

Über den Tellerrand geschaut ...

Wir sind stets bemüht, aktuelle und praxisrelevante Daten über den Einsatz monochromatischen Lichtes in der Mundhöhle zu präsentieren. Und doch sollte der Blick über den eigenen Tellerrand hinaus nie unterbleiben, auch Randgebiete haben ihre Berechtigung. Bei Internet-Recherchen stießen wir auf die überaus interessanten Aktivitäten des Department of Pathology in South San Francisco, California.

BRANDEN D. TARLOW UND HARTMUT K. KOEPPEN/CALIFORNIA

Laser Capture Microdissection: Ein technischer Überblick

Mit der Technologie der Laser Capture Microdissection (LCM) verfügen Forscher und Untersucher über ein Mittel zur schnellen Isolierung ausgewählter Zellpopulationen aus Schnitten mit komplexen, heterogenen Geweben. Die Fortschritte von Molekularbiologie, Proteomik und Mikroarray-Technologien haben es ermöglicht, sehr effizient eine beträchtliche Menge von Daten zu sammeln. Doch auch die raffiniertesten Proteomik- und Molekulartechniken sind nur von begrenztem Wert, wenn der Protein-, RNA- oder DNA-Input nicht von einer reinen Population von Zellen abstammt, die die jeweils interessante Morphologie aufweisen. Während eine Grobbiopsie Proteinwerte, mRNA-Expression oder Anzahl der DNA-Stränge über alle Zelltypen in einem heterogenen Gewebe mittelt, kann die Laser Capture Microdissection den zu untersuchenden Zelltyp sauber von „kontaminierenden“ angrenzenden Geweben trennen.

Die LCM bietet signifikante Vorteile gegenüber anderen Methoden der Anreicherung eines bestimmten Zelltyps wie etwa der fluoreszenzaktivierten Zellsortierung (FACS), Grobdissektion oder Zellselektion mit Antikörper-gebundenen Immuno-Beads aus Kollagenase-gelösten Geweben. Die LCM ist einzigartig im Hinblick auf ihre Effizienz, Präzision und Fähigkeit, gefrorene Gewebe aus klinischen Proben zu verwenden. Während FACS und Immuno-Beads-Zellen ausschließlich auf der Basis ihrer Antikörper-Affinität selektieren, verwendet die LCM eine routinemäßige histologische oder fluoreszente Färbung zur positiven Identifikation von Zelltypen (Abb. 1). LCM-Studien haben Expressionsprofile von neuronalen Subtypen charakterisiert, Tumorzellen aus Biopsien zur Analyse von Gen-Kopienzahlen und somatischen Mutationen isoliert und post-translationale Modifikationen in angereichertem Epithel untersucht. Seit der erstmaligen Entwicklung dieser Technik durch Emmert-Buck und Mitarbeitern sind inzwischen zahlreiche LCM-Systeme im Handel erhältlich. LCM-Systeme schmelzen entweder mit einem IR-gepulsten Laser einen thermoplastischen Film über die zu untersuchenden Zellen oder umschreiben einen ausgewählten Gewebereich mit einem UV-Laser. Zu untersuchende Gewebereiche werden durch Adhäsion an die Cap des Capture-Röhrchens (wie in Abb. 2 dargestellt), Gravität oder einen Photonendruckstrahl isoliert. Die LCM ergibt eine hochqualitative, intakte DNA, die zur Analyse von Mutationen

sequenziert, auf SNP-Mikroarrays verarbeitet, auf den Verlust von Heterozygotie untersucht, auf schlafende infektiöse Erreger gescreent oder auf Ketten von Genkopien kleiner Genomregionen in Tumoren untersucht werden kann. Spezifische genetische Läsionen in Verbindung mit kleinen, jedoch klinisch relevanten Tumorarealen können auf Grund von Heterogenität oder des Vorhandenseins normaler kontaminierender Zellen unerkannt durchschlüpfen. Die LCM kann Kontamination deutlich reduzieren und die Effizienz von Downstream-Anwendungen (d.h. Sequenzierung) steigern. RNA-Extraktionsexperimente, die auf die Ableitung der Differential-Genexpression ausgerichtet sind, erfordern die Beachtung einer Vielzahl technischer Faktoren, einschließlich der initialen Qualität der Gewebe-RNA, des Einflusses eines beliebigen Färbeverfahrens auf die RNA-Qualität, der Geschwindigkeit der Dissektion und der Genauigkeit der reversen Transkription und der Amplifikationsverfahren. Da eine relativ große

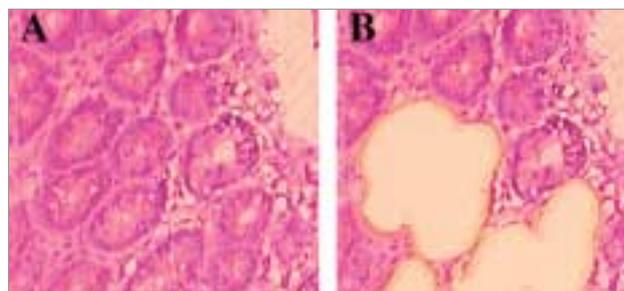


Abb. 1: Colon-Epithel wurde mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt. Die Gewebe wurden mit 100 % Ethanol dehydriert. Die Colorkrypten sind a) vor Isolierung und b) nach Dissektion mit dem uCut LCM (MMI) dargestellt.

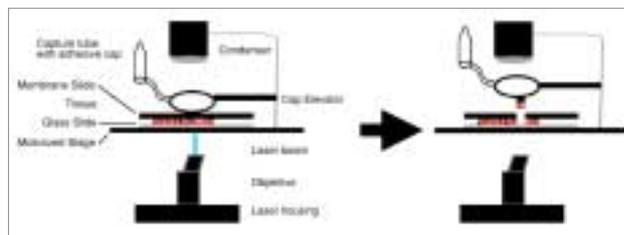


Abb. 2: Laser Capture Microdissection schematisch: In einer gemeinsamen LCM-Anordnung wird der UV-Laser durch das Objektiv eines invertierten Mikroskops gerichtet. Ein gefärbter Gewebeschnitt ist auf einen Membran-Objektträger auf einer motorisierten Arbeitsbühne montiert. Der Anwender zeichnet mit einem Computersystem einen Laserpfad. Eine adhäsive Cap ist in Kontakt mit der Membran, während der UV-Laser um die zu untersuchenden Zellen herum schneidet. Wenn die Cap angehoben wird, klebt die ausgeschnittene Region am Capture-Röhrchen.