

1.félévi beszámoló

Szakállas Nikolett (szakallasn3@student.elte.hu)

Statisztikus Fizika, Biológiai Fizika és Kvantumrendszerek Fizikája PhD
program

Témavezető: **Molnár Béla**, M.D., DSc
Semmelweis Egyetem

Belgyógyászati és Onkológiai Klinika

Belső konzulens: **Szabó Bálint**, PhD

Eötvös Loránd Tudományegyetem,

Természettudományi Kar

Biológiai Fizika Tanszék

Dolgozat címe: Új szövet alapú egyedi sejt izolációs rendszer kifejlesztése a
horizontális géntranszfer jelenségének vizsgálatára

1 Bevezetés

Ahogy a legtöbb rák típus esetén, úgy a vastagbél daganatok korai fázisainak mechanizmusainak kapcsán korlátozott ismerettel rendelkezünk. A vastagbél daganatok kialakulása is egy több lépcsős folyamat, mely során a normál vastagbél hám- vagy kötőszövetek neoplasztikus változásokon mennek keresztül mutációk felhalmozódása mellett. A normál vastagbél szövetek teljes genomi szekvenálása (WGS) betekintést nyújtott a daganatok genomszintű és klonális evolúciójába és ekkor vált ismeretessé, hogy a neoplasztikus változások a szövet morfológiát tekintve már a normál vastagbél szövetekben is megfigyelhetők. A különböző ráktípusok kutatása során alkalmazott szekvenálási eljárásokkal azonosítani tudták azokat a (driver) mutációkat, melyek káros változásokat idéznek elő különböző gének DNS szekvenciáiban, ezzel elősegítve a rákos sejtek kialakulását, elburjánzását és a daganatos megbetegedés megjelenését a szervezetben. [1]

Az elmúlt években bővült a szekvenáló eljárások ¹ tárháza, ezzel párhuzamosan sorra jelentek meg az eredmények kiértékeléséhez szükséges bioinformatikai eszközök is. Ezek segítségével már nagyon alapos elemzés készíthető DNS szekvenciák alapján a mutációkról és a daganatokat megelőző vagy kísérő kóros jelenségekről. Az állítás alátámasztható azzal, hogy egy bioinformatikai analízis során (ha kifejezetten egy szekvenálás kiértékelésére szorítkozunk) különböző adat- és fájl típusok szolgálnak be- és kimenetként és ezek a fájlok tartalmazzák a szekvenálási nyers adatokat, a referencia genomhoz illesztett szekvenciát, a megjelenő variánsokat és azok típusait, következményeit, elhelyezkedését és egyéb releváns információkat.

2 Az aktuális félévben elvégzett kutatások ismertetése

2.1 Egyedi sejt izolációs rendszer fejlesztése

Az eddig ismert és bemutatott egyedi sejtekre irányuló mintavételi technikák általánosan nem szöveti metszetből végzik az izolációt. Azonban igény felmerül arra vonatkozólag, hogy egyedi sejt méret tartományban is képesek legyünk szöveti mintavételt elvégezni. Ez a fajta mintavétel paraffin fixált vagy gyorsfagyasztott szövetblokkokból vágott metszeteket igényel, melyek speciális tárgylemezekre kerülnek felvételre. Az izoláció módja eltérő lehet, a legtöbb esetben ez lézer mikrodisszekciós eljárás alkalmazását vonja maga után. Az igazi kihívást ezeknek a lézer mikrodisszekált mintadaraboknak a mozgatása jelentheti. Az elmúlt félévben többek között a felvételi és lerakási lépéseknél igényelt levegőáramoltatás lehetséges eszközének és módjának kiválasztásával és optimalizálásával foglalkoztam, ezen belül pedig az alkalmazott levegő áramoltató eszköz mechanizmusainak elméleti leírásán és a különböző paraméterek értékeinek kísérleti igazolásán dolgoztam. A kutatás részét képezte továbbá a lehetséges izolációs módok kiválasztása, megvalósíthatóságuknak elemzése.

Mivel az elszívás egy többkomponensű, változó cső átmérőket tartalmazó rendszerben valósul meg, annak áramlástanra alapozott tanulmányozása nem egyszerű feladat a különböző fellépő áramlástanai profilok miatt, de szükségszerű az áramlási sebességek, a fellépő nyomásesések tekintetében. Az áramlási sebesség, a nyomásesés és a térfogatáram mind meghatározó abból a szempontból, hogy sikerül-e egy adott mintát elragadnunk, megtartanunk, majd kiengednünk a

¹A DNS szekvenálás egy biokémiai módszer, mely a DNS nukleotid bázisainak sorrend meghatározására használható.

gyűjtőhelyre. A rendszerre vonatkoztatott áramlási jelenségeket tanulmányoztam munkám során, ám a kapott paramétereket szükséges igazoló kísérletekből származó eredményekkel is alátámasztani. Az említett mérések egy részének végrehajtása és az eredmények kiértékelése és az elméleti megközelítésből kapott adatokkal való összehasonlítása még folyamatban van.

2.2 CRC-NAT mintapárok szekvenálása, bioinformatikai kiértékelése

A féléves munkám másik részét a vastagbéliszövetekből származó CRC (tumoros) és NAT (tumor melletti egészséges) eredetű mintapárok szekvenálási adatainak kiértékelése képezte. A használt szekvenátor az Oxford Nanopore Technologies PromethION típusú modellje volt. A szekvenátorból származó kimeneti adatok áramsűrűségek, melyek függenek a nanopórusok nagyságától és abban található DNS/RNS összetételétől, ezeken első lépésként bázisazonosítást szükséges elvégezni. A bázisazonosítás során az elektromos jelet a DNS/RNS bázisaivá, másnéven nukleotidaivá konvertáljuk. A bázisazonosítással párhuzamosan vagy azután megtörténhet a szekvenációk referencia genomhoz való illesztése. A kapott adatok sorbarendezése, indexelése és egy egésszé való egyesítése után nyerhetőek ki különböző alapstatisztikák (pl. ATGC mennyiség, metilációk kimutatása, átlagos read hosszak stb.) Ezt követi általában a variánsazonosítás, melynek eredményei alapján akár génekre, kromoszómákra szűkítve összefoglalhatóak a meglévő mutációk tulajdonságai. Az adatok feldolgozását és kiértékelését különböző bioinformatikai programokkal és Python programnyelv használatával végeztem.

A CRC-NAT párok általános szekvenálásán felül egy mintapárt adaptív szekvenálási eljárással is elemeztünk. Az adaptív szekvenálás lényege, hogy nem a teljes genomról gyűjtünk információt, csupán az annak 1-2%-át kitevő kódoló régiókról. Ez azt jelenti, hogy adott bázishosszúság átvizsgálása után amennyiben arra nem igazak az adaptív szekvenálás követelményei, az átugrásra kerül és csak a kódoló régiók kerülnek szekvenálásra, ez pedig egyfajta dúsulást eredményez kitüntetett régiók esetén. Ez kifejezetten hasznos a ritka mutációk detektálása kapcsán. Az adaptív és normál szekvenálás eredményei összehasonlításra kerülnek.

Egyelőre kevés irodalom született a vastagbél szövetből származó CRC-NAT párok szekvenálása és az adatok kiértékelése kapcsán, legalább is az általunk használt Nanopore szekvenátort illetően. Az eredmények alapján betekintést kaphatunk a daganatok korai és/vagy későbbi fázisának mechanizmusaira, rálátásunk lehet a DNS tulajdonságaira, sérüléseire és ezáltal a célzott terápiák új potenciális célpontokkal bővíthetnek.

3 Tanulmányi tevékenység az aktuális félévben

A félév során az alábbi tárgyakat végeztem el:

- Adatmodellek és adatbázisok a tudományban (FIZ/3/086)
- Bioinformatika (Simmelweis Egyetem, DI0085-KV)
- Evolúciós játékelmélet (FIZ/3/059E)

4 Konferenciák az aktuális félévben

Ebben a félévben 2022. december 5. és 7. között részt vettem a hibrid formában megrendezett Nanopore Community Meeting 2022 konferenciáján.

References

[1] H. Lee-Six et al.

The landscape of somatic mutation in normal colorectal epithelial cells

Nature, Vol 574: 532-556, 2019

doi: 10.1038/s41586-019-1672-7