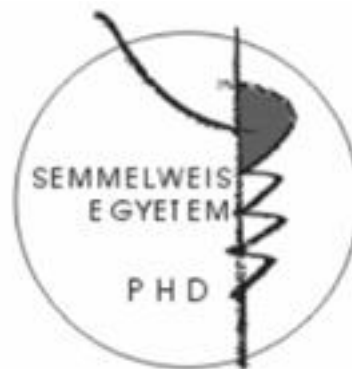


# Nukleinsav alapú diagnosztikai módszerfejlesztés a molekuláris patológiában

Doktori tézisek

**Becságh Péter**

Semmelweis Egyetem  
Patológiai tudományok Doktori Iskola



Konzulens: Dr. Rásó Erzsébet tudományos főmunkatárs, Ph.D.

Hivatalos bírálók: Dr. Tímár Botond egyetemi adjunktus, Ph.D.  
Dr. Kis Zoltán osztályvezető, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Lakatos Péter egyetemi tanár, Ph.D.  
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Patócs Attila egyetemi docens, Ph.D.  
Dr. Szentirmay Zoltán főorvos, Ph.D.

Budapest  
2014



## **1. Bevezetés**

### **Molekuláris patológia**

Napjainkban a patológia diagnosztikai palettájának egyre inkább szerves részévé válik a molekuláris technológiákon alapuló molekuláris patológia. A molekuláris patológia ötvözi a klasszikus szövettan és a molekuláris biológia módszereit és eszközeit. A nemrég még a molekuláris biológiai alaputatásokat, a molekulák szintjén megvalósuló mechanizmusok feltárását célzó módszerek ma már a mindennapi patológiai gyakorlatot szolgálják. Ennek előfeltétele, hogy a vizsgálatokat szigorú szakmai kritériumoknak megfelelő sztenderd protokollok szerint kell elvégezni. A diagnosztikus, prognosztikus és terápiás molekuláris célpontok drámai gyorsasággal növekvő száma miatt a módszerfejlesztés fontos eleme a fiatal molekuláris patológiának.

### **A tumorképződés folyamata**

Weinberg és munkatársai 2000-ben hat pontban foglalták össze a tumorok főbb jellemzőit. Nevezetesen:

1. Függetlenség a növekedési faktorok jelzéseitől.
2. Függetlenség a növekedést gátló jelzésektől.
3. Végtelen osztódási képesség.
4. Az apoptózis kikerülésének képessége.
5. Az angiogenezis, érképződés folyamatos biztosítása.
6. Szövetekbe történő behatolás (invázió) és az áttétképzés képessége.

2011-ben a szerzők újraírták a listát és kibővítették a következőkkel:

7. Az immunrendszer hatásainak kikerülése, kiiktatása.
8. A gyulladási reakció jelenléte.
9. A genomi instabilitás fenntartása és továbbfejlődése.
10. Szabályozatlan metabolizmus, hypoxia és anaerob környezet jelenléte.

Ez a feltételrendszer egy, az időben és térben komplexen változó molekuláris mátrix eredményeképpen jön létre, ahol az egyes molekulák módosulásai (kis- és nagyléptékű egyaránt) a pillangóeffektus következtében kihatnak a teljes rendszerre. Mivel egyes

molekuláris változások (akár fiziológias akár patológias jellegűek) teljesen új funkciók ellátására teszik képessé az adott molekulát és ez a jelenség képezi a daganatos evolúció alapját. A funkciók kódolása alapvetően a genomban, a sejt genetikai állományában történik és ezen belül szabályozott. Léteznek olyan kódolt eltérések, öröklött mutációk, variációk, amelyek növelik a tumor kialakulásának kockázatát az egyénben. Ha az ellenőrzésben szerepet játszó molekulák nem hajtják végre a feladatukat, akkor bármilyen eltérés kialakulása esetén a sejt elkerülheti az apoptózist és továbbörökítheti a potenciálisan függetlenséget biztosító új tulajdonságot. Az előzőekben említett történések egy instabil genomszerveződés irányába mutatnak. A folyamat végigkísérhető a tumor kialakulásától és molekuláris profilozással az egyes állomások, lehetséges útvonalak is leírhatók. Azonosíthatók az egymást követő lépések, az, hogy hogyan követték egymást az eszközök aktiválásai, csendesítései. Ezek a genomi folyamatok, de nem ez a teljes eszközkészlet. További variációk generálódhatnak a transzkripció és a transláció során is is. A funkció megjelenéséhez ez közelebb áll és nem igényli a genom változtatását. Hatékony eszköz lehet, akár sokszorosán eltérő funkciók kialakításához a másolt pre-mRNS target alternatív hasítási fragmentjeinek, úgynevezett „splice variánsainak” létrehozása. Az eredeti 10-es listát biztosan kibővíthetjük az abnormalis splicing jelenlétével is.

## 2. Célkitűzések

A molekuláris biológiai kutatások és a molekuláris patológia diagnosztikai algoritmusában egyaránt fontos szerepe van a nukleinsav sorrend eltérések pontos kimutatásának. Ez a feladat genomi és transzkriptomikai szinten is fennáll. Azt is figyelembe kell vennünk, hogy számos ilyen kérdést csak igen nagyszámú minta alapján nyert mérési eredmény statisztikai kiértékelésével tudunk megválaszolni. Ez a feladat technikailag a felhasználó szintjén könnyen kivitelezhető, de nagyon megbízható méréseket igényel. Ennélfogva a molekuláris biológiai/patológiai kutatások és az esetek egy jelentős hányadában erre alapozott diagnosztikus munkák kevésbé látványos, de kétségtelenül fundamentális része a metodika kidolgozása. Munkám során DNS és mRNS szinten vizsgáltam két olyan alapvető problémát, amelyek közül az egyik már napi rutin szintjén is megoldást igényel, míg a második, bár még a kutatás stádiumában van, de napról napra nyilvánvalóbbá válik, hogy hamarosan szerepet kap a mindennapi orvoslásban is.

- Genomi szinten felmerülő kérdés és igény a DNS báziscseréinek (SNP/mutáció) és kisebb léptékű delécióinak egy rendszerben történő szűrése nagyobb számú mintán nagy megbízhatósággal. Számos bevezetett módszer párhuzamos vizsgálatát végeztem el egy olyan modellen, amely erre optimálisnak bizonyult. Nevezetesen a humán C-Kit gén 11-es exonján, amely érdekes (de nem egyedülálló módon) egy rövid tartományban felvonultatja az egyszeri nukleotid cserék, triplétt kiesések és rövidebb hosszabb deléciók egész sorát, melyek ideálisak a technika tesztelésére.
- Az mRNS szintű munkában adott molekula alternatív splice variánsainak azonosítására alkalmas eljárások kidolgozása volt a cél. A modellként szolgáló molekula a humán CD44 volt, amelynek a variábilis régiójában található 10 variábilis exon potenciálisan több száz izoforma megjelenését teszi lehetővé. Célkitűzésem volt, hogy az izoformák azonosítására kialakított, az újgenerációs szekvenáláson alapuló módszer kidolgozásával a humán melanómák és kolorektális tumorok esetén segítsem eldönteni, hogy létezik-e tumortípus-specifikus CD44 splice-mintázat és ha igen annak melyek az adott tumortípusra jellemző izoformái (tumorspecifikus izoforma lajstrom generálása).

### **3. Anyagok és módszerek**

#### **Valós idejű PCR, szaturáló festékekkel, HRM analízissel**

A munka során alkalmazott módszerek mind PCR-en alapuló technikák voltak. A C-Kit gén 11-es exonjának rendkívül változékonnyal eltéréseinek kimutatását úgynevezett nagy felbontású olvadás görbe analízissel valósítottam meg (High Resolution Melting Curve Analysis, HRM).

A PCR hez használt primerekkel az eltérés típusának jelenlététől függően, körülbelül 135 és 171 bp tartományba eső cél régiót sokszoroztam fel.

A beállítást és a végső módszert a *LightCycler 480* berendezésen hajtottam végre (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim).

#### ***Rekombináns PCR***

A pozitív, mesterséges kontroll fragmentek előállítására rekombináns PCR technikát alkalmaztam. Az eljárás során a variáns motívumokat átfedő és hosszú PCR primerekkel sokszoroztam fel, majd egy külön PCR reakció során hozzá amplifikáltam a konstans végeket. Így előállítottam a normál PCR primerekkel sokszorozható variáns bázist a próba alapú technika analitikai teszteléséhez.

#### ***Valós idejű PCR próba jelöléssel***

A valós idejű PCR reakciókat három különböző stratégiával detektáltam. A pozitív kontrollokban található négy alrégióknak megfelelően, három és négypróbás rendszereket állítottam be. A három stratégia sorrendben a következő volt: „simple” próba jelölés három próbával, „*Taqman*” próba jelölés három és négy próbával, és végül „unlabeled” próba detektálás HRM festék és jelöletlen próba alkalmazásával

### ***Valós idejű PCR kísérlet***

A különböző detektálási stratégiák optimalizált protokollja a következő rendszer szerint állt össze. A „simple” próba rendszerhez a *LightCycler* 480 genotyping mastert használtam (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) asszimetrkus primer koncentráció jelenlétében. A jelöletlen próbákhoz használt *LightCycler* HRM master –hez (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) szintén asszimmetrikus primerkoncentrációt állítottam be. A *Taqman* próbás rendszerekhez *LightCycler* probe mastert (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) és azonos primer koncentrációt alkalmaztam. A végtérfogat 30 $\mu$ l volt és az aszimetria 5 $\mu$ Mol forward és 10 $\mu$ Mol reverse primer (Metabion GmbH, Martinsried) koncentrációt biztosított a simple és unlabeled próbák esetében, 5 $\mu$ Mol-t pedig a *Taqman* probe- alapú reakcióban mindkét primerre. A próba koncentrációk a simple, unlabeled és *Taqman* próbáknál azonosak, 5 $\mu$ Mol-osak voltak. A *Taqman* próbás rendszer többszínű mérés volt, azaz mind a 3 próbát tartalmazta ebben a koncentrációban, de egyenként különböző jelöléssel.

A MgCl<sub>2</sub> koncentráció titrálás után 3mMol volt a simple és unlabeled próba esetében. A *Taqman* próbás rendszer nem igényelt hozzáadott magnéziumot a mastermix saját, beépített mennyiségén felül. A reakciót *LightCycler* 480 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) rendszeren végeztem, TD PCR programmal.

### **Alternatív splice variánsok újgenerációs szekvenálása**

A CD44 variánsokat újgenerációs szekvenálási technológiával határoztam meg. A mérés a Roche 454 klonális szekvenátor, *GS Junior* berendezésén (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) történt. A folyamat négy elkülöníthető részből áll. A könyvtárkészítésből, a klonális sokszorozásból, a szekvenálási reakcióból és végül a kiértékelésből.

### ***RNS izolálás és átírás***

Az irányított humán CD44 alternatív splice variánsokat teljes RNS izolátum, átírt és PCR-el sokszorozott, majd tisztított termékéből mutattam ki. A folyamat eddig a pontig a SE 2-es patológia intézet tumorprogressziós csoportja által végrehajtott lépésekből állt.

A teljes RNS frakciót felnőtt scid egér xenograft, sejtvonal tumorok friss fagyasztott szövetmintáiból izolálták vissza. A beültetett sejtvonalak colorectális HT25 (M. Hendricks, Iowa), HCT116 (ICLC HTL95025), HCR31 és melanóma HT199, A2058, WM983B sejtvonalak voltak.

### ***Könyvtárkészítés az újgenerációs ampikon alapú, klonális szekvenáláshoz***

A könyvtárkészítési eljárás célja, hogy a szekvenálendő DNS fragmenteket a sztenderd újgenerációs munkafolyamat, bemeneti kémiai igényeihez igazítsuk. Az ampikon szekvenáláshoz az átírt cDNS frakciót CD44 specifikus primer párokkal sokszoroztuk fel.

Az újgenerációs szekvenálás során a bemeneti nukleinsav darabokat univerzális PCR reakcióban, gyöngyfelülethez rögzítve darabonként elkülönítve felsokszoroztam. A kapott, gyöngyfelülethez rögzített darabonként identikus klón szekvenciák bázis sorrendjét, reakcióterenként elkülönítve, piroszekvenálással meghatároztam.

A sejtvonal mintákból származó termékeket MID-ekkel azonosítottam.

### ***Klonális szekvenálás GS 454 rendszeren.***

A szekvenálási reakció egy picotiter plate-ben zajlik. A keletkező kameraképeket a program automatikusan lineáris szekvenciaisorrendé konvertálja bináris állomány formájában, minőségi adatokkal együtt. A minőségi beállításoknak megfelelően egy szűrést követően a leolvasások kinyerhetőek. A leolvasásokat MID-ekre, azaz azonosítókra szedtem, majd FASTA formátumba hoztam, a gép saját programjának segítségével. A FASTA állományokat adott exon motívumok keresésével – fishing -



kombinációkat tartalmazó állománnyá alakítottam és a kapott sorrendeket darabszámuk és megbízhatóságuk alapján szűrtem. A megbízhatóságot az adott leolvasások azonosítói alapján a gép saját programjában, a flowgramm, azaz az adott szekvenálás jelsorozatainak a vizsgálatával végeztem el.

#### 4. Eredmények

A HRM mérés során, sikeresen *csoportokba lehetett rendezni* a különböző jellegű DNS szintű eltéréseket hordozó mintákat. *Jól látszottak a normáltól egyértelműen eltérő szétolvadási karakterisztikák.*

Az SNP-t tartalmazó szekvenciák szétolvadása jellegzetes csúcsot mutattak függetlenül az eltérés pozíciójától, lényegében megőrizve az eredeti olvadáspont értéket. A delécióknál a szétolvadás eleje gyorsabb és így nagyobb különbséget látunk. Ez a különbség annál hosszabb úton volt látható minél hosszabb volt a deléció.

#### Próba alapú valós idejű PCR

Az unlabeled és simple próba rendszerek amplifikálást követő olvadáspont analízis el egymástól jól elkülönülő értékeket adtak. Az olvadáspont értékek - az első próbától a harmadik próbáig - és azoknak az elmaradásai a következőképpen alakultak. WT:67,2°C; 63,9°C; 63,3°C - DEL1:---; 63,9°C; 63,3°C - DEL2:---;---;63,3°C - DEL3:67,2°C; ---; 63,3°C -DEL4:67,2°C; 63,9°C; --; DEL12: --; --; 63,3°C - DEL123: --; --; 63,3°C - DEL1234: --; --; --; - 1ACC: 65,4°C; 63,9°C; 63,3°C - 2TTG: 67,2°C; 61,4°C; 63,3°C - 3GGA: 67,2°C; 60,8°C; 63,3°C - 4CCA: 67,2°C; 63,9°C; 61,5°C - 1234ACCTTGGGACCA: 65,4°C; 58,4°C; 61,5°C.

*Mindkét módszer alkalmas a vad típus elkülönítésére a rövid és hosszabb deléciók kimutatására olvadási érték eltolódásával.*

A hidrolízis próba rendszerénél minden régióra kaptam igen/nem választ, amit az amplifikálási görbén túl, végpontos genotipizálással tudtam kimutatni színpáronként. A detektáló csatornák függvényében először az 510nm-es és a 610nm-es emisszió grafikonját vizsgáltam. A DEL3, 2TTG, 3GGA, tripllett eltéréseket hordozó minták 510nm-es erős emisszióval, a DEL1, 1ACC tripllett eltérést hordozók 610nm-es emisszióval és a WT, DEL4, 4CCA, eltéréseket hordozó mindkét csatornán jelet adó minták szintén külön csoportokba kerültek. Az 510nm-es és a 645nm-es csatornák függvényében a DEL4, 4CCA elkülönült a 645nm-es emissziótól és a DEL1, DEL2, DEL12, DEL123, 1ACC 645nm-en adott magas értéket. A WT, DEL3, 2TTG, 3GGA mind 510nm-en, mind 645nm-en adott jelet, így itt is három csoport volt látható.

## **A CD44 alternatív splice variánsainak azonosítása**

Az azonosított exon kombinációk a minőségi szűrést követően álltak elő. A szekvenálások egyedi szignál minőségei a flowgramm alapján, a konszenzushoz való hasonlítással jól vizsgálhatóak. *Az exon kombináció jelenléteket szekvencia átfedés illesztéssel lehetett azonosítani.*

A minőségi szelektálást követően, a következő exon kombinációkat kaptam eredményül (a CD44 cDNS szekvenciában : exon1 = v1, exon10 = v10, exon a= v1 előtti szakasz, exon b = exon 10 utáni szakasz): exon1,exon8,exon9,exon10;  
exon8,exon9,exon10,exonb,exon3; exona,exon1,exon6,exon3;  
exona,exon1,exon4,exon5; exona,exon1,exonb; exona,exon1,exona;  
exona,exon1,exon6,exon7; exon3,exon3,exon4,exon5,exon6;  
exona,exon1,exon8,exon9; exon1,exon2,exon3; exona,exon1,exon2,exon3;  
exon3,exon8,exon10,exonb; exon3,exonb; exona,exon1,exon3,exon4,exon5;  
exon3,exona,exon1,exonb; exona,exon1,exonb,exon3;  
exona,exon1,exon3,exon6;exona,exon1,exon3,exon3;exona,exon1,exon3,exon4;  
exona,exon1,exon3,exon8; exon2,exon3,exon4,exon5,exon6; exona,exonb;  
exona,exon1,exon3,exonb; exon3,exona,exon1,exon3; exon3,exon6;  
exon3,exona,exon1,exon6; exon3,exon3; exona,exon1; exon1,exon8,exon9,exonb;  
exona,exon1,exon8,exonb; exon6,exon7,exon8,exon9,exonb; exon4,exon5,exon6;  
exon1,exon8,exon9,exon10,exonb; exon3,exon4,exon5,exon6,exon7;  
exon3,exon4,exon5,exon6; exon3,exon8,exon9,exonb; exona,exon1,exon10,exonb;  
exona; exona,exon1,exon8,exon9,exonb; exon3,exon4,exon6; exon3;  
exon1,exon3,exon4,exon5; exon1,exon3,exon4,exon6; exona,exon1,exon6;  
exon8,exon9,exon10,exonb; exona,exon1,exon3; exona,exon1,exon2;  
exon1,exon3,exon4,exon5,exon6; exon1,exon3; exon1,exon6, exon1,exon10,exonb;  
exon3,exon5,exon6; exon1,exonb; exon1,exon4,exon5,exon6;  
exon6,exon5,exon4,exon3,exona,exon1; exon3,exon8,exon9,exon10;  
exona,exon1,exon8,exon9,exon10; exon3,exon7,exon8,exon9,exon10;  
exon3,exon10,exonb.

## **A CD44 alternatív splice variánsainak tumorspecifikus mintázata**

A SE 2. sz Pathológiai Intézet Tumorprogressziós Laboratóriumának munkacsoportja a fentiekben részletezett módszer alapján teljessé tette több, genetikailag eltérő humán kolorektális tumor és melanóma CD44 alternatív splice variánsainak listáját és összevetette azt számos más humán tumor CD44 ASP-ével (alternative splice pattern).

Az eredmények azt mutatták, hogy létezik egy tumor típusra jellemző alternatív splice mintázat, amely kvalitatívan stabilnak bizonyult a tumorprogresszió során is. Ugyancsak eltérőnek bizonyult ez a mintázat a tumor kiindulásául szolgáló szövettípusnál fellelhető CD44 mintázattól (amely az esetek jelentős hányadában gyakorlatilag nem is expresszálta az alternatív exonokat).

A jelenség bizonyítani látszik azt a feltevést, hogy az alternatív splicing szerepet játszik a tumorok kialakulásában/túlélésében, jóllehet a mintázat kialakulásának módja egyáltalán nem ismert.

## 5. Következtetések

A választott *HRM jelölésre épülő valós idejű PCR módszer képes széles spektrumban kimutatni a legváltozatosabb eltéréseket, tehát minőségi érzékenysége, azaz a variációk jelenlétének detektálása rendkívül jó*. Felbontását tekintve megállapítható, hogy az eltéréseket jellegüknek megfelelően eltérő szignál típusal mutatja ki, de *genotipizálásra nem alkalmas*.

A célzott, próba alapú, szekvenciaspecifikus detektálás két alkalmazott formája közül, a *Taqman próbás rendszer képes adott szekvencia jelenlétére igen/nem választ adni. Nem képes azonban a tervezetten várt eltéréseken túl mást genotipizálni*.

A simple próba, hyprobe és unlabelled próba rendszerek *előre nem sejtett eltérés jelenlétét az olvadáspont értékével képes detektálni. Kontrollokkal való beállítást követően genotipizálásra alkalmazhatóak*.

A jelöletlen próbák olcsóbbak, de jelszintjük nem elég magas és így felbontóképességük alacsonyabb, fókuszált HRM analízisre alkalmasak. *Diagnosztikai feladatra a Taqman próbás és a simple próbás rendszer is használható*.

Az mRNS szintű eltérések, főként a splice variánsok jellemzője a szekvencia kombinációk heterogenitása. Ezeknek *a variációknak a felderítésében a leghasználhatóbb eljárás a hosszú leolvasással működő, klonális szekvenálással meghatározott, cDNS minták célzott PCR termékeinek vizsgálata*. Az eljárás *nem használható kvantitatív kérdések megválaszolására, de mintázat, profil összetétel, arányeltolódás, variáns kiesés, eltűnés igazolására nagy biztonsággal bevethető*. Az így szerzett *exon-kombináció adatbázis, pontos alapja a kvantitatívan is használható valós idejű, próba alapú PCR tervezésnek*.

## 6. Saját publikációk jegyzéke

### Disszertációhoz kapcsolódó publikációk

1. Becságh P, Szakács O. Setting Up a Probe Based, (2014) Closed Tube Real-Time PCR Assay for Focused Detection of Variable Sequence Alterations. Pathol Oncol Res. 22. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 24659043.
2. Becságh P, Varga K, Szakács O, Kopper L, Orosz Z. (2010) High resolution melting curve analysis of DNA sequence alterations of various sizes. Pathol Oncol Res.;16(3):421-6.
3. Raso-Barnett L, Banky B, Barbai T, Becsagh P, Timar J, Raso E. (2013) Demonstration of a melanoma-specific CD44 alternative splicing pattern that remains qualitatively stable, but shows quantitative changes during tumour progression. PLoS One.;8(1):e53883.
4. Bánky B, Rásó-Barnett L, Barbai T, Tímár J, Becságh P, Rásó E. (2012) Characteristics of CD44 alternative splice pattern in the course of human colorectal adenocarcinoma progression. Mol Cancer. 14;11:83.

### **Disszertációhoz nem kapcsolódó publikációk**

1. Orosz E, Farkas A, Ködöböcz L, Becságh P, Danka J, Kucsera I, Füleky G. (2013) Isolation of Acanthamoeba from the rhizosphere of maize and lucerne plants. Acta Microbiol Immunol Hung.;60(1):29-39.
2. Dömötör D, Becságh P, Rákhely G, Schneider G, Kovács T. (2012) Complete genomic sequence of Erwinia amylovora phage PhiEaH2. J Virol.;86(19):10899.
3. Schmidt H, Schmidt R, Niederkorn K, Horner S, Becságh P, Reinhart B, Schumacher M, Weinrauch V, Kostner GM. (1998) Beta-fibrinogen gene polymorphism (C148-->T) is associated with carotid atherosclerosis: results of the Austrian Stroke Prevention Study. Arterioscler Thromb Vasc Biol.;18(3):487-92.
4. Deák J, Lázár A, Nagy E, Benjamin Á, Becságh P, Zalka A. (2004) Optimization of a real-time PCR method for the detection of Herpes simplex virus types 1 and 2, ACTA MICROBIOLOGICA ACADEMIAE SCIENTIARUM HUNGARICAE 51: pp. 180-181.