

Neue Verfahren für Einzelzellanalysen in Forschung und Diagnostik

Sowohl in der Grundlagenforschung als auch in der Diagnostik werden die meisten Untersuchungen mit DNA oder RNA durchgeführt, die aus einer Vielzahl von Zellen isoliert wurden. Die Resultate reflektieren daher einen Durchschnitt dieser Zellen mit potenziell unterschiedlichen zellulären Genotypen. Deshalb sind Informationsverluste möglich, die mit signifikanten Einschränkungen für eine detaillierte und spezifische Analyse assoziiert sein können.

Virchow beschrieb bereits vor 150 Jahren die einzelne Zelle als die kleinste biologische Einheit, sodass viele Erkenntnisse über Pathogenese und Phänotypmerkmale nur dann gewonnen werden können, wenn diese kleinste biologische Einheit eines Erkrankungsgeschehens einer umfassenden Analyse zugänglich gemacht wird. Von daher haben Techniken für die Analyse einzelner oder weniger Zellen für viele biologische Fragestellungen eine hohe Relevanz. Zusätzlich gibt es Fragestellungen, bei denen grundsätzlich nur einzelne oder wenige Zellen für eine Untersuchung zur Verfügung stehen und die deshalb besonderer Analysetechniken bedürfen (■ **Tab. 1**). Infolgedessen haben die Diagnostik bzw. Untersuchung von einzelnen oder wenigen Zellen in den letzten Jahren in den unterschiedlichsten Bereichen der klinischen Medizin und Forschung zunehmende Bedeutung erlangt und gleichzeitig zu einer kontinuierlichen Erweiterung des Methodenspektrums zur Analyse geringer Zellzahlen geführt. Dadurch wurden Verbesserungen v. a. im Bereich der Auflösung durch die Einführung molekularer Tech-

niken erreicht, sodass auch für die Einzeltechniken die traditionellen Grenzen zwischen Zytogenetik und Molekulargenetik immer mehr aufgehoben werden.

Hier fokussieren wir auf verschiedene Techniken zur Einzelzellanalyse mit besonderem Schwerpunkt auf neue Verfahren zur Amplifikation des gesamten Genoms und anschließender hochauflösender Auswertung mittels Arraytechniken.

Anwendungsgebiete der Analysen einzelner oder weniger Zellen

Spezielle Anwendungsgebiete für die Untersuchung weniger oder einzelner Zellen sind in ■ **Tab. 1** zusammengefasst. Im Wesentlichen lassen sich 3 Bereiche (Grundlagenforschung, klinische Fragestellungen und forensische Anwendungen) unterscheiden:

Grundlagenforschung

Heterogenität innerhalb normalen Gewebes

Die Erkenntnis, dass auch das Genom von Menschen mit unauffälligem Phänotyp Variationen in Form von Gewinnen und Verlusten größerer Regionen aufweist [13, 23], war eine der faszinierendsten Entdeckungen in der Humangenetik in den vergangenen Jahren. Mittlerweile wurden erste Karten dieser „copy number variations“ (CNV) erstellt [20]. Zurzeit gibt es erste Hinweise, dass diese CNV die Prädisposition für bestimmte Krankheitsbilder oder Phänotypmerkmale beeinflussen können (s. dazu [28]). Jedoch wurden alle Informationen über konsti-

tutionelle CNV bisher aus der DNA von Lymphozyten gewonnen.

Bislang ist es unklar, ob CNV in der Mitose stabil weitergegeben werden oder ob Menschen durch mitotische Rekombinationen eine CNV-Mosaikkonstellation aufweisen. Erste Studien, deren Daten noch einen eher vorläufigen Charakter haben, weisen darauf hin, dass CNV in bestimmten Organen in Mosaikform vorliegen könnten [3, 19]. Sollten diese ersten Hinweise auf CNV-Instabilitäten in weiteren Studien bestätigt werden, wird die genomweite Analyse von CNV in kleinen Zellzahlen aus verschiedenen Organen eine neue Herausforderung für molekularzytogenetische Techniken darstellen. Dabei ist davon auszugehen, dass das Auflösungsvermögen zur Erfassung von CNV-Mosaiken umso besser sein wird, je kleiner die zu untersuchende Zellzahl ist, da neu entstandene CNV nur in den entsprechenden Tochterzellen und nicht in der Gesamtzellpopulation nachzuweisen sein werden. Dieselben Methoden werden auch hilfreich sein, mögliche Chromosomenveränderungen, die nur in limitierten Zellpopulationen bei älteren Menschen auftreten und damit zum Alterungsprozess beitragen können, zu analysieren.

Untersuchung solider Tumoren auf mögliche Heterogenität

Die Mehrheit solider Tumoren ist aufgrund ihrer genomischen Instabilität durch Heterogenität charakterisiert [10]. Ein besseres Verständnis dieser Heterogenität ist die Voraussetzung, um gezielte, maßgeschneiderte Therapieansätze zu entwickeln. Für dieses Ziel bedarf es

Tab. 1 Beispiele für spezielle, nur durch Analyse einzelner oder weniger Zellen beantwortbare Fragestellungen

Grundlagenforschung	Heterogenität innerhalb normalen Gewebes und/oder während der Alterung	
	Heterogenität innerhalb von Tumorgewebe	
	Frühe Metastasierung	
	Tumorzelldisseminierung	
	Analyse molekularer Krankheitsmechanismen direkt am Gewebeschnitt (Interphase-FISH)	
Untersuchung der dreidimensionalen Organisation des Genoms innerhalb von Zellkernen (Interphase-FISH)		
Klinische Fragestellungen	Pränataldiagnostik	Polkörperanalysen (Präkonzeptionsdiagnostik)
		Präimplantationsdiagnostik
	Diagnosestellung/-sicherung	Syndromale Fälle, in denen eine Mosaikkonstellation vermutet wird (klassisches Beispiel: Pallister-Kilian-Syndrom)
		Analyse von Gewebematerial auf Amplifikationen oder Deletionen mit hoher diagnostischer/prognostischer Relevanz (Beispiel: <i>HER2/NEU</i> -Amplifikation beim Mammakarzinom)
		Hämatologische Erkrankungen mit niedrigem mitotischem Index zur Abschätzung der Prognose (Beispiel: CLL)
		Biopsiematerial, das in der Regel aus wenig Zellmaterial besteht
		CUP, von dem häufig auch nur Biopsiematerial zur weiteren Untersuchung zur Verfügung steht
Therapieüberwachung	„minimal residual disease“	Disseminierte Tumorzellen in Blut und Knochenmark
<small>CLL chronisch-lymphatische Leukämie, CUP „cancer of unknown primary“, FISH Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung</small>		

der systematischen Untersuchung kleiner Zellzahlen, die aufgrund definierter Kriterien, wie Morphologie oder Anfärbung mit bestimmten Oberflächenmarkern, ausgewählt wurden. Beispielsweise kann ein solider Tumor auf seine Heterogenität, seine chromosomale Instabilität und auf Regionen bzw. Subklone, die bei anderweitigen Untersuchungen vollständig verloren gehen würden, mit unterschiedlicher prognostischer Relevanz hin untersucht werden.

Analyse erster Schritte zur Metastasierung

Die so genannte minimal residuale Tumorerkrankung (MRD) wird als Resultat einer frühsystemischen Streuung von Tumoreinzellen durch den Primärtumor seit mehreren Jahren diskutiert und als Ursache der häufig auftretenden Rezidive auch nach kurativer Resektion des Primärtumors angesehen [18]. An einem murinen Modell für Brustkrebs konnte kürzlich experimentell nachgewiesen werden, dass Metastasierung bereits in einem sehr frühen Stadium erfolgen kann [12]. Entsprechend können disseminierte Tumorzellen, die vielleicht eine der frühes-

ten Formen der Metastasierung darstellen, bereits in einem gewissen Prozentsatz von Patientinnen, bei denen Brustkrebs im Frühstadium diagnostiziert wurde, in Knochenmarkspiraten mit Hilfe von immunzytochemischen Färbungen identifiziert werden [18]. Beim Mammakarzinom stellt die Präsenz dieser Zellen im Knochenmark einen unabhängigen prognostischen Marker dar [2], sodass die detaillierte Analyse dieser disseminierten Zellen wertvolle Einsichten in den Metastisierungsprozess liefern sollte. Mit den unten erläuterten Methoden sind diese Zellen jetzt tatsächlich solchen Analysen zugänglich, und erste Arbeiten konnten wirklich Veränderungen im Genom dieser disseminierten Zellen zeigen und dadurch die Theorie einer frühen Zelldisseminierung vom Primärtumor untermauern [8, 21, 22].

Analyse molekularer Krankheitsmechanismen direkt am Gewebeschnitt

Für bestimmte Fragestellungen kann es wichtig sein, das Genom von Zellen innerhalb des natürlichen Zellverbands zu analysieren, um eine direkte Genotyp-

Phänotyp-Korrelation zu erreichen. Solche Analysen werden durch Interphase-FISH direkt am Gewebeschnitt möglich.

Untersuchung der dreidimensionalen Organisation des Genoms innerhalb von Zellkernen

Die detaillierte Analyse der 3D-Genom-Organisationsstruktur innerhalb von Zellkernen ist essenziell, um die Auswirkungen von Positionseffekten auf die Genexpression und andere Zellfunktionen zu etablieren. Interphase-FISH mittels speziellen, die 3D-Struktur erhaltenden Protokollen, bietet die einzige Möglichkeit, die Anordnung von Chromosomenterritorien oder anderer kleinerer Regionen direkt im Zellkern zu analysieren (s. hierzu [4]).

Klinische Fragestellungen

Pränataldiagnostik: Präkonzeptions-/Präimplantationsdiagnostik

Naturgemäß stehen auch in der Präimplantationsdiagnostik (PID) nur eine (Polkörperdiagnostik) oder maximal 2 Zellen zur Verfügung. Die vorgeburtliche Diagnostik beschränkt sich, abhängig von der rechtlichen Situation, auf Polkörper oder Zellen eines Embryos in vitro vor dem Transfer in den Uterus. Ziel dieser Untersuchungen ist häufig, die Chromosomenzahl zu bestimmen in der Erwartung, dass die Auswahl euploider Eizellen bzw. Embryonen die Schwangerschaftsrate erhöhen kann. Dieser Nachweis konnte mittels Interphase-FISH noch nicht erbracht werden [17]. Eine andere Studie, bei der die Anzahl aller Chromosomen mittels CGH („comparative genomic hybridization“) untersucht wurde, berichtete dagegen einen deutlichen Anstieg der Erfolgsrate [24]. Weitere Studien werden die Ursachen für diese Diskrepanzen klären müssen.

Diagnosestellung/-sicherung Klinisch-humangenetische Diagnostik.

In der der klinischen Genetik kann bei Patienten mit Verdacht auf ein Syndrom mit Mosaikkonstellation die Einzel-/Wenigzellanalyse dazu beitragen, die Diagnose zu klären. Ein klassisches Beispiel ist das Pallister-Kilian-Syndrom, das durch ein i(12p) charakterisiert ist, wel-

ches in der Regel aber nur in Mosaikkonstellationen in Fibroblasten, üblicherweise aber nicht in Lymphozyten, nachweisbar ist.

Darüber hinaus werden Mosaikkonstellationen bei vielen anderen Krankheitsbildern vermutet [31], sind aber aufgrund diagnostischer Limitationen oder durch Probleme, geeignetes Zellmaterial zu erhalten, schwer diagnostizierbar.

Untersuchung solider Tumoren (Erhebung von Parametern mit hoher prognostischer/therapeutischer Relevanz). Auch im Bereich der klinisch-onkologischen Diagnostik hat die Einzelzelltechnik einen hohen Stellenwert. So können Informationen über bestimmte genetische Veränderungen gesammelt werden, für die bereits eine prognostische Relevanz etabliert ist: Beim Mammakarzinom erlauben *HER2/NEU*-Amplifikationen am Gewebeschnitt, Patienten zu identifizieren, die von einer Herceptintherapie profitieren können.

Hämatologische Erkrankungen. Im klinisch-diagnostischen Bereich treten oft Zellpopulationen auf, die, sei es durch die Erkrankung per se (z. B. bei der chronisch lymphatischen Leukämie) oder therapeutisch induziert, keine Zellteilungstendenzen zeigen. Hier können ebenfalls Einzelzellanalysestrategien hilfreich sein, die Erkrankung zu definieren, um daraufhin patientenspezifische Therapien einzuleiten. Ein gutes Beispiel ist die CLL, bei der durch Interphase-FISH-Assays bekannte, wichtige prognostische Marker untersucht werden [5].

Therapieüberwachung („minimal residual disease“)

Unter einer geeigneten Therapie kann sich die Anzahl der Tumorzellen verringern oder auch qualitativ verändern. Diese Veränderungen können oft nur über Einzelzellanalysen erfasst werden.

Methoden der Einzelzellanalysen

Wie bereits erwähnt, repräsentiert die klassische Zytogenetik mit der Analyse von Chromosomen in der Metaphase das Paradebeispiel für eine Einzelzelluntersuchung, die seit Jahrzehnten zur Stan-

medgen 2008 · 20:407–415 DOI 10.1007/s11825-008-0138-3
© Springer Medizin Verlag 2008

J. Geigl · M. Speicher

Neue Verfahren für Einzelzellanalysen in Forschung und Diagnostik

Zusammenfassung

Die traditionelle Zytogenetik ist ein Paradebeispiel für eine Einzelzelldiagnostik, weil mit jeder gebänderten Metaphase das gesamte Genom einer Zelle – bei relativ niedriger Auflösung – untersucht wird. Dies repräsentiert über mehrere Jahrzehnte einen wichtigen Unterschied zu molekulargenetischen Untersuchungstechniken, die in der Mehrheit der Fälle auf DNA oder RNA basieren, die aus hunderten oder tausenden von Zellen extrahiert wurden. Viele Fragestellungen können jedoch nur durch Analysen auf dem Niveau einzelner oder weniger Zellen beantwortet werden. Deshalb wurden besonders in den

letzten Jahren neue Einzelzelltechniken mit dem Ziel entwickelt, immer mehr Loci mit verbessertem Auflösungsvermögen simultan analysieren zu können. In dieser Übersichtsarbeit werden die diesbezüglich wichtigsten Entwicklungen der letzten Jahre zusammengefasst.

Schlüsselwörter

Einzelzellanalyse · Gleichmäßige Gesamtgenomamplifikation · Vergleichende genomische Hybridisierung (CGH) · Copy number variation (CNV) · Auflösungsvermögen

New methods of single-cell analysis in research and diagnostics

Abstract

Traditional cytogenetics is a paradigm for single-cell diagnostics; after a banding procedure, each metaphase examined represents the analysis of an entire genome of a cell, albeit at a low resolution. For several decades, this single-cell character has represented an important distinction in molecular genetics technologies, which are mostly based on DNA or RNA extracted from hundreds or thousands of cells. However, many essential questions can be addressed only by analyzing cells on the level of fewer or single cells.

In the last few years, new single-cell techniques have been developed with the aim to simultaneously examine more regions with improved resolution. In this overview we summarize the most important recent developments and changes.

Keywords

Single-cell analysis · Unbiased whole-genome amplification · Comparative genomic hybridization (CGH) · Copy number variation (CNV) · Resolution limits

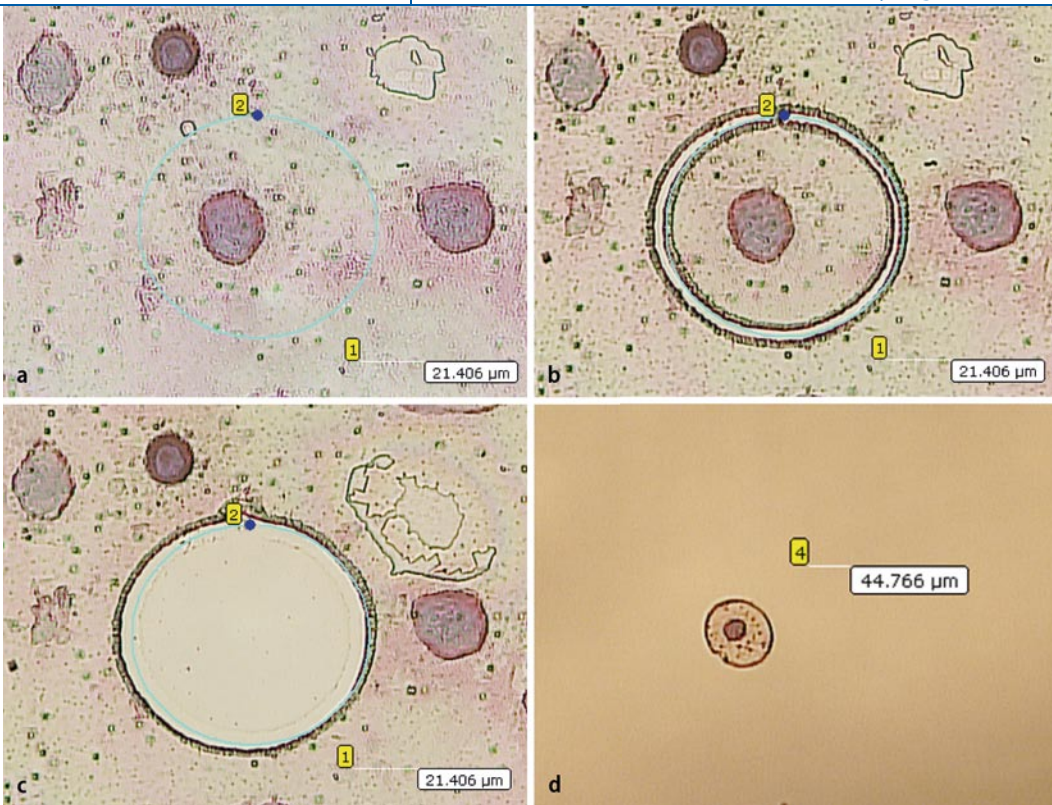


Abb. 1 ▲ Isolierung einer Einzelzelle durch „laser capture catapulting“, **a** Phasenkontrast: Auswahl der zu isolierenden Zelle (Mammakarzinomzelllinie SKBR3, Färbung mit Antizykeratinantikörper, Neufuchsin; Gegenfärbung mit Hämatoxylin) und Markieren des zu dissektierenden Areal mit ausreichendem „Sicherheitsabstand“ zur Zelle, **1**, *Balken* (21,406 µm lang) am Bildschirm einstellbarer Größenmaßstab, **2**, *dunkelblauer Punkt* Start des Lasers, **b** Abfahren des definierten Kreises mit Hilfe des mittels der Parameter für Energie und Fokus auf eine Schnittbreite von weniger als 1 µm justierten Lasers, **c** Katapultieren der Zelle inklusive Membran in den Deckel eines 200-µl-Eppendorf-Gefäßes mittels eines einzigen, über die Software gesteuerten defokussierten Laserimpulses, **a–c** Vergr.: 40:1, **d** Kontrolle der erfolgreichen Dissektion im Deckel des Eppendorf-Gefäßes, Vergr.: 10:1

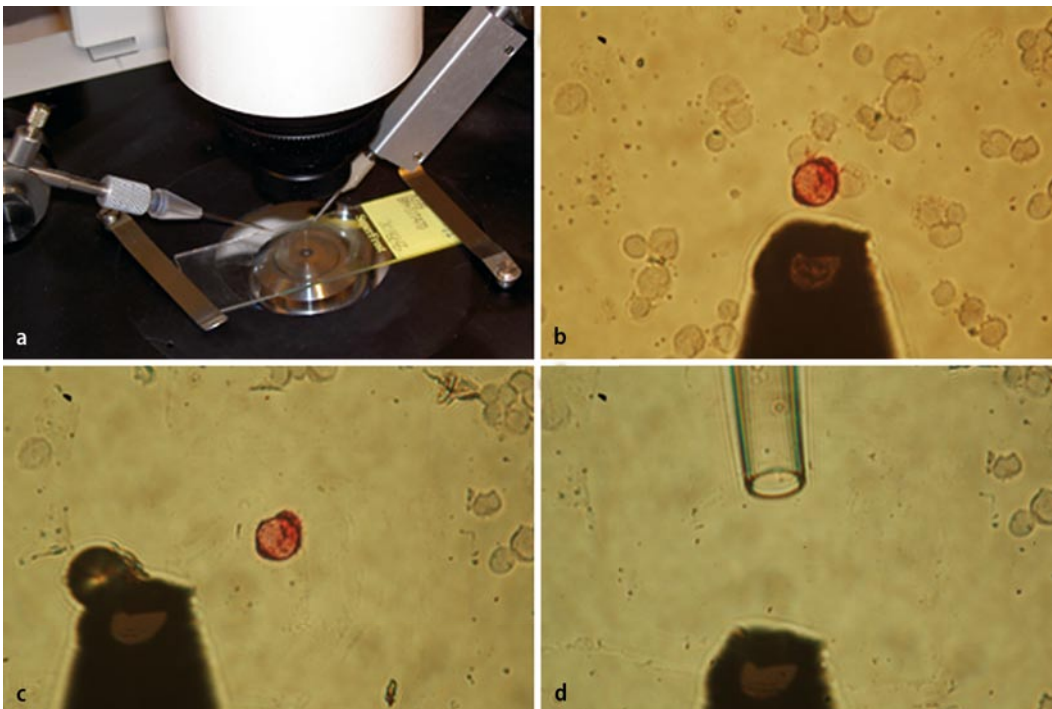


Abb. 2 ◀ Isolierung einer Zelle mittels Mikromanipulation, **a** Inversmikroskop mit Mikromanipulator und manuellen Mikroinjektor, **b** Objektträger nach immunzytochemischer Färbung mit Zytokeratinantikörper mit zytokeratinpositiver Zelle (*Mitte*), **c** Beiseiteschieben benachbarter Zellen mit dem Mikromanipulator, **d** Aufnahme der zytokeratinpositiven Zelle mit der Glaskapillare

darddiagnostik in der Humangenetik und der Tumorzytogenetik gehört. Die Bänderungsanalysen wurden durch Methoden der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung erweitert. Sie ermöglicht die Analyse ausgewählter genomischer Regionen unabhängig vom Zellzyklus, also auch in intakten Interphasekernen, was auch als „Interphase-FISH“ bezeichnet wird. Diese Methode ist speziell bei Anwendungen extrem populär, bei denen eine Kultivierung von Zellen nicht möglich oder beispielsweise aus Zeitgründen nicht gewünscht ist, oder wenn eine sehr große Zellpopulation auf eine bestimmte Chromosomenzahl hin untersucht werden soll. Des Weiteren ist Interphase-FISH essenziell, um die 3D-Organisation des Genoms zu charakterisieren.

Sowohl Bänderungsanalysen als auch Aspekte der Interphase-FISH werden in anderen Beiträgen dieser Ausgabe ausführlich behandelt, sodass sie hier nicht weiter im Detail diskutiert werden. Stattdessen fokussieren wir hier auf neue Verfahren, die das Ziel haben, das Genom einzelner Zellen möglichst hochauflösend zu analysieren. Für diese Analysen sind spezielle Techniken für die Isolierung einzelner Zellen, zur gleichmäßigen Amplifikation des gesamten Genoms und schließlich der Auswertung der Amplifikationsprodukte notwendig. Diese Schritte werden im Nachfolgenden erläutert.

Techniken der Zellgewinnung

Die Aussagekraft der Einzelzellanalyse hängt von bestimmten Charakteristika (z. B. Morphologie und Alter) der verwendeten Zellen ab sowie der Methode, mit der einzelne Zellen isoliert werden. Die beiden am häufigsten verwendeten Ansätze sind die Lasermikrodissektion und die Mikromanipulation. Beide Verfahren sind für Einzelzellanalysen in Diagnostik und Forschung geeignet und liefern reproduzierbare und vergleichbare Ergebnisse.

Lasermikrodissektion

Eine Vielzahl von Herstellern bietet Systeme an, mit denen einzelne Zellen kontaminationsfrei isoliert werden können. Unsere Protokolle sind für die LMPC („laser microdissection and pressu-

re catapulting“)-Methode (PALM Micro-laser Technologie, Zeiss bzw. Leica) modifiziert und optimiert [9, 25]. Zellen in Suspension werden zunächst auf einen mit UV (ultraviolettem)-Licht vorbehandelten Objektträger zentrifugiert, der mit einer Membran [z. B. PEN („poly-ethylen-naphthalat“); PET („polyethylene terephthalate“)] überzogen ist, und daraufhin luftgetrocknet. Um bei der Einzelzellisolation eine mögliche Kontamination durch benachbarte Zellen zu verhindern, sollte die Zelldichte 250.000 bis maximal 500.000/240 mm² betragen.

Werden andere Trägermembranen benutzt, müssen diese unbedingt auf ihre PCR (Polymerasekettenreaktion)-Kompatibilität überprüft werden. Diese Zytospins können immunzytochemisch oder mit Immunfluoreszenz gefärbt werden, um relevante Zellen zu identifizieren. Bei der LMPC-Methode wird ein UVA-Laser mit einer Wellenlänge von 334 nm verwendet, also fern der Absorptionsmaxima von RNA, DNA und Proteinen, sodass eine Beeinträchtigung dieser Strukturen unwahrscheinlich ist.

Zunächst wird der Laser mittels der Parameter für Energie und Fokus auf eine Schnittbreite von weniger als 1 µm justiert (■ **Abb. 1**). Anschließend wird das zu dissektierende Areal mit einem Durchmesser von etwa 60–100 µm kreisförmig umfahren und geschnitten, ein Sicherheitsabstand zur Zelle sollte berücksichtigt werden. Durch einen einzigen, über die Software gesteuerten defokussierten Laserimpuls kann die Zelle inklusive Membran in den Deckel eines 200-µl-Eppendorf-Gefäßes katapultiert und abzentrifugiert werden und steht somit einer weitergehenden Amplifikation zur Verfügung (■ **Abb. 1**).

Das technische Vorgehen ist auch auf andere Systeme (z. B. von Olympus und Arcturus) übertragbar. Diese Komplettgeräte unterscheiden sich bezüglich der Materialgewinnung. Hier haftet die isolierte Zelle mittels UV oder IR (Infrarot)-Laser-Manipulation an einer thermosensiblen Folie auf der Innenseite eines Reaktionsgefäßdeckels. Zur Probe wird anschließend ein geeigneter (Verdau-)Puffer zugegeben, nach Zentrifugation schließt sich die Amplifikation an.

Mikromanipulation

Mikromanipulatoren sind meist auf einem Inversmikroskop (z. B. Zeiss, Nikon usw.) montiert und mit einem manuellen Mikroinjektor versehen (■ **Abb. 2**). Komplettsysteme können z. B. über die Firmen Eppendorf, Olympus, Zeiss oder Leica bezogen werden. Ein Mikromanipulator koordiniert die Bewegungsrichtung einer Glaskapillare in allen x-, y-, z-Richtungen und erlaubt die präzise Bewegung mit Hilfe eines Joysticks. Die Kapillare ist mit einer manuellen Pumpe verbunden, die ein Halten, Transportieren und Transferieren der Zellen ermöglicht. Für die Einzelzellisolation sollten diese Glaskapillaren besondere Spezifikationen aufweisen, wie einen Innendurchmesser von etwa 25–30 µm, um die Handhabung zu vereinfachen. Diese Kapillaren können innerhalb eines breiten Spektrums variabler Parameter hergestellt werden (z. B. Eppendorf-CustomTips).

Zellen in Suspension werden für genomische Einzelzellanalysen auf Adhäsionsobjektträger (z. B. Diagnostika, Adcell surface, Diagonal) gegeben, sedimentiert und luftgetrocknet. Die Objektträger stehen dann für eine immunzytochemische Färbung zur Verfügung. Zellen, die mit der Glaskapillare isoliert werden, können direkt in ein mit PCR-Mix befülltes Eppendorf-Gefäß pipettiert werden. Sollen Einzelzellen für Transkriptomanalysen isoliert werden, eignet sich unserer Erfahrung nach die Mikromanipulation am besten. Hierbei wird die Zellsuspension mit einem geeigneten Oberflächenmarker gefärbt (Immunfluoreszenz), und Einzelzellen werden nach Sedimentation direkt aus der Suspension isoliert (■ **Abb. 2**).

Gleichmäßige Gesamtgenomamplifikation („unbiased whole genome amplification“)

Nach erfolgreicher Isolierung hat man eine oder wenige Zellen gesammelt. Für eine nachfolgende Analyse des gesamten Genoms ist das Verfahren der vergleichenden genomischen Hybridisierung („comparative genomic hybridization“, CGH) sehr populär, weil es die Kartierung von Gewinnen („gains“) oder Verlusten („losses“) in einem Testgenom erlaubt. Da das Genom einer einzelnen di-

ploiden Zelle nur aus 6,6 pg DNA besteht, für nachfolgende Analysen wie die CGH aber Mengen im ng- oder µg-Bereich benötigt werden, wurden Protokolle entwickelt, um das Genom einzelner Zellen so zu amplifizieren, dass numerische Veränderungen ganzer Chromosomen oder kleinerer chromosomaler Regionen im Amplifikationsprodukt immer noch abgebildet werden. Diese PCR-Verfahren ähneln somit einer quantitativen PCR, werden aber nicht für eine ausgewählte Region, sondern für das gesamte Genom durchgeführt und deshalb auch häufig als „unbiased whole genome amplification“ bezeichnet. Im Folgenden werden diese Amplifikationsverfahren kurz dargestellt, wobei sich immer die entscheidende Frage stellt, mit welcher Auflösung das Genom einzelner Zellen auf Gewinne oder Verluste analysiert werden kann. Während die ersten Amplifikationsprodukte mittels konventioneller CGH auf Metaphasen analysiert wurden, erschienen in letzter Zeit erste Arbeiten, die die Anwendungen von Einzelzellprodukten auf verschiedenen Arrayplattformen beschrieben.

DOP („degenerate oligonucleotide primed“)-PCR

Die DOP-PCR war das erste für genomische DNA entwickelte Amplifikationsverfahren und basierte auf dem Einsatz eines degenerierten Primers und einiger initialer, unspezifischer Amplifikationszyklen [27]. Sie erlaubte erstmals die Amplifikation von DNA aus kleinen Zellmengen für anschließende CGH-Analysen [25]. Die Amplifikation von einzelnen Zellen mit der DOP-PCR erwies sich allerdings als deutliche Herausforderung und wurde erst durch zusätzliche Modifikationen erreicht [29, 30]. Unserem Wissen nach gibt es bislang nur eine Publikation, die die Hybridisierung von DOP-PCR-Einzelzellprodukten auf einer Arrayplattform beschreibt [11]. Der dafür eingesetzte BAC („bacterial artificial chromosome“)-Array war jedoch nur für die Diagnose von Monosomien oder Trisomien ganzer Chromosomen entwickelt worden, sodass im Vergleich zur konventionellen Chromosomen-CGH keine Auflösungsverbesserung erreicht werden konnte.

Linker-Adaptor-PCR

Bei ihr wird das Genom mit dem Restriktionsenzym Mse I am 4-Basen-Motiv TTAA definiert verdaut, mit Fragmentgrößen zwischen 100 bp und 1500 bp. An den daraus resultierenden „sticky ends“ der genomischen Fragmente werden Adaptoren ligiert, sodass in einer weiteren Amplifikations-PCR das Produkt vervielfältigt werden kann [14]. Dieses Protokoll wurde in mehreren Publikationen erfolgreich für die Charakterisierung von disseminierten Tumorzellen eingesetzt [8, 12, 21, 22, 26]. Die Linker-Adaptor-PCR ist jedoch eine äußerst komplexe Methode, die sehr zeitintensiv (>30 h) ist.

Kürzlich wurde auch erstmals der Einsatz von Linker-Adaptor-PCR-Produkten auf einer BAC-Array-Plattform beschrieben [7]. Die Autoren berichteten bezüglich der Auflösungsgrenzen, dass etwa 60% aller Gewinne oder Verluste mit einer Größe „unter 20 Mb“ korrekt identifiziert werden können [7]. Da die bekannten Auflösungsgrenzen der konventionellen CGH bei etwa 10 Mb liegen und Kopienzahlveränderungen in dieser Größenordnung mit großer Zuverlässigkeit korrekt identifiziert werden, stellt die Detektion von 20 Mb Veränderungen mit einer 60%igen Wahrscheinlichkeit kaum eine tatsächliche Verbesserung der Auflösung dar.

GenomePlex®-Single-Cell-whole-Genome-Amplifikation (WGA)

Mit der WGA bietet Sigma-Aldrich eine Technik an, das genomische Material einer einzigen Zelle mit Hilfe einer optimierten PCR zu vervielfältigen. Die Methode beruht auf einer initialen Fragmentierung der DNA in einem Fragmentierungspuffer, der eine Zellyse und ein Proteinverdau vorausgehen. Diese Fragmentierung folgt einem Zufallsprinzip, sodass repräsentative Spaltstellen in der kompletten genomischen DNA entstehen, um systematische Fehler zu verhindern. Die Umwandlung dieser gespaltenen DNA-Fragmente in eine amplifizierbare Bibliothek („library“) erfolgt durch eine PCR, bei der DNA-Primer mit zufälligen Sequenzen am 3'- und bekannten Sequenzen am 5'-Ende entstehen. Diese Library kann daraufhin in einer weiteren PCR mit Universal-Primern und einer limitierten Anzahl

von Zyklen amplifiziert werden. Die Methode hat eine relativ einfache Handhabung und erlaubt es, aus einer Zelle mehrere µg DNA innerhalb von maximal 5 h zu amplifizieren.

Auch zu dieser Amplifikationstechnik gibt es bereits eine erste publizierte Anwendung auf einer BAC-Array-Plattform, die zeigen konnte, dass numerische Veränderungen mit einer Größe von 8,3 Mb zuverlässig identifiziert werden können [6], sodass hier eine Auflösungsverbesserung im Vergleich zur konventionellen CGH erreicht werden konnte.

„multiple displacement amplification“ (MDA)

Hierbei handelt es sich um eine isotherme Amplifikation geringer DNA-Ausgangsmengen. Mehrere Hersteller bieten entsprechende Kits an (z. B. GE Healthcare, Qiagen). Die DNA wird entweder thermisch (Genomiphi™) oder chemisch (REPLI-g®) denaturiert und anschließend bei 30°C amplifiziert. Die Technik ist aufgrund der hohen „proofreading“ 3'-5'-Exonuklease-Aktivität der DNA-Polymerase sehr akkurat.

Ursprünglich waren diese Ansätze nicht für die Einzelzellanalyse konzipiert. Mittlerweile wurden aber entsprechend adaptierte Protokolle erstellt, die die Amplifikation von Einzelzellen ermöglichen und der molekularzytogenetischen Auswertung zugänglich machen. MDA-Produkte von Einzelzellen wurden auch bereits auf BAC-Arrays hybridisiert, wobei die kleinste noch detektierbare Deletion eine Größe von 34 Mb hatte [16]. Der Qualität der Ausgangs-DNA kommt eine große Bedeutung zu. Verschiedene Fixierungen und Färbesubstrate beeinflussen die nachfolgende Amplifikation in negativer Weise, dies gilt insbesondere für FFPE („formalin fixed paraffin embedded“)-Material. Bei stark fragmentiertem Material ist eine Gesamtgenomamplifikation naturgemäß nicht möglich. Sind entsprechende Voraussetzungen gegeben, sollten Kryomaterial oder lebende Zellen verwendet werden.

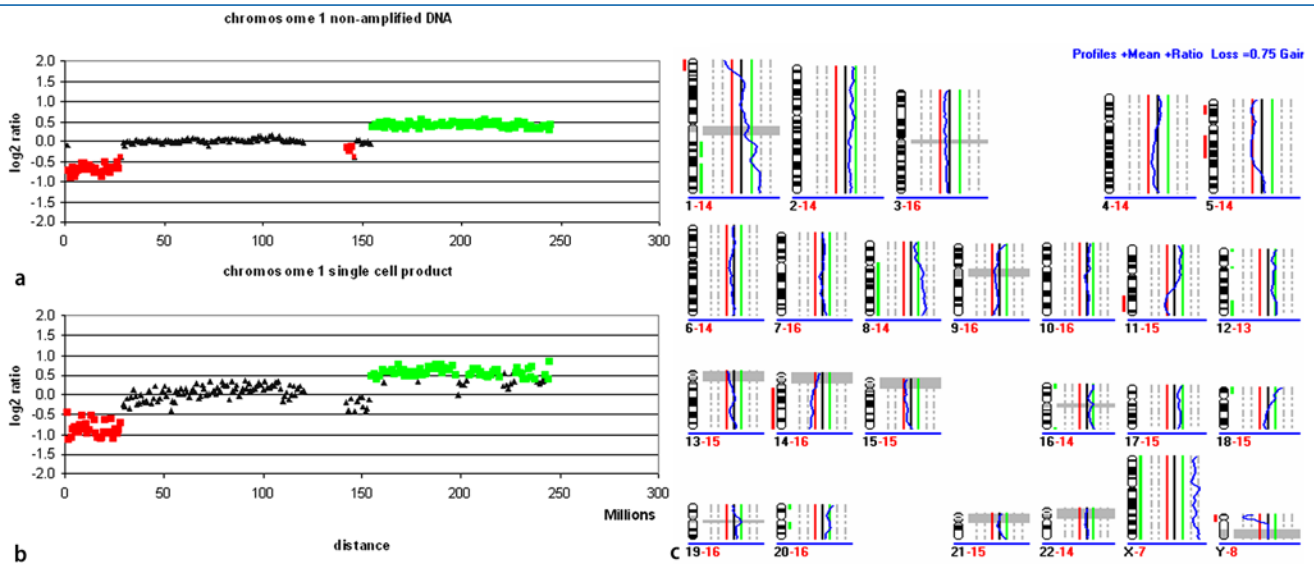


Abb. 3 ▲ Repräsentativer Vergleich verschiedener CGH-Profile, Hybridisierungen unterschiedlicher DNA-Präparationen einer Nierenzellkarzinomzelllinie auf einen Tiling-Path-BAC-Array (**a,b**) oder auf Metaphasen (**c**), **a** Profil für Chromosom 1 auf einem Tiling-Path-BAC-Array für genomische, nichtamplifizierte DNA, **b** Einzelzellamplifikationsprodukt von Chromosom 1 auf dem gleichen Array wie in **a**, **c** Einzelzellamplifikationsprodukt, Analyse mittels konventioneller CGH auf Metaphasen, weitere Details im Text und in [6]

Beispiel für die Auswertung der Amplifikationsprodukte mittels CGH

Das erreichbare Auflösungsvermögen für die korrekte Identifizierung von Gewinnen und Verlusten aus dem Amplifikationsprodukt einer einzelnen Zelle ist für die oben beschriebenen Techniken eine zentrale Frage.

■ **Abb. 3** zeigt einen repräsentativen Vergleich von CGH-Profilen, die mit DNA einer Nierenzellkarzinomzelllinie berechnet wurden. Zusammengefasst sind Profile für Chromosom 1 auf einem Tiling-Path-BAC-Array für genomische, nichtamplifizierte DNA (■ **Abb. 3a**), für ein Einzelzellamplifikationsprodukt (■ **Abb. 3b**) und konventionelle CGH auf Metaphasen (■ **Abb. 3c**; [6]). Aus der Abbildung ist ersichtlich, dass die Variabilität des CGH-Profiles des Einzelzellprodukts verglichen mit genomischer unamplifizierter DNA steigt (vergleiche ■ **Abb. 3a** mit ■ **Abb. 3b**) und deshalb biostatistische Auswertungen und spezielle Algorithmen notwendig sind. Berücksichtigt man jedoch, dass diese Techniken noch am Anfang ihrer Entwicklung stehen, wird noch viel Potenzial für Auflösungsverbesserungen vorhanden sein.

Qualitätsmanagement der Einzelzellanalyse

Die oben beschriebenen Einzelzellanalysen stellen eine hochspezifische Anwendung dar, die mehrere Anforderungen an den Arbeitsplatz stellt:

Für welche Amplifikationsmethode man sich auch unter Berücksichtigung der jeweiligen Fragestellung entscheidet, einige Voraussetzungen müssen für alle Ansätze erfüllt sein. Die Einzelzellamplifikation ist eine technisch anspruchsvolle Methode, die arbeitsintensiv ist und speziell geschultes Personal voraussetzt. Entscheidend ist eine regelmäßige Anwendung der Methode, um eine entsprechende Routine zu entwickeln, die Voraussetzung für eine hohe Reproduzierbarkeit ist. Es sind alle geeigneten Maßnahmen zu treffen, um etwaige Kontaminationen zu verhindern. Die Vorbereitungen zur Amplifikation, d. h. das Ansetzen der Reagenzien, sollten in einem eigenen Sterilraum, vorzugsweise mit Luftschleuse, erfolgen. Für alle Schritte ist ein geeigneter Arbeitsplatz (Laminar Flow, PCR Workstation) vorzusehen, der durch UV-Behandlung dekontaminiert werden kann. Das Tragen von Handschuhen ist notwendige Voraussetzung und sollte konsequenterweise auf Mund- und Haarschutz erweitert werden. Für alle Pipettierschritte sollen spe-

ziell für die Einzelzelldiagnostik vorgesehene Pipetten und Filterspitzen verwendet werden, die PCR-Amplifikation hat ausschließlich in einem eigens dafür vorgesehenen Raum zu erfolgen. Nur durch diese Kautelen und die sichere Beherrschung der Technik kann garantiert werden, dass eine Kontamination verhindert wird und das ermittelte Ergebnis auch dem tatsächlichen genetischen Status entspricht.

Eine weitere, wichtige Frage ist, wie die Richtigkeit der erzielten Ergebnisse kontrolliert werden kann, insbesondere, da die untersuchte Zelle während des Prozesses zerstört wird und somit für weitere Untersuchungen nicht mehr zur Verfügung steht. Von daher sind Kontrolluntersuchungen naturgemäß limitiert. Ein sinnvoller und relativ einfach durchzuführender Ansatz zur Qualitätskontrolle ist, immer wieder Zellen mit bekannter Chromosomenkonstellation (z. B. normale weibliche oder männliche Zellen, Zellen mit einer bekannten Aneuploidie wie Trisomie 21 usw.) in einem Ansatz mitzuarbeiten, um zu testen, ob bei diesen Zellen das erwartete Ergebnis erzielt wird. Eine andere Möglichkeit besteht darin, sequenziell 2 verschiedene Einzelzellanalysen bei derselben Zelle anzuwenden. Beispielsweise ist es möglich, auf eine Zellpopulation erst Interphase-FISH durchzuführen, die Zellen nach Auswertung

der FISH-Signale mittels Laser-Catapulting in ein Eppendorf-Gefäß zu überführen und dann die DNA mit den oben beschriebenen Verfahren zu amplifizieren [15]. Die vorausgegangene FISH-Untersuchung hat dabei keinen Einfluss auf das CGH-Profil [15]. Stimmt das Interphase-FISH-Muster mit den entsprechenden Regionen des CGH-Profiles überein, ist es sehr wahrscheinlich, dass das Einzelzell-CGH-Profil das Genom der entsprechenden Zelle reflektiert. Bei einer Diskrepanz besteht theoretisch die Möglichkeit, dass dieser Unterschied entweder auf inkorrekt interpretierter Interphase-FISH oder auf einem Schritt der Einzelzell-CGH beruht. Da die tatsächliche Ursache für die Diskrepanz in der Regel nicht sicher zu beurteilen sein wird, sollten die Ergebnisse mit unterschiedlichen Interphase-FISH/Einzelzell-CGH-Resultaten verworfen werden.

Die Überprüfung bestimmter Regionen mittels qPCR wurde ebenfalls vorgeschlagen [21, 26]. Ein Problem dieses Ansatzes ist jedoch, dass die qPCR mit der DNA des Einzelzellamplifikationsprodukts durchgeführt wird. Bestätigt die qPCR beispielsweise eine Amplifikation, die im Einzelzell-CGH-Profil beobachtet wurde, bleibt immer noch die Möglichkeit, dass diese Imbalance ein Artefakt der initialen Einzelzellamplifikation war. Von daher lässt diese Zusatzuntersuchung viel Spielraum für Interpretationen und ist als Kontrolle nur begrenzt sinnvoll.

Fazit/Ausblick

Die Analyse einzelner oder weniger Zellen liefert einzigartige Informationen, die mit vielen der gegenwärtigen „high-throughput“-Verfahren nicht zu erhalten sind. Von daher wird die Analyse einzelner/weniger Zellen immer eine Sonderstellung innehaben. Des Weiteren erklärt sich diese Sonderstellung auch durch den Umstand, dass die Untersuchung weniger Zellen aufgrund des sehr geringen Untersuchungsmaterials immer ein besonders delikates Verfahren darstellen wird, das auf speziell ausgerichtete Labors beschränkt bleiben wird, die dafür auch gesondert ausgebildetes und sehr geschicktes Personal benötigen. Ob

die hier aufgeführten Einzelzellverfahren mittels WGA und Array-CGH deshalb ein „Nischenprodukt“ bleiben oder ob sich zukünftig mehr Labors dieser Technik annehmen werden, wird von einigen Faktoren abhängen, die wahrscheinlich in naher Zukunft geklärt werden:

Wie oben bereits aufgeführt, ist die Fragestellung, ob CNV durch mitotische Ereignisse in Mosaikkonstellation auftreten können, faszinierend. Sollte dem so sein, könnten in einem Körper regional auftretende CNV die Anfälligkeit bestimmter Organe für Erkrankungen erklären, und diese erhöhte Anfälligkeit wäre nicht durch eine Analyse aus dem Blut, wie sie üblicherweise durchgeführt wird, zu erfassen.

Eine entscheidende Frage für solche CNV Analysen aus geringen Zellzahlen wird jedoch das erreichbare Auflösungsvermögen sein. Deshalb wird es in naher Zukunft noch sicher weitere Optimierungen im Bereich der PCR-Amplifikation, der Arrayplattformen und Auswertungsalgorithmen geben. Wenn das Auflösungsvermögen der Einzelzell-CGH reproduzierbar auf einen Bereich unter 1 Mb gesenkt werden könnte, werden deutlich mehr Fragestellungen mit diesem methodischen Ansatz angegangen werden können.

Kürzlich wurde die Amplifikation von HER2 bei disseminierten Zellen von Ösophaguskarzinompatienten als prognostischer Marker beschrieben [26]. Interessanterweise war diese HER2-Amplifikation nur dann von prognostischer Relevanz, wenn sie in disseminierten Tumorzellen, nicht aber im Primärtumor beobachtet wurde, sodass therapeutische Entscheidungen bezüglich Herceptin nur über eine Einzelzellanalyse disseminierter Zellen gemacht werden könnte [26]. Wenn diese Beobachtungen in weiteren Studien bestätigt werden können, würde dies der Identifizierung des ersten prognostisch/therapeutischen Markers aus Einzelzellen entsprechen, sodass ein ähnlicher Untersuchungsansatz sich auch bei anderen Tumorentitäten auszahlen könnte. Dieses Vorgehen hat im Zeitalter der Biomarkerentwicklung für eine Therapie eine hohe Relevanz [1].

Korrespondenzadresse

Dr. J. Geigl
Institut für Humangenetik,
Medizinische Universität Graz,
Harrachgasse 21/8, A-8010 Graz,
Österreich
jochen.geigl@meduni-graz.at

Interessenkonflikt. Der korrespondierende Autor gibt an, dass kein Interessenkonflikt besteht.

Literatur

- Allison M (2008) Is personalized medicine finally arriving? *Nat Biotechnol* 26: 509–517
- Braun S, Vogl FD, Naume B et al. (2005) A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. *N Engl J Med* 353: 793–802
- Bruder CE, Piotrowski A, Gijsbers AA et al. (2008) Phenotypically concordant and discordant monozygotic twins display different DNA copy-number-variation profiles. *Am J Hum Genet* 82: 763–771
- Cremer M, Müller S, Solovei I et al. (2008) 3D-Fluoreszenz-in-situ Hybridisierung und Zellkernarchitektur. *Med Genet* 4
- Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A et al. (2000) Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 343: 1910–1916
- Fiegler H, Geigl JB, Langer S et al. (2007) High resolution array-CGH analysis of single cells. *Nucleic Acids Res* 35: e15
- Fuhrmann C, Schmidt-Kittler O, Stoecklein NH et al. (2008) High-resolution array comparative genomic hybridization of single micrometastatic tumor cells. *Nucleic Acids Res* 36: e39
- Gangnus R, Langer S, Breit E et al. (2004) Genomic profiling of viable and proliferative micrometastatic cells from early-stage breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 10: 3457–3464
- Geigl JB, Speicher MR (2007) Single-cell isolation from cell suspensions and whole genome amplification from single cells to provide templates for CGH analysis. *Nat Protocols* 2: 3173–3184
- Geigl JB, Obenauf AC, Schwarzbraun T et al. (2008) Defining chromosomal instability. *Trends Genet* 24: 64–69
- Hu DG, Webb G, Hussey N (2004) Aneuploidy detection in single cells using DNA array-based comparative genomic hybridization. *Mol Hum Reprod* 10: 283–289
- Hüsemann Y, Geigl JB, Schubert F et al. (2008) Systemic spread is an early step in breast cancer. *Cancer Cell* 13: 58–68
- lafrate AJ, Feuk L, Rivera MN et al. (2004) Detection of large-scale variation in the human genome. *Nat Genet* 36: 949–951
- Klein CA, Schmidt-Kittler O, Scharadt JA (1999) Comparative genomic hybridization, loss of heterozygosity and DNA sequence analysis of single cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 4494–4499
- Langer S, Geigl JB, Gangnus R et al. (2005) Sequential application of interphase-FISH and CGH to single cells. *Lab Invest* 85: 582–592
- Le Caignec C, Spits C, Sermon K et al. (2006) Single-cell chromosomal imbalances detection by array CGH. *Nucleic Acids Res* 34: e68
- Mastenbroek S, Twisk M, Van Echten-Arends J et al. (2007) In vitro fertilization with preimplantation genetic screening. *N Engl J Med* 357: 9–17
- Pantel K, Brakenhoff RH (2004) Dissecting the metastatic cascade. *Nat Rev Cancer* 4: 448–456

19. Piotrowski A, Bruder CE, Andersson R et al. (2008) Somatic mosaicism for copy number variation in differentiated human tissues. *Hum Mutat* [Epub ahead of print]
20. Redon R, Ishikawa S, Fitch KR et al. (2006) Global variation in copy number in the human genome. *Nature* 444: 444–454
21. Schardt JA, Meyer M, Hartmann CH et al. (2005) Genomic analysis of single cytokeratin-positive cells from bone marrow reveals early mutational events in breast cancer. *Cancer Cell* 8: 227–239
22. Schmidt-Kittler O, Ragg T, Daskalakis A et al. (2003) From latent disseminated cells to overt metastasis: genetic analysis of systemic breast cancer progression. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 7737–7742
23. Sebat J, Lakshmi B, Troge J et al. (2004) Large-scale copy number polymorphism in the human genome. *Science* 305: 525–528
24. Sher G, Keskindepe L, Keskindepe M et al. (2007) Oocyte karyotyping by comparative genomic hybridization provides a highly reliable method for selecting „competent“ embryos, markedly improving in vitro fertilization outcome: a multiphase study. *Fertil Steril* 87: 1033–1040
25. Speicher MR, Du Manoir S, Schröck E et al. (1993) Molecular cytogenetic analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded solid tumors by comparative genomic hybridization after universal DNA-amplification. *Hum Mol Genet* 2: 1907–1914
26. Stoecklein NH, Hosch SB, Bezler M et al. (2008) Direct genetic analysis of single disseminated cancer cells for prediction of outcome and therapy selection in esophageal cancer. *Cancer Cell* 13: 441–453
27. Telenius H, Pelmear AH, Tunnacliffe A et al. (1992) Cytogenetic analysis by chromosome painting using DOP-PCR amplified flow-sorted chromosomes. *Genes Chromosomes Cancer* 4: 257–263
28. Ullmann R (2008) Strukturelle Genomvarianten – Ausmaß, Entstehung und phänotypische Konsequenzen. *Med Genet* 4
29. Voullaire L, Wilton L, Slater H et al. (1999) Detection of aneuploidy in single cells using comparative genomic hybridization. *Prenat Diagnosis* 19: 846–851
30. Wells D, Sherlock JK, Handyside AH et al. (1999) Detailed chromosomal and molecular genetic analysis of single cells by whole genome amplification and comparative genomic hybridisation. *Nucleic Acids Res* 27: 1214–1218
31. Youssoufian H, Pyeritz RE (2002) Mechanisms and consequences of somatic mosaicism in humans. *Nat Rev Genet* 3: 748–758

Hier steht eine Anzeige.

