

# AZ EMBERI MÁJRAK KOMPARATÍV GENOMIKAI OSZTÁLYOZÁSA

Kaposi-Novák Pál

Semmelweis Egyetem, Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola, Budapest

A génextpresszió microarray-alapú globális elemzése sikeresen alkalmazható a humán tumorok, közöttük a primer májrákok karakterizálására. A microarray technológia elősegítheti a rákbetegek korai diagnózisát, prognosztikus és terápiás klasszifikációját. Annak érdekében, hogy az archivált patológiai mintákban elrejtett genomikai információhoz jobb hozzáférést biztosítsunk, három különböző fixálószerrel kezelt, paraffinba ágyazott szöveteken vizsgáltuk az RT-PCR reakciók hatékonyságát. Minden fixálószer esetén megbízható amplifikációt kaptunk, amennyiben az amplicon mérete nem haladta meg a 225 bp-t. A termék hossz további növekedésével azonban a reakció hatékonysága és reprodukálhatósága gyorsan csökkent. A legjobb szöveti morfológiát és a legegyszerűsebb claudin-4 és claudin-7 immunhisztokémiai festést ugyanakkor a formalin-fixált minták esetén láttuk. A konvencionális lineáris RNS-amplifikációs protokollt egy random nonamer T3-polimeráz lépéssel módosítottuk. A T7T3 amplifikáció olyan „sense” szálú terméket hozott létre, ami indirekt jelölt cDNS-templáttá volt konvertálható. A fagyasztott és mikrodisszekált Myc és Myc/TGF- $\alpha$  egértumorok microarray-elemzése az amplifikációt követően jól reprodukálható expressziós profilokat ( $r=0,9$ ) eredményezett, az eredeti expressziós mintázatok megtartottak voltak ( $r=0,78$ ). A HGF-kezelt, c-Met kondicionális knock-out és kontroll egerekből származó májsejtek expressziós profiljainak összehasonlításával 690, a HGF/c-Met útvonal által szabályozott gént azonosítottunk. A szignifikáns gének funkcionális elemzése azt mutatta, hogy a c-Met receptor a májsejtek motilitásának és oxidatív homeosztázisának fontos regulátora. A c-Met-indukált expressziós mintázat kifejeződését humán HCC-kben is vizsgáltuk, és beazonosítottuk a humán tumorok egy csoportját (27%), melyekben a c-Met útvonal aktivációja valószínűsíthető (MET+). E tumorokra a gyakori vaszkuláris invázió, a magas mikrovaszkuláris sűrűség és a többihez képest rövidebb túlélés volt jellemző. Egy, a 111 evolúcionálisan konzervált c-Met-célgén expresszióján alapuló predikciós modell pedig 83–95%-os pontossággal volt képes a májrákban beteget a jó és a rossz túlélést mutató csoportokba szétválogatni. Összességében kutatásaink megmutatták, hogy a gondos kísérlettervezés és a legkorszerűbb molekuláris technikák felhasználása mellett archivált és ezáltal ritka mintákon is lehetővé válik a globális génextpresszió elemzése. A komparatív genomikai analízis segítségével pedig olyan új molekuláris klaszifikációs rendszereket hozhatunk létre, amelyek nélkülözhetetlenek az individualizált daganatterápiás protokollok létrehozásához. Magyar Onkológia 53: 61–67, 2009

Levelezési cím:

Dr. Kaposi-Novák Pál  
Semmelweis Egyetem  
II. sz. Patológiai Intézet  
1091 Budapest  
Üllői út 93.  
Telefon/Fax:  
(06-1) 215-6921

Témavezető:

Dr. Kiss András

**Kulcsszavak:** máj, hepatocelluláris karcinóma, transzgén egér, génextpresszió, genomikai klasszifikáció

Global transcriptome analysis has been successfully applied to characterize various human tumors, including hepatocellular carcinomas. This novel technology can facilitate early discovery as well as prognostic and therapeutic diversification of cancer patients. To enhance access to the genomic information buried in archived pathology samples, we assessed RT-PCR amplification rates in paraffin-embedded tissues preserved in three different fixatives. Reliable amplification could be achieved from all paraffin-embedded specimens, when the amplicon size did not exceed 225 bp. A longer amplicon size resulted in rapid decrease of yield and reproducibility. In addition, formalin provided superior morphology and better reactivity with claudin-4 and -7 immunohistochemistry. Amplification of the initial sample is often required before transcriptome analysis of clinical specimens could be performed. We introduced a random nonamer primed T3 polymerase reaction into the conventional linear RNA amplification protocol. The modified T3T7 method generated a sense strand product ideal for synthesizing indirectly labeled cDNA templates. Microarray analysis of amplified frozen and laser-microdissected Myc and Myc/TGF $\alpha$  mouse liver tumors confirmed good reproducibility ( $r=0.9$ ) of the reaction and conservation of original transcriptional patterns ( $r=0.78$ ). Finally, we tested the utility of expression profiling for the classification of human HCC samples. By comparing expression data from HGF-treated c-Met conditional knock-out and control primary mouse hepatocytes, we identified 690 HGF/c-Met target

genes. Functional analysis of the significant gene set implicated *c-Met* as key regulator of hepatocyte motility and oxidative homeostasis. Cross comparison of the *c-Met*-induced transcription signature with human HCC expression profiles revealed a group of tumors (27%) with potentially activated *c-Met* signaling (MET+). These tumors were characterized by higher vascular invasion rate, increased microvessel density, and shortened survival. A prediction model based on 111 cross-species conserved *c-Met* signature genes was able to diversify HCC patients into good and bad prognostic groups with 83–95% accuracy. Our results therefore demonstrate that careful experimental design and state-of-the-art laboratory methods could open the way for global expression profiling of archived and limited availability pathologic samples. Comparative functional genomics based analysis of the cancer transcriptome could lead to novel molecular classification systems which are essential for the introduction of individualized cancer therapeutics. Kaposi-Novák P. Comparative genomic classification of human hepatocellular carcinoma. *Hungarian Oncology* 53: 61–67, 2009

**Keywords:** liver, hepatocellular carcinoma, transgenic mice, DNA microarray, genomic classification

## BEVEZETÉS

A hepatocelluláris karcinóma, avagy májrák, előfordulását tekintve az ötödik leggyakoribb rosszindulatú daganatos betegség a világon, és évente több mint 500 000 ember halálát okozza. A májrák kialakulásához vezető legfontosabb rizikófaktorok viszonylag jól ismertek. A daganat kialakulását szinte minden esetben több évtizedes krónikus májgyulladás előzi meg, amelynek hátterében legtöbbször krónikus hepatitis B-, hepatitis C-fertőzés, toxikus vagy metabolikus eredetű elváltozások állnak, amelyek gyakran májcirrózissal is társulnak. Jól ismert, hogy a malignus tumorok kialakulásának hátterében a sejtproliferációt és a sejthalált szabályozó géneket érintő genetikai elváltozások szekvenciális felhalmozódása áll. Az egymásra halmozódó genetikai és epigenetikai elváltozások lépésről lépésre történő felhalmozódása vezet el a tumorok kialakulásához, és azok disszeminációjához. Bár a májrákban számos jelentős szereppel bíró genetikai elváltozást sikerült azonosítani, a hepatokarcinogenezis pontos patomechanizmusa egyelőre nem ismert. A Rb, E-cadherin, p16 és egyéb tumorszuppresszor gének allélvesztés és epigenetikai eltérés révén történő inaktivációja már korai neoplasztikus elváltozásokban is kimutatható. Az előrehaladott stádiumban lévő májtumorok pedig számtalan, a genom egészét érintő genetikai eltérést tartalmaznak, amelyek között a p53 és  $\beta$ -catenin onkogének mutációja, valamint az 1q és 8q kromoszómaregiók amplifikációja és a 8p és 17q szakaszok deléciója fordul elő a leggyakrabban. A HCC-s betegek igen magas halálozási arányát elsősorban a daganat terápiás próbálkozásokkal szembeni rezisztenciája okozza. A HCC-s betegeknek csak a legkorábbi stádiumban diagnosztizált viszonylag kis hányada bizonyul alkalmasnak valamely agresszív sebészi kezelésre, mint a májtranszplantáció vagy a májresektó, ami kuratív lehet. Mai tudásunk szerint a májrák-személyek rezisztensek szinte az összes elérhető kemoterápiás szerrel szemben, ezért az előrehaladott stádiumban lévő betegek számára a terápiás lehetőségek száma limitált. A tumorellesztő szereket új generációja áll kifejlesztés alatt. Ezek a tumor kialakulásában szerepet játszó jelátviteli utakat specifikusan gátolva fejtik ki terápiás hatásukat.

Számos ilyen szer, mint a bevacizumab vagy sorafenib, biztató eredményeket mutattak a kezdeti klinikai tesztek során. Ezért nélkülözhetetlen olyan molekuláris klaszifikációs módszerek kifejlesztése, amelyek képesek a változatos genetikai elváltozásokat tartalmazó májrákban azokat beazonosítani, ahol ezeket az új, célzott terápiás szereket a legnagyobb sikerrel alkalmazhatjuk.

A nagy felbontású genetikai profilalkotási technikák elterjedésével a rendelkezésünkre álló genetikai információ drámai módon megnövekedett. Elérhetővé vált a tumorsejtekben végbemenő összes transzkripciós elváltozás egyidejű detektálása. Az expressziós microarrayeket sikeresen alkalmazták különféle humán tumorok molekuláris hátterének feltérképezésére. A májrákban is meghatározásra kerültek a különféle klinikai, prognosztikai és virális faktorokhoz köthető génexpressziós eltérések. A tumorokban látott expressziós profilok komplexitása miatt azonban az elváltozás hátterében álló onkogenetikai elváltozás direkt azonosítása általában nem lehetséges. Az egyes jelátviteli útvonalak aktivációjára jellemző transzkripciós mintázatokat szövetkultúrákban valamint állatmodellekben, ahol a kísérletes változók megfelelően kontrollálhatók, viszonylag egyszerűbben azonosíthatjuk. A komparatív genomikai módszerek pedig lehetővé teszik, hogy az evolúció során konzervált ortológ gének egymás mellé rendezése révén a kísérleti modellekből származó mintázatokat a humán léziókban is vizsgálhassuk. Így olyan új molekuláris klaszifikációs rendszereket hozhatunk létre, amelyekben az emberi tumorok patogenetikai hátterük alapján kerülnek besorolásra.

A technológia fejlődésével elérhetővé vált a paraffinba ágyazott szöveti mintákban található RNS kinyerése, ami korábban nem volt általánosan lehetséges. Korábbi tanulmányok az mutatják, hogy alternatív szöveti fixatívumok, mint például az RNAlater használata a hagyományos formalinfixációval szemben jelentősen javíthatja a patológiai mintákból molekuláris analízisre kinyerhető nukleinsavak mennyiségét és minőségét. Az új, jobb hatékonyságú RNS-izolációs módszerek elterjedése további segítséget nyújthat a paraffinba ágyazott archivált szövetekben rejlő genetikai információ

feltárásában. A szöveti RNS mennyiségét mérni képes valósídejű PCR elemzések során viszonylag rövid szekvenciák kerülnek amplifikálásra, ezért ez a technika különösen alkalmas olyan minták elemzésére, ahol az RNS fragmentált. Ugyanakkor bármilyen fixáció esetén alapkövetelmény a szöveti morfológia, illetve az immunhisztokémiai markerek reaktivitásának mind tökéletesebb megőrzése. Ezek ugyanis nélkülözhetetlenek a pontos patológiai diagnózis felállításához. Ezáltal a patológiai archívumokban tárolt szövetekben rejlő genetikai információ elérhetővé válik a kutatás számára, ami jelentős számú, kiválóan dokumentált minta elemzését teszi lehetővé. A rutin módon kezelt szövettani mintákon végzett expressziós vizsgálatok ezen felül lehetőséget teremtenek új molekuláris tesztek diagnosztikai bevezetésére is.

A komplex illetve kisméretű elváltozások elemzése során gyakran felmerülő probléma, hogy az eltérő szöveti alkotóelemek, a morfológiailag jelentősen különböző sejtsoportokban bekövetkező transzkripciós elváltozások csak egymást átfedve, esetenként zavarva értékelhetők. A microarray-alapú géneexpresszióanalízis, a lézer-mikrodisszekció és a mágnesgyöngyös vagy áramlási citometriás sejtszétválasztási technikák kombinációjával lehetővé vált, hogy az egyes komplex elváltozásokon belül csak egy meghatározott sejtpopulációt vizsgáljunk. Például egy tumoron belül külön elemezhetjük az epiteliális és a kötőszöveti komponenset. A kinyert minta mennyisége azonban sok esetben nem teszi lehetővé a hagyományos cDNS-jelölési módszerek alkalmazását, amelyekhez legalább 100 ng poli(A) szeparált mRNS vagy 10–20 µg teljes RNS szükséges. Ilyenkor az RNS-minta amplifikációjára van szükség, amire számos PCR-alapú és lineáris amplifikációs technika került leírásra. Mára az oligonukleotid-próbákat tartalmazó microarray-k váltak a legelterjedtebb platformmá. Ezeknél a mintákat általában indirekt, aminoallil-konverzió alapuló reakcióval jelöljük. Annak érdekében, hogy az új platformokon kis mennyiségű klinikai mintákat is elemezhesünk, a hagyományos lineáris RNS-amplifikációs módszerek módosítása elkerülhetetlenné vált.

Kísérleteink során a legfejlettebb molekuláris biológiai módszereket használtuk fel annak érdekében, hogy a humán hepatokarcinogenezis folyamatát jobban megismerhesük, és olyan molekuláris klasszifikációs rendszereket dolgozzunk ki, amelyek lehetővé teszik a májrákban szenvedő betegek prognózisának megbecsülését, és teret nyitnak a személyre szabott molekuláris terápiák előtt.

## CÉLKITŰZÉS

1. Rutin szöveti fixációs metodikák hatása a patológiai minták expressziós analízisére. Vizsgáltuk, hogy a különböző rutin szövettani fixációs metodikák (formalin, acetone, etanol) milyen mértékben őrzik meg a szövetekben az mRNS integritását, valamint azt,

hogy real-time RT-PCR segítségével lehetséges-e az ily módon archivált tumorminták transzkripciós analízise.

2. A kis mennyiségű biológiai minták oligonukleotid microarray alapú expressziós analízisét lehetővé tevő lineáris RNS-sokszorozási technológia kifejlesztése. Célul tűztük ki olyan mRNS-amplifikációs metodika kifejlesztését, amely kétkörös virális RNS-polimeráz (T7 és T3) amplifikációt alkalmazva sense szekvenciájú RNS-terméket generál, és felhasználható aminoallil-jelölt cDNS szintézisére.
3. A T7T3 lineáris RNS-sokszorosítás reprodukálhatóságának és megbízhatóságának vizsgálata. Bizonyítani kívántuk, hogy a T7T3 metodika lehetővé teszi igen kis mennyiségű, lézer-mikrodisszekált szöveti minták microarray-analízisét oly módon, hogy az amplifikáció eredménye reprodukálható és jól korrelál az amplifikáció nélküli microarray-kísérletekben kapott géneexpressziós értékekkel. Ezáltal jól alkalmazható kisméretű hepatikus léziók vizsgálatára.
4. A HGF/c-Met jelátviteli útvonal által transzkripciós szinten regulált célgén azonosítása genetikailag módosított egérmodell segítségével. Célunk volt, hogy *c-met* kondicionális knock-out és kontroll ege-rekből izolált primer hepatociták géneexpresszióját rekombináns HGF kezelés után különböző időpontokban (30 perc, 2, 12 és 24 óra) microarray-vel vizsgálva feltérképezzük, és meghatározzuk a HGF/c-Met jelátviteli útvonal aktivációja által indukált hepatocita-specifikus transzkripciós választ.
5. A HGF májsejtekben betöltött fiziológiás hatásának elemzése a célgén funkcionális klasszifikációjával. Vizsgálni kívántuk a HGF célgén funkcionális klasszifikációja alapján a HGF/c-Met útvonal aktivációjának hatását a májsejtek fenotípusára és homeosztázisára.
6. Humán hepatocelluláris karcinóma molekuláris klasszifikációja összehasonlító funkcionális genomikai módszerekkel. A komparatív funkcionális genomikai elemzést alkalmazva az elsők között vizsgáltuk a genetikailag módosított egérmodellben azonosított HGF/c-Met-specifikus célgén expressziós profilját humán hepatocelluláris karcinómákban és azonosítottuk a humán tumorok azon alcsoportját, ahol a c-Met-aktiváció részvétele a tumor patogenezisében kimutatható.
7. A c-Met útvonal aktivációjának a humán májrák patogenezisében betöltött szerepének vizsgálata. Az expressziós mintázat alapján a HGF/c-Met útvonal aktivációját mutató májrákoknak a többi tumorról való összehasonlító klinikopatológiai elemzése során feltártuk azon változó csoportját, amelyek összefüggést mutatnak a géneexpressziós mintázattal.
8. Géneexpressziós mintázaton alapuló prediktív statisztikai modell megalkotása. Célunk volt, hogy a c-Met-indukált géneexpressziós mintázat és a túlélés korrelációja alapján olyan prediktív modellt alkossunk, ami képes a HCC-s betegek prognózisának előrevetítésére.

## MÓDSZEREK

*A humán máj- és endometriális minták gyűjtése*

Az endometrium-minták jóindulatú méhelváltozásban szenvedő, menopausa előtt lévő, 35–43 év közötti betegekből származtak, akik a beavatkozást megelőzően semmilyen hormonkezelést nem kaptak. A tizennyolc humán endometrium-minta mindegyikét a hisztorektómiát követően azonnal háromfelé osztottuk, és fixáltuk a három különböző fixáló valamelyikében. A szövettanilag 5–5 ml friss 10%-os pufferelt (pH 7,0) formalinban vagy RNAlaterben egy napig, vagy 5 ml  $\text{CuSO}_4$ -szaturált acetoneban hatvan percig szobahőn fixáltuk. Ezt követően a mintákat a rutin szövettani protokollt követve paraffinba ágyasztuk.

A 139 hepatocelluláris karcinóma-mintát és 60 párosított tumormentes környező májból vett mintát 138, lobektómián átesett májrákos betegből izoláltuk. A tumorok között virális (HBV, HCV), toxikus és örökletes anyagcserezavar (hemokromatózis,  $\alpha 1$ -antitripszin-hiány) hátterén kialakuló is megtalálhatóak voltak. Hetven beteg estében tumorközeli májból származó nem tumoros minta is elérhető volt. Normális kontrollként tizennyolc, metasztatikus vastagbélrák vagy közlekedési baleset miatt májreszekción átesett betegekből származó tumormentes mintákat használtunk. A szövetek tárolása és felhasználása az összes érintett intézet kísérleti bizottsága által jóváhagyottan történt.

*Egérmodellek*

A c-Met receptor kondicionális knock-out egérmodell létrehozása során a c-Met gén 16-os exonja került módosításra a Cre-loxP metodika felhasználásával. A c-Met 16-os exonját megcélzó génkonstrukttal a 16-os exont megelőző intronba egy loxP-felismerőhelyet, míg az exont követő intronba egy flox szakasz határolt neomicinrezisztencia-génszakaszt juttatunk. Az így létrehozott c-Met<sup>wt/t</sup> állatoknak keresztezése során homozigóta c-Met<sup>flox/flox</sup> és c-Met <sup>$\Delta 16/\Delta 16$</sup>  genotípusok jöttek létre. Az Alb-Cre törzsből a Cre rekombináza expresszióját a humán albumin gén promótere szabályozza, így a Cre-indukált delécia a posztnatális májsejtekre specifikus. A c-Met<sup>flox/flox</sup> és Alb-Cre vonalak párosításával létrejöttek az Alb-Cre<sup>+/+</sup> / c-Met<sup>flox/flox</sup> kondicionális KO és a kontrollként használt Alb-Cre<sup>+/+</sup> / c-Met<sup>wt/wt</sup> genotípusok.

Az RNS-amplifikációs kísérletek során használt Alb c-myc monotrászgen és az Alb c-myc / MT TGF- $\alpha$  kettős trászgen egértörzsek létrehozásának részletes leírása, valamint az ezekre az állatokra jellemző patológiai elváltozások összefoglalása szorosan nem kapcsolódik a dolgozat témájához, de korábbi közleményekben elérhető. A májkarcinóma-mintákat nyolc hónapos állatokból gyűjtöttük. A negatív kontroll minták két B6/CBA genotípusú egér májából kerültek

felhasználásra. Minden állatkísérleti eljárás a National Institutes of Health állatkísérletekre vonatkozó irányelvei szerint került végrehajtásra.

*Primer májsejtek izolálása és kezelése*

A primer májsejtek izolálásához két lépcsős kollagenázemésztést használtunk. A kollagenázemésztést követően az életképes májsejteket (~95%) az egyéb sejtfrakcióktól percoll sűrűséggradiens-centrifugálással választottuk el. Az így megtisztított májsejtfrakcióból edényenként  $2 \times 10^6$  sejtet a letapadást segítő médiumban 10 cm átmérőjű, kollagénnel bevont sejt-kultúraedényekbe osztottuk szét. Négy órás inkubáció után a letapadt sejteken a kezdeti médiumot szérumentes médiumra cseréltük. A sejteket egy éjszakán át szérumentes környezetben növesztettük, majd 50 ng/ml rekombináns humán HGF-fel kezeltük fél, kettő, tizenkettő illetve huszonnégy órán át. A nem kezelt vad-típusú és c-Met<sup>-/-</sup> sejteket pedig 0 órás kontrollként alkalmaztuk. Minden kísérlet triplikátumban ismételtük meg. Hibridizációs referenciaként pedig több B6/129 vad genotípusú egérből frissen izolált és összekevert primer májsejteket használtunk.

*Lézer-mikrodisszekció*

A vad típusú és a transzgenikus egerek májából származó szövetminták OCT médiumban kerültek beágyazásra és lefagyasztásra. A fagyasztott blokkokból 7  $\mu\text{m}$  vastagságú metszeteket vágunk, amelyeket kezeletlen üveg tárgylemezre vittünk fel és a mikrodisszekciós -80 °C-on tároltunk. A metszeteket alciankék festékkel festettük 10 másodpercig, majd felszálló alkohol soron (50%, 75%, 95% és 100%, mindegyikben 20 másodperc) dehidráltuk. A mikrodisszekcióhoz az Arcturus PixCell Ie lézer-mikrodisszekciós készüléket használtuk. Mind a tumorsejtek, mind a normális minták mikrodisszekciója során ezer darab, 30  $\mu\text{m}$  átmérőjű impulzusnak megfelelő nagyságú területet vágunk ki. Mintánként mintegy 3000–4000 sejtet gyűjtöttünk guanidiniumot tartalmazó RNS-lízis-oldatba.

*RNS-izoláció*

A paraffinba ágyazott endometrium-mintákból öt 10  $\mu\text{m}$  vastagságú metszetet vágunk, majd ezekből a deparaffinizációt követően a High Pure RNA Paraffin kit felhasználásával teljes RNS-t izoláltunk. A primer májsejtekből az RNS-t Trizol reagens segítségével, a humán mintákból a teljes RNS-t CsCl-gradiens-centrifugálással nyertük ki. A mikrodisszekciós szövetmintákból történő RNS-izoláláshoz PicoPure kitet használtunk. A DNáz-emésztést az izoláló oszlopon hajtottuk végre. Az RNS koncentrációját NanoDrop ND 1000 spektrofotométerrel mértük meg. Az RNS-minták integritását a Bioanalyzer kapilláris-elektroforézis készülékkel ellenőriztük a gyártó útmutatásai alapján.

Az izolátumokból 0,5 µg teljes RNS-t (10 µl térfogatban) *Mmulv* reverz transzkriptáz (Applied Biosystems N8080127) enzimrel cDNS-re írtunk át. Az átírás során a mintákat 10 percig 42 °C-on, 50 percig 42 °C-on és 5 percig 95 °C-on inkubáltuk. A GAPDH- és β-globin gének átíródásának kvantitatív elemzése során a PCR reakciókhoz 2 µl cDNS-templátot használtunk. A 25 µl térfogatú reakcióelegy a 12,5 µl 2-szeres SYBR Green (Biorad 1708882) puffer hozzáadása után a két primert 300 nmol/l koncentrációban tartalmazta. Két perc 95 °C-on történt denaturáció után minden mintával 40 PCR-ciklust (60 másodperc 95 °C-on, 60 másodperc 60 °C-on, 120 másodperc 72 °C-on) futtatunk le a Biorad iCycler Real-time PCR berendezésen. Az olvadáspontanalízis során a mintákat 55 °C-ról 95 °C-ra hevítettük és a termékeket a jellegzetes disszociációs csúcs alapján azonosítottuk. A relatív kvantifikáció során a legkisebb ampikonhosszúságú GAPDH-termék amplifikációját használtuk referenciaként. A PCR reakciókat triplikátumban megismételtük és az egyes termékekre jellemző  $C_T$  értékeket az ismételt mérések átlagából számítottuk ki. A különböző módon fixált minták közötti relatív expressziós értékeket a Pfaffl és társai által kidolgozott Pairwise Fixed Reallocation Randomisation teszt alapján állapítottuk meg.

#### Microarray-plattformok

A Compugen által gyártott egér oligonukleotid-könyvtár 21997,65 bp hosszúságú próbát tartalmaz, amelyek 19140 egyedi gént és expresszált szekvenciát reprezentálnak. Az Operon V2 humán hosszú oligonukleotid próba szett 21329 egyedi, 70 bp hosszúságú próbát tartalmazott. Az oligonukleotid próbák 384 zsebes mikrotiter lemezen 3xSSC pufferben, 20–30 µM koncentrációban lettek feloldva. A próbák 160 µm denzitással kerültek nyomtatásra az amino-szilánal bevont üveg tárgylemezeken. A microarray-eket az NCI Advanced Technology Center-ben nyomtatták.

#### A minták jelölése és a microarray-k hibridizációja

A primer egér májsejtekből, illetve a humán szövetekből izolált teljes RNS-minták fluoreszcens jelölésére indirekt aminoallil metodikát alkalmaztunk. A cDNS-mintákat a hozzáadott Cy3 és Cy5 fluoreszcens festékekkel jelöltük. A microarray-k hibridizációja során az összes humán, illetve egér mintát egy-egy közös referenciamintával szemben hibridizáltunk. Minden egyes minta analíziséhez két array-t használtunk fel, amelyek között a kísérleti- és a referenciaminták fluoreszcens jelölését megcseréltük. A hibridizáció után a próbák fluoreszcens jelét a GenePix 4000A fluoreszcens szkennelrel detektáltuk.

A nyers microarray-adatok filtrációját és normalizációját az NCI MadB webszerveren végeztük el. A humán karcinóma-minták nem ellenőrzött klasszifikációja Michel Eisen Cluster és TreeView programjának felhasználásával történt. Az expressziós differenciát mutató gének kiválasztásához két karú t-tesztet használtunk, ahol a fals pozitív gének arányát az azonosítók random permutációja során határoztuk meg. A transzkripció min-tázaton alapuló predikciós modell megalkotásához a BRB Array Tools statisztikai csomagban elérhető hat algoritmust használtuk. A túlélési statisztikát az R programmal kalkuláltuk (<http://www.R-project.org/>).

## EREDMÉNYEK

### A szöveti RNS integritása a különféle fixálószerrel kezelt és paraffinba ágyazott humán endometrium-mintákban

Paraffinba ágyazott endometrium-mintákon kvantitatív PCR-assay segítségével vizsgáltuk az RNS integritását formalin, aceton, illetve RNAlater fixálást követően. A változó hosszúságú GAPDH és β-globin PCR-termékek amplifikációs hatékonysága nem mutatott különbséget az egyes fixálószerrel kezelt minták között. A 225 bp-nál rövidebb termékek minden minta esetében jól amplifikálhatóak voltak. Ennél hosszabb ampikonok esetén azonban a PCR reakciók hatékonysága jelentősen csökkent. A sejtmag és a citoplazma strukturális részleteit legjobban a formalin őrizte meg. A claudin 4 és claudin 7 immunfestés ugyancsak a formalinnal volt a legmegbízhatóbb. Az RNAlaterrel kezelt mintákban mind a festés intenzitása, mind az eloszlása egyenetlen volt.

### Sense szálú termék szintetizálása

#### a T7T3 lineáris RNS-amplifikációs technológia segítségével

Kifejlesztettünk egy új lineáris RNS-amplifikációs protokollt, amely sense szálú aRNS terméket eredményez. Az első és második körben oligo(d)<sub>20</sub>-T7 és (N9)-T3 amplifikációs lépéseket kombinálva a kiindulási mRNS-t átlagosan 2×10<sup>4</sup>-szeresére sokszoroztuk fel. Az amplifikáció után az RNS-szakaszok hosszúsága 150 és 1,350 bp között változott. Az aRNS-minták, akár a mikrodisszektált, akár a fagyasztott mintákból származtak, a reverz transzkripció és az aminoallil-reakció során megfelelően jelölődtek, és a microarray-hibridizáció során jól detektálhatóak voltak.

### A lineáris RNS-amplifikáció reprodukálhatóságának vizsgálata transzgen egér tumorokon

A T3T7 génamplifikációs metodika reprodukálhatóságát Myc és Myc/TGFα transzgen egerekben kifejlődő májkarcinómák elemzésével validáltuk. A legalább

kétszeres regulációt mutató gének expressziós értékei igen magas korrelációt (Pearson  $r=0,9$ ) mutattak a megismételt amplifikációs reakciók között. Az amplifikált mintákat a nem amplifikált mintákhoz hasonlítva a szignifikáns gének száma majdnem azonos (1036 vs. 1035) volt. A hierarchikus klaszterelemzés alapján megerősítést nyert, hogy az amplifikált minták az eredetihez nagyon hasonló ( $r=0,78$ ) profillal rendelkeznek és a genotípusra jellegzetes expressziós mintázatok az amplifikáció során megőrződtek.

*A HGF/c-Met-regulált expressziós mintázat azonosítása c-Met kondicionális knock-out primer májsejtekben*

Meghatároztuk a hepatocitákban expresszálódó HGF/c-Met útvonal által az átíródás szintjén szabályozott gének csoportját. A c-Met kondicionálisan kiűtött és vad-típusú primer egér májsejtekben különböző időtartamú rekombináns humán HGF-kezelés (0, 1/2, 2, 12 és 24 óra) után nyert microarray-adatok összehasonlító elemzése során 690, c-Met-aktivált expressziós profilt mutató gént azonosítottunk. A c-Met knock-out sejtekben végbemenő hosszú távú adaptációt pedig az a 67 gén reprezentálta, melyek transzkripciós szintje permanensen különbözött a kontroll és knock-out sejtek között.

*A c-Met-szabályozott gének funkcionális elemzése és szerepük a sejtproliferációban, motilitásban és oxidatív homeosztázisban*

A HGF-szabályozott gének funkcionális genomikai klasszifikációját a Gene Ontology adatbázis és a jelátviteli útvonalak kapcsolati térképei alapján végeztük el. Ennek során megerősítettük, hogy a fél és két óránál észlelt azonnali válasz géneken (Egr1, Hmga1, MafF, JunB) túl a sejtadhézióban, a sejtmotilitásban és a sejt-váz felépítésében részt vevő gének (Fn1, Neo1, Robo1, Cldn2, Arpc1b, Cap1, Nck2, Msn, stb.) alkotják a c-Met-szabályozott expressziós mintázat funkcionálisan legmeghatározóbb csoportjait. Elsőként fedeztük fel, hogy a HGF-kezelés elnyomta számos oxidatív stressz válaszgen, közöttük az Nrf2 transzkripciós faktor és célgénjeinek átíródását. Ezen adatok alapján feltételezzük, hogy a HGF/c-Met útvonal jelentős szerepet tölt be a májsejtek homeosztázisának szabályozásában.

*A c-Met- indukált expressziós mintázatot mutató humán májrakok azonosítása komparatív funkcionális genomikai módszerekkel*

A komparatív genomika módszereinek felhasználásával vizsgáltuk a HGF-szabályozott gének átíródását humán hepatocelluláris karcinóma-mintákban. Megállapítottuk, hogy az emberi májrakok egy jól meghatározható csoportjában (67/242, 27%) a HGF/c-

Met-célgének transzkripciós mintázata megegyezett a HGF-kezelte vad-típusú májsejtekében mutatottal. Ez pedig a c-Met útvonal aktivációját feltételezi. A c-Met-aktivált expressziós mintázatot mutató csoportot más, független kutatócsoportok által közölt májkarcinóma- és metasztatikus vastagbél-tumorokban is azonosítani tudtuk.

*A c-Met-aktiváció a májrakokban megnövekedett mikrovaszkuláris denzitással és vaszkuláris inváziós frekvenciával társul*

A májkarcinómákban vizsgált klinikai és patológiai paraméterek közül a megnövekedett mikrovaszkuláris denzitás (átlagosan  $90,8 \pm 6,7$  vs.  $44,5 \pm 6,2$ ,  $p < 0,001$ ) és a vaszkuláris invázió frekvenciája ( $\chi^2=4,0$ ,  $p < 0,05$ ) mutatott szignifikáns, pozitív összefüggést a c-Met transzkripciós mintázatával. Azon betegek túlélése (átlagosan  $35,1 \pm 7,15$  hónap), ahol a tumor c-Met-aktivált mintázatot mutatott, ugyancsak szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a többi betegé ( $70,3 \pm 9,7$  hónap).

*A c-Met-aktivált mintázaton alapuló predikciós modell 83–95% százalékos pontossággal képes a humán HCC-s betegek prognózisának megbecslésére*

Végül kidolgoztunk egy, a c-Met-expressziós mintázaton alapuló predikciós modellt, amely képes a májkarcinóma betegek prognózisának megállapítására. A legjobb szeparációt biztosító 111 c-Met-célgén listáját 60 teszt-mintán (30 MET+ és 30 MET-) hatféle predikciós algoritmussal végzett elemzéssel határoztuk meg. A modellt egy 79 mintából álló ellenőrző csoporton validáltuk. Az így létrehozott modell 85–98% közötti pontossággal tudta a májkarcinóma betegek két, az átlagos túlélésben jelentősen különböző csoportját azonosítani.

## MEGÁLLAPÍTÁSOK

1. A paraffinba ágyazott mintákból kinyerhető szöveti RNS integritása formalin, acetone és RNAlater fixálószerekkel azonos mértékű. A 225 bp-nál rövidebb RNS-szakaszok az archivált mintákból hatékonyan felamplifikálhatók. Az immunhisztokémiai festések a formalinfixált mintákon megbízhatóbban működnek, mint a két másik fixálószer használata esetén.
2. A lineáris amplifikáció átlagos mértéke a T7T3 módszer használata esetén átlagosan  $2 \times 10^4$ , az átlagos termék hossz 150 és 1,350 bp között található. Az aRNS-termékből anti-sense szálú, aminoallil-jelölt cDNS-minta szintetizálható.
3. Microarray-elemzés során a T7T3-amplifikált minták jó korrelációt mutatnak mind a technikai replikátumokkal (Pearson  $r=0,9$ ), mind a nem amplifikált mintákkal (Pearson  $r=0,78$ ). Az amplifikáció során a májtumorok genotípusára jellemző expressziós mintázatok megőrződnek.

4. A HGF/c-Met útvonal aktivációja egér primer májsejtekben a korai válasz gének mellett a sejtadhézióban, a sejtmotilitásban és a sejtváz felépítésében részt vevő gének expresszióját indukálja. A c-Met útvonal meghatározó szerepet játszik az oxidatív stressz válasz gének regulációjában. A c-Met-knock-out hepatocitákban 67 gén expressziója permanens adaptációs különbséget mutat.
5. Az ortológ HGF-indukált gének expressziója a humán májkarcinómákban illetve májmetasztázisok egy csoportjában a c-Met aktivációjával megegyező mintázatot mutat. Ezen tumorokban a mikrovaskuláris denzitás (átlagosan  $90,8 \pm 6,7$  vs.  $44,5 \pm 6,2$ ,  $p < 0,001$ ) és a vaszkuláris invázió frekvenciája ( $\chi^2=4,0$ ,  $p < 0,05$ ) szignifikánsan megemelkedett.
6. A c-Met-aktivált mintázaton alapuló predikciós modell 83–95% százalékos pontossággal képes a humán HCC-s betegek prognózisának megbecslésére. A c-Met-aktivációt mutató betegek túlélése rövidebb (átlagosan  $35,1 \pm 7,15$  hónap), mint a többi betegé ( $70,3 \pm 9,7$  hónap).

## IRODALOM

### *A disszertációhoz kapcsolódó saját közlemények*

1. Kaposi-Novak P, Lee JS, Gomez-Quiroz L, et al. Met-regulated expression signature defines a subset of human hepatocellular carcinomas with poor prognosis and aggressive phenotype. *J Clin Invest* 116:1582–1595, 2006

2. Kaposi-Novak P, Lee JS, Mikaelyan A, et al. Oligonucleotide microarray analysis of aminoallyl-labeled cDNA targets from linear RNA amplification. *Biotechniques* 37:580, 582–586, 588, 2004
3. Paska C, Bogi K, Szilak L, Kaposi-Novak P, et al. Effect of formalin, acetone, and RNAlater fixatives on tissue preservation and different size amplicons by real-time PCR from paraffin-embedded tissue. *Diagn Mol Pathol* 13:234–240, 2004
4. Lotz G, Kiss A, Kaposi-Novak P, et al. Hepatitis viruses and hepatocarcinogenesis. *J Physiol Paris* 95:417–422, 2001
5. Szabo E, Paska C, Kaposi-Novak P, et al. Similarities and differences in hepatitis B and C virus induced hepatocarcinogenesis. *Pathol Oncol Res* 10:5–11, 2004
6. Kiss A, Lotz G, Kaposi-Novak P, Schaff Z. Hepatitis viruses and hepatocarcinogenesis. *Orvosi Hetilap* 143:83–86, 2002

### *A disszertációtól független saját közlemények*

1. Glasz T, Hortovanyi E, Mozes G, et al. Chlamydia pneumoniae in coronary bypass grafts of redo patients. The concept of the 'adventitial baseline infection'. *Pathol Res Pract* 200:609–618, 2004
2. Podanyi B, Kiss A, Kaposi-Novak P, et al. Hepatitis C virus RNA in the cutaneous eruption but not in the symptom-free skin from patient with prurigo simplex and chronic C hepatitis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 19:520–522, 2005
3. Podanyi B, Kiss A, Kaposi-Novak P, et al. Hepatitis C virus RNA in the skin eruption from patients with prurigo and chronic hepatitis C. *Orvosi Hetilap* 145:2371–2374, 2004
4. Tokes AM, Kulka J, Paku S, et al. Claudin-1, -3 and -4 proteins and mRNA expression in benign and malignant breast lesions: a research study. *Breast Cancer Res* 7:R296–R305, 2005
5. Kulka J, Tokes AM, Kaposi-Novak P, et al. Detection of HER-2/neu gene amplification in breast carcinomas using quantitative real-time PCR – a comparison with immunohistochemical and FISH results. *Pathol Oncol Res* 12:197–204, 2006