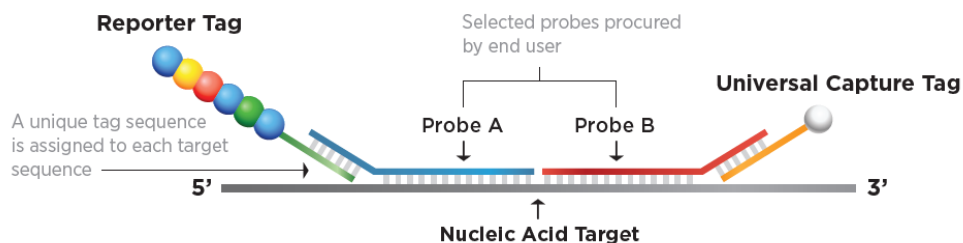


RAS diagnosztikum prototípus tesztelés

A KRAS alternatív splice-variánsok mutációs kvantitatív meghatározása Nanostring nCounter Elements technológiával

A kalitatív vizsgálatot követően kvantitatív módon is meghatároztuk az egyes splice variánsok mennyiségét. A NanoString nCounter technológia egy olyan nukleinsavak szelektív kimutatására alkalmas hibridizációs módszer, mellyel amplifikációs lépés nélkül, vagyis az egyes variánsok expressziós frekvenciájának eltorzítását kiküszöbölve tudjuk detektálni a mintáink nukleinsav összetételét.

Az eljárás molekuláris bárkódoláson és a célszekvencia (RNA/DNS) digitális kvantifikálásán alapul. A reakció target-specifikus oligonukleotid próbákból és az ún. *nCounter Elements TagSet*-ből áll. A TagSet további két részre bontható: egy fluoreszcensen jelölt specifikus „Reporter” - és egy biotinált univerzális „Capture” tag-re, melyek biztosítják a célszekvenciához történő egyidejű és specifikus hibridizációt. A hibridizáció során az egyszálú target nukleinsav (esetünkben RNS) keresztköti a célszekvenciával komplementer oligonukleotid próbákat, mely utóbbiak végeihez a tag szekvenciák vannak hibridizáltatva: az „A” próba a specifikus Reporter tag-hez és a célszekvencia 5' régiójához hibridizál, míg a „B” próba az univerzális Capture tag-gel, továbbá a célszekvencia 3' végével alkot hibridizációs komplexet. Az így kialakult struktúrát – amely tehát tartalmazza a célszekvenciát (DNS/RNS), a két oligonukleotid próbát és a TagSet-et (Reporter és Capture tagek) – Tag Complex-nek hívjuk. A Reporter tag-ek mindegyike egy egyedi, hat „helyiértékkel” rendelkező fluoreszcens jelet visel, amely jel négy féle színű fluoreszcens molekula bármilyen kombinációjából állhat, ezáltal kellően sokféle jel generálható (228 féle egyedi célszekvencia). Ez adja a fluoreszcens bárkódot, ami egyenként detektálható és megszámlálható. A Tag Complex kialakulása után az univerzális „Capture” tag sztreptavidin-biotin jelölés által egy szilárd felszínhez immobilizálja a hibridizációs komplexet, amely felszínen történik majd a leolvasás.



A TagSet és a próbák a reakcióban nagy feleslegben vannak a target molekulákhoz adva, ezáltal biztosítva minden célszekvencia hibridizációját. A hibridizáció után egy mosási lépés következik a feleslegben maradt próbák és tag-ek, valamint a nem-target nukleinsav szekvenciák eltávolítása érdekében. A mosás egy kétlépéses, mágneses gyöngy technikán

Az alternatív splice variánsok junction jellege miatt néhány variáns esetén protektor próbát is használtunk (Nanostring patent: Junction Probe Design), amelyben a cég szakértője volt segítségünkre.

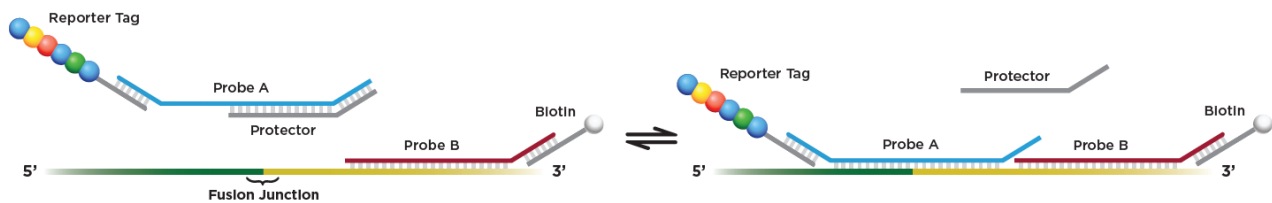


FIGURE 1: Illustration of the junction probe design methodology. Junction probes span a unique fusion junction, using toehold exchange technology for greater specificity. For a technical explanation of toehold exchange technology, see Zhang DY, Chen SX, Tin P. (2012) Optimizing the specificity of nucleic acid hybridization. Nat Chem 4(3):208-14.

A teljes splice variáns mintázatokat csak két eltérő hibridizációban tudtuk realizálni a potenciális keresztreakciók miatt. A KRAS mellett az NRAS, a HRAS, az EGFR és a WT1 ismert és nem ismert alternatív splice variánsait, a housekeeping géneket és néhány egyéb a vizsgálat szempontjából lényeges gén expresszióját detektáltuk párhuzamosan 6 kolorektális és 6 tüdő sejt vonal esetén. **A kialakított Splicing-Chip prototípusa új lehetőséget jelent a RAS mintázatának mérésére amelyet jelenleg egy RUO (research use only) terméké kívánunk fejleszteni a NanoString technológiával együttműködésben.**

Az új Nanostring RAS és más onkogén Splicing-Chip prototípusainak elrendezése:tesztelésre való előkészítése: oszlopokban a próbák, vízszintesen a teszt sejt vonalak

Probe Name	H358	H1792	SW1573	LCLC103H	H1650	H1975	HCT116	DLD1	SW480	SNUC2B	HCA7	HT29
CD274												
CTLA4												
EGFR-vIII												
EGFRdel_2-3												
EGFRdel_4												
EGFRdel_J												
GBP1												
HBB												
HLA-A												
HLA-B												
HLA-C												
HRASvar1(del_5)												
HRASvar2												
IFNG												
KRASvarA												
KRASvarB												
MET												
MLH1												
MSH2												
MSH6												
MX1												
NRASvar1												
NRASvar3												
NRASvar5												
PDCD1												
PMS2												
WT117AA+												
WT117AA-												
ACTB												
B2M												
GAPDH												
HPRT1												
RPLP0												
YWHAZ												

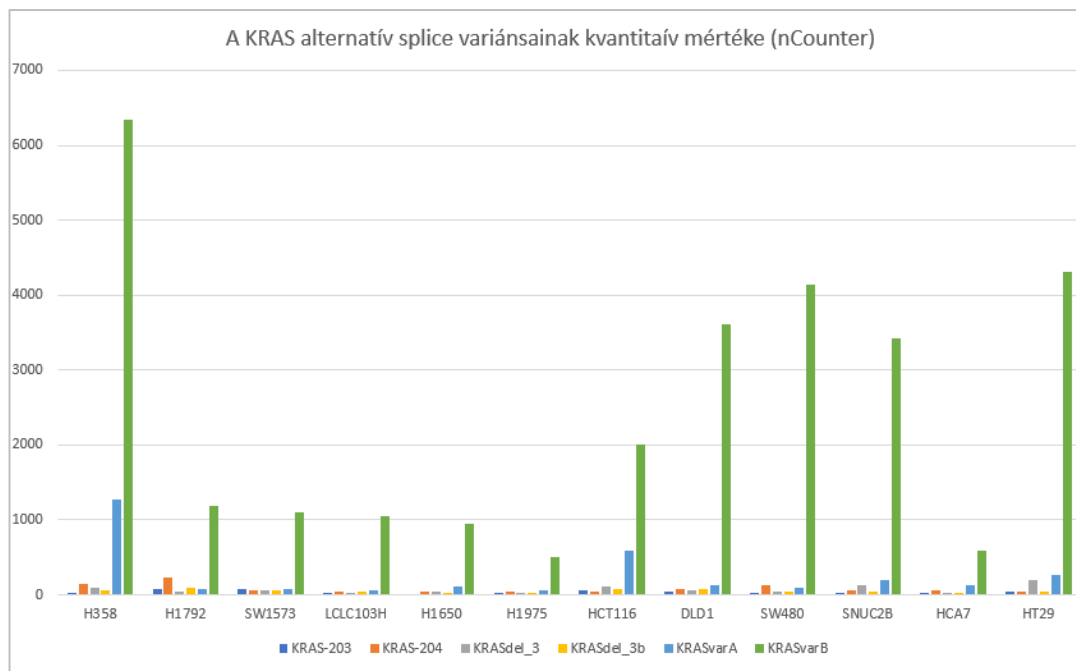
és

Probe Name	H358	H1792	SW1573	LCLC103H	H1650	H1975	HCT116	DLD1	SW480	SNUC2B	HCA7	HT29
EGFR-var2												
EGFR-var3												
EGFR-var4												
EGFRdel_13-14												
KRAS-203												
KRAS-204												
KRASdel_3												
KRASdel_3b												
NRASvar2												
NRASvar4												
WT1del_1												
WT1del_1-2-3												
WT1del_2												
WT1del_2-3												
WT1del_3												
ACTB												
B2M												
GAPDH												
HPRT1												
RPLP0												
YWHAZ												

A KRAS splice mintázat meghatározása emberi daganatsejtekben nanostring technológiával

AznCounter Digital Analyser által detektált nyers adatok elemzését aznSolver szoftverrel végeztük el. A nyers eredmények importálása után a szoftver ellenőrzi az importált adatok minőségét és megjelöli azokat, amelyek nem felelnek meg a program követelményeinek. Az adataink közül mindegyik megfelelt a program minőségi követelményeinek. A háttérzaj kiszűrésére a negatív kontrollok átlagértéke alapján generált küszöbértéket használtuk. Az adatokat az általunk meghatározott housekeeping gének (ACTB, B2M, GAPDH, HPRT1, RPLP0 és YWHAZ) és pozitív kontroll segítségével normalizáltuk. A pozitív kontrollokkal történő normalizálás a technikai hibákból fakadó eltéréseket – hibridizáció, képalkotás – egységesítik, míg a housekeeping génekkel történő normalizálás a minták közötti koncentrációbeli és minőségi eltéréseket egyenlíti ki. A normalizált adatok már alkalmasak a további kiértékelések végrehajtására és vizualizálására. A normalizált adatok elemzését a Microsoft Excel Analysis ToolPak bővítményével végeztük el. Az egyes splice variánsok mennyiségének összevetésére kétmintás t-próbát használtunk, azzal a nullhipotézissel, hogy a két vizsgált változó átlaga statisztikailag megegyezik. A t-próba alkalmazásának feltételeit – normális eloszlás, szóráshomogenitás – leíró statisztika és F-próba alkalmazásával ellenőriztük. A szóráshomogenitás egyezését, illetve szignifikáns eltéréseit figyelembe véve alkalmaztuk a két- oldali t-próbát egyenlő/nem-egyenlő szórásnégyzetekre.

Eredmények



Méréseink igazolják azt a „közhiedelmet” hogy a KRAS variánsai közül messze legnagyobb mértékben az KRAS4vB expresszálódik emberi daganatsejtvonalakban a KRAS4vA-hoz képest. A kérdést az hogy ez in vivo szöveti környezetben is így van-e? Ehhez emberi daganatszövetek vizsgálatára van szükség. Másrészt a 12 sejtvonalból 3 olyan akadt, amelyikben a KRAS4A jelentős mennyiségben volt kimutatható (25%), ezek közül egy RAS mutáns tüdőrák, 2 pedig KRAS-vad vastagbélrák sejtvonal volt. Az ábrán az is látható hogy a különféle egyéb alternatív splice variánsok aránya igen alacsony volt a többihez képest.