

VYUŽITÍ LASEROVÉ MIKRODISEKCE PRO PŘÍPRAVU KOMPLEXNÍCH VZORKŮ Z NÁDOROVÉ TKÁNĚ PRO ÚČELY MIKROGENOMICKÝCH ANALÝZ

THE UTILIZATION OF LASER CAPTURE MICRODISSECTION FOR CONSTRUCTION OF SPECIFIC SAMPLES FROM CANCER TISSUE, IN ORDER TO MICROGENOMIC ANALYSES

DZIECHCIARKOVÁ M.¹, BERKOVCOVÁ J.¹, TROJANEC R.¹, SROVNAL P.¹, BOUCHALOVÁ K.¹, HAJDÚCH M.^{1,2}

¹ LABORATOŘ EXPERIMENTÁLNÍ MEDICÍNY PŘI DĚTSKÉ KLINICE LÉKAŘSKÉ FAKULTY UNIVERZITY PALACKÉHO A FAKULTNÍ NEMOCNICE V OLOMOUCI

² ONKOLOGICKÁ KLINIKA LÉKAŘSKÉ FAKULTY UNIVERZITY PALACKÉHO A FAKULTNÍ NEMOCNICE V OLOMOUCI

Souhrn

Laserová záchytná mikrodisekce (Laser capture microdissection, LCM) je rychlá a spolehlivá metoda, která umožňuje izolaci cílových buněk ze specifického komplexu tkáně pro jejich následnou molekulární nebo proteinovou analýzu. Základem LCM je inverzní mikroskop se zabudovaným nízkovýkonnostním infračerveným laserem. Nařezané tkáně jsou upevněny na standardní podložní sklo a termoplastická membrána (TM) je umístěna nad dehydratovaný preparát. V ohnisku laserového mikroskopu je umístěna TM, kterou laser roztaví v požadovaném místě a naváže tak cílovou buňku či strukturu k membráně. V současné době máme k dispozici několik laserových mikrodisekčních systémů, které se liší způsobem zachycení disekovaných buněk, v konfiguraci systému i v jednotlivých aplikacích. Laserovou mikrodisekcí lze použít pro izolaci buněk u řady typů buněčných i tkáňových preparátů, včetně zamražených vzorků, formalínem fixovaných parafinizovaných tkání či cytologických preparátů. V závislosti na použitém materiálu je možno z mikrodisekovaných buněk extrahovat DNA, RNA či proteiny v dobré kvalitě. Kombinací s dalšími technikami, jako je například cDNA microarray, LCM pomáhá identifikovat nové diagnostické a prognostické znaky vedoucí ke zlepšení diagnosticko-terapeutických metod v léčbě onkologických onemocnění. Na našem pracovišti jsme laserovou mikrodisekcí izolovali buňky z cytologických preparátů adenokarcinomu plic získaných punkční cytologií zmražených či parafinizovaných nádorů a také buněčné linie, např. myeloidní leukemii K562. V této práci popisujeme naše zkušenosti se zavedením LCM s následnou mikroizolací DNA/RNA a lineární amplifikací DNA/RNA pro účely dalších genetických analýz jako je např. komparativní genomická hybridizace, expresní studie, či přímé sekvenování vyšetřovaných genů z biologického materiálu s minimálním obsahem nádorových buněk, či pro studium nádorové heterogenity na jednobuněčné úrovni.

Klíčová slova: EGFR1, komparativní genomická hybridizace, laserová mikrodisekce, lineární amplifikace DNA/RNA, izolace DNA/RNA, K-ras

Summary

Laser capture microdissection (LCM) is a rapid, reliable method to obtain pure populations of targeted cells from specific microscopic regions of tissue sections for subsequent analysis. LCM is based on the adherence of visually selected cells to a thermoplastic membrane, which overlies the dehydrated tissue section and is focally melted by triggering of a low energy infrared laser pulse. Tissue sections are mounted on standard glass slides, and transparent thermoplastic membrane is then placed over the dry section. The laser provides enough energy to transiently melt this thermoplastic film in to the target cells. Several systems are available for LCM, and vary in cell-capture method, system configuration and applications. LCM was applied to a wide range of cell and tissue preparations including frozen samples, formalin-fixed paraffin-embedded tissues or cytology smears. Depending on the starting material, DNA, good quality mRNA, and proteins can be extracted successfully from captured tissue fragments, down to the single cell level. In combination with another techniques like expression library construction and cDNA array hybridisation, LCM will allow the establishment of new diagnostic and prognostic markers, in order to indicate therapy individually tailored to the molecular profile of a given tumour.

In this paper we refer our experiences with the LCM isolation of single cells from cytology smears of lung carcinomas, frozen and paraffin embedded tumour tissues as well as cell line cytospin preparation. Our ultimate goal was to introduce LCM technology in combination with DNA/RNA isolation and linear amplification for subsequent genomic analyses such as comparative genomic hybridisation, RNA expression studies and specific amplifications of investigated genes from tissue specimens with minority of tumour cells and/or for tumour heterogeneity studies based on one the single cell level.

Key words: EGFR1, comparative genomic hybridization, laser capture microdissection, linear amplification of DNA/RNA, RNA/DNA isolation, K-ras

Úvod:

V současné době molekulárně biologické vyšetření buněk a tkání na úrovni DNA, RNA a proteinů představuje revoluční obrat v diagnostice a charakterizaci biologických vlastností nádorových onemocnění. Nicméně, problém proteomických a genomických studií v případě analýzy komplexních nádorových vzorků spočívá v přípravě homogenní buněčné populace. Průtoková cytometrie byla dlouhou dobu používána jako výhradní technologie k získání jednotlivých buněčných typů do suspenze, avšak možnost získání čistých buněk ze vzorků solidní tkáně, jako je biopsie, je časově zdouhavá. Další nevýhodou průtokové cytometrie je, že vyžaduje specifický selekční marker (1). Pro zlepšení metody izolace jednotlivých buněk nebo samostatných buněčných populací byla proto vyvinuta technika laserové mikrodisekce (LCM) (2, 3, 4). Laserová mikrodisekce byla použita pro izolaci buněk u řady typů buněčných i tkáňových preparátů, včetně zamražených vzorků, formalínem fixovaných a parafrinovaných tkání či cytologických preparátů. V závislosti na použitém materiálu je možno z mikrodisekovaných buněk extrahovat DNA, RNA či proteiny v dobré kvalitě. Kombinací s dalšími technikami, jako například cDNA microarrays, pak LCM pomáhá identifikovat nové diagnostické, prediktivní a prognostické markery, vedoucí ke zlepšení diagnosticko-terapeutických metod v léčbě onkologických onemocnění.

Princip a vývoj laserové mikrodisekce

Laserová mikrodisekce je rychlá a spolehlivá metoda, která umožňuje izolaci cílových buněk ze specifického komplexu tkáně pro jejich následnou molekulární nebo proteinovou analýzu (5).

Počátek laserové mikrodisekce se datuje do roku 1970, kdy byl poprvé použit laser pro zachycení a manipulaci s buněčnými populacemi. V polovině 90. let minulého století byl vyvinut první prototyp laserového mikrodisekčního systému ve spolupráci několika ústavů z National Institutes of Health (NIH). Později ze spolupráce NIH a firmy Arcturus (www.arctur.com) vznikl první komerční mikrodisekční systém (6). Tento systém vyřezává buňky pomocí laserových pulsů cílených na okrsky tkáně, které jsou překryty speciální membránou, tzv. fúzováním tkáně a membrány. Po disekci příslušných buněk je termoplastická fólie s adharovanými buňkami odstraněna a zbytek tkáně, která nebyla vybrána k disekci, zůstává na podložním sklíčku. Buňky na membráně pak mohou být podrobeny příslušným extrakčním podmínkám pro jejich následnou mikrogenomickou analýzu.

Rozdílné LCM technologie

LCM umožňuje disekci nejen jednotlivých buněk či buněčných kolonií z komplexu tkáně uchycené na podložním sklíčku, ale také vyřezání jednotlivých chromozómů a v některých případech i disekci živých buněk přímo z kultivační misky. V současné době máme k dispozici několik mikrodisekčních systémů, které se liší v metodě odchyty buněk, v konfiguraci systému i v aplikacích (tab.1) (7). Některé systémy umožňují bezdotykové katapultování označených buněk přímo do sběrných zkumavek, nebo vyzvednutí vyřezaných buněk přímo víčkem mikrocetrifugační zkumavky. LCM systémy mohou mít zabudovaný infračervený, nízko výkonostní infračervený, ultrafialový laser, nebo i jejich kombinace. Všechny mikrodisekční systémy mají laser zabudovaný do standardního mikroskopu.

Technologie zachytávání buněk:

Membránové (fúzní) technologie

Jedna z možností, jak zachytávat vyřezané buňky, je tzv. fúzní technologie. Fúzní technologie zachytávání buněk je založena na selektivní přilnavosti cílových buněk a fragmentů tkáně k termoplastické membráně, která je upevněna na průsvitné víčko mikrozukavky (CapSure™) (viz. www.arctur.com). Termoplastická membrána je aktivována nízkovýkonostním infračerveným laserovým pulsem. Nařezané tkáně jsou upevněny na standardní podložní sklíčko a termoplastická membrána je umístěna nad dehydratovaný preparát. V ohnisku laserového mikroskopu se aktivuje termoplastická membrána, která je navázána k identifikované cílové buňce v mikroskopované části preparátu. Laser roztaví termoplastickou fólii v místě vybrané cílové buňky (1,5,8). Protože termoplastická fólie absorbuje většinu tepelné energie a laserový puls trvá jen zlomek sekundy, poškození biologických makromolekul je minimální nebo nedetekovatelné. Po disekci příslušných buněk, je termoplastická fólie s adharovanými buňkami odstraněna a zbytek nepoužité tkáně zůstává na podložním sklíčku. Tuto technologii využívá PixCell II laserový mikrosektor firmy Arcturus. Novější verze laserového mikrodisektoru (Veritas) této společnosti má zabudovaný jak nízkovýkonostní infračervený laser, tak UV laser. Pro disekci pomocí UV laseru jsou tkáňové preparáty upevněny na tenkou polyetylenovou fólii. Polyetylenová fólie s dehydratovaným preparátem je přerostvena víčkem s termoplastickou membránou (CapSure™). Cílové buňky jsou mikrodisekovány prostřednictvím ultrafialového laseru, který přesně obkrouží feznou dráhu podél obvodu disekovaných buněk. Mikrodisekované části tkáně tak zůstávají přichyceny na spodní části víčka.

VÝROBCE	LCM SYSTÉM	VLASTNOSTI					APLIKACE
		Technologie zachytávání buněk	Technologie sběru buněk	Kompatibilní mikroskop	Typ laseru	Fluorescence	
ARCTURUS	PixCell II VERITAS	Termoplastická membrána uchycena na sběrná víčka. Laser roztaví termoplastickou fólii v daném místě kde jsou navázány cílové buňky.	Odstraněním víčka z preparátu. Cílové buňky zůstávají uchyceny na membráně víčka.	Invertovaný Olympus IX 50	IF laser IF a UV laser	ano	Zamražené tkáně Parafrinované tkáně Cytologické preparáty Živé buňky Jedna buňka
CELL ROBOTICS	Cell Robotics	Tkáňové preparáty jsou uchyceny na skla pokrytá polyetylenovou fólií, buňky jsou laserem obkrouženy.	Vyřezání kousků fólie s buňkami je vtlačeno do víčka mikrozukavky elektrostatickou silou.	Invertovaný Leica, Nikon, Olympus a Zeiss	UV laser	ano	Zamražené tkáně Parafrinované tkáně Cytologické preparáty Živé buňky Jedna buňka
MMI Molecular Machines	mmi CellCut mmi SmartCut	Tkáňové preparáty jsou uchyceny na skla pokrytá polyetylenovou fólií, buňky jsou laserem obkrouženy.	Vyřezané okrasky tkáně jsou zachyceny víčky která jsou pokryta adhezivní vrstvou.	Invertovaný Nikon, Olympus	UV laser	nevíme	Zamražené tkáně Parafrinované tkáně Cytologické preparáty Živé buňky Jedna buňka Mikromanipulace

Tabulka 1.: Srovnání různých komerčně dostupných mikrodisekčních systémů.

Cell Robotics (www.cellrobotics.com) využívá tzv. techniku „Pick-Up Sticks“, která umožňuje zachycení disekovaných buněk. Tento mikrodisekční systém je založen na UV laseru. Mikroskalpel produkuje fototermální reakci v ohniskovém bodu čočky mikroskopu, kde laserový paprsek protíná cílový vzorek. Tkáňové preparáty jsou uchyceny na skla pokrytá tenkou polyetylenovou fólií, vyřezávané buňky či okrsky tkáně jsou laserem obkrouženy. Fototermální reakce v ohniskovém bodu laseru vypaří nebo odstraní velmi malou část cílových buněk či tkáně. Disekované okrsky tkáně jsou směřovány elektrostatickou silou směrem k filmu a film s buňkami je pak vložen do mikrocentrifugační zkumavky a zpracován.

Podobný systém vyřezávání buněk má i mikrodisektor mmi-CellCut firmy MMI Molecular Machines & Industries AG (www.molecular-machines.com), tento systém se však liší od Cell Robotics ve způsobu zachytávání buněk po disekci. Buňky jsou vyřezávány automaticky pomocí velmi přesného UV laseru. Vzorky jsou uchyceny na speciální membrány upevněné v rámečku. Takto připravené vzorky jsou překryty skleněným podložním sklíčkem. Toto přikrytí efektivně ochrání vzorek před nečistotami z okolí a je rozhodující pro všechny aplikace, u kterých je klíčové zabránit zevní kontaminaci. Vyřezané okrsky tkáně jsou zachyceny víčky, která jsou pokryta adhesivní vrstvou.

Systém Bio-Rad Colonis (viz. www.microscopy.bio-rad.com) používá rovněž film pro zachycení buněk, ale jinou cestou. Tento systém umožňuje i aplikace s živými buňkami. Film je umístěn do kultivační misky a živé buňky jsou na něm přímo kultivovány. Po vypěstování kolonií je možno řezat buňky přímo v kultuře. Vyřezaný film je z kultury odloupen a požadované buňky zůstanou na něm uchyceny. Je také možno provést ablaci nežádoucích kolonií buněk. Ty jsou následně odmyty a zbylé buňky mohou být dále kultivovány (7).

Paprskové technologie

Zachytávání buněk pomocí speciálního filmu není jedinou cestou jak izolovat disekovaný materiál (7). PALM MicroBeam's (www.palm-microlaser.com) využívá tzv. technologii laserové tlakové katapultování (Laser Pressure Catapulting, LPC). Pulzní UV-A laser je zabudovaný do standardního mikroskopu. Laser je zaostřen přes objektiv čočky do bodu o velikosti 1 µm. Uvnitř úzkého bodu laserového ohniska je vytvořená síla pro ablaci materiálu, zatímco okolní tkáň zůstává zcela neporušena. Použitím tohoto laserového systému mohou být separované buňky nebo vybrané oblasti tkáně vyzvednuty a zachyceny do sběrného zařízení. Toto je zcela bezkontaktní proces zachytávání buněk, kdy pro transport selektovaných oblastí do sběrných systémů je použito jenom zaostřené světlo. Vzorek je přemístěn několik milimetrů proti gravitaci. Stejný systém je také aplikován pro získávání živých buněk z buněčných kolonií (9, 10, 11). Katapultovaný materiál může být dále centrifugován a použit pro následnou molekulární analýzu, nebo další experimenty jako je rekultivace selektovaných vitálních buněk.

Další široce používanou technikou je laserový mikropaprskový mikrodisekční systém (12) (viz. www.leica-microsystems.com). Tento systém používá pulzní ultrafialový laser s malým paprskem pro vyřezávání cílových buněk prostřednictvím fotoablace sousední tkáně. Tkáňové preparáty jsou uchyceny na tenkou polyetylenovou fólii. Cílové buňky jsou mikrodisekovány prostřednictvím UV laseru, který přesně obkrouží řezanou dráhu podél obvodu disekovaných selektovaných buněk. Touto „studenou“ ablací není materiál vystaven přímému laserovému záření. Mikrodisekované části tkáně jsou sbírány do víčka nanozkumavky bezkontaktně, tzn. buňky padají do víčka zkumavky na základě gravitace, a mohou být následně použity pro molekulární analýzu.

Mechanické technologie

Další možností zachytávání buněk nabízí např. společnost Eppendorf (www.eppendorf.com) prostřednictvím tzv. „Piezo power for microdissection“ (PPMD) technologie. Tento

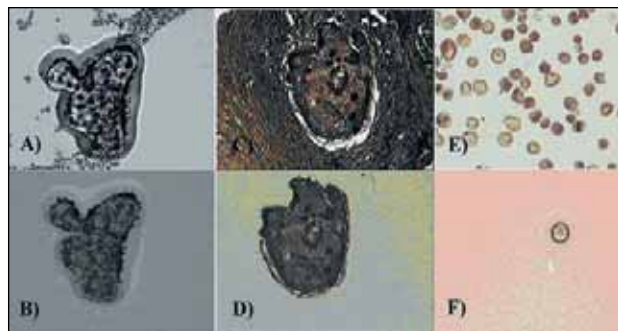
systém zahrnuje ultrazvukový piezo-mikroskalpel s velmi tenkou kovovou špičkou, který je napojen na standardní mikroskop propojený s počítačem. Disekce je prováděna v kapce vody, xyleny či jiného média a to tak, že na preparát je nanesena kapka daného média, a mikroskalpel kmitavými pohyby seškrabává potřebný úsek tkáně do této kapky. Kapka s izolovanými buňkami či okrsky tkáně je aspirována speciální pipetou a vnesena do sběrné mikrozukavky.

Aplikace LCM v diagnostice a prognózování nádorových onemocnění

Na našem pracovišti používáme laserový mikrodisektor Veritas (Arcturus) (obr.1). Vypracovali jsme rutinní postupy pro laserovou mikrodisekci z cytologických preparátů karcinomů plic získaných punkční cytologií barvených metodou Giemsa-Romanovski, zamražených či parafinizovaných nádorových tkání (barveno hematoxylinem) a také cytospinových preparátů z nejrůznějších buněčných linií (barveno neutrální červení) (obr.2). Metodickým cílem bylo zavést kombinaci LCM s lineární amplifikací DNA i RNA pro účely dalších mikrogenomických analýz z biologického materiálu s minimálním obsahem nádorových buněk, či pro studium nádorové heterogenity na jednobuněčné úrovni. V další části tohoto sdělení referujeme naše odzkoušené metodické postupy, které snad usnadní práci dalším zájemcům o přípravu genetického materiálu technikou LCM spojenou s amplifikací DNA či RNA a následnými genetickými analýzami.



Obr. 1: Laserový mikrodisektor Veritas firmy Arcturus.

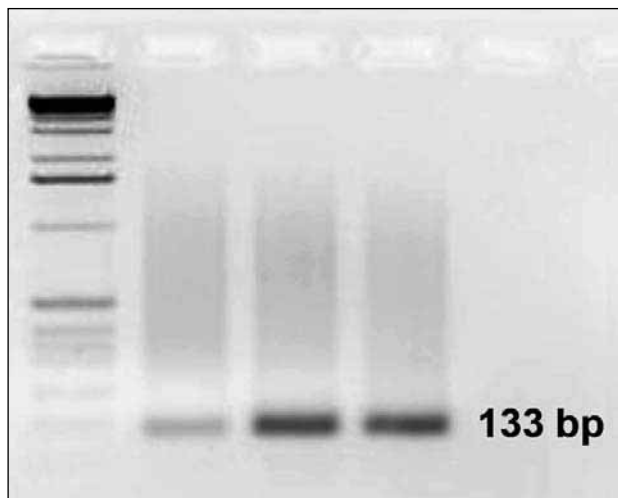


Obrázek 2.: Laserová záchytná mikrodisekce nádorových buněk z cytologického preparátu karcinomu plic získaného punkční cytologií (barveno metodou Giemsa-Romanowski), zamražených či parafinizovaných nádorových tkání (barveno hematoxylinem) a stabilní buněčné linie K562 (barveno neutrální červení): Na obrázku jsou **A)** označeny nádorové buňky cytologického preparátu karcinomu plic; **B)** disekované buňky karcinomu plic; **C)** označené nádorové buňky z řezu formalinem fixované a parafinizované nádorové tkáně; **D)** vyřezané buňky z tohoto tkáňového řezu; **E)** cytospin buněčné nádorové linie K562; **F)** disekovaná buňka nádorové buněčné linie K562.

Izolace a lineární amplifikace DNA

Technika lineární amplifikace DNA byla modifikovaná podle dříve publikovaných prací (13-16). Buňky získané pomocí LCM (1-1000 buněk) byly v mikropodmínkách lyzovány pro-

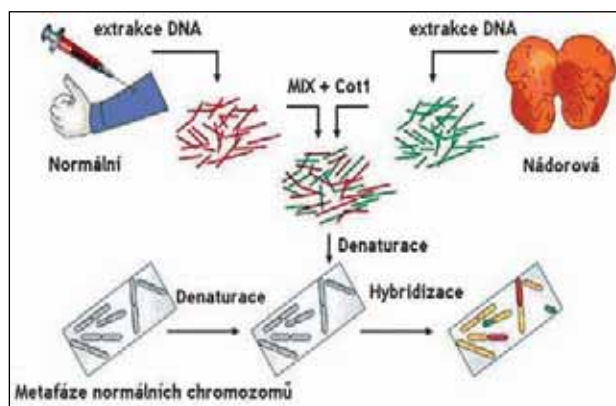
teinázou K. K mikrodisekovaným buňkám bylo přidáno 5 μ l PK pufru [50mM Tris-HCl (Sigma, USA) pH=8.1, 1 mg/ml proteinázy K (New England Biolabs, USA), 1 mM EDTA (Serva, Německo)] a 5 μ l minerálního oleje (Sigma, USA). Vše bylo inkubováno přes noc při 40°C. Druhý den byly zkumavky s natrávenými buňkami krátce centrifugovány a inkubovány 10 min. při teplotě 95°C. Při této teplotě dochází k inaktivaci proteinázy K. Poté byla dvoušroubovice DNA rozštěpena restričním enzymem *MseI* (New England Biolabs, USA). K 5 μ l lyzátu bylo přidáno 0,2 μ l One-Phor-All-Buffer-Plus (Amersham Biosciences, USA), 1 μ l *MseI* (10 jednotek) a 0,8 μ l H₂O. Směs byla inkubována 3 hodiny při 37°C. Po restrikci byly na rozštěpené konce navázány adaptéry se specifickými amplifikačními sekvencemi. Pro annealing primerů byly použity primery *MseLig* – 21 merový (5'-AGT GGG ATT CCG CAT GCT AGT-3') a *MseLig* -12 merový (5'-TAA CTA GCA TGC-3') (Generi Bitech, Česká republika), 0,5 μ l One-Phor-All-Buffer-Plus a 1,5 μ l H₂O. Annealing byl zahájen inaktivací restričních enzymů při 65°C, pak se teplota snižovala po 1°C/min až na 15°C. Při 15°C bylo k reakční směsi přidáno 1 μ l T4 DNA ligázy a 1 μ l T4 DNA ligázového pufru (New England Biolabs, USA), obsahujícího 10mM ATP. Ligace probíhala přes noc při 15°C. Pomocí výše zmiňovaných sekvencí primerů byla DNA následně amplifikována v PCR reakci. Pro primární amplifikaci bylo k 12 μ l ligovaného produktu přidáno 40 μ l primární PCR směsi, která obsahovala 3 μ l Expand Long Template, buffer 1 (Expand Long Template PCR Systém, Roche, Švýcarsko), 2 μ l dNTPs (10mM deoxynukleotidy, dATP, dCTP, dGTP, dTTP, Sigma, USA), 35 μ l H₂O. Primární amplifikace byla započata 4 min. denaturací při 68°C. V tomto kroku jsou odstraněny přebytečné oligonukleotidy z vazby na DNA řetězec. Po denaturaci bylo do reakční směsi přidáno 0,7 μ l (3,5 jednotek) DNA polymerázové směsi Taq a Pwo polymerázy (Expand Long Template PCR Systém, Roche, Švýcarsko). V termocykléru byly nastaveny tyto amplifikační podmínky: 14 cyklů – 94°C (40s), 57°C (30s), 68°C (1min. 15s); 34 cyklů – 94°C (40s), 57°C (30s), 68°C (1min. 45s) a 1 cyklus – 94°C (40s), 57°C, 68°C (5min.). Pro kontrolu kvality a senzitivity DNA amplifikace byla použita specifická PCR amplifikace exonu 2 genu pro lidský mamaglobin B1 (Obr. 3). Naše výsledky ukazují, že lineární amplifikací lze reprodukovatelně namnožit DNA z jediné disekované buňky do množství postačujícího pro běžné genetické analýzy založené na PCR.



Obr. 3: Výsledek genově specifické PCR amplifikace exonu 2 genu pro lidský mamaglobin B1 z mikrodisekovaných buněk, jejichž DNA byla lineárně amplifikována. Produkt selektivní amplifikace exonu 2 genu pro lidský mamaglobin B1 se nacházel v oblasti 133bp. Zleva: 1) DNA ladder, 2) templat připravený lineární amplifikací DNA z 1 buňky, 3) templat připravený lineární amplifikací DNA z 10 buněk, 4) templatem byla kontrolní DNA.

Komparativní genomická hybridizace (CGH) jako jedna z možností použití lineárně amplifikované DNA získané z buněk izolovaných LCM.

Principem komparativní genomické hybridizace (CGH; obr.4) je porovnání referenční a vyšetřované DNA. Každá z obou DNA je označena jinou fluorescenční barvou. Na našem pracovišti konsenzuálně značíme referenční DNA červeně a vyšetřovanou DNA zeleně. Obě DNA jsou smíchány v poměru 1:1 a hybridizovány na normální lidské metafázni chromozómy. Interpretace výsledků je založena na změně poměru intenzity zelené a červené fluorescence u chromozómů, na nichž obě DNA byly hybridizovány (17,18,19). Delece (loss) ve vyšetřované DNA způsobí barevný posun směrem do červená, amplifikace (gain) posun do zelena. Nevýhodou CGH je fakt, že dokáže zachytit pouze nebalancované cytogenetické změny, které jsou přítomny alespoň u 50% jader, z nichž byla izolována DNA. V případě nádorových preparátů je vzorek více či méně „kontaminován“ i nenádorovými populacemi buněk, které mohou výsledky CGH ovlivnit naředěním cytogenetických alterací pod detekční limit CGH. Laserová mikrodisekce proto umožňuje citlivější zachycení cytogenetických změn, výběrem požadovaných nádorových populací či pouze jediné (ne)nádorové buňky.



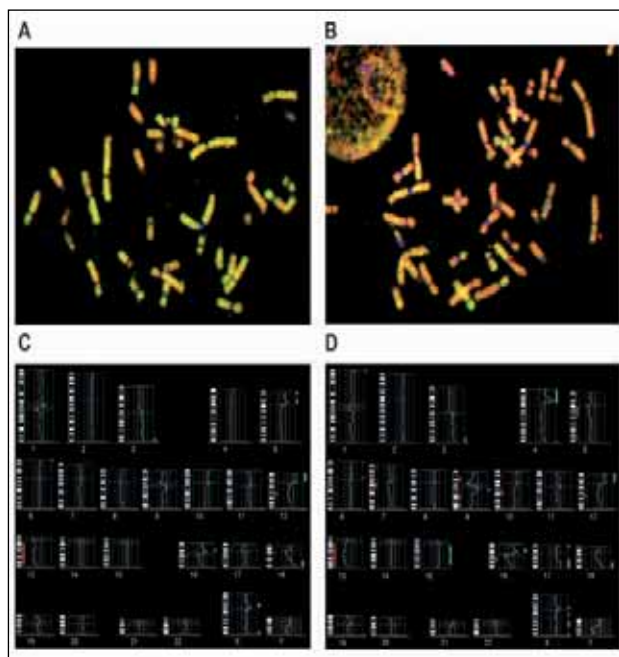
Obrázek 4.: Schématický princip komparativní genomické hybridizace (CGH)

Příkladem tohoto tvrzení je jeden z našich experimentů, ve kterém jsme technikou u laserové mikrodisekce izolovali jednotlivé buňky z linie myeloidní leukémie K562. Technikou lineární amplifikace byla DNA namnožena a produkt primární amplifikace byl použit pro CGH. Pomocí CGH jsme porovnávali DNA získanou izolací klasickým způsobem ze směsné kultury buněk a DNA po LCM jediné buňky s následnou lineární amplifikací. Na obrázku 5 jsou zobrazeny výsledky této CGH studie, včetně idiogramů po LCM a lineární amplifikaci DNA z jediné buňky v porovnání se směsným vzorkem myeloidní leukemické linie K562. Z výsledných idiogramů je patrné, že se nálezy částečně liší díky nádorové heterogenitě buněk v tkáňové kultuře. U myeloblastu podrobeného LCM je např. patrná nová amplifikace v oblasti chromozómu 15. Z analýzy také vyplývá, že při vyšetření DNA získané ze směsné populace bylo detekováno menší množství cytogenetických změn, než v případě DNA izolované z jedné buňky. U směsného vzorku tedy nebyly zachyceny aberace méně frekventní, nedosahující zastoupení alespoň u 50% buněk v celkové populaci.

Specifická amplifikace vyšetřovaných genů pro účely mutačních studií

V současné době používáme techniku laserové mikrodisekce zejména při analýze mutací genů *EGFR1* a *k-ras* u pacientů s nemalobuněčným plicním karcinomem (20). Oddělením nádorové populace od nenádorových buněk si totiž významně zvyšujeme senzitivitu DNA sekvenace. DNA získaná z 300-500 mikrodisekovaných buněk je amplifikována ve dvouko-

lové nested PCR. Dvoukolová nested PCR je založena na 30 cyklech amplifikace s externím párem genově specifických primerů. Vzniklý PCR produkt je využit jako šablona pro druhé kolo amplifikace ve 30 cyklech s interním párem primerů. Výsledný amplikon je pak podroben klasické sekvenční analýze.



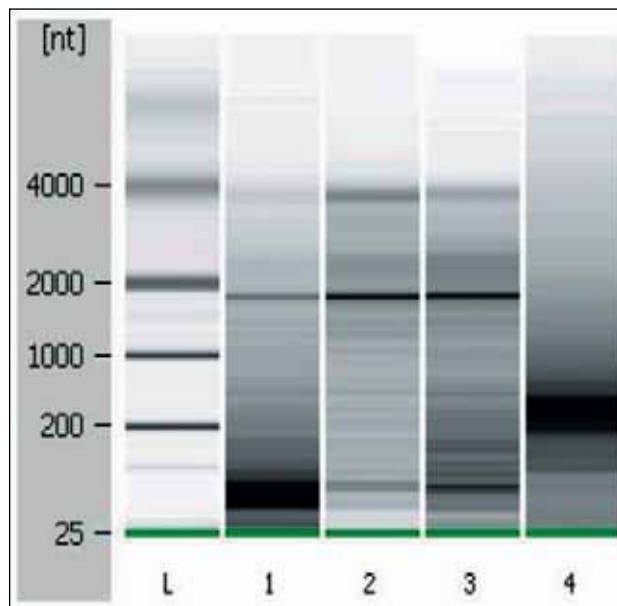
Obrázek 5.: Výsledek komparativní genomické hybridizace: **A)** Výsledný preparát (mitóza) při vyšetření cytogenetických změn DNA získané ze směsného vzorku kultury myeloidní leukemické linie K562. **B)** Výsledný preparát (mitóza) při vyšetření DNA po LCM a lineární amplifikaci získané z jedné buňky myeloidní leukemické linie K562. **C)** Idiogram získaný stanovením cytogenetických změn u DNA získané ze směsného vzorku kultury myeloidní leukemické linie K562. Cytogenetický nálezn: REV ISH ENH (3q29qter; 5p12-13.3; 5p15.2pter; 6p25.1pter; 12p11.1pter; 16p11.2-12; 18q21.3qter) REV ISH DIM (9q34.1qter; 12q21.1-21.3; 13q11.1qter; 16q12.1-13; 17p11.1-11.2; 18q11.2-12.1; 19p13.3pter). **D)** Idiogram cytogenetických změn DNA po LCM a lineární amplifikaci získané z jedné buňky myeloidní leukemické linie K562. Cytogenetický nálezn: REV ISH ENH (1p36.2pter; 3q26.3qter; 4p11.1pter; 4q35qter; 6p11.1-12.1; 9q13-21; 12p11pter; 15q11.2-24.1; 16p11.2-12; 17p12.1pter; 17q22qter; 18q22qter) REV ISH DIM (5q11.2-15; 5q34.0-35.1; 7q11.2-21.1; 9p12-21; 9q21.3qter; 10q22.1-22.3; 10q26.1qter; 12q21.1-21.3; 13q11.1qter; 16q12.1-22; 19p13.3pter)

Izolace, lineární amplifikace a hodnocení kvality mikroizolované RNA po LCM s použitím IR nebo UV laseru

Laserovou mikrodisekcí byly izolovány buňky kryoprezervované nádorové tkáně karcinomu rekta. Pro srovnání byly buňky disekovány IR laserem nebo UV laserem a to jednak jako 1) rozsáhlejší úseky tkáně čítající >1000 buněk a také jako 2) jednotlivé shluky 1-3 nádorových buněk. RNA byla izolována pomocí PicoPure™ RNA Isolation kitu (Arcturus, USA), který umožňuje purifikaci přes centrifugační kolonky. Kontrola degradace získané RNA byla provedena pomocí RNA 6000 Pico Kitu na bioanalyzáru Agilent 2100. Na obrázku 6 je znázorněn výsledek získané RNA po mikrodisekcii IR versus UV laserem. Vidíme, že při disekci malých okrsků tkáně (např. jednotlivé infiltruující či metastatické buňky) je vhodnější použít IR laser, protože během disekce malých úseků tkáně pomocí UV laseru dochází ke značné tepelné degradaci RNA.

RiboAmp RNA amplifikační kit (Arcturus, USA) byl použit pro amplifikaci vyzizolované RNA. Tento kit umožňuje amplifikaci již nanogramového množství celkové RNA na mikrogramové. Lineární amplifikace RNA byla započata přepisem jednovláknové molekuly RNA na cDNA reverzní transkriptázou se současnou inkorporací T7 promotoru. Druhé vlákno cDNA bylo dosyntetizováno pomocí exogenních primerů

s následným přečištěním dvoušroubovice cDNA. *In vitro* transkripce cDNA na antisense RNA byla provedena pomocí T7 RNA polymerázy. Amplifikace RNA byla ukončena izolací a přečištěním získané antisense RNA. Takto připravenou RNA lze použít pro účely většiny expresních analýz.



Obr. 6: Analýza kvality RNA získané z nádorové tkáně karcinomu rekta po mikrodisekcii IR nebo UV laserem na bioanalyzáru Agilent 2100 kitem RNA 6000 Pico: **1)** RNA získaná po disekci celé tkáně pomocí IR laseru. **2)** RNA získaná po disekci izolovaných nádorových buněk pomocí IR laseru. **3)** RNA získaná po disekci celé tkáně pomocí UV laseru. **4)** Degradovaná RNA získaná po disekci izolovaných nádorových buněk pomocí UV laseru. **L)** Specifický selekční marker kontroly kvality a reprodukovatelnosti elektroforetické separace.

Závěr:

V současnosti existuje celá řada mikrodisekčních systémů, které se liší nejen metodou zachytávání buněk, (tzv. membránové nebo-li fúzní technologie, paprskové technologie či mechanické technologie), ale také konfigurací systému a v následných aplikacích. Pomocí všech těchto systémů lze vyšetřovanou tkáň prohlédnout pod mikroskopem před a po mikrodisekcii. Tím je zkontrolována homogenita studovaného materiálu a zachování morfologie disekované části tkáně na víčku. Tyto systémy také umožňují obrazovou dokumentaci po každé disekci, což poskytuje příležitost ke korelaci histopatologických nálezů s výsledky molekulární analýzy.

Na našem pracovišti je k dispozici laserový mikrodisekční systém Veritas firmy Arcturus, který má zabudovaný jak IR tak UV laser, což nám umožnilo provedení různých aplikací. Laserovou mikrodisekcí byly izolovány buňky z cytologických preparátů karcinomu plic, zamražených či parafrinizovaných nádorových tkání, i ze stabilních buněčných linií. Za účelem získání dostatečného množství DNA/RNA jsme zavedli techniku lineární amplifikace DNA/RNA. V současné době používáme techniku laserové mikrodisekce zejména při analýze mutací genu *EGFR* a *k-ras*, pro techniku komparativní genomické hybridizace (CGH) a pro izolaci RNA za účelem dalších expresních analýz. Z našich zkušeností jednoznačně vyplývá nutnost použití LCM pro přesnou diagnostiku, predikci terapeutické odpovědi a prognózování solidních nádorů vyznačujících se vysokou tkáňovou i buněčnou heterogenitou.

Poděkování:

Práce na tomto projektu byla podpořena výzkumným záměrem MŠM 6198959216, granty Interní Grantové Agentury Ministerstva zdravotnictví ČR NR/9076 a Ministerstvem průmyslu a obchodu ČR 1H-PK/45.

Literatura:

1. Curran S., McKeay J.A., McLeod H.L., Murray G.I.: Laser capture microscopy. *J Clin Pathol*, 2000; 53:64-68.
2. Simone N.L., Bonner R.F., Gillespie J.W. et al.: Laser-capture microdissection: opening the microscopic frontier to molecular analysis. *Trends Genet.*, 1998; 14(7):272-276.
3. Banks R.E., Dunn M.J., Forbes M.A. et al.: The potential use of laser capture microdissection to selectively obtain distinct populations of cells for proteomic analysis—preliminary findings. *Electrophoresis*, 1999; 20(4-5):689-700.
4. Emmert-Buck M.R., Bonner R.F., Chuaqui R.F. et al.: Laser capture microdissection. *Science*, 1996;274(5289):998-1001.
5. Bonner R.F., Emmert-Buck M., Cole K., Pohida T. et al.: Laser capture microdissection: Molecular analysis of tissue. *Science*, 1997; 278: 1481-1483.
6. Brignole E.: Laser-capture microdissection. *Modern Drug Discovery*, 2000; 3:69-70, 73.
7. Willingham E.: Laser Microdissection Systems. *The Scientist*, 2002; 16(10): 42.
8. Fend F., Raffeld M.: Laser capture microdissection in pathology. *J Clin Pathol*, 2000; 53: 666-672.
9. Burgemeister R., Stich M.: Laser mediated live cell handling: Detection and collection of single live cells by laser microdissection and pressure catapulting (LMPC). *Zellbiologie*, 2004; 23-24.
10. Gjerdrum L.M., Lielpetere I., Rasmussen L.M. et al.: Laser-assisted microdissection of membráně-mounted parafin section. *J Mol Diagn*, 2001; 3:105-110.
11. Zhang L., Yang N., Conejo-Garcia J.R. et al.: Expression of endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor in ovaria carcinoma. *Clin Cancor Res*, 2003; 9:264-272.
12. Chimenti C., Pieroni M., Russo A., Sale P. et al.: Laser microdissection in clinical cardiovascular research. *American College of Chest Physicians*, 2005; 128: 2876-2881.
13. Klein Ch.A., Schmidt-Kittler O., Schardt J.A. et al.: Comparative genomic hybridization, loss of heterozgosity, and DNA sequence analysis of single cells. *Proc Natl Acad Sci*, 1999; 96: 4494-4499.
14. Stoecklein N.H., Erbersdobler A., Schmidt-Kittler O. et al.: SCOMP is superior to degenerated oligonucleotide primed-polymerase Chin reaction for global amplification of minute amounts of DNA from microdissected archival tissue samples. *American Journal of Pathology*, 2002; 161: 43-51.
15. Serth J., Kuczyk M.A., Paeslack U. et al.: Quantitation of DNA extracted after micropreparation of cells from frozen and formalin-fixed tissue sections. *Am J Pathol*, 2000; 156:1189-1196.
16. Kuukasjarvi T., Tanner M., Pennanen S. et al.: Optimizing DOP-PCR for universal amplification of small DNA samples in comparative genomic hybridization. *Genes Chromosom Cancer*, 1997; 18:94-101.
17. Kallioniemi A., Kallioniemi O.P., Sudar D. et al.: Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science*, 1992; 258(5083):818-21.
18. Kallioniemi O.P., Kallioniemi A., Piper J. et al.: Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors. *Genes Chromosomes Cancer*, 1994 10(4): 231-43.
19. Speicher M.R., du Manoir S., Schrock E. et al.: Molecular cytogenetic analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded solid tumors by comparative genomic hybridization after universal DANN-amplification. *Hum Mol Genet*, 1993; 2:1907-1014.
20. Berkovcová J., Hajdúch M., Dziechciarková M., Trojanec R., Janošťáková A., Wiecek S., Grygárková I., Kolek V., Vorlíček J.: Predikce účinnosti tyrozinkinázových inhibitorů Egfr1 v léčbě nemalobuněčných plicních karcinomů. *Klin Onkol*, 2006 (v tisku).