

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Fälle

Verwendet wurden formalinfixierte und in Paraffin eingebettete Gewebsblöcke aus dem Institut für Pathologie der Freien Universität Berlin. Aus diesen Gewebsblöcken wurden 6µm dicke Schnitte hergestellt, welche auf Objektträgern fixiert wurden.

#### 2.1.1. Lymphome

Die Lymphome, die für diese Studie ausgewählt wurden, waren ausschließlich B-Zell Non-Hodgkin-Lymphome aus der schon zuvor zitierten Studie von Hummel *et al.*<sup>30</sup>. Aus den partiell EBER-positiven Fällen wurden vier Fälle ausgewählt, bei denen die malignen Zellen einen homogenen Zellrasen bildeten.

Fall 1:

##### **Extramedulläres Plasmozytom**

Extramedulläres Plasmozytom mit hoher plasmoblastischer Komponente, vorwiegend im Bereich der Magencardia. Etwa 30-50% der Tumorzellen zeigten sich in der ISH EBER-positiv. Keine der Zellen exprimierte EBNA-2 oder LMP-1. B- und T-Zell-Marker konnten nicht nachgewiesen werden. Leichte und schwere Immunglobulin-Ketten ließen sich nicht nachweisen.

Fall 2:

##### **Diffuses großzelliges immunoblastisches B-Zell-Lymphom**

Innerhalb diffuser Tumorzellinfiltrate zeigten sich Inseln aus EBER-positiven neoplastischen Zellen; in den Arealen zwischen diesen Inseln waren die Tumorzellen EBER-negativ. Einzelne Zellen exprimierten LMP-1. EBNA-2 Protein oder BHLF-Transkripte konnten nicht nachgewiesen werden.

Fall 3:

### **Diffuses großzelliges zentroblastisches Lymphom**

Zentroblastisches Lymphom vom multilobulären Subtyp. Die Tumorzellen waren L26-positiv. Etwa 50-70% der neoplastischen Zellen exprimierten EBER. Nachweis von einzelnen LMP-1-positiven Zellen, kein Nachweis von EBNA-2 Protein oder BHLF-Transkripten.

Fall 4:

### **Diffuses großzelliges anaplastisches Lymphom**

80% der Tumorzellen waren EBER-positiv. Die meisten der neoplastischen Zellen zeigten auch eine starke LMP-1-Expression. EBNA-2 Protein oder BHLF-Transkripte konnten nicht nachgewiesen werden.

## **2.1.2. Epitheliale Tumoren**

Fall 5-7:

### **Magenkarzinome**

Bei den untersuchten Magenkarzinomen handelte es sich um niedrig differenzierte Magenkarzinome. Die Tumorzellen bildeten primitive tubuloglanduläre und mikroalveoläre Strukturen. Es fanden sich Areale mit durchgängig EBER-exprimierenden Tumorzellen sowie EBER-freie Areale und eingestreute EBER-negative Tumorzellen in ansonsten EBER-positiven Drüsen. Eine LMP-Expression konnte in keiner Zelle nachgewiesen werden. Immunhistologisch (Anti-Zytokeratin-Antikörper) konnten die EBER-exprimierenden Zellen als Epithelzellen identifiziert werden.

Fall 8:

### **Nasopharynxkarzinom vom Typ Schmincke**

Undifferenziertes Karzinom mit ausgeprägtem lymphatischem Stroma. Auf den Tumorzellen konnte immunhistologisch Panzytokeratin nachgewiesen werden. Ca. 50% der Tumorzellen exprimierten EBER, keine der Tumorzellen exprimierte LMP-1 oder EBNA-2.

## 2.2. In situ-Hybridisierung (ISH)

In dieser Studie wurde eine RNA-ISH zum Nachweis von EBER-1 und EBER-2 angewandt. Digoxigenin-markierte cRNA-Sonden wurden zur Detektion der RNA eingesetzt, das Protokoll folgt zum größten Teil dem von Herbst *et al.* beschriebenen<sup>68</sup>.

### 2.2.1. Herstellung der cRNA-Sonden

Die EBER1- und EBER2-spezifischen Genfragmente J1 und J2 wurden in das Plasmid pBluescript II KF (Fa. Stratagene) inseriert. Die Plasmide wurden nach Standardmethoden vermehrt, isoliert und linearisiert. Die Linearisierung erfolgte durch eine spezifische Restriktionsendonuklease (RE): 50 Einheiten (Units, U) der RE wurden mit 50 µg Plasmid in entsprechender RNase-freien Pufferlösung über Nacht bei 37°C inkubiert. In einem Minigel (Agarose, 1%) wurde die Vollständigkeit der Linearisierung kontrolliert, nach Äthanolpräzipitation wurde die Konzentration der DNA photometrisch auf 1 mg/ml eingestellt.

Mit diesen linearisierten DNA-Fragmenten wurde die *in vitro* Transkribierung der EBER-Gene durchgeführt. Antisense-Sonden sind komplementär zu spezifischen RNA-Abschnitten auf der EBER-RNA, mit denen sie hybridisieren können. Sense-Sonden entsprechen diesen RNA-Abschnitten, hybridisieren dementsprechend nicht und dienen als Negativkontrolle.

Tabelle 2: Herstellung der Sonden

	Restriktionsenzym	RNA-Poymerase
Antisense-Sonde für EBER1	HindIII	T7
Antisense-Sonde für EBER2	BamH1	T3
Sense-Sonde für EBER1	EcoRI	T3
Sense-Sonde für EBER2	EcoRI	T7

Durch den Einsatz Digoxigenin (Dig)-markierter UTPs bei der Transkription wurden die Sonden für die spätere Detektion markiert.

### **2.2.2. EBER-ISH**

Alle Reaktionsschritte und alle verwendeten Lösungen und Materialien während der Prähybridisierung und der Hybridisierung waren RNase- und DNase-frei, Lösungen und Materialien der Posthybridisierungsschritte DNase-frei. RNase-Freiheit erlangt man durch Zugabe von Diethyl-Pyrocbonat (DEPC) zu den Lösungen, Verwendung von sterilen Einmalpipetten und „Backen“ der Glasgefäße bei 200°C für vier Stunden. DNase-Freiheit erlangt man durch Autoklavieren von Material und Lösungen. Alle Schritte wurden mit Einmalhandschuhen durchgeführt. Sofern nicht anders erwähnt, fanden alle Reaktionsschritte bei Raumtemperatur statt.

#### **2.2.2.1. Prähybridisierung**

Die Paraffinschnitte wurden zum Entparaffinieren zunächst für 15 min. auf 60°C erwärmt und zweimal 10 min. in Xylol geschüttelt. Anschließend wurden sie durch eine absteigende Äthanolreihe rehydriert und in Phosphatpuffer (1xPBS) gespült. Danach erfolgte eine Denaturierung basischer Proteine durch 0,2 M HCl für 20 min. Nach Spülung mit 1xPBS erfolgte die Lyse des Zellmaterials durch Proteinase K (0,1 mg/ml, 15 min.), um die Zielnukleinsäuren von umgebenden Proteinen zu befreien und zugänglich für die Sonden zu machen. Die Proteinase K wurde durch 1 M Glycin für 30 sec. geblockt, mit Phosphatpuffer gespült, durch eine aufsteigende Äthanolreihe dehydriert und luftgetrocknet.

#### **2.2.2.2. Hybridisierung**

Der Hybridisierungsmix enthielt auf 50°C erwärmtes Formamid (50%), Dextransulfat (20%), 10x-Salze (10%), Wasser (19%) und Digoxigenin-markierte Sonde (1%). Bevor diese Lösung auf den Schnitt gelangte,

wurde sie für 30 sec. auf 80°C erhitzt. Jeder Schnitt wurde mit 50 µl Hybridisierungsmix bedeckt und mit einem Deckgläschen bedeckt. Die Hybridisierung fand über Nacht in einer feuchten Kammer bei 44°C statt. Pro untersuchten Fall wurde eine Hybridisierung mit Sense-Sonde als Negativkontrolle durchgeführt.

### **2.2.2.3. Posthybridisierung**

Die Schnitte wurden zweimal für 15 min. in 0,1%-iger Detergenzlösung (Triton X-100 in Trispuffer, 1xTBE) gewaschen und mit 1xTBE gespült. Es folgte ein Verdauungsschritt mit RNase (20 µg/ml) für 15 min., um überschüssige, unspezifisch gebundene Sonde zu eliminieren. Nach weiteren Waschschritten erfolgte die Detektion der Sonden durch Inkubation mit Alkalischer-Phosphatase-konjugierten Anti-Dig-Antikörpern in RPMI-Medium für 45 min. Anschließend werden die Schnitte für ca. 30 min. unter mikroskopischer Kontrolle entwickelt (Naphthol-As-bisphosphat und Neufuchsin) und mit Hämalaun gegengefärbt. Die Schnitte wurden entweder sofort weiterverwendet oder bei -80°C gelagert.

Tabelle3: Lösungen und Reagenzien für die RNA-in situ Hybridisierung  
(ribonukleasefrei/ DEPC-H<sub>2</sub>O)

- 
- DEPC-H<sub>2</sub>O: Acqua tridest. (Ultrapureinwasser) mit 0,1% DEPC-Zusatz über Nacht inkubiert und anschließend autoklaviert.
  - Digoxigenin-markierte EBER1 und EBER2-spezifische sense- und antisense-cRNA-Sonden.
    - Digoxigenin-11-2'-desoxy-Uridin-5'-Triphosphat (DIG-11-UTP), alkalistabil (Boehringer-Mannheim, Mannheim)
    - Restriktionsendonukleasen (Gibco BRL, Karlsruhe)
    - RNA-Polymerasen (Gibco BRL, Karlsruhe)
  - 100fache Denhardt'sche Lösung: 2% Ficoll 400, 2% Polyvinylpyrrolidon (PVP), 2% Rinderserumalbumin (bovine serum albumin, BSA) Fraktion V.
  - 50% Dextransulfat (DexSO<sub>4</sub>, Pharmacia Biotech, Freiburg): Dextransulfat/DEPC-H<sub>2</sub>O 1:2, erhitzt im 80°C Wasserbad, gemischt, zentrifugiert, Lagerung bei -20°C.
  - Formamid (deionisiert): pH 7,0: 0,1g Mischbett-Ionenaustauschharz (mixed bed-resin, Bio-Rad, München)/ml Formamid über Nacht gemischt, steril filtriert, gelagert bei -20°C.
  - 1M Glycin/PBS (phosphate buffered saline), (Merck, Darmstadt)
  - 10fach phosphatgepufferte Kochsalzlösung (phosphate-buffered saline, PBS): 1,3M NaCl, 70mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 30mM NaHPO<sub>4</sub> pH 7,2, eingestellt mit NaOH, autoklaviert.
  - Proteinase K: 40mg/ml, 4h bei 37°C vorverdaut (Zerstörung kontaminierender Enzyme), gelagert bei -20°C (Boehringer-Mannheim, Mannheim).
  - 10fach Salze: 5M NaCl, 1M Tris-HCl pH7,5, 1M NaPO<sub>4</sub> pH6,8 (1M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 1M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ca. 1:1), 0,5M EDTA pH8,0, 1xDenhardt'sche Lösung.
  - 10fach Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE): 890mM Tris/HCl pH 8,3, 890mM Borsäure, 25mM EDTA
  - RPMI-Medium: 50mg RPMI (Seromed), 40ml H<sub>2</sub>O, 50ml inaktives Rinderserum, 0,5g Natriumazid
  - 0,2M HCl/ DEPC-H<sub>2</sub>O
  - RNase 20µg/ml
  - Triton X
  - Xylol
  - Äthanol
-

## **2.3. Einzelzellisolierung**

Durch die hier eingesetzte Technik der Einzelzellisolierung ist es möglich, einzelne Zellen nach EBER-ISH aus den Gewebeschnitten zu isolieren. Mittels feiner Glaskapillaren werden die Zellen von ihren Nachbarzellen getrennt und über den Schnitt gehoben. Dann können sie in ein Reaktionsgefäß überführt werden. So liegen sowohl EBER-positive als auch EBER-negative Zellen nach der ISH getrennt vor und können weiter untersucht werden.

### **2.3.1. Durchführung**

#### **2.3.1.1. Anfertigung der Glaskapillaren für die Mikromanipulation**

Für die Einzelzellisolierung mittels Mikromanipulation waren geschlossene spitze Glaskapillaren zur Manipulation und offene, an der Innenseite silikonisierte Glaskapillaren zum Transport der Zellen notwendig. Für die Herstellung wurden Glaskapillaren von der Firma Narishige eingesetzt. Diese wurden in einem begrenzten Bereich in der Mitte der Kapillare stark erhitzt, gezogen und je nach Temperatur schmolz das Ende der Kapillare zu einer Spitze oder einer sehr dünnen Öffnung. Um eventuell auf den Kapillaren vorhandene DNase zu entfernen, wurden sie nach der Herstellung für zwei Stunden auf 200°C erhitzt.

#### **2.3.1.2. Präparation der Schnitte**

Die gefärbten und eingefrorenen Schnitte wurden langsam und schonend aufgetaut, in einer aufsteigenden Alkoholreihe rehydriert und abschließend mit Natrium- und Magnesium-freiem PBS-Puffer bedeckt. Jede Stunde wurde diese Pufferschicht erneuert, um Kontamination der Proben durch in den Puffer freigesetzte DNA zu minimieren.

### **2.3.1.3. Mikromanipulation**

Die eigentliche Mikromanipulation wurde am Mikroskop Nikon Diaphot 300 durchgeführt. Die offene und die geschlossene Kapillare wurden mithilfe einer Hydraulik durch zwei Joy-Sticks bewegt. Mit der spitzen Kapillare konnten einzelne Zellen von ihren Nachbarzellen und dem Objektträger gelöst werden, über den Schnitt gehoben und in die Öffnung der offenen Kapillare überführt werden, wobei die Spitze der spitzen Kapillare in der Öffnung der offenen Kapillare zerbrochen wurde. Wichtig war, dass sich in der offenen Kapillare zusätzlich zur Zelle nur eine minimale Menge Pufferlösung (ca. 0,05 - 0,1 µl) befand, um die Kontaminationsgefahr durch möglicherweise im Puffer vorhandene DNA zu minimieren. Die Öffnung der offenen Kapillare mit der Zelle darin wurde in einem 100 µl-Reaktionsgefäß mit 10 µl Proteinase-K-Lösung (1 mg/ml Wasser) zerbrochen. Nach Zentrifugation des Reaktionsgefäßes wurde die Zelle für eine Stunde bei 50°C verdaut.

Die isolierten Zellen wurden anhand morphologischer Kriterien ausgewählt. In einer Sitzung wurden immer sowohl EBER-positive als auch EBER-negative Zellen isoliert. Die positiven und negativen Zellen sollten so nahe wie möglich beieinander liegen. Es wurde darauf geachtet, dass ausschließlich Material der ausgewählten Zellen isoliert wurde und das Untersuchungsmaterial nicht durch Zellmaterial benachbarter Zellen verunreinigt wurde.

### **2.3.2. Kontrollen**

Die Spezifität der Einzelzellisolierung wurde durch zahlreiche Negativkontrollen überprüft. Nach jeder isolierten Zelle wurde Pufferlösung aus dem Gebiet der isolierten Zelle entnommen. Bei dieser Negativkontrolle wurde ca. die zehnfache Menge des Puffers eingesetzt, der normalerweise mit den isolierten Zellen entnommen wurde. Das

weitere Procedere mit dieser Pufferprobe war identisch mit dem der Zellen.

Versuchsreihen, bei denen mehr als einer der isolierten Pufferproben ein PCR-Amplifikat ergab, wurden von der Auswertung ausgeschlossen.

## **2.4. PCR**

### **2.4.1. Etablierung**

Um einen Genabschnitt in einer einzelnen Formalin-fixierten Zelle mittels PCR amplifizieren zu können, muss die gewählte Sequenz so kurz wie möglich sein. Durch die Formalin-Behandlung des Gewebes entstehen Strangbrüche in und Quervernetzungen zwischen den DNA-Molekülen. Diese Strangbrüche und Quervernetzungen machen eine Amplifizierung dieses Abschnittes unmöglich. Mit zunehmender Länge des Amplifikates nimmt die Wahrscheinlichkeit zu, dass sich im Bereich zwischen den Primer-Bindungsstellen solche Brüche oder Querverbindungen befinden, so dass die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen PCR mit zunehmender Amplifikatlänge sinkt.

Deshalb wählten wir einen Abschnitt, der

- a) möglichst kurz ist, um die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Strangbrüchen und Quervernetzungen in diesem Bereich niedrig zu halten und
- b) innerhalb einer repetitiven Sequenz innerhalb des EBV-Genomes liegt und so auch bei Vorhandensein nur eines einzigen EBV-Genoms mehrmals vorhanden ist.

Anhand der Gensequenz wählten wir Primer, die innerhalb der "terminal repeats" des Episoms liegen. Um höchstmögliche Sensitivität und Spezifität zu erzielen, konstruierten wir eine „full-nested“ PCR. Hier entsteht in einer ersten Amplifikationsrunde ein Primäramplifikat, welches in einer zweiten Amplifikationsrunde (Reamplifikation) als Template dient. Die Bindungsstellen der Primer für die zweiten Amplifikationsrunde liegen

innerhalb des Primärampifikats, so dass ein kürzeres Sekundärampifikat entsteht. Durch die große Menge an spezifischem Template in der Reamplifikation erhält man eine sehr große Menge Sekundärampifikat mit relativ geringem Anteil an unspezifischen Reaktionsprodukten.

#### Primersequenzen

##### **Primärampifikation:**

EBV-SCup: 5'- GAT TTG GAC CCG AAA TCT GA (Position 17077-17096 auf dem EBV-Episom)

EBV-SClow: 5'- TGG GGG CTT ATT CCT CTT TT (Pos. 17275-17256)

##### **Reamplifikation:**

EBV-SCRup: 5'- AAA ACT TTA GAG GCG AAT GGG (Pos. 17136-17156)

EBV-SCrlow: 5'- GCG CAG CCA ACC ATA GAC (Pos. 17235-17218)

### **2.4.1.1. Etablierung der Einzelzell-PCR an Zelllinien-DNA**

Nach der Auswahl der Primer wurden die Reaktionsbedingungen für die PCR optimiert. DNA-Extrakte aus EBV-infizierten Zelllinien (Zelllinie Raji, enthält ca. 45 EBV-Episome pro Zelle, Zelllinie Namalva, enthält 2 Episome EBV pro Zelle) dienten als Substrat. Für die Sensitivität entscheidende und individuell verschiedene Reaktionsparameter einer PCR sind die Konzentration an Magnesiumchlorid (Kofaktor für die Polymerase) im Verhältnis zur eingesetzten Polymerase, die Konzentration von dNTPs und die Temperaturen der einzelnen Reaktionsschritte. Diese Parameter wurden optimiert und dieser speziellen EBV-PCR angepasst.

Folgende Reaktionsbedingungen zeigten sich für eine sensitive und spezifische Amplifizierung von EBV-DNA in einzelnen Zellen als am besten geeignet:

Beide Schritte der PCR fanden in einem Gesamtvolumen von 100 µl statt.

Der Reaktionsmix enthielt folgende Bestandteile:

Tabelle 4: Reaktionsmix für die Einzelzell-PCR:

- 
- 10x Puffer (10  $\mu$ l)
  - 1,75 mM MgCl<sub>2</sub>
  - jeweils 15 pmol Primer (TibMolbiol, Berlin)
  - 4x200  $\mu$ mol dNTP (Perkin Elmer, Weiterstadt)
  - zwei Units DNA-Polymerase (AmpliTaq, Perkin Elmer, Weiterstadt)
  - Substrat (DNA aus der isolierten Zellen, Wasser, DNA-Extrakt oder 1  $\mu$ l des Primäramplifikats)
- 
- 10x Puffer ohne MgCl<sub>2</sub>
    - 500 mM KCl
    - 100 mM Tris Puffer
    - Gelatine 1%

Die PCR fand in Thermocyclern der Firma Perkin-Elmer (Modell GeneAmp PCR System 9600) statt. Die Primäramplifikation begann mit einem zehnminütigen Denaturierungsschritt bei 96°C, es folgten 15 Zyklen mit je 15 sec. bei 96°C zur Denaturierung, 30 sec. bei 63°C zur Anlagerung der Primer an die DNA („annealing“) und 30 sec. bei 72°C zum Aufbau des komplementären DNA-Stranges („elongation“). Nach diesen 15 Zyklen folgten 35 äquivalente Zyklen allerdings mit einer Annealingtemperatur von 57°C. Anschließend fand eine zehnminütige Elongation bei 72°C statt. Die Reamplifikation bestand aus einer zehnminütigen Denaturierungsphase bei 96°C, gefolgt von 40 Zyklen aus Denaturierung, Annealing und Elongation mit einer Annealingtemperatur von 63°C bei ansonsten gleichen Temperaturen und Zeiten wie bei der Primäramplifikation. Abschließend folgte wieder eine zehnminütige Elongation bei 72°C.

Sechs Mikroliter des Reamplikates wurden zusammen mit Pufferlösung auf ein 6%-iges Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Auf jedem Polyacrylamid-Gel wurde parallel zu den Reamplikaten ein Größenstandard aufgetragen, der eine Bestimmung der Größe der Amplifikate ermöglicht. Bei einer

Spannung von 200 mV wurden die Amplifikate und der Standard ca. 30 min. elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend durch Färbung mit Ethidiumbromid im UV-Licht sichtbar gemacht.

#### **2.4.1.2. Etablierung an isolierten Einzelzellen**

Die eingesetzte EBV-Einzelzell-PCR wurde an Zellen der BL-Zelllinie Namalwa getestet. Die Zellen dieser Zelllinie enthalten zwei episomale Kopien des EBV-Genoms und boten damit die Möglichkeit, die Sensitivität der PCR in Bereichen von wenigen EBV-Kopien zu testen.

Nach Kultivierung und Vermehrung der Zellen in einer Zellkultur wurde eine dünne Schicht Zellen auf einen Objektträger aufgetragen (Cytospin) und für zwei Stunden in 4%-igem Formalin fixiert. Danach wurden die Objektträger mit Puffer (PBS ohne Ca und Mg) bedeckt und einzelne Zellen wurden durch Mikromanipulation isoliert.

Durch die Optimierung der PCR konnten wir Bedingungen schaffen, die eine zuverlässige Amplifikation des EBV-Genoms der Namalwa-Zellen in 70% der Zellen ermöglichte.

#### **2.4.2. Positiv- und Negativkontrollen**

Um die Validität und Spezifität des EBV-Nachweises zu sichern, wurden in jeder Versuchsreihe zahlreiche Positiv- und Negativkontrollen durchgeführt. Eine potentielle Fehlerquelle bei der Einzelzell-PCR war die Kontamination der Probe durch DNA, die aus den Zellen der Gewebeschnitte in die Pufferlösung diffundiert und beim Transport der Zelle mit in das Reaktionsgefäß gelangt. Um diese Möglichkeit der Kontamination zu prüfen, wurde nach jeder isolierten Zelle eine deutlich größere (ca. die zehnfache) Menge an Puffer direkt über dem bearbeiteten Zellareal entnommen (Pufferprobe). Waren in einer Sitzung mehr als eine der Pufferproben EBV-positiv, wurden die gesamten Ergebnisse dieser Sitzung nicht in die Auswertung miteinbezogen.

Mit allen isolierten Zellen und Pufferproben wurde direkt nach dem Proteinase K-Verdau die PCR durchgeführt. Um eine Kontamination der

Proben nach der Zellisolierung beispielsweise über den Reaktionsmix der PCR auszuschließen, wurden in die PCR immer drei Proben eingeschlossen, die ausschließlich Wasser enthielten. Im Falle eines positiven Ergebnisses bei diesen Proben wurde die gesamte Reaktion nicht ausgewertet.

Schließlich mussten noch falsch negative Versuchsergebnisse ausgeschlossen werden. So wurden in jedem PCR-Untersuchungsgang parallel zu den Proben DNA aus EBV-infizierten Zelllinien in unterschiedlichen Konzentrationen mit untersucht.