

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
8. Dezember 2005 (08.12.2005)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 2005/116245 A2

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C12Q 1/68,  
C12N 15/10

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE2005/000979

(22) Internationales Anmeldedatum:  
27. Mai 2005 (27.05.2005)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
10 2004 026 744.8 28. Mai 2004 (28.05.2004) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme  
von US): PHILIPPS-UNIVERSITÄT MARBURG  
[DE/DE]; Biegenstrasse 10, 35032 Marburg (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): LISS, Birgit [DE/DE];  
Schwanallee 19A, 35037 Marburg (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für  
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,  
AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,  
CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,

GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,  
KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA,  
MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ,  
OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL,  
SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC,  
VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für  
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,  
GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,  
ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU,  
TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,  
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL,  
PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,  
CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Erklärung gemäß Regel 4.17:**

— hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, die Priorität einer früheren Anmeldung zu beanspruchen (Regel 4.17 Ziffer iii) für alle Bestimmungsstaaten

**Veröffentlicht:**

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: CDNA PRODUCTION FROM CELLS AFTER LASER MICRODISSECTION

(54) Bezeichnung: ERFINDUNG BETREFFEND cDNA-HERSTELLUNG AUS ZELLEN NACH LASER-MIKRODISSEKTION

(57) Abstract: The invention relates to a novel method for producing cDNA from individual cells after microdissection. The inventive method is inexpensive, comprises few steps and can be carried out also by less skilled laboratory personnel. The novel method for producing cDNA from individual cells obviates the time-consuming and risky step of RNA isolation by allowing for lysis and cDNA synthesis to be carried out in the same reaction vessel in a buffer solution which yields reliable contamination-free results. The buffer is composed of NP40, carrier DNA and Super RNAsin<sup>®</sup>, as well as dNTPs and cDNA synthesis primers.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung stellt ein neues Verfahren zur Herstellung von cDNA aus Einzelzellen nach Mikrodisektion zur Verfügung. Es hat den Vorteil, dass es kostengünstig ist und schnell in wenigen Arbeitsschritten auch von weniger geschultem Laborpersonal durchgeführt wird. Erstmals entfällt bei der Herstellung von cDNA aus Einzelzellen der aufwendige und riskante Schritt der RNA Isolation, indem Lyse und cDNA-Synthese im selben Reaktionsgefäß in einer Pufferlösung durchgeführt werden, die sichere kontaminationsfreie Ergebnisse liefert. Die Zusammensetzung des Puffers besteht aus NP40, Carrier-RNA und Super RNAsin, sowie dNTPs und cDNA Synthesepriern.



WO 2005/116245 A2

5

10

15

**Titel**

Erfindung betreffend cDNA-Herstellung aus Zellen nach Laser-Mikrodissektion

20 Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur kontaminationsfreien Isolierung einzelner Zellen aus fixiertem Gewebe durch Laser-Mikrodissektion und die anschließende analytische und präparative Untersuchung dieser Zellen, insbesondere die cDNA Synthese einzelner Neuronen aus fixierten Hirnschnitten mit Einzelzell-Sensitivität.

## Beschreibung und Einleitung des allgemeinen Gebietes der Erfindung

Die Mikrodissektion ist ein Verfahren der Biowissenschaften, mit dem isolierte oder in einem Gewebe lokalisierte zelluläre, supra- und subzelluläre Strukturen abgetrennt werden und somit weiteren analytischen und präparativen Verfahren zugänglich gemacht werden können. Unter den Mikrodissektionsverfahren spielt das Laser Capture Microdissection-Verfahren kurz LCM genannt, eine besondere Rolle. Die Mikrodissektion wird manuell oder durch Mikromanipulation mechanisch in direktem Kontakt mit der Probe oder kontaktfrei mittels fokussierten Lasern durchgeführt. Die US 5998129 beschreibt ein Lasermikrodissektions-Verfahren, in dem aus einer auf einem planaren Objektträger aufgebracht Gewebeprobe ein gewünschter Bereich z.B. Zellorganellen oder eine einzelne Zelle per Laserstrahl vom umgebenden Gewebe ausgeschnitten wird. Die sich noch auf dem Objektträger befindende isolierte Zelle wird mit einem zusätzlichen Laserimpuls in Richtung des Laserstrahl mobilisiert und in einem Reaktionsbehälter aufgefangen. Eines der weiteren analytischen und präparativen Verfahren mit Zellen, die durch Lasermikrodissektion isoliert wurden ist die Isolierung von Nukleinsäuren, DNA, RNA, insbesondere mRNA. Derzeit gibt es kommerzielle Kits beispielsweise der Firmen PALM (PALM RNA\Extraction Kit) und Qiagen (Qiagen RNAeasy Micro Kit), die die Isolierung von mRNA aus Lasermikrodisektierten Zellen ermöglicht. Allerdings liefern die mit diesen Kits durchgeführten keine akzeptablen reproduzierbaren Ergebnissen für isolierte einzelne Zellen.

Kamme Feta I (2003) J Neurosci 23(9) und Tietjen I et al (2003) Neuron 38 benutzen das Laser-Mikrodissektionsgerät der Firma Arcturus und beschreiben ein Verfahren, das zwar in der Anwendung und Ausbeute unkomplizierter als die kommerziellen Kits ist, aber keine kontaminationsfreie Sammlung einzelner spezifischer Zellen erlaubt. Insbesondere sind bei der Präparation von einzelnen Neuronen aus fixierten Hirnschnitten (z.B. postmortem human) Kontaminationen durch benachbarte Gliazellen problematisch. Derzeit ist kein Verfahren bekannt, mit welchem aus einzelnen Zellen nach spezifischer Lasermikrodissektion z.B. mit dem kontaktfreien PALM System mRNA in guter Qualität gewonnen werden kann.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es die beschriebenen Nachteile im Stand der Technik zu beheben und ein einfaches und schnelles Verfahren zur direkten cDNA-Synthese aus isolierten Zellen einer Gewebeprobe nach Lasermikrodissektion bereitzustellen.

5

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch ein Verfahren zur kombinierten Lyse und direkten cDNA-Synthese gemäß der Ansprüche.

Das Verfahren beinhaltet folgende Schritte:

10

1. Bereitstellen von Zellen nach Lasermikrodissektion und Überführung in Reaktionsbehälter

2. Lyse der Zellen nach Schritt 1 und reverse Transkription der RNA aus den Zellen nach Schritt 1 in einem Lyse/cDNA-Synthese Reaktionspuffer und in einem

15 Reaktionsgefäß

Das erfindungsgemäße Verfahren hat den Vorteil, dass es kostengünstig ist und schnell in wenigen Arbeitsschritten auch von weniger geschultem Laborpersonal durchgeführt wird. Entscheidend ist, dass der aufwendige und riskante Schritt der RNA Isolation entfällt und statt dessen im selben Reaktionsgefäß eine kombinierte Lyse und direkte cDNA-Synthese durchgeführt wird, die sichere kontaminationsfreie Ergebnisse liefert. Zur Detektion der cDNA ist eine direkte PCR im selben Reaktionsgefäß ohne weitere Aufreinigung oder andere zusätzliche Schritte möglich. Die Zusammensetzung des Puffers (aus NP40, Poly-I Carrier und Super

20 RNAsin, sowie dNTPs und cDNA Syntheseprimer) als Lyse/cDNA-Synthese Reaktionspuffer ist besonders auf diese Anforderung abgestimmt. Weitere Schritte, wie Probenvorbereitung und Färbung, die Durchführung des Inkubationsprotokoll und Einhaltung der Temperaturvorgaben optimieren die RNA/cDNA Ausbeute.

25

30 Als Zellen werden intakte Zellen aus Suspension oder Kultur verwendet oder fixierte dehydrierte Schnittpräparate. Durch die Verwendung eines Trocknungsmittels z.B. Silica und den Zusatz eines Molekularsiebes in den Alkohol ist gewährleistet, dass die Gewebeprobe in sehr kurzer Zeit trocken genug für die Lasermikro-

dissektion ist. Gleichzeitig minimiert die vollständige Dehydrierung Materialverluste durch RNase Aktivität.

Vorteilhafterweise finden Lyse und cDNA-Synthese direkt im selben Reaktionsgefäß, sogar im selben Reaktionspuffer (Lyse/cDNA-Synthese Reaktionspuffer) statt. Eine gesonderte RNA Isolation ist nicht notwendig. Alternativ wird vor der cDNA-Synthese ein DNase Verdau durchgeführt. Der erfindungsgemäße Lyse/cDNA-Synthese Reaktionspuffer beeinflusst eine anschließende direkte qualitative PCR Amplifikation nicht, sodass auch diese im selben Reaktionsgefäß durchgeführt wird. Für die Durchführung einer quantitativen Real-time PCR Analyse wird alternativ ein Reinigungsschritt zwischengeschaltet, da die cDNA Reaktionskomponenten bekanntermaßen die Kinetik einer PCR Amplifikation stören. Derartige Reinigungsschritte sind dem Fachmann bekannt und können dem Stand der Technik z.B. aus Liss, Nuc Acids Research, 2002 entnommen werden.

15

## Ausführungsbeispiele

### 1. Bereitstellen von Zellen nach Laser-Mikrodissektion und Überführung in Reaktionsbehälter

20

Das Bereitstellen einzelner fixierter Zellen oder einer einzelnen fixierten Zelle nach Laser-Mikrodissektion beinhaltet die Präparation einer geeigneten Gewebeprobe. Die Gewebeprobe stammt aus Organen und Geweben von Wirbeltieren, also Tieren und Menschen, die durch herkömmliche Verfahren wie Biopsie oder Präparation gewonnen werden, beispielsweise ist die Gewebeprobe eine Gehirnprobe eines Wirbeltieres, durch Präparation und Cryostat-Schneiden gewonnen. Dazu wird dem Wirbeltier z.B. einer Maus unter sterilen Bedingungen und auf Eis das Gehirn entnommen und Frontalcortex und caudales Kleinhirn entfernt. Das Mittelhirn wird auf einem Objektisch mit Einbettmedium (z.B. tissue freezing medium der Firma Jung) versetzt und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  auf einer Schnellgefrierleiste ( $-45^{\circ}\text{C}$ ) eingefroren. Nach ca. 20 min werden bei einer Cryostattemperatur von  $-19^{\circ}\text{C}$  Schnitte einer Schnittdicke von  $12\ \mu\text{m}$  gewonnen. Diese Schnitte werden anschließend auf einen sterilen Objektträger gebracht (z.B. PALM, PEN 1mm Glas).

30

Die Fixierung und Färbung der Gewebeprobe erfolgt z.B. durch Färbung der Schnitte mit Cresylviolett (z.B. Cresyl Violet acetate Staining Dye von Sigma, C 5042). Alternativ zu den gängigen Cresylviolett Färbeprotokollen wird eine sehr schnelle Färbung in einer 100 %igen alkoholischen Cresylviolettlösung bevorzugt.

- 5 Daran schließt sich ein dem Fachmann bekanntes, jedoch verkürztes Verfahren mit Alkoholreihe an, wobei die Schnitte nach folgendem Schema inkubiert werden:

- |    |   |                |
|----|---|----------------|
|    | 1. 75% Ethanol (-20°C vorgekühlt)               | Dauer: 2 min   |
|    | 2. Cresylviolett,                               |                |
| 10 | einige Tropfen durch sterile Spritze mit Filter | Dauer: 30 sec  |
|    | 3. 75% Ethanol                                  | Dauer: 1-5 sec |
|    | 4. 100% Ethanol                                 | Dauer: 1-5 sec |
|    | 5. 100% Ethanol auf einem Molekularsieb         | Dauer: 1min    |

- 15 Alternativ werden auch andere, dem Fachmann bekannte Färbeverfahren durchgeführt. Vorteilhaft zur Erzielung einer möglichst vollständigen Dehydrierung der Gewebeprobe ist die Verwendung eines Molekularsiebes, beispielsweise das Molekularsieb der Firma VWR Merck Perlform 0,3nm und 2mm, Artikelnummer 1.057.041.000, im 100% Ethanol.

- 20 Nach der letzten Alkoholreihe werden die Schnitte in einer Box mit Trocknungsmittel z.B. Silica Gel getrocknet. Die Box mit Silica-Gel (Silica Gel with moisture indicator; Merck, 1kg Best.No. 1.01925.1000) und das 100% Ethanol-Reaktionsgefäß wird zum längeren Lagern mit Parafilm abgedichtet.

- Die Lasermikrodissektion einer einzelnen oder einzelner Zellen aus dem Gewebeschnitt wird nach Herstellerangaben z.B. PALM mit sterilen Geräten durchgeführt. 25 Dazu werden beispielsweise der Laser und alle Geräte z.B. Pipetten, Zentrifuge, Vortex, Tisch zuerst mit RNase Zap, dann mit RNase freiem Wasser gereinigt. Es werden einzelne Zellen z.B. aus der Substantia nigra aus der vorbereiteten Gewebeprobe z.B. dem dehydrierten Gehirnschnitt ausgeschnitten und in Abhängigkeit vom Präparat z.B. bei einer Distanz von 2 mm und einer Katapult-Energie von 30 78% automatisch in einen Behälter oder Deckel (z.B. Adhesive Cap bei Geräten der Firma PALM) katapultiert. Letzterer hat den Vorteil, dass kein Puffer vorgelegt werden muss. Alternativ wird der sterile Lyse/cDNA-Synthese Reaktionspuffer aber auch in einem konventionellen Deckel zum Katapulting vorgelegt.

**2. Lyse der Zellen nach Schritt 1 und reverse Transkription der RNA aus den Zellen nach Schritt 1** in einem Lyse/cDNA-Synthese Reaktionspuffer und in einem Reaktionsgefäß

- 5 Die Zelle wird nach der Lasermikrodissektion im Behälter bzw. Deckel des Cap mit 4,5µl Lyse/cDNA-Synthese Reaktionspuffer versetzt, vorzugsweise wird dazu ein unter RNase freien Bedingungen steril frisch angesetzter Puffer folgender Zusammensetzung verwendet:

Lyse/cDNA-Synthese Reaktionspuffer 1x	Menge	Endkonz.
5x first strand buffer (Invitrogen)	1,00µl	1x
10x RT-Puffer (s.u.)	0,50µl	1x
DTT (Invitrogen; 0,1M)	0,50µl	10mM
Poly-I Carrier RNA (Sigma) 1µg/mg	0,50µl	500ng
Super-RNasin (20 u/µl Ambion)	0,50µl	10u
Nonidet P40 (1:10 verdünnt; RNase-frei, Roche Diagnostics)	0,25µl	0,5%
H <sub>2</sub> O	1,25µl	

10

10x RT-Puffer	Konz.	Endkonz
dNTPs (20mM each, Amersham Pharmacia Biotech)	5mM	0.5mM
random hexamer primer (1mM, Roche Diagnostics)	50µM	5µM
Tris HCl pH 8, 100 mM	10 mM	1mM

- 15 Als cDNA-Syntheseprimer werden beispielsweise random hexamer primer eingesetzt. Als RNA-Carrier wird beispielsweise Poly-I Carrier RNA verwendet. Dem Fachmann sind weitere Alternativen zu diesen Substanzen, die mit gleichem Effekt eingesetzt werden bekannt.

Auf den Deckel wird unter sterilen Bedingungen z.B. direkt ein PCR-Reaktionsgefäß aufgesetzt und 1,5 min bei 65°C im Wärmeschrank oder beheiztem geschlossenem System inkubiert, wobei das Reaktionsgefäß auf dem Deckel steht. Anschließend kommt die Probe im Deckel kurz auf Eis und wird kurz zentrifugiert, um dann erneut kurz auf Eis gestellt zu werden.

Nun wird Reverse Transcriptase beispielsweise Superscript (SuperScript II Reverse Transcriptase RNase H<sup>-</sup> der Firma Invitrogen 100U/Reaktion) hinzugefügt und der Ansatz bei 37-38°C 2h inkubiert (Thermomixer Comfort Eppendorf; 38°C, Interval Mix). Vorzugsweise werden 0,5 µl Reverse Transcriptase eingesetzt.

10

Im Anschluss an die Lyse der Zellen und der reversen Transkription der RNA zu cDNA erfolgt die Detektion und Charakterisierung der cDNA durch Expressionsanalyse, dazu wird direkt eine qualitative (z.B. Multiplex) PCR durchgeführt. Alternativ wird der Ansatz auch sofort zur globalen PCR Amplifikation und anschließenden Microarray Analyse eingesetzt. Für quantitative Genexpressionsanalyse wird ein Aufreinigungsschritt der Einzelzell cDNA (Liss, Nuc Acids Research, 2002) empfohlen.

15

Als Positivkontrolle dient z.B. hochverdünnte Midbrain-RNA oder Referenz-RNA (z.B. von Clontech oder Ambion), die genauso wie das Probenmaterial behandelt wird.

20

Die PCR dient der Amplifikation der gewünschten Gene aus den isolierten Einzelzellen beispielsweise für eine Nested PCR. Die Durchführung der PCR-Reaktion erfolgt unter Standardbedingungen, die Primer, Puffer und Inkubationszeiten sind dabei so ausgewählt, dass sie geeignet sind, die gewünschten Gene in guter Qualität zu amplifizieren.

25

Eine Ausführungsform der Erfindung betrifft einen Kit zur Lyse von Zellen aus einer Gewebeprobe nach Mikrodisektion und reverse Transkription der RNA, mindestens enthaltend

30

- a) steril abgefüllten Lyse/cDNA-Synthese Reaktionspuffer
- b) reverse Transcriptase

Auf Grund der Lehre der vorliegenden Erfindung sowie auf Grund des allgemeinen Fachwissens in diesem technischen Gebiet ist dem Hersteller des erfindungsgemäßen Kits bekannt, wie er die einzelnen Komponenten des Kits, z.B. die Puffer steril herstellt, formuliert und lagert.

Der Kit enthält, falls es für die Kundenfreundlichkeit gewünscht wird, auch weitere Materialien zur Dehydrierung der Gewebeprobe, wie 100% Alkohol mit Molekularsieb und Silicagel. Zusätzlich ist ein steriles Reaktionsgefäß mit geeignetem Deckel zur Aufnahme der Zellen nach Mikrodissektion enthalten. Steril meint dabei,

10 dass das Reaktionsgefäß RNase- und DNase frei ist.

## Ansprüche

1. Verfahren zur kombinierten Lyse und cDNA Synthese aus RNA von einzelnen Zellen aus einer Gewebeprobe nach Lasermikrodissektion, gekennzeichnet durch die Schritte
  - 1) Bereitstellen von Zellen nach Laser-Mikrodissektion und Überführung in Reaktionsbehälter
  - 2) Lyse der Zellen nach Schritt 1) und reverse Transkription der RNA aus den Zellen nach Schritt 1) in einem Lyse/cDNA-Synthese Reaktionspuffer und in einem Reaktionsgefäß
2. Verfahren gemäß Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet dass Lyse und reverse Transkription in einem sterilen Reaktionsgefäß mit Deckel durchgeführt werden.
3. Verfahren gemäß Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet dass Lyse und reverse Transkription in einem sterilen Lyse/cDNA-Synthese Reaktionspuffer bestehend aus NP40, Carrier RNA, Super RNAsin, sowie dNTPs und cDNA Syntheseprimer durchgeführt werden.
4. Verfahren gemäß einem der vorangegangenen Ansprüche dadurch gekennzeichnet dass zwischen Lyse und cDNA-Herstellung eine DNase Reaktion stattfindet.
5. Verfahren gemäß einem der vorangegangenen Ansprüche dadurch gekennzeichnet dass die einzelnen Zellen einer biologischen Probe entstammen.
6. Verfahren gemäß einem der vorangegangenen Ansprüche dadurch gekennzeichnet dass die biologische Probe Gewebe oder Organ eines Wirbeltieres ist.

7. Verfahren gemäß einem der vorangegangenen Ansprüche dadurch gekennzeichnet dass die biologische Probe mit einer alkoholischen Cresylviolettlösung gefärbt ist.
- 5 8. Verfahren gemäß einem der vorangegangenen Ansprüche dadurch gekennzeichnet dass die biologische Probe ein dehydrierter Gewebeschnitt ist.
- 10 9. Verfahren gemäß einem der vorangegangenen Ansprüche dadurch gekennzeichnet dass die Dehydrierung in 100% Ethanol mit einem Molekularsieb erfolgt.
- 15 10. Verfahren gemäß einem der vorangegangenen Ansprüche dadurch gekennzeichnet dass die dehydrierte biologische Probe mit einem Trocknungsmittel behandelt werden.
11. Verfahren gemäß Anspruch 10 dadurch gekennzeichnet dass das Trocknungsmittel Silica-Gel ist.
- 20 12. Kit zur Lyse von Zellen aus einer Gewebeprobe nach Mikrodisektion und reverse Transkription der RNA bestehend aus
- Lyse/cDNA-Synthese Reaktionspuffer
  - reverse Transkriptase
- 25 13. Kit gemäß Anspruch 12 dadurch gekennzeichnet dass der Lyse/cDNA-Synthese Reaktionspuffer steril ist und aus NP40, Carrier-RNA, Super RNAsin, sowie dNTPs und cDNA Syntheseprimer besteht.
- 30 14. Kit gemäß der Ansprüche 12 und 13 dadurch gekennzeichnet dass er eine 100% Alkohol-Lösung mit Molekularsieb und Silicagel enthält.
15. Kit gemäß der Ansprüche 12 bis 14 dadurch gekennzeichnet dass er ein steriles Reaktionsgefäß mit Deckel enthält.