

Lösung für die Asservierung von Zellen

Die vorliegende Erfindung betrifft generell die Stabilisierung von Blutproben und insbesondere die Asservierung von Zellen, vor allem von zirkulierenden Tumorzellen, in Blutproben oder anderen Körperflüssigkeiten. Die Erfindung betrifft dabei insbesondere eine asservierende Lösung und eine Verwendung für die schnelle, permanente Unterbrechung des Stoffwechsels von Zellen zur Stabilisierung des Genexpressionszustandes, insbesondere des Transkriptoms unter Erhalt der Morphologie, was eine anschließende molekulare Analyse des Transkriptoms ermöglicht. Ferner betrifft die Erfindung die Verwendung asservierender Lösungen sowie von Proberöhrchen oder Blutentnahmeröhrchen oder-spritzen, in denen eine erfindungsgemäße Lösung vorgelegt ist.

Hintergrund der Erfindung

Biomoleküle unterliegen in einer intakten, stoffwechselnden Zelle einem ständigen Umsatz. Je nach z.B. Umweltbedingung oder Differenzierungsstadium oder einer anderen den Metabolismus beeinflussenden Gegebenheit erfolgt dieser Umsatz von Molekülen durch Neusynthese und Abbau. Eine Änderung der Biomolekülausstattung geschieht innerhalb von Zellen spezifisch, kontrolliert und zielgerichtet. Außerhalb von Zellen dagegen unterliegen Biomoleküle einem unspezifischen, unkontrollierten und zufälligen Abbau. Zum Verständnis biologischer Funktionen eines Moleküls in einer Zelle ist es von entscheidender Bedeutung seine Funktion im Kontext der gleichzeitig anwesenden weiteren Biomoleküle zu verstehen. Insbesondere durch Einzelzell-Transkriptomanalyse (RNASeq) ist in letzter Zeit deutlich geworden, dass Zellen gleichen Typs durchaus unterschiedliche Genexpressionsmuster aufweisen können. Insbesondere wurde in der Analyse von Tumorzellen deutlich, dass ein solider Tumor heterogen in der Genexpression sein kann. Die Analyse des Transkriptoms einzelner Zellen ist deshalb von allgemeinem Interesse.

Die Analyse des Genexpressionszustandes einer Zelle ist durch verschiedene Gegebenheiten erschwert. Hierzu gehört die Instabilität von vielen Biomolekülen insbesondere von RNA, wenn sie außerhalb von Zellen vorliegen. Aber auch die Verwahrung von intakten Zellen bis zur Analyse kann erheblichen Einfluss auf die Genexpression haben. Es ist allgemein üblich, z. B. Zellen aus der Zellkultur während der Ernte bei 4°C zwischenzulagern, Medium und Wachstumsfaktoren zu entziehen und durch wiederholte Zentrifugation zur Aufbereitung nicht nur erhebliche Temperaturwechsel zu induzieren, sondern hierdurch auch Zelldichten oszillierend zu

verändern. Dabei ist bekannt, dass die Zelldichte einen erheblichen Einfluss auf die Differenzierung und Zellteilung ausübt. Ähnliches gilt nach der Entnahme von Gewebe oder Tumoren. Die Aufbereitung ändert die Nährstoffzufuhr, Sauerstoff- und CO₂-Partialdrucke und die Mikroumgebung. Es folgt eine schnelle Antwort der Zellen in Form von veränderten Expressionsmustern, die sich am schnellsten auf Transkriptom-Ebene bemerkbar machen. Es ist also von Bedeutung, das Transkriptom als Istzustand so weit wie möglich zu erhalten und vor manipulationsbedingten Veränderungen zu schützen.

Am Beispiel der Biobanken werden die Schwierigkeiten der Transkriptomanalyse deutlich. Menschliche Tumormproben, die bspw. nach einer Operation dem Biobanking zugeführt werden, werden in der Regel direkt nach Entnahme mit 10% Formalin fixiert. Dies hat allerdings den erheblichen Nachteil, dass das für die Analyse des Ist-Zustandes wichtige Transkriptom quervernetzt wird. Eine molekulare Analyse wird so erheblich erschwert und eine Isolierung intakter Moleküle ist in der Regel nicht mehr möglich. Deshalb werden die frischen Proben meist bei Raumtemperatur gelagert, bis sie durch Fachpersonal weiterbearbeitet werden können. Die Weiterverarbeitung geschieht in der Regel durch fachgerechte Teilung der Probe, um einen Teil für spätere molekulare Analysen einzufrieren und einen anderen Teil nach Formalinfixierung für morphologischen Analysen bereitzuhalten. Die Lagerungszeit zwischen der Entnahme und der Weiterverarbeitung kann unter Umständen mehrere Stunden betragen und birgt erhebliche Risiken für die Validität der Biobanken bzw. der asservierten Proben. Das spätere Auftauen der Probe für molekulare Analysen führt darüber hinaus zur Induktion von RNA-Abbauprozessen und so zur Veränderung des Transkriptoms.

In der Tumorbilogie konnte in den letzten Jahren eine große Heterogenität der molekularen Ausstattung von Zellen innerhalb eines Tumors nachgewiesen werden. In diesem Zusammenhang wird zirkulierenden Tumorzellen (CTC) besondere Bedeutung zugeschrieben, da eine Analyse dieser Zellen ermöglicht, Therapieoptionen aufzuzeigen sowie den Krankheit- und Therapieverlauf zu überwachen. Zirkulierende Tumorzellen sind Zellen, die sich von einem Primärtumor abgelöst haben. Sie können entweder im Lymphsystem vorliegen oder aber im Blutkreislauf zirkulieren. Zumindest bei einigen Arten von zirkulierenden Tumorzellen besteht die Möglichkeit, dass sie sich in anderen Organen oder Geweben ansiedeln und neue Tumore bzw. Metastasen bilden. Die Mehrheit der krebisbedingten Todesfälle ist nicht auf Primärtumore zurückzuführen, sondern auf davon abgeleitete Metastasen und Sekundärtumore.

Diagnostische Methoden, welche es erlauben, CTCs zu analysieren, können wesentlich zur Auswahl von personalisierten und effektiven Behandlungsmethoden beitragen. Ferner

kann die Analyse von CTCs bei der Erstellung einer Prognose für den Patienten in einem frühen Stadium hilfreich sein, da man mittlerweile weiß, dass diese zirkulierenden Zellen bereits in einem frühen Krankheitsstadium existieren und nachgewiesen werden können. Auch für die Untersuchung der Wirksamkeit von Medikamenten sind Analysen von CTCs von hoher Bedeutung.

CTCs liegen allerdings nur in äußerst geringen Mengen in den jeweiligen Körperflüssigkeiten vor und sind darüber hinaus empfindlich gegenüber Manipulationen im Rahmen der Analysen. Wie oben bereits erwähnt, unterliegen alle Biomoleküle in einer intakten, stoffwechselnden Zelle außerdem einem ständigen Umsatz. Abhängig von unterschiedlichen Einflussfaktoren, zum Beispiel Umweltbedingungen oder Differenzierungsstadium oder einer anderen, den Metabolismus beeinflussenden Gegebenheit, erfolgt dieser Umsatz von Molekülen durch Neusynthese und Abbau. Eine Änderung der biomolekularen Ausstattung geschieht innerhalb von Zellen spezifisch, kontrolliert und zielgerichtet. Zum Verständnis biologischer Funktionen eines Moleküls in einer Zelle ist es von entscheidender Bedeutung, die jeweilige Funktion im Kontext der gleichzeitig anwesenden weiteren Biomoleküle zu beobachten. Hierzu ist eine Konservierung von Zellen und eine Stabilisierung ihres metabolischen und morphologischen Zustands erforderlich.

Obwohl die Existenz von CTCs grundsätzlich seit langem bekannt ist, rückten sie erst vor einigen Jahren in das Interesse der Forschung, um die Behandlungsmöglichkeiten von Tumorkranken zu verbessern. Für die Konservierung von Blut sind einige Wege seit Jahrzehnten weltweiter Standard. EDTA-, Citrat- oder Heparin-Zusätze verhindern die Blutgerinnung und erlauben es die Bestandteile des Blutes zu analysieren. CTCs können mit Hilfe dieser Zusätze allerdings nicht sehr gut stabilisiert werden, da viele normale Blutfunktionen auch nach der Blutentnahme, also *ex vivo*, erhalten bleiben. So reagiert beispielsweise das Immunsystem und versucht, CTCs zu eliminieren, oder von einer Chemotherapie bereits angegriffene CTCs unterliegen Nekrose oder Apoptose.

Die Lagerungszeit zwischen der Entnahme und der Weiterverarbeitung von Blutproben kann außerdem viele Stunden betragen und birgt erhebliche weitere Risiken. Der Expressionsstatus der CTCs ändert sich mit Temperatur und Umgebungsbedingungen, auf welche die CTC mit geänderter Genexpression reagieren. Dies führt zu einer unerwünschten Änderung des molekularen Abbilds in der nachfolgenden Analyse.

Es ist ferner bekannt, dass auch normale Blutzellen erheblicher Veränderung durch Lagerung unterliegen. Auf der anderen Seite gehört die Lagerung von Blut zur diagnostischen Routine, da im Krankenhausalltag bestimmte Abläufe und Zeiten vorgegeben sind. Zu den lagerungsbedingten Veränderungen ist nicht nur eine Änderung des Expressionsstatus von Blutzellen zu zählen, sondern auch bspw. eine Art Desintegration von Zellen, was sogenannten Debris induziert, also Aggregate herumliegenden Zellmaterials, die nicht nur die Analyse von Zellen erschweren, sondern auch invalide Analysen verursachen können (siehe hierzu auch US 7,863,012 B2). Hierdurch wird ersichtlich, dass nicht nur der Erhalt der zellulären Integrität, sondern auch der Erhalt des Expressionsstatus von Zellen über einen längeren Zeitraum von entscheidender Bedeutung für die Analyse von CTCs ist. Insbesondere ist die RNA-Stabilität von Bedeutung, da durch das Transkriptom entscheidende Erkenntnisse zu Tumorbilogie und therapeutischen Optionen gewonnen werden können.

Unter „molekulare Analyse des Transkriptoms“ wird die Untersuchung der zellulären RNA mit molekularbiologischen Methoden verstanden. Zu ihnen gehören bspw. die spektroskopische Quantifizierung, die Northern Hybridisierung, die reverse Transkription mit oder ohne Hybridisierung eines Biochips oder auch die Amplifikation einzelner Transkripte durch Polymerasekettenreaktion sowie RNASeq Methodiken (Gesamt-RNA-, mRNA-, Amplicon-Sequenzierung). Solche molekularbiologischen Analysemethoden sind allgemein bekannt und selbst nicht Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Unter „morphologischer Analyse“ wird hier die Analyse einzelner oder mehrerer Zellen bis hin zur Analyse eines Zellverbandes in dem natürlichen Kontext bzw. der natürlichen Umgebung verstanden und bezieht sich auf Größe, Form, Granularität etc. Unter „morphometrischer Analyse“ wird hier die Analyse eines oder mehrere zellulären Charakteristika einzelner oder mehrerer Zellen verstanden, bspw. die Analyse auf die Expression eines bestimmten Zellmarkers.

Stand der Technik

In der Literatur wurden verschiedene Wege vorgeschlagen, wie die zelluläre Integrität aufrechterhalten werden kann. In der Regel basieren diese auf vernetzenden Agenzien wie Formaldehyd, Paraformaldehyd, Glutaraldehyd (bspw. EP 0 214 613 A2, DE 40 39 716 A1). US 4971783 A beschreibt ein Verfahren zur Gewebeaufbereitung. Das US-Patent US 5976829 A beschreibt ein Formalin-basiertes Fixativ, das auch für die DNA/RNA Analyse geeignet ist.

Ein weiterer Ansatz wird durch Literaturstellen aufgezeigt, in denen Methylol-Derivate eine Fixierung der Blutbestandteile ermöglichen. Methylol wird auch als Konservierungsmittel in der Kosmetikindustrie verwendet. Der exakte Wirkmechanismus ist unbekannt, Formaldehyd scheint jedoch eine bedeutende Rolle hierbei zu spielen. Die quervernetzende Natur dieser Fixierungslösungen, insbesondere auch die Quervernetzung von Nukleinsäuren, erschwert aber die Analyse von Zellen auf molekularer Ebene. Dieses Problem versucht unter anderem die US 5976829 A durch ein Fixativ zu lösen, welches einen Aldehyd, einen Alkohol, einen Chelatbildner und einen keine Aminogruppen enthaltenden Puffer umfasst.

Im wissenschaftlichen Bereich werden für die Fixierung von Zellen bzw. der Moleküle auch weitere Methoden verwendet. Hierzu gehören bspw. das Einfrieren bei tiefen Temperaturen, Einsatz von alkoholhaltigen Fixativen (wie z.B. Methanol, Ethanol, Glycol), oder auch von chaotropen Reagenzien (wie z.B. Isothiocyanat), welche eine Stabilisierung von Molekülen unter Zerstörung morphologischer Zusammenhänge ermöglichen.

Im Stand der Technik sind außerdem verschiedene Lösungen verfügbar, um Gewebe ohne Quervernetzung bei gleichzeitigem Strukturert zu fixieren. EP 2 126 542 B1, FR 2 852 392 A1, WO 2013/131816 A1 und WO 03/029783 A1 beschreiben Gemische zur Gewebefixierung unter Verwendung von organischen Lösungsmitteln. Ebenso sind Lösungen verfügbar, um Biomoleküle zu stabilisieren, ohne den morphologischen Kontext zu wahren. Nicht quervernetzende Methoden zur Konservierung von Zellen und Gewebe basieren in der Regel auf Dehydrierung durch Inkubation in organische Lösungen wie Alkohol bzw. Aceton vorzugsweise zusammen mit starken Säuren, z.B. einer Kombination, von Methanol/Eisessig. Nukleinsäuren sind vergleichsweise gut geschützt. Aceton/Eisessig fixiert im Vergleich etwas milder. Allerdings ist eine Analyse von Molekülen nach einer Alkohol- oder Acetonfixierung auf zellulärer Ebene ohne eine Rehydrierung nicht möglich. Nukleinsäuren, insbesondere RNA sind durch Auflösung der Kompartimentierung, also der Beschädigung der zellulären Membransysteme (z. B. Lysosomen) durch Rehydrierung dem ungehinderten Abbau ausgesetzt.

Andere Publikationen beschreiben weitere Lösungen zur Fixierung von Zellen über verschiedene Mechanismen. So enthält eine entsprechende in WO 2012/150479 A1 offenbarte Lösung halogenierte Cyanacetamide und die US 2015/0050689 A1 beschreibt eine Kombination von Polyamiden und Säuren, welche unter Freisetzung von Aldehyden, insbesondere von Formaldehyd reagieren.

In der Praxis werden biologische Präparate für den Erhalt von RNA meist tiefgefroren. Zur RNA Gewinnung werden die Proben dann im gefrorenen Zustand unter stark denaturierenden bzw. chaotropen Bedingungen lysiert. Die so isolierte RNA ist zwar oft von zufriedenstellender Qualität, allerdings ist eine Qualifizierung der zur Untersuchung gewünschten Zelle(n) durch morphologische oder morphometrische Analyse nicht möglich, gleichwohl besonders die molekulare Analyse einer Subpopulation in der Praxis wünschenswert ist. Eine morphologische oder morphometrische Selektion eines solchen Subsets vor dem Einfrieren erfordert aber für den Erhalt des Expressionsstatus eine vernetzende Formalin-Fixierung, die als Folge die molekulare Analyse erschwert oder unmöglich macht. Die Alternative der nicht vernetzenden, dehydrierenden Fixierung zur Isolierung eines Subsets von Zellen ist ebenfalls ungünstig, da die nachfolgende Selektion einer Subpopulation im dann rehydrierten Zustand zu einem raschen Abbau der RNA führt.

CN202011616524 lehrt die Stabilisierung von DNA in Vollblut unter Verwendung einer komplexen Mischung von Antikoagulanzen und Stabilisatoren bei neutralem oder nahezu neutralem pH.

Ein weiterer Vorschlag im Stand der Technik zur nicht quervernetzenden Fixierung von Zellen und Gewebe ist die HEPES mediated Glutamic acid Protection (DE10021390C2). Hier wird eine aminosäurehaltige Lösung vorgeschlagen, um Gewebe durch dehydrierende Paraffineinbettung als Langzeitkonservierung morphologisch zu erhalten. Obwohl die dehydrierende Fixierung vergleichsweise mild durch Aceton erfolgt, gibt es Strukturveränderungen des Gewebes durch die fehlende Quervernetzung. Das System ist vergleichsweise ineffektiv in der Stabilisierung des Transkriptoms, obwohl die Bearbeitung bei niedriger Temperatur erfolgt.

Ringwald et al (Transfusion Medicine Reviews, 20(2), 2006) stabilisieren Thrombozyten mit einer Mischung aus verschiedenen Salzen und Säuren. Insbesondere wird Essigsäure verwendet, um bei neutralem pH den Stoffwechsel der Thrombozyten bei Lagerung für Transfusionszwecke aufrecht zu erhalten. Als zellkernlose „Zellen“ sind Thrombozyten transkriptionsinaktiv.

In eine kürzlich publizierte Methode für RNAseq Transkriptomanalysen werden Zellen mit einer Mischung aus Wasser, Methanol, Essigsäure und Glycerin (ACME) fixiert. Dieses Verfahren verändert Zellstruktur und Zellmorphologie und es ist nicht ausgeschlossen, dass durch die verwendeten alkoholischen Reagenzien RNA Moleküle und Proteinmarker aus den Zellen herausgelöst werden. Darüberhinaus führt die Rehydrierung zum Abbau der RNA Transkripte. Einen ähnlichen Ansatz verfolgt die Lehre aus PCT/EP2015/061678 (WO 2015/181220 A1).

Für eine Stabilisierung von RNA unter Zerstörung morphologischer Zusammenhänge werden verschiedene chaotrop wirkende Reagenzien kommerziell angeboten (z. B. RNAlater, Ambion; ProtectAll, Qiagen).

Eine Abwandlung ohne organisches Lösungsmittel, aber unter Einsatz von Bisulfiten ist in US 5,432,056 A beschrieben. Hier wird ein Bisulfit-haltiges saures System vorgeschlagen, um Gewebeschnitte oder andere dünnsschichtige Proben zu fixieren. US 6,337,189 B1 wiederum beschreibt eine Harnstoffverbindung in Verbindung mit Alkohol zur nicht-vernetzenden Fixierung zytologische Präparate. Der morphologische Erhalt zellulärer Strukturen ist allerdings bei all diesen Methoden beschränkt.

Für eine Konservierung von Vollblut für die Analyse von CTCs sind solche Methoden ungeeignet, da sie entweder nicht für die Routinediagnostik geeignet sind, die zelluläre Integrität zerstören oder keine effektive Molekülstabilisierung gewährleisten.

US 10,091,984 B2 lehrt allerdings, dass eine Formaldehyd-freisetzende Harnstoffverbindung bei gleichzeitigem Abfangen des Formaldehyds durch Glycin geeignet ist, CTCs morphologisch zu stabilisieren. Auch wenn diese Offenlegung keine kovalente Modifikation der CTC Moleküle postuliert, ist die Rolle des Formaldehyds unklar.

Der Stand der Technik hat Limitierungen bezüglich der Lösungsmöglichkeiten, das Transkriptom von intakten Zellen im status quo zu erhalten, um zu einem späteren Zeitpunkt eine molekulare Analyse durchzuführen. Der Stand der Technik hat insbesondere Limitierungen, wenn eine molekulare Analyse des Transkriptoms von bestimmten Zellen erfolgen soll: (A) Quervernetzende Agenzien konservieren den Expressionstatus in Abhängigkeit von der Diffusionsgeschwindigkeit des Agens relativ langsam und erschweren die molekulare Analyse; (B) Eine nicht quervernetzende Fixierung durch organische Lösungen erfordert eine Rehydrierung und forciert durch unkontrollierten Molekülabbau die Veränderung des Transkriptoms; (C) Die Lyse eines Zellverbandes durch chaotrope Reagenzien erlaubt keine Differenzierung einzelner Zellen. Die chaotrope Lyse einzelner Zellen ist theoretisch möglich. Allerdings würde der Vereinzelung die Zerstörung ihres Kontexts vorausgehen, die zur Änderung des Transkriptoms führen würde.

Die zu lösende Aufgabe war es also eine Lösung zu entwickeln, die es ermöglicht zu einem vom Experimentator zu bestimmenden Zeitpunkt den Metabolismus in Zellen einer Kultur bzw. eines Gewebes zu unterbrechen, um insbesondere das Transkriptom zum

vorliegenden Zeitpunkt zu stabilisieren und gleichzeitig Zellen und Zellkompartimentierung intakt zu lassen, um einen unkontrollierten Abbau der RNA zu verhindern. Dabei soll die Lösung eine zeitversetzte Transkriptomanalyse ermöglichen, für die Asservierung oder die Durchführung zellqualifizierender morphologischer oder morphometrischer Analysen.

Die zu lösende Aufgabe bestand auch darin eine Methode und geeignete Mittel zu entwickeln, die es ermöglichen, den Metabolismus bzw. Biomolekülsatz in Zellen des Blutes, insbesondere von CTCs oder anderer Körperflüssigkeiten zu unterbrechen, um einen temporären, hochstabilisierten nicht quervernetzten Erhalt des Ist-Zustandes von Genom, Transkriptom und Proteom zu gewährleisten und einen unkontrollierten Abbau der Moleküle zu verhindern, dabei gleichzeitig die Zellen morphologisch intakt zu halten und die Koagulation des Blutes zu verhindern. Dabei soll die Lösung der Aufgabe eine zeitversetzte Aufarbeitung für die Isolierung von CTCs und die Durchführung molekularer und ggf. morphologischer Analysen der CTCs oder anderer Zellen ermöglichen.

Zusammenfassung der Erfindung

Die genannten Aufgaben werden durch die vorliegende Erfindung gelöst. Ein erster Aspekt der vorliegenden Erfindung ist eine Lösung zur Asservierung von Zellen, insbesondere mindestens einer eukaryontischen Zelle und insbesondere von Tumorzellen und von zirkulierenden Tumorzellen in einer Blutprobe oder einer anderen Körperflüssigkeit, von Zellen aus der Zellkultur oder von Zellen im Gewebe, welche dadurch gekennzeichnet ist, dass sie einen

- a) membrangängigen Protonencarrier enthält,
- b) im wesentlichen frei ist von chaotropen Substanzen, Alkoholen und Detergentien, und
- c) einen pH-Wert aufweist, der einen intrazellulären pH der Zelle oder Zellen von unter 6 erzeugt.

Ferner liegt ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung in der Verwendung einer solchen Lösung gemäß dem ersten Aspekt der Erfindung zur Konservierung, Asservierung oder/und Fixierung von Zellen, insbesondere mindestens einer eukaryontischen Zelle, insbesondere von Tumorzellen oder zirkulierenden Tumorzellen in einer Blutprobe oder einer anderen Körperflüssigkeit oder von Zellen aus der Zellkultur oder von Zellen im Gewebe unter weitgehendem Erhalt der Zellmorphologie,

insbesondere für eine molekulare Analyse des Genom, des Transkriptoms und des Proteoms.

Ein dritter Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft Proberöhrchen, Blutentnahmespritzen oder Blutentnahmeröhrchen, welche eine Lösung nach dem ersten Aspekt der Erfindung enthalten.

Vorteile und Details der vorliegenden Erfindung ergeben sich aus den Ansprüchen, der folgenden detaillierten Beschreibung und den Ausführungsbeispielen.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

Intakte Zellmembranen sind für einen passiven Protonentransport nicht permeabel und der Protonentransport über die Zellmembran ist hoch kontrolliert. Die vorliegende Erfindung beruht auf der Erkenntnis, dass eine abrupte und schnelle Änderung (Senkung) des pH-Werts innerhalb der Zellen zu einem Funktionsverlust der zellulären Maschinen für Synthese und Abbau von Molekülen und über die Inaktivierung der enzymatischen Aktivität zu einem Stopp des Stoffwechsels führt, ohne in die zelluläre Kompartimentierung einzugreifen. Das wesentliche Kennzeichen der erfindungsgemäßen Lösung ist daher, dass die Stilllegung der Stoffwechselvorgänge sehr schnell, durch Reduktion des pH-Werts erfolgt und so die umgebungsabhängige Änderung des Expressionszustandes vermieden wird.

Erfindungsgemäß wird diese Änderung des intrazellulären pH durch in der Lösung enthaltene membrangängige Protonencarrier erreicht. Unter einem Protonencarrier wird ein Molekül verstanden, das in der Lage ist, unter geeigneten Bedingungen in protonierter Form die Zellmembran, bevorzugt passiv, zu überwinden und welches innerhalb der Zelle in Anion und Proton zerfällt. Dabei werden z.B. geeignete Bedingungen geschaffen, indem man Zellen mit einem Protonencarrier mit einem pKs im sauren Bereich in einem sauren Milieu mischt. Hierbei passiert die protonierte Form des Protonencarriers die Zellmembran und dissoziiert aufgrund des höheren intrazellulären pHs innerhalb der Zelle. Als Ion ist ein Verlassen der Zelle des Protoncarriers nicht möglich, sodass im Gleichgewicht der intrazelluläre pH durch den extrazellulären pH bestimmt wird.

Des Weiteren erfolgt im Rahmen der vorliegenden Erfindung eine weitgehende Ladungsneutralisierung von Nukleinsäuren. Dies führt insbesondere bei RNA zu einer

partiellen Ausfällung aus dem wässrigen Milieu und so zu einer Stabilisierung sowohl gegen enzymatische, als auch gegen alkalische Hydrolyse.

Wesentlich ist im Rahmen der vorliegenden Erfindung und insbesondere für den Erhalt der Morphologie der Zellen darüber hinaus die im wesentlichen vollständige Abwesenheit von chaotropen Substanzen, welche im Stand der Technik in vielen entsprechenden konservierenden Lösungen vorhanden sind. Chaotrope Substanzen wie zum Beispiel Perchlorate, wie Natriumperchlorat, Thiocyanate, wie Guanidiniumthiocyanat, aber auch Guanidiniumhydrochlorid und Bariumsalze sind Substanzen, die geordnete Wasserstoffbrückenbindungen in Wasser auflösen, die Wasserstruktur aufbrechen und für eine Zunahme der Entropie sorgen. Sie interferieren mit der Hydrathülle von Biomolekülen, führen zu deren Denaturierung und bei entsprechender Konzentration zur vollständigen Auflösung von Zellen.

Die Bezeichnung „im wesentlichen vollständige Abwesenheit“ bedeutet im Rahmen der vorliegenden Erfindung, dass eine Substanz nur in solcher Höchstmenge vorhanden sein kann, welche nicht die morphologische Integrität der Zellen zerstört. In bevorzugten Ausführungsformen ist die erfindungsgemäße Lösung vollständig frei von chaotropen Substanzen.

Analog zur Abwesenheit von chaotropen Substanzen ist die erfindungsgemäße Lösung außerdem gekennzeichnet durch eine im wesentlichen vollständige Abwesenheit von Alkoholen und Detergenzien. In bevorzugten Ausführungsformen sind auch diese Substanzen vollständig aus der erfindungsgemäßen Lösung ausgeschlossen.

Schließlich ist die erfindungsgemäße Lösung weiter dadurch gekennzeichnet, dass sie einen pH-Wert aufweist, der einen intrazellulären pH der Zelle oder der Zellen von unter 6 erzeugt.

Vorteilhaft werden im Rahmen der vorliegenden Erfindung membrangängige Carbonsäuren als Protonencarrier eingesetzt, nämlich vor allem C₂ bis C₅-Carbonsäuren. Wie oben bereits erwähnt, ist Kennzeichen der Erfindung der schnelle Metabolismusstopp unter Erhalt der Morphologie von Zellen, insbesondere von Zellen im Blut. Unter Zellen im Blut werden alle zellkernhaltigen Zellen verstanden. Dieser Metabolismusstopp wird im Folgenden auch als Fixierung oder Asservierung bezeichnet, obwohl der Wirk-Mechanismus der vorliegenden Erfindung von den bekannten quervernetzenden, dehydrierenden oder denaturierenden Fixierungen verschieden ist. Erreicht wird der

Metabolismusstopp bevorzugt durch eine gelöste Carbonsäure in Kombination mit einem niedrigen pH. Dabei passiert die protonierte Form der Carbonsäure die Zellmembran und dissoziiert im Zellinneren. Darüber hinaus können allerdings auch andere, in protonierter Form membrangängige Säuren eingesetzt werden.

Die Säuren liegen in der erfindungsgemäßen Lösung bevorzugt in Form eines Carbonsäure-Puffersystems bzw. eines Säure/Basen-Systems vor, welches einen pH im gewünschten sauren Bereich ausbildet und stabilisiert. Diese Puffersysteme umfassen bevorzugt schwache Säuren und ihre korrespondierenden Basen. Blut weist eine sehr hohe Pufferkapazität auf. Erfindungsgemäß wird diese Pufferkapazität mit dem in der Lösung enthaltenen Puffersystem austitriert, um in der Mischung und insbesondere innerhalb der Zellen ein saures Milieu zu schaffen, das wiederum metabolische Aktivitäten weitgehend stilllegt. Erfindungsgemäß ist ein Puffersystem geeignet, das eine ausreichende Menge protonierter Carbonsäure zur Membranpassage zur Verfügung stellt und gleichzeitig intrazellulär genügend H^+ Ionen freisetzt.

Je nach verwendetem Untersuchungsmaterial kann es erforderlich sein, zur Einstellung des intrazellulären pH-Werts der erfindungsgemäßen Lösung zusätzlich eine starke Säure zuzusetzen, damit die Pufferkapazität des Untersuchungsmaterials austitriert wird. Geeignete starke Säuren sind insbesondere Salzsäure oder andere Mineralsäuren. Diese Säuren sind aber nicht membrangängig und stellen daher keine Protonencarrier im Rahmen der vorliegenden Erfindung dar.

Insbesondere erfolgt die Auswahl des Protonencarriers und die Einstellung des pH-Werts der erfindungsgemäßen Lösung in solcher Weise, dass sich nach der Vermengung mit Zellen, der Blutprobe bzw. einer anderen Körperflüssigkeit oder Gewebeprobe eine Mischung mit einem pH von zwischen 4 und 6 ergibt. Die entsprechende Einstellung kann der Fachmann leicht treffen, da ihm der pH-Wert und die Pufferkapazität von Zellkulturmedium, Blutproben oder anderen Körperflüssigkeiten oder Gewebeproben, die als Untersuchungsgegenstand in Frage kommen, bekannt ist und er daher je nach gewünschtem Mischungsverhältnis den pH-Wert der Lösung voreinstellen kann. Übliche Mischungsverhältnisse von zu analysierenden Blutproben und Konservierungslösungen sind dem Fach ebenfalls bekannt und betragen beispielsweise 1:10 bei Zitratblut. Auf andere Untersuchungsgegenstände können die Mischungsverhältnisse entsprechend angepasst werden und liegen generell im selben Bereich.

In Rahmen der Erfindung wird als Carbonsäure insbesondere Essigsäure eingesetzt. Essigsäure liegt dann in der erfindungsgemäßen Lösung bevorzugt als Essigsäure/Azetat-System vor und der pH-Wert der Lösung wird so eingestellt, dass er jedenfalls unterhalb von 6 liegt. In weiteren bevorzugten Ausführungsformen wird der pH-Wert und die Pufferkapazität der erfindungsgemäßen Lösung so gewählt, dass der resultierende pH-Wert nach dem Mischen mit der Probe unterhalb von 6 liegt. Insbesondere liegt der pH-Wert der Mischung aber sogar zwischen 2 und 6, mehr bevorzugt zwischen 4,8 und 5,8 und besonders bevorzugt zwischen 5,0 und 5,5, bzw. zwischen 5,1 und 5,3. Hierzu werden insbesondere erfindungsgemäße Lösungen in Betracht kommen, deren pH-Wert unterhalb von 6, bevorzugt unterhalb von 5,8 und insbesondere gleich oder unterhalb von 5,3 liegt. Je nach beabsichtigtem Mischungsverhältnis und zu konservierender Körperflüssigkeit zeigen solche Lösungen erfindungsgemäß einen pH-Wert im sauren Bereich, insbesondere zwischen 1 und 5 und bevorzugt zwischen 1,8 und 4,5, und, wenn z.B. zur Mischung mit Blut im Verhältnis 1:5 vorgesehen, bevorzugt zwischen 2 und 3. Die Angaben zum pH-Wert beziehen sich im Rahmen der vorliegenden Erfindung auf eine Temperatur von 20°C. Wie oben bereits ausgeführt, stellt sich basierend auf dem pH der Lösung, in der die Zellen vorliegen und der Pufferkapazität der Untersuchungsmaterials, auch der innerzelluläre pH Wert ein.

Das Säure/Basensystem des Protonencarriers der vorliegenden Erfindung liegt üblicherweise in einer Konzentration von 1 bis 300 mM vor, abhängig davon, ob es sich um eine konzentrierte Lösung handelt, die einer Verdünnung durch die Blutprobe und weiteren wässrigen Lösungen unterworfen wird, oder ob es sich um eine gebrauchsfertige Lösung handelt, die im Überschuss, bspw. mit 10-fachem Volumen zu isolierten Zellen zugegeben wird. Kennzeichen der erfindungsgemäßen Lösung ist dabei die Möglichkeit der Ausgestaltung als (Mehrfach)-Konzentrat, um Blut ohne übermäßige Verdünnung zu fixieren. Hierzu wird insbesondere eine erfindungsgemäße Lösung ins Auge gefasst, in der das Säure/Basen System des Protonencarriers sowie deren gerinnungshemmende Bestandteile als 2 bis 20-faches, bevorzugt 5 bis 10-faches Konzentrat für die Asservierung von Blut oder einer anderen Körperflüssigkeit ausgestaltet ist, um den gewünschten intrazellulären -pH wie oben beschrieben zu erzielen.

In bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung liegt das Säure/Basen System und bevorzugt ein Essigsäure/Azetat-System in einer erfindungsgemäßen konzentrierten Lösung in einer Konzentration vor, die 10 mM bis 300 mM, bevorzugt 25 mM bis 200 mM und besonders bevorzugt 50 mM bis 150 mM beträgt. Insbesondere für die gebrauchsfertige Lösung dagegen ist es bevorzugt, dass die Lösung das Säure/Basen

System in einer Konzentration von 1 mM bis 100 mM, bevorzugt 5 mM bis 50 mM und besonders bevorzugt 10 mM bis 20 mM aufweist.

Die erfindungsgemäße Lösung kann neben den genannten oder weiteren Protonencarriern auch zusätzliche Substanzen, wie insbesondere Puffersubstanzen oder übliche Hilfsstoffe aufweisen. Insbesondere kann die erfindungsgemäße Lösung Imidazol oder/und Dimethylsulfoxid (DMSO) enthalten. Imidazol weist einen leicht sauren pKs auf und kann in protonierter oder nicht-protonierter Form die Zellmembran überwinden. Imidazol kann initial den Transport von H⁺-Ionen in das Zellinnere unterstützen. Eine geeignete Konzentration von Imidazol beträgt bspw. 50 mM. Zur Verwendung der erfindungsgemäßen Lösung für die gefrorene Lagerung von Untersuchungsgegenständen enthält sie bevorzugt DMSO in einer Endkonzentration von 5 bis 15 %, besonders bevorzugt 10%.

Weitere geeignete Protonencarrier, welche im Rahmen der Erfindung als Bestandteil der Asservierungslösung eingesetzt werden können, sind zyklische Peptide wie z. B. Valinomycin oder Nigericin. Außerdem kann die erfindungsgemäße Lösung weitere Ionen, insbesondere Cl⁻-Ionen enthalten.

Die erfindungsgemäße Lösung kann auch weitere zur Konservierung beitragende Stoffe enthalten. Beispielsweise kann die Zugabe von β -Mercaptoethanol oder Dithiotreitol oder ähnlichen Reagenzien die Aktivität von RNasen zusätzlich reduzieren. Es ist für den Fachmann selbstverständlich, dass auch die Zugabe anderer Enzym-Inhibitoren, beispielsweise Phosphatase-Inhibitoren, den konservierenden Effekt der erfindungsgemäßen Lösung positiv beeinflussen kann.

In weiteren bevorzugten Ausgestaltungen umfasst die erfindungsgemäße Lösung zusätzlich mindestens eine Aminosäure. Insbesondere handelt es sich dabei um eine im Gewebe oder in den Zellen natürlicherweise vorkommende Aminosäure. Dabei nutzt das Puffersystem der vorliegenden Erfindung den protektiven Effekt von Aminosäuren. Dieser Effekt kommt insbesondere zum Tragen, wenn derartige Aminosäuren in einer Konzentration von insgesamt oder jeweils 0,1 M bis 1M, vorzugsweise in einer Gesamtkonzentration von 100 mM bis 300 mM enthalten sind. Bevorzugt handelt es sich bei den Aminosäuren um eine oder mehrere aus der Gruppe umfassend Glycin, Alanin, Prolin, Serin, Threonin, Glutaminsäure und als Asparaginsäure.

Eine weitere Ausgestaltung der Erfindung ist die Kombination der schnellen pH abhängigen Fixierung mit einem zusätzlich konservierenden Wirkstoff aus der Gruppe der Formaldehyd-Donatoren. Solche Wirkstoffe können beispielsweise Diazolidinyl-Harnstoff oder Imidazolidinyl-Harnstoff sein.

Bevorzugt ist die Zusammensetzung der erfindungsgemäßen Lösung außerdem so gestaltet, dass die Osmolarität 1 osmol nicht überschreitet. Bevorzugt liegt die Osmolarität der Lösung über 100 und unter 500 mosmol, bevorzugt zwischen 250 und 350 mosmol. Besonders bevorzugt ist die Lösung isoton bzw. bildet eine isotone Umgebung für die zu asservierende Zelle bzw zu asservierenden Zellen aus.

In einigen Ausgestaltungen der Erfindung wird durch die Formulierung der erfindungsgemäßen Lösung eine Koagulation des Blutes nicht vollständig verhindert. Es ist dem Fachmann bekannt, dass diese Koagulationserscheinungen durch Zugabe von Komplexbildnern, die Koagulation verhindernde Agenzien oder inhibierenden Antikörpern unterbunden werden kann. Die Anwesenheit solcher Komplexbildner, Antikoagulantien oder Antikörper in der erfindungsgemäßen Lösung führt daher zu weiteren bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung. In bevorzugten Ausführungsformen sind in der erfindungsgemäßen Lösung als Antikoagulantien $MgSO_4$, Dabigatran oder/und Plasminogen-Aktivator (t-PA) vorhanden.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung der erfindungsgemäßen Lösung zur Konservierung, Asservierung oder/und Fixierung von Zellen, insbesondere mindestens einer eukaryontischen Zelle, insbesondere von Tumorzellen und zirkulierenden Tumorzellen in einer Blutprobe oder anderen Körperflüssigkeit, von Zellen aus der Zellkultur oder von Zellen im Gewebe, bevorzugt mit anschließender oder zeitversetzter molekulare Analyse.

Diese erfindungsgemäße Verwendung ist dadurch gekennzeichnet, dass die Lösung mit der Blutprobe oder anderen Körperflüssigkeit, den Zellen aus Zellkultur in entsprechendem Medium oder mit zellhaltigem Gewebe bevorzugt direkt nach der Entnahme vermischt wird.

Die molekulare Analyse kann jegliche in der Zelle vorhandene Substanz oder Gruppe von Substanzen betreffen, insbesondere das Genom, das Transkriptom und das Proteom. Bevorzugt wird als molekulare Analyse an der mindestens einen Zelle nach Behandlung mit der erfindungsgemäßen Lösung eine Transkriptomanalyse durchgeführt.

Ein besonderes Kennzeichen der Erfindung ist die Möglichkeit, weitgehend intakte Zellen anhand eines Merkmals zu qualifizieren und diese Qualifikation zu benutzen, um molekulare Analysen durchzuführen. Bevorzugt wird ein mit der erfindungsgemäßen Lösung behandeltes Gemisch aus unterschiedlichen Zellen auf einen Marker analysiert. Bevorzugt ist dies ein morphologischer Marker (z.B. analysiert durch FSC/SSC in der Durchflusszytometrie) oder ein morphometrischer Marker (z.B. ein markierter Antikörper zur Bindung an ein Oberflächenprotein). Dabei kann das Gemisch aus zwei, drei oder mehr unterschiedlichen Zellpopulationen bestehen. Bevorzugt wird dieser Marker für die Qualifizierung mindestens einer Zelle für die Analyse der zellulären Bestandteile, besonders bevorzugt des Transkriptoms genutzt.

Es kann bevorzugt sein, die erfindungsgemäße Lösung mit wenigstens einem Enzym für einen Gewebeverdau zu versetzen, um einzelne Zellen aus einem Gewebeverband zu lösen. Bevorzugt ist das wenigstens eine Enzym eine Collagenase, eine Dispase, oder eine Kombination hiervon.

Es kann bevorzugt sein, die mit der erfindungsgemäßen Lösung behandelte mindestens eine Zelle zu lagern. Es kann bevorzugt sein diese Lagerung bei 2-8°C durchzuführen. Es kann alternativ bevorzugt sein diese Lagerung in gefrorenem Zustand durchzuführen.

Die erfindungsgemäße Verwendung weist bevorzugt mindestens auf: einen Eingangsschritt a) Behandlung von Zellen oder Gewebe, mit einer für die Verwendung geeignete Lösung und einen Ausgangsschritt f) die molekulare Analyse des Transkriptoms mindestens einer Zelle.

Bevorzugt weist die Verwendung noch weitere Schritte auf, die einzeln oder in Kombination in Abhängigkeit des Untersuchungsgegenstandes und des Untersuchungszieles zwischen dem Eingangsschritt und dem Ausgangsschritt durchgeführt werden können, nämlich einen oder mehrere der Schritte b) Qualifizierung mindestens einer Zelle für die Transkriptomanalyse durch morphologische oder morphometrische Selektion, c) Lagerung der Zellen in gefrorenem Zustand, d) Lagerung der Zellen bei 2-8°C, e) Proteaseverdau eines Gewebes zur Generierung einzelner Zellen.

Im Rahmen dieser Verwendungsaspekte der Erfindung ist es besonders vorteilhaft, die Lösung bereits in einem Proberöhrchen oder Blutentnahmeröhrchen oder -spritzen oder

einem anderen geeigneten Gefäß, wie der Blutentnahmespritze vorzulegen. Dies ermöglicht insbesondere die direkte Vermischung der Körperflüssigkeit nach der Entnahme mit der erfindungsgemäßen Lösung, so dass einer Verfälschung der Analyse durch zum Beispiel enzymatische Aktivitäten entgegengewirkt werden kann. Entsprechende Proberöhrchen oder Blutentnahmeröhrchen oder -spritzen oder auch andere Reaktionsgefäße, welche die erfindungsgemäße Lösung enthalten, stellen auch weitere Gegenstände der vorliegenden Erfindung dar.

Hierbei ist es wiederum besonders bevorzugt, die erfindungsgemäße Lösung in konzentrierter Form vorzulegen, um eine starke Verdünnung der Probe zu vermeiden. Alternativ zu einem Vorlegen der Lösung in Proberöhrchen oder dergleichen kann auch eine sofortige Vermischung nach der Entnahme der Blutprobe oder der Körperflüssigkeit erfolgen.

Die Proberöhrchen, Blutentnahmeröhrchen oder -spritzen sowie andere Gefäße enthaltend die erfindungsgemäße Lösung können im Rahmen der erfindungsgemäßen Verwendungen eingesetzt werden. Wie die erfindungsgemäße Lösung selbst, sind diese Gegenstände aber auch geeignet zur Durchführung anderer Verfahren, wie z.B. Analysen zellfreier DNA/RNA. Auch die Verwendung zu derartigen Zwecken ist von der vorliegenden Erfindung umfasst.

Alle Erläuterungen, die im Obigen für die erfindungsgemäße Lösung aufgeführt sind, gelten gleichfalls für die erfindungsgemäße Verwendung dieser Lösung und ebenso für die vorgefertigten Proberöhrchen oder Blutentnahmeröhrchen, welche die erfindungsgemäße Lösung enthalten.

Die folgenden Beispiele erläutern in Verbindung mit den Figuren die Erfindung weiter.

Figur 1 zeigt wie im Ausführungsbeispiel 1 beschrieben fixiertes Blut, welches mit kultivierten Tumorzellen versetzt und nach 24 h durchflusszytometrisch untersucht wurde. Die Tumorzellpopulation ist eindeutig identifizierbar.

Figur 2 zeigt eine beispielhafte Einzelzellanalyse. Fixiertes Blut wie im Ausführungsbeispiel 1 beschrieben wurde mit kultivierten Tumorzellen versetzt und nach 40 Stunden mit einem Antikörper gegen EpCam markiert und im Imagestream durchflusszytometrisch untersucht. Die Zellmorphologie ist erhalten (2a). Die

Fluoreszenzfärbung durch den Antikörper ist in 2b und die Überlagerung von Morphologie und Fluoreszenz ist in 2C abgebildet.

Figur 3 zeigt einen Vergleich der Integrität des Transkriptoms nach Anwendung verschiedener Zellfixierungsmethoden anhand einer elektrophoretischen cDNA-Analyse nach Behandlung von Zellen wie im Ausführungsbeispiel 2 beschrieben. Zellen, die mit der erfindungsgemäßen Lösung behandelt wurden gleichen im Expressionszustand frischen, unbehandelten Zellen.

Beispiel 1

In diesem Ausführungsbeispiel wurde eine erfindungsgemäße Lösung mit folgender Zusammensetzung verwendet:

Die erfindungsgemäße Lösung ist in diesem Beispiel wie folgt zusammengesetzt:

23 mM Glucose, 53 mM Imidazol, 11 mM Hepes, 5 mM Asparaginsäure, 40 mM Glutaminsäure, 12 mM Prolin, 24 mM Serin, 3,5 mM Threonin, 32 mM Alanin, 56 mM Glycin, 10 mM MgSO₄, 0,09% Natriumazid, 150 mM Essigsäure, HCl add pH 2.2

Die Lösung weist bei einer Temperatur von 20°C einen pH von 2,2 auf.

2 ml dieser Lösung wurden in eine Blutentnahmespritze vorgelegt. Die so präparierte Spritze wird verwendet, um einem Probanden 8 ml Blut abzunehmen und gleichzeitig die erfindungsgemäße Mischung herzustellen. Das so fixierte Blut kann bei 4°C bis 20°C gelagert werden, um nachfolgend, bspw. innerhalb 24 h, die Mischung auf das Vorhandensein von CTC durch mikroskopische oder durchflusszytometrische Analyse zu analysieren. Möglicherweise vorhandene CTC können auch direkt isoliert werden, bspw. über die Affinität von Oberflächenmarkern zu Antikörpern.

Beispiel 2

HEK293 Zellen aus Zellkultur wurden mittels einer Trypsin-Lösung vom Substrat gelöst und geerntet. Die Zellen wurden mit einem Lebend/Tot-Farbstoff inkubiert und nachfolgend lebende Zellen isoliert. Die Zellen wurden dann in einem Überschuss von unterschiedlichen Lösungen, nämlich einem FACS Puffer, (Sheath fluid, BDBiosciences), einer erfindungsgemäßen Lösung, einer 4%igen Paraformaldehyd PFA-Lösung, einer 3%igen Glyoxal-Lösung, einer DSP-Lösung (dithio-bis(succinimidyl propionate), einem

reversiblen crosslinker) oder einer ACME-Lösung (ACetic-MEthanol: Wasser, Methanol, Eisessig, Glycerin im Verhältnis von 13:3:2:2) für 5 Stunden bei 4 °C bis zur weiteren Analyse konserviert. Danach wurde die Zellen lysiert und mRNA isoliert. Zum Vergleich wurden frische Zellen direkt nach der Ernte lysiert.

Die erfindungsgemäße Lösung ist in diesem Beispiel wie folgt zusammengesetzt:

23 mM Glucose, 53 mM Imidazol, 11 mM Hepes, 5 mM Asparaginsäure, 40 mM Glutaminsäure, 12 mM Prolin, 24 mM Serin, 3,5 mM Threonin, 32 mM Alanin, 56 mM Glycin, 0,09% Natriumazid, Essigsäure (15 mM) add pH 5.3.

Durch Reverse-Transkription wurde cDNA für die gesamte zelluläre mRNA der unterschiedlich behandelten Zellen erzeugt und sequenziert.

Der Vergleich der cDNA für die unterschiedlichen Proben ergab, dass eine äußerst hohe cDNA-Integrität der in der erfindungsgemäßen Lösung gelagerten Zellen beobachtet wird, wogegen für andere Lagerungslösungen oder Puffer eine deutlich nachteilige Konservierung des zellulären Transkriptoms gewährleistet ist. Figur 3 zeigt die Ergebnisse in graphischer Darstellung, wobei das cDNA-Profil mit dem höchsten Peak das Ergebnis für frisch geerntete Zellen darstellt. Das cDNA-Profil mit dem zweithöchsten Peak stellt die erfindungsgemäße Lösung dar und gleicht dem cDNA-Profilverlauf von frischen Zellen sehr stark und im Vergleich am stärksten, während die Profilverläufe anderer Lösungen sehr stark abweichen oder gar nicht dem Profilverlauf von frischen Zellen gleichen.

Patentansprüche

1. Lösung für die Konservierung oder Asservierung von Zellen, bevorzugt mindestens einer eukaryontischen Zelle, insbesondere von Tumorzellen und zirkulierenden Tumorzellen in einer Blutprobe oder einer anderen Körperflüssigkeit, von Zellen aus der Zellkultur oder von Zellen in Gewebeproben, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um eine wässrige Lösung handelt, die
 - a) einen zellmembrangängigen Protonencarrier enthält,
 - b) im Wesentlichen frei ist von chaotropen Substanzen, Alkoholen oder Detergenzien, und
 - c) einen pH-Wert aufweist, der einen intrazellulären pH der Zelle oder Zellen von unter 6 erzeugt.
2. Lösung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Protonencarrier ausgewählt ist aus C₂-C₅ Carbonsäuren oder einer Mischung solcher Carbonsäuren, oder anderen, in protonierter Form membrangängigen Säuren und als Säure/Basen System, bevorzugt als Essigsäure/Actetat System vorliegt und einen pH im sauren Bereich ausbildet.
3. Lösung nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass das Säure/Basen System in einer Konzentration von 1 mM bis 100 mM, bevorzugt 5 mM bis 50 mM und besonders bevorzugt 10 mM bis 20 mM vorliegt.
4. Lösung nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass das Säure/Basen System als 2-20 -faches Mehrfachkonzentrat, besonders bevorzugt als 5-fach Konzentrat ausgestaltet ist.
5. Lösung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass sie zur Einstellung des intrazellulären pH zusätzlich eine starke Säure, bevorzugt Salzsäure oder eine andere Mineralsäure enthält.

6. Lösung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass ihr pH-Wert nach Mischung mit Zellen oder anderem biologischen Material einen sauren pH, bevorzugt zwischen 4 und 6, besonders bevorzugt zwischen 4,5 und 5,5 und am meisten bevorzugt 5,3 beträgt, jeweils gemessen bei 20°C.
7. Lösung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass sie weitere Puffersubstanzen oder Protonencarrier enthält.
8. Lösung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Lösung Imidazol oder/und DMSO enthält.
9. Lösung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass sie mindestens einen Zucker, welche bevorzugt ausgewählt ist aus der Gruppe der Monosacharide oder Disacharide, oder/und mindestens eine Aminosäure, welche bevorzugt ausgewählt ist aus der Gruppe umfassend Glycin, Alanin, Prolin, Serin, Threonin, Glutaminsäure, Asparaginsäure, umfasst.
10. Lösung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass die eine oder mehrere Aminosäuren in einer Konzentration von insgesamt oder jeweils 0,1 M bis 1 M, vorzugsweise in einer Gesamtkonzentration von 100 mM bis 300 mM enthalten sind.
11. Lösung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass sie zusätzlich einen konservierenden Wirkstoff aus der Gruppe der Formaldehyd-Donatoren, insbesondere Diazolidinyl-Harnstoff oder Imidazolidinyl-Harnstoff enthält.
12. Lösung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Osmolarität 1 osmol nicht überschreitet, bevorzugt unter 500 mosmol liegt, und insbesondere eine isotone Umgebung für die zu asservierende eukaryontische Zelle oder Zellen ausbildet.

13. Lösung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass sie Komplexbildner oder Koagulation verhindernde Agenzien oder inhibierende Antikörper enthält.
14. Lösung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Koagulation-verhindernde Agens ausgewählt ist aus MgSO_4 , Dabigatran, Plasminogen-Aktivator oder beliebigen Mischungen dieser Substanzen.
15. Verwendung einer Lösung nach einem der Ansprüche 1 bis 14 zur Konservierung, Asservierung oder/und Fixierung mindestens einer eukaryontischen Zelle, insbesondere von Tumorzellen und zirkulierenden Tumorzellen, in einer Blutprobe oder anderen Körperflüssigkeit, oder von Zellen aus der Zellkultur oder von Zellen in Gewebeproben, wobei insbesondere die Lösung mit der Blutprobe oder Körperflüssigkeit, der Zellkultur- oder Gewebeprobe direkt nach Entnahme vermischt wird oder/und die Lösung in einem Proberöhrchen, einem Blutentnahmeröhrchen oder einer Blutentnahmespritze vorgelegt wird und die Blutprobe, Körperflüssigkeit, Zellkultur- oder Gewebeprobe in dieses Gefäß zugegeben wird, wobei wiederum bevorzugt die Lösung in konzentrierter Form vorgelegt oder zugegeben wird.
16. Verwendung nach Anspruch 15, bei welcher die Zelle oder die Zellen im Wesentlichen intakt bleiben und aus mindestens einer Zelle RNA für eine Transkriptomanalyse verwendet wird.
17. Verwendung nach Anspruch 15 oder 16, wobei eine morphologische Analyse von mindestens einem Markerprotein der Zelle oder Zellen benutzt wird, um mindestens eine Zelle für die Transkriptomanalyse zu qualifizieren.
18. Verwendung nach einem der Ansprüche 15 bis 17, umfassend einen Eingangsschritt a) Vermischen von Zellen in Flüssigkeit oder Gewebe mit der Lösung nach einem der Ansprüche 1 bis 14 und einen Ausgangsschritt f) molekulare Analyse des Transkriptoms mindestens einer Zelle.
19. Verwendung nach Anspruch 18, umfassend einen oder mehrere Zwischenschritte ausgewählt aus b) Quantifizierung mindestens einer Zelle für die Transkriptomanalyse durch morphologische oder morphometrische Selektion, c)

Lagerung der Zellen in gefrorenem Zustand, d) Lagerung der Zellen bei 2 bis 8 °C,
e) Proteaseverdau eines Gewebes zur Generierung einzelner Zellen.

20. Proberöhrchen, Blutentnahmespritze oder Blutentnahmeröhrchen,
welche dadurch gekennzeichnet sind, dass darin eine Lösung nach einem der
Ansprüche 1 bis 14 enthalten ist.