



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 600 28 393 T2** 2007.06.14

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 218 743 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 28 393.3**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US00/20354**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **00 953 685.5**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2001/007915**

(86) PCT-Anmeldetag: **26.07.2000**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **01.02.2001**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **03.07.2002**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **31.05.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **14.06.2007**

(51) Int Cl.⁸: **G01N 33/543** (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

145613 P 26.07.1999 US

(73) Patentinhaber:

**The Government of the United States of America
as represented by the Secretary, Department of
Health and Human Services, Rockville, Md., US**

(74) Vertreter:

BOEHMERT & BOEHMERT, 28209 Bremen

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:

**EMMERT-BUCK, R., Michael, Silver Spring, MD
20904, US**

(54) Bezeichnung: **SCHICHTVORRICHTUNG MIT EINFANGBEREICHEN ZUR ZELLULÄREN ANALYSE**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung**GEBIET DER ERFINDUNG**

[0001] Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf die Separation und Identifizierung von Komponenten von zellulären Proben. Insbesondere schließt die vorliegende Erfindung Expressions-Scanning und insbesondere Beispiele eines Verfahrens zur Identifizierung von Proben-Komponenten ein, während die räumliche Beziehung zwischen dem Ort der Proben-Komponente von Interesse und dem Rest der Probe aufrecht erhalten wird.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Das Human Genome Project und andere Initiativen zur Entdeckung von Genen erhöhen dramatisch die Information, welche in Bezug auf die Anzahl, die genomische Lokalisierung und die Sequenzen humaner Genen erhältlich ist. Die wachsende Basis genetischen Wissens begleiten einige neue Technologien, die auf Hochdurchsatz-mRNA und proteomische Analyse von biologischen Proben ausgerichtet sind, was einen globalen Blick auf die Gene und Genprodukte, die normale Physiologie und pathologische Zustände reflektieren, erlaubt. Wenn sie zusammen zu Nutze gemacht werden, bieten die wachsende genetische Datenbank und die sich neu entwickelnden Analyse-Technologien ein enormes Potential, um das Verständnis von normaler zellulärer Physiologie und den molekularen Veränderungen, welche Krankheitszuständen zu Grunde liegen, zu erhöhen. Jedoch verbleiben viele biologische Proben, wie z.B. Gesamtzellgewebe-Proben, aufgrund ihrer komplexen zellulären Heterogenität einmalig schwierig zu analysieren.

[0003] Der erste Bericht über die direkte Auftragung von Gewebesektionen auf Papierstreifen und nachfolgende Elektrophorese wurde von Lindner et al. (1956) gemacht. Später verwendeten Saravis et al. (1979) Agarosegele und verwendete Bonte (1978) Polyacrylamidgele, um eine bessere Separation der analysierten Proteine zu erzielen. Wie in einem Review von Neuhoﬀ (1980) berichtet wurde, war die Routine-Anwendung dieser Verfahren für Gesamtzellgewebe aufgrund von technischen Schwierigkeiten nicht weit verbreitet, so dass Verfahren vorherrschend waren, die die Extraktion der Proteine aus der Probe durch Zell-Lyse vor der Separation verwendeten.

[0004] Erst kürzlich beschrieben Inczedy-Marcsek et al. (1988) die Verwendung von Elektrophorese und isoelektrischer Fokussierung von Kryostatproben, die direkt auf ultradünne Polyacrylamidgele platziert wurden. Die Verwendung von ultradünnen Gelen erlaubte die Extraktion der Proteine aus der Gewebeprobe ohne Lyse der Zellen der Probe und überwand einige der technischen Schwierigkeiten, die die frühen Tätigen auf diesem Gebiet erfuhren. Schumacher et al. (1990) beschreiben ebenso die Verwendung von isoelektrischer Fokussierung, um Enzyme, Glycoproteine und Neuropeptide zu identifizieren, die in Kryostat-Sektionen vorhanden sind. Dieser Prozess schloss die direkte Platzierung der Probe auf ultradünne Gele, gefolgt von isoelektrischer Fokussierung ein. Die Verfahren von sowohl Inczedy-Marcsek et al. und Schumacher et al. produzieren Gele, in welchen sich die Proteine oder andere Moleküle von Interesse, gemäß den physikalischen Eigenschaften, die mit der Ladung und dem Molekulargewicht zusammenhängen, durch das Gelmedium bewegen. Diese Ansätze stellen jedoch nur Information über den molekularen Gesamtgehalt der zu analysierenden Probe zur Verfügung, was die Aggregat-Proteine und Nukleinsäuren repräsentiert, die in allen der verschiedenen Zelltypen vorhanden sind, die in der Probe vorhanden sind.

[0005] Isofokussierungs- und Elektrophorese-Verfahren, wurden für Kryostat-Gewebeproben, gefolgt von immunochemischer Analyse, offenbart. Insbesondere beschreiben Schumacher und Schumacher und Trudrung (1991) und van der Sluis et al. (1988) die Identifizierung von alkalinen Phosphatasen bzw. Peptiden, wie zum Beispiel Vassopressin, durch direkte Gewebe-isoelektrische Fokussierung gefolgt von Western Blotting. Diese immunochemische Analyse-Technik schließt die Bewegung des Proteins oder der Moleküle von Interesse durch Kapillarkwirkung aus dem Fokussierungsgel in Nitrozellulose-Membranen ein. Das Membran-gebundene Protein wird dann unter der Verwendung von Immuno-Färbeverfahren detektiert. Van der Sluis et al. (1988) versuchten, die Proteine innerhalb der Gewebeprobe durch Anwendung dieses Verfahrens auf eine Reihe von geschnittenen Gewebe-Sektionen generell zu lokalisieren. Jedoch ging dem Immunodetektions-Prozess ein Isofokussierungs-Schritt voraus, so dass die Ergebnisse nur die Anwesenheit des Proteins innerhalb einer bestimmten Gewebeprobe anzeigten.

[0006] Eine molekulare Analyse von Zellpopulationen in Gewebe-Sektionen wurde durchgeführt unter der Verwendung von Immunohistochemie (ICH) und in-situ Hybridisierung (ISH). Die ISH-Technik wird von Jin und Lloyd (1997) im Überblick dargestellt und die IHC-Technik wird von Grogan (1992) im Überblick dargestellt.

Während diese Techniken wertvolle Werkzeuge sind, um die zelluläre Lokalisierung eines bestimmten Proteins oder mRNA in einer komplexen Gewebe-Sektion zu untersuchen, leiden beide unter 3 hauptsächlichen Nachteilen. Erstens sind IHC und ISH limitiert auf die Analyse einer einzelnen molekularen Spezies pro Probe. Zweitens beeinflusst Artefakt-Färbung, welche auf Kreuz-Hybridisierung basiert, die Genauigkeit der Testergebnisse schwerwiegend. Letztendlich haben diese Methoden eine limitierte Fähigkeit, Proteine und mRNAs zu visualisieren, die in moderaten oder niedrigen Spiegeln der Abundanz exprimiert werden.

[0007] Es wurden Techniken für das Separieren von bestimmten Teilsätzen von Zellen aus einer Gesamtgewebeprobe offenbart. Zum Beispiel beschreiben Emmer-Buck et al. (1996) die Verwendung von Laser-basierten Microdissektions-Techniken um rasch mikroskopische, histopatologisch definierte Zell-Populationen zu erzielen. Alternativ dazu, erlauben Gewebe-Arrays, wie diejenigen, die von Kononen et al. (1998) beschrieben wurden, dass individuelle Moleküle simultan in Hunderten von separaten Gewebeproben studiert werden können. Jedoch verbleibt im Stand der Technik Bedarf für eine verbesserte Methode zur Analyse von Proteinen oder anderen Molekülen von Interesse, die in zellulären Proben vorkommen, wobei die Methode in der Lage ist, in einigen Ausführungsformen Information zur Verfügung zu stellen in Bezug auf den Ort der Proteine oder Moleküle von Interesse in der initialen Gewebeprobe, und/oder eine Methode zur Verfügung zu stellen, die einige der Probleme vermeidet, die man mit IHC und ISH antrifft.

[0008] WO 98/41863 A offenbart eine Methode zur Durchführung von mindestens 2 simultanen Tests unter der Verwendung einer stationären Test-Media-Vorrichtung. US 5,486,452 A offenbart eine Methode für die immunologische Analyse. WO 99/67647 und US 5,057,438 offenbaren Multischicht-Vorrichtungen für die immunologische Analyse, beziehen sich aber nicht auf den Ort der Proteine oder Moleküle in der initialen Probe. WO 99/67647 ist Stand der Technik gemäß Art. 54(3) EPÜ.

ZUSAMMENFASSUNG DER OFFENBARUNG

[0009] Die vorliegende Offenbarung beschreibt Verfahren, Systeme und Vorrichtungen für die Analyse einer biologischen Probe, wie zum Beispiel einer zellulären Probe. Das Verfahren schließt ein Verfahren für die Analyse einer zellulären Probe ein, umfassend:

Platzieren der zellulären Probe auf ein Substrat, umfassend mindestens zwei verschiedene überlagernde Einfang-Regionen, ein Substrat, umfassend mindestens zwei verschiedene überlagernde Einfang-Regionen, wobei jede Einfang-Region eine Schicht ist und die verschiedenen Einfang-Regionen des Substrates verschiedene Identifizierungs-Moleküle enthalten, welche mit den verschiedenen biologischen Molekülen aus der zellulären Probe wechselwirken und wobei die zelluläre Probe intakte Zellen oder Zell-Lysate umfasst; und Übertragen von Komponenten der intakten Zellen oder Zell-Lysate durch die Einfang-Regionen unter Bedingungen, welche den Komponenten erlauben, mit den verschiedenen Identifizierungs-Molekülen in den verschiedenen Einfang-Regionen des Substrates zu wechselwirken, so dass die übertragenen Komponenten Positionen aufweisen, die den Positionen der intakten Zellen oder Zell-Lysate entsprechen, um ein Muster zu produzieren, welches eine Entsprechung mit einer zweidimensionalen Architektur der zellulären Probe bewahrt, und wobei eine geometrische Entsprechung der übertragenen Komponenten mit den intakten Zellen oder Zell-Lysaten hergestellt wird, wobei dadurch die zelluläre Probe analysiert wird.

[0010] In einer Ausführungsform werden die Komponenten der zellulären Probe durch das Substrat (wie zum Beispiel Matrizen oder Schichten eines Substrates) durch Elektrophorese oder durch Kapillarwirkung eines Transferpuffers übertragen, der sich durch die zelluläre Probe bewegt. In spezifischen Beispielen werden die Komponenten sequentiell durch eine Vielzahl von substantiell parallelen Schichten übertragen.

[0011] Der Transfer der Komponenten einer zellulären Probe durch das Substrat kann geschehen, während die zelluläre Architektur der Probe erhalten wird, wenn erwünscht. Weil die zelluläre Architektur der Probe in einigen Ausführungsformen erhalten werden kann, kann eine Korrelation zwischen dem Ort der verschiedenen Identifizierungs-Moleküle, die mit den zellulären Komponenten interagieren, und dem originalen Ort der zellulären Komponente innerhalb der zellulären Probe etabliert werden. Die Analyse kann mit einer oder mehreren verschiedenen diskreten zellulären Proben auf einer Oberfläche des Substrats durchgeführt werden. Beispiele für zelluläre Proben schließen ein, sind aber nicht limitiert auf Gewebe-Sektionen (insbesondere Tumorgewebe-Sektionen), eine Zytologieprobe, mikrodissektierte Zellen und kultivierte Zellen. Zytostat-Gewebe-Sektionen, die geringfügig dicker als gewöhnlich geschnitten sind, das ist ungefähr 25 bis ungefähr 50 µm, verbessern die Detektion der Moleküle mit moderaten und geringen Spiegeln der Abundanz.

[0012] Die Regionen (Schichten) des Substrats können eine Anzahl in einem Bereich von ungefähr 1 bis mehr als einhundert, zum Beispiel mehrere hundert, mehrere tausend oder mehrere zehntausend haben, wobei jede

Region (eine Schicht) eine Dicke von (zum Beispiel) mindestens ungefähr 25 nm aufweist. Die Regionen erstrecken sich über das Substrat (Schichten) und Komponenten der Probe transferieren im Allgemeinen quer zu den Schichten, sie können aber auch in anderen Winkeln zu den Schichten übertragen werden. Identifizierungs-Moleküle, die in den Substratschichten vorhanden sind, können zum Beispiel Antikörper sein, welche mit den Komponenten der zellulären Probe interagieren, und können verwendet werden, um bestimmte Moleküle von Interesse, die in der Probe vorhanden sind, zu identifizieren. Andere repräsentative, nicht limitierende Beispiele für Identifizierungs-Moleküle schließen Nukleinsäuren, Peptide, Rezeptoren und Liganden ein. Die Identifizierungs-Moleküle können zum Beispiel ein Einfang-Molekül umfassen, das eine Komponente der Probe in der Schicht hält. Wenn dies geschieht, kann die Analyse durch Aussetzen des Identifizierungs-Moleküls gegenüber einem Detektions-Molekül vervollständigt werden, das mit einer Kombination des Einfang-Moleküls und der Komponente der Probe assoziiert oder das mit einer Region der Komponente assoziiert, die verschieden ist, zu der Region, die durch das Identifizierungs-Molekül erkannt wird. Zum Beispiel kann das Molekül von Interesse ein Protein sein und das Identifizierungs-Molekül kann eine erste Domäne des Proteins erkennen und das Detektions-Molekül erkennt eine zweite Domäne des Proteins.

[0013] Eine andere bestimmte Ausführungsform ist eine Methode zur Analyse einer Probe durch das zur Verfügung stellen eines Substrates, welches verschiedene Regionen (Schichten) beinhaltet, die benachbarte Flächen aufweisen, wobei jede Schicht ein korrespondierendes Einfang-Molekül beinhaltet, welches zur Interaktion mit und zum Einfangen einer Komponente der Probe fähig ist; Auftragen der Probe auf eine Fläche des Substrates und Übertragen der Komponenten (wie zum Beispiel intakte Komponenten) der Probe durch die benachbarten Flächen der verschiedenen Schichten der Matrix. Die Komponenten der Probe reagieren mit dem Einfang-Molekül und das Muster des Einfanges in den verschiedenen Schichten kann mit der Information über die Probe korreliert werden. Zum Beispiel zeigt die Interaktion mit einem spezifischen Antikörper in einer bestimmten Schicht die Anwesenheit des Antigens in der Probe an. Der Ort der Interaktion in einer Schicht kann mit einer Position der Probe korreliert werden. Im Falle von zellulären Proben kann die zelluläre Architektur einer Gewebeprobe, aus welcher die Probe entnommen wurde, erhalten werden, um eine Korrelation zwischen dem Muster des Einfanges und einer zellulären oder sub-zellulären Komponente der Probe zu erlauben.

[0014] Das Einfang-Molekül, welches in einigen Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung verwendet wird, hat die Fähigkeit, den Transfer von mindestens einigen eines oder mehrerer Moleküle von Interesse, die in der Probe vorkommen, in eine Stromab-Region (eine Schicht) des Substrats zu inhibieren. In einigen Ausführungsformen resultiert die Methode in einem Muster des Einfanges, welches als eine Pluralität von zweidimensionalen Mustern gesehen werden kann, die, wenn sie gestapelt werden, eine dreidimensionale Matrix bilden. Die zweidimensionalen Muster können in spezifischen Ausführungsformen zellkohärent sein, so dass die Muster das Muster der Expression oder die Anwesenheit des Moleküls von Interesse innerhalb der Probe reflektieren. Wenn die Probe eine zelluläre Probe ist und die zweidimensionalen Muster zellkohärent sind, kann die dritte dimensionale Matrix des Einfangs mit spezifischer zellulärer Architektur in einer zellulären Probe korreliert werden. Da die Anwesenheit von Proteinen oder mRNA mit der Expression von bestimmten Genprodukten assoziiert ist, kann der Scan in einigen Ausführungsformen als ein Expressions-Scan bezeichnet werden.

[0015] Eine Vorrichtung für die Analyse einer Probe, wobei diese Vorrichtung ein Substrat einschließt, das verschiedene übereinander gelagerte Regionen (wie z.B. Matrizen oder Schichten) enthält, das eine Oberfläche aufweist, auf welche die Probe aufgebracht werden kann, und das in einer räumlichen Kohärenz, wie zum Beispiel Zellkohärenz, beibehalten wird, kann für die oben erwähnte Methode verwendet werden. In solchen Beispielen enthalten aufeinanderfolgende Regionen (Schichten des Substrates) verschiedene Identifizierungs-Moleküle, wovon jedes in der Lage ist, mit einer korrespondierenden intakten Komponente der Probe zu interagieren und diese zu halten, sogar wenn die zelluläre Probe nicht vorheriger proteolytischer, nukleolytischer oder anderer Degradation vor dem Transfer durch die Substratschichten ausgesetzt war. Die Vorrichtung kann Substratschichten aufweisen, die zusammenhängend und leitfähig sind und die in der Lage sind, intakte Komponenten der zellulären Probe durch die Schichten zu übertragen, während eine Korrespondenz zwischen einer Position auf einer Oberfläche des Substrates und einer Position in dem Substrat aufrecht erhalten wird, zu welcher die Komponente übertragen wird. Alternativ dazu können die Schichten auch separiert sein (insbesondere wenn die Komponenten mittels Elektrophorese übertragen werden).

[0016] In bestimmten Beispielen ist das Substrat strukturiert, um in der Lage zu sein, Kapillardruck auf die Probe auszuüben, um die Komponente durch das Substrat zu übertragen, wobei ein Beispiel für solch eine Struktur ein Stapel von Nitrozellulose-Membranen ist. Wenn Bewegung mittels Elektrophorese gewünscht wird, schließt die Vorrichtung Elektroden ein, die in Beziehung zu dem Substrat positioniert sind, um einen elektrischen Strom durch das Substrat einzubringen, z.B. durch die verschiedenen Schichten eines Substrates. In solch einer Ausführungsform bewegt der elektrische Strom die Komponenten von Interesse aus der Probe

durch ein oder mehrere Schichten des Substrates. Wenn Bewegung durch Mittel eines Flüssigkeitsdruck-Differentials angewendet wird, schließt die Vorrichtung ein Mittel für die Etablierung und Aufrechterhaltung eines Flüssigkeitsdruck-Differentials über die Substratschichten ein.

[0017] In einem anderen Aspekt kann ein System für die molekulare Analyse einer biologischen Probe, wie zum Beispiel einer zellulären Probe, für die oben erwähnte Methode verwendet werden. Das System kann zum Beispiel enthalten: einen Probenträger, multiple zusammenhängende Separationsregionen, Schichten, ein Transportmittel und mindestens zwei Gehäuse übereinander gelagert. Der Probenträger ist in der Lage, die Probe während der Bewegung einer Komponente der Probe von der Probe durch die Separationsregionen zu halten. Die Separationsregionen können zum Beispiel ausgerichtet sein (zum Beispiel gestapelt) von Fläche zu Fläche („face to face“) und jede Region, d.h. eine Schicht, schließt Einfang-Moleküle ein, welche in der Lage sind, mit einer oder mehreren Komponenten der Probe zu hybridisieren. Das Transportmittel des vorliegenden Systems kann mindestens eine Komponente der Probe von dem Probenträger durch die Flächen und in die Separationsmatrizen bewegen. Das Transportmittel kann zum Beispiel Kapillarwirkung, ein Flüssigkeitsdruck-Differential oder ein Elektrodenpaar einschließen, welche einen elektrischen Strom durch die Matrizen schaffen.

[0018] Ein Beispiel eines spezifischen Gehäuses des vorliegenden Systems hält multiple Separations-Matrizen in einer Fläche-zu-Fläche-Ausrichtung („face to face alignment“) während der Bewegung der Probenkomponenten, aber erlaubt die Separation der multiplen Separations-Matrizen von einander, so dass weitere Analyse durchgeführt werden kann. Das zweite Gehäuse ist die Stelle für die weitere Analyse der Hybridisierung zwischen dem Einfang-Molekül und der Komponente von Interesse aus der zellulären Probe.

[0019] Die vorangehenden und weiteren Objekte, Merkmale und Vorteile der Erfindung werden aus der folgenden detaillierten Beschreibung von mehreren Ausführungsformen deutlich werden, was mit Bezug auf die begleitenden Figuren stattfindet.

KURZE BESCHREIBUNG DER FIGUREN

[0020] [Fig. 1](#) ist eine Illustration einer Prostata-Sektion, die zeigt, wie auf verschiedene Gebiete der Prostata und auf verschiedene Zell-Population für die Analyse unter der Verwendung der vorliegenden Erfindung abgezielt werden kann. In dieser besonderen Ausführungsform wird die Methode geschichtetes Expressions-Scanning („Layered Expression Scanning“) (LES) bezeichnet.

[0021] [Fig. 2A](#) ist eine schematische Zeichnung des Verfahrens der vorliegenden Erfindung. Drei verschiedene Typen von Ausgangsproben werden gezeigt: eine Gesamtfassungs-Gewebeprobe („whole mount issue specimen“); dissektierte, intakte Zellen und dissektierte lysierte Zellen. Diese [Fig. 2A](#) schließt auch einen vergrößerten perspektivischen Blick auf ein Beispiel eines Substrates der vorliegenden Erfindung ein, welches multiple zusammenhängende poröse Schichten aufweist, wobei jede Schicht ein verschiedenes Identifizierungs-Molekül darin gebunden aufweist.

[0022] [Fig. 2B](#) zeigt eine Ausführungsform des Substrates, die ähnlich ist zu derjenigen, die in [Fig. 2A](#) gezeigt ist, aber wo die individuellen Schichten separiert sind.

[0023] [Fig. 3](#) präsentiert einen Satz an Photomikrographen, welche die Retention der zweidimensionalen Architektur einer Gesamtfassungs-Gewebeprobe während des Transfers durch multiple Einfang-Schichten illustriert. Die Figuren zeigen eine intakte Sektion von Prostata-Gewebe ([Fig. 3B](#)) und eine Aufnahme nach ([Fig. 3A](#)) Kapillartransfer durch Einfang-Membranschichten, wobei jede Schicht einen verschiedenen Typ von Antikörper überall in ihr gebunden aufweist. Die Gesamtfassungs-Sektion einer humanen Prostata repräsentiert einen Querschnitt des gesamten Organs, welche auf eine oberste Schicht von zehn Einfang-Schichten platziert wurde, danach durch die Schichten und auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert wurde. Die Membran wurde nachfolgend ähnlich zu einem Standard-Immunoblot weiterverarbeitet, unter der Verwendung eines Antikörpers gegen Zytokeratin, welcher selektiv Epithelium färbt ([Fig. 3A](#)). Die Retention der grundlegenden Organisation der Gewebe-Sektion während des gesamten Transfer-Prozesses wird demonstriert durch den Vergleich von [Fig. 3A](#) mit [Fig. 3B](#), welche ein mit Hämatoxylin und Eosin gefärbter Objektträger eines benachbarten Nachschnitts aus dem selben Gewebeblock ist. Die Retention der Gewebe-Sektions-Architektur nach dem Transfer durch 100 Einfang-Schichten wird auch durch den Vergleich von [Fig. 3C](#) mit [Fig. 3D](#) demonstriert, welche die mit dem Anti-Zytokeratin-Antikörper gefärbte Nitrozellulose-Schicht, die nach dem Transfer einer Gesamtfassungs-Gewebesektion durch 100 Schichten erhalten wird, bzw. einen mit Hämatoxylin und Eosin gefärbten Objektträger eines benachbarten Nachschnitts aus dem selben Gewebeblock zeigen.

[0024] [Fig. 4A](#) ist ein Diagramm, welches das Färbemuster illustriert, das in einer Einfang-Schicht, die mit einem Anti-PSA-Antikörper verbunden ist, erhalten wird, nachdem fünf Zell-Lysatproben (wovon nur eine PSA enthält) und eine positive Kontrolle von gereinigtem PSA als diskrete 4 mm-Spots durch zehn Einfang-Membranen passiert wurden, wobei jede Einfang-Membran mit einem verschiedenen Antikörper verbunden ist.

[0025] [Fig. 4B](#) ist ein Diagramm, welches das Färbemuster illustriert, das erhalten wird, wenn jede individuelle Schicht eines Stapels von zehn LES-Schichten separat mittels Elektrophorese auf PSA analysiert wurde.

[0026] [Fig. 4C](#) ist ein Diagramm, welches das Färbemuster illustriert, das erhalten wurde, nachdem jede individuelle Schicht eines Stapels von 100 LES-Schichten separat mittels Elektrophorese auf PSA analysiert wurde.

[0027] [Fig. 4D](#) ist ein Diagramm, welches die Ergebnisse der Gel-Zymographie illustriert, die erhalten wurden, nachdem mmp-2 durch 100 LES-Schichten transferiert wurde.

[0028] [Fig. 5](#) zeigt die Autoradiogramme, die für zehn LES-Schichten und eine Nitrozellulose-Membran erhalten wurden, nachdem radiomarkierte PCR-Produkte von pov1- und β -Aktin-Transkripten als diskrete Spots durch zehn Einfang-Schichten übertragen wurden. Schicht 5 war mit einem Plasmid verbunden, welches die gesamte pov1 cDNA enthält. Eine nichtblockierte Nitrozellulose-Membran (gezeigt ganz oben) wurde verwendet, um nicht eingefangene Transkripte zu binden, nachdem sie den Satz von Schichten durchlaufen hatten.

[0029] [Fig. 6](#) ist eine schematische Zeichnung, die ein initiales Gel mit zwanzig verschiedenen Proben, welche durch zehn Schichten (A bis J) passiert werden, und das PSA-Färbemuster der zehnten Schicht zeigt.

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER VERSCHIEDENEN AUSFÜHRUNGSFORMEN

[0030] Diese detaillierte Beschreibung offenbart ein Verfahren zur Analyse einer zellulären Probe, umfassend:

Bringen der zellulären Probe auf ein Substrat, umfassend mindestens zwei verschiedene überlagernde Einfang-Regionen, wobei jede Einfang-Region eine Schicht ist und die verschiedenen Einfang-Regionen des Substrates verschiedene Identifizierungs-Moleküle enthalten, welche mit verschiedenen biologischen Molekülen aus der zellulären Probe wechselwirken und wobei die zelluläre Probe intakte Zellen oder Zell-Lysate umfasst; und

Übertragen von Komponenten der intakten Zellen oder Zell-Lysate durch die Einfang-Regionen unter Bedingungen, welche den Komponenten erlauben, mit den verschiedenen Identifizierungs-Molekülen in den verschiedenen Einfang-Regionen des Substrates zu wechselwirken, so dass die übertragenen Komponenten Positionen aufweisen, die den Positionen der intakten Zellen oder Zell-Lysate entsprechen, um ein Muster zu produzieren, welches eine Entsprechung mit einer zweidimensionalen Architektur der zellulären Probe bewahrt, und wobei eine geometrische Entsprechung der übertragenen Komponenten mit den intakten Zellen oder Zell-Lysaten hergestellt wird, wobei dadurch die zelluläre Probe analysiert wird.

[0031] Die verschiedenen Regionen können eine Vielfalt von Formen annehmen, wie zum Beispiel separat identifizierbare Substrat-Untereinheiten, einschließlich einer Matrix, in welcher die Identifizierungs-Moleküle suspendiert oder angelagert sind. Eine Matrix ist nicht notwendigerweise ein regulärer Array, sondern bezieht sich stattdessen auf eine Einheit, die eine relativ niedrige Tiefe und eine Fläche mit Weite und Länge aufweist. Die Fläche der Matrix kann parallel, quer oder in einem anderen Winkel zu der Richtung der Bewegung der Probe durch das Substrat sein. Die Matrix kann sich vollständig oder teilweise quer durch das Substrat ausweiten und die verschiedenen Matrizen können von im Wesentlichen einheitlichen oder unterschiedlichen (wie z.B. Weite und Länge und Tiefe) sein. Die Matrix ist eine Schicht, die eine einer Serie von diskreten dünnen Schichten („strata“) ist, welche voneinander separierbar sind oder welche nicht voneinander separierbar sind. Obwohl es klar sein sollte, dass das Substrat viele verschiedene Formen annehmen kann, wird für die Zwecke der Illustration das Substrat in Assoziation mit einem geschichteten Substrat beschrieben werden, in welchem die Schichten physisch voneinander separiert werden können.

[0032] Die biologischen Proben (wie z.B. Gewebe-Sektionen oder andere Zell-Populationen, welche hierin als zelluläre Proben bezeichnet werden) werden in multiple geschichtete Substrate separiert, so dass jede der Schichten einer separaten Analyse unterzogen werden kann, welche mit der zytologischen Architektur der Originalprobe korreliert werden kann. Die Prostata-Gewebe-Sektion von [Fig. 1](#) illustriert, wie intakte Gewebe-Sektionen verschiedene mikroskopische Variationen aufweisen können, welche nützlicher Weise mit den Ergebnissen der verschiedenen Analysen korreliert werden können. [Fig. 1](#) zeigt eine Sektion von Prostata-Ge-

webe, welche aufweist: ein Gebiet 1 von Lymphozyten, die nicht mit Tumor assoziiert sind; Gebiet 2 von normalem Epithelium, benachbart zum Tumor; Gebiet 3 von Niedriggrad-Tumor; Gebiet 4 von Stroma; Gebiet 5 von hochgradigem Tumor, Gebiet 6 von Hyperplasie; Gebiet 7 von Niedriggrad-Prostatistischer Intraepithelialer Neoplasie (PIN); Gebiet 8 von normalem Epithelium, nicht benachbart zum Tumor; und Gebiet 9 von Lymphozyten, die mit Tumor assoziiert sind. Es ist von Interesse, in der Lage zu sein, verschiedene molekulare Charakteristika der intakten Gewebeprobe zu bestimmen und diese molekularen Charakteristika mit bestimmten Regionen des Gewebes zu korrelieren. Besondere Ausführungsformen des geschichteten Expressions-Scans (LES) der vorliegenden Erfindung machen dies möglich.

[0033] Ein Beispiel eines geschichteten Expressions-Scans ist in schematischer Form in **Fig. 2** gezeigt. Eine oder mehrere biologische Proben, wie eine intakte Gewebe-Sektion (z.B. Prostata-Sektion **30**), dissektierte intakte Zell-Lysate **32** oder dissektierte Zell-Lysate **34** werden präpariert und in oder auf ein ultradünnes Gel platziert, dass das Probengel genannt wird, welches auf ein Multischichtgel aufgebracht wird, zum Beispiel auf eine Oberfläche (wie z.B. eine oberste Oberfläche) eines Multischicht-Substrates **36**.

[0034] Das Probengel kann jede bekannte Gel-Matrix verwenden, einschließlich Agarose, Polyacrylamid und Gelatine-basierte Matrizen. Wenn das Probengel Agarose ist, ist seine Konzentration z.B. in dem Bereich von ungefähr 0,1% bis ungefähr 5% und es kann gegossen werden, um „ultradünn“ zu sein, d.h. in dem Bereich von ungefähr 0,10 µm bis ungefähr 1 mm dick sein. Alternativ dazu können die biologischen Proben direkt in das Substrat oder auf eine Oberfläche, wie z.B. die oberste Oberfläche des multi-geschichteten Substrates **36** platziert werden. Für die Zwecke einer vereinfachten Illustration in **Fig. 2** wird die intakte Prostata-Sektion **30** direkt auf eine oberste Oberfläche des multi-geschichteten Substrates **36** platziert.

[0035] Die Probe **30** wird auf die oberste Oberfläche der Substratschicht A platziert, deren Oberfläche im Wesentlichen parallel zu den Separationen zwischen den Schichten ist. Für die Zwecke der Illustration werden elf Schichten gezeigt (obwohl vielmehr verwendet werden können, z.B. mindestens Hunderte oder Tausende von Schichten) und die Schichten werden als A bis K markiert. Jede der Schichten kann eine Membran oder ein Film sein, wovon jede(r) eines (oder mehrere) Identifizierungs-Moleküle enthalten kann, wie zum Beispiel einen Antikörper, der ein bestimmtes Antigen erkennt, oder eine DNA-Sequenz, welche als eine Sonde für die Hybridisierung der komplementären DNA-Sequenzen in der Probe fungiert. Das Identifizierungs-Molekül kann in jeder der Schichten A bis K unterschiedlich oder dasselbe sein.

[0036] Nach der Aufbringung der Probe **30** auf die flache oberste Oberfläche von Schicht A, werden die löslichen Inhalte der Probe transferiert (z.B. durch Kapillarkwirkung oder Elektrophorese) durch die Reihen von Schichten A bis K, während die gesamte zweidimensionale Architektur innerhalb der Probe erhalten wird. Während die Proben-Komponenten, wie zum Beispiel Proteine und Nukleinsäuren, durch die Membranen passieren, wechselwirken die Identifizierungs-Moleküle der Substratschichten mit den Proteinen oder Molekülen von Interesse. Nachdem diese Wechselwirkung auftritt, werden die Membranen separiert (**Fig. 2B**) und weiterer Analyse unterzogen, wie zum Beispiel Aussetzen gegenüber einem zweiten Antikörper oder DNA-Sequenz, was ein hochsensitives und spezifisches molekulares Profil produziert, oder „Expression-Scan“ der zellulären Probe. Wenn die Analyse auf eine Gesamtgewebeprobe angewendet wird, kann der finale Schritt der Methode die Untersuchung einer Referenzprobe involvieren, welche von einem Ort unmittelbar benachbart zu der ersten Gewebeprobe geschnitten wird, so dass die Gebiet von Interesse in der intakten Probe (so wie Gebiete von zellulärer Atypie) mit den Befunden in dem Expressions-Scan korreliert werden können. Auf diese Weise können molekulare Charakteristika der Probe (wie z.B. die Expression von bestimmten Proteinen) mit Gebieten von histologischem Interesse (wie z.B. Invasion der Prostata-Kapsel) korreliert werden. Im Kontext dieses Beispiels kann die Expression von bestimmten Proteinen, die mit der kapselförmigen Invasion (oder Metastase im Allgemeinen) assoziiert sind, lokalisiert werden.

[0037] Das vorliegende Beispiel für die Analyse einer zellulären Probe schließt ein das Platzieren der zellulären Probe auf ein geschichtetes Substrat, wo die verschiedenen Schichten des Substrates verschiedene Identifizierungs-Moleküle enthalten, und das Übertragen der Komponenten der zellulären Probe durch die Schichten unter Bedingungen, die es dem den Komponenten erlauben, mit verschiedenen Identifizierungs-Molekülen in den verschiedenen zusammenhängenden Schichten des Substrates zu interagieren. Zelluläre Proben schließen ein, sind aber nicht limitiert auf, Gewebe-Sektionen, kultivierte Zellen oder eine Zytologieprobe. Tumorgewebe-Sektionen, die mittels der Kryostat-Methode produziert werden, sind insbesondere geeignet für die Verwendung in der vorliegenden Methode. Standard-Methoden für die Präparation von Gewebe-Sektionen werden in Lefkovits et al. (1996) gelehrt. Wenn das Molekül von Interesse in einer Abundanz mit moderatem oder niedrigem Spiegel vorkommt, wie diejenigen, die in einem Bereich von 1 bis 10.000 Kopien pro Zelle oder sogar 1 bis 100 Kopien pro Zelle vorkommen, kann die Dicke der Gewebe-Sektion, die analysiert wird, erhöht

werden, um den produzierten Expressions-Scan zu intensivieren. Die Dicke von solchen Proben beträgt ungefähr 25 µm bis ungefähr 50 µm. Da eine benachbarte Referenzprobe verwendet werden kann, um das Gewebe mikroskopisch zu betrachten, und die Sektionen dünn sind, wird das histologische Detail der Analyse nicht durch die Verwendung von dickeren Gewebe-Sektionen für die vorliegende Methode gefährdet.

[0038] Die zelluläre Probe, die durch die Methode der vorliegenden Erfindung analysiert werden soll, kann auch erhalten werden durch das Sezieren einer Zell-Population von Interesse aus einer größeren Zell-Population, zum Beispiel durch Laser-Einfang-Mikrodissektion („laser capture microdissection“), oder die Zellprobe können Lysate einer dissezierten Zell-Population sein. Methoden für die Präparation von Gewebeproben für die Mikrodissektion werden von Emmert-Buck et al. (1996) und Bonner et al. (1997) offenbart. Die Prozedur der Laser-Einfang-Mikrodissektion, beschrieben von Emmert-Buck et al. (1996) und Bonner et al. (1997), erlaubt das Sezieren von bestimmten Zell-Populationen von Interesse aus einer Gewebeprobe, was individuelle Proben für Experimente, die den Inhalt von verschiedenen Gewebetypen innerhalb einer Probe vergleichen, zur Verfügung stellt. [Fig. 1](#) illustriert eine Gewebeprobe, die neun Populationen von Interesse enthält, wobei jede unter der Verwendung des Prozesses der Laser-Einfang-Mikrodissektion separat isoliert werden könnte. Alternativ dazu können Vergleiche desselben Gewebes über die Zeit, wie zum Beispiel Veränderungen in der Proteinexpression oder mRNA während der Entwicklung eines Tumors erhalten werden. Wenn ein Forscher ein Protein oder eine mRNA von sehr geringer Abundanz, wie zum Beispiel Menin, das Gen, welches für multiple Endokrine Neoplasie Typ 1 verantwortlich ist, studieren möchte, kann die Präparation eines hochkonzentrierten Lysates verwendet werden, das von mikrodissezierten Zellen abgeleitet wird. Sehr niedrige Abundanz an mRNA würde in der Zelle in einem Bereich von 1 bis 10.000 Kopien vorkommen. Es ist auch möglich, die niedrig abundanten mRNAs durch reverse Transkription/Polymerase-Kettenreaktion (RT/PCR) zu amplifizieren und danach auf ihre korrespondierenden cDNAs zu analysieren.

[0039] Wie zuvor diskutiert, wird die präparierte zelluläre Probe optional in ein Gel platziert, um eine einfachere Behandlung vor der Analyse zu erlauben. In einigen Ausführungsformen kann das Probengel ein ultradünnes Gel sein, welches aus Agarose oder Polyacrylamid hergestellt ist. Das Probengel könnte hergestellt werden unter der Verwendung von Standard 2% Agarose, die in Tris-Borat EDTA-Puffer gelöst ist. 200 µl dieser Präparation werden auf einen Standard-Glas-Histologie-Objektträger pipettiert und mit einem Deckglas abgedeckt, so dass ein ultradünnes Gel in der Ordnung von einer Dicke von 0,5 bis 1 mm geschaffen wird. Das Probengel kann selektiert werden, um bei der Separation der verschiedenen Komponenten der zellulären Probe teilzunehmen. Diese Separations-Funktion wird erreicht durch das zur Verfügung stellen des Probengels mit einer bestimmten Struktur, welche die Migration der verschiedenen Komponenten in den Schichten des Substrates **36** verändert oder unterstützt und/oder die Migration der Komponenten verhindert, welche in dem Probengel verbleiben sollten. Strukturelle Veränderungen, welche die Separations-Funktion unterstützen, schließen ein die Variation der Gel-Konzentration, um die Gelporengröße zu verändern, oder die Variation der Gel-Zusammensetzung, wie zum Beispiel die Verwendung einer sauren oder basischen Formulierung, um die Migration von bestimmten Komponenten zu unterstützen oder zu verhindern. Wenn keine Separations-Funktion des Probengels gewünscht wird, kann ein Gel mit neutralen Charakteristika ausgewählt werden, wie zum Beispiel 2% Agarose in TBE mit einem pH-Wert von 7,4.

[0040] Wenn keine Gelseparations-Funktion gewünscht wird und die physische Form der Probe geeignet ist (zum Beispiel eine Gewebe-Sektion), wird die Probe **30** direkt auf eine planare oberste Fläche der ersten Schicht A ([Fig. 2A](#)) des Substrates **36** platziert. Auch wenn kein Gel verwendet wird, kann die analysierte zelluläre Probe vor dem Transfer behandelt werden, um die selektive Übertragung von bestimmten Ziel-Molekülen in die Substratschichten zu erlauben. Ein Beispiel einer solchen Behandlung ist die Verwendung eines Transferpuffers, der Detergentien enthält, welche dazu neigen, den Transfer der Komponenten einer zellulären Probe zu erhöhen, welche in der zellulären Membran (wie z.B. der Plasmamembran) vorkommen.

[0041] Wenn die Proben solubilisierter zellulärer Lysate sind, ist es möglich, ein Probengel wie folgt zu präparieren. Ein 2 mm dickes 2%iges Agarosegel wird „geloht“, um eine Reihe von Löchern (4 mm im Durchmesser z.B.) zu generieren, welche als Proben-„Wells“ dienen. Die Proben können dann zu 1%iger flüssiger Agarose, welche in die Wells platziert wird, addiert werden und es kann ihnen dann erlaubt werden, sich zu verfestigen, um ein Probengel **34** zu bilden. Das Probengel, das mit diesem Verfahren geschaffen wird, kann dann oben auf das geschichtete Substrat **36** platziert werden.

[0042] Das geschichtete Substrat **36** der Ausführungsform, die in [Fig. 2A](#) offenbart ist, schließt separierbare Schichten eines Materials ein (wie z.B. Schichten A bis K aus Nitrozellulose, welche von Schleicher und Schuell, Keene, NH, Produkt Nr. BA-85, erhalten werden können), welches in der Lage ist, in multiplen zusammenhängenden Schichten platziert zu werden, wie gezeigt in [Fig. 2A](#), und welches zur nachfolgenden Separation

in multiple separate (nicht zusammenhängende) Schichten in der Lage ist, wie gezeigt in [Fig. 2B](#). Die Nitrozellulose-Schichten können mit einem Blockierungsmittel behandelt werden, um die Bindung von Proteinen an die Nitrozellulose der Schichten zu inhibieren, was es den Proteinen erlaubt, durch die Schicht zu passieren, wenn sie nicht mit dem Identifizierungs-Molekül interagieren und von diesem eingefangen werden. Nachdem die Komponenten der Probe durch die zusammenhängenden Schichten migriert sind, werden die Schichten separiert, um eine individualisierte Analyse der Komponenten der zellulären Probe zu erlauben, welche in jeder separierten Schicht zurückbehalten wurden.

[0043] Andere Beispiele der Substratschichten schließen ein, sind aber nicht limitiert auf, Agarosegele mit hoher Konzentration, Agarosegele mit niedriger Konzentration, Polyacrylamidgele mit hoher Konzentration, ein Polyacrylamidgel mit niedriger Konzentration und Membranen, wie zum Beispiel poröse Membranen, wie zum Beispiel Nitrozellulose-Papier. Agarose mit niedriger Konzentration ist von ungefähr 0,1 bis ungefähr 3%, wohingegen hohe Konzentration über ungefähr 3% ist. Acrylamid mit niedriger Konzentration ist ungefähr 2% bis ungefähr 20% wohingegen hohe Konzentration über ungefähr 20% ist. Solche Gele oder Membranen können optional unterstützt sein mit einer Polyester-Membran oder ähnlichem, um mechanische Stärke zur Verfügung zu stellen und um eine „kontakte“ Substanz zur Verfügung zu stellen, welche effizienten Transfer der Komponenten der zellulären Probe zwischen den Schichten des Substrates erlaubt und Verlust der zweidimensionalen Architektur der Probe (wie z.B. Probe **30**) reduziert, während die Komponenten durch das Substrat **36** migrieren.

[0044] Nitrozellulose-Schichten sind Beispiele für poröse Schichten, welche Kapillardruck auf die Proben (wie z.B. Probe **34**) auf der obersten Oberfläche von Schicht A ([Fig. 2A](#)) ausüben und Komponenten der Probe durch die Schichten führen. Solche porösen Schichten oder Membranen erlauben die Bewegung von Flüssigkeit von einer Fläche zu einer gegenüberliegenden Fläche der Membran und üben Kapillarwirkung auf die Probe aus, um die löslichen Komponenten der Probe durch die multiple Schichten zu bewegen. Die Porengröße der porösen Schichten kann jede sein, die erhältlich ist, insbesondere die Nitrozellulose-Membran mit ungefähr 0,45 µm Porengröße. Die Anzahl der Schichten in dem Substrat kann weit variieren, zum Beispiel von ungefähr 1 bis mindestens 2, 5, 10 oder 1.000 Schichten, obwohl für die Zwecke der Illustration in [Fig. 2A](#) und [Fig. 2B](#) elf Schichten A bis K gezeigt werden. Die Anzahl der Schichten kann variiert werden, in Abhängigkeit zum Teil von der Anzahl der verschiedenen Bindungs- und anderen Identifizierungs-Moleküle, welche verwendet werden, und wird ultimativ limitiert nur durch die Fähigkeit, die Migration der zellulären Komponenten durch die Substratschichten zu begünstigen. Die Substratschichten können von identischer Struktur sein oder die Schichten können Mischungen von verschiedenen Substrat-Typen sein.

[0045] In einer offenbarten Ausführungsform ist jede Schicht des Substrates mit multiplen Kopien von mindestens einem Identifizierungs-Molekül imprägniert, welches mit einem oder mehreren Molekülen von Interesse interagieren kann. Gleichmaßen können verschiedene Schichten des Substrates multiple verschiedene Identifizierungs-Moleküle enthalten, zum Beispiel kann jede Schicht eines oder mehrere anwesende Identifizierungs-Moleküle aufweisen. In einer alternativen Ausführungsform des Substrates würden alle Schichten dasselbe Identifizierungs-Molekül enthalten und eine differentielle Migration durch die verschiedenen Substratschichten würde eine Separation erlauben. Die differentielle Migration kann begünstigt werden durch sich unterscheidende physische Eigenschaften der Substratschichten, wie zum Beispiel unterschiedliche Porendurchmesser oder pH-Werte oder Porosität oder pH-Gradienten, in der Richtung der Schichten A bis K. Gleichmaßen enthalten in anderen Ausführungsformen einige der Substratschichten keine Identifizierungs-Moleküle und können dazu dienen, die differentielle Migration der Proben-Komponenten durch die Schichten zu begünstigen.

[0046] Repräsentative Beispiele für ein Identifizierungs-Molekül schließen ein, sind aber nicht limitiert auf Antikörper, Nukleinsäuren, Peptide, Rezeptoren, Liganden, Farbstoffe, Färbemittel oder kolorimetrische Enzyme. Spezifische Beispiele für Identifizierungs-Moleküle schließen ein Anti-Prostata-spezifische Antigen-Antikörper (Scripps, San Diego, CA); Anti-Zytokeratin-Antikörper, Anti-alpha-Aktin-Antikörper (Sigma, St. Louis, MO); und Anti-PB39-Antikörper und Anti-Menin-Antikörper (National Cancer Institute Core Antibody Lab, Frederick, MD). Identifizierungs-Moleküle können spezifisch mit dem Molekül von Interesse interagieren, wie zum Beispiel die Bindung eines Antikörpers oder komplementäre Interaktion mit einer einzelsträngigen DNA-Sequenz, oder allgemeiner, wie zum Beispiel die Interaktion zwischen einem Farbstoff und einem Molekül, welches durch diesen Farbstoff gefärbt wird. Wenn das Identifizierungs-Molekül die Migration des Moleküles von Interesse in nachfolgende Schichten des Substrates verhindert, wird das Identifizierungs-Molekül als ein Einfang-Molekül bezeichnet.

[0047] Wenn der Transfer der Komponenten der zellulären Probe durch Kapillarbewegung der in der Probe

vorhandenen Flüssigkeit durch das Substrat geschieht, ist es wünschenswert, multiple Schichten (oder andere Regionen) des Substrates in physischem Kontakt zueinander zu haben. Die Verwendung von zusammenhängenden Substratschichten A bis K (wie in [Fig. 2A](#)) reduziert die Effekte der Diffusion auf die akkurate Migration der Proteine oder Moleküle von Interesse durch das Substrat und verstärkt die Kapillarbewegung der Komponenten. Alternativ dazu können die Komponenten durch die Substratschichten unter der Verwendung von Elektrophorese, einer Variation von isoelektrischer Fokussierung oder anderer ähnlicher Methoden zur Bewegung geladener Moleküle bewegt werden. Wenn Elektrophorese oder eine andere Methode unter der Verwendung von Elektrizität verwendet wird, sind die verschiedenen Schichten des Substrates idealer Weise leitfähig, wie zum Beispiel ein Agarose- oder Polyacrylamidgel. Methoden, die auf Elektrophorese basieren, würden im Allgemeinen auf die Separation von geladenen Spezies aus der zellulären Probe limitiert sein. Jedoch kann die Verwendung von Elektrophorese die Verwendung von zusammenhängenden Substratschichten vermeiden. Zum Beispiel können die Schichten voneinander separiert sein, solange wie ein elektrisch leitfähiges Medium (wie z.B. eine Flüssigkeit insbesondere eine Flüssigkeit, die Ionen umfasst, wie sie z.B. durch die Lösung eines Salzes in einer Flüssigkeit gebildet wird) zwischen den Schichten existiert, zwischen denen die Probe elektrophoretisch aufgetrennt („electrophoresed“) wird.

[0048] Ein anderes Mittel zum Transfer von Proben-Komponenten durch die Substratschichten ist mittels Flüssigkeits-Bewegung als Antwort auf ein Flüssigkeits-Druckdifferential. Zum Beispiel kann Druck, wie zum Beispiel zur Verfügung gestellt durch ein komprimiertes Gas, auf die Probe aufgebracht werden, um die Flüssigkeit, die in der Probe vorhanden ist, in und durch das Substrat **36** zu forcieren. Alternativ dazu kann eine andere Flüssigkeit unter Druck verwendet werden, um Proben-Inhaltsstoffe in und durch die Substratschichten zu einem Gebiet mit niedrigerem Druck zu befördern. Flüssigkeit, die in einer Probe vorhanden ist oder zur Verfügung gestellt wird, um die Proben-Inhaltsstoffe in die Substratschichten zu befördern, kann auch veranlasst werden, sich durch das Substrat zu bewegen, mittels eines Vakuums, das an das Substrat **36** gegenüber der Oberfläche, wo die Probe (wie z.B. Probe **30**) aufgebracht wird, angelegt wird. Da ein kontinuierliches Flüssigkeits-Medium mit solch einem Ansatz etabliert werden kann, können die Schichten entweder zusammenhängend oder nicht zusammenhängend sein.

[0049] Nachdem die Moleküle von Interesse durch die Substratschichten in dem offenbarten Beispiel transferiert wurden, können die verschiedenen Schichten voneinander separiert werden, um Analyse unter der Verwendung eines zweiten Identifizierungs-Moleküls, separat von demjenigen, welches für den anfänglichen Einfang verwendet wurde, wie zum Beispiel ein zweiter Antikörper oder DNA-Sequenz, zu erlauben. Zum Beispiel kann der zweite Antikörper ein spezifisches Bindemittel sein, wie zum Beispiel ein Antikörper, der den Original-Antikörper, der an sein Antigen in der Substratschicht gebunden ist, zu erkennen. Die Verwendung des zweiten Identifizierungs-Mittels stellte eine hohe Spezifität des Färbesignals, welches im Expressions-Scan vorhanden ist, sicher.

[0050] Die separate Analyse von verschiedenen Substratschichten wird in den [Fig. 2A](#) bis B illustriert. In diesem Beispiel wurde eine Gesamtfassungs-Sektion („whole mount section“) eines humanen Prostata-Gewebes, welches einen Querschnitt des gesamten Organs repräsentiert, oben auf das Substrat platziert und durch zehn Einfang-Schichten und auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Die Membran wurde nachfolgend ähnlich wie in einem Standard-Immunoblot unter der Verwendung eines Antikörpers gegen Zytokeratin, welcher selektiv Epithelium färbt, weiter behandelt.

[0051] Die Retention der grundlegenden Organisation der Gewebe-Sektion während des ganzen Transfer-Prozesses wird demonstriert durch einen Vergleich von [Fig. 3A](#) (Zytokeratin-Antikörper-Transferschicht) mit [Fig. 3B](#) (mit Hämatoxylin und Eosin gefärbter Objektträger eines benachbarten Nachschnittes desselben Gewebeblockes).

[0052] Die Spezifität des molekularen Einfangs unter der Verwendung dieser Technik wurde ebenso illustriert durch den Transfer einer Gesamtfassungs-Sektion des Prostata-Gewebes durch zehn Einfang-Membranen, wobei jede einen unterschiedlichen Antikörper aufwies, der überall in der Membran verbunden war. Nach dem Transfer der Gewebe-Sektion wurde jede Membran in denaturierenden Puffer platziert, um eingefangene Moleküle zu entfernen, und nachfolgend mittels Immunoblot unter der Verwendung von Anti-PSA (Prostata-spezifisches-Antigen) analysiert. Spezifischer Einfang von PSA wurde demonstriert durch die Isolierung einer einzelnen PSA-Bande bei 30 kDa nachfolgend Elektrophorese.

[0053] Um das Potential der Methode für sehr hohe Durchsatz-Analyse zu demonstrieren, wurde eine Wiederholung des PSA-Einfang-Experimentes durchgeführt, mit der Ausnahme, dass das Gewebe durch 100 Einfang-Schichten transferiert wurde, mit Anti-PSA platziert auf Schicht Nr. 100. Es wurde ein erfolgreicher Ein-

fang von PSA in Schicht in Nr. 100 erreicht. Es scheint kein Limit für die Anzahl von Einfang-Membranen zu geben, welche verwendet werden können, folglich kann die Methode Expressions-Scanning unter der Verwendung von Hunderten oder sogar Tausenden von Schichten einschließen, um die simultane Messung von Tausenden von molekularen Spezies zu erlauben.

[0054] Um die Verwendung der Scanning-Technik mit mikrodisezierten Proben zu demonstrieren, wurde neun separate Zell-Populationen aus drei verschiedenen Subjekten von Gewebe-Sektionen mittels Laser-Einfang-Mikrodisektion beschafft, solubilisiert und transferiert als neun separate 5 mm-Spots durch zehn Einfang-Schichten, in welchen polyklonales Anti-PSA auf Schicht Nr. 10 vorhanden war. Eine dissezierte Zell-Population von epithelialen Prostata-Zellen wurden in die obere linke Ecke der obersten Schicht des Substrates platziert. Nach dem Gewebe-Transfer wurde Schicht Nr. 10 mit dem monoklonalen Antikörper gegen PSA sondiert und mittels verstärkter Chemilumineszenz (ECL) visualisiert. Spezifische PSA-Färbung wurde nur für die Gewebeprobe, die Prostata-Epithelium enthält, visualisiert, was mit der bekannten epithelialen Lokalisierung von PSA konsistent ist. Die Proben 2–9 waren entsprechenderweise negativ in der PSA-Färbung.

[0055] Die Erhaltung der zellulären Architektur hilft, Assoziationen zwischen zellulären Befunden und molekularen Charakteristika, die mittels des Expressions-Scans bestimmt wurden, zu bestimmen. Zum Beispiel kann die Anwesenheit der Lymphozyten mit Befunden korreliert werden, die mit anderen der Schichten assoziiert sind. Auch kann die Expression eines bestimmten Rezeptors mit dem Epithelium korreliert oder abgebildet werden. Alternativ dazu kann ein anderer molekularer Marker mit Gebieten der Metaplasie oder kapselförmigen Invasion assoziiert werden.

[0056] Die separate Analyse der Substratschichten erlaubt es, multiple Regionen der Moleküle von Interesse zu untersuchen, das heißt Domänen eines Proteins oder Exons eines RNA-Transkriptes, wie es vollständiger in den Beispielen beschrieben wird. Die vorliegende Methode kann eine quantitative Indikation der relativen Abundanz der Komponenten in der zellulären Probe zur Verfügung stellen, wenn die Identifizierungs-Moleküle in relativer Abundanz zu der Quantität der Komponente von Interesse in der zellulären Probe interagieren. Massenspektroskopie-Sequenzierung kann auch nach der Separation durchgeführt werden, um eine eingefangene Aminosäure-Sequenz zu charakterisieren.

[0057] Die vorangegangene Erklärung wird besser durch die folgenden zusätzlichen spezifischen Beispiele illustriert werden.

Beispiel 1

Identifizierung von PSA, Tubulin, Aktin und Zytokeratin in Prostata-Tumor

[0058] Die LES-Prozedur wurde an Prostata-Tumor-Sektionen durchgeführt. Das einleitende Experiment verwendete Zytokeratin als das Protein von Interesse. Eine Gesamtfassungs-Kryostat-Sektion („whole mount cryostat section“) von humanem Prostata-Gewebe wurde durch Herstellen einer dünnen gefrorenen Sektion der Prostata präpariert, wobei die Sektion eine Dicke von ungefähr 10 µm aufwies. Wie in [Fig. 1](#) gezeigt, schließt die Sektion multiple Zell-Populationen von biologischem Interesse ein, einschließlich normales Epithelium, prä-maligne Läsionen, Hoch- und Niedriggrad-Tumor-Fokusse („foci“) und signifikante Tumor-Wirt-Interaktionen, wie zum Beispiel Lymphozyten, die mit Krebszellen interagieren. Diese Sektion wurde auf ein ultradünnem 2%iges Agarosegel platziert, welches auf einen Glas-Histologie-Objekträger gegossen worden war. Die Sektion wurde mit 2%iger Agarose-Lösung abgedeckt. Ein Deckgläschen wurde oben auf die Sektion aufgebracht und der Agarose wurde erlaubt zu polymerisieren, wodurch ein zwei-geschichtetes Probengel mit der Gewebe-Sektion dazwischen geschaffen wurde. Das Agarose-Probengel, enthaltend die Gewebeprobe, wurde auf die Oberfläche eines Einzelschicht-Substrates aufgebracht, welches aus einer 1,75" × 1,75" Nitrozellulose-Membran mit 0,45 Porengröße (Schleicher und Schuell, Keen, NH) hergestellt war. Die Membran wurde dann mit einem Antikörper gegen Zytokeratin (Sigma, Verdünnung 1:1000) über Nacht bei 4°C sondiert. Diese Membran wurde dann ein zweites Mal mit einem biotinylierten sekundären Antikörper (Sigma, Titer 1:5000) für 30 Minuten bei Raumtemperatur sondiert. Die Membranen wurden mittels Autoradiographie unter der Verwendung von verstärkter Chemilumineszenz (ECL) visualisiert, wie vom Hersteller (Pierce, Rockford, IL) empfohlen.

[0059] Danach wurde ein zweites Experiment durchgeführt, um die Spezifität der „Einfang-Moleküle“ in den Membran-Schichten zu testen. Eine 20 µm Kryostat-Sektion von Prostata-Gewebe wurde innerhalb eines ultradünnen Agarosegels präpariert, wie oben beschrieben. Die Komponenten dieser Gewebe-Sektion wurden über Nacht bei Raumtemperatur durch zehn zusammenhängende Nitrozellulose-Membranen (0,5" × 0,5", 0,45

Porengröße, Schleicher und Schuell) durch Kapillarkwirkung transferiert. Vor der Verwendung wurde jede Membran mit einem verschiedenen Identifizierungs-Molekül verbunden, in diesem Fall mit Antikörpern, für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Die Membranen wurden dreimal für 10 Minuten in 1 × PBS gewaschen und mit einem kommerziellen Blockierungsmittel (Pierce) für eine Stunde bei Raumtemperatur behandelt, gefolgt von einem wiederholten Waschschritt. Die Nitrozellulose/Antikörper-Membranen (illustriert als A–J in **Fig. 2**) wurden wie folgt präpariert:

Schicht	Identifizierungs-Molekül	Quelle
A	Anti-PB39, 644	NCI
B	Anti-Aktin	Sigma
C	Anti-Tubulin	Sigma
D	Anti-PB39, 655	NCI
E	Polyklonales Anti-PSA	Scripps, San Diego, CA
F	Anti-CAIR 1	NCI
G	Anti-PB-39, 656	NCI
H	Anti-Zytokeratin	Sigma
I	Anti-CD-3	NCI
J	Anti-PB-39, 645	NCI

[0060] Antikörper wurden mit den Zellulose-Membranen gemäß gut bekannter Prozeduren verbunden, wie diejenigen, die in US-Patent Nr. 4,774,177, das an Marks am 27. September 1988 erteilt wurde, oder US-Patent Nr. 4,727,037, das an Ring am 23. Februar 1988 erteilt wurde, offenbart sind.

[0061] Nitrozellulose-Schichten sind Beispiele für poröse Schichten, welche Kapillardruck auf die Proben auf der oberen Oberfläche des Substrates ausüben und Komponenten der Proben durch die Schichten leiten. Solche porösen Schichten oder Membranen erlauben die Bewegung von Flüssigkeit von einer Fläche zu einer entgegengesetzten Fläche der Membran und üben Kapillarkwirkung auf die Probe aus, um lösliche Komponenten der Probe durch die multiplen Schichten zu bewegen. Obwohl Nitrozellulose eifrig Biomoleküle, wie zum Beispiel Proteine, bindet, kann die Nitrozellulose mit gut bekannten Blockierungsmitteln verändert werden, um zum Beispiel Protein-Bindung zu inhibieren und Bewegung des Proteins oder anderen Biomoleküls durch die Nitrozellulose-Schichten zu begünstigen.

[0062] Blockierungsmittel dienen dazu, nicht-spezifische Interaktionen zwischen dem Substrat und den Komponenten der Probe zu verhindern, während diese durch das Substrat transferiert werden. „Blockierungsmittel“ ist ein Sammelbegriff für verschiedene Additive, welche nicht-spezifische Bindung verhindern, die aber keinen Anteil an der spezifischen Reaktion haben, wie zum Beispiel einer immunochemischen Reaktion, zwischen einem bestimmten Identifizierungs-Molekül und seinem Ziel. Blockierungsmittel sind am üblichsten konzentrierte Protein-Lösungen. Beispiele für solche Lösungen schließen ein 10–20% fötales Kalbserum und 5% fettfreies trockenes Milchpulver, gelöst in einem Puffer, wie zum Beispiel PBS, TBS oder TBST. Kommerziell erhältliche Blockierungsmittel schließen SuperBlock™, Blocker™ BLOTTO, Blocker™ BSA und SeaBlock™ (Pierce Chemical, Rockford, IL) sowie NAP-SureBlocker™, ein nicht-tierisches Protein-Blockierungs-Mittel (Geno Technology, Maplewood, MO) ein.

[0063] Nach dem Transfer wurde jede Membran separat in 30 µl SDS-Probenpuffer (Novex, San Diego, CA) platziert, um alle eingefangenen Moleküle zu entfernen. Die entfernten, solubilisierten Moleküle wurden mittels Elektrophorese auf einem 4–20% Tris-Glycin-Acrylamidgel (Novex) für 1,5 Stunden bei 110V separiert. Die Proteine wurden auf eine PVDF-Membran mit 0,2 µm Porengröße für 2 Stunden bei 40V transferiert und mittels einer Standard-Immunoblotting-Prozedur unter der Verwendung eines monoklonalen Anti-PSA-Moleküls, 1:1000 Titer (Scripps) analysiert. In jedem Fall beschränkte sich das erhaltene Signal auf die Bande mit dem passendem molekularen Gewicht für das Molekül, was durch den Antikörper eingefangen war.

[0064] Die Ausführbarkeit des Transfers durch 100 Membran-Schichten wurde gezeigt durch die Wiederho-

lung des obigen Experimentes mit 99 Schichten, die nur mit Blockierungs-Mittel behandelt wurden, und einer finalen Schicht 100, welche polyklonalen Anti-PSA-Antikörper mit ihrer Oberfläche verbunden hatte. Der Western Blot zeigte Einfang von PSA nur in Schicht 100. Nicht-spezifischer Einfang von PSA in den Schichten 1–99 wurde durch die Vorbehandlung mit Blockierungsmittel verhindert. Dieses Experiment wurde wiederholt unter der Verwendung eines Antikörpers gegen Matrix-Metalloproteinase-2 in Schicht 100. Anstatt von Western-Immunoblotting wurde das isolierte Protein mittels Gel-Zymographie analysiert, wie in Zucker et al. (1994) offenbart. Daher ist es möglich, die simultane Messung von Tausenden von molekularen Spezies, die in den Gewebeproben oder isolierten Zell-Populationen vorhanden sind, durch die Verwendung von Tausenden von Substrat-Schichten zu erlauben.

[0065] Ein weiteres Experiment wurde durchgeführt, um die Anwesenheit von PSA in einer dissektierten Zell-Population zu detektieren. Verschiedene Zell-Populationen, die sich im Gewebetyp unterscheiden, wurden separat unter der Verwendung der Laser-Mikrodissektions-Techniken gesammelt, wie beschrieben von Emmert-Buck et al. (1997). Zehn Epithelium-Proben 1–10 wurden in einer Reihe auf ein Probengel platziert, wie in [Fig. 6](#) gezeigt, und zehn Nicht-Epithelium-Proben 11–20 wurden in eine zweite Reihe unmittelbar unter die epithelialen Proben platziert. Alle 20 Proben wurden durch ein Substrat, enthaltend zehn Nitrozellulose-Membranen (A bis J) transferiert, in welchem nur Membran J Anti-PSA-Antikörper an ihre Oberfläche gebunden hatte. Nach dem Transfer wurde jede der zehn Membranen mit einem monoklonalen Antikörper gegen PSA sondiert und mittels verstärkter Chemilumineszenz (ECL), wie oben beschrieben, visualisiert. Die ersten neun Membranen A bis I produzierten kein ECL-Signal, was anzeigte, dass kein Einfang von PSA aufgetreten war. Jedoch wurde positive Färbung für PSA auf Membran J in allen Proben, die Epithelium enthielten (Proben Nr. 1 bis 10) visualisiert. Dieses Ergebnis ist konsistent mit der bekannten epithelialen Lokalisierung von PSA. Proben 11–20 enthielten keine epithelialen Zellen und waren passender Weise negativ in der PSA-Färbung.

Beispiel 2

Selektiver Einfang von Prostata-spezifischem Antigen (PSA)

[0066] Um den selektiven molekularen Einfang innerhalb der Substratschichten zu demonstrieren, wurden Zellproben von fünf separaten Patienten aus Gewebeproben beschafft und in Standard-Protein-Extraktionspuffer solubilisiert. Die Proben schlossen Lysate von normaler Lunge, Lungenkrebs, ösophagalem Krebs, normaler Prostata und Brustkrebs-Gewebe ein. Jedes der Zell-Lysate wurde innerhalb eines diskreten Spots mit 4 mm Durchmesser auf der obersten Schicht eines Einfang-Membranen-Satzes platziert. Dieses wurde erreicht durch Lochen von Löchern mit 4 mm Durchmesser („wells“) in ein 2 mm dickes Agarosegel, Addieren der Lysate zu der 1%igen flüssigen Agarose, Füllen der 4 mm Wells mit der Lysat-Agarose-Lösung und Erlauben, diesen zu verfestigen. Das somit geschaffene Probengel wurde auf die obere Schicht eines Einfang-Membran-Satzes platziert. Zusätzlich wurde gereinigtes PSA als eine positive Kontrollprobe verwendet. In diesem Experiment bestanden die Einfang-Membranen aus zehn Nitrozellulose-Schichten, wovon jede mit einem unterschiedlichen Antikörper gekoppelt war. Polyklonales Anti-PSA wurde mit Schicht Nr. 10 (die zehnte aufeinander folgende Einfang-Membran) verbunden. Die sechs Gewebeproben wurden auf die Oberfläche des Substrates platziert und durch die Einfang-Membranen durch Kapillarkwirkung transferiert und jede Membran wurde nachfolgend analysiert. [Fig. 4A](#) zeigt die Einfang-Schicht Nr. 10 nach der Sondierung mit einem monoklonalen Antikörper gegen PSA und Visualisierung durch verstärkte Chemilumineszenz (ECL). Probe 1 (gereinigtes PSA) und Probe 5 (normales Prostata-Gewebe) zeigen ein positives Signal, was anzeigt, dass PSA erfolgreich eingefangen wurde. Probe 2 (normale Lunge), Probe 3 (Lungentumor), Probe 4 (ösophagealer Tumor) und Probe 6 (Brustkrebs) enthielten kein PSA und waren dementsprechend negativ.

[0067] Der Ort jeder Probe, die auf die oberste Schicht platziert wurde, wurde im wesentlichen konserviert und reproduziert auf den Membranen, durch welche die Proben transferiert wurden. Deren substantielle Retention der räumlichen Beziehungen erlaubt geeigneter Weise, dass die resultierenden Muster mit den originalen Proben korreliert werden.

Beispiel 3

Spezifität des PSA-Einfangs

[0068] Um die Spezifität des Einfang-Prozesses zu zeigen, wurde eine einzelne Probe von Prostata-Gewebe solubilisiert und durch einen Satz an Einfang-Schichten transferiert, wie oben in Beispiel 2 beschrieben, außer dass polyklonales Anti-PSA auf Membran 5 platziert wurde. Nach dem Transfer des Prostata-Gewebes durch die Schichten wurde jede Schicht in denaturierenden Puffer platziert, um eingefangene Moleküle zu entfernen.

Die Proteine, die von jeder Membran zurückgewonnen wurden, wurden nachfolgend mittels Gel-Elektrophorese separiert (die Proteine, die aus Schicht 1 zurückgewonnen wurden, wurden in der Spur 1 gelaufen; die Proteine, die aus Schicht 2 zurückgewonnen wurden, wurden in der Spur 2 gelaufen und so weiter) und mittels Immunoblot unter der Verwendung eines monoklonalen Anti-PSA-Antikörpers analysiert. [Fig. 4B](#) zeigt die Ergebnisse von jeder der Einfang-Schichten eins bis neun. Spur 5 (repräsentierend Schicht 5, verbunden mit Anti-PSA) zeigt eine einzelne, deutliche PSA-Bande bei $M_r = 30.000$ (30 kDa). Die verbleibenden Einfang-Membranen sind negativ für PSA. Dieses Ergebnis demonstriert, dass PSA nur auf der Membran eingefangen wurde, die seinen Antikörper enthielt. Des weiteren indiziert die einzelne Bande auf dem Immunoblot, dass das ECL-Signal, welches von der Einfang-Membran in Beispiel 2 abgeleitet wurde, spezifisch für PSA war.

[0069] Um das Potential der Methode für Hochdurchsatz-Analyse zu illustrieren, wurde eine Wiederholung des Experiments durchgeführt, außer dass das Gewebe durch 101 Einfang-Schichten transferiert wurde, wobei Anti-PSA auf Schicht Nr. 100 platziert wurde. Der erfolgreiche und spezifische Einfang von PSA wird in [Fig. 4C](#) gezeigt. Nur die Spur 100 (repräsentierend Schicht 100, verbunden mit Anti-PSA) zeigt eine einzelne, deutliche PSA-Bande bei $M_r = 30.000$ (30 kDa). Die verbleibenden Einfang-Membranen sind negativ für PSA. Dieser spezifische und selektive Einfang, der nach dem Transfer durch diese große Anzahl von Schichten beobachtet wurde, zeigt an, dass es möglich ist, das geschichtete Expressions-Scanning für die simultane Messung von Hunderten, Tausenden oder sogar Zehntausenden von molekularen Spezies zu verwenden, und zwar durch das zur Verfügung stellen von verschiedenen Einfang-Mitteln in den verschiedenen Schichten.

Beispiel 4

Einfang von aktiven Enzymen

[0070] Um die Fähigkeit des geschichteten Expressions-Scannings beim Einfang und der Analyse von aktiven Enzymen zu demonstrieren, wurde eine Wiederholung des Experimentes mit zehn Schichten, wie oben in Beispiel 3 beschrieben, durchgeführt, außer dass der Anti-PSA-Antikörper, welcher mit der Einfang-Schicht 5 verbunden war, durch einen Antikörper gegen Matrix-Metalloproteinase-2 (MMP-2) ersetzt wurde. Gereinigtes MMP-2-Protein wurde durch die Einfang-Schichten transferiert und jede Membran wurde nachfolgend mittels Gelatine-Zymographie analysiert. [Fig. 4D](#) zeigt das erfolgreiche Einfangen von MMP-2, welches durch eine einzelne Bande bei $M_r = 72.000$ (72 kDa) in Spur 5 repräsentiert wird, welche mit der Einfang-Schicht korrespondiert. Alle anderen Spuren, die mit den Schichten korrespondieren, die keine Anti-MMP-2-Antikörper enthielten, waren negativ für MMP-2.

Vergleichsbeispiel 5

Selektiver und spezifischer Einfang von Nukleinsäuren

[0071] Dieses Beispiel demonstriert die Fähigkeit des geschichteten Expressions-Scannings, Nukleinsäuren zu analysieren. ^{32}P -markierte PCR-Produkte (200 bp) wurden aus Plasmiden amplifiziert, welche cDNAs der POV1 (PB39, NCI) bzw. β -Aktin (Clontech, Palo Alto, CA) -Gene enthielten. Die radiomarkierten PCT-Produkte wurden aus einem Agarosegel ausgeschnitten und 5% jedes Produktes wurden in diskrete 4 mm-Spots, wie beschrieben für die Gewebeproben in Beispiel 2, platziert. Die PCR-Produkte wurden durch 10 Einfang-Schichten über Nacht durch Kapillartransfer unter der Verwendung von $6 \times \text{SSC}$ transferiert. In diesem Experiment bestanden die Einfang-Schichten aus ultradünnen ($< 50 \mu\text{m}$) 2%igen Agarosegelen. Die Einfang-Schicht 5 enthielt ein Plasmid, welches die gesamte cDNA für das POV1 enthält. Während der Präparation von Schicht 5 wurde das cDNA des POV1 enthaltende Plasmid zu der Agarose vor der Gel-Polymerisation bei einer Endkonzentration von 30 ng/ μl addiert. Eine nicht blockierte Nitrozellulose-Membran wurde verwendet, um die nicht-eingefangenen POV1- und β -Aktin-PCT-Produkte zu binden, nachdem sie den Membranen-Satz durchlaufen hatten. Nach dem Transfer wurden die Schichten separiert und mittels X-OMAT-Radiographie visualisiert. [Fig. 5](#) zeigt den erfolgreichen und selektiven Einfang von POV1 cDNA in Schicht 5, während sich das Aktin-PCR-Produkt durch den gesamten Satz an Schichten bewegte und nicht eingefangen wurde, bis es mit der nicht blockierten Nitrozellulose-Schicht reagierte.

Beispiel 6

Transfer von intakten Gewebe-Sektionen

[0072] Die Beispiele oben zeigen die Fähigkeit des geschichteten Expressions-Scannings, Gewebeproben zu analysieren, nachdem sie geeigneterweise beschafft und solubilisiert wurden. Geschichtetes Expressi-

ons-Scanning kann auch verwendet werden, um intakte Gewebe-Sektionen zu analysieren. Wenn eine intakte Gewebe-Sektion als Probe verwendet wird, ist es möglich, die zweidimensionale Architektur der Gewebe-Sektion mit dem zweidimensionalen Muster der zellulären Komponenten, die in bestimmten Einfang-Schichten nach dem Transfer lokalisiert sind, zu korrelieren.

[0073] Um die Retention der zweidimensionalen Architektur einer Gewebe-Sektion zu demonstrieren, wurden 10 µm dicke Gesamtfassungs-Kryostat-Sektionen von menschlicher Prostata von radikalen Prostatektomie-Proben auf entweder ein Agarosegel-Set aus 10 Schichten oder aus 100 Schichten platziert. Die intakte Gewebe-Sektion wurde durch die Schichten mittels Kapillarflüssigkeitsbewegung bei Raumtemperatur auf eine 1,75 inch² Nitrozellulose-Membran mit 0,45 µm Porengröße (Schleicher und Schuell) transferiert. Nach dem Transfer der Gewebe-Sektionen wurden die Nitrozellulose-Membranen mit einem Antikörper gegen Zytokeratin (Sigma, Verdünnung 1:1000) sondiert, um selektiv epitheliale Elemente zu identifizieren, und wurden mittels ECL gemäß der Empfehlungen des Herstellers (Pierce) visualisiert.

[0074] Die Retention der grundlegenden Organisation der Gewebe-Sektion über den gesamten Transfer-Prozeß wird in den [Fig. 3A–D](#) durch Vergleichen der transferierten Sektionen ([Fig. 3A](#) und [Fig. 3C](#)) mit einem mit Hämatoxylin und Eosin (H&E) gefärbten Objektträger einer benachbarten Nachschnitt-Sektion demonstriert. Die gesamte Architektur der transferierten Sektionen ist sehr ähnlich zu den korrespondierenden H&E-gefärbten Objektträgern und die Lage der individuellen glandulären epithelialen Elemente innerhalb der Gewebe-Sektionen kann bestimmt werden. Daher kann das geschichtete Expressions-Scanning für die Analyse von intakten Gewebe-Sektionen verwendet werden, indem eine Korrespondenz zwischen der zweidimensionalen Architektur der Gewebe-Sektion und der zweidimensionalen Position der Komponenten, welche durch die Einfang-Schichten transferiert wurden, bewahrt wird. Eine Auflösung auf Einzelzell-Niveau wird es erlauben, dass individuelle Zellen auf die Anwesenheit von bestimmten Molekülen analysiert werden. Zum Beispiel könnten bei Prostata-Krebs alle der individuellen prämaligen Fokusse („foci“) der normalen Drüsen und die Hoch- und Niedriggrad-Tumordrüsen simultan analysiert werden, sowie bedeutende Subpopulationen, wie zum Beispiel Tumordrüsen, welche durch die Prostata-Kapsel einwandern. Alternativ dazu könnte eine Auflösung auf dem Niveau der mikroskopischen Struktur die Lokalisierung von bestimmten Proteinen zu individuellen subzellulären Organellen erlauben.

Beispiel 7

Membranen für geschichtetes Expressions-Scanning

[0075] Membranen und Gele, die nützlich für die Schaffung von Identifizierungs- und Einfang-Schichten sind, wie sie in den Beispielen verwendet werden, können eine oder mehrere der folgenden Eigenschaften aufweisen. Erstens sind die Membranen oder Gele in der Lage, individuelle Identifizierungs- oder Einfang-Moleküle (z.B. Antikörper, Nukleinsäuren und Farbstoffe) zu immobilisieren. Zweitens erlauben die Membranen oder Gele zellulären Komponenten, die von einer Probe transferiert werden, den Satz von Schichten effizient zu durchlaufen und in der entsprechenden Schicht zu akkumulieren oder zu reagieren. Drittens ermöglichen die Membranen oder Gelen den Transfer mit minimalem Verlust der zweidimensionalen Beziehung der biologischen Probe(n).

[0076] Bestimmte Beispiele für Materialien, die für die Konstruktion eines Satzes an Schichten für das geschichtete Expressions-Scanning geeignet sind, schließen ein Nitrozellulose-Membranen, derivatisierte Nitrozellulose-Membranen, Agarosegele mit hoher Konzentration, Agarosegele mit niedriger Konzentration, Polyacrylamidgele mit hoher Konzentration, ein Polyacrylamidgel mit niedriger Konzentration und Membranen, wie zum Beispiel poröse Membranen, wie Nitrozellulose-Papier. Agarose mit niedriger Konzentration ist von ungefähr 0,1 bis ungefähr 3%, wohingegen hohe Konzentration über ungefähr 3% ist. Acrylamid mit niedriger Konzentration ist ungefähr 2% bis ungefähr 20%, wohingegen hohe Konzentration über ungefähr 20% ist.

[0077] Individuelle Schichten können auch Komposite von zwei oder mehreren Membranen oder Gelen sein. Zum Beispiel können dünne Polymer-Membranen, wie zum Beispiel polare Polymer-Membranen, wie zum Beispiel Polyester-Membranen mit Nitrozellulose-Membranen oder Agarose- oder Polyacrylamidgelen kombiniert werden, um Kompositen-Schichten für geschichtetes Expressions-Scanning zu bilden.

[0078] In einer besonderen Ausführungsform wird die Kompositen-Membran wie folgt gebildet. Eine dünne (10 µm) Polyester-Membran wird als Rückgrat-Schicht verwendet. Die Polyester-Membran wird dann mit einem löslichen Polymer-Material, wie zum Beispiel 2% Agarose, beschichtet, um eine ultradünne (< 1 µm) Schicht zu bilden, die das Polyester-Rückgrat abdeckt. Ein Einfang-Molekül (z.B. ein Antikörper oder eine Nu-

kleinsäure) wird zu dem Polymer-Material vor dessen Addition zu dem Polyester-Rückgrat addiert. Nachdem das Polymer auf dem Rückgrat beschichtet ist, bildet es ein Gel und fängt das Einfang-Molekül irreversibel innerhalb der Gel-Struktur. Die Polyester-Rückgrat/Polymergel-Komposite, enthaltend das Einfang-Molekül, kann dann als eine Einfang-Membran des geschichteten Expressions-Scannings verwendet werden. Experimente haben demonstriert, dass solche Kompositen-Membranen hocheffizient sind, um die Kriterien, die oben beschrieben sind, zu erfüllen. Ein besonderer Vorteil der Kompositen-Membranen ist es, dass das Polymergel, welches auf das Polyester-Rückgrat geschichtet wird, als eine „Kontakt-Substanz“ zwischen jeder der Schichten dient, wobei effizienter Transfer der Biomoleküle mit einem minimalen Verlust der Korrespondenz mit der zweidimensionalen Architektur in der Probe erlaubt wird.

Beispiel 8

Bestimmung des Bindungsstatus oder der Bindungspartner eines Moleküls von Interesse während der Tumor-Progression

[0079] Verschiedene Tumorzell-Populationen, die sich durch das Stadium der Tumor-Progression unterscheiden, werden separat unter der Verwendung der Laser-Mikrodissektions-Techniken gesammelt, wie von Emmert-Buck et al. (1997) beschrieben. Jede verschiedene Zell-Population wird an ihrem eigenen Ort innerhalb eines Probengels platziert, wie oben in Beispiel 1 beschrieben. Das Probengel wird auf ein Multischicht-Substrat platziert, welches mindestens eine Schicht enthält, die mit Antikörpern gegen eines oder mehrere bekannte Bindungspartner des Moleküls von Interesse quervernetzt ist. Die Moleküle können mit einem Quervernetzungs-Mittel behandelt werden, so dass Bindungspartner in dem Status bewahrt werden, in welchem sie sich zum Zeitpunkt der Präparation des Kryostats während des Transfers befanden. Nach dem Transfer der Komponenten von den Zell-Populationen durch die Substratschichten, wie oben beschrieben, werden die Schichten separiert und die Moleküle von Interesse auf einem Gel gelaufen und mit dem Einfang-Antikörper sondiert. Daher zeigt dieses Experiment, ob in verschiedenen Stadien der Tumor-Entwicklung ein Molekül von Interesse gebunden oder frei ist, durch die Bestimmung des Molekulargewichts der Spezies, wenn die Gewebeprobe präpariert wird.

[0080] Um nach neuen Bindungspartnern zu suchen, wird das Experiment, wie oben beschrieben, für den Bindungsstatus ohne die Quervernetzung vor dem Transfer durchgeführt. Nach dem Transfer der zellulären Probe kann Massenspektrometrie verwendet werden, um die Identität der Proteine, die zusammen mit dem Protein von Interesse eingefangen wurden, zu bestimmen. Nach der Separation von dem Einfang-Molekül und der Isolation in einem Gel, kann MS-MS (Massenspektrometrie-Massenspektrometrie)-Sequenzierung die Proteine identifizieren, die von einer relativ geringen Anzahl von mikrodissektierten Zellen zurückgewonnen wurden, wie in Huang et al. (1999) beschrieben.

Beispiel 9

Vergleichende Expression zwischen normalen und erkrankten Zell-Populationen

[0081] LES kann als ein „offenes System“ verwendet werden, um nach Krankheits-assoziierten molekularen Veränderungen in Gewebeproben zu suchen. In diesem Beispiel werden normale und erkrankte Zellproben innerhalb des Probengels platziert, wie in Beispiel 1 beschrieben. Die Informations-Moleküle, die auf den Membran-Schichten quervernetzt sind, können Antikörper, Peptide oder DNA-Sequenzen für entweder bekannte Proteine oder Bibliotheken von ssDNA oder mRNA sein. Eine große Zahl von Einfang-Molekülen wird simultan verwendet, um die vergleichende Expression zwischen normalen und erkrankten Zell-Populationen des Ziels der Einfang-Moleküle zu analysieren. Die Proben, die getestet werden, können von einem oder multiplen Patienten abstammen. Nachdem von einem Protein oder einer Nukleinsäure gezeigt wurde, dass es/sie in normalen und erkrankten Zellen unterschiedlich exprimiert wird, kann seine/ihre Identität durch das Einfang-Molekül, an welches es/sie bindet, bestimmt werden. Diese Identität kann unter der Verwendung von Standard-Sequenzierungs-Techniken bestätigt werden oder solche Sequenzierungs-Techniken können anfänglich verwendet werden, um zu bestimmen ob das Ziel des Einfang-Moleküls unbekannt ist.

Beispiel 10

Bestimmung der Struktur eines Proteins von Interesse während der Tumor-Progression

[0082] Verschiedene Zell-Populationen, die sich durch das Stadium der Tumor-Progression unterscheiden, werden separat unter der Verwendung der Laser-Mikrodissektions-Techniken gesammelt, wie beschrieben von

Emmert-Buck et al. (1996). Jede Zell-Population wird an ihren eigenen Ort innerhalb eines Probengels platziert, wie oben in Beispiel 1 beschrieben. Das Probengel wird auf ein Substrat platziert, welches mindestens eine Membran enthält, die mit einem polyklonalen Antikörper gegen Tumorsuppressor-Protein quervernetzt ist. Nach dem Transfer der Komponenten der Zell-Populationen durch die Substratschichten, werden die Membranen separiert und die Anti-Tumorsuppressor-Protein-Membran mit ihren eingefangenen Molekülen mit zwei unterschiedlich markierten monoklonalen Antikörpern sondiert, welche verschiedene Regionen des Tumorsuppressor-Proteins erkennen. Ein Antikörper ist spezifisch für den N-Terminus des Proteins und der andere ist spezifisch für den C-Terminus des Proteins. Durch den Vergleich der Anwesenheit oder Abwesenheit des N- oder C-Terminus des Proteins in verschiedenen Stadien der Tumor-Progression kann diese Untersuchung detektieren, ob das Tumorsuppressor-Protein an einem Punkt während der Tumor-Entwicklung trunkiert wurde. Mutation ist ein Beispiel für ein Ereignis, welches zur Protein-Trunkierung führen kann. Solche Veränderungen in Proteinen während des Überganges zwischen normalen und Tumorzellen tritt bekanntermaßen auf, zum Beispiel in dem Genprodukt des Adenomatösen Polyposis Coli (APC)-Tumorsuppressors, wie von Smith et al. (1993) berichtet wurde.

Beispiel 11

Verwendung von differentialem Transfer für das Probengel

[0083] Das anfängliche Platzieren der Gewebeprobe in ein Gel mit hoher Konzentration limitiert die Migration auf relativ kleine Proteine. Alternativ dazu erlauben Gele mit relativ niedriger Konzentration größeren Molekülen, transferiert und analysiert zu werden. In der normalen Prostata ist PSA exklusiv innerhalb der ephithelialen Zellen lokalisiert, wohingegen in Tumoren PSA in der Lage ist, in das Stroma einzutreten und von Alpha-1-Anti-Chymotrypsin (ACT) gebunden zu werden, wie beschrieben von Chen et al. (1995). PSA und ACT bilden einen Enzym-Inhibitor-Komplex mit einem signifikant größeren Aggregat-Molekulargewicht als PSA allein. Durch die Veränderung der Charakteristika des Gels, in welche die Gewebeprobe platziert wird, ist es möglich, PSA und PSA-ACT-Komplex in Tumoren separat zu analysieren. Es gibt einen selektiven Membran-Einfang von PSA nach dem Platzieren einer Prostata-Tumor-Sektion in ein 2%iges Agarosegel. Wenn jedoch die Konzentration des Gels auf 0,5% reduziert wird, migrieren sowohl PSA als auch PSA-ACT durch die Membranen und werden eingefangen. Die Veränderung der experimentellen Bedingungen, um die molekulare Migration zu beeinflussen, kann es dem Forscher ermöglichen, die Experimente maßzuschneidern, so wie sie für die bestimmten Ziele benötigt werden. Zum Beispiel kann das Studium der subzellulären molekularen Profile durchgeführt werden durch die Verwendung von Transferpuffern mit und ohne Detergentien, um selektiv lösliche oder Membran-gebundene Proteine zu mobilisieren.

Beispiel 12

Automatisiertes Expressions-Scanning

[0084] Das geschichtete Expressions-Scanning der vorliegenden Erfindung kann auch in Assoziation mit einem automatisierten Laboratoriums-Instrument verwendet werden, welches zu multiplen Anwendungen in der Lage ist. Zum Beispiel werden die Einfang-Schichten in dem vorliegenden Prototyp-System durch transparente Membranen ersetzt, so dass mehrere tausend gestapelte Schichten kumulativ nur einige wenige Millimeter Dicke haben werden. Daher ist die gesamte Migrations-Distanz der Gewebeprobe während des Transfers und der Detektion oder Immobilisierung minimal, wodurch die zelluläre Auflösung des Systems optimiert wird. In dieser Anwendung werden die Gewebeprobe, der Waschpuffer und die Fluoreszenz-markierten sekundären Detektions-Moleküle durch den intakten Membran-Satz transferiert, wodurch der Bedarf, jede Einfang-Schicht zu separieren und individuell weiter zu bearbeiten, vermieden wird. Die Probe, der Waschpuffer und die Fluoreszenz-markierten sekundären Detektions-Moleküle können in die gestapelten Schichten entweder in dieselbe Richtung, wie die Proben-Komponenten durch die gestapelten Schichten geleitet werden, oder in eine andere Richtung transferiert werden, wie zum Beispiel die reverse Richtung oder entlang der Richtung der Schichten selbst. Der intakte Membran-Satz wird dann mittels konfokaler Fluoreszenz-Mikroskopie analysiert und die Expressions-Daten von jeder individuellen Schicht werden bestimmt und mit dem Hochqualitäts-histologischen Bild der Gewebe-Sektion überlagert. Der Ansatz wurde demonstriert in einem Experiment, das ähnlich ist zu dem, wie in **Fig. 4** gezeigt, in welchem jedes der Detektions-Reagentien durch die Einfang-Membranen transferiert wurde, während die Membranen als ein intakter Satz verblieben. Es erfolgten erfolgreicher Einfang und Analyse.

[0085] In noch einer anderen Ausführungsform kann der Satz von Einfang-Schichten wiederholt verwendet werden, um Expressions-Scans zu produzieren, und zwar durch Waschen der gestapelten Schichten mit ei-

nem denaturierenden Puffer zwischen den Scans, um eingefangene Moleküle zu entfernen. Geeignete Puffer für diesen Zweck schließen Puffer ein, welche denaturierende Mittel enthalten, wie zum Beispiel Detergentien oder Harnstoff, und Salze, wie zum Beispiel Natriumchlorid in Konzentrationen, die ausreichend sind, um die eingefangenen Moleküle aus den gestapelten Schichten zu entfernen. Ein bestimmtes Beispiel für einen geeigneten denaturierenden Puffer ist ein Puffer, enthaltend 1% Natrium-Dodecylsulfat (SDS) und 500 mM Natriumchlorid. Andere denaturierende Puffersysteme sind im Stand der Technik bekannt und deren Eignung für die Verwendung mit automatisierten Expressions-Scanning kann durch die Analyse der Schichten auf die andauernde Anwesenheit von gebundenen Molekülen bestimmt werden, nachdem sie mit einem bestimmten denaturierenden Puffersystem gewaschen wurden.

[0086] In einem anderen Ansatz werden die Einfang-Membranen separierbar sein und individuell nach dem Gewebetransfer bearbeitet werden. Die separierten Membranen können dann über die Messung der Expressions-Spiegel von individuellen Molekülen hinaus studiert werden.

[0087] Zum Beispiel kann Massenspektrometrie verwendet werden, um Bindungspartner zu identifizieren, welche zusammen mit den abgezählten Proteinen „co-eingefangen“ werden.

Beispiel 13

Analyse von individuellen klonierten Biomolekülen

[0088] Die Methoden des geschichteten Expressions-Scannings (LES) können verwendet werden, um individuelle klonierte Biomoleküle zu analysieren, wie zum Beispiel Messenger-RNAs, die aus einer Zell-Population gewonnen wurden und in Bakterien unter der Verwendung von Standard-Methoden kloniert wurden.

[0089] In einer besonderen Ausführungsform werden die Bakterien auf Medium ausplattiert und individuelle Kolonien werden bei der Anwesenheit eines markierten Nukleotids gewachsen. Individuelle Kolonien werden dann oben auf eine LES-Vorrichtung platziert und die Nukleinsäuren aus jeder Kolonie werden durch einen Satz von LES-Schichten, wie denjenigen, die in Beispiel 5 oben beschrieben sind, und wo jede LES-Schicht einen individuellen cDNA-Klon enthält, transferiert. Die Identität der cDNA in allen bakteriellen Kolonien wird simultan bestimmt durch die Analyse der Anwesenheit oder Abwesenheit von Hybridisierung auf jeder Einfang-Membran, nachdem die klonierte DNA den LES-Schicht-Satz durchlaufen hat. Eine Anwendung dieser bestimmten Methode ist es, Hochdurchsatz-Genexpressions-Analyse einer gegebenen Zell-Population durch die Bestimmung der Identität einer großen Zahl von bakteriellen Klonen durchzuführen, die von einer bestimmten Zell-Messenger-RNA-Population abstammen.

Beispiel 14

Analyse des genomischen Gehalts von Zellen.

[0090] Die Methode des geschichteten Expressions-Scannings kann verwendet werden, um den genomischen DNA-Gehalt von individuellen Zellen oder Zellen innerhalb einer Gewebe-Sektion zu analysieren. Ein Beispiel für diese Anwendung ist wie folgt.

[0091] DNA aus einer Serie von Zell-Linien wird gereinigt, mit einem „beschilderten“ („tagged“) (radiomarkierten oder Fluoreszenz-markierten) Nukleotid markiert und in ein Gitter auf einer Membran oben auf der LES-Vorrichtung platziert, wie oben in Beispiel 2 beschrieben. In dieser besonderen Ausführungsform enthält jede der LES-Schichten einen spezifischen genomischen DNA-Klon. Die DNA-Proben werden durch die LES-Schichten transferiert, so dass die DNA-Fragmente aus den Zellproben spezifisch an die LES-Schicht hybridisieren, welche den korrespondierenden genomischen Klon enthält. Die LES-Schichten werden danach analysiert (durch Radiographie oder Fluoreszenz), um ein quantitatives Maß der Menge an DNA in jeder Zellprobe bei jedem genomischen Lokus, der in dem Satz der LES-Schichten eingeschlossen ist, zur Verfügung zu stellen. Diese Anwendung würde bei der Bestimmung der spezifischen Regionen von DNA (und assoziierter Gene) nützlich sein, welche in einer Serie von Zell-Linien amplifiziert oder deletiert sind.

[0092] Obwohl viele der vorangehenden Beispiele in Zusammenhang mit einem geschichteten Substrat beschrieben wurden, in welchem sich diskrete und separierbare Schichten sukzessive quer zu dem Pfad der Bewegung des zu analysierenden Materials erstrecken, können dieselben Prinzipien auf andere Konfigurationen des Substrates angewendet werden. Zum Beispiel können Schichten substantiell parallel oder in einigen anderen winkelförmigen Beziehungen zu dem Pfad der Bewegung arrangiert werden. In anderen Ausführungs-

formen kann jede Schicht in multiple Regionen unterteilt werden, wobei jede ein verschiedenes Einfang-Molekül hat, welches in der Lage ist, komplexere Muster zu produzieren, welche von der Anwender- oder Bildverarbeitungs-Software erkannt werden können. Jede der Regionen kann sich in jeder gewünschten Form durch die Schicht erstrecken, welche sich in jede Richtung relativ zu der Richtung der Bewegung der Probe durch das Substrat erstrecken kann. Jedoch sind in besonders nützlichen Ausführungsformen die verschiedenen Regionen quer zu der Richtung der Bewegung, um eine räumliche Korrespondenz zwischen einer Oberfläche des Substrates, auf welche die Probe aufgebracht wird, und der Region, welche ein Molekül von Interesse einfängt, aufrecht zu erhalten.

[0093] Obwohl offenbarte Ausführungsformen ein Muster der Interaktion in sukzessiven Schichten, welche mit Positionen auf einer Oberfläche korrespondieren, untersuchen, kann jedes Muster, welches Information über den molekularen Gehalt der Probe mitteilt, verwendet werden. Bei besonders komplexen Mustern (des Typs, welche mit multiplen verschiedenen Typen von Einfang-Molekülen in jeder Schicht generiert werden können, in regulären oder irregulären Mustern, welche sich durch die verschiedenen Tiefen des Substrates erstrecken können) ist Muster-Erkennungs-Software besonders effektiv, um die Muster zu speichern und zu vergleichen.

[0094] Im Hinblick auf die vielen möglichen Ausführungsformen, auf welche die Prinzipien dieser Erfindung angewendet werden können, sollte erkannt werden, dass die illustrierten Ausführungsformen nur bestimmte Beispiele der Erfindung sind, und sie sollten nicht als eine Limitierung des Umfangs der Erfindung aufgefaßt werden. Stattdessen wird der Umfang der Erfindung durch die folgenden Ansprüche definiert.

Referenzen

- W. Bonte, *Acta histochem.* 62: 68–77 (1978).
- Z. Chen et al., *Clin. Chem.* 41: 1273–82 (1995).
- M. Emmert-Buck et al. *Science* 274: 998–1001 (1996).
- M. Inczedy-Marcsek et al., *Acta Histochem. Supp.* 36: S 377–94 (1988).
- T. Grogan, *Am. J. Clin. Pathol.* 4 (Supp. 1): S 35–8 (1992).
- Z. Huang et al., *Anal Biochem.* 268: 305–17 (1999).
- L. Jin and R. Lloyd, *J. Clin. Lab Anal.* 11: 2–9 (1997).
- J. Kononen et al., *Nat. Med.* 4: 844–847 (1998).
- I. Lefkoviets et al. (eds.), *Immunology Methods Manual* (1996).
- J. Lindner et al., *Naturwissenschaften* 43: 201 (1956).
- V. Neuhoff, *Electrophoresis* '79 (1980).
- C. Saravis et al., *J. Immun. Meth.* 29: 97–100 (1979).
- U. Schumacher et al. (1990) *Histochem. J.* 22: 433–438 (1990).
- U. Schumacher and D. Trudrung, *Anal. Biochem.* 194: 256–58 (1991).
- M. Schena et al., *Science* 270: 467–469 (1995).
- K. Smith et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90: 2846–2850 (1993).
- P. van der Sluis et al., *Electrophoresis* 9: 654–66 (1988).
- L. Zhang et al., *Science* 276: 1268–1272 (1997).
- S. Zucker et al., *Clin. Exp. Metastasis* 12: 13–23 (1994).

Patentansprüche

1. Verfahren zur Analyse einer zellulären Probe, umfassend:

Bringen der zellulären Probe auf ein Substrat, umfassend mindestens zwei verschiedene überlagernde Einfang-Regionen, wobei jede Einfang-Region eine Schicht ist und die verschiedenen Einfang-Regionen des Substrates verschiedene Identifizierungs-Moleküle enthalten, welche mit verschiedenen biologischen Molekülen aus der zellulären Probe wechselwirken und wobei die zelluläre Probe intakte Zellen oder Zell-Lysate umfaßt; und

Übertragen von Komponenten der intakten Zellen oder Zell-Lysate durch die Einfang-Regionen unter Bedingungen, welche den Komponenten erlauben, mit den verschiedenen Identifizierungs-Molekülen in den verschiedenen Einfang-Regionen des Substrates zu wechselwirken, so daß die übertragenen Komponenten Positionen aufweisen, die den Positionen der intakten Zellen oder Zell-Lysate entsprechen, um ein Muster zu produzieren, welches eine Entsprechung mit einer zweidimensionalen Architektur der zellulären Probe bewahrt, und wobei eine geometrische Entsprechung der übertragenen Komponenten mit den intakten Zellen oder Zell-Lysaten hergestellt wird, wobei dadurch die zelluläre Probe analysiert wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Schichten zusammenhängend sind und Komponenten der zellulären Probe durch die verschiedenen Schichten des Substrates durch Kapillar-Wirkung des Substrates oder durch Elektrophorese übertragen werden.
3. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Komponenten eine zelluläre Architektur der intakten Zellen aufrechterhalten, während die Komponenten durch die Schichten des Substrates übertragen werden.
4. Verfahren nach Anspruch 3, weiterhin umfassend eine entsprechende Wechselwirkung zwischen verschiedenen Identifizierungs-Molekülen und den Komponenten der intakten Zellen mit einer zellulären Architektur der intakten Zellen.
5. Verfahren nach Anspruch 1, weiterhin umfassend das Bringen von multiplen verschiedenen diskreten zellulären Proben auf eine Oberfläche des Substrates.
6. Verfahren nach Anspruch 5, wobei mindestens 20 verschiedene zelluläre Proben auf die Oberfläche des Substrates gebracht werden.
7. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die intakten Zellen einen Schnitt einer Gewebe-Probe, kultivierte Zellen oder eine Zytologie-Probe umfassen.
8. Verfahren nach Anspruch 7, wobei der Gewebeschnitt ein Schnitt eines Tumors ist.
9. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Substrat mindestens 10 Schichten oder mindestens 100 Schichten umfaßt.
10. Verfahren nach Anspruch 2, wobei die Schichten des Substrates eine Dicke von mindestens ungefähr 25 mm aufweisen.
11. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die zelluläre Probe vor dem Übertragen der Komponenten der zellulären Probe durch das Substrat auf eine Oberfläche des geschichteten Substrates gebracht wird.
12. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die intakten Zellen vor dem Übertragen der Komponenten der zellulären Probe durch die Schichten behandelt werden, um Komponenten selektiv durch die Schichten zu übertragen.
13. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die zelluläre Probe auf eine Oberfläche des geschichteten Substrates in einem Gel gebracht wird und eine Konzentration des Gels variiert wird, um selektiv Komponenten von verschiedener molekularer Größe zu übertragen.
14. Verfahren nach Anspruch 13, wobei ein Gel mit hoher Konzentration verwendet wird, um selektiv Proteine mit einer relativ kleineren Molekulargröße zu übertragen.
15. Verfahren nach Anspruch 1, weiterhin umfassend das Reagieren einer identifizierten Komponente mit einem zweiten Identifizierungs-Molekül, um zu bestimmen, ob die identifizierte Komponente mit einer anderen Komponente assoziiert ist.
16. Verfahren nach Anspruch 15, wobei die zelluläre Probe eine Tumor-Probe ist und die identifizierte Komponente ein intaktes Protein ist und die Identifizierung der anderen Komponente verwendet wird, um zu bestimmen, ob ein zweites Protein mit dem Protein in dem Tumor assoziiert ist.
17. Verfahren nach Anspruch 16, wobei multiple Tumor-Proben auf das Substrat gebracht werden und Komponenten der multiplen Tumor-Proben simultan separat durch das Substrat übertragen werden.
18. Verfahren nach Anspruch 17, wobei die multiplen Tumor-Proben Proben eines bestimmten Tumortyps in verschiedenen Stadien der Tumor-Progression sind.
19. Verfahren nach Anspruch 18, wobei die multiplen Tumor-Proben Proben eines Tumors von einem bestimmten Patienten in verschiedenen Stadien der Tumor-Progression in diesem Patient sind.
20. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die zelluläre Probe durch Sezieren einer Zell-Population von Inter-

esse aus einer größeren Zell-Population erhalten wird.

21. Verfahren nach Anspruch 20, wobei das Sezieren einer Zell-Population von Interesse eine Laser-Einfang-Mikrodissektion der Zell-Population umfaßt.

22. Verfahren nach Anspruch 1, wobei eine oder mehrere der Schichten eine elektrisch leitfähige Schicht ist.

23. Verfahren nach Anspruch 22, wobei die Schichten separierbar sind und nach dem Übertragen der Komponenten der zellulären Probe für die individualisierte Identifizierung der Komponenten der zellulären Probe separiert werden, welche in jeder separierten Schicht zurückgehalten werden.

24. Verfahren nach Anspruch 22, wobei jede Schicht ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus einem Agarose-Gel mit hoher Konzentration, einem Agarose-Gel mit niedriger Konzentration, einem Polyacrylamid-Gel mit hoher Konzentration, einem Polyacrylamid-Gel mit niedriger Konzentration und einer Membran.

25. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Identifizierungs-Moleküle Moleküle umfassen, die ausgewählt sind aus der Gruppe, bestehend aus Antikörpern, Nukleinsäuren, Peptiden, Rezeptoren und Liganden.

26. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Identifizierungs-Moleküle ein Einfang-Molekül umfassen, welches eine Komponente der zellulären Probe in der Schicht zurückhält, wobei das Verfahren weiterhin das Aussetzen des Identifizierungs-Moleküls gegenüber einem Nachweis-Molekül umfaßt, welches mit einer Kombination des Einfang-Moleküls und der Komponente der zellulären Probe assoziiert oder mit einer Region der Komponente assoziiert, die verschieden von einer Region ist, welche von dem Identifizierungs-Molekül erkannt wird.

27. Verfahren nach Anspruch 26, wobei die Komponente ein Protein ist, das Identifizierungs-Molekül eine erste Domäne des Proteins erkennt und das Nachweis-Molekül eine zweite Domäne des Proteins erkennt.

28. Verfahren nach Anspruch 27, wobei das Nachweis-Molekül ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus Antikörpern, Nukleinsäuren, Peptiden, Rezeptoren, Liganden und Färbemitteln.

29. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei die Identifizierungs-Moleküle Komponenten der übertragenen Komponenten in relativer Menge zu einer Menge der Komponenten in der zellulären Probe einfangen und einen quantitativen Hinweis auf die relative Menge der Komponenten in der zellulären Probe geben.

30. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei die übertragenen Komponenten, die mit den verschiedenen Identifizierungs-Molekülen wechselwirken, intakte Proteine oder intakte Nukleinsäure-Moleküle umfassen, welche keinen proteolytischen oder nukleolytischen Reaktionen vor dem Übertragen durch die verschiedenen Schichten des Substrates unterzogen wurden.

31. Verfahren nach Anspruch 1, weiterhin umfassend das Einfangen einer Komponente der zellulären Proben und die Durchführung von Massenspektroskopie-Sequenzierung, um die eingefangene Komponente zu identifizieren.

32. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Übertragen der Komponenten der zellulären Probe durch das geschichtete Substrat eine dreidimensionale Matrix produziert, wobei eine Oberfläche des Substrates, auf welche die zelluläre Probe gebracht wird, eine zweidimensionale Matrix zur Verfügung stellt, und eine dritte Dimension durch die Übertragung der Komponenten der zellulären Proben durch die verschiedenen Schichten zur Verfügung gestellt wird, wobei es eine identifizierbare Entsprechung zwischen einer Position der Komponente der zellulären Probe in der zweidimensionalen Matrix und einer Position der übertragenen Komponenten in der dreidimensionalen Matrix gibt.

33. Verfahren nach Anspruch 2, wobei die Elektrophorese das Einbringen eines elektrischen Stroms durch die zusammenhängenden Schichten des Substrates umfaßt, so daß der Strom quer zur Vielzahl der verschiedenen Schichten fließt.

34. Verfahren nach Anspruch 22, wobei die eine oder mehreren elektrisch leitfähigen Schichten elektrisch leitfähige Gele umfassen, durch welche der elektrische Strom geleitet wird.

35. Verfahren nach Anspruch 32, wobei die zweidimensionale Matrix eine zweidimensionale cytotokohärente Matrix oder eine Anordnung von zellulären Proben ist.

Es folgen 5 Blatt Zeichnungen

FIG. 1

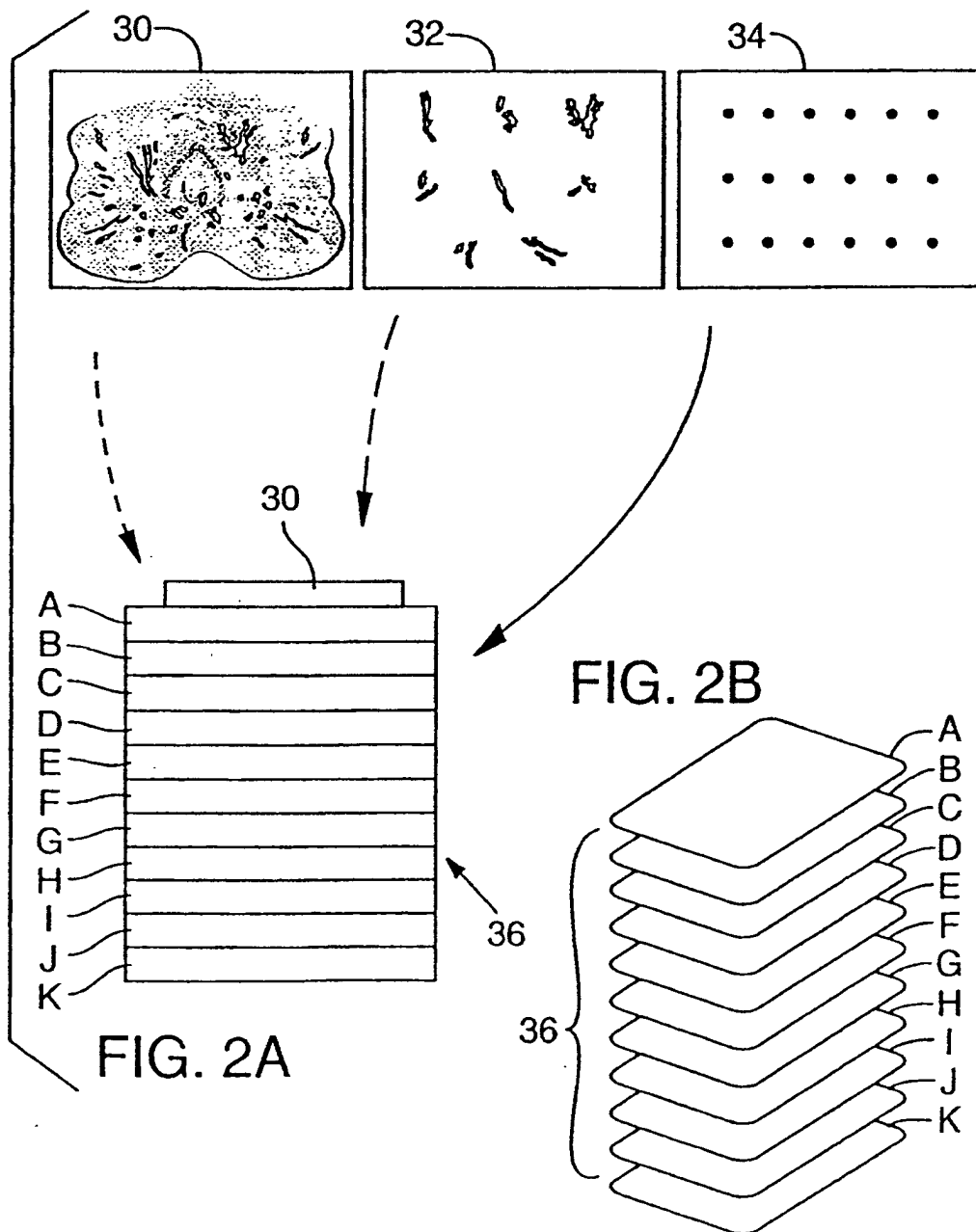
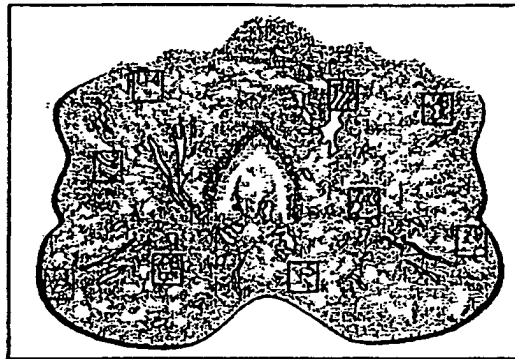


FIG. 3A

Nach der Übertragung durch 10 Schichten

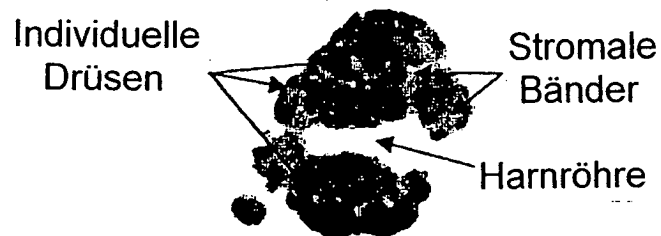


FIG. 3B

H & E

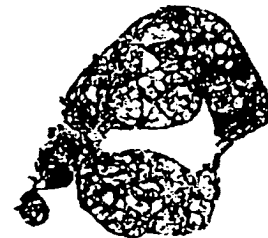


FIG. 3C

Nach der Übertragung durch 100 Schichten



FIG. 3D

H & E



FIG. 4A

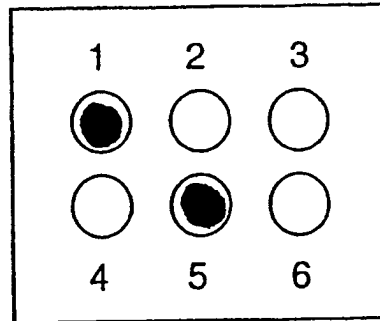


FIG. 4B

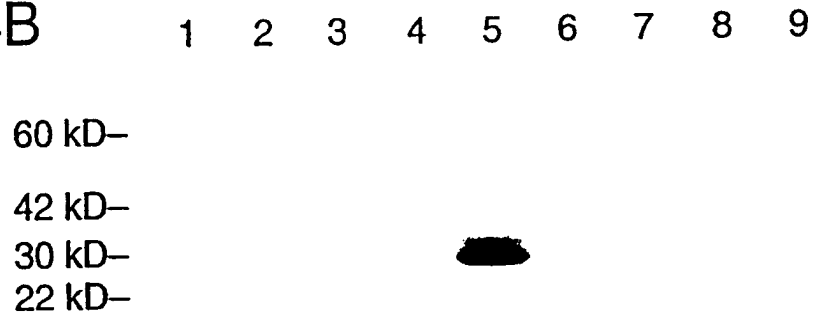


FIG. 4C

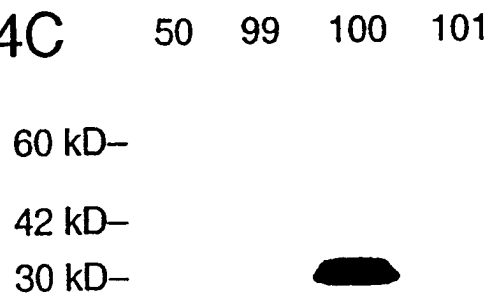


FIG. 4D

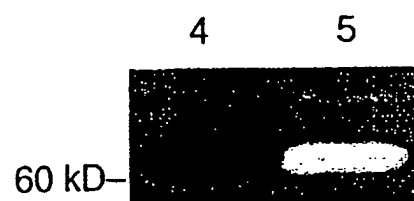


FIG. 5

