

MIKROČIPOVÁ ANALÝZA GENOVÉ EXPRESE V MIKRODISEKOVANÝCH VZORCÍCH

MICROARRAY ANALYSIS OF GENE EXPRESSION IN MICRODISSECTED SAMPLES

BOUCHAL J., TURASHVILI G., KOLÁŘ Z.

LABORATOŘ MOLEKULÁRNÍ PATOLOGIE, LF UP, OLOMOUC

Souhrn

V poslední době se v experimentální praxi stále ve větší míře uplatňují metody využívající mikročipové expresní analýzy. Většina expresních analýz v medicínském výzkumu vychází z bioptických vzorků, které obsahují řadu různých typů buněk. Majoritní populace buněk je určující pro celkovou informaci o genové expresi a znemožňuje tak rozlišení specifické genové exprese jednotlivých typů buněk. Mezi metody, které umožňují selekci přesně definovaných populací buněk patří laserová a mechanická mikrodisekce. Současné čipy vyžadují mikrogramová množství značené nukleové kyseliny, přičemž vstupní množství RNA ze selektovaných buněk se může pohybovat pouze v nanogramovém až pikogramovém řádu. Tento problém je možno řešit různými způsoby amplifikace RNA, mezi které patří dvojité lineární amplifikace RNA nebo metody využívající kombinovanou PCR s lineární amplifikací. V tomto krátkém přehledu poskytujeme jednak informace, se kterými jsme se setkali jednak během naší současné analýzy genové exprese v mikrodisekovaných buňkách mléčné žlázy, a také náš optimalizovaný postup. Celý projekt sestával z časově náročného sběru čerstvě zmražené tkáně, optimalizace přípravy kryorezů pro mikrodisekci, izolace a amplifikace RNA, hybridizace na mikročipy, analýzy dat a konečně verifikace vybraných výsledků pomocí imunohistochemie. V současné době je vlastní práce v opo-
nentním řízení v zahraničním časopise, a nemůžeme proto poskytnout detailnější informace o získaných výsledcích.

Klíčová slova: fixace, mikrodisekce, RNA, amplifikace, mikročipy

Abstract: The DNA microarray is a powerful, high throughput technique for assessing gene expression on a system-wide genomic scale. Most expression profiling studies of solid tumors have used biopsy samples containing large numbers of contaminating stromal and other cell types, thereby complicating any precise delineation of gene expression in nontumor versus tumor cell types. Combining microdissection, RNA amplification protocols, microarray technologies and our knowledge of the human genome sequence, it is possible to isolate pure populations of cells or even a single cell and interrogate the expression of thousands of sequences for the purpose of more precisely defining the biology of the tumor cell. In this short overview, we provide informations on selected problems which we had to solve during our microarray analysis of microdissected normal and tumour cells of mammary gland. We provide our optimized procedure as well. The whole project consisted of the long-term collection of snap-frozen tissues, optimization of staining of cryosections for laser capture microdissection, isolation and amplification of RNA, hybridization onto chips, data analysis and finally verification of the results by immunohistochemistry. Our work is currently reviewed by an international journal and we can't provide detailed information on particular achievements yet.

Keywords: fixation, microdissection, RNA, amplification, microarray

V literatuře existuje velké množství informací týkající se mikročipové analýzy, mikrodisekce i amplifikace RNA. V tomto krátkém přehledu poskytujeme informace, se kterými jsme se setkali jednak během naší současné analýzy genové exprese v mikrodisekovaných buňkách mléčné žlázy, a také v již ukončeném experimentu s nádorovými liniemi odvozenými od karcinomu prostaty (1). Většina expresních analýz v medicínském výzkumu vychází z biptických vzorků, které obsahují řadu různých typů buněk. Majoritní populace buněk je přitom určující pro celkovou informaci o genové expresi a znemožňuje tak rozlišení specifické genové exprese jednotlivých typů buněk (2). Mezi metody, které umožňují selekci přesně definovaných populací buněk patří laserová a mechanická mikrodisekce. V naší práci jsme testovali obě metody, ale mechanická mikrodisekce pomocí systému Eppendorf se ukázala být vhodná spíše pro izolaci větších tkáňových okrsků. Vzhledem k požadavku izolace nejen nádorové tkáně, ale i normálních duktálních a lobulárních luminálních buněk mléčné žlázy, jsme použili systém laserové mikrodisekce od firmy Arcturus. Celý projekt sestával z časově náročného sběru čerstvě zmražené tkáně, optimalizace přípravy kryofezů pro mikrodisekci, izolace a amplifikace RNA, hybridizace na mikročipy, analýzy dat a konečně verifikace vybraných výsledků pomocí imunohistochemie. Zkrácený optimalizovaný postup poskytujeme níže. V současné době je naše práce v oponentním řízení v zahraničním časopise, a nemůžeme proto poskytnout detailnější informace o získaných výsledcích.

Vliv fixace a barvení na mikrodisekci a kvalitu nukleových kyselin

Optimální fixace tkání musí poskytovat přijatelnou morfologii, umožnit samotnou mikrodisekci a stabilizovat mRNA. Goldsworthy a spolupracovníci testovali účinky cross-linkujících i precipitujících fixativů na zmraženou i do parafinu zalitou tkáň (3). Precipitující fixativa jako ethanol a aceton zajišťovaly více RT-PCR produktů než formalin. Autoři také pozorovali větší výtěžnost RT-PCR z kryofezů než z řezů parafinových. Kim a spolupracovníci označují jako optimální fixativum pro stabilizaci RNA v tkáních zalitých do parafinu methacarn (kombinaci methanolu, chloroformu a kyseliny octové) (4). Takto fixované tkáně úspěšně používali pro mikrodisekci a následně RNA pro analýzu genové exprese taktéž pomocí RT-PCR. Další práce srovnávala ethanolovou fixaci a čerstvě mraženou tkáň pomocí Affymetrix mikročipů, avšak bez mikrodisekování jednotlivých buněk (5). Autoři detegovali 26% prób (přesnější probe sets, viz níže) u mražených tkání, oproti pouhým 4,5% z tkání fixovaných ethanolem a zalitých do parafinu. Přes výrazný pokles počtu detegovaných transkriptů tato data ukazují, že pokud není k dispozici čerstvě zmražená tkáň, lze získat omezenou informaci o genové expresi i z tkání zalitých do parafinu. Taktéž další autoři zjistili, že fixace tkání 70% etanolem zvyšuje výtěžnost RNA, DNA i proteinů oproti formalinové fixaci a poskytuje srovnatelnou histologickou kvalitu řezů (6-8). Přesto existuje poptávka po analýze genové exprese z tkání fixovaných formalinem a zalitých do parafinu. Firmy Arcturus a Affymetrix proto vyvinuly speciální čipy (GeneChip® X3P Arrays), které obsahují hybridizační próby pouze v blízkosti 3' konce a jsou tak schopné detegovat více fragmentovaných transkriptů (vysvětlení viz níže). Laserová mikrodisekce a izolace RNA pro analýzu genové exprese je možná i z imunohistochemicky barvených parafinových řezů (9). Autoři používali kvalitně imunobarvené řezy z tkání fixovaných v acetonu, methanolu nebo ve směsi ethanolu a acetonu. Specifická i rychlost mikrodisekce byla výrazně zvýšena právě díky snazší identifikaci žádaných, popřípadě nechtěných buněčných populací. Přitom samotné barvení preparátů trvalo pouze 12-25 minut. Naproti tomu méně uspo-

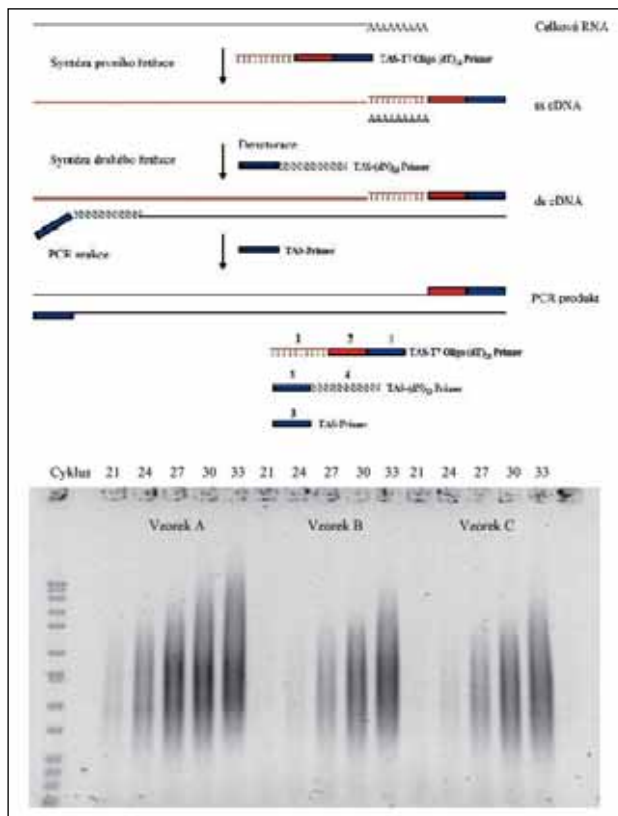
kojivé výsledky po mikrodisekci imunobarvených řezů získali Uneyama a spolupracovníci (10). Tito autoři doporučují spíše barvení cresylovou violetí, případně hematoxylin-eosinem. Použití hematoxylinu-eosinu pro laserovou mikrodisekci a mikročipovou analýzu doporučují také Michel a spolupracovníci. (11). Ginsberg a Che testovali mikrodisekci a mikročipovou analýzu při použití nejen hematoxylinu-eosinu a cresylové violeti, ale také po barvení thioninem, akridinovou oranží a stříbrem (12). Někteří autoři s úspěchem použili pro stabilizaci RNA v analyzovaných vzorcích RNAlater (13). Chaotropní soli RNAlateru však interferují s mikrodisekcí, a tak museli autoři snížit jejich koncentraci promytím v 70% ethanolu a následnou dehydratací a vysušením pomocí absolutního ethanolu a xylenu. V naší práci se vyskytl také problém související s vysokým obsahem tuků v prsní tkáni, které znesnadňují přípravu kryofezů. Po přidavku RNAlateru nebylo již možné připravit kvalitní kryofezy ani při vychlazení tkání při -80°C, a proto jsme byli nuceni používat pouze klasické kryofezy.

Obdobně jako u dostatečně koncentrovaných vzorků je optimální kontrolou kvality RNA sledování poměru 28S/18S rRNA. Vzhledem celkovému objemu vzorků v řádu mikrolitrů je tato kontrola umocněna v podstatě pouze pomocí kapilární elektroforézy s laserem indukovanou fluorescencí (14). Standardem se v této oblasti stal přístroj Agilent 2100 Bioanalyzer, který umožňuje na speciálních čípech analýzu jednoho mikrolitru celkové RNA a poskytuje nejen informaci o kvalitě RNA, ale zároveň i o koncentraci. Pokud není uvedená technologie k dispozici, je nutné barvení řezů, mikrodisekci buněk i izolaci RNA ověřit alespoň na testovacích vzorcích a celý výtěžek obětovat pro kontrolu pomocí klasických metod jako je agarozová elektroforéza a RT-PCR. Po optimalizaci celé procedury je následně nutné striktně dodržovat celý postup u analyzovaných vzorků. Průměrný výtěžek z 1000 mikrodisekovaných buněk je asi 50 ng celkové RNA, přičemž v našich laboratořích jsme pozorovali pro agarozovou elektroforézu a barvení Sybr-Gold detekční limit 10 ng při vizualizaci pomocí chlazené CCD kamery (Diana II, Raytest, Německo). Pro ověření kvality pomocí RT-PCR jsme testovali primery pro beta-actin (15), které poskytují jednak relativně dlouhý amplikon 626 bp a kontaminace genomickou DNA se projeví odlišným fragmentem o velikosti 1966 bp. Při použití Titan One Tube RT-PCR kitu (Roche) jsme však nedocílili snížení detekčního limitu a vzhledem k finanční náročnosti jsme od RT-PCR testování upustili. V době řešení našeho projektu nebyl k dispozici zmiňovaný systém 2100 Bioanalyzer a pro kvantifikaci RNA jsme používali spektrofotometr Nanodrop, který umožňuje analýzu taktéž jediného mikrolitru vzorku. Po optimalizaci postupu byl připraven nejprve jeden vzorek pouze pro testovací čip Test3 Array (viz níže) a následně byla provedena kompletní analýza všech tří buněčných populací od jedné pacientky. Po získání kvalitních výsledků jsme přistoupili k dokončení analýzy všech třiceti vzorků. Celý proces amplifikace a značení (viz níže) byl navíc monitorován pomocí GeneChip® Eukaryotic Poly-A RNA Control Kit (Affymetrix), jehož definované ředěné kontroly byly přidány do všech vzorků před syntézou cDNA a finálně byly detegovány na cílových čípech Human Genome U133 Plus 2.0 Arrays (Affymetrix).

Možnosti amplifikace mRNA pro mikročipovou analýzu
Eberwine a spolupracovníci vyvinuli dnes již klasickou, tzv. lineární amplifikaci RNA (16). Jedná se o přepis mRNA do cDNA pomocí oligo-dT-T7 primeru, přičemž inkorporovaný T7-promotor umožňuje následnou amplifikaci in vitro transkripční pomocí T7- polymerázy. K dosažení mikrogramových množství RNA pro samotnou mikročipovou analýzu je někdy

tento postup třeba zopakovat. Jenson a spolupracovníci pozorovali pouze malé změny v expresním profilu vzorků amplifikovaných dvojitou lineární amplifikací oproti neřaděné RNA (17). Nejlepší výsledky byly získány při amplifikaci 500 a více nanogramů celkové RNA, přičemž jako kritické faktory se ukázaly kvalita vstupní RNA a koncentrace oligo-dT-T7 primeru. Pro zmiňovanou dvojitou lineární amplifikaci je dostupná celá řada komerčních kitů (Ambion, Arcturus, Epicentre a další). Detailní informace o problémech syntézy cDNA a in vitro transkripce poskytuje práce Baugh a spolupracovníků (18). Z jejich zkušeností vychází i další kit od firmy Artus-biotech, jehož hlavní odlišností je využití speciálních trinukleotidových primerů (sekvence neuvedena) pro syntézu druhého řetězce cDNA.

Jak již bylo zmíněno výše jedním ze základních předpokladů úspěšné mikročipové analýzy je kvalita RNA. Existují však přístupy, které umožňují získat informaci také z degradované RNA. Většina přístupů pro amplifikaci RNA používá oligo-dT-T7 primer, který umožňuje jednak přepis do cDNA (oligo-dT primer) a také in vitro transkripci pomocí T7-polymerázy (T7-promotor). Přepis do cDNA je tedy možný pouze pro fragmenty RNA obsahující poly-A signál. Xiang a spolupracovníci vyvinuli modifikovanou lineární amplifikaci při použití alternativního oligo-N9-T3 primeru (19). Náhodný devíti-mer (N9) umožňuje přepis jakéhokoli fragmentu RNA do cDNA a k in vitro transkripci slouží promotor pro T3-polymerázu. Tento postup vykazoval v degradovaných vzorcích asi o třetinu lepší záchyt rozdílně exprimovaných genů než klasická oligo-dT-T7 amplifikace.



Obrázek 1.: Amplifikace RNA pomocí PCR. Detailní vysvětlení této metody je k dispozici v textu. Z výsledku agarozové elektroforézy vyplývají optimální počty cyklů pro druhou PCR (24 cyklů pro vzorek A a 27 cyklů pro další dva vzorky). Výsledné produkty jsou použity pro in vitro transkripci, která je umožněna inkorporací T7-promotoru.

In vitro transkripci je možné kombinovat také s PCR amplifikací (20-22). Oligo-dT-T7 promotor je navíc spojen s PCR primerem, který je inkorporován i při syntéze druhého řetězce cDNA (Obr. 1). Nevýhodou tohoto postupu je nutnost defino-

vání počtu PCR cyklů pro každou cDNA tak, aby amplifikace byla ukončena v exponenciální fázi PCR. V systému firmy Roche, který jsme použili i v naší práci, se PCR amplifikace provádí dvakrát, přičemž během první reakce se odeberají alikvoty z cyklů 21, 24, 27, 30 a 33 (Obr. 1). Ty jsou poté analyzovány agarozovou elektroforézou a podle intenzity amplifikovaných produktů je vybrán počet cyklů pro druhou PCR. Získané PCR produkty jsou použity pro in vitro transkripci, během které dochází k další amplifikaci a také ke značení pro detekci na mikročipech.

Limitace mikročipových analýz

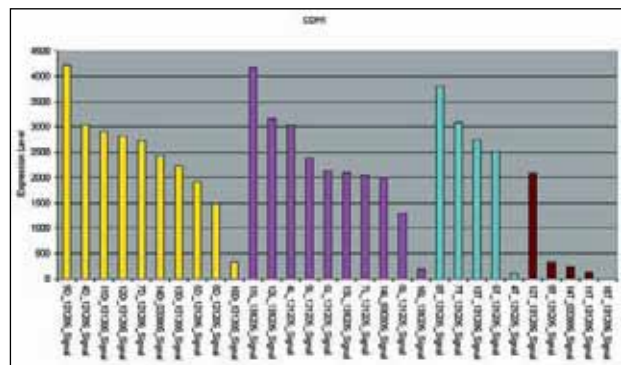
Po naskenování čipů následuje obtížná fáze analýzy dat. V naší práci jsme využili zkušeností pracoviště v anglickém Birminghamu a kromě postupu uvedeného níže zde zmíníme pouze několik detailů týkajících se Affymetrix čipů. Izzary a spolupracovníci modifikovali způsob hodnocení fluorescenčních signálů jednotlivých průb na Affymetrix čipech a srovnali jejich postup s algoritmy programů dChip (www.biostat.harvard.edu/complab/dchip) a komerčního programu Affymetrix (23). Čipy Affymetrix jsou tvořeny oligonukleotidy o délce 25nt, které jsou organizovány do tzv. probe sets pro jednotlivé geny (pro většinu genů je dostupný větší počet probe sets). Tyto probe sets sestávají z 11 až 20 párů tzv. perfect match (PM) a mismatch (MM) oligonukleotidů, přičemž uprostřed MM průby (v pozici 13) je inkorporován chybný nukleotid. Cílem tohoto přístupu je možnost lepší kontroly nespecifické hybridizace a hybridizační signály z těchto průb jsou při klasické analýze obvykle zohledňovány. Izzary a spolupracovníci však ukazují, že matematická korekce probe sets pomocí těchto MM průb pravděpodobně neodpovídá jejímu zamýšlenému biologickému významu a v jejich algoritmu hodnoty MM průb ignorují. Vedle konzistentnějších hodnot tzv. fold change, jejich použití RMA (Robust Multiarray Analysis) vykazovalo oproti Affymetrix i dChip algoritmem více než pěti-násobné snížení variance mezi replikáty. Tento aspekt je důležitý pro plánování experimentů a vzhledem k nižšímu požadavku na počet replikátů má významný ekonomický dopad.

V naší předchozí práci jsme analyzovali telomerázovou aktivitu v prostatických buněčných liniích po působení antiandrogenu bicalutamidu (1). Přes vysokou telomerázovou aktivitou v buňkách LNCaP i DU145 nebyl transkript pro TERT (proteinová podjednotka telomerázy) pomocí mikročipů detegován. Transkripty TERT pravděpodobně podléhají posttranskripční úpravě, při které dochází ke ztrátě poly-A konce, který je nutný pro reverzní transkripci. Expresi TERT v obou liniích jsme následně potvrdili pomocí kvantitativní PCR v reálném čase, která pro reverzní transkripci využívá specifické primery. Stabilita mRNA i jejího poly-A konce má při mikročipové analýze zásadní význam a mechanismy její regulace jsou v literatuře diskutovány (24). Z našeho současného projektu upozorňujeme na význam ověření mRNA signálů na jednotlivých mikročipech (Obr. 2). V rámci genů, hodnocených jako statisticky signifikantně rozdílně exprimované, mohou být zahrnuty také geny s velmi heterogenní nebo nízkou expresí a jejich použití pro interpretaci studovaného problému může být zavádějící.

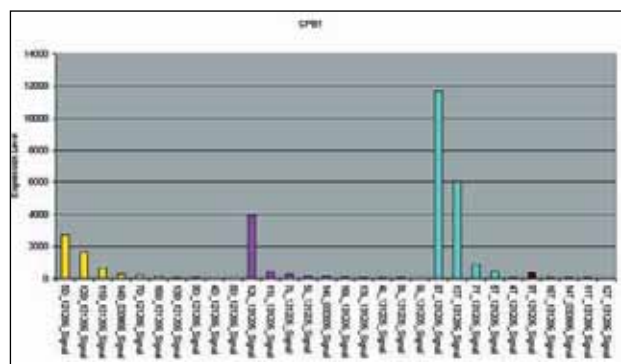
Na zásadní problém analýzy dat upozorňují Michiels a spolupracovníci, kteří znovu analyzovali mikročipová data ze sedmi velkých studií, které sestávaly alespoň ze 60 pacientů a poukázaly na význam analýzy genové exprese pro prognózu nádorového onemocnění (25). Vzhledem k neadekvátní validaci výsledků se publikované závěry ukázaly jako příliš optimistické, kdy pět ze sedmi studií neklasifikovalo pacienty lépe než náhoda. Problém mikročipových analýz představuje také použití rozdílných platform. Van't Veer a spolupracovníci definovali 70 genů, jejichž exprese by mohla diferencovat pacientky s dobrou a špatnou prognózou karcinomu prsu (26). Obdobný profil 76 genů definovali Wang a spolupracovníci (27). Pouze tři geny jsou však oběma profilům společné, což se vysvětluje

použitím odlišných mikročipů a matematických algoritmů pro analýzu dat (28). V této souvislosti Rogojina a spolupracovníci analyzovali stejné vzorky pomocí dvou rozdílných mikročipových platform, Clontech a Affymetrix, a jako nezávislé ověření použili q-RT-PCR a částečně i western blot analýzu (29). Pokud byly vzorky hodnoceny opakovaně pomocí stejných čipů, obě platformy vykazovaly vysokou míru konzistence. Avšak pokud byly výsledky získané pomocí čipů Clontech Atlas Glass 3.8 a Affymetrix U95A/U133A srovnány mezi sebou, ukázala se velmi malá shoda. Výsledky q-RT-PCR lépe korelovaly s Affymetrix (85%) než s Clontech (33%) a také western blot analýza se shodovala spíše s Affymetrix platformou.

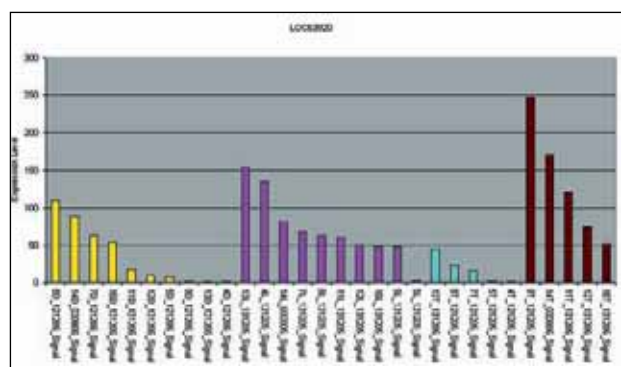
2a) Gen CDH1 vykazuje vysoké a homogenní hodnoty.



2b) Statistické hodnocení diferenciální exprese genu CPB1 je ovlivněno jeho velmi vysokou expresí ve vzorcích 8T a 13T.



2c) Expresí transkriptu LOC63920 je relativně homogenní, ale celkově nízká expresí nadhodnocuje význam tzv. násobné změny.



Obrázek 2.: Význam kontroly dat z jednotlivých čipů pro geny hodnocené jako rozdílně exprimované. Barevně jsou odlišeny čtyři buněčné populace, přičemž jsou komentovány tři geny, které byly statisticky hodnoceny jako rozdílně exprimované mezi dvěma populacemi vpravo.

Použití mikročipů umožňuje analyzovat genovou expresi celého genomu, ale potýká se přitom nejen s již uvedenými problémy. Především poskytuje informaci na úrovni mRNA, která nemusí odpovídat expresi proteinů, které jsou zodpovědné za samotnou biologickou funkci. Nemůže také poskytnout infor-

maci o postranlačních úpravách proteinů, které do značné míry rozhodují o jejich biologické aktivitě. Dalším problémem interpretace výsledků je doposud omezená nebo zcela chybějící informace o biologické funkci řady genů. Přes tyto obtíže je mikročipová analýza ve spojení s dalšími metodami, které verifikují její výsledky, velmi výkonným a nadále slibným přístupem pro studium nejen humánních chorob, ale biologie jako celku.

Metodika optimalizovaná v našich a spolupracujících laboratořích

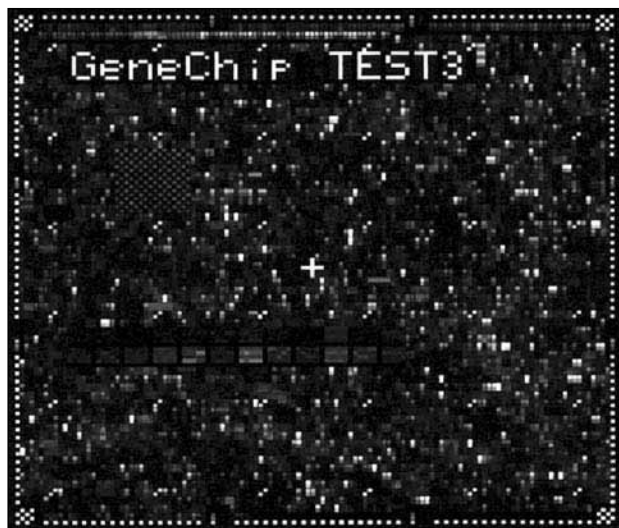
Příprava kryožejů, laserová mikrodisekce a izolace RNA.

Nádorová i normální tkáň byly zhodnoceny erudovaným patologem ihned po operaci, zmrazeny v kapalném dusíku a skladovány při -80°C . Kryožejy 7–8 μm byly připraveny v kryostat (Leica CM1850), jehož pracovní plochy byly očištěny pomocí RNaseZap (Sigma, USA). Řezy byly ihned fixovány v acetonu, obarveny hematoxylinem a dehydratovány v alkoholu a xylenu. Před samotnou mikrodisekcí byly nabarvené řezy krátkodobě skladovány v uzavřených zkumavkách se silicagelem (Sigma). Během celého postupu byly používány nástroje zbavené RNáz a všechny roztoky byly připraveny v DEPC-vodě. Přibližně 1500 buněk studovaných buněčných populací bylo mikrodisekováno pomocí VeritasTM Laser Capture Microdissection System (Arcturus Bioscience, USA; Laboratoř Experimentální Medicíny, Olomouc) podle standardního protokolu. Mikrodisekované buňky na speciálních discích byly ihned lyzovány v pufru RNesy Micro kitu (Qiagen, Německo). Úplná lyze buněk byla provedena inkubací při 42°C po dobu 30 minut a následovala izolace RNA pomocí zmíněného kitu nebo skladování při -80°C . Pro kvantifikaci RNA byl použit spektrofotometr Nanodrop (Nanodrop Technologies, USA; Biofyzikální Ústav AV ČR, Brno).

Amplifikace RNA, značení a hybridizace.

Padesát nanogramů celkové RNA bylo převedeno do cDNA a následně amplifikováno pomocí Microarray Target Amplification Kit (Roche Diagnostics, Svycarsko). Přesněji, pro přepis do cDNA byl použit modifikovaný oligo-dT primer (TAS-T7 Oligo (dT)₂₄). Speciální sekvence TAS (Target Amplification Sequence), která nevykazuje homologii k žádným známým sekvencím a umožňuje následnou amplifikaci pomocí PCR, je inkorporována i při syntéze druhého řetězce cDNA pomocí TAS-(dN)₁₀ primeru (Obr. 1). Po purifikaci cDNA pomocí Microarray Target Purification Kit (Roche) byla provedena PCR s TAS primery opět pomocí Microarray Target Amplification Kit. Aby nedošlo ke zkreslení informace o genové expresi během pozdních fází PCR, byl optimální počet cyklů určen v předběžné PCR a kontrolou produktů z cyklů 21, 24, 27, 30 a 33 pomocí agarozové elektroforézy. PCR produkty z druhé, optimalizované PCR byly přečištěny pomocí Microarray Target Purification Kit a použity pro in vitro transkripci. Pomocí Microarray RNA Target Synthesis Kit T7 (Roche) byly do finální cRNA inkorporovány biotin-14-CTP (Invitrogen, USA) a biotin-16-UTP (Roche). Značená cRNA byla purifikována pomocí Microarray Target Purification Kit, spektrofotometricky kvantifikována a zkontrolována pomocí agarozové elektroforézy. Monitorování celého procesu amplifikace a značení umožnil GeneChip[®] Eukaryotic Poly-A RNA Control Kit (Affymetrix, USA). Jeho definované ředěné exogenní pozitivní kontroly byly přidány do všech vzorků před syntézou cDNA a byly detegovány na cílových čípech Human Genome U133 Plus 2.0 Arrays (Affymetrix). Před samotnou hybridizací bylo vždy 25 μg biotinylované cRNA fragmentováno a použito pro přípravu hybridizační směsi. Proces fragmentace, který umožňuje efektivní hybridizaci k oligonukleotidovým probám, byl zkontrolován pomocí agarozové elektroforézy. Hybridizační směs standardně obsahuje biotinylované hybridizační kontroly z GeneChipTM Eukaryotic Hybridization Control Kit (Affymetrix). Syntetický oligonukleotid B2 hybridizuje ke specifickým místům na čipu a umožňuje programu GCOS (Gene Chip Operating Software, Affymetrix) správně umístit mřížku oddělující jednotlivé signály po naskenování celého čipu (Obr.

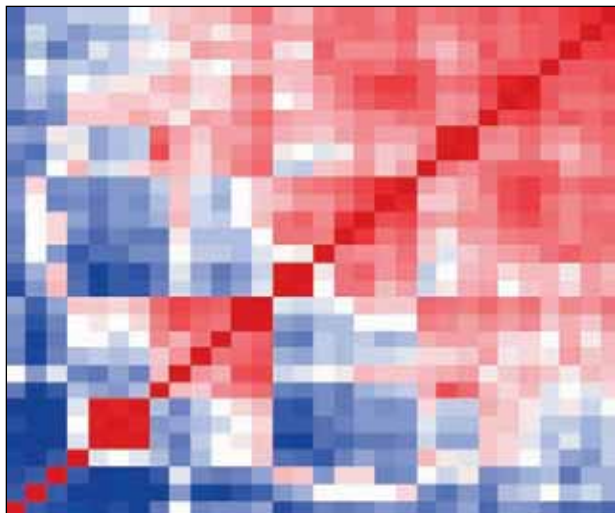
3). Další neeukaryotické hybridizační kontroly (geny syntetické dráhy E. coli pro biotin a gen pro rekombinázu bakteriofága P1) umožňují kontrolu hybridizačního kroku i kvality vlastního čipu. Vzhledem k vysoké ceně čipů Human Genome U133 Plus 2.0 Arrays byla provedena nejdříve hybridizace, barvení i skenování na čipech Test3 Array za účelem ověření kvality celého procesu přípravy značené cRNA. Hybridizační směs byla přitom připravena již pro oba čipy najednou. Hybridizace probíhala 16 hodin při 45°C a 60 rpm v hybridizační peci. Promývání, barvení streptavidin-phycoerythrinem i skenování byly řízeny programem GCOS v promývacím automatu a skeneru.



Obr. 3. Affymetrix Test3 Array. Hybridizační kontroly vytváří rám a definované rohy čipu a umožňují tak správné počítačové přiložení mřížky, která odděluje signály pro jednotlivé próby.

Analýza dat. Naskenované čipy byly analyzovány pomocí GCOS se základním nastavením, s výjimkou cílového signálu definovaného na hodnotu 100. Relativní expresní hladiny mRNA byly definovány normalizovanými hodnotami signálu. Vzájemná podobnost kompletních expresních profilů všech vzorků byla hodnocena pomocí Pearsonových korelačních koeficientů. Jejich korelační matrix byla graficky zobrazena jako tzv. Heatmap (Obr. 4) pomocí příslušné funkce v programovacím prostředí R (<http://www.r-project.org/>). Podobnost kompletních expresních profilů byla hodnocena také metodou PCA (Principal components analysis) pomocí PLS_Toolbox (Version 3.5, Eigenvector Research, USA) v programu Matlab (Version 7.1, The MathWorks, USA). Rozdílně exprimované geny mezi jednotlivými buněčnými typy byly identifikovány jednak pomocí analyzačního algoritmu v GCOS a také pomocí tzv. Rank Products a RMA (Robust Multiarray analysis) (23, 30). V rámci GCOS analýzy bylo provedeno nejprve srovnání buněčných populací v rámci jednotlivých pacientek a následně byly filtrovány geny s nejvyšším počtem změn v rámci všech

deseti pacientek pomocí programů Microsoft Excel a Access. Rank Products analýza byla provedena pomocí modulu RankProd v programu Bioconductor (<http://www.bioconductor.org/>), přičemž mezní procento falešných pozitivit bylo stanoveno na 10%. Diferenciálně exprimované geny mezi jednotlivými buněčnými populacemi byly dále analyzovány pomocí online databáze DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery, <http://david.abcc.ncifcrf.gov/>). Vzhledem ke komplikovanému systému Gene Ontology, který je stratifikován do tří skupin (biologický proces, molekulární funkce a buněčná lokalizace) a pěti úrovní, jsme profunkční anotaci genů použili tzv. Functional Categories (SP_PIR_Keywords), které umožnily snazší orientaci v získaných výsledcích. Detailnější informace o jednotlivých genech byly získány z dalších volně dostupných databází, především z Gene Cards (www.genecards.org) a NETAFFX Analysis Center (www.affymetrix.com/analysis).



Obrázek 4.: Analýza podobnosti genových profilů. Vzájemná podobnost kompletních expresních profilů třiceti vzorků byla hodnocena pomocí Pearsonových korelačních koeficientů a zobrazena jako tzv. sample correlation heatmap. Na ose x i y jsou jednotlivé vzorky (jejich číslování neuvádíme) a jednotlivé barevné body odpovídají korelačním koeficientům pro srovnání každého vzorku s každým. Čím vyšší korelace, tím je barva více červená a naopak nižší korelace odpovídá odstínům modré barvy. Uhlopříčka reprezentuje absolutní korelaci stejných vzorků.

Poděkování

Srdečně děkujeme všem svým spolupracovníkům za spolupráci při laserové mikrodisekci (Marta Dziechciaruková, Marian Hajdúch), při zpracování mikročipů a analýze dat (Karl Baumforth, Wenbin Wei) a za veškerou další technickou pomoc a odborné diskuze (Jiřina Zatloukalová, Jana Běláková, Irena Koutná, Kateřina Bouchalová, David Friedecký, Jiří Drábek, Jiří Klein). Tato práce byla podpořena granty NR 7844-3 a MSM 6198959216.

Literatura

1. Bouchal J, Baumforth KR, Svachova M, et al. Microarray analysis of bicalutamide action on telomerase activity, p53 pathway and viability of prostate carcinoma cell lines. *J Pharm Pharmacol* 2005;57:83-92.
2. Taylor TB, Nambiar PR, Raja R, et al. Microgenomics: Identification of new expression profiles via small and single-cell sample analyses. *Cytometry A* 2004;59:254-61.
3. Goldsworthy SM, Stockton PS, Trempus CS, et al. Effects of fixation on RNA extraction and amplification from laser capture microdissected tissue. *Mol Carcinog* 1999;25:86-91.
4. Kim JO, Kim HN, Hwang MH, et al. Differential gene expression analysis using paraffin-embedded tissues after laser microdissection. *J Cell Biochem* 2003;90:998-1006.
5. Perlmutter MA, Best CJ, Gillespie JW, et al. Comparison of snap freezing versus ethanol fixation for gene expression profiling of tissue specimens. *J Mol Diagn* 2004;6:371-7.
6. Gillespie JW, Gannot G, Tangrea MA, et al. Molecular profiling of cancer. *Toxicol Pathol* 2004;32 Suppl 1:67-71.
7. Kabbarah O, Pinto K, Mutch DG, Goodfellow PJ. Expression profiling of mouse endometrial cancers microdissected from ethanol-fixed, paraffin-embedded tissues. *Am J Pathol* 2003;162:755-62.
8. Qin Y, Heine VM, Karst H, et al. Gene expression patterns in rat dentate granule cells: comparison between fresh and fixed tissue. *J Neurosci Methods* 2003;131:205-11.
9. Fend F, Emmert-Buck MR, Chuaqui R, et al. Immuno-LCM: laser capture microdissection of immunostained frozen sections for mRNA analysis. *Am J Pathol* 1999;154:61-6.

10. Uneyama C, Shibutani M, Masutomi N, et al. Methacarn fixation for genomic DNA analysis in microdissected, paraffin-embedded tissue specimens. *J Histochem Cytochem* 2002;50:1237-45.
11. Michel C, Desdouets C, Sacre-Salem B, et al. Liver gene expression profiles of rats treated with clofibrate: comparison of whole liver and laser capture microdissected liver. *Am J Pathol* 2003;163:2191-9.
12. Ginsberg SD, Che S. Combined histochemical staining, RNA amplification, regional, and single cell cDNA analysis within the hippocampus. *Lab Invest* 2004;84:952-62.
13. Thelen P, Burfeind P, Grzmil M, et al. cDNA microarray analysis with amplified RNA after isolation of intact cellular RNA from neoplastic and non-neoplastic prostate tissue separated by laser microdissections. *Int J Oncol* 2004;24:1085-92.
14. Zabzdyr JL, Lillard SJ. UV- and visible-excited fluorescence of nucleic acids separated by capillary electrophoresis. *J Chromatogr A* 2001;911:269-76.
15. Raff T, van der Giet M, Endemann D, et al. Design and testing of beta-actin primers for RT-PCR that do not co-amplify processed pseudogenes. *Bio-techniques* 1997;23:456-60.
16. Eberwine J, Yeh H, Miyashiro K, et al. Analysis of gene expression in single live neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:3010-4.
17. Jenson SD, Robetorye RS, Bohling SD, et al. Validation of cDNA microarray gene expression data obtained from linearly amplified RNA. *Mol Pathol* 2003;56:307-12.
18. Baugh LR, Hill AA, Brown EL, Hunter CP. Quantitative analysis of mRNA amplification by in vitro transcription. *Nucleic Acids Res* 2001;29:E29.
19. Xiang CC, Chen M, Ma L, et al. A new strategy to amplify degraded RNA from small tissue samples for microarray studies. *Nucleic Acids Res* 2003;31:e53.
20. Aoyagi K, Tatsuta T, Nishigaki M, et al. A faithful method for PCR-mediated global mRNA amplification and its integration into microarray analysis on laser-captured cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;300:915-20.
21. Klur S, Toy K, Williams MP, Certa U. Evaluation of procedures for amplification of small-size samples for hybridization on microarrays. *Genomics* 2004;83:508-17.
22. Ji W, Zhou W, Gregg K, et al. A method for gene expression analysis by oligonucleotide arrays from minute biological materials. *Anal Biochem* 2004;331:329-39.
23. Irizarry RA, Bolstad BM, Collin F, et al. Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. *Nucleic Acids Res* 2003;31:e15.
24. Ross J. mRNA stability in mammalian cells. *Microbiol Rev* 1995;59:425-50.
25. Michiels S, Koscielny S, Hill C. Prediction of cancer outcome with microarrays: a multiple random validation strategy. *Lancet* 2005; 365: 488-92.
26. van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 2002;415:530-6.
27. Wang Y, Klijn JG, Zhang Y, et al. Gene-expression profiles to predict distant metastasis of lymph-node-negative primary breast cancer. *Lancet* 2005;365:671-9.
28. Weigelt B, Peterse JL, van 't Veer LJ. Breast cancer metastasis: markers and models. *Nat Rev Cancer* 2005;5:591-602.
29. Rogojina AT, Orr WE, Song BK, Geisert EE Jr. Comparing the use of Affymetrix to spotted oligonucleotide microarrays using two retinal pigment epithelium cell lines. *Mol Vis* 2003;9:482-96.
30. Breitling R, Armengaud P, Amtmann A, Herzyk P. Rank products: a simple, yet powerful, new method to detect differentially regulated genes in replicated microarray experiments. *FEBS Lett* 2004; 573: 83-92.