

STRESZCZENIE

Wstęp. Materiał biologiczny określony jako gruczolakorak jelita grubego reprezentuje różne grupy komórek (komórki nowotworowe, komórki naczyń krwionośnych i limfatycznych, czy podścieliska). Wykorzystanie techniki mikrodysekcji laserowej do pozyskania jednorodnych subpopulacji komórek niezmiennych nowotworowo oraz nowotworowych, zapewnia bardzo selektywny materiał do dalszych badań z zakresu biologii molekularnej na poziomie ekspresji genów [96,97]. Mikromacierze ekspresyjne, są wykorzystywane do tworzenia profili ekspresji genów w określonych jednostkach chorobowych, co może mieć istotne znaczenie w określeniu nowych czynników prognostycznych i predykcyjnych [8,98,99,100]. Dlatego otrzymanie wysokiej jakości RNA jest często momentem krytycznym w dalszej analizie na poziomie ekspresji genów [93,101].

Cel. Głównym celem przeprowadzonych badań było takie opracowanie metodologii przygotowania preparatów do LM oraz protokołu izolacji RNA z fragmentów gruczolakoraka jelita grubego, aby zapewnić najlepszą jakość RNA. Równie ważnym celem niniejszej pracy doktorskiej była optymalizacja kontroli jakości oraz ilości RNA w małych próbkach materiału biologicznego (tj. po mikrodysekcji laserowej).

Materiały i metody. Materiał do badań stanowiły wycinki gruczolakoraka jelita grubego oraz niezmienną nowotworowo błonę śluzową jelita grubego z okolic guza. Zamrożone bloczki tkanek skrawano seryjnie na grubość 10 μm (krioskrawki) przy wykorzystaniu kriostatu *Leica CM 1950 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Niemcy)* w temperaturze -25°C . Do izolacji RNA w pierwszym etapie badań zastosowano zestaw *PicoPure® RNA Isolation Kit (Arcturus Bioscience GmbH, Mörfelden-Walldorf, Niemcy)*. Następnie określono zakres, precyzję i błędy pomiarów stężenia RNA i współczynnika RIN z wykorzystaniem Bioanalyzera (*Agilent 2100 Bioanalyzer™ system - Agilent Technologies, Waldbronn, Niemcy*). W dalszej części badań na podstawie wartości współczynnika RIN porównywano ze sobą protokoły do izolacji RNA oraz warunki przygotowania preparatów do LM. Porównano również dwie metody badawcze w zakresie pomiarów stężeń RNA: wykorzystując spektrofotometr NanoDrop (*NanoDrop 1000 Spectrophotometer - Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA*) oraz elektroforezę kapilarną - Bioanalyzer (*Agilent 2100 Bioanalyzer™ system - Agilent*

Technologies, Waldbronn, Niemcy). Następnie w celu określenia wpływu denaturacji na stężenie oraz jakość RNA (RIN), część próbek RNA poddano denaturacji (70°C, 2 min.) i przeprowadzono elektroforezę kapilarną (Bioanalizator).

Kolejnym ważnym etapem badań była optymalizacja protokołu do izolacji RNA z małych próbek pozyskanych z mrożonego materiału biologicznego. W tym celu porównano współczynniki RIN między różnymi protokołami izolacji RNA. Całkowite RNA wyizolowano każdym z 8 protokołów (*p1 - p8*) z każdego z 12 krioskrawków gruczołakoraka jelita grubego. Wykorzystano komercyjnie dostępne zestawy do izolacji RNA: (*p1*) *PicoPure® RNA Isolation Kit*, (*p2*) *RNeasy Plus Micro Kit®*, (*p3*) *RNeasy Micro Kit®* oraz modyfikacje protokołu *RNeasy Micro Kit®* z wykorzystaniem (*p4*) *poly-A RNA* oraz (*p5*) *GenElute™ LPA*. Ponadto zastosowano zmodyfikowaną metodę, będącą kombinacją metody fenolowej z zastosowaniem *TRI Reagent® Solution* z izolacją opartą na stałych złożach krzemionkowych w kolumnkach *Qiagen RNeasy MinElut spin column* (*p6*). Dodatkowymi modyfikacjami zastosowanymi w tym protokole (*p6*) było wykorzystanie *GenElute™ LPA* (*p7*) oraz *glikogenu* (*p8*). Stężenie oraz jakość pozyskanego RNA weryfikowano za pomocą elektroforezy kapilarnej (Bioanalizatora).

Ostatnim etapem badań była optymalizacja protokołu przygotowania preparatów do mikrodysekcji laserowej. Mrożone krioskrawki gruczołakoraka jelita grubego umieszczono na membranie i barwiono zestawem: *MMI H&E Staining Kit Plus®* (specjalna hematoksylina i eozyna), *Ambion LCM Staining Kit®* (fiolet krezyłowy) lub *Arcturus® HistoGene® Frozen Section Staining Kit* (producent nie ujawnił składu). Wykonano również standardowe barwienie hematoksyliną i eozyną na podstawowym szkiełku mikroskopowym z zastosowaniem szkiełka nakrywkowego. Procedura ta miała na celu porównanie różnych barwień stosowanych w LM do standardu barwienia histopatologicznego. Pozyskane jednorodne subpopulacje komórek z LM izolowano następnie z wykorzystaniem autorskiej procedury, która jest kombinacją metody fenolowej z zastosowaniem *TRI Reagent® Solution* z izolacją opartą na stałych złożach krzemionkowych w kolumnkach *Qiagen RNeasy MinElut spin column* (*p6*). Stężenie oraz jakość pozyskanego RNA weryfikowano za pomocą elektroforezy kapilarnej (Bioanalizatora).

Wyniki. Wyniki otrzymane podczas optymalizacji kontroli jakości i stężenia RNA pozyskiwanego z małych próbek po mikrodysekcji laserowej dotyczyły w pierwszej

kolejności określenia zakresu pomiarów stężenia i współczynnika RIN z wykorzystaniem Bioanalyzera. Pomiar wartości współczynnika RIN nie był możliwy w zakresie stężeń 5-10 ng/ μ l z wykorzystaniem zestawu Nano LabChip przy użyciu Bioanalyzera. Możliwe okazało się wykonanie pomiarów wartości współczynnika RIN w zakresie stężeń 10-25 ng/ μ l z wykorzystaniem zestawu Nano LabChip przy użyciu Bioanalyzera. Dla większych stężeń RNA nie zaobserwowano problemów z pomiarem RIN na płytkach Nano LabChip. Również na płytkach Pico LabChip w badanym zakresie stężeń (100-15000 pg/ μ l) nie zaobserwowano problemów z oznaczeniem współczynnika RIN.

Kolejne badania optymalizacji kontroli jakości i stężenia RNA pozyskiwanego z małych próbek po mikrodysekcji laserowej dotyczyły precyzji pomiarów stężenia i współczynnika RIN z wykorzystaniem Bioanalyzera. Współczynnik zmienności (CV) dla pomiarów wartości RIN był mniejszy niż 5%, przy czym analiza statystyczna wykazała istotne statystycznie różnice w CV między Pico i Nano LabChip dla pomiarów RIN, na korzyść płytek Pico LabChip. Natomiast współczynnik zmienności (CV) dla pomiarów stężenia RNA na płytkach Nano LabChip był mniejszy niż 25%, a dla Pico LabChip był mniejszy niż 31%, przy czym analiza statystyczna wykazała nieistotne statystycznie różnice w CV dla pomiarów stężenia RNA dla obu płytek.

Ostatni etap badań optymalizacji kontroli jakości i stężenia RNA polegał na określeniu błędów pomiarów stężenia i współczynnika RIN z wykorzystaniem Bioanalyzera. Granica powtarzalności (r) dla pomiarów współczynnika RIN wynosi 0,81, a dla pomiaru stężenia [pg/ μ l] wynosi 952 dla płytek Pico LabChip. Dla pomiarów współczynnika RIN granica powtarzalności (r) wynosi 1,01, a dla pomiaru stężenia [ng/ μ l] wynosi 12,88 dla płytek Nano LabChip.

W badaniach porównawczych pomiędzy 2 metodami umożliwiającymi pomiar stężenia RNA, wartość stężenia RNA przy wykorzystaniu spektrofotometru NanoDrop była istotnie wyższa niż ta mierzona z wykorzystaniem Bioanalyzera.

W badaniach mających na celu określenie wpływu denaturacji RNA na RIN otrzymano wyższe pomiary stężenia RNA w zdenaturowanych próbkach w porównaniu do tych samych próbek bez denaturacji. Denaturacja RNA nie wpływa bezpośrednio na pomiar wartości współczynnika RIN z wykorzystaniem Bioanalyzera.

Wnioski. Na podstawie przeprowadzonych badań sformułowano następujące wnioski:

- 1.** Możliwość określenia jakości badanego RNA (współczynnik RIN) jest zależne od jego stężenia, dlatego niezbędne jest wcześniejsze orientacyjne określenie stężenia RNA, aby odpowiednio dobrać zestaw do pomiarów z wykorzystaniem Bioanalyzera (Pico lub Nano LabChip).
- 2.** Oba zestawy LabChip (Pico i Nano) umożliwiają precyzyjne pomiary stężenia RNA w badanych próbkach przy użyciu Bioanalyzera.
- 3.** Pomiary jakości RNA (współczynnika RIN) są bardziej precyzyjne niż pomiary stężenia RNA w przypadku obu zestawów LabChip (Pico i Nano).
- 4.** Wartość stężenia RNA w badanych próbkach zależy od rodzaju aparatury użytej do jego pomiaru (NanoDrop vs. Bioanalyzer).
- 5.** Denaturacja RNA wpływa na pomiar stężenia RNA. Nie wywiera ona jednak wpływu na wartość współczynnika RIN przy użyciu Bioanalyzera.
- 6.** Izolacja RNA, z mrożonych fragmentów gruczołakoraka oraz niezmienionej nowotworowo błony śluzowej jelita grubego, z swoją modyfikacją własną zapewnia najlepszą jakość pozyskiwanego RNA w porównaniu do innych protokołów.
- 7.** Jakość pozyskanego RNA jest uzależniona od procedury barwienia skrawków mrożonych w procesie przygotowania preparatów do mikrodysekcji laserowej.

SUMMARY

Introduction. Biological material specified as colorectal cancer represents different groups of cells (cancer cells, blood vessels and lymphatic cells, or gastrointestinal stromal cells). The use of laser microdissection technique (LM) to obtain homogeneous subpopulations of neoplastic and healthy cells, provides a very selective material for further research in molecular biology at the level of gene expression [96,97]. Gene expression microarrays are used for gene expression profiling in certain illnesses, which may be of vital importance in identifying new predictive and prognostic factors [8,98,99,100]. Therefore, obtaining high quality RNA is often a critical moment for further analysis at the level of molecular studies [93,101].

Objective. The main objective of the study was to develop a methodology for LM preparations and protocol of RNA isolation from fragments of colorectal cancer, to ensure the best quality of RNA. An equally important objective of this dissertation was to optimize the quality and quantity of RNA in small samples of biological material (i.e. after laser microdissection).

Materials and methods. The research material consisted of slices of colorectal cancer and healthy mucosa of the colon from the area of the tumor. Frozen tissue blocks were cut in series on the thickness 10 microns (cryosections) using *Leica CM 1950* cryostat (*Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany*) at a temperature of -25°C . For the RNA isolation in the first stage of research *PicoPure[®] RNA Isolation Kit* (*Arcturus Bioscience GmbH, Mörfelden-Walldorf, Germany*) was used. Then the range, precision, and measurement of concentrations of RNA and RIN (*RNA Integrity Number*) using Bioanalyzer (*Agilent 2100 Bioanalyzer[™] system-Agilent Technologies, Waldbronn, Germany*) were defined. Further, on the basis of the RIN value protocols for RNA isolation and the LM preparation conditions were compared. Moreover two test methods for measuring concentrations of RNA: using a NanoDrop spectrophotometer (*NanoDrop 1000 Spectrophotometer-Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA*) and capillary electrophoresis - Bioanalyzer (*Agilent 2100 Bioanalyzer[™] system-Agilent Technologies, Waldbronn, Germany*) were compared. Afterwards, in order to determine the impact of denaturation on RNA (RIN) concentration and quality, some RNA samples were denatured (70°C , 2 min.) and capillary electrophoresis (Bioanalyzer) was performed.

Another important stage included optimization of RNA isolation protocol from small samples obtained from frozen biological material. To do this, RIN value between different RNA isolation protocols were compared. Total RNA was isolated with each of the 8 protocols (*p1-p8*) from each of 12 cryosections of colorectal cancer. All commercially available RNA isolation kits were used: (*p1*) *PicoPure® RNA Isolation Kit*, (*p2*) *RNeasy Plus Micro Kit®*, (*p3*) *RNeasy Micro Kit®* and modified *RNeasy Micro Kit®* using (*p4*) *poly-A RNA* and (*p5*) *GenElute™ LPA*.

In addition, a personal modified method - a combination of the phenol method using *TRI Reagent® Solution* with isolation based on fixed siliceous deposits in *Qiagen RNeasy MinElut spin column* (*p6*) was used. Additional changes that were applied to this protocol (*p6*) was to use *GenElute™ LPA* (*p7*) and *glycogen* (*p8*). The concentration and quality of obtained RNA were verified with capillary electrophoresis (Bioanalyzer).

The final stage included slide's staining protocol optimization for laser microdissection. Frozen cryosections of colorectal cancer were placed on the membrane and stained with: *MMI H&E Staining Kit Plus®* (special hematoxylin and eosin), *Ambion LCM Staining Kit®* (cresyl violet) or *Arcturus® HistoGene® Frozen Section Staining Kit* (manufacturer did not reveal the composition). Also standard hematoxylin and eosin staining on the primary microscopic slide using the cover slip was performed. This procedure was designed to compare different staining used in LM to standard histopathological staining. Homogeneous subpopulations of cells obtained from LM were then isolated using own procedure, which is a combination of the phenol method using the *TRI Reagent® Solution* with insulation based on fixed siliceous deposits in *Qiagen RNeasy MinElut spin column* (*p6*). The concentration and quality of obtained RNA were verified with capillary electrophoresis (Bioanalyzer).

Results. The result obtained when optimizing quality control and concentrations of RNA from small samples after laser microdissection were to determine the scope of measurement of concentrations and RIN using Bioanalyzer. Measuring RIN value was not possible in the range of concentrations 5-10 ng/μl with Nano LabChip set using Bioanalyzer. Nevertheless it was possible to measure RIN in the concentration range 10-25 ng/μl with Nano LabChip using Bioanalyzer. For larger RNA concentrations no problems with RIN on Nano LabChip were observed. Also on Pico LabChip in the studied

range of concentrations (100-15000 pg/ μ l) there were no problems with RIN measurement.

Other tests to optimize the quality control and the concentrations of RNA from small samples after laser microdissection were performed to check the precision of concentration and RIN measurement using Bioanalyzer. Coefficient of variation (CV) for measuring the value of RIN was less than 5% and the statistical analysis showed a statistically significant difference in CV between Pico and Nano LabChip for measurements of RIN, in favor of Pico LabChip. While the coefficient of variation (CV) for the measurement of concentrations of RNA in Nano LabChip was less than 25%, and the Pico LabChip was less than 31%, the statistical analysis showed statistically significant differences in the CV for the measurement of concentrations of RNA for both LabChip.

The last stage of quality control optimization and RNA concentration focused on identifying concentration and RIN measurement errors using Bioanalyzer. Repeatability limits (r) for measuring RIN coefficient is 0.81, and for measuring the concentration [pg/ μ l] is 952 for Pico LabChip. Repeatability limits (r) for measuring RIN coefficient equals 1.01, and for measuring the concentration [ng/ μ l] is 12,88 for Nano LabChip.

Comparative studies on the 2 methods for measuring the concentration of RNA, its concentration with NanoDrop spectrophotometer was significantly higher than that measured with the use of Bioanalyzer.

In studies aiming to determine the impact of RNA denaturation on RIN higher concentrations of RNA in denatured samples compared to those same samples without denaturation were obtained. Denaturing RNA does not directly affect the measurement of the value of RIN using Bioanalyzer.

Conclusions.

On the basis of performed studies the following conclusions have been drawn:

- 1.** The ability to determine the quality of the RNA (RIN value) is dependent on its concentration, therefore it is necessary to determine approximately RNA concentration to properly choose a kit of measurements with the use of Bioanalyzer (Pico or Nano LabChip).

- 2.** Both LabChip kits (Pico and Nano) allow for precise measurements of RNA concentrations in the test sample using Bioanalyzer.
- 3.** Measurements of RNA quality (RIN value) are more accurate than measuring concentrations of RNA in case of both LabChip kits (Pico and Nano).
- 4.** RNA concentration in the test sample depends on the type of device used for its measurement (NanoDrop vs. Bioanalyzer).
- 5.** Denaturing RNA affects the measurement of RNA concentration. However, it has no effect on the value of RIN coefficient when using Bioanalyzer.
- 6.** RNA isolation, from frozen slices of colorectal cancer and healthy colon mucosa, with my own modification provides the best quality of obtained RNA in comparison to other protocols.
- 7.** The quality of obtained RNA is dependent on the staining procedure of cryosection in the process of preparation for laser microdissection.