

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze

Katedra antropologie a genetiky člověka

Zuzana Faltýsková

**Aplikace laserové mikrodisekce v oblasti
forenzní genetiky**

Bakalářská práce

Praha, květen 2007

Vedoucí práce: RNDr. Martin Krátký

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma „Aplikace laserové mikrodisekce v oblasti forenzní genetiky“ zpracovala samostatně s použitím podkladových pramenů a literatury uvedených v přehledu použité literatury.

V Praze dne 3.5.2007.

datum a místo

Faldyskova

podpis

Poděkování

Děkuji panu RNDr. Martinovi Krátkému z Kriminologického ústavu Praha za odborné vedení a podnětné návrhy při zpracování této bakalářské práce.

Dále chci poděkovat své rodině za poskytnuté rady a podporu.

Aplikace laserové mikrodisekce v oblasti forenzní genetiky

Abstrakt:

První část práce pojednává o jednotlivých variantách techniky laserové mikrodisekce, jako je použití termoplastického filmu, gravitační síly, adheze nebo katapultování vzorku. Druhá část se věnuje využití laserové mikrodisekce ve forenzní genetice, např. při izolaci mužských buněk z vaginálních stěrů, plodových buněk z placenty po provedení potratu nebo při separaci buněk z vlasu. Zvláště významné je srovnání laserové mikrodisekce s dosud používanými technikami zpracování vzorků a zhodnocení opodstatnění použití laserové mikrodisekce ve forenzní praxi.

Klíčová slova:

Laserová mikrodisekce, forenzní genetika, smíšený vzorek, separace buněk, vaginální stěr, spermie, choriové klky, vlasové buňky, STR analýza.

Use of Laser Microdissection in Forensic Genetics

Abstract:

Several different principles of laser microdissection technique are discussed, such as use of thermoplastic foil, gravity force recovery, adhesion or pressure catapulting. The following part speaks about use of laser microdissection in processing forensic samples, e.d. male cells isolation from vaginal smear, fetal cells isolation from placental tissue after abortion and hair cells separation. The main point of this work is a comparison of laser microdissection to up to date techniques of cell separation. The question of necessity of using laser microdissection in forensic laboratories is assessed.

Keywords:

Laser microdissection, forensic genetics, mixed sample, cell separation, vaginal smear, sperm cells, chorionic villi, hair cells, STR typing.

1. Obsah

1. OBSAH	2
2. SEZNAM ZKRATEK	3
3. ÚVOD	4
3.1. CÍLE PRÁCE.....	5
4. MECHANIZMY LASEROVÉ MIKRODISEKCE	5
4.1. DRUHY POUŽÍVANÝCH LASERŮ.....	5
4.2. SOFTWARE NA VYHLEDÁVÁNÍ BUNĚK.....	6
4.3. TECHNIKY LASEROVÉ MIKRODISEKCE.....	6
4.3.1. LASEROVÁ MIKRODISEKCE S TERMOPLASTICKÝM FILMEM.....	6
4.3.2. LASEROVÁ MIKRODISEKCE A KATAPULTOVÁNÍ VZORKU.....	7
4.3.3. LASEROVÁ MIKRODISEKCE S VYUŽITÍM GRAVITAČNÍ SÍLY.....	8
4.3.4. LASEROVÁ MIKRODISEKCE POMOCÍ ADHEZE.....	9
5. ANALÝZA BIOLOGICKÝCH STOP	9
5.1. VAGINÁLNÍ STĚR.....	9
5.1.1. DOSAVADNÍ METODY ZPRACOVÁNÍ.....	10
5.1.2. ZPRACOVÁNÍ VAGINÁLNÍHO STĚRU LASEROVOU MIKRODISEKČÍ.....	11
5.1.3. CITLIVOST LASEROVÉ MIKRODISEKCE A DIFERENCIÁLNÍ LÝZY.....	15
5.2. TKÁNĚ Z POTRATU.....	16
5.2.1. DOSAVADNÍ METODA STANOVENÍ PATERNITY.....	16
5.2.2. LASEROVÁ MIKRODISEKCE CHORIOVÝCH KLKŮ.....	17
5.2.3. URČOVÁNÍ PATERNITY.....	18
5.3. VLASY.....	19
5.3.1. STAVBA, RŮST A VÝVOJ VLASU.....	19
5.3.2. DOSAVADNÍ ZPŮSOB ZPRACOVÁNÍ VLASU.....	20
5.3.3. IZOLACE BUNĚK VLASU LASEROVOU MIKRODISEKČÍ.....	21
5.3.4. GENETICKÁ ANALÝZA VLASU.....	21
6. DALŠÍ MOŽNOSTI VYUŽITÍ LASEROVÉ MIKRODISEKCE	22
6.1. VÝZKUM RAKOVINY.....	22
6.2. BUNĚČNÁ SIGNALIZACE.....	23
6.3. CYTOGENETIKA.....	23
6.4. PROTEOMIKA A GENOVÁ EXPRESE.....	23
6.5. VÝVOJOVÁ BIOLOGIE.....	23
7. SHRnutí A ZÁVĚR	23
8. PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY	25

2. Seznam zkratek

AO	akridinová oranž
CTS	Christmas Tree Stain (Nuclear Fast Red + Picroindigocarmine)
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DTT	dithiotreitol
FISH	fluorescenční in-situ hybridizace
HE	hematoxylin + eosin
LCN	malý počet kopií
LM	laserová mikrodisekce
mtDNA	mitochondriální DNA
MZ	methylová zeleň
PCR	polymerázová řetězová reakce
PE	polyethylenový
PEN	polyethylen-naftalenový
RNA	ribonukleová kyselina
SDS	dodecylsulfát sodný
STR	krátká tandemová repetice
UV	ultrafialový
WRT	Wrightovo barvivo

3. Úvod

V současné forenzní praxi se často setkáváme s případy, kdy výsledkem genetické analýzy provedené standardními laboratorními metodami je smíšený genetický profil dvou nebo více osob. Takto stanovený smíšený profil je obtížně použitelný nebo nepoužitelný pro individuální identifikaci osob. Dalším příkladem vzorků náročných na zpracování jsou tkáně obsahující inhibitory polymerázové řetězové reakce (PCR), která je nezbytným mezikrokem genetické analýzy při identifikaci osob.

Původní metodou izolace buněk ze smíšených stop je mechanické shromáždění buněk pomocí mikromanipulátoru, žiletky nebo mikropipety. Tento postup je náročný na zručnost a především čas. Další metody používané k oddělení jednoho typu buněk od ostatních jsou diferenciální lýza, průtoková cytometrie a nově také laserová mikrodisekce (LM).

Technika LM byla vyvinuta ve skotském Národním ústavu rakoviny a poprvé byla popsána v roce 1996 (EMMERT-BUCK et al. 1996). V oblasti medicíny se rutinně používá už několik let. Ve forenzní genetice je však laserová mikrodisekce nástrojem poměrně novým, první publikace o použití LM v kriminalistice je stará pět let (BAUER et al. 2002).

V současné době nachází laserová mikrodisekce největší pole působnosti v oblasti výzkumu rakoviny. Díky technickému zdokonalování lze laserovou mikrodisekcí izolovat objekty na subbuněčné úrovni, jako jsou chromozomy, buněčné organely nebo části membrány s povrchovými molekulami. To otevírá prostor pro využití LM v proteomice, ve výzkumu genové exprese nebo v molekulární biologii při zkoumání mechanismů buněčné signalizace. Díky své přesnosti a čistotě má LM velký potenciál i ve forenzní genetice.

Studiem použitelnosti LM ve forenzní genetice a její optimalizací se zatím zabývalo jen několik světových laboratoří. Proto je důležité zaměřit se v budoucím výzkumu na vývoj nových protokolů pro zpracování vzorků pomocí LM, ať už se jedná o způsob barvení a fixace preparátu před vlastní LM, extrakci deoxyribonukleové kyseliny (DNA) z izolovaných buněk, kvantifikaci nebo amplifikaci DNA.

3.1. Cíle práce

Hlavním cílem této bakalářské práce je poskytnout základní informace o technice LM a zhodnotit její výhody a nevýhody ve srovnání se standardními metodami separace buněk. Dalším cílem je nastínit praktické využití LM při analýze biologických stop v oblasti forenzní genetiky.

Cílem budoucí diplomové práce bude vytvořit a aplikovat nejvhodnější protokoly na zpracování vzorků pomocí LM ve forenzní praxi.

4. Mechanizmy laserové mikrodisekce

Původní metoda LM popsaná v roce 1996 (EMMERT-BUCK et al. 1996) byla založena na použití termoplastického filmu. Od té doby technika LM i tato konkrétní metoda prodělala značný vývoj, a tak došlo ke zdokonalení a různým modifikacím samotného principu laserové mikrodisekce.

4.1. Druhy používaných laserů

Laserový paprsek je velice tenký spojitý proud fotonů specifické vlnové délky. Původně se používal infračervený laser jako zdroj tepelného záření s vlnovou délkou v desítkách mikrometrů. Novější metody využívají ultrafialových (UV) laserů s vlnovou délkou v desetinách mikrometru. UV záření se podle své biologické aktivity dělí do tří kategorií.

Záření UV-C s vlnovou délkou 200 až 290 nm je absorbováno nukleovými kyselinami i proteiny, v nichž způsobuje přestavbu vazeb, tedy indukuje vznik mutací. Záření typu UV-B s vlnovou délkou 290 až 320 nm je také v nezanedbatelném množství absorbováno biomolekulami, a může tak měnit jejich strukturu. Nicméně, interval vlnové délky UV-B leží mimo absorpční maxima DNA resp. proteinů (256 nm resp. 280 nm). Vliv záření UV-A (320-400 nm) na biomolekuly a v nich obsaženou informaci je zanedbatelný. Proto se pro účely LM používá UV-A laser, konkrétně dusíkový laser (337 nm) nebo pevnolátkový laser (355 nm) (SCHUTZE et al. 2003).

4.2. Software na vyhledávání buněk

Pro rutinní použití LM ve forenzní laboratoři je nezbytné zjednodušit a urychlit každý krok genetické analýzy, počínaje izolací homogenního vzorku buněk. Pro tyto účely se používá speciální software, který řídí pohyb stolku mikroskopu a laser. Tento software dokáže rychle skenovat preparát, automaticky vyhledat a vyříznout buňky určené k mikrodisekci. Výběr buněk probíhá v několika krocích: prvním je automatické vyhledávání určitého typu buněk na základě definovaných kritérií, v dalším kroku lze vybrané buňky vizuálně překontrolovat. To je možné jak před začátkem mikrodisekce, tak i po jejím provedení a případné nežádoucí buňky lze dodatečně odstranit.

Software rozlišuje buňky podle definované barvy, tvaru, světelné intenzity nebo indexu lomu. Buňky lze vyhledat v běžném histologickém i ve fluorescenčně obarveném preparátu, včetně vícebarevných (např. software firmy P.A.L.M.: Metafer P je schopen rozlišit 6 fluorochromů, P.A.L.M. MICROLASER 2007). Díky této možnosti lze izolovat samostatné chromozomy obarvené metodou fluorescenční in-situ hybridizace (FISH).

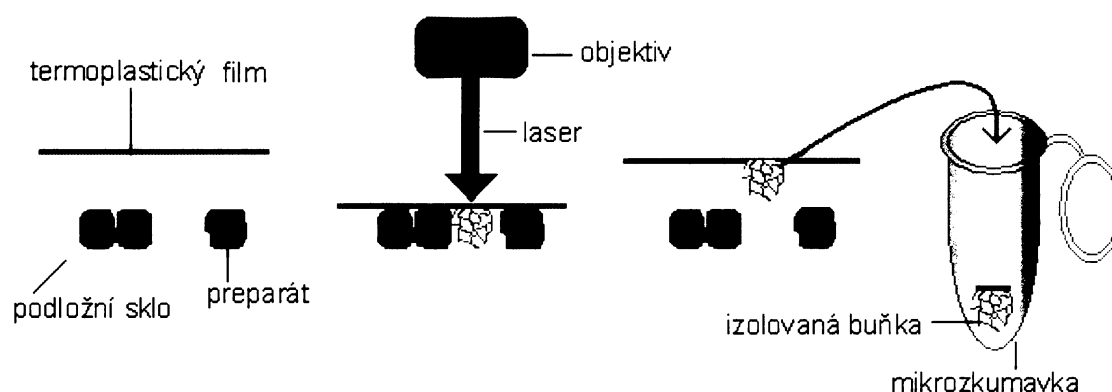
4.3. Techniky laserové mikrodisekce

4.3.1. Laserová mikrodisekce s termoplastickým filmem

Nejstarší technika LM je založena na následujícím principu. Tkáňové řezy na podložním sklíčku jsou překryty adhezivním termoplastickým filmem. Jedná se o syntetický polymer ethylvinylacetátu. Pod mikroskopem jsou zaměřeny všechny zkoumané buňky nebo jejich komplexy a vybraná místa jsou postupně ozářena pulzem infračerveného karbon-dioxidového laseru. Přitom dojde ke krátkodobému tavení filmu a ke vzniku fokálních adhezí s přilehlými buňkami. Film s pevně přichycenými buňkami se potom odlepí od zbytku tkáňového řezu, a to při zachování jejich morfologie. Následně lze pod mikroskopem ověřit specifitu buněk, a pak je i s filmem umístit do pufru vhodného pro jejich další zpracování (obr. 1) (EMMERT-BUCK et al. 1996).

Zahřátí filmu na 90°C po dobu 0,2 s (EMMERT-BUCK et al. 1996), ani termoplastická vazba buněk na film neovlivňuje chemické vazby biomolekul (BONNER et al. 1997).

Síla laserového paprsku je nastavitelná a u této techniky se pohybuje v řádu mikrometrů. Nejužší možný řez v roce 2000 měřil 7,5 μm (CURRAN et al. 2000). Technika LM s termoplastickým filmem je už zastaralá, nyní se používají technologie dosahující vyšší přesnosti.



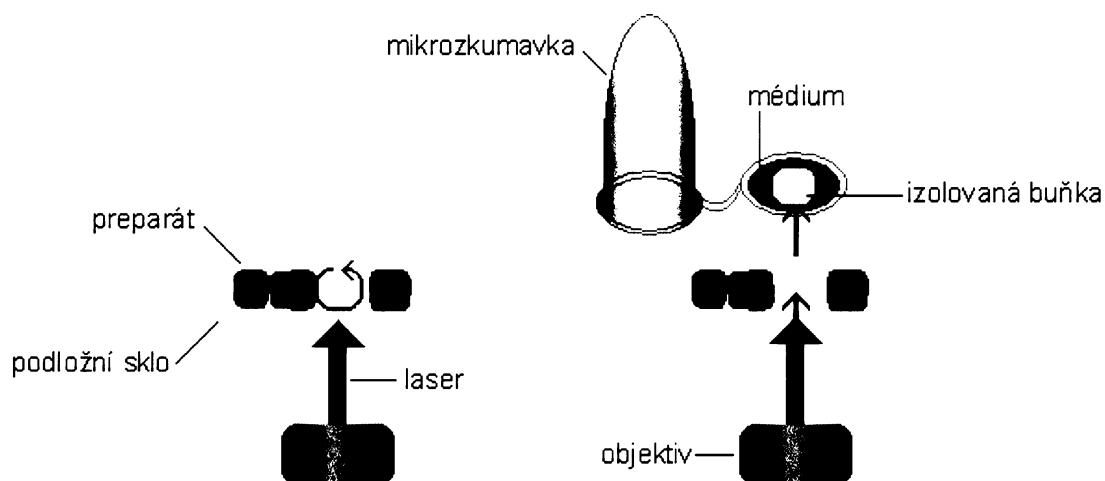
Obr. 1. Laserová mikrodisekce s termoplastickým filmem: Buňky jsou překryty termoplastickým filmem. V ohnisku procházejícího laseru dochází k tavení filmu, na který se přichytí zaměřené buňky. Komplex buňka-film se přenesse do mikrozkumavky.

4.3.2. Laserová mikrodisekce a katapultování vzorku

Technologie laserové mikrodisekce spojená s katapultováním vybraných oblastí vzorku je založena na velmi přesném řezu tkání prostřednictvím UV-A laseru a následném katapultování výřezu přímo do mikrozkumavky cíleným laserovým pulzem o vyšší energii (obr. 2) (SCHUTZE a LAHR 1998).

V místě řezu, kde prochází ohnisko laseru, dochází ke studené ablaci, tj. přerušení tkáně fotofragmentací (BURGEMEISTER 2005 podle VOGEL a VENUGOPALAN 2003). Laserový řez je rychlý, bez účasti tepla, a proto okolní buňky a v nich obsažené biomolekuly zůstávají intaktní. Tímto způsobem je možné izolovat nejenom buňky, ale dokonce jednotlivé chromozomy.

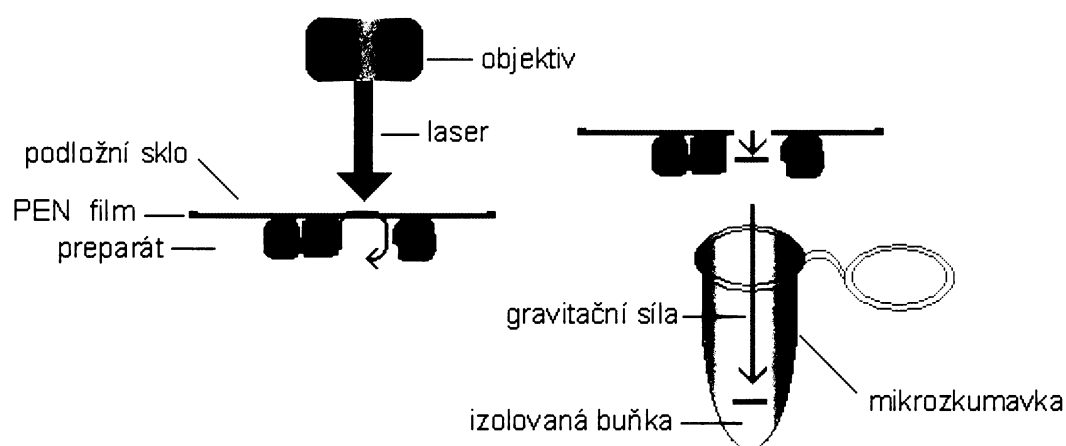
Tento princip LM vyvinula firma P.A.L.M.



Obr. 2. Laserová mikrodisekce a katapultování vzorku: Požadované buňky se oříznou tenkým laserovým paprskem, pak se výřez katapultuje do víčka mikrozkumavky cíleným laserovým pulzem o vyšší energii.

4.3.3. Laserová mikrodisekce s využitím gravitační síly

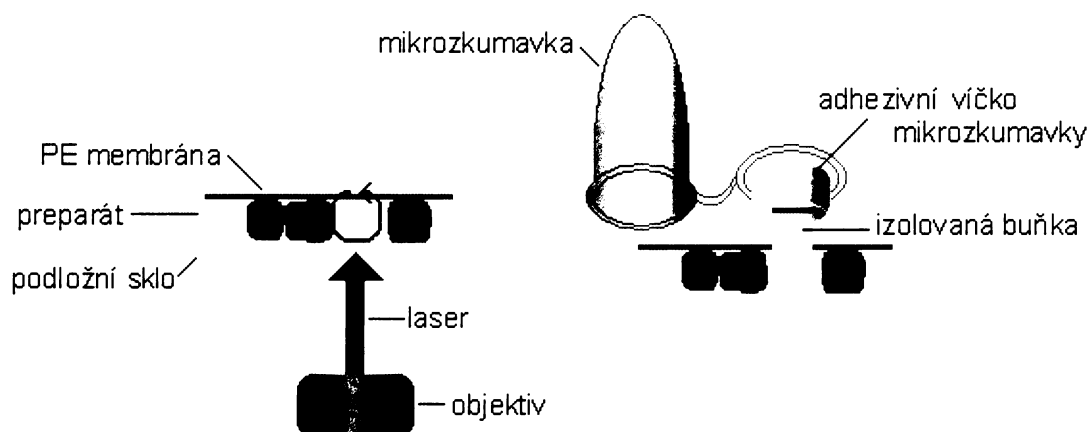
Z produkce firmy Leica je známa technologie LM s využitím gravitační síly. Při této variantě LM se používají podložní sklíčka potažená polyethylen-naftalenovou fólií připevněnou po obvodu skla. Vzorek se zafixuje na fólii a umístí se do mikroskopu inverzně (buňkami dolů). Laserem se přeruší fólie v oblasti kolem požadované buňky, která se i s částí fólie propadne do připravené mikrozkumavky (obr. 3) (LANGLEY a WOJTKIEWICZ 2005).



Obr. 3. Laserová mikrodisekce s využitím gravitační síly: Buňky jsou zafixovány na polyethylen-naftalenovém (PEN) filmu. Laserem se přeruší PEN film kolem vybrané buňky, která se tak propadne do připravené mikrozkumavky.

4.3.4. Laserová mikrodisekce pomocí adheze

Technologii LM pomocí adheze uvedla na trh laserové mikrodisekce firma Olympus. Při této modifikaci LM se vzorek upevní mezi sklíčko a polyethylenovou membránu, do mikroskopu se umístí membránou nahoru. Laserem se ořízne membrána kolem vybrané buňky. V dalším kroku se vyříznutá oblast membrány s buňkou přilepí na speciálně upravené víčko mikroskopavky s adhezivním silikonovým povrchem (obr. 4) (OLYMPUS 2007).



Obr. 4. Laserová mikrodisekce pomocí adheze: Buňky jsou zafixovány na polyethylenové (PE) membráně. Laserem se ořízne membrána kolem vybrané buňky. Výřez se přilepí na víčko mikroskopavky s adhezivním povrchem.

5. Analýza biologických stop

5.1. Vaginální stěr

Při analýze vzorků ze znásilnění, kdy jedinou stopou pachatele jsou spermie z vaginálního (popř. orálního nebo análního) stěru oběti, je pro stanovení použitelného genetického profilu pachatele zapotřebí oddělit spermie od ostatních buněk.

5.1.1. Dosavadní metody zpracování

5.1.1.1. Diferenciální lýza

Ve forenzní praxi se pro účely oddělení spermií od ostatních buněk nejčastěji používá metoda diferenciální lýzy (diferenciální extrakce), která je založena na odolnosti spermií. Ty jsou schopny vydržet v nepříznivých podmínkách v neporušeném stavu delší dobu než ostatní buňky (BUTLER 2005 podle GILL et al. 1985).

Prvním krokem diferenciální lýzy je inkubace směsi buněk s detergentem dodecylsulfátem sodným (SDS) a proteinázou K, při které dochází k degradaci buněčné a jaderné membrány somatických buněk (epitel, krvinky, atd.) oběti i pachatele. Následnou centrifugací se oddělí lyzovaná frakce buněk (v supernatantu) a neporušené spermie (v sedimentu na dně mikrozkuhavky). Spermie se následně suspendují ve směsi činidel: SDS, proteináza K a dithiotreitol (DTT). DTT je redukční činidlo, které odbourává disulfidové vazby v jaderné membráně spermií. Ta se následně působením detergentu SDS rozpadne a dojde k uvolnění jaderné DNA.

Použitelnost diferenciální extrakce je limitována množstvím spermií obsažených ve vzorku. Existuje zde totiž riziko předčasné lýzy spermií, nebo naopak nedostatečné lýzy ostatních buněk. Výsledkem genetické analýzy pak jsou smíšené profily DNA pachatele a oběti, v prvním případě stanovené analýzou supernatantu, v druhém případě analýzou sedimentu.

5.1.1.2. Protilátky proti spermiím

Spermie mají na cytoplazmatické membráně specifické molekuly, díky kterým mají afinitu k jiným protilátkám než ostatní buňky. Fluorescenčně značené protilátky se váží na povrchové molekuly spermie, jako jsou např. MHC I proteiny, receptor CD45 nebo cytokeratin. Fluorescenčně značené spermie lze následně oddělit od neznačených buněk průtokovým cytometrem (SCHOELL et al. 1999).

Tato metoda není ve forenzní praxi příliš obvyklá. Prvním důvodem je fakt, že průtokový cytometr nepatří mezi běžné vybavení forenzní laboratoře, za druhé, průtoková cytometrie je úspěšná pouze u vzorků obsahujících intaktní spermie, proto ji nelze použít při analýze starších (degradovaných) vzorků.

Alternativní metoda je založena na protilátkách konjugovaných s magnetickými partikulami. Spermie svázané s magnetickými partikulami jsou přes protilátku drženy

v magnetickém poli, zatímco ostatní buňky jsou odmyty (BUTLER 2005 podle MARSHALL 2002). Tato metoda je rovněž málo účinná při zpracování degradovaných vzorků.

5.1.1.3. Y-haplotyp

Analýza Y-haplotypu je obvyklý doplněk k analýze autozomálních STR lokusů (krátké tandemové repetice, short tandem repeats). Pokud se v poševním stěru nevyskytují spermie v dostatečném počtu, nepodaří se stanovit profil autozomálních STR lokusů. K tomu dochází, když je pachatel znásilnění aspermik, dříve podstoupil vasektomii nebo při styku nedošlo k ejakulaci.

Dosavadní analýza vzorku bez spermií byla problematická, částečné řešení umožnila právě analýza Y-STR lokusů. Y-STR jsou lokusy na mužském Y chromozomu, které dohromady tvoří tzv. haplotyp. Haplotyp se dědí paternálně v nezměněné podobě, proto ho nelze využít k individuální identifikaci jedince, pouze k vyloučení možných pachatelů nesoucích odlišný haplotyp.

Použitelnost této metody je omezena životností DNA, ze které lze profil stanovit. Podle zpracované studie, Y-STR profily lze určit u vzorku odebraného nejvýše čtyři dny po znásilnění (HALL a BALLANTYNE 2003).

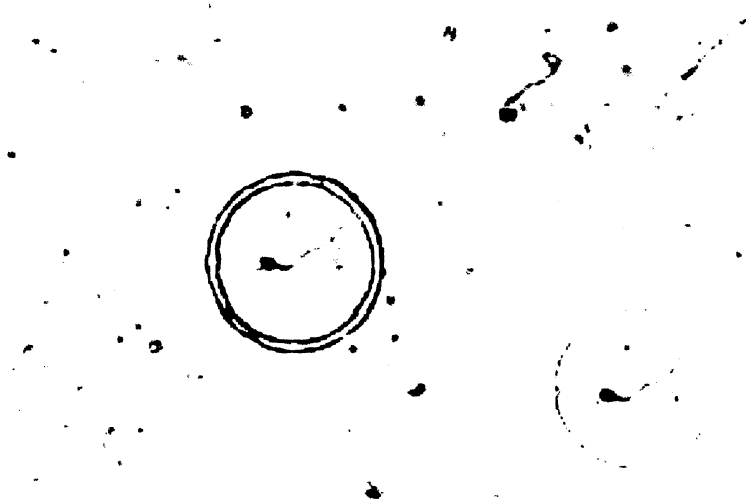
5.1.2. Zpracování vaginálního stěru laserovou mikrodisekcí

Vzorky získané po znásilnění poševním stěrem obsahují z větší části buňky oběti, jako je epitel a krevní buňky, zatímco spermie nebo epitel pachatele jsou menšina čítající desítky až stovky buněk. Z tak malého počtu je možné izolovat jen malé množství DNA použitelné k analýze. Z toho důvodu se DNA amplifikuje metodou PCR malého počtu kopií (LCN-PCR, low copy number PCR), která je ovšem velmi citlivá na výskyt kontaminující DNA. V případě, že se do LCN-PCR dostane DNA oběti, vytvoří tak silné pozadí genetickému profilu pachatele, že není možné ho identifikovat.

Ze vzorku s dostatkem intaktních spermií lze mužskou DNA ze spermií izolovat diferenciální lýzou. U vzorků, kde jsou spermie degradované nebo ve velmi malém počtu, tedy celkový obsah DNA je menší než 250 pg (ELLIOTT et al. 2003), je pro získání použitelného genetického profilu pachatele zapotřebí izolovat spermie pomocí LM (obr. 5), protože při diferenciální lýze vždy dojde ke ztrátě určitého podílu DNA spermií. Díky velmi přesné izolaci spermií laserovou mikrodisekcí se podařilo stanovit genetický

profil z 10,4 pg čisté DNA (DI MARTINO et al. 2004a). Vzorek poševního stěru bez spermií se analyzuje nejhůře, donedávna to nebylo možné vůbec (s výjimkou analýzy Y-haplotypu). Dnes, s pomocí LM v kombinaci s hybridizací fluorescenční značkou, lze získat k analýze alespoň epitelové buňky pachatele (viz kapitola 5.1.2.2).

Nezanedbatelnou výhodou LM je fakt, že odpadá nutnost provádět kvantifikaci DNA, protože v mikrozkuhavce je po mikrodisekci definovaný počet buněk. Jedna haploidní buňka obsahuje přibližně 3,3 pg DNA (SANDERS et al. 2006), celkový obsah DNA tak lze odhadnout. To významně zvyšuje pravděpodobnost úspěšné STR analýzy u vzorků obsahujících jen velmi malé množství zkoumaného materiálu, protože všechna izolovaná DNA zůstane k dispozici pro následnou PCR. Pouze u velmi degradovaných vzorků je zapotřebí určit obsah analyzovatelné DNA.



Obr. 5. Spermie vyříznutá laserem z preparátu vaginálního stěru. Převzato z OLYMPUS 2007, upraveno.

5.1.2.1. Barvení spermií před jejich izolací

Vizualizace buněk v preparátu pro LM není jednoduchá. Řada laboratoří se snaží navrhnout nejvhodnější protokol pro barvení spermií.

V provedených studiích se porovnávaly profily buněk izolovaných laserovou mikrodisekcí po obarvení barvivy hematoxylin + eosin (HE), Nuclear Fast Red + Picroindigocarmine (tzv. barva vánočního stromečku – Christmas Tree Stain, CTS), methylová zeleň (MZ), Wrightovo barvivo (WRT) a akridinová oranž (AO) ve srovnání s profilem získaným z neobarvených buněk.

V neobarveném vzorku lze spermie odlišit podle morfologie, dokonce i poté, co u nich došlo ke ztrátě bičíku. Profily z takovýchto vzorků jsou nejkvalitnější, nicméně jejich zpracování je časově velmi náročné.

Nejlepší profily z obarvených vzorků se podařilo stanovit s použitím HE, profily však nebyly tak výrazné jako srovnávací. Prvním důvodem je fakt, že hematoxylin inhibuje rozvolnění DNA a znesnadňuje tak její amplifikaci. Druhým důvodem je kyselý charakter eosinu, který poškozují DNA. Efektivitu HE protokolu lze zvýšit zkrácením expozice buněk barvicímu roztoku (SANDERS et al. 2006).

Barvení pomocí CTS se ukázalo jako vhodné pro rozlišení spermií od jiných buněk, nicméně získané profily byly ještě méně výrazné než po barvení HE. Sandersová přisuzuje úbytek fluorescence při elektroforéze účinkům Indigocarminu, který částečně inhibuje PCR (SANDERS et al. 2006). Vysvětlení tohoto efektu podle Di Martina tkví v kyselém charakteru obsažené pikrové kyseliny, která má obdobný účinek jako eosin: fragmentuje nukleové kyseliny (DI MARTINO et al. 2004a).

AO dokáže dobře obarvit jádra, ale spermie lze podle nich odlišit jen pokud nejsou převrstveny mnoha jinými buňkami. AO je však interkalační barvivo, které se elektrostaticky váže na fosfátovou kostru DNA, a tím úplně inhibuje PCR. Proto se AO ve forenzní genetice nepoužívá.

Barviva WRT a MG znesnadňují identifikaci spermií mezi epitelovými buňkami, a tak ani jejich použití na barvení vaginálních stěrů není vhodné (SANDERS et al. 2006).

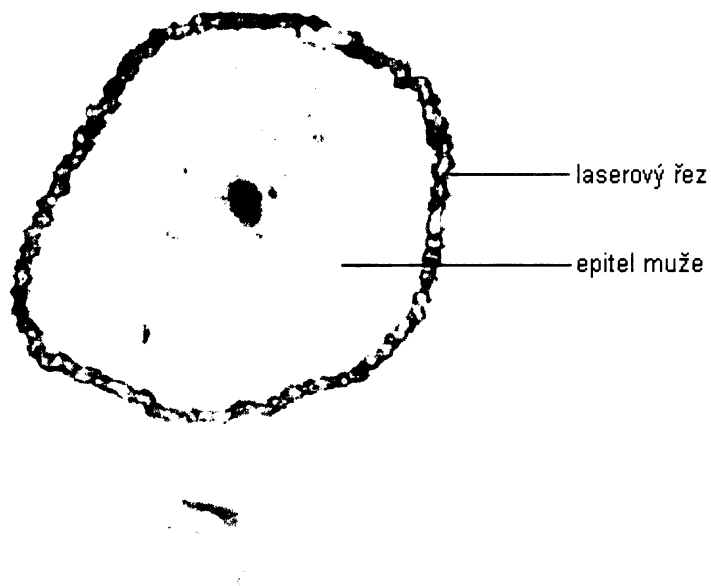
Další možností, jak spermie zviditelnit, je použití fluorescenčních barev, které přes protilátky mohou barvit velmi specifické buněčné struktury.

5.1.2.2. Smíšený vzorek bez spermií

Dosavadní metoda, jak analyzovat vzorek vaginálního stěru bez spermií, spočívala ve stanovení Y-haplotypu. Tento postup však neumožňuje individuální identifikaci pachatele. Díky LM je možné získat DNA i z jiných mužských buněk než jsou spermie, např. z buněk epitelu. Mužský epitel se od ženského rozlišuje hybridizací Y-specifickou sondou, která je fluorescenčně označena nebo má schopnost luminiscence (např. digoxigenin). Díky vizualizaci Y chromozomu se mužská frakce snadno odliší a izoluje pomocí LM (obr. 6a a obr. 6b). Genetickou analýzou takto izolované DNA lze získat čistý autozomální profil pachatele. Pro částečný profil stačí analyzovat 10 diploidních buněk, úplný profil pak vyžaduje analýzu alespoň 20 buněk (ANSLINGER et al. 2005).



Obr. 6a. Smíšený vzorek bukálního epitelu ženy a spermatu. Sperma obsahuje spermie a epitelové buňky muže. Převzato z ANSLINGER et al. 2005, upraveno.



Obr. 6b. Epitelová buňka muže označená digoxigeninem je oříznuta laserem. Převzato z ANSLINGER et al. 2005, upraveno.

Tento mechanismus izolace buněk pomocí LM je použitelný na všechny smíšené vzorky pocházející od dvou lidí různého pohlaví, pokud je zapotřebí izolovat právě mužskou frakci. Obohacením kitu o další, X-specifickou sondu (např. CEP X SpectrumOrange/Y SpectrumGreen probe kit), je možné zviditelnit i samostatnou ženskou frakci. Kromě zelené sondy hybridizující s Y chromozomem tak bude v preparátu svítit i červená sonda navázaná na X chromozom. V mužských somatických buňkách se rozsvítí červená i zelená barva, v ženských dvě červené barvy. Buňky, které svítí jen jednou barvou nebo nesvítí vůbec, jsou pravděpodobně poškozené nebo sonda nestačila hybridizovat. Tyto buňky nelze zahrnout do genetické analýzy (ANSLINGER et al. 2007).

Oproti barvení digoxigeninem, tato technika minimalizuje riziko falešně negativního výsledku. Ten může vzniknout nedostatečnou hybridizací s digoxigeninem, preparát se pak jeví, jako by v něm nebyly žádné mužské buňky. V případě barvení obou pohlavních chromozomů lze úspěšnost hybridizace posoudit z podílu buněk, které nesvítí nebo svítí jen jednou barvou.

5.1.3. Citlivost laserové mikrodisekce a diferenciální lýzy

Ve vaginálním stěru je obvykle mnohonásobně více buněk epitelu než spermií. V provedených studiích prokázala LM vyšší citlivost než diferenciální extrakce, a to při různých vzájemných poměrech spermií a epitelových buněk. Citlivost metody se posuzuje podle jistoty, s jakou lze identifikovat jedince, tedy s jakou pravděpodobností je stanovený genotyp v populaci unikátní.

Elliott a kol. v roce 2003 analyzoval vaginální stěry odebrané v různou (známou) dobu od znásilnění, které obsahovaly různě velký podíl spermií, aby otestoval citlivost LM ve srovnání s diferenciální lýzou. Vzorky byly na sklíčka nanášeny vždy ve dvou paralelách, každé sklíčko obsahovalo určitý počet spermií (od několika jednotlivých do cca 300 spermií). Z každého vzorku pak byla DNA izolována jednak laserovou mikrodisekcí, jednak diferenciální extrakcí. Ukázalo se, že za daných podmínek je LM citlivější v 15 ze 16 případů. U vzorku, kde diferenciální extrakce dosáhla lepšího výsledku než LM, došlo k blíže nespecifikovaným komplikacím při izolaci buněk, proto se do PCR dostalo výrazně menší množství DNA než u vzorku z diferenciální lýzy.

Na základě této analýzy lze konstatovat, že úspěšnost diferenciální extrakce je limitována množstvím spermií ve vzorku. Genetický profil umožňující individuální

identifikaci pachatele nelze stanovit, pokud do extrakce vstupuje méně než cca 200 spermií (ELLIOTT et al. 2003).

Další proměnnou, která ovlivňuje citlivost obou metod, je doba od znásilnění do odebrání vzorku. V této době totiž dochází k destrukci DNA endogenními nukleázami, přestože spermie se na první pohled jeví intaktní. Analýza degradované DNA je možná, její výsledky jsou ovšem velmi závislé na čistotě izolované DNA. Právě díky své schopnosti izolovat jen konkrétní buňky, a z nich extrahovat čistou DNA, prokázala LM vyšší citlivost i u vzorků obsahujících dostatečný počet buněk na izolaci diferenciální extrakcí (ELLIOTT et al. 2003).

5.2. Tkáň z potratu

Genetická analýza plodu se provádí při určování paternity, tedy při identifikaci biologického otce plodu. Otec plodu je mezi podezřelými z vraždy těhotné ženy nebo ženy, která nedávno prodělala potrat. Po biologickém otci se pátrá také v případech incestu, těhotenství nezletilé dívky nebo těhotenství v důsledku znásilnění.

5.2.1. Dosavadní metoda stanovení paternity

Pokud dojde k potratu většího plodu, jeho buňky lze přímo podrobit genetické analýze. Při interrupci v časně fázi vývoje však dochází k fragmentaci zárodku a placenty, a tak nelze makroskopicky odlišit mateřskou tkáň, která je v převaze, od minoritní tkáň plodu.

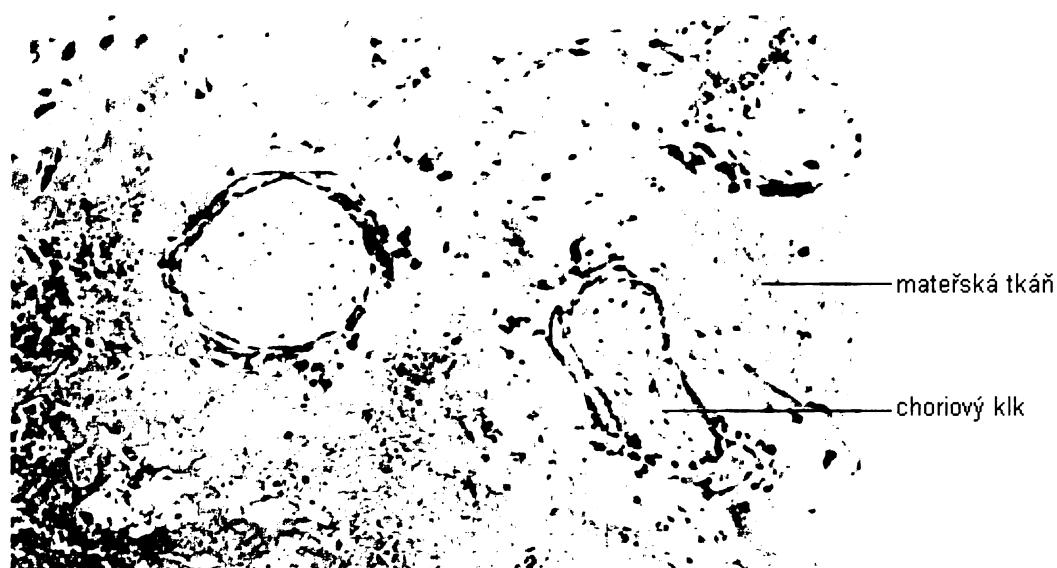
Standardní postup, jak stanovit genetický profil plodu z takového materiálu, je namátkově odebrat a analyzovat několik vzorků tkáň z různých míst. Ve směsi tkání odebraných při potratu jsou mateřské buňky většinou v převaze, a proto je velké riziko, že se do vzorků dostanou přednostně. V tom případě se DNA plodu při PCR vůbec neamplifikuje a výsledkem genetické analýzy je profil DNA matky. Pokud je zastoupení buněk plodu v odebraném vzorku alespoň jedna desetina, výsledkem je profil smíšený (ROBINO et al. 2006).

Nevýhodou tohoto postupu je velká spotřeba chemikálií a času potřebných ke zpracování mnoha vzorků neurčitého původu.

Obvykle se provádí navíc analýza Y-STR lokusů, protože k tomu není zapotřebí separovat buňky plodu od mateřských (specificky se amplifikují pouze úseky na mužském Y chromozomu, které v mateřské DNA nejsou). V případě, že se jedná o plod mužského pohlaví, podaří se stanovit jeho Y-haplotyp, který se musí shodovat s Y-haplotypem biologického otce. Ale jak již bylo řečeno, analýzu Y-haplotypu nelze použít k individuální identifikaci jedince.

5.2.2. Laserová mikrodisekce choriových klků

Laserovou mikrodisekcí lze izolovat samostatné buňky plodu, a stanovit tak jeho čistý genetický profil bez kontaminace mateřskými alelami. Vzhledem k fragmentaci plodu a placenty při provádění potratu je pro účely genetické analýzy nejvhodnější izolovat buňky choriových klků. Choriové klky jsou částí placenty, která vzniká z chorionu, vnějšího plodového obalu embryonálního původu. Chorion se pomocí výběžků (klků) zanořuje do stěny dělohy v raném stádiu vývoje zárodku. Choriové klky jsou dostatečně malé, aby se vyhnuly fragmentaci, ale pod mikroskopem je možné je morfologicky odlišit od zbytku placenty (obr. 7). Odumírající choriové klky ve stěně dělohy přetrvávají po dobu čtyř až pěti týdnů od potratu (ANDERSON a DAVIS 1968). Díky tomu je možné určit pachatele znásilnění, v jehož důsledku plod vznikl, i po několika týdnech od jeho spáchání.



Obr. 7. Choriové klky placenty. Převzato z BAUER et al. 2002, upraveno.

Vzorek tkáně z potratu se zpracovává standardními histologickými technikami, jako je fixování ve formalinu, barvení hematoxylin-eosinem, zatavení do parafinového bločku a nařezání na řezy o tloušťce kolem 5 μm . Řezy se nanosou na sklíčko či membránu určenou pro LM a izolují se buňky choriových klků. DNA se extrahuje ve standardním lyzačním pufru s proteinázou K, a dále se provádí standardní genetická analýza, kterou se stanoví čistý genetický profil plodu (BAUER et al. 2002). Jeden choriový klk obsahuje řádově desítky buněk. Pro stanovení úplného genetického profilu stačí analyzovat 50 buněk (ROBINO et al. 2006).

Pomocí LM je možné vyřešit dosud nevyřešené případy znásilnění z archivovaných řezů materiálu z potratu. Pokud se dříve nepodařilo izolovat buňky plodu, nebyl stanoven ani jeho genetický profil. Jestliže nebyly k dispozici jiné důkazy, pachatel znásilnění nemohl být usvědčen a vzorek byl archivován mezi nevyřešenými případy. U archivních vzorků však existuje nezanedbatelné riziko kontaminace exogenní DNA, ke které mohlo dojít v patologické laboratoři při zpracování vzorku (barvení nebo řezání na mikrotomu bez zajištění sterility). Aby byla zajištěna sterilita prostředí při zpracování vzorku, pro fixaci a barvení se musí použít nový roztok na každý řez a mikrotomové čepele na jedno použití (BUDIMLIJA et al. 2005).

5.2.3. Určování paternity

Genetický profil autozomálního STR lokusu je tvořen dvojicí alel, z nichž jedna alela se dědí od otce a druhá od matky. Při určování paternity se stanoví genetický profil zvláště u plodu a zvláště u matky. Jednu alelu z každé dvojice plod zdědil od matky, v jedné se tedy musí shodovat. Druhá alela plodu pochází od jeho biologického otce (dále „otcovská“ alela plodu).

U muže podezřelého ze znásilnění se stanoví genetický profil. Pokud se v daném lokusu „otcovská“ alela plodu neshoduje s jednou z alel podezřelého, tento muž není otcem plodu. Pokud má každá „otcovská“ alela plodu v příslušných lokusech svůj ekvivalent mezi alelami podezřelého, lze prohlásit, že s určitou definovatelnou pravděpodobností je tento muž otcem. Míra této pravděpodobnosti závisí na počtu testovaných lokusů, na konkrétních alelách, které daný jedinec nese a na čistotě stanovených genetických profilů.

Doplňková analýza Y-haplotypu může u plodu mužského pohlaví zvýšit míru pravděpodobnosti správného určení otcovství, nebo otcovství vyvrátit.

5.3. Vlasy

5.3.1. Stavba, růst a vývoj vlasu

Vlas se skládá ze tří vrstev. Uvnitř je dřev, která tvoří nejméně objemnou část vlasu, někdy dokonce není přítomna vůbec. Silnou střední vrstvu vlasu tvoří kůra (kortex) a na povrchu je tenká kutikula. Buňky kůry jsou dlouhé až 100 μm . Probíhají podél vlasu a jsou vyplněny keratinovými fibrilami. Kutikula je tvořena 5 – 10 vrstvami plochých buněk o délce 5-10 μm , které vzájemně přesahují ve směru od kořene vlasu ke špičce (WEI et al. 2005).

Kortex a dřev obsahují vejčitá granula melaninu, vlasového pigmentu. Tmavá barva vlasu je determinována obsahem eumelaninů, naproti tomu phaeomelaniny způsobují světlé a zrzavé zbarvení. Eumelaniny jsou silné inhibitory PCR. Phaeomelaniny tak silné inhibiční účinky nemají, nicméně jejich role v PCR není doposud příliš prozkoumaná (MCNEVIN et al. 2005).

Vlas vyrůstá z vlasového folikulu, kde se neustále dělí zárodečné buňky. Dávají tak vznik novým vlasovým buňkám, které starší buňky vytlačují ven z folikulu. Krátce po diferenciaci ze zárodečné buňky začnou kortikální buňky syntetizovat intermediární filamenta α -keratinu. Keratinová vlákna se díky obsažené aminokyselině cysteinu propojí disulfidovými můstky a vytvoří tak pevné fibrily. Jádro buňky zůstane zaklíněno mezi provázanými fibrilami keratinu. Jak jsou kortikální buňky vytlačovány z folikulu, dehydrují se a dochází k apoptóze. Apoptóza je řízená smrt buňky, při které dojde ke ztrátě organel a dvouvláknovým zlomům na DNA mezi histony. Tak vzniknou fragmenty o maximální délce 200 nukleotidů.

Vývoj vlasu má tři stádia. První a nejdelší je anagenní stádium, které trvá 2 až 4 roky a dochází při něm k aktivnímu růstu vlasu. Během katagenní fáze vývoje, která trvá 2 až 3 týdny, dochází k ukončení mitózy v zárodečných buňkách. Poslední, telogenní fáze vývoje vlasu trvá cca 3 měsíce a dochází při ní k apoptóze a keratinizaci buněk ve vlasovém kořínku (MCNEVIN et al. 2005).

5.3.2. Dosavadní způsob zpracování vlasu

Genetická analýza vlasu je obtížná, protože vlas obsahuje inhibitory PCR, např. keratin (v kortexu) a melanin (v dřeni a kortexu).

5.3.2.1. Analýza jaderné DNA

Genetický profil z jaderné DNA lze stanovit u vlasů ve stádiu růstu, nebo těsně po jeho ukončení. Takový vlas je vytržen i s buněčnými obaly, které obsahují zachovalou nebo jen částečně degradovanou jadernou DNA. DNA se extrahuje z rozpuštěného vlasového folikulu s buněčnými obaly fenol-chloroformovou extrakcí (DI MARTINO et al. 2004b), nebo s použitím speciálního kitu na zpracování vlasů. Z extrahované DNA se stanoví genetický profil.

Nevýhodou extrakce jaderné DNA z celého vlasového folikulu je riziko přítomnosti velkého množství keratinu, který vyplňuje většinu folikulu, což vede k inhibici PCR. Bez úspěšné amplifikace pak nelze stanovit genetický profil.

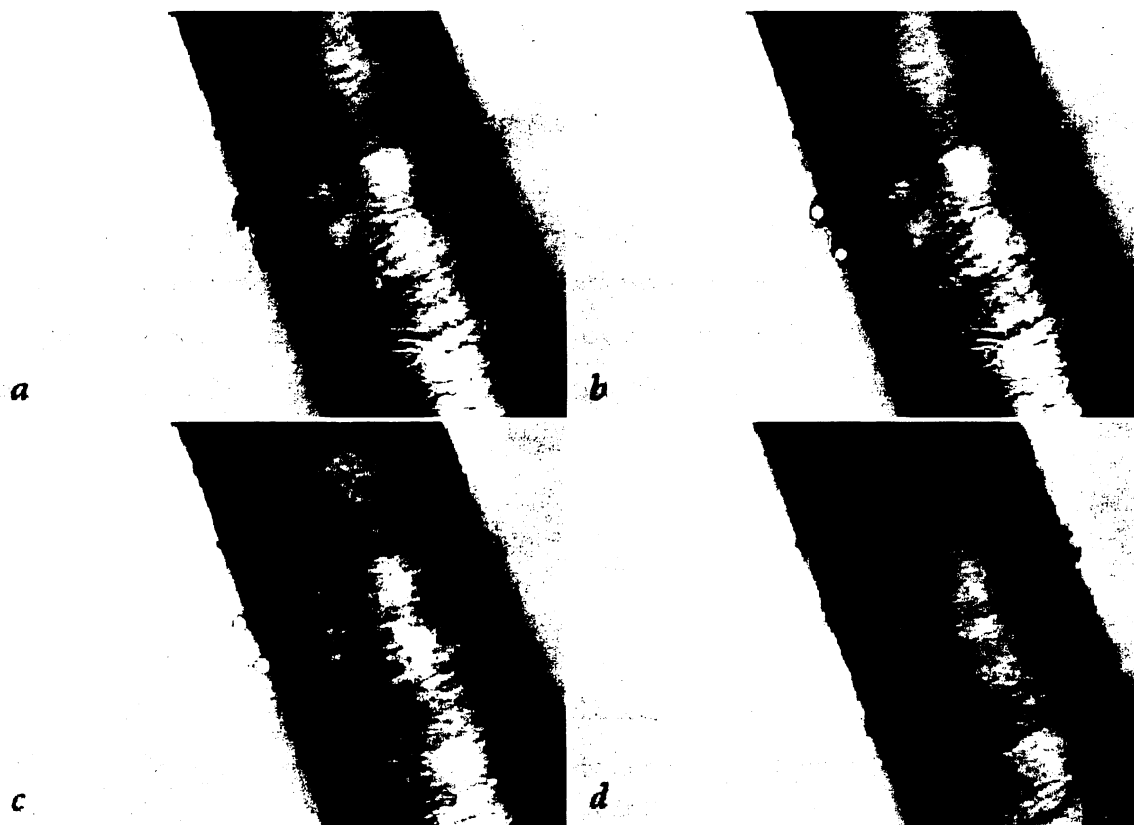
5.3.2.2. Analýza mitochondriální DNA

U vlasového stvolu bez asociovaných buněk nebo u vlasu po ukončení růstu je obtížné stanovit alespoň částečný genetický profil. Proto se přistupuje k analýze mitochondriální DNA (mtDNA), která není během růstu vlasu degradována tak rychle jako jaderná DNA. Mitochondrie obsahují malou kruhovou molekulu DNA, která neobsahuje žádné repetitivní sekvence, jako tomu je u jaderné. Proto nelze z mtDNA stanovit STR profil, ale musí se určit přímo primární struktura mtDNA, sekvence nukleotidů v hypervariabilním úseku nekódující D-kličky.

Výhoda analýzy mtDNA oproti jaderné je její vyšší odolnost a větší počet kopií v buňce, ve které se nacházejí tisíce mitochondrií, ale jen jedno jádro. Nevýhody mitochondriální analýzy jsou hned tři. První z nich je nezanedbatelný výskyt heteroplazmie, kdy jedinec nese mozaiku dvou či více odlišných linií mitochondrií, které obsahují různé molekuly mtDNA. Druhá nevýhoda analýzy mtDNA je fakt, že se mitochondrie v nezměněné podobě předávají po mateřské linii, a proto s jejich pomocí nelze individuálně identifikovat jedince, lze pouze vyloučit možné pachatele. Poslední nevýhoda je nedostatek dat v databázích, které jsou koncipovány jen pro STR analýzu (MCNEVIN et al. 2005).

5.3.3. Izolace buněk vlasu laserovou mikrodisekcí

LM umožňuje izolaci jednotlivých buněk asociovaných s vlasovým folikulem (obr. 8), a díky tomu téměř nedochází ke kontaminaci vzorku keratinem a melaninem (DI MARTINO 2004b). Obsah DNA a obsah inhibitorů ve vzorku je proto ve výhodnějším poměru než při extrakci DNA z rozpuštěného vlasového folikulu. V důsledku toho PCR probíhá lépe, což může být zásadní pro stanovení kvalitního genetického profilu.



Obr. 8. Laserová mikrodisekce buněk asociovaných s vlasem. Převzato ze SEIDL a NOVOTNY 2007, upraveno.

5.3.4. Genetická analýza vlasu

Z vlasu lze izolovat jen několik jednotlivých buněk. Pro zpracování tak malého počtu se používá modifikovaný protokol, např. PCR v redukováném objemu (GAINES et al. 2002), LCN-PCR (GILL 2001) nebo prodloužená PCR (GILL et al. 2000). Vzhledem k možné fragmentaci DNA je výhodné analyzovat pouze krátké STR lokusy. Účinnost

genetické analýzy fragmentované DNA se ještě zvyšuje použitím primerů nasedajících při PCR blíže k repetitivnímu úseku (HELLMANN et al. 2001).

Po stanovení profilu DNA je zapotřebí provést jeho správnou statistickou interpretaci, neboť při analýze může docházet k drop-outu, kontaminaci cizí alelou atd. Použitím LM se zvyšuje čistota vzorku a možnost amplifikace extrahované DNA. Stanovený genetický profil je tak průkaznější.

6. Další možnosti využití laserové mikrodisekce

LM vyniká svou schopností izolovat skutečně homogenní populaci buněk. Zachovává přitom původní obsah buněk nepoškozený, použitelný k analýze jak na úrovni nukleových kyselin, tak proteinů. Proto se používá zejména v oblasti patologie a výzkumu rakoviny, nicméně uplatnění nachází v posledních letech i v oborech jako je molekulární biologie, cytogenetika, proteomika a vývojová biologie.

6.1. Výzkum rakoviny

V patologicky změněných tkáních se obvykle vyskytuje mozaika zdravých a poškozených buněk. Pomocí imunohistochemického barvení lze odlišit buňky podle jejich funkčních a fenotypových projevů, pomocí LM je izolovat a analyzovat zvlášť.

Ke vzniku rakoviny dochází z různých příčin, jednou z nich jsou mutace: multiplikace genu pro některý růstový faktor či jeho receptor, delece v supresorových genech, apod. Oddělenou analýzou buněk zdravých, premaligních, maligních a metastázových (všechny z jednoho jedince) lze jednoznačně definovat mutační změny vedoucí ke vzniku rakoviny (CURRAN et al. 2000).

Genetické „otisky prstů“ stanovené zvlášť z rakovinných a ze zdravých buněk umožní identifikovat konkrétní mutaci individuálně u každého pacienta. S určením molekulárního profilu nádoru je možné stanovit jeho přesnou diagnózu, prognózu a najít nejvhodnější terapii (FEND A RAFFELD 2000).

6.2. Buněčná signalizace

Ať už pro účely imunologie, živočišné fyziologie, neurobiologie nebo buněčné biologie, LM nachází uplatnění ve výzkumu buněčné signalizace. Oddělení jednotlivých typů buněk umožňuje výzkum jejich povrchových molekul, receptorů a signalizačních schopností (CURRAN et al. 2000). Praktická aplikace této techniky v medicíně je např. v oboru endokrinologie, při vyšetřování pacientů s poruchou hormonální regulace.

6.3. Cytogenetika

Izolace samostatného chromozomu nebo jeho určité části umožňuje vývoj nových sond pro FISH (SCHERMELLEH et al. 1999). Díky tomu lze sledovat translokace a fúze chromozomů pro účely prenatální diagnostiky (BURGEMEISTER 2005).

6.4. Proteomika a genová exprese

Proteomika se zabývá studiem proteinů, zkoumá kromě jejich posttranslačních modifikací a vzájemných interakcí také jejich lokalizaci v buněčných kompartmentech a různou míru exprese v různých tkáních. Poslední dvě jmenované otázky mohou být zodpovězeny s pomocí LM a dvojrozměrné gelové elektroforézy (CRAVEN et al. 2002).

6.5. Vývojová biologie

Izolace buněk laserovou mikrodisekcí nebrání jejich přežití a zachování správné funkce. Je možné izolovat např. živé kmenové buňky z tkáňové kultury nebo živé organizmy mikroskopické velikosti, jako je *C. elegans* (OLYMPUS 2007).

7. Shrnutí a závěr

Laserová mikrodisekce je rychlá, přesná metoda použitelná na široké spektrum preparátů, včetně archivních. Má oproti zavedeným postupům řadu výhod. Izolace je bezdotyková, nevyžaduje manuální zručnost ani velké zkušenosti. Ve srovnání s izolací

buněk pomocí mikromanipulátoru při LM nehrozí riziko mechanického poškození či ztráty buněk. Je možné izolovat DNA pouze z vybraných buněk, bez příměsi nežádoucí DNA. LM umožňuje odběr právě tolika buněk, kolik je zapotřebí pro genetickou analýzu, zatímco zbytek preparátu zůstává nepoškozený a bez kontaminace, může se použít opakovaně, třeba i za několik let (po obnovení vyšetřování). S použitím fluorescenčně značených protilátek proti specifickým antigenům lze laserovou mikrodisekcí izolovat určité buňky, které se od okolních morfologicky neliší. Laserem lze z buňky vyříznout pouze jádro nebo samostatné chromozomy, a tak oddělit DNA od cytoplazmy obsahující inhibitory PCR, jako je např. keratin ve vlasech, nebo endogenní nukleázy, které degradují DNA. Použitím LM většinou odpadá nutnost kvantifikovat DNA.

Podstatnou nevýhodou LM jsou vysoké náklady na pořízení mikroskopu vybaveného zařízením pro laserovou mikrodisekci. Další nevýhody vyplývají především z krátké doby její existence. Pro účely LM je nutné preparáty připravovat bez krycího sklíčka, avšak archivní vzorky krycí sklíčko mají (nicméně, je možné ho uvolnit pomocí rozpouštědla). Vizualizace preparátu bez krycího sklíčka je poněkud obtížná, vyhledávání buněk vyžaduje obarvení preparátu. Účinky některých barviv na stabilitu DNA jsou dosud předmětem zkoumání. Otázkou také zůstává vliv fluorescenčního barvení na kvalitu DNA profilů, tedy zda nedochází k interferenci fluorescenčního záření, které vzniká hybridizací chromozomů s fluorescenční sondou při barvení buněk, s fluorescenčním zářením, které se měří při elektroforéze.

V souhrnu lze říci, že výhody LM jednoznačně převažují nad nevýhodami, které budou dalším výzkumem ubývat. Moje budoucí diplomová práce se proto zaměří právě na optimalizaci a tvorbu nových protokolů laserové mikrodisekce. Nejdůležitější bude zdokonalit využití LM na vzorky vlasů, protože o této problematice bylo publikováno zatím nejméně informací. Poprvé s touto možností přišel Di Martino et al. v roce 2004, ale od té doby se nikdo nepokusil jejich práci rozvést. Další výzkum se bude týkat analýzy smíšených stop. O analýze vaginálních stěrů už existuje podstatně více informací než u vlasů. Jak nastínila Katja Anslingerová et al. v roce 2005 a 2007, LM je v kombinaci s fluorescenčně značenými protilátkami nezbytná při separaci jednotlivých buněk stejné morfologie. Vývoj nových specifických protilátek tak může otevřít nové pole působnosti laserové mikrodisekce ve forenzní genetice.

8. Přehled použité literatury

1. ANDERSON, W. R., DAVIS, J. Placental site involution. *Am J Obstet Gynecol.* 1968, vol. 102, no. 1, s. 23-33.
2. ANSLINGER, K., MACK, B., BAYER, B., ROLF, B., EISENMENGER, W. Digoxigenin labelling and laser capture microdissection of male cells. *Int J Legal Med.* 2005, vol. 119, no. 6, s. 374-377.
3. ANSLINGER, K., BAYER, B., MACK, B., EISENMENGER, W. Sex-specific fluorescent labelling of cells for laser microdissection and DNA profiling. *Int J Legal Med.* 2007, vol. 121, no. 1, s. 54-6.
4. BAUER, M., THALHEIMER A, PATZELT D. Paternity testing after pregnancy termination using laser microdissection of chorionic villi. *Int J Legal Med.* 2002, vol. 116, no. 1, s. 39-42.
5. BONNER, R. F., EMMERT-BUCK M., COLE K., POHIDA T., CHUAQUI R., GOLDSTEIN S., LIOTTA L. A. Laser capture microdissection: molecular analysis of tissue. *Science.* 1997, vol. 278, no. 5342, s. 1481-1483.
6. BUDIMLIJA, Z. M., LECHPAMMER, M., POPIOLEK, D., FOGT, F., PRINZ, M., BIEBER, F. R. Forensic applications of laser capture microdissection: use in DNA-based parentage testing and platform validation. *Croat Med J.* 2005, vol. 46, no. 4, s. 549-555.
7. BURGEMEISTER, R. New aspects of laser microdissection in research and routine. *J Histochem Cytochem.* 2005, vol. 53, no. 3, s. 409-412.
8. BUTLER, J. M. *Forensic DNA Typing: Biology, Technology, and Genetics of STR Markers.* [s.l.]: Elsevier, 2005. 2. ISBN 0121479528. Differential extraction, Direct capture of sperm cells, s. 46-47.

9. CRAVEN, R. A., TOTTY N., HARNDEN P., SELBY P. J., BANKS R. E. Laser capture microdissection and two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis: evaluation of tissue preparation and sample limitations. *Am J Pathol.* 2002, vol. 160, no. 3, s. 815-822.
10. CURRAN, S., MCKAY J. A., MCLEOD H. L., MURRAY G.I. Laser capture microscopy. *J Clin Pathol: Mol Pathol.* 2000, vol. 53, no. 2, s. 64-68.
11. DI MARTINO, D., GIUFFRE, G., STAITI, N., SIMONE, A., LE DONNE, M., SARAVO, L., 2004a. Single sperm cell isolation by laser microdissection. *Forensic Sci Int.* 2004, vol. 146, s. 151-153.
12. DI MARTINO, D., GIUFFRE, G., STAITI, N., SIMONE, A., TODARO, P., SARAVO, L., 2004b. Laser microdeissection and DNA typing of cells from single hair follicles. *Forensic Sci Int.* 2004, vol. 146, s. 155-157.
13. ELLIOTT, K., HILL D. S., LAMBERT C., BURROUGHES T. R., GILL P. Use of laser microdissection greatly improves the recovery of DNA from sperm on microscope slides. *Forensic Sci Int.* 2003, vol. 137, s. 28-36.
14. EMMERT-BUCK, M. R., BONNER, R. F., SMITH, P. D., CHUAQUI, R. F., ZHUANG, Z., GOLDSTEIN, S. R., WEISS, R. A., LIOTTA, L. A. Laser capture microdissection. *Science.* 1996, vol. 274, no. 5289, s. 998-1001.
15. FEND, F., RAFFELD, M. Laser capture microdissection in pathology. *J Clin Pathol.* 2000, vol. 53, no. 9, s. 666-672.
16. GAINES, M. L., WOJTKIEWICZ, P.W., VALENTINE, J. A., BROWN, C. L. Reduced volume PCR amplification reactions using the AmpFISTR Profiler Plus kit. *J Forensic Sci.* 2002, vol. 47, no. 6, s. 1224-1237.
17. GILL, P. Application of Low Copy Number DNA Profiling. *Croat Med J.* 2001, vol. 42, no. 3, s. 229-232.

18. GILL, P., JEFFREYS, A. J., WERRETT, D. J. Forensic application of DNA 'fingerprints'. *Nature*. 1985, vol. 318, no. 6046, s. 577-579.
19. GILL, P., WHITAKER, J., FLAXMAN, C., BROWN, N., BUCKLETON, J. An investigation of the rigor of interpretation rules for STRs derived from less than 100 pg of DNA. *Forensic Sci Int*. 2000, vol. 112, no. 1, s. 17-40.
20. HALL, A., BALLANTYNE, J. Novel Y-STR typing strategies reveal the genetic profile of the semen donor in extended interval post-coital cervicovaginal samples. *Forensic Sci Int*. 2003, vol. 136, no. 1-3, s. 58-72.
21. HELLMANN, A., ROHLEDER, U., SCHMITTER, H., WITTIG, M. STR typing of human telogen hairs: a new approach. *Int J Legal Med*. 2001, vol. 114, no. 4-5, s. 269-273.
22. LANGLEY, K. B., WOJTKIEWICZ, P. W. Application of Leica™ Laser Microdissection microsystem to expedite forensic sexual assault casework. North Louisiana Criminalistics Laboratory. 2005, s. 1-8.
23. MARSHALL, P. *Optimization of spermatozoa capture during the differential extraction process for STR typing with the potential for automation*. University of North Texas, 2002. Master's thesis.
24. MCNEVIN, D., WILSON-WILDE, L., ROBERTSON, J., KYD, J., LENNARD, C. Short tandem repeat (STR) genotyping of keratinised hair. Part 1: Review of current status and knowledge gaps. *Forensic Sci Int*. 2005, vol. 153, no. 2-3, s. 237-246.
25. Olympus - Brochures [online]. 2007 [cit. 2007-03-20]. Dostupný z WWW: <http://resources.olympus-europa.com/micro/catalogs/C12570450051DE75D890AC3A528FD2BAC1257185004746FC_CellCut1105.pdf>.

26. P.A.L.M. Microlaser: Metafer P [online]. 2007 [cit. 2007-03-20]. Dostupný z WWW: <<http://www.palm-microlaser.com/dasat/index.php?cid=100147&conid=0&sid=dasat>>.
27. ROBINO, C., BARILARO, M. R., GINO, S., CHIARLE, R., PALESTRO, G., TORRE, C. Incestuous paternity detected by STR-typing of chorionic villi isolated from archival formalin-fixed paraffin-embedded abortion material using laser microdissection. *J Forensic Sci.* 2006, vol. 51, no. 1, s. 90-92.
28. SANDERS, CHRISTINE T., SANCHEZ N., BALLANTYNE J., PETERSON D. A. Laser microdissection separation of pure spermatozoa from epithelial cells for short tandem repeat analysis. *J Forensic Sci.* 2006, vol. 51, no. 4, s. 748-757.
29. SEIDL, S., NOVOTNY, J. Forensic Medicine: Bridging the Gap between Identification and Contact-free Separation. PALM MicroBeam [online]. 2007, [cit. 2007-04-14], s. 1-8. Dostupný z WWW: <<http://www.palm-microlaser.com/dasat/images/8/100538-49-0008-0407.pdf>>.
30. SCHERMELLEH, L. THALHAMMER S, HECKL W, POSL H, CREMER T, SCHUTZE K, CREMER M. Laser microdissection and laser pressure catapulting for the generation of chromosome-specific paint probes. *Biotechniques.* 1999, vol. 27, no. 2, s. 362-367.
31. SCHOELL, W. M., KLINTSCHAR M, MIRHASHEMI R, PERTL B. Separation of sperm and vaginal cells with flow cytometry for DNA typing after sexual assault. *Obstet Gynecol.* 1999, vol. 94, no. 4, s. 623-627.
32. SCHUTZE, K., LAHR, G. Identification of expressed genes by laser-mediated manipulation of single cells. *Nat Biotechnol.* 1998, vol. 16, no. 8, s. 737-742.

33. SCHUTZE, K., BURGEMEISTER R., CLEMENT-SENGEWALD A., EHNLE, S., FRIEDMANN G., LAHR G., SAGMULLER B., STICH M., THALHAMMER S. P.A.L.M. Microlaser Technologies: Non-Contact Live Cell Laser Manipulation Using PALM R MicroLaser Systems. 11th edition. *Germany: Bernried, 2003*. 40 s. ISBN 3-9808893-0-0.
34. VOGEL, A., VENUGOPALAN, V. Mechanisms of pulsed laser ablation of biological tissues. *Chem Rev.* 2003, vol. 103, no. 2, s. 577-644.
35. WEI, G., BHUSHAN, B., TORGERSON, P. M. Nanomechanical characterization of human hair using nanoindentation and SEM. *Ultramicroscopy.* 2005, vol. 105, no. 1-4, s. 248-266.