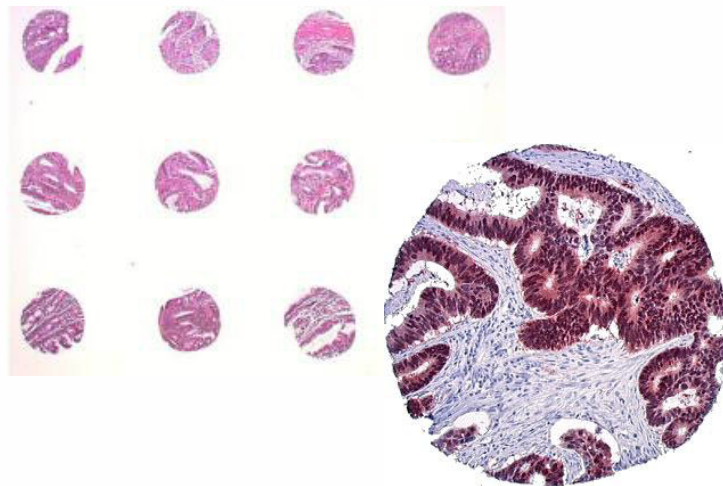


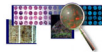
BEDIENUNGSANLEITUNG

Manueller Tissue Arrayer

MTA-1



Für weiteren Gebrauch aufbewahren!



INHALTSVERZEICHNISS

EINFÜHRUNG	3
ANWENDUNG IN DER KREBSFORSCHUNG	3
BESTANDTEILE DES TISSUE ARRAYER'S	5
BEDIENUNG	
VORBEREITUNG DES SPENDER BLOCKS UND DER OBJEKTTRÄGER	6
VORBEREITUNG DES EMPFÄNGER BLOCKS	6
DESIGN DES ARRAYS	7
JUSTAGE DER STANZEN	8
HERSTELLUNG DES ARRAYS	10
SCHNEIDEN DES ARRAY BLOCKS	12
MECHANISCHE JUSTAGE DER KOMONENTEN	13
WARTUNG DES TISSUE ARRAYERS	14
FEHLERBEHEBUNG .	15
AUSGESUCHTE PUBLIKATIONEN	18
ZUSÄTZLICHE AUSRÜSTUNG FÜR TISSUE ARRAYER	21

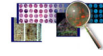
ZUSÄTZLICHE HANDBÜCHER:

HINWEISE ZUR BENUTZUNG DES 4ER KARUSSELS

HINWEISE ZUR BENUTZUNG DES DEPTH STOP KITS (STANZTIEFE KIT)

Hersteller und Importeur haben keine Verantwortung für direkte, indirekte, resultierende oder unabsichtliche Schäden. Dieses Produkt ist ausschließlich für den Gebrauch in der Forschung bestimmt.

Dies ist die zweite Version des Tissue Arrayer Handbuchs. Es wurde um Kommentare und Hinweise erweitert die von Benutzern des Systems beigetragen wurden auf Basis der Erfahrung die bei der Nutzung des Gerätes gesammelt wurde. Wir danken all denjenigen, die dazu beigetragen haben, die Benutzung einfacher und praxisgerechter darzustellen. Weitere Hinweise und Kommentare sind jederzeit willkommen und werden in zukünftigen Versionen dieses Handbuchs integriert.



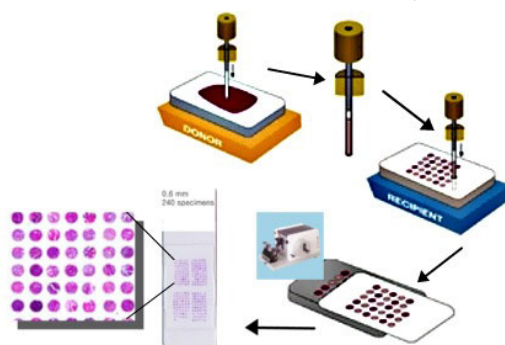
EINFÜHRUNG

Ein Tissue Arrayer ist ein einfaches manuell zu bedienendes Laborgerät, das es Forschern ermöglicht bis zu 1000 Gewebeprobe in einen einzigen Paraffinblock als Matrix anzulegen.

Das Gerät benutzt dazu zwei Stanzen : Eine, um eine regelmäßige Matrix von Löchern in einen Empfängerblock zu stanzen und eine Zweite um präzise Stanzkerne aus selektierten Bereichen eines Spenderblockes zu entnehmen und diese in die Löcher des Empfängerblocks zu platzieren.

X-Y Mikrometer legen die Koordinaten der Matrix fest. Die meisten Anwender beherrschen das Gerät in weniger als einem Tag.

Die Schnitte des Tissue Arrays können für alle histologischen Färbeverfahren und *in situ* Analysen benutzt werden z.B. für Immunzytologie, mRNA *in situ* Hybridisierung, Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung, *in situ* PCR und *in situ* RT-PCR. (Protokolle finden Sie in dem Abschnitt „Publikation mit Bezug zum Thema“) Das Gerät kann auch dazu benutzt werden, um Gewebeprobe aus präzise definierten



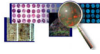
Bereichen zu dissektieren und anschließend Nukleinsäuren zu extrahieren.

Für diese Applikation werden die Stanzen in ein Eppendorf Gefäß und nicht in den Empfängerblock transferiert. Die Gewebestanzkerne können bequem vor der DNA oder RNA Extraktion im Eppendorf Gefäß gelagert werden. Die Menge DNA aus einer einzigen 0.6mm Stanze ist typischerweise ausreichend um ca. 50 PCR Reaktionen durchzuführen. Wenn

mehr DNA benötigt wird (zum Beispiel für die CGH, comparative genomic hybridisation) können zusätzliche Proben entnommen werden. Es kann durchaus sinnvoll sein eine Probe für die Nukleinsäureextraktion zu sammeln und eine andere in den Array Block zu platzieren. Diese Probe kann zur Histologischen Verifikation, zur FISH oder zur Immunocytochemie eingesetzt werden oder einfach im Block zur späteren Verwendung gelagert werden.

ANWENDUNG IN DER KREBSFORSCHUNG

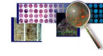
Der Arrayer zeigt seinen Nutzen insbesondere in der Krebsforschung. Die Entstehung von Krebs ist ein mehrstufiger Prozess, der den Verlust, Rearrangements und Amplifikationen von diversen chromosomalen Regionen und multiplen Genen beinhaltet. Diese Vorkommnisse führen zur Disregulierung von Signaltransduktionswegen die für Zellwachstum, Apoptosis und Differenzierung wichtig sind. Die Einzelheiten dieses komplexen Prozesses sind nur unvollständig verstanden, teilweise weil Hochdurchsatzstrategien und -technologien zur Analyse solcher



genetischen Änderungen in einer großen Anzahl von unkultivierten humanen Tumoren nicht verfügbar waren. Zum Beispiel kann die gleichzeitige Analyse verschiedener Gene in denselben Signaltransduktionswegen notwendig sein, um kritische Schritte der Disregulierung der Krebszellen während des Wachstums zu beleuchten. Zudem ist die Analyse von strukturellen und numerischen Änderungen, die mehrere Chromosome, Loci oder Gene zum selben Zeitpunkt betreffen notwendig, um die Akkumulation von genetischen Änderungen in unterschiedlichen Stadien der Krebsentwicklung zu verstehen. Abschließend, nachdem neue Gene und genetische Änderungen, die potentiell für das Verständnis der Entwicklung des Krebses interessant sind gefunden wurden, ist substantieller zusätzlicher Forschungsaufwand nötig, um die diagnostische, prognostische und therapeutische Wichtigkeit dieser molekularen Marker in der klinischen Onkologie zu begreifen. Sowohl Grundlagen-, als auch angewandte Forschung, kann durch schnelle Erforschung der Rolle vieler unterschiedlicher genetischer Änderungen, Gene und Signaltransduktionswegen aus Hunderten menschlicher Tumorgewebe profitieren.

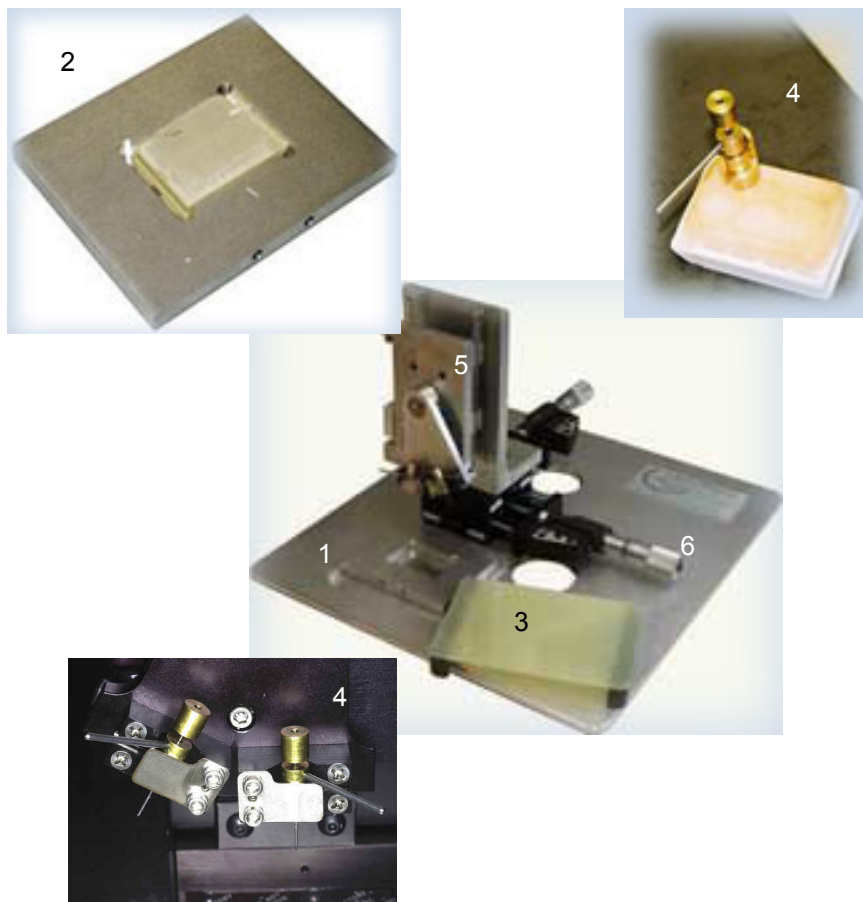
Weil die zur Verfügung stehende Gewebemenge endlich ist und deshalb zum limitierenden Faktor für solche Untersuchungen wird, ist die Möglichkeit Gewebe für molekulare Analytik zu gewinnen, zu fixieren, zu speichern und zu verteilen essentiell. Dies muss in einer Art und Weise geschehen, die den Verbrauch dieser oftmals einzigartigen und kostbaren Tumorproben optimiert. Durch die Herstellung von Tissue Arrays aus hunderten von Tumorgeweben lässt sich Hochdurchsatzanalytik zur Gen- und Expressionsanalyse durchführen. (Kononen et al., 1998). Mit dieser Technik werden kleine Tumorbiopsien aus selektierten Bereichen der archivierten Gewebeproben entnommen und hunderte solcher zylindrischen Proben nacheinander präzise in einem neuen Paraffinblock abgelegt.

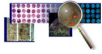
Die Tissue Microarray Technologie ist grundsätzlich nicht mit der traditionellen Multigewebeblock Technologie, die häufig in pathologischen Laboratorien zur Testung von Antikörpern zum Einsatz kam und vor mehr als 10 Jahren beschrieben wurde (Battifora et al., 1986), zu vergleichen. Die größten Vorteile der Tissue Array Technologie beinhalten größere Anzahl der Gewebeproben, geringere vernachlässigbare Schädigung des Spenderblocks, präzise Anordnung in der neuen Matrix und die Benutzbarkeit in unterschiedlichen molekularen Analysen. Die Entnahme von 10 bis 20 Stanzten aus dem Spenderblock ohne signifikante Schädigung ist möglich. Dies ermöglicht die Herstellung einer großen Anzahl von gleichen Blöcken, deren Probenstanzen immer an denselben Koordinaten sitzen. Die Anwendung eines hochpräzisen Gerätes um eine Probe in ein vorgegebenes Format zu bringen, macht eine automatisierte Form der Auswertung durch mikroskopische Analyse erst möglich. Abhängig von der Dicke der Originalblöcke, können zwischen 150 und 300 Schnitte aus jedem Array-Block geschnitten werden. Diese Technologie ermöglicht auch die Analyse sehr kleiner Primärtumore unter gleichzeitiger Schonung der Originalproben, die auch in Zukunft für andere Technologien zur Verfügung stehen.



BESTANDTEILE DES TISSUE ARRAYER'S

Das Gerät besteht aus einer Basisplatte (1), einem Halter für den Empfänger Block(2), einer Brücke für den Spender Block (3), zwei Stanzen aus rostfreiem Stahl (4) mit unterschiedlichen Durchmessern, deren Schneiden ähnlich wie bei Korkbohrern geschärft sind, einer Tiefeneinstellung, einem Schwingkopf (5) zum Umschalten zwischen den einzelnen Stanzen und X und Y Präzisionsführungen. Die Führungen bewegen sich, wenn die Einstellschrauben an den Mikrometerschrauben (6) gedreht werden. Die Anzeige der Mikrometerschrauben zeigt dann die absolute oder relative Position der Führungen an. Die Anzeige kann in Inch oder Millimeter eingestellt sein.





BEHANDLUNG DES SPENDER BLOCKS UND DER OBJEKTTRÄGER

Die Auswahl der richtigen Entnahmeposition aus dem Spenderblock ist von essentieller Bedeutung für die Konstruktion eines Tissue Arrays. Ein frischer HE Schnitt sollte von jedem Spenderblock angefertigt werden und dient als Übersicht, um die richtige Entnahmestelle festzulegen. Die Entnahmestellen sollten durch eine Markierung auf dem jeweiligen zur Probe korrespondierenden HE Schnitt gekennzeichnet sein, bevor man mit der eigentlichen Fertigung des Array Blocks beginnt. (Abb.1) Die Spenderblöcke sollten eine Dicke von 1mm nicht unterschreiten. Die besten Ergebnisse werden mit Blöcken erzielt, die nicht dünner als 3-4 mm sind.



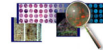
Abb 1.
Markieren der Entnahmeposition

VORBEREITUNG DES EMPFÄNGER BLOCKS

Ein leerer Paraffinblock ist der Empfänger für die Stanzen der Gewebeprobe. Stellen Sie den Block wie üblich durch das Aufschmelzen von Paraffin (55-58° C) und Giessen des Blocks in eine entsprechende Form her. Typischerweise wird als Halter eine Kunststoffkassette verwendet, die entweder vor dem Giessen des Wachses auf die Form aufgebracht, oder direkt danach in das noch flüssige Wachs eingelegt wird. Danach sollte das Wachs langsam bei Raumtemperatur abkühlen und soweit ausgehärtet sein, dass man die Form entfernen kann.



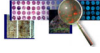
Abb 2. Anbringen der Untersatzstücke
an die Brücke



Schneiden Sie alle Unebenheiten vom Kassettenhalter ab und überprüfen Sie ob der Paraffinblock eingeschlossene Luftblasen enthält. In diesem Fall ist der Block zu verwerfen. Wir empfehlen für die Herstellung des Empfängerblocks Formen, die eine Tiefe von 5 bis 10 mm haben. Stellen Sie sicher, dass die Oberfläche des Blocks parallel zum Boden der Kassette ist. Dies wird am besten durch antrimmen des Blocks mit dem Mikrotom erreicht. Manchmal kommt es vor, dass Empfängerblöcke mit einer Höhe von mehr als 10 mm eingesetzt werden sollen, und deshalb muss die Arbeitsplattform (Brücke) auf der die Spenderblöcke zur Entnahme liegen höher gesetzt werden. Wenn dies der Fall sein sollte, benutzen Sie bitte die jedem Gerät beigefügten Untersatzstücke (85 x 12 x 6 mm), die unter der Brücke durch doppelseitiges Klebeband angebracht werden. (Abb:2)

DESIGN DES ARRAYS

Die Planung, wie viele Proben in welcher Anordnung auf einen Array gebracht werden sollen, ist eine notwendige Vorbereitung. Um den darauf folgenden Analyseprozess zu unterstützen, empfehlen wir Untergruppen einzurichten, die bei max. 100 Probenstanzen liegen (10X10). Auch wenn es möglich ist bis zu 1000 Proben auf einem Block unterzubringen, ist die Herstellung von Blöcken mit mehr als 700 Proben durch eine sehr hohe Probendichte gekennzeichnet, die nur mit extremer Sorgfalt und entsprechendem Aufwand erzielt werden kann. Ein Array mit 300 bis 500 Proben reicht für die meisten Anwendungen aus und ist wesentlich einfacher herzustellen. Bitte beachten Sie, dass bei älteren Geräten (Bis Nov.2004) der Empfängerblock zudem um 180° gedreht werden muss um alle Proben einsetzen zu können. Dies liegt an den verwendeten X-Y Mikrometerschrauben, die einen Verstellbereich von ~25 mm haben und deshalb in der X-Achse nicht die volle Länge eines Empfängerblocks abdecken können. Seit Nov. 2004 sind neue Mikrometerschrauben im Einsatz, die eine Herstellung des Arrays ohne Drehung des Empfängerblocks erlaubt. Der Abstand zwischen zwei Stanzen variiert mit dem Durchmesser des verwendeten Stanzenpaares. Auch wenn ein Abstand von 0,8 mm von Mitte zu Mitte bei der Benutzung einer 0,6mm Stanze ausreicht (0,2mm zwischen den beiden Tangenten der Probenstanzen), ist ein geringfügig größerer Abstand von 1.0 mm (oder 2.0 mm wenn man 1,5mm Stanzen benutzt) viel einfacher in der Handhabung, insbesondere durch die dadurch vereinfachte Einstellung an den Mikrometerschrauben. Es ist sehr wichtig, genügend Platz an den Rändern des Paraffinblocks zu lassen, um eine Rissbildung im Ansatz zu vermeiden. Wir empfehlen 3 bis 4mm Abstand einzuhalten.

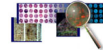


JUSTAGE DER STANZEN

Bevor Sie mit dem Arbeiten an einem Array beginnen, überprüfen Sie die Position der Stanzen. Die Stanzen sind mit einem roten und einem blauen Griff gekennzeichnet. Die rot gekennzeichnete Stanze ist die Stanze für die Entnahme des Wachses aus dem Empfängerblock. Diese Stanze hat einen kleineren Durchmesser als die Entnahmestanze der Spenderprobe. Der größere Durchmesser der Spenderblockstanze gleicht die Wanddicke der rot gekennzeichneten Empfängerblockstanze aus. Das Bohrloch im Empfängerblock hat einen Durchmesser der dem Außendurchmesser der Empfängerblockstanze entspricht. Die blau gekennzeichnete Stanze ist zur Entnahme der Spenderprobe und ihrer Platzierung in der Bohrung des Empfängerblocks gedacht. Die Dicke des Stanzkerns entspricht dem Durchmesser der Bohrung im Empfängerblock. Deshalb hat diese Stanze einen größeren Außendurchmesser. Ein Rechtshänder sollte die Stanze der Spenderprobe rechts installieren (Blaue Stanze), so dass der Spenderblock mit der linken Hand gehalten und geführt werden kann. Dies ermöglicht es dem Benutzer die beweglichere rechte Hand zu benutzen, um die Stanze nach unten und gleichzeitig den Schwingkopf etwas nach links zu drücken. Ein Linkshänder sollte die Installation seitenverkehrt vornehmen, also die Probenstanze auf der linken Seite installieren. Um nun die Justage der Stanzen zu überprüfen, kann man einen leeren Paraffinblock in die Position einspannen, den normalerweise ein Empfängerblock einnimmt. Drücken Sie die rote (kleinere) Stanze nach unten, bis diese eine Markierung in der Wachsoberfläche hinterlässt. Bewegen Sie den Schwingkopf mit den Stanzen in die andere Position und wiederholen dies nun mit der größeren (blauen) Stanze und bringen ebenfalls eine Markierung in der Wachsoberfläche an. Eine Justage ist notwendig, wenn diese Markierungen nicht übereinstimmen. Stanzen, deren Markierungen nebeneinander liegend erscheinen, benötigen eine Justage in der X-Achse (links-rechts) und Stanzen deren Markierungen voreinander liegend erscheinen, benötigen eine Justage in der Y-Achse (vorne-hinten).



Abb. 3. Justage der Y-Achse (vorne-hinten) durch drehen der Klemmschraube mit einem Inbuschlüssel, die sich hinter dem glänzenden Halter der Stanzen befindet. Diese Justageschrauben sind erst bei Geräten vorhanden die nach dem März 2000 ausgeliefert wurden.



Die Justage der Y-Achse (vorne – hinten) wird durch Klemmschrauben erreicht, die vertieft in dem V-Kunststoffhalter der Stanzen angebracht sind. Diese Klemmschrauben lassen sich mit einem Inbusschlüssel durch ein kleines Loch erreichen, das sich in jeder glänzenden Halteplatte der Stanzen befindet. Diese Justageschrauben sind erst bei Geräten vorhanden, die nach dem März 2000 ausgeliefert wurden. (Siehe Abb. 3) Suchen Sie sich eine Stanze zur Justage aus. Lösen Sie alle 4 Schrauben die den V-Kunststoffhalter halten und benutzen Sie dann den kleinsten Inbusschlüssel um durch drehen im Uhrzeigersinn die Stanze nach vorne, oder entgegen dem Uhrzeigersinn nach hinten zu bringen. Die Stanzmarkierungen sollten übereinander gebracht werden. Drehen Sie alle Schrauben wieder fest, und kontrollieren Sie erneut auf Übereinstimmung der Stanzmarkierungen beider Stanzen. Gehen Sie unter Hilfe der Mikrometerschrauben an eine andere X oder Y- Position, um die Stanzmarkierungen deutlich erkennen zu können. Wiederholen Sie den Vorgang, wenn dies nötig ist.

Ein sehr festes Andrehen der vier Halteschrauben ist nicht notwendig und kann den V-Kunststoffhalter beschädigen. Ziehen Sie diese nur soweit an, um zu gewährleisten, das der V-Block sicher in Position gehalten wird. Die Stanze sollte fest genug gehalten werden, ohne zu wackeln aber noch durch den roten oder blauen Handgriff leicht rotierbar sein. Um nun die Einstellung in der X-Achse (links–rechts) vorzunehmen benutzt man den größten mitgelieferten Inbusschlüssel und die Klemmschrauben die jeweils am linken, sowie am rechten unteren Ende des Schwingkopfes angebracht sind. (Abb. 4).

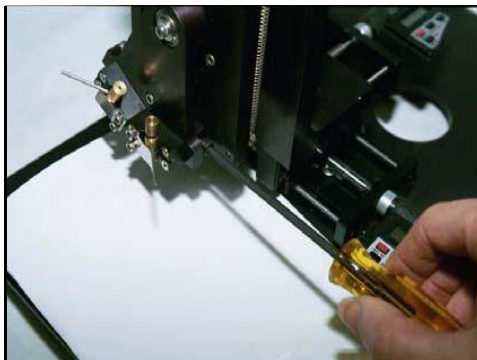
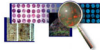


Abb 4. X- (links-rechts) Justage einer Stanze durch Justage der Klemmschraube die sich jeweils am unteren Ende des Schwingkopfes befindet.

Zur genauesten Justage achten Sie darauf das sich die Handgriffe der Stanzen während der Justage in der Position befinden, in der Sie auch beim Einbringen der entnommenen Stanze in die Vorbohrung wahren. Stellen Sie bei der Arbeit sicher, dass diese Positionen auch eingenommen werden, um eventuelle Positionierungsfehler zu vermeiden, die aus einer potentiell exzentrischen Anordnung der Nadeln folgen könnten.



HERSTELLUNG DES ARRAYS

Legen Sie den Empfängerblock in den Halter und benutzen nun den kleinsten Inbusschlüssel um die Halteschrauben anzuziehen und den Block einzuspannen. Die Schrauben sollten gerade fest genug gedreht werden um den Block zu halten. Die Oberfläche des Blocks sollte parallel zur Arbeitsplatte liegen. Schieben Sie den Empfänger Block nun mit seinem Halter an die vertikale und horizontale Führungsschiene. Magnete, die in die Basisplatte eingelassen sind, halten den Empfängerblockhalter fest am Platz. (Abb.5).

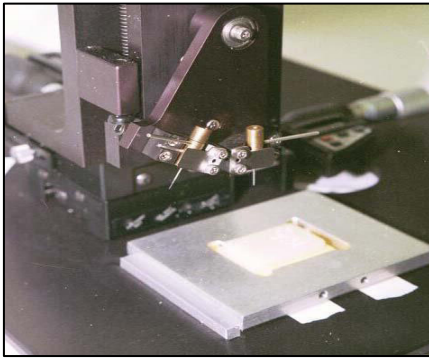


Abb 5. Korrekter Sitz des Empfängerblocks.

Das Anlegen eines Loches in der ersten Position startet den Herstellungsprozess. Zu diesem Zeitpunkt sollten die Mikrometer auf Null gesetzt werden. Die Beschriftung auf den Mikrometern weist darauf hin, welche Taste gedrückt werden soll. Je nach Ausführung der verwendeten Mikrometer, reicht ein kurzer Tastendruck oder aber die Taste muss eine kurze Zeit gehalten werden. Die rote (dünnere) Stanze wird zum Anlegen des Loches benutzt. Als erstes wird die Einstechtiefe durch das Feststellen der Mutter festgelegt - zwischen 0,5 und 1mm oberhalb der Plastikassette des Paraffinblocks ist ideal. (Abb. 6).

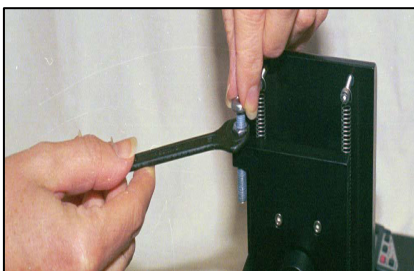
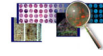


Abb 6. Einstellung der Einstechtiefe durch Justage der Schraube und Feststellung durch die Kontermutter. Bitte beachten Sie, dass sich die Eindringtiefe um 1mm pro Umdrehung verstellt.



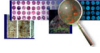
Drücken Sie die Stanze mit der Hand nach unten. Gleich ob man Empfänger oder Spenderstanze nach unten drückt, sollte man dies durch Druck auf die obere Ecke des Schwingkopfes machen, bei gleichzeitiger Führung der Stanze mit der anderen Hand. Wenn die Einstichtiefe erreicht ist, blockiert die Schraube ein weiteres Eindringen. Benutzen Sie jetzt den Handgriff und drehen Sie ihn mehrfach um ca. 45 Grad hin und her. Diese Drehbewegungen helfen dabei, die Paraffinstanze aus dem Block zu lösen. Als nächstes lassen sie mit dem Druck auf den Schwenkkopf langsam nach, bis die Rückzugsfeder den Schwingkopf nach oben zieht. Achten Sie darauf, dass Sie diese Aufwärtsbewegung kontrollieren. Benutzen Sie den Stößel der Stanze um den Inhalt auszustoßen. Verwerfen Sie die Paraffinstanze. Beachten Sie bitte, dass die Stößel der Stanzen nicht vertauscht werden, da auch diese unterschiedliche Durchmesser haben. Stellen Sie jetzt die Arbeitsbrücke über den Blockhalter und wechseln den Schwingkopf in die Position, dass sich die größere (blaue) Stanze in vertikaler Position befindet. Bringen Sie den Spenderblock mit Hilfe des angezeichneten HE Schnittes in die Entnahmeposition.

(Abb. 7).



Abb 7. Abstimmung des HE gefärbten Schnittes mit dem Entnahmeblock.

Halten Sie das Schnitt-Block Sandwich auf der Arbeitsbrücke in Position. Ein Vergrößerungsglas kann bei der Lokalisierung der auf dem HE Schnitt markierten Stelle helfen. Als nächstes bringen Sie dieses Sandwich unter den Schwingkopf. Wenn Sie richtig positioniert sind, nehmen Sie den HE-Schnitt vorsichtig weg, ohne den Spenderblock zu bewegen und drücken die größere (blaue) Stanze nach unten, um die gewünschte Probe zu entnehmen. Beachten Sie bitte, dass die Tiefeneinstellung hier nicht wirkt. Deshalb muss darauf geachtet werden, dass die Stanze nicht zu tief in den Spenderblock eindringt. Die besten Resultate werden nach einiger Trainingszeit erreicht. Manche Anwender finden es hilfreich, mit einem Marker die Eindringtiefe auf der Stanze anzuzeichnen. Eine andere Möglichkeit ist der Einsatz eines Kits (Depth Stop Kit) zur Fixierung der Eindringtiefe sowohl auf der Spender- als auch auf der Empfängerblockseite. Dieser Kit wird in einem separatem Kapitel des Handbuches beschrieben. Nachdem die Probe entnommen wurde, nehmen Sie diese mit der Brücke beiseite und drücken den Schwingkopf nach unten, bis die Spitze der Stanze die Oberfläche des vorgestanzen Loches im Empfängerblocks erreicht.

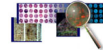


Während man diese Position hält, benutzt man den Ausdruckstempel der Stanze um den Stanzkern in das Loch zu überführen. Diese Arbeit braucht eine gewisse Übung. Wenn der Stanzkern komplett überführt worden ist, drücken Sie den Stempel nicht weiter durch. Ansonsten könnte die Proben durch weiteres Drücken zerquetscht werden. Beachten sie auch, dass der Stanze überschüssiges Paraffin anhaftet, was nach einiger Zeit zu einer Schwergängigkeit führt. Wenn dies passiert säubern sie die Stanze durch mehrmaliges ausstoßen des Ausdruckstempels bis diese wieder freigängig ist. Die Stanzen sind so gefertigt, dass die Gewebestanze eine Passform mit dem Stanzloch hat, so dass die Gewebestanze nicht nach unten in das Loch fällt. Es ist wichtig die Probe nicht zu tief einzubringen, da das die Anzahl der Schnitte verringert ,auf der alle Stanzen zu finden sind. Einige Anwender benutzen einen O-Ring von 1mm Höhe als Zwischenstück zwischen Ausdruckstempel- und Stanzenkopf. Dies verhindert, dass der Stößel über die Oberfläche des Empfängerblocks hinaus in den Empfängerparaffinblock eingeführt wird. Mache Anwender bevorzugen einen mitgelieferten geeigneten Inbuschlüssel beim Ausdrücken der Probenstanze zwischen Ausdruckstempel- und Stanzenkopf zu halten und erzielen damit denselben Effekt. Jetzt können die Mikrometerschrauben angepasst werden, um die Präzisionsführung in die nächste X-Y Position zu bringen.

Wie bereits bemerkt, ist ein Abstand von 0,8mm zwischen den Mittelpunkten der Stanzen bei der Verwendung von 0,6mm Stanzen die Standardvorgabe. Allerdings ist die Addition von ungeraden Werten mühsam. Wenn sie keinen etwas größeren Abstand, von z. B. 1.0 mm benutzen wollen, kann es günstiger sein, nun bei jedem Mal das Mikrometer durch Drücken der Einstelltaste auf 0 zu stellen. Dies macht es einfacher die nächste Position einzustellen. Mit dieser Methode können allerdings kumulative Fehler auftreten. Wiederholen Sie diese Schritte um das gesamte Array herzustellen. Bei der Herstellung des Arrays ist zu beachten, das man tunlichst in der X-Achse von links nach rechts arbeitet, da die dafür zu benutzende Mikrometerschraube ergonomisch günstiger liegt. Die für die Y.- Achse zuständige Mikrometerschraube liegt im rückwärtigen Bereich des Gerätes und ist nicht so einfach zugänglich. Deshalb ist es günstiger, nur am Ende einer Reihe die Y-Position zu verstellen. Bitte beachten Sie auch, dass die bis Ende 2004 benutzten Mikrometer nur einen Verstellbereich von 25 mm aufweisen. Dies bedeutet, dass man ca. 2/3 eines normalen Blocks erreicht und diesen dann um 180 Grad drehen muss, wenn man ihn komplett mit Probenstanzen versehen will.

SCHNEIDEN DES ARRAY BLOCKS

Bevor man den Block schneidet müssen die Stanzen mit dem umgebenden Paraffin verbunden , und die Oberfläche durch antrimmen geglättet werden. Entfernen Sie den Empfängerblock aus dem Halter und legen sie ihn in einen warmen Ofen. Die Zeit und Temperatur richtet sich nach dem von Ihnen verwendeten Wachs. Dies kann von 37°C und 15 bis 20 Minuten bis 45°C und 2 bis 3 Stunden variieren. Diese Prozedur wärmt das Paraffin und verbessert dadurch die Verbindung der Gewebebiopsien zum umgebenden Wachs. Nachdem der Block aufgewärmt ist, können Sie einen Objektträger benutzen, um die Oberfläche des Arrays auszugleichen. Legen Sie den Objektträger flach auf die Oberfläche und üben Sie einen gleichmäßigen Druck aus, um alle Gewebestanden auf dieselbe Höhe zu



bringen. Diese Prozedur maximiert die Anzahl der Schnitte, die alle Gewebestanden des Arrays beinhalten. Der Array kann unter Verwendung eines Standard Mikrotoms geschnitten. Es kann aber durchaus von Vorteil sein, die Schnitte mit Hilfe eines Folientransfersystems zu unterstützen. Das System besteht aus einer adhäsiven Folie, die durch Anrollen auf die Oberfläche des gekühlten Blocks aufgebracht wird. Unter dieser Folie erfolgt nun der Schnitt, wobei dieser auf der Folie temporär gehalten wird. Die Struktur des Arrays bleibt dadurch unverändert und die Analyse der Stenzen kann unbeeinflusst von Verschiebungen durchgeführt werden. Es wurde von einigen Nutzern über Probleme bei ISH berichtet. Andererseits wurde darüber berichtet, dass diese Probleme durch geringere Antikörperkonzentrationen behoben wurden. (Abb.8)



Abb.8. PSA Hilfsfolie zum Transfer von Paraffinschnitten auf vorbeschichtete Objektträger

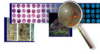
MECHANISCHE JUSTAGE DER KOMPONENTEN

Alle Tissue Arrayer werden mit einem Satz Inbusschlüssel, sowie einem Gabelschlüssel und einem Spezialschlüssel für die Mikrometerschrauben ausgeliefert. (Abb. 9).



Abb.9. Werkzeug Satz bestehend aus Gabelschlüssel, Inbusschlüssel und Spezialwerkzeug zur Justage der Mikrometer.

Benutzen Sie den Gabelschlüssel, um die Kontermutter der Tiefenkontrolle zu befestigen. Der größte Inbusschlüssel wird für die Justage der Stellschrauben am unteren Ende des Schwingkopfes benutzt. Diese Stellschrauben justieren die X-Achse (links-rechts). Benutzen Sie den zweitgrößten Schlüssel *nur* zur Justage des Schwingkopfes, um ein Wackeln desselben zu beseitigen.



Ziehen Sie nicht zu fest an. Benutzen Sie den nächst kleineren Inbusschlüssel, um eine Stanze durch das Lösen der zwei Schrauben, die auf dem glänzenden Halteklipp angebracht sind, auszutauschen. Der kleinste Inbusschlüssel wird zweifach benutzt. Die erste Aufgabe ist die, den Empfängerblock in dem Blockhalter einzuspannen. Die zweite Anwendung ist die Justage der Stanzen in der Y-Achse (vorne -hinten). Dies geschieht durch Lösen oder Anziehen der Schraube, die in der Mitte zwischen den Schrauben auf dem glänzenden Halteklipp zugänglich ist. (Nur bei Geräten die nach dem März 2000 gebaut wurden.)

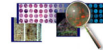
WARTUNG DES TISSUE ARRAYER'S

Während des Herstellungsprozesses eines Arrays ist es ratsam von Zeit zu Zeit die Stanzen, den Blockhalter und die Brücke von überschüssigem Wachs zu reinigen. Benutzen Sie Xylol oder andere wachslösende Flüssigkeiten, um die Teile zu säubern. Weichen Sie keine Teile, insbesondere Stanzen, in den Lösungen ein, da es zu einem Aufweichen von geklebten Verbindungen kommen kann. Benutzen Sie keine Lösungen, um die Führungen der X-Y oder Z- Achse zu säubern. Diese sollten bestenfalls alle Monate mit etwas Mineralöl gefettet werden. Die Stanzen sollten periodisch ersetzt werden. Diese werden aus sehr dünnen Rohr gefertigt und verformen sich in Abhängigkeit von der Benutzung. Eventuell wird auch die Spitze der Stanze unscharf nachdem mehrere hundert oder tausend Stanzungen durchgeführt wurden. Der Ersatz einer Stanze wird durch Lösen der Schrauben des glänzenden Halteklipps und Ersatz durch eine neue Stanze durchgeführt. Der Ersatz wurde korrekt durchgeführt, wenn die Nut der Stanze dicht an die Metallführung des V-Blocks aus Kunststoff gedrückt wird.



Abb. 9. Ersatz einer Stanze durch das Lösen der Schrauben im Kunststoff V-Block. Beachten Sie bitte den korrekte Sitz auf der linken Seite mit dem Handgriff der Stanze über dem glänzenden Metallklipp.

Die Stanze sollte ohne Spiel, aber beweglich in der Rotationsebene sein. Die Justage der ausgetauschten Stanzen sollte ebenfalls vor einem weiteren Arbeiten am Array überprüft werden, wie bereits in dem Absatz 'Mechanische Justage der Komponenten' beschrieben wurde.



FEHLERBEHEBUNG

Beim Einbringen der Stanze in den Empfängerblock sieht es so aus, als ob die Stanze nicht exakt in das Loch passt, das durch die kleine Stanze vorgebohrt wurde.

- Vergewissern Sie sich, dass Sie den Schwenkarm nicht unbewusst während des Herausdrückens der Stanze bewegen.

Die Justage hat sich verändert (z.B. nachdem eine Stanze ausgetauscht wurde).

- Justieren Sie die Stanzen erneut.

Der Abstand zwischen aufeinander folgenden Proben scheint zu variieren und verursacht dadurch eine Störung.

- Vergewissern Sie sich, dass sich die Handgriffe der Stanzen nach Benutzung immer in derselben Position befinden.
- Die Nadel mag verbogen sein. Überprüfen Sie dies und ersetzen Sie gegebenenfalls.

Die Stanze entnimmt kein Gewebe oder Wachs.

- Dies kann durch sanftes Drücken des Auswurfstempels auf die Probe vor der Entnahme behoben werden. Durch Druck auf die Probe wird diese komprimiert und expandiert im Radius, wodurch eine bessere Haftung an der Stanze stattfindet, bevor man Sie extrahiert. Durch leichte Rotation der Handgriffe wird das Abbrechen der Probe von Ihrem Sitz bewerkstelligt. Lange Stanzen sind leichter zu extrahieren als sehr kurze. Dies ist insbesondere bei Benutzung der größeren Stanzen (1,0, 1,5 und 2,0 mm) von Bedeutung.

Die Gewebestanze lässt sich nicht ohne Weiteres aus der Stanze ausdrücken. Es sieht so aus, als ob da ein Widerstand ist.

- Die scharfe Spitze der Stanze scheint zerstört zu sein. Wechseln Sie die Stanze.

Die Gewebestanze wurde versehentlich zu tief in die leere Bohrung gesenkt. Gibt es eine Korrekturmöglichkeit?

- Ja. Entnehmen Sie die Probe wieder mit der kleinen Stanze (roter Handgriff) und bringen Sie eine neue Probe an dieser Stelle ein.



Ich habe nun 200 Proben in den Array gebracht und es sieht so aus, als ob der mittlere Teil sich nach oben wölbt. Was ist die Ursache und kann es behoben werden.

- Wenn der Array Block eine sehr hohe Dichte hat, kann es durch überschüssiges Paraffin zu einem derartigen Effekt kommen. Dies wird durch kleine Größenunterschiede zwischen den Probenstanzen und den vorgebohrten Löchern im Array verursacht. Dies führt zu einem Verwurf der Oberfläche nach oben und wird nach einer größeren Anzahl Proben sichtbar. Auf den Punkt gebracht bedeutet es, dass zu viele Proben zu wenig Platz haben. Um dies zu verhindern kann entweder der Abstand zwischen den Proben vergrößert werden, oder das Loch in den Empfängerblock sollte tiefer gebohrt werden. Um diese Unebenheit zu glätten sollte man den Block für 15 Minuten auf 37°C aufwärmen. Während der Block noch warm und geschmeidig ist, legt man einen sauberen Objektträger auf die Oberfläche und ebnet diese durch leichten Druck ein.

Eines der Mikrometer lässt sich schwer bewegen.

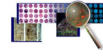
- Vergewissern Sie sich, dass die Sicherungsschrauben nicht angezogen sind. Der schwarze Ring am Handgriff des Mikrometers und die kleine silberne gekerbte Schraube an der Seite der Führung müssen freigängig sein.

Der Schwingkopf wackelt.

- Ziehen Sie die zentrale Schraube am oberen Teil des Schwingkopfes in kleinen Schritten gerade soweit an, dass dieser nicht mehr wackelt. Überdrehen Sie die Schraube nicht.

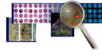
Die Tiefeneinstellung stoppt die Bewegung der Stanze nicht, wenn man eine Gewebeprobe entnimmt.

- Die Tiefeneinstellung ist nur zur Kontrolle der kleineren Entnahmestanze gedacht. Um die Probenstanze zu kontrollieren wird ein separat erhältlicher Kit benötigt.



Ableseprobleme am Mikrometer

- Wenn die digitale Anzeige nicht auf das Drehen an der Mikrometereinstellung reagiert und die Anzeige dunkel bleibt, ist die Batterie möglicherweise zu alt und muss ersetzt werden. Die Batterien befinden sich an der Unterseite der Mikrometer und sind durch Löcher in der Basisplatte zugänglich. Positionieren Sie den Arrayer vorsichtig in eine Lage, die es Ihnen erlaubt Zugang zu den Batteriefächern zu haben, die durch Schraubdeckel verschlossen sind. Diese lassen sich entweder durch einen großen Schraubenzieher oder besser durch eine passende Münze öffnen. Legen Sie eine neue Batterie mit dem Plus (+) Pol entgegengesetzt dem Schraubdeckel ein. Prüfen Sie nach dem Aufsetzen des Schraubdeckels durch Drehen an der Mikrometereinstellung ob die Anzeige wieder in Funktion ist. Es kann durchaus sein, dass Sie diese Prozedur zwei bis dreimal wiederholen müssen, bevor die Batterie die Anzeige wieder korrekt initialisiert. Wir empfehlen Renata, Sanyo oder Duracell vom Typ 2450. Batterien anderer Hersteller, obwohl der Typ derselbe ist, passen nicht in das Gehäuse und können im schlimmsten Fall einen Kurzschluss verursachen. Dem Arrayer liegt ein kleines Handbuch des Mikrometerherstellers bei, das über diese Charakteristika mehr Auskunft gibt.



Ausgesuchte Publikationen

Diese Liste ist nur eine unvollständige Auflistung der wissenschaftlichen Veröffentlichungen, die in der Zwischenzeit so zahlreich sind, dass hier nur einige grundlegende Publikationen aus den ersten Jahren Erwähnung finden.

Barlund, M., Monni, O., Kononen, J., et al.
Multiple genes at 17q23 undergo amplification and overexpression in breast cancer.
Cancer Research, 60(1), 5340-4: Oct. 1, 2000.

Barlund, M., Forozan, F., Kononen, J., et al.
Detecting activation of ribosomal protein S6 Kinase by complementary DNA and tissue microarray analysis.
Journal of the American Cancer Institute, 92(15):1252-9: Aug. 2, 2000.

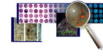
Bowen, C., Bubendorf, L., Voeller, H., et al.
Loss of NKX3.1 expression in human prostate cancers correlates with tumor progression.
Cancer Research, 60(21), 6111-5: Nov. 1, 2000.

Bubendorf, L., Kolmer, M., Kononen, J., et al.
Hormone therapy failure in human prostate cancer: Analysis by complementary DNA and tissue microarrays.
Journal of the National Cancer Institute, 91(20): Oct. 20, 1999.

Bubendorf, L., Kononen, J., Koivisto, P., et al.
Survey of gene amplifications during prostate cancer progression by high throughput fluorescence *in situ* hybridization on tissue micro-arrays.
Cancer Research, 59(4), 803-06: Feb. 15, 1999.

Camp, R., Charette, L., & Rimm, D.
Validation of tissue microarray technology in breast carcinoma
Laboratory Investigations, 80(12), 1943-9: Dec. 2000.

Fejzo, M. S. & Slamon, D.
Frozen tumor tissue microarray technology for analysis of RNA, DNA, and proteins.
American Journal of Pathology, 59(5):



Hoos, A. & Cordon-Cardo, C.
Tissue microarray profiling of cancer specimen and cell lines
Opportunities and limitation.
Laboratory Investigations, 81(10), 1331-38: 2001.

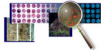
Kononen, J., Bubendorf, L., Kallioniemi, A., et al.
Tissue microarrays for highthroughput molecular
profiling of tumor specimens.
Natural Medicine, 4(7), 844-7: July 1998.

Meinhold-Heerlein, I., Stenner-Liewen, F., Liewen, H, et al.
Expression and potential role of Fas-associated
phosphatase-1 in ovarian cancer.
American Journal of Pathology, 158(4), 1335-44: 2001.

Moch, H., Kononen, J., Kallioniemi, O., & Sauter, G.
Tissue micro-arrays: What will they bring to molecular
And anatomic pathology?
Advances in Anatomic Pathology, 8(1), 14-20.

Moch, H., Schraml, P., Bubendorf, L., et al.
High-throughput tissue microarray analysis to evaluate
genes uncovered by cDNA microarray screening in
renal cell carcinoma.
The American Journal of Pathology, 154(4), 981-6: Apr.1999.

Moch, H., Schraml, P., Bubendorf, L., et al.
Identification of prognostic parameters for renal cell
carcinoma in cDNA arrays and cell chips
[article in German]. *Verh. Dtsch. Ges. Pathol.*, 83, 225-32: 1999.



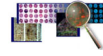
Mucci, N., Akdas, G., Manely, S., et al.
Neuroendocrine expression in metastatic prostate cancer:
Evaluation of high-throughput tissue microarrays
to detect heterogeneous protein expression.
Human Pathology, 31, 406-14: 2000.

Perrone, E., Theoharis C., Mucci, N., et al.
Tissue microarray assessment of prostate cancer tumor
proliferation in African American and white men.
Journal of the National Cancer Institute, 92(11), 937-9: June 2000.

Proverbs-Singh, T., Mucci, N.R., Strawderman, M., et al.
Prostate carcinoma biomarker analysis using
tissue microarrays: Optimization of a tissue sampling strategy
For proliferation labeling index.
Paper presented at *the 90th Annual Meeting of
the United States and Canadian Academy
of Pathology*, Atlanta, GA, March 2001.

Richter, J., Wagner, U., Kononen, J., et al.
High-throughput tissue micro-array analysis of cyclin E gene
Amplification and overexpression in urinary bladder cancer.
American Journal of Pathology, 157, 787-94: Sept. 2000.

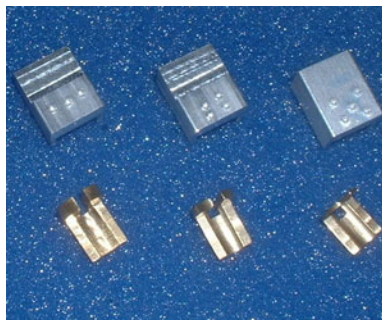
Schraml, P., Kononen, J., Bubendorf, L., et al.
Tissue microarrays for gene amplification surveys in
Many different tumor types.
Clinical Cancer Research, 5(8), 1966-75: Aug. 1999.



ZUSÄTZLICHE AUSRÜSTUNG FÜR DIE HERSTELLUNG VON TISSUE ARRAYS

1) Depth Stop Kit (00-DSK1)

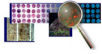
- Kit zur genauen Einstellung der Einstichtiefe. Beinhaltet je 5 Einstellwerkzeuge in Abstufung von jeweils 1mm für den Empfänger- und Spenderblock



2) PSA Tape Transfer System (02-PSA)

- Zur Übertragung von Schnitten auf vorbeschichtete Objektträger. Beinhaltet alle notwendigen Komponenten.





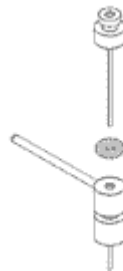
3) Magnifying Lamp (03-ML)

- Vergrößerungsglas mit Beleuchtung, 3 Dioptrien



4) Punches and Stylets

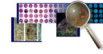
- Stanzen unterschiedlicher Größe
- 0,6mm (00-MP06)
- 1,0mm (00-MP10)
- 1,5mm (00-MP15)
- 2,0mm (00-MP20)



5) Receptacle Block Carousel (001-RBI1)

- Rotierender Halter für bis zu 4 Empfängerblöcke. Dadurch ist die gleichzeitige Herstellung von bis zu 4 gleichen Empfängerblöcken möglich.





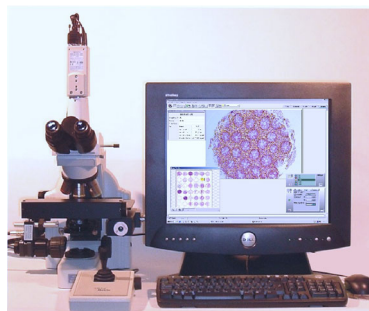
6) Arrayer Booster (00-MTAB01)

- Automatisierungskit bestehend aus Steppermotoren, Kontrollbox, Transfer-schlüssel und Designsoftware, die es ermöglicht, den Arrayer schneller und präziser zu betreiben und die Fehlermöglichkeiten durch automatische Übernahme der Probenamen und Positionen zu minimieren.



7) Spot Browser (01-SBV2)

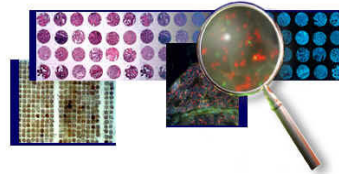
SPOT BROWSER™ ist eine dedizierte 'Bildanalyse Workstation' und integriert ein Mikroskop, eine CCD Kamera, die Bilder erfasst und speichert sowie einen motorisierten Mikroskoptisch. Das System erlaubt eine schnelle Übersichtsanalyse der Gewebe Matrix, um eine 'Road Map' darzustellen. Definierte Koordinaten zu jeder einzelnen Gewebeprobe garantieren eine einfache Zuordnung und ergeben eine robuste Benutzeroberfläche für den Pathologen.



AlphaMetrix Biotech GmbH

Paul Ehrlich Str. 28/G3
DE-63322 Rödermark

Telefon : +49 (0)6074 2116240
Fax : +49 (0)6074 2116241
Email : info@alphamatrix.de

The logo for AlphaMetrix, featuring the word "Alpha" in red and "Metrix" in blue, with a stylized "A" and "M" that overlap and form a circular shape.

Alpha
Metrix