der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung

[Aldinger 1993]

1.7 Kombinatorische Oligonukleotid FISH (COMBO-FISH)

Die kombinatorische Oligonukleotid Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung ist ein Verfahren, das die spezifische Markierung von Genregionen erlaubt [Hausmann et al. 2003]. Das für die Markierung verwendete Sondenset setzt sich aus einzelsträngigen Oligonukleotidsequenzen zusammen, (aufgebaut aus 15 bis 30 Homopurin- oder Homopyrimidin-Basen), die sich in der zu untersuchenden Genregion spezifisch anlagern und somit ein Fluoreszenzsignal hervorrufen. Das Sondenset kann aus DNA oder PNA synthetisiert werden. Mit einem DNA-Sondenset, für die *abl*-Genregion auf Chromosom 9, sowie für die *bcr*-Genregion auf Chromosom 22, wurde die COMBO-FISH-Methode bereits durchgeführt [Schwarz-Finsterle et al. 2005] [Nolte et al. 2006].

1.7.1 Konfiguration der Sondensets

Die Konfiguration des Sondensets [Schmitt und Hausmann 2003] erfolgt auf Basis der Sequenzierung des Humangenoms und der NCBI Chromosomendatenbank.

Bei dieser Analyse werden alle repetitiven Sequenzen und alle clusterbildende (mehr als fünf Sonden innerhalb 250 kb) Sequenzen entfernt. Ein deutliches Fluoreszenz-Signal ist zu detektieren, wenn die verbleibenden Sequenzen innerhalb von 250 Kilobasenpaaren binden [Hausmann et al 2003].

Die optimale Länge für eine Sequenz liegt zwischen 15 bis 30 Basenpaaren. Die Sondensets setzen sich entweder ausschließlich aus Homopurin oder ausschließlich aus Homopyrimidin zusammen. Bei allen verwendeten Sequenzen befindet sich am 5'-Ende das jeweilige Fluoreszenzfarbstoffmolekül.

1.7.2 Vergleich von COMBO-FISH-Sonden mit BAC-Sonden

Ein Faktor, in dem sich die COMBO-FISH-Methode von der Standard-FISH-Methode abhebt, ist die Konfiguration und Synthese der Sonden.

Im Gegensatz zur automatisierten Oligonukleotidsynthese bei COMBO-FISH werden die BAC-Sonden durch Klonierung und Amplifikation der DNA-Segmente in Bakterienzellen hergestellt. COMBO-FISH hat also den Vorteil, dass durch Computeranalyse der Genomdatenbank, ein Sondenset ohne Verwendung molekularbiologischer Methoden hergestellt werden kann.

Ein weiterer Vorteil der COMBO-FISH-Sonde gegenüber der BAC-Sonde liegt in ihrer Größe (COMBO-FISH: 20 x 10 - 30 Nukleotide / BAC: ~ 100000 Nukleotide). Die geringe Größe der COMBO-FISH-Sonden ermöglicht eine punktgenaue Markierung der zu untersuchenden Genregion. Das Sondenset bindet mit seinen Sequenzen, im Gegensatz zu den kommerziellen BAC-Sonden, direkt in die vorgegebene Genregion. Dabei werden keine benachbarten Gene mit eingeschlossen, wie es bei BAC-Sonden möglich ist (siehe Abbildung 6).

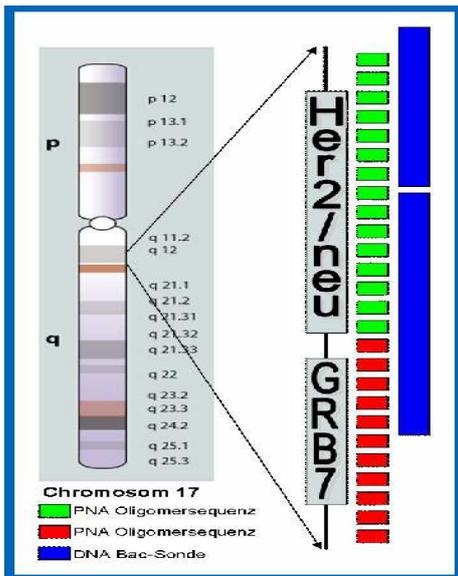


Abbildung 6: Vergleich BAC-Sonde mit PNA-COMBO-FISH-Sonde

1.7.3 Bindung von PNA-COMBO-FISH-Sonden an DNA und RNA

PNA-Oligonukleotid-Sequenzen binden parallel oder antiparallel über Watson-Crick-Bindungen an Einzelstrang-DNA und RNA. Die antiparallele Bindung wird aufgrund der Stabilität bevorzugt eingegangen.

PNAs mit einem hohen Anteil an Pyrimidinen sind in der Lage tripelhelikale Bindungen einzugehen. Die Sonde setzt sich mittels Hoogsteen-Bindungen in die große Furche der DNA-Doppelhelix.

Durch das neutrale Rückgrat der PNAs kommt es nicht wie bei DNA-Sonden zu elektrischen Abstoßungen. Der Vorteil einer tripelhelikalen Bindung liegt im Verzicht auf die Denaturierung. Aufgrund dessen besteht die Möglichkeit sie für eine in vivo-Markierung einzusetzen.

Literaturangabe FISH und COMBO-FISH: [Hausmann et al. 2003] [Hausmann et al. 2005] [Schwarz-Finsterle et al. 2005] [Nolte et al. 2006] [Schwarz-Finsterle et al. 2006/2007] [Schmitt² et al. 2010] [Grossmann et al. 2010]

1.8 Peptid-Nukleinsäure (PNA)

Peter Nielsen entwickelte im Jahre 1991 ein neuartiges DNA-Analogon, dessen nukleobasenträgendes Peptidrückgrat strukturell dem Zucker-Phosphat-Rückgrat der DNA ähnelt [Nielsen et al. 1991] [Nielsen et al. 1994] [Egholm¹ et al. 1992] [Egholm² et al. 1992]. Er nannte diese neue Verbindung Peptidnukleinsäure (engl. Peptide nucleic acid – PNA), da das Rückgrat aus einem ungeladenen Pseudopeptid N-(2-Aminoethyl)-Glycin besteht (siehe Abbildung 7).

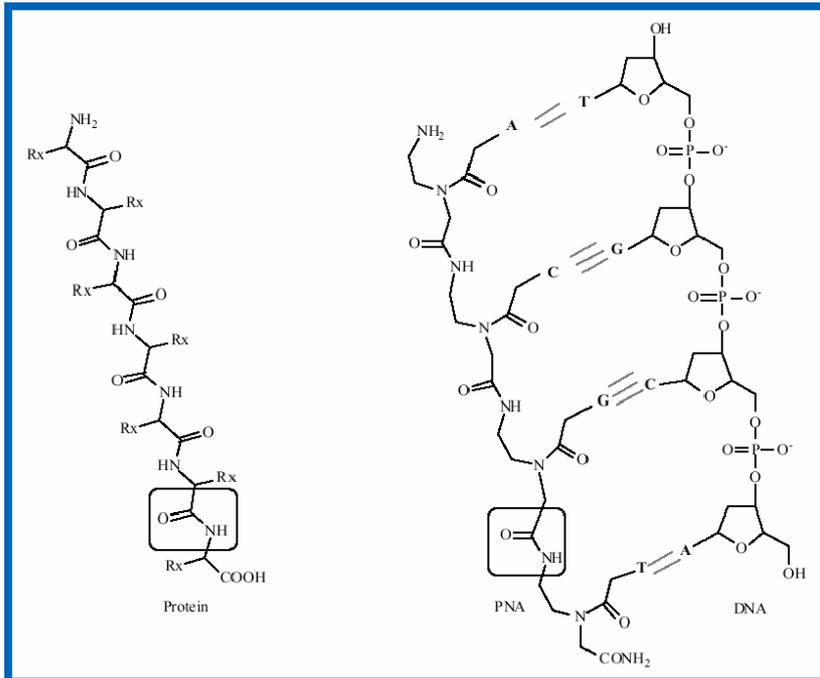


Abbildung 7: Strukturaufbau der PNA im Vergleich zu Proteinen und DNA

[Nielsen et al. 2001]

Die PNA ist in der Lage DNA zu imitieren. Sie besitzt ebenfalls die Fähigkeit zur Bildung komplementärer Basenpaarungen. Im Gegensatz zur DNA verfügt die PNA über eine hohe chemische und thermische Stabilität in biologischer Umgebung, eine Resistenz gegenüber Nukleasen und Proteasen und eine hohe Bindungsaffinität und –spezifität an Nukleinsäuren [Nielsen et al. 1999]. Durch das neutrale Rückgrat der PNA, was auf die Abwesenheit der negativ geladenen Phosphatgruppen zurückzuführen ist, erhöht sich im Vergleich zu DNA–DNA Duplizaten die Bindungsstärke zur komplementären DNA. Die Wechselwirkungen zwischen PNA–DNA und PNA–RNA beruhen auf Basenpaarungen nach Watson-Crick (Abbildung 7). Neben ihnen besteht auch die Möglichkeit von Hoogsteen-Bindungen (Abbildung 8), die durch die Paarung des Antigen-Strangs mit

der DNA-Doppelhelix entstehen. Durch Bindung des Antigen-Strangs in die große Furche kommt es zur Ausbildung einer Tripelhelix.

Es werden auch antiparallele und parallele Doppelbindungen gebildet, wobei die Watson-Crick antiparallele Doppelbindung die bevorzugte Bindungsvariante ist.

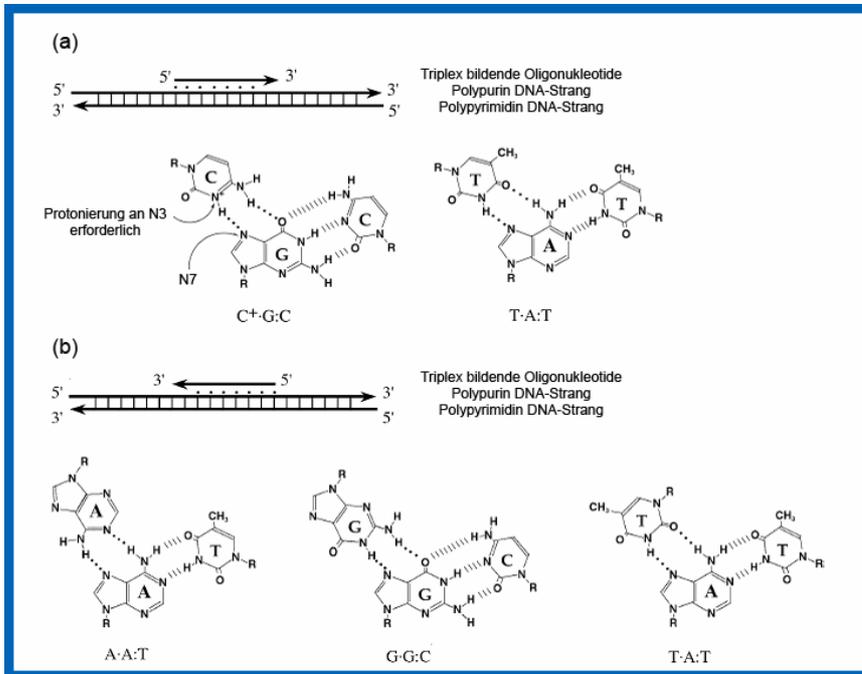


Abbildung 8: Tripelhelix-bildende Oligonukleotide

Muster für Tripelhelix-bildende Oligonukleotide. Triplex-Bildung erfolgt in Polypurin - Polypyrimidin Regionen der doppelsträngigen DNA. An diesen Stellen können die Tripelhelix bildenden Oligonukleotide entweder in die (a) die Pyrimidin-Muster (Y. R: Y) oder (b) Purin-Muster (R. R: Y) binden. In den Pyrimidin-Mustern ist der dritte Strang parallel zum Purin-Strang der Doppelhelix angeordnet, in den Purin-Mustern antiparallel [Vasquez und Glazer 2002].

Die Hybridisierungsgeschwindigkeit für PNA-DNA gleicht der Geschwindigkeit von DNA-DNA Hybridisierung. Die Stabilität hingegen ist bei PNA-DNA bzw. PNA-RNA-Hybriden größer als reine DNA-DNA bzw. DNA-RNA-Hybriden, das durch Bestimmungen der Schmelztemperaturen bewiesen wurde (Tabelle 2).

Hybrid	Schmelztemperaturen T _m in °C
PNA-RNA	72,3
PNA-DNA	69,5
DNA-DNA	53,3
DNA-RNA	50,6

Tabelle 2: Schmelztemperaturen verschiedener Hybride

Die unterschiedlichen Schmelztemperaturen basieren auf Messungen von Oligonukleotiden mit gleicher Basensequenz (TGTACGTCACAATA). Sie zeigen exemplarisch die Stabilität der unterschiedlichen Hybriden [Egholm et al. 1993]

Ein Nukleinsäure-Doppelstrang ist umso stabiler, je höher seine Schmelztemperatur ist. Wie die Tabelle 2 zeigt besitzt die PNA eine deutlich stärkere Bindungsaffinität zu den Nukleinsäuren, als die DNA selbst. Durch diese höhere Bindungsstärke der PNA kommt es im Fall einer Basenfehlpaarung im PNA-DNA-Hybrid zu einem stärker ausgeprägten Absinken der Schmelztemperatur im Vergleich zu reinen DNA-DNA-Hybriden. Eine Unterscheidungen zwischen korrekten und fehlerhaften Basenpaarungen ist damit möglich. Die PNA-Hybride sind in ihrer Bindungsaffinität unabhängig von der jeweiligen Salzkonzentration. Sie zeigen sowohl gegen Säuren als auch gegen schwache Basen eine ausreichende Stabilität. Bei der Synthese wird durch Anhängen geladener Gruppen, wie etwa C-terminaler Lysine, die Wasserlöslichkeit stark verbessert [Egholm et al. 1993].

1.9 PNA-Synthese

Die auf automatisierter (AutoSpot Roboter von INTAVIS Bioanalytical Instruments, Köln) Festphasentechnik beruhende Parallel-Synthese von PNA-Oligomeren wird gegenwärtig routinemäßig durchgeführt (in Kooperation mit Deutschem Krebs Forschungszentrum - DKFZ, Dr. Anette Jacob). Adenin, Cytosin, Guanin und Thymin werden als reaktive Nukleobasen eingesetzt. Sie besitzen jeweils eine N-(2-Aminoethyl)-glycin-Einheit. Durch die Schutzgruppe Fluornyl-9-methyloxy-carbonyl (Fmoc) wird die erste Aminogruppe des Peptidrückgrats geschützt. Die Benzhydryloxy-carbonyl-Schutzgruppe (Bhoc) schützt die exocyclische Aminogruppe der Basen A, G, C.

Ausgehend von einer Festphase (Resin), die nach außen stehende Aminogruppen trägt, findet die Synthese statt. Beim Synthese-Beginn werden diese Aminogruppen mit den ersten PNA-Monomeren an der Carboxylgruppe kondensiert. Der Synthese-Beginn kann auch mit einem Fmoc geschützten Lysin durchgeführt werden. Lysin hat die Funktion in wässrigen Medien die Löslichkeit der PNA zu erhöhen, da die PNA-Moleküle zur Selbstaggregation neigen und somit im Falle der Aufreinigung Probleme bereiten.

Im Syntheseautomaten erfolgt eine sequenzielle PNA-Synthese. Die überschüssigen Reagenzien können zwischen den einzelnen Synthesezyklen mit Dimethylformamid herausgewaschen werden und über das Anlegen eines Vakuums aus dem Well abgesaugt werden. Die PNA bleibt während der Synthese fest an dem Resin gebunden. Zu Beginn des Synthesezyklus wird die Schutzgruppe Fmoc am N-Terminus mit einer 20%igen Lösung von Piperidin in DMF entfernt. Der anschließende Waschschrift wird

mit DMF durchgeführt und die erste Kopplungsreaktion kann stattfinden. Durch die Verwendung von HATU (O-(7-azabenzotriazol-1-yl)-1, 1, 3, 3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat) kommt es zur Aktivierung der Basen-Monomere, was eine Kopplung ermöglicht. Anschließend wird erneut ein Waschschrift mit DMF getätigt. Die Behandlung mit Acetanhydrid und 2,6-Lutidin in DMF acetyliert die noch freien Aminogruppen und blockiert diese für weitere Reaktionen (Capping). Der Capping-Schritt verhindert die Verlängerung von PNA-Ketten, in denen ein Nucleobasen-Baustein fehlt.

Das Entschützen, die Kopplung des nächsten Monomers und der Capping-Schritt werden so oft wiederholt bis die Synthese der PNA-Sequenzen vollständig abgeschlossen ist. Nach der kompletten Synthese wird die N-terminale Fmoc-Schutzgruppe des letzten gekoppelten Monomers entfernt.

Durch Einsatz von Succinimidylester von Fluoreszenzfarbstoffen kann das Aminoende der PNA-Kette modifiziert werden. Diese Fluoreszenzfarbstoff-Modifikation findet an der Festphase statt. Abschließend kommt es zur Eliminierung der Bhoc-Schutzgruppen der Basen sowie zur Abspaltung der PNA-Kette von der Festphase. Dies erfolgt durch Behandlung mit Trifluoressigsäure. Die Abbildung stellt schematisch den Ablauf der PNA-Synthese an der Festphase dar.

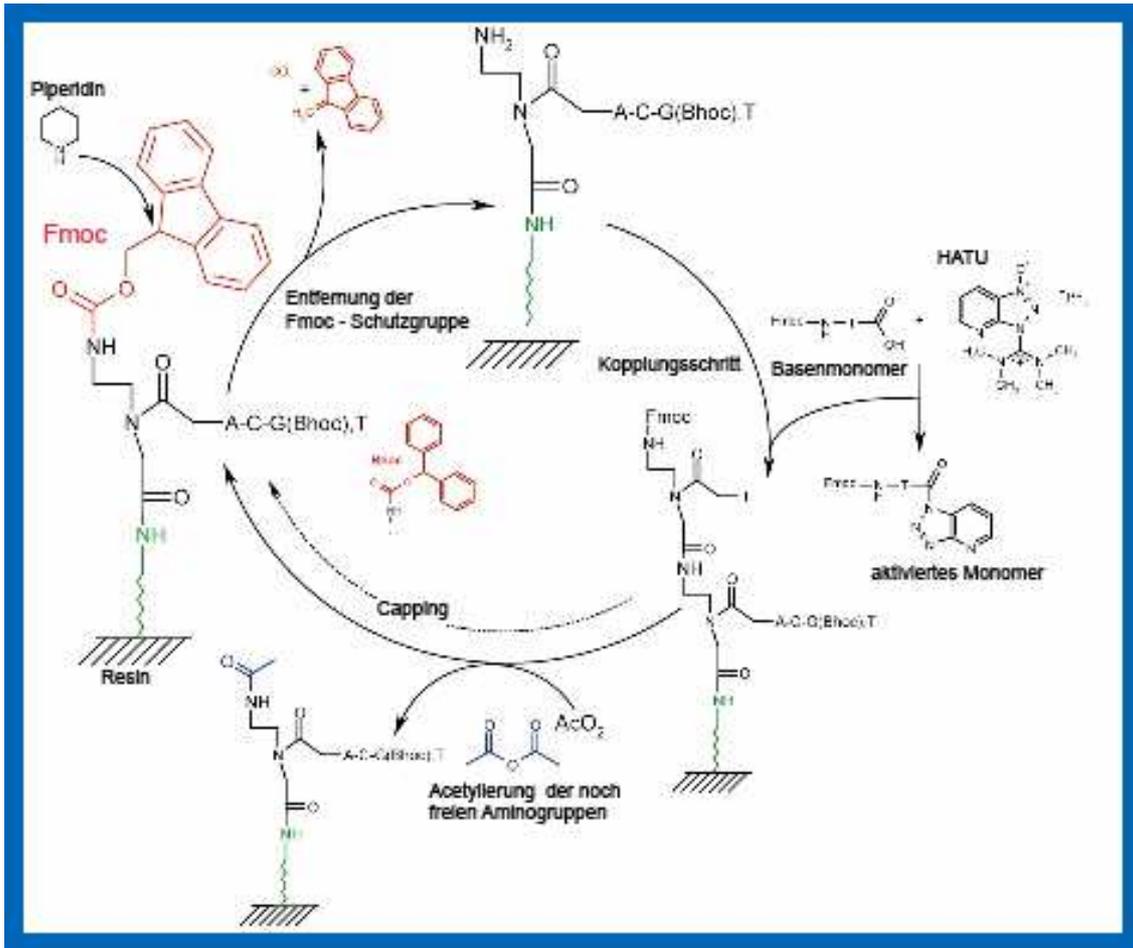


Abbildung 9: PNA-Synthesezyklus

Matrix - unterstützte Laserdesorption / Ionisation - Flugzeit - Massenspektrometrie (engl. Matrix - Assisted - Laser - Desorption / Ionization - Time - Of - Flight - Mass - Spectrometry, MALDI - TOF - MS) wurde zur Analyse der PNAs eingesetzt, um die über HPLC (engl. high performance liquid chromatography) gereinigten Sequenzen auf ihre Aufreinigungseffizienz zu überprüfen.

Dazu wird bei MALDI-TOF der zu untersuchende Analyt (PNAs) und die Matrix (2,5-Dihydroxybenzoesäure) auf einem metallischen Träger co-kristallisiert. Durch Laserbeschuss (UV bei 337 nm) wird die Probe in die Gasphase gebracht. Durch Protonenübertragung von den Matrixmolekülen auf die Peptide entstehen Peptidionen. Die freien Ionen werden dann in einem elektrischen Feld beschleunigt und die Messung der Flugzeit der Ionen lässt auf die Masse der erzeugten Peptidionen zurückschließen. Man kann zusätzlich durch Fragmentierung einzelner Peptidionen die Aminosäuresequenz des jeweiligen Peptids ableiten [Dauber et al. 2010]. Die Aufreinigungseffizienz der einzelnen fluoreszent markierten PNA-Sequenzen liegt bei diesem Verfahren bei 88-99%.

VI) Zielsetzung PNA COMBO-FISH

Die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) ist ein Routineverfahren zur spezifischen Markierung von Chromatin in Interphasezellkernen und Metaphasechromosomen. In der medizinischen Diagnostik wird die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung zur Detektion von numerischen und strukturellen Chromosomenanomalien eingesetzt (z.B. Kopienzahländerungen von Genen, Translokationen, Deletionen ...etc.). Molekularbiologische Ansätze geeignete Sonden herzustellen, erweisen sich für eine nukleotidgenaue Markierung meist jedoch als unzureichend. So werden kleine Genregionen häufig überlappend auf andere Genomregionen markiert oder Bruchpunkte nur unzureichend genau *in situ* detektiert. Die Methode der kombinatorischen Oligonukleotid-Markierung bietet aufgrund des Sondendesigns, das auf einer kombinatorischen Analyse des Genoms beruht [Schmitt et al. 2005], die Möglichkeit einer lokusgenauen Markierung [Hausmann et al. 2003]

COMBO-FISH setzt kurze, einfach- oder doppelt-fluoreszenzmarkierte DNA-Oligonukleotidsequenzen ein, die in der gewünschten Zielregion binden und dadurch ein präzises Fluoreszenzsignal der Genregion liefern. Mit speziell konfigurierten DNA-Sondensets, für die *abl*-Genregion auf Chromosom 9, sowie für die *bcr*-Genregion auf Chromosom 22, wurden die Unterschiede von COMBO-FISH und klassischen Markierungsmethoden gezeigt. Erste Vermessungen dieser Regionen mittels SMI-Mikroskopie (engl. Spatially Modulated Illumination Microscopy) zeigten signifikante Unterschiede bei Präparaten von Leukämie-Patienten und gesunden Probanden. Aus den bisherigen Arbeiten geht hervor, dass DNA-Oligonukleotide auf Grund des relativ hohen Signal-zu-Rausch-Verhältnis und einem gewissen Grad an unspezifischen Bindungen nur bedingt einsetzbar sind [Hausmann et al. 2003] [Schwarz-Finsterle et al. 2005] [Nolte et al. 2006] [Schwarz-Finsterle et al. 2006/2007] [Grossmann et al. 2010].

In dieser Doktorarbeit sollen erstmals Peptidnukleinsäuren (PNA) als Oligosonden eingesetzt werden. Die großen Vorteile (z.B. Nukleasen- und Proteasenresistenz, Anlagerung an den nativen DNA-Strang...etc.) der PNA-Sonden bei einer Lebendzellmarkierung, gewinnen immer mehr an Bedeutung, um Abläufe innerhalb der Genomorganisation bei der Entstehung von Chromosomenanomalien verfolgen zu können.

Erste Grundlagenexperimente mit einer repetitiven PNA-Oligonukleotidsonde für die Subregion von Zentromer 9 sollen folgende methodische Fragestellungen beantworten:

A) Stellen PNA-Oligonukleotidsonden für COMBO-FISH in Zellen eine bessere Alternative zu DNA – Oligonukleotidsonden dar? Welche Eigenschaften besitzen PNA-Sonden in Zellen?

B) Welche Bedingungen müssen Fluoreszenzmoleküle / -molekülkomplexe haben, um eine Mehrfarbenmarkierung reproduzierbar zu erreichen? Welches ist die best geeignete Kombination von Farbstoffen für eine Mehrfarbenmarkierung?

C) Wie spezifisch sind die synthetisierten PNA-Sondensets?

D) Welche Hybridisierungs-Parameter müssen auf die neuen PNA-Sonden angepasst werden, um eine hohe Hybridisierungseffizienz und Spezifität zu erreichen?

Weiterhin sollen Experimente, am Beispiel einer geeigneten Sondenkombination für die diagnostisch relevanten Gene *Her2/neu* und *GRB7* auf Chromosom 17, zeigen ob Unterschiede in der Gen-Amplifikationen von verschiedenen Brustkrebszellen genauer bestimmt werden können.

Insbesondere Mehrfarben-COMBO-FISH an unterschiedlichen Brustkrebszelllinien sollen *in situ* und *in vivo* sowie an fixiertem Gewebe etabliert und optimiert werden.

Zusätzlich sollen neuartige Sonden, z.B. mit TINA-modifizierten (Twisted Intercalating Nucleic Acids) Sonden für den Einsatz zur spezifischen Markierung an ausgewählten Modellbeispielen getestet werden [Filichev und Pedersen 2005] [Filichev et al. 2006].

B) Physikalische Grundlagen:

1.10 Mikroskopische Auflösung

Im folgenden Kapitel werden die Grundlagen der Fluoreszenzmikroskopie näher beleuchtet. Neben der Auflösung werden die Mechanismen der Fluoreszenz kurz erläutert und die wichtigsten in der Doktorarbeit genutzten Mikroskopie-Systeme (Epifluoreszenzmikroskopie, konfokale Laser-Raster-Fluoreszenzmikroskopie, konfokale Spinning-Disk-Mikroskopie und Lokalisationsmikroskopie) dargestellt.

Der Grundaufbau eines Mikroskops besteht im einfachsten Fall aus zwei Linsen. Die Objektivlinse befindet sich auf der Seite des zu betrachtenden Gegenstandes und die Okularlinse auf der Augenseite. Die Kombination dieser beiden Linsen resultiert in einer starken Vergrößerung und ermöglicht die Beobachtung von feinen Details im Objekt.

Das Objektiv entwirft in der Brennebene des Okulars ein reelles spiegelverkehrtes und vergrößertes Zwischenbild des Objekts, welches durch das Okular beobachtet wird. Das Okular wirkt als eine Lupe und erzeugt ein virtuelles Bild im Unendlichen. Ins Auge gelangen parallele Strahlenbündel ausgehend von jedem Punkt des Objektes und dies ermöglicht ein Betrachten des Bildes ohne Akkomodation des Auges. Das Auflösungsvermögen eines Mikroskops ergibt sich aus dem Produkt des Abbildungsmaßstabs des Objektivs und der Vergrößerung des Okulars.

Der Begriff der Auflösung beschreibt die Fähigkeit eines Detektorsystems, zwei oder mehr räumlich voneinander getrennte Objekte der gleichen spektralen Signatur zu unterscheiden. Die minimale Distanz zweier Objekte (d), bei dem das menschliche Auge bei maximaler Nahakkommodation diese noch als getrennt wahrnehmen kann liegt bei 0,1 mm.

Ernst Abbe formulierte 1873, dass die Auflösung eines Weitfeld-Lichtmikroskops durch die Beugung fundamental begrenzt ist [Abbe 1873]. Das Abbe Limit besagt, dass die kleinste auflösbare Distanz eines optischen Systems

$$\lambda / 2n \sin \alpha \quad \text{oder} \quad \lambda / 2 \text{ NA}$$

λ = Wellenlänge des Lichtes

n = Brechungsindex des Mediums zwischen Objekt und Objektiv

α = Winkel zwischen der Mittelachse und den Randstrahlen der Linse

$\text{NA} = n \sin \alpha$ = numerische Apertur des Objektivs

beträgt.

Diese Formel galt bis vor einigen Jahren als unumstößliches Limit und bleibt, trotz neueren Methoden der Lichtmikroskopie, die das Abbe Limit umgehen, ein fundamentales Prinzip in der Lichtmikroskopie.

In der Fluoreszenzmikroskopie wird weitestgehend sichtbares Licht (400 bis 800 nm) zur Anregung von Farbstoffen genutzt.

Berechnet man nun die Auflösungsgrenze für eine gängige Wellenlänge von 488 nm und einem hochnumerisches Ölimmersionsobjektiv ($NA = 1,4$) und setzt diese Werte in die oben aufgeführte Formel ein, so erhält man Werte in der Größenordnung von ~ 180 nm (lateral). Dieser Wert entspricht ungefähr der Hälfte der Anregungswellenlänge und galt lange als Faustformel für die absolute Grenze bei der Lichtmikroskopie. Entlang der optischen Achse ist die Auflösung um den Faktor 3 schlechter. In dieser Richtung liegt die Auflösung bei 600 nm (axial).

1.11 Fluoreszenz

1.11.1 Geschichtliche Entwicklung der Fluoreszenz

Der britische Wissenschaftler Sir George Gabriel Stokes (1819-1903) beschrieb erstmals Mitte des neunzehnten Jahrhunderts Fluoreszenz-Erscheinungen am Mineral Calciumfluorit (Flussspat) und prägte somit diesen bis heute noch verwendeten Begriff. Stokes entdeckte außerdem, dass durch Stimulation mit ultraviolettem Licht Fluoreszenz in bestimmten Substanzen induziert werden konnte und formulierte außerdem 1852 das Stokes Gesetz. Meist auch als Stokes-Verschiebung (engl. Stokes-Shift) bezeichnet, besagt das Gesetz, dass die Wellenlänge des fluoreszierenden Lichts immer größer als die Wellenlänge des Anregungslichtes ist.

In der optischen Mikroskopie wurde der Effekt der Fluoreszenz erstmals in der ersten Hälfte des zwanzigsten Jahrhunderts ausgenutzt, jedoch berichteten Forscher, wie August Köhler und Carl Reichert, zunächst von einem Ärgernis in der UV-Mikroskopie. Der Forscher Max Haitinger (1868–1946) prägte 1911 den Begriff Fluorochrom und gilt als Begründer der modernen Fluoreszenzmikroskopie und Fluorochromierungstechnik. Die ersten Fluoreszenzmikroskope wurden zwischen 1911 und 1913 von den deutschen Physikern Otto Heimstädt und Heinrich Lehmann aus den etablierten UV-Instrumenten entwickelt. Diese Mikroskope wurden für Beobachtungen von Autofluoreszenzen in Bakterien, Tieren und pflanzlichen Geweben eingesetzt. Stanislav Provazek untersuchte

kurze Zeit später mittels Fluoreszenzmikroskopie die Farbstoff-Bindung im fixierten Gewebe und in lebenden Zellen.

Alexander Jablonski (1898-1980) stellte 1935 sein Modell zur Erklärung der Fluoreszenz vor, welches im folgenden Abschnitt näher erläutert wird.

Erst in den frühen 1950er Jahren entwickelte Albert Hewett Coons (1912-1978) und Melvin Kaplan eine Technik, die eine Markierung von Antikörpern mit Fluoreszenz-Farbstoffen erlaubte und trug somit grundlegend zum heutigen Forschungsgebiet der Immunfluoreszenztechnik bei.

1.11.2 Prinzip der Fluoreszenz

Im Jahre 1935 wurde von Alexander Jablonski ein Modell zur Erklärung der Fluoreszenz vorgestellt (Abbildung 10). Es zeigt die verschiedenen Energieniveaus der Elektronen, sowie die Übergänge zwischen diesen Zuständen bei der Fluoreszenz [Jablonski 1935]. Die Fluoreszenz setzt sich aus drei grundlegenden Prozessen zusammen, die alle auf einer Zeitskala auftreten, die durch mehrere Größenordnungen voneinander getrennt sind.

1.11.3 Anregung

Ein Photon wird von einer externen Quelle (z.B. Glühlampe oder Laser) geliefert und vom Fluorophor absorbiert, was zu einem elektronisch angeregten Singulett-Zustand (S_1) führt (10^{-15} Sekunden).

1.11.4 Anregungs-Lebensdauer

Während des angeregten Zustands unterliegt das Fluorophor Konformationsänderungen und einer Vielzahl von Interaktionen mit seiner molekularen Umgebung (Schwingungsrelaxation, 10^{-12} Sekunden). Diese Prozesse haben zwei wichtige Konsequenzen.

Die Energie von S_1' wird teilweise abgebaut, was in einem entspannten angeregten Singulett Zustand (S_1) resultiert. Aus diesem Prozess resultiert die Verschiebung der Wellenlänge hin zu größeren Werten (Stokes-Verschiebung; engl. Stokes Shift) [Stokes 1852].

Nicht alle Moleküle, die durch Absorption angeregt wurden, kehren durch Fluoreszenz-Emission in den Grundzustand (S_0) zurück. Andere Prozesse, wie Kollisions-Auslöschung, Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET) und Intersystem Crossing (siehe unten) können S_1 ebenfalls reduzieren.

1.11.5 Fluoreszenz-Emission

Ein Photon wird emittiert und das Fluorophor kehrt in den Grundzustand (S_0) zurück (10^{-9} Sekunden). Aufgrund der Energieaufnahme des Photons im angeregten Zustand wird die Energie des emittierten Photons geringer und somit verschiebt sich die Wellenlänge der Emissions-Photonen im Vergleich zu den Anregungs-Photonen in Richtung der längeren Wellenlänge. Dieser Unterschied in der Energie oder Wellenlänge wird Stokes-Verschiebung genannt. Die Stokes-Verschiebung ist von grundlegender Bedeutung für die Sensitivität der Fluoreszenz-Techniken, weil sie eine Trennung von Emissions-Photonen und Photonen mit der Anregungswellenlänge ermöglicht.

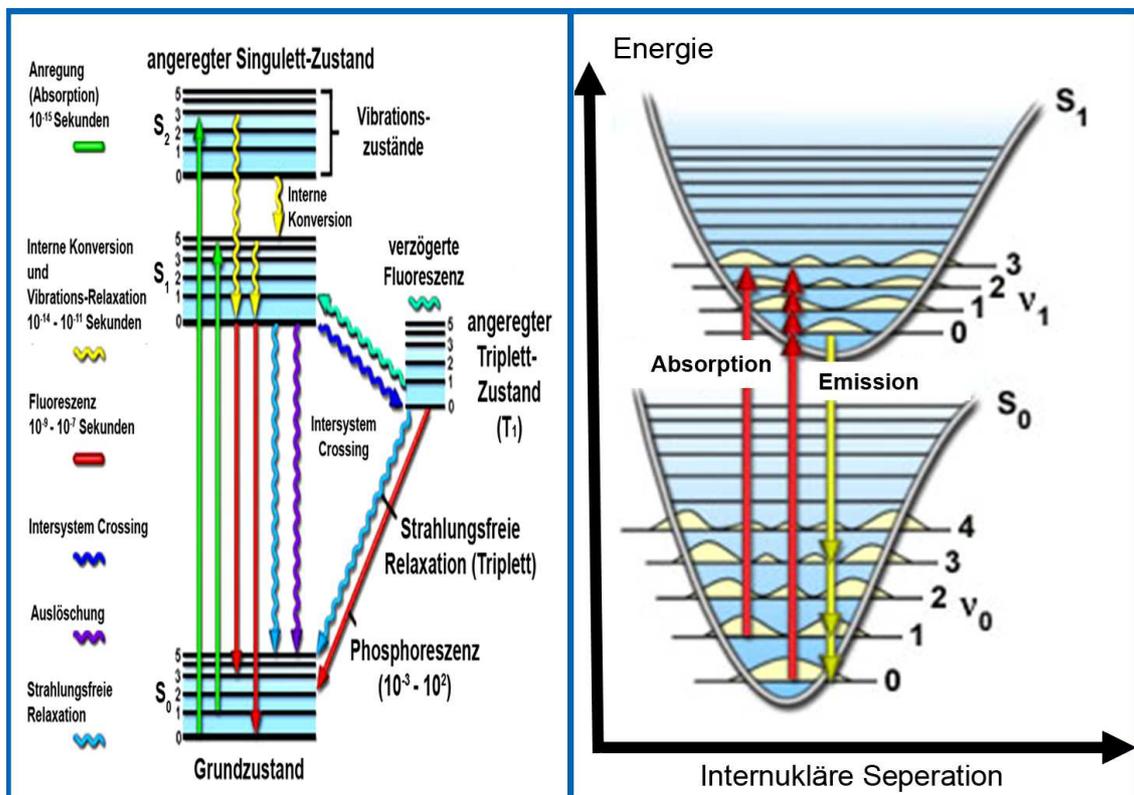


Abbildung 10: Jablonski- und Franck-Condon-Diagramm

[Olympus 2010]

In Abbildung 10 ist ein Jablonski-Diagramm dargestellt, das die verschiedenen Energieniveaus der Elektronen sowie die Übergänge zwischen diesen Zuständen zeigt. Der Grundzustand ist mit S_0 , die höheren Energieniveaus mit S_1 und S_2 bezeichnet. T_1 steht für den so genannten Triplet-Zustand. Die elektronischen Zustände sind weiter durch Schwingungs-Energieniveaus unterteilt.

Die Anregung eines Elektrons im Grundzustand S_0 in einen höheren angeregten Zustand S_1 (grüne Pfeile) erfolgt durch Absorption eines Photons mit einer Energie $E = h\nu$, die dem Abstand der Niveaus entspricht. Der direkte Übergang in den Triplet-Zustand ist nicht möglich. Der Übergang in das höhere Energieniveau S_2 (grüne Pfeile) ist ebenfalls möglich, jedoch geht dieser Zustand innerhalb von 10^{-14} Sekunden strahlungslos in den S_1 -Zustand über (gelbe Pfeile). Dieser Vorgang wird als interne Konversion bezeichnet.

Aufgrund der geringen Dauer von Absorption und Emission eines Photons gegenüber einer Umorientierung des Abstandes der relativ schweren Atomkerne kann der Abstand der Atomkerne als konstant angesehen werden (Franck-Condon-Prinzip, siehe Abbildung 10) [Franck 1926] [Condon 1926] [Condon 1928]. Die Anregung von S_0 zu S_1 erfolgt also in einen höheren Schwingungsenergie-Zustand von S_1 , da sich der Schwingungsgrund-Zustand von S_1 bei einem anderen Kernabstand befindet. Durch Stöße mit anderen Molekülen oder Atomen gibt das Molekül Energie ab und relaxiert in den Schwingungsgrundzustand von S_1 (innerhalb von Picosekunden).

Bei der Rückkehr aus dem S_1 -Zustand in den Grundzustand S_0 kommt es Idealerweise zur Aussendung eines Fluoreszenzphotons (Photonen-Emission zwischen Zuständen mit gleichem Spin), welches eine geringere Energie, und somit eine längere Wellenlänge, als das Anregungsphoton aufweist (Stokes-Verschiebung). Die Fluoreszenzlebensdauer liegt im Bereich von Nanosekunden.

Eine weitere Möglichkeit ist der strahlungslose Übergang eines Elektrons in den Triplet-Zustand (Intersystem Crossing). Bei dem weiteren Übergang von T_1 zum Grundzustand wird ein Photon emittiert (Photonen-Emission zwischen Zuständen mit verschiedenem Spin). Dieses emittierte Licht besitzt eine längere Wellenlänge und der Triplet-Zustand eine längere Lebensdauer im Vergleich zur Fluoreszenz. Man spricht dann von Phosphoreszenz.

Bei der Mikroskopie nutzt man den Effekt der Fluoreszenz aus, um eine vielseitige spektrale Markierung und Betrachtung verschiedene Strukturen und Organellen von Zellen zu ermöglichen. Dieser Effekt beruht auf der Stokes-Verschiebung, die die

Maxima von Absorptions- und Emissionsspektrum des Farbstoffes gegeneinander verschiebt und somit eine spektrale Auftrennung durch geeignete Filter erlaubt.

Konzepte der Fluoreszenzmikroskopie, die das Abbesche Gesetz nicht außer Kraft setzen und die zur Steigerung der Auflösung führen, können auf den folgenden drei Ansatzpunkten beruhen, wenn man sich die Abhängigkeit der Auflösung von der Punktverbreiterungsfunktion (PSF; engl. „point spread function“) bzw. der optischen Transferfunktion (OTF; engl. „optical transfer function“) betrachtet [Weisshart et al. 2010].

- Verengung der PSF durch Probenwechselwirkung (STED, engl. „Stimulated Emission Depletion“)
- Nutzung der Form der PSF durch eine Maximumsbestimmung zur genauen Lokalisation von einzelnen Signalen (SPDM, engl. Spectral Precision Distance Microscopy; PALM, engl. „Photoactivated Lokalisation Microscopy“)
- Erweiterung der OTF durch spezielle Mikroskopanordnung und eventuell zusätzlich durch nichtlineare Probenwechselwirkung (axiale Erweiterung: 4Pi- und I5-Mikroskopie, axiale und laterale Ausdehnung der OTF: strukturierte Beleuchtung)

1.12 Fluorophore

Ein Fluorophor (analog Chromophor) ist eine funktionelle Gruppe in einem Molekül, die die Energie einer bestimmten Wellenlänge absorbiert und sie wieder bei einer anderen bestimmten Wellenlänge emittiert. Die Quantität und die Wellenlänge der abgestrahlten Energie sind vom Fluorophor und der chemischen bzw. biologischen Umgebung abhängig.

Die wichtigste Eigenschaft, um die Fluoreszenz eines Fluorophors zu charakterisieren, ist die Quantenausbeute Q . Diese gibt an, welcher Bruchteil der Intensität des absorbierten Lichtes als Fluoreszenzlicht wieder emittiert wird:

$$F = I_0 e(c) x Q,$$

$e(c)$ = molarer Extinktionkoeffizient

c = Konzentration

x = Schichtdicke

I_0 = Intensität des einfallenden Lichts vor dem Auftreffen auf die Probe

1.12.1 Exogene Fluorophore

Die gezielte Untersuchung von Zellen wird durch den Einsatz exogener Fluorophore (z.B. fluoreszente Proteine, organische Farbstoffe oder Quantum Dots), die als Marker für gewisse Zielproteine, Zielgene oder Zielstrukturen fungieren, ermöglicht.

Fluoreszierende Proteine wie zum Beispiel das GFP (Grün fluoreszierendes Protein, engl. green fluorescent protein) können dabei als Marker für verschiedene biologische Vorgänge (z.B. Genexpression) innerhalb der Zellen dienen. Weiterhin finden eine Vielzahl von organischen Farbstoffen Anwendung in der Forschung. Fluorescein-Isocyanat (FITC), ein reaktives Derivat des Fluorescein, ist wohl das bekannteste und eines der meist verwendeten Fluorophore. Rhodamin (TRITC) -, Cumarin - und Cyaninderivate werden ebenfalls zu Markierungszwecken genutzt, um zelluläre Vorgänge näher zu beleuchten.

Verschiedene biologische Techniken werden eingesetzt, um solch eine Markierung mit exogenen Fluorophoren zu erreichen. In dieser Doktorarbeit wurde die Fluoreszenz in situ Hybridisierung und die Immunfluoreszenz als biologische Methoden gewählt, um Untersuchungen am Her2/neu sowohl auf Gen-, als auch auf Proteinebene durchzuführen. Beide Methoden werden in dieser Arbeit in einem eigenen Abschnitt näher erläutert.

Anforderungen, die an die exogenen Fluorophore gestellt werden, sind hohe Fluoreszenzquantenausbeuten, um gegenüber der Eigenfluoreszenz einen verstärkten Kontrast zu erreichen und eine zuverlässige Detektion zu gewährleisten. Weiterhin sollten die Fluorophore eine gute Photostabilität mit einem geringen Bleichverhalten über die Aufnahmedauer aufweisen. Für die erfolgreiche Durchführung der Untersuchungen sollten auch keine Nebenbindungsstellen oder unselektive Akkumulationen auftreten.

Bei Mehrfarbenexperimenten sollte darauf geachtet werden, dass die Fluorophore nur ein minimales Übersprechen (engl. cross talk) zwischen ihren Anregungs- und Emissionswellenlängen besitzen. Wird die spektrale Überlappung durch die Auswahl der Fluorophore minimiert, können Probleme bei der Detektion und spektralen Trennung vermieden werden. Der Förster-Resonanzenergietransfer ist eine strahlungsfreie Energieübertragung zwischen Farbstoffen und sollte, wenn nicht erwünscht, durch eine präzise Selektion der Farbstoffe vermieden werden.

Besteht die Möglichkeit, Fluorophore frei auszuwählen, ist es empfehlenswert exogene Fluorophore mit gleicher Fluoreszenzintensität zu wählen, da dadurch die Arbeit am

Mikroskop erleichtert wird. Die sorgfältige Auswahl von geeigneten Filtern ist ein weiterer wichtiger Punkt für erfolgreiche Untersuchungen.

1.12.2 Endogene Fluorophore

Die emittierte Fluoreszenz von angeregten endogenen Fluorophoren nennt man Eigenfluoreszenz (Autofluoreszenz). In den meisten Zellen ist im unbehandelten Zustand solch eine Fluoreszenz zu erkennen, die auf natürlich vorkommende Moleküle zurückzuführen ist. Die am häufigsten in der Zelle auftretenden Fluorophore sind:

- die pyridinischen Koenzyme
z.B. Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADP)
(Anregungsmaxima 340 nm, Fluoreszenzmaximum 450-470 nm)
- die Koenzym-Familie der Flavine
(Anregungsmaxima 370 nm und 450 nm, Fluoreszenzmaximum 530nm)
- die Strukturproteine des Bindegewebes Kollagen und Elastin
(Anregungsmaxima 300 - 340 nm, Fluoreszenzmaximum 420 - 460 nm)
- das Alterspigment Lipofuszin, welches in den sekundären Lysosomen (residual bodies) oder Phagosomen ansammelt
(Anregungsmaxima UV und VIS, Fluoreszenzmaximum 570 - 590 nm)
- zinkhaltige und metallfreie Porphyrine
(Anregungsmaxima 400 - 630 nm, Fluoreszenzmaximum 580 - 635 nm)

Endogene Fluorophore können einerseits eine sehr gute Hilfe sein, um Zellen ohne jegliche Markierung zu beobachten, andererseits kann die Eigenfluoreszenz eine störende Eigenschaft sein, um Zellen mit exogener Markierung zu untersuchen. Die Eigenfluoreszenz vermindert bei exogen markierten Zellen das Signal zu Rausch-Verhältnis und erschwert somit die präzise Detektion der zu untersuchenden Markierung.

Die Ausnutzung der Eigenfluoreszenz zur Lokalisation einzelner Moleküle an nicht markierten Zellen konnte kürzlich erstmals mittels hochauflösender Lokalisationsmikroskopie gezeigt werden [Kaufmann et al. 2010] und ist Bestandteil der hier vorliegenden Doktorarbeit.

Literaturangabe für das Kapitel 1.12 Fluorophore: [Udenfried 1969] [Galeotti et al. 1970] [Voltti und Hassinen 1978] [Benson et al. 1979] [Kunz und Kunz 1985] [Dayan und Wolman 1993] [Monici 2005]

1.12.3 Hintergrund zum Blinkverhalten von Fluoreszenzfarbstoffen

Im Jahre 2005 wurden von Mc Ananey et al. und Sinnecker et al. erste Ergebnisse publiziert, die sich mit dem Blinkverhalten und der Regeneration aus dem Dunkelzustand bei fluoreszierenden Proteinen beschäftigten [McAnaney et al. 2005] [Sinnecker et al. 2005]. Es wurde beobachtet, dass Moleküle durch Laserbestrahlung in einen nicht fluoreszenten Zustand übergehen und nach kurzer Zeit wieder in den fluoreszenten Zustand zurückkehren. Durch Variation der Bestrahlung konnte ein Zusammenhang zwischen diesem Phänomen und der Laserintensität festgestellt werden.

Sinnecker et al. zeigte am Beispiel des fluoreszierenden Protein CFP (engl. cyan fluorescent protein), dass die Fluoreszenzintensität der Probe bei Bestrahlung über die Zeit abnimmt und dass nach Unterbrechung der Laserbestrahlung eine Regeneration der Fluorophore stattfindet. Dieses Verhalten der Fluoreszenz konnte auch in einem weiteren Experiment, welches die Probe mit einer Wellenlänge außerhalb des Absorptionsspektrum des Farbstoffs bestrahlt, bestätigt werden. Bei dem untersuchten Effekt handelt es sich wohl um reversibles Photobleichen von Fluorophoren. Zusätzlich konnten Untersuchungen die Auswirkungen des pH-Werts auf das Blinkverhalten von Fluoreszenzfarbstoffen zeigen.

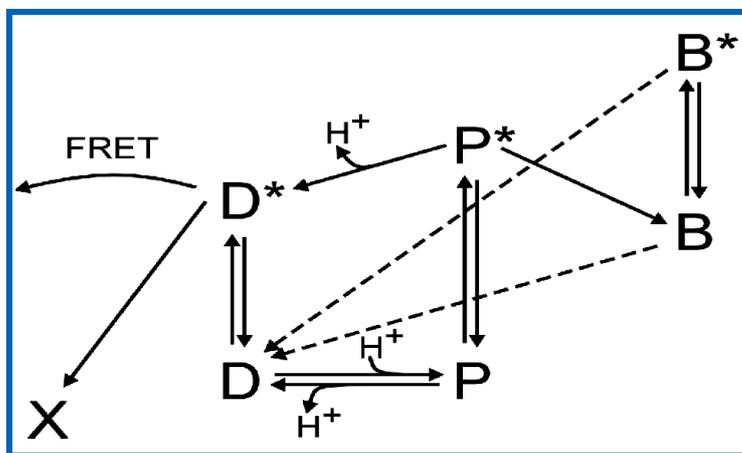


Abbildung 11: Reversibles und irreversibles Photobleichen

Das Zustandsmodell zeigt mögliche Übergänge eines fluoreszenten Proteins. (P) protonierter Zustand, (D) deprotonierter Zustand, (B) reversibel gebleichter Zustand, (X) irreversibel gebleichter Zustand und * angeregte Zustände [Sinnecker et al. 2005].

Das von Sinnecker entwickelte Zustandsmodell (Abbildung 11) stellt die Beziehung zwischen den Übergängen eines fluoreszierenden Proteins und Zuständen unterschiedlicher spektraler Signaturen dar. Dabei spricht er sowohl von einem protonierten-, als auch von einem deprotonierten Zustand, die sich in einem pH-

abhängigen Gleichgewicht befinden. Analysen mittels Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie konnten zeigen, dass der Protonierungsprozeß in der Größenordnung von wenigen Millisekunden abläuft. Weitere Übergänge von fluoreszierenden Proteinen können in reversiblen (B) und irreversiblen (X) Zuständen resultieren.

Im Vergleich zum klassischen Fluoreszenz-Zyklus, in dem der deprotonierte Grundzustand (D) angeregt wird, kann alternativ auch der protonierte Grundzustand durch Absorption eines Photon angeregt werden. Dieser angeregte protonierte (P^*) Zustand geht dann mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit in einen reversiblen gebleichten Zustand (B) über. Ausgehend von diesem Zustand kann die Rückkehr in den Grundzustand (D) auf mehreren Wegen erfolgen. Durch Bestrahlung kann auch der reversible gebleichte Zustand (B) in einen angeregten reversiblen gebleichten Zustand (B^*) überführt werden, was zu einer sehr schnellen Relaxation in den fluoreszenten Grundzustand (D) führt.

Versuche zum Photobleichen konnten zeigen, dass die Übergangswahrscheinlichkeit für reversibles Bleichen bis um den Faktor 100 größer ist, als irreversible Bleichen. Diese Tatsache birgt die Möglichkeit diesen Effekt für die Lokalisationsmikroskopie zu nutzen.

1.13 Fluoreszenzmikroskopie

1.13.1 Weitfeld-Mikroskopie

Man spricht von Weitfelddetektion, wenn alle Punkte einer gewissen Fläche aufgrund der optischen Anordnung parallel beleuchtet und deren Licht simultan detektiert wird. Die Weitfeld Anregung erfolgt nach einem von Ploem entwickelten Prinzip [Ploem 1967]. Die nicht fokussierte Beleuchtung hat den Nachteil, dass auch Photonen außerhalb der Fokusebene angesammelt werden, die zu einem erhöhten Hintergrund-Signal beitragen und zum Verlust struktureller Information in axialer Richtung führen. Die Weitfeldmikroskopie ist daher vor allem für Untersuchungen dynamischer Prozesse in lebenden Proben und für Untersuchungen an dünnen Objekten von Bedeutung.

1.13.2 Epifluoreszenz

Die Fluoreszenzmikroskopie ist eine spezielle Form der Lichtmikroskopie, die auf dem physikalischen Phänomen der Fluoreszenz beruht. Der Grundaufbau entspricht einem Auflichtmikroskop, welches mit unterschiedlichen Lichtquellen ausgestattet ist. Zum

einen besitzt das Gerät eine gewöhnliche Lampe (meist eine Halogenlampe) für die Durchlichtmikroskopie und zum anderen eine Quecksilberdampflampe, die Licht über das gesamte sichtbare Spektrum und UV-Licht liefert, um die Detektion der Fluoreszenz zu gewährleisten. Der wichtigste Bestandteil eines Fluoreszenzmikroskops ist das Objektiv, das sowohl zur Beleuchtung der Probe, als auch zur Detektion des emittierten Fluoreszenzlicht dient. Objektive mit einer hohen numerischen Apertur (Öffnungswinkel des Objektivs) können zu einer besseren Auflösung und zu verbessertem Kontrast führen, da bei größeren Winkeln höhere Raumfrequenzen detektiert werden. Die Vergrößerung des Raumwinkels ermöglicht eine optimierte Detektion von emittierten Photonen.

Die Methode der Epi-Beleuchtung wurde in den 60er Jahren von Johann Sebastian Ploem entwickelt [Ploem 1967] und gehört wohl zu einer der meist genutzten. Hierbei erfolgt die Abbildung des Anregungslichts auf die hintere Aperturblende des Objektivs durch einen dichromatischen Strahlteiler. Hierdurch wird der Teil der Probe vor dem Objektiv beleuchtet und zur Fluoreszenz angeregt. Das Fluoreszenzlicht wird durch das Objektiv gesammelt und passiert den dichromatischen Strahlteiler, der das Fluoreszenzlicht vom Anregungslicht trennt. Das Fluoreszenzlicht wird dann weitergeleitet zum Okular oder auf einen Detektor (meist Kamera mit CCD-Chip oder Photomultiplier) fokussiert.

1.14 Hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie

1.14.1 Konfokale Mikroskopie

Konfokale Laser-Raster-Mikroskopie (engl. confocal laser scanning microscopy - CLSM) und
konfokale Spinning-Disk-Mikroskopie (engl. confocal spinning disc microscopy)

Das Prinzip der konfokalen Mikroskopie wurde von Minsky 1957 erstmals vorgestellt [Minsky 1961] und 1979 von Brackenhoff et al. experimentell realisiert. Hierbei wurde das transmittierte Licht mit hochnumerischen Aperturen detektiert. Um die Tiefenschärfe zu verbessern, wurden schon in den 70er Jahren Überlegungen angestellt ein Laser-Scanning-Mikroskop zu entwickeln [Cremer und Cremer 1978]. Die konfokale Laserraster-Fluoreszenzmikroskopie, wurde durch Brackenhoff [Brackenhoff et al. 1985] und [Carlson et al. 1985] erstmals auch für die Bildgebung

mikroskopischer Objekte umgesetzt. Der erstmalige Gebrauch eines Spinning-Disk-Mikroskops wurde 1967 in der Veröffentlichung von Egger und Petran gezeigt [Egger und Petran 1967] [Davidovits und Egger 1969].

Prinzip des konfokalen Laser-Raster-Mikroskop:

Die meisten Konfokal-Mikroskope sind Laser-Raster-Mikroskope. Bei der konfokalen Mikroskopie übernimmt ein Laser mit gaußförmigen Intensitätsprofil die Funktion der Lichtquelle. Dieser lässt sich beugungsbegrenzt auf einen Lichtfleck fokussieren. Die Fokussierung wird mittels Objektiv mit einer hohen numerischen Apertur (NA) erreicht. Im Objekt werden die Fluoreszenzmoleküle durch das Laserlicht angeregt, die dann ihr Fluoreszenzlicht in alle Raumrichtungen emittieren. Das Fluoreszenzlicht wird durch einen dichroitischen Strahlenteiler vom Anregungslicht getrennt, über eine Tubuslinse auf eine Lochblende (engl. pinhole) fokussiert und darauffolgend mit Photoelektronenvervielfacher (engl. photomultiplier, PMT) oder Lawinenphotodioden (engl. avalanche photodiode, APD), vor denen sich ein Spektralfilter befindet, detektiert. Das aus Objektteilen außerhalb des Beleuchtungsfokus stammende Fluoreszenzlicht wird nicht auf die Lochblende fokussiert und somit zum größten Teil ausgeblendet, wodurch die verbesserte Tiefenauflösung des CLSM entsteht. Da Anregungs- und Detektionsfokus übereinander liegen spricht man hier von konfokalen Systemen. Zwei voneinander unabhängig verstellbare Spiegel dienen bei der Laseranregung als Scanning-Einheit und ermöglichen die Probe mittels fokussierten Laserstrahls abzurastern [Pawley 1989].

Es gibt drei unterschiedliche Ansatzpunkte der konfokalen Mikroskopie:

Die am weitesten verbreitete Methode ist der oben beschriebene Punkt-Scanner, bei dem der Laserstrahl das Objekt punktwise abrastert (konfokales Laser-Raster-Mikroskop). Eine weitere Technik ist das Rastern von ganzen Linien. Hierbei werden nicht einzelne Punkte erstellt, sondern eine ganze Bildzeile. Die dritte Variante projiziert das Anregungslicht gleichzeitig durch eine Nipkow-Scheibe auf der mehrere Lochblenden angeordnet sind. Diese Lochblenden befinden sich auf einer schnell drehenden Scheibe, um eine rasche Beleuchtung des Objekts zu erreichen. Emissionslicht außerhalb der Fokusebene wird von der Scheibe nahezu vollständig blockiert. Spinning-Disk-Mikroskope sind parallel abtastende konfokale Systeme, die große Bereiche der Probe mit einer hohen Geschwindigkeit erfassen.

Die optische Information, die nicht aus der Fokusebene stammt wird unterdrückt. Eine fast komplette Blockierung des nicht gewünschten Lichts erfolgt zum einen durch die

schwache Beleuchtungsintensität außerhalb des Fokus und zum anderen dadurch, dass lediglich das im Fokus befindliche Licht auf die Lochblende fokussiert wird.

In der biophysikalischen Forschung finden das konfokale Laser-Raster-Mikroskop und das konfokale Spinning-Disk-Mikroskop aufgrund ihrer Auflösung bei der 3D-Bildgebung biologischer Präparate eine breite Anwendung.

In den letzten Jahren wurden neue lichtmikroskopische Möglichkeiten entwickelt, die die Beugungsgrenze umgehen und somit eine Nanometer genaue Auflösung von zellulären Strukturen ermöglichen.

Cremer et al. [Cremer 1971] entwickelten 1971 schon erste Ansätze zur Erzeugung eines idealen Hologramms, das ein Interferenzfeld in allen Raumrichtungen festhält und trugen damit zur Entwicklung des 4Pi-Mikroskops bei. 1991 entwickelte Stefan Hell [Hell 1991] ein neues Konzept der konfokalen Mikroskopie, welche unter Verwendung zwei gegenüberliegender hochnumerischer Objektive die Laserstrahlen zur Interferenz bringt. Durch die Vergrößerung des Raumwinkels wird nur die axiale Auflösung auf etwa 100-150 nm verbessert [Hell und Stelzer 1992] [Hell et al. 1994] [Schrader und Hell 1996]. Ein weiterer Ansatz bei der es sich um eine spezielle Methode des Fluoreszenz-Laser-Raster-Mikroskops handelt ist die STED-Mikroskopie (engl. stimulated emission depletion) die ebenfalls von Hell 1999 experimentell realisiert wurde [Hell und Wichmann 1994]. Beim STED-Mikroskop wird durch gezieltes Ausschalten der Fluoreszenzfarbstoffmoleküle im Außenbereich des Fokus eine verbesserte Auflösung erreicht. Diese effektive Einengung der Anregungs-PSF verhilft zu einer lateralen Auflösungsverbesserung. Es konnte bereits eine Auflösung im Bereich von ~ 6 nm gezeigt werden [Klar et al. 2000].

1.14.2 Strukturierte Beleuchtung

Eine Möglichkeit eine Auflösungsverbesserung zu erreichen ist die strukturierte Beleuchtung. Beim gegenwärtig am Kirchhoff-Institut für Physik befindliche SMI (engl. Spatially Modulated Illumination)-Mikroskop wird die strukturierte Beleuchtung dadurch erreicht, dass die Anregungsintensität im Objektraum im Gegensatz zu herkömmlichen Weitfeldfluoreszenz-Mikroskopen nicht homogen ist, sondern durch Verwendung zweier gegenläufiger, interferierender Laserstrahlen in axialer Richtung räumlich moduliert wird. Das Prinzip des räumlich modulierten Wellenfeldes wurde 1993 von Bailey et al. entwickelt [Bailey et al. 1993]. Bei dem Heidelberger SMI Mikroskopieansatz wird das Objekt in hochpräzisen Schritten durch das Wellenfeld

bewegt. Die daraus resultierende Fluoreszenzintensitätsmodulation lässt axiale Größen und Distanzbestimmungen weit unterhalb der Auflösungsgrenze zu.

Der Aufbau des SMI-Mikroskops ist im Detail in den Publikationen [Albrecht et al. 2002] [Spöri 2004] [Reymann et al. 2008] beschrieben.

In lateraler Richtung kann durch strukturierte Beleuchtung und Anwendung des Moire-Effekts der zugängliche Frequenzraum erweitert werden, da die Modulation eines Signals mit einer Sinus-Funktion fester Frequenz einer Verschiebung im Fourierraum entspricht. Im günstigsten Fall kann die Auflösung um den Faktor 2 verbessert werden. Verfahren mit lateral strukturierter Beleuchtung sind beispielsweise I⁵M [Gustafsson et al. 1999] und SIM (engl. structured illumination microscopy) [Heintzmann und Cremer 1999].

1.14.3 Lokalisations-Mikroskopie

Weitfeld-Fluoreszenz-Techniken basierend auf der präzisen Bestimmung von Objektpositionen haben das Potenzial, die optische Auflösungsgrenze zu umgehen. Die Fluoreszenzlokalisationsmikroskopie ermöglicht also durch die genaue Ermittlung der Positionen der einzelnen Markierungen Aussagen über Strukturen und Dichteverteilungen im Bereich der Lokalisationsgenauigkeit zu treffen. Strukturelle Informationen weit unterhalb der Beugungsgrenze können durch eine unabhängige Detektion von "punktförmigen" Komponenten der Struktur erhalten werden, auch wenn der Abstand geringer ist als die konventionelle optische Auflösung. Dieses Ziel wird durch Nutzung verschiedener photo-physikalischer Eigenschaften von Fluoreszenz-Markierung ("spektralen Signaturen") erreicht.

Die Verfahren PALM (engl. photoactivated localisation microscopy) [Betzig et al. 2006], FPALM (engl. fluorescence photoactivation localisation microscopy) [Hess et al. 2006] und STORM (engl. stochastic optical reconstruction microscopy) [Rust et al. 2006] sind spezielle Varianten der Lokalisationsmikroskopie und nutzen die Eigenschaften photoschaltbarer oder photoaktivierbarer Fluorophore [Patterson und Lippincott-Schwartz 2002], die eine zeitliche Isolation ermöglichen, um damit eine räumliche Trennung einzelner Signale zu erreichen.

Bei den beiden Varianten PALM und FPALM befinden sich zu Beginn des Experimentes alle Moleküle in einem dunkeln Zustand. Durch Auswahl geeigneter Parameter (z.B. Anpassung der Anregungs-Laserintensität) werden nur Moleküle in einen hellen Zustand geschaltet, die einen räumlichen Abstand besitzen, der nach dem Abbe-

Kriterium auflösbar ist. Durch Anwendung eines 2D-Gauss-Fit wird der Intensitätsschwerpunkt der einzelnen Moleküle bestimmt. Nach der Aufnahme des Bildes werden die fluoreszenten Moleküle durch einen Bleichvorgang in einen dunkeln Zustand überführt, um weitere Zyklen anzuschließen. Dieser Zyklus wird vermehrt wiederholt und ermöglicht so die Rekonstruktion eines Bildes aus den erhaltenen Positionen.

STORM verwendet einen zusätzlichen Partnerfarbstoff zum Schalten des Detektionsfarbstoffes (z.B. Cy5 und Cy3). So kann Cy5 durch Bestrahlung mit rotem Laserlicht in einen dunklen Zustand geschaltet werden und durch Bestrahlung mit grünem Laserlicht in den hellen Zustand zurückkehren. Dieser Vorgang ist ein reversibler Prozess, der jedoch die Anwesenheit eines Partnerfarbstoffes benötigt.

Eine Weiterentwicklung von der Arbeitsgruppe von M. Sauer konnte zeigen, dass im Gegensatz zu früheren Arbeiten kein Aktivator als Photoschalter eingesetzt werden muss und komplizierte Mehrfachmarkierungen von Antikörpern oder anderen Zielmolekülen nicht erforderlich sind. Auch hier konnte eine optische Auflösung in Säugerzellen unterhalb der Auflösungsgrenze erreicht werden (~ 21 nm). Diese Methode wurde als dSTORM (engl. direct STORM) publiziert [Heilemann et al. 2008].

Erste Ansätze von SPDM (engl. spectral precision distance microscopy) [Cremer et al. 1996] [Bornfleth et al. 1998] [van Oijen et al. 1998] [Cremer et al. 1999] [Esa et al. 2000] erreichten die Trennung über die Verwendung unterschiedlicher Fluoreszenzfarbstoffe mit unterschiedlichen spektralen Eigenschaften [Cremer und Cremer 2006] [Cremer et al. 2010].

Eine Weiterentwicklung von SPDM erreicht die optische Isolation durch photophysikalische Veränderungen, die auf reversiblen Photobleichen von Fluoreszenzfarbstoffen beruhen. Dieses reversible Bleichen ist als Störeffekt in der Fluoreszenzmikroskopie bekannt und wurde ausgiebig bei fluoreszierenden Proteinen untersucht [Sinnecker et al. 2005]. Dem Übergang der Moleküle vom reversiblen gebleichten Zustand in den fluoreszierenden liegt ein stochastischer Effekt zu Grunde, welcher für die optische Isolation der Fluorophore genutzt wird. Vorteil dieses Verfahrens ist die Anwendung von konventionellen Farbstoffen unter Standard-Präparationsmethoden. Diese Technik erlaubt eine effektive optische Auflösung in biologischen Präparaten bis zu 10 Nanometern [Lemmer et al. 2008] [Lemmer et al. 2009] [Kaufmann et al. 2009] [Gunkel et al. 2009] [Gunkel et al. 2010]. Ein weiterer Vorteil ist die Möglichkeit, das biologische Präparat im Weitfeld-Modus anzuschauen,

B) Physikalische Grundlagen

um die Auswahl auf die biologische Fragestellung konkret anzupassen. 3D-SPDM beruht auf der Kombination von SMI- und 2D-SPDM. Durch SMI-Messungen mit einem stehenden Wellenfeld erhält man strukturelle Information in axialer Richtung. Bei SMI-Messungen kann entweder das Objekt in gleichen Schritten durch das Wellenfeld entlang der optischen Achse bewegt werden, oder die Phase des Wellenfelds über die Probe verschoben werden. Nach jedem Schritt wird das Fluoreszenzlicht von der Kamera erfasst und in einem Bild gespeichert. Die Bestimmung der räumlichen Ausdehnung der Struktur erfolgt über den Modulationskontrast, die relative Position der Objekte zueinander über ihren Phasenunterschied [Spöri 2004] [Reymann et al. 2008]. Im Anschluss an die SMI-Messungen wird eine SPDM-Messung ausgeführt, welche auf lateraler Ebene die Struktur-Information liefert. Durch diese Kombination dieser beiden Messungen kann jedem lokalisierten Molekül in der x-y-Ebene eine Position in z-Richtung präzise zugeordnet werden [Lemmer et al. 2009].

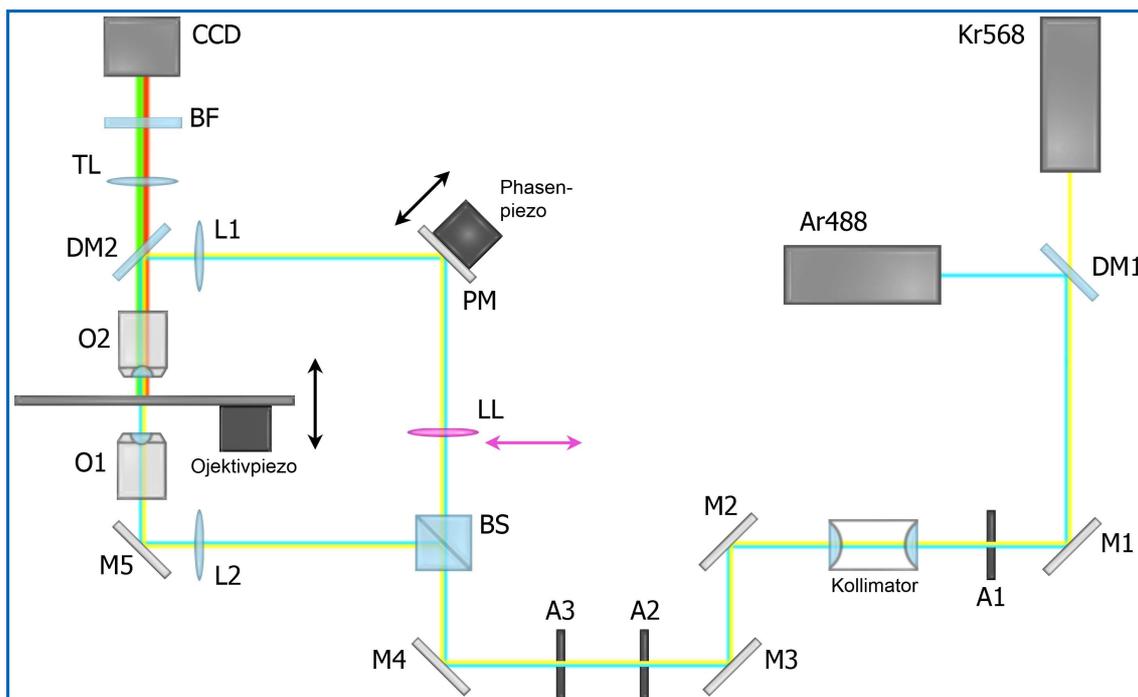


Abbildung 12: Mikroskopischer Aufbau des Vertico-SMI

[Kaufmann et al. 2009]

VII) Zielsetzung Lokalisationsmikroskopie

In der modernen Fluoreszenzmikroskopie spielen hochauflösende Verfahren zur Umgehung der Auflösungsgrenze von ungefähr 200 nm (nach Abbe/Rayleigh) eine immer größere Rolle, da die Darstellung kleiner Strukturen innerhalb der Zelle ermöglicht wird. Die Lokalisation einzelner fluoreszenter Moleküle kann zur Rekonstruktion eines Bildes mit einer effektiven optischen Auflösung weit unterhalb des Abbe-Limits genutzt werden.

Die hier in der Arbeit verwendete Methode der Lokalisationsmikroskopie basiert auf dem Effekt des reversiblen Photobleichens konventioneller Fluorophore, wie beispielsweise der fluoreszierenden Proteine (GFP, YFP) oder synthetischer Alexa-Farbstoffe. Die stochastische Rückkehr in den fluoreszierenden Zustand erlaubt eine zeitliche Isolation, die für eine optische Separation der Fluorophore genutzt werden kann. Durch die Anpassung einer Modellfunktion an die detektierten Signale kann die Position jedes einzelnen fluoreszenten Moleküls auf bis zu wenige Nanometer genau bestimmt werden. Da es sich hier um eine neue Methode handelt, die den Vorteil hat konventionelle Fluorophore zu verwenden, müssen Experimente durchgeführt werden, die Aufschluss über die Handhabung und Präparation der biologischen Präparate geben.

Welche A) Farbstoffe, B) Präparationsmethoden, C) Markierungsmethoden und D) Einbettmedien eignen sich für Lokalisationsmikroskopie?

Im Anschluss dieser Grundlagenexperimente soll eine aktuelle biologische Fragestellung bearbeitet werden, die sich mit der Verteilung und Clusteranalyse von Her-Rezeptoren in der Plasmamembran auf unterschiedlichen Zelllinien (krank vs. gesund, krank vs. krank) beschäftigt. Hier stellten sich die Fragen, ob man Unterschiede im Expressionsmuster erkennen und somit einen zusätzlichen Parameter für die medizinische Diagnostik gewinnen kann. Weiterhin sollten auch Unterschiede im Expressionsmusters der Her-Rezeptoren vor und nach Liganden-Stimulation untersucht werden. Viele aktuelle Fragestellungen in der Biologie erfordern die gleichzeitige Markierung unterschiedlicher Proteine oder Strukturen innerhalb der Zelle, um beispielsweise Aussagen über relative Verteilungen und Positionen treffen zu können. Daher sollten zusätzlich Zweifarben-Präparate erstellt werden, um die Fragestellung hinsichtlich der Rezeptor-Verteilung in 2D und 3D zu erörtern.

Dieses Verständnis der Biologie der Her-Rezeptoren könnte zu neuen Ansatzpunkten für die Therapie von Krebspatienten führen und wäre daher von enormer Bedeutung.

2. Material und Methoden

2.1 Material

Im Folgenden werden die für den jeweiligen Versuch benötigten Verbrauchsmaterialien und Lösungen vor den einzelnen Protokollen aufgeführt. Eine komplette Liste der Materialien befindet sich im Anhang dieser Arbeit.

2.2 Verwendete Zelllinien

Zelllinien	Herkunft	Zytogenetik
AG11132	etabliert aus normalem Gewebe einer Brustverkleinerung einer 16-jährigen Frau	humaner Karyotyp (diploider Chromosomensatz $46<2n>XX$) keine Abnormalitäten detektiert
Cal-51	Im Jahre 1985 etabliert von Metastasen im Pleuraraum einer 45-jährigen Frau mit progressiven Brustdrüsenkrebs (nach Bestrahlung, Chemotherapie und Operation)	humaner Karyotyp (diploider Chromosomensatz mit 28% Tetraploidie $46<2n>XX$) keine Abnormalitäten detektiert Tumor - Zelllinie mit normalem Karyotyp
SKBr3	etabliert aus dem Pleuralraum einer 43-jährigen Frau mit Brustdrüsenkrebs	humaner Karyotyp (hypertriploider Chromosomensatz- Chromosomenanzahl = 84 in 34%, Chromosomenanzahl = 80 in 28% und höher ploide Zellen in 7%); besitzt eine Amplifikation im Her2/neu - Gen und überexprimiert das Genprodukt

Tabelle 3: verwendete Zelllinien mit Herkunft und Zytogenetik

Cal-51 (Deutsches Ressourcenzentrum für biologisches Material - DSMZ, Braunschweig, Deutschland) und SKBR3 (American Type Culture Collection - ATCC, Manassas, USA) sind zwei Brustkrebs-Zelllinien aus Pleuraerguß, wobei die erste einen normalen Genotyp besitzt, die zweite eine Amplifikation des Her2/neu aufweist und den Her2/neu- Rezeptor auf der Plasmamembran überexprimiert. Cal-51 wurden in DMEM Medium (+ 20 % FCS, 1 % L-Glutamin, 1 % Penicillin / Streptomycin) und SKBR3 in McCoy's 5a Medium (+ 10 % FCS, 1 % L-Glutamin, 1 % Penicillin / Streptomycin) in einem Standard-CO₂-Inkubator (5 % CO₂, 37 °C, H₂O > sätt.) kultiviert. AG11132 sind menschliche Epithelzellen eines gesunden Spenders (Coriell Institut, Camden, USA) und wurden aus normalem Gewebe einer Brustverkleinerungs-Operation erhalten und etabliert. Die Zellen wurden in einem Brustdrüsenepithel Wachstumsmedium (MEGM),

welches mit 4 μl / ml Rinder-Hypophysen-Extrakt, 5 μg / ml Insulin, 5 ng / ml epidermaler Wachstumsfaktor, 0,5 μg / ml Hydrocortison (MEGM BulletKit von Lonza, Walkersville, USA) , 10^{-5} M Isoproterenol (Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland), 5 μg / ml Transferrin (Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland) und 10 mM HEPES-Puffer ergänzt wurde (Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland) in einem Standard-CO₂-Inkubator kultiviert.

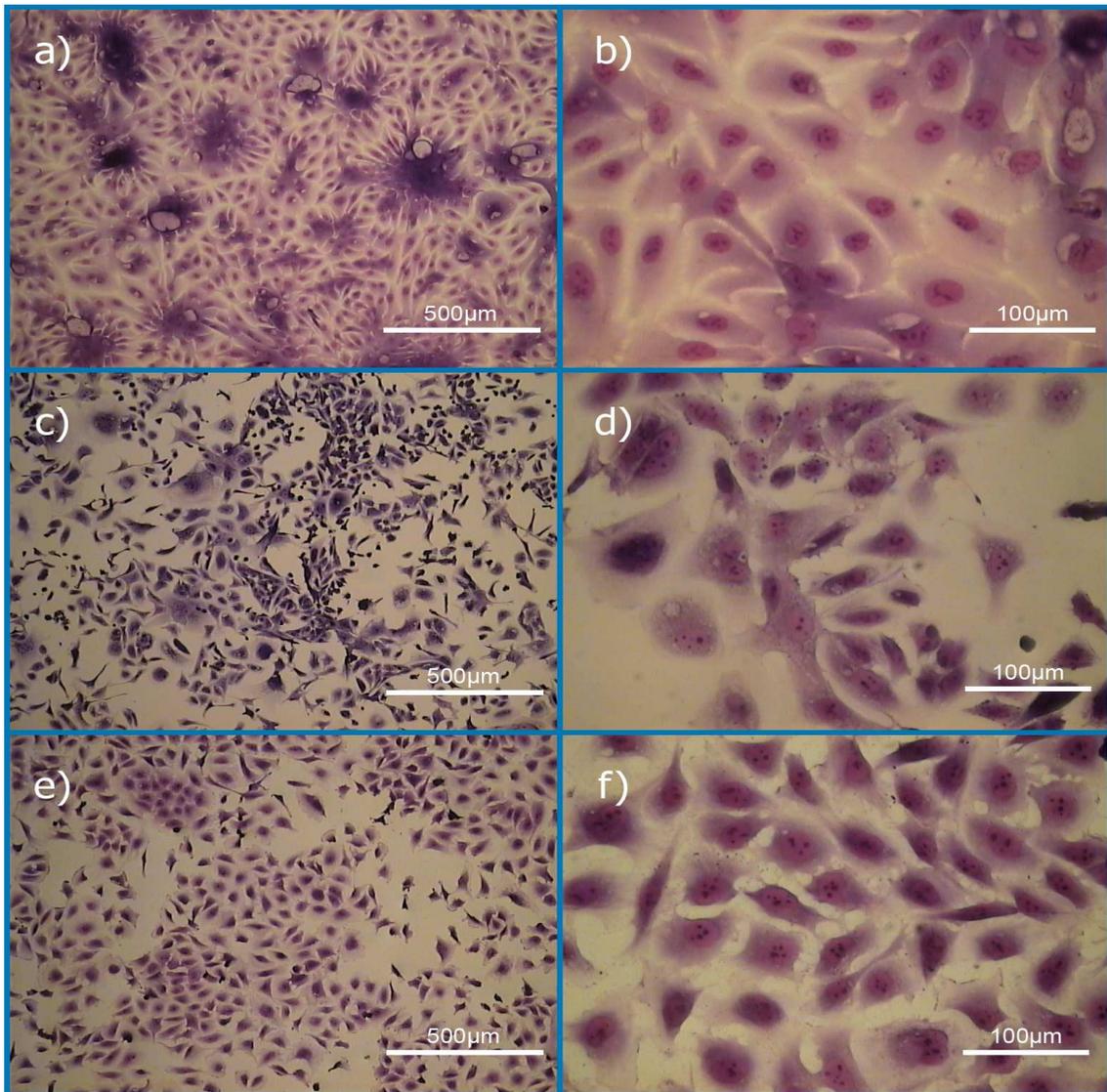


Abbildung 13: Giemsa-Färbungen von AG11132, Cal-51 und SKBr3

Zelllinie	Herkunft	Medium	Verdünnung	Zeit
Cal-51	Mammakarzinom	Dulbeccos modified Eagle medium (DMEM) + 20% Foetales Kälberserum (FCS) + 1% Penicillin / Streptomycin + 1% L-Glutamin	1:10	2-3 Tage
SKBr3	Mammakarzinom	Mc Coy´s 5A + 10% Foetales Kälberserum (FCS) + 1% Penicillin / Streptomycin + 1% L-Glutamin	1:10	2-3 Tage
AG11132	gesundes Brustgewebe	Brustdrüsenepithel Wachstumsmedium (MEGM) + 4 µl / ml Rinder-Hypophysen-Extrakt + 5 µg / ml Insulin + 5 ng / ml epidermaler Wachstumsfaktor + 0,5 µg / ml Hydrocortison + 10 ⁻⁵ M Isoproterenol + 5 µg / ml Transferrin + 10 mM HEPES-Puffer + 1 ml Gentamicin/Amphotericin	1:5	2-3 Tage
HeLa-H2B	Gebärmutterhalskarzinom	RPMI 1640 + 10% Foetales Kälberserum + 1% Penicillin / Streptomycin + 1% L-Glutamin	1:10	2-3 Tage

Tabelle 4: verwendete Zelllinien

Die Tabelle zeigt die verwendeten Zelllinien, deren Herkunft sowie die Zusammensetzung der entsprechenden Kulturmedien. Zusätzlich werden die Teilungsraten und die Zeitpunkte einer Teilung aufgelistet.

2.3 Zellkultur von adhärennten Zellen

Alle Zelllinien werden entweder in sterilen T25 oder T75 Zellkulturflaschen mit Gasaustauschdeckel bei 37°C und 5% CO₂ in einem befeuchteten Kulturschrank kultiviert. Die Zusammensetzung der Kulturmedien der unterschiedlichen Zellen ist in Tabelle 4 aufgeführt. Die Kulturmedien enthalten ein Antibiotikum, um eine Kontamination der Zelllinien zu vermeiden.

Um eine sterile Arbeitsumgebung zu schaffen, werden alle Zellkulturarbeiten in einer sterilen Werkbank, ausgestattet mit Bunsenbrenner und Absaugvorrichtung, durchgeführt. Die Sterilität, der von außen eingeführten Utensilien, wird durch das Abreiben mit 70%-igem Ethanol und anschließenden Abflammen erreicht.

Allgemeine Laborausstattung:

Absaugvorrichtung
Bunsenbrenner
NeoAccupette
Wasserbad
Zentrifuge
Kulturschrank 37 °C, 5% CO₂
Lichtmikroskop
Neubauer Zählkammer
Pinzetten

Eismaschine
Gefrierschrank -80 °C
Gefrierschrank -21 °C
Kühlschrank 4 °C
Autoklav
Spülmaschine
pH-Meter
Schüttler
Thermo-Mixer
Tischzentrifuge
Vortexer

2.3.1 Auftauen von Zellen

Da Zelllinien nicht permanent genutzt werden, besitzt man die Möglichkeit diese zu lagern und erst wieder bei Bedarf zu verwenden. Lagerung von Zellen bei - 80 °C kann für kurze Zeit durchgeführt werden.

Vorteile einer solchen Lagerung ist nicht nur die Aufbewahrung solcher Zellen, sondern auch der Schutz vor Kontamination und zusätzlich wirkt man der Variabilität durch Subkultivierung entgegen. Somit hat man die Möglichkeit Zellen zu einer bestimmten Passage einzufrieren und diese zu jedem beliebigen Zeitpunkt neu zu kultivieren.

Als Schutzsubstanz beim Einfrieren von Zelllinien diene Dimethylsulfoxid (DMSO), das die Kristallbildung innerhalb und außerhalb der Zellen sowie die partielle Dehydratation des Zytoplasmas verhindert.

Beim Auftauen von Zellen sollte daher der Auftauvorgang zügig vorgenommen werden und die Zellen schnellstmöglich in Kulturmedium überführt werden, da das beim Einfriervorgang zugesetzte DMSO toxisch auf die Zellen wirkt. Gleiches gilt beim Einfrieren nach der Überführung der Zellen in das Einfriermedium. Weiterhin sollte beim Einfrieren darauf geachtet werden, dass die Einfrierröhrchen den ersten Tag im -80 °C oder -150 °C Kühlschrank in einer Styroporbox gelagert werden, um den Einfriervorgang etwas zu verlangsamen.

Verbrauchsmaterial und Lösungen:

70% Ethanol
Kulturmedium

Zellkulturflaschen T25 und T75 mit Gasaustauschdeckel
Zentrifugenröhrchen 15 ml und 50 ml
Serologische Pipetten
Pasteurpipetten 230 mm

Protokoll:

- Kulturflasche vorbereiten
- Zentrifuge vorkühlen (10 °C)
- Eingefrorene Zellsuspension zügig auftauen und in bereits auf 37 °C vorgewärmtes Medium (5 ml) transferieren
- Zentrifugieren für 10 Min. bei 200 g und 10 °C
- Überstand mit steriler Pasteurpipette absaugen
- Resuspendieren des Pellet in Medium (5 ml)
- Überführen der Zellsuspension in die bereits mit 10 ml Medium vorbereitete Kulturflasche
- Kultivierung erfolgt im CO₂ – Inkubator
- Nach 24 Stunden erfolgt ein Mediumwechsel

2.3.2 Einfrieren von Zellen

Verbrauchsmaterial und Lösungen:

70% Ethanol
DMSO
Kulturmedium
Einfriermedium (95% Kulturmedium + 5% DMSO)
D-PBS

Kryoröhrchen steril 2 ml
Zentrifugenröhrchen 15 ml und 50 ml
Serologische Pipetten
Pasteurpipetten 230 mm

Protokoll:

- Einfriermedium (steril filtrieren!), Kulturmedium und Einfrierröhrchen auf Eis stellen
- Waschen (D-PBS) und Trypsinieren der Zellen, aufnehmen der Zellen in Kulturmedium und Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer bestimmen
- Zentrifugieren für 5 Min. bei 200 g und 4 °C
- Überstand abnehmen und das Pellet im Einfriermedium resuspendieren, dabei die Zellzahl auf 1×10^6 / ml einstellen
- Je 1 ml Zellsuspension in die Einfrierröhrchen aliquotieren und sofort auf Eis stellen
- Einfrierröhrchen in Styroporbox stellen und diese für den ersten Tag in -80 °C oder -150 °C Kühlschrank legen
- Lagerung erfolgt bei -80 °C oder -150 °C in Kryoboxen

2.3.3 Austausch des Zellkulturmediums

Zelllinien benötigen zu ihrem Wachstum einen regelmäßigen Wechsel des Kulturmediums, da bestimmte Bestandteile des Mediums einschließlich aller Zusätze entweder durch den Metabolismus der Zelle umgesetzt werden oder sie bei 37 °C im Laufe der Zeit zerfallen. Die Kulturmediumerneuerung und die Subkultivierung variiert von Zelllinie zu Zelllinie und ist abhängig vom Metabolismus und der Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen. Kulturmedien mit Phenolrot machen durch Farbumschlag den pH-Wert sichtbar.

Verbrauchsmaterial und Lösungen:

Kulturmedium

FCS

L-Glutamin

Penicillin / Streptomycin

70% Ethanol

Zellkulturflaschen T25 und T75 mit Gasaustauschdeckel

Pasteurpipetten 230mm

Serologische Pipetten

Protokoll:

- Kulturmedium frühzeitig auf 37 °C warm stellen
- Gebläse der Werkbank einschalten (Vorlauf ca. 20 Min.)
- Hände säubern
- Kultur auf mögliche Kontamination kontrollieren (Lichtmikroskop)
- Arbeitsfläche, Bunsenbrenner, Pipettierhilfe, Mediumflasche mit Alkohol abwischen.
- Kulturflasche mit Alkohol abwischen und in Werkbank stellen
- Kulturflasche aufschrauben, Deckel wenn möglich nicht auf Werkbank ablegen
- Pasteurpipettenbehälter vor dem Öffnen kurz abflammen
- Pasteurpipette durch schütteln entnehmen, Spitze kurz abflammen
- Medium vom Flaschenboden der Kulturflasche vorsichtig absaugen
- 15 ml Medium in Kulturflasche ohne Schaumbildung pipettieren, Flaschenhals dabei nicht berühren
- Kulturflasche wieder verschließen
- Alle nicht mehr benötigten Utensilien aus der Werkbank nehmen, Kulturflasche in Brutschrank (37 °C) stellen, Arbeitsfläche mit Alkohol säubern,

2.3.4 Passagieren von Zellen

Erreichen adhärente (anheftende) Zellen ihre Konfluenz, d.h. ihre dichtest mögliche Anordnung an der Oberfläche des Kulturgefäßes, hören die meisten Zellen auf sich zu teilen, es kommt zu einer so genannten Kontaktinhibition. Die am weitesten verbreitete Methode adhärente Zellen zu subkultivieren ist der Gebrauch von Trypsin in Verbindung mit EDTA (siehe Protokoll 1 und 2). Das Ablösen der adhären Zellen vom Substrat wird hierbei durch die Zugabe von der Endopeptidase Trypsin-EDTA erreicht, die bei kurzer Einwirkzeit nur die extrazellulären Adhäsionsproteine (Zell-Zell und Zell-Matrix Adhäsionspunkte) spaltet und die Zelle nicht schädigt.

EDTA ist ein Calcium-Chelator, d.h. die Calcium-Ionen werden komplexiert und stehen der Zelle nicht mehr zu Zelladhäsion zur Verfügung. Das Entfernen der Ca^{2+} -Ionen ist auch für das ungestörte Wirken von Trypsin erforderlich. Die Zellen kugeln sich ab und verlieren somit ihre Haftung. Die vereinzelt Zellen werden dann in einer geeigneten Verdünnung vom alten Kulturgefäß in eine neue Kulturflasche überführt. Dieser Vorgang gestaltet sich von Zelllinie zu Zelllinie verschieden. Nähere Informationen zum Passagieren der unterschiedlichen Zelllinien sind aus Tabelle 4 zu entnehmen.

Verbrauchsmaterial und Lösungen:

70% Ethanol
Trypsin-EDTA
Kulturmedium

Zellkulturflaschen T25 und T75 mit Gasaustauschdeckel
Zentrifugenröhrchen 15 ml und 50 ml
Serologische Pipetten
Pasteurpipetten 230 mm

Protokoll 1:

- Kulturmedium und Trypsin-EDTA auf 37 °C erwärmen
- Kulturflasche leicht schwenken und altes Medium vollständig abziehen
- Trypsin-EDTA in die Kulturflasche geben: T25 (1 ml) bzw. T75 (2 ml), durch leichtes schwenken der Kulturflasche Trypsin auf der ganzen Oberfläche verteilen, so dass alle Zellen damit in Berührung kommen
- Inkubieren für 2-4 Min. (abhängig von jeweiliger Zelllinie) bei 37 °C im Brutschrank
- Das Ablösen und Abkugeln der Zellen kann im Lichtmikroskop kontrolliert werden
- Abklopfen der Zellen von der Kulturflasche, Kontrolle im Lichtmikroskop, gegebenenfalls Inkubationsvorgang und Abklopfvorgang wiederholen
- Frisches Medium zugeben (5 - 10 ml), verbleibende Zellen mit dem Kulturmedium von der Unterlage abspülen
- Zellsuspension in Zentrifugenröhrchen überführen
- Zentrifugieren für 5 Min. bei 200 g und Raumtemperatur
- Überstand abnehmen, Pellet entsprechend der Teilungsrate in Kulturmedium resuspendieren, je x ml der Zellsuspension in eine neue Kulturflasche überführen und mit frischem Kulturmedium auf 5 ml (T25) bzw. 15 ml (T75) auffüllen
- Kulturflasche in Brutschrank (37 °C) zurückstellen
- Alle 2 - 3 Tage je nach Zelldichte eine weitere Passagierung vornehmen

Protokoll 2:

- Kulturmedium und Trypsin-EDTA auf 37 °C erwärmen
- Kulturflasche leicht schwenken und altes Medium vollständig abziehen
- Trypsin-EDTA in die Kulturflasche geben: T25 (1 ml) bzw. T75 (2 ml), durch leichtes schwenken der Kulturflasche Trypsin auf der ganzen Oberfläche verteilen, so dass alle Zellen damit in Berührung kommen
- Inkubieren für 2 - 4 Min. (abhängig von jeweiliger Zelllinie) bei 37°C im Brutschrank
- Das Ablösen und Abkugeln der Zellen kann im Lichtmikroskop kontrolliert werden. Kurz bevor die Zellen sich ablösen Kulturflasche aus dem Inkubator nehmen und sofort die Trypsin-EDTA Lösung entfernen.
- Frisches Kulturmedium zugeben (entsprechend der Teilungsrate – siehe Tabelle 4), alle verbleibenden Zellen mit dem Kulturmedium von der Unterlage abspülen
- Je nach gewünschter Verdünnung die entsprechenden Milliliter der Zellsuspension in eine neue Kulturflasche überführen und mit frischem Kulturmedium auf 5 ml (T25) bzw. 15 ml (T75) auffüllen
- Kulturflasche in Brutschrank (37 °C) zurückstellen
- Alle 2 - 3 Tage je nach Zelldichte eine weitere Passagierung vornehmen

Zellen, die relativ lose am Substrat gebunden sind oder Zellen, die sich gerade in der Mitose befinden, können durch einfaches Abklopfen, Schlagen an die Kulturflasche oder mehrfaches Abspülen mit Kulturmedium in Suspension gebracht werden und dann in eine neue Kulturflasche überführt werden. Meist ist die Zellausbeute so gering, dass der Vorgang mehrmals wiederholt werden muss.

Protokoll 3: („Shake off“ – Verfahren)

- Kulturflasche mit den konfluenten Kulturen entweder direkt aus dem Brutschrank (37 °C) oder 30 Min. geschlossen im Kühlschrank (4 °C) aufbewahren und dann in den sterilen Arbeitsbereich überführen
- 2 - 3 x kräftig an Kulturflasche klopfen (zusätzlich können die Zellen mit Kulturmedium abgespült werden)
- Kulturmedium direkt in steriles Zentrifugenröhrchen überführen

- Die Prozedur kann innerhalb von 30 Min. wiederholt werden, nachdem den Zellen frisches Medium zugeführt worden ist
- Zellen anschließend durch Zentrifugation (5 Min. / 200 g / Raumtemperatur) vom Kulturmedium trennen
- Neues Kulturmedium auf die Zellen geben und die Suspension auf neue Kulturflaschen verteilen

2.3.5 Zellzahlbestimmung und Vitalitätstest (Neubauer-Zählkammer)

Die Zellzahlbestimmung spielt eine wichtige Rolle bei der Subkultivierung von Zellen, da die Wachstumsgeschwindigkeit von der anfänglich zugesetzten Zellzahl von entscheidender Bedeutung ist. Daher sollten Zellen nicht zu dünn ausgesät werden, da sie dann nur sehr langsam oder gar nicht wachsen. Jedoch sollte man auch nicht zu viele Zellen aussäen, um unnötige Subkultivierungsschritte zu vermeiden und somit die Gesamtlebensdauer der Zelllinie zu erhöhen. Eine Zellzahlbestimmung sollte aufgrund der Variabilität des Zellwachstums vor jedem Subkultivierungsschritt durchgeführt werden.

Protokoll:

- 20 µl Zellsuspension der trypsinisierten Zellen entnehmen und in ein Eppendorfgefäß überführen
- Neubauer - Zählkammer und Deckglas säubern, Deckglas leicht anfeuchten und auf Zählkammer legen (das Erscheinen von so genannten „Newtonringen“ zeigt an, dass das Deckglas richtig angebracht ist und dass die Tiefe der Zählkammer richtig eingestellt ist [0,1 mm])
- Vitalfärbung mittels Trypanblau (20 µl, 1:1) oder Erythrosin durchführen (eine Zellzahlbestimmung beruht stets auf der Zahl vitaler Zellen, welche nicht unbedingt mit der Gesamtzellzahl übereinstimmt)
- Gefärbte Zellsuspension in die Zählkammer füllen, ansetzen der Pipette an der Kante der Zählkammer, wobei die Kapillarkräfte die Suspension selbst in den Zwischenraum zwischen Deckglas und Zählkammer saugen
- Die Kammer unter das Mikroskop legen und so lange bewegen bis die Einteilungslinien der Kammer sichtbar werden

2. Material und Methoden

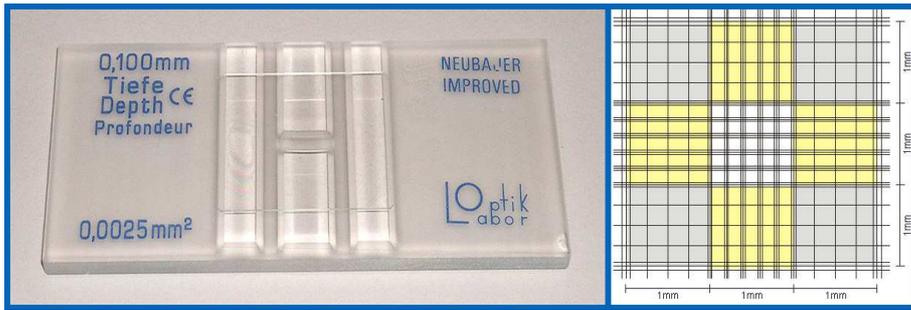


Abbildung 14: Neubauer Zählkammer und vergrößertes Zählfeld

[Lindl 2002]

Die Neubauer Zählkammer (Hämocytometer) besteht aus neun großen Quadraten. Jedes große Quadrat hat eine Fläche von 1 mm^2 , dies ergibt bei einer Tiefe von $0,1 \text{ mm}$ ein Volumen von $0,1 \text{ }\mu\text{l}$.

Mindestens vier große Quadrate auszählen und den Mittelwert errechnen
(Vorsicht! Zellen auf der Linie nur einmal zählen)

Berechnung der Zellzahl:

Durch Multiplikation des Mittelwerts der vier großen Quadrate mit 10^4 erhält man die Zellkonzentration pro Milliliter. Die Gesamtzahl ergibt sich aus dem Volumen der Zellsuspension mal der Zellzahl pro ml (Verdünnungsfaktor der Zellsuspension berücksichtigen!)

Der Prozentsatz an lebenden Zellen berechnet sich aus:

$$\% \text{ lebende Zellen} = (\text{ungefärbte Zellen} / \text{ungefärbte Zellen} + \text{gefärbte Zellen}) \times 100$$

2.3.6 Aussäen von Zellen

Das Aussäen von Zellen erfolgt auf den vorgereinigten Objektträgern oder Deckgläsern. Hierbei werden entweder die Objektträger (OT) in quadriPERM-Behältern platziert oder die Deckgläser (DG) in 6 Well-Platten. Danach kommt es nach der Zellzahlbestimmung mittels Neubauer-Zählkammer zum Auftropfen der Zellsuspension. Die Zellen werden nach einer kurzen Zeit mit Kulturmedium überschichtet und bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ und 5 \% CO_2 solange kultiviert bis sie die gewünschte Konfluenz erreicht haben.

Verbrauchsmaterial und Lösungen:

70% Ethanol

Trypsin-EDTA

Kulturmedium

quadriPERM (PAA)

Gewebekulturplatten 6 Well

Vorbehandelte Deckgläser # 1.5, 20 x 20 mm oder 24 x 24 mm (Menzel-Gläser)

Vorbehandelte Objektträger

Zentrifugenröhrchen 15 ml und 50 ml

Pasteurpipetten 230 mm

Protokoll:

- 6 Well-Gewebekulturplatten oder quadriPERM mit vorbehandelten DG oder OT bestücken
- Trypsinieren der konfluent gewachsenen Zellen
- Inkubieren für 2 - 4 Min. bei 37 °C im Brutschrank
- Abklopfen der Zellen von der Kulturflasche
- Frisches Medium zugeben (7 - 10 ml), Zellen mit dem Medium von der Unterlage abspülen
- Zellsuspension in Zentrifugenröhrchen überführen
- Zentrifugieren für 5 Min. bei 200 g und Raumtemperatur
- Überstand absaugen
- Pellet entsprechend der Passagierate in Kulturmedium resuspendieren
- Je x µl der Zellsuspension auf vorbehandelte DG oder OT auftropfen. Zellen kurz absetzen lassen und dann mit 2 - 4 ml Kulturmedium auffüllen
- 6 Well-Gewebekulturplatten oder quadriPERM in Brutschrank zurückstellen
- Zelldichte täglich kontrollieren bis die gewünschte Konfuenz erreicht ist

2.4 Molekularbiologische Arbeiten mit Zellen

2.4.1 Vorbehandlung von Objektträgern und Deckgläsern

Nach der Resuspension der Zellen im Kulturmedium kann das Aussäen der Zellen auf gereinigten und sterilisierten Deckgläsern erfolgen. Die Kultivierung erfolgt in einer 6 Well Gewebekulturplatte.

Alle verwendeten Objektträger und Deckgläser werden vor dem Gebrauch mit 70 % Ethanol behandelt, um alle Rückstände auf dem Glas zu entfernen. Dieser Reinigungsschritt hilft den Hintergrund bei der Mikroskopie zu minimieren und verhindert unspezifische Bindung des Sondenmaterials. Das Backen bei 200 °C eliminiert die noch vorhandenen RNasen und wirkt ebenfalls unspezifischen Bindungen entgegen.

Verbrauchsmaterial und Lösungen:

70% Ethanol
ddH₂O

Deckgläser # 1.5, 20 x 20 mm oder 24 x 24 mm
Objektträger
Alufolie
Fusselfreie Tücher

Protokoll:

- Objektträger oder Deckgläser (20 x 20 mm oder 24 x 24 mm) mit ddH₂O abspülen
- 24 Stunden in 70 % Ethanol lagern
- Säubern mit fusselfreien Tüchern und anschließend kurz in 70 % Ethanol eintauchen
- OT bzw. DG lufttrocknen
- Trockene OT bzw. DG einzeln in Alufolie verpacken und 4 - 5 Stunden in Trockenschrank (200 °C) lagern
- Vorbehandelte OT bzw. DG können nun zum Aussäen von Zellen genutzt werden.

2.4.2 Fixierung von Zellen auf Objektträgern oder Deckgläsern

Formaldehyd ist ein in der Biologie weit verbreitetes Fixativ. Meist wird es in Konzentrationen zwischen 1 % und 4 %, gepuffert auf neutralen pH-Wert verwendet, um entweder Gewebe oder Zellkulturen zu fixieren.

Dabei werden die Proteine durch den Aufbau einer kovalenten Bindung vernetzt. Vorteil dieser Fixierung ist zum einen die extrem verlängerte Aufbewahrungszeit der Präparate und zum anderen die Strukturhaltung der Zellen, die bei Untersuchungen der Genomarchitektur von enormer Bedeutung ist.

Verbrauchsmaterial und Lösungen:

Fixativ (4% Paraformaldehyd in 1 × PBS)
70% Ethanol
Trypsin-EDTA
D-PBS

quadriPERM
Gewebekulturplatten 6 Well
Vorbehandelte Deckgläser # 1.5, 20 x 20 mm oder 24 x 24 mm
Vorbehandelte Objektträger

Protokoll:

- OT oder DG 2 - 3 x mit vorgewärmten D-PBS spülen
- Inkubieren der Zellen im Fixativ für 10 Min. bei Raumtemperatur
- Abziehen des Fixativs und sofortige Zugabe von PBS
- (Vorsicht! Zellen ab diesem Schritt nicht austrocknen lassen.)
- 2 – 3 x mit PBS waschen

Fixierte Präparate können für einige Wochen bei 4 °C im Kühlschrank gelagert werden. Bei längerer Lagerung kann die Zugabe von 0,1 % Natrium-Azid eine Verunreinigung mit Mikroorganismen verhindern.

2.5 Molekularbiologische Arbeiten mit Blutlymphozyten

2.5.1 Isolierung von peripheren Blutlymphozyten (FicolTM Gradienten)

Anwendung findet dieses Verfahren bei der Fixierung von Zellen und Zellkernen sowie zur Herstellung von Chromosomenpräparaten. Nach Isolierung der peripheren Blutlymphozyten über einen FicolTM Gradienten wird heparinisiertes Vollblut mit Phytohämagglutinin (PHA) stimuliert und über drei Tage in Kultur genommen. Während des Kultivierungsvorganges gehen aufgrund der vorherrschenden Bedingungen die Granulozyten verloren. Durch Anwendung von Colcemid (Alkaloid der Herbstzeitlosen) wird die Ausbildung der Spindelfasern blockiert und somit das Auseinanderweichen der Schwesterchromatiden verhindert. Zusätzlich kann bei längerer Einwirkzeit von Colcemid eine stärkere Kondensation der DNA beobachtet werden. Der nächste Präparationsschritt mit einer hypotonen Kaliumchloridlösung (KCl-Lösung) erhöht das Zellvolumen um ein Vielfaches und bewirkt ein Anschwellen des Chromatins, wodurch es mikroskopisch besser sichtbar wird. Das Anwärmen der Lösung verstärkt diese beiden Effekte. Die kernlosen Erythrozyten werden während dieses Behandlungsschrittes lysiert und dadurch eliminiert. Bei den Lymphozyten hingegen kommt es durch die Volumenzunahme, resultierend aus der KCl-Behandlung, beim Auftropfen auf den nassen Objektträger zur Lyse. Zu den nun stimulierten und in der Metaphase abgestoppten Lymphozyten wird die auf 4 °C gekühlte Methanol/Eisessig-Lösung (Verhältnis 3:1) tropfenweise hinzugegeben. Die Fixierung wird durch das Ausfällen von Proteinen erreicht und ist ein Konservierungsprozess, der die Gewebestrukturen härtet und den Verlust von Nukleinsäuren verhindert. Das in dem Gemisch befindliche Methanol wirkt als Zellhärtungsstoff, die Essigsäure hingegen als Weichmacher.

Die auf diese Weise behandelten Zellen können zur Herstellung von Interphase- sowie auch von Metaphasepräparaten genutzt werden.

Probleme, die bei fehlerhafter Fixierung auftreten können, sind:

- Strukturveränderungen der Zellen und Zellkerne (z.B. Abflachen der Zellen)
- Verlust von DNA

Um den detaillierten Präparationsverlauf nachvollziehen zu können sind im Folgenden die ausführlichen Protokolle mitsamt den verwendeten Reagenzien beschrieben.

Verbrauchsmaterial und Lösungen:

Ficoll™
Kulturmedium (RPMI 1640/FCS,1:1)
D-PBS
Zentrifugenröhrchen 15 ml und 50 ml

Protokoll:

- 20 ml vorgewärmte (37 °C) Ficoll-Lösung in 50 ml Zentrifugenröhrchen vorlegen und langsam mit 30 ml heparinisiertem Vollblut überschichten, so dass zwei getrennte Phasen entstehen
- Zentrifugieren für 20 Min. bei 200 g und Raumtemperatur (ohne Bremse)
- Überführen der mit Lymphozyten angereicherten Schicht (engl. buffy coat) in ein neues Zentrifugenröhrchen, Rest verwerfen
- Zum Entfernen des restlichen Ficoll, die Zellen mit einem Überschuss an RPMI 1640/FCS (1:1, 37 °C) waschen
- Zentrifugieren für 10 Min. bei 200 g und Raumtemperatur
- Pellet mit 1x D-PBS waschen
- Zentrifugieren für 10 Min. bei 200 g und Raumtemperatur
- Waschschrift mit D-PBS 2 - 3 x wiederholen
- Überstand verwerfen und die Zellen in einem geeignetem Kulturmedium resuspendieren

2.5.2 Kultivierung und Fixierung von peripheren Blutlymphozyten

Verbrauchsmaterial und Lösungen:

Chromosom Medium B + Phytohaemagglutinin (PHA)
Colcemid (10 µg / ml)
KCl (75 mM)
Fixativ: Methanol / Eisessig (3:1)
Zentrifugenröhrchen 15 ml und 50 ml

Protokoll:

- 1 ml vorgewärmtes (37 °C) Chromosomen Medium B mit Phytohaemagglutinin (PHA) zu 10^6 Zellen hinzufügen
- Inkubieren für 72 Stunden bei 37 °C in einem mit 5 % CO₂ - Inkubator
- Colcemid (10 µg / ml) zugeben und mischen
- Inkubieren 10 - 30 Min. bei 37 °C
- Zentrifugieren für 10 Min. bei 200 g und Raumtemperatur
- Überstand bis auf 2 ml abnehmen und verwerfen
- Pellet vorsichtig resuspendieren
- Tropfenweise unter leichtem Schwenken vorgewärmte (37 °C) 75 mM KCl-Lösung (ca. 5 ml) zufügen
- Mit KCl-Lösung auf 12 ml auffüllen
- Inkubieren 15 Min. bei 37 °C
- Zentrifugieren für 10 Min. bei 200 g und Raumtemperatur
- Überstand bis auf 2 ml abnehmen und verwerfen
- Pellet vorsichtig resuspendieren
- Tropfen für Tropfen unter leichtem Schwenken ca. 5 ml Methanol / Eisessig (3:1, -21 °C) zufügen
- Auffüllen auf 12 ml und durch auf den Kopf drehen vorsichtig mischen
- Lagern bei 4 °C über Nacht
- Zentrifugieren bei 200 g für 10 Min.
- Der Fixierungsvorgang sollte 3-4 x wiederholt werden bis der Überstand farblos und das Pellet weiß bis transparent erscheint.

Die Methanol/Eisessig-Fixierung von adhären Zellen verläuft gemäß dem oben aufgeführten Protokoll, wobei die Inkubationszeit mit Colcemid von Zelllinie zu Zelllinie variiert.

Die Interphase-Präparation verläuft mit einer Ausnahme nach demselben Protokoll. Die Colcemid-Behandlung wird ausgelassen, da die Arretierung in der Metaphase nicht notwendig ist. Je nachdem, ob man hypoton- oder nicht-hypoton behandelte Zellen verwenden möchte, wird die Behandlung mit Kaliumchlorid-Lösung durchgeführt oder übersprungen.

2.5.3 Metaphasen-Präparation

Verbrauchsmaterial und Lösungen:

Colcemid (10 µg / ml)
KCl (75 mM)
Fixativ: Methanol / Eisessig (3:1)
Trypsin/EDTA (10x)
Kulturmedium

Zentrifugenröhrchen 15 ml und 50 ml

Protokoll:

Kultivierung und Blocken

- Zellen in T75-Kulturflasche aussäen und über Nacht in einem CO₂-Inkubator (37 °C) bis zu 40 % Konfluenz wachsen lassen
- Colcemid zugeben, mischen und Zellen 1 - 2 Stunden oder über Nacht inkubieren
- Zellen trypsinieren und in 10 ml Kulturmedium aufnehmen
- Überführen in 15 ml Zentrifugenröhrchen und für 10 Min. bei 200 g und Raumtemperatur zentrifugieren

Hypotonische Behandlung

- Überstand abnehmen und verwerfen. Pellet in 5 ml KCl-Lösung resuspendieren
- Inkubation für 10 - 30 Min. bei 37°C
- 10 Min. bei 200 g und Raumtemperatur zentrifugieren
- Überstand abnehmen. Zellen in einem kleinen Volumen von restlichem KCl resuspendieren

Fixierung

- Tropfen für Tropfen unter leichten Schwenken Fixativ hinzufügen (ca. 5 ml)
- Auffüllen auf 12 ml und vorsichtig durch auf den Kopf drehen mischen
- Lagerung auf -21 °C über Nacht
- Fixierungs-Vorgang 3 - 4x wiederholen bis Überstand farblos und das Pellet weiß bis transparent erscheint

2.5.4 Präparation von Metaphase-Spreitungen durch Auftropfen

Verbrauchsmaterial und Lösungen:

Zell-Suspension (auf Eis!)

70 % Ethanol

ddH₂O

Fusselfreie Tücher

gereinigte Deckgläser # 1.5, 20 x 20 mm oder 24 x 24 mm

gereinigte Objektträger

Protokoll:

Reinigung der OT bzw. DG

- Objektträger oder Deckgläser (20 x 20 mm oder 24 x 24 mm) mit 70 % Ethanol abspülen
- Säubern mit fusselfreien Tüchern und anschließend erneut kurz in 70 % Ethanol Eintauchen
- OT bzw. DG in ddH₂O stellen
- 10 Min. bei 200 g und Raumtemperatur Zell-Suspension zentrifugieren
- Überstand verwerfen
- Zell-Pellet in eiskaltem Fixativ resuspendieren (Zell-Dichte kontrollieren)
- Gereinigte Objektträger in ddH₂O tauchen
- ~ 10 µl der Zellsuspension von ca. 1 cm horizontal auf den noch nassen Objektträger tropfen
- gegebenenfalls 45 Sekunden über Wasserdampf halten
- Kontrolle der OT im Lichtmikroskop
- OT in 70 % Ethanol stellen, um Eisessig zu entfernen

2.5.5 Präparation von Metaphase-Spreitungen mittels Zytospin

Die Zytospin erlaubt das Sedimentieren von Zellen auf einen klar definierten Bereich des Objektträgers. Dabei werden Restflüssigkeiten über die Filterkarten der Probenkammer absorbiert. Die Zellen werden durch diese Präparationstechnik stark abgeflacht und ermöglichen so eine gute mikroskopische Darstellung.

Für Chromosomen Spreitungen wurde H2B-GFP exprimierende HeLa-Zellen mit Colcemid für 10 Minuten behandelt, trypsiniert, geerntet und in hypotonischen Puffer für 10 Minuten resuspendiert. Die hypotonen Zellen wurden auf Poly-L-Lysin beschichteten Objektträgern mittels Shandon Zytospin 4 Zytozentrifuge (Shandon Scientific, Astmoor, GB) aufgebracht und anschließend mit 4 % Formaldehyd für 10 min fixiert (siehe Protokolle Kapitel 2.4.3 und 2.3.2) .

Einstellungen der Shandon Zytospin 4 Zytozentrifuge:

- Geschwindigkeit: 1200 rpm
- Beschleunigung: Hoch
- Dauer der Zentrifugation: 2 Minuten
- Volumen der zugegebenen Zellsuspension: 50 µl

2.6 Molekularbiologische Methoden

2.6.1 Diffusion

Verbrauchsmaterial und Lösungen:
Zentromer 9 PNA-Sonde
Zelllinie mit entsprechendem Kulturmedium
serumfreies Kulturmedium
Fluorodish

Die Diffusion ist ein physikalischer Prozess der zu einer gleichmäßigen Verteilung von Teilchen führt. Durch die thermische Eigenbewegung von Teilchen kommt es zum Abbau von Konzentrationsunterschieden bis hin zu einer vollständigen Durchmischung zweier Stoffe. Die dafür benötigte Zeit wächst mit dem Quadrat des Abstandes und ist somit vor allem für kurze Strecken wirksam (nm – mm Skala).

Protokoll:

Aussäen von Zellen (siehe Kapitel 2.2.5):

- Inkubation der Zellen bei 37 °C in einem CO₂-Inkubator bis die Zellen maximal 80 % Konfluenz erreicht haben
- 2 µl Zentromer 9-PNA-Sonde in 200 ml serumfreies Kulturmedium zugeben
- Zellen bei 37 °C in einem CO₂-Inkubator kultivieren

Abschließend werden die Zellen nach 24 Stunden fixiert und eingedeckelt (Protokoll siehe Kapitel 2.3.2).

2.6.2 MATra

Verbrauchsmaterial und Lösungen:

MATra-Reagenzien
Zentromer 9 PNA-Sonde
Zelllinie mit entsprechendem Kulturmedium
Serum- und Zusatz-freies Kulturmedium

6 Well-Platte
Deckgläser # 1.5, 20 x 20 mm oder 24 x 24 mm
Objektträger
Magnetplatte
Serologische Pipetten
Eppendorf-Gefäße

Magnet assisted Transfection (MATra) ist eine Methode, die durch Assoziation von Nukleinsäure (Plasmid DNA, Oligonukleotide oder siRNA) mit magnetischen Nanopartikel (~ 100 – 200 nm), eine effiziente Transfektion von Zellen in Kultur ermöglicht. Durch eine starke magnetische Kraft, werden die Nukleinsäure-Nanopartikel Komplexe auf die Zytoplasma-Oberflächen der Zellen gezogen, was zu einer hohen Transfektion Effizienz führt (siehe Abbildung 15).

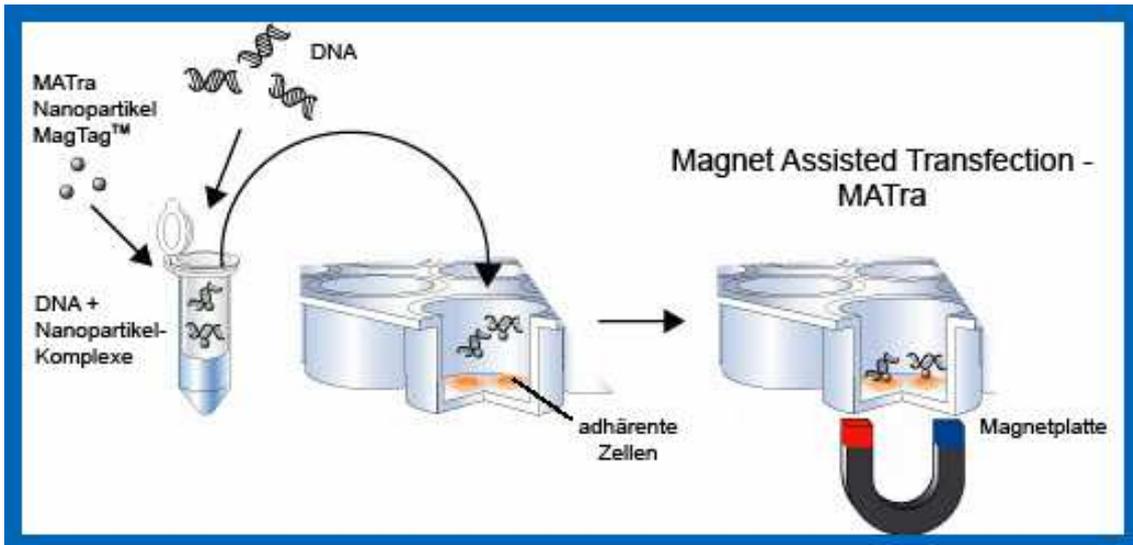


Abbildung 15: Prinzip der Magnet Assisted Transfection (MATra)

[IBA, Göttingen, Deutschland]

Protokoll:

Aussäen von Zellen (siehe Kapitel 2.2.5):

- Inkubation der Zellen bei 37 ° C in einem CO₂-Inkubator bis die Zellen maximal 30-60% Konfluenz erreicht haben

MATra für adhärente Zellen in 6-Well-Platten:

- 1 µl Zentromer 9-PNA-Sonde in 200 µl Medium frei von Serum und Antibiotika zugeben
- 3 µl MATra-A-Reagenz zugeben (1 µl Reagenz pro 1 µg Nukleinsäure)
- Inkubation für 20 Minuten bei Raumtemperatur
- Medium abziehen und zusammengestellte Lösung (2 ml Medium frei von Serum und Antibiotika + 200 µl MATra-A + Zentromer 9-PNA-Sonde) auf die Zellen geben und durch auf – und abpipettieren vorsichtig mischen
- Unmittelbar nach Zugabe der Transfektions-Lösung 6-Well-Platte für 15 Min. auf die Magnetplatte stellen
- Entfernen der Magnetplatte
- Austausch der Transfektions-Lösung mit entsprechendem Kultturmedium
- Zellen bei 37 °C in einem CO₂-Inkubator kultivieren bis gewünschte Transfektionsrate erreicht ist (~ 48 Stunden)

Abschließend werden die Zellen fixiert und eingedeckelt (Protokoll siehe Kapitel 2.3.2).

2.6.3 Mikroinjektion

Die Mikroinjektionsanlage wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Prof. Lichter zur Verfügung gestellt, DKFZ Heidelberg

Verbrauchsmaterial und Lösungen:
70% Ethanol
Trypsin-EDTA
Zelllinie mit entsprechendem Kulturmedium
20 mM HEPES-Kulturmediumlösung
Mikroinjektionspuffer
Zentromer 9 PNA-Sonde
Gegenfärbung: TOPRO-3-Jodid
Petrischalen
Gewebekulturplatten 6 Well
Vorbehandelte Deckgläser # 1.5, 18 x 18 mm
Pinzette
Microloader
Mikrokapillare
Styroporbox
Wärmebeutel

Für die Mikroinjektion werden die Deckgläser nach dem schon erläuterten Protokollen (siehe 2.3.1) vorbehandelt. Die Zellen werden in einer Petrischale auf den vorbehandelten Deckgläsern ausgesät (siehe 2.2.5).

Weiterhin muss eine 20 mM HEPES-Kulturmediumlösung hergestellt werden, die über Nacht bei 37°C gelagert wird. Diese Puffer-Lösung ermöglicht durch Konstanthaltung des pH-Werts im Kulturmedium das Injizieren der vitalen Zellen ohne CO₂ und bei Raumtemperatur. Zusätzlich wird die Injektionslösung mittels Injektionspuffer (Zusammensetzung siehe Tabelle 11) auf die gewünschte Konzentration eingestellt. Man sollte für den nächsten Tag auch eine Styroporbox mit Wärmebeutel zur Verfügung haben, um gegebenenfalls einen Transport der Zellen zu ermöglichen.

Protokoll:

- Medium absaugen und mit je 4 ml 20 mM HEPES-Kulturmediumlösung auffüllen

Da die Mikroinjektion bei Raumtemperatur und ohne CO₂ stattfindet werden die Zellen trotz Hepes-Kulturmedium nicht länger als 30 Min. injiziert. Die HEPES-

Kulturmediumlösung wirkt hierbei stabilisierend auf den pH-Wert des Mediums und erhält somit die Vitalität der Zellen.

Die verwendete Mikroninjektionsanlage ist ein AIS2-System2 [Kern] und besteht aus einem Mikroskop mit einem entsprechenden Mikroinjektionsaufsatz, einem PC mit der AIS2 Software, einem Femtojet und aus den Kontrolleinheiten für die Motoren. Die Mikroinjektion ist ein vollautomatisiertes Verfahren. Der Benutzer steuert die Anlage über eine Kontrolleinheit und der AIS2 Software vom PC aus (siehe Abbildung 16). Die Injektion erfolgt, indem die zu injizierende Zelle mit einem Mausklick auf dem Bildschirm markiert wird. Anhand der Koordinaten der Markierung wird die Zelle über Motoren angefahren und durch eine automatisierte Injektionsbewegung mit Injektionslösung beladen. Die auf der Zelle verbleibende Markierung und ein 8 x 8 Raster über dem Arbeitsbereich ermöglicht eine systematische Mikroinjektion und verhindert eine zweifache Injektion der gleichen Zelle.

Das Ziehen der Kapillare erfolgt an einem dafür vorgesehenen Gerät.

- Programm 10 verwenden (Durchmesser der Kapillarspitze 300-500 nm)

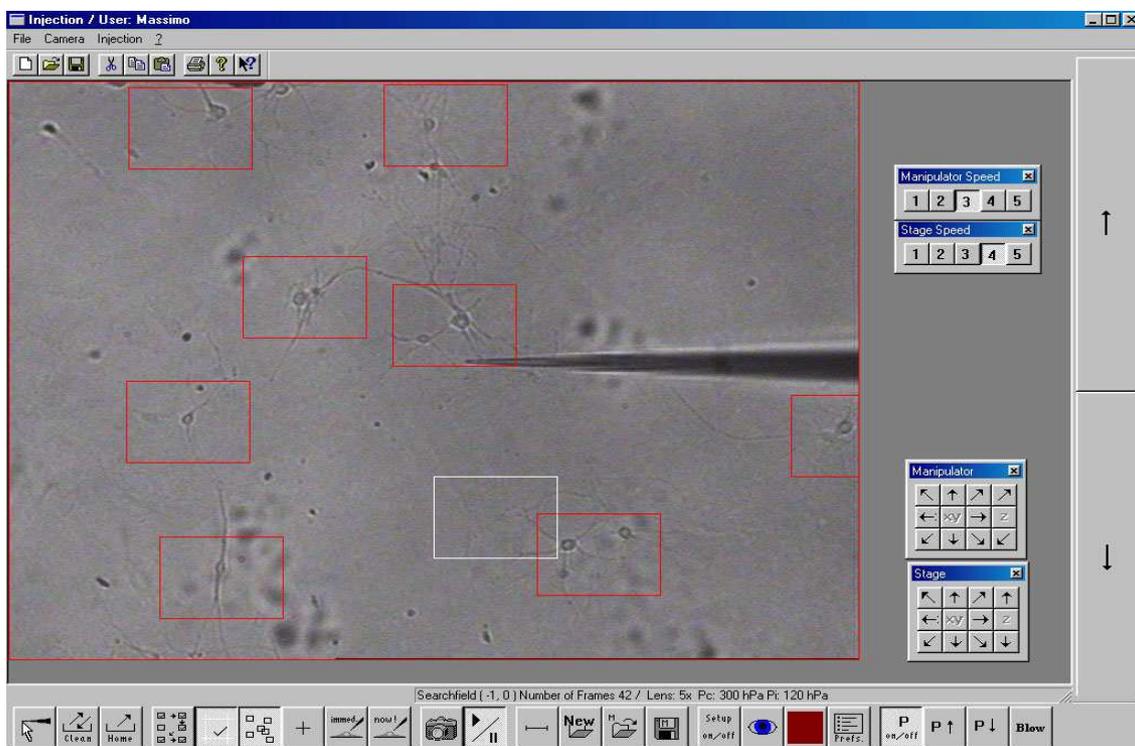


Abbildung 16: Bedieneroberfläche der Mikroinjektionsanlage

[Kern 2006]

2. Material und Methoden

Bedienungsfelder:

- Manipulator und Stage: Steuerung der Motoren und Mikroskoptisches
- Untere Leiste: Steuerung der Mikroinjektionsschritte und der Kalibration des Gerätes

Mikroinjektion:

- Starten des Computers und der AIS2-Software
- Starten des Femtojet (Injektionsschlauch abziehen für ordnungsgemäßen Druck aufbau)
- Objektiv mit minimaler Vergrößerung einstellen
- Füllen einer Kapillare mit der zu injizierenden Substanz unter Verwendung von Microloader-Pipettenspitzen. Kapillare schütteln um Luftblasen zu entfernen
- Kapillare in die Kapillarhaltespitze einsetzen
- Petrischale in die dafür vorgesehene Halterung einsetzen
- Deckglas in die Mitte der Petrischale schieben (Pinzette zuvor abflammen), da der Aktionsradius der Kapillare, aufgrund der Petrischale eingeschränkt ist.
- Kapillare an die Petrischale heranfahren
- Kapillarspitze absenken bis die Spitze das Kulturmedium berührt
- Kapillarspitze weiter in das Kulturmedium absenken (langsam!) bis die Spitze der Kapillare auf dem Bildschirm sichtbar wird
- Spitze in der Mitte des Monitors platzieren
- Objektivwechsel hin zu 32-40 x Vergrößerung.
- Einstellen der Fokusebene (obere Zellkernmembran anfokusieren)
- Kapillare absenken bis die Spitze oberhalb der Zellen ist (langsam und vorsichtig!)
- Die Kapillarspitze darf sich an diesem Punkt noch nicht im Fokus befinden
- Setup on/off Knopf drücken. Höhe der Kapillarspitze einstellen
- Anklicken der Kapillarspitze
- Prefs. Knopf drücken, um Injektionsdruck p_i , Kompensationdruck p_c und Injektionszeit einzustellen

Der Injektionsdruck und -zeit sind zelltypspezifische Parameter und müssen für jeden Zelltyp eingestellt werden. Für die injizierten Zellen (Cal-51) wurde ein

Injektionsdruck von 50 hPa und eine Injektionszeit von 0.5 Sek. gewählt. Der Kompensationsdruck ist so zu wählen, dass sich die zu injizierende Flüssigkeit im Gleichgewicht befindet (~ 30 hPa).

- + Knopf drücken. 8 x 8 Raster wird über den Arbeitsbereich gelegt und die zu injizierenden Zellen werden mit einem Kreuz markiert.
- Mikroinjektion der im Arbeitsbereich befindlichen Zellen starten
- Gegebenenfalls neue Region auswählen und erneut mikroinjizieren.

Bei einer Verschmutzung oder Verstopfung der Kapillarspitze Clean Knopf drücken. Der Clean Knopf verursacht einen 0.1 s langen Injektionsdruck von 6000 hPa.

- Home Knopf drücken und Kapillare in Ruheposition fahren, um Kapillarspitze zu wechseln oder Injizieren zu beenden

Nach Beenden des Injektionsvorgangs wird die HEPES-Kulturmedium Lösung gegen das Standardkulturmedium ausgetauscht. Die injizierten Zellen werden für 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ im Kulturschrank inkubiert. Nach 24 Stunden werden die Zellen fixiert und eine Gegenfärbung der Kern-DNA vorgenommen (Kapitel 2.3.2).

Die Detektion der Zentromer 9 PNA-Sonde, welche am 5'-Ende den Fluoreszenzfarbstoff Oregon Green 488[®] trägt, erfolgt am konfokalen Spinning Disk mit einem 100 x PlanApo NA 1.4 Objektiv. Die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe, TOPRO-3-Jodid für die Färbung der DNA des Zellkerns (Gegenfärbung) und Oregon Green 488[®], wurden mit einem Laser mit den Wellenlängen 488 nm und 647 nm angeregt.

2.6.4 FISH und COMBO-FISH

Durch eine mit Fluorochromen markierte Sonde ist es möglich, bei einer Fluoreszenz in situ Hybridisierung eine spezifische Gensequenz sichtbar zu machen. Bei den hier verwendeten Sonden handelte es sich zum einen um eine repetitive Sequenz für die Subregion des Zentromer 9 und zu anderen um genspezifische Sonden für Her2/neu und GRB7.

Herstellung der Metaphase- und Interphasepräparate

Zuerst werden die Objektträger oder Deckgläser mit Ethanol gereinigt. Es sollte darauf geachtet werden, dass diese Reinigung äußerst sorgfältig durchgeführt wird, da sonst bei der Mikroskopie ein hoher Hintergrund auftreten kann. Die Objektträger bzw. Deckgläser werden nach der Reinigung in Millipore-Wasser eingetaucht.

Das schnelle Auftropfen der Blutlymphozyten auf den noch nassen Objektträger führt zur Lyse der hypoton behandelten Zellen und zur Spreitung der Metaphasechromosomen. Nach Markierung der Auftropfränder mittels Diamantschneider wird die Zelldichte mit einem Durchlicht-Mikroskop kontrolliert. Gegebenenfalls erfolgt bei einer niedrigen Zelldichte ein zusätzliches Auftropfen von Blutzellen oder es kommt zu einer Neupräparation. Die auf diese Weise präparierten Objektträger bzw. Deckgläser werden für die Hybridisierung wie folgt vorbehandelt.

Verbrauchsmaterial und Lösungen:

70% Ethanol
ddH₂O
Methanol / Eisessig-fixierte Blutzellen

Deckgläser # 1.5, 20 x 20 mm oder 24 x 24 mm
Objektträger
Alufolie
Fusselfreie Tücher
Diamantschneider

Protokoll:

- Objektträger säubern mit EtOH
- Objektträger in ddH₂O tauchen
- 10 µl Methanol / Eisessig-fixierte Blutzellen schnell auftropfen!
- Markieren der Ränder der aufgetropften Blutzellen mit dem Diamantschneider
- Kurze Kontrolle mit dem Mikroskop, ob Auftropfen erfolgreich war

Vorbehandlung der Metaphase- und Interphasepräparate für die Hybridisierung

Zu Beginn werden die auf dem Objektträger bzw. Deckgläsern befindlichen Lymphozyten mittels Triton X-100 und Saponin permeabilisiert. Die Bindung von Cholesterin, hervorgerufen durch Triton und Saponin, erzeugt auf diese Weise Löcher in der Zellmembran.

Durch Zugabe von SSC-Puffer (engl. Saline Sodium Citrate) wird der Permeabilisierungsschritt gestoppt. Im nächsten Schritt wird die RNase-Lösung auf den markierten Teil des Objektträgers aufgebracht. Folgend legt man ein großes Deckglas (24 x 60 mm) blasenfrei auf und inkubiert den Objektträger in einem luftbefeuchtenden Hybridisierungsschrank für eine Stunde bei 37 °C. Der RNA-Verdau dient zur Eliminierung der einzelsträngigen RNA und schließt die Bindung der Sonde an die RNA aus, damit keine unspezifischen Bindungen detektiert werden. Dieser Verdau wird ebenfalls durch mehrmaliges Waschen mit SSC gestoppt. Die nachfolgende Behandlung mit PBS dient zur Äquilibrierung der Pepsin-Lösung. Die nachfolgende Pepsin-Behandlung sorgt für den enzymatischen Abbau der in den Chromosomen und Zellkernen befindlichen Proteinen. Der Abbau des Zytoplasmas ermöglicht der Sonde ein einfacheres und gezielteres Binden in der gewünschten Genregion. Gestoppt wird dieser Verdauungsschritt durch PBS. Die im folgenden Schritt benutzte Ethanolreihe dehydriert die Präparate. Nach dieser Vorbehandlung ist es möglich, die so präparierten Objektträger bzw. Deckgläser für eine Woche im Kühlschrank bei 4 °C in 70 %-igem Ethanol zu lagern. Bei längerer Lagerung kommt es zur Zugabe von 0,1 % Natrium-Azid. Die Präparate sollten vor Gebrauch unter einem Durchlicht-Mikroskop auf ihre Tauglichkeit bzw. Morphologie kontrolliert werden.

Verbrauchsmaterial und Lösungen:

0.7% Triton 100
0,1% Saponin
SSC
PBS
0,01M HCl
Pepsin
RNase
70% / 90% / 100% Ethanol
ddH₂O
Methanol / Eisessig-fixierte Blutzellen
70 % Formamid
Einbettmedium
Sonden
Hybridisierungspuffer

Deckgläser # 1.5, 20 x 20 mm oder 24 x 24 mm
Objektträger
Fusselfreie Tücher
Diamantschneider
Fixogum
Nagellack (farblos)

Protokoll:

- Inkubation der OT oder DG für 30 Min. in 0,7 % Triton 100 und 0,1% Saponin / 2 x SSC
- 2 x waschen in 2 x SSC
- RNase - Behandlung
- Inkubation im Hybridisierungssofen für 1 Stunde bei 37 °C
- 3 x waschen für 3 Min. in 2 x SSC
- Äquilibrieren für 5 Min. in 1 x PBS
- Pepsin - Behandlung für 45 Sekunden bei 37 °C
- 1 x waschen für 5 Min. in 1 x PBS
- je 3 Min. in 70 % / 90 % / 100 % EtOH inkubieren

Denaturierung der Metaphase- und Interphasepräparate

Der Denaturierungsvorgang wird mittels einer im Wasserbad auf 75 °C temperierten Formamid / SSC-Lösung durchgeführt. Bei der Denaturierung kommt es zur Trennung der Komplementärstränge innerhalb der DNA-Doppelhelix. Die DNA liegt danach in ihren Einzelsträngen vor und ist zugänglich für die Sonden. Das in der Lösung enthaltene Formamid führt zu einer künstlichen Erniedrigung des Schmelzpunktes der DNA. Eine Dehydrierung der Präparate mittels einer eiskalten Ethanolreihe wird nach der Denaturierung nochmals durchgeführt.

Protokoll:

- Inkubation für 5 Min. in 70 % Formamid / 2 x SSC (pH 7-7,2) bei 75 °C
- je 3 Min. in 70 % / 90 % / 100% EtOH inkubieren

Hybridisierung und Nachbehandlung der Präparate

Als Vorbereitung auf die Hybridisierung wird die Probe zunächst in einem Hybridisierungsmix aufgenommen. Danach wird diese Lösung mittels Eppendorf-Pipette tropfenweise zwischen die mit dem Diamantmarker gezogenen Markierungslinien pipettiert. Mit Fixogum wird das anschließend aufgelegte Deckglas am Rand verschlossen. Zu beachten ist das blasenfreie Auflegen des Deckglases. Das

Präparat wird entweder im feuchten Hybridisierungssofen bei 37°C oder in einem für das Wasserbad vorgesehenen Hybridisierungsblock bei 42°C inkubiert. Die nichtgebundene Sonde und die unspezifischen Bindungen werden in einem nachfolgenden Waschschrift entfernt. Dabei kann man durch Erhöhung der Temperatur und Erniedrigung der Salzkonzentration die Stringenz des jeweiligen Waschschriftes steigern. Zur Verringerung des Ausbleichens wird sofort nach dem Waschschrift ein Tropfen Eindeckmittel (Vectashield) auf das Präparat gegeben und je nach Gebrauch mittels Fixogum (CLSM) bzw. Nagellack (SMI) eingedeckelt. Für den Fall, dass eine Gegenfärbung für das Präparat erforderlich ist, sollte diese vor dem Eindeckeln durchgeführt werden.

Protokoll:

- OT trocknen lassen bei 37 °C (PFA-fixierte Präparate nicht austrocknen lassen!)
- Sonde + Hybridmix (Gesamtvolumen: 30 µl) auftropfen und eindeckeln mit Fixogum
- Inkubation für 24 Stunden bei 37 °C (bzw. 42 °C in Metallkammer im Wasserbad)
- Waschen für 5 Min. bei 37 °C in 2 x SSC (gegebenenfalls Stringenz erhöhen z.B. 5 Min. bei 60 °C in 0,5 x SSC)
- 10 µl Einbettmedium (1 Tropfen) auftropfen und eindeckeln mit Fixogum (CLSM) bzw. Nagellack (SMI)

2.6.5 Immunfärbung

Antikörper sind Proteine, die der Körper als Antwort auf körperfremde Substanzen (Antigene) bildet. Die in Wirbeltieren spezialisierten B-Lymphozyten des adaptiven Immunsystems sind klonal. Jeder B-Lymphozyt synthetisiert nur einen gegen ein bestimmtes Antigen gerichteten Antikörper. Die hohe Affinität der Antikörper zu den entsprechenden Antigenen lässt sich in der Immunfärbung nutzen.

Antikörper haben sich neben Nukleinsäuren als ein weiteres wesentliches Werkzeug für biologische Untersuchungen herausgestellt. Antikörper bieten die Möglichkeit Genprodukte (meist Proteine) auf ihr Vorhandensein oder Fehlen zu untersuchen. Zusätzlich kann eine genaue Lokalisation des Genproduktes erfolgen. Die aufgezählten Möglichkeiten können somit zu molekularen Analyse eines Phänotyps genutzt werden.

2. Material und Methoden

In dieser Doktorarbeit wurde eine indirekte Immunfärbung angewendet, bei der sich der fluoreszenz-markierte sekundäre Antikörper gegen die konstante Region des primären Antikörpers richtet. Dieses System ermöglicht eine Flexibilität bei der Variation der Fluoreszenzfarbstoffe. Alle Antikörper wurden in der verwendeten Blocking-Lösung verdünnt. Um unspezifische Bindungen der Antikörper zu vermeiden, wurden die noch freien Bindungsstellen mit einem inerten Protein (hier: BSA – Bovine serum albumin) abgesättigt.

Verbrauchsmaterial und Lösungen:

Vorbehandelte und fixierte OT oder DG
Gewebekulturplatten 6 Well oder quadriPERM
PBS
Fixativ (4% Paraformaldehyd in 1 x PBS)
Nagellack
Einweg-Pasteurpipetten
Lichtgeschützte, feuchte Kammer
Permeabilisierungspuffer (0,2 % Triton-X / 1 x PBS oder 0,5 % Saponin / 1 x PBS)
Blocking-Lösung (2 % BSA in 1 x PBS)
Primäre Antikörper gegen zu untersuchendes Epitop
(Verdünnung in geeignete Konzentration erfolgt mittels Blocking-Lösung)
Fluorochrome-konjugierte Sekundäre Antikörper gegen Primäre Antikörper
(Verdünnung in geeignete Konzentration erfolgt mittels Blocking-Lösung)
Gegenfärbung
Einbettmedium

Protokoll:

- Inkubieren in Permeabilisierungspuffer für 3 Min. bei Raumtemperatur
- 2 – 3 x kurz waschen in 1 x PBS
- Inkubieren in Blocking-Lösung für 30 Min. bei Raumtemperatur
- 100 µl Primär-Antikörperlösung (pro Präparat) auf ein Stück PARAFILM geben und DG, mit der von Zellen bewachsenen Seite nach unten, blasenfrei auflegen. Präparat für 30 Min. in einer feuchten Kammer bei 37°C inkubieren
- 3 x waschen in 1 x PBS
- 100 µl Sekundär-Antikörperlösung (pro Präparat) auf ein Stück PARAFILM geben und DG, mit der von Zellen bewachsenen Seite nach unten, blasenfrei auflegen. Präparat für 30 Min. in einer feuchten Kammer bei 37°C inkubieren

- 3 x 5 Min. waschen in 1 x PBS (unter Schütteln!)
- gegebenenfalls Gegenfärbung
- 3 x 5 Min. waschen in 1 x PBS (unter Schütteln!)
- mehrmaliges Spülen mit Einweg-Pasteurpipetten
- Einbettmedium (1Tropfen). DG blasenfrei auflegen und mit Nagellack an den Rändern versiegeln

Optional kann eine RNase-Behandlung durchgeführt werden, um unspezifische RNA-Bindungen im Zytoplasma und an den Nucleoli zu vermeiden. Dieser Behandlungsschritt sollte nach dem Fixierungs-Waschschrift erfolgen.

- DG oder OT für 30 Min. in 200 µg / ml RNase in 1 x PBS in einer feuchten Kammer bei 37°C inkubieren

2.6.6 Organelle/Cellular Lights TM

Organelle/Cellular Lights TM Reagenzien sind gebrauchsfertige Fusions-Konstrukte, die sich aus einem fluoreszierenden Protein und einem Signalprotein zusammensetzen und somit eine präzise und spezifische Markierung sub-zellulärer Kompartimente und Strukturen ermöglichen. Die fluoreszenten Fusions-Konstrukte sind in einem Baculovirus-Chromosom kloniert und in Viruspartikeln verpackt, die für eine effiziente Transfektion der Zellen sorgen (BacMam Technologie – siehe Abbildung 17).

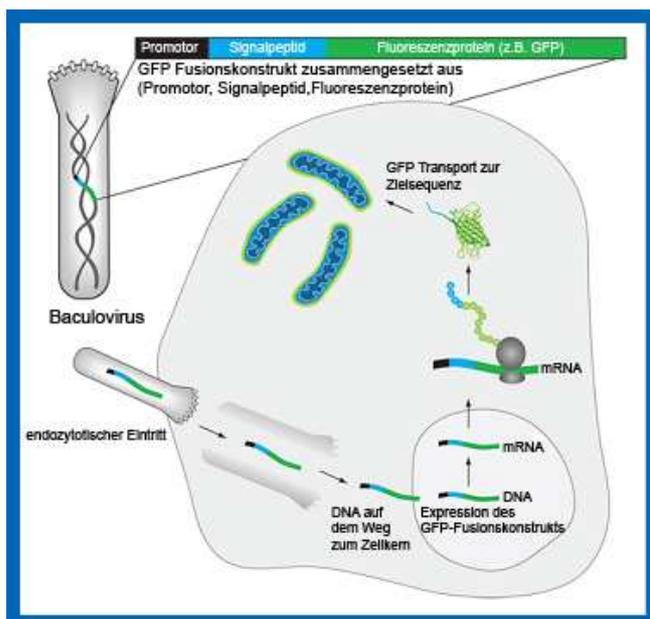


Abbildung 17: Prinzip von Organelle/Cellular Lights TM

[Invitrogen, Carlsbad, USA]

Verbrauchsmaterial und Lösungen:

Vorbehandelte und fixierte OT oder DG
Gewebekulturplatten 6 Well oder quadriPERM
D-PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}
Fixativ (4% Paraformaldehyd in 1 x PBS)
Nagellack
Einweg-Pasteurpipetten
Lichtgeschützte, feuchte Kammer
Permeabilisierungspuffer (0,2 % Triton-X / 1 x PBS oder 0,5 % Saponin / 1 x PBS)
Blocking-Lösung (2 % BSA in 1 x PBS)
Primäre Antikörper gegen zu untersuchendes Epitop
(Verdünnung in geeignete Konzentration erfolgt mittels Blocking-Lösung)
Fluorochrome-konjugierte Sekundäre Antikörper gegen Primäre Antikörper
(Verdünnung in geeignete Konzentration erfolgt mittels Blocking-Lösung)
Gegenfärbung
Einbettmedium

Protokoll:

Zellkultur

- Aussäen von Zellen auf DG in 6 Well-Platten
- Inkubation der Zellen für 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO_2 → 70 - 80 % Konfluenz

Organelle Lights™

- Vorbereitung der Lösungen (siehe Hersteller-Protokoll im Anhang)
- Volumen für zwei DG: 1 ml Organelle Lights™ Reagenz mit 2 ml D-PBS mischen (Organelle Lights™ Reagenz nicht dem Licht aussetzen und sofort nach Gebrauch wieder auf 4 °C zurückstellen!)
- Absaugen des Kulturmediums von den adhärennten Zellen
- Zugabe von 1,5 ml der vorbereiteten Organelle Lights™-Lösung
- Inkubation der Zellen für 2 Stunden bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln (im Dunkeln!)
- Vorbereitung der Enhancer-Lösung (1 μl Enhancer auf 1 ml serumfreies Kulturmedium)
- Absaugen der Organelle Lights™-Lösung

- Inkubation der in 2 ml Enhancer-Lösung befindlichen Zellen für 2 Stunden unter optimalen Wachstumsbedingungen (37 °C und 5 % CO₂)
- Absaugen der Enhancer-Lösung von der Zellkulturschale
- Zugabe von 2 ml Kulturmedium
- Inkubation der Zellen für mehr als 16 Stunden unter optimalen Wachstumsbedingungen (37 °C und 5 % CO₂)

Nach der Inkubation und damit einsetzenden Expression des Organelle Lights™ Fluoreszenzproteins können die Zellen im lebenden oder fixierten Zustand mikroskopisch untersucht werden.

2.6.7 Durchflusszytometrie (FACS)

Die Durchflusszytometrie (FACS - Fluorescence Activated Cell Sorting) ist eine Technik bei der verschiedene Eigenschaften von Zellen untersucht werden, während diese Zellen hintereinander durch eine dünne Messkammer fließen. Die durchfließenden Zellen werden von der Seite von einem Laserlicht angestrahlt und somit über ihr jeweiliges Streulicht sortiert. Je größer eine Zelle ist und je mehr Strukturen im Inneren der Zelle sind, desto größer ist das entstehende Streulicht.

Man detektiert zwei unterschiedliche Streulichtarten:

- (fast) in Richtung des ursprünglichen Strahls (Vorwärtsstreulicht)
- etwa im 90° Winkel zum ursprünglichen Strahl (Seitwärtsstreulicht)

Das Vorwärtsstreulicht gibt Auskunft über die Größe einer Zelle. Je kleiner die Zelle ist, desto geringer ist ihr Vorwärtsstreulicht. Das Seitwärtsstreulicht hängt neben der Größe auch sehr stark von der Granularität der Zelle ab. Eine hohe Granularität bedeutet hohes Seitwärtsstreulicht, niedrige Granularität steht für ein niedriges Seitwärtsstreulicht.

Die Durchflusszytometrie kann das Fluoreszenzlicht von Antikörper markierten Zellen messen und erlaubt dadurch die Analyse dieser sich auf der Oberfläche der Zelle befindlichen Proteine zu untersuchen.

Das Gaten („Schleusen“) von Zellen erfolgt durch setzen einer interessanten Region in der nur die Zellen enthalten sind, die später auch für die Analyse verwendet werden sollen.

2.7 Verwendete Sondensets

Die folgenden Tabellen zeigen die Zusammensetzungen der verwendeten Sonden bzw. Sondensets. Dabei wird neben den einzelnen Oligosequenzen auch die Genregion angegeben, an der sich die einzelne Oligos anlagern. Zusätzlich werden die Farbstoffe der jeweiligen Sonden und die durchgeführten Modifikationen angegeben.

2.7.1 Repetitive Zentromer 9 PNA-Sonde

In Tabelle 5 ist die Oligosequenz der PNA-Sonde für die Subregion von Zentromer 9 angegeben. Sie setzt sich sowohl aus Pyrimidin- als auch aus Purinbasen zusammen. Diese Sequenz lagert sich an der repetitiven Zentromerregion von Chromosom an und liefert somit ein Fluoreszenzsignal dieser Region. Die unterschiedlich verwendeten Farbstoffe mit ihren dazugehörigen Anregungs- und Emissionsmaxima sind in Tabelle 6 gezeigt.

PNA Sonden	
Zentromer 9 - Fluorophor	
Lage der Oligo-Sequenzen	Gemischte Pyrimidin-Sequenz / Purin-Sequenz
Zentromer 9	5'- aatcaaccggagtgcaat -3'

Tabelle 5: Repetitive Zentromer 9 PNA-Sonde

	Fluorophore	$\lambda_{ex/em}$
(a)	Alexa 488	495 / 519
(b)	Oregon Green 488	496 / 524
(c)	Tetramethylrhodamine (TAMRA)	555 / 580
(d)	Texas Red	595 / 615

Tabelle 6: Fluorophore der unterschiedlichen Zentromer 9 PNA-Sonden

Die Tabelle zeigt die unterschiedlichen Fluorophore der für Zentromer 9 hergestellten spezifischen PNA-Sonden mit den dazugehörigen Anregungs- und Emissionsmaxima der unterschiedlichen Fluorophore.

2.7.2 Genspezifisches PNA-Sondenset für *Her2/neu*

Tabelle 7 zeigt das mit Oregon Green 488 markierte PNA- Sondenset für die Genregion von *Her2/neu*. Dieses Sondenset besteht aus 18 Homopyrimidin- und Homopurin-Sequenzen, die sich über Watson-Crick-Basenpaarung an die jeweilige Genregion anlagern und dadurch ein Fluoreszenzsignal hervorrufen.

PNA Sondenset	
<i>Her2/neu</i> – Oregon Green 488	Watson-Crick Sondenset
Lage der Oligo-Sequenzen	Homopyrimidin-Sequenzen, Homopurin-Sequenzen
auf <i>Her2/neu</i>	5'- ctttctccccttctcctc -3'
	5'- aaggagaaaaggagga -3'
	5'- gaggggagaagggagg -3'
	5'- cctcctctctctccc -3'
	5'- gggaaggagaagaggaagg -3'
	5'- cccctcctccttctct -3'
	5'- agaggaagagaagaa -3'
	5'- cccttcttctctctctctccc -3'
	5'- cccttctcctcccc -3'
	5'- tctcttttcttctcttccccctcctc -3'
	5'- aaaggaagagaagaa -3'
	5'- ccccttcccttccct -3'
	5'- ccccccttctctctctct -3'
	5'- gggggggaggggaagagagaaagaga -3'
	5'- gaagagagggagaaag -3'
	5'- gagaaggaaggagagag -3'
	5'- cctcttctctctctc -3'
	5'- tccttcctccccctct -3'

Tabelle 7: Genspezifisches PNA-Sondenset für *Her2/neu*

2.7.3 Genspezifische PNA-Sondensets für *Her2/neu* und *GRB7*

Tabelle 8 zeigt die beiden genspezifischen PNA-Sondensets für *Her2/neu* (grün - Oregon Green 488[®]) und *GRB7* (rot - Texas Red[®]). Die Zusammenlagerung der 20 Homopyrimidin-Oligonukleotidsequenzen, die am 5'-Ende je ein Oregon Green 488[®] Molekül tragen führt zu einer spezifischen Markierung der *Her2/neu* – Genregion. Die spezifische Markierung der *GRB7* - Genregion kommt durch die Zusammenlagerung der 17 Homopyrimidien-Oligonukleotidsequenzen, die am 5'-Ende je ein Texas Red[®] Molekül tragen zustande. Es sind in Tabelle 7 beide genspezifischen Sondensets sowohl als Hoogsteen- als auch als Watson-Crick-bindende Sondensets dargestellt.

Genspezifische		PNA-Sondensets	
<i>Her2/neu</i> – Oregon Green 488, <i>GRB7</i> - Texas Red	Hoogsteen Sondenset	Watson-Crick Sondenset	
Lage der Oligo-Sequenzen	Homopyrimidin-Sequenzen	Homopyrimidin-Sequenzen	
<i>vor Her2/neu</i>	5'-ttcctcttttctctct-3'	5'- tctccttttctcctt -3'	
	5'-ctcccctttccctcc-3'	5'- cctcccttctcccctc -3'	
	5'-ccctctctctctcc-3'	5'- cctcctctctctccc -3'	
	5'-cccttctcttctcttcc-3'	5'- ccttctcttctcttccc -3'	
	5'-tctccttctctctccc-3'	5'- ccctcctctctctct -3'	
	5'-tctccttctcttctt-3'	5'- ttcttctctctctct -3'	
	5'-ttcctctctcttttctccc-3'	5'-cccttcttctctctctctt-3'	
<i>auf Her2/neu</i>	5'-ccccctctctttccc-3'	5'-cccttctctctcccct-3'	
	5'-tttcttctcttctt-3'	5'-ttcttctcttctt-3'	
	5'-tcccttccctttccc-3'	5'-ccccttcccttccct-3'	
	5'-ttctctctcttcccc-3'	5'-cccccttctctctctt-3'	
	5'-cttctctcccttttc-3'	5'-ctttctccctctcttc-3'	
	5'-ccccttctctcccc-3'	5'-ccccctctcttccc-3'	
	5'-ctcttctctctctc-3'	5'-ctctctcttctcttc-3'	
	5'-tcctctctctttc-3'	5'-ctttctctctccct-3'	
	5'-ctctctctttctcc-3'	5'-ccttttctctctc-3'	
	5'-tctccccctccttct-3'	5'-tcttccctcccctct-3'	
	5'-cttccctccctccc-3'	5'-cccctccctccctc-3'	
	5'-ccttcttttcttttctct-3'	5'-tctcttttcttttcttcc-3'	
	5'-ccctcccttctcttttctc-3'	5'-ctcttttctcttcccctccc-3'	
	<i>zwischen Her2/neu and GRB7</i>	5'-cctcctttccctccttc-3'	5'-cttctcccttctctcc-3'
<i>auf GRB7</i>	5'-tcctcctcttccc-3'	5'-ccccttctctccct-3'	
	5'-tctcccctttctcc-3'	5'-cctccttctcccctct-3'	
	5'-tcttcccttccctcct-3'	5'-tccctcccttcccttct-3'	
	5'-tctccccttccctctcc-3'	5'-cctcctcccttcccctct-3'	
	5'-cccctcttttctc-3'	5'-ctcttttctctccc-3'	
	5'-tcctccctcttctctccc-3'	5'-ccctcttctctccctcct-3'	
	5'-tctcttctctcccc-3'	5'-ccccctctcttctct-3'	
<i>nach GRB7</i>	5'-ccctctctttccctcc-3'	5'-cctcccttctctccc-3'	
	5'-ctctctcttttctt-3'	5'-ttccttctctctc-3'	
	5'-ttcttcttttccctc-3'	5'-ctcccttttcttctt-3'	
	5'-ttctttctccctttctc-3'	5'-cttcttccctccttctt-3'	
	5'-cccctctcccctcttttc-3'	5'-ctttctctcccctctccc-3'	
	5'-ccccctctctttttctc-3'	5'-cttcttttctctctcccc-3'	
	5'-ctcctctctctctccct-3'	5'-tccctctctctctctc-3'	
	5'-ccctctcccccttcttcc-3'	5'-ccttcttccccctctccc-3'	
	5'-ccccctccccttctctcc-3'	5'-cctccttcttcccctcccc-3'	

Tabelle 8: Genspezifische PNA-Sondensets für *Her2/neu* und *GRB7*

2.7.4 Genspezifisches TINA-modifiziertes-Sondenset für *bcr*

Tabelle 9 zeigt das PNA-Sondenset für die *bcr*-Genregion. Die Fluoreszenzsignale werden erzielt durch die Zusammenlagerung der 15 mit TINA modifiziertem Homopyrimidien-Oligonukleotidsequenzen, die am 5'-Ende je ein Fluorescein-Molekül tragen. TINAs besitzen eine interkalierende Einheit die die Anlagerung und die Anbindung der Oligosequenzen in die große Furche des nativen DNA-Doppelstrangs unterstützt und somit die zu erwartende Triplex-Formation erhöht (Abbildung 18).

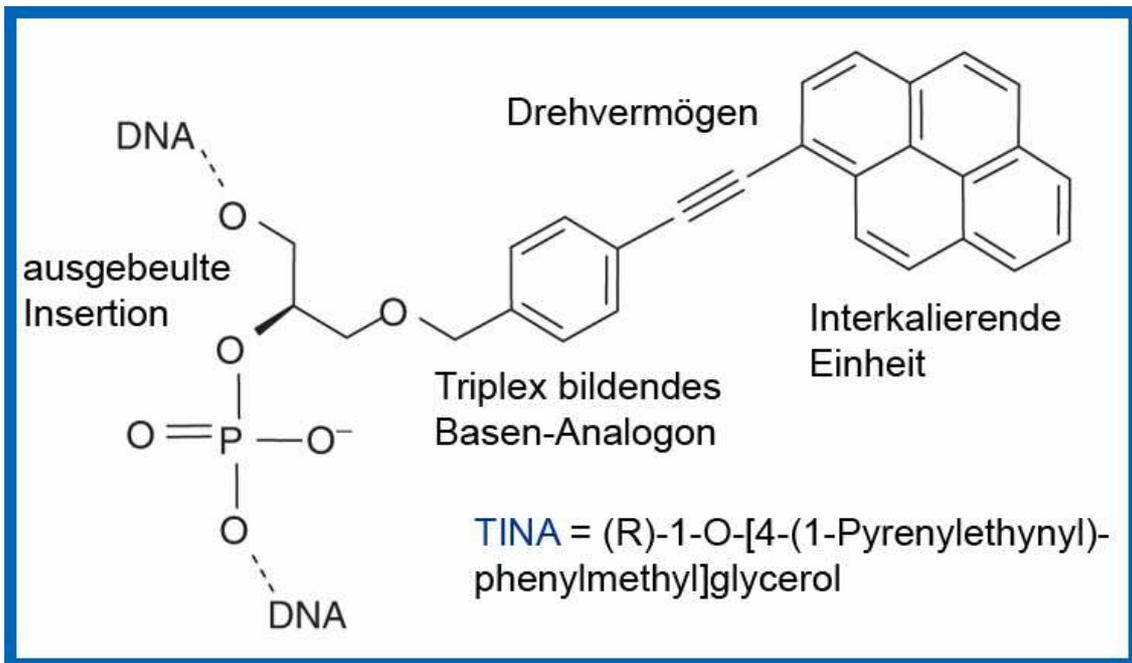


Abbildung 18: Twisted Intercalating Nucleic Acid (TINA)

[Paramasivam et al. 2008]

TINA Sondenset, [TINA]P=(R)-1-O-[4-(1-Pyrenylethynyl) phenylmethyl]glycerol	
<i>bcr</i> – Oregon Green	Hoogsteen Sondenset
Lage der Oligo-Sequenzen	Homopyrimidin-Sequenzen
auf <i>bcr</i>	3'- tcctPtccPtccctccPcct -5'
	3'- cctPtctctcPcctcPtcc -5'
	3'- cttPtccPtcccttcPcc -5'
	3'- tctPtcttcPtctccPcctc -5'
	3'- cttccPtctcPtcttcPcct -5'
	3'- ctPtccPtctccPcctttt -5'
	3'- tccPctctPtccctcPtct -5'
	3'- cctcPtctcPctctcPtcc -5'
	3'- tctPtccPtcccttPtcc -5'
	3'- tctPtctcPtccctcPtct -5'
	3'- ttcPtccctcPtctcPtcc -5'
	3'- ttcPtctctPtccPcc -5'
	3'- tctPtcttcPcctcPtcc -5'
	3'- tccPctccctcPtccPtcc -5'
3'- tccPtcccPtccctcPtcc -5'	

Tabelle 9: Genspezifisches TINA-modifiziertes-Sondenset für *bcr*

2.7.5 Genspezifisches TINA-modifiziertes-Sondenset für *Her2/neu*

Die Zusammensetzung des genspezifischen TINA-modifizierten-PNA-Sondenset für die Genregion *Her2/neu* ist in Tabelle 10 aufgelistet. Dieses Sondenset besteht aus Homopurin-Oligosequenzen und kann sich an die native DNA über Hoogsteen-Basenpaarung anlagern. Die Fluoreszenzsignale in der *Her2/neu*-Genregion werden durch die Zusammenlagerung der 24 mit TINA modifiziertem Sequenzen erzielt, die am 5'-Ende je ein Cy3-Molekül tragen.

TINA Sondenset, [TINA]P=(R)-1-O-[4-(1-Pyrenylethynyl) phenylmethyl]glycerol	
<i>Her2/neu</i> - Cy3	Hoogsteen Sondenset
Lage der Oligo-Sequenzen	Homopurin-Sequenzen
auf <i>Her2/neu</i>	3'- aagPgagaaaagPgagPga -5'
	3'- gaggPggagaagPggagPg -5'
	3'- ggPgagagagagPgagPg -5'
	3'- ggPgaagPgagaagagPgaagg -5'
	3'- agagPgaagPgaggaggPgg -5'
	3'- agagPgaagPagaagPaa -5'
	3'- gPgggPgaggagaaaagPgg -5'
	3'- ggPgggagPgagaaaggPg -5'
	3'- aaagPgaagaPgaapga -5'
	3'- aggPgaagPggaaaggPgg -5'
	3'- aagagPgagaggaagPgggPgg -5'
	3'- aagagPgagaggaaggPgggPg -5'
	3'- gaagPagagPggagaaaPg -5'
	3'- gggPgaagaggagPgggPg -5'
	3'- ggPggaagagPgagggPgg -5'
	3'- gagaagPgaagPgagagPag -5'
	3'- agPggagPgagagaaaPg -5'
	3'- gagagPgagPgaagagPg -5'
	3'- agagPgggPgaggPgaagga -5'
	3'- agagggPggagPggaagPga -5'
	3'- gaaggPgagPggaaggPgg -5'
	3'- aagPgagagagPgaagaagPgg -5'
	3'- gPgaagagaaagPgaaaaPgaga -5'
	3'- ggPgaggPgaagagagPaaagag -5'

Tabelle 10: Genspezifisches TINA-modifiziertes-Sondenset für *Her2/neu*

2. Material und Methoden

2.8 Verwendete Hybridisierungspuffer

Die Zusammensetzung der in der Doktorarbeit verwendeten Hybridisierungspuffer sind in Tabelle 11 aufgelistet.

Hybridmix 1:	0,6 M MgCl ₂ x 6 H ₂ O (pH 7) + 3 M NaCl (pH 7) + 1 M NaAc (pH 7) steril filtriert!
Hybridmix 2:	3 M NaCl (pH 7) + 1 M NaAc (pH 7) steril filtriert!
Hybridmix 3:	Kommerzieller Hybridmix mit 40 % Formamid
Hybridmix 4:	Kommerzieller Hybridmix mit 60 % Formamid
Hybridmix 5:	Hybridmix 1 + Denhardts + Salmon Sperm
Hybridmix 6 - 16:	Hybridmix 1 + 0 % - 100 % Formamid (0, 10, 20, 30...etc.)
Hybridmix 17:	10 mM NaHPO ₄ (pH 7.4) + 10 mM NaCl + 20 mM Tris (pH 7.5) + 70% Formamid + 1x Denhardts + 0.1 µg/ml t-RNA und Salmon Sperm
Hybridmix 18:	70% Formamid + 1% (wt/vol) Blocking Reagenz in 10 mM Tris (pH 7.2)
Hybridmix 19:	Hybridmix: 70 % FA, 1 % Blocking Reagent in 10mM Tris (pH 7)
Hybridmix 20:	Mikroinjektionspuffer: 80 mM KCl, 10mM K ₂ HPO ₄ , 4mM NaCl
Hybridmix 21:	Hybridmix 1 + Cot - 1 DNA
Hybridmix 22:	Hybridmix 1 + tRNA
Hybridmix 23:	Hybridmix 1 + Salmon Sperm
Hybridmix 24:	20 x SSC, 10 x Blocking Reagent, SDS
Hybridmix 25:	20 x SSC, 10 x Blocking Reagent, SDS, Formamid
Hybridmix 26:	1 M Na ₂ HPO ₄ , 10 x Blocking Reagent, SDS, Formamid
Hybridmix 27:	Hybridmix 1 + Cot -1 DNA + Salmon Sperm

Tabelle 11: Verwendete Hybridisierungspuffer

2.9 Verwendete Antikörper

Die Tabelle listet sowohl die Primärantikörper, als auch die Sekundärantikörper auf, die bei den einzelnen Versuchen verwendet werden. Blau markiert sind die Abkürzungen der einzelnen Antikörper, die gleich die Bindungs-Domänen beinhalten und somit die Zuordnung erleichtern sollen.

Primäre Antikörper	Wirt / Isotyp	Bindungs Domäne	Firma
monoklonaler Anti-Her2/neu = ExR	Maus IgG	extrazelluläre Domäne	Sigma
monoklonaler Anti-Her2/neu = ExC	Ratte IgG	extrazelluläre Domäne	Abcam
monoklonaler Anti-Her2/neu = ExD	Ratte IgG	extrazelluläre Domäne	Abcam
polyklonaler Anti-Her2/neu = intraTR	Hase IgG	intrazelluläre Kinase Domäne	Merck
monoklonaler Phospho-Her2/neu = intraP	Hase IgG	intrazelluläre phospho Domäne	New England Biolabs
polyklonaler Anti-Her3 = ExR3	Hase IgG	extrazelluläre Domäne	Abcam
Sekundäre Antikörper			
Alexa488 [®]	Ziege Anti-Maus IgG		Invitrogen
Alexa568 [®]	Ziege Anti-Maus IgG		Invitrogen
Alexa488 [®]	Ziege Anti-Hase IgG		Invitrogen
Alexa488 [®]	Ziege Anti-Ratte IgG		Invitrogen
Ligand für c-erbB3 (Her-3)			
Neuregulin-1 (NRG-1)			Abcam

Tabelle 12: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper

2.10 Verwendete Mikroskopiesysteme

2.10.1 Konfokale Spinning Disk Mikroskopie

Für die Aufzeichnung von hochaufgelösten Bildern wurde in dieser Arbeit ein konfokales Ultra-View Spinning Disk auf Nikon TE2000-E invers-Mikroskop verwendet (Perkin Elmer Life Science, Waltham, Massachusetts).

Das Spinning Disk ist mit einem Plan Apo 100 x / NA 1,4 Ölimmersionsobjektiv und mit einem Argon-Krypton-Laser (Anregungswellenlängen: 488 nm, 568 nm und 647 nm) ausgestattet. Außerdem verfügt das System zusätzlich über eine 405 nm Lichtquelle, um DAPI-Gegenfärbungen sichtbar machen zu können.

Die Fluoreszenz wurde mittels entsprechenden Bandpassfilter auf einer EM-CCD-Kamera (engl. Electron Multiplying Charge Coupled Device) detektiert (EM-CCD, C9100-50, Hamamatsu, Japan). Folgende Bandpassfilter wurden zur Emissions-Detektion der entsprechenden Fluorophore eingesetzt. Die Emission von Oregon Green 488 erfolgte durch einen Emissionsfilter mit 527 (55) nm und Texas Red mit einem 625 (70) nm.

Der laterale Scan-Bereich war 1000 x 1000 Pixel, was einer lateralen Voxelgröße von 82 nm x 82 nm entspricht. Innerhalb dieses Bereiches wurde je nach Größe des Zellkerns eine entsprechende Region ausgewählt und aufgezeichnet. Die Schrittweite der einzelnen optischen Schnitte betrug 200 nm in axialer Richtung.

Die durch das Spinning Disk aufgenommenen 3D Bildersequenzen wurden entweder mit dem Programm ImageJ oder Matlab bearbeitet und ausgewertet. Dabei wurden lediglich Veränderungen hinsichtlich der Helligkeit, sowie des Kontrastes vorgenommen. Filtereinstellungen wurden nicht verwendet.

(Das Mikroskop wurde freundlicherweise durch das Nikon-Imaging-Center in Heidelberg zur freien Verfügung gestellt).

Die in den folgenden Punkten angegebenen Einstellungen wurden für alle Messungen am Spinning Disk vorgenommen.

Laser: Argon-Krypton-Ionen-Laser ($\lambda_{\text{exc}} = 488 / 568 / 647 \text{ nm}$), Laser ($\lambda_{\text{exc}} = 405 \text{ nm}$)

Filtereinstellungen: entsprechende Bandpassfilter (siehe Text)

Objektiv: Ölimmersionsobjektiv (100 - fache Vergrößerung / Numerische Apertur 1,4)

Immersionöl (ImmersionolTM518 F / Zeiss)

Voxelgröße: 82 nm x 82 nm

Datenspeicherung: 16 bit tiff-Format

2.10.2 Räumlich strukturierte Beleuchtung (SMI)

Die SMI-Mikroskopie ist ein lichtoptisches Verfahren, das die Punktbild-Funktion (Point Spread Function, PSF) eines Mikroskops so modifiziert, dass die optische Auflösung erhöht wird. Dies ermöglicht nicht nur präzise Distanzmessungen, sondern auch Strukturparameter im Nanometerbereich zu extrahieren.

Beim gegenwärtig am Kirchhoff-Institut für Physik der Universität Heidelberg entwickelten SMI-Mikroskop wird dies dadurch erreicht, dass die Anregungsintensität im Objektraum im Gegensatz zu herkömmlichen Weitfeldfluoreszenz-Mikroskopen nicht homogen ist, sondern durch Verwendung zweier gegenläufiger, interferierender Laserstrahlen in axialer Richtung räumlich präzise moduliert wird. Bei diesem SMI-Mikroskop wird das Objekt in hochpräzisen Schritten durch das Wellenfeld bewegt, oder es wird das Wellenfeld selbst verschoben (Phase). Daraus resultiert eine Erhöhung der axialen Größen- und Distanzauflösung [Albrecht et al. 2002] [Spöri 2004] [Reymann et al. 2008].

Die bessere Distanzauflösung in axialer Richtung der SMI-Mikroskopie wurde in dieser Arbeit in Verbindung mit der Lokalisationsmikroskopie genutzt, um die 3D-Anordnung von Her2/neu (intrazelluläre Markierung) und Her3-Rezeptoren (extrazelluläre Markierung) zu zeigen. Außerdem konnte zusätzlich in ersten Versuchen eine 3D-Darstellung der Plasmamembran von Zellen rekonstruiert werden.

Die im Folgenden Verlauf angegebenen Einstellungen beziehen sich auf Messungen, die am SMI-Mikroskop vorgenommen wurden:

Laser: diodengepumpter Festkörperlaser ($\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$),

diodengepumpter Festkörperlaser ($\lambda_{\text{exc}} = 568 \text{ nm}$)

Laserintensität: 22 - 24 mW

Objektive: Öl-Immersion Objektiv (Leica) (63 - fache Vergrößerung /

Numerische Apertur 1,4) (HCX PL APO 63 x / NA = 1.4)

Immersionöl (ImmersionolTM518 F / Zeiss)

Phasenscan: 200 Bilder

Schrittweite: 25 nm

Integrationszeit: 250 ms

Objektscan: 100 Bilder

Schrittweite: 50 nm

Integrationszeit: 250 ms

Es wurde ohne binning gemessen

Datenspeicherung im kdf - Format

Blocking - Filter: Z488/568 (AHF-Analysetechnik GmbH, Tübingen, Germany)

Bei der Datenabspeicherung wird automatisch ein Logfile ausgeworfen, das die detaillierte Einstellungsübersicht zeigt.

Die Analyse der erhaltenen Bilder erfolgt sowohl mit den Software Programmen ImageJ als auch mit Matlab. Bei der Bildbearbeitung dieser Aufnahmen wurden Veränderungen bezüglich Helligkeit und Kontrast getätigt. Wie bei den Spinning Disk-Aufnahmen wurden auch in diesem Fall keine Filtereinstellungen verwendet.

2.10.3 Lokalisationsmikroskopie

Die in der Gruppe von Christoph Cremer entwickelte Methode der Lokalisationsmikroskopie (SPDM) basiert auf dem Effekt des reversiblen Photobleichens konventioneller Fluorophore (fluoreszierende Proteine (GFP, YFP, mRFP) oder synthetische Alexa- Farbstoffe). Durch eine geeignete Anpassung der Anregungsintensität ist es möglich, einen großen Anteil der Fluoreszenzmoleküle in einen reversibel gebleichten Zustand zu befördern. Die Rückkehr in den fluoreszierenden Zustand erfolgt stochastisch, mit einer Lebensdauer von $\tau \approx 10$ s, so dass diese zeitliche Isolation für eine optische Separation der Fluorophore genutzt werden kann. Durch die Anpassung einer Modellfunktion an die detektierten Signale kann die Position jedes einzelnen fluoreszenten Moleküls auf bis zu wenige Nanometer genau bestimmt werden. Der Vorteil von SPDM gegenüber anderen Methoden liegt zum einen darin, dass konventionelle Fluorophore verwendet werden, wodurch die biologische Anwendbarkeit enorm gesteigert wird, da bereits etablierte Markierungsverfahren benutzt werden können. Zum anderen sind die erreichten Lokalisationsgenauigkeiten mindestens genau so gut wie bei vergleichbaren Verfahren.

Alle Lokalisationsaufnahmen wurden mit dem oben erwähnten SMI-Mikroskop durchgeführt, hierbei handelt es sich um den selben mikroskopischen Aufbau der lediglich durch eine Linse erweitert wurde.

Laser: diodengepumpter Festkörperlaser ($\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$),

diodengepumpter Festkörperlaser ($\lambda_{\text{exc}} = 568 \text{ nm}$)

Laserintensität: 200 mW

Objektive: Öl-Immersion Objektiv (Leica) (63 - fache Vergrößerung /

Numerische Apertur 1,4) (HCX PL APO 63x / NA = 1.4)

Immersionöl (ImmersionolTM518 F / Zeiss)

Datenstapel: 500 – 10000 Bilder

Beobachtete Schichtdicke: 600 nm

Integrationszeit: 55 - 150 ms

Es wurde ohne binning gemessen

Datenspeicherung im kdf - Format

Blocking - Filter: Z488/568 (AHF-Analysetechnik GmbH, Tübingen, Germany)

520 FD40 (GFP-Filter)

Die genauen Details zur Lokalisationsmikroskopie (wie z.B. Aufbau, Justage und Einstellungen) und den damit entwickelten Algorithmen sind in der Doktorarbeit von Rainer Kaufmann nachzulesen [Kaufmann 2011].

3. Ergebnisse

3.1 COMBO-FISH mit repetitiver Zentromer 9 PNA-Sonde

Die ersten Versuche dieser Doktorarbeit wurden zur Selektion von Farbstoffmolekülen und zur Feststellung der Spezifität und Hybridisierungseffizienz der PNA-Sonden durchgeführt. Sie sollten Aufschluss über die Farbstoffe hinsichtlich ihrer Nachweiseffizienz und Kombinatorik geben, da weitere genspezifische SONDENSSETS mit unterschiedlichen spektralen Farbstoffen synthetisiert werden sollten.

Dafür wurden Hybridisierungen mittels unterschiedlich spektral markierten repetitiven Zentromer 9 PNA-Sonden auf peripheren Blutlymphozyten eines gesunden Spenders durchgeführt. Die Lymphozyten des gesunden Spenders besitzen einen diploiden Karyotyp (46, XY) und daher sind bei den Hybridisierungen zwei Fluoreszenzsignale zu erwarten. Es wurden Untersuchungen sowohl auf Interphasezellkernen als auch auf Metaphase-Spreitungen vollzogen, um die oben genannten Fragestellungen zu beantworten.

Anschließend wurden Experimente mit zwei unterschiedlich spektral markierten Zentromer 9 PNA-Sonden simultan hybridisiert, um eindeutige Kollokationen zu erhalten, die die spezifische Bindung der Zentromer-Sonden bestätigt. Zusätzlich sollten diese Versuche zeigen, welche Fluoreszenzfarbstoffe für weiterführende Experimente vereinbar sind.

Die Experimente mit unterschiedlich fluoreszenzmarkierten Sonden zeigten bei separaten Einzel-Hybridisierungen auf peripheren Blutlymphozyten eines gesunden Spenders zwei klar definierte Fluoreszenzsignale. Diese Markierungen spiegeln die beiden Zentromerregionen von Chromosom 9 wieder. Die Hybridisierungseffizienz lag bei allen Sonden bei $\sim 70\%$. Abbildungen dieser Einzel-Hybridisierungen sind nicht gezeigt.

Die weiteren Experimente mit den simultan hybridisierten Farbstoffkombinationen zeigten zu den Einzel-Hybridisierungen vergleichbar gute Hybridisierungseffizienzen. Auch hier konnten pro Zelle je zwei Fluoreszenzsignale in den unterschiedlichen Farbkanälen detektiert werden. Abbildung 19 zeigt exemplarisch am Beispiel der mit Oregon Green[®] und Texas Red[®] markierten Zentromer 9 PNA-Sonde das simultane Hybridisierungsergebnis dieser beiden Sonden. Die Hybridisierungen wurden erfolgreich sowohl auf Interphase-Zellkernen als auch auf Metaphase-Spreitungen

gezeigt. Die Abbildungen a - e zeigen die einzelnen Zentromermarkierungen der Oregon Green[®] bzw. Texas Red[®] markierten PNA-Sonde. In den überlagerten Abbildungen ist eine eindeutige Kolo-kalisation der beiden erwarteten Fluoreszenzsignale der Zentromere 9 zu sehen. Dieses Ergebnis spricht für eine kompetitive Bindung der beiden Sonden in die Zentromerregion von Chromosom 9 und zeigt, dass die Farbstoffe ohne jeglichen Störeffekt miteinander kombinierbar sind.

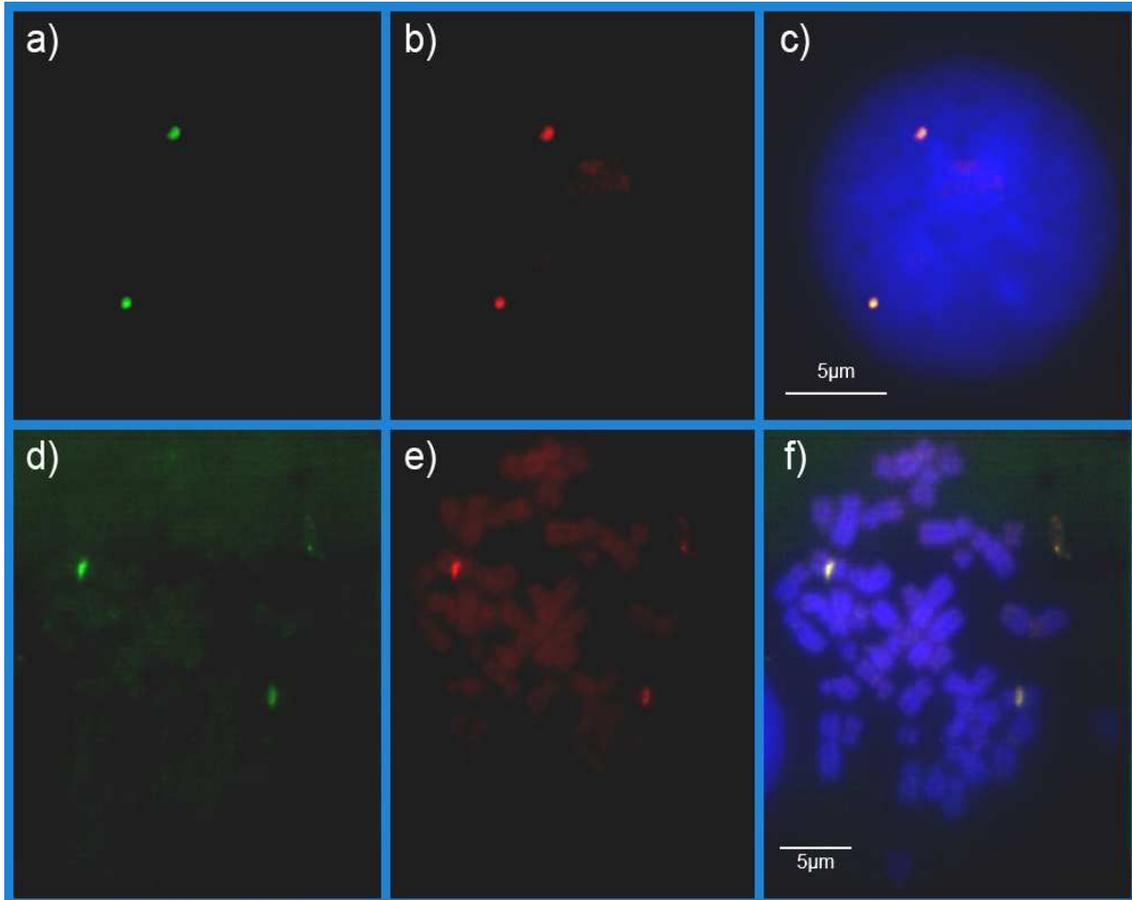


Abbildung 19: COMBO-FISH mit Zentromer 9 PNA-Sonden

Zweifarbigen-COMBO-FISH mit der repetitiven PNA-Oligonukleotid-Sequenz für Zentromer 9 auf Methanol - Eisessig (3:1) fixierten peripheren Blut-Lymphozyten. Beide Sonden (Oregon Green 488[®] $\lambda_{ex/em} = 496/524$ nm und Texas Red[®] $\lambda_{ex/em} = 595/615$ nm) wurden simultan auf Interphasezellkernen (a - c) und auf Metaphase-Spreitungen (d - e) hybridisiert und zeigen Fluoreszenzsignale an der gleichen Position. Abbildungen a und b zeigen sowohl den grünen und roten Farbkanal mit den beiden zugehörigen Fluoreszenzmarkierungen der Zentromere von den beiden Chromosomen 9 im Interphasezellkern. Das gleiche ist bei den Abbildungen d und e für eine Metaphase-Spreitung zu sehen. Die Abbildungen c und f zeigen eine Überlagerung der beiden Farbkanäle. In blau dargestellt ist die DNA-Gegenfärbung mit TOPRO-3-Iodid [Müller¹ et al. 2010].

3.2 Spezifitätsnachweis der repetitiven Zentromer 9 PNA-Sonde

Im nächsten Schritt wurde die Spezifität der Zentromer 9 PNA-Sonde überprüft. Dieses Experiment sollte zeigen, dass die synthetisierten PNA-Sonden sich spezifisch an die Zentromerregion von Chromosom 9 anlagern. Außerdem ist dieser Versuch eine Bestätigung der schon erfolgreich durchgeführten Hybridisierungsexperimente und kann zeigen, dass diese Kolokalisationsexperimente ausreichend sind, um die Spezifität einer Sonde zu ermitteln.

Es wurde die Oregon Green[®] markierte PNA-Sonde für Zentromer 9 mit einer kommerziellen Telomer 9q DNA-Sonde (BAC-Sonde, 9qtel) simultan auf peripheren Blutlymphozyten eines gesunden Spenders hybridisiert. Auch hier werden aus den oben genannten Gründen zwei Fluoreszenzsignale für die Zentromerregion von Chromosom 9 erwartet. Die Telomer-Markierung lässt vier Fluoreszenzsignale erwarten, da jeder der beiden langen Arme der Chromosomen 9 markiert werden sollte. In diesen Experimenten zeigten die Metaphasen-Spreitungen neben den roten Fluoreszenzsignalen der markierten subtelomeren Enden der langen Arme von Chromosom 9 ein zusätzlich grünes Fluoreszenzsignal in der Zentromer-Region des selben Chromosoms. Diese Hybridisierung, welche in Abbildung 20 dargestellt ist, spiegelt die erwarteten Ergebnisse wieder und zeigte somit die Spezifität der synthetisierten PNA-Sonden.

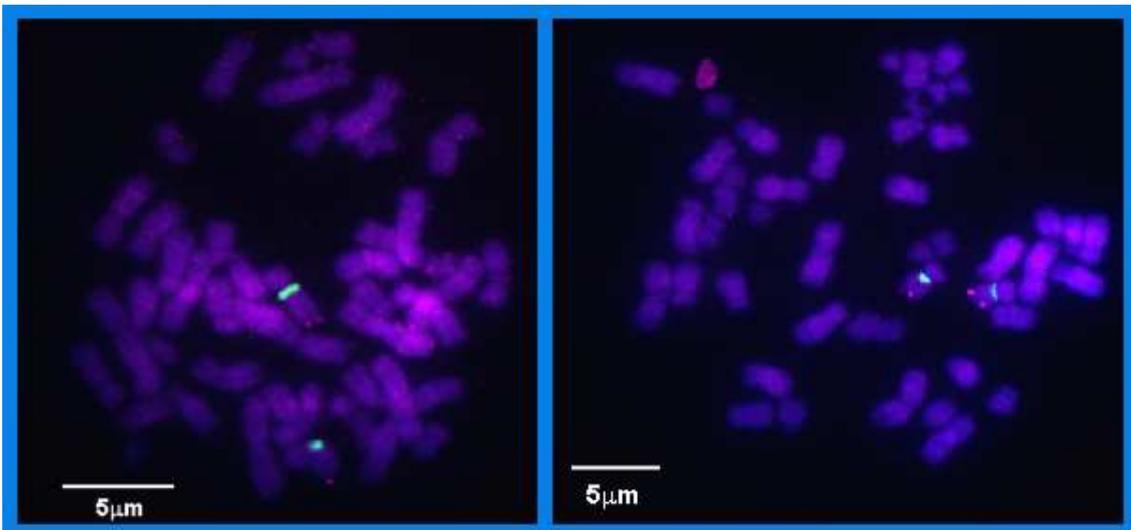


Abbildung 20: COMBO-FISH und Standard-FISH

Zweifarbigen-Experiment mit repetitiver PNA-Oligonukleotid-Sequenz für Zentromer 9 (Oregon Green[®] 488, $\lambda_{ex/em} = 496 / 524$ nm) und kommerzieller Telomer 9q DNA-Sonde (Rhodamin, $\lambda_{ex/em} = 546 / 580$ nm, Qbiogene) auf Methanol - Eisessig (3:1) fixierten peripheren Blut-Lymphozyten (Metaphase). Die beiden roten Fluoreszenzsignale zeigen die Anlagerungen der mit Rhodamin markierten DNA-Sonde an die subtelomere Enden des langen Armes der humanen Chromosomen 9. Die grünen Signale zeigen die Markierung der Zentromerregionen auf den beiden Chromosomen 9. Beide Fluoreszenzsignale liegen auf dem selben Chromosom. TOPRO-3-Iodid wurde als DNA-Gegenfärbung verwendet und ist in blau dargestellt [Müller¹ et al. 2010].

3.3 Diffusionsexperiment mit repetitiver Zentromer 9 PNA-Sonde

Die hier verwendeten PNA-Sonden besitzen zwei Eigenschaften warum sich diese insbesondere für Lebendzellmarkierungen eignen. Zum einen zeigen die PNA-Sonden Resistenzen gegen Nukleasen und Proteasen, was einen schnellen Abbau in den lebenden Zellen verhindern. Zum anderen benötigt die repetitive Zentromersonde keine Denaturierung der Ziel-DNA, um an die gewünschte Region binden zu können. Die verwendeten Cal-51 sind adhärente Brustkrebszelllinien und besitzen wie die Lymphozyten einen diploiden Karyotyp (46, XX). Sie eignen sich aufgrund ihrer festen Anhaftung für die folgenden Experimente. Auch hier erwartet man zwei Zentromersignale pro Zellkern.

Bei allen Experimenten wurde die Oregon Green[®] markierte PNA-Sonde für Zentromer 9 durch direkte Zugabe in das serumfreie Kulturmedium den lebenden Zellen zugeführt und für 24 Stunden in einem Standard-Kulturschrank inkubiert. Die Inkubationszeit wurde so gewählt, dass die Sonde ausreichend Zeit besitzt über Diffusion die Zellen zu erreichen und in den Zellkern transportiert zu werden.

In Abbildung 21 ist eine Cal-51-Zelle nach Inkubation mit der Zentromer 9 PNA-Sonde dargestellt. Die Zellen wurden nach Entfernen des Kulturmediums und Waschen mit 1 x PBS mit 4 % Formaldehyd fixiert. Es erfolgte kein weiterer Behandlungsschritt.

Es zeigten sich nur sehr schwache Fluoreszenzsignale im Zellkern, die hinsichtlich ihrer Intensität nicht vergleichbar mit den oben durchgeführten Hybridisierungen sind. Es scheint, dass kein aktiver Transport der PNA-Sonde in den Zellkern stattfindet. Zusätzlich konnten auch noch Anlagerungen der PNA-Sonde auf der Plasmamembran der Zelle beobachtet werden, die eine deutlich stärkere Fluoreszenz im Gegensatz zu den Signalen im Zellkern zeigen. Dies zeigt, dass ein Teil der PNA-Sonde keine Möglichkeit hatte in das Zellinnere vorzudringen. Aufgrund dieser unspezifischen Fluoreszenzsignale ist eine eindeutige Identifikation der Zentromersignale nicht möglich.

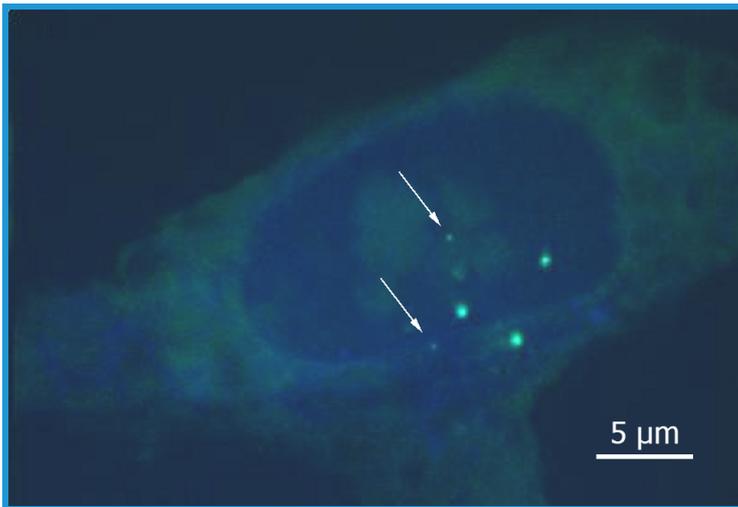


Abbildung 21: Diffusionsexperiment mit Zentromer 9 PNA-Sonde

Die Abbildung zeigt ein Experiment mit repetitiver PNA-Oligonukleotid-Sequenz für die Subregion von Zentromer 9 (Oregon Green 488[®], $\lambda_{\text{ex/em}} = 496 / 524 \text{ nm}$). Die Oregon Green 488[®] markierte PNA-Sonde wurde direkt in das Kulturmedium lebender Cal-51-Zellen zugegeben. Die schwach grünen Fluoreszenzsignale (weiße Pfeile) zeigen die Markierung des Zentromer 9 im Zellkern. Die starken grünen Fluoreszenzsignale hingegen zeigen ein unspezifisches Anlagern der Sonde auf der Zellmembran.

3.4 MATra mit repetitiver Zentromer 9 PNA-Sonde

Eine molekularbiologische Methode lebende Zellen effektiv und zahlreich zu transfizieren ist die Magnet Assisted Transfection (MATra). Diese Methode basiert auf Kopplung von Nukleinsäuren an magnetische Nanopartikel. Das anschließende Anlegen eines magnetischen Feldes zieht die magnetischen Nukleinsäure-Nanopartikel-Komplexe auf die Oberfläche der Zellen und erhöht dadurch die Transfektionswahrscheinlichkeit.

Für diese Versuche wurden die gleichen Zellen sowie die gleiche PNA-Sonde wie in Kapitel 3.3 verwendet. Die zu erwarteten Ergebnisse sind entsprechend zu den oben erwähnten Hybridisierungsergebnissen.

In Abbildung 22 sind in grün die Zellkerne der Cal-51-Zellen dargestellt. Die roten Fluoreszenzsignale zeigen die mit Oregon Green 488[®] markierte PNA-Sonde für Zentromer 9. Die Zellen wurden nach Entfernen der Nukleinsäure-Nanopartikel-Komplexe mit frischem Kulturmedium versorgt und für 48 Stunden in einem Standard-Kulturschrank inkubiert. Abschließend wurden die Zellen mit Formaldehyd fixiert.

Die Transfektionsergebnisse sind in Abbildung 22 zu sehen. Sie zeigen, dass die angewendeten PNA-Sonden die Zellen penetrieren, jedoch der Transport in den Zellkern ausbleibt. Es ist eine klare Ansammlung der PNA-Sonde im Zytoplasma der Zellen zu beobachten. In den Zellkernen konnten keine Fluoreszenzsignale detektiert

werden. Diese Ergebnisse sind nicht konform zu den bereits durchgeführten Hybridisierungen mit dieser PNA-Sonde. Der Weitertransport der im Zytoplasma angesammelten PNA-Sonden in den Zellkern findet nicht statt, daher konnten auch keine spezifischen Zentromersignale detektiert werden.

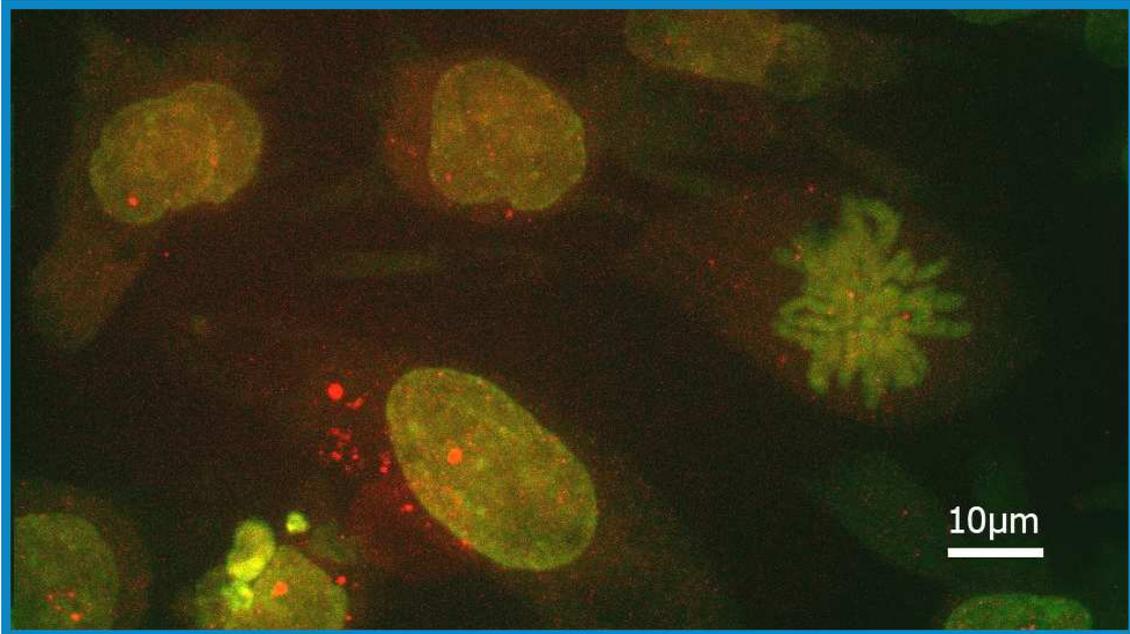


Abbildung 22: MATra mit Zentromer 9 PNA-Sonde

Die Abbildung zeigt ein Ergebnis eines durchgeführten MATra-Experiments mit repetitiver PNA-Oligonukleotid-Sequenz für die Subregion von Zentromer 9 (Oregon Green 488[®], $\lambda_{\text{ex/em}} = 496 / 524 \text{ nm}$). Die Sonde wurde durch Magnet unterstützende Transfektion (engl. Magnet Assisted Transfection - MATra) in die lebenden Cal-51-Zellen eingebracht. Die roten Fluoreszenzsignale zeigen die unspezifischen Ansammlungen der Oregon Green 488[®] markierten PNA-Sonde. In den Zellkernen können keine spezifischen Fluoreszenzsignale der Zentromerregion von Chromosom 9 erfasst werden. TOPRO-3-Iodid wurde als DNA-Gegenfärbung verwendet und ist in grün dargestellt.

3.5 Mikroinjektion von Antikörpern und repetitiver Zentromer 9 PNA-Sonde

Eine weitere Methode um Lebendzelluntersuchungen durchführen zu können ist die Mikroinjektion. Durch feine Glaskanülen wird die Fluoreszenzsonde direkt in die adhärennten Zellen injiziert. Diese Experimente sollten wie die vorangegangenen Versuche zeigen, ob eine Lebendzellmarkierung mit den verwendeten PNA-Sonden grundsätzlich möglich ist.

Für diese Versuche wurden die gleichen Zellen sowie die gleiche PNA-Sonde wie in Kapitel 3.3 und 3.4 verwendet. Die zu erwarteten Ergebnisse sind entsprechend den oben erwähnten.

3. Ergebnisse

Bei den Mikroinjektionsexperimenten wurden zusätzlich zu den repetitiven Zentromer 9 PNA-Sonden auch ein Ki67-Antikörper injiziert, um Aufschluss über Effizienz der Mikroinjektion zu bekommen. Der benutzte Antikörper Ki67 ist ein Proliferationsmarker und färbt die sich teilenden Zellen. Das Protein ist mit Ausnahme der G₀-Phase in allen aktiven Zellzyklusphasen vorhanden. Ki67 zeigt unterschiedliche Muster in den verschiedenen Zellzyklusphasen und ist in der Interphase nur im Zellkern zu beobachten. Alle Zellen wurden nach der Mikroinjektion im entsprechenden Kulturmedium für 24 Stunden in einem Standard-CO₂-Inkubator inkubiert und anschließend sofort mit Formaldehyd fixiert. Es erfolgten keine weiteren Behandlungsschritte.

Dieses direkte Einbringen in den Zellkern zeigte bei Experimenten ausschließlich mit Antikörpern eine gute und spezifische Anlagerung an das jeweilige Zielprotein (Abb. 23 a). Die Fluoreszenzsignale in Abbildung 23 a zeigen die Anlagerung des Ki67-Antikörpers im Interphasezellkern einer proliferierenden Zelle. Diese Beobachtungen entsprechen den zu erwarteten Ergebnissen und zeigen eine erfolgreiche Injektion der Antikörper. Bei simultaner Injektion von Antikörpern mit PNA-Sonde konnte die Antikörpermarkierung klar detektiert werden. Die zu erwartende Fluoreszenzsignale der Zentromer 9 PNA-Sonde konnten aufgrund eines schlechten Signal-zu-Rausch-Verhältnisses im Zellkern nicht detektiert werden. Die grüne Fluoreszenz in Abbildung 23 b) zeigt die hohe Akkumulation der PNA-Sonde im Zellkern. Die Antikörper-Anlagerung ist an der schwach roten Fluoreszenz der Nukleoli zu erkennen. Auch Versuche mit geringeren Konzentrationen der PNA-Sonde lieferten keine eindeutigen Ergebnisse.

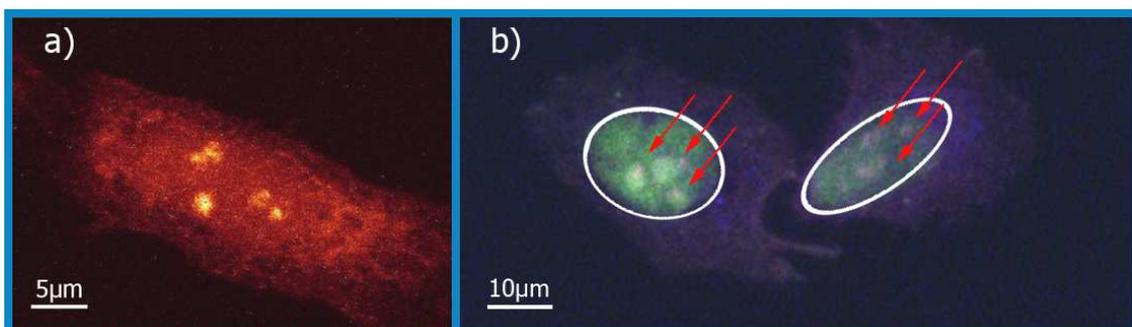


Abbildung 23: Mikroinjektion von Antikörpern & Zentromer 9 PNA-Sonde

a) Experiment mit Ki67-Antikörper (Ziege anti-Maus monoklonaler Primärantikörper Ki67 + Sekundärantikörper Alexa Fluor® 488). Die Antikörper wurden durch Mikroinjektion in die lebenden Cal-51-Zellen injiziert. Die Fluoreszenzsignale zeigen die Markierung des Ki67-Antigens im Interphase-Zellkern. b) Experiment mit Zentromer 9 PNA-Sondenset (Oregon Green 488®) und Ki67-Antikörper (Ziege anti-Maus monoklonaler Primärantikörper Ki67 + Sekundärantikörper Alexa Fluor® 568). Die Sonden und Antikörper wurden durch Mikroinjektion in die lebenden Cal-51-Zellen eingebracht. Danach wurden die Zellen mit Formaldehyd fixiert. Die grüne Fluoreszenz (weißer Kreis) zeigt die Anreicherung der PNA-Sonde im Zellkern. Die Markierung des Ki67-Antigens zeigt sich in der schwach roten Fluoreszenz (rote Pfeile).

3.6 COMBO-FISH mit genspezifischem PNA-Sondenset für *Her2/neu*

Als nächster Schritt wurde ein genspezifisches Sondenset für *Her2/neu* angewendet. Erstes Ziel war es mit diesem Sondenset ein optimales Hybridisierungs-Protokoll zu finden, um weitere Versuche mit guten und hohen Hybridisierungseffizienzen zu erreichen.

Jeder einzelne Protokollschritt wurde geprüft und bei auftretenden Störeffekten variiert, um ein optimales Signal-zu-Rausch-Verhältnis zu erzielen.

In allen Experimenten war ein Hybridisierungs-Protokoll für Oligonukleotid-Sonden die Grundlage. Es wurde immer das neu synthetisierte PNA-Sondenset für die *Her2/neu*-Genregion verwendet. Das Sondenset besteht aus 18 Oligonukleotid-Sequenzen, die am 5'-Ende je ein Oregon Green 488[®] Molekül tragen.

Die verwendeten Zellen waren mit Phytohämagglutinin stimulierte Methanol - Eisessig fixierte periphere Blut-Lymphozyten. Die Zellen wurden zusätzlich mit einer Kaliumchlorid-Lösung behandelt. Diese hypotone Lösung erhöht das Zellvolumen der Zellen und bietet dadurch den Chromosomen eine bessere Ausbreitungsmöglichkeit im Zellkern. Zudem quillt das Chromatin was eine verbesserte Detektion der fluoreszent markierten Genregionen ermöglicht. Wie schon erwähnt besitzen die peripheren Blutlymphozyten eines gesunden Spenders einen diploiden Karyotyp (46, XX) und lassen daher zwei Fluoreszenzsignale für die *Her2/neu*-Genregion im Interphasezellkern erwarten.

Detektiert wurden die Fluoreszenzsignale am konfokalen Spinning Disk- sowie am SMI-Mikroskop. Die erstellten Aufnahmen wurden mittels ImageJ oder Matlab dargestellt.

Bei der hier vorliegenden Arbeit wurde das Hybridisierungs-Protokoll optimiert, um eine gute Bindungsspezifität zu erhalten und eine Clusterbildung der Sonde ausschließen zu können. Unter Verwendung unterschiedlicher Hybridisierungspuffer (siehe Kapitel 2.7, Tabelle 11), unterschiedlicher Hybridisierungstemperaturen sowie verschiedener Konzentrationen der Sonde wurde Einfluss auf die Bindungsspezifität und Clusterbildung genommen.

Bei der Anwendung der unterschiedlichen Hybridisierungspuffer konnte meist kein oder nur ein ungenügender Nachweis von Fluoreszenzsignalen erfolgen. Die fluoreszent markierten Genregionen von *Her2/neu*, die als zwei fluoreszente Punkte im Zellkern auftreten sollten, konnten teilweise aufgrund des hohen Rauschens des Zellkerns nicht beobachtet werden. Im Gegensatz dazu konnte bei der Verwendung des Hybridisierungsmix 1 (siehe Tabelle 11) ein Nachweis dieser beiden Fluoreszenz-

signalen erfolgen, da hier das Signal-zu-Rausch-Verhältnis eine eindeutige Detektion zuließ. Diese guten und eindeutigen Hybridisierungsergebnisse (siehe Abbildungen 24 und 25) führte zur ausschließlichen Benutzung des Hybridisierungsmix 1 für alle weiteren Experimente.

In weiteren Experimenten wurden Hybridisierungstemperaturen von 37 °C, 42 °C und 50 °C getestet. Bei 37 °C konnten die besten Hybridisierungsergebnisse erzielt werden. Hier zeigten die Experimente die stärksten Fluoreszenzsignale der markierten Genregion. Die Hybridisierungstemperatur wurde daher bei den folgenden Experimenten immer bei 37 °C gehalten.

Um eine verbesserte Fluoreszenzsignalausbeute zu erreichen wurde die Sondenkonzentration variiert. Es zeigte sich, dass die besten Ergebnisse erzielt wurden, wenn insgesamt pro Hybridisierung ~ 200 ng PNA bzw. DNA eingesetzt wurde. Andere Sondenkonzentrationen führten entweder zu erhöhtem Rauschen oder zum Fehlen von spezifischen Fluoreszenzsignalen. Eine eindeutige Zuordnung von Signalen konnte bei diesen Hybridisierungen nicht erfolgen.

Des Weiteren wurden verschiedene Variationen bei den nachfolgenden Waschschritten vorgenommen. Die Waschschriffe entfernen die im Überschuss zugegebene Sonde und lösen die nicht erwünschten unspezifischen Bindungen. Eine Erhöhung der Temperatur und / oder Erniedrigung der Salzkonzentration führen zur Stringenzsteigerung der jeweiligen Waschschriffe. Hierbei muss eine für die hybridisierten Sonden optimale Lösung gefunden werden, um weitgehend alle unspezifischen Signale zu eliminieren und die spezifischen Fluoreszenzsignale noch detektieren zu können.

Die besten Hybridisierungsergebnisse wurden bei folgender Behandlung beobachtet. Das Ablösen der mit Zellen besiedelten Deckgläser vom Objektträger erfolgte in 2 x SSC bei Raumtemperatur. Danach wurden die Deckgläser zweimal in 2 x SSC für 5 Minuten bei 42 °C gewaschen und anschließend in eine 0.5 x SSC – Lösung überführt. Dieser Waschschriff dauerte 5 Minuten bei einer Temperatur von 60 °C. Vor dem Eindeckeln der Präparate in Einbettmedium wurden die Deckgläser aus der 60 °C warmen Waschlösung wieder in Raumtemperatur temperiertes 2 x SSC überführt. Diese Waschschriffe kristallisierten sich aus allen Versuchen als am Effektivsten heraus, um anschließend eindeutige Hybridisierungssignale detektieren zu können.

Die folgende Tabelle 13 zeigt eine Zusammenfassung der wichtigsten Schritte der PNA-COMBO-FISH Protokollentwicklung.

Protokollschritte COMBO-FISH	Variationsbereich	Etablierter Wert für COMBO-FISH
Permeabilisierung	nicht variiert	30 Min. bei Raumtemperatur
RNA-Verdau	nicht variiert	1 Stunde bei 37 °C
Pepsin-Verdau	45 Sek. - 1 Min. 20 Sek. bei 37 °C	muss für unterschiedliche Zellen immer individuell angepasst werden: x Sek. bei 37 °C
Denaturierung	nicht variiert	5 Minuten bei 75 °C
Hybridisierungsmix	Zusammensetzung Hybridisierungspuffer siehe 2.7	Hybridisierungsmix 1
Hybridisierungstemp.	37 °C, 42 °C und 50 °C	37 °C
Sondenkonzentration	Zentromer 9: 1,2 pg/µl - 2,4 pg/µl Gen-Sonden: 100 – 200 ng PNA (total)	Zentromer 9: 1,2 pg/µl Gen-Sonden: 200 ng PNA (total)
Waschschrift I	Temperatur: 37 °C – 63 °C	42 °C
	Salzkonzentration: 2 x SSC - 0,5 x SSC	2 x SSC
	Zeit: nicht variiert	5 Minuten
Waschschrift II	Temperatur: 37 °C – 63 °C	60 °C
	Salzkonzentration: 2 x SSC - 0,5 x SSC	0,5 x SSC
	Zeit: nicht variiert	5 Minuten

Tabelle 13: PNA-COMBO-FISH Protokollentwicklung

Die Tabelle zeigt die unterschiedlichen Präparationsschritte einer COMBO-FISH. Weiterhin zeigt sie neben den in der Arbeit variierten Hybridisierungsparametern auch die durch Experimente etablierten Werte für weitere Hybridisierungen.

Abbildungen 24 und 25 zeigen erfolgreiche Hybridisierungen mit dem genspezifischen PNA-Sondenset für das bei Brustkrebs relevante Onkogen *Her2/neu*. Die Anwendung des optimierten Protokolls (optimale Werte für die Hybridisierung sind aus Tabelle 13 zu entnehmen) führte zu eindeutigen Ergebnissen bei diesen nachfolgenden COMBO-

3. Ergebnisse

FISH-Experimenten. Die beiden grünen Fluoreszenzsignale im Zellkern resultieren aus der Zusammenlagerung der mit Oregon Green 488[®] markierten 18 Oligonukleotid-Sequenzen in der Genregion von *Her2/neu*. Die blaue Färbung des Zellkerns ist auf die DNA-Gegenfärbung mit Topro-3-Iodid zurückzuführen. Diese in Abbildung 24 und 25 dargestellten erfolgreichen Hybridisierungsergebnisse sind somit zum einen ein Nachweis für ein optimiertes und erfolgversprechendes Hybridisierungsprotokoll und zum anderen zeigen sie eine spezifische Anlagerung des synthetisierten PNA-Sondensets an die *Her2/neu*-Genregion. Im Gegensatz zu Abbildung 24 sind in Abbildung 25 im unteren Bereich des Zellkerns noch zwei weitere Fluoreszenzsignale zu erkennen. Da keine Synchronisierung der Lymphozyten stattfand, kann es sein, dass der hier dargestellte Zellkern sich zum Fixierungszeitpunkt in der Synthese- oder G2-Phase befand. Die vier detektierten Fluoreszenzsignale sind somit auf die Verdopplung der DNA zurückzuführen.

Anhand der in Abbildung 25 gezeigten 3D-Rekonstruktion kann das Abflachen des Zellkerns das auf die Methanol/Eisessig-Fixierung zurückzuführen ist klar beobachtet werden [Bartram 2007]. In hellblau ist der Zellkern mit seiner geringen Ausdehnung in axialer Richtung zu sehen, grün hervorgehoben sind die beiden spezifischen Fluoreszenzsignale für *Her2/neu*. Die 3D-Rekonstruktion erfolgte durch ein auf Matlab basierendes Programm.

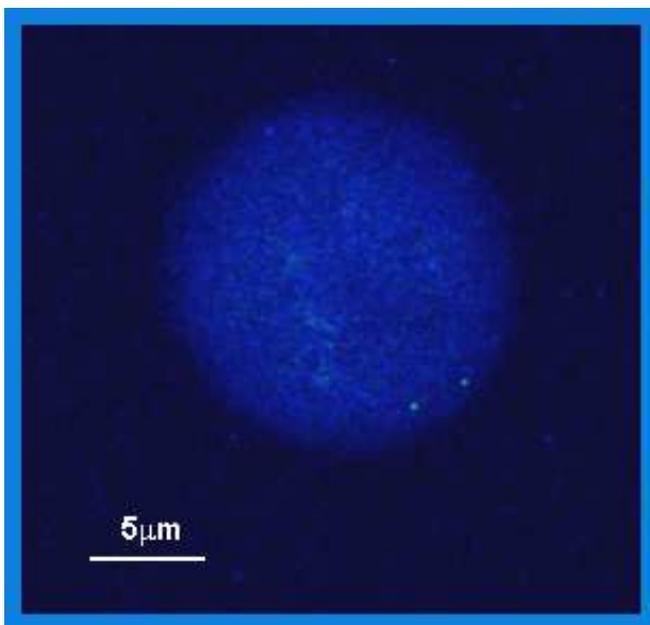


Abbildung 24: COMBO-FISH mit *Her2/neu* PNA-Sondenset

COMBO-FISH mit dem genspezifischen *Her2/neu* PNA-Sondenset (Oregon Green 488[®]) auf Methanol - Eisessig (3:1) fixierten peripheren Blut-Lymphozyten. Der Interphasezellkern wurde mit Topro-3-Iodid gegengefärbt und ist in blau dargestellt. Die grünen Fluoreszenzsignale wurden durch die Zusammenlagerung der 18 Oligonukleotid Sequenzen, die am 5'-Ende je ein Oregon Green 488[®]-Molekül tragen erzielt.

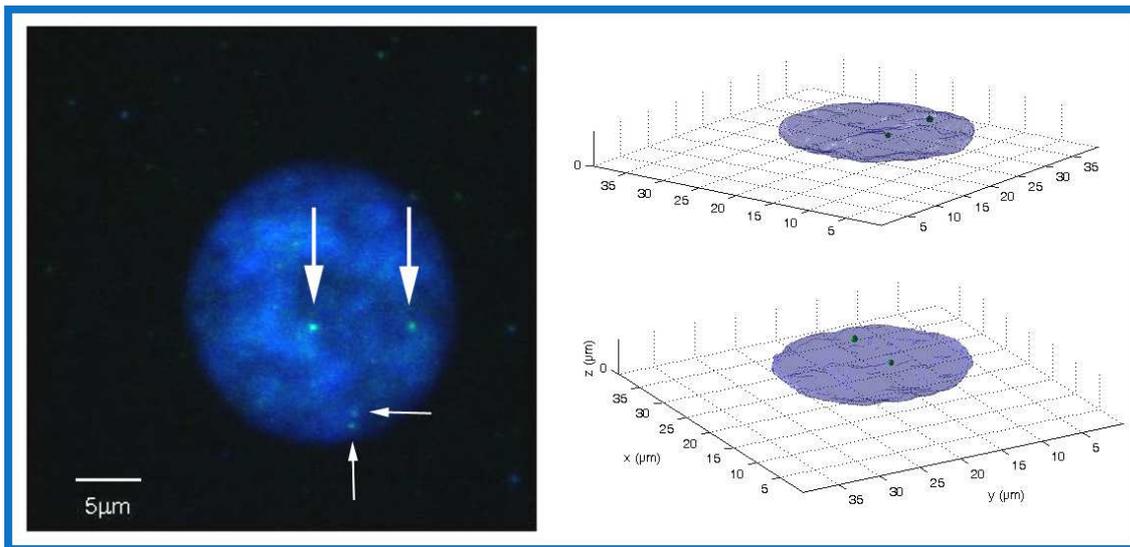


Abbildung 25: 3D-COMBO-FISH mit *Her2/neu* PNA-Sondeset

COMBO-FISH mit genspezifischen *Her2/neu* PNA-Sondenset (Oregon Green) auf Methanol - Eisessig (3:1) fixierten peripheren Blut-Lymphozyten. a) Die grünen Fluoreszenzsignale (große und weiße Pfeile) wurden erzielt durch die Zusammenlagerung der 18 Oligonukleotid Sequenzen, die am 5'-Ende je ein Oregon Green 488[®] Molekül tragen. Im unteren Bereich des Zellkerns sind noch weitere grüne Fluoreszenzsignale zu erkennen (kleine und weiße Pfeile). Interphasezellkern mit in blau dargestellter Topro-3-Iodid-Gegenfärbung. b) 3D-Rekonstruktion des Zellkerns aus a). Die grünen Signale spiegeln die beiden Fluoreszenzsignale wieder, in hellblau ist der abgeflachte Zellkern zu sehen. Die 3D-Rekonstruktion wurde mit einem in Matlab implementierten Programm erstellt.

3.7 COMBO-FISH mit genspezifischen PNA-Sondensets für *Her2/neu* und *GRB7*

Nach der Etablierung eines Hybridisierungsprotokolls für genspezifische Sondensets wurde nicht nur ein weiteres Sondenset für *Her2/neu*, sondern auch ein Sondenset für das benachbarte *GRB7*-Gen synthetisiert. Da die beiden Onkogene auf Chromosom 17 in direkter Nachbarschaft liegen sollte dieser Versuchsansatz, wie schon in Kapitel 3.1 gezeigt wurde, über eine Kolo-kalisation der Fluoreszenzsignale die spezifische Bindung beider Sondensets bestätigen.

Die unterschiedlich fluoreszenzmarkierten Sondensets wurden auf Cal-51 Brustkrebszellen, die einen normalen Genotyp aufweisen simultan hybridisiert und anschließend mit Formaldehyd-Lösung fixiert. Diese strukturerhaltende Fixierungsmethode wurde getestet, um in naher Zukunft die Anordnung der beiden Onkogene in unterschiedlichen Zellzyklusphasen zu untersuchen. Für diese Untersuchungen ist eine strukturerhaltende Fixierung entscheidend, um möglichst getreu die Chromatinorganisation im Zellkern untersuchen zu können.

Es kamen die über Watson-Crick-Bindungen hybridisierenden Sondensets zum Einsatz. Diese benötigen aufgrund dieser Anlagerung der Sonde an die komplementäre Einzelstrang-DNA eine Denaturierung. Finden beide spektral unterschiedlich markierte

3. Ergebnisse

Sondensets erfolgreich ihre Ziel-DNA sollten jeweils zwei punktförmige Fluoreszenzsignale detektierbar sein, die bei einer Überlagerung der einzelnen Farbkanäle kolokalisieren.

In Abbildung 26 ist eine simultane Hybridisierung der beiden unterschiedlich fluoreszenzmarkierten Sondensets zu sehen. Die roten punktförmigen Fluoreszenzsignale resultieren aus den 17 Oligonukleotid-Sequenzen für *GRB7*, die am 5'-Ende je ein Texas Red[®] Molekül tragen, die grünen Signale aus den 20 Oligonukleotid-Sequenzen für *Her2/neu*, die am 5'-Ende je ein Oregon Green 488[®] Molekül tragen. Die gelben Fluoreszenzsignale in dem überlagerten Bild setzen sich entsprechend aus den roten und grünen Fluoreszenzsignalen der beiden markierten Genregionen zusammen. Die Kolokalisation zeigt die spezifische Markierung der beiden benachbarten Genregionen. In Abbildung 26 sind zusätzlich zu den gelben Fluoreszenzsignalen je ein weiteres rotes und grünes Fluoreszenzsignal zu erkennen. Diese Markierungen sind wohl auf unspezifische Anlagerungen der Sondensets zurückzuführen. Die blaue Färbung des Zellkerns zeigt die DNA-Gegenfärbung mit Topro-3-Iodid.

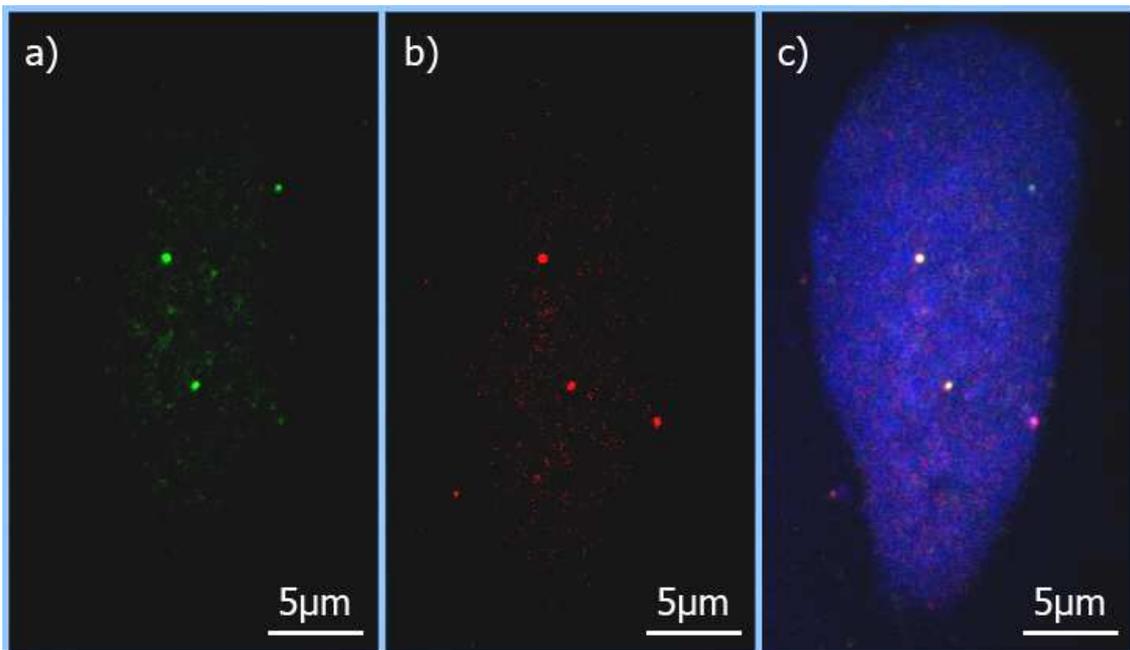


Abbildung 26: COMBO-FISH mit *Her2/neu* und *GRB7* PNA-Sondensets

COMBO-FISH mit dem genspezifischen *Her2/neu* PNA-Sondenset (Oregon Green 488[®]) und dem *GRB7* PNA-Sondenset (Texas Red[®]) auf Formaldehyd fixierten Cal-51-Zellen. a) Die grünen Fluoreszenzsignale wurden durch die Zusammenlagerung der 20 Oligonukleotid Sequenzen, die am 5'-Ende je ein Oregon Green 488[®] Molekül tragen und spezifisch an die *Her2/neu* – Genregion hybridisieren erreicht. b) Die roten Fluoreszenzsignale kommen durch die 17 Oligonukleotid Sequenzen, die am 5'-Ende je ein Texas Red[®] Molekül tragen und somit spezifisch die *GRB7* – Genregion markieren zustande. c) Die Überlagerung der beiden Farbkanäle führt zu den gelben Signalen. Sie zeigen, dass die beiden markierten Gene in direkter Nachbarschaft liegen und sprechen somit für eine spezifische Anlagerung der beiden Watson-Crick-Sondensets an ihre jeweilige Ziel-DNA. Die Gegenfärbung des Interphasezellkern mit Topro-3-Iodid ist in blau dargestellt [Dauber et al. 2010].

Die unterschiedlichen Hybridisierungen führten teilweise auch zu Anlagerungen der Sonden an die Nucleoli der Zellkerne (siehe Abbildung 27). Diese nicht erwünschte Markierung konnte jedoch durch Variation des Hybridisierungspuffers minimiert und eliminiert werden. Hier handelte es sich um sehr starke Bindungen, da diese nicht durch stringenteren Waschschrte gelöst werden konnten. Neben den Markierungen der Nucleoli sind auch kleine Fluoreszenzsignale in den Zellkernen zu erkennen. Diese Anlagerungen an die Nucleoli wurden zu einem Zeitpunkt beobachtet, als die PNA-Sondensets mehrere Auftau- und Einfriervorgänge hinter sich hatten. Es könnte sein, dass die fluoreszent markierten Sonden sich chemisch verändern und dadurch eine Affinität zu den Nucleoli im Zellkern entwickeln. Bei neu synthetisierten Sonden konnte diese Phänomen nicht beobachtet werden.

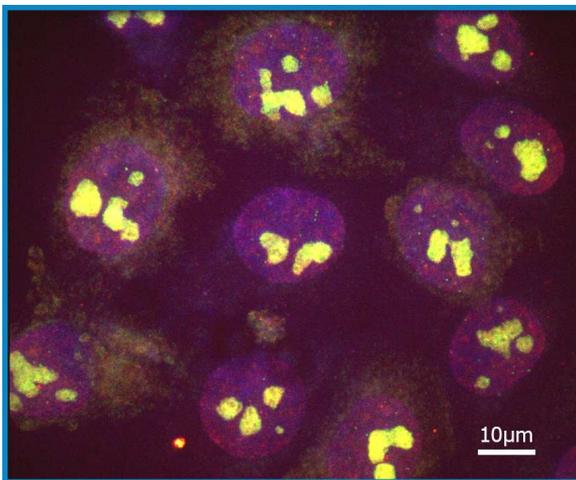


Abbildung 27: COMBO-FISH mit unspezifischer Anlagerung

COMBO-FISH mit genspezifischen *Her2/neu* PNA-Sondenset (Oregon Green 488[®]) und *GRB7*-PNA-Sondenset (Texas Red[®]) auf Formaldehyd fixierten Cal-51-Zellen. Die Gegenfärbung des Interphasezellkerns mit Topro-3-Iodid ist in blau dargestellt. Die gezeigte Überlagerung der beiden Farbkanäle führt zu den gelben Signalen. Die gelben Fluoreszenzsignale zeigen eine Anlagerung der beiden Watson-Crick-PNA-Sondensets an die Nucleoli des Zellkerns. Weiter sind auch noch kleine punktförmige Fluoreszenzsignale zu erkennen, die die beiden Genregionen markieren.

3.8 COMBO-FISH mit TINA-modifizierten PNA-Sondenset für *bcr*

Eine Modifikation der tripelhelikal bindenden Sondensets für die Lebendzellmarkierung war das Einführen von sogenannten TINAs in die jeweiligen Oligo-Sequenzen. Diese Interkalatoren unterstützen die Anlagerung und Anbindung der Oligos in die große Furche des nativen DNA-Doppelstrangs und erhöhen somit die zu erwartende Triplex-Formation. Erste Versuche mit diesen TINA-modifizierten Sondensets wurden an Methanol/Eisessig fixierten peripheren Blutlymphozyten eines gesunden Spenders

3. Ergebnisse

getestet. Der diploide Karyotyp lässt zwei Fluoreszenzsignale für die markierten *bcr*-Genregionen erwarten. Dieses Sondenset war mit dem Farbstoff Fluorescein markiert und bestand aus 15 Oligosequenzen, die sich in der *bcr*-Genregion anlagern sollten. Die Ergebnisse der Hybridisierung auf Interphase und Metaphase sind in Abbildung 28 dargestellt. Es zeigten sich sehr viele fluoreszenzmarkierte Regionen, so dass keine eindeutige Zuordnung der *bcr*-Genregion möglich war. Die vielen unspezifischen Bindungen, die zu diesem schlechten Hybridisierungsergebnis führten sind wohl auf die Synthesereinheit des Sondensets zurückzuführen.

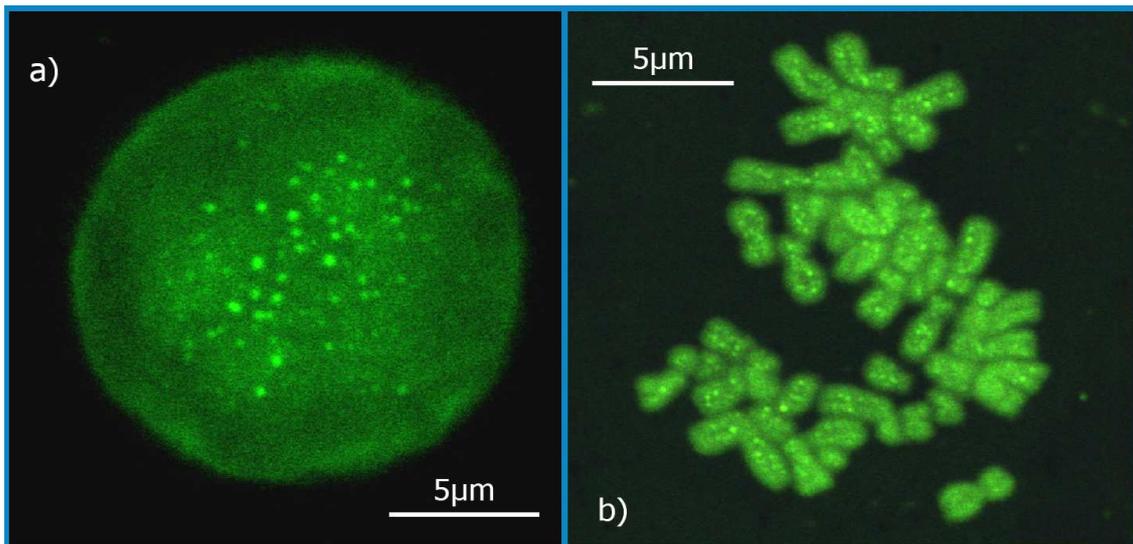


Abbildung 28: COMBO-FISH mit TINA-PNA-Sondenset für *bcr*

COMBO-FISH mit dem TINA modifiziertem PNA-Sondenset für die *bcr*-Genregion auf Methanol/Eisessig (3:1) fixierten Blut-Lymphozyten. a) zeigt einen Interphasezellkern, b) eine Metaphasen-Spreitung. Die Fluoreszenzsignale wurden erzielt durch die Zusammenlagerung der 15 mit TINA modifiziertem Oligonukleotid-Sequenzen, die am 5'-Ende je ein Fluorescein-Molekül tragen. Eine Gegenfärbung wurde nicht durchgeführt.

3.9 COMBO-FISH mit TINA-modifizierten PNA-Sondenset für *Her2/neu*

Die Weiterentwicklungen dieses Sondensets bestanden zum einen in der Neuordnung der TINAs in den schon vorhandenen und etablierten Oligosequenzen für *Her2/neu* und zum anderen in der Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffs Cy3. Die Lage der TINAs in den einzelnen SONDENSEQUENZEN ist für die Inkorporation in die native DNA von entscheidender Bedeutung. Darüber hinaus spielen auch die verwendeten Farbstoffmoleküle eine Rolle, um möglichst effiziente Fluoreszenzsignale zu erreichen. Der Wechsel zu dem etablierten Sondenset für die *Her2/neu*-Genregion war von Vorteil, da hier schon eindeutige Hybridisierungsergebnisse auf den Cal-51-Brustkrebszellen erreicht werden konnten (siehe Abbildung 26). Nach den Hybridisierungen dieses TINA-modifizierten PNA-Sondensets für *Her2/neu* wurden die

Brustkrebszellen Cal-51 mit Formaldehyd fixiert. Es waren keine weiteren Behandlungsschritte nötig, da das verwendete TINA-Sondenset tripelhelikal in die große Furche der doppelhelikalen DNA bindet. In Abbildung 29 sind Interphasezellkerne von Cal-51-Zellen gezeigt. Die zwei roten Fluoreszenzsignale pro Zellkern wurden durch die Zusammenlagerung der 24 mit TINA modifizierten Oligonukleotid-Sequenzen erzielt, die am 5'-Ende je ein Cy3 Molekül tragen. Die Hybridisierungseffizienz lag bei 40 %. Die erhaltenen Ergebnisse entsprechen dem zu erwartenden Ergebnis und sind ein Beispiel für eine erfolgreiche Lebendzellmarkierung, die über das Hoogsteen bindende Sondenset für *Her2/neu* erreicht wurde.

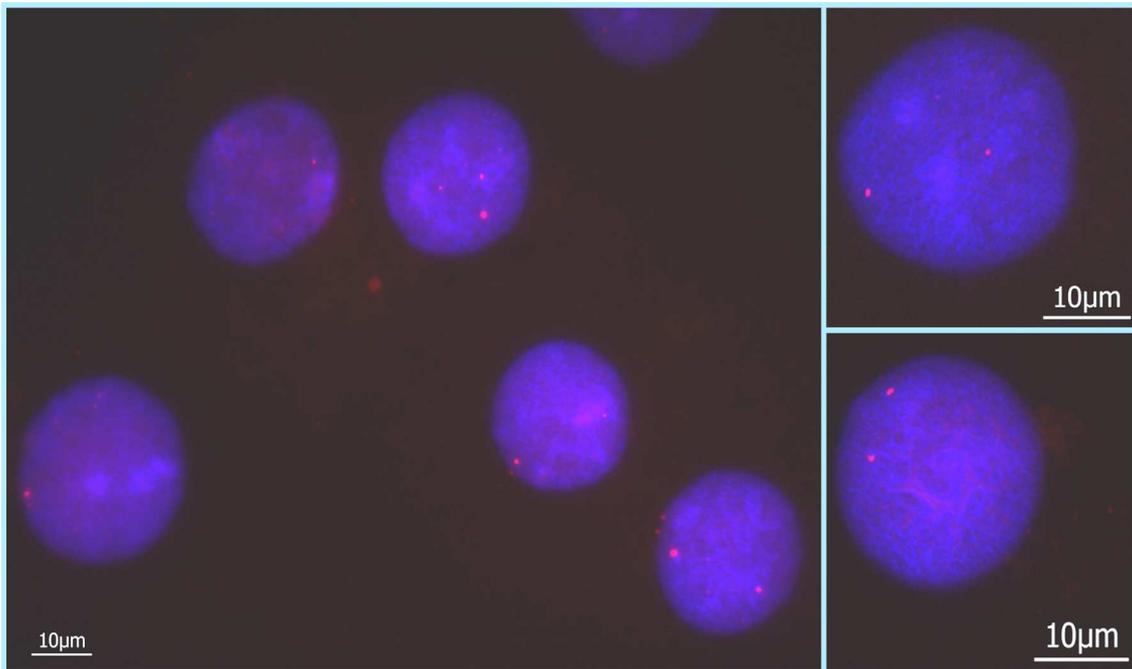


Abbildung 29: COMBO-FISH mit dem TINA-PNA-Sondenset für *Her2/neu*

COMBO-FISH mit TINA-modifiziertem PNA-Sondenset (Cy3) für *Her2/neu* auf Methanol/Eisessig (3:1) fixierten Cal-51-Zellen. Interphasezellkerne mit Topro-3-Iodid-Gegenfärbung. Die roten Fluoreszenzsignale wurden durch die Zusammenlagerung der 24 mit TINA modifizierten Oligonukleotid-Sequenzen erzielt, die am 5'-Ende je ein Cy3-Molekül tragen. Das TINA-Sondenset bindet in die große Furche der doppelhelikalen DNA. Es wurde daher keine Denaturierung durchgeführt.

3.10 Analyse der Plasmamembran von Cal-51-Zellen mittels Lokalisationsmikroskopie

Die in der Arbeitsgruppe von Prof. C. Cremer weiterentwickelte Spektrale-Präzisions-Distanz-Mikroskopie (SPDM - engl. Spectral Precision Distance / Position Determination Microscopy) führte zu Grundlageexperimenten, die zur Optimierung und Etablierung biologischer Präparate für diese Art von Mikroskopie dienen sollten. Der Vorteil dieser hochauflösenden Lokalisationsmikroskopie im Vergleich zu anderen Lokalisationsmikroskopie-Methoden ist die Anwendung von konventionellen Fluoreszenzmolekülen (z. B. fluoreszierende Proteine und Alexa-Farbstoffe) unter Standard-Präparationsmethoden.

Es wurden dafür systematisch die unterschiedlichen Kompartimente der menschlichen Zelle mit Fluoreszenzproteinen markiert und untersucht, um diese neu entwickelte Mikroskopiemethode zu überprüfen.

Die Präparate zur Untersuchung der Plasmamembran wurden mit einem kommerziellen Plasmid-Konstrukt durchgeführt, das sich aus einem Promotor, Fluoreszenz-Protein (hier: YFP) und einem Signal-Peptid zusammensetzt. Das Signal-Peptid des fluoreszenten Plasmid-Konstrukts ermöglicht einen zielgerichteten Transport des Fluoreszenzmarkers zum spezifischen zellulären Kompartiment (hier: die Plasmamembran). Bei den verwendeten Zellen handelt es sich um Zellen der Brustkrebszelllinie Cal-51, die nach Anwendung des kommerziellen Kits mit Formaldehyd fixiert wurden. Das Prinzip des Organelle Lights™-Kits ist in Abbildung 16 in Kapitel 2.5.6 genau dargestellt.

In allen drei Lokalisationsbildern von Abbildung 30 ist die Plasmamembran einer Cal-51-Zelle zu sehen, die mittels des Organelle Lights™-Kit mit dem fluoreszierenden Protein YFP markiert wurde. Die rot eingefärbten Punkte der Bilder zeigen die einzelnen detektierten Fluoreszenzsignale, die bei einer Lokalisationsaufnahme reversibel gebleicht und aufgenommen wurden. Jeder Punkt ist mit der entsprechenden Lokalisationsgenauigkeit verschmiert. Das aus diesen Punkten zusammengesetzte Lokalisationsbild lässt eindeutig die dünnen Strukturen von Plasmamembranausläufern der Cal-51-Zelle erkennen. Das in grün dargestellte Weitfeld-Fluoreszenzbild wurde mit dem roten Lokalisationsbild überlagert und zeigt eine klare Übereinstimmung der detektierten Plasmamembranstrukturen der Zelle. In Abbildung 30 b ist ein vergrößerter Ausschnitt aus 30 a zu sehen. Hier ist nochmal klar zu erkennen, dass beide Fluoreszenzbilder deckungsgleich den Verlauf der beiden Zellausläufer widerspiegeln. Anhand dieser ersten Ergebnisse konnte gezeigt werden,

dass sich mit Lokalisationsmikroskopie dünne mit einem Fluoreszenzprotein markierte Strukturen eindeutig bis auf wenige Nanometer genau nachweisen lassen. In Abbildung 30 c ist eine aus den Lokalisationsdaten rekonstruierte 3D-Darstellung der Zellmembranausläufer zu sehen. Diese Abbildung zeigt, dass durch die Kombination von Lokalisationsmikroskopie mit SMI-Mikroskopie eine Möglichkeit besteht biologische Nanostrukturen mit einer effektiven optischen Auflösung im Bereich von 50 nm darzustellen.

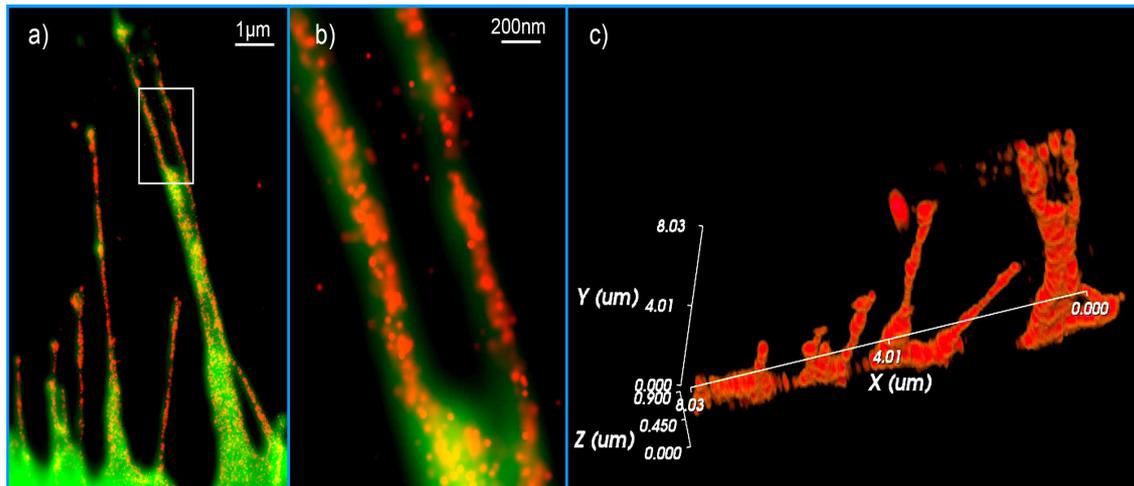


Abbildung 30: Lokalisationsbild der Plasmamembran einer Cal-51-Zelle

Lokalisationsbild der YFP-markierten Plasmamembran einer Cal-51-Zelle. Jeder Punkt ist mit der entsprechenden Lokalisationsgenauigkeit verschmiert. a) Das in rot dargestellte Lokalisationsbild ist mit dem entsprechenden grün eingefärbten Weitfeld-Bild überlagert. Beide zeigen die zellulären Ausläufer einer Cal-51-Zelle. In b) ist ein vergrößerter Ausschnitt zweier Zellausläufer aus a) gezeigt. c) 3D-Darstellung der Zellausläufer (x, y und z zeigen die drei verschiedenen Raumrichtungen an).

3.11 m164-Protein-Verteilung nach Virusinfektion (mCMV)

In einer weiteren Untersuchung wurde die Verteilung eines im Zytoplasma und der äußeren Kernmembran akkumulierenden Proteins analysiert. Dieser Versuch sollte zeigen, ob es möglich ist mittels Lokalisationsmikroskopie Proteinverteilungen im Zytoplasma zu untersuchen und gegebenenfalls auftretende Strukturunterschiede zu erkennen. Für diese Untersuchungen im Zytoplasma wurden Fibroblasten-Zellen (COS7) mit dem murinen Zytomegalievirus (mCMV) infiziert. Durch diese über den mCMV erreichte Transfektion wird ein YFP-markiertes Plasmid-Konstrukt für das Transmembran-Glykoprotein m164 in die COS7-Zellen eingebracht und von diesen transient exprimiert. Das Genprodukt von *m164* ist ein 36,5 kDa großes integrales Typ-I-Membran-Glykoprotein und akkumuliert sowohl innerhalb des endoplasmatischen Retikulums (ER) als auch in der äußeren Kernmembran [Holtappels et al. 2002]

3. Ergebnisse

[Däubner et al. 2010]. Die Abbildung 31 zeigt die m164-Proteinverteilung einer mit dem mCMV infizierten Fibroblasten-Zelle, sowohl als Weitfeldaufnahme als auch als Lokalisationsaufnahme. Durch die starke Expression des m164-Proteins und der damit verbundenen guten Fluoreszenzausbeute können deutliche, strukturell unterschiedliche Regionen im Zytoplasma beobachtet werden (Abbildung 31 b). Die Abbildungen c - e zeigen zusätzlich drei vergrößerte Bereiche der Zelle, die eine homogene Molekülverteilung c), eine strukturierte Molekülverteilung e) und die Molekülverteilung eines Membranabschnitts d) widerspiegeln. Die unterschiedlichen Strukturen des Zytoplasmas und der äußeren Kernmembran sind gegenüber dem Weitfeld-Bild klar zu erkennen. Andeutungen dieser Strukturen sind jedoch auch im Weitfeld-Bild zu sehen (Abbildung 31 a). Diese Ergebnisse zeigen, dass neben einer eindeutigen Proteinverteilung auch strukturelle Unterschiede innerhalb des Zytoplasmas beobachtet werden können [Müller² et al. 2010].

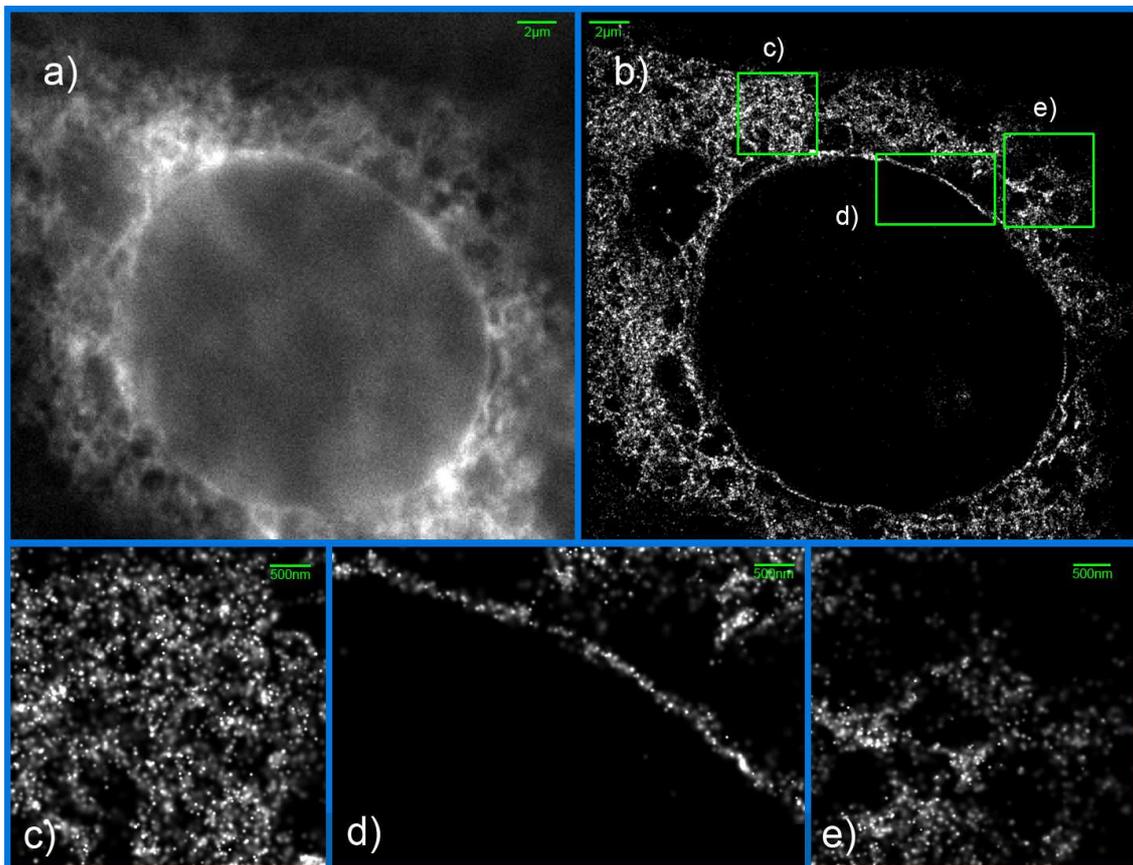


Abbildung 31: m164-Protein-Verteilung nach Virusinfektion (mCMV)

Die Abbildung zeigt YFP-markierte m164-Proteine einer Fibroblasten-Zelle. Die Verteilung spiegelt die Akkumulation des exprimierten Proteins im Endoplasmatischen Retikulum und in der äußeren Kernmembran wider. a) Weitfeld-Bild einer mit YFP-markierten COS7-Zelle, b) Lokalisations-Bild der gleichen COS7-Zelle. Die Position der einzelnen detektierten Moleküle (Protein: m164-YFP) ist mit der jeweiligen Lokalisationsgenauigkeit verschmiert. Die vergrößerten Bilder c – e zeigen die in Abbildung b) markierten Ausschnitte. Dabei ist c) eine Region mit homogener Molekülverteilung, d) eine Region eines Membranbereichs und e) eine Region mit strukturierter Molekülverteilung [Müller² et al. 2010].

In diesem Zusammenhang sollte zusätzlich die Frage beantwortet werden, ob sich die im Lokalisationsbild auftretenden Strukturen statistisch nachweisen lassen.

Die in Abbildung 31 vergrößert dargestellten Regionen (c – e) zeigen exemplarisch die strukturell unterschiedlichen, ausgewerteten Bereiche im Zytoplasma der Zelle. Die nachfolgenden Diagramme zeigen eine Distanzanalyse und zwei Nachbarschaftsanalysen der detektierten fluoreszent markierten m164-Proteine in diesen drei strukturell unterschiedlichen Zytoplasmaregionen.

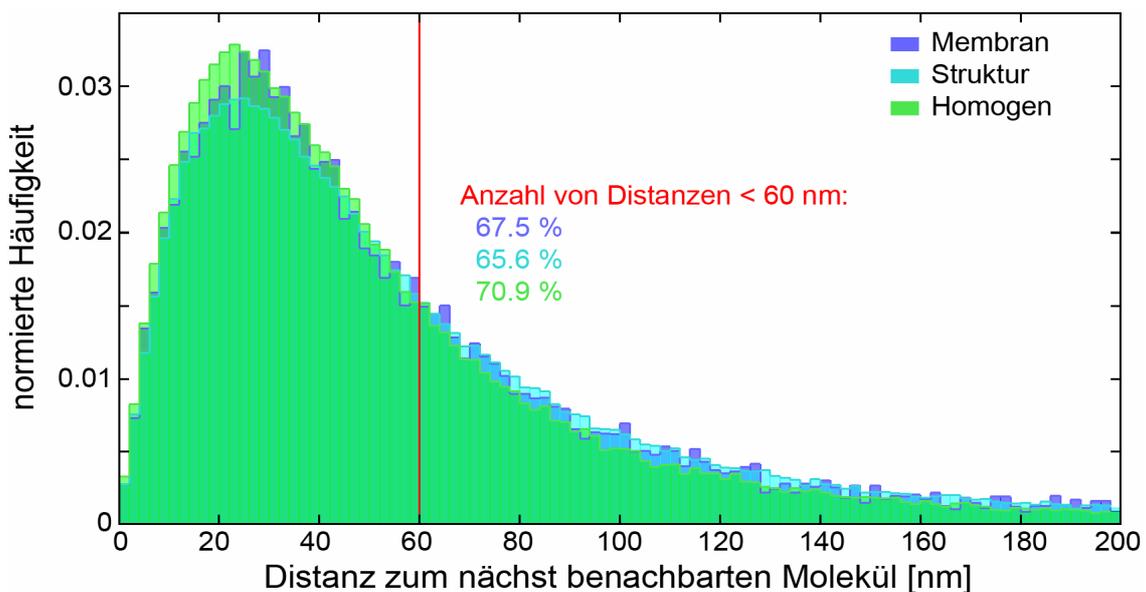


Abbildung 32: Verteilung der Distanzen zum nächsten Nachbarn (m164)

m164-Protein-Verteilungen für drei unterschiedlich strukturierte Zytoplasmabereiche. Anhand der Distanzen zum nächsten benachbarten Molekül wurde die lokale Dichte der m164-Proteine in diesen strukturell unterschiedlichen Zytoplasmabereichen ermittelt. Grün dargestellt sind die homogenen Regionen, türkis die strukturierten Regionen und blau die Membran-Regionen. Die Zahlen zeigen den prozentualen Anteil von Distanzen, die unterhalb 60 nm liegen [Müller² et al. 2010].

Das Diagramm in Abbildung 32 zeigt anhand der Distanzen zum nächsten benachbarten Molekül die lokale Dichte der m164-Proteine in den strukturell unterschiedlichen Zytoplasmabereichen. Das Diagramm weist bei allen drei Verteilungen eine ähnlich hohe lokale Dichte auf. Die strukturierten Regionen und die Membran-Regionen zeigen im Vergleich zu den homogenen Regionen eine etwas geringere Anzahl von kleinen Distanzen. Dieses Ergebnis deutet auf mehr Struktur in den beiden Bereichen hin. Der prozentuale Anteil der Distanzen kleiner als 60 nm zum nächsten Nachbarn im Verhältnis zu allen nächsten Nachbarn-Distanzen bis 200 nm beträgt für die Membran-Regionen 67.5%, für die strukturierten Regionen 65.6% und für die homogenen Region 70.9%.

3. Ergebnisse

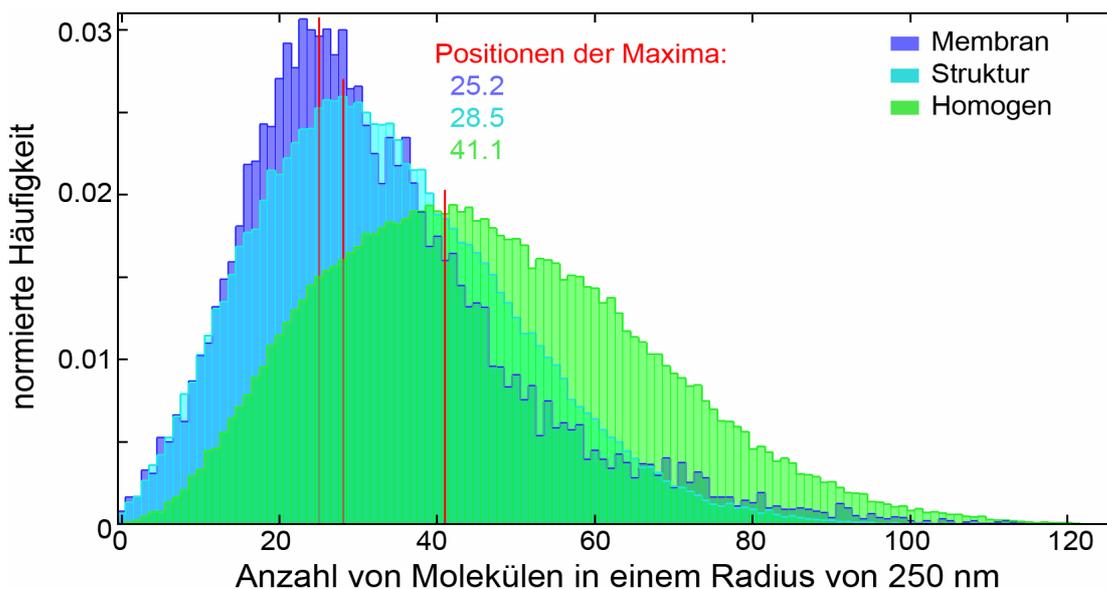


Abbildung 33: Anzahl von m164 in einem Radius von 250 nm

m164-Protein-Verteilungen für drei unterschiedlich strukturierte Zytoplasmabereiche. Die Verteilungen zeigen die Anzahl der Nachbarn innerhalb eines Radius von 250 nm für jedes detektierte Molekül. Der Radius wurde so gewählt, dass die in den Lokalisationsbildern detektierten charakteristischen Strukturen innerhalb dieses Radius liegen. Grün dargestellt sind die homogenen Regionen, türkis die strukturierten Regionen und blau die Membran-Regionen. Die Zahlen zeigen die Positionen der Maxima in nm und sind zusätzlich mit einem roten senkrechten Strich gekennzeichnet [Müller² et al. 2010].

Bei der Auswertung in Abbildung 33 wurde die Anzahl der Nachbarn innerhalb eines Radius von 250 nm für jedes detektierte Molekül bestimmt. Hier wurde der Radius so gewählt, dass die im Lokalisationsbild detektierten charakteristischen Strukturen innerhalb dieses Radius liegen.

Bei annähernd gleicher lokaler Dichte aller drei ausgewählten Regionen (siehe Abbildung 32) ist die Anzahl von Punkten in einem Radius von 250 nm bei den schmalen Membranregionen im Mittel am geringsten. Die Verteilung bei den strukturierten Regionen ist ähnlich zu den Membranregionen, jedoch zeigt sie eine breitere Verteilung und ist zu höheren Werten hin verschoben. Da die lokalen Dichten von Molekülen in beiden Regionen sehr ähnlich sind (Abb. 32) spricht das für ähnlich auftretende Strukturen in diesen Regionen. Die Verschiebung der strukturierten Regionen hin zu größeren Werten kann damit begründet werden, dass zwar ähnliche Strukturen vorliegen, jedoch die Moleküle in der Membran-Region in nur einer Richtung orientiert sind. Im Gegensatz dazu können die Moleküle der strukturierten Region in mehrere Raumrichtungen orientiert vorliegen. Sie zeigen ein Geflecht aus diesen Strukturen.

Da die homogenen Regionen eine etwas höhere lokale Dichte aufweisen (Abb. 32) kann eine deutlich höhere Anzahl von Nachbarn im gleichen Radius detektiert werden. Dieses Ergebnis deutet auf deutlich breitere Strukturen in diesen homogenen

Zytoplasmaregionen hin. Die Positionen der Maxima der Verteilungen sind für die Membran-Regionen 25.2 ± 0.7 nm, für die strukturierten Regionen 28.5 ± 0.5 nm und für die homogenen Regionen 41.1 ± 0.5 nm.

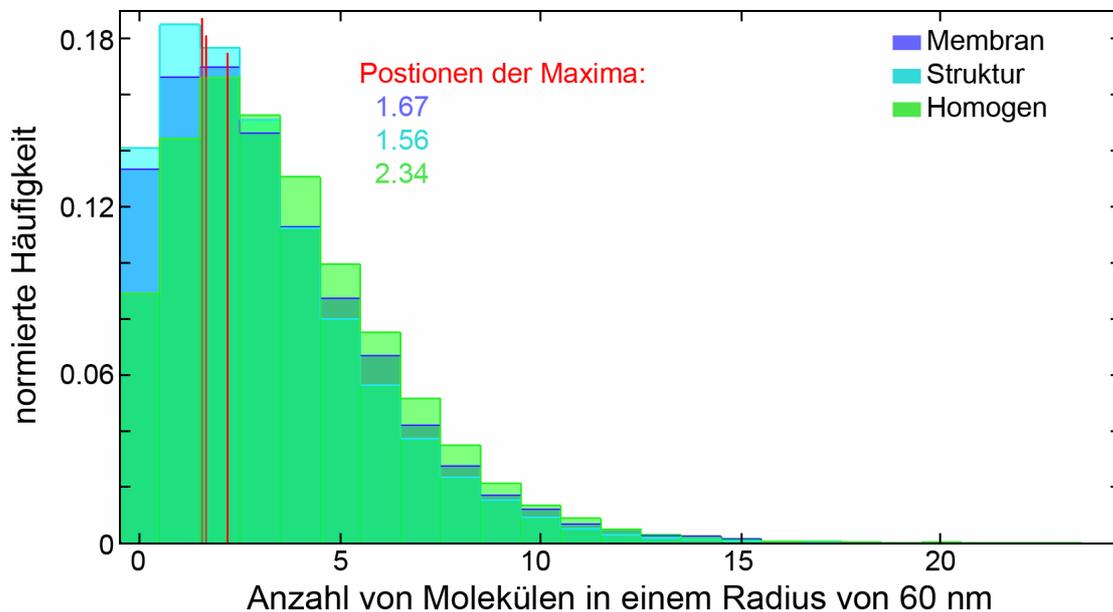


Abbildung 34: Anzahl von m164 in einem Radius von 60 nm

m164-Protein-Verteilungen für drei unterschiedlich strukturierte Zytoplasmabereiche. Die Verteilungen zeigen die Anzahl der Nachbarn innerhalb eines Radius von 60 nm eines jeden detektierten Moleküls. Der Radius wurde so gewählt, dass dieser über der effektiven optischen Auflösung der Lokalisationsbilder liegt, jedoch deutlich unterhalb der konventionellen Auflösungsgrenze. Grün dargestellt sind die homogenen Regionen, türkis die strukturierten Regionen und blau die Membran-Regionen. Die Zahlen zeigen die Positionen der Maxima in nm und sind zusätzlich mit einem roten senkrechten Strich gekennzeichnet [Müller² et al. 2010].

Bei einer weiteren Auswertung (Abb. 34) wurde der Radius für die Nachbarschaftsanalyse so gewählt, dass dieser über der effektiven optischen Auflösung der Lokalisationsbilder liegt, jedoch deutlich unterhalb der konventionellen Auflösungsgrenze. In Abbildung 34 wurde daher die Anzahl der Nachbarn innerhalb eines Radius von 60 nm eines jeden detektierten Moleküls bestimmt.

Die Histogramme in Abbildung 34 spiegeln genau das Ergebnis der Distanzanalyse zur Untersuchung der lokalen Dichte wider (siehe Abbildung 32). Das Maximum der strukturierten Zytoplasmaregion ist am weitesten zu einer kleinen Anzahl von benachbarten Molekülen verschoben und liegt bei 1.56 ± 0.05 nm. Das Histogramm der Membranregion zeigt wieder eine starke Ähnlichkeit zu den strukturierten Regionen. Das Maximum hier liegt bei 1.67 ± 0.07 nm. Die homogene Region hingegen zeigt eine deutliche Verschiebung hin zu einer größeren Anzahl von benachbarten Molekülen. Das Maximum liegt bei 2.34 ± 0.09 nm. Diese Ergebnisse

zeigen wie schon zuvor, dass die Membran-Region und die strukturierte Region sehr ähnliche Strukturen aufweisen, die homogene Region sich jedoch klar strukturell unterscheidet.

Im Vergleich zur Nachbarschaftsanalyse mit 250 nm Radius (Abb. 33) unterscheiden sich die Regionen bei einem Radius von 60 nm lediglich noch durch die lokalen Dichten der detektierten Moleküle (Abb.32).

Die Ergebnisse der Dichte- und Nachbarschaftsanalysen zeigen, dass sich die unterschiedlichen Strukturen im Lokalisationsbild statistisch charakterisieren lassen [Müller² et al. 2010]. Für eine eindeutige Charakterisierung ist eine der Strukturgröße entsprechend hohe Moleküldichte und Lokalisationsgenauigkeit erforderlich.

3.12 Histon H2B-Verteilung in stabil transfizierten HeLa-Zellen

Die nächsten Experimente sollten zeigen, ob Lokalisationsmikroskopie auch auf Chromatinebene durchführbar ist. Dafür wurden Untersuchungen an stabil transfizierte HeLa-Zellen, die das GFP markierte Histonprotein H2B exprimieren durchgeführt. Es wurde mittels Lokalisationsmikroskopie die H2B-Proteinverteilung nicht nur in Interphasezellkernen, sondern auch auf Metaphase-Spreitungen untersucht.

Für diese Versuche wurden stabil transfizierte HeLa-Zellen verwendet, die das mit GFP-markierte Histonprotein H2B exprimieren. H2B ist ein Bestandteil des Nukleosoms und trägt somit zur Verpackung der DNA bei. Die Zellen wurden mit Colcemid in der Metaphase arretiert, mit hypotoner Kaliumchlorid-Lösung behandelt. Das Aufbringen der Zellen auf die Objektträger erfolgte durch Zytospin. Danach wurden die aufgespinteten Zellen mit Formaldehyd fixiert.

Abbildung 35 stellt für ein Beispiel dieser Untersuchungen von Interphasezellkernen, Prometaphasen und Metaphasen dar. Die kleinen Bilder zeigen neben den Weitfeldbildern (Abb. 35 a – c) die dazugehörigen Lokalisationsbilder (Abb. 35 d – f). Die in den Lokalisationsbildern rot markierten Regionen wurden für die Dichteanalysen in Abbildung 36 verwendet. Die drei weiteren Lokalisationsbilder zeigen nochmals vergrößert den Interphasezellkern (Abb. 35 g), die Metaphase (Abb. 35 h) sowie die Prometaphase (Abb. 35 i). In diesen Bildern ist die Lokalisationsgenauigkeit gaußförmig verschmiert. Diese Verschmierung hat eine Breite entsprechend der individuellen Lokalisationsgenauigkeit. Die lokalen Dichten werden farblich codiert dargestellt.

Weiter wurde ein Vergleich der Histonverteilung von Interphasezellkern, Metaphase (K) sowie Prometaphase (NK) untereinander und gegen eine Zufallsverteilung angestellt

(Abbildung 36). So zeigt Histogramm a) einen Vergleich dieser drei unterschiedlichen Zellzyklus- bzw. Mitosephasen. Die Verteilungen von Interphasezellkern und Prometaphase sind nahezu identisch, wohingegen sich die Verteilung der Metaphase von den beiden unterscheidet und zu größeren Werten verschoben ist. Die erhöhte Anzahl von kleinen Distanzen bei Inter- und Prometaphase im Gegensatz zur Metaphase deutet auf mehr Struktur in diesen beiden H2B-Protein-Verteilungen hin. Dieses Ergebnis kann auch rein visuell aus der Farbcodierung in Abbildung 35 g – i abgelesen werden.

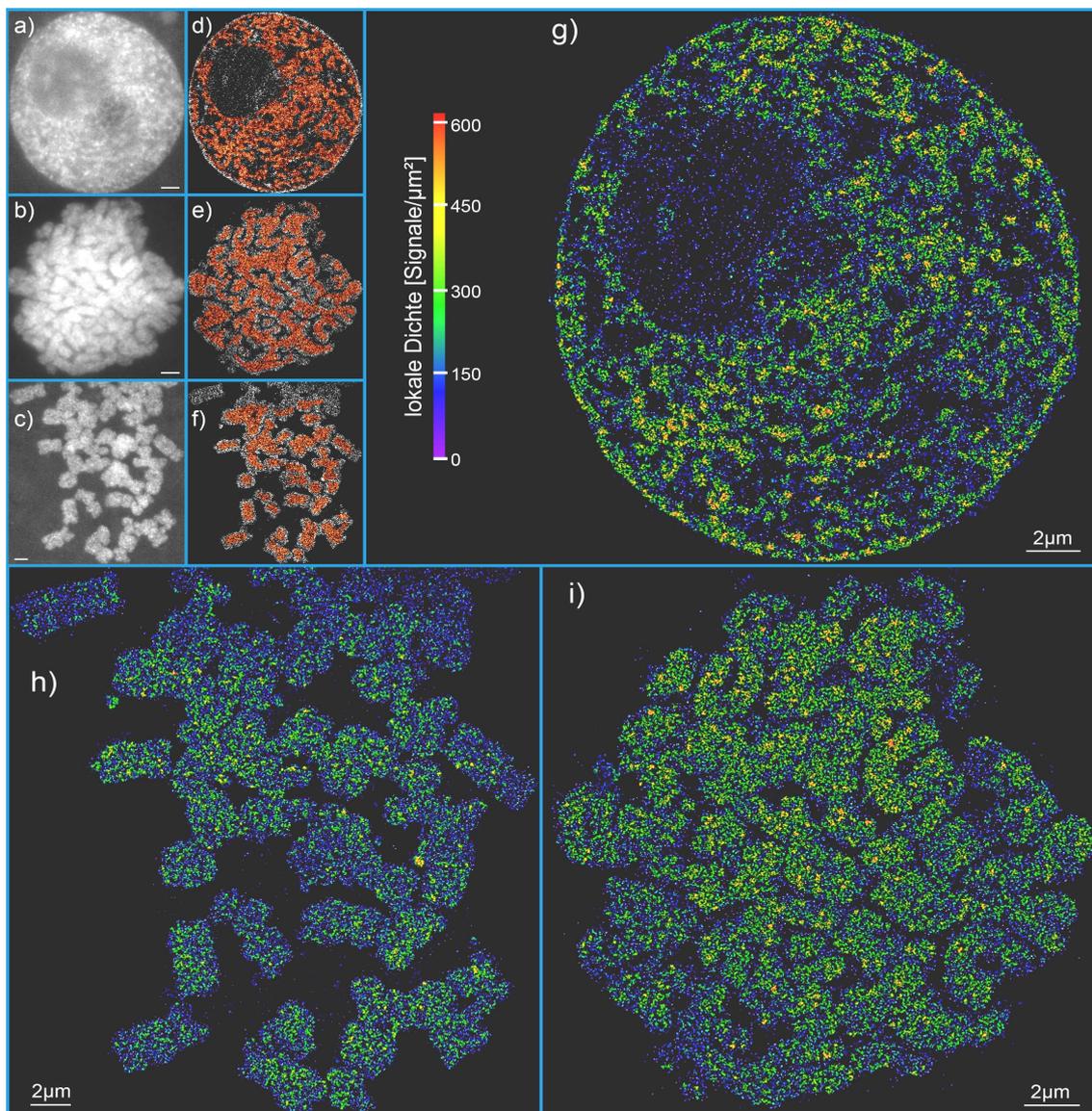


Abbildung 35: Histon H2B-Verteilung bei HeLa-Zellen

a – c zeigen Weitfeld-Bilder einer stabil transfizierten HeLa-Zelllinie, die das mit GFP markierte Histonprotein H2B exprimiert (a - Interphasezellkern, b - Prometaphase, c - Metaphase). Die rot markierten Bereiche in den Lokalisationsbildern d – f zeigen die Regionen, die für die Dichteanalyse verwendet wurden. g – i zeigen nochmals vergrößert die Lokalisationsbilder von Interphasezellkern, Metaphase und Prometaphase. In diesen Bildern ist die Lokalisationsgenauigkeit verschmiert mit einem Gauß, der eine Breite hat entsprechend der individuellen Lokalisationsgenauigkeit. Die lokalen Dichten werden farblich codiert dargestellt.

3. Ergebnisse

Die weiteren Histogramme (Abbildung 36), die die Vergleiche der einzelnen Zellzyklus- bzw. Mitosephasen mit einer Zufallsverteilung darstellen, zeigen lediglich geringe Abweichungen zu den Zufallsverteilungen. Für diese Verteilungen wurden zufällig verteilte Punkte mit der gleichen mittleren Dichte wie detektierte Moleküle im Lokalisationsbild benutzt. Der Unterschied zur Zufallsverteilung ist am klarsten beim Interphasezellkern zu erkennen. Die anderen beiden zeigen eher eine zufällig verteilte H2B-Proteinanordnung.

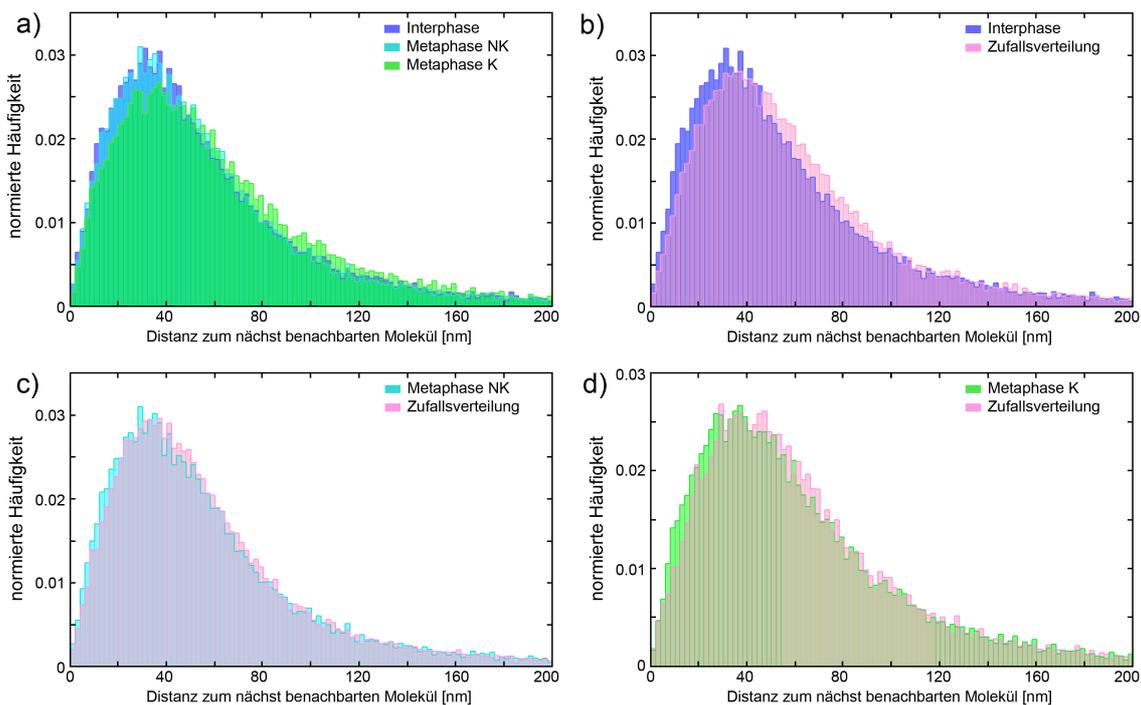


Abbildung 36: Histogramme zu den Histon H2B-Verteilungen

Vergleich der Histonverteilung H2B von Interphasezellkern, Metaphase (K) sowie Prometaphase (NK) untereinander a) und jeweils gegen eine Zufallsverteilung b – d. Grün dargestellt ist die Metaphase, türkis die Prometaphase und blau die Interphase. In rosa sind bei den Abbildungen b – d die jeweils zugehörigen Zufallsverteilungen gezeigt.

Der Vergleich von Histon H2B-Verteilungen auf unterschiedlichen Metaphasechromosomen ist in Abbildung 37 verdeutlicht. Im Lokalisationsbild sind die unterschiedlichen Chromosomen farblich markiert, die bei der Auswertung genutzt wurden. Das Histogramm (Abb. 37) zeigt, dass kaum Unterschiede zwischen den ausgewählten Chromosomen detektiert werden konnten, obwohl sie sich in der Größe unterscheiden. Dieses Ergebnis spricht für eine von der Größe unabhängige Gleichverteilung der H2B-Proteine auf Metaphasechromosomen.

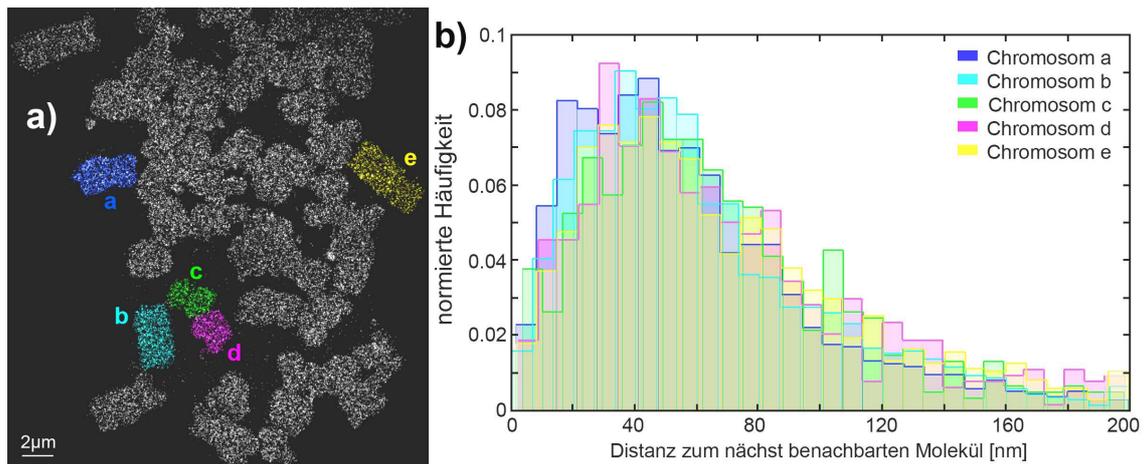


Abbildung 37: Vergleich von Histon H2B-Verteilungen auf Metaphasen

Im Lokalisationsbild a) sind die unterschiedlichen Chromosomen farblich markiert, die bei der Auswertung genutzt wurden. In b) ist ein Vergleich von den Histon H2B-Verteilungen dieser farblich markierten Metaphasechromosomen zu sehen. Die Farben in b) entsprechen den Farbcodierungen aus a).

Diese Versuche konnten zusammenfassend zeigen, dass Untersuchungen auf Chromatinebene mittels Lokalisationsmikroskopie erfolgreich durchführbar sind. So können die Proteinverteilungen auch direkt im Zellkern beobachtet und analysiert werden. Die anschließenden Auswertungen der Lokalisationsdaten konnten erste Ansätze zeigen, wie statistische Analysen genutzt werden können, um strukturelle Unterschiede in der Proteinverteilung zu erkennen.

3.13 Unmarkierte intrazelluläre Strukturen

In dieser Doktorarbeit wurde die Lokalisationsmikroskopie auch mit unmarkierten Zellen durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass SPDM die Fähigkeit besitzt, neben unmarkierten zellulären Strukturen auch Strukturen mit bisher nicht beobachteter Fluoreszenz mit einer Lokalisationsgenauigkeit im Bereich von 30 nm nachzuweisen.

Die nachfolgenden Experimente beruhen auf einer Beobachtung in durchgeführten SPDM-Messungen an den menschlichen Brustkrebszellen Cal-51 und SKBr3.

Sie zeigten, dass die Möglichkeit besteht, Lokalisationsbilder von zellulären Strukturen ohne jegliche Markierung zu erhalten (Abbildung 38). Sowohl konventionelle Weitfeldfluoreszenz- und SPDM-Messungen deckten zelluläre Strukturen auf, die durch die Autofluoreszenz der Zellen sichtbar wurden.

Die kugelförmigen Objekte konnte man im Durchlichtmikroskop als kleine dunkle Flecken im Zytoplasma der Zelle erkennen (Abb. 38 a, d). Im Gegensatz zu konventionellen Weitfeldfluoreszenzbildern (Abb. 38 e) konnten in den Lokalisationsbildern (Abb. 38 c, g - k) diese kugelförmigen Objekte mit einer Größe im Mikrometerbereich deutlich sichtbar gemacht werden.

Erste SPDM-Messungen mit einem Laser der Wellenlänge von 568 nm konnten keine dieser strukturellen Details darstellen (Abb. 38 f). Darauf folgende SPDM-Messungen zeigten, dass mit einem Laser der Wellenlänge von 488 nm diese Strukturen in der Zelle nun detektiert wurden (Abb. 38 g). Die Positionen der detektierten kugelförmigen Objekte im Lokalisationsbild entsprechen den schwarzen Flecken im Durchlichtbild (Abb. 38 c, k). Direkt nach der SPDM-Messung mit 488 nm wurde nochmals mit einem 568 nm Laser dieselbe Region beleuchtet. Nun konnte man die gleichen Strukturen wie bei der SPDM-Messung mit 488 nm erkennen (Abb. 38 i, h). Die kugelförmigen Objekte konnten jetzt auch im konventionellen Weitfeldfluoreszenzbild detektiert werden (Abb. 38 j).

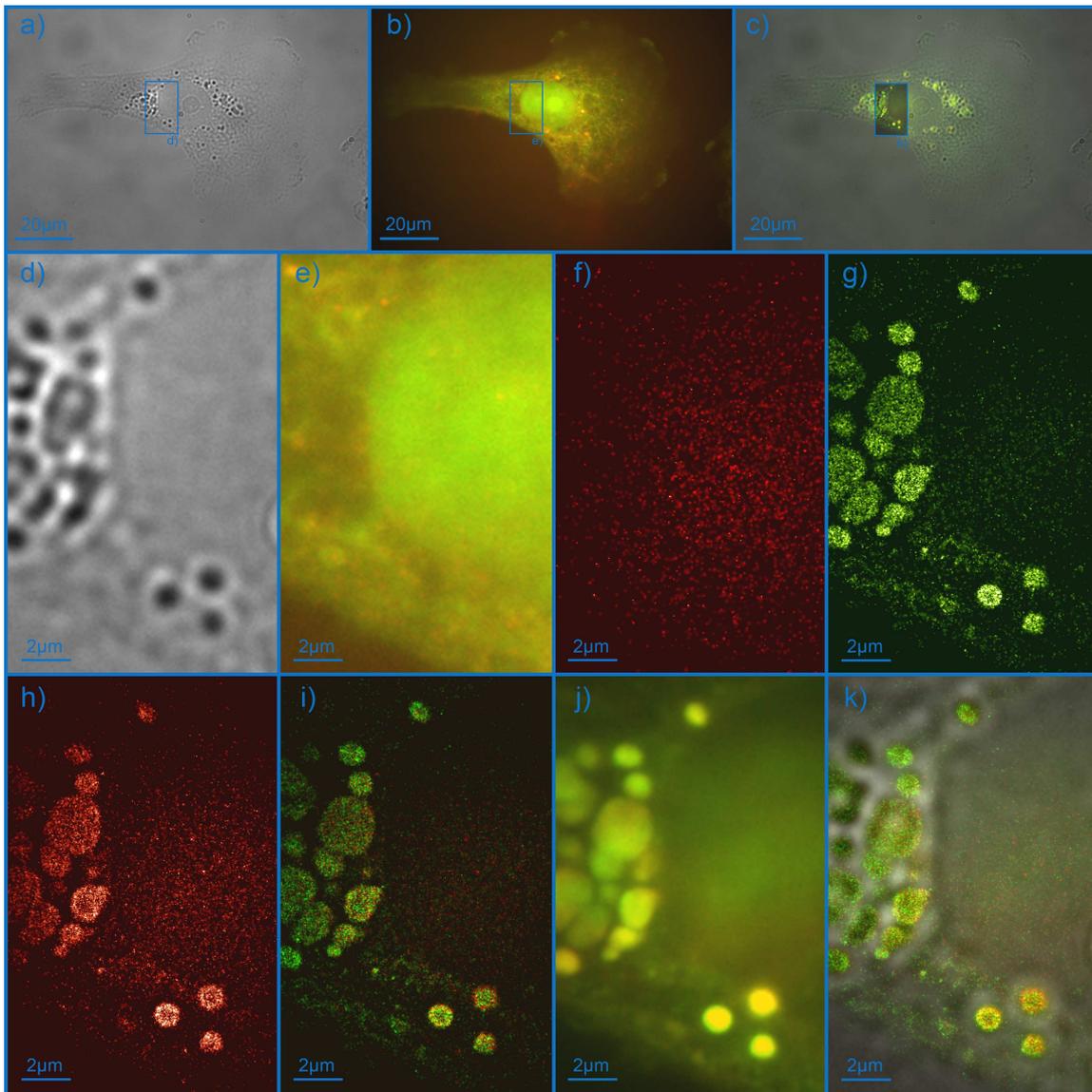


Abbildung 38: Unmarkierte SKBr3-Zelle angeregt mit 488 und 568 nm

a) Durchlichtbild einer SKBr3-Zelle. Die dunklen Flecken sind deutlich im Zytoplasma erkennbar (vergrößerter Ausschnitt siehe Abb. d).

b) zeigt ein konventionelles Weitfeld-Fluoreszenz-Bild der gleichen Zelle vor den SPDM Messungen. Der rote Kanal zeigt die Anregung mit 568 nm, der grüne Kanal die Anregung mit 488 nm. Die Objekte, die als dunkle Flecken im Durchlichtbild klar zu erkennen sind fehlen im Fluoreszenzbild (vergrößerter Ausschnitt siehe Abb. e).

c) ist ein zusammengefügtes Bild und setzt sich aus dem Durchlichtbild (a), dem Weitfeld-Fluoreszenz-Bild nach den SPDM-Messungen (j) und den beiden Lokalisationsbildern (g und h) zusammen. Die kugelförmigen Objekte in den Fluoreszenz-Bildern stimmen völlig mit den dunklen Flecken des Durchlichtbildes überein.

f) zeigt ein Lokalisationsbild, das mit einer Anregungswellenlänge von 568 nm aufgenommen wurde. Keine strukturellen Details sind sichtbar.

g) Danach wurde ein zweites Lokalisationsbild mittels Beleuchtung mit 488 nm aufgenommen. Kugelförmige Objekte sind deutlich an den Stellen sichtbar, an denen im Durchlichtbild die dunklen Flecken erkennbar waren.

h) zeigt das Ergebnis einer SPDM-Messung mit einer Anregungswellenlänge von 568 nm nach Fluoreszenz-"Aktivierung" von Molekülen. Die Aktivierung findet durch die Anregung mit dem 488 nm-Laser der vorherigen Messung statt. Dieses Lokalisierungsbild zeigt die gleichen kugelförmigen Objekte, welche schon bei der 488 nm Anregung erkennbar waren.

i) zusammengefügtes Lokalisationsbild aus Abb. g und Abb. h.

j) konventionelles Weitfeld-Fluoreszenz-Bild nach den SPDM-Messungen.

k) vergrößerte Darstellung aus (c). [Kaufmann¹ et al. 2010]

3. Ergebnisse

In Abbildung 39 ist der zeitliche Verlauf (100s) gegen die Anzahl von detektierten Fluoreszenzmolekülen einer SPDM-Messung dargestellt. Sie zeigt das Fluoreszenzverhalten von SKBr3-Zellen während einer SPDM-Messung mit einer Anregung von 488 nm und einer direkt anschließenden SPDM-Messung mit einer Anregung von 568 nm. Die Anregung mit 488 nm resultiert in einer zunehmenden Anzahl detektierter Signale über die Zeit (Abb 39 a). Im Gegensatz dazu wird bei der Messung mit 568 nm ein Rückgang der detektierten Signale verzeichnet (Abb. 39 b).

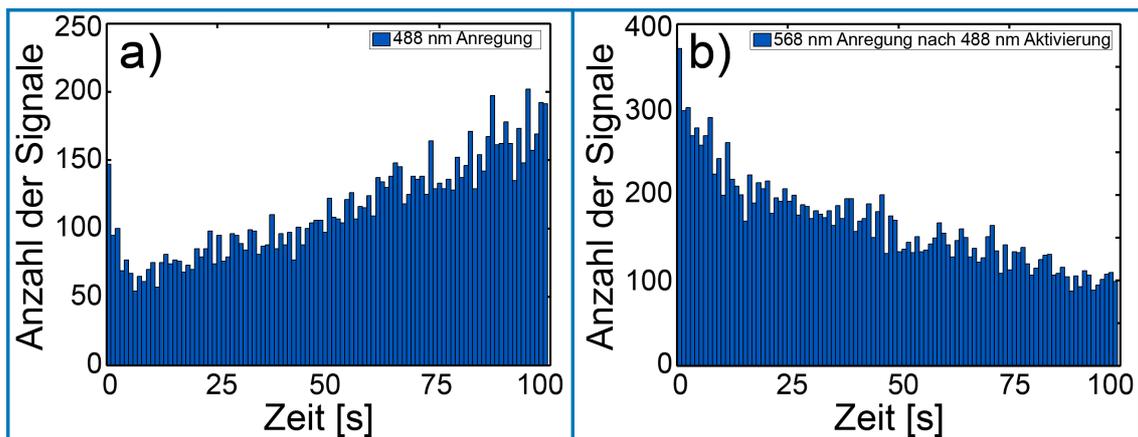


Abbildung 39: Histogramme der SPDM-Messungen für 488 und 568 nm.

In beiden Histogrammen wird die Anzahl der detektierten Signale im Zeitverlauf dargestellt. Die Breite der Balken entspricht einem Zeitintervall von 1 s. Die Abbildung a) zeigt einen Anstieg der Signale im Laufe einer SPDM Messung mit 488 nm Anregung. Dies deutet auf eine Fluoreszenz "Aktivierung" von Molekülen in der Zelle hin. Das Histogramm b) zeigt das Ergebnis einer SPDM-Messung mit 568 nm Anregung nach vorheriger 488 nm-Aktivierung. Eine Abnahme der detektierten Signale im Laufe der Zeit ist zu erkennen. Dieses Verhalten ist auf gebleichte Fluorophore während der Messung zurückzuführen. Zeitgleich kommt es zu keiner weiteren „Aktivierung“ von Molekülen in den fluoreszenten Zustand [Kaufmann¹ et al. 2010].

In Abbildung 40 ist eine Darstellung von unmarkierten SKBr3-Zellen zu sehen. Die Charakterisierung dieser Strukturen zeigte eine auffallend hohe Dichte von detektierten Signalen in den kugelförmigen Objekten (mehrere 1000 / μm^2).

Für zwei dieser Objekte (in Orange hervorgehoben) wurden die mittleren Dichten bestimmt (Abb. 40 b). Während die Dichte für das kleinere Objekt 8728 Signale / μm^2 betrug, setzte sich das größere Objekt aus 6007 Signale / μm^2 zusammen. Die sichtbaren Membranstrukturen zeigten im Vergleich nur eine geringe Dichte der detektierten Signale. Im Bildausschnitt (Abb. 40 d) wurde der Dynamikbereich des Lokalisationsbildes so geändert, dass die dünnen Strukturen neben den sehr hellen kugelförmigen Objekten dargestellt werden konnten. Der in gelb eingezeichnete Line-Scan durch ein kugelförmiges Objekt besitzt eine Linienbreite von 200 nm. Der Scan wurde sowohl am Weitfeldfluoreszenzbild (Abb. 40 a) als auch am Lokalisationsbild

(Abb. 40 b) durchgeführt und ist in Abbildung 40 c zu sehen. Beide Line-Scans zeigten deutlich, dass die meisten der nachgewiesenen Moleküle an der Peripherie der Objekte lagen. Zusätzlich konnte man an den Line-Scans feststellen, dass die Form der Objekte mit den Lokalisationsdaten genauer bestimmt werden kann.

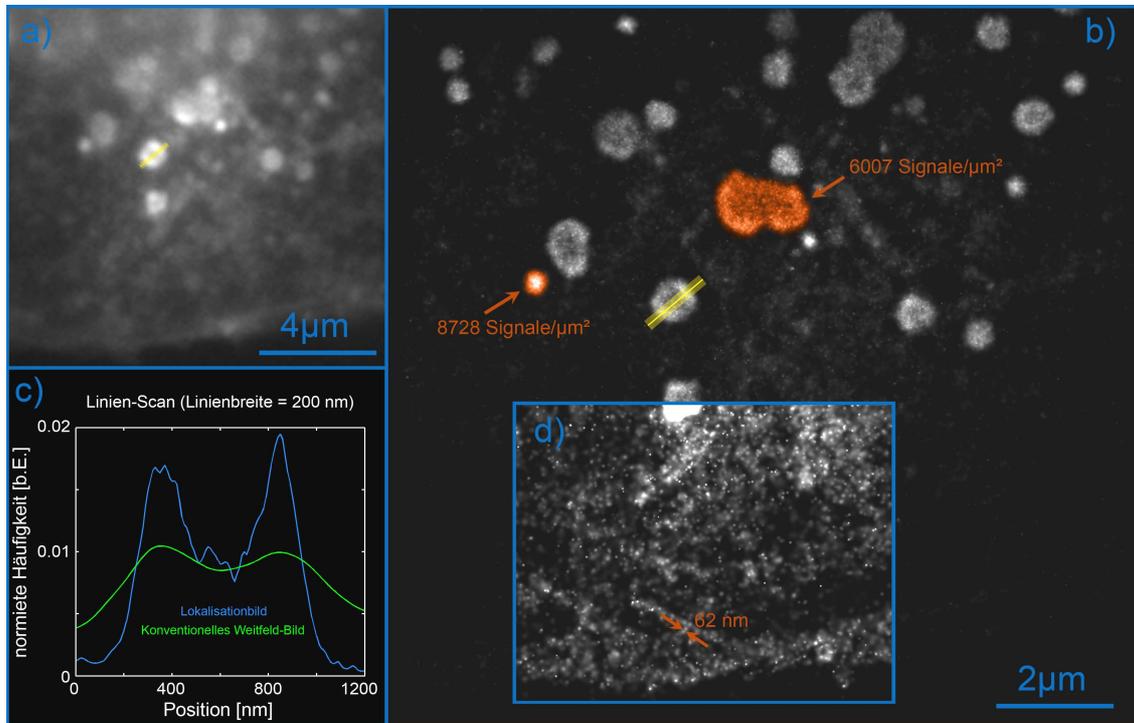


Abbildung 40: Strukturelle Charakterisierung unmarkierter SKBr3-Zellen

a) zeigt ein Weitfeld-Bild von einer unmarkierten SKBr3-Zelle nach einer SPDM-Messung mit einer Anregungswellenlänge von 488 nm. Das Ergebnis der SPDM-Messung ist in b) dargestellt. Die mittlere Lokalisationsgenauigkeit der rund 100000 detektierten Signale betrug 31,5 nm mit einer Standardabweichung von 10,7 nm. Ein Line-Scan (gelb) mit einer Linienbreite von 200 nm wurde auf eines der kugelförmigen Objekte angewendet. Ein Vergleich zwischen den Line-Scans des Weitfeld-Bildes und des Lokalisations-Bildes ist in c) gezeigt. Die Änderung des dynamischen Bereichs in einer ausgewählten Region, ermöglicht dünnere Strukturen im Lokalisations-Bild zu verdeutlichen. Siehe Ausschnitt in d). Die kugelförmigen Strukturen sind aufgrund der hohen Dichte der detektierten Signale (mehrere 1000 pro μm^2) in diesen Objekten durch diesen Rendering-Prozess sehr übersättigt dargestellt [Kaufmann¹ et al. 2010].

Zusammen mit zwei spektral unterschiedlichen Immunfärbungen auf Formaldehyd fixierten Cal-51-Zellen konnten noch gezeigt werden, dass die Autofluoreszenz der Zelle als eine Art „Falschfarbe“ für weitere Experimente genutzt werden kann. In Abbildung 41 ist solch eine SPDM-Aufnahme zu sehen. Die roten Fluoreszenzsignale zeigen die Her3-Rezeptoren, die grünen die Her2/neu-Rezeptoren der Zelle. In blau dargestellt ist die Autofluoreszenz der Zelle.

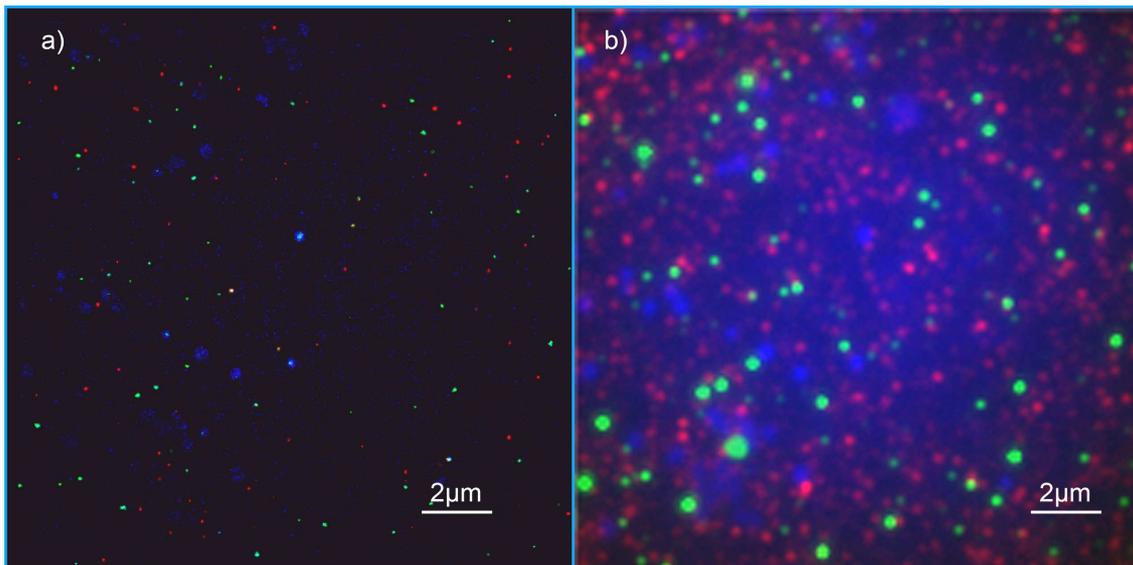


Abbildung 41: Immunfärbungen und Eigenfluoreszenz der Zelle

Immunfärbung von Formaldehyd fixierten Cal-51-Zellen (polyklonaler Primärantikörper Her3 + Sekundärantikörper Alexa488[®] + monoklonaler Primärantikörper Her2/neu; Sekundärantikörper Alexa568[®]). Die grünen Fluoreszenzsignale zeigen die Alexa488[®] markierten Her3-Rezeptoren, die roten Fluoreszenzsignale die Alexa568[®] markierten Her2/neu-Rezeptoren auf der Plasmamembran. Die blau dargestellten kugelförmigen Fluoreszenzsignale zeigen die durch Eigenfluoreszenz auftretenden Strukturen der Zelle. a) Lokalisationsbild. b) konventionelles Weitfeld-Bild (die roten und grünen Fluoreszenzsignale wurden vor der Lokalisationsaufnahme aufgenommen, die blauen Signale zeigen die während der Lokalisationsaufnahme erscheinenden kugelförmigen Objekte) [Kaufmann¹ et al. 2010].

3.14 Bleichverhalten Alexa-markierter Antikörper in verschiedenen Einbettmedien

Die Untersuchungen unterschiedlicher Einbettmedien wurden anhand Alexa488[®] konjugierter Antikörper realisiert, da weitere Experimente mit diesen Antikörpern geplant waren. Die Experimente sollten Aufschluss über das Blinkverhalten des Fluoreszenzfarbstoffes in der jeweiligen Umgebung geben und somit die Planung späterer Versuche vereinfachen. Für die Experimente wurde eine Immunfärbung an SKBr3-Zellen durchgeführt. Der primäre Antikörper richtete sich gegen ein extrazelluläres Membranprotein des Her2/neu-Rezeptors. Die indirekte Markierung erfolgte durch einen gegen den primären Antikörper gerichteten sekundären Antikörper, der eine Alexa488[®]-Markierung trug. Die Zellen wurden nach der Immunfärbung direkt mit Formaldehyd fixiert und in unterschiedlichen Einbettmedien eingedeckelt. Die Analyse Alexa488[®] markierter Antikörper in verschiedenen Einbettmedien ist in den beiden Histogrammen in Abbildung 42 dargestellt. Zum einen wurde die kumulative Summe über alle detektierten Alexa488[®]-Signale pro Bild, zum anderen der Verlauf aller detektierten Alexa488[®]-Signale pro Bild aufgetragen. Die

beiden Histogramme zeigen die Verläufe der detektierten Signale für die Einbettmedien ProLong[®]Gold (P = auspolymerisiert), ProLong[®]Gold (NP = nicht auspolymerisiert), Fluoromount und Immumount. In Histogramm a) liegen die Kurven von ProLong[®]Gold weit über den beiden anderen Einbettmedien. Im Gegensatz zu Fluoromount und Immumount zeigt die Signalzahl in ProLong[®]Gold auch keine Sättigungskurve, sondern steigt stetig mit der Zeit an. Dies zeigt, dass über die Zeit deutlich mehr Signale detektiert werden. Das gleiche Ergebnis ist in Histogramm b) zu erkennen. Hier fallen die beiden Kurven von ProLong[®]Gold im Gegensatz zu den anderen Einbettmedien langsamer ab. Sie erreichen nicht den Wert null wie die anderen beiden, sondern steigen sogar noch leicht an. An beiden Histogrammen in Abbildung 42 ist durch den höheren Verlauf der Kurven zu erkennen, dass die Signalausbeute hier weitaus größer ist als in den beiden anderen getesteten Einbettmedien.

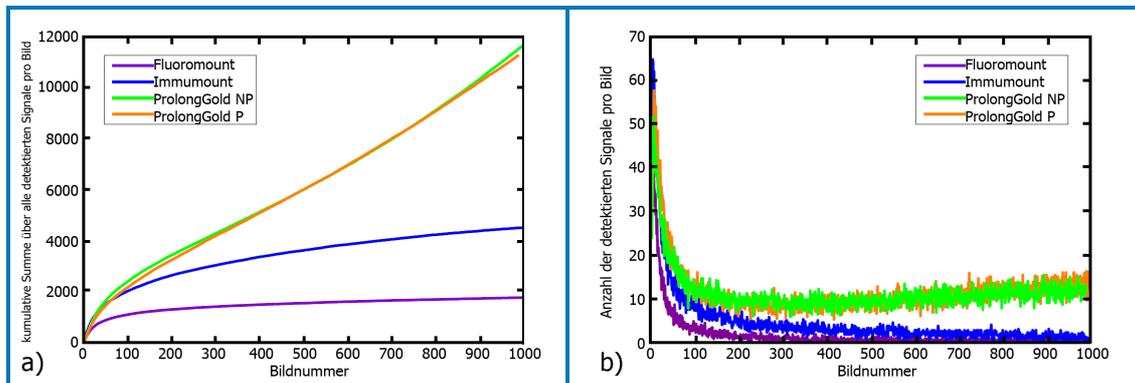


Abbildung 42: Analyse verschiedener Einbettmedien

a) Kumulative Summe über alle detektierten Alexa488[®]-Signale pro Bild. b) Darstellung aller detektierten Alexa488[®]-Signale pro Bild. Die Diagramme zeigen den zeitlichen Verlauf der detektierten Alexa488[®]-Signale in unterschiedlichen Einbettmedien. Alle Messungen wurden mit SKBr3-Zellen vorgenommen.

3.15 Analyse von Her2/neu-Membranproteincluster in Brustkrebs-Zellen

Erste Untersuchungen zu den Her2/neu-Membranproteincluster in unterschiedlichen Brustkrebszellen erfolgte mittels FACS (engl. Fluorescence Activated Cell Sorting). Die Durchflusszytometrie kann das Fluoreszenzlicht von Antikörper markierten Zellen messen und erlaubt dadurch die Analyse dieser auf der Oberfläche der Zelle befindlichen Proteine. Es wurden dafür Immunfärbungen für Her2/neu nach dem in Kapitel 2.6.5 beschriebenen Protokoll durchgeführt, um Aufschluss über die gesamte Her2/neu-Rezeptorverteilung in den unterschiedlichen Zelllinien (AG11132, Cal-51 und SKBr3) zu erhalten. Diese Analyse beruht auf der Fluoreszenzintensität der einzelnen Zellen, die durch die fluoreszent markierten Antikörper erreicht werden. Es werden ungefähr 5000 – 10000 Zellen ausgewertet. Tabelle 14 listet die insgesamt Anzahl der Zellen auf, die mittels FACS analysiert wurden. Aufgrund der Streulichtanalyse wurden nur Zellen, die in Größe, Form und Granularität der festgesetzten Norm entsprechen, ausgewählt. Diese ausgewählten Zellen wurden anschließend anhand ihrer Fluoreszenzintensität sortiert. AG11132 zeigte im Vergleich zu Cal-51 und SKBr3 die geringste Fluoreszenz. SKBr3 hingegen die stärkste Oberflächenfluoreszenz, die auf die Antikörperfärbung für Her2/neu zurückzuführen ist (siehe Tabelle 14).

In Abbildung 43 a - c sind rot die Negativkontrollen der unterschiedlichen Zelllinien dargestellt. Die grünen Verläufe (d – f) spiegeln die Häufigkeit der Alexa488[®] markierten Zellen wieder. M1 steht für den Bereich der markierten Zellen.

Alle Intensitätsverläufe der Negativkontrollen a – c zeigen, dass die analysierten Zellen alle außerhalb des M1-Bereiches liegen. Dieses Ergebnis zeigt, dass die ungefärbten Zellen fast keine Eigenfluoreszenz aufweisen und dadurch die spätere Messung nicht negativ beeinflussen. Mit dem Ergebnis der Nullkontrolle wird ein Schwellwert ermittelt der, zeigt bei welcher Intensität die Zellen in den M1-Bereich fallen.

Alle Intensitätsverläufe der markierten Zellen liegen in diesem M1-Bereich und zeigen unterschiedliche Maxima. SKBr3 zeigt mit 34 das größte Intensitätsmaximum, gefolgt von Cal-51 mit 22 und AG11132 mit 14. Dies bedeutet, dass SKBr3 im Schnitt die stärkste Fluoreszenz aufweist und sich somit am meisten Her2/neu-Rezeptoren auf der Plasmamembran dieser Zellen befinden. Cal-51-Zellen zeigen im Vergleich zu AG11132-Zellen eine größere Her2/neu-Rezeptorpopulation. AG11132 besitzen die wenigsten Her2/neu-Rezeptoren auf der Oberfläche. Die wichtigsten Messergebnisse der FACS-Analyse sind Tabelle 14 zu entnehmen.

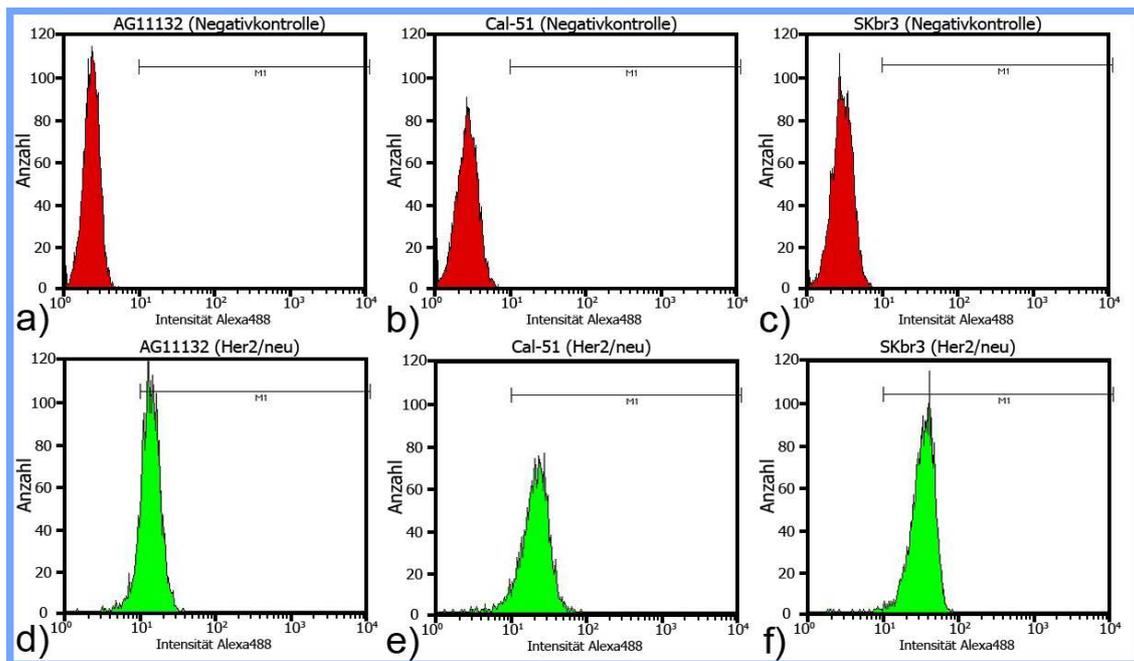


Abbildung 43: FACS-Analyse für Her2/neu

a) – c) zeigen die Negativkontrollen von den verschiedenen Zelltypen der FACS-Analyse. Die Intensitätsverläufe (rot) liegen alle außerhalb des markierten Bereichs (M1). d) – f) zeigen die Intensitätsverläufe (grün) für die über Alexa488[®]-konjugierte Antikörper markierten Her2/neu-Rezeptoren der unterschiedlichen Zelltypen.

Zelllinie	Antikörpermarkierung	Zellen insgesamt	ausgewählte Zellen	fluoreszierende Zellen Anzahl / %	Maximum der Intensität
AG11132	Kontrolle ohne AK	13087	6486	0	0
	Her2/neu	13699	6099	5320 / 87%	14
Cal-51	Kontrolle ohne AK	13869	6151	0	0
	Her2/neu	14673	5096	4878 / 96%	22
SKBr3	Kontrolle ohne AK	10841	6961	0	0
	Her2/neu	11152	6116	6092 / 99%	34

Tabelle 14: Ergebnisse der FACS-Analyse für Her2/neu

Die Tabelle zeigt die wichtigsten Messergebnisse der FACS-Analyse. Dabei wurden die mit einem Alexa488[®]-konjugierten Antikörper markierten Her2/neu-Rezeptoren unterschiedlicher Zelltypen untersucht. Es werden die Zellen, die Antikörpermarkierung, die insgesamt Anzahl analysierter Zellen, die ausgewählten Zellen und die fluoreszierende Zellen (mit Prozentangabe) aufgelistet. Die letzte Spalte zeigt die Intensitätsmaxima der FACS-Messung der verschiedenen Zellen.

Um die durch die FACS-Analyse erworbenen Daten verifizieren zu können, wurden Immunfärbungen für Her2/neu nach dem gleichen Protokoll durchgeführt und anschließend mittels Lokalisationsmikroskopie untersucht.

Aufbauend auf den bisher gezeigten Untersuchungen zur Lokalisationsmikroskopie wurde eine biologische Fragestellung bearbeitet, die in der aktuellen Brustkrebsforschung von großer Bedeutung ist.

Mit der Technik der Lokalisationsmikroskopie wurde die Her2/neu-Expressionsmuster von unterschiedlichen Zelllinien untersucht. Außerdem sollten statistische Analysen zu einem klaren Verteilungsmuster der fluoreszenzmarkierten Proteine führen und zusätzlich die Größe der erwarteten Protein-Cluster bestimmen. Da diese Analysen alle auf 2D-Daten basierten, stellte sich in diesem Zusammenhang auch die Frage, ob durch die schon erfolgreich gezeigte Kombination von Lokalisationsmikroskopie und SMI-Mikroskopie auch in diesem Fall 3D-Informationen über die Proteinanordnung gewonnen werden können.

Für die folgenden Experimente wurden drei verschiedene Zelllinien verwendet:

Cal-51 und SKBr3 sind zwei Brustkrebs-Zelllinien aus einem Pleuraerguß, wobei die Erste einen normalen Genotyp besitzt, die Zweite eine Amplifikation des *Her2/neu*-Gens aufweist und daher den Her2/neu- Rezeptor auf der Plasmamembran überexprimiert. Der Expressionsstatus von Her2/neu ist für Cal-51 bisher nicht beschrieben. AG11132 sind menschliche Epithelzellen einer gesunden Spenderin und wurden aus normalem Gewebe einer Brustverkleinerung erhalten und etabliert. Sie zeigen eine normale Expression der Her2/neu-Rezeptoren. Die Immunfluoreszenzfärbungen wurden bei allen Präparaten immer nach dem gleichen Protokoll (siehe Kapitel 2.5.5) durchgeführt. Die Variationen der angewendeten Antikörper können in Tabelle 12 nachgelesen werden.

Abbildung 44 ist zusammengesetzt aus einem konventionellen Weitfeld-Fluoreszenzbild, einem Lokalisationsbild und einem mittels Cluster-Algorithmus ausgewertetem Bild von Her2/neu-Proteinen auf der Plasmamembran einer SKBr3-Zelle. Auf der rechten Seite sind jeweils vergrößerte Bildausschnitte dargestellt. Diese Abbildungen stellen exemplarisch einen Zellausschnitt dar, der für die weiteren Auswertungen genutzt wurde. In Abbildung 44 c) sind die Positionen einzelner Moleküle als schwarze Punkte dargestellt. Cluster, die der Algorithmus gefunden hat, sind orange gekennzeichnet. Die genaue Funktionsweise des Algorithmus ist in Kaufmann et al. 2010 näher erläutert [Kaufmann² et al. 2010].

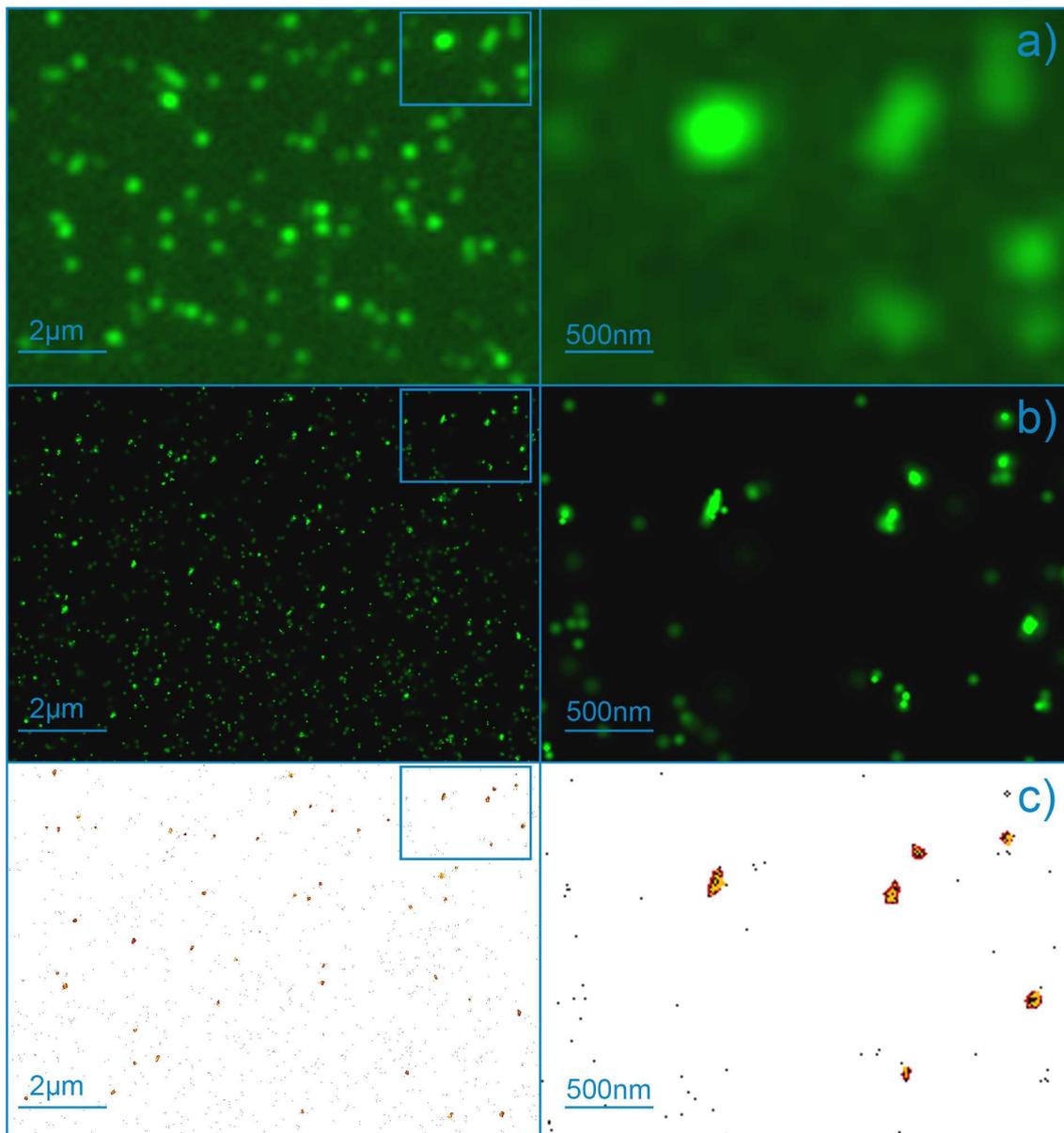


Abbildung 44: Her2/neu Cluster auf der Membran einer SKBr3-Zelle

a) Konventionelles Weitfeldfluoreszenzbild von Her2/neu-Proteinen auf der Plasmamembran einer SKBr3-Zelle. Her2/neu wurde mit Alexa 488[®]-konjugierten Antikörper markiert und durch einen Laser mit der Wellenlänge von 488 nm angeregt. b) Lokalisationsbild des gleichen Ausschnitts. Die Intensität zeigt die lokale Dichte der detektierten Fluorophore. Die individuelle Lokalisations-Genauigkeit ist durch eine Verschmierung mit einem entsprechenden Gauß-Filter dargestellt. c) Ergebnisse des Cluster-Algorithmus. Die Positionen einzelner Moleküle sind als schwarze Punkte dargestellt. Cluster, die der Algorithmus gefunden hat, sind orange gekennzeichnet. Die Parameter für eine Cluster-Detektion wurden auf eine kritische lokale Dichte von 530 Punkten pro μm^2 gesetzt. Dies entspricht der minimalen Anzahl von fünf Nachbarn um jedes detektierte Molekül in einem Umkreis von 60 nm. Für die Analyse von Her2/neu-Clustern wurden nur die Punkte betrachtet deren lokale Dichte höher waren als die festgelegte kritische Dichte [Kaufmann² et al. 2010].

Zur Charakterisierung der Protein-Cluster wurde eine Bedingung definiert, die festlegen sollte, wie viele Moleküle in einem gewählten Radius detektiert werden müssen, um von einem Cluster sprechen zu können. Dies wurde durch einen Algorithmus basierend

auf den lokalen Dichten, sowie auf die jeweiligen Nachbarn eines jeden detektierten Moleküls festgelegt.

In einem ersten Schritt wurde der Abstand zum nächsten Nachbarn für jedes Molekül ermittelt. Danach wurden alle Punkte normalverteilt um die ursprünglichen Positionen in Bezug auf ihre individuelle Lokalisationsgenauigkeit variiert. Diese neuen Positionen wurden für die Bestimmung der Distanzen zum nächsten benachbartem Molekül verwendet. Dieses Verfahren wurde mehrfach wiederholt (100 Mal für die hier vorgestellten Messungen), um ein Bild zu erstellen, das die lokale Dichte sowie die Lokalisationsgenauigkeit eines jeden Moleküls zeigte. Ein zweites Bild mit der lokalen Dichte wurde so berechnet, dass jedem Punkt im resultierenden Bild ein Wert zugeteilt wurde. Dieser Wert wurde errechnet über die Summe der Punkte die in einem vordefinierten Bereich um jede Molekülposition lagen. Für die Cluster-Bestimmung wurden beide Methoden kombiniert angewendet, um Artefakte zu minimieren.

Die kritische Dichte für ein Cluster wurde auf 530 Punkte pro μm^2 gesetzt. Dies entsprach der minimalen Anzahl von fünf Nachbarn um jedes detektierte Molekül in einem Umkreis von 60 nm. Für die Analyse von Her2/neu-Clustern wurden nur die Punkte betrachtet deren lokale Dichte höher war als die festgelegte kritische Dichte. Die Detektionsgrenze wurde nach folgendem Ansatz gewählt:

Zuerst wurde eine zufällige Verteilung von Punkten mit der gleichen mittleren Dichte wie in dem errechneten Lokalisationsbild erstellt. Die Cluster in dieser Verteilung wurden zufällig gebildet. Um Cluster in den Lokalisationsdaten eliminieren zu können, wurden die Parameter für die kritische Dichte auf einen Wert gesetzt, für den die Wahrscheinlichkeit von Clusterbildung durch Zufall in einer zufälligen Verteilung bei 0,1% liegt. Der zweite Schritt des Cluster-Algorithmus beinhaltete ein morphologisches Schließen der Cluster. Dabei werden die bestehenden einzelnen Punkte in ein zusammenhängendes Objekt umgewandelt. Nach dieser Segmentierung konnten alle charakteristischen Größen der Cluster berechnet werden (Abbildung 44).

Anhand dieser Auswertung konnte ein mittlerer Durchmesser von 67 nm mit einer Standardabweichung von 21 nm ermittelt werden. Die Berechnung basierte auf 20637 Her2/neu-Clustern auf den ausgewählten Membranabschnitten von insgesamt 176 Zellen (Abbildung 45). Die Messungen beinhalteten die beiden Krebszelllinien (Cal-51 und SKBr3) mit verschiedenen Antikörpermarkierungen (EXR-Alexa488, EXR-Alexa568 und intraTR-Alexa488) sowie die markierten AG11132-Zellen mit EXR-Alexa488 (Abkürzungen siehe Tabelle 12). Die mittlere Dichte der detektierten Signale pro Cluster betrug 2434 Punkte pro μm^2 mit einer Standardabweichung von 852 Punkten

pro μm^2 . Ein signifikanter Unterschied in der Clustergröße hinsichtlich der Fluoreszenzmarkierung oder des Zelltyps konnte nicht beobachtet werden.

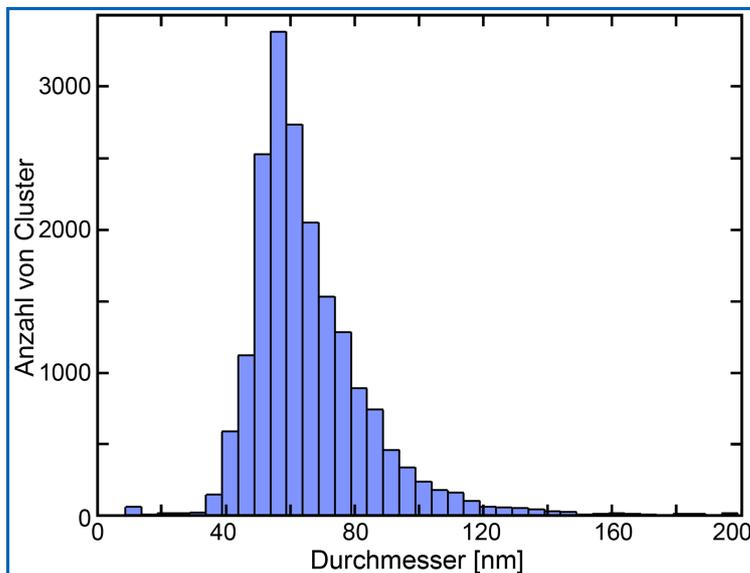


Abbildung 45: Histogramm der Her2/neu-Clustergrößen

Die Verteilung der Cluster-Durchmesser hat einen Mittelwert von 67 nm und eine Standardabweichung von 21 nm. Für die Bestimmung der Her2/neu-Cluster wurden 20637 Proteincluster von 176 SPDM-Messungen analysiert. Alle drei Zelllinien wurden für diese Analyse verwendet (AG11132, Cal-51, SKBr3) [Kaufmann² et al. 2010].

Die Untersuchungen über die Verteilung der einzelnen Moleküle wurden durch die Bestimmung der Entfernungen zwischen den detektierten Fluorophoren vorgenommen. Die Daten für die Distanzanalysen stammten aus 94 SPDM-Messungen. Diese beinhalteten alle drei Zelllinien, die mit dem Antikörper ExR-Alexa488[®] markiert wurden. Es wurden neben den Abständen zum nächst benachbarten Molekül auch die Entfernung eines jeden Moleküls zu allen anderen untersucht (Abbildung 46). Alle Messungen zeigten eine nicht zufällige Verteilung von Her2/neu-Proteinen auf der Plasmamembran. Es konnten relativ mehr kurze Distanzen in den SPDM-Messungen ermittelt werden, als bei einer zufälligen Verteilung mit der gleichen Dichte von Punkten beobachtet wurde.

Darüber hinaus konnten Unterschiede zwischen den drei Zelllinien festgestellt werden. Es unterschieden sich nicht nur die kranken Zellen von den Gesunden, sondern auch die beiden Krebszelllinien untereinander. Die Verteilung der Distanzen in SKBr3-Zellen im Vergleich zu Cal-51 zeigte einen signifikanten Unterschied und ein größeres Maximum bei kurzen Distanzen. Die gesunde Zelllinie AG11132 zeigte nur geringfügig mehr kurze Distanzen im Vergleich zu einer zufälligen Verteilung (Histogramme in (a) und (c) in Abbildung 46). Die höhere Anzahl von kleinen Distanzen im Vergleich zur

entsprechenden Zufallsverteilung deutet auf das Vorhandensein von Struktur hin (hier: Her2/neu-Cluster).

Das Histogramm in Abbildung 46 c) zeigt die Verteilungen der Distanzen für die Signale innerhalb eines Clusters. Die unterschiedliche Dichte von Signalen innerhalb eines Clusters zeigte die größten Werte für SKBr3, gefolgt von Cal-51 und AG11132.

Für die verschiedenen Zelllinien konnten keine Unterschiede in bezug auf die Clustergröße festgestellt werden. Ein direkter Vergleich ist in Abbildung 46 a) gezeigt. Hier wurde die Zahl der detektierten Signale pro Cluster gegen den Clusterdurchmesser aufgetragen (siehe Abb. 46 a). In den beiden oberen Histogrammen ist zu erkennen, dass die in grün dargestellte Verteilung von AG11132 jeweils oberhalb der rot dargestellten Verteilungen der beiden Krebszelllinien verläuft. Dies ist aufgrund gleicher Clustergröße ein direkter Nachweis, dass bei beiden Krebszelllinien mehr Signale pro Cluster detektiert werden konnten. Ein Unterschied (Abb. 46 a - Histogramm unten) zwischen den beiden Krebszelllinien ist nicht erkennbar und spricht für eine ungefähr gleiche Signalanzahl in einem Cluster.

In einem ersten Ansatz konnte gezeigt werden, dass auch die Möglichkeit besteht, die zu untersuchende Proteinverteilung der Her2/neu- und Her3-Rezeptoren in 3D zu realisieren. Es wurde eine Kombination aus SPDM- und SMI-Mikroskopie [Albrecht et al. 2002] [Hildenbrand et al. 2005] [Reymann et al. 2008] nach Lemmer et al. 2008 [Lemmer et al. 2008] verwendet und diese für eine Zweifarbenmessung erweitert. Dafür wurde durch zwei gegenüber angeordnete Objektive ein stehendes Wellenfeld des Laserstrahls im Objektraum generiert. Mittels Objekt- und Phasen-Scan der ausgewählten Region hatte man die Möglichkeit, die axialen Positionen sowie die Ausdehnung der Protein-Cluster in z-Richtung zu ermitteln. Diese Informationen konnten mit den lateralen Positionen der detektierten Einzelmoleküle aus den anschließenden SPDM-Messungen kombiniert werden.

Für die 3D-Rekonstruktion wurden AG11132-Zellen verwendet, bei denen die Her2/neu-Rezeptoren mit Alexa568[®] und die Her3-Rezeptoren mit Alexa488[®] markiert waren. Die SMI- und SPDM-Messungen wurden nacheinander für die beiden Farbstoffe mit Hilfe von Lasern mit einer Wellenlänge von 568 und 488 nm durchgeführt. Für die Korrektur der chromatischen Verschiebungen in lateraler- sowie in axialer Richtung wurden fluoreszierende Mikrosphären (TetraSpeck, Invitrogen) mit einem Durchmesser von 100 nm verwendeten. Diese lagen sowohl auf der Membran der Zellen als auch auf der Oberfläche der präparierten Objektträger.

In Abbildung 47 d) und e) ist eine 3D-Rekonstruktion einer zweifarbigen SPDM-Messung gezeigt. Die Positionen der Cluster in jeder Richtung konnten mit einer mittleren Genauigkeit von 25 nm bestimmt werden. Dieser Ansatz ermöglichte eine 3D-Untersuchung der Verteilung von Her2/neu- und Her3-Rezeptoren in unterschiedlichen Zelltypen.

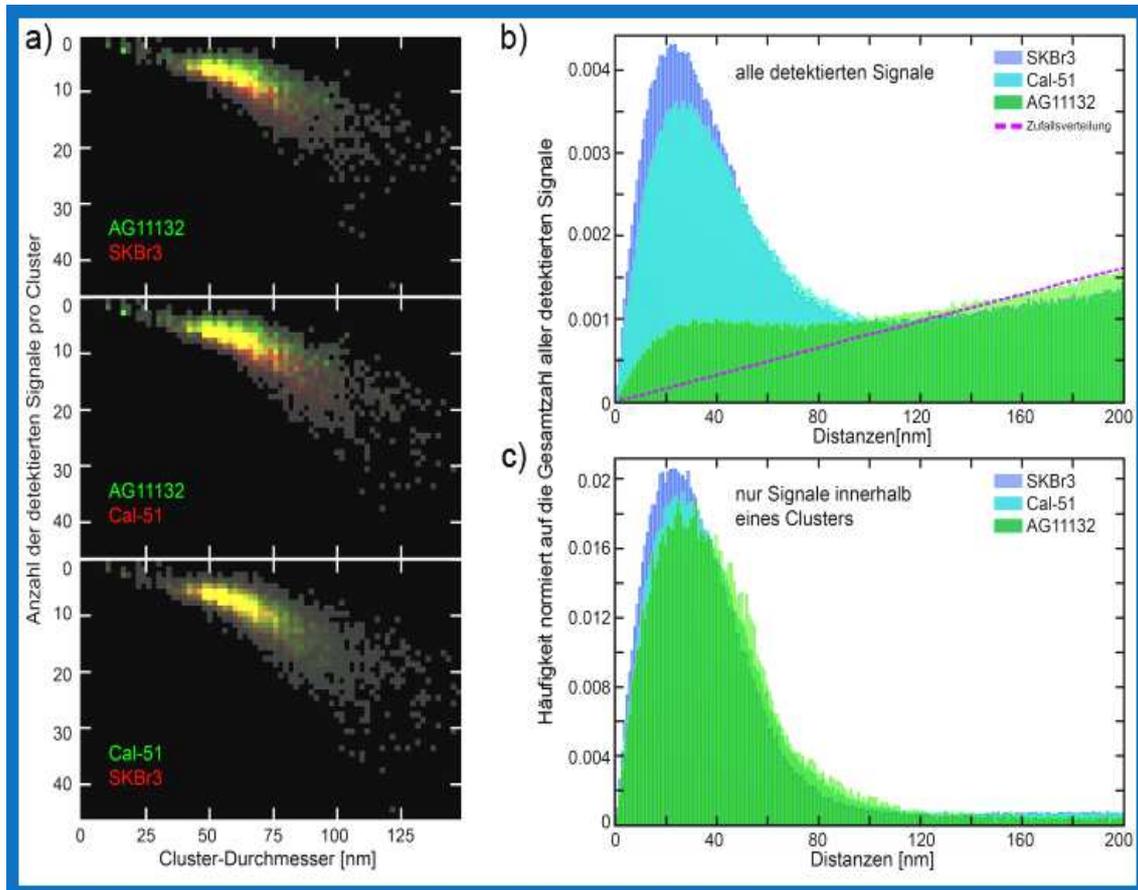


Abbildung 46: Vergleich auf Einzel-Molekül-Ebene

a) Die 2D-Histogramme zeigen die Anzahl der detektierten Signale pro Cluster im Vergleich zum Cluster-Durchmesser. Die verschiedenen Zelltypen sind farbkodiert. Die Frequenz wird über die Helligkeit der Kästchen kodiert. Unterschiede zwischen den Zellen eines gesunden Spenders (AG11132) und die der Brustkrebszelllinien sind erkennbar, während die Verteilungen der Brustkrebszellen untereinander (Cal-51 und SKBr3) sehr ähnlich sind. b) Das Diagramm zeigt alle Distanzen zwischen den einzelnen detektierten Molekülen bis zu 200 nm, die bei der Lokalisationsmessung aufgetreten sind. c) Das Diagramm beruht auf die gleiche Analyse wie in b) jedoch nur für die Signale innerhalb eines Clusters. In beiden Histogrammen wird die Frequenz der gefundenen Distanzen auf den Gesamtbetrag aller ermittelten Distanzen normiert. Die Unterschiede zwischen den verschiedenen Zelllinien sind deutlich sichtbar [Kaufmann² et al. 2010].

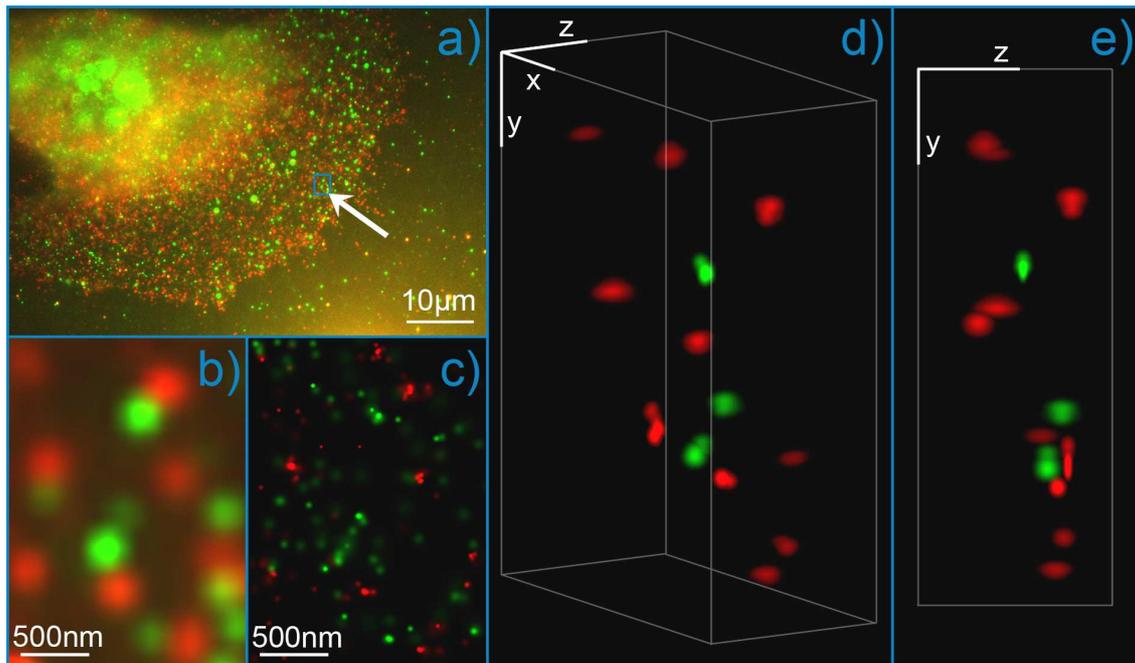


Abbildung 47: Zweifarben-3D-Rekonstruktion von Her2/neu und Her3

a) Konventionelles Weitfeld-Fluoreszenzbild einer gesunden AG11132-Zelle. Her3 wurde mit Alexa 488[®]-konjugierten Antikörpern (grün) und Her2/neu mit Alexa568[®]-konjugierten Antikörpern (rot) markiert. b) vergrößertes Bild des in a) markierten Bereichs (siehe Pfeil). c) Lokalisationsbild der gleichen Region. d) und e) zeigen eine 3D-Rekonstruktion der Protein-Cluster von Her2/neu und Her3. Die Aufnahme erfolgte mittels einer Kombination aus SPDM- und SMI-Mikroskopie. Die Größenbalken in d) und e) entsprechen 500 nm in jede Richtung [Kaufmann² et al. 2010].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mit der Technik der Lokalisationsmikroskopie zwei entscheidende Vorteile für die Analyse von Immunfluoreszenz markierten Proteinen gewonnen werden konnte. Auf der einen Seite ermöglicht die hohe Auflösung die Charakterisierung der Her2/neu-Verteilung auf der Plasmamembran, auf der anderen Seite geben einem die Informationen über die Einzelmoleküle die Möglichkeit eine statistische Analyse der Verteilung der Proteine durchzuführen. Algorithmen zur Bestimmung der Entfernungen zwischen den einzelnen detektierten Molekülen zeigten Ansammlungen von Her2/neu-Clustern. Diese Analyse erlaubte eine klare Differenzierung zwischen drei gut kategorisierten Zelllinien (Cal-51 und SKBr3 - zwei Brustkrebs-Zelllinien; AG11132 - gesunde Zellen einer Brust-Biopsie). Die durch die FACS-Analyse erworbenen Daten wurden mittels Lokalisationsmikroskopie eindeutig bestätigt. Zusätzlich wurden Zweifarben-Präparate erstellt, die eine Darstellung der Rezeptor-Verteilung in 3D erlaubten.

Um Aufschluss über den aktivierten Zustand von Her2/neu-Rezeptoren zu erhalten wurden weiterführende SPDM-Messungen mit Alexa488[®] markierten phosphorylierten Her2/neu-Rezeptoren auf AG11132-Zellen in stimulierten und unstimulierten Zustand der Zellen untersucht. Die Stimulation der Her2/neu-Rezeptoren erfolgte nicht direkt, da diese keinen direkten Liganden besitzen. Jedoch wurde eine Aktivierung der Zellen mit einem Liganden (Neuregulin-1 - NRG-1) für die Her3-Rezeptoren durchgeführt. So sollte über Dimerisierungsprozesse auch eine Aktivierung der Her2/neu-Rezeptoren beobachtbar sein. Die Immunfärbung wurde nach demselben Protokoll wie bisher durchgeführt (siehe Kapitel 2.5.5). Da die Phosphorylierungsstellen der Her2/neu-Rezeptoren an die der Antikörper bindet jedoch intrazellulär liegen, wurde zusätzlich eine Permeabilisierung mit Saponin durchgeführt. Die Zellen wurden mit Formaldehyd fixiert. Die Auswertung der stimulierten Zellen beruht auf 12 Zellen, die der Unstimulierten auf 10 Zellen. Insgesamt wurden für die stimulierten Zellen 72500 Moleküle detektiert. Bei den Unstimulierten zeigten sich 55000 detektierte Fluoreszenzmoleküle.

In Abbildung 48 ist der Vergleich von unstimulierten (grün) und stimulierten (blau) AG11132-Zellen graphisch dargestellt. Die stimulierten AG11132-Zellen zeigen nicht nur einen fast doppelt so hohen Anteil an kleinen Distanzen, sondern auch einen geringeren Anteil an großen Distanzen im Vergleich zu den unstimulierten Zellen. Dieser Befund zeigt, dass durch Aktivierung eines verwandten Rezeptors (hier: Her3) ein klarer Anstieg der aktivierten Her2/neu-Rezeptoren beobachtet werden kann. Dieses Ergebnis entspricht genau den Erwartungen, da durch Stimulation eines Tyrosinkinase-Rezeptors die Signalweiterleitung in das Zellinnere über eine Autophosphorylierung der Rezeptoren läuft. Auch eine indirekte Stimulation der Her2/neu-Rezeptoren kann zur ihrer Aktivierung bzw. Autophosphorylierung führen.

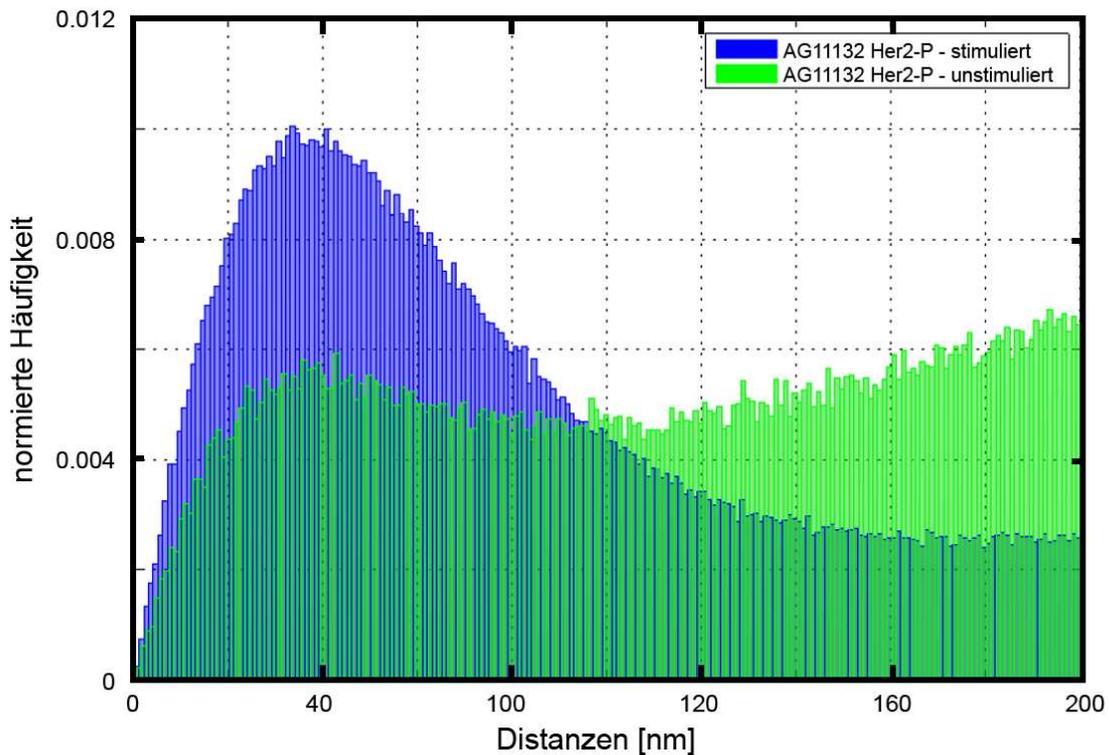


Abbildung 48: Her2/neu-P in unstimulierten/stimulierten Zustand

Vergleich der Alexa488[®] markierten phosphorylierten Her2/neu-Rezeptoren auf AG11132-Zellen im stimulierten (blau) und unstimulierten (grün) Zustand. Nach Stimulation zeigen die AG11132-Zellen einen klaren Anstieg phosphorylierter Her2/neu-Rezeptoren.

3.16 Cluster-Analysen von Her3-Rezeptoren

Folgende Ansätze wurden anhand von Alexa488[®] markierten Her3-Rezeptoren auf AG11132-, SKBr3- und Cal-51-Zellen im unstimulierten Zustand durchgeführt. Diese Distanzanalysen sollten erste Aufschlüsse über das Expressionsmuster von Her3-Rezeptoren auf der Oberfläche der Plasmamembran geben. Somit sollte auch einer zur Familie der EGFR-Rezeptoren gehöriger verwandter Rezeptor untersucht werden, der bei der Signaltransduktion von Brustkrebs ebenfalls eine entscheidende Rolle spielt.

Die Immunfärbung wurde nach demselben Protokoll wie bisher durchgeführt (siehe Kapitel 2.5.5). Der verwendete Antikörper richtet sich gegen eine extrazelluläre Domäne des Her3-Rezeptors. Daher wurde hier keine Permeabilisierung durchgeführt. Die Zellen wurden mit Formaldehyd fixiert. Die Auswertung der unstimulierten Zellen beruht bei AG11132 auf 25 Zellen, bei SKBr3 auf 24 Zellen und bei Cal-51 auf 22 Zellen. Insgesamt wurden für die unstimulierten Zellen von AG11132 120000 Moleküle, für SKBr3 140000 Moleküle und für Cal-51 79000 Moleküle detektiert.

In Abbildung 49 ist der Vergleich von Her3-Rezeptoren auf den drei unterschiedlichen Zelllinien gezeigt. Man kann erkennen, dass AG11132 aufgrund des größeren Anteils an kleinen Distanzen mehr bzw. größere Cluster im Vergleich zu den beiden anderen Zelltypen aufweisen.

SKBr3 hingegen zeigt den stärksten Anstieg hin zu großen Distanzen. Dies deutet auf weniger bzw. kleinere Cluster von Her3-Rezeptoren hin. Cal-51 liegt zwischen AG11132 und SKBr3. Die Clustergrößen der Her3-Rezeptoren von Cal-51 tendieren eher zu denen in AG11132. Diese Ergebnisse zeigen hinsichtlich der Her3-Rezeptor-Cluster dieser drei verschiedenen Zelltypen einen umgekehrten Befund im Vergleich zur Her2/neu-Rezeptor Anordnung.

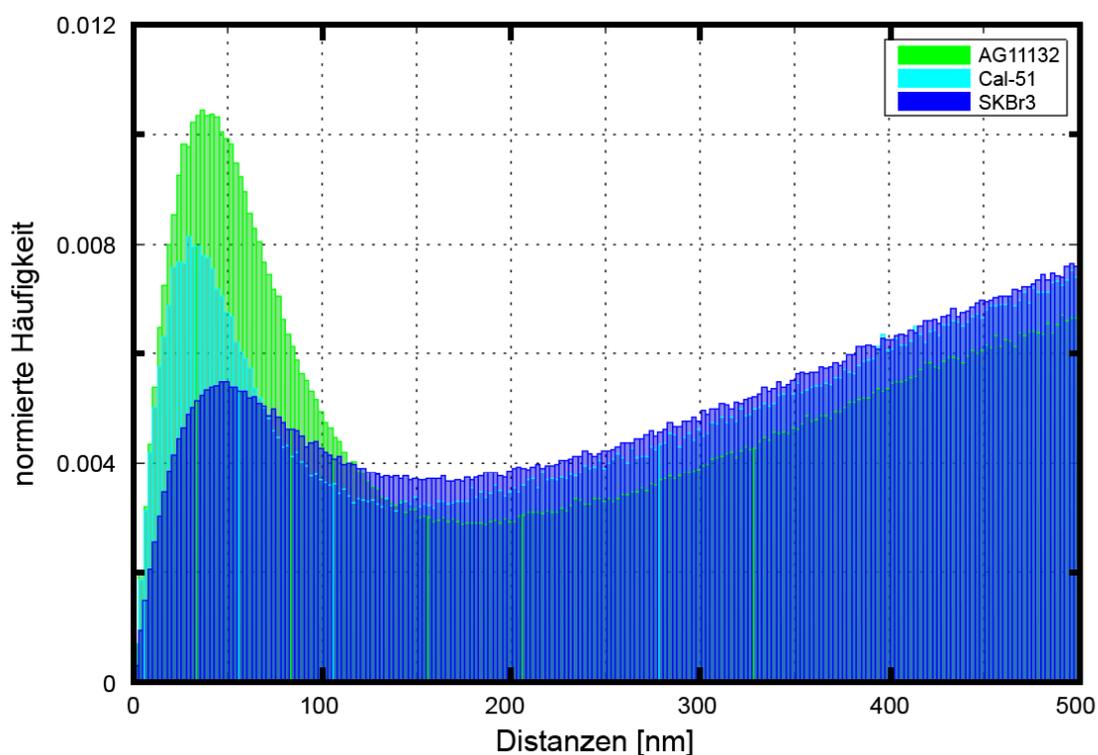


Abbildung 49: Vergleich von Her3-Rezeptoren (AG11132, SKBr3, Cal-51)

Vergleich von Alexa488[®] markierten Her3-Rezeptoren auf AG11132- (grün), SKBr3- (blau) und Cal-51-Zellen (türkis) im unstimulierten Zustand. AG11132 zeigen den größten Anteil an kleinen Distanzen, gefolgt von Cal-51 und SKBr3.

Auch bei den Alexa488[®] markierten Her3-Rezeptoren wurde eine Distanzanalyse im stimulierten Zustand von AG11132-Zellen gemacht und mit den nicht-stimulierten AG11132-Zellen aus der vorherigen Analyse verglichen.

Die Immunfärbung wurde nach demselben Protokoll wie bisher durchgeführt (siehe Kapitel 2.5.5). Der verwendete Antikörper richtet sich gegen eine extrazelluläre Domäne des Her3-Rezeptors. Daher wurde hier keine Permeabilisierung durchgeführt.

3. Ergebnisse

Die Zellen wurden zuerst mit Neuregulin-1 stimuliert und anschließend mit Formaldehyd fixiert.

Die Analyse beruht zum einen auf 15 Membranabschnitten von stimulierten AG11132-Zellen und zum anderen auf 25 Membranabschnitten von unstimulierten AG11132-Zellen. Die insgesamt detektierten Fluoreszenzsignale der Her3-Rezeptoren waren 55800 für die stimulierten- und 120000 für die unstimulierten Zellen.

Von beiden in Abbildung 50 gezeigten Kurven liegt das Maximum der stimulierten Zellen (blau) höher als das der unstimulierten (grün). Auch ist das Maximum (50 nm) der Kurve der stimulierten AG11132-Zellen im Vergleich zu dem der unstimulierten Zellen (40 nm) weiter zu größeren Werten hin verschoben. Die unstimulierten AG11132-Zellen zeigen den stärkeren Anstieg zu großen Distanzen. Man kann erkennen, dass die stimulierten AG11132-Zellen aufgrund des größeren Anteils an kleinen Distanzen mehr bzw. größere Cluster als die unstimulierten Zellen aufweisen. Die unstimulierten Zellen zeigen den stärkeren Anstieg hin zu großen Distanzen. Dies deutet auf weniger bzw. kleinere Cluster von Her3-Rezeptoren hin. Diese Ergebnisse entsprechen elektronenmikroskopischen Untersuchungen [Yang et al. 2007].

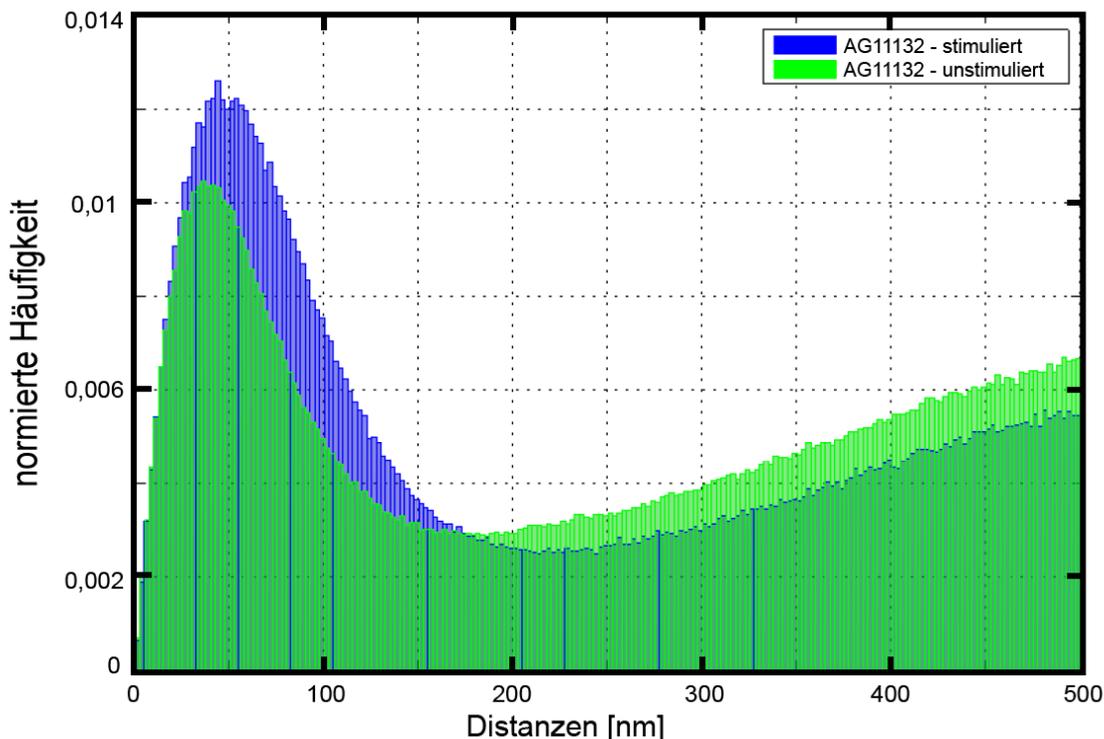


Abbildung 50: Vergleich von un- und stimulierten Her3-Rezeptoren

Vergleich von Alexa488[®] markierten Her3-Rezeptoren auf AG11132-Zellen im stimulierten und unstimulierten Zustand. In den beiden gezeigten Kurven liegt das Maximum der stimulierten Zellen (blau) höher als das der unstimulierten (grün). Auch ist das Maximum (50 nm) der Kurve der stimulierten AG11132-Zellen im Vergleich zu den unstimulierten Zellen (40 nm) weiter zu größeren Werten verschoben. Die unstimulierten AG11132-Zellen zeigen einen stärkeren Anstieg hin zu großen Distanzen.

3.17 Zweifarben-Markierungen von Her-Rezeptoren

Die Zweifarben-Experimente wurden aus folgenden Gründen verfolgt. Erstens sollten die Kolokalisationen der unterschiedlich spektral markierten Antikörper eine verbesserte quantitative Bestimmung der Clustergrößen ermöglichen und zweitens sollten unspezifische Bindungen der Antikörper detektiert und somit eliminiert werden. Die Immunfärbung wurde nach demselben Protokoll wie bisher durchgeführt (siehe Kapitel 2.5.5). Der verwendete Antikörper richtet sich gegen eine extrazelluläre Domäne des Her3-Rezeptors. Da jedoch die Kinase-Domänen der Her2/neu-Rezeptoren, an denen der zweite primäre Antikörper bindet, intrazellulär liegen, wurde zusätzlich eine Permeabilisierung mit Saponin durchgeführt. Die Zellen wurden nach der Immunfärbung mit Formaldehyd fixiert.

In Abbildung 51 sind die Epitopmarkierungen (Alexa568[®] und Alexa488[®]) von Her2/neu-Rezeptoren auf Cal-51-Zellen zu sehen. Abbildung 51 a) zeigt ein konventionelles Weitfeld-Bild. Die grünen Fluoreszenzsignale zeigen die Alexa488[®]-markierten Her2/neu-Rezeptoren (intrazelluläre Kinase-Domäne), die roten Fluoreszenzsignale die Alexa568[®]-markierten Her2/neu-Rezeptoren (extrazelluläre Domäne). Das Lokalisationsbild in Abbildung 51 c) verdeutlicht die auftretenden Kolokalisationen der beiden Fluoreszenzsignale. Einige Fluoreszenzsignale aus b) sind in dem Lokalisationsbild nicht zu sehen. Da nur ein geringer Prozentsatz an Kolokalisationen der beiden Fluoreszenzmarkierungen zu beobachten war, konnte man anhand dieser Messungen weder eine quantitative Bestimmung der Clustergrößen noch eine Eliminierung der unspezifischen Bindungen der Antikörper durchführen.

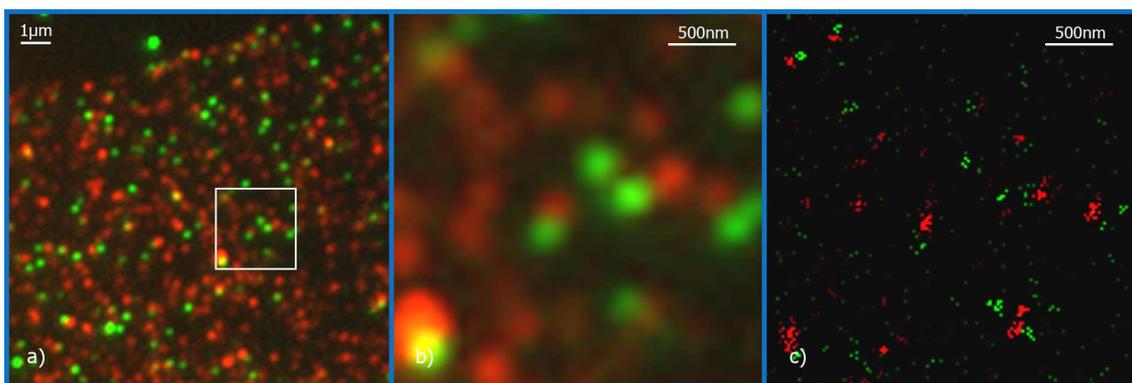


Abbildung 51: Extra- und intrazelluläre Her2/neu-Markierung

Immunfärbung von Formaldehyd fixierten Cal-51-Zellen (monoklonaler extrazellulärer Primärantikörper Her2/neu + Sekundärantikörper Alexa568[®]; polyklonaler intrazellulärer Primärantikörper Her2/neu + Sekundärantikörper Alexa488[®]). Die grünen Fluoreszenzsignale zeigen die Alexa488[®] markierten Her2/neu-Rezeptoren (intrazelluläre Kinase-Domäne), die roten Fluoreszenzsignale die Alexa568[®] markierten Her2/neu-Rezeptoren (extrazelluläre Domäne). a) Weitfeldfluoreszenzbild. b) Vergrößerter Ausschnitt aus a). c) Lokalisationsbild von b). Die Helligkeit der Punkte repräsentiert die lokale Dichte der detektierten Moleküle. Die Lokalisationsgenauigkeit ist nicht dargestellt.

3. Ergebnisse

Es erfolgten weitere Epitopmarkierungen (Alexa568[®] und Alexa488[®]) von Her2/neu-Rezeptoren und Her3-Rezeptoren auf AG11132-Zellen.

Die Immunfärbung wurde nach demselben Protokoll wie bisher durchgeführt (siehe Kapitel 2.5.5). Die verwendeten Antikörper richteten sich sowohl gegen eine extrazelluläre Domäne des Her3-Rezeptors als auch gegen eine extrazelluläre Domäne des Her2/neu-Rezeptors. Daher wurde hier keine Permeabilisierung durchgeführt. Die Zellen wurden nach der Immunfärbung mit Formaldehyd fixiert.

Abbildung 52 a zeigt ein konventionelles Weitfeld-Bild. Die grünen Fluoreszenzsignale zeigen die Alexa488[®]-markierten Her3-Rezeptoren, die roten Fluoreszenzsignale die Alexa568[®]-markierten Her2/neu-Rezeptoren. Das Lokalisationsbild (Abb. 52 c) verdeutlicht die geringe Anzahl an Kollokationen der beiden Fluoreszenzsignale. Einige Fluoreszenzsignale aus b sind in dem Lokalisationsbild nicht zu sehen, da sie vom Cluster-Algorithmus, aufgrund geringer Anzahl detektierte Moleküle, nicht erkannt werden. Da hier ebenfalls nur ein geringer Prozentsatz an Kollokationen der beiden Fluoreszenzmarkierungen zu beobachten war, konnte man auch anhand dieser Messungen weder eine quantitative Bestimmung der Clustergrößen noch eine Eliminierung der unspezifischen Bindungen der Antikörper durchführen.

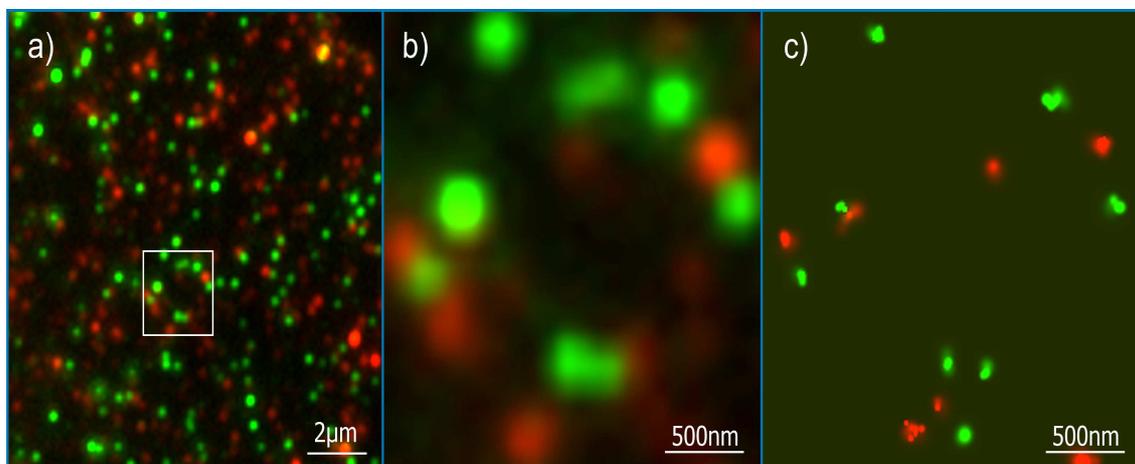


Abbildung 52: Markierung von Her2/neu- und Her3-Rezeptoren

Immunfärbung von Formaldehyd fixierten AG11132-Zellen (polyklonaler Primärantikörper Her3 + Sekundärantikörper Alexa488[®]; monoklonaler extrazellulärer Primärantikörper Her2/neu + Sekundärantikörper Alexa568[®]). Die grünen Fluoreszenzsignale zeigen die Alexa488[®]-markierten Her3-Rezeptoren, die roten Fluoreszenzsignale die Alexa568[®]-markierten Her2/neu-Rezeptoren. a) Weitfeldfluoreszenzbild. b) Vergrößerter Ausschnitt aus a). c) Lokalisationsbild von b). Es wurden nur Punkte, die in einem Radius von 60 nm mindestens 3 Nachbarn besitzen dargestellt. Diese sind mit der jeweiligen Lokalisationsgenauigkeit verschmiert.

3.18 Mehrfach-Epitop-Markierung von Her2/neu-Rezeptoren

Das Einfarben-Experiment (Alexa488[®]) mit unterschiedlichen Epitop-Markierungen von Her2/neu-Rezeptoren auf AG11132-Zellen (drei extra- und zwei intrazelluläre Markierungen) war ein Ansatz, der zu einer verbesserten Fluoreszenzausbeute in den einzelnen SPDM-Messungen führen sollte.

Die Immunfärbung wurde nach demselben Protokoll wie bisher durchgeführt (siehe Kapitel 2.5.5). Die verwendeten Antikörper richteten sich sowohl gegen extrazelluläre Domänen des Her2/neu-Rezeptors als auch gegen intrazelluläre Domänen. Daher wurde zusätzlich eine Permeabilisierung mit Saponin durchgeführt. Die Zellen wurden nach der Immunfärbung mit Formaldehyd fixiert.

Abbildung 53 a) und c) stellt zum einen ein überlagertes Lokalisationsbild (grüne Signale) mit einem Weitfeld-Bild (rote Signale) dieser Experimente dar. In jedem dieser Bilder ist zusätzlich ein vergrößerter Ausschnitt gezeigt. Die Histogramme b) und d) zeigen die Anzahl detektierter Her2/neu-Signale in 5 Bildern bei den erfolgten SPDM-Messungen.

Die Analyse beruht zum einen auf 10 Membranausschnitten von mehrfach markierten AG11132-Zellen und zum anderen auf 35 Membranausschnitten von einfach markierten AG11132-Zellen. Die insgesamt detektierten Fluoreszenzsignale der Mehrfachmarkierung waren 93300, die der Einfachmarkierung 183000.

Im vergrößerten Ausschnitt des überlagerten Bildes der Mehrfachmarkierung ist im Vergleich zur Einfachmarkierung klar zu erkennen, dass alle im Weitfeld-Bild auftretenden Cluster auch im Lokalisationsbild detektiert wurden. Bei der Einfachmarkierung wurden einige Cluster aufgrund der geringeren Fluoreszenzausbeute nicht mehr als Cluster identifiziert. Das Histogramm der Mehrfachepitopmarkierung (Abb. 53 b) zeigt einen viel gleichmäßiger abnehmenden Verlauf und die Anzahl detektierter Signale liegt anfangs weitaus höher als bei der Einfachmarkierung. Man kann klar erkennen, dass die Fluoreszenzausbeute durch eine Mehrfachepitopmarkierung extrem gesteigert werden kann und somit eine präzisere Analyse zulässt.

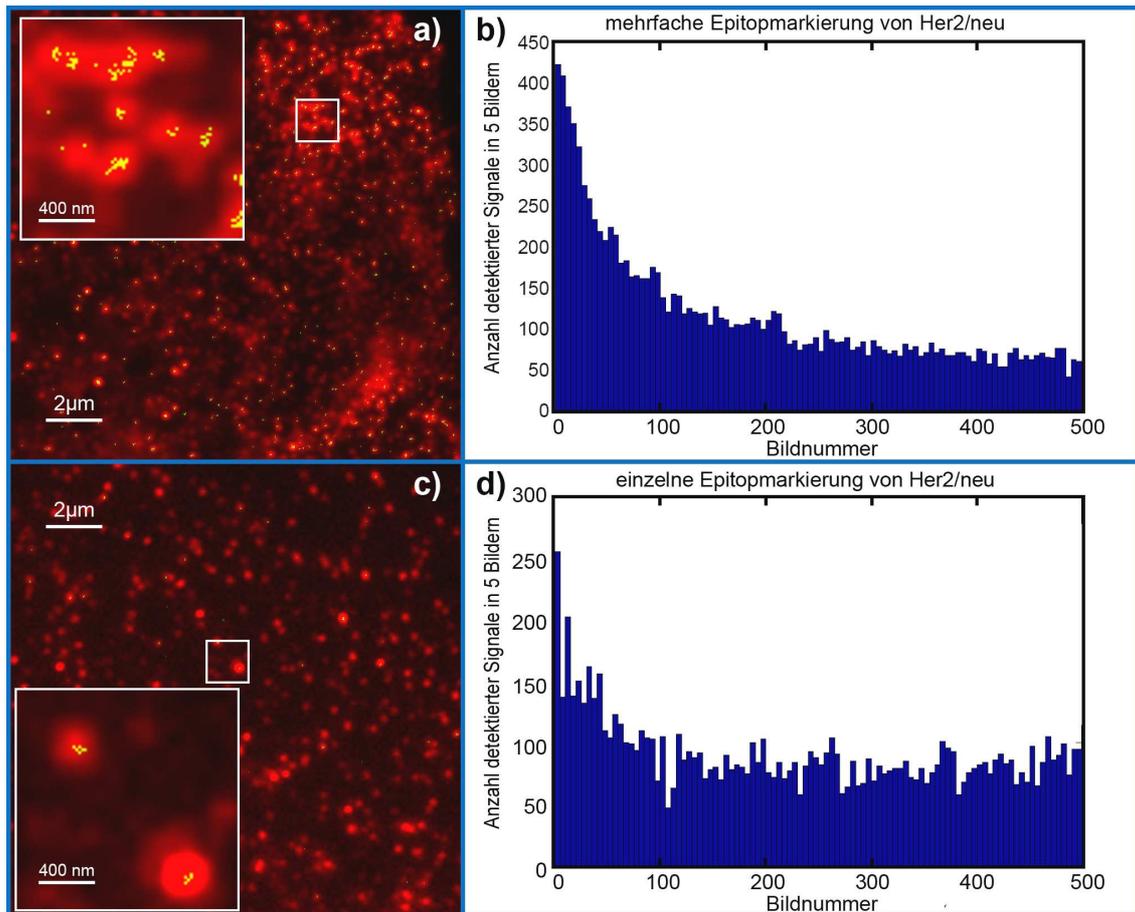


Abbildung 53: Unterschiedliche Epitop-Markierungen von Her2/neu

Einfarben-Experiment mit unterschiedlichen Epitop-Markierungen von Her2/neu-Rezeptoren. a) und c) zeigen überlagerte Lokalisationsbilder (grüne Signale) mit den dazugehörigen Weitfeld-Bildern (rote Signale). In jedem dieser Bilder ist zusätzlich ein vergrößerter Ausschnitt gezeigt. In grün sind die Positionen der detektierten Moleküle dargestellt, die mindestens 5 Nachbarn in einem Radius von 60 nm besitzen. Die Histogramme b) und d) zeigen die Anzahl detektierter Her2/neu-Signale in 5 Bildern bei den erfolgten SPDM-Messungen.

Das Histogramm in Abbildung 54 zeigt die normierte Häufigkeit der auftretenden Distanzen bei AG11132-Zellen. Es stellt die bei einer Einfach- und Mehrfachmarkierung mit Alexa488[®]-konjugierten Antikörpern auftretenden Distanzen von Her2/neu-Rezeptoren dar. Die blaue Kurve der Mehrfachmarkierung besitzt ein doppelt so hohes Maximum wie die grüne Kurve der einfach markierten Zellen. Die grüne Kurve besitzt einen steilen Anstieg bei größer werdenden Distanzen. Das Histogramm zeigt klar, dass man bei einer Mehrfachmarkierung mit den verwendeten Antikörpern für Her2/neu insgesamt mehr Signale im Vergleich zu einer Einfachmarkierung detektieren kann.

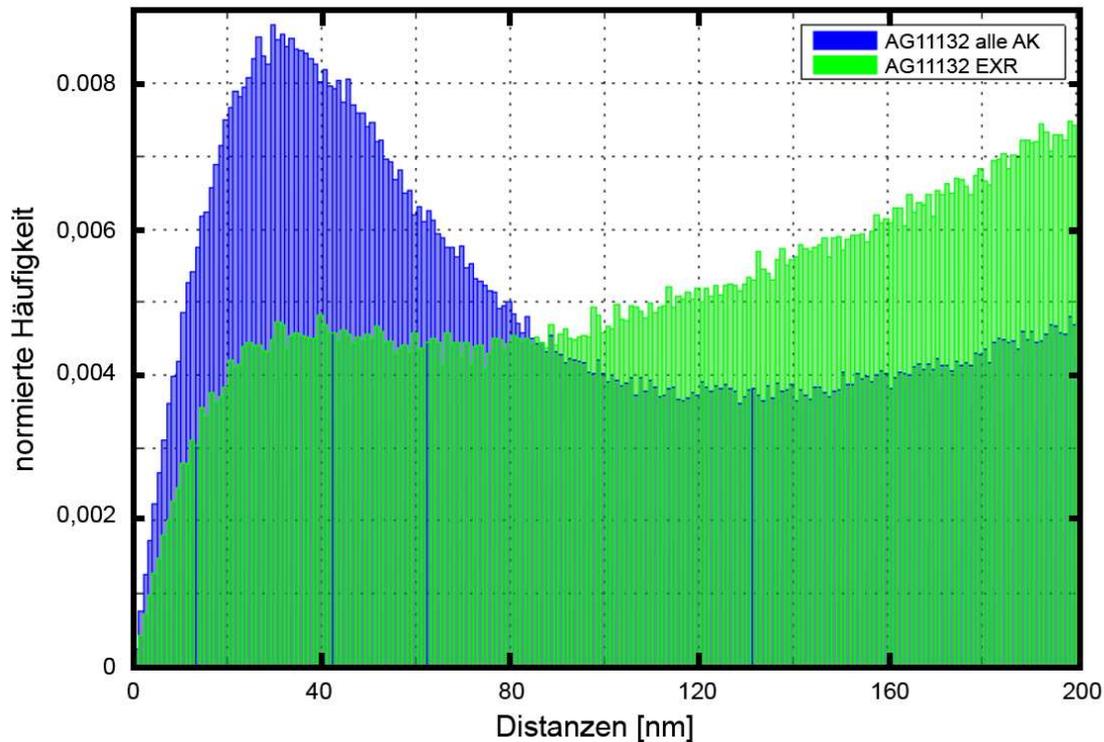


Abbildung 54: Vergleich mehrerer unterschiedlicher Epitop-Markierungen mit EXR

Vergleich von Alexa488[®]-markierten Her2/neu-Rezeptoren auf AG11132-Zellen mit einfacher- und mehrfacher Epitopmarkierung. Die blaue Kurve der Mehrfachmarkierung zeigt ein doppelt so hohes Maximum wie die grüne Kurve der einfach markierten AG11132-Zellen. Die grüne Kurve besitzt einen steilen Anstieg bei größer werdenden Distanzen.

3.19 Lokalisationsmikroskopie in Verbindung mit COMBO-FISH

Abschließend wurde in der Doktorarbeit eine mit Alexa488[®]-markierte PNA-Oligomersequenz für die Subregion von Zentromer 9 mit Lokalisationsmikroskopie untersucht.

Die PNA-COMBO-FISH wurde nach dem in Kapitel 2.5.4 beschriebenen Protokoll durchgeführt. Bei den verwendeten Zellen handelt es sich um die gesunden epithelialen Brustzellen AG11132. Diese Zellen einer gesunden Spenderin besitzen einen diploiden Karyotyp und lassen daher zwei Fluoreszenzsignale für die Zentromerregion von Chromosom 9 im Interphasezellkern erwarten.

Abbildung 55 zeigt das Experiment mit dieser repetitiven PNA-Sonde. Auf allen Bildern sind die beiden Zentromerregionen von Chromosom 9 zu sehen. In Bild a) setzt sich das Lokalisationsbild aus allen detektierten Signalen zusammen. Diese Abbildung zeigt zusätzlich die unspezifischen Hintergrundsignale im Zellkern, die wohl zum Teil auf der Autofluoreszenz und der unspezifischen Bindung der PNA-Sonde beruhen.

3. Ergebnisse

Die beiden Histogramme für die Lokalisationsgenauigkeiten der Zentromersignale (Abbildung 56 a) und Hintergrundsignale (Abbildung 56 b) zeigen zwei unterschiedliche Verläufe. Die Signale im Zentromer zeigen eine Lokalisationsgenauigkeit um die 20 nm. Der größte Anteil der Lokalisationsgenauigkeiten des Hintergrundsignals liegt bei Werten um die 40 nm. Die Mehrheit der Zentromersignale zeigen Lokalisationsgenauigkeiten besser als 30 nm, während im Vergleich dazu die Hintergrundsignale wesentlich schlechtere Lokalisationsgenauigkeiten besitzen (Abbildung 56). Aus diesem Grund führt das Setzen eines Schwellwertes bei 30 nm zu einer klaren Diskriminierung der Zentromersignale von den Hintergrundsignalen. Das Lokalisationsbild in b) zeigt nur Signale mit einer Lokalisationsgenauigkeit besser als 30 nm. Hiermit wird eine Reduktion der unspezifischen Hintergrundsignale erreicht und die Zentromersignale lassen sich eindeutig vom Hintergrund unterscheiden.

Darüber hinaus zeigen die Ergebnisse, dass innerhalb dieser Zentromercluster die meisten Signale mehr als 40 Nachbarmoleküle innerhalb eines Kreises mit einem Radius von 200 nm aufweisen (Abbildung 55 c). Das in c) dargestellte Lokalisationsbild setzt sich nur aus diesen Signalen zusammen und führt zu einer deutlichen Darstellung der Zentromere. Die im Hintergrund auftretenden unspezifischen Signale sind nicht mehr zu beobachten.

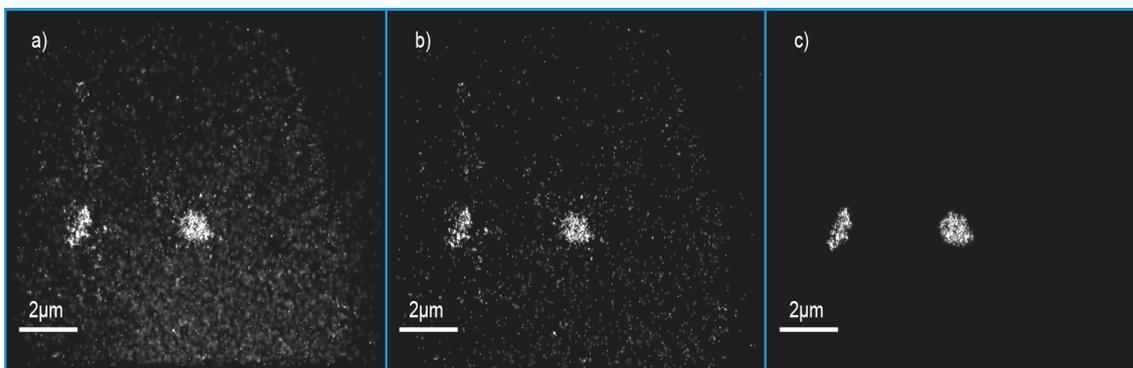


Abbildung 55: Lokalisationsbild von Zentromer 9 PNA-Sonde

Experiment mit repetitiver PNA-Oligonukleotid-Sequenz für Zentromer 9 (Alexa488[®], $\lambda_{\text{ex}} / \lambda_{\text{em}} = 495 / 519$ nm) auf Formaldehyd fixierten AG1132-Zellen. Die beiden Fluoreszenzsignale zeigen eine Anlagerung der mit Alexa488[®]-markierten Sonde an die Subregion von Zentromer 9. a) Lokalisations-Bild aller detektierten Signale. b) Das Lokalisations-Bild zeigt nur Signale mit einer Lokalisationsgenauigkeit besser als 30 nm. c) Lokalisationsbild in dem nur die Signale gezeigt werden, die in einem Radius von 200 nm mehr als 40 benachbarte Moleküle aufweisen [Müller¹ et al. 2010].

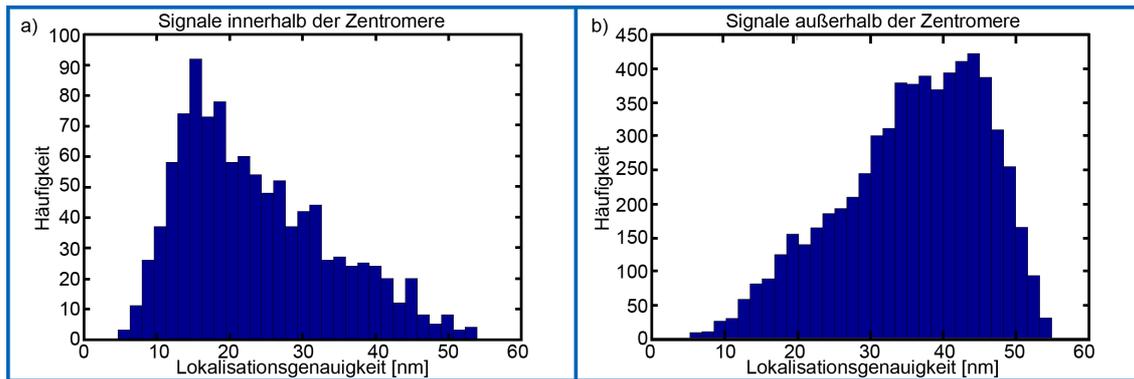


Abbildung 56: Histogramme über die Lokalisationsgenauigkeit

Histogramme über die Lokalisationsgenauigkeit der Signale, die in den Zentromer-Markierungen a) und im Hintergrund des Zellkerns b) detektiert wurden [Müller¹ et al. 2010].

Die Daten zeigen die prinzipielle Möglichkeit, dass SPDM-Messungen mit COMBO-FISH Sonden durchführbar sind, wenn ein geeigneter Farbstoff für die Lokalisationsmikroskopie verwendet wird. Die COMBO-FISH Signale können durch die erhaltenen Lokalisationsgenauigkeiten der SPDM-Messungen von den Hintergrundsignalen, die zum Teil auf Autofluoreszenz und unspezifischer Bindung der PNA-Sonde beruhen klar diskriminiert werden.

4. Diskussion und Ausblick

Zum Nachweis struktureller und numerischer Chromosomenveränderungen im Zusammenhang mit Untersuchungen der funktionellen Genom-Nanoarchitektur bedarf es einer spezifischen Fluoreszenz-Markierungsmethode, die im Gegensatz zu vielen kommerziellen DNA-Sonden, eine lokusgenaue Markierung ermöglicht. Die COMBO-FISH-Methode setzt kurze, einfach fluoreszenzmarkierte Oligonukleotidsequenzen ein, die nur in der gewünschten Zielregion binden und dadurch ein präzises Fluoreszenzsignal der Genregion liefern [Hausmann et al. 2003].

In dieser Doktorarbeit wurden PNA-COMBO-FISH Sonden eingesetzt, um Aufschluss über ihr Hybridisierungsverhalten zu erlangen. Peptidnukleinsäuren wurden erstmals 1991 von Peter Nielsen vorgestellt [Nielsen et al. 1991]. Dabei handelt es sich um ein sequenzspezifisches DNA-Analogon, bei dem das Zucker-Phosphat-Rückgrat der DNA durch ein Peptidrückgrat ersetzt ist. Die PNA ist aufgrund ihrer Fähigkeit zur Bildung komplementärer Basen-Paarungen in der Lage die DNA zu imitieren [Egholm et al. 1993].

PNA hat gegenüber DNA und RNA mehrere Vorteile [Braasch und Corey 2001]:

- PNA zeigt eine höhere chemische Stabilität als DNA oder RNA. Sie ist sowohl gegen Säuren und schwache Basen als auch gegen erhöhte Temperatur stabil [Nielsen 1998].
- PNA ist auch biochemisch gesehen sehr stabil. Sie zeigt eine Resistenz gegen Proteasen und Nukleasen [Demidov et al. 1994]. Diese Resistenzen erhöhen die Verweildauer der PNA-Sonden im Zellkern im Gegensatz zu DNA-Sonden (Halbwertszeit 15 – 20 Minuten) [Fisher et al. 1993] um das 30fache.
- Bei der Hybridisierung kommt es zu einer präzisen Anlagerung der PNA-Sonde an ihre Ziel-DNA. Aufgrund ihres ungeladenen Pseudopeptid-Rückgrats, welches mit der DNA oder RNA keine Ladungsabstoßung hervorruft, entstehen stabile PNA-DNA-Hybride bzw. PNA-RNA-Hybride [Egholm et al. 1993] [Leijon et al. 1994] [Eriksson und Nielsen¹ 1996] [Ray und Nordén 2000]. Dies ermöglicht eine große Affinität zur Ziel-DNA.
- PNA besitzt eine höhere sequenzspezifische Bindung als DNA oder RNA. Eine einzige Basenfehlpaarung führt zu einer Reduktion der Schmelztemperatur einer PNA-DNA Bindung um 15 – 20 °C [Ratilainen et al. 2000].

- Die PNA-Bindung an die komplementäre einzelsträngige Ziel-Region wird von der Ionenstärke des Mediums nicht beeinflusst [Tomic et al. 1996]. Dies erlaubt Hybridisierungen bei niedrigen Ionenstärken, um potentielle Sekundärstrukturen innerhalb der Zielmoleküle aufzulösen, die sich störend auf die Hybridisierung auswirken können.
- Die Bindungen der PNA mit den komplementären Strängen der DNA erfolgt über Watson-Crick-Bindungen und vollzieht sich sowohl in paralleler als auch in antiparalleler Anordnung. Die antiparallele Orientierung wird dabei bevorzugt [Eriksson und Nielsen² 1996] [Egholm et al. 1993]. Die zweite Variante ist die tripelhelikale Bindung der PNA-Sonde an die doppelsträngige Ziel-DNA lebender Zellen. Dabei binden die Pyrimidinsequenzen in paralleler Richtung über Hoogsteen-Bindungen an die Homopurinsequenzen in der großen Furche des nativen DNA-Doppelstrangs [Schmitt und Hausmann 2003]. Diese Art von Sonden eignen sich vor allem für Lebendzelleexperimente, da sie keine Denaturierung benötigen.

PNA besitzt auch Nachteile:

- PNA besitzt eine geringere Löslichkeit als DNA oder RNA [Gildea et al. 1998]. Die PNA Löslichkeit ist dabei abhängig von der Oligomerlänge und vom Purin / Pyrimidin-Verhältnis [Hyrup und Nielsen 1996].
- Unmodifizierte PNA besitzt eine nur schwache zelluläre Permeabilität [Wittung et al. 1995] [Demidov et al. 1994], jedoch kann diese durch gezielte Modifikationen um ein vielfaches verbessert werden [Koppelhus und Nielsen 2003].
- Neutrale PNA-Moleküle haben eine Tendenz Aggregate zu bilden. Dies ist von der Oligomersequenz abhängig [Ray und Nordén 2000].

Insbesondere die oben erwähnten Vorteile von Peptid-Nukleinsäuren machen diese Art von Sonden für die Lebendzellmarkierung interessant und wurden deshalb in dieser Doktorarbeit verwendet und getestet.

COMBO-FISH mit repetitiven PNA-Sonden für Zentromer 9

Die ersten COMBO-FISH-Experimente mit repetitiven Peptidnukleinsäure-Sonden für die Subregion von Zentromer 9 dienten dazu die Hybridisierungseigenschaften von PNA-Sonden in Zellen, ihre Spezifität und Hybridisierungseffizienz sowie die Kombinatorik der Fluoreszenzfarbstoffe zu testen. Die Sonde für das Zentromer 9 entspricht prinzipiell einer COMBO-FISH-Sonde, jedoch besteht diese nur aus einer Oligosequenz, welche sich mehrfach an die repetitive Sequenz des Zentromer 9 anlagert [Chen et al. 2000]. Sie ist eine heterogene Sonde und setzt sich aus Purin- und Pyrimidinbasen zusammen (5'- aatcaacccgagtgaat -3'). Erste Hybridisierungsergebnisse dieser mit spektral unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markierten Sonden lieferten auf peripheren Blutlymphozyten eines gesunden Spenders immer zwei klare Fluoreszenzsignale sowohl im Interphasezellkern als auch auf Metaphasen. Diese ersten eindeutigen Ergebnisse führten zu simultanen Hybridisierungen zweier spektral unterschiedlich markierten Sonden für das Zentromer 9 und zeigten kolokalisierende Fluoreszenzmarkierungen auf Interphase- und Metaphasepräparaten (siehe Abbildung 19). Die Kolokalisation der beiden Signale spricht für eine kompetitive und spezifische Bindung der Sonden an die gleiche Zielregion. Man konnte dadurch zeigen, dass die durch die Kolokalisationsexperimente erhaltenen Ergebnisse ein Nachweis für die Spezifität der synthetisierten PNA-Sonden sind. Dieser Spezifitätsnachweis konnte durch anschließende Versuche verifiziert werden. Dafür wurden weitere Experimente mit einer kommerziellen Telomer-Sonde für Chromosom 9 auf Metaphasechromosomen zum Überprüfen der Sondenspezifität durchgeführt (siehe Abbildung 20). Dieser Versuch zeigte neben der Markierung der Zentromere von Chromosom 9 auch eine Markierung der subtelomeren Enden auf den langen Armen des gleichen Chromosoms und bestätigte die mittels Kolokalisation ermittelte spezifische Anlagerung der PNA-Sonden. Die Hybridisierungseffizienz der einzelnen Zentromer-Sonden lag bei allen Experimenten bei ~ 70 % und entspricht nicht ganz der kommerzieller DNA-BAC-Sonden. Eine Optimierung wäre nötig, wenn diese Sonde für weitere Forschungsstudien eingesetzt werden sollte. In diesem Fall zeigte es sich, dass diese erreichte Hybridisierungseffizienz eindeutige Ergebnisse für weiterführende Versuche lieferte. Die Farbstoffauswahl für die später synthetisierten genspezifischen SONDENSSETS wurde aufgrund mikroskopischer Untersuchungen hinsichtlich der Fluoreszenzsignalintensitäten und deren Stabilität getroffen. So wurden die beiden Farbstoffe Oregon Green 488® und TexasRed® gewählt, da diese bei den COMBO-FISH-

Experimenten sowohl ein gutes Signal-zu-Rausch-Verhältnis als auch eine gute Fluoreszenzstabilität während der Messungen zeigten. Zusätzlich erlaubten beide Farbstoffe eine gute Aufreinigung und Ausbeute bei der PNA-Synthese.

Molekularbiologische Ansätze für Lebendzellmarkierungen

FISH-Markierungen von subchromosomalen Regionen im Zellkern in vivo sind zum jetzigen Zeitpunkt nur begrenzt möglich. Die größten Schwierigkeiten liegen dabei in der spezifischen Markierung der Zielsequenzen ohne Beeinflussung der nativen DNA-Struktur [Rauch et al. 2000] [Solovei et al. 2002] [Hepperger et al. 2007]. Mittels SNOM konnte an Metaphasechromosomen gezeigt werden, dass der Denaturierungsschritt und die Behandlung mit chaotropen Detergenzien, die beide Bestandteile einer Standard-FISH-Markierung sind, zu einer Zerstörung der nativen Chromatinstruktur führen [Winkler et al. 2003]. Daher wurden molekularbiologische Methoden getestet, die eine Markierung in vivo mit hoher Spezifität erreichen sollten und auf strukturverändernde Behandlungsschritte verzichten. Einige der oben aufgeführten Vorteile der PNA machen sie zu optimalen Sonden für diese folgenden Versuche.

Die Diffusionsversuche zeigten neben Fluoreszenzsignalen im Zellkern auch Zusammenlagerungen und unspezifische Bindungen der PNA-Sonden (siehe Abbildung 21). In Ray et al. 2000 wurde eine Tendenz zur Aggregat-Bildung neutraler PNA-Moleküle beschrieben. Dies konnte auch bei den hier durchgeführten Experimenten beobachtet werden. Diese zusätzlichen Fluoreszenzsignale erlauben keine eindeutige Zuordnung mehr. Da PNA eine geringe zelluläre Permeabilität besitzt konnten insgesamt nur sehr wenige Zellen mit Fluoreszenzsignalen detektiert werden [Wittung et al. 1995] [Demidov et al. 1994] [Koppelhus und Nielsen 2003]. Der Spezifitätsnachweis bei in vivo Experimenten stellt sich aufgrund fehlender Sonden für Lebendzellmarkierungen fast immer als sehr schwierig da. Für weiterführende Experimente können kolokalisierende Fluoreszenzsignale helfen, die Spezifität der verwendeten Sonden zu überprüfen. Zusätzlich können erste Versuche auf fixierten Präparaten Auskunft über die spezifische Bindung der verwendeten Sonde geben. Für Untersuchungen der funktionellen Genom-Nanoarchitektur müssen jedoch wieder jegliche Störeffekte (z.B. Fixierungsprozess) eliminiert werden.

Eine effiziente Transfektion von lebenden Zellen in Kultur wurde auch mittels Magnet Assisted Transfektion (MATra) durchgeführt, indem die vorhandenen Nukleinsäure-Sonden mit magnetischen Nanopartikeln beladen und anschließend durch

Anlegen eines magnetischen Feldes auf die Zytoplasma-Oberfläche der Zelle gezogen werden [IBA Göttingen]. Durch die MATra-Versuche konnten im Gegensatz zu den Diffusionsexperimenten eine erhöhte Transfektionseffizienz der Zellen erreicht werden. Es konnte jedoch nur eine Ansammlung der fluoreszenzmarkierten PNA-Sonde im Zytoplasma der Zelle detektiert werden (siehe Abbildung 22). Dieses Ergebnis spricht dafür, dass eine Wechselwirkung zwischen den Nanopartikeln mit der ungeladenen PNA stattfindet, obwohl diese Kopplung eigentlich auf der positiven Ladung der Nukleinsäuren beruht. Die Ansammlung der PNA im Zytoplasma der Zelle ist wohl auf die Aggregat-Bildung der neutralen PNA-Moleküle zurückzuführen [Ray und Nordén 2000]. Es konnten trotz der erhöhten Transfektionseffizienzen keine spezifischen Fluoreszenzsignale im Zellkern nachgewiesen werden. Hier wäre ein Ansatz für weiterführende Versuche, die PNA-Sonden mit einer NLS (nuclear localising sequence)-Sequenz zu modifizieren, dass ein aktiver Transport der im Zytoplasma angereicherten Sonde begünstigt wird. Einige Modifikationsansätze sind bei Koppelhus und Nielsen 2003 aufgelistet [Koppelhus und Nielsen 2003].

Eine weitere molekularbiologische Methode Zellen ohne chemische oder thermische Behandlung zu markieren ist die Mikroinjektion von Fluoreszenzsonden. Zusammen mit Antikörpern wurde den vitalen Zellen die Zentromer 9 PNA-Sonde injiziert, um eine eindeutige Identifikation der injizierten Zellen zu gewährleisten. Das schlechte Signal-zu-Rausch-Verhältnis im Zellkern nach Injektion der PNA-Sonde erlaubte keine Detektion spezifischer Fluoreszenzsignale. Obwohl erste Versuche nach diesem Protokoll klare Fluoreszenzsignale für die Zentromerregionen von Chromosom 9 lieferten [Schmitt² et al. 2010] konnten diese Ergebnisse so nicht reproduziert werden. Die Präparate mit dem schlechten Signal-zu-Rausch-Verhältnis (siehe Abbildung 23) zeigen eine zu hohe lokale Konzentration der PNA-Sonde im Zellkern und machen somit eine Detektion der spezifischen Signale unmöglich. Die Mikroinjektion als molekularbiologische Methode hat den Nachteil, dass nur ein geringer Prozentsatz an Zellen injiziert werden kann. Das mikroskopische Wiederfinden der einzelnen Zellen nach der Injektion stellte sich als zusätzliche Schwierigkeit heraus. Daher sollte in weiteren Experimenten Objektträger benutzt werden, die ein Koordinatensystem besitzen mit dem man die Zellen leichter wiederfinden kann [Amberger 2008]. PNA besitzt auch eine Affinität zu Glas und macht dadurch das Injizieren als solches sehr schwierig, da die feinen Glaskanülen sehr schnell durch die zu injizierende Sonde verstopft werden. Der hohe zeitliche Aufwand in der Handhabung ist ein weiterer Punkt der für einfachere und effizientere Transfektionsmethoden spricht.

Etablierung eines PNA-COMBO-FISH-Protokolls

Als nächster Schritt wurde ein genspezifisches Sondenset für *Her2/neu* hergestellt. Ein erstes Ziel lag in der Etablierung eines Hybridisierungs-Protokolls für PNA-COMBO-FISH mit diesem genspezifischen Sondenset, das als Grundlage für weitere Arbeiten mit diesen neu synthetisierten PNA-Sonden dienen sollte.

Die Protokollentwicklung basierte auf einem bereits im Rahmen meiner Diplomarbeit entwickelten Hybridisierungsprotokoll für einzelsträngige DNA- und PNA-Oligonukleotid-Sonden. Es wurden anfangs alle Einzelschritte separat überprüft und an die neuen genspezifischen PNA-Sondensets individuell angepasst. Dabei dienten die Resultate und Erfahrungswerte der COMBO-FISH-Experimente mit der repetitiven Zentromer 9 PNA-Sonde als Grundlage für die Entwicklung eines optimalen Hybridisierungsprotokolls für das genspezifischen PNA-Sondensets von *Her2/neu*. Diese Experimente wurden entweder mit peripheren Blutlymphozyten eines gesunden Spenders oder den Brustkrebszellen Cal-51 durchgeführt, da beide einen normalen Genotyp (46, XX) besitzen und somit ein eindeutiges Ergebnis hinsichtlich der erwarteten Fluoreszenzsignale liefern.

Im Folgenden werden die in Tabelle 13 aufgelisteten wichtigsten Schritte des Hybridisierungsprotokolls näher erläutert und diskutiert:

Durch die Variation der Sondenkonzentration, Hybridisierungspuffer und Hybridisierungstemperatur wurden Ansätze erstellt, die Aufschluss in Hinblick auf die Bindungsaffinität, Bindungsspezifität, Bindungsstabilität sowie Clusterbildung der PNA-Sonden geben sollten.

Viele der in Tabelle 11 aufgeführten Hybridisierungspuffer konnten zu keiner eindeutigen Signaldetektion beitragen. Neben unspezifischer Clusterbildung konnten auch eine Anlagerungen an die Nukleoli des Zellkerns beobachtet werden (siehe Abbildung 27). Die besten Ergebnisse wurden mit Hybridisierungsmix 1 erreicht und die erfolgreichen Hybridisierungen sind in den Abbildungen 24 – 26 dargestellt. Die beobachtete Clusterbildung kann auf die Selbstaggregation der neutralen PNA-Moleküle zurückzuführen sein [Ray und Nordén 2000]. Hybridisierungsmix 1 wurde daher für alle weiteren PNA-COMBO-FISH-Experimente verwendet.

Versuche hinsichtlich der Hybridisierungstemperatur wurden bei 37 °C, 42 °C und 50 °C durchgeführt. Die besten Ergebnisse konnten bei 37 °C erzielt werden und wurde daher auch als optimale Temperatur für weitere Versuche gewählt. Die Stringenzerhöhung durch Steigerung der Temperatur, die eine Bildung unspezifischer

Bindungen verhindert, konnte nicht beobachtet werden. Die Hybridisierungen mit 50 °C führten zu morphologischen Veränderungen der Zellen.

Die Konzentrationserhöhung der Sonden, die zu einer besseren Signalausbeute und einem besseren Signal-zu-Rausch-Verhältnis führen sollte, zeigte bei hohen PNA-Konzentrationen ein erhöhtes Hintergrundsignal im Zellkern und verhinderte dadurch die Detektion der eigentlichen Fluoreszenzsignale. Das PNA-Sondenset wurde daher in der selben Konzentration, wie die DNA-Oligosonden für die *abl*-Genregion, eingesetzt [Schwarz-Finsterle et al. 2005] [Schwarz-Finsterle et al. 2006/2007].

Weitere wichtige Punkte bei den Hybridisierungsprotokollen sind die stringenten Waschschriffe, die unspezifische Hintergrundfärbungen und Fehlbindungen vermindern sollen. Die Zusammensetzung der Waschlösung wird nach der gewünschten Stringenz gewählt. Zu hohe Temperatur kann zu Verlust der sich angelagerten Sonde führen, zu niedriger hingegen zu rückbleibenden unspezifischen Bindungen. Letztendlich sollen nur die homolog gebundenen Oligo-Sequenzen an der Zielregion verbleiben.

Die Durchführung vieler unterschiedlicher Stringenzvarianten führte zum Ergebnis, dass bei zweimaligem Waschen mit 2 x SSC bei 42 °C für 5 Minuten und einem anschließenden Waschschriffe mit 0,5 x SSC bei 60 °C für 5 Minuten das beste Signal-zu-Rausch-Verhältnis erreicht werden konnte. Die starke Bindung von PNA zu DNA [Leijon et al. 1994, Egholm et al. 1993] macht es wohl möglich solch hoch temperierte Waschschriffe durchzuführen ohne die spezifischen Bindungen zu lösen.

Die wichtigsten Parameter, Variationen und empfohlene Werte für PNA-COMBO-FISH können aus Tabelle 13 entnommen werden. Es zeigte sich, dass diese Werte für die nachfolgenden Experimente eine gute Hybridisierung gewährleisten, sofern die Präparationsschriffe strikt nach dem entwickelten Protokoll erfolgten. COMBO-FISH-Experimente mit dem genspezifischen Sondenset für *Her2/neu* wurden mit Methanol/Eisessig fixierten peripheren Blutlymphozyten eines gesunden Probanden nach dem optimierten Protokoll durchgeführt und zeigten zwei klare Fluoreszenzsignale. Der eindeutige Befund führte dazu, dass alle weiterführenden Präparate genau nach diesem entwickelten Protokoll gemacht wurden.

COMBO-FISH mit zwei genspezifischen Sondensets (*Her2/neu* und *GRB7*)

Nachdem erste Ergebnisse zeigen konnten, dass die genspezifische PNA-Sonde für *Her2/neu* positive Resultate liefert wurde eine Mehrfarben-COMBO-FISH mit der Brustkrebs-Zelllinie Cal-51 an mit Formaldehyd fixierten Präparaten durchgeführt. Cal-

51 stammt von Metastasen im Pleuraraum einer Frau mit progressivem Brustdrüsenkrebs und besitzt einen normalen Genotyp (46, XX). Als Fluoreszenz-Sonden wurden genspezifische SONDENSSETS für die Onkogene *Her2/neu* und *GRB7* verwendet, die auf Chromosom 17 in direkter Nachbarschaft liegen. Die Oligonukleotid-Sequenzen setzen sich ausschließlich aus Pyrimidinbasen zusammen. Alle PNA-Oligonukleotid-SONDENSSETS liegen einzelsträngig vor und können sich sowohl parallel als auch anti-parallel an die Kern-DNA anlagern. Das doppelhelikal bindende SONDENSSET ermöglicht eine Anlagerung an die komplementäre-DNA über Watson-Crick Bindungen, wobei hier eine Denaturierung der Kern-DNA erforderlich ist. Das tripelhelikal bindende SONDENSSET wurde so konstruiert, dass sich die Oligonukleotid-Sequenzen über Hoogsteen-Bindungen in die große Furche der nativen Doppelstrang-DNA anlagern können. Diese PNA-Sonden haben große Vorteile bei einer Lebendzellmarkierung, da sie keine Denaturierung und auch keinen Einsatz von chaotropen Reagenzien erfordern. Eine strukturerhaltende Untersuchung der Chromatinorganisation unter sehr milden Bedingungen wird ermöglicht.

Die Hybridisierungen der beiden spektral unterschiedlich markierten SONDENSSETS für *Her2/neu* und *GRB7* zeigten zwei klare Fluoreszenzsignale in den jeweiligen Farbkanälen. Aufgrund der direkten Nachbarschaft der beiden Gene auf Chromosom 17 konnte bei der Überlagerung der beiden Bilder eine korrekte Kolokalisation der Fluoreszenzsignale detektiert werden (Abbildung 26). Wie schon mit den Zentromer 9 PNA-Proben gezeigt wurde spricht eine Kolokalisation der Signale für die Spezifität der SONDENSSETS. Die Wahrscheinlichkeit, dass beide SONDENSSETS an die falsche Stelle im Genom binden ist schon aufgrund des SONDENSSETDESIGNS sehr gering. Hier wurde ein Ansatz erarbeitet, der in naher Zukunft eine genaue Charakterisierung von Brustkrebszellen hinsichtlich ihrer *Her2/neu* - Amplifikation zulassen soll. Die kleinen COMBO-FISH-Sonden sollen zu einer verbesserten Auflösung der einzelnen Genkopien unterschiedlicher Brustkrebszelllinien führen. Auch die in der Literatur oft beschriebene Ko-Amplifikation der *Her2/neu*- und *GRB7* - Gene kann mit dieser Art von SONDENSSETS untersucht werden [Stein et al. 1994].

COMBO-FISH mit TINA (Twisted Intercalating Nucleic Acids)-modifizierte-SONDENSSETS (*bcr* und *Her2/neu*)

Bei der COMBO-FISH-Methode kam es zur Anwendung TINA-modifizierter-SONDENSSETS sowohl für die *bcr*-Genregion, als auch für *Her2/neu*-Genregion, die zum einen mit Fluorescein und zum anderen mit Cy3 markiert wurden. Diese Modifikation verbessert

die Anlagerung der tripelhelikal bindenden Sondensets in die große Furche des nativen DNA-Doppelstrang und soll ein weiterer Schritt in Richtung Lebendzellmarkierung sein. Die Oligo-Sequenzen dieses *Her2/neu*-Sondensets sind komplementär zu dem oben genannten PNA-Sondenset, jedoch wurden hier vereinzelt TINAs eingebracht, die eine verbesserte Anlagerung der einzelsträngigen Oligo-Sequenzen in die große Furche der nativen Ziel-DNA erlauben. Für die Zusammensetzung des *bcr*-Sondensets wird auf Tabelle 9 verwiesen.

Die ersten Hybridisierungen mit dem *bcr*-Sondenset zeigten viele, über die ganzen Inter- und Metaphasen verteilte unspezifische Fluoreszenzsignale (Abbildung 28). Da nur eine kleine Menge an Sondenmaterial zur Verfügung stand, konnte nur eine einzige Hybridisierung durchgeführt werden. Die unspezifischen Fluoreszenzsignale kommen durch Fehlbindungen der Sonde zustande. Es kann nicht eindeutig geklärt werden, ob diese unspezifische Anlagerungen auf die Farbstoffmoleküle oder auf Probleme bei der Aufreinigung (z.B. Verunreinigungen durch Abbruch-Sequenzen bei der Synthese) zurückzuführen sind. Die Aufreinigung der Oligosequenzen und die damit verbundene Reinheit der Sonden sind für erfolgreiche Hybridisierungen von enormer Bedeutung. Diese Vermutungen liegen jedoch nahe, da die Sonde bereits erfolgreich in vorherigen Experimenten hybridisiert wurde [Schwarz-Finsterle et al. 2005] [Schwarz-Finsterle et al. 2006/2007].

Für das neu synthetisierte TINA-modifizierte-Sondenset ist man auf das etablierte *Her2/neu*-Sondenset umgestiegen und es kam zusätzlich zu einer Neuordnung der TINAs in den einzelnen PNA-Oligosequenzen. Die Lage der TINAs in den einzelnen SONDENSEQUENZEN ist für die Inkorporation in die native DNA von entscheidender Bedeutung [Schneider et al. 2010]. Hybridisierungen dieses neuentwickelten Sondensets für *Her2/neu* zeigten auf der Brustkrebszelllinie Cal-51 eine sehr gute Hybridisierungseffizienz (Abbildung 29). In 40 Prozent aller Zellen konnten zwei Fluoreszenzsignale detektiert werden. Da bei diesen Experimenten kein Denaturierungsschritt durchgeführt wurde, eignet sich solch ein Versuchsansatz die Chromatinmikro- und Chromatinnanostruktur möglichst strukturerhaltend untersuchen zu können.

Die geringen Hybridisierungseffizienzen einzelner Versuche, die auf die geringe Anzahl von Fluorophoren pro Sondenset (z.B. 15 Oligosequenzen = 15 Fluorophore) zurückzuführen sind zeigen einen Ansatzpunkt diese Sondensets weiter zu verbessern. Modifikationen die zu einer erhöhten Fluoreszenzausbeute und somit zu einer besseren Detektionswahrscheinlichkeit der Fluoreszenzsignale führen können sind zum einen die

Doppelmarkierung der Oligosequenzen am 3' und 5'-Ende und zum anderen der Einbau von mehreren Fluorophoren in die einzelnen Sequenzen. Weiterhin könnten hochauflösende Mikroskopieverfahren (wie z.B. Lokalisationsmikroskopie) mit einer gesteigerten Nachweisempfindlichkeit dazu beitragen, dass diese mit wenig Fluorophoren ausgestatteten SONDENSSETS eindeutig detektiert und diskriminiert werden.

Biologische Grundlagenexperimente zur Lokalisationsmikroskopie

Das Auflösungsvermögen der konventionellen Weitfeld-Lichtmikroskopie liegt lateral bei ~ 200 nm und axial bei ~ 500 nm. Die Lokalisationsmikroskopie ist eine neue lichtmikroskopische Möglichkeit die Beugungsgrenze zu umgehen und ermöglicht somit eine Nanometer genaue Darstellung von zellulären Strukturen.

Die Varianten (PALM, FPALM, STORM) der Lokalisationsmikroskopie beruhen auf den Eigenschaften photoschaltbarer Fluorophore, die eine zeitliche Isolation ermöglichen, um damit eine räumliche Separation zu erreichen [Betzig et al. 2006] [Hess et al. 2006] [Rust et al. 2006].

Bei SPDM (engl. Spectral Precision Distance Microscopy) wird diese Trennung über die Verwendung unterschiedlicher Fluoreszenzfarbstoffe mit unterschiedlichen spektralen Eigenschaften erreicht [Bornfleth et al. 1998] [van Oijen et al. 1998] [Esa et al. 2000]. Eine Weiterentwicklung von SPDM erreicht die optische Isolation durch photophysikalische Veränderungen, die auf reversiblen Photobleichen von Fluoreszenzfarbstoffen beruht. Dieses reversible Bleichen ist als Störeffekt in der Fluoreszenzmikroskopie bekannt und wurde ausgiebig bei fluoreszierenden Proteinen untersucht. Dem Übergang der Moleküle vom reversibel gebleichten Zustand in den fluoreszierenden liegt ein stochastischer Effekt zu Grunde, welcher für die optische Isolation der Fluorophore genutzt wird [Sinnecker et al. 2005]. Diese Technik erlaubt eine effektive optische Auflösung in biologischen Präparaten bis zu einigen wenigen Nanometern.

Der zweite Teilbereich dieser Forschungsarbeit beschäftigt sich mit der Etablierung und Optimierung biologischer Anwendungen auf die oben erwähnte weiterentwickelte Spektralen-Präzisions-Distanz-Mikroskopie (engl. Spectral Precision Distance / Position Determination Microscopy). Vorteil dieser hochauflösenden Lokalisationsmikroskopie im Vergleich zu anderen Lokalisationsmikroskopie-Methoden ist die Anwendung von konventionellen Fluoreszenzmolekülen (z. B. fluoreszierende Proteine und Alexa-Farbstoffe) unter Standard-Präparationsmethoden. Die Neuentwicklung dieser Lokalisationsmikroskopie-Methode führte zu vielen biologischen

Grundlagenexperimenten. Dafür wurden Präparate mit fluoreszenten Proteinen, organischen Farbstoffen und Alexa konjugierten Antikörpern hergestellt, um eine optimale Auswahl an Farbstoffmolekülen für weiterführende Experimente treffen zu können. Zusätzlich wurden unterschiedliche Markierungsmethoden verwendet und Experimente mit unterschiedlichen Einbettmedien durchgeführt, die Aufschluss über das Blinkverhalten der Fluoreszenzfarbstoffe in der jeweiligen Umgebung zeigen sollten und die Planung späterer Versuche vereinfachten.

In den ersten Experimenten, die zur Etablierung und Optimierung der biologischen Präparate für die Lokalisationsmikroskopie dienten wurden die unterschiedlichen Kompartimente von menschlichen Zellen untersucht. Die Präparate zur Untersuchung der Plasmamembran wurden mit einem kommerziellen Plasmid-Konstrukt markiert, das sich aus einem Promotor, dem Fluoreszenz-Protein (z.B. YFP oder GFP) und einem Signal-Peptid zusammensetzt. Das Signal-Peptid des fluoreszenten Plasmid-Konstrukts ermöglicht einen zielgerichteten Transport des Fluoreszenzmarkers zum spezifischen zellulären Kompartiment (hier: myristoylierte und palmitoylierte Sequenzen der Lck-Tyrosin-Kinase) Die Lage und Verteilung der Lck-Tyrosin-Kinasen in der Plasmamembran führen zu einer gleichmäßigen Markierung der Plasmamembran [Invitrogen, Carlsbad, USA]. Der zelluläre Transport wird über die BacMam Technologie, die auf einem Baculovirus beruht, erreicht [Smith 2007]. Zusätzliche Mikroskopiedaten und Ergebnisse dieser Präparate wurden 2008 in Lemmer et al. [Lemmer et al. 2008] veröffentlicht. Das kommerziell erhältliche Markierungskit wurde genutzt, um zu zeigen, dass die Methode eine Untersuchung von dünnen mit einem Fluoreszenzprotein markierte Strukturen eindeutig bis auf wenige Nanometer genau zulässt.

Für Untersuchungen im Zytoplasma wurde eine transient transfizierte Fibroblasten-Zelllinie (COS7) mikroskopiert, die ein YFP markiertes Plasmid-Konstrukt für das Transmembrane-Glykoprotein m164 trägt. Gen *m164* des murinen Zytomegalovirus codiert ein immundominantes CD8 T-Zell-Epitop [Holtappels et al. 2002]. Es repräsentiert ein Gen, das bei der Virus-Wirt-Interaktion beteiligt ist und zu der Wirtanpassung des Virus beiträgt. Das *m164* Genprodukt ist ein 36,5 kDa großes Protein mit ungewöhnlichen Eigenschaften. Vor kurzem konnte gp36.5/m164 als integrales Typ-I-Membran-Glykoprotein identifiziert werden. Es zeigt eine außergewöhnliche intrazelluläre Dynamik und akkumulierte sowohl innerhalb des endoplasmatischen Retikulums (ER) als auch in der äußeren Kernmembran mit einer überdurchschnittlich hohen lateralen Membran-Mobilität [Däubner et al. 2010].

Insbesondere konnte beobachtet werden, dass dieses Protein im endoplasmatischen Retikulum zurückgehalten wird und keine Weitergabe in den Golgi-Apparat stattfindet [Däubner et al. 2010]. Die Akkumulation von m164 in den oben genannten Regionen konnte mittels Lokalisationsmikroskopie präzise dargestellt werden und zeigte unterschiedliche Proteindichteverteilungen in den ausgewählten Zytoplasma-Regionen. Die Bildabschnitte in Abbildung 31 zeigen exemplarisch die ausgewählten Abschnitte des Endoplasmatischen Retikulums und der Kernmembran. Im Gegensatz zu den Weitfeld-Bildern ermöglichen die SPDM Bilder eine genaue Darstellung der Protein-Anordnung und können somit zur Identifikation von immunogenen Virus-Proteinen als Kandidaten für Impfungen und Zytoimmunotherapien beitragen. Die Ergebnisse der Distanz- und Nachbarschaftsanalysen der Proteine konnten zeigen, dass sich die im Lokalisationsbild auftretenden Strukturen auch statistisch nachweisen lassen [Müller² et al. 2010].

Des Weiteren wurde die Histon-Verteilung im Interphasezellkern und auf Metaphasechromosomen untersucht. Dafür wurde eine stabil transfizierte HeLa-Zelllinie verwendet, die ein GFP markiertes Plasmid-Konstrukt für H2B besitzt, das dauerhaft in das Genom eingebaut wurde [Knoch 2002]. Die Metaphasen-Präparate wurden mittels Zytospin erstellt.

Strukturelle Unterschiede in der Chromatinanordnung von Interphasezellkernen anhand von Dichteanalysen konnten vor kurzem bei Bohn et al. 2010 gezeigt werden [Bohn et al. 2010]. Die Untersuchungen in dieser Doktorarbeit führten zu Ergebnissen, die anhand von Dichteanalysen strukturelle Unterschiede nicht nur in Interphasezellkernen, sondern auch an unterschiedlich kondensierten Metaphase-Spreitungen zeigen konnten (Abbildung 35). Um diese ersten strukturellen Untersuchungen verifizieren zu können sind weitere Versuche im Rahmen einer Bachelorarbeit geplant, die nicht nur das Expressionsmuster einzelner Histongruppen untersucht, sondern auch die Kompaktierung hetero- und euchromatischer Bereiche bestimmen soll.

Beim Vergleich einzelner unterschiedlicher Metaphasechromosomen konnte kein struktureller Unterschied nachgewiesen werden, vermutlich ist dies auf die unterschiedliche Fluoreszenzausbeute der detektierten Signale zurückzuführen. Hier könnte man durch eine verbesserte Markierungs- und Detektionseffizienz einen größeren Unterschied in der Histonverteilung unterschiedlicher Metaphasechromosomen beobachten. Für quantitative Messungen sind diese weiteren Optimierungsschritte nötig, um eine klare Aussage treffen zu können. Man konnte mit diesen Untersuchungen prinzipiell zeigen, dass die Methode der

Lokalisationsmikroskopie einen Einblick in die Chromatinnanostruktur erlaubt. Die hochaufgelöste Analyse der räumlichen Anordnung von Histonen im Zellkern und von Metaphasechromosomen können zu neuen Erkenntnissen hinsichtlich unterschiedlich exprimierender Zellen führen. Wie schon in Bohn et al. 2010 gezeigt wurde liefern komplexere Analysen der Lokalisationsdaten mit Methoden aus der statistischen Physik genauere Einblicke in die Verteilung von Histonproteinen. Diese Ergebnisse können wiederum mit Modellen aus der Polymerphysik verglichen werden (z.B. Kompressibilität, Persistenzlängen) [Bohn et al. 2009].

Bisher sind keine Berichte vorhanden, die eine Darstellung von unmarkierten zellulären Strukturen mit Lokalisationsmikroskopie belegen. Jedoch konnte ein kürzlich veröffentlichter Bericht zeigen, dass bisher undetektierbare zelluläre Fluorophore mit Hilfe stimulierter Emission (STED) dargestellt werden können [Min et al. 2009]. Die Auflösung dieser Mikroskopie-Methode ist jedoch beugungsbegrenzt. In der hier vorliegenden Arbeit wurde Lokalisationsmikroskopie auch an unmarkierten Zellen realisiert und führte zur Auflösung von intrazellulären Strukturen im Bereich von $\lambda/10$ (~ 50 nm). Neben der erheblichen Verbesserung der Auflösung dieser autofluoreszenten Strukturen konnten nicht nur Membranstrukturen nachgewiesen werden, sondern auch zelluläre Objekte detektiert werden, die mit konventioneller Weitfeld-Fluoreszenzmikroskopie nicht nachweisbar sind [Kaufmann¹ et al. 2010]. Zusätzlich zeigten Beobachtungen mit unterschiedlichen Anregungswellenlängen eine Fluoreszenz-„Aktivierung“ von Molekülen. Die Fluoreszenz-Aktivierung beruht wahrscheinlich auf einer lichtinduzierten Konformationsänderung des Moleküls selbst oder eines benachbarten Moleküls, welches dessen Fluoreszenz unterdrückt [Kunz und Kunz 1985] [Voltti und Hassinen 1978]. Die meisten zellulären Autofluoreszenzen beruhen auf Proteinen die aromatische Aminosäuren enthalten (z.B. die reduzierte Form der Pyridinnukleotide (NAD(P)H), Flavine und Lipopigmente [Udenfried 1969] [Galeotti et al. 1970] [Benson et al. 1979] [Dayan und Wolman 1993]. Die Mehrheit dieser Proteine sind in den Mitochondrien und Lysosomen zu finden und ihre Anregungsmaxima sind meist im blauen und UV-Bereich des elektromagnetischen Spektrums [Monici 2005]. Die Versuche die kugelförmigen Objekte näher zu verifizieren waren nicht erfolgreich. Es liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei diesen zellulären Objekten um Liposome der Zelle handeln könnte. Weitere Untersuchungen sind nötig, um diese kugelförmigen Objekte genau zu identifizieren. Zahlreiche Anwendungen sind bekannt, die die Fluoreszenz der im Zytoplasma angesammelten Granula als diagnostisches Verfahren ausnutzen (z.B. Alterung

[Shimasaki et al. 1980] [Tsuchida et al. 1987], Krebs [Matsumoto 2001] [Shin et al. 2000] und Netzhautdegeneration [Stark et al. 1984]). Nach Identifikation dieser autofluoreszenten Strukturen könnten präzise und quantitative Auswertungen dieser Strukturen in zukünftigen Anwendungen als diagnostisches Werkzeug dienen.

Die Auflösung dieser intrazellulären Strukturen ermöglichte zudem über die Autofluoreszenz der Zelle eine „Drei-Farben“-Darstellung durch Kombination mit zwei spektral unterschiedlichen Fluorophor-konjugierten-Antikörpern. Die Autofluoreszenz kann hier als eine Art Gegenfärbung der Zelle genutzt werden.

Distanz- und Nachbarschaftsanalysen von Her2/neu

Nachdem systematisch die unterschiedlichen Kompartimente der Zelle untersucht wurden, kam es zur Zusammenstellung eines biologischen Antikörper-Systems für das in der aktuellen Brustkrebs-Forschung relevante Protein Her2/neu.

Dafür wurden mittels Immunfärbung die Her2/neu-Rezeptoren fluoreszent markiert. Mit Hilfe hochauflösender Mikroskopie sollte diese Methode neue Parameter für die Tumordiagnose und Therapiekontrolle festlegen, die es erlaubt, eine verbesserte Prognose zu stellen. Dieses Forschungsprojekt untersucht die Verteilung von Her2/neu-Rezeptoren auf der Plasmamembran unterschiedlicher Brustkrebszelllinien, um Rückschlüsse auf mögliche Protein-Cluster ziehen zu können.

Da eine Überexpression des Her2/neu-Proteins auf der Zelloberfläche mit einer schlechteren Prognose bei der Brustkrebsbehandlung korreliert [Slamon et al. 1987], wird versucht eine Aussage über die Rezeptorenanzahl, Rezeptorenverteilung, insbesondere Clusterbildung von Her2/neu-Rezeptoren unterschiedlicher Brustkrebszelllinien zu erhalten. Ein Vergleich unterschiedlich exprimierender Zelllinien wurde angestrebt und realisiert [Kaufmann² et al. 2010]. Die hier in der Doktorarbeit angewandte Mikroskopie, ermöglichte eine genauere Größenbestimmung der Cluster im Vergleich zu früheren Untersuchungen [Nagy et al. 1999] [Yang et al. 2007], sowie eine Abschätzung der Anzahl von Einzelproteinen innerhalb der vorliegenden Cluster.

Diese in Kapitel 3.15 dargestellten Ergebnisse sind vergleichbar mit früheren Studien, die mit unterschiedlichen Mikroskopie-Techniken durchgeführt wurden [Nagy et al. 1999] [Yang et al. 2007]. Algorithmen, basierend auf der Bestimmung der lokalen Dichte und der Distanzen zwischen den einzelnen detektierten Molekülen, ergaben neue Einblicke in das Her2/neu-Verteilungsmuster auf der Plasmamembran von Zellen eines gesunden Spenders und zweier verschiedener Brustkrebszelllinien. Die Algorithmen, die für die Analyse entwickelt wurden und zur Bestimmung der

Proteincluster (in diesem Fall die Her2/neu Rezeptoren) eingesetzt wurden, ergaben eine mittlere Cluster-Größe von 67 nm. Es zeigte sich, dass die Cluster-Größen unabhängig von den unterschiedlichen Zelllinien sind. Bei der Markierung verschiedener Antikörperepitope des gleichen Rezeptors konnte auch kein Unterschied festgestellt werden. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Beobachtungen von Nagy et al. 1999 [Nagy et al. 1999]. Sie zeigten, dass die Cluster-Größen unabhängig sowohl von der Gesamtzahl von Her2/neu-Proteine einer Zelle als auch von der Anzahl von Molekülen in einem einzigen Cluster sind.

Weitere Ergebnisse der Arbeit dokumentieren eine statistische Distanz-Analyse auf Einzel-Molekülebene, die als ein zusätzlicher Faktor für eine Diskriminierung der unterschiedlich verwendeten Zelllinien in bezug auf ihren Karyotyp und der Her2/neu-Expression auf der Plasmamembran zulässt.

Es wurden zwei Brustkrebs-Zelllinien verwendet, die aus dem Pleuralraum einer Frau stammen. Cal-51 besitzt einen gesunden Karyotyp mit einer normalen Kopienzahl des *Her2/neu*-Gens. Über die Expression von Her2/neu liegen bisher keine Daten vor. SKBr3 hingegen trägt eine Amplifikation des *Her2/neu*-Gens und überexprimiert daher die Her2/neu-Rezeptoren auf der Plasmamembran. Sie besitzt einen hypertriploiden Karyotyp. AG11132 sind gesunde menschliche Brustdrüsenepithel-Zellen, etabliert aus normalem Gewebe einer Brustverkleinerung. Diese gesunden Zellen wurden ausgewählt, um einen Vergleich mit den beiden Krebszelllinien ziehen zu können (Nullkontrolle).

Die Analysen für alle drei Zelltypen zeigten eine deutliche Häufung von kleinen Distanzen im Vergleich zu einer Zufallsverteilung mit gleicher Dichte (siehe Abbildung 46 b). Dieses Ergebnis ist ein zusätzliches Indiz für das Auftreten von Her2/neu-Proteinclustern. Außerdem erlaubt diese Analyse eine deutliche Differenzierung der drei Zelllinien hinsichtlich ihrer Distanzen zwischen den detektierten Molekülen. In AG11132 Zellen ist die Anzahl von Distanzen unter 100 nm um ein vielfaches geringer als in den beiden Brustkrebszelllinien. Dies zeigt, dass beide Krebszelllinien eine erhöhte Anzahl von Her2/neu-Rezeptoren besitzen.

Der Vergleich der detektierten Signale pro Cluster mit dem Cluster-Durchmesser zeigte eine höhere Dichte von Proteinen innerhalb eines Clusters in Krebszellen. Dieses Ergebnis bestätigt, dass der Durchmesser der Cluster unabhängig von der jeweiligen Zelllinie ist und steht somit im Einklang mit den vorherigen Ergebnissen.

Beide Ergebnisse zeigen aber auch, dass ein Unterschied zwischen den Zelllinien vor allem in der Dichte der Her2/neu-Proteine innerhalb eines Clusters beobachtet werden

kann. Hier werden nicht nur Unterschiede zwischen den gesunden Zellen und den Krebszellen aufgezeigt, sondern es konnte auch ein Unterschied zwischen Cal-51 und SKBR3 beobachtet werden. Die steigende Anzahl von *Her2/neu*-Genkopien korreliert meist mit einer erhöhten *Her2/neu*-Expression [Slamon et al. 1987] [Slamon et al. 1989] [Elledge et al. 1992]. Dies ist auch in der Häufung der kleineren Distanzen zwischen den *Her2/neu*-Proteinen zu erkennen.

Die pathologische Untersuchung von Cal-51, SKBR3 und AG11132 mit Herceptin auf Einzel-Zellniveau wird Gegenstand weiterer Untersuchungen sein und wird helfen die hier erforschten Ergebnisse näher zu charakterisieren. Es kann somit auch ein direkter Bezug zur medizinischen Diagnostik hergestellt werden.

Da die hier beschriebene Methode auf der Untersuchung von einzelnen Zellen beruht, könnte eine weitere Anwendung dieser Methode mit zirkulierenden Tumorzellen im Blut von Brustkrebspatienten sein [Pachmann et al. 2001] [Ring et al. 2004] [Pachmann² et al. 2005]. Auch hier wäre der direkte Bezug zu Patientenmaterial von enormer Bedeutung, um zu zeigen, dass die Lokalisationsmessungen von *Her2/neu*-Proteinen als ein zusätzlicher Faktor für neue Diagnoseansätze genutzt werden können. Die zirkulierenden Tumorzellen können nicht nur in vielen Stadien der Erkrankung erkannt werden, sondern sind auch nach einer Behandlung noch zu beobachten. Diese Zellen reagieren auf eine systemische Therapie und sind somit mit Brustkrebstumoren vergleichbar [Pachmann¹ et al. 2005].

Die Variabilität der *Her2/neu*-Rezeptor-Expression wird als ein wichtiger Faktor in der Prognose und Diagnose für Brustkrebs angesehen. Die genauere Charakterisierung der *Her2/neu*-Proteinverteilung in dieser Arbeit kann zum besseren Verständnis des biologischen Verhaltens von Membranproteinen beitragen, die bei der Krebsentstehung beteiligt sind.

Für einen ersten Einblick in die räumliche Anordnung der *Her*-Proteine wurden 3D Zwei-Farben-SPDM-Messungen durchgeführt. Es wurden dafür die *Her2/neu*-Proteine mit Alexa568® konjugierten Antikörpern und *Her3* mit Alexa488® konjugierten Antikörpern markiert. Die Messungen konnten zeigen, dass mit dieser Methode die Möglichkeit besteht, die Positionen und Ausdehnungen in alle drei Raumrichtungen der Protein-Cluster mit einer Genauigkeit von 25 nm zu bestimmen. In näherer Zukunft kann die Mehrfarben- und 3D-Lokalisationsmikroskopie in Kombination mit quantitativen Analysen zu einer klaren Darstellung der räumlichen Anordnung von Proteinen in morphologisch intakten Zellen beitragen.

Zusammenfassend konnte diese Studie zeigen, dass die Lokalisationsmikroskopie eine Charakterisierung der Expressionsmuster des Membranproteins Her2/neu ermöglicht. Diese Analyse erlaubt eine Differenzierung sowohl zwischen gesunden Brustzellen und Brustkrebszelllinien als auch zwischen verschiedenen Brustkrebszelllinien untereinander. Diese Diskriminierung hinsichtlich des Proteinverteilungsmusters kann neben den in der Medizin durchgeführten Herceptin-Tests und Fluoreszenz *in situ* Hybridisierungen ein unterstützender Parameter für die genauere Charakterisierung und Bestimmung des Her2/neu-Status eines Krebspatienten sein. Aufgrund der Korrelation des Her2/neu-Status mit einer schlechteren Prognose und Überlebenschance könnte diese Technik zu einer verbesserten Anpassung der Therapie von Krebspatienten führen.

Die in Kaufmann et al. 2010 [Kaufmann² et al. 2010] veröffentlichten Ergebnisse bestätigten die FACS-Analyse der Her2/neu-Rezeptorprotein-Expression. Hierfür wurden die Zellen nach dem selben Markierungsprotokoll gefärbt und anschließend hinsichtlich ihrer Fluoreszenzintensität, die auf die markierten Her2/neu-Rezeptoren zurückzuführen ist, untersucht. Es zeigte sich die stärkste Expression bei SKBr3, gefolgt von Cal-51 und AG11132. Diese mit FACS ermittelten Expressionsmuster der verschiedenen Zelltypen sind somit äquivalent zu den Ergebnissen der SPDM-Messungen. Die durch die SPDM-Messungen erhaltenen Daten und die damit durchgeführten Strukturanalysen erlauben im Gegensatz zur FACS-Analyse nicht nur eine Aussage hinsichtlich der Gesamtproteinexpression von Her2/neu auf den unterschiedlichen Zelllinien. Die durch Lokalisationsmikroskopie erreichte hohe Auflösung erlaubt daher neben einer detaillierten Charakterisierung der Her2/neu-Proteinverteilung auch eine statistische und quantitative Analyse der Proteinverteilung.

Des Weiteren konnte für die gesunden Brustzellen ein Expressionsmuster der phosphorylierten Her2/neu-Rezeptoren vor und nach Stimulation mit Neuregulin-1 (NRG-1) erstellt werden. Diese Stimulation erfolgte nicht direkt, da Her2/neu keinen direkten Liganden besitzt. Jedoch erfolgen durch Stimulation eines verwandten Her-Rezeptors Dimerisierungsprozesse, die die Signalkaskade in Gang setzen [Citri et al. 2003]. Nach Stimulation war ein klarer Anstieg der phosphorylierten Her2/neu-Rezeptoren zu erkennen. Dieses Ergebnis entspricht den Erwartungen, da durch Stimulation der Tyrosinkinase-Rezeptoren die Signalweiterleitung in das Zellinnere über eine Autophosphorylierung dieser Rezeptoren verläuft. Dieser Versuch zeigte, dass die Möglichkeit besteht auch intrazelluläre Vorgänge einer Signalkaskade zu untersuchen.

Dabei können Veränderungen direkt mit dieser Art von Mikroskopie beobachtet werden.

Distanz- und Nachbarschaftsanalysen von Her3

Es wurden auch weiterführende Untersuchungen der zu der Familie der epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptoren (engl. epidermal growth factor receptor - EGFR) gehörigen Her3-Rezeptoren realisiert. Interessanterweise werden Heterodimere vor allem zwischen dem Liganden-freien Her2-Rezeptor und dem Kinase-defizienten Her3-Rezeptor ausgebildet [Citri et al. 2003]. Die Bildung der Heterodimere zeigt eine stark verlangsamte Dissoziation des Liganden, eine langsame Liganden-induzierte Endozytose, eine starke Ligandenbindung sowie eine starke Signalweiterleitung im Vergleich zu nicht-Her2 enthaltenden Dimeren. Folglich generieren Her2-Her3-Dimere lang andauernde potente Signale, die die Aktivierung des MAPK-Signalwegs verstärken. Man nimmt an, dass die Her2-spezifischen Therapien (z.B. Herceptin) auf die Blockierung dieser Her2-Her3 Dimeren beruhen [Yarden 2001].

Als erster Versuch wurde hier das Expressionsmuster der Her3-Rezeptoren auf den unterschiedlichen Zelllinien untersucht. Der Vergleich dokumentiert die höchste Her3-Rezeptor Expression bei den gesunden Brustzellen, eine mittlere Expressionsrate bei Cal-51 und den niedrigsten Expressionswert für SKBr3. Die Vermutung liegt nah, dass SKBr3 aufgrund der hohen Anzahl von Her2/neu-Rezeptoren die Expression der verwandten Rezeptoren der EGFR-Familie (wie z.B. Her3) herabsetzt. Um dies bestätigen zu können, müssen noch Expressions-Untersuchungen anhand von SPDM-Messungen mit Her1 und Her4 bewerkstelligt werden.

Weiterhin wurden Ansätze erprobt, die anhand einer Distanzanalyse das Her3-Expressionsmuster von nicht aktivierten Zellen und Liganden-aktivierten Zellen vergleicht und gegebenenfalls Veränderungen erkennen lässt. Es wurden nur die gesunden Zellen (AG11132) aus der Brustbiopsie hinsichtlich des Expressionsmusters der Her3-Rezeptoren vor und nach Stimulation mit Neuregulin-1 untersucht. Die Ergebnisse zeigten einen Anstieg und eine Vergrößerung der Her3-Cluster. Dies ist konform zu elektronenmikroskopischen Untersuchungen, die 2007 von Yang et al. publiziert wurden [Yang et al. 2007] Man kann zeigen, dass die SPDM-Lokalisationsmikroskopie eine vergleichbare Leistung wie die Elektronenmikroskopie aufweist. Ein Vorteil der Lokalisationsmikroskopie liegt jedoch in der vereinfachten Anfertigung von Präparaten. Die Analysen der beiden Brustkrebs-Zelllinien (Cal-51 und SKBr3) sind Projekte für die weiterführende Forschung.

Mehrfarbenansätze für Her2/neu und Her3

Zusätzlich wurden noch Zweifarben-Kolokalisationsexperimente der Proteinverteilungen (Doppelmarkierungen von Her2/neu – Rezeptoren über ein extra- und intrazelluläres Epitop sowie unterschiedliche spektrale Markierung von Her2/neu-Rezeptoren + Her3-Rezeptoren) durchgeführt. Der Zweifarbenansatz sollte aufgrund von Kolokalisationen der Antikörper zum einen eine verbesserte quantitative Bestimmung der Clustergrößen ermöglichen und zum anderen unspezifische Bindungen des Antikörpers detektieren und eliminieren.

Erste Ergebnisse zeigten noch unzureichende Fluoreszenzausbeuten bei beiden Markierungen (Her2-Alexa568[®] und Her3-Alexa488[®]) und somit konnten nicht viele Kolokalisationen detektiert werden. Hierzu müssen weitere Experimente zur Verifikation realisiert werden, die eine verbesserte Markierungseffizienz aufweisen. Die daraus resultierende höhere Fluoreszenzausbeute könnte dann zu eindeutigen Kolokalisationen der beiden spektral unterschiedlich markierten Antikörperepitope führen. Es müssen auch sterische Hinderungen beachtet und umgangen werden, damit überhaupt überlappende Fluoreszenzsignale beobachtet werden können.

Das Einfarben-Experiment mit unterschiedlichen Epitop-Markierungen eines Her2/neu-Rezeptors ist ein Ansatz für weiterführende Untersuchungen. Die Mehrfachmarkierung ermöglicht eine starke Erhöhung der Fluoreszenzausbeute und somit eine verbesserte Detektion der einzelnen Cluster.

PNA-COMBO-FISH in Kombination mit Lokalisationsmikroskopie

Abschließend konnte anhand der einzelnen Alexa488[®] markierten PNA-Oligomersequenzen für das Zentromer 9 gezeigt werden, dass die hochauflösende Lokalisationsmikroskopie prinzipiell auch mit COMBO-FISH-Sonden verwirklicht werden kann, um eine effektive optische Auflösung in biologischen Präparaten bis zu einigen wenigen Nanometern zu erreichen. Dafür müssen jedoch neben den für die Lokalisationsmikroskopie geeigneten Farbstoffen auch SONDENSETS mit verbesserter Fluoreszenzintensität verwendet werden. Anhand der Zentromer 9 PNA-Sonde konnte gezeigt werden, dass Lokalisationsmikroskopie prinzipiell mit dieser Art von Sonden durchführbar ist. Diese Sonde erreicht die Steigerung der Fluoreszenzintensität dadurch, dass sich die einfach-markierte Sonde repetitiv in die Zentromerregion von Chromosom 9 anlagert und somit eine hohe Fluoreszenzausbeute bei der Detektion mittels Lokalisationsmikroskopie erlaubt.

Sind diese Voraussetzungen erfüllt, kann man die COMBO-FISH-Signale durch die erhaltenen Lokalisationsgenauigkeiten der SPDM-Messungen von den Hintergrundsignalen, die zum Teil auf Autofluoreszenz und unspezifischer Bindung der PNA-Sonde beruhen klar diskriminieren. Darüber hinaus zeigte die Einzelmolekül-Detektion von diesen COMBO-FISH-Markierungen, dass es möglich ist, eine quantitative Analyse von Chromatin-Nanostrukturen innerhalb von Gendomanen oder Gen-Subregionen durchzuführen [Müller¹ et al. 2010]. So konnte in Weiland et al. 2010 ein erstes Beispiel gezeigt werden, dass anhand von Standard-FISH-Markierungen eine Analyse der räumlichen Anordnung von spezifischen DNA-Sequenzen in humanen Zellkernen möglich ist [Weiland et al. 2010]. Diese Erkenntnisse eröffnen neue Perspektiven für die Untersuchung von strukturabhängigen Genomfunktionen oder Fehlfunktionen.

Aufgrund der ungeeigneten Farbstoffe der *Her2/neu* (Oregon Green488[®]) und *GRB7* (TexasRed[®]) PNA-COMBO-FISH-Sondensets für Lokalisationsmikroskopie und der geringen Fluoreszenzintensität der Sondensets konnten in dieser Arbeit keine SPDM-Messungen für diese beiden Onkogene durchgeführt werden. Auf Basis dieser Ergebnisse werden fortführende Versuche im Rahmen eines BMBF-Projektes erfolgen, die eine erfolgreiche Kombination dieser beiden Methoden ermöglicht.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sowohl die Kombination von Immunfärbung mit hochauflösender Lokalisationsmikroskopie als auch die Kombination von PNA-COMBO-FISH mit hochauflösender Lokalisationsmikroskopie zukünftig weitere Verfeinerung für die medizinische Diagnostik festlegen können, die es beispielsweise erlauben, eine verbesserte Prognose zum Therapieerfolg zu geben.

VIII) Literaturverzeichnis

[Abbe 1873]

Abbe E (1873) Beitrage zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung. Archiv f. mikroskopische Anatomie 9, 411 - 468.

[Akiyama et al. 1986]

Akiyama T, Sudo C, Ogawara H, Toyoshima K, Yamamoto T (1986) The product of the human c-erbB2 gene: a 185-kilodalton glycoprotein with tyrosine kinase activity. Science 232, 1644 - 1646

[Albanell und Baselga 1999]

Albanell J, Baselga J (1999) The ErbB receptors as targets for breast cancer therapy. J. Mammary Gland Biol. Neoplasia. 4, 337-351.

[Alberts et al. 1999]

Alberts B, Bray D, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (1999) Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie (Der „kleine“ Alberts); WILEY-VCH; Weinheim 1999

[Albrecht et al. 2002]

Albrecht B, Failla A V, Schweitzer A, Cremer C (2002) Spatially modulated illumination microscopy allows axial distance re-resolution in the nanometer range. Appl. Opt. 41(1)

[Aldinger 1993]

Aldinger K (1993) http://www.kip.uni-heidelberg.de/AG_Cremer/mol_label.html

[Amberger 2008]

Dipl. Phys. Amberger R (2008) Hochauflösende multispektrale Fluoreszenzmikroskopie mit lateralen stehenden Wellen. PhD thesis, Fakultät für Physik und Astronomie, Universität Heidelberg

[Bacus et al. 2002]

Bacus S S, Altomare D A, Lyass L, Chin D M, Farrell M P, Gurova K, Gudkov A, Testa J R (2002) AKT2 is frequently upregulated in HER-2/neu-positive breast cancers and may contribute to tumor aggressiveness by enhancing cell survival. Oncogene 21, 3532-3540.

[Bailey et al. 1993]

Bailey B, Farkas D L, Taylor D L, Lanni F (1993) Enhancement of axial resolution in fluorescence microscopy by standing-wave excitation. Nature. 366: 44 – 48.

[Bartram 2007]

Dipl. Biol. Bartram C (2007) Hochpräzisionsgrößenmessung und Bestimmung der Topologie subchromosomaler Domänen nach molekularer Markierung unter Berücksichtigung des Einflusses der Zellfixierung. PhD thesis, Fakultät für Biowissenschaften, Universität Heidelberg

[Benson et al. 1979]

Benson R C, Meyer R A, Zaruba M E, McKhann G M (1979) Cellular autofluorescence – Is it due to flavins? J. Histochem. Cytochem 27, 44-48.

[Betzig et al. 2006]

Betzig E, Patterson G H, Sougrat R, Lindwasser O W, Olenych S, Bonifacino J S, Davidson M W, Lippincott-Schwartz J, Hess H F (2006) Imaging Intracellular Fluorescent Proteins at Nanometer Resolution. *Science* 313(5793): 1642 –1645

[Bohn et al. 2010]

Bohn M, Diesinger P, Kaufmann R, Weiland Y, Müller P, Gunkel M, von Ketteler A, Lemmer P, Hausmann M, Heermann DW, Cremer C (2010) Localization microscopy reveals expression-dependent parameters of chromatin nanostructure. *Biophys. J.* 99: 1358-1367

[Bornfleth et al. 1998]

Bornfleth H, Sätzler E H K, Eils R, Cremer C (1998) High-precision distance measurements and volumeconserving segmentation of objects near and below the resolution limit in three-dimensional confocal fluorescence microscopy. *Journal of Microscopy* 189(2): 118 – 136

[Braasch und Corey 2001]

Braasch D A, Corey D R (2001) Synthesis, Analysis, Purification, and Intracellular Delivery of Peptide Nucleic Acids. *Methods* 23: 97 - 107

[Brackenhoff et al. 1985]

Brackenhoff G J, van der Voort H T M, van Spronson E A, Linnemans W A M, Nanninga N (1985) Three dimensional chromatin distribution in neuroblastoma nuclei shown by confocal scanning laser microscopy. *Nature*, 317: 748 - 749

[Brustkrebsmagazin 2009]

www.mammamia-online.de/MMSpezialBuch.pdf, Spezial Ausgabe 2009

[Campbell 1997]

Campbell N A (1997), Akademischer Verlag Heidelberg · Berlin · Oxford; 1. Korrigierter Nachdruck 1998

[Carlson et al. 1985]

Carlson K, Danielsson P, Lenz R, Liljeborg A, Majlof L, Aslund N (1985) Three dimensional microscopy using a confocal laser scanning microscope; *Optical Letters*, 10: 53-55

[Chen et al. 2000]

Chen C, Wu B, Wie T, Egholm M, Strauss W M (2000) Unique chromosome identification and sequence-specific structural analysis with short PNA oligomers. *Mammalian Genome* 11: 384 - 391

[Citri et al. 2003]

Citri A, Skaria K B, Yarden Y (2003) The deaf and the dumb : the biology of ErbB-2 and ErbB-3. *Experim. Cell Research* 284: 54 - 65

[Condon 1926]

Condon E U (1926) A theory of Intensity Distribution in Band Systems. *Phys. Rev.* 28: 1182 – 1201

[Condon 1928]

Condon E U (1928) Nuclear Motions Associated with Electron Transitions in Diatomic Molecules. Phys. Rev. 32: 858 - 872

[Coussens et al. 1985]

Coussens L, Yang-Feng T L, Liao Y C, Chen E, Gray A, McGrath J, Seeburg P H, Libermann T A, Schlessinger J, Francke U, Levinson A, Ullrich A (1985) Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. Science 230, 1132-1139

[Cremer 1971]

Cremer C (1971) 4 Pi, Patentschrift DE000002116521A

[Cremer¹ et al. 1988]

Cremer T, Lichter P, Borden J, Ward D C, Manuelidis L (1988) Detection of chromosome aberrations in metaphase and interphase tumor cells by in situ hybridization using chromosome-specific library probes. Hum. Genet. 80, 235-246

[Cremer² et al. 1988]

Cremer T, Tesin D, Hopman A H, Manuelidis L (1988) Rapid interphase and metaphase assessment of specific chromosomal changes in neuroectodermal tumor cells by in situ hybridization with chemically modified DNA probes. Exp. Cell. Res. 176, 199-220

[Cremer et al. 1996]

Cremer C, Hausmann M, Bradl J, Rinke B. (1996) Verfahren zur multispektralen Präzisionsdistanz-messung in biologischen Mikroobjekten. Patentschrift DE 196 54 824.1 eingereicht beim Deutschen Patentamt München am 23. 12. 1996 (Priorität für EP 0 946 855 B1)

[Cremer et al. 1999]

Cremer C, Edelmann P, Bornfleth H, Kreth G, Muench H, Luz H, Hausmann M (1999) Principles of Spectral Precision Distance Confocal Microscopy for the Analysis of Molecular Nuclear Structure. In: Handbook of Computer Vision and Applications (ed. B. Jähne, H. Haußecker, P. Geißler), Vol. 3, Academic Press San Diego, New York: 839 - 857

[Cremer et al. 2010]

Cremer C, von Ketteler A, Lemmer P, Kaufmann R, Weiland Y, Müller P, Hausmann M, Gunkel M, Ruckelshausen T, Baddeley D, Amberger R (2010) Far field fluorescence microscopy of cellular structures at molecular optical resolution. In: Nanoscopy and Multidimensional Optical Fluorescence Microscopy (Ed.: Diasporo A), Taylor and Francis

[Cremer und Cremer 1978]

Cremer C und Cremer T (1978) Considerations on a laser-scanning-microscope with high resolution and depth of field. In: Microscopica Acta 81 (1): 31 – 44

[Cremer und Cremer 2006]

Cremer T und Cremer C (2006) Rise, fall and resurrection of chromosome territories: a historical perspective Part I. The rise of chromosome territories. European Journal of Histochemistry 50 (3): 161 - 176

[Dauber et al. 2010]

Dauber M, Müller P, Hausmann M, Schnölzer M, Hoheisel J D, Jacob A (2010) PNA synthesis and parallel purification in microwell plates for biological applications. *Nucl. Acid Res.* (eingereicht)

[Däubner et al. 2010]

Däubner T, Fink A, Seitz A, Tenzer S, Müller J, Strand D, Seckert C K, Janssen C, Renzaho A, Grzimek N K, Simon C O, Ebert S, Reddehase M J, Oehrlein-Karpi S A, Lemmermann N A (2010) A novel transmembrane domain mediating retention of a highly motile herpesvirus glycoprotein in the endoplasmic reticulum. *J. Gen. Virol.* 91: 1524 - 1534

[Davidovits und Egger 1969]

Davidovits P, Egger M D (1969) Scanning laser microscope. *Nature* 223(208): 831

[Dayan und Wolman 1993]

Dayan D, Wolman M (1993) Lipids pigments. *Prog. Histochem. Cytochem* 25: 1-75

[Demidov et al. 1994]

Demidov V V, Potaman V N, Frank-Kamenetskii M D, Egholm M, Burchardt O, Sönnichsen S H, Nielsen P E (1994) Stability of peptide nucleic acids in human serum and cellular extracts. *Biochem. Pharmacol.* 48 (6): 1310 - 1313

[Egholm¹ et al. 1992]

Egholm M, Burchardt O, Nielsen P E, Breg E H (1992) Oligonucleotide analogues with an achiral peptide backbone. *J. Am. Chem. Soc.* 114: 1895 - 1897

[Egholm² et al. 1992]

Egholm M, Burchardt O, Nielsen P E, Breg E H (1992) Recognition of guanine and adenine in DNA by cytosine and thymine containing peptide nucleic acids (PNA). *J. Am. Chem. Soc.* 114: 9677 - 1978

[Egholm et al. 1993]

Egholm M, Burchardt O, Christensen L, Behrens C, Freier S, Driver D A, Berg R H, Kim S K, Norden P E, Nielsen P E (1993) PNA hybridizes to complementary oligonucleotides obeying the Watson-Crick hydrogen bonding rules. *Nature*, 365: 566 - 568

[Egger und Petran 1967]

Egger M D, Petran M (1967) New reflected-light microscope for viewing unstained brain and ganglion cells. *Science* 157(786): 305 - 307

[Elledge et al. 1992]

Elledge R M, McGuire W L, Osborne C K (1992) Prognostic factors in breast cancer. *Semin. Oncol.* Jun; 19(3): 244-53

[Eriksson und Nielsen¹ 1996]

Eriksson M, Nielsen P E (1996) Solution structure of a peptide nucleic acid-DNA duplex. *Nat. Struct. Biol.* 3 (5): 410 - 413

[Eriksson und Nielsen² 1996]

Eriksson M, Nielsen P E (1996) PNA-nucleic acid complexes: Structure, stability and dynamics. *Q. Rev. Biophys.* 29: 369 - 394.

[Esa et al. 2000]

Esa, A et al. (2000) Three-dimensional spectral precision distance microscopy of chromatin nanostructures after triple-colour DNA labelling: a study of the BCR region on chromosome 22 and the Philadelphia chromosome. *Journal of Microscopy* 199(2): 96 – 105

[Filichev und Pedersen 2005]

Filichev V V, Pedersen E B (2005) Stable and selective formation of Hoogsteen-type triplexes and duplexes using twisted intercalating nucleic acids (TINA) prepared via postsynthetic Sonogashira solid-phase coupling reactions. *J. Am. Chem. Soc.* 127: 14849 – 14858

[Filichev et al. 2006]

Filichev V V, Gaber H, Olsen T R, Jorgensen P T, Jessen C H, Pedersen E B (2006) Twisted intercalating nucleic acids – intercalator influence on parallel triplex stabilities. *Eur. J. Organic Chem.*: 3960 – 3968

[Fisher et al. 1993]

Fisher T L, Terhorst T, Cao X, Wagner R W (1993) Intracellular disposition and metabolism of fluorescently-labeled unmodified and modified oligonucleotides microinjected into mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 21: 3857 – 3865

[Franck 1926]

Franck J (1926) Elementary processes of photochemical reactions. *Trans. Faraday Soc.* 21: 536 - 542

[Galeotti et al. 1970]

Galeotti T, Van Rossum G D V, Mayer D H, Chance B (1970) On the fluorescence of NAD(P)H in whole cell preparations of tumors and normal tissues. *Eur. J. Biochem.* 17: 485 - 596.

[Gildea et al. 1998]

Gildea B D, Casey S, Mac Neill J, Perry O, Keefe H, Sørensen D, Coull J M (1998) *Tetrahedron Lett.* 39 (40): 7255 - 7258

[Grossmann et al. 2010]

Grossmann C, Schwarz-Finsterle J, Schmitt E, Birk U, Hildenbrand G, Cremer C, Trakhtenbrot L, Hausmann M (2010) Variations of the spatial fluorescence distribution in ABL gene chromatin domains measured in blood cell nuclei by SMI microscopy after COMBO – FISH labelling. *Microsc. Sci. Technol. Appl. Educ.* (in Druck)

[Gunkel et al. 2009]

Gunkel M, Erdel F, Rippe K, Lemmer P, Kaufmann R, Hörmann C, Amberger R, Cremer C (2009) Dual color localization microscopy of cellular nanostructures. *Biotechnol. J.* (4): 927 – 938

[Gunkel et al. 2010]

Gunkel M, Kaufmann R, Pres S, Geiger F, Degenhard S, Müller P, Hausmann M, Lemmer P, Weiland Y, Lemmermann N A W, Holtappels R, Strickfaden H, Cremer T, Wege C, Cremer C (2010) Superresolution Imaging of Biological Nanostructures by Spectral Precision Distance Microscopy (SPDM). *Nature Protocols* (eingereicht)

[Gustafsson et al. 1999]

Gustafsson M G L, Agard D A, Sedat J W (1999) I5M: 3D widefield light microscopy with better than 100 nm axial resolution. *J. Microsc.* 195: 10–16

[Hausmann et al. 2003]

Hausmann M, Winkler R, Hildenbrand G, Finsterle J, Weisel A, Rapp A, Schmitt E, Janz S, Cremer C (2003) COMBO-FISH: specific labelling of nondenatured chromatin targets by computer-selected DNA oligonucleotide probe combinations. *Biotechniques* 35: 564 – 577

[Hausmann et al. 2005]

Hausmann M, Hildenbrand G, Schwarz-Finsterle J, Spöri U, Schneider H, Schmitt E, Cremer C (2005) New technologies measure genome domains – high resolution microscopy and novel labeling procedures enable 3-D studies of the functional architecture of gene domains in cell nuclei. *Biophotonics Int.* 12(10): 34 – 37

[Heilemann et al. 2008]

Heilemann M, van der Linde S, Schüttpelz M, Kasper R, Seefeldt B, Mukherjee A, Tinnefeld P, Sauer M (2008) Subdiffraction-resolution fluorescence imaging with conventional fluorescent probes. *Angew. Chem.* 47: 6172 – 6176

[Heintzmann und Cremer 1999]

Heintzmann R, Cremer, C (1999) Lateral modulated excitation microscopy: Improvement of resolution by using a diffraction grating, "Proc. SPIE 356: 185 - 196

[Heldin 1995]

Heldin C H (1995) Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell* 80: 213-223

[Hell 1991]

Hell S W (1991) Double confocal microscope. Europäische Patentschrift EP 0491289

[Hell und Stelzer 1992]

Hell, S W, Stelzer E H K (1992) Fundamental improvement of resolution with a 4Pi-confocal fluorescence microscope using two-photon excitation. *Opt. Commun.* 93: 277 – 282

[Hell et al. 1994]

Hell S, Lindek S, Cremer C, Stelzer E H K (1994) Measurement of the 4pi-confocal point spread function proves 75 nm axial resolution. *Appl. Physics Lett.* 64: 1335 – 1337

[Hell und Wichmann 1994]

Hell S W, Wichmann J (1994) Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated emission depletion microscopy. *Opt. Lett.* 19: 780 – 782

[Hepperger et al. 2007]

Hepperger C, Otten S, von Hase J, Dietzel S (2007) Preservation of large-scale chromatin structure in FISH experiments. *Chromosoma* 116: 117 – 133

[Hess et al. 2006]

Hess S, Girirajan T, Mason M (2006) Ultra-High Resolution Imaging by Fluorescence Photoactivation Localization Microscopy. *Biophysical Journal* 91(11): 4258 - 4272

[Hildenbrand et al. 2005]

Hildenbrand G, Rapp A, Spöri U, Wagner C, Cremer C, Hausmann M (2005) Nano-sizing of specific gene domains in intact human cell nuclei by Spatially Modulated Illumination (SMI) light microscopy. *Biophys. J.* 88: 4312 – 4318

[Holtappels et al. 2002]

Holtappels R, Thomas D, Podlech J, Reddehase M J (2002) Two antigenic peptides from genes m123 and m164 of murine cytomegalovirus quantitatively dominate CD8 T-cell memory in the H-2d haplotype. *J. Virol.* 76: 151 - 164

[Hyrup und Nielsen 1996]

Hyrup B, Nielsen P E (1996) Peptide nucleic acids (PNA): synthesis, properties and potential applications. *Bioorg. Med. Chem.* 4: 5 - 23

[IBA, Göttingen, Deutschland]

www.magnet-assisted-transfection.com

[Invitrogen, Carlsbad, USA]

www.invitrogen.com

[Jablonski 1935]

Jablonski A (1935) Über den Mechanismus der Photolumineszenz von Farbstoffphosphoren. *Zeitschrift für Physica* 94: 38 – 46

[John et al. 1969]

John H A, Birnstiel M L, Jones K W (1969) RNA-DNA hybrids at the cytological level. *Nature.* Aug 9; 223(206): 582-587

[Kaufmann et al. 2009]

Kaufmann R, Lemmer P, Gunkel M, Weiland Y, Müller P, Hausmann M, Baddeley D, Amberger R, Cremer C (2009) SPDM – Single molecule superresolution of cellular nanostructures. *Proc. SPIE* 7185: 71850J1-71850J19 (DOI: 10.1117/12.809109)

[Kaufmann¹ et al. 2010]

Kaufmann R, Müller P, Hausmann M, Cremer C (2010) Imaging label-free intracellular structures by localisation microscopy. *Micron*: (doi: 10.1016/j.micron.2010.03.006)

[Kaufmann² et al. 2010]

Kaufmann R, Müller P, Hildenbrand G, Hausmann M, Cremer C (2010) Analysis of Her2/neu membrane protein clusters in different types of breast cancer cells using localization microscopy. *J. Microsc.*: doi: 10.1111/j.1365-2818.2010.03436.x

[Kaufmann 2011]

Dipl. Phys. Kaufmann R (2011) PhD thesis, Fakultät für Physik und Astronomie, Universität Heidelberg (in Bearbeitung)

[Kauraniemi et al. 2001]

Kauraniemi P, Barlund M, Monni O, Kallioniemi A (2001) New amplified and highly expressed genes discovered in the ERBB2 amplicon in breast cancer by cDNA microarrays. *Cancer Res.* 61: 8235 - 8240

[Kauraniemi et al. 2003]

Kauraniemi P, Kuukasjarvi T, Sauter G, Kallioniemi A (2003) Amplification of a 280-kilobase core region at the ERBB2 locus leads to activation of two hypothetical proteins in breast cancer. *Am. J. Pathol.* 163: 1979 – 1984

[Kauraniemi und Kallioniemi 2006]

Kauraniemi P, Kallioniemi A (2006) Activation of multiple cancer-associated genes at the ERBB2 amplicon in breast cancer. *Endocrine Relat. Cancer* 13(1): 39 - 49

[Kern 2006]

Kern R, Cell biology trading, www.ais2.com

[King et al. 1985]

King C R, Kraus M H, Aaronson S A (1985) Amplification of a novel v-erbB-related gene in a human mammary carcinoma. *Science* 229 : 974-976

[Klar et al. 2000]

Klar T A, Jakobs S, Dyba M, Egner A, Hell S W (2000) Fluorescence microscopy with diffraction resolution limit broken by stimulated emission. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 8206 – 8210

[Knoch 2002]

Dipl. Phys. Knoch T A (2002) Approaching the 3D organization of the human cell nucleus. PhD thesis, Fakultät für Physik und Astronomie, Universität Heidelberg

[Koppelhus und Nielsen 2003]

Koppelhus U, Nielsen P E (2003) Cellular delivery of peptide nucleic acid (PNA). *Adv. Drug. Rev.* 55 (2): 267 - 280

[Kunz und Kunz 1985]

Kunz W S, Kunz W, (1985) Contribution of different enzymes to flavoprotein fluorescence of isolated rat liver mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta.* 841: 237-246.

[Lawrence et al. 1988]

Lawrence J B, Villnave C A, Singer R H (1988) Sensitive, high-resolution chromatin and chromosome mapping in situ: presence and orientation of two closely integrated copies of EBV in a lymphoma line. *Cell* 52: 51-61

[Lemmer et al. 2008]

Lemmer P, Gunkel M, Baddeley D, Kaufmann R, Urich A, Weiland Y, Reymann J, Müller P, Hausmann M, Cremer C (2008) SPDM – light microscopy with single molecule resolution at the nanoscale. *Appl. Phys. B* 93: 1-12 (DOI 10.1007/s00340-008-3152-x)

[Lemmer et al. 2009]

Lemmer P, Gunkel M, Weiland Y, Müller P, Baddeley D, Kaufmann R, Urich A, Eipel H, Amberger R, Hausmann M, Cremer C (2009) Using conventional fluorescent markers for far-field fluorescence localization nanoscopy allows resolution in the 10 nm range. *J. Microsc.* 235: 163-171

[Leijon et al. 1994]

Leijon M, Gräslund A, Nielsen P E, Buchardt O, Kristensen S M (1994) Structural characterization of PNA-DNA duplexes by NMR. Evidence for DNA in a B-like conformation. *Biochemistry* 33 (33): 9820-9825

[Lichter¹ et al. 1988]

Lichter P, Cremer T, Borden J, Manuelidis L, Ward D C (1988) Delineation of individual human chromosomes in metaphase and interphase cells by in situ suppression hybridization using recombinant DNA libraries. *Hum. Genet.* 80, 224-234

[Lichter² et al. 1988]

Lichter P, Cremer T, Tang C J, Watkins P C, Manuelidis L, Ward D C (1988) Rapid detection of human chromosome 21 aberrations by in situ hybridisation. *Proc. Nat. Acad. Sci., USA* 85, 9664-8

[Lindl 2002]

Lindl T (2002) *Zell- und Gewebekultur*. 5. überarbeitete Auflage, Heidelberg, Berlin, Spektrum Akad. Verlag 2002

[Luoh 2002]

Luoh S W (2002) Amplification and expression of genes from the 17q11 approximately q12 amplicon in breast cancer. *Cancer Genet. Cytogenet.* 136: 43 - 47

[Margolis et al. 1990]

Margolis B, Li N, Koch A, Mohammadi M, Hurwitz D R, Zilberstein A, Ullrich A, Pawson T, Schlessinger J (1990) The tyrosine phosphorylated carboxyterminus of the EGF receptor is a binding site for GAP and PLC-gamma. *EMBO J.* Dec; 9(13): 4375-80

[Matsumoto 2001]

Matsumoto Y (2001) Lipofuscin pigmentation in pleomorphic adenoma of the plate. *Oral surg. Oral Med. Oral Pathol.* 3: 299 - 302

[McAnaney et al. 2005]

McAnaney T B, Zeng W, Doe C F E, Bhanji N, Wakelin S, Pearson D S, Abbyad P, Shi X, Boxer S G, Bagshaw C R (2005) Protonation, Photobleaching, and Photoactivation of Yellow Fluorescent Protein(YFP 10C): A Unifying Mechanism. *Biochemistry* 44: 5510 – 5524

[Min et al. 2009]

Min W, Lu S, Chong S, Roy R, Holtom G R, Xie S(2009) Imaging chromophores with undetectable fluorescence by stimulated emission microscopy. *Nature* 461: 1105 – 1109

[Minsky 1961]

Minsky M (1961) *Microscopy Apparatus*. US Patent 3013467.

[Monici 2005]

Monici M (2005) Cell and tissue autofluorescence research and diagnostic applications. *Biotechnol. Annu. Rev.* 11: 227-256

[Moran et al. 1990]

Moran M F, Koch C A, Anderson D, Ellis C, England L, Martin G S, Pawson T (1990) Src homology region 2 domains direct protein-protein interactions in signal transduction. *Proc. Nat. Acad. Sci., USA* 87(21), 8622-6

[Müller¹ et al. 2010]

Müller P, Schmitt E, Jacob A, Hoheisel J, Kaufmann R, Cremer C, Hausmann M (2010) COMBO-FISH enables high precision localization microscopy as a prerequisite for nanostructure analysis of genome loci. *Int J. Molec. Sci.* 11: 4094 - 4105

[Müller² et al. 2010]

Müller P, Kaufmann R, Lemmermann N A W, Gunkel M, Hildenbrand G L, Peach D C, Holtappels R, Hausmann M, Cremer C (2010) Spatial distribution of a murine cytomegalovirus glycoprotein by SPDM localisation microscopy. *Histochemistry and Cell Biology* (eingereicht)

[Nagy et al. 1999]

Nagy P, Jenei A, Kirsch A K, Szöllosi J, Damjanovich S, Jovin T M (1999) Activation-dependent clustering of the erbB2 receptor tyrosine kinase detected by scanning near-field optical microscopy. *Journal of Cell Science* 112, 1733-1741

[Nielsen et al. 1991]

Nielsen P E, Egholm M, Berg R H, Buchardt O (1991) Sequence-selective recognition of dna by strand displacement with a thymine-substituted poyamide. *Science* 254: 1497 - 1500

[Nielsen et al. 1994]

Nielsen P E, Egholm M, Buchardt O (1994) Evidence for (PNA)₂ /DNA triplex structure upon binding of PNA to dsDNA by strand displacement. *J. Mol. Recog.* 7, 164–170

[Nielsen 1998]

Nielsen P E (1998) Structural and biological properties of peptide nucleic acid (PNA). *Pure & Appl. Chem.* 70 (1): 105-110

[Nielsen et al. 1999]

Nielsen P.E. (1999) Peptide nucleic acid. A molecule with two identities; *Acc. Chem. Res.* 32: 624 - 630

[Nielsen et al. 2001]

Nielsen P. E. (2001) Targetin double stranded DNA with peptide nucleic acid (PNA). *Curr. Med. Chem.* 8: 545 - 550

[Nolte et al. 2006]

Nolte O, Müller M, Häfner B, Knemeyer J-P, Stöhr K, Wolfrum J, Hakenbeck R, Denapaite D, Schwarz-Finsterle J, Stein S, Schmitt E, Cremer C, Herten D-P, Hausmann M, Sauer M (2006) Novel singly labelled probes for identification of microorganisms, detection of antibiotic resistance genes and mutations, and tumor diagnosis (SMART PROBES). In: *Biophotonics* (Ed.: Popp J, Strehle M) Wiley-VCH, Weinheim: 167 - 230

[Olympus 2010]

www.olympusmicro.com

[Pachmann et al. 2001]

Pachman K, Heiß P, Demel U, Tilz G (2001) Detection and enumeration of minimal numbers of circulating tumour cells in peripheral blood using Laser Scanning Cytometry. *Clin. Chem. Lab. Med.* 39: 811 – 817

[Pachmann¹ et al. 2005]

Pachmann K, Clement J H, Schneider C P, Willen B, Camara O, Pachmann U, Höffken K (2005) Standardized quantification of circulating peripheral tumor cells from lung and breast cancer Clin. Chem. Lab. Med. 43: 617 – 627

[Pachmann² et al. 2005]

Pachmann K, Camara O, Kavallaris A, Schneider U, Schünemann S, Höffken K (2005) Quantification of the response of circulating epithelial cells to neoadjuvant treatment for breast cancer: a new tool for therapy monitoring. Breast Cancer Research 7: 975 - 979

[Paramasivam et al. 2008]

Paramasivam M, Cogoi S, Filichev V V, Bomholt N, Pedersen E B, Xodo L E (2008) Purine twisted-intercalating nucleic acids: a new class of anti-gene molecules resistant to potassium-induced aggregation. Nucleic Acid Research 36 (10): 3494 – 3507

[Pardue und Gall 1969]

Pardue M L and Gall J G (1969) Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. Proc. Nat. Acad. Sci., USA 64, 600-604

[Patterson und Lippincott-Schwartz 2002]

Patterson G H, Lippincott-Schwartz J (2002) A photoactivatable GFP for selective photolabeling of proteins and cells. Science 297: 1873 - 1877

[Pawley 1989]

Pawley J B (1989) Handbook of biological confocal microscopy. © Plenum Press, New York 1989

[Pinkel et al. 1986]

Pinkel D, Straume T, Gray J W (1986) Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridisation. Proc. Nat. Acad. Sci., USA 83(9), 2934-2938

[Pinkel et al. 1988]

Pinkel D, Landegent J, Collins C, Fuscoe J, Segarves R, Lucas J, Gray J W (1988) Fluorescence in situ hybridization with human chromosome-specific libraries: Detection of trisomy 21 and translocation of chromosome 4. Proc. Nat. Acad. Sci., USA 85, 9138

[Ploem 1967]

Ploem J S (1967) The Use of a Vertical Illuminator with Interchangeable Dichroic Mirrors for Fluorescence Microscopy with Incident Light. Zeitschrift für wissenschaftliche Mikroskopie 68: 129 – 142

[Popescu et al. 1989]

Popescu N C, King C R, Kraus M H (1989) Localization of the human erbB-2 gene on normal and rearranged chromosomes 17 to bands q12-21.32. Genomics 4, 362-366

[QIAGEN, Hilden, Deutschland]

www.qiagen.com

[Rauch et al. 2000]

Rauch J, Wolf D, Hausmann M and Cremer C (2000) The influence of formamide on thermal denaturation profiles of dna and metaphase chromosomes in suspension. Zeitung für Naturforschung, 55c, 737-746

[Ratilainen et al. 2000]

Ratilainen T, Holmen A, Tuite E, Nielsen P E, Norden B (2000) Thermodynamics of sequence-specific binding of PNA to DNA. *Mamm. Genome* 39: 7781 - 7791

[Ray und Nordén 2000]

Ray A, Nordén B (2000) Peptide nucleic acid (PNA): its medical and biotechnical applications and promise for the future *FASEB* 14: 1041 - 1060

[Reymann et al. 2008]

Reymann J, Baddeley D, Gunkel M, Lemmer P, Stadter W, Jegou T, Rippe K, Cremer C, Birk U (2008) High-precision structural analysis of subnuclear complexes in fixed and live cells via spatially modulated illumination (SMI) microscopy. *Chromosome Research* 16(3): 367 – 382

[Ring et al . 2004]

Ring A, Smith I E, Dowsett M (2004) Circulating tumour cells in breast cancer. *The Lancet Oncology* 5: 79-88

[Robert Koch-Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister 2008]

Krebs in Deutschland 2003 – 2004 Häufigkeiten und Trends. Eine gemeinsame Veröffentlichung des Robert Koch-Instituts und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.; 6. überarbeitete Auflage, 2008

[Rust et al. 2006]

Rust M, Bates M, Zhuang X (2006) Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nature Methods* 3: 793 – 795

[Schechter et al. 1984]

Schechter A L, Stern D F, Vaidyanathan L, Decker S J, Drebin J A, Greene M I, Weinberg R A (1984) The neu oncogene: an erb-B-related gene encoding a 185,000-Mr tumour antigen. *Nature* 312, 513-516

[Schmitt und Hausmann 2003]

Schmitt E, Hausmann M (2003) Design of specific labelling probes for COMBO-FISH. 16th Heidelberg Cytometry Symposium, Heidelberg, 16. – 18. 10. 2003, Abstracts (ISSN 0949-5347)

[Schmitt et al. 2005]

Schmitt E, Hausmann M, Finsterle J, Stein S, Großmann C, Schneider H, Hildenbrand G, Rapp A, Cremer C (2005) COMBO-FISH: A new approach for specific labeling by computer selected DNA oligo-probe combinations. *Biophotonik Symposium*, Jena, 15. – 17. 3. 2005

[Schmitt¹ et al. 2010]

Schmitt E, Müller P, Stein S, Schwarz-Finsterle J, Hausmann M (2010) Cell nucleus architecture in health and medicine: Geometrical descriptors and their use in GRID based case studies. In: *Healthgrid Applications and Core technologies. Proceedings of HealthGrid 2010* (Eds: Solomonides T, Blanquer I, Breton V, Glatard T, Legré Y), *Studies in Health Technology and Informatics* 159: 272-276 (ISBN: 978-1-60750-582-2)

[Schmitt² et al. 2010]

Schmitt E, Schwarz-Finsterle J, Stein S, Boxler C, Müller P, Mokhir A, Krämer R, Cremer C, Hausmann M (2010) Combinatorial Oligo FISH: Directed labelling of specific genome domains in differentially fixed cell material and live cells. *Meth. Molec. Biol.* 659 (Part 2): 185 - 202

[Schneider et al. 2010]

Schneider U V, Mikkelsen N D, Jøhnk N, Okkels L M, Westh H, Lisby G (2010) Optimal design of parallel triplex forming oligonucleotides containing Twisted Intercalating Nucleic Acids-TINA. *Nucleic Acids Research* 38 (13): 4394 – 4403

[Schrader und Hell 1996]

Schrader M, Hell S W (1996) 4Pi-confocal images with axial superresolution. *J. Microsc.* 183: 189 – 193

[Schwarz-Finsterle et al. 2005]

Schwarz-Finsterle J, Stein S, Großmann C, Schmitt E, Schneider H, Trakhtenbrot L, Rechavi G, Amariglio N, Cremer C, Hausmann M (2005) COMBO-FISH for focussed fluorescence labelling of gene domains: 3D-analysis of the genome architecture of *abl* and *bcr* in human blood cells. *Cell Biol. Intern.* 29: 1038 – 1046

[Schwarz-Finsterle et al. 2006/2007]

Schwarz-Finsterle J, Stein S, Großmann C, Schmitt E, Trakhtenbrot L, Rechavi G, Amariglio N, Cremer C, Hausmann M (2006/2007) Comparison of triplehelical COMBO-FISH and standard FISH by means of quantitative microscopic image analysis of *abl/bcr* genome organisation. *J. Biophys. Biochem. Meth.* [epub (Sept. 2006)] 70: 397 – 406

[Shen und Guan 2004]

Shen T L, Guan J L (2004) Grb7 in intracellular signaling and its role in cell regulation. *Front Biosci.* 9: 192 - 200

[Shimasaki et al. 1980]

Shimasaki H, Ueta N, Privett O S (1980) Isolation and analysis of age-related fluorescent substances in rat testes. *Lipids* 15: 236 - 241

[Shin et al. 2000]

Shin S J, Kanomatra N, Rosen P P (2000) Mammary carcinoma with prominent cytoplasmic lipofuscin granules mimicking melanocytic differentiation. *Histopathology* 37: 456 – 459

[Sinnecker et al. 2005]

Sinnecker D, Voigt P, Hellwig N, Schaefer M (2005) Reversible Photobleaching of Enhanced Green Fluorescent Proteins. *Biochemistry* 44: 7085-7094

[Slamon et al. 1987]

Slamon D J, Clark G M, Wong S G, Levin W J, Ullrich A, McGuire W L (1987) Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* Jan 9; 235(4785): 177-82.

[Slamon et al. 1989]

Slamon D J, Godolphin W, Jones L A, Holt J A, Wong S G, Keith D E, Levin W J, Stuart S G, Udove J, Ullrich A (1989) Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer, *Science* May 12; 244(4905): 707-12

[Smith 2007]

Smith C (2007) Keeping tabs on fluorescent tags. *Nature Methods* 4: 755 – 761

[Solovei et al 2002]

Solovei I, Cavallo A, Schermelleh L, Jaunin F, Scasselati C, Cmarko D, Cremer C, Fakan S, Cremer T (2002) Spatial Preservation of Nuclear Chromatin Architecture during Three-Dimensional Fluorescence *in Situ* Hybridization (3D-FISH). *Experimental Cell Res.* 276: 10 - 23

[Spöri 2004]

Dipl. Phys. Spöri U. (2004) Messungen mit dem SMI-Mikroskop. PhD thesis, Fakultät für Physik und Astronomie, Universität Heidelberg

[Stark et al. 1984]

Stark W S, Miller G V, Itoku K A (1984) Calibration of microspectrophotometers as it applies to the detection of lipofuscin and blue- and yellow-emitting fluorophores *in situ*. *Methods Enzymol.* 105: 341 - 347

[Stein et al. 1994]

Stein D, Wu J, Fuqua S A, Roonprapunt C, Yajnik V, D'Eustachio P, Moskow J J, Buchberg A M, Osborne C K, Margolis B (1994) The SH2 domain protein GRB-7 is co-amplified, overexpressed and in a tight complex with HER2 in breast cancer. *EMBO J.* March 15; 13(6): 1331–1340

[Stern et al. 1986]

Stern D F, Heffernan P A, Weinberg R A (1986) p185, a product of the neu proto-oncogene, is a receptor-like protein associated with tyrosine kinase activity. *Molecular and Cellular Biology* 6, 1729-1740

[Stokes 1852]

Stokes G G (1852) On the change of refrangibility of light. *Phil. Trans. R. Soc. (London)* 142: 463 – 562

[Tomac et al. 1996]

Tomac S, Sarkar M, Ratilainen T, Wittung P, Nielsen P E, Nordén B, Gräslund A (1996) Ionic Effects on the Stability and Conformation of Peptide Nucleic Acid (PNA). *J. Am. Chem. Soc.* 118: 5544-5552.

[Tsuchida et al. 1987]

Tsuchida M, Miura T, Aibara K (1987) Lipofuscin and lipofuscin-like substances. *Chem. Phys. Lipids* 44: 297 - 325

[Udenfried 1969]

Udenfried S (1969) *Fluorescence Assay in Biology and Medicine*, Academic Press, New York / London 2: 491 - 492.

[van Oijen et al. 1998]

van Oijen A M, Köhler J, Schmidt J, Müller M, Brakenhoff G J (1998) 3-Dimensional super-resolution by spectrally selective imaging. *Chem. Physics Lett.* 192 (1): 182 - 187

[Vasquez und Glazer 2002]

Vasquez K M und Glazer P M (2002) Triplex-forming oligonucleotides: principles and applications. *Quarterly Reviews of Biophysics* 35 (1): 89 – 107

[Voltti und Hassinen 1978]

Voltti H, Hassinen I E, (1978) Oxidation-reduced midpoint potentials of mitochondria flavoproteins and their intramitochondrial localization. *J. Bioenerg. Biomem.* 10: 45 - 58.

[Vennström und Bishop 1982]

Vebbström B, Bishop J M (1982) Isolation and characterization of chicken DNA homologous to the two putative oncogenes of avian erythroblastosis virus. *Cell* 28(1): 135 - 143

[Warren und Landgraf 2006]

Warren C M, Landgraf R (2006) Signaling through ERBB receptors: multiple layers of diversity and control. *Cell Signal* 18: 923 – 933

[Weiland et al. 2010]

Weiland Y, Lemmer P, Cremer C (2010) Combining FISH with Localisation Microscopy: Superresolution Imaging of Nuclear Genome Nanostructures. *Chromosome Research* (in Druck)

[Weisshart et al. 2010]

Weisshart K, Krampert G, Novikau Y, Kempe M (2010) Strukturierte Beleuchtung in der Hochauflösungsmikroskopie. *Optik und Photonik, Wiley-VCH, Weinheim* 4(1): 40 - 45

[Winkler et al 2003]

Winkler R, Perner B, Rapp A, Durm M, Cremer C, Greulich KO, Hausmann M (2003) Labelling quality and chromosome morphology after low temperature FISH analysed by scanning far-field and scanning near-field optical microscopy. *J. Microsc.* 209: 23 – 33

[Wittung et al. 1995]

Wittung P, Kajanus J, Edwards K, Nielsen P E, Nordén B, Malmstom B G (1995) Phospholipid membrane permeability of peptide nucleic acids. *FEBS Lett.* 365 (1): 27 - 29

[Yang et al. 2007]

Yang S, Raymond-Stintz M A, Ying W, Zhang J, Lidke D S, Steinberg S L, Williams L, Oliver J M, Wilson B S (2007) Mapping ErbB receptors on breast cancer cell membranes during signal transduction. *J. Cell Sci.* 120: 2763 - 2773

[Yarden 2001]

Yarden Y (2001) Biology of HER2 and its Importance in Breast Cancer. *Oncology* 61: 1 - 13

[Yarden und Sliwkowski 2001]

Yarden Y, Sliwkowski M X (2001) Untangling the ErbB signalling network. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2: 127 - 137

IX) Abkürzungsverzeichnis

µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
°C	Grad Celcius
3D	dreidimensional
Abb.	Abbildung
abl	abelson murine leukemia
AK	Antikörper
APD	avalanche photodiode
Ar ⁺	Argon
ATCC	American Type Culture Collection
bcr	breakpoint cluster region
BAC	bacterial artificial chromosome
Bhoc	Benzhydrioxycarbonyl
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BRCA	breast cancer
BSA	bovine serum albumin
bzw.	Beziehungsweise
ca.	circa
c-erbB-2	cellular erythroplastic leukemia viral oncogene homologue 2
CCD	charged coupled device
CFP	cyan fluorescent protein
Chr.	Chromosom
CLSM	confocal laser scanning microscopy
CISH	chromogene <i>in situ</i> hybridisation
cm	Zentimeter
COMBO-FISH	Combinatorial-oligonucleotide fluorescence <i>in situ</i> hybridisation
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
d.h.	das heißt
dd H ₂ O	Destilliertes Wasser
DMEM	Dulbeccos modified eagle medium
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid

IX) Abkürzungsverzeichnis

DNA	Deoxyribonucleic acid
DG	Deckgläser
Dr.	Doktor
DSMZ	Deutsches Ressourcenzentrum für biologisches Material
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	epidermal growth factor receptors
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
Em	Emission
EM-CCD	Electron multiplying charge coupled device
Engl.	Englisch
ER	endoplasmatisches Retikulum
EtOH	Ethanol
Ex	Excitation
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FCS	Foetales Kälberserum
FISH	Fluorescence <i>in situ</i> hybridisation
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
Fmoc	Fluornyl-9-methyloxy-carbonyl
FPALM	fluorescence photoactivation localisation microscopy
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
g	Gramm
G2-Phase	Gap2-Phase
GRB7	growth factor receptor bound protein 7
GFP	green fluorescent protein
HATU	(O-(7-azabenzotriazol-1-yl)-1, 1, 3, 3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat)
H2B	Histonprotein 2B
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
Her2/neu	human epidermal growth factor receptor 2
H ₂ O	Wasser
HCl	Salzsäure
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie

Kb	Kilobase
KCl	Kaliumchlorid
KDF	Khoros data format
K_2HPO_4	Di-Kaliumhydrogenphosphat
KIP	Kirchhoff-Institut für Physik
Kr^+	Krypton
l	Liter
MALDI - TOF - MS	Matrix – assisted – laser – desorption / ionization – time – of – flight – mass – spectrometry
MATra	Magnet assisted transfection
Mb	Megabase
MCMV	Zytomegalievirus
med.	medizinisch
mg	Milligramm
$MgCl_2 \times 6H_2O$	Magnesiumchlorid-6-hydrat
MEGM	Mammary epithelial cell growth medium
Min.	Minuten
ml	Milliliter
Mm	Millimeter
mol	Mol
mRFP	monomeric red fluorescent protein
ms	Millisekunden
mW	Milliwatt
N	Normal
NA	Numerische Apertur
NaAc	Natriumacetat
NADP	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid- Phosphat
$NaHPO_4$	Natriumhydrogenphosphat
NCBI	National Center for Biotechnology Information
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
NRG-1	Neuregulin-1
OT	Objektträger
OTF	optical transfer function

PALM	photoactivated localisation microscopy
PBS	Phosphat buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
pg	Pikogramm
pH	Begriff leitet sich von pondus hydrogenii oder von potentia hydrogenii (lat. pondus = Gewicht; potentia = Kraft; hydrogenium = Wasserstoff) ab
PHA	Phytohaemagglutinin
PMT	Photomultiplier
PNA	Peptide nucleic acid
PSF	Point spread function
RNA	Ribonucleic acid
rpm	revolutions per minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumlaurylsulfat
sek.	Sekunden
siRNA	small interfering ribonucleic acid
SMI	Spatially modulated illumination
SPDM	Spectral precision distance / position determination microscopy
SSC	Saline-sodium citrate buffer
Std.	Stunde
STED	Stimulated emission depletion
STORM	stochastic optical reconstruction microscopy
Tab.	Tabelle
TAMRA	Tetramethylrhodamine
TINA	Twisted intercalating nucleic acid
T_m	Schmelztemperatur
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TRITC	Tetramethyl-Rhodamin-Isothiocyanat
t-RNA	transfer ribonucleic acid
UV	Ultraviolett
VIS	visible
YFP	yellow fluorescent protein
z.B.	zum Beispiel

X) Anhang**Materialliste:****Chemikalien**

2-Propanol	J.T. Baker, Deventer, NL
Agar	Fluka, Buchs, CH
Agarose	Cambrex, Rockland, USA
Ammoniak, 25%	VWR, Darmstadt
β -Mercaptoethanol	AppliChem, Darmstadt
BSA (Fraktion V)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Chromosomenmedium B mit PHA	Biochrom, Berlin
Colchecin (10 μ g/ml)	Sigma-Aldrich, Steinheim
DAPI	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	J.T. Baker, Deventer, NL
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (4.5 g/l D-Glucose)	Gibco, Karlsruhe
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (1.5 g/l D-Glucose)	Gibco, Karlsruhe
Dulbecco's PBS (D-PBS) w/o Ca^{2+} , Mg^{2+}	Gibco, Karlsruhe
Eisessig	J.T. Baker, Deventer, NL
Ethanol, absolut p.a.	J.T. Baker, Deventer, NL
FBS Superior	Biochrom, Berlin
Formamid	Merck, Darmstadt
Formamid, deionisiert (pH 7.0)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Gentamicin/Amphotericin (500x)	Invitrogen, Karlsruhe
Glycerin	J.T. Baker, Deventer, NL
HCl, 1N	Merck, Darmstadt
Immersöl 518F	Zeiss, Göttingen
Isoproterenol	Sigma-Aldrich, Steinheim
KCl	Merck, Darmstadt
L-Glutamin (200 mM)	Gibco, Karlsruhe
Mc Coy`s 5A	Invitrogen, Karlsruhe
Methanol	Merck, Darmstadt
$\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	AppliChem, Darmstadt
NaCl	J.T. Baker, Deventer, NL

X) Anhang (Materialliste)

NaOH, 1 N	J.T. Baker, Deventer, NL
Paraformaldehyd	Riedel-de Haën, Seelze
PBS, 10 x (pH 7.4)	Gibco, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml, 10000 µg/ml)	Gibco, Karlsruhe
ProLong®Gold Antifade Reagenz	Invitrogen, Karlsruhe
RPMI 1640 Medium	Gibco, Karlsruhe
Saponin	Serva, Heidelberg
SSC, 20 x (pH 7.0)	Invitrogen, Karlsruhe
TO-PRO-3-Iodid	Molecular Probes, Karlsruhe
Transferrin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Triton X-100	Merck, Darmstadt
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypsin/EDTA	Invitrogen, Karlsruhe
Tween 20	Carl Roth, Karlsruhe
Vectashield Antifade-Medium	Vector, Burlingame, USA
Versene	Invitrogen, Karlsruhe

Enzyme

Pepsin (3300 U/mg)	Sigma-Aldrich, Steinheim
RNase A	Sigma-Aldrich, Steinheim

Antikörper

primär

Maus anti-Human-Ki67 (Klon MIB-1)	DAKO, Dänemark
Maus anti-Her2/neu (extrazellulär - ExR)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ratte anti-Her2/neu (extrazellulär - ExC)	Abcam, Cambridge, UK
Ratte anti-Her2/neu (extrazellulär - ExD)	Abcam, Cambridge, UK
Hase anti-Her2/neu (intrazellulär – intraTR)	Merck, Darmstadt
Hase anti-Her2/neu (intrazellulär – intraP)	New England Biolabs
Hase anti-Her3 (extrazellulär – ExR3)	Abcam, Cambridge, UK

sekundär

Ziege anti-Maus-AlexaFluor®488	Molecular Probes, Karlsruhe
Ziege anti-Maus-AlexaFluor®568	Molecular Probes, Karlsruhe
Ziege anti-Ratte-AlexaFluor®488	Molecular Probes, Karlsruhe
Ziege anti-Hase-AlexaFluor®488	Molecular Probes, Karlsruhe

Ligand

Neuregulin-1 (NRG-1) Abcam, Cambridge, UK

Ausstattung**Geräte**

Autoklave 5075 EC	Systemec, Wettenberg
CO ₂ -Inkubator BC210	Binder, Tuttlingen
Feinwaage CP124S	Sartorius, Göttingen
Heizrührplatte MR2002	Heidolph, Schwabach
Hybridisierungskammer	Feinmechanik KIP
Inkubator BFED53	Binder, Tuttlingen
pH-Meter 765 Calimatic	Knick, Berlin
Pipettierhilfe neoAccupette®	neoLab, Heidelberg
Schüttler KS125 basic	IKA Labortechnik
Sicherheitswerkbank HeraSafe®	KS Kendro, Hanau
Speed Vac plus SC 110 A (Savant)	Thermo Scientific, Schwerte
Spülmaschine	Miele, Gütersloh
Thermomixer comfort 1.5 ml	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge MS 1 Minishaker	IKA Labortechnik
Universal Vakuum System plus (Savant)	Thermo Scientific, Schwerte
Wasserbad	Memmert, Schwabach
Zentrifugen Universal 320R	Hettich, Tuttlingen
Biofuge 28RS	Heraeus, Hanau

Arbeitsmaterial

Cot-1-DNA (1 mg/ml)	Invitrogen, Karlsruhe
Deckgläser Nr. 1.5 Ø 18x18 mm, 24x24 mm, 50x24 mm	Menzel Gläser, Braunschweig
Fixogum	Marabu, Tamm
FluoroDish Ø 35mm	WPI, Berlin
Färbekästen	neoLab, Heidelberg
Gewebekulturasche 25cm ² , 75cm ²	Nunc, Roskilde, DK
Gewebekulturplatte 6 Well, 9.6 cm ²	Greiner, Frickenhausen
Glas-Pasteurpipetten 230 mm, 150 mm	WU, Mainz
Glasware	Duran, Wertheim/Main
Kryoröhrchen 1.8 ml	Nunc, Wiesbaden

X) Anhang (Materialliste)

Objektträger SuperFrost® Plus	Menzel Gläser, Braunschweig
PE-Pasteurpipetten	α-laboratory, Hampshire, UK
Pipettenspitzen 0,5 µl, 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße 0.5 ml Safe-Lock	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße 1.5 ml Safe-Lock	Eppendorf, Hamburg
Serologische Pipetten 2 ml, 5 ml, 15 ml, 50 ml	Greiner, Frickenhausen
Sterilfilter 0.22 µm	Millipore, Cork, IRL
TetraSpeck™ Microspheres 0.1, 0.2, 0.5 µm	Invitrogen, Darmstadt
Zentrifugen-Röhrchen 15 ml, 50 ml	Greiner, Frickenhausen

Software

ImageJ (v 1.39t)	NIH, Bethesda, USA (http://rsbweb.nih.gov/ij/)
Matlab 7.0.1	The MathWorks, Natick, USA
Photoshop CS3 Extended	Adobe Systems, S. Jose, USA
Ultraview ERS	Perkin Elmer, Waltham, USA
Volocity 5.4	Perkin Elmer, Waltham, USA

kommerzielle Kits

OrganelleLights™ Plasmamembran-YFP	Invitrogen, Darmstadt
------------------------------------	-----------------------

Verschiedenes/Diverses

Pinzetten	
Parafilm-M	Pechiney Plastic Packaging
Nagellack	

Lösungen / Puffer

Blocklösung	3% BSA in PBS
DAPI-Lösung	1:10000 in PBS
DMEM	450 ml DMEM-Medium 50 ml FCS 5 ml Penicillin/Streptomycin 5 ml L-Glutamin
Fixativ (Metaphasen)	Methanol:Eisessig (3:1)
Fixativ (3D-FISH)	4 g PFA in 100 ml PBS (pH 7.4)

Formamid-Lösung	70ml Formamid 30 ml 2 x SSC (pH 7,0)
Lymphozyten-Einfriermedium	9 ml FCS 1 ml DMSO
Einfriermedium	5 % DMSO in entsprechendem Kulturmedium
Mc Coy 's 5A	400 ml Medium 100 ml FCS 5 ml Penicillin/Streptomycin
Pepsin-Stocklösung (10 %)	100 mg in 1 ml 0,01 N HCl
Permeabilisierungslösung	0,7 ml Triton 0,1 g Saponin 99,3 ml 2 x SSC
RNase A-Stocklösung	10 mg/ml
RNase A-FISH-Lösung	1 µl RNase A-Stocklösung 99 µl 2 x SSC
RPMI 1640	440 ml RPMI 1640 50 ml FCS 5 ml Penicillin/Streptomycin 5 ml L-Glutamin
1 M Tris-HCl	121.14 g Tris-Base ad 1 l ddH ₂ O pH mit konz. HCl einstellen
Hybridisierungspuffer	Zusammensetzung der verwendeten Hybridisierungspuffer siehe Kapitel 2.7, Tabelle 11
Brustdrüsenepithel-Wachstumsmedium (MEGM)	4 µl/ml Rinder-Hypophysen- Extrakt 5 µg/ml Insulin 5 ng/ml rhEGF 0,5 µg/ml Hydrocortison 10 ⁻⁵ M Isoproterenol 5 µg/ml Transferrin 10 mM HEPES-Puffer 1 ml Gentamicin /Amphotericin (500x)

Mikroskope

• <u>SMI-Aufbau</u>	Vertico-SMI
Objektive	Plan-Apochromat 63x /N.A. 1.4 Öl (Leica)
Diodengepumpter Festkörperlaser	Coherent Sapphire HP 488 nm (~ 200 mW)
Diodengepumpter Festkörperlaser	Coherent Sapphire 568 nm (~ 200 mW)
Emissionsfilter	Dualband-Sperrfilter Z488/568 nm Bandpass-Filter 500-540 nm
CCD-Kamera	SensicamQE, PCO
Software	Python
• <u>konfokales Laser Scanning Mikroskop</u>	TCS NT, Leica
Objektive	Plan-Apochromat 63x/1.4 Öl, Leica
Laser	Ar+/Kr+-Mischgas-Laser, 488/568/647 nm, Leica
Emissionsfilter	Langpass-Filter 665nm Bandpass-Filter 530±30nm Bandpass-Filter 600±30nm
Detektion	Photo-Multiplier
• <u>Spinning Disk konfokales Mikroskop</u>	Ultraview ERS TE2000, Perkin Elmer
Objektive	Plan-Apochromat 100x/1.4 Öl , Nikon
Laser	Ar ⁺ -Laser 457-514 nm, ~400mW (Melles Griot, 543-A-A02) Kr ⁺ -Laser 568 nm, ~75mW (Melles Griot, 643-Y-A03)
Diodenlaser	405/440/640 nm, 25/20/35 mW (Point Source, iFlex2000)
Emissionsfilter	Bandpass-Filter 705±90nm Bandpass-Filter 527±55nm Bandpass-Filter 625±70nm
Kamera	EM-CCD-Kamera C9100-02, Hammamatsu
Software	Ultraview ERS 6.0 Volocity

- Epifluoreszenz-Mikroskop DMRB, Leica
 - Objektive Plan-Apochromat 40x/1.25-0.75 Öl, Leica
Plan-Apochromat 63x/1.4-0.6 Öl, Leica
 - Beleuchtung Quecksilberdampampe
 - Kamera QuantiCam phase SVGA color

- Phasenkontrast-Mikroskop Laborvert, Leitz
 - Objektive EF 10x/0.25 - 160/- PHACO 1, Leitz
Plan-Apochromat 16x/0.4 - 160/0.17 PHACO 1, Leitz
EF L32x/0.4 - 160/- PHACO 1, Leitz
 - Beleuchtung Quecksilberdampampe
 - Kamera Vario-Orthomat2, Leitz

XI) Liste der bereits publizierten Ergebnisse

Teile aus dieser Arbeit wurden bereits publiziert oder sind zur Publikation eingereicht:

Wissenschaftliche Veröffentlichungen (referierte Artikel, Buchartikel)

■ = Erstautorenschaft oder geteilte Erstautorenschaft

Lemmer P, Gunkel M, Baddeley D, Kaufmann R, Urich A, Weiland Y, Reymann J, **Müller P**, Hausmann M, Cremer C (2008) SPDM – light microscopy with single molecule resolution at the nanoscale. Appl. Phys. B 93: 1-12 (DOI 10.1007/s00340-008-3152-x)

Lemmer P, Gunkel M, Weiland Y, **Müller P**, Baddeley D, Kaufmann R, Urich A, Eipel H, Amberger R, Hausmann M, Cremer C (2009) Using conventional fluorescent markers for far-field fluorescence localization nanoscopy allows resolution in the 10 nm range. J. Microsc. 235: 163-171

Kaufmann R, Lemmer P, Gunkel M, Weiland Y, **Müller P**, Hausmann M, Baddeley D, Amberger R, Cremer C (2009) SPDM – Single molecule superresolution of cellular nanostructures. Proc. SPIE 7185: 71850J1-71850J19 (DOI: 10.1117/12.809109)

Schmitt E, Schwarz-Finsterle J, Stein S, Boxler C, **Müller P**, Mokhir A, Krämer R, Cremer C, Hausmann M (2010) Combinatorial Oligo FISH: Directed labelling of specific genome domains in differentially fixed cell material and live cells. Meth. Molec. Biol. 659 (Part 2): 185 - 202

Bohn M, Diesinger P, Kaufmann R, Weiland Y, **Müller P**, Gunkel M, von Ketteler A, Lemmer P, Hausmann M, Heermann DW, Cremer C (2010) Localization microscopy reveals expression-dependent parameters of chromatin nanostructure. Biophys. J. 99: 1358-1367

Schmitt E, **Müller P**, Stein S, Schwarz-Finsterle J, Hausmann M (2010) Cell nucleus architecture in health and medicine: Geometrical descriptors and their use in GRID based case studies. In: Healthgrid Applications and Core technologies. Proceedings of HealthGrid 2010 (Eds: Solomonides T, Blanquer I, Breton V, Glatard T, Legré Y), Studies in Health Technology and Informatics 159:272-276 (ISBN: 978-1-60750-582-2)

Kaufmann R, **Müller P**, Hausmann M, Cremer C (2010) Imaging label-free intracellular structures by localisation microscopy. Micron: (doi: 10.1016/j.micron.2010.03.006)

Kaufmann R, **Müller P**, Hildenbrand G, Hausmann M, Cremer C (2010) Analysis of Her2/neu membrane protein clusters in different types of breast cancer cells using localization microscopy. J. Microsc.: doi: 10.1111/j.1365-2818.2010.03436.x

Cremer C, von Ketteler A, Lemmer P, Kaufmann R, Weiland Y, **Müller P**, Hausmann M, Gunkel M, Ruckelshausen T, Baddeley D, Amberger R (2010) Far field fluorescence microscopy of cellular structures at molecular optical resolution. In: Nanoscopy and Multidimensional Optical Fluorescence Microscopy (Ed.: Diasporo A), Taylor and Francis (in Druck)

Müller P, Schmitt E, Jacob A, Hoheisel J, Kaufmann R, Cremer C, Hausmann M (2010) COMBO-FISH enables high precision localization microscopy as a prerequisite for nanostructure analysis of genome loci. *Int J. Molec. Sci.* 11: 4094 - 4105

Gunkel M, Kaufmann R, Pres S, Geiger F, Degenhard S, **Müller P**, Hausmann M, Lemmer P, Weiland Y, Lemmermann N A W, Holtappels R, Strickfaden H, Cremer T, Wege C, Cremer C (2010) Superresolution Imaging of Biological Nanostructures by Spectral Precision Distance Microscopy (SPDM). *Nature Protocols* (eingereicht)

Dauber M, **Müller P**, Hausmann M, Schnölzer M, Hoheisel JD, Jacob A (2010) PNA synthesis and parallel purification in microwell plates for biological applications. *Nucl. Acid Res.* (eingereicht)

Müller P, Kaufmann R, Lemmermann N A W, Gunkel M, Hildenbrand G L, Peach D C, Holtappels R, Hausmann M, Cremer C (2010) Spatial distribution of a murine cytomegalovirus glycoprotein by SPDM localisation microscopy. *Histochemistry and Cell Biology* (eingereicht)

Abstracts in wissenschaftlichen Zeitschriften

Schmitt E, **Müller P**, Paramavisam M, Filichev VV, Bornholt N, Schwarz-Finsterle J, Hildenbrand G, Pedersen EB, Xodo LE, Hausmann M (2007) TINA meets COMBO for FISHing: Integrative design of useful oligonucleotide probes. *Int. Workshop Integrative Bioinformatics, Ghent*, 10. 9. – 12. 9. 2007

Schmitt E, **Müller P**, Filichev VV, Bornholt N, Schwarz-Finsterle J, Hildenbrand G, Pedersen EB, Hausmann M (2008) A biosystematically approach to nuclear structure detection using COMBO-FISH and TINAs. *FORSYS Tagung, Berlin*, 19. 6. – 20. 6 2008

Schmitt E, **Müller P**, Schwarz-Finsterle J, Hildenbrand G, Großmann C, Cremer C, Hausmann M (2008) Combinatorial fluorescence in situ hybridization for the detection of genetic parameters. *LALS, Taiwan*, 4. 12. – 6.12.2008.

Hausmann M, Hildenbrand G, Schmitt E, Schwarz-Finsterle J, Grossmann C, Birk U, **Müller P**, Weiland Y, Kaufmann R, Gunkel M, Lemmer P, Trakhtenbrot L, Cremer C (2009) Imaging genetic structures by SMI microscopy and SPDM. *51st Symposium of the Society for Histochemistry, Fulpmes*, 7. 10. – 10. 10. 2009.

A Systems Biology Approach to Labelling of Cell Nuclei and Processing of their Geometry Parameters in Disease Diagnosis and Monitoring



Eberhard Schmitt, Patrick Müller, Götz Pilarczyk, Jutta Schwarz-Finsterle, Stefan Stein, Michael Hausmann

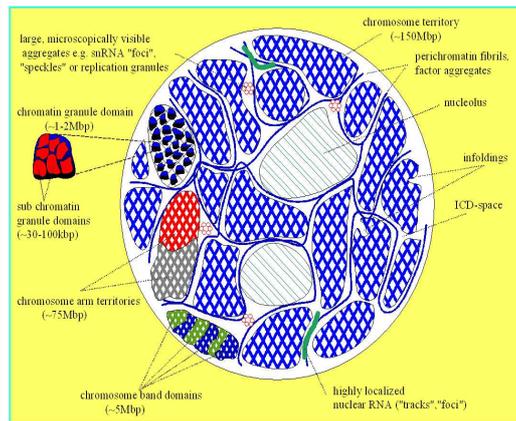
Kirchhoff Institute for Physics, University of Heidelberg



Introduction:

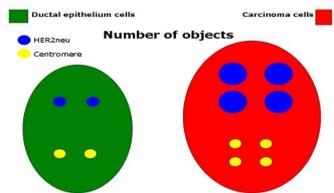
In modern practical medicine, especially tumour diagnosis and monitoring of tumour therapy, as well as basic research and development, **parameters of the genome architecture** of cell nuclei play an increasingly important role. They exhibit an increasing complexity ranging from **copy number** changes of genes to numerical and structural aberrations of chromosomes displayed by changes of size, shape, form and **geometric arrangement** of the related territories and domains.

Objective: Characterization of Nuclei on different scales:

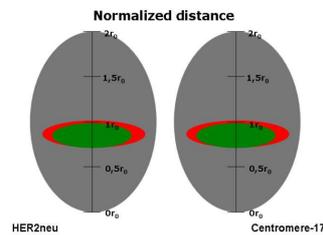


Parameters of Cell Nuclei:

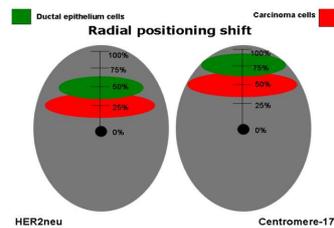
a) Number of gene locations in different tissues:



b) Positions and Distances, absolute and normalized, for genes, territories and domains:



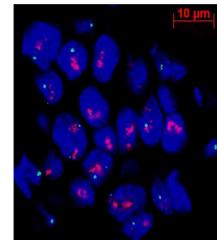
c) Relative Radial Positions and their frequencies reveal significant differences between nuclei in different tissues:



Positions of genetic elements are labelled by FISH methods and localized by high precision imaging. Position, angle, distance, volume, density and further information are derived by computer image analysis. Statistical evaluations of selected nucleus parameter frequencies lead to significant conclusions about nucleus architecture in different tissues.

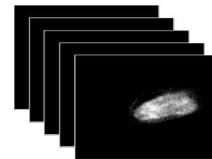
Example of COMBO-FISH labelled cep17 and Her2neu = ERBB2 gene locations:

The centromeres and genes ERBB2 are labelled by uniquely colocalizing short oligo nucleotide sequences (COMBO-FISH). The COMBO sets are configured by NP-complete whole genome exhaustive search.



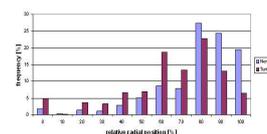
Method of Image Acquisition resulting in 3D stacks:

3D-Image Acquisition



Example of Resulting Statistical Data:

Relative radial position of the barycentres of centromere 17 in normal epithelium and in invasive ductal carcinoma of the breast (5 cases, scores)



The frequencies of relative radial positions of territory barycentres show significant differences between tumour and normal tissue.

Conclusion: 3D and 4D imaging of cell nuclei has led to a nucleus architecture data bank, including values of nucleus parameters as well as geometric and statistical evaluation algorithms, which together with high precision localisation microscopy and high performance computing will allow application to diagnosis and therapy monitoring.

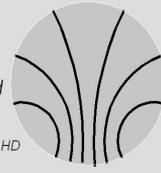
Acknowledgement: The financial support by the BMBF (contract "Services@MediGRID") is gratefully acknowledged.

High Throughput siRNA Screening and COMBO-FISH Labelling Two Sides of a Medal



Eberhard Schmitt, Patrick Müller, Jutta Schwarz-Finsterle, Gloria Torralba (1), Nigel P. Brown (3), Julian M. Kunkel (2), Thomas Ludwig (2), Volker Lindenstruth, Reinhard Schneider (3), Michael Hausmann.

Kirchhoff Institute for Physics, University of Heidelberg; (1) BioQuant, Uni HD; (2) Institute for Informatics, Uni HD; (3) EMBL, HD



Introduction:

COMBO-FISH labelling as well as RNAi screening depend on a selection of short oligo-nucleotides and a subsequent hybridization and optical detection. Whereas in the well established method of synthetic production and biochemical application of siRNA for screening purposes the oligo-nucleotide attaches to RNA molecules, the COMBO-FISH method refers to a combination of oligonucleotides which label a locus on DNA by unique colocalization.

Principles of COMBO-FISH

Though COMBO-FISH can be applied to double strand binding of denaturated DNA as well, it shows its major advantage when forming triple helices which interact with intact duplex genomic DNA when using homopurine/homopyrimidine oligo-nucleotides. Here, prior denaturation of the target sequence that is usually applied for probe binding in standard FISH protocols can be omitted.

Application to abl / bcr and formation of Philadelphia Chromosome

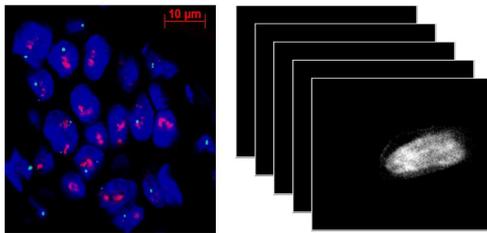
Using DNA database information, one can configure a set of distinct, uniformly labeled homopurine/homopyrimidine probes that is expected to exclusively co-localize within a given 250-kb chromatin domain.

Homopurine-Sequences	Homopyrimidine-Sequences
GAGGGGAGAGAAGGGG	CCTTTCCTTTTC
GGGAGAGAGGAGGAGA	TCTCTTCCCTTTTC
AGAAAGAGGAGAGGAG	CTTTTCCTTTTC
AGGAAGAAAGAGGAGAG	TCCTTTTCCTTTTC
GGGAGGGGAGGAGGAG	TTTCCTTCCCTTTTC
AAAGAGGAGGAGGAGGAG	TCTCTTCCCTTTTC
AAAGGAGGAGGAGGAGGAG	TCTCTTTCCTTTTC
AGGGGAAAAGGAGGAG	CTTTTCTCTCTTTTC
AGGAGGGGAGGAGGAGGAG	CTTCCCTCTCTCTTC
GAAAGAAAAGGAGGAGGAG	TTTCTCTCTCTCTTC
GAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG	TCTTCTCTCTCTTCC
AGGAGGGGAGGAGGAGGAGGAG	TCTTCTCTCTCTTCT
AAAAAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG	CTCTTCTCTCTCTCTC

Due to the diffraction-limited resolution of a microscope, the fluorescence signals of the configured oligonucleotide probe set merge into a typical, nearly homogenous FISH spot. 3D Images of cell nuclei are automatically analyzed by specially developed image software. The method has been performed successfully to detect gene translocations, deletions and amplifications.

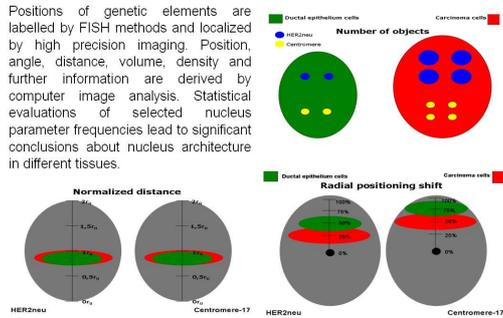
Example of COMBO-FISH labelled cep17 and Her2neu = ERBB2 gene locations:

The centromeres and genes ERBB2 are labelled by uniquely colocalizing short oligo nucleotide sequences configured by NP-complete whole genome exhaustive search. For evaluation, 3D stacks of fluorescence images are taken.



Evaluation of Statistical Data: Gene Numbers, Distances, Relative Radial Positions and their frequencies reveal significant differences between nuclei in different tissues:

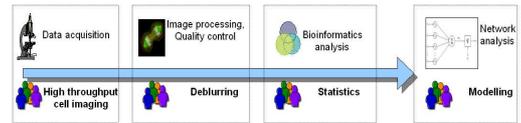
Positions of genetic elements are labelled by FISH methods and localized by high precision imaging. Position, angle, distance, volume, density and further information are derived by computer image analysis. Statistical evaluations of selected nucleus parameter frequencies lead to significant conclusions about nucleus architecture in different tissues.



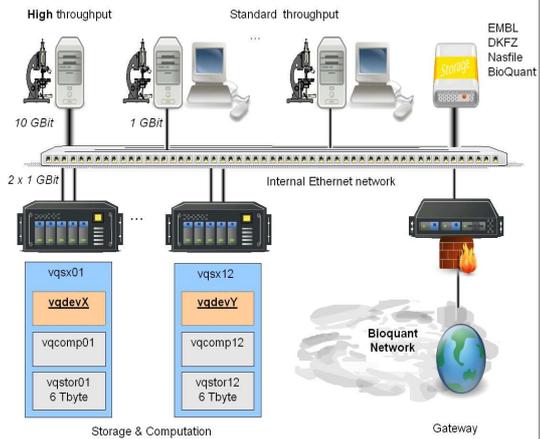
Principles of Data Storage and Processing for High Throughput RNAi Screening

On the other hand, high-content RNAi screening calls for high-resolution microscopy in combination with analysis of large numbers of 2D images with subsequent statistical evaluations and handling of very large data sets. The data storage and processing infrastructure is designed to provide a fast parallel and distributed processing environment supporting data capture, data access, analysis, and integration of different disciplines.

Idealized Workflow:



The design requires massive storage capability, able to capture image data from the microscopes at rates of 1GB/s, and ensuring reliability and durability of the data combined with high throughput and processing. A typical human genome screen will collect of the order of 100,000 images (about 250G) every few days.



Current RNAi screening production workflow:



Databases of genomic and associated information such as human gene loci with cross-references to synonyms, sequences, diseases, literature, and collected human and viral protein interaction data are being integrated into the system.

References:
1. Hausmann M, Winkler R, Hildenbrand G, Finsterle J, Weisel A, Rapp A, Schmitt E, Janz S, Cremer C (2003) COMBO-FISH: specific labeling of non-denatured chromatin targets by computer-selected DNA oligonucleotide probe combinations. *Biotechniques* 2003 Sep;35(3):564-70. 572-7.
2. Börner K, Hermle J, Sommer C, Brown NP, Knapp B, Glass B, Kunkel J, Torralba G, Reymann J, Beil N, Beneke J, Pepperkok R, Schneider R, Ludwig T, Hausmann M, Hamprecht F, Erle H, Kaderali L, Kräusslich H-G, Lehmann MJ (2009) From experimental setup to bioinformatics: a RNAi screening platform to identify host factors involved in HIV-1 replication. *Biotechnology J.* (accepted)

Acknowledgement: The financial support by the BMBF (contract 01IG07015G "Services@MediGRID") is gratefully acknowledged.



PNA COMBO-FISH

Molecular labelling with specific oligo-probe sets

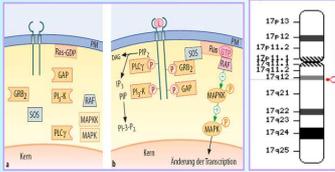
Patrick Müller¹, Anette Jacob², Eberhard Schmitt^{1,3}, Jutta Schwarz-Finsterle¹ and Michael Hausmann¹

¹Kirchhoff-Institute for Physics Heidelberg ²German Cancer Research Center Heidelberg ³Leibniz-Institut für Altersforschung - Fritz-Lipmann-Institut Jena

Ruprecht-Karls-University Heidelberg

Introduction:

The nuclear architecture of the genome in normal, non-neoplastic cells is well organized, highly conserved, and functionally determined. Recent studies indicate that during tumor genesis irreversible rearrangements of chromosomal domains and genetic elements occur on one hand in a tumor specific but on the other hand also in an individual, patient specific way. So far only very few systematic microscopic studies of the analysis of such chromosomal rearrangements and changes in the nuclear architecture exist. For such microscopic studies FISH (Fluorescence In Situ Hybridization) labelling may be the method of choice due to its specificity and sensitivity. However, up to now FISH cannot be performed in living cells which is a serious drawback for investigations of dynamic rearrangements. COMBO-FISH (COMBINatorial Oligo FISH) is a novel technique that has been used to specifically label genome targets in cell nuclei under vital conditions. Novel applications of COMBO-FISH labels are under development to analyze the genome nano-architecture of breakpoint regions (e.g. *abl*; *bcr*; *ryr2*) and tumor genes (e.g. *Her2/neu*; *GRB7*; *c-myc*) in fixed cell nuclei as well as in vital cells. Studies of the arrangement of the target sites by confocal laser scanning microscopy and gene compaction by Spatially Modulated Illumination (SMI) microscopy offer new perspectives in tumor diagnosis, risk estimate and tumor therapy control

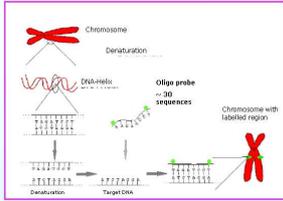


1. Gene of interest
e.g. *Her2/neu*

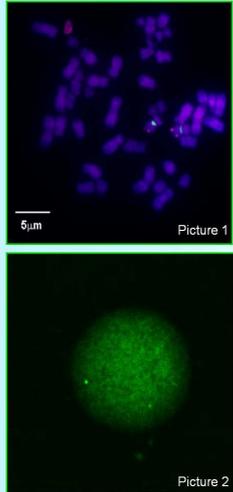
2. DNA database evaluation

3. PNA synthesis

4. COMBO-FISH



5. Microscopy Images



Results:

In earlier studies we showed that COMBO-FISH is also feasible with PNA (Peptide Nucleic Acids) probe sets by using repetitive oligomers labelled with different fluorophores (picture 1).

After establishing PNA COMBO-FISH with repetitive PNA oligomers a gene specific probe set for *Her2/neu* was synthesized. The used probe set consists of 18 DNA database evaluated homopyrimidine oligomers (17-22 bp) which co-localize with high specificity in the *Her2/neu* region on the long arm of chromosome 17. All PNA sequences are single stranded and can hybridize to DNA via Watson-Crick-bonding either parallel or anti-parallel. The *Her2/neu* oligonucleotides were all labelled at the 5'-end with one Oregon Green 488 molecule ($\lambda_{ex/em} = 494/518$ nm). The COMBO-FISH experiments were first of all realised on methanol/acetic acid fixed peripheral blood lymphocytes (see picture 2).

Further experiments: By using Spinning disk confocal microscopy as well as SMI (Spatially Modulated Illumination) microscopy, high-resolution images will be acquired to determine specific labelling and genome compaction patterns.

Relevant Publications:

Hausmann M. et al. (2003) COMBO-FISH: specific labelling of nondenatured chromatin targets by computer-selected DNA oligonucleotide probe combinations. *Biotechniques* 35: 564 – 577

Hausmann M. et al. (2005) New technologies measure genome domains - high resolution microscopy and novel labeling procedures enable 3-D studies of the functional architecture of gene domains in cell nuclei. *Biophotonics Int.* 12(10): 34 - 37

Schmitt E. et al. (2005) Focused COMBO-FISH for selected nanosized genomic regions. *Cell Proliferation* 38: 12

Schwarz-Finsterle J. et al. (2005) COMBO-FISH for focussed fluorescence labelling of gene domains: 3D-analysis of the genome architecture of *abl* and *bcr* in human blood cells. *Cell Biol. Intern.* 29: 1038 - 1046

Schwarz-Finsterle J. et al. (2006/2007) Comparison of triplehelical COMBO-FISH and standard FISH by means of quantitative microscopic image analysis of *abl/bcr* genome organisation. *J. Biophys. Biochem. Meth.* [epub (Sept. 2006)] 70: 397-406.

- FLUORESCENCE MICROSCOPY -

Analysis of c-erbB-2 (Her2/neu)

on gene (e.g. amplification) and protein level (e.g. receptore cluster size)

PNA COMBO-FISH

workflow

Immunostaining

workflow

P. Müller, R. Kaufmann, E. Schmitt,
M. Hausmann, C. Cremer

Kirchhoff Institute for Physics

University of Heidelberg

c-erbB-2 pathway

microscope setup

confocal microscopy

Images were done by using spinning disc confocal microscopy. Both show an interphase nucleus with Topro-3-iodid counterstain.

(1) COMBO-FISH with repetitive centromere 9 PNA probes (Oregon Green 488 and Texas Red) on a methanol-acetacid (3:1) fixed peripheral blood lymphocyte. Both probes were hybridised simultaneously and show fluorescence signals located at the same position in interphase nucleus.

(2) Dual colour COMBO-FISH with gene specific PNA oligonucleotide probe set (Oregon Green 488 / Texas Red) for Her2/neu and GRB7 on a paraformaldehyde fixed epithelial cell of mammary origin (Ca151). Both probe sets have been hybridised simultaneously and yield in fluorescence signals at the same position of the nucleus. The yellow fluorescence signals show the overlay of the single green and red fluorescence signals of the different probe sets.

localisation microscopy

widefield microscopy

Example of paraformaldehyde fixed epithelial cells of mammary origin (Ca151). Immunostain was performed simultaneously with a monoclonal primary antibody anti-c-erbB2 (extracellular domain – EX R) and a polyclonal primary antibody anti-c-erbB-2 (intracellular tyrosine kinase domain – INTRA TR). EX R was labelled with a secondary antibody with Alexa Fluor® 568. The red fluorescence signals show the detected c-erbB-2 receptors on the plasma membrane. INTRA TR was labelled with a secondary antibody with Alexa Fluor® 488. The green fluorescence signals show the detected intracellular c-erbB-2 receptors of the plasma membrane. The neighbouring fluorescence signals represent the co-localisations of both antibodies (without correction of the chromatic shift) which allow an improved analysis of the cluster sizes and structures as well as an identification and elimination of unspecific antibody binding.

Relevant Publications:

Hausmann M. et al. (2003)
COMBO-FISH: specific labelling of nondensaturated chromatin targets by computer-selected DNA oligonucleotide probe combinations.
Biotechniques 35: 564 – 577

Hausmann M. et al. (2005)
New technologies measure genome domains - high resolution microscopy and novel labelling procedures enable 3-D studies of the functional architecture of gene domains in cell nuclei.
Biophotonics Int. 12(10): 34 – 37

Schmitt E et al. (2005)
Focused COMBO-FISH for selected nanosized genomic regions.
Cell Proliferation 38: 182

Schwarz-Finstler J. et al. (2005)
COMBO-FISH for focussed fluorescence labelling of gene domains: 3D-analysis of the genome architecture of abl and bcr in human blood cells. Cell Biol. Intern. 29: 1038 – 1046

Schwarz-Finstler J. et al. (2006/2007)
Comparison of triplehelical COMBO-FISH and standard FISH by means of quantitative microscopic image analysis of abl/bcr genome organisation.
J. Biophys. Biochem. Meth. [epub (Sept. 2006)] 70: 397-406.

Relevant Publications:

Lemmer P., Gunkel M., Baddeley D., Kaufmann R., Ulrich A., Willand Y., Reymann J., Müller P., Hausmann M., Cremer C. (2009)
SPDM: light microscopy with single-molecule resolution at the nanoscale
Applied Physics B 93, 1-12

Lemmer P., Gunkel M., Willand Y., Müller P., Baddeley D., Kaufmann R., Ulrich A., Eipel H., Amberger R., Hausmann M., Cremer C. (2009)
Using conventional fluorescent markers for far-field fluorescence localization nanoscopy allows resolution in the 10-nm range.
Journal of Microscopy 235, 163-171

Kaufmann R., Lemmer P., Gunkel M., Willand Y., Müller P., Hausmann M., Baddeley D., Amberger R., Cremer C. (2009)
SPDM: single molecule superresolution of cellular nanostructures.
Proceedings of the SPIE 7185

Gunkel M., Erdel F., Rippe K., Lemmer P., Kaufmann R., Hörmann C., Amberger R., Cremer C. (2009)
Dual color localization microscopy of cellular nanostructures.
Biotechnology Journal 4, 927 - 938

Danksagung

Herzlich möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mich in meinem Vorhaben unterstützt haben, die mir geholfen oder ihre Hilfe angeboten haben. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. Christoph Cremer für die jederzeit freundliche Unterstützung seinerseits und seiner Arbeitsgruppe, sowie für die Möglichkeit der Ausführung meiner biologischen Analysen an seinen hochauflösenden Mikroskopen. Herzlichen Dank für die mir stets entgegengebrachte Hilfsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. Michael Hausmann möchte ich ganz herzlich danken, für die Chance an einem Thema seines Projektes mitarbeiten zu dürfen, für die Gesprächsbereitschaft sowie für die Unterstützung in allen Belangen. Bei allen im Laufe dieser Doktorarbeit angefallenen Problemen konnte ich jederzeit auf die Hilfe von Herrn Prof. Dr. Michael Hausmann zurückgreifen. Vielen Dank für die Möglichkeit zur selbständigen Arbeit, und für das Vertrauen das mir immer entgegenbracht wurde.

Mein Dank gebührt auch vor allem Diplom-Physiker Rainer Kaufmann, Dr. Jutta Schwarz-Finsterle, Diplom-Biologin Yanina Weiland und Dr. Götz Pilarczyk, die mir stets eine große Hilfe waren. Jederzeit konnte ich auf Ihre Unterstützung bauen. Bedanken möchte ich mich für die wertvollen Tipps, für das Lesen sowie für die hilfreiche Korrektur meiner Arbeit.

Vielen Dank für die außerordentlich nette Atmosphäre! Die vielen lustigen Momente und Euch werde ich nicht vergessen! DANKE!

Außerdem möchte ich allen Mitgliedern und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für die Lösungsansätze bei auftretenden Problemen, sowie für die tatkräftige Unterstützung danken. Da ich von allen Mitgliedern der Gruppe eine große Hilfsbereitschaft erfahren habe, möchte ich allen gesamt und ohne Ausnahme danken. Mit euch hat das Arbeiten jederzeit richtig viel Spaß gemacht und viel Freude bereitet. Bleibt so wie ihr seid!

Mein Dank gilt auch dem Nikon Imaging Center (Universität Heidelberg) mit den beiden Betreuern Dr. Ulrike Engel und Dr. Christian Ackermann. Die Hilfsbereitschaft und wertvollen Tips bei den Einführungen in die unterschiedlichen Mikroskopiesysteme ermöglichte mir eine anschauliche Darstellung meiner COMBO-FISH-Experimente.

Meinen Freunden danke ich für die Unterstützung während meiner Doktorarbeit, sowie für die immer schöne gemeinsam verbrachte Zeit.

Ich danke meinem Bruder, meiner Schwägerin, meinen Großeltern sowie dem Rest meiner Familie, die immer für mich da sind.

Dank gilt auch meinen Schwiegereltern Traudel und Karl-Heinz, die mich stets seelisch und moralisch unterstützten und aufbauten.

Meiner Frau Sabine möchte ich einfach nur Danke sagen. Ich bin froh, dass es dich gibt und du immer für mich da bist!

Sollte ich jetzt noch jemanden vergessen haben, so möge er mir verzeihen. Mein Dank ist ihm dennoch sicher.

Es war einmal ein Professor, der vor seiner Philosophie-Klasse stand. Er hatte einige Gegenstände vor sich ausgebreitet. Als der Unterricht begann, nahm er wortlos einen sehr großen Blumentopf und begann diesen mit Golfbällen zu füllen. Er fragte die Studenten, ob der Topf nun voll sei.

Die Studenten bejahten die Frage.

Dann nahm der Professor eine Tüte mit Kieselsteinen und schüttete diese in den Topf. Er bewegte den Topf sachte und die Kieselsteine rollten in die Leerräume zwischen den Golfbällen. Dann fragte er die Studenten wiederum, ob der Topf nun voll sei.

Die Studenten stimmten wieder zu.

Der Professor nahm als nächstes eine Dose mit Sand und schüttete diesen in den Topf. Natürlich füllte der Sand den kleinsten verbliebenen Freiraum. Er fragte erneut, ob der Topf nun voll sei. Die Studenten antworteten einstimmig "Ja". Nun holte der Professor zwei Dosen Bier unter dem Tisch hervor und schüttete den ganzen Inhalt in den Topf und füllte somit den letzten Raum zwischen den Sandkörnern aus.

Die Studenten lachten. "Nun", sagte der Professor, als das Lachen langsam nachließ, "Ich möchte, dass Sie diesen Topf als die Repräsentation Ihres Lebens ansehen.

Die Golfbälle sind die wichtigen Dinge in Ihrem Leben: Ihre Familie, Ihre Kinder, Ihre Gesundheit, Ihre Freunde, die bevorzugten, ja leidenschaftlichen Aspekte Ihres Lebens, mit welchen, falls in Ihrem Leben alles verloren ginge und nur noch diese verbleiben würden, Ihr Leben trotzdem noch erfüllend wäre."

"Die Kieselsteine symbolisieren die anderen Dinge im Leben wie Ihre Arbeit, Ihr Haus, Ihr Auto. Der Sand ist alles andere, die Kleinigkeiten. Falls Sie den Sand zuerst in den Topf geben", fuhr der Professor fort, "hat es weder Platz für die Kieselsteine noch für die Golfbälle. Dasselbe gilt für Ihr Leben.

Wenn Sie all Ihre Zeit und Energie in Kleinigkeiten investieren, werden Sie nie Platz haben für die wichtigen Dinge. Achten Sie auf die Dinge, welche Ihr Glück gefährden. Spielen Sie mit den Kindern. Führen Sie Ihren Partner zum Essen aus. Es wird immer noch Zeit bleiben um das Haus zu reinigen oder Pflichten zu erledigen."

"Achten Sie zuerst auf die Golfbälle, die Dinge, die wirklich wichtig sind. Setzen Sie Ihre Prioritäten. Der Rest ist nur Sand."

Einer der Studenten erhob die Hand und wollte wissen, was denn das Bier repräsentieren soll. Der Professor schmunzelte: "Ich bin froh, dass Sie das fragen. Es ist dafür da, Ihnen zu zeigen, dass, egal wie schwierig Ihr Leben auch sein mag, es immer noch Platz hat für ein oder zwei Bierchen."

Danke nochmals an Euch alle für die schöne Zeit!