



3DHISTECH

Solution

resides in the

details



A projekt a Magyar Kormány támogatásával, a Kutatási és Fejlesztési Innovációs Alap támogatásával valósul meg.

Certified company
ISO 13485:2003 / ISO 9001:2008

Address: 1121 Budapest, HUNGARY
29-33. Konkoly-Thege Miklós Str., Bld. 6.

Phone: +36 1 392 22 74
Fax: +36 1 392 27 23

info@3dhitech.com
www.3dhitech.com



Szakmai jegyzőkönyv (utolsó frissítés: 2015.04.20)

A projekt céljának összefoglalása

3DHISTECH Kft.

A daganatos elváltozások diagnosztikájához, tipizálásához és terápiás érzékenységének meghatározásához alapvető ismereteket adhat a paraffinba ágyazott minták molekuláris vizsgálata. Ezeknek a reakcióknak az elvégzése ma fluoreszcens próbákkal történik. A fluoreszcens in situ hybridizációs (FISH) technika rutin elterjedése, bevezetése azonban a képalkotás oldaláról több fizikai, elméleti problémát hordoz (Autofluoreszcencia, gyenge jelölési erősség, limitált marker szám, különböző erősségű jelölés, kvantifikálás, artefaktumok, tumorheterogenitás, minta kiégés és kolokalizáció). Projektünk keretében megvizsgáltuk, lehetséges-e ezen ismert, eddig meg nem oldott elméleti fizikai problémákra egy olyan új választ adni, amelyekkel a FISH jelölések rutin elterjedését elősegíthetjük, kiértékelését automatizálhatjuk.

SE:

Az utóbbi évek genomikai kutatásai révén a különböző tumortípus nagyszámú mintáinak genomszekvenálásával mérhetetlenül sok már ismert, vagy új mutációt írtak le, ezzel párhuzamosan az epigenetikai módszerek fejlődésével lehetővé vált a DNS metilációs mintázatát, illetve a mikro RNS molekulák expresszióját genom szinten tanulmányozni. Újabban olyan adatbázisok válnak bárki által szabadon hozzáférhetővé, amelyek genomszintű mutációs, DNS metilációs, illetve mikro RNS expressziós adatokat is tartalmaznak. Ezek az adatok jó kiindulópontjai olyan célzott vizsgálatoknak, melyek egy konkrét biológiai kérdést céloznak megválaszolni. Ebben az alprojektben különböző vastagbélrák (CRC) minták molekuláris biológiai karakterizálásával olyan motívumokat / típusokat igyekszünk azonosítani, amelyek a vastagbél daganatok tipizálását, terápiás választ jelezhetik előre.

ELTE:

Az elmúlt pár évben az ún. újgenerációs szekvenátorok (NGS) hihetetlen fejlődésen mentek át úgy kapacitásban, mind pedig ár/érték arány tekintetében. Az általuk szolgáltatott információ nagyságrendekkel részletgazdagabb mint bármi eddigi vizsgálaté. A részletek között rejtőzik valahol az az információ amire szükségünk van az egészséges és rákos állapotú szervezet közötti különbségek megismeréséhez, aminek tudatában jobk diagnosztikai és gyógyítási eljárások fejleszthetőek ki. Ezen részletes információk nélkül mindez valószínűleg ugyanannyira reménytelen, mint amennyire a sejtszintű folyamatok megértése volt a mikroszkóp feltalálása előtt. A pozitív hozadék mellett persze az új technológiák új kihívásokat is magukkal hoznak. Az információ "tűje", amire szükségünk lenne, a számunkra egyelőre mellékes információ "szénakazalban" rejtőzik.



Első részfeladat

2013.01.15-2013.07.10

3DHISTECH Kft.

- Autofluoreszcencia kompenzálás

Az autofluoreszcencia csökkentésére 2 úton indultunk el. Az első drágább, technológiailag azonban fejlettebb, gyorsabb jobb képet adó módszer a *confokalis* képalkotás bevezetése- A confokalis technika előnye , hogy a képalkotó részletet nem a teljes metszetről gyűjti ki, hanem az 5 um-es vastagságú szövettani minta 1-1 um-éből. Ezzel a fluoreszcens kép autofluoreszcenciája csökken.

Multspektrális képalkotás: Ezzel a módszerrel szoftveresen lehet a képminőségét javítani. A vizsgálni kívánt mintákból 1-1 referencia metszetről festés nélküli mintát is be kell digitalizálni különböző 3-4 hullámhosszon. Ezek után ebből a spektrálisan felvett egy dekompozíciós könyvtárat, modult kell kialakítani. Ebben benne van a hullám hosszak szerinti erősítésgyensítés faktorai. Az új mintákat már csak normál festéssel, de több hullám hosszban felvéve, a dekompozíciós könyvtárat alkalmazva lehet már autofluoreszcencia mentes képet előállítani.

- FISH próbák fény kibocsátása/ elnyelődés a szövetekben, sejtmag vastagság és használt metszetvastagság.

A formalin fixált paraffinba ágyazott minták fény átengedésének fokozása lehetségessé vált LED Laserek alkalmazásával, a megvilágítás erejének fokozásával. A LED laserek további előnye, hogy egyszerre egy vagy több de választott hullámhosszúságú laserrel lehet megvilágítást, általunk meghatározott ideig és erővel alkalmazni. A confokalis képalkotás segítségével 5 um feletti metszetekben is lehet megfelelő minőségű képet alkotni.

- Jelölések száma 3, de legalább 6-7 fajta kellene

A LED laserek segítségével, multspektrális dekompozíciót alkalmazva lehetséges 6-7 különböző festék, jelölés alkalmazása után autofluoreszcencia kompenzálás után, immunhisztokémiai és FISH reakciók párhuzamos detekciója. Ezzel csökkenthető a festések közötti áthallás (Cross-talk) is.

- Jelölések különböző erőssége , FITC, Texas red színben, kompenzálás



A digitalizálás során egy automatikus erősség kompenzációt építettünk a scannelési programba. Ez minden egyes képnél, a különböző csatornák átlag megvilágítási szintjét meghatározza és adott szint feletti eltérés esetén ezeket újra digitalizálja, hosszabb expozíciós idővel, ill. nagyobb megvilágítási erővel. Az automatikus átlag megvilágítás meghatározás segítségével így a különböző jelölési erősségek, különböző erősségű képek közötti különbség eltűnik. A digitalizált tárgylemez képe homogén lesz.

- Quantifikálás, strukturális és számbeli eltérések

A FISH jelek quantifikálására alkalmas szoftver csomag kifejlesztése történt meg. A FISH jelek meghatározását sejtmagonként kell elvégezni. A sejtmagok szegmentálását azonban mintatípusonként különböző módon kellett kifejleszteni. Citológiai, hematológiai mintákban a sejtmag igen könnyen elhatárolható. Szövettani metszetekben azonban nem. Itt a sejtmagtorlódás és a félbe vágott sejtmagok miatt rugalmasabb, kézzel javítható módszert kellett kifejlesztenünk. A sejtmagdetekció utáni FISH quantifikálásnak ki kell terjednie strukturális és mennyiségi eltérésekre is. Ezen algoritmusok kifejlesztése is megtörtént.

- Artefaktumok

Az artefaktumok kiszűrése autofluoreszcencia meghatározás után történik. Az autofluoreszkáló, szabálytalan formájú képletek szoftverrel automatikusan törölhetők a digitális tárgylemezből.

- Szövetszerkezeti lokalizáció : 200 sejt számolás, heterogenitás

A digitális tárgylemezek segítségével lehetséges most már a normál hematoxilin-eosin és a fluoreszcens FISH tárgylemez összevetése egymásra vetítése. A 2 digitális tárgylemez között lehetséges koordináció kialakítás is. Ez azt jelenti, hogy azt a területet, amit a hematoxilines tárgylemezen kiválasztunk, jó láthatóságban, annak párhuzamosa területét a nehezen értékelhető FISH tárgylemezen automatikusan bejelöljük és a kiértékelést ezen hajtjuk végre. A teljes tárgylemez használatával, elérhetőségével, a tumor különböző területein is elvégezhető a FISH kiértékelése. Ezzel a tumor heterogenitásáról kaphatunk információkat.

- Minta kiégés



Megoldási fejlesztés: A nagy érzékenyséű scientific CMOS kamerák lényegileg az összes foton begyűjtését lehetővé teszik. Ezzel a megvilágítási idő és energia csökkenhet, amivel a minta kiégése megszűnik. A kiégés megelőzését támogatja a speciális Fluorofor objektívek alkalmazása. Ezek oldalirányú felbontóképessége kisebb, de fényáteresztő képessége nagyobb.

- Kolokalizáció

Munkánk során a kolokalizációs eltérések csökkentésére multispektrális szűrőszettek alkalmaztunk. Ezeket angol nyelven 4pas vagy 5pass szűrőknek nevezik. Ezek a szűrők egyszerre 4 vagy 5 excitációs hullámhosszt tudnak átengedni a mintákra és 4 vagy 5 emissziós hullámhosszon képesek a fényt kibocsátani, amelyek a mintákból jöhetnek. Így nem kell a szűrőket változtatni, amivel a mechanikus mozgásból, a szűrők különböző fizikai formájából eredő helyzetet lehet csökkenteni, megszüntetni. Ezek a szűrők természetesen nem annyira fényhatékonyak, a hullámhosszai között nagyobb lehet az áthallás, de a fent leírt szoftver fejlesztésekkel ezeket lehet kompenzálni.

SE

A vastagbél daganatok molekuláris karakterizálásához egyfelől egy multiplex mutációs hotspot PCR panelt hoztunk létre, másrészt a DNS metilációs mintázatát genomszinten vizsgáló módszert (Methyl Capture) teszteltünk fagyasztott, illetve paraffinos mintáinkon.

A vastagbélrákban előforduló, illetve az eddig leírt mutációk tanulmányozására a COSMIC adatbázist használtuk. Az itt fellelhető adatokból is kiderül, hogy a legtöbb mutáció a gének bizonyos kisebb szakaszaira esnek, vagyis úgynevezett forró pontokba (hotspotokba) tömörülnek. Ebből kiindulva egy daganat mutációs profiljának felvételéhez nem szükséges a minta teljes genomját megszekvenálnunk, elég csak a forró pontokra öszpontosítanunk. A mutációs hotspotok szekvenálására ezért egy multiplex PCR panelt terveztünk, amely 39 primerpárt tartalmaz. A panel révén a vastagbél rákokban a 12 leggyakrabban mutálódó, illetve az onkodiagnosztikában rutinszerűen vizsgált gének mutációs forró pontjait tudjuk felszaporítani. A multiplex PCR termékeket a következő lépésben egy GS Junior újgenerációs szekvenáló készülékkel szekvenáljuk meg. A 12 gén listáját, a CRC-ben lehetséges mutációik gyakoriságát, illetve azt, hogy ezek mekkora részét vizsgálja a multiplex PCR panel, az 1. táblázat tartalmazza.

A vastagbél daganatok DNS metilációs profilját a teljes genom szintjén kívántuk vizsgálni. Ennek megvalósítására a Methyl Capture módszert választottuk, amellyel a minták genomjából a hipermetilált DNS szakaszokat tudjuk kitisztítani. Az eljárás során a DNS-t fragmentáljuk, és egy metilcsoport-kötő fehérjével precipitáljuk. Ezen lépéseket a debreceni UD-Genomed kft. végezte el, mivel Magyarországon csak ők rendelkeznek az erre alkalmas műszerekkel. A technika hatékonyságát kvantitatív PCR segítségével ellenőriztük, melyhez a primereket magunk terveztük és teszteltük. Mivel a paraffinba ágyazott minták vizsgálhatósága sok előnnyel járna, ezért a módszer tesztelésekor a fagyasztott minták mellett paraffinba



ágyazott mintákon is elvégeztük a precipitálást. A tesztelés eredményéből egyértelműen kiderült, hogy a fagyasztott mintákkal jól működik a módszer, míg a paraffinos minták sajnos nem használhatóak.

ELTE

A humán genom 3 milliárd bázispárból áll, de az NGS vizsgálatok során kapott információ könnyen elérheti a több tucat terabájtot. Ennek befogadására bővítettük szervereinket mind diszkekkel, mind pedig alkalmassá tettük őket a sokprocesszoros futtatásra. A hardver önmagában nem oldja meg a feladatot, gyors szoftverekre, hatékony adatstruktúrákra van szükség. Ilyen mennyiségű adatnak pusztán átmásolása is napokat vehet igénybe, bonyolultabb keresések optimalizáció nélkül gyakorlatilag kivitelezhetetlenek lennének. Felállítottunk tehát gyors indexelést lehetővé tevő adatbázisokat (SQL Server) valamint több szoftvert is felinstalláltunk, amik a szekvencia-illesztésekhez és elemzésekhez kellenek. Az illesztő szoftverek, amiket több szoftver kiértékelése után végül használunk, a csökkenő sebesség és növekvő pontosság sorrendjében a Bowtie, SHRiMP és a BLAST szoftverek. Statisztikai elemzésekhez MATLAB ill. R/Bioconductor csomagokat telepítettük, illetve saját fejlesztésű kódokat használunk.

Három nagy adatbázist vizsgáltunk meg közelebbről, illetve töltöttünk át belőlük adatokat a szervereinkre. A GEO – Gene Expression Omnibus egy nagy komplex adatbázis, amely leginkább génexpressziós tanulmányok adatait tartalmazza. A meta-adatok kereshetőek (ezt teljes mértékben áttettük szerverünkre és részletesebb keresésre tettük alkalmassá) és a kiválasztott nyers adatok (CEL file-ok) letölthetőek. Az SRA - Sequence Read Archive (SRA) nyers NGS szekvenálási adatokat tartalmaz melyeket nemzetközi kutatócsoportok különböző platformokon gyűjtöttek. A legszéleskörűbb rákkutatás genomikai adatbázis a TCGA – The Cancer Genom Atlas. Itt teljes genom szekvenálási, expressziós, metilációs, SNP, micro-RNS, stb. adatok állnak rendelkezésre több különféle platformon, a daganatos betegségek számos válfajára. Megismertük az adatbázis szerkezetét és colorectalis daganatokkal kapcsolatos adatokat töltöttünk le, ez fogja adni további vizsgálataink gerincét.

Saját vizsgálatokból két mintacsoport szekvenálására volt lehetőség. Az egyik poolozott vérplazma mintákon alapult. Mintánként mintegy 500 millió - 1 milliárd 50 nukleotid hosszúságú short read keletkezett ABI Solid platformon. Ahhoz hogy egyedi különbségeket is fel tudjunk deríteni, néhány egyedi mintának teljes genom szekvenálását is elvégeztük, itt mind egészséges mind rákos betegekből vérplazma illetve biopszia mintát vizsgáltunk. A minták short read-jeit illesztettük a referencia humán genomhoz több módszerrel is. Az elemzés során számos érdekes különbséget találtunk az egészséges és beteg minták között, melyek egy része megfelel a szakirodalomból már ismerteknek, az eredmények részletes kiértékelése a következő félév feladata, a csatolt ábrákon egy viszonylag könnyen érthető nagyskálás eltérést mutatunk be, mely egyes rákos mintákban kromozómatorést mutat ki.



Második részfeladat

2013.07.10-2014.01.06

3DHISTECH Kft és SE

- Autofluoreszcencia

A sebészeti, invazív radiológiai, biopsziás vizsgálatok során, autopszia során a formalin fixálás elősegíti a szövettani struktúrák épen maradását, az önmésztés gátlását és a mikroszkópos vizsgálatra alkalmas minta előkészítést. A formalin azonban autofluoreszkáló struktúrák kialakulását is elősegíti. Ez azt jelenti, hogy mindenféle fluoreszcens jelölés nélkül a vörösvértestek, a kötőszöveti struktúrák, fehérje depozitumok, de kisebb szinten minden sejt, ami a szövettani metszetben van, fluoreszkál, minden hullámhosszon, különböző mértékben.

Ez a molekuláris eltérések kimutatására szolgáló fluoreszcens jelölésekkel átfed, azokat elnyomhatja.

Megoldási fejlesztés:

Háttér kivonás: A festődés nélkül autofluoreszkáló elváltozásokat, háttér zajok legkézenfekvőbb eltávolítása egy plusz, festésre nem jellemző fluoreszcens csatorna felvétele és kivonása a jelölést tartalmazó képből egy plusz szűrő használatával. Ezt a scannelési program módosításával és a képrögzítési algoritmus fejlesztésével tudtuk elérni. Ez ugyan hosszabbítja a képfelvétel idejét (100 ms/kép) de képminőségben nagyon nagy javulást eredményez.

- FISH próbák fény kibocsátása / elnyelődés a szövetekben, sejtmag vastagság és használt metszetvastagság.

A genetikai eltérések kimutatására ma 20-100 000 nukleotid, bázispár hosszúságú fluoreszcens molekulákkal (FITS, Rhodamin, Cyanin 5,7) direkte, vagy indirekte jelölt próbákat használunk. A próbák hosszát limitálja a diffúziós képességük, ezzel arányosan pedig az általuk kibocsátható fluoreszcens fény is limitált. A FISH reakciókat ezért 3-5 um vastag szövettani metszeteken végzik el. A paraffinos beágyazás során a sejtmagok mérete 8-12 um. A FISH reakciók célja a sejtmagon belül található genetikai eltérések kimutatása. Így az alkalmazott metszetvastagság és a cél objektum között szignifikáns méretbeli különbség van, ami fals eredmények megszületéséhez vezethet.

*Megoldási fejlesztés:*

A confocalis tárgylemez scannelési technikával képesek vagyunk akár több fókuszszíkot külön-külön is felvenni, 500-nmes távolsággal. Ezek után a metszet 6-12 umes vastagságában külön- külön is, térben látjuk a korábban csak pontként vizualizálható FISH módszerrel jelölt genetikai eltéréseket . A genetikai eltérések egymáshoz való térbeli viszonya adhatja meg két gén egymáshoz való kapcsolatát. Ez 3 dimenziós vizualizálása teljes magstruktúra képet tud bemutatni, erre korábban nem volt lehetőség.

- Számolás : különböző genetikai próbák, különböző színek, különböző fókusz síkok

A FISH vizsgálatok célja a számbeli és strukturális genetikai eltérések kimutatása.

A FISH vizsgálatok hagyományos optikai mikroszkópban történő elvégzésekor azonban a jelek számának, távolságának, helyének meghatározása szubjektíve történik, becsléssel. A jelek lehetnek különböző fókusz síkban, akár a levágott, elvesztett metszet síkban. Távolság meghatározásra ez nem alkalmas. A 2 dimenziós FISH jelölt magokban a jelölések pontos mérete, egymáshoz való távolsága optikailag limitált, korlátozott értékű.

Megoldási fejlesztés:

A 3D-ben felvett mag képeken jelölés szegmentálás kidolgozása. Az elszegmentált, elhatárolt jelölések méretének és egymástól, magon belüli helyzetének, méretének meghatározása algoritmus fejlesztés.

SE és ELTE

Tovább bővítettük az előző fázisban létrehozott adatbázisokat A TCGA és SRA nemzetközi archívumból letöltött adatokkal. Többek közt lehetőség nyílt például egy olyan mintahalmaznak (SRA archívum) az elemzésére, amely egyedi rákos sejtek szekvenálásának adatait tartalmazta mely különösen alkalmas a genetikai diverzitás szerepének vizsgálatára. Ezen kívül a TCGA archívumában rendelkezésre állnak, és elemzésre kerültek különböző típusú rákos mintákból származó adatok, melyek fontosak a saját colorectalis daganat minták elemzésének értelmezéséhez.

Az NGS adatok referencia genomokra illesztése után sokféle statisztikai, bioinformatikai elemzést végeztünk el. Egyrészt olyan szakaszokat kerestünk a genomban, amelyek lefedettsége a különböző mintákban szignifikánsan eltér. Ezek utalhatnak kromoszómatorésekre vagy ellenkezőleg bizonyos szakaszok megtöbbszöröződésére, átrendeződésére, ami a rákos folyamat oka illetve következménye lehet. Mivel leginkább a béltraktushoz kapcsolódó rákos elváltozásokat elemezzük, nem hagyható figyelmen kívül a bélflórában élő sok ezer mikroorganizmus szerepe sem. Relatív új felfedezés, hogy ezek dinamikai egyensúlyának megbomlása akár jelentős egészségügyi problémákkal járhat, és akár rák szignatúra is lehet. A nagyszámú faj genomikai elemzése, különösen nehéz bioinformatikai feladatot jelent, ilyen típusú elemzéshez is fejlesztettünk statisztikai eszköztárat és végeztünk elemzéseket.



A mutációk vizsgálatában az elmúlt és során több érdekes új eredmény született a nemzetközi szakirodalomban. Ezek feldolgozása alapján egyre inkább az a kép rajzolódik ki, hogy nem véletlen mutációk a problémák elsődleges okozói, hanem a már részben feltárt DNS javító mechanizmusok kóros működése (pl. BRCA1 gén, APOBEC mechanizmus). Mindezek alapján sikerült nekünk is demonstrálni, hogy a mutációk speciális mintázatokban („cancer signature”) jelennek meg, melyet inkább a lokális nukleotid elrendezés karakterizál, mintsem a kromoszóma-pozíció.

A teljes genom szekvenálási eredmények kiértékelése mellett szem előtt tartottuk a következő fázisban végrehajtandó methyloma elemzés szempontjait is, illetve a SE kutatóival közösen megterveztük az újabb minták methyl-capture vizsgálatát, mely a következő fázisban valósul meg.



Harmadik részfeladat

2014.01.07 – 2014.07.01.

3DHISTECH Kft.

- Spot (egy-egy fluorokrómmal jelölt gén) detekció fluoreszcens mintán

A sejtmagok szegmentációja után a spot csatornákon történő spotdetekció következik. Minden, a FISH próbában szereplő csatornán megkeressük azon spotokat, melyek valamely sejtmaghoz hozzárendelhetők. Spotdetekció esetén célunk volt, hogy a spotokat hasonlóan a sejtmag-detekcióhoz, tudjuk detektálni széles intenzitástartományban, azaz halvány és erős festődésű spotokat, valamint kezeljük az autofluoreszcencia hatást is.

A spot-szegmentációs algoritmus vázlata a következő:

1. FindMaxima algoritmus futtatása a spot-csatornán, mely megadja a lehetséges spotok csúcsait
2. Növeljük a spotokat (a csúcsoktól) watershed algoritmussal a hozzájuk tartozó völgy széléig
3. Azon spotokat, melyek között az intenzitás-csökkenés mértéke egy adott szint alatt van, vonjuk össze egy spottá
4. Az így kapott lehetséges spotokat rendeljük hozzá a detektált sejtmagok egyikéhez. Amennyiben egyik sejtmaghoz sem rendelhető hozzá, az a spot a háttérhez tartozik.

A megtalált lehetséges spotokhoz olyan paramétereket rendeltünk, melyek alapján a próba szabálynak megfelelően ki tudjuk választani, hogy ténylegesen részt kell-e veyen a próbában:

1. Autofluorescent intensity on the spot channel

2. Sizes of spots
3. Intensities of spots
4. Contrasts of spots
5. Contrasts between the neighboring spots

A próba típusa definiálja, hogy ezeknek az paramétereknek mennyi a minimális értéke. Így kiválogattuk a próba alapján figyelembe veendő spotokat, mely alapján ez után már tudunk classzifikálni.

- FISHquant 1.16.2. alkalmazás funkciói

A szoftver alkalmazásainak definiálásakor az egyik legfontosabb szempont a rutin diagnosztikai módszertannak történő megfelelés mellett, olyan funkciók biztosítása, melynek segítségével, még több, részlet gazdagabb információ adható a felhasználó számára. A program felülete letisztult, és megpróbáltuk egyértelmű helyekre és sorrendben megjeleníteni a beállítási opciókat. Az algoritmus egy „Quant Center” nevű képfeldolgozó applikációkat tartalmazó felületen nyílik meg. A FISHQunat választható algoritmus, mely kijelölése után a FISH minták kiértékeléséhez szükséges paraméterek jelennek meg.

A fluoreszcens *in situ* hibridizáció molekuláris technika minden olyan szöveti típuson elvégezhető, mely ép DNS-t, vagy RNS-t tartalmaz, melyhez a fluoreszcensen jelölt, a vizsgálandó gén szekvenciáival komplementer oligonukleotid szakaszok hibridizálni tudnak. Ilyen minta típusok lehetnek, metszetek, tumor lenyomatok, citológiai kenetek, valamint sejt szuszpenziók. A hematológiai kórképek kimutatására használt perifériás vér vagy csontvelő minták limfocitáiból sejtenyészeteket is készítenek, mely minták így nem csak nem osztódó interfázis sejteket, hanem metafázis osztódási állapotban lévő sejteket is tartalmaznak. Az algoritmus sejtmag detekciója éppen ezért nem csak interfázis sejtek szegmentálására alkalma, hanem osztódó sejtek azonosítására is. Számos hematológiai kórképnél megfigyelhető, hogy míg a nem osztódó



sejtek nem tartalmaznak specifikus genetikai eltérést, a mintában lévő tumor sejtek nagyobb osztódási képességének köszönhetően az osztódásban lévő sejtekben megtalálható a genetikai aberráció. A metafázis azonosítása opcionálisan választható algoritmus típus a programban.

A fluoreszcens mintákban, nagymértékű autofluoreszcenciát láthatunk, ez a háttér aspecifikus festődés zavarja a mérést és a vizuális ellenőrzését a digitális mintának. Ezért a Quant Center rendelkezik egy autofluoreszcencia szűrő opcióval, mely egy adaptív threshold elvén alapuló képtisztítási eljárás.

SE

Az előző két munkaszakaszban 60 szövetmintának határoztuk meg a mutációs profilját az általunk létrehozott mutációs hot-spot panel segítségével, újgenerációs szekvenálással. A metilációs profil vizsgálatához szintén egy újgenerációs szekvenáláson alapuló technikát, a Methyl Capture módszert állítottuk be, majd 32 szövetmintát készítettünk elő a vizsgálatra. A mintákon a Methyl Capture eljárást az UD-Genomed kft végezte el, ennek hatékonyságát ellenőriztük PCR technikával, majd jóváhagytuk, hogy az affinitás tisztított mintákat a továbbiakban megszekvenálják.

A jelen munkaszakasz során készültek el a szekvenálások, melyek minőségét az ELTE munkacsoporttal ellenőriztük. Összességében a három minőségbiztosítási vizsgálatból egynél, A CpG Coverage elemzésnél a minták jelentős része gyengének bizonyult. Ennél az elemzésnél a MEDIPs program kiszámítja az összes metilációs hely lefedettségét, majd összesíti, hogy az összes metilációs hely hány százaléka van egyszeresen, kétszeresen stb. lefedve. Ennek háttérében az állhat, hogy a megrendelt 20 milliónál általában lényegesen kevesebb readet sikerült szekvenálni mintánként, ezért a minták újraszekvenálását kértük az UD-Genomed kft-től. Eközben a már meglévő adatokkal megkezdtük a normál, adenoma és a tumoros mintacsoportok összehasonlító elemzését metilációs mintázatuk szempontjából. Az UD-Genomed kft. a hiánypótló szekvenálásokkal július hónap közepére készült el, ezek minőségellenőrzését is elvégeztük, továbbá megkezdtük a kiegészült adatokkal a mintacsoportok összehasonlítását.

ELTE

Az első két munkaszakaszban a DNS szintjén bekövetkezett változásokat elemeztük. Ez csupán az egyik lehetséges forrása a végül funkcionálisan megjelenő változásoknak. A másik kritikus lépés, az, hogy a DNS-ben kódolt gének expresszálódnak-e. Az expresszió egyik, talán legjelentősebb ismert szabályzófaktora a DNS metiláció, amikor is bizonyos génekhez tartozó szabályzó régiókban (CpG szigetek) lévő citozin nukleotidok metilálódnak. A metilációt közvetlenül a DNS szekvenálás nem mutatja ki de lehetséges a metilált citozinokat átkonvertálni (biszulfit konverzió) vagy pedig csak azokat a DNS részleteket specifikusan kiszűrni, amelyek metilált bázisokat tartalmaznak („methyl capture”). Most ez utóbbit alkalmaztuk egészséges, adenomás és rákos mintákra. A kiszűrt szekvencia-részleteket az előző szakaszokban tárgyalt NGS metodikával megegyező módon megszekvenáltattuk. A szekvenálási munka két



fázisban történt. Minőségbiztosítási vizsgálatokat végeztük el, és megállapítottuk, hogy az első körben megkapott szekvenálási mélység önmagában nem elégíti ki a követelményeket, de a második körben kapott adatokkal együtt alkalmasak a további elemzésekre.

Több szoftvermegoldást is kielemeztünk, amikkel a methyl capture adatok feldolgozhatóak, és végül a MeDIPS (<http://omictools.com/sequencing/medip-seq/medips-s1005.html>) metodológia mellett döntöttünk, ez a legmodernebb, legrészletesebb elemzést lehetővé tevő módszer. A workflow a szekvenálást, majd illesztést követően a minták minőségét értékeli ki. Ezek után az adatokat normalizálja, validálja és differenciális lefedettség értékeket határoz meg, amelyekhez funkcionális annotáció is tartozik. A szoftver pipeline-t telepítettük, és az elemzés első lépéseit ezzel végeztük el.

A módosított munkatervnek megfelelően, a saját minták elemzését kiegészítendő metilációs adatokat töltöttünk át a TCGA adatbázisából. Itt egy másik kísérleti technikával, az Infinium HumanMethylation27 ill. HumanMethylation27 BeadChip-pel gyűjtöttek egyedi bázis-szintű metilációs információt normál és tumor mintákból. A minták áttöltése után azokat adatbázisba rendeztük, és összekapcsoltuk a UCSC CpG –sziget adatbázisával, majd differenciális metilációs térképeket készítettünk.



Negyedik részfeladat

2014.07.01-2014.12.15.

3DHITECH Kft.

Az előző munkaszakaszban felállított adatbázisokra és kialakított metodikára alapozva a saját és TCGA, valamint Luo et al. minták metylációs mintázatait vizsgáltuk meg. Egyrészt a saját szekvenálások adataiban, megkerestük azokat a gén-régiókat, melyek metylációs mintázata szignifikánsan elkülöníti az osztályokat (normal, AD, CRC). Az eredmények validációját a fenn említett független minták (Illumina 450-es chip) segítségével végeztük el. Néhány jól ismert, a rákhoz kapcsolódó jelátviteli útvonalban részt vevő gén promoter régiójának metylációs mintázatát külön megvizsgáltuk. Megkerestük a hozzájuk tartozó ún. CpG szigeteket, és az ezekkel átfedő szakaszokon kiértékeljük a metylációs jeleket mind a saját minták, mind pedig a TCGA és Luo adatok alapján. Megállapítottuk, hogy számos szakasz található mely hypermethylálódik, de azt is, hogy nem feltétlenül teljes CpG szigetek átlagait érdemes vizsgálni, mert gyakran egy-egy szakaszon belül is nagy variabilitás tapasztalható. Az epigenetikai és mutációs változások kapcsolatának vizsgálatához, azon géneket, melyek mutációja kimutatható volt, külön megvizsgáltuk metyláció szempontjából is. Ezeknek a géneknek bizonyos szakaszait egy külön mutációs panellel is vizsgáltuk, ezekre a részletekre, a metylációt is kiértékeljük. Az eredményekről részletes heat-map ábrákat és táblázatokat készítettünk.

SE

A Semmelweis Egyetem munkaszakasz során a kapott eredmények kiértékelését végezte a klinikai szempontból fontos csoportokban. A metylációs eredmények kiértékelése és verifikációja mellett miRNS, transcriptom array vizsgálatokat végeztünk el. Ezeknek a vizsgálatoknak a segítségével a metyláció központi szabályozására kívánunk alap mechanizmusokat felderíteni. A munkacsoport egyik tagja perifériás vér plazma vizsgálatokat végzett el metylációs markerek ill. miRNS markerek alkalmazhatóságra vonatkozóan. Ezek vizsgálatok kiértékelése a következő munkaszakaszban lesz elérhető.

A metylációs vizsgálatainkban a kiértékeléseinkben az 50 legfontosabb, legnagyobb eltérést mutató génszekvenciát azonosítottuk és verifikáltuk eredményeinket a TCGA vagy a nemzetközi irodalomban elérhető, összehasonlításra használható adatasteken amelyet Luo és munkatársai közöltek (Gastroenterology, 2014, 147:418-429), (1,2,3,4,5,6,7,8 ábra a mellékletben.)

ELTE



- Digitális tárgylemezek továbbítása szerver felé,

A Munkaszakasz ebben a feladatában egy technikai jellegű fejlesztést oldottunk meg. A fluoreszcens digitális tárgylemezek orvosi munkaállomáson történő kiértékeléséhez szükséges a tárgylemezek serveren történő tárolása, illetve a scannelés során direkt oda történő írása. A fejlesztés során a fluoreszcens FL scannelő programunkat fejlesztettük tovább abba az irányba, hogy a helyi lokális lemez helyett a megadott kiválasztott serverre írjunk, direkt a „CASECENTER” tárgylemez tároló programunkba.

- Fluoreszcens spot detektálás, kiértékelő algoritmus fejlesztés

A korábban kifejlesztett SPOT dektciós algoritmusunk, FISHQUANT programunk klinikai engedélyeztetését végeztük el (CE-IVD). Ehhez 2 független laboratóriumban 100- 100 rutin FISH mint festését mikroszkópos kiértékelését végeztük el először. A festett minták között megtalálható volt szöveti és sejtes FISH festések(ALK-RET, HER2, hematológiai panel). A minták hagyományos mikroszkópos kiértékelése után digitalizáltuk őket, majd A FISHQUANT programot használva elvégeztük a gépi, szoftveres kiértékelést. Itt a mikroszkópos kiértékelés 200 sejt számához képest, több ezres sejten tudtunk eltéréseket meghatározni, akár több sejtpopulációt elkülöníteni. A mérési adatok szerint a gépi szoftveres kiértékelésünk (FISHQUANT) korreláló eredményt adott, a magas mért sejtszám tekintetében a szoftver képes volt minimális reziduális betegséget okozó (MRD) sejt csoportokat azonosítani a minták 5% hiba határ alatt levő negatív hematológiai esetekben.

- Szöveti FRET technikák kifejlesztése

A szöveti jelölések során az egyes jelölések közötti távolság meghatározása történhet morphometriás úton, 2D- 3D s távolsági mérésekkel. Egy új útja a pontos méréseknek a fluoreszcens rezonancia energia transfer (FRET) módszer. Itt a 2 jelölés két olyan molekulával van jelölve, amelynek egyi szerep az energia kibocsátás, fény aktiválás után (donor), a másik fényt bocsát ki ha ez az energia csomag eléri . Az energia átadás csak adott távolságon belül jöhet létre.

Ennek hazai úttörője Dr. Vereb György, Szöllösi János a debreceni egyetem Biofizikai Intézetének kutatói professzorai. Az általuk közölt és fejlesztett szöveti FRET algoritmus implementálása történt meg szoftver rendszerünkben.

- Spektrális dekompozíció digitális tárgylemezre való implementálása,



A szöveti minták fluoreszcens FISH festésének velejárója az autofluoreszcencia, az aspecifikus festések bekötődése, a festések közötti áthallás, cross-talk. Ezek az alap eltérések különösen megnehezítik a pontszerű festődést adó genetikai jelölések (DNS, mRNS, miRNS FISH, fluoreszcens in situ hybridizáció) kiértékelését. Jelenleg főként emiatt a nukleáris festődések mellett csak 2 próbával festünk eltéréseket (FITC, Rhodamin), pedig sokkal többre is szükség lenne. A többes jelölések elvégzéséhez a tiszta zajmentes háttér mellett fontos lenne a fluoreszcens jelölések közötti áthallás (crosstalk)szintjének csökkentésére, eltörlésére.

Ennek a 2 funkciónak az elvégzésére alkalmas lehet a spektrális dekompozíció, azaz az egyes festések specifikus hullámhosszának a meghatározására, az átfedő festési spektrumok elszeparálása.

Ezt végeztük el, a case viewer program implementáltuk a spektrális dekompozíciót elvégző algoritmusunkat.

Az így létrejövő multi-markeres festésekre először egy négyes festési kombinációt alkalmaztunk: DAPI/FITC/Rhodamin/Cy5 fluoreszcens markereket alkalmaztuk és nukleáris DNS, SFRP1, CA7, b-aktin in situ hybridizációt végeztünk el.

- 3D-s monitoron történő, multifokális digitális tárgylemezek vizualizálása

A molekuláris jelölések specifitása (in situ DNS, mRNS, miRNA) pontos vizualizációt eredményez a sejten belül, mag területen vagy citoplazmatikus területeken (3.,4. ábra). A fehérje jelölések inhomogenitásával szemben , itt tényleges kvantifikáció lehetséges a pontszerű jelölések megszámlálásával. Ehhez azonban a horizontális kiértékelése (X/Y) mellett egy Z irányú vizualizáció és kvantifikálás is szükséges. Ezt értelemszerűen 3 dimenziós térben lehet és kell elvégezni, 3 dimenziós vizualizálás során.

A 3dimenziós vizualizálás lehetséges normál monitorokon is, virtuális 3dimenziós képalkotással. A megjelenő 3 dimenziós monitorok, képernyők új lehetőséget adtak a pontosabb, élvezhetőbb, alkalmazhatóbb képalkotásra.

A 3 dimenziós monitorok első generációja úgynevezett szemüveges (passzív vagy aktív) módszer alkalmaz. Ezek a monitorok egyre nagyobb méretben, egyre csökkenő árral érhetők el.

A szemüveg nélküli 3D monitorok megjelenése, kifejlesztése most kezdődött el. Ennek egyik első fejlesztője az I-PONT Kft, amelynek szemüveg nélküli monitorát alkalmaztuk.



3DHISTECH

S o l u t i o n

resides in the

d e t a i l s

3DVIEW vizualizációs programunk, mely szövettani digitális tárgylemezekből, mintákból képes sejtes komponenseket kiemelni, azokban nagy felbontással mindegyik fluoreszcens csatornát egyben vagy külön-külön vizualizálni.

A 3DVIEW program képes a 3D monitorok felé szükséges video outputot generálni.