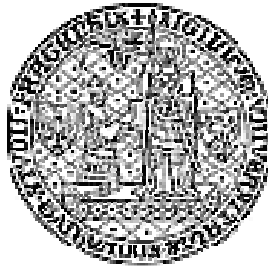


Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra genetiky a mikrobiologie



**Detekce experimentální minimální choroby
metodou PCR**

Pavel Procházka

Praha 2005

Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a žádám, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovateli. Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně citovat.

Vedoucí diplomové práce: Prof. MUDr. Tomáš Eckchlager, CSc

Prohlašuji, že diplomová práce byla vypracována samostatně, jen s použitím citované literatury a pod vedením vedoucího diplomové práce

Pavel Procházka

Poděkování:

Zde bych rád poděkoval svému školiteli prof. T. Eckschlagerovi za vedení diplomové práce, cenné rady, trpělivost a čas, který mi věnoval.

Dále bych chtěl poděkovat MUDr. A. Víchovi z laboratoře kliniky dětské hematologie a onkologie UK 2.LF a FN Motol za praktické rady a pomoc zejména při izolaci deoxyribonukleových kyselin. Můj dík patří i doc. L. Jebavému ze Zemědělské univerzity v Praze za poskytnutí tkání laboratorních zvířat (tkáně byli získány ze zvířat usmrcených v rámci jiných experimentů). V neposlední řadě děkuji též J.Jašínské a dalším kolegům a kolegyním z laboratoře za technickou pomoc a vytvoření příjemného pracovního prostředí.

Poděkování bych chtěl směřovat i ke svým rodičům za podporu, kterou mi poskytovali během celého studia.

Tato práce vznikla v letech 2003 – 2005 v rámci grantů GA ČR 304/03/1189 a MSM 0021620813.

Obsah

Obsah	2
Seznam použitých zkratek	3
1. ÚVOD	5
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED	7
2.1. Minimální zbytková choroba	7
2.2. Diagnostika pomocí PCR	10
2.2.1. Historie polymerázové řetězové reakce	10
2.2.2. Princip polymerázové řetězové reakce	11
2.2.3. Využití polymerázové řetězové reakce	13
2.3. Sledování lidských kmenových buněk v xenotransplantacích	17
2.4. Neuroblastom	18
3. MATERIÁL A METODIKA	21
3.1. Vzorky	21
3.2. Metodika	21
3.2.1. Izolace RNA	21
3.2.2. Průkaz přítomnosti RNA metodou gelové elektroforézy.	23
3.2.3. Převod RNA na cDNA metodou reverzní transkripce.	26
3.2.4. Izolace DNA ze zvířecí tkáně (myší linie)	29
3.2.5. Detekce cílové lidské sekvence ve zvířecí tkáni metodou polymerázové řetězové reakce	32
3.2.5. Průkaz přítomnosti DNA metodou gelové elektroforézy.	36
4. VÝSLEDKY	38
4.1. Metoda PCR amplifikující lidskou specifickou sekvenci	38
4.1.1. Optimalizace metody	38
4.1.2. Testování citlivosti metody	39
4.1.3. Testování funkčnosti metody	40
4.1.4. Detekce přítomnosti lidské DNA v myších mozcích	41
4.2. Metoda RT-PCR k detekci myší tyrozin hydroxylázy	45
4.2.1. Optimalizace metody	45
4.2.2. Testování citlivosti metody	45
5. DISKUZE	47
Detekce lidské specifické sekvence	47
Sledování lidských CD34⁺ buněk	48
Detekce myší tyrozin hydroxylázy	49
6. SOUHRN	51
7. SEZNAM PŘÍLOH	52
8. SEZNAM LITERATURY:	53
Příloha 1	59
Příloha 2	69

Seznam použitých zkratek

Bp	pár bází (<i>base pair</i>)
CD	diferenční antigen (<i>cluster of differentiation</i>)
cDNA	komplementární řetězec deoxyribonukleové kyseliny k řetězci kyseliny ribonukleové (<i>copy DNA</i>)
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxynukleosidtrifosfát
EDTA	disodná sůl kyseliny etylendiaminotetraoctové, dihydrát
FISH	fluorescenční in situ hybridizace
GD ₂	disialogangliosid
HPCs	hematopoetické progenitorové buňky
MACS	magnetické třídění buněk (<i>magnetic cell sorting</i>)
MHC	Major Histocompatibility Complex
MOPS	kyselina 3 – morfolin propansulfonová
MRI	zobrazení magnetickou rezonancí (<i>magnetic resonance imaging</i>)
MRD	minimální zbytková choroba (<i>minimal residual disease</i>)
MuLV	reverzní transkriptáza z myšího leukemického viru (<i>murine leukemia virus reverse transcriptase</i>)
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
NBL	neuroblastom
PBPC	progenitorová buňka periferní krve (<i>peripheral blood progenitor cell</i>)
PBS	fosfátový pufr (<i>phosphate buffer saline</i>)
PCR	polymerázová řetězová reakce (<i>polymerase chain reaction</i>)

QBT	vyvažovací pufr (<i>equilibration buffer</i>)
QC	promývací pufr (<i>wash buffer</i>)
QF	vymývací pufr (<i>elution buffer</i>)
RNA	ribonukleová kyselina
rRNA	ribozomální ribonukleová kyselina
RT PCR	reverzně transkripční polymerázová řetězová reakce
SCID	těžký kombinovaný defekt imunity (<i>severe combined immunodeficiency</i>)
TBE	pufr Tris-borát-EDTA
Tris	hydroxymethyl aminomethan

1. ÚVOD

Jednou z metod využívaných experimentální medicínou je průkaz přítomnosti malého množství odlišných buněk v hostitelské tkáni. Často se jedná o detekci lidských buněk v myších tkáních po xenotransplantacích. Xenotransplantáty lidských nádorů imunodeficitním zvířatům jsou v experimentální onkologii často využívány hlavně jako model pro testování protinádorových léčiv. Proto jsme se rozhodli zavést u nás v laboratoři citlivou metodu s jejíž pomocí jsme schopni detekovat minimální množství buněk obsahujících lidskou DNA ve zvířecích tkáních. Zavedli jsme metodu popsanou BECKEREM (2002), která je založena na průkazu pro člověka specifické sekvence DNA nacházející se na α satelitu 17. chromozomu. K průkazu této sekvence DNA využíváme polymerázovou řetězovou reakci. Poprvé jsme ověřili, že tato sekvence se kromě myši nevyskytuje ani v tkáních opice (*Macacus rhesus*), psa, králíka, morčete a laboratorního potkana.

Tuto metodu jsme pak využili v pokusu, který se zabýval možností zlepšení reparace mozkových lézí aplikací hematopoetických progenitorových buněk. V tomto experimentu jsme sledovali migraci lidských CD34⁺ kmenových buněk implantovaných do hlodavčích mozků s druhostrannou fotochemickou lézí. Zjišťování přítomnosti lidských kmenových buněk jsme prováděli ve vzorkcích z různých míst mozkové tkáně hlodavců. V izolátech DNA jsme pomocí PCR hledali 850 bp dlouhou sekvenci vyskytující se pouze u člověka.

Druhou oblastí našeho zájmu je průkaz buněk myšího neuroblastomu na základě detekce mRNA pro myší tyrozin hydroxylázu metodou RT PCR.

Cílem mé diplomové práce bylo:

- 1) Zavést a optimalizovat metodu PCR amplifikující pro člověka specifickou sekvenci a metodu RT PCR k detekci myší tyrozin hydroxylázy

- 2) Ověřit specifitu této metody na živočišných druzích nejčastěji využívaných k pokusům
- 3) Provéřit citlivost metod v dilučních experimentech
- 4) Využít tyto metody v experimentech
- 5) Detekce experimentální nádorové choroby v pokusných zvířatech

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1. Minimální zbytková choroba

MRD (z anglického minimal residual disease) definujeme jako přítomnost životaschopných nádorových buněk v organismu v množství, které nelze detekovat obvyklými metodikami, tedy v období takzvané klinické kompletní remise (vymizení příznaků a projevů onemocnění, nikoliv nemoci samotné). Mluvíme o ní zpravidla v průběhu nebo po ukončení onkologické léčby. Pokud po minimální zbytkové nemoci pátráme v kostní dřeni, což je nejčastější, lze morfologicky detekovat přítomnost asi 2-5 % nádorových buněk mezi normálními buňkami punktátu kostní dřene (JANOSSY *et al.* 1988). Při tomto zastoupení nádorových buněk v kostní dřeni to při difúzní infiltraci znamená zhruba 10^{10} nedetekovatelných nádorových buněk v lidském organismu. Za minimální nádorovou chorobu považujeme tedy přítomnost nádorových buněk v kostní dřeni v množství menším než 5 nádorových buněk na 100 (ECKSCHLAGER a PRŮŠA 2002). Nutnost zvýšit citlivost metod k průkazu nádorových buněk v současnosti stoupá se zaváděním nových léčebných postupů jako je megachemoterapie a transplantace progenitorových hematopoetických buněk, genové terapie nebo použití modifikátorů biologické odpovědi. Detekce MRD se v současnosti stává nedílnou součástí diagnosticko léčebných protokolů nejen u leukemií a lymfomů, ale i u některých solidních nádorů (FUKUDA *et al.* 2001, SUMERAUER *et al.* 2001). Zvláště důležitý je průkaz i minimálního množství nádorových buněk ve štěpech hematopoetických progenitorových buněk, protože použití štěpů obsahujících nádorové buňky by mohlo přenést recidivu onemocnění (BRENNER 1996, SUMERAUER *et al.* 2002)

Pro hodnocení dynamiky MRD nebo vývoje nádorové infiltrace po zahájení protinádorové terapie stoupá význam kvantitativních metod průkazu nádorových buněk. Tyto metody určují nejen přítomnost, ale i množství nádorových buněk ve vyšetřovaném materiálu. Mezi kvantitativní metody patří průtoková cytometrie, imunocytochemie a fluorescenční in situ hybridizace. V poslední době jsou zaváděny i kvantitativní nebo alespoň semikvantitativní metody PCR a RT PCR (SEEGER *et al.* 2000)

Diagnostika minimální zbytkové nemoci je založena na průkazu odlišnosti mezi nádorovými a zdravými buňkami. Tento rozdíl je nutné zjistit v době záchytu onemocnění, kdy máme pro vyšetření k dispozici dostatek nádorových buněk. Pátrání po MRD bez „vstupního“ vyšetření v době zjevného onemocnění je málokdy úspěšné. Proto je nutné provést v době stanovení diagnózy co nejpodrobnější imunologické, cytogenetické a molekulárně biologické vyšetření nádoru (VÍCHA a ECKSCHLAGER 2005). Hlavními předpoklady úspěšnosti detekce MRD je volba vhodného znaku, který je skutečně specifický pouze pro buňky daného nádoru a výběr nejvhodnější metody pro průkaz toho znaku.

Metoda vhodná k vyšetření MRD musí splňovat následující požadavky:

1. Detekce subklinického relapsu onemocnění po ukončené léčbě.
2. Monitorování odpovědi na protinádorovou léčbu.
3. Minimální zátěž pacienta (množství vzorku, bolest, celková anestezie atd.).
4. Vysoká specifita.
5. Technická a finanční dostupnost.

Molekulárně biologickými metodami prokazujeme chromozomální aberaci nebo expresi specifického genu na úrovni RNA, imunologickými metodami přítomnost pro nádor specifického proteinu- antigenu nebo častěji jejich specifické kombinace. U imunologické i molekulárně biologické detekce se často jedná pouze o "specifitu relativní". Tím míníme, že daný imunofenotyp nebo specifická mRNA se nevyskytuje ve zkoumané tkáni pokud v ní nejsou přítomny nádorové buňky. Například pro detekci MRD u neuroblastomu využíváme průkazu mRNA genu pro tyrozin hydroxylázu, která je přítomna nejen v buňkách neuroblastomů, ale i v jiných buňkách produkujících katecholaminy, nikoliv však v normálních buňkách kostní dřeně nebo periferní krve (NAITO *et al.* 1991, MATTANO *et al.* 1992, MIYAJIMA *et al.* 1994).

V následující *tabulce 1* je uveden přehled citlivostí jednotlivých metodik použitelných k detekci minimální zbytkové choroby podle literárních údajů a zkušeností laboratoří kliniky dětské hematologie a onkologie (HAGENBEEK 1992, GRIBBEN 1994). Tato přehledně udávaná citlivost jednotlivých metod je pouze orientační a platí pro optimální situaci. V experimentech bylo prokázáno, že v detekci neuroblastomových buněk na základě amplifikace onkogenu N-myc je fluorescenční in situ hybridizace citlivější než diferenciální PCR i když ve většině situací je PCR nejméně o jeden řád citlivější než FISH (ECKSCHLAGER a MCCLAIN 1996).

Ještě větší citlivosti lze dosáhnout kombinací metod, například separací buněk na základě imunofenotypu průtokovým cytometrem (sorterem) nebo imunomagnetickými partikulami s následnou detekcí nádorových buněk molekulárně biologickou metodou (BEROIS *et al.* 1997). Velké naděje se vkládají rovněž do metod kultivačních, které mohou být dále doplněny metodou imunologickou nebo molekulárně biologickou (GERHARTZ a SCHMETZR 1990, KASIMIR-BAUER *et al.* 2001). Jejich velkou výhodou je to, že detekují pouze proliferace schopné buňky. Ostatní metody mohou prokázat i neživotoschopné buňky a PCR dokonce pouze DNA z rozpadlých buněk (CAMPANA *et al.* 1992). U RT PCR je riziko průkazu neživotoschopných buněk menší. RNA nutná k vyšetření RT PCR je totiž v poškozených buňkách velmi rychle enzymaticky degradována.

Metoda	Citlivost	Podstata
Morfologie *	1 : 100	morfologické odlišnosti nádorové buňky
Konvenční cytogenetika **	1 : 100	průkaz specifické chromozomální aberace
Southern blot **	1 : 100	průkaz specifické sekvence DNA - chromozomální aberace nebo mutace
FISH	1 : 1 000	průkaz specifické sekvence DNA - chromozomální aberace
Imunologické metody	1 : 10 000	průkaz pro nádor specifického antigenu nebo kombinace antigenů
PCR	1 : 100 000	průkaz specifické sekvence DNA - chromozomální aberace nebo mutace
RT-PCR	1 : 1 000 000	průkaz specifické sekvence RNA - chromozomální aberace nebo mutace

Tabulka 1. Citlivost jednotlivých metod k detekci minimální zbytkové choroby (HAGENBEEK 1992)

* morfologické hodnocení je konvenční metoda, průkaz nádorových buněk citlivější metodou je považován za minimální nádorovou chorobu

** tyto metody nejsou podstatně citlivější než morfologické hodnocení

V experimentální medicíně se detekce MRD využívá nejčastěji k průkazu buněk xenotransplantátů i syngenních nádorových buněk. Tyto modely jsou využívány k ověřování účinnosti nových postupů protinádorové léčby *in vivo*, které předcházejí klinickým studiím (FICHTNER *et al.* 1999).

2.2. Diagnostika pomocí PCR

2.2.1. Historie polymerázové řetězové reakce

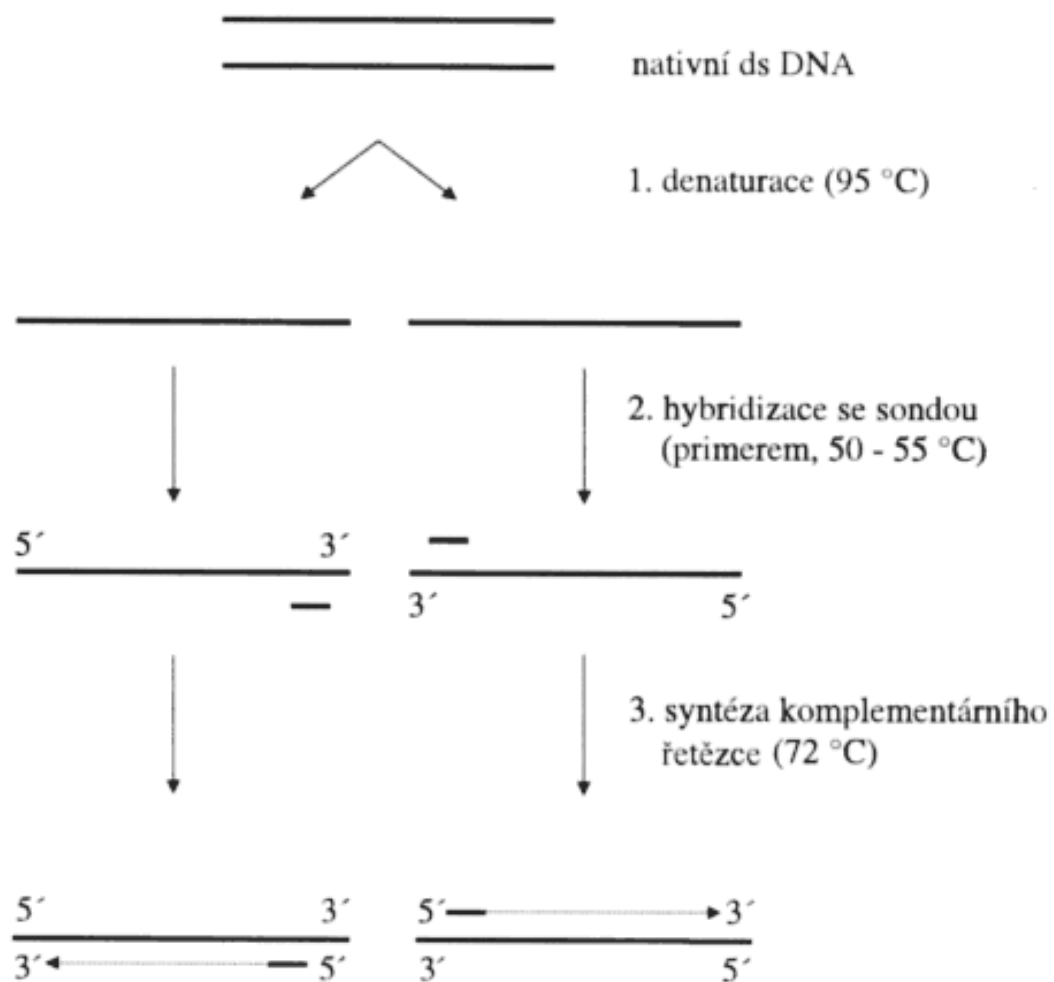
„Pravěk“ molekulárně biologických technik můžeme spatřovat v druhé polovině 19. století. Nevýznamnější počín k dalšímu rozvoji se udál roku 1869, kde se Fridrichu Miescherovi povedla izolace DNA. V následujících letech se dědičnost a vlastnosti geonomu studovali zejména pomocí tzv. „mendelovské“ genetiky. Velkého rozvoje se molekulární genetiky dočkala ve 20. století. Za zmínku stojí W. T. Astbury, který jako první získal difrakční obrazce DNA a navrhl první možnou strukturu DNA. Roku 1953 publikovali Francis Crick a James Watson trojrozměrný model DNA. Po té v druhé polovině 20. století začal rychlý rozvoj molekulárně biologických technik směřující k vyvinutí a zdokonalení polymerázové řetězové reakce. Pro RT PCR byl významný rok 1970, kdy byla Howardem Teminem a Davidem Baltimorem objevena reverzní transkriptáza přepisující molekulu RNA na cDNA. Roku 1973 zdokonalil Jozeph Sambrook DNA elektroforézu na agarózovém gelu a vizualizaci fragmentů ethidium bromidem (BOEHRINGER 1995).

Počátky využívání PCR, tak jak ji známe dnes, se datují od roku 1985, kdy Karry B. Mullis popsal využití termostabilní DNA polymerázy pro PCR (SAIKI *et al.* 1985, MULLIS a FALOONA 1987).

2.2.2. Princip polymerázové řetězové reakce

PCR umožňuje mnohonásobné pomnožení (teoreticky 2^n krát, kdy n je počet cyklů, který se zpravidla pohybuje mezi 15- 40 – větší počet cyklů již nevede ke zvýšení citlivosti) specifických úseků zkoumané DNA o velikosti několika stovek až tisíců bází. Takto získaný produkt PCR lze prokázat elektroforézou. Podstatou této reakce je opakovaná enzymatická syntéza DNA v cyklické reakci o třech fázích: v první fázi je dvouvláknová DNA denaturována, ve druhé fázi hybridizuje s primery (oligonukleotidové - 18 až 28 nukleotidů dlouhé sondy, které specificky hybridizují pouze na obou stranách cílového úseku DNA) a ve třetí probíhá syntéza dvou řetězců DNA komplementárních ke sledovaným úsekům. Tyto fáze jsou zajišťovány změnou teploty v cyklerech- přístrojích, které umožňují rychlé cyklické změny teploty podle zadaného programu. Denaturace je zajištěna teplotou 95°C , optimální teplota pro vazbu primerů je individuální pro každou dvojici primerů a pohybuje se zpravidla v rozmezí 42°C - 70°C . Syntézu katalyzují termostabilní DNA polymerázy, které mají reakční optimum kolem 72°C . Kromě tohoto enzymu a primerů jsou v reakční směsi ještě deoxynukleosid trifosfáty („stavební kameny DNA“), pufr s ionty nezbytný pro činnost polymerázy a vzorek vyšetřované DNA (SAIKI *et al.* 1985, MULLIS a FALOONA 1987). Hlavní problém zavádění nové reakce je vyhledat vhodné primery tak aby se nevázaly i na jinou oblast genomu, aby se nevázaly na sebe navzájem a aby měly přibližně stejnou teplotu vazby. Další problém – vyhledání vhodné vazebné (anealingové) teploty již odstranily gradientové cyklery, které umožňují současné provedení reakcí o různé vazebné teplotě, takže optimalizaci reakce můžeme zvládnout najednou.

Jako vzorek lze také použít RNA přeepsanou pomocí reverzní transkripce při RT PCR na cDNA. K reverzní transkripci jsou využívány reverzní transkriptázy což jsou enzymy retrovirů (HOOBERMAN 1992). Na cDNA lze přepsat buď celou RNA metodou náhodných hexamerů nebo poly T, případně pouze vybranou část za použití specifických primerů. Metoda specifických primerů zvyšuje citlivost, ale protože nepřepíše celou mRNA na cDNA umožňuje průkaz pouze jedné sekvence.



Obr 1: Princip PCR. (R.Průša a kol.. Multimediální učebnice molekulární biologie, UK 2:LF, <http://www.lf2.cuni.cz/Projekty/prusa-dna/newlook/defa6.htm>).

2.2.3. Využití polymerázové řetězové reakce

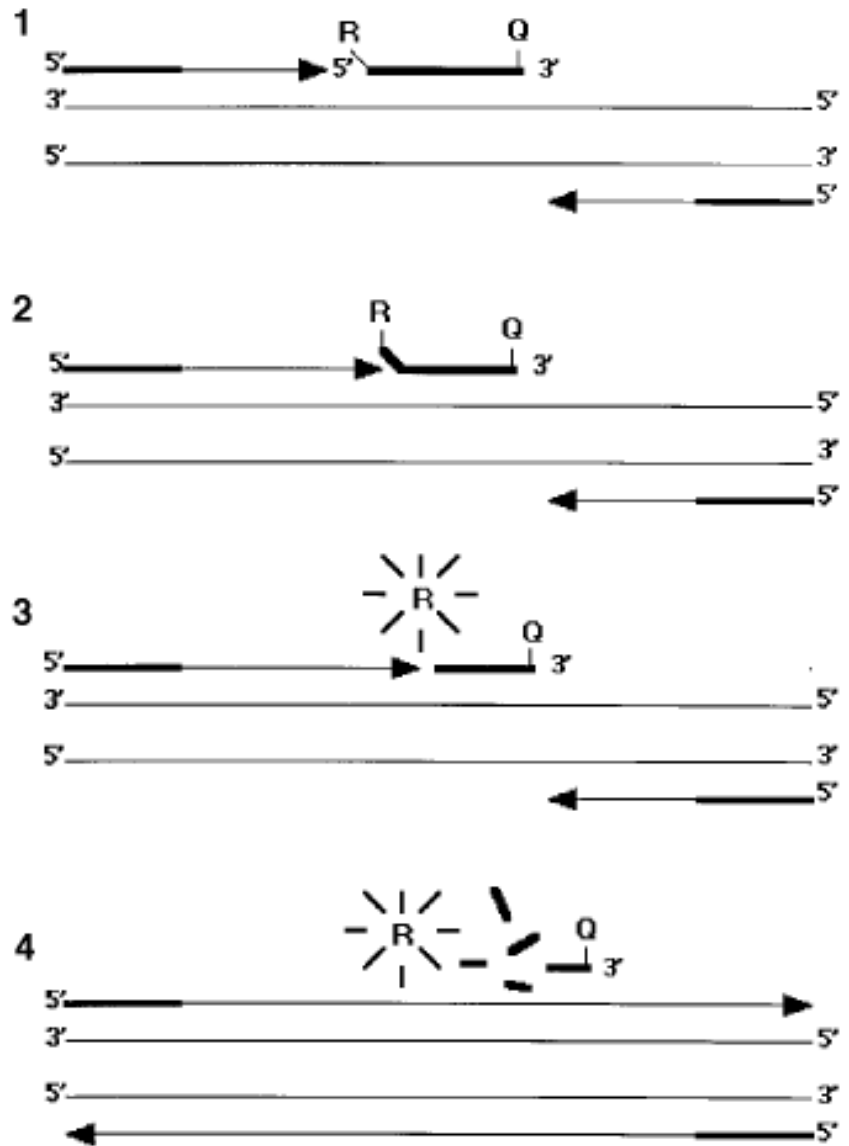
V diagnostice MRD lze využít PCR a RT PCR k detekci specifických translokací a RT PCR umožňuje průkaz specifické mRNA. Citlivost těchto metod je vysoká. PCR umožňuje prokázat 1 nádorovou buňku na 10^3 až 10^4 a RT PCR je ještě o 1 až 2 řády citlivější (HAGENBEEK 1992).

Citlivost a specifitu lze ještě zvýšit tak zvanou „nested“ PCR nebo RT PCR (PETER *et al.* 1995). Podstatou je použití dvou PCR, přičemž ve druhé reakci jsou použity primery ležící uvnitř produktu první reakce a jako vzorek se používá produkt první reakce. Citlivost také samozřejmě ovlivňuje množství DNA respektive cDNA přidané do reakce tedy i celkový objem reakce.

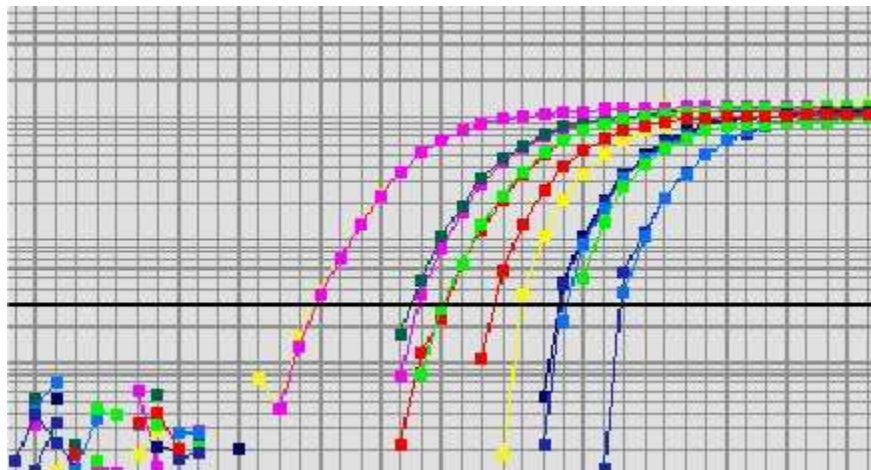
Dalšího výrazného zvýšení citlivosti RT PCR lze docílit izolací pouze mRNA pomocí poly T navázaného na magnetické partikule. Messengerová RNA obsahuje na svém konci řetězec několika adeninů (tzv. poly A řetězec), čehož lze využít k vazbě na polymer složený z thymidinů (tzv. poly T). Protože mRNA tvoří pouze 1- 2 % celkové buněčné RNA, lze do jedné reakce použít všechnu mRNA izolovanou z 5 ml krve nebo kostní dřeně.

Pro účely detekce MRD je často důležité kvantitativní hodnocení. Toho lze docílit několika postupy. V současnosti lze provádět semikvantitativní hodnocení za použití denzitometrie nebo metodou limitního ředění. Podstatou denzitometrické metody je měření intenzity fluorescence odpovídající produktu reakce a porovnání s fluorescencí standardu. K tomu je nezbytné přístrojové vybavení a vhodný software. Metoda limitního ředění je založena na řadě PCR reakcí, při kterých se jako vzorek použije sestupná řada ředěného vzorku například 1: 10, 1: 100, 1: 1 000 atd. a zjišťuje se při kterém ředění ještě prokážeme produkt reakce. Složitější, ale přesnější jsou metodiky založené na srovnání dvou reakcí- metoda interního kompetitoru nebo diferenciální PCR. Obě tyto metody jsou založeny na srovnání dvou produktů, jedním je zkoumaná oblast a druhou je buďto jiný gen - diferenciální PCR nebo přidaný kompetitor což je zpravidla shodný úsek DNA, ze kterého byla určitá sekvence vyštěpena, takže výsledný produkt PCR je menší (FREYE *et al.* 1989, HELFRICH *et al.* 1997).

V současné době je využívána kvantitativní PCR v reálném čase, která je založená na průběžné fluorescenční detekci produktu PCR (HELFRICH *et al.* 1997). Detekce je prováděna fluorescenčně značenou sondou, která se navazuje na produkt reakce. Množství vzniklého produktu PCR reakce je tak přímo úměrné intenzitě fluorescence (HOLLAND *et al.* 1991). K tomu jsou využívány přístroje, které kromě cyklických změn teploty, stejně jako konvenční cyklery, umožňují navíc excitovat fluorescenci a měřit její intenzitu. Koncentrace hledané DNA je vyjádřena počtem cyklů, které jsou nezbytné ke vzniku takového množství produktu, které protne „nulovou“ hranici. Princip fluorescence a výsledky křivky detekující GD2 syntázu užívanou k průkazu MRD u neuroblastomu na klinice dětské hematologie a onkologie ukazuje obrázek a a b.



Obr 2a: Princip fluorescenční detekce produktu. Sonda s navázanými fluorochromy R (reporter) a Q (quencher) neemituje záření, protože záření produkované reporterem je quencherem pohlcené. Po odštěpení (DNA syntetáza má i endonukleázovou aktivitu) quencheru, reporter emituje záření.



Obr 2b: Výsledky vyšetření PCR v reálném čase.

2.3. Sledování lidských kmenových buněk v xenotransplantacích

Hlavním důvodem pro výzkum kmenových buněk je možnost jejich použití v klinické terapii. Implantace terapeutických buněk pacientům vyžaduje detekční techniky, které mohou neinvazivně monitorovat jejich osud, chování a pohyb v hostitelském organismu. Jednou z možností je na buňky navázat dostatečné množství superparamagnetické kontrastní látky do buněk, umožňující jejich detekci in vivo použitím zobrazení magnetickou rezonancí (MRI - z anglického magnetic resonance imaging). V takovém uspořádání MRI představuje neinvazivní metodu pro sledování implantovaných buněk. Pro syntézu kontrastního činidla je převážně využíváno malých krystalů magnetitu $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{FeO}$. Krystaly jsou pokryty makromolekulární skořápkou, která může být chemicky nebo biochemicky modifikována (YEH *et al.* 1993, 1995, WEISSLEDER *et al.* 1997, WANG *et al.* 2001). Když jsou specifické protilátky navázány na skořáčku, kontrastní látka se může specificky vázat na tkáň. Doposud bylo popsáno několik typů kontrastních látek s nanočásticemi o poloměru v rozmezí 20 až 150 nm. Některé z nich jsou komerčně využitelné.

CD34^+ buňky – část buněk kostní dřeně a periferní krve – jsou známy jako hematopoetické progenitorové buňky (HPCs) (CIVIN a GORE 1993). Tyto buňky, které mohou být izolovány Miltenyi MACS porterem, jsou v klinické praxi používány pro obnovení krvetvorby. (HANDGRETINGER *et al.* 2001, 2002, LANG *et al.* 2003). CD34^+ buňky jsou důležitým nástrojem v klinické medicíně, protože jsou součástí některých transplantačních protokolů. Navíc se krvetvorné kmenové buňky mohou diferencovat v neuroektodermální buňky, které produkují neurotrofní cytokiny (GOOLSBY *et al.* 2003). Proto mohou být HPCs alternativním zdrojem pro léčení defektů CNS.

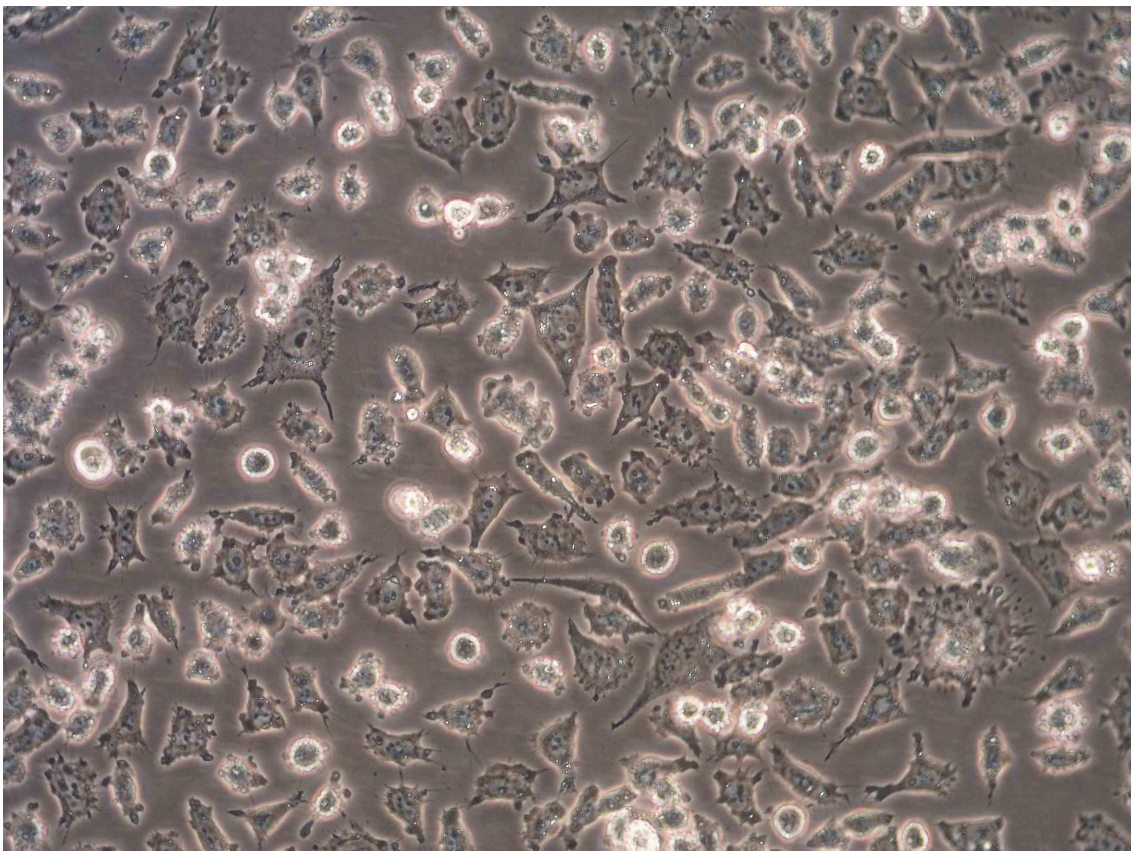
2.4. Neuroblastom

Neuroblastom je maligní embryonální nádor dětského věku odvozený z nezralých a nediferencovaných buněk neurální lišty osídlujících paravertebrální sympatická ganglia, dřev nadledviny a paraganglií. Příčina jeho vzniku není známa. Neuroblastom je nejčastější extrakraniální solidní nádor dětského věku s incidencí - frekvencí výskytu nově vzniklých onemocnění v dané populaci v určitém časovém období (u dětí zpravidla na 1 000 000 dětí/rok), udávanou v rozmezí 8 - 9/ milion dětí. Tvoří tedy asi 7- 10 % všech nádorů dětského věku. Průměrný věk v době stanovení diagnózy se pohybuje kolem dvou let. Z celkového počtu pacientů je 36% pacientů je mladších 1 roku, 79% mladších 4 let a 97% pacientů onemocní do 10. roku života. Velmi vzácně se neuroblastom vyskytne i u dospělých. Některé studie prokazují bifázickou distribuci v závislosti na věku s prvním vrcholem do 1 roku a druhým mezi 2.- 4. rokem života (BRODEUR a MARIS 2002). Již BRESLOW a MC CANN (1971) se domnívali, že věk vzniku onemocnění je i významným prognostickým faktorem. Z hlediska místa vzniku je nejčastější dutina břišní, kde vzniká asi 70 % primárních nádorů. Z nich polovina vychází z dřev nadledviny a polovina z paraganglií a viscerálních sympatických ganglií břišních, pět procent je lokalizováno do pánevní oblasti a zbývající čtvrtina vyrůstá z ganglií krční a hrudní oblasti.

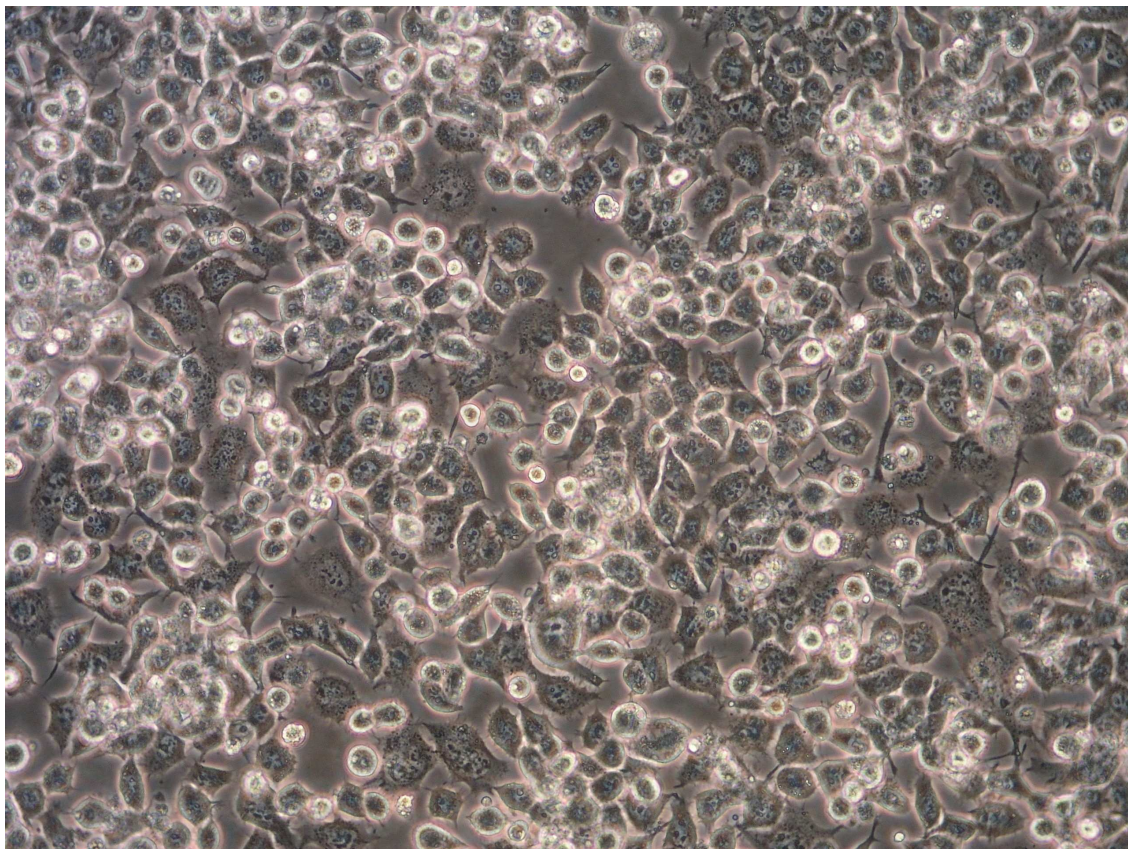
Pro neuroblastom je charakteristická značná biologická variabilita (GOTO *et al.* 2001). Nádory nízké rizikové formy často samovolně regredují, nebo se spontánně či při léčbě diferencují v ganglioneuroblastom nebo dokonce benigní ganglioneurom, který je tvořen pouze diferencovanými buňkami. Vysoce maligní forma se vyznačuje mimořádně agresivním průběhem s neovlivnitelnou progresí, nádor rychle roste a časně metastazuje - především do kostí, kostní dřev, mízních uzlin a u nejmenších dětí do kůže a jater (VAN NOESEL *et al.* 2005). V době stanovení diagnózy mají dvě třetiny pacientů metastázy, které jsou mnohdy prvním příznakem (WEINSTEIN *et al.* 2003). U vysoce maligní formy se dosud významněji nepodařilo zlepšit přežití pacientů i když do léčebných schémat byla zařazena řada nových postupů včetně megachemoterapie s následnou autologní transplantací hematopoetických progenitorových buněk (BRODEUR a MATIS 2002).

V experimentální onkologii je využíváno několik myších modelů neuroblastomu. Syngenní modely jsou nezbytné hlavně pro možnost sledování protinádorové imunity, což xenotransplatace imunodeficitním zvířatům neumožňují (LODE *et al.* 1998). Naše

pracoviště používá k experimentům buněčnou linii NXS2. Jedná se o myší hybridní neuroblastomovou buněčnou linii, vytvořenou fúzí myší neuroblastomové linie s myšími ganglionálními buňkami zadních kořenů míšních. Tato hybridní buněčná linie exprimuje MHC třídy I syngenní k A/J myši a GD₂ (LODE *et al.* 1997). Buněčnou linii UKF-NB4 odvozenou od lidského vysoce rizikového neuroblastomu a buněčnou linii NXS2 – model myšího neuroblastomu ukazují obrázky 3a a 3b.



Obr 3a: Buněčná linie odvozená od lidského neuroblastomu.



Obr 3b: Buněčná linie NXS2

3. MATERIÁL A METODIKA

3.1. Vzorky

K dispozici jsem měl vzorky lidské krve, lidské kostní dřeně, izolované lymfocyty, neuroblastomovou linii, buněčnou linii odvozenou od Ewingova sarkomu, vzorky tkání nejčastěji používaných laboratorních zvířat - myši, laboratorního potkana, králíka, opice (*Macacus rhesus*), psa, morčete, tkáně myši, kterým byl transplantován syngenní neuroblastom, mozkové tkáně potkanů z místa vpichu a z místa leze a vzorky kam byly dodány lidské hematopoetické progenitorové buňky i kontrolní vzorky, kam nebyly progenitorové buňky podány.

3.2. Metodika

3.2.1 Izolace RNA

3.2.1.1. Princip: Buňky jsou lyzovány, fenol-chloroformovou extrakcí se separují fáze vodní a organická, z vodní fáze se RNA precipituje isopropylalkoholem.

3.2.1.2. Materiál:

chemikálie: TRIZOL® Reagent (GIBCO BRL), chloroform, isopropylalkohol (Fluka), ethanol 99% (Merck),

roztoky:

1) 0,5M EDTA pH 8,0 ; sterilní:

EDTA.....18,6g

H₂O.....do 80ml

PH upravit pomocí NaOH na 8,0

následně autoklávovat

skladovat při laboratorní teplotě

2) 10x TBE á 500ml:

TRIS.....54g

Kyselina boritá27,5g

0,5M EDTA pH 8,0.....20ml

destilovaná H₂O.....doplnit do 500ml

skladovat při laboratorní teplotě

spotřební materiál: špičky (1000µl, 200µl, 10µl), mikrocentrifugační
zkumavky (1,5ml)
(vše sterilizovat v autoklávu)

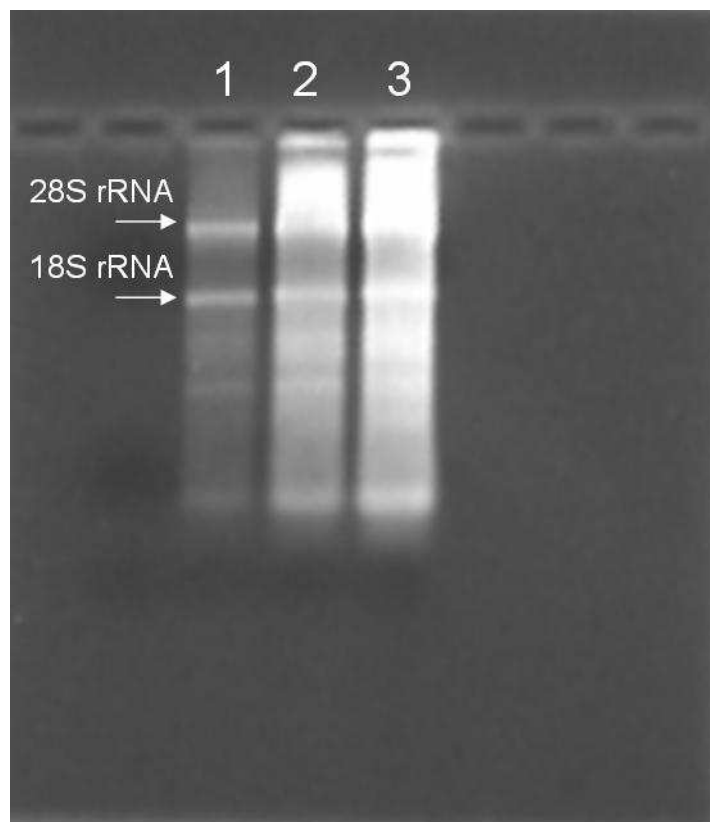
přístroje: vortex, chlazená centrifuga, mikropipety (Eppendorf)

3.2.1.3. Postup: Izolaci celkové RNA jsem provedl modifikovanou metodou podle CHOMCZYNSKÉHO a SACCHIHO (1987). Abych minimalizoval možnost přenosu RNA či cDNA z jednoho vzorku do druhého či kontaminaci vzorků produkty předchozích reakcí, prováděl jsem jednotlivé metody v oddělených prostorech: v místnosti 1 - zpracování buněk a izolace RNA (laminární box), v místnosti 2 - gelová elektroforéza a reverzní transkripce, v místnosti 3 - příprava směsi pro reverzní transkripci a amplifikaci – tzv. master mixu (laminární box), v místnosti 4- přidání RNA do RT směsi a cDNA do amplifikační směsi. V laminárním boxu v místnosti 1 jsem ke 150 µl vzorku přidal

1000 μ l lyzačního činidla Trizol® a za občasného protřepání nechal působit cca 1-1,5 h dokud se tkáň či buňky úplně nerozpadly. Poté jsem přidal 200 μ l chloroformu a protřepával na Vortexu minimálně 15s. Vzorky jsem inkuboval 5 min při pokojové teplotě. Zkumavky jsem poté přenesl do centrifugy předem vychlazené na 4 °C a centrifugoval 15 min při 13500ot/min. Suspenze se rozdělila na 3 fáze: spodní fenol-chloroformovou proteinovou fázi, interfázi obsahující DNA a horní vodní fázi s RNA. Vodní fázi jsem přenesl do sterilní zkumavky a precipitoval RNA přidáním 500 μ l isopropylalkoholu. Vzorky jsem nechal inkubovat 16 min při pokojové teplotě a poté jsem je centrifugoval 20 min při 12000 ot/min. Supernatant jsem slil a po přidání 1ml 70% ethanolu pro promytí RNA pelety jsem centrifugoval dalších 5 min při 12000 ot/min. Po odstranění supernatantu jsem nechal RNA pelety sušit 5 min při pokojové teplotě. Po vysušení jsem pelety rozpustil v 40 μ l sterilní vody ve vodní lázni při 55°C. Z každého vzorku jsem odebral 4 μ l RNA a přidal 6 μ l TBE pufru do sterilní zkumavky a ponechal je na elektroforézu. Zbytek jsem zamrazil při -80°C.

3.2.2. Průkaz přítomnosti RNA metodou gelové elektroforézy.

3.2.2.1. Princip: Nukleové kyseliny migrují díky svému negativnímu náboji v elektrickém poli směrem ke katodě. Rychlost pohybu molekul NK závisí na koncentraci gelu a na velikosti a konformaci nukleové kyseliny. Po obarvení gelu se vzorky ethidium bromidem je možné RNA vizualizovat pod UV zářičem. Hodnotíme přítomnost dvou pruhů rRNA viz obr 4



Obr 4: Elektroforéza RNA- patrné jsou dva pruhy rRNA.

3.2.2.2. Materiál:

Roztoky: 1) TBE pufr 10x koncentrovaný:

Tris.....54,0g

H₃BO₃.....27,5g

EDTA pH 8,0.....20ml

Doplnit do 500ml.....dest H₂O

Uchovávat při +4°C

2) PBS pufr:

NaCl.....8,0g

KCl.....0,2g

Na₂HPO₄ krystal.....2,16g

H₂O.....ad 1000ml

pH 7,2-7,4

3) Agarosa (GIBCO BRL, Life technologies) Ultrapure

vlhkost...< 10,1%

sulfát.....< 0,351%

skladovat v temnu u suchu

4) Ethidium bromid

Přístroje: digitální váhy (Scaltec), mikrovlnná trouba, aparatura pro

horizontální elektroforézu Bio-Rad Power Pac 300 s nádobou

Mini-sub® cell GT, mikropipety, transiluminátor s možností

fotodokumentace

3.2.2.3. Postup: Elektroforézu jsem prováděl v místnosti 2 (viz.3.2.1.3.). Navážil jsem si 0,3g agarosu a 20ml TBE pufru, směs rozvařil a nalil na nosič gelu, vložil hřeben a nechal 30 min ztuhnout. Nosič jsem vložil do elektroforetické vany naplněné TBE tak, aby jamky pro vzorky jím byly převrstvené. 10 μ l vzorku jsem smíchal s 3 μ l vkládacího pufru a 11 μ l směsi nanesl na gel. Vzorky jsem separoval cca 15 min při 70V. Gel jsem barvil 15 min v roztoku ethidium bromidu. Po opláchnutí vodou jsem analyzoval přítomnost RNA na transiluminátoru pod UV s využitím softwaru.

3.2.3. Převod RNA na cDNA metodou reverzní transkripce.

3.2.3.1. Princip: Při reverzní transkripci se obvykle vychází z mRNA, podle které se připraví řetězec cDNA (komplementární DNA) pomocí RNA dependentní DNA polymerázy. S využitím náhodných krátkých primerů vzniká hybridní molekula DNAxRNA. RNA lze odstranit od DNA denurací při zvýšené teplotě.

3.2.3.2. Materiál:

- 10x koncentrovaný PCR pufr
- 25 mM MgCl₂ (finální koncentrace 5,5mM)
- dNTP mix (500 μ M per dNTP)
- Random Hexamers (2,5 μ M)
- RNase Inhibitor (0,4 U/ μ l)
- MuLV reverzní transkriptasa (3U/ μ l)
- RNase free H₂O
- led

Spotřební materiál: mikrozkušavky pro PCR, špičky (sterilizované v autoklávu)

Přístroje: mikropipety, cykler GeneAmp Systém 2400 (Perkin Elmer)

3.2.3.3.Postup: V místnosti 3 (viz.3.2.1.3.) jsem si připravil v laminárním boxu směs pro reverzní transkripci – tzv. master mix. Reagencie jsem pipetoval do sterilní zkumavky (1,5ml) umístěné ve stojánku na ledu a doplnil sterilní vodou na požadovaný objem (viz.tabulka 2). Směs pro reverzní transkripci jsem rozplnil do sterilních PCR mikrozkušavek po 17 μ l.

V místnosti 4 jsem ke směsi přidal 3 μ l izolované RNA naředěné na výsledné množství cca 0,2- 0,5 μ g ve 3 μ l. Do každého pokusu jsem zařadil negativní kontrolu (místo 3 μ l RNA stejné množství sterilní vody) a pozitivní kontrolu (3 μ l leukocytů) .

Reverzní transkripce probíhala v místnosti 2, kde jsem mikrozkušavky se vzorky vložil do cykleru a zadal program pro konkrétní pokus:

- Podmínky amplifikace:
1. 10min/25°C (denaturace a annealing připojení náhodných primerů)
 2. 60min/37°C (enzymatická syntéza DNA podle RNA)
 3. 5min/95°C (odstranění RNA z DNAXRNA hybridu denaturací při vysoké teplotě)
 4. 4°C (zastavení reakce)

Po provedené transkripci jsem cDNA použil do PCR a nebo krátkodobě uchovával při 4°C.

Složka	Objem 1 vzorek [μl]	Objem 8 vzorků [μl]
25mM MgCl ₂	4	32
RT PCR Buffer	2	16
dNTP (10mM)	8	64
RNAase inhib (20U/μl)	1	8
Random hexamers (50 uM)	1	8
MuLV Reverse Transcriptase (50U/μl)	1	8
Mezísoučet	17	136
RNA vzorek	3	24 (21 RNA+3H ₂ O*)
Celkový objem	17	150

Tabulka 2. Reakční směs pro 8 vzorků (RT)

* H₂O jako negativní kontrola

3.2.4. Izolace DNA ze zvířecí tkáně (myší linie)

Princip: Buňky jsou tráveny Proteinázou K. Po vysrážení proteinů je DNA vysrážena v izopropanolu.

3.2.4.1. Izolace DNA pomocí QIAGEN Genomic DNA Purification Kit

3.2.4.1.1. Materiál QIAGEN Genomic-tip 20/G

QIAGEN Genomic-tip 100/G

QIAGEN Genomic-tip 500/G

QBT pufr

NaCl.....43.85g

MOPS.....10.46g

Destilovaná voda.....800 ml

pH upravit pomocí NaOH na 7.0

přidat 150ml izopropanolu a 15 ml 10% roztoku Triton X-100

Destilovanou vodou doplnit objem na 1 litr

QC pufr

NaCl.....58.44g

MOPS.....10.46g

Destilovaná voda.....800 ml

pH upravit pomocí NaOH na 7.0

přidat 150ml izopropanolu.

Destilovanou vodou doplnit objem na 1 litr

QF pufr

NaCl.....73.05g

Tris.....6.06g

Destilovaná voda.....800 ml

pH upravit pomocí HCl na 8.5

přidat 150ml izopropanolu.

Destilovanou vodou doplnit objem na 1 litr

Destilovaná voda

Izopropanol

70% ethanol

QIAGEN Proteáza a Proteináza K

3.2.4.1.2. Postup: K buněčné linii jsem přidal 25 μ l (95 μ l, 200 μ l) QIAGEN Proteázy nebo Proteinázy K a inkuboval při 50°C 60 min. Pokud jsem izoloval z tkáně, přidával jsem 0.1 ml (0.5ml, 1.0 ml) QIAGEN Proteasy nebo Proteinázy K a inkubace trvala 2 hodiny i déle až do úplného natrávení. Vyrovnal jsem QIAGEN Genomic-tip 20/G (100/G, 500/G) pomocí 2 ml (4 ml, 10 ml) pufrem QBT a nechal ho prokapat skrz QIAGEN Genomic-tip. Vzorek jsem protřepal 10 sekund a aplikoval do vyrovnaného QIAGEN Genomic-tip, který jsem po protečení promyl 3 x 1 ml (2 x 7.5 ml, 2 x 15 ml) pufrem QC. Vyměnil jsem nádobky pod QIAGEN Genomic-tip a vyplavil DNA 2 x 1 ml (1 x 5, 1 x 15) pufrem QF. DNA jsem vysrážel přidáním 1.4 ml (3.5ml, 10.5 ml) izopropanolu do vyplavené DNA. Pokud bylo vlákno viditelné, přenesl jsem ho do zkumavky, pokud ne, centrifugoval jsem DNA při 5000 ot a teplotě 4°C 15 minut. Slil jsem supernatant. Centrifugovanou DNA jsem pak promyl 1 ml (2ml, 4 ml) chladným 70% ethanolem, protřepal a opět centrifugoval při 5000 ot. a teplotě 4°C 10 min. Slil jsem supernatant. Peletu jsem sušil na vzduchu 5 – 10 minut a po vyschnutí ethanolu přidal 100 μ l (podle velikosti pelety) destilované vody. DNA jsem rozpouštěl na třepačce při 55°C 1 hodinu a pak přes noc při laboratorní teplotě. Kvalitu a koncentraci izolované DNA jsme kontrolovali spektrofotometricky na přístroji Biomate 3.

3.2.4.2. Izolace DNA pomocí Wizard Genomic DNA Purification Kit

- 3.2.4.2.1. Materiál
- 1.5 ml mikrocentrifugační zkumavky
 - 15 ml centrifugační zkumavky
 - malý tkáňový homogenizér (Fischer Tissue Tearor, Cat.#15-338-55)
 - trypsin (pouze pro přisedle rostoucí tkáňové buněčné kultury)
 - PBS
 - vodní lázeň, 37°C
 - izopropanol pokojové teploty
 - 70% ethanol pokojové teploty
 - vodní lázeň, 65°C (volitelné; pro rychlé uschnutí DNA)
 - 0.5M EDTA (pH 8.0) (pro myší linii)
 - Proteináza K (20mg/ml ve vodě; Promega Cat.# V3021)

3.2.4.3.2. Postup

Pro každý zpracovávaný vzorek jsem přidal 120 µl 0.5M EDTA roztoku (pH 8.0) k 500 µl jaderného lyzačního roztoku v centrifugační zkumavce. Přidal jsem 0.5-1 cm čerstvé nebo rozmražené myší linie nebo tkáň do 1.5 ml mikrocentrifugační zkumavky. Pak jsem přidal 600 µl EDTA/jaderný lyzační roztok do zkumavky. Následovalo přidání 17.5 µl 20mg/ml Proteinázy K. Inkuboval jsem přes noc při 55°C s mírným třepáním. Strávení vzorku jsem napomáhal občasným třepáním. Přidal jsem 3 µl RNAase roztoku k jadernému lyzátu a mixoval vzorek 2-5 krát invertováním zkumavky. Inkuboval jsem směs 15-30 minut při 37°C. Nechal jsem vzorek zchladnout na pokojovou teplotu 5 minut před pokračováním. Přidal jsem 200 µl činidla srážícího proteiny a vortexoval důkladně při vysoké rychlosti 20 sekund. 5 minut jsem pak vzorek chladil na ledu. Centrifugoval jsem 4 minuty při 13,000-16,000 ot /min. Sražené proteiny vytvoří pevnou bílou peletu. Pečlivě jsem přenesl supernatant

obsahující DNA a přenesl do čisté 1.5ml mikrocentrifugační zkumavky obsahující 600 µl izopropanolu v pokojové teplotě. Abych předešel možné kontaminaci, nechával jsem ve zkumavce malé množství supernatantu. Mírně jsem mixoval roztok převrácením dokud nebylo viditelné bílé vlákno DNA. Následovala centrifugace 1 minutu při 13,000-16,000 ot/min při pokojové teplotě. DNA byla viditelná jako malá bílá peleta. Pečlivě jsem slil supernatant. Přidal jsem 600 µl 70% ethanolu z pokojové teploty a několikrát mírně převracel zkumavku k promytí DNA. Centrifugoval jsem 1 minutu při 13,000-16,000 ot/min při pokojové teplotě. Pečlivě jsem odsál ethanol pipetou. Převrátil jsem zkumavku na čistý savý papír a sušil na vzduchu 10-15 minut. Přidal jsem 100 µl DNA rozpouštěcího roztoku a rozpouštěl DNA inkubací při 35°C 1 hodinu a dále přes noc při pokojové teplotě. DNA jsem uskladnil při 2-8°C. Kvalitu a koncentraci izolované DNA jsme kontrolovali spektrofotometricky na přístroji Biomate 3.

3.2.5. Detekce cílové lidské sekvence ve zvířecí tkáni metodou polymerázové řetězové reakce

3.2.5.1. Princip Polymerázová řetězová reakce umožňuje mnohonásobné pomnožení specifických úseků zkoumané DNA o velikosti několika stovek až tisíců bazí. Podstatou této reakce je opakovaná enzymatická syntéza DNA v cyklické reakci o třech fázích: v první fázi je dvouvláknová DNA denaturována, ve druhé fázi hybridizuje s primery (oligonukleotidové- 18 až 28 nukleotidů-sondy, které specificky hybridizují pouze na obou stranách cílového úseku DNA) a ve třetí probíhá syntéza dvou řetězců DNA komplementárních ke sledovaným úsekům. Syntézu katalyzují termostabilní DNA polymerázy.

3.2.5.2.Materiál MgCl₂ (2 mM)
 10 x PCR Buffer II
 dNTP mix
 dva primery (250 nM)
 Taq GOLD DNA polymeráza (Perkin Elmer)
 destilovaná voda
 led

spotřební materiál: špičky (1000μl, 200μl, 10μl), mikrocentrifugační
 zkumavky (1,5ml), zkumavky pro PCR
 (vše sterilizovat v autoklávu)

přístroje: vortex, mikropipety (Eppendorf), cykler GeneAmp Systém
 2400 (Perkin Elmer)

3.2.5.3.Postup

V místnosti 3 (viz.3.2.1.3.) jsem si připravil v laminárním boxu směs pro PCR. Reagencie jsem pipetoval do sterilní zkumavky (1,5ml) umístěné ve stojánku na ledu a doplnil sterilní vodou na požadovaný objem (viz.tabulka 2). Směs pro PCR jsem rozplnil do sterilních PCR mikrozkuvek po 24μl.

V místnosti 4 jsem ke směsi přidal 1μl izolátu DNA. Do každého pokusu jsem zařadil negativní kontrolu (místo 1μl DNA stejné množství sterilní vody) a pozitivní kontrolu (1 μl leukocytů) .

PCR probíhala v místnosti 2, kde jsem mikrozkuvky se vzorky vložil do cykleru a zadal program pro konkrétní reakci:

Podmínky amplifikace: 0. 10min/95°C (denaturace veškeré přítomné DNA)

Cykly (35x)

1. 1min/95°C (denaturace DNA)

2. 1min/56°C (annealing připojení primerů)

3. 1min/72°C (enzymatická syntéza DNA)

4. 10min/72°C (kompletní dosyntetizování řetězců)

5. 4°C (zastavení reakce)

Po provedené amplifikaci jsem vzorky přechovával krátkodobě (do 15 hodin) v teplotě 4°C a nebo je okamžitě po skončení amplifikace použil ke gelové elektroforéze.

Složka	objem 1 vzorek [μ l]	Objem 8 vzorků [μ l]	2 x objem 8 vzorků [μ l]
MgCl ₂	2	16	32
10xPCR Buffer II	2.5	20	40
dNTP mix	2	16	32
Primery	2 x 0.25	2x2	2 x 4
Taq GOLD DNA polymeráza	0.125	1	2
H ₂ O	16.875	135	270
Mezisoučet	24	192	384
DNA vzorek	1	8 (7x1 + 1 H ₂ O*)	16 (7x2+2 H ₂ O*)
celkový objem	25	200	400

Tabulka 3: Reakční směs pro 8 vzorků v základním a dvojitém objemu

* H₂O jako negativní kontrola

3.2.5. Průkaz přítomnosti DNA metodou gelové elektroforézy.

3.2.5.1. *Princip:* Nukleové kyseliny migrují díky svému negativnímu náboji v elektrickém poli směrem ke katodě. Rychlost pohybu molekul NK závisí na koncentraci gelu a na velikosti a konformaci nukleové kyseliny. Po obarvení gelu se vzorky ethidium bromidem je možné DNA vizualizovat pod UV zářičem.

3.2.5.2. *Materiál:*

Roztoky: 1) TBE pufr 10x koncentrovaný:

Tris.....54,0g

H₃BO₃.....27,5g

EDTA pH 8,0.....20ml

Doplnit do 500ml.....dest H₂O

Uchovávat při +4°C

5) PBS pufr:

NaCl.....8,0g

KCl.....0,2g

Na₂HPO₄ krystal.....2,16g

H₂O.....ad 1000ml

pH 7,2-7,4

6) Agarosa (GIBCO BRL, Life technologies) Ultrapure

vlhkost...< 10,1%

sulfát.....< 0,351%

skladovat v temnu u suchu

7) Ethidium bromid

Přístroje: digitální váhy (Scaltec), mikrovlnná trouba, aparatura pro horizontální elektroforézu Bio-Rad Power Pac 300 s nádobou Mini-sub® cell GT, mikropipety, Gel- Doc transiluminátor s možností fotodokumentace a s počítačovým zpracováním

3.2.5.3.Postup:

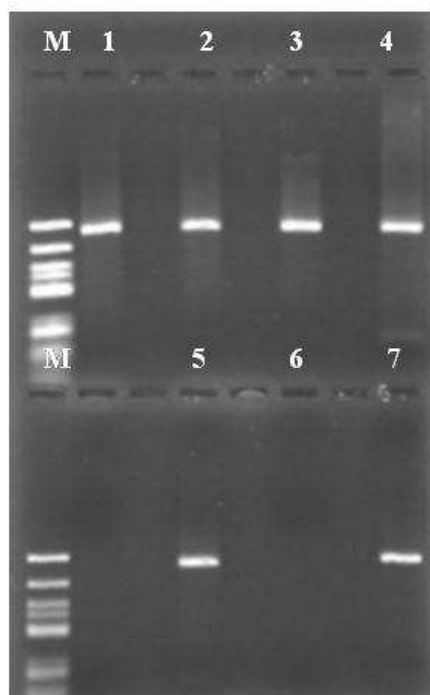
Elektroforézu jsem prováděl v místnosti 2 (viz.3.2.1.3.). Navážil jsem si 0,3g agarosy a 20ml TBE pufru, směs rozvařil a směs nalil na nosič gelu pak jsem vložil hřeben a nechal ztuhnout 30 min. Nosič jsem vložil do elektroforetické vany naplněné TBE tak, aby jamky pro vzorky jím byly převrstvené. 25 μ l vzorku jsem smíchal s 20 μ l vkladacího pufru a 15 μ l směsi nanesl na gel. Vzorky jsem separoval cca 35 min při 70 V. Gel jsem barvil 45 min v roztoku ethidium bromidu. Po opláchnutí vodou jsem analyzoval přítomnost DNA na transiluminátoru pod UV s využitím softwaru.

4. VÝSLEDKY

4.1. Metoda PCR amplifikující lidskou specifickou sekvencí

4.1.1. Optimalizace metody

Metoda detekce lidské specifické sekvence je založena na opakované enzymatické syntéze 850 bp dlouhé sekvence, vyskytující se pouze na α satelitu lidského 17. chromozomu. K optimalizaci metody jsem používal DNA vyizolovanou z lidské tkáně nebo buněčných linií odvozených od různých lidských nádorů. Použil jsem vzorky: IARC (linie odvozená od Ewingova sarkomu), DR 1 (leukocyty lidské kostní dřeně zdravého dobrovolníka), DR 2 (leukocyty lidské kostní dřeně od pacienta s podezřením na leukemii, která se neprokázala), F VCR (lidská neuroblastomová linie), DR 38 (lidská neuroblastomová linie) a lidské leukocyty z periferní krve zdravého dobrovolníka. Výsledky PCR ukazuje obrázek 5

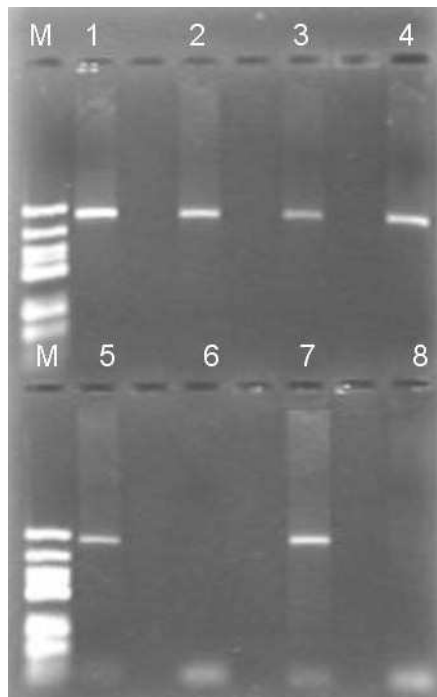


Obr 5: Očekávané potvrzení přítomnosti lidské sekvence v lidských vzorcích

Vysvětlivky: M = marker (velikostní standart), 1 - IARC (linie odvozená z Ewingova sarkomu), 2 – DR1 (leukocyty lidské kostní dřeně), 3 – DR2 (leukocyty lidské kostní dřeně), 4 – F VCM (lidská neuroblastomová linie), 5 – DR38 (lidská neuroblastomová linie), 6 – negativní kontrola (PCR voda), 7 – pozitivní kontrola (lidské leukocyty periferní krve)

4.1.2. Testování citlivosti metody

Naším cílem bylo zjistit i otestovat citlivost metody. K testu citlivosti jsem použil tzv. diluční test (BECKER *et al.* 2002) (Obr , kdy jsem v konstantním objemu přenášel lidské leukocyty do koncentráту buněk myší linie. Postupně docházelo k snižování koncentrace z původní 1 : 1, na 1 : 10, 1 : 100 atd. Z jednotlivých koncentrací jsem vyizoloval DNA a v ní pak pomocí PCR hledal lidský specifický úsek. Výsledky PCR reakce ukazuje obr 6. Diluční test ukazuje, že jsme schopni detekovat 1 lidskou buňku mezi 10^5 .

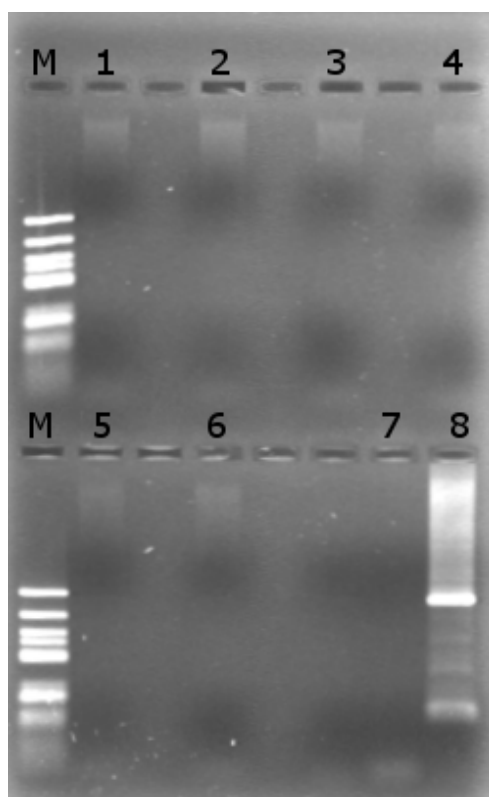


Obr 6: Potvrzení očekávané citlivosti 1:10 000

Vysvětlivky: M = marker (velikostní standart), 1 - koncentrace 1 : 10, 2 – koncentrace 1 : 100, 3 – koncentrace 1 : 1 000, 4 – koncentrace 1 : 10 000, 5 – koncentrace 1: 100 000, 6 – koncentrace 1 : 1 000 000, 7 – pozitivní kontrola (lidské leukocyty), 8 – negativní kontrola (PCR voda)

4.1.3. Testování funkčnosti metody

Testování funkčnosti metody jsem prováděl na DNA izolované ze zvířat nejčastěji používaných k laboratornímu výzkumu. Měl jsem k dispozici vzorky tkání králíka, laboratorního potkana, myši, opice (*Macacus rhesus*), psa a morčete. Prokázali jsme, že PCR amplifikující α satelit lidského 17. chromozomu neamplifikuje žádné jiné sekvence DNA výše uvedených živočišných druhů a lze jí proto využít k průkazu lidských xenograftů na těchto modelových organizmech.



Obr 7: Detekce lidské DNA ve zvířatech

Vysvětlivky: M = marker (velikostní standart), 1 – králík, 2 – laboratorní potkan, 3 – myš, 4 – opice, 5 – pes, 6 – morče, 7 – negativní kontrola (PCR voda), 8 – pozitivní kontrola (lidské leukocyty)

4.1.4. Detekce přítomnosti lidské DNA v myších mozcích

Buňky byly separovány z lidských PBPC a koncentrovány prostřednictvím imunomagnetické selekce použitím CliniMACS systému (Miltenyi). Stejný systém se používá i pro zpracování štěpů hematopoetických progenitorových buněk (kostní dřeň nebo periferní progenitorové buňky) v klinické praxi. Mikrokuličky Microbeads byly navázány na buněčný povrch přes komplexy antigen/protilátka. Tyto buňky byly injikovány do hemisféry myším, kterým byla vyvolána fotochemická léze v druhostrané

hemisféře s cílem prokázat jejich migraci do místa leze. K sledování osudu implantovaných buněk bylo využito několik metod – MRI, imunohistochemie a PCR. Na obrázcích z magnetické rezonance mozku s fotochemickou lézí a kontralaterálně injektovanými buňkami byly buněčné implantáty čistě viditelné 24 hodin po injekci jako slabě intenzivní oblast u místa injekce. Slabá intenzita implantátu se mírně snižovala během prvního týdne a pak zůstala bez podstatných změn pro celou dobu měření. Během druhého týdne byl pozorován slabě intenzivní signál v lézi, který přetrvával další dva týdny. Čtyři týdny po implantaci ukázalo histologické barvení pruskou modří pozitivní signál potvrzující přítomnost magneticky značených lidských buněk v lézi. Mnoho značených buněk bylo také detekováno v corpus callosum, představující migraci z kontralaterální hemisféry směrem k lézi.

Z důvodu nezvrtného potvrzení přítomnosti lidských buněk byly části mozkové tkáně z místa vpichu, z místa leze testovány použitím PCR k detekci pro člověka specifického 850 párů bází dlouhého fragmentu alfa satelitu DNA z lidského chromosomu 17. Lidská DNA byla detekována v mozkové části z místa vpichu pouze ve zvířatech zabitych 2 týdny po transplantaci, ačkoli v části z místa leze byla lidská DNA detekována ve zvířatech dva, stejně tak jako čtyři týdny po transplantaci. Ve zvířatech bez transplantace nebyla lidská DNA detekována.

V současnosti je dokončen nový experiment, kde jsme opět detekovali lidské progenitorové buňky v místech vpichu časně po aplikaci a později v místech léze. V současné době provádíme jeho vyhodnocení a interpretaci výsledků.

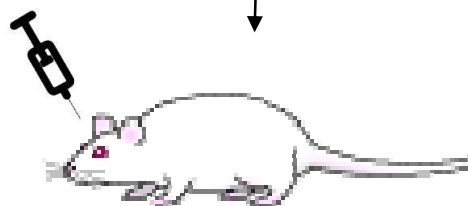


**Imunomagnetická
purifikace CD34⁺
buněk**

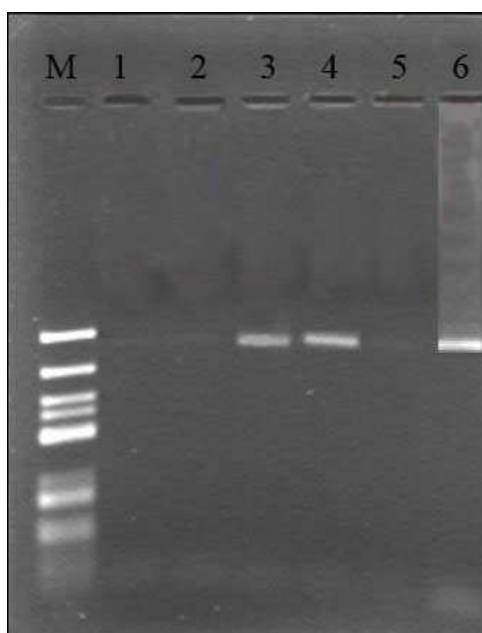
Fotochemická leze



Progenitorové buňky



Obr 8: Uspořádání experimentu



Obr 9: Potvrzení přítomnosti lidské DNA v hlodavčích mozcích

Vysvětlivky: M = marker (velikostní standart), 1 – negativní kontrola (PCR voda), 2 – leze kontrola, 3 – leze, 4 – vpich, 5 – vpich kontrola, 6 – pozitivní kontrola (lidské leukocyty)

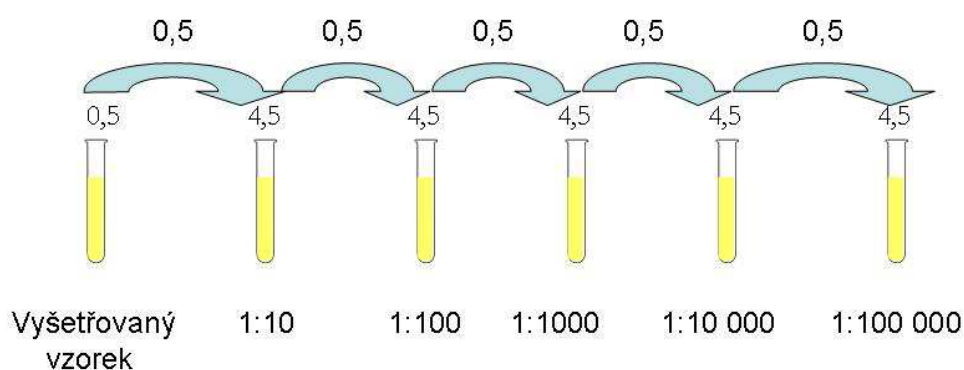
4.2. Metoda RT-PCR k detekci myší tyrozin hydroxylázy

4.2.1. Optimalizace metody

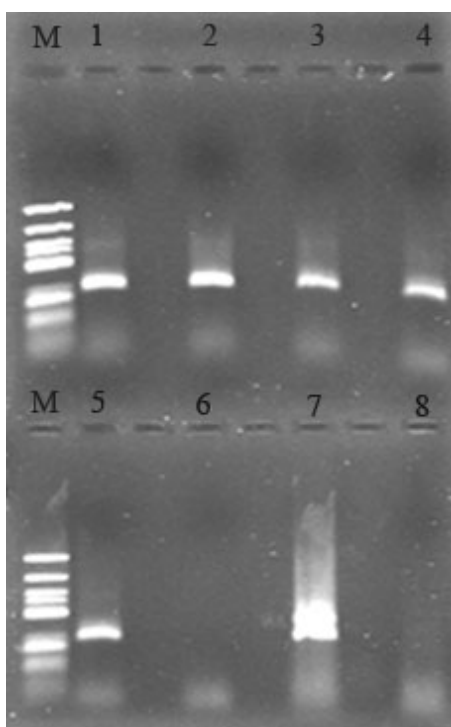
Metoda detekce myší tyrozin hydroxylázy je založena na průkazu mRNA genu pro myší tyrozin hydroxylázu vyskytující se v buňkách NBL. Tyrozin hydroxyláza je enzym podílející se na syntéze katecholaminů. Na detekci myší tyrozin hydroxylázy je nutné používat jiné primery než na lidskou, protože zde není mezidruhová homologie. Z neuroblastomové linie jsem vyizoloval RNA, metodou reverzní transkripce převedl na cDNA a v té pak hledal sekvenci genu pro tyrozin hydroxylázu.

4.2.2. Testování citlivosti metody

Citlivost metody jsme opět ověřili dilučním testem. Jako vyšetřovaný vzorek jsme přenášeli buňky myšího NBL do koncentrátu leukocytů lidské kostní dřeně. Z jednotlivých koncentrací buněk jsem vyizoloval RNA a metodou RT-PCR získal produkt. Výsledky PCR reakce zobrazuje obr 11. Diluční test ukazuje, že jsme schopni detekovat 1 lidskou buňku mezi 10^5 .



Obr 10: Schéma dilučního testu



Obr 11: Diluční test potvrzující citlivost 1 : 100 000

vysvětlivky: M = marker (velikostní standart) , 1 – koncentrace 1 : 10, 2 - koncentrace 1 : 100, 3 - koncentrace 1 : 1 000, 4 - koncentrace 1 : 10 000, 5 – koncentrace 1 : 100 000, 6 – negativní kontrola (lidské lymfocyty), 7 – pozitivní kontrola (myší NBL), 8 – negativní kontrola (PCR voda)

5. DISKUZE

Detekce lidské specifické sekvence

V experimentální medicíně jsou zaváděny metody umožňující prokázat přítomnost minimálního množství buněk odlišných od hostitelské tkáně. I u nás v laboratoři jsme se zaměřili na detekci xenotransplantátů. Častým úkolem je detekování lidských buněk xenotransplantovaných zvířeti. Pro testování metody jsme použili tkáně zvířat často využívaných v xenotransplantacích. Metodu jsme nejdříve optimalizovali použitím gradientového termocykleru, kdy jsme hledali optimální anealingovou teplotu pro hybridizaci primerů k sekvenci alfa satelitní DNA 17. chromozomu. Po optimalizování jsme testovali citlivost metody dilučním testem. Tento test je standartně využíván k hodnocení citlivosti metod v molekulární biologii a imunologii (CAMPANA *et al.* 1992). Podařilo se nám prokázat citlivost 1 : 100 000, což ještě o řád překračuje obecně udávanou citlivost metody 1 : 10 000 (BURCHILL *et al.* 2001). Otázkou je, zda by se zvýšením objemu reakce nezdařilo ještě dále zvýšit citlivost.

Pro potvrzení funkčnosti metody jsme provedli testování vybraných lidských vzorků, představující různorodou skupinu složenou ze zdravé lidské kostní dřeně, ale i z tkání nebo buněčných linií odvozených od maligních nádorů. Ve všech případech bylo potvrzeno nalezení lidské specifické sekvence a potvrzení funkčnosti metody detekující lidskou specifickou sekvenci tak, jak ji navrhl a otestoval BECKER (2002). Přesto se domníváme, že zvláště u xenotransplantátů lidských nádorů je nezbytné ověřit přítomnost této sekvence pro každý nádor zvlášť. Jako první jsme otestovali většinu laboratorních zvířat používaných v laboratorním výzkumu (opice, pes, králík, laboratorní potkan, morče, myš) což dosud nebylo s výjimkou myši v literatuře uvedeno (BECKER *et al.* 2002). V tkáních žádného z těchto zvířat nebyla prokázána přítomnost lidské specifické sekvence alfa satelitní DNA 17. chromozomu. Proto se domníváme, že tato metoda je využitelná ke sledování xenotransplantátů u všech výše uvedených laboratorních zvířat. Při použití jiných laboratorních zvířat by však bylo

předem nutné otestovat zda vyšetřovaná sekvence alfa satelitní DNA 17. chromozomu není přítomna i u sledovaného živočišného druhu, i když to vzhledem k nepřítomnosti této sekvence u šesti živočišných druhů včetně opice nepovažujeme za příliš pravděpodobné.

Naším posledním cílem bylo nejen metodu zavést a otestovat její funkčnost na laboratorních zvířatech a vybraných lidských vzorcích, ale také pokusit se nalézt její možné uplatnění v konkrétním výzkumu. Ve spolupráci s RNDr. Jendelovou, PhD z Ústavu neurověd UK 2.LF jsme se zaměřili na sledování lidských CD34⁺ kmenových buněk implantovaných do hlodavčích mozků s cílem posoudit jejich migraci do ložiska fotochemické léze.

Sledování lidských CD34⁺ buněk

V experimentu jsme ukázali, že technika zobrazení magnetickou rezonancí, imunohistochemie a PCR mohou být použity k monitorování osudu transplantovaných kmenových buněk v hostitelském organismu. V předešlých studiích byly monitorovány kmenové buňky kostní dřeně a myší embryonální kmenové buňky značené kontrastním činidlem Entoderm transplantovaných do hlodavců s mozkovým nebo míšním poraněním (JENDELOVÁ 2003, JENDELOVÁ *et al.* 2004). Podobně, několik jiných výzkumných skupin oznámilo, že je možné zobrazit magneticky značené buňky v mozku nebo míše po transplantaci (BULTE *et al.* 1999, 2002, FRANKLIN *et al.* 1999, HOEHN *et al.* 2002, LEE *et al.* 2004). Microbeads použité pro imunomagnetickou separaci zůstanou po selekci navázány na povrch buňky. Takto selektované buňky byly bezpečně transplantovány pacientům s různými hlavně hematologickými onemocněními (HANDGRETINGER *et al.* 2001, 2002). V naší studii jsme potvrdili, že mikročástice mohou být použity jako magnetické značení. Dále jsme potvrdili, že mikročástice prokazují dostatečný MR kontrast, ačkoli průměrný obsah železa na buňku byl v řádové hodnotě nižší, než v případě buněčného značení použitím jiných kontrastních činidel, které vstupují do buňky. Data získaná z MR dobře odpovídají histologickým nálezům a výsledkům PCR.

Alternativní zdroje kmenových buněk mohou mít praktické výhody ve srovnání s embryonálními kmenovými buňkami a byly navrženy pro užití v autologních

transplantacích. Hematopoetické progenitorové buňky charakterizované přítomností CD34 antigenu jsou ve středu zájmu v současnosti probíhajících výzkumů (WEISSMAN 2000, GOOLSBY *et al.* 2003). Tyto buňky mají kapacitu pro rozsáhlou sebeobnovu a pluripotentní diferenciaci a jsou používány léčebně k zajištění dlouhodobé obnovy kostní dřeně u lidských pacientů (AGUILA *et al.* 1997). V současné době se uvažuje o jejich léčebném využití i mimo oblast hematologie (HAMANO *et al.* 2001, TAGUCHI *et al.* 2003). V současné době probíhá v České republice klinická studie zaměřená na regionální autologní transplantaci HPCs pacientům s poškozením míchy (SYKOVÁ, osobní sdělení). Tato studie byla zahájena na základě předchozích kasuistických zkušeností (VALBONESI *et al.* 2004).

Lidské CD34⁺ buňky mohou být jednoduše získány z pupečnickové krve při narození a z periferní krve po uvolnění cytokinů. V naší studii jsme transplantovali lidské CD34⁺ progenitorové buňky do hlodavčích mozků s lézí. U místa vpichu byly buňky detekovány pouze 10 dnů po transplantaci. Žádné buňky nebyly nalezeny v dráze jehly čtyři týdny po transplantaci. Tyto buňky putovaly do léze a subventrikulární zóny, kde přežívaly přinejmenším jeden měsíc. Naše výsledky jsou v souladu s nálezem ASHEUERA (2004), který zjistil putování lidských CD34⁺ buněk do mozku po infúzi CD34⁺ buněk myším se SCID. GOOLSBY (2003) prokázal lidské CD34⁺ buňky šest měsíců po implantaci do dospělého myšního mozku. TAGUCHI (2004), který nitrožilně aplikoval lidské CD34⁺ buňky myším s fokální mozkovou ischemií, nepozoroval žádnou kolokalizaci transplantovaných CD34⁺ buněk. Naše nálezy, že lidské CD34⁺ buňky přežívaly pouze v lézi a subventrikulární zóně mohou podporovat TAGUCHIHO hypotézu (2004), že CD34⁺ buňky mohou hrát pozitivní roli v neuroregeneraci, budíci neovaskularizaci ischemické zóny a poskytují příznivé prostředí pro neurogenezu. Zvířecí studie naznačují, že transplantace kmenových buněk může být využita v terapii lézí centrálního systému.

Detekce myší tyrozin hydroxylázy

Druhou oblastí našeho zájmu byla detekce minimální nádorové choroby v modelu myšního neuroblastomu. Tento modelový nádor je využíván v experimentální onkologii pro svojí podobnost s neuroblastomem lidským. Na rozdíl od

xenotransplantátů jsou u syngenních modelů zachovány imunitní mechanismy. Naším úkolem bylo zavést metodu k průkazu myší tyrozin hydroxylázy. Metodu jsme optimalizovali pomocí gradientového termocykleru, kdy jsme hledali optimální anealingovou teplotu pro hybridizaci primerů k cDNA genu pro tyrozin hydroxylázu myšího neuroblastomu. Po optimalizování podmínek metody jsme prověřili citlivost metody. Stejně jako v případě PCR detekující lidskou sekvenci, jsme i tentokrát provedli diluční test. Zjištěná citlivost RT PCR byla naším testem stanovena na 1 : 100 000, což koresponduje s výsledky ostatních autorů pro detekci MRD metodou RT PCR (HAGENBEEK 1992) .

V současnosti probíhá na Klinice dětské hematologie a onkologie pokus s experimentální terapií myšího neuroblastomu zaměřený na průkaz účinnosti kombinace inhibitor histon deacetylázy valproatu a některých cytosatik (ellipticinu a antracyklínu). V nedávných letech byl prokázán protinádorový účinek antiepileptického léku valproatu. Jedním z mechanismů jeho protinádorového účinku je i inhibice histon deacetylázy. Nyní se provádí na řadě pracovišť experimentální i klinické studie s tímto lékem (BLAHETA *et al.* 2005, NORIYUKI *et al.* 2004) V těchto pokusech bude metoda detekce myší tyrozin hydroxylázy pomocí RT PCR využita k průkazu mikrometastáz i k průkazu vitality nádorových buněk v reziduu nádoru po terapii protože RNA vznikajících buňkách je rychle rozštěpena endogeními RNázami.

6. SOUHRN

- 1) Zavedli jsme a optimalizovali metodu detekce DNA sekvence specifické pro člověka umožňující specifický průkaz lidských buněk.
- 2) Jako první jsme tuto metodu otestovali na běžně používaných laboratorních zvířatech s negativním výsledkem (není zkřížená pozitivita).
- 3) Prokázali jsme využitelnost metody detekce lidské specifické sekvence na experimentu s xenotransplantací lidských CD34⁺ hematopoetických progenitorových buněk. Dokázali jsme, že CD34⁺ buňky implantované do mozku migrují do místa leze.
- 4) Zavedli jsme a vyzkoušeli detekci experimentální minimální nádorové choroby na modelu myšího neuroblastomu. Využití této metodiky v experimentech se plánuje do konce tohoto roku.

7. SEZNAM PŘÍLOH

Jendelová P, Herynek V, Urdziková L, Glogarová K, Rahmatová Š, Fales I, Andersson B, Procházka P, Zámečník J, Eckschlager T, Kobylka P, Hájek M, Syková E:

Magnetic resonance tracking of human CD34⁺ progenitor cells separated by means of immunomagnetic selection and transplanted into injured rat brain

Cell Transplant. 2005;14(4):173-82.

Jendelová P, Herynek V, Urdziková L, Glogarová K, Rahmatová Š, Fales I, Andersson B, Procházka P, Zámečník J, Eckschlager T, Kobylka P, Hájek M, Syková E:

MR tracking of human CD34⁺ progenitor cells separated by means of immunomagnetic selection and transplanted into injured rat brain

3. Celostátní konference o genové a buněčné terapii, Praha 3. 12. 2004

8. SEZNAM LITERATURY:

Aguila H. L., Akashi K., Domen J., Gandy K. L., Lagasse E., Mebius R. E., Kortison S. J., Shizuru J., Strober S., Uchida N., Wright D. E., Weissman I. L.: From stem cells to lymphocytes: biology and transplantation. *Immunol Rev.* 157:13-40; 1997

Asheuer M., Pflumio F., Benhamida S., Dubart-Kupperschmitt A., Bouquet F., Imai Y., Auburg P., Cartier N.: Human CD34+ cells differentiate into microglia and express recombinant therapeutic protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:3557-62; 2004

Becker M., Nitsche A., Neumann C., Aumann J., Junghahn I., Fichtner I : Sensitive PCR metod for the detection and real-time quantification of human cells in xentransplantation systems. *Br J Cancer.* 87:1328-35; 2002

Berois N, Varangot M, Osinaga E, Babino A, Caignault L, Muse I, Roseto A.: Detection of rare human breast cancer cells. Comparison of an immunomagnetic separation method with immunocytochemistry and RT-PCR. *Anticancer Res.* Vol. 17: 2639-46; 1997

Blaheta R. A., Michaelis M., Driever P. H., Cinatl J: Evolving anticancer drug valproic acid: Insights into the mechanism and clinical studies. *J Med Res Rev.* 2005 Jan 6; [Epub ahead of print]

Boehringer Mannheim: PCR application manual, Boehringer Mannheim GmbH, Biochemica 194; 1995

Brenner M. K.: Gene transfer to hematopoietic cells. *New Engl J Med,* 335; 337- 339, 1996

Breslov N., Mc Cann B.: Sattistical estimation of prognosis for children with neuroblastoma. *Cancer Res* 21:2098-2103; 1971

Brodeur G. M., Maris J. M.: Neuroblastoma. in. Pizzo PA, Poplack DG (eds.) *Principles and practice of pediatric oncology.* Lippincot, Williams and Wilkins, Philadelphia, 2002

Bulte J. W., Duncan I. D., Frank J. A.: In vivo magnetic resonance tracking of magnetically labeled cells after transplantation. *J Cereb Blood Flow Metab.* 22:899-907; 2002

Bulte J. W., Zhang S. C., van Gelderen P., Herynek V., Jordan E. K., Duncan I. D., Frank J. A.: Neurotransplantation og magnetically labeled oligodendrocyte progenitors: magnetic resonance tracking of cell migration and myelination. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96:15256-15261; 1999

- Burchill S. A., Lewis I. J., Abrams K. R., Riley R., Imeson J., Pearson A. D., Pinkerton R., Selby P.: Circulating neuroblastoma cells detected by reverse transcriptase polymerase chain reaction for tyrosine hydroxylase mRNA are an independent poor prognostic indicator in stage 4 neuroblastoma in children over 1 year. *J Clin Oncol.* Vol. 15;19:1795-801; 2001
- Campana D., Coustan-Smith E. a Behm F.G.: The immunological detection of minimal residual disease in acute leukemia. *Blood*, 76, 163; 1992
- Civin C. I., Gore S. D. Antigenic analysis of hematopoiesis: a review. *J Hematother.* 2:137-44;1993
- Eckschlager T. a McClain K. L.: Comparison of fluorescent in situ hybridization and the polymerase chain reaction for detection of residual neuroblastoma cells. *Neoplasma*, 43,s.301; 1996
- Eckschlager T, Průša R: *Laboratorní vyšetření v onkologii.* Triton, Praha 2002
- Fichtner I., Goan S. R., Becke M., Baldy C, Borgmann A, von Stackelberg A., Henze H.: Transplantation of human haematopoietic or leukaemic cells into NOD/SCID mice. In *Relevance of tumor models for anticancer drug development*, Vol 54, 207-217; 1999
Freiberg
- Franklin R. J., Blaschuk K. L., Bearchell M. C., Prestoz L. L., Setzu A., Brendle K. M., French-Constant, C.: Magnetic resonance imaging of transplanted oligodendrocyte precursors in the rat brain. *Neuroreport.* 10:3961-5; 1999
- Freye C., Benz C. a Liu E.: Detection of amplified oncogenes by differential polymerase chain reaction. *Oncogene*, 4, s.1153; 1989
- Fukuda M, Miyajima Y, Miyashita Y, Horibe K: Disease outcome may be predicted by molecular detection of minimal residual disease in bone marrow in advanced neuroblastoma: A pilot study. *J.Pediatr.Hematol. Oncol.* Vol. 23: 10-13; 2001
- Gerhartz H. H. a Schmetzer H.: Detection of minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 4, s.508; 1990
- Goolsby J, Marty M. C., Heletz D., Chiapelli J., Tashko G., Yarnell D., Fishman P.S., Chin-Jalbut S., Bever C. T. Jr., Pessac B., Trisler D.: Hematopoietic progenitors express neural genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:14926-31; 2003
- Goto S, Umehara S, Gerbing RB,,: Histopathology (International Neuroblastoma Pathology Classification) and MYCN status in patients with peripheral neuroblastic tumors: a report from the Children's Cancer Group. *Cancer*, Vol. 92:2699- 2708; 2001
- Gribben J.G.: Attainment of Molecular Remission: A Worthwhile Goal? *J.Clin.Oncol.*,12,s.1532; 1994

Hamano K., Nishida M., Hirata K., Mikamo A., Li T. S., Harada M., Miura T., Matsuzaki M., Esato K.: Local implantation of autologous bone marrow cells for therapeutic angiogenesis in patients with ischemic heart disease: clinical trial and preliminary results. *Jpn Circ J.* 65:845-7; 2001.

Handgretinger R., Klingebiel T., Lang P., Schumm M., Neu S., Geiselhart A., Bader P., Schlegel P. G., Greil J., Stachem D., Herzog R. J., Niethammer D.: Megadose transplantation of purified peripheral blood CD34(+) progenitor cell from HLA-mismatched parental donors in children. *Bone Marrow Transplant* 27:777-83; 2001

Handgretinger R., Lang P., Ihm K., Schumm M., Geiselhart A., Koscielniak E., Hero B., Klingebiel T., Niethammer D.: Isolation and transplantation of highly purified autologous peripheral CD34(+) progenitor cells: purging efficacy, hematopoietic reconstitution and longterm outcome in children with high-risk neuroblastoma. *Bone Marrow Transplant* 29:731-6; 2002

Hagenbeek A.: Minimal residual disease in leukemia: state of the art 1991. *Leukemia*, 6,s.12; 1992

Helfrich W, ten Poele R, Meersma GJ, Mulder NH, de Vries EG, de Leij L, Smit EF. A quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction-based assay to detect carcinoma cells in peripheral blood. *Br J Cancer.* Vol. 76:29-35; 1997

Hoehn M., Kustermann E., Blunk J., Wiedermann D., Trapp T., Focking M., Arnold H., Hescheler J., Fleischmann B. K., Bábrle C.: monitoring of implanted stem cell migration in vivo: A highly resolved in vivo magnetic resonance imaging investigation of experimental stroke in rat. *Proc Natl Acad Sci USA.* 100:1073-1078; 2002

Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Vol. 15; 88:7276-80; 1991

Hooberman A.L.: The use of the polymerase chain reaction in clinical oncology. *Oncology*, 6, s.25; 1992

Chromczynski P., Sacchi N.: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, 156-159, 1987

Janossy G, Campana D, Amlot PL. Leukaemia and lymphoma treatment with autologous bone marrow transplantation:preclinical studies. *Cancer Detect Prev.* Vol. 12:597-604; 1988

Jendelova P., Imaging the fate of implanted bone marrow stroma cells labeled with superparamagnetic nanoparticles. *Magn Reson Med* 50;2003

Jendelova P., Herynek V., Urdzikova L., Glogarova K., Kroupová J., Bryja V., Andersson B., Burian M., Hájek M., Syková E.: MR tracking of transplanted bone marrow and embryonic stem cells labeled by iron oxide nanoparticles in rat brain and spinal cord. *J Neurosci Res*:in press; 2004

Kasimir-Bauer S., Oberhoff C., Sliwinska K., Neumann R., Schindler A. E., Seeber S.: Evaluation of different methods for the detection of minimal residual disease in blood and bone marrow of patients with primary breast cancer: importance for clinical use? *Breast Cancer Res Treat.* Vol. 69:123-32; 2001

Lang P., Handgretinger R., Niethammer D., Schlegel P. G., Schumm M., Greil J., Bader P., Engel C., Scheel-Walter H., Erich M., Klingebiel T., Ihm K., Geiselhart A., Koscielniak E., Hero B., Neu S., Stachem D., Herzog R. J., Transplantation of highly purified CD34+ progenitor cells from unrelated donors in pediatric leukemia. *Blood* 101:1630-6; 2003

Lee I. H., Bulte J. W., Schweinhardt P., Douglas T., Trifunovski A., Hofstetter C., Olson L., Spenser C.: In vivo magnetic resonance tracking of olfactory ensheathing glia grafted into the rat spinal cord. *Exp Neurol.* 187:509-16; 2004

Lode H. N., Xiang R., Varki N. M., Dolman C. S., Gillies S. D., Reisfeld R. A.: Targeted Interleukin-2 Therapy for Spontaneous Neuroblastoma Metastases to Bone Marrow, *J Natl Cancer Inst.* Vol. 89, No. 21:1586-1594; 1997

Lode H. N., Xiang R., Dreier T., Nissi M., Varki N. M., Gillies S. D., Reisfeld R. A.: Natural Killer Cell-Mediated Eradication of Neuroblastoma Metastases to Bone Marrow by Targeted Interleukin-2 Therapy. *Blood* Vol. 91, No. 5, 1706-1715; 1998

Mattano L., Moss T. J. and Emerson S. G.: Sensitive detection of rare circulating neuroblastoma cells by the reverse transcriptase-polymerase chain reaction, *Cancer Res.*, 52, s.4701; 1992

Miyajima Y., Kato K., Numata S., and kol.: Detection of neuroblastoma cells in bone marrow and peripheral blood at diagnosis by the reverse transcriptase-polymerase chain reaction for tyrosine hydroxylase mRNA, *Cancer*, 75, s.2757; 1995

Mullis K. B; Faloona F. A.: Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*, 155:335-50; 1987

Naito H., Kuzumaki N., Uchino J. and kol.: Detection of tyrosine hydroxylase mRNA and minimal neuroblastoma cells by the reverse transcription-polymerase chain reaction, *Eur. J. Cancer*, 27, s.765; 1991

Noriyuki T Norihiko K Dorina G Jonathan W. S Isao M H. Phillip K Human Ovarian Carcinoma Cells: Histone Deacetylase Inhibitors Exhibit Antiproliferative Activity and Potently Induce Apoptosis *Cancer* 2004;101: 2760–2770

Peter M, Magdelenat H, Michon J, Melot T, Oberlin O, Zucker JM, Thomas G, Delattre O. Sensitive detection of occult Ewing's cells by the reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Br J Cancer.* Vol. 72:96-10; 1995

Saiki R., K., Scharf S., Faloona F., Mullis K. B., Horn G. T., Erlich H. A., Arnheim N.: Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia, *Science*, Vol. 20, 230:1350-4; 1985

Seeger RC, Reynolds P, Gallego R: Quantitative tumor cell content of bone marrow and blood as a predictor of outcome in stage IV neuroblastoma: A Children's Cancer Group study. *J.Clin.Oncol.*, Vol. 18: 4067-4076; 2000

Sumerauer D., Vicha A., Kučerová H., Kavan P., Eckschlager T.: Detection of minimal bone marrow infiltration in patients with localised and metastatic Ewing's sarcoma using RT-PCR. *Folia Biol-Prague*, 47: 206- 210: 2001

Sumerauer D, Matějčková Š, Hrubá A, Eckschlager T: Manipulace se štěpy hematopoetických progenitorových buněk a jejich použití v klinické praxi. *Čas lék čes.*, 141:411-416, 2002

Taguchi, A., Ohtani M., Soma T., Watanabe M., Kinoshita N.: Therapeutic angiogenesis by autologous bone-marrow transplantation in a general hospital setting. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 25:276-8; 2003

Taguchi A., Soma T., Tahara H., Kanda T., Nishimura H., Yoshikawa H., Tsukamoto Y., Iso H., Fujimori Y., Stern D. M., Naritomi H., Matsuyama T.: Administration of CD34+ cells after stroke enhances neurogenesis via angiogenesis in a mouse model. *J Clin Invest.* 114:330-8; 2004

Valbonesi M., Giannini G., Migliori, F., Dalla Costa R., Dejana A. M.: Cord blood (CB) stem cells for wound repair. Preliminary report of 2 cases. *Transfus Apheresis Sci.* 30:153-6; 2004.

van Noesel M. M., Versteeg R.: Pediatric neuroblastomas: genetic and epigenetic 'Danse Macabre' *Gene* 325, 1 –15; 2004

Vícha A., Eckschlager T.: Metody molekulárně cytogenetického vyšetření v klinické onkologii, *Praktický lékař*, 2005, přijato do tisku

Wang Y. X., Hussain S. M, Krestin G. P.: Superparamagnetic iron oxide contrast agents: physicochemical characteristics and applications in MR imaging. *Eur Radiol.* 11:2319-31 2001

Weinstein J. L., Katzenstein H. M., Cohn S. L.: Advances in the diagnosis and treatment of neuroblastoma. *Oncologist* 8:278-92; 2003

Weissleder R, Cheng H. C., Bogdanova A., Bogdanov A. Jr: Magnetically labeled cells can be detected by MR imaging. *J Magn Reson Imaging.* 7:258-63; 1997

Weissman I. L.: Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities. *Science.* 287:1442-6;2000

Yeh T., Zhang W., Ildstad S. T., Ho C.: Intracellular labeling of T-cells with superparamagnetic contrast agents. *Magn Reson Med.* 30:617-625; 1993

Yeh T., Zhang W., Ildstad S. T., Ho C.: In vivo dynamic MRI tracking of rat T-cells labeled with superparamagnetic iron-oxide particles. *Magn Reson Med.* 33:200-208; 1995

Příloha 1

Příloha 2

