



Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem

Vegyésszmérnöki és Biomérnöki Kar

Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék

Mócza Levente András

Vegyésszmérnök BSc szakos hallgató

Kemoterápiás szerek által indukált mutagenézis kimutatása 3D-PCR-rel

37. OTDK Kémiai és vegyipari szekció

Témavezető: Dr. Békési Angéla

BME, Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék

TTK, Enzimológiai Intézet, Genomi Metabolizmus Kutatócsoport

Konzulens: Holub Eszter

ELTE, Természettudományi Kar, Biológia Doktori Iskola

Tartalom

I.	Köszönetnyilvánítás.....	4
II.	Rövidítésjegyzék.....	5
III.	Bevezetés	6
IV.	Irodalmi áttekintés.....	8
1.	DNS és uracil	8
a)	Citozin dezaminációja.....	10
b)	Magas dUTP/dTTP arány	11
c)	A DNS-beli uracil javítása	12
d)	Timidilát szintézist gátló terápiás stratégiák.....	12
e)	Az uraciltartalmú DNS jelentősége	13
2.	U-DNS detektálása	14
a)	Tömegspektrometria.....	14
b)	Csepp blot mennyiségi mérés	14
c)	PCR-alapú mérési módszerek.....	15
d)	Immunocitokémia (ICC).....	15
e)	Szekvenálás (NGS)	16
3.	A TS-inhibitorok eltérő hatásmechanizmusa	17
a)	A 3D-PCR.....	18
V.	Célkitűzés.....	19
VI.	Módszerek.....	20
1.	Primerek tervezése.....	20
2.	Reakció hagyományos PCR-rel	22
3.	Agaróz gélelektroforézis.....	23
4.	PCR termékek preparatív kinyerése és tisztítása	24
5.	Templátkoncentráció kiszámítása 3D-PCR-hez	25
6.	Reakció 3D-PCR-rel	26
7.	NT és 5FdUR-termékek összehasonlítása.....	27
8.	qPCR vagy kvantitatív PCR	27
a)	Primer hatásfok kiszámítása	27
b)	Gradiens qPCR.....	29
VII.	Eredmények.....	31

1.	Specificitásvizsgálat hagyományos PCR-rel.....	31
2.	PCR termékek izolálása, tisztítása	33
3.	Próbareakció 3D-PCR-rel	35
4.	NT és 5FdUR-kezelt termékek összehasonlítása	37
5.	Primerek hatásfokának meghatározása qPCR-rel	45
6.	Gradiens qPCR a kiválasztott targetekre.....	46
VIII.	Összegzés	50
IX.	Irodalomjegyzék.....	52
X.	Függelék	56

I. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani Prof. Vértessy G. Beátának, hogy a kutatómunkám során rendelkezésemre bocsátotta a szükséges erőforrásokat, és a laborjában végezhettem el a méréseimet.

Köszönöm a témavezetőmnek, Dr. Békési Angélának a különböző kémiai biológiai technikák megismertetését, a sok tanácsot, iránymutatást és támogatást amit a munkám során kaptam.

Köszönetet szeretnék mondani Holub Eszternek, aki segített a qPCR kezelésével, és tanácsot, segítséget nyújtott a dolgozat összeállításához.

Szeretném megköszönni a teljes Genom Metabolizmus Kutatócsoportnak, hogy számíthattam a segítségükre és hasznos tanácsokat adtak nekem.

És végül szeretném megköszönni a családom kitartó támogatását és türelmét.

II. Rövidítésjegyzék

Rövidítés	Jelentés
ΔUNG	Inaktív uracil-N-glikoziláz
5FdUR	5-fluoro-2'-dezoxiuridin
AID	Aktiváció indukált citozin dezamináz
AP-hely	Abázikus hely (DNS-ben)
APOBEC	Apolipoprotein B mRNS-t editáló katalitikus polipeptid
ARPs	Aldehid reaktív próba
BER	Báziskivágásos javítás (Base Excision Repair)
bp	Bázispár
DNS	Dezoxiribonukleinsav
dNTP	Dezoxi-nukleotid-trifoszfát
dTMP	Dezoxi-timidin-monofoszfát
dTTP	Dezoxi-timidin-trifoszfát
dUMP	Dezoxi-uridin-monofoszfát
DUT	Dezoxi-uridin trifoszfatazt kódoló gén
dUTP	Dezoxi-uridin-trifoszfát
dUTPáz	Dezoxi-uridin-trifoszfátáz
EDTA	Etilén-diamin tetraacetát
FLAG	Flagellin derivált peptid alapú epitóp címke
HCl	Hidrogén-klorid oldat (sósav)
HPLC	Magas nyomású folyadékkromatográfia
MMR	Hibáspár-javítás (Mismatch Repair)
NT	Nem kezelt (Non-treated)
PCR	Polimeráz láncreakció
RNS	Ribonukleinsav
RTX	Raltitrexed
ssDNS	Egyszálú DNS
Tris	Trisz-(hidroximetil)-aminometán
TS	Timidilát-szintáz
U-DNS	Uracilt tartalmazó DNS
UNG	Uracil-N-glikoziláz
UNG2	Uracil-N-glikoziláz nukleáris izoformája

III. Bevezetés

A genetikai információt tartalmazó DNS építőkövei a nukleotidok, röviden dNTP-k. Három fontos alkotórészük van: foszforsav, egy cukoregység (DNS esetében 2-dezoxi-D-ribóz), és egy szerves bázis. A DNS gerincét az ún. foszfo-diészterek alkotják. A foszforsav két dezoxiribózzal alkot észtert: egyiknek a 3', másiknak az 5' OH-csoportjával. Ez adja a lánc irányítottságát: a DNS-szál végeinek nevét az adja, hogy az adott végen lévő dezoxiribóz melyik OH-csoportja szabad. A DNS változatosságát a négyféle bázis (adenin, a citozin, a guanin és a timin) adja: a pirimidin- és purinvázis vegyületek egymással specifikus párokat képeznek. Az adenin a timinnel 2 H-kötéssel, a citozin a guaninnal 3 H-kötéssel alakít ki bázispárt (ez a stabilizáló kölcsönhatás a DNS-ben, ez adja a kettős hélix szerkezetet), a DNS két szála egymás reverz komplementere, vagyis ellentétes lefutásúak, azaz antiparallelek. A bázissorrend adja a genetikai információt, ami a bázispár képzés miatt másolható: örökítésnél (szemikonzervatív replikáció) és mobilizálásnál (transzkripció) van jelentősége. Utóbbi esetben a termék az RNS (pontosabban hírvivő RNS), amely információtartalma a fehérjeszintézisnél aminosav-szekvenciára fordítódik (transzláció): három-három bázis kódol egy-egy aminosavat, vagy egy STOP-kodont (1).

Az RNS-ben, ahol nincsen komplementer szál (lokálisan előfordulhat kettős hélix), szintén négy bázis fordul elő, azonban timin helyett uracil (gyakorlatilag demetilált timin) tartalmaz. Mivel az uracil és a timin szerkezetileg nagyon hasonló, bázispárképzési tulajdonságaikat tekintve ekvivalensek, könnyen előfordulhat, hogy uracil kerül a DNS-be. Mivel a DNS-polimeráz enzim nem különbözteti meg őket, ez akkor fordul elő, ha magas az intracelluláris dUTP/dTTP arány (2).

Egy másik lehetőség az uracil beépülésére a citozin dezaminációja. A dezaminálás történhet spontán, vagy enzimreakció útján, amelyet az AID/APOBEC, az adaptív, illetve veleszületett immunrendszer működéséhez szükséges fehérjecsald tagjai hajtanak végre (3,4). Az ebből adódó C→T(U) átmenetek javítás nélkül pontmutációhoz vezetnek (2). Erre a gyakran előforduló spontán mutációra evolválódott javító mechanizmus tagjai az uracil-DNS-glikozilázok, amelyek báziskivágással kezelik a problémát. A bázis és a cukor közötti N-glikozidos kötést hasítják, létrehozva egy abázikus helyet (5,6).

A C→T(U) pontmutáció gyakorisága rákos megbetegedések jelentős részében megemelkedett, ez arra utal, hogy ez is hozzájárul a tumorgenezishez. Az immunitás folyamatain és a tumorfejlődésen túl számos esetben a DNS-beli uracil valamilyen biológiai szereppel bír (7,8). Ezért a közelmúltban jelentős erőfeszítések fordultak arra, hogy hatékonyan ki tudják mutatni a genomi uracilt (9).

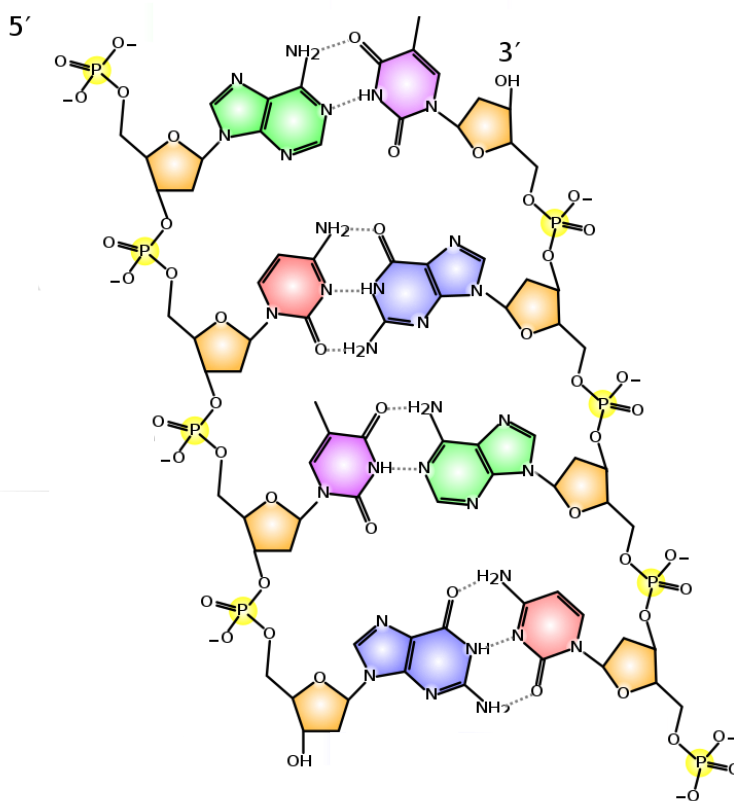
Ugyanakkor arra is rájöttek, hogy az intracelluláris dUTP/dTTP arány felborításával a rákos sejteket el is lehet pusztítani: az uracil beépülésének elősegítésével hiperaktiválják a javító mechanizmust, ez citotoxikus intermediereket eredményez, ami sejtciklus feltartóztatáshoz és programozott sejthalálhoz vezet (10). A kemoterápiában bizonyos szerek használata esetén másodlagos mutagenézist figyeltek meg, ami a tumorprogressziót katalizálhatja, áttéteket, agresszívabb tumorokat vagy drogrezisztens változatokat eredményezhet. A mutagén hatású kemoterápiás szerek közé tartozik az 5-fluoro-2'-dezoxiuridin (5FdUR), ami a timidilát-szintáz enzim aktív centrumát elfoglalva akadályozza az enzim-szubsztrát komplex kialakulását, és a Raltitrexed (RTX) antifolat, amely a TS metilénhidrofolát-kötő helyével kölcsönhatásba lépve a folát-ciklust akadályozza.

Kutatómunkám során az 5FdUR emberi genomra gyakorolt hatását vizsgáltam meg. Alapvetően egy másik kemoterápiás szer hatását is vizsgálat alá vettem volna (az RTX), azonban az 5FdUR esetében az előzetes vizsgálatok többlet genomi mutációt detektáltak. Ezek a mutációk a mintázatuk alapján citozin dezaminázok aktivitása nyomán keletkezhetnek. Kimutatták továbbá, hogy az APOBEC3 család több tagja is indukálódik mindkét szer hatására, de 5FdUR-re erősebben reagálnak. A genomszekvenálási eredményeket validálandó, illetve egy olcsóbb és rugalmasabban alkalmazható módszer kidolgozása végett szerettem volna a 3D-PCR technikát megalapítani a laborban, és az alkalmazott modellrendszeren beállítani.

IV. Irodalmi áttekintés

1. DNS és uracil

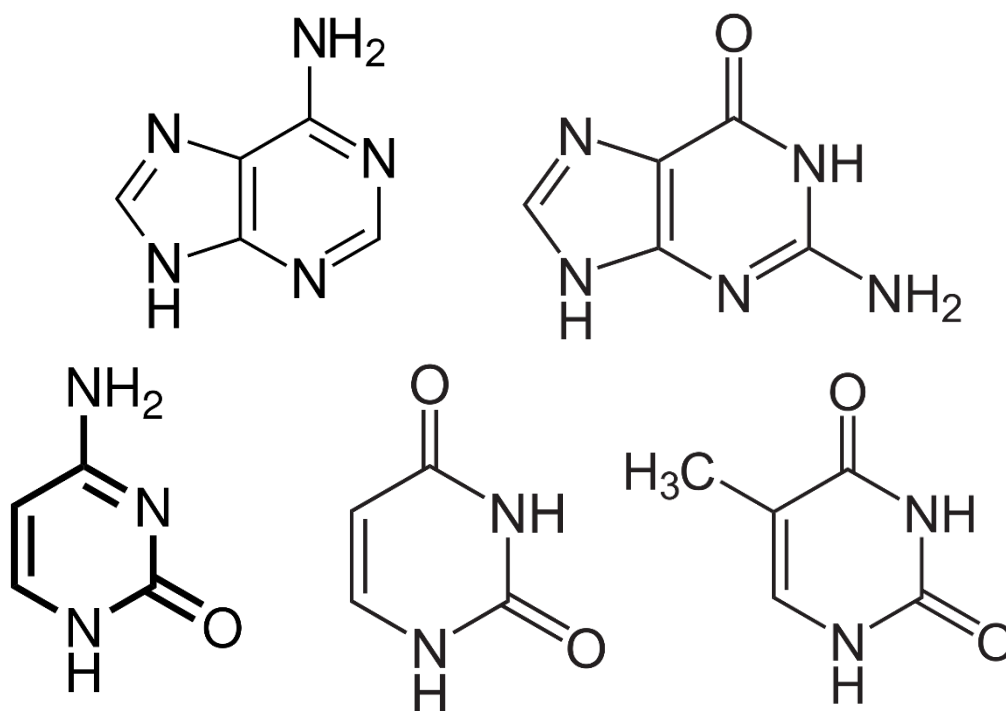
A DNS-ben (1. ábra) található négy szerves bázis az adenin, citozin, guanin és timin (2. ábra). Az adenin és a guanin purin-, a citozin és a timin pirimidinvázis vegyületek. A DNS-ben adeninnel szemben timin, guaninnal szemben citozin található. Az AT-párok kettő, a GC-párok három H-kötést hoznak létre. A bázisok egy cukoregységből (2-dezoxi-D-ribóz) és foszfátból álló gerinchez kapcsolódva és hidrogénkötéseket kialakítva stabil kettőshélix szerkezetet hoznak létre (1. ábra).



1. ábra: A DNS egyszerűsített szerkezete, a cukorfoszfát gerinccel és a szerves bázisokkal. Zöld: adenin, lila: guanin, piros: citozin, rózsaszín: timin, narancssárga: 2-dezoxi-D-ribóz, sárga: foszfát. Kép forrása: <https://en.wikipedia.org/wiki/DNA>

A DNS molekula stabilitása fontos, mert a fehérjék elsődleges szerkezetét határozza meg a bázissorrenddel, a benne történő változás a fehérje aktivitását, funkcióját változtathatja meg, vagy akár denaturációhoz is vezethet. Ugyanakkor a sejtben lévő DNS folyamatos fizikai, kémiai hatásoknak van kitéve, amelyek károsítják, ezek javítás híján mutációkat eredményeznek.

A négy, DNS-ben előforduló szerves bázison kívül van egy ötödik, az uracil (2. ábra), ami közönséges körülmények között csak az RNS-ben található meg, a timin helyett (adenin, citozin és guanin az RNS-ben is megtalálható).

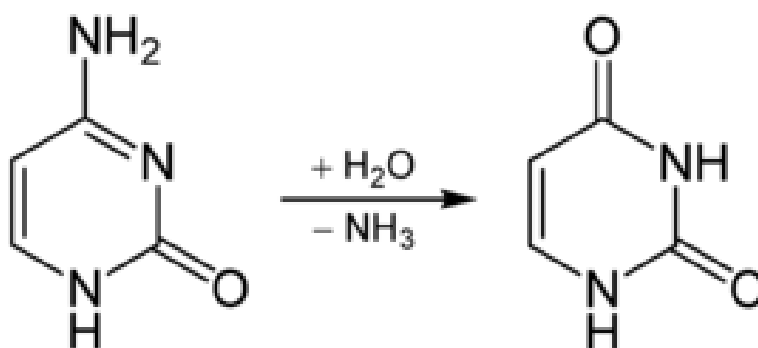


2. ábra: Az öt, nukleinsavakban előforduló szerves bázis. Balról jobbra: adenin, citozin, guanin, timin, uracil. A képek forrása: <https://en.wikipedia.org/wiki/Adenine>, <https://en.wikipedia.org/wiki/Cytosine>, <https://en.wikipedia.org/wiki/Guanine>, <https://en.wikipedia.org/wiki/Thymine>, <https://en.wikipedia.org/wiki/Uracil>

A timin és az uracil bázispárképzési ekvivalenciája miatt előfordulhat, hogy pl. replikáció során a DNS-polimeráz nem a megfelelő bázist épít a szálba, azaz timin helyett uracil kerül a DNS-be. Ennek leggyakoribb oka a magas dUTP/dTTP arány (2). Azonban uracil más módon is megjelenhet a DNS-ben: citozin dezaminációjával (11).

a) Citozin dezaminációja

Az aerob organizmusokban leggyakrabban előforduló mutáció a C→T átmenet (12,13), mely többféle módon is létrejöhet. Az egyik lehetőség a DNS endogén/exogén oxidatív ágensek hatására történő károsodása. A reaktív oxigén szuperoxid, hidrogénperoxid és hidroxil-gyök formájában képes oxidálni a DNS bázisait (14). Kimutatták, hogy az oxidált citozinnak, az 5-hidroxicitozinnak, illetve a belőle dezaminációval keletkező 5-hidroxouracilnak jelentős szerepe van a C→T átmenetben, mivel ez a pirimidin bázis csak két hidrogén-híd kialakítására képes (15–18). A leggyakoribb azonban a citozin vagy az 5-metilcitozin hidrolitikus dezaminációja (uracillá illetve timinné) (7) (3. ábra), a legtöbb emberi sejtben naponta 300-szor is megtörténhet (11). A reakció enzimkatalízis nélkül kis sebességgel megy végbe (8), de ez a spontán folyamat fontos szerepet játszott az evolúció során (7).

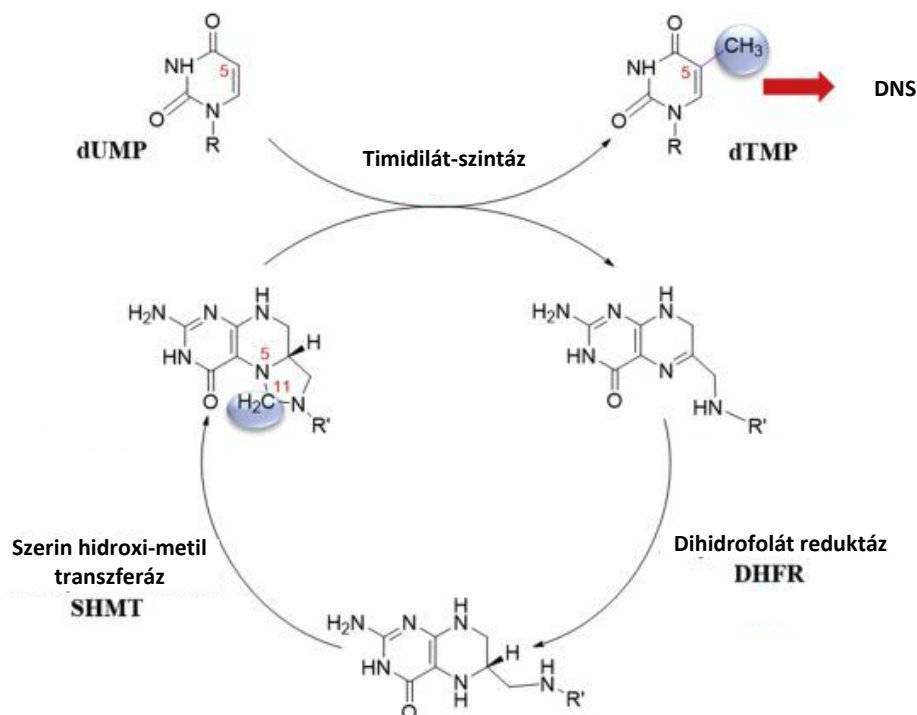


3. ábra: A citozin hidrolitikus dezaminációja. A kép forrása:
<https://en.wikipedia.org/wiki/Deamination>

A magasabb rendű eukarióták genomjában több citozin dezamináz is kódolva van, melyek a sejtek DNS-ének citozintartalmát képesek katalitikusan dezaminálni. Egyesek csak a nukleotidot képesek dezaminálni (dCMP dezamináz), de az APOBEC enzimes család tagjai már az RNS-, illetve a DNS-láncba beépített citozinnal is képesek elvégezni a reakciót (19,20). Az APOBEC családnak a természetes immunitásban van szerepe. Ezeknek az enzimeknek a nem megfelelő működése rákos megbetegedéshez és különböző gyógyszerekkel szembeni rezisztenciához vezethet (21).

b) Magas dUTP/dTTP arány

A magas dUTP/dTTP arány miatt bekerülő uracil a replikációkor épül be a láncba. DNS replikációnál az egyik szál a templát, amelyen a reverzkomplementer szálát a DNS-polimeráz a sejtmagban lévő dNTP-készletet felhasználva megszintetizálja.



4. ábra: A dTMP képződése dUMP-ből TS enzim hatására. A kép forrása: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0003986117304186>

A dTTP a dUTP-ből képződik a dUTPáz és a timidilát-szintáz (TS) enzimek segítségével. A dUTP-t a dUTPáz dUMP-vé és pirofoszfáttá (22), a TS a dUMP-t dTMP-vé alakítja (23), amiből foszfatázok segítségével megkapjuk a DNS-szintézisben lévő timin prekursor dTTP-t (4. ábra). A metilcsoportot egy szerin adja, amit a szerin-hidroximetil-transzferáz a tetrahidrofolátra helyez.

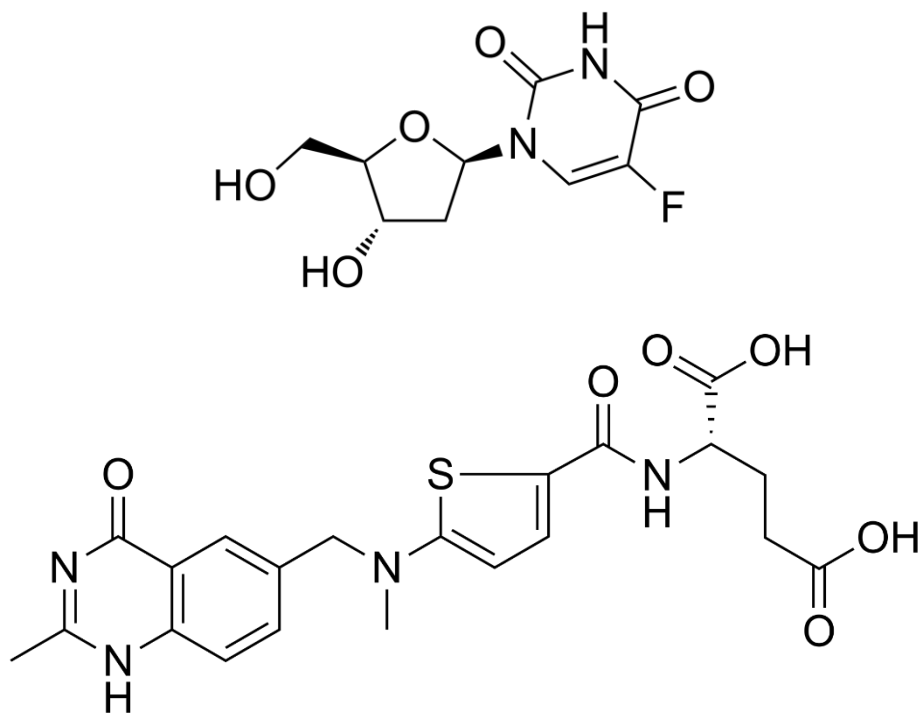
A sejtekben az alacsony dUTP/dTTP arányt a dUTPáz és a TS enzimek biztosítják. A polimeráz enzim nem tud különbséget tenni a timin és az uracil között, így az uracil beépülésének valószínűsége a dUTP/dTTP arány függvénye. Ha bármelyik enzim működésében megváltozik vagy teljesen elveszti funkcióját, akkor a dUTP/dTTP arány felborul, megemelkedik, ez pedig halmozott uracil beépülést eredményez. A magas genomi uraciltartalom a hibajavító mechanizmus

hiperaktivitását, végül a sejt halálát okozza. Éppen ezért ennek a két enzimnek a blokkolása hatékony módszer lehet a rákos sejtek kezelésében (22,24).

c) A DNS-beli uracil javítása

A spontán, illetve enzimatisz citozin dezamináció következtében gyakran előfordul, hogy uracil kerül a DNS-be. Azonban az eukarióta sejtekben, így az emberi sejtekben is, kifejlődött egy javítómechanizmus, amely eltávolítja az uracilt a DNS-ből, a genetikai információ megőrzése végett. A fehérjecsald, amely ezt a feladatot hajtja végre, az uracil-DNS-glikozilázok. Ezek eliminálják az uracilt a DNS-ből úgy, hogy az N-glikozidos kötést elhasítják (5), és elindítják a BER-t (báziskivágásos javítás) (25). Az abázikus helyen kinyílik a DNS, és a DNS-polimeráz beszúrja a komplementer nukleotidot, a guaninnal szembe citozint, a timinnel szembe pedig adenint rendel (26). Az emberi sejtekben 4 féle UDG van, amelyek egymás között megosztva végzik ezt a feladatot (27).

d) Timidilát szintézist gátló terápiás stratégiák



5. ábra: TS-specifikus kemoterápiás szerek. Fent: 5-fluoro-2'-deoxiuridin (5FdUR).
Lent: Raltitrexed (RTX). A képek forrása: <https://en.wikipedia.org/wiki/Floxuridine>,
<https://en.wikipedia.org/wiki/Raltitrexed>

A TS-t inhibeáló kemoterápiás szereket már a 60-as évek óta aktívan használják a rosszindulatú rákos megbetegedések kezelésében.

Ezek egyik, a kutatás témája szempontjából releváns tagja: az 5-fluoro-2'-deoksiuridin (5FdUR). Az 5FdUR a TS dUMP-kötőhelyéhez kapcsolódva akadályozza a szubsztrát-enzim komplex kialakulását (28). Maga az 5FdUR csak a prekursor, az aktív molekula a belőle foszforilációval keletkező 5FdUMP. Az 5FdUR a TS inhibeálásán túl képes közvetlenül is beépülni a DNS-be úgy, hogy 5FdUTP-vé foszforilálódik, amit a polimeráz timin analóggént beépít (29).

A másik gyógyszer a Raltitrexed (RTX), antifolat, mely a TS metilénhidrofolát-kötőhelyén fejt ki hatását (30) (5. ábra). Ez a leginkább specifikus a TS-re, mivel az antifolatok a folát-ciklus további folát-kötő enzimeit is gátolják.

A dTMP hiányában a dTTP sejten belüli koncentrációja lecsökken, a felhalmozódott dUMP-t a kinázok dUTP-vé alakítják. A TS gátlásával megnő az uracil beépülésének valószínűsége, és ezt az uracil-DNS-t javító mechanizmus felerősödése, és citotoxikus intermedierek felhalmozódása követi. Mindazonáltal nem ismert teljesen a mechanizmus, mert gátolt U-DNS javítás esetén is tapasztalható citotoxikus hatás (31,32).

e) Az uraciltartalmú DNS jelentősége

A DNS-ben kialakuló mutációk, fontos biológiai szereppel bírnak, mert ez feltétele az evolúciónak. Minden élőlénynek adaptálódnia kell a környezethez, különben elpusztul. Bizonyos esetekben a mutációk kedvező tulajdonságokat adnak az egyednek. Erre az egyik legismertebb példa az ember: mutációk eredményeként lett kisebb testszörzetünk, tudtunk felegyenesedni, lett nagyobb az agyunk.

Az élővilágban több esetben is az U-DNS valamilyen biológiai szereppel bír. Megfigyeltek olyan bakteriofágot, amelynek genomja teljes mértékben uracilt tartalmaz timin helyett (33). Kutatások folytak arról is, hogy a HIV vírus reverz transzkriptázzal készített DNS-e erősen uracilosodik, ha a gazdasejtben nagy a dUTP/dTTP arány, ennek eredményeként nem tud a sejt genomjába integrálódni (34). Feltételezések vannak arról, hogy a dUTPáz enzim gátlása szerepet

játszhat egyes élőlények metamorfózisában (35), illetve maga az uracil jelenléte a DNS-ben közrejátszhat a szerzett és veleszületett immunitás kialakításában (36).

Az adaptív immunválasznál a sejtekben antigén hatására történő hipermutáció bizonyos szempontból egy felgyorsított evolúció (25,37). Az AID által dezaminált citozin (38), azaz uracil a hibajavító mechanizmusokat, mint például a báziskivágásos javítás (BER) és a hibaspár-javítás (MMR), aktiválja (25,37). Ezek ún. error-prone (hibás beépüléseket eredményező) DNS-polimerázokkal szintetizálják az utódszálat, amplifikálva ezzel a hibákat (39). Az APOBEC enzimes család tagjai a virális fertőzések ellen védik a sejteket: a virális DNS-ben illetve RNS-ben található citozinok dezaminációjával károsítják az örökítőanyagot (40).

2. U-DNS detektálása

A DNS-beli uracilnak olyan biológiai és klinikai jelentősége van, hogy egyre sürgetőbbé vált olyan eszközök, módszerek, szenzorok kifejlesztése, amelyekkel hatékonyan és többféle kísérleti elrendezésben lehet kimutatni, nyomon követni egy DNS-minta uraciltartalmát. A kutatócsoport, ahol dolgoztam, jelentősen hozzájárult ezen törekvésekhez: kifejlesztettek több uracil-DNS-re specifikus szenzort egy inaktív mutáns UNG (32,41), illetve egy különleges UDG, az UdgX alapján, ami az U-DNS-t kovalensen képes megkötni (42). Ezeket a szenzorokat egyrészt globális uracil meghatározásra, másrészt az uracilos DNS sejtbeli lokalizációjának, illetve genomi eloszlásának jellemzésére egyaránt lehet használni (9). A csoportban fejlesztett módszereken túl számos egyéb U-DNS-t detektáló módszert is publikáltak az elmúlt években.

a) Tömegspektrometria

A tömegspektrometriás mérést folyadékkromatográfiával egybekötve végzik el (43). A DNS-t DNáz I, illetve nukleáz enzimekkel emésztik, majd preparatív HPLC-vel tisztítják a mintát, végül tömegspektrométerrel megméri a DNS-minták uracil tartalmát egy izotópjelölt belső standard segítségével (44). Ezzel a módszerrel ki lehet mutatni egészen alacsony uracil mennyiséget, akár 0,08 uracil/millió bázis mértékben, melyek lényegesen kisebbek korábbi tömegspektrometriás módszerekkel szemben (45).

b) Csepp blot mennyiségi mérés

A tömegspektrometriához képest pontatlanabb, de kevesebb eszközt igénylő mérést lehet elvégezni a membránhoz kötött U-DNS specifikus reakciókkal vagy szenzorokkal való detektálással. A kémiai detektálás során az uracilt UNG-kezeléssel AP helyé alakítják (46), amit alkoxiamin alapú aldehyd reaktív próbákkal (ARPs) detektálnak (47). A szenzorokkal való kimutatás során a humán UNG2 D145N/H268N dupla mutáns katalitikusan inaktív, viszont szorosan kapcsolódik DNS-hez és ssDNS-hez egyaránt (48). Az UNG egyéb fehérje-fehérje kölcsönhatásait kiküszöbölve, az N-terminális 84 aminosavját eltávolítva létrehozták a Δ UNG szenzort, amit affinitás és fluoreszcens címkékkel láttak el (32,41).

c) PCR-alapú mérési módszerek

A DNS-ben lévő uracilt PCR alapú technikákkal is lehet detektálni a templát megfelelő előkezelésével, vagy uracilra érzékeny polimeráz választásával. A módszerek előnye, ugyanakkor hátránya is, hogy a mérés csupán a specifikus primerek által közrezárt szakaszra vonatkozik. Ezzel helyspecifikusan meg lehet határozni a genomi uracil mennyiséget szemben a tömegspektrometriával és a blot analízissel, amelyek a templátra vonatkozó globális értéket szolgáltatnak.

Egy ilyen, a csoportban fejlesztett PCR-alapú mérés során Archeák DNS-polimerázát (Pfu) és annak egy mutáns változatát (V93Q) használták fel, kihasználva az uracilos templáton való hatékonyságbeli eltérést (49). Ezzel detektálni lehet az uracillal szembe való beépülést két PCR primer közötti, jól definiált régióban.

d) Immunocitokémia (ICC)

Az ICC egy olyan laboratóriumi technika, amely lehetővé teszi egy adott protein vagy antigén anatómiai vizualizálását egy sejtben egy specifikus primer antitest segítségével, ami hozzá kapcsolódik. Ezt meg lehet figyelni fluoreszcencia mikroszkóp alatt, ha a primer antitesthez hozzákapcsolunk egy szekunder antitestet, ami egy fluorofór csoporttal van konjugálva.

Ez a módszer lehetővé teszi annak megfigyelését, hogy a vizsgált sejtek expresszálják-e a kérdéses antigént. Ha találnak egy immunopozitív jelet, akkor azt is meg lehet vizsgálni, hogy a sejt melyik része expresszálja az antigént (32,50). A csepp blotban használt szenzorok FLAG-

címkéjét antitestekkel lehet detektálni. Ennek a fehérjeszenzornak fluoreszcens jellel való ellátása lehetővé teszi a genomi uracil in situ érzékelését nagy-felbontású fluoreszcens mikroszkóppal (32,41).

e) Szekvenálás (NGS)

Az NGS (Next-generation Sequencing), illetve maga a szekvenálás, a kérdéses DNS-szakasz, vagy akár az egész genom bázisonkénti beolvasását jelenti. A szekvenálási folyamat alapvetően több lépésből tevődik össze.

Először is, DNS szekvenáló könyvtárakat állítanak elő in vitro klonális amplifikációval PCR segítségével. Másodszor, a DNS-t szintézissel szekvenálják úgy, hogy a nukleotidok komplementer szálhoz való hozzáadását nyomon követik. Harmadszor, a térben szegregált, amplifikált DNS-templátokat egyidejűleg, masszívan párhuzamos módon szekvenálják, anélkül, hogy fizikai elválasztási lépésre lenne szükség (51).

A legtöbb NGS módszer ezeket a lépéseket követi, de mindegyik más stratégiát alkalmaz. Például XR-Seq-el (Excision Repair) DNS adduktok nukleotid báziskivágásos javítását lehet feltérképezni (52). Egy másik módszer, az U-DNA-Seq pedig a DNS uraciltartalmát mutatja ki az UdgX szenzorfehérjével, ami hozzáköt az uracilhoz, így az U-DNS-t ennél a fehérjénél fogva el lehet választani (53).

TDK munkám annyiban kapcsolódik az U-DNS témájához, hogy a csoportban TS inhibitorokkal kezelt, és különböző DNS-javítási kapacitással rendelkező vastagbélrák sejtek genomi uracilosodásának tanulmányozása során felmerült a kérdés, hogy a mért uracil pusztán timint helyettesítő beépülés révén kerül a sejtek DNS-ébe, vagy esetleg aktív citozin dezamináció is történik. Mivel az U-DNA-Seq adatokkal tulajdonképpen genomi szekvenálási adatok is rendelkezésre álltak, ezekből lehetett mutációanalízist végezni, mely kissé meglepetést okozva kimutatta, hogy az egyik TS inhibitor esetén a DNS-javításban deficiens sejtekben a C→T mutáció gyakorisága megnő a másik gyógyszerhez és a kezeletlen esetekhez képest. Ez adott egy lendületet a két gyógyszer hatásmechanizmusa közti különbségek kutatásának, másrészt kíváncsiságot, hogy egy független validálási módszert is kidolgozzunk, ami remélhetőleg nemcsak validálásra lesz alkalmas, hanem rugalmasabb és olcsóbb alkalmazhatósága révén lehetővé teszi a

megfigyelések kiterjesztését további sejtvonalakra, más rákterápiás szerekre, illetve idő- és dózisfüggő mérésekre is.

3. A TS-inhibitorok eltérő hatásmechanizmusa

A két említett kemoterápiás szerről (5. ábra), amelyek TS-gátló szereppel bírnak, kimutatták a csoportban, hogy nem teljesen egyezik a biológiai hatásuk. U-DNS-szekvenálással feltérképezték HCT116 UGI rákos sejtvonalak genomi uracil mintázatát, miután 5FdUR-rel és RTX-szel kezelték őket. A kettő szerrel kezelt sejtek genomi uracil profilja hasonló volt, de nem teljesen egyforma, ez önmagában utalhat eltérő hatásmechanizmusra (32). Az 5FdUR-kezelt sejtek genomjában több C→T mutációkloszttert találtak, és ez a gyógyszer koncentrációjával arányosan növekedett (nagy 5FdUR-koncentrációnál), de magasabb koncentrációnál kisebb citotoxicitást érzekeltek. Ez a megfigyelés utalhat rezisztenciára, de erre egyelőre nincsen egyértelmű bizonyíték.

Egy további, kollaborációban szerzett eredmény szerint az APOBEC3C és 3D enzimeknek az elakadt replikációs villák feloldásában és a replikáció újraindításában valamiképp szerepük lehet, ami erősítheti azt a hipotézisünket, hogy az általunk alkalmazott sejtes modellben is összefügg az enyhébb citotoxikus hatás és a tapasztalt C→T mutációs gyakoriság növekedés. A csoportban transzkriptomikai vizsgálatokat is végeznek ugyanezen a modellrendszeren, ami szintén megerősíti, hogy jelentős gyógyszer specifikus különbségek vannak a génkifejeződési mintázatokban és azok változásaiban.

Bármi is a válasz, a gyógyszerek kétségtelenül okoznak további mutációkat a genomban, márpedig a mutagén gyógyszer nem gyógyszer. A kutatásomban azért csak az 5FdUR hatását vizsgáltam, mert a szekvenálás eredménye alapján, ha van változás a mintában, akkor az az 5FdUR esetében sokkal markánsabb, mint az RTX esetében, továbbá C→T mutációk kimutatására törekedtem, így ha a módszer beválik, akkor azt az RTX esetében is lehet alkalmazni. A másik előzmény maga a szekvenálás volt. Jelenleg egy mutáció kimutatásához egy egész szekvenálási folyamatot le kell bonyolítani, ami nagyon hosszú munka. Ez a módszer egy egyszerűbb lehetőséget próbál teremteni e feladat elvégzésére, azaz a genom teljes feltérképezése helyett egy analitikai megoldással is ki lehetne mutatni pl. kemoterápiás szerek által indukált mutagenezist.

a) A 3D-PCR

Az első publikált technika a $C \rightarrow T$ mutáció detektálására adott régióban, egy olvadási hőmérsékleten alapuló PCR technika volt (54). Később ezt a módszert az UNG inhibitorral (UGI azaz uracil-glikoziláz inhibitor) egészítették ki, hogy semlegesítsék az UNG aktivitást (55). Ez a 3D-PCR, vagy Differenciális DNS Denaturáció-PCR. A módszer a bázisok közötti kölcsönhatások eltérésén alapul, ezzel olvadáspont különbséget érzékelve. Ha egy DNS-szakaszon történik egy $C \rightarrow T$ átmenet, például dezaminációval, a citozin (vagy 5-metilcitozin) átalakul uracillá (vagy timinné). Normál körülmények között a citozinnal szemben guanin található, azonban ha $C \rightarrow T$ átmenet történik, és a citozin helyére uracil/timin kerül, akkor a legközelebbi DNS-replikációkor már nem guanin fog a komplementer száiba beépülni, hanem adenin (éppen ezért a $C \rightarrow T$ átmenet egyben $G \rightarrow A$ átmenet is). Ennek következtében az a DNS-szakasz, amelyen történt $C \rightarrow T$ mutáció, AT-párokban gazdagabb lesz, mint a vad típusú DNS. A citozin és a guanin egymás között három hidrogén-hidat tud kiépíteni, ellenben az adenin az uracillal/timinnel csak kettőt. Ez azt jelenti, hogy az AT-gazdagabb DNS kevésbé stabil, így könnyebben felbomlik, denaturálódik. Gyakorlatilag ez annyit tesz, hogy az AT-gazdag DNS-nek alacsonyabb az olvadási hőmérséklete (54).

A 3D-PCR technikához használt eszköz annyiban különbözik a közönséges PCR-készülékektől, hogy a polimeráz reakció bármely lépésére (denaturáció, annealáció leginkább) be lehet állítani egy gradiens hőmérsékletet. Egy alsó és egy felső hőmérsékleti határérték között szigorúan monoton növekszik a hőmérséklet, és ezt a gradienst sorokra és oszlopokra is be lehet állítani. Ha a mintákat porciózzuk annyifelé, ahány hőmérsékleten meg szeretnénk vizsgálni, hogy lezajlott-e a reakció, és gondosan megválasztjuk a gradienst, akkor azok a minták, amelyek AT-gazdagabbak, alacsonyabb hőmérsékleten is adják a reakciót (54). Persze erről csak úgy lehet megbizonyosodni, ha a birtokunkban vannak a megfelelő analitikai információk. Ugyanis egy DNS-mintának akkor is alacsonyabb az olvadási hőmérséklete, ha rövidebb, mint a vad típusú szakasz. Tehát meg kell győződni arról, hogy a termékek tömege többé-kevésbé megegyezik. Erre a legalkalmasabb módszer a tömegspektroszkópia, vagy az agaróz gélelektroforézis.

V. Célkitűzés

Prof. Vértessy Beáta csoportjában még senki nem dolgozott mélybe menően 3D-PCR-rel, így a kutatásom csoportszinten kicsit úttörőnek bizonyult.

TDK munkámban azt tűztem ki célnak, hogy hatékonyan ki tudjam mutatni különböző HCT116 UGI humán genomi DNS-szakaszok AT-feldúsulását 5-fluoro-2'-dezoxiuridinnel kezelve, 3D-PCR segítségével, kihasználva az AT-gazdag régiók alacsonyabb olvadási hőmérsékletét.

Részletesen a céljaim a következők voltak:

- 1) Az NGS adatok alapján C→T mutációtól terhelt illetve nem terhelt genomi DNS-szakaszokra (köztük a TS-t, a dUTPázt, és az APOBECA3-t kódoló gének részleteire is) specifikus primereket tervezni úgy, hogy a PCR-termék kb. 500-600 bp hosszúságú legyen. Minden szakaszra 3-3 primerpár tervezése.
- 2) A primerek specificitásának vizsgálata gradiens PCR-rel, humán genomi DNS-t használva templátként. A specifikus primerek kiválasztása úgy, hogy minden szakaszra 1-1 primerpár legyen.
- 3) A kiválasztott primerekkel PCR elvégzése kezeletlen, illetve 5FdUR-rel kezelt humán genomi DNS-t használva templátként.
- 4) A PCR-termékek elektroforézise agaróz gélen, majd a minták izolálása és tisztítása. Innentől a PCR-termékek a templátok.
- 5) Próbareakció elvégzése 3D-PCR-rel, először a vad típusú templátokkal. A specificitás ellenőrzése.
- 6) A kezeletlen és az 5FdUR-kezelt DNS-minták PCR-termékeinek reakciója 3D-PCR-rel, az olvadási hőmérséklet összehasonlítása.
- 7) Az ígéretesnek tűnő templátokkal finomabb felbontású 3D-PCR elvégzése, az esetleges eltérő olvadási hőmérséklet kiemelése gyanánt.
- 8) A finomabb felbontású 3D-PCR reakciókat qPCR-rel megismételni, hogy megbízható eredményeket kapjunk.

VI. Módszerek

1. Primerek tervezése

A természetes primerek azok a rövid (néhány tíz bp hosszúságú) RNS-fragmensek, amelyek „folytatásaként” a DNS-polimeráz meg tudja szintetizálni az utódszálat replikációkor. A sejtekben primerek a lagging strand komplementer szálához szükségesek többségben (egy primer kell a leading strand-re is), a képződő utódszálszakaszok az Okazaki-fragmensek. A PCR esetén azonban szintetikus DNS oligonukleotid primerek szükségesek, melyeket úgy tervezünk meg, hogy specifikusan kötődjenek a templát meghatározott helyéhez. Tehát minden szakaszhoz kétféle primer kell: egy Forward és egy Reverse.

A munka elején a humán referencia genomhoz illesztett NGS adatokból származó variáció lista fájlokat vizsgáltam, és próbáltam olyan, pár száz bp hosszúságú szakaszt kijelölni, amelyek tartalmaztak C→T mutációklosztereket. Ezek voltak a pozitív régiók. De negatív kontrollt is kerestem, azaz olyan szakaszokat, amelyek biztosan nem tartalmaztak mutációt. Az adatok heterogén populációból származtak, és a szekvenálás mélysége miatt nincs információ az összes sejt genomjáról, így nem tudtam 100%-os bizonyossággal negatív kontrollt találni. A szakaszok kijelölésénél fontos volt, hogy a kapcsolódási helyeken ne legyen mutáció, mert akkor előfordulhat, hogy a primer nem kötődik specifikusan (vannak PCR technikák, amik pont erre épülnek, de ebben az esetben ez a jelenség hátráltató).

Végül találtunk hét szakaszt, amelyekre tervezhattunk primert. A pozitív szakaszok a humán genomból véletlenszerűen lettek választva (azaz csak a mutációklosztert kellett tartalmaznia, függetlenül attól, hogy kódol-e valamit), de a negatív szakaszok némelyike egy-egy, a téma szempontjából fontos enzimet, fehérjét kódoló gén egy részlete. Így jelöltünk ki egy-egy szakaszt a timidilát-szintáz, a dUTPáz és az APOBEC3B fehérjét kódoló szakaszokról. A negyedik negatív minta egy véletlenszerű genomrészlet.

A primerek tervezése az NCBI Primer Blast szoftver segítségével történt. A szoftverben meg kellett adni a kijelölt szakaszok szekvenciáját, majd a paramétereket (oladási hőmérséklet, hossz stb.) is be kellett állítani. Az oladási hőmérsékletet 59 °C köré állítottuk be. A szoftver minden szakaszra 10 találatot adott, azaz 10 db Forward-Reverse primer párt. Ezekből én

kiválasztottam 3-3 primerpárt minden szakaszra (1. táblázat) véletlenszerűen. Végül a kiválasztott primerpárokat megrendeltük a Sigma-Aldrich-tól.

Target	Primer típusa	Termék hossza (bp)	Hossza (bp)	T _m (°C)	Primerek
					Szekvenciája
1neg	Forward	646	21	59,93	GGTCTGGTTCGTTTCCTCACT
	Reverse		20	59,67	AACCATGGAGGAGCTGGTTC
	Forward	648	20	58,88	TGGTCTGGTTCGTTTCCTCA
	Reverse		20	59,67	GAACCATGGAGGAGCTGGTT
	Forward	600	22	59,36	TGTCCTTATTGGTCTGGTTCGT
	Reverse		20	59,67	AAGCTCGAGGTGGATTTGCT
4negTS	Forward	513	20	59,33	AGTCGTGTGTTGAGCTGCTA
	Reverse		22	59,30	GTCATGAGATGGCCTTAGAGGT
	Forward	507	20	59,14	GTCAGTCGTGTGTTGAGCTG
	Reverse		24	58,54	TGGCCTTAGAGGTCATCTATTACA
	Forward	519	21	60,54	AGTCAGTCGTGTGTTGAGCTG
	Reverse		24	61,19	ATGTCATGAGATGGCCTTAGAGGT
3negDUT	Forward	501	21	59,25	GCAGCATTTGCTATGTGGACT
	Reverse		22	59,56	TGGTGGTGTGAAGAGATGTCAA
	Forward	538	20	59,38	AAGCAAGGTCCATCTCCAGG
	Reverse		24	59,22	TTTATGAAGAAGGTAGAGGTGGCT
	Forward	508	21	59,86	GTGATCAGCTGTCTCCCTCAG
	Reverse		24	59,12	GTTTATGAAGAAGGTAGAGGTGGC
3pos	Forward	648	20	59,89	ATTGGAACCTGGGGTGGGAC
	Reverse		20	59,75	AGTGTGCAGCATGAGAGGAG
	Forward	642	20	59,61	GTGTCAAGGGTGAGCTCTGT
	Reverse		20	60,46	GGGATTGGCGAGGAAGAGTG
	Forward	614	20	60,67	GTGAGCTCTGTGGCGGAAAT
	Reverse		21	60,07	GTGCAGCATGAGAGGAGAAGT
2pos	Forward	620	20	60,11	CCAATTCTGCCGACAAAGGC
	Reverse		20	60,04	GCCTCCCTTCCAGTCAGAAC
	Forward	500	20	60,25	CTGGACAAGGGAGAGGGACT
	Reverse		21	60,27	GACACTGTGGCAGTGAGTCAT
	Forward	537	19	59,85	TTCTGCCGACAAAGGCAGT
	Reverse		20	59,10	GTGGCAGTGAGTCATCCTCT

1pos	Forward	581	20	60,90	CAGCCTCACAGCCCCATTTT
	Reverse		25	60,05	GATACGGATAGTCCATGCTTACAGT
	Forward	578	23	60,18	CTCACAGCCCCATTTTGTATAGC
	Reverse		25	60,05	TGATACGGATAGTCCATGCTTACAG
	Forward	542	22	59,07	TCCTAACCCCTAGTACCTGTGA
	Reverse		25	59,17	ACACTTAAAGGTAGCAATTTGGTGA
2negA3B	Forward	552	22	59,59	CGCAGAGTGAAACATCAGGAAG
	Reverse		20	60,18	AAGTTTGGGTGGTACCTGGC
	Forward	512	22	59,25	GCAGAGTGAAACATCAGGAAGG
	Reverse		20	59,55	CCAAAGGAGATTTGAGCGGC
	Forward	512	23	59,56	CAGGAAGGAATTGAGCTGAAAGG
	Reverse		20	59,52	AAGACCCCTGTGTCCCAAAG

1. táblázat: Az NCBI Primer Blast szoftverrel tervezett primerek fontosab adatai. Sárgával vannak megjelölve azok, amelyekkel a specifikitásvizsgálat után tovább dolgoztam.

2. Reakció hagyományos PCR-rel

Az egyes szakaszokra 3-3 primerpárt terveztünk, azonban szakaszonként csak 1-1 primerpárral terveztünk tovább dolgozni. Azért terveztünk mindenhova 3-3-at, hogy jó eséllyel legyen legalább egy specifikus pár.

A megrendelt primereket először egységes koncentrációra hígítottam (10 μ M), majd ezt ellenőriztem UV-spektrofotométerrel (Nanodrop™ 2000 Thermofischer Scientific). Utána összeraktam a PCR-elegyet, ami tartalmazott 2x Mytaq HS Red Mixet (MTHRX-920401A, ez tartalmazza a polimerázt, a nukleotidokat, a polimeráz működéséhez optimális puffert, az elektroforézishez szükséges komponenseket) (továbbiakban Mastermix), humán genomi DNS templátot (HCT116 UGI P12) és nukleázmentes vizet. 10 μ l-es reakcióelegyet raktam össze, ebben volt 5 μ l Mastermix, 0,1 μ l templát DNS (304,5 ng/ μ l), és 3,9 μ l nukleázmentes víz, a maradék 1 μ l a primerpár oldatából van. Sok mintával dolgoztam, ezért ahelyett, hogy egyesével kimértem volna valamennyi mintához a reagenseket, elkészítettem egy ún. törzsoldatban az összes mintára elég oldatmennyiséget, majd porcióztam. Ez azért volt hasznos, mert a templát 0,1 μ l-ét nem lehet pipettával kimérni.

Miután ki lettek mérve és porciózva a minták, beállítottam a PCR-készülék (Applied Biosystems GeneAmp® PCR System 2700 hőfokprogramját (2. táblázat), és elvégeztem a reakciót valamennyi mintával.

A PCR hőfokprogramja		
95 °C	2 min	
95 °C (denaturáció)	30 s	35x
58 °C (annezáció)	30 s	
72 °C (elongáció)	1 min	
72 °C	10 min	

2. táblázat: A PCR-készülék hőfokprogramja.

3. Agaróz gélelektroforézis

A PCR-reakciók lefutása után a mintákat agaróz gélelektroforézissel analizáltam Bio-Rad Mini-Sub Cell GT rendszerben. Az elektroforézis során a gélmátrix polarizálódik, és a negatív töltésű nukleinsav fragmensek a pozitív pólus felé vándorolnak. Azonban a közegellenállás miatt a nagyobb (azaz nagyobb tömegű) fragmensek jobban lemaradnak, így el lehet választani egymástól a különböző tömegű termékeket. A nukleinsavak szelektív kimutatására több specifikus festék is létezik. Én a GelRed (Gelred Nucleic Acid Stain 10000x) festékanyagot használtam, ami ha kölcsönhatásban áll a DNS-sel, akkor UV-fénnyel gerjesztve fluoreszkál. Az elektroforézis folyamata a következő:

- 300 mg agarózt kimértem analitikai mérlegen egy bemérőcsónakban, majd egy 100 ml-es Erlenmeyer-lombikba öntöttem.
- Hozzáöntöttem 30 ml 1x frissen készített TAE pufferoldatot (összetétel a Függelékben). A folyadékszintet filctollal a lombik külső oldalán megjelöltem.
- Egy erre a célra fenntartott mikrohullámú sütőben forrásig melegítettem, majd homogenizáltam az oldatot. A melegítést teljes oldódásig folytattam, az elpárolgott oldatot desztillált vízzel pótoltam.
- Közben előkészítettem a gélöntő apparátust. Ellenőriztem a vízszintességet az öntőformában, és belehelyeztem egy nyolcfogú, műanyag fésűt.
- Miután lehűlt az oldat, hozzáadtam 3 µl Gelred fluoreszcens, nukleinsavakhoz kötődni képes festékanyagot, homogenizáltam, majd az öntőformába öntöttem. Alufóliát helyeztem rá és állni hagytam.

- Miután megdermedt a gél, kivettem a rögzítőből és a gélfuttató apparátusba helyeztem, amit megtöltöttem 1x friss TAE pufferoldattal (egyszer használt TAE puffer is használható). Kivettem a gélből a fésűt, és a helyén maradó zsebekbe raktam bele a mintákat. Molekulatömeg markerként GRS 1kb DNA Ladder-t használtam.
- A gélfuttató apparátust egy Bio-Rad PowerPac™ Universal tápegységhez csatlakoztatva az elektroforézist 100 V-on, 40 percig végeztem.
- Az idő lejárta után a gélét BioRad Molecular Imager® Gel Doc TM XR+ géldokumentációs rendszerben ImageLab szoftver segítségével elemeztem.

4. PCR termékek preparatív kinyerése és tisztítása

A specifikitásvizsgálat után kiválasztottam minden egyes szakaszra a legmegfelelőbb primerpárt, majd ezekkel ismét elvégeztem a fent említett PCR-reakciót. Annyi a különbség, hogy a minták mennyiségét megötszöröztem. Így 50 µl-es mintákat készítettem, amelyekben 25 µl Mastermix, 0,5 µl genomi DNS templát, 19,5 µl nukleázmentes víz, és 5 µl primerpár volt. Itt a 7,5x-es mennyiséget ötszöröztem meg, majd ugyanúgy kiporcióztam a csövekbe.

Azonban ebben a lépésben egy másik sor mintát is készítettem. Ebből ugyanúgy hét darab volt, és összetételük megegyezik a fentiekével, de a templátjuk 5FdUR-rel kezelt sejtekből származó genomi DNS volt. A mintákat az egyszerűség kedvéért rövid jelzőkkel megneveztem (3. táblázat), majd a PCR-készülék változatlan hőfokprogramjával (2. táblázat) elvégeztem a reakciót. Egyetlen dolgot kellett a programon módosítani: a mintatérfogatot 50 µl-re állítottam.

	1neg(3)	4negTS(1)	3negDUT(1)	3pos(2)	2pos(1)	1pos(1)	2negA3B(2)
Nem kezelt	NT1	NT2	NT3	NT4	NT5	NT6	NT7
Kezelt (5FdUR)	5F1	5F2	5F3	5F4	5F5	5F6	5F7

3. táblázat: A PCR termékek rövidítésjegyzéke.

A reakciók lefutása után a mintákat agaróz gélelektroforézissel megfuttattam (Agaróz gélelektroforézis). Az elektroforézis előkészítése során nagyobb fogú fésűt használtam, hogy beférjenek a zsebekbe az 50 µl minták. Az elektroforézis után a mintákat BioRad Molecular Imager® Gel Doc TM XR+ segítségével megvizsgáltam. Ezután a mintákat UV-fénybe helyeztem,

és megfelelő védőfelszerelésben a gélben látható fluoreszkáló sávokat szikével kivágtam, majd előzőleg odakészített 1,5 ml-es csövekbe raktam. A PCR termékeket Nucleospin Gel and PCR Clean-up Kit (Macherey-Nagel) segítségével, a gyártó ajánlásait követve tisztítottam, 30 µl NE pufferrel eluáltam őket. A minták koncentrációját Nanodrop™ 2000 Thermofischer Scientific spektrofotométerrel ellenőriztem.

Az eluált PCR termékeket ezek után átvittem a BME-re, ahol a 3D-PCR reakciókat végeztem (Eppendorf Mastercycler X50s).

5. Templátkoncentráció kiszámítása 3D-PCR-hez

Itt viszont szükség volt egy kis számításra. Eddig a PCR-reakciót genomi DNS templáttal végeztem, most viszont a PCR termékek a templátok, amik jóval rövidebbek. Ha ugyanannyi mennyiségű PCR termék lenne, akkor nem látszódna nyoma semmilyen reakciónak, mert akkora feleslegben lenne a templát.

Az előző PCR-reakciókban az egyes mintákat úgy mértem össze, hogy a mintákban kb. 30 ng genomi DNS templát legyen. A templát hossza nagyjából $3 \cdot 10^9$ bp (<https://www.genome.gov/genetics-glossary/Base-Pair>). Ellenben a PCR termékek hossza 600 bp körül mozog (1. táblázat).

$$\frac{3 \cdot 10^9}{600} = 5 \cdot 10^6$$

Tehát a PCR termékeket 5 milliószorosan kell hígítani, hogy ugyanakkora legyen a templátok koncentrációja.

$$\frac{30 \text{ ng}}{5 \cdot 10^6} = 6 \cdot 10^{-6} \text{ ng} = 6 \text{ fg}$$

Mintánként tehát 6 femtogramm PCR terméket tartalmaz a reakcióelegy. A reakcióelegyben 5 µl Mastermix, 1 µl primerpár és 4 µl PCR termék templát van. Vagyis a templátok koncentrációja 1,5 fg/µl kell, hogy legyen. Ezt úgy oldottam meg, hogy először mindegyik termék koncentrációját egységesen 1,5 ng/µl-re állítottam be, majd 100-szoros hígítás háromszori elvégzésével megkaptam a végleges koncentrációt.

6. Reakció 3D-PCR-rel

Először végeztem egy próbareakciót, hogy mennyire megbízható a készülék, illetve hogy a termékek is megfelelőek-e. A koncentrációk beállítása után láttam neki a PCR-reakcióknak. A reakciókat a lenti hőfokprogrammal végeztem el (4. táblázat, Gradiens1 ld. 5. táblázat).

A 3D-PCR hőfokprogramja			
	95 °C	2 min	
Denaturáció	Gradiens1	30 s	35x
	Gradiens2		
	Gradiens3		
Anneláció	58 °C	30 s	
Elongáció	72 °C	1 min	

4. táblázat: A 3D-PCR hőfokprogramja.

Oszlopszám	Gradiens1	Gradiens2	Gradiens3
1	74,9	79,7	82,2
2	75,3	79,9	82,2
3	76,5	80,4	82,4
4	78,6	81,1	82,7
5	81,2	82,1	83,0
6	83,8	83,1	83,3
7	86,2	84,0	83,7
8	88,8	85,0	84,0
9	91,5	86,0	84,3
10	93,5	86,7	84,6
11	94,7	87,2	84,8
12	95,2	87,4	84,8

5. táblázat: A gradiens hőmérsékletek.

A reakció után a mintákat ismét agaróz gélelektroforézisnek vetettem alá (Agaróz gélelektroforézis), annyi különbséggel, hogy a BME-n lévő kád mérete miatt az agaróz gél hozzávalóinak mennyiségét megháromszoroztam. A megfutott mintákat UV-készülékben megvizsgáltam.

7. NT és 5FdUR-termékek összehasonlítása

A próbareakció után a nem kezelt és a kezelt templátokat összehasonlítottam egy újabb 3D-PCR reakcióval. A gradiens egy kicsit finomabb volt (Gradiens2 ld. 5. táblázat). A fentiek szerint jártam el (Reakció 3D-PCR-rel), és szintén agaróz gélelektroforézissel és UV-spektrometriával vizsgáltam meg a termékeket.

Azokkal a mintákkal, amik ígéretesnek tűntek, egy még finomabb felbontású 3D-PCR reakciót végeztem el (Gradiens3 ld. 5. táblázat). Ezekkel is ugyanúgy jártam el, mint az előbb.

8. qPCR vagy kvantitatív PCR

A qPCR, real-time PCR vagy kvantitatív PCR során egy fluoreszcens festéket raknak a reakcióelegybe, amely a PCR termék szerkezetébe interkalálódik és fényt emittál. A PCR-készülékbe épített detektorok érzékelik a festék emisszióját, ezzel élő képet adnak az adott minta termékmennyiségéről (C_q értékek). Erre a módszerre azért volt szükség, hogy meghatározzuk a primerek hatásfokát, mert ez is egy jelentős faktora annak, ha nem elég éles a különbség a NT és az 5FdUR-kezelt minta között.

a) Primer hatásfok kiszámítása

Először a hígítatlan PCR-termékekből készítettem egy hígítási sort: az első tag 500 fg/μl volt, majd ennek 10x hígítási sora következett, egészen 0,0005 fg/μl-ig. A reakcióelegybe még kellett MyTaq (MyTaqTM Mix 2x), EvaGreen fluoreszcens festék (EvaGreen® Dye 20x), nukleázmentes víz és a primerpár.

A qPCR-t 2-2, ígéretesnek tűnő, negatív és pozitív szakasszal végeztem el, kettő 96 lyukú plate-en. A betöltés vázlatja az alábbi ábrán van a negatív mintákra (6. táblázat). Minden hígítási elemre 3-3 párhuzamos mintát készítettem.

A mintákat egybe készítettem el, a templátok ötszörösen, a MyTaq kétszeresen, a festék és a primerek hússzorosan hígultak. Minden DNS-szakaszhoz összesen 30x8,5x2, azaz 510 µl mintát készítettem, templát nélkül 24x8,5x2 (30 µl van összesen soronként az egyes mintatípusokból, ennek ötöde 6 µl, a templát), azaz 408 µl-t, amit aztán kiporcióztam, minden minta első oszlopába (1., 4., 7., 10. oszlopok) 24 µl-t téve. Már előzőleg belemértem a templátokat (az utolsó sor az NTC volt, abba a sorba templátok helyett nukleázmentes vizet mértem be), így már összesen 30 µl volt ezen oszlopok welljeiben. Alaposan homogenizáltam az elegyeket, majd 10-10 µl-t áthelyeztem az adott sorokban lévő 2-2 további helyre, így lett teljesen elfoglalva a plate.

	1neg3						4negTS						C _{well} (fg/ µl)
	NT			5FdUR			NT			5FdUR			
A													100
B													10
C													1
D													0,1
E													0,01
F													0,001
G													0,0001
H													NTC
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	

6. táblázat: A qPCR során használt plate sematikus ábrája.

Ezután a plate-t beletettem a készülékbe (BioRad CFX96 Touch qPCR), és beállítottam a hőfokprogramot (7. táblázat). A folyamat végén megvizsgáltam a detektorok által érzékelt jeleket és az olvadásgörbéket.

A primerek hatásfokait a C_q értékek alapján számoltam ki, Microsoft Excel alkalmazást használva. A hígítási sor tagjának vettem a 10-es alapú logaritmusát, és a három technikai párhuzamos C_q értékeinek átlagát. Az ezekből készített pontokra trendvonalat illesztve meghatároztam az egyenes meredekségét. Akkor vettem elfogadhatónak a mérést, ha $R^2 > 0,99$. A meredekségből pedig a következő módon számoltam a hatásfokot.

$$\eta = \left(10^{\frac{1}{\text{meredekség}}} - 1 \right) * 100$$

A qPCR hőfokprogramja		
95 °C	3 min	
95 °C	20 s	50x
58 °C	20 s	
72 °C	1 min	
Plate Read		
Melt Curve + Plate Read	5 s	

7. táblázat: A qPCR hőfokprogramja.

b) Gradiens qPCR

Miután kiszámoltam a hatásfokokat, a leghatékonyabb primerekkel elvégeztem egy másik qPCR mérést is. Ez inkább a 3D-PCR és a qPCR ötvözete volt, mert gradiens PCR reakciót végeztem el, de élő kép volt a wellek termékkoncentrációjáról. Ehhez már nem volt szükség plate-re, mert nem volt annyi minta. Készítettem minden szakaszhoz kettő NTC-t, kettő mintát megengedő hőmérsékleten (95 °C), és kettőt a restriktációs hőmérsékleten (ennek értéke a 3D-PCR reakción állt, illetve a becslőképességen). Mivel két szakaszt vizsgáltam, ezért kettő mixre volt szükségem. A kettő NTC 10-10 µl, a négy minta szintén. Ráahagyásokkal együtt:

$$2 * 45 + 25 = 115 \mu\text{l}$$

összesen egy DNS-szakaszra a mix. Először összemértem mindent a templátok (NTC esetében a víz) kivételével: erre is adtam 5% ráahagyást, így 60,375 µl MyTaq, 6,0375 µl EvaGreen és primer, valamint 24,12 µl nukleázmentes víz került a mixbe. Ezt kiporcióztam, majd az éles minták 36 µl-éhez adtam 9 µl templátot, az NTC 20 µl-éhez pedig 5 µl nukleázmentes vizet. 10-10 µl-ben elosztottam mindegyiket, és új PCR reakciót hajtottam végre, új hőfokprogrammal (8. táblázat).

A qPCR hőfokprogramja		
95 °C	3 min	
81,4→95 °C	20 s	50x
58 °C	20 s	
72 °C	1 min	
Plate Read		
Melt Curve + Plate Read	5 s	

8. táblázat: A gradiens qPCR hőfokprogramja.

A reakciók lejátszódása után megvizsgáltam az olvadási görbéket, és agaróz gélelektroforézissel is analizáltam a mintákat, hogy azonos-e a tömegük. Végül megismételtam ezt a folyamatot, de ezúttal hat-hat éles mintát készítettem. Ez szakaszonként

$$2 * 65 + 25 = 155 \mu\text{l}$$

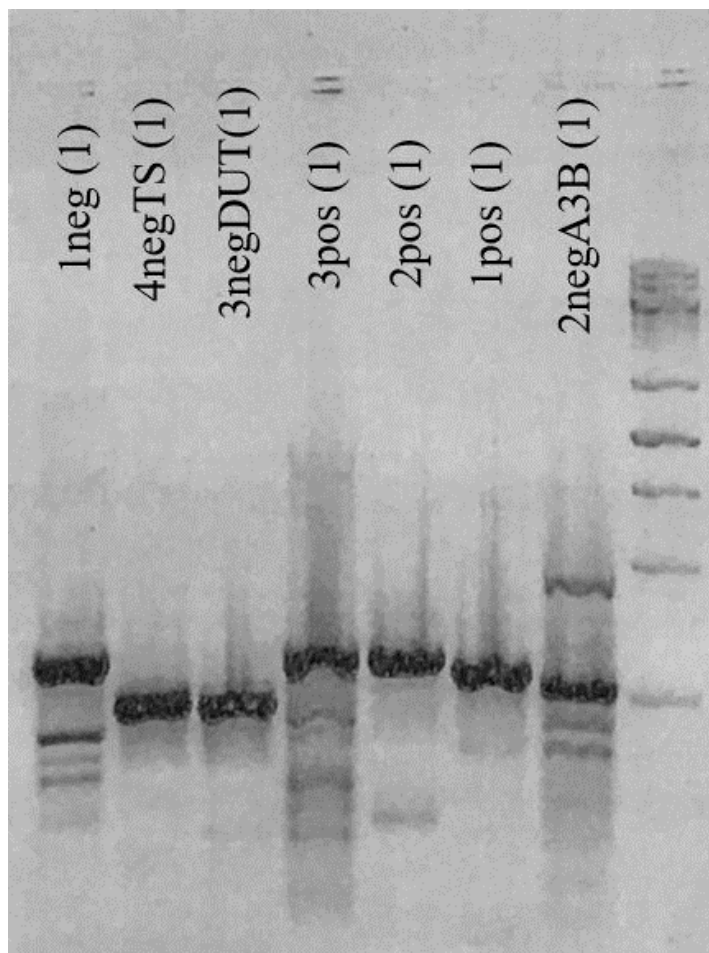
mix. A szokásos ráhagyásokkal számolva kimértem 81,375 μl MyTaq-ot, 8,1375 μl EvaGreen-t és primert, és 32,52 μl nukleázmentes vizet. Kiporciózás után az NTC mixhez adtam 5 μl nukleázmentes vizet, az éles mintákhoz pedig 13 μl templátot. Az éles mintákból négy-négy került a restrikciós hőmérsékletre, kettő-kettő pedig a megengedő hőmérsékletre.

VII. Eredmények

1. Specifitásvizsgálat hagyományos PCR-rel

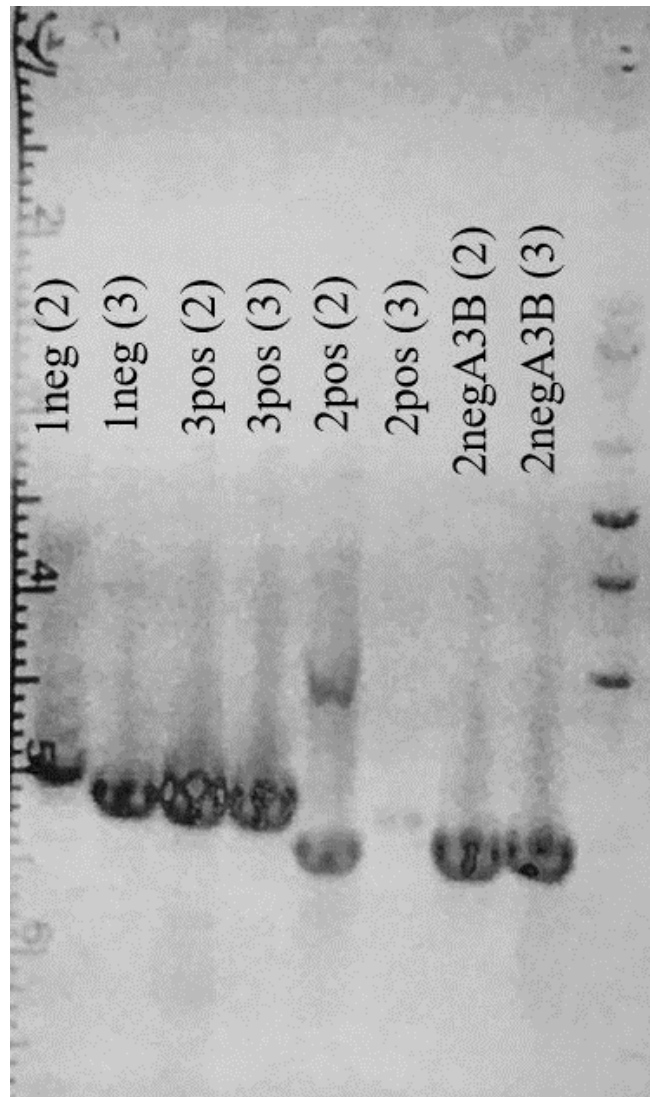
A megrendelt, szakaszonkénti 3-3 primerpárral először specifitásvizsgálatot végeztem el. Mindenhol a legspecifikusabb párokat választottam ki.

Az első specifitás reakciót minden szakasz első számú primerpárjával végeztem el. Normál PCR-hez állítottam össze a mintákat (Reakció hagyományos PCR-rel), majd a reakciók végén agaróz gélen megfuttattam a termékeket (Agaróz gélelektroforézis), és megvizsgáltam az UV-képüket.



6. ábra: Az első specifitásvizsgálat agaróz gélelektroforézisének eredménye. Jól látható, hogy csak három termék specifikus: a 4negTS, a 3negDUT és az 1pos. A többi termék aspecifikusságára utal a sűrű csíkozottság. Piros nyíllal jelöltem azt a helyet, ahol a GRS 1kb Ladder szerint az 500 bp hosszúságú termék jön.

Az ábra alapján (6. ábra) a hét termékből mindössze három volt specifikus (egy csík a termék oszlopán a várt magasságban): a 4negTS, a 3negDUT és az 1pos termékei. A többi esetben a gélen több csík is látható, ami azt jelenti, hogy több, eltérő hosszúságú termék keletkezett. Ezeken a szakaszokon újra elvégeztem a reakciót, ezúttal a második és harmadik primerpárokkal. A körülmények teljesen azonosak voltak, és ugyanúgy agaróz gélelektroforézist hajtottam végre.



7. ábra: A második specificitásvizsgálat agaróz gélelektroforézisének eredménye. A legtöbb szakaszon szinte egyezik a kétféle termék (esetleg más a tömegük), de a 2pos szakasz harmadik primerpárja szinte nem adott terméket. Piros nyíllal jelöltem azt a helyet, ahol a GRS 1kb Ladder szerint az 500 bp hosszúságú termékek jönnek.

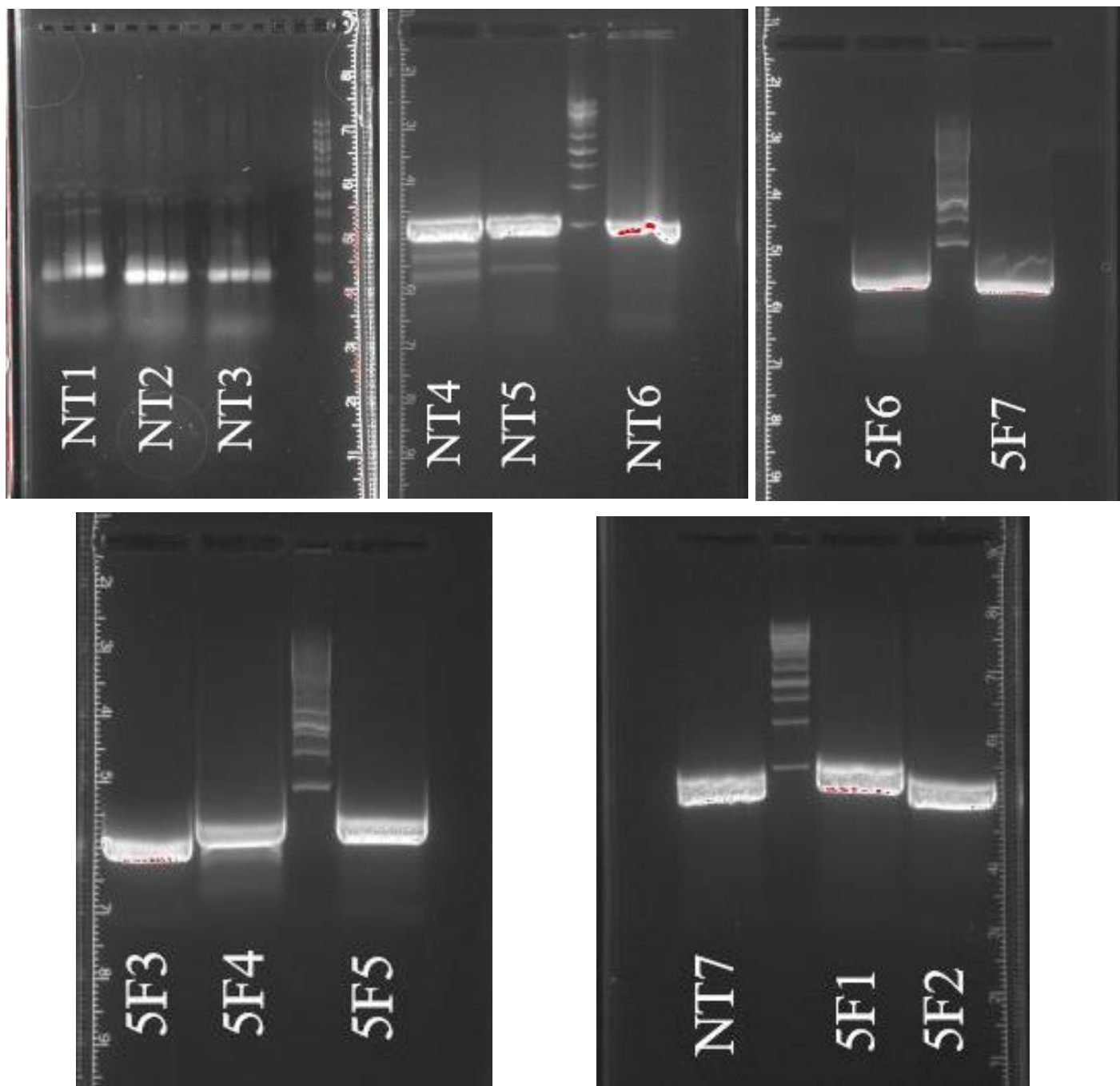
A vizsgálat eredménye alapján (7. ábra) a második és harmadik primerpárok többnyire specifikus termékeket adtak. A többihez képest jelentős eltérés a 2pos szakasz primereinek termékeinél van: a második pár is elég halovány, de a harmadik párral szinte nem is jött fel semmilyen termék.

A fenti eredmények alapján a hét kiválasztott primerpár a következők: 1neg(3), 4negTS(1), 3negDUT(1), 3pos(2), 2pos(1), 1pos(1), 2negA3B(2). A 4negTS, 3negDUT, 1pos szakaszok esetében az első vizsgálatnál már eldőlt, hogy az első primerpár alkalmas. Az 1neg szakasz második primerpárja a többi termékhez képest magasabban van, azaz valamivel nagyobb a tömege, ezért inkább a harmadik primerpárt választottam. A 3pos második és harmadik primerpárja között nincs nagy különbség, a második pár terméke egy kicsit erősebb képet ad, így arra esett a választás. A 2pos második és harmadik primerpárja annyira nem adott terméket, hogy az aspecificitása ellenére az első párt választottam. A 2negA3B szakasz primerpárjai közül a másodikat választottam, mert annak ugyanúgy egy kicsit erősebb volt a képe, mint a harmadiknak.

2. PCR termékek izolálása, tisztítása

Az előző fejezetben kiválasztott primerpárokkal ezután elvégeztem egy másik PCR reakciót, ahol ötszörös mennyiségű mintákat állítottam elő (PCR termékek preparatív kinyerése és tisztítása). A reakciók lejátszódása után agaróz gélelektroforézisnek vettem alá a mintákat, és megvizsgáltam az UV-képüket. Ezután az UV-készülékbe áthelyezve, szikével kivágtam a mintákat a gélből, és elvégeztem a tisztítási eljárást.

A mintákra itt már a rövidítésjegyzék szerinti neveket használtam (3. táblázat).



8. ábra: Az 50 µl-es PCR termékek UV-képe. Az első képen a 3-3 zsebben ugyanazok a minták vannak.

A gélképek alapján (8. ábra) minden szakasz primerpárja specifikus és megfelelő mennyiségű terméket adott. Az első képen azért van a három minta 3-3 zsebben, mert utólag tudtam meg, hogy gélből kivágáskor nagyobb zsebekre van szükség, a többi mintánál már ennek tudatában készítettem el az agaróz gél.

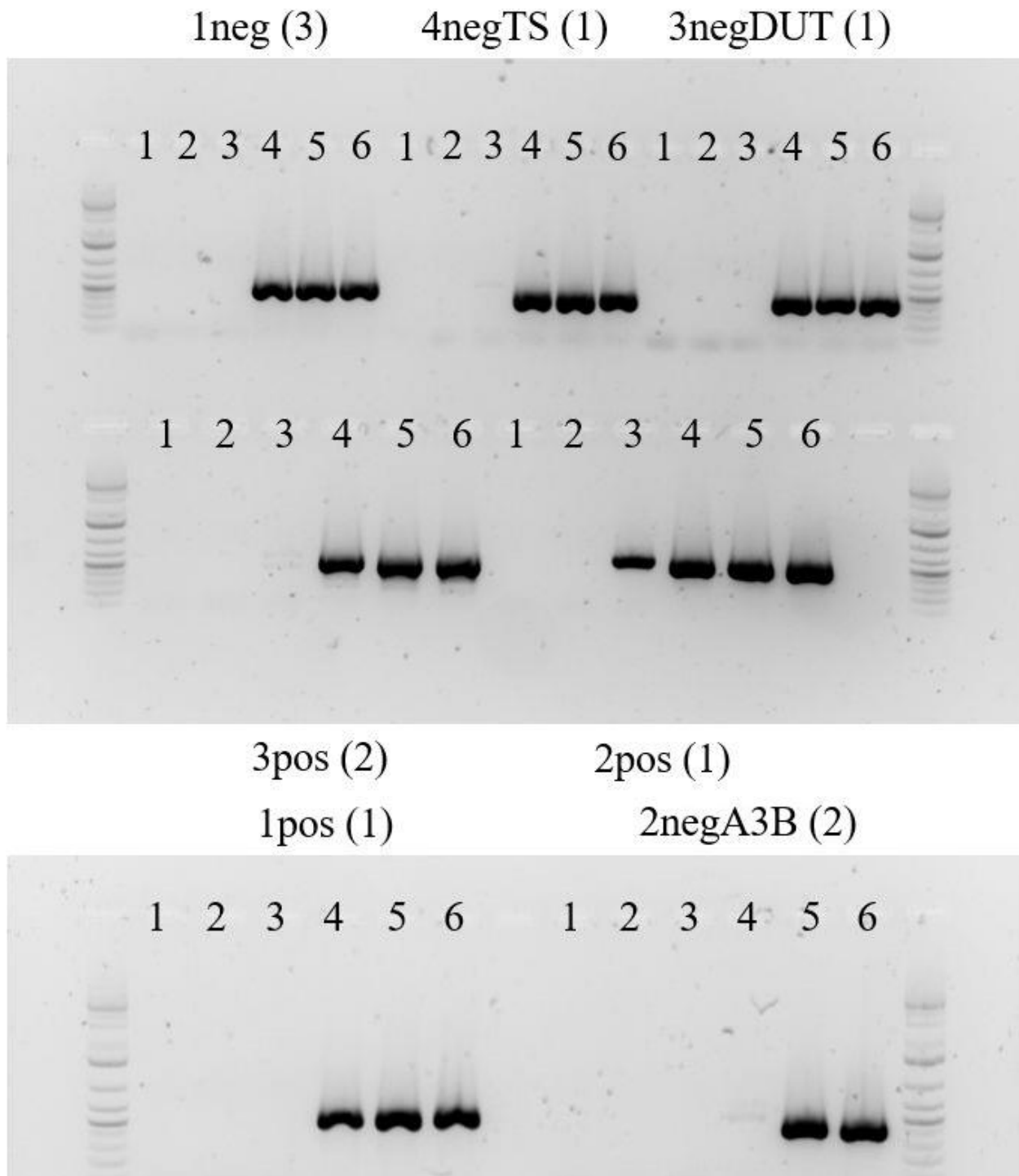
A tisztítási protokoll elvégzése után megmértem a minták koncentrációját és feljegyeztem (9. táblázat).

Minta	Koncentráció (ng/μl)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀ (-)	A ₂₆₀ /A ₂₃₀ (-)
NT1	39,1	1,98	1,29
NT2	26,2	2,03	1,84
NT3	46,8	1,96	1,34
NT4	82,6	1,96	1,53
NT5	73,5	1,96	1,73
NT6	87,4	1,96	2,10
NT7	109,4	1,95	1,60
5F1	115,2	1,95	1,72
5F2	105,1	1,95	2,14
5F3	118,1	1,96	1,99
5F4	148,8	1,94	1,75
5F5	126,8	1,95	1,86
5F6	96,6	1,96	1,57
5F7	100,3	1,96	1,71

9. táblázat: A tisztított PCR termékek koncentráció és abszorbancia adatai. A két relatív abszorbancia minél közelebb van 2-höz, annál tisztább a termék.

3. Próbareakció 3D-PCR-rel

A minták preparatív kinyerése után következett a próbareakció, amelyet a kezeletlen mintákkal hajtottam végre. Az volt a célja ennek, hogy megvizsgáljam a reakciók specifitását. Elkészítettem a reakcióelegyet, kiporcióztam (Reakció 3D-PCR-rel), majd a folyamat végén agaróz gélelektroforézissel analizáltam a termékeket (Agaróz gélelektroforézis).



9. ábra: A 3D-PCR-rel való próbareakció eredménye a NT mintákon. Valamennyi termék specifikus, egycsíkos. A 2pos és 2negA3B szakaszok termékeinél már most látható különbség olvadási hőmérsékletben.

Gradiens	Zseb száma	Gradiens hőmérséklet (°C)
Gradiens1	1	74,9
	2	76,5
	3	81,2
	4	86,2
	5	91,5
	6	95,2
Gradiens2	7	81,1
	8	82,1
	9	83,1
	10	84,0
	11	85,0
	12	86,0
Gradiens3	13	82,2
	14	82,4
	15	82,7
	16	84,3
	17	84,6
	18	84,8

10. táblázat: A 3D-PCR-rel való kísérletezés során használt gradiens hőmérsékletek.

Az agaróz gél képen (9. ábra) jól látszik, hogy a PCR termékek szépen, specifikusan adták a reakciót. A gradiens hőmérséklet elég nagy hőmérséklettartományt fogott közre (10. táblázat, Gradiens1), mert ez még tapogatózó kísérlet volt. De erre már lehetett építeni. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy már a NT-termékek között is ki lehet mutatni különbséget az olvadási hőmérsékletben. A most következő kísérletben már a NT és a kezelt mintákat hasonlítottam össze.

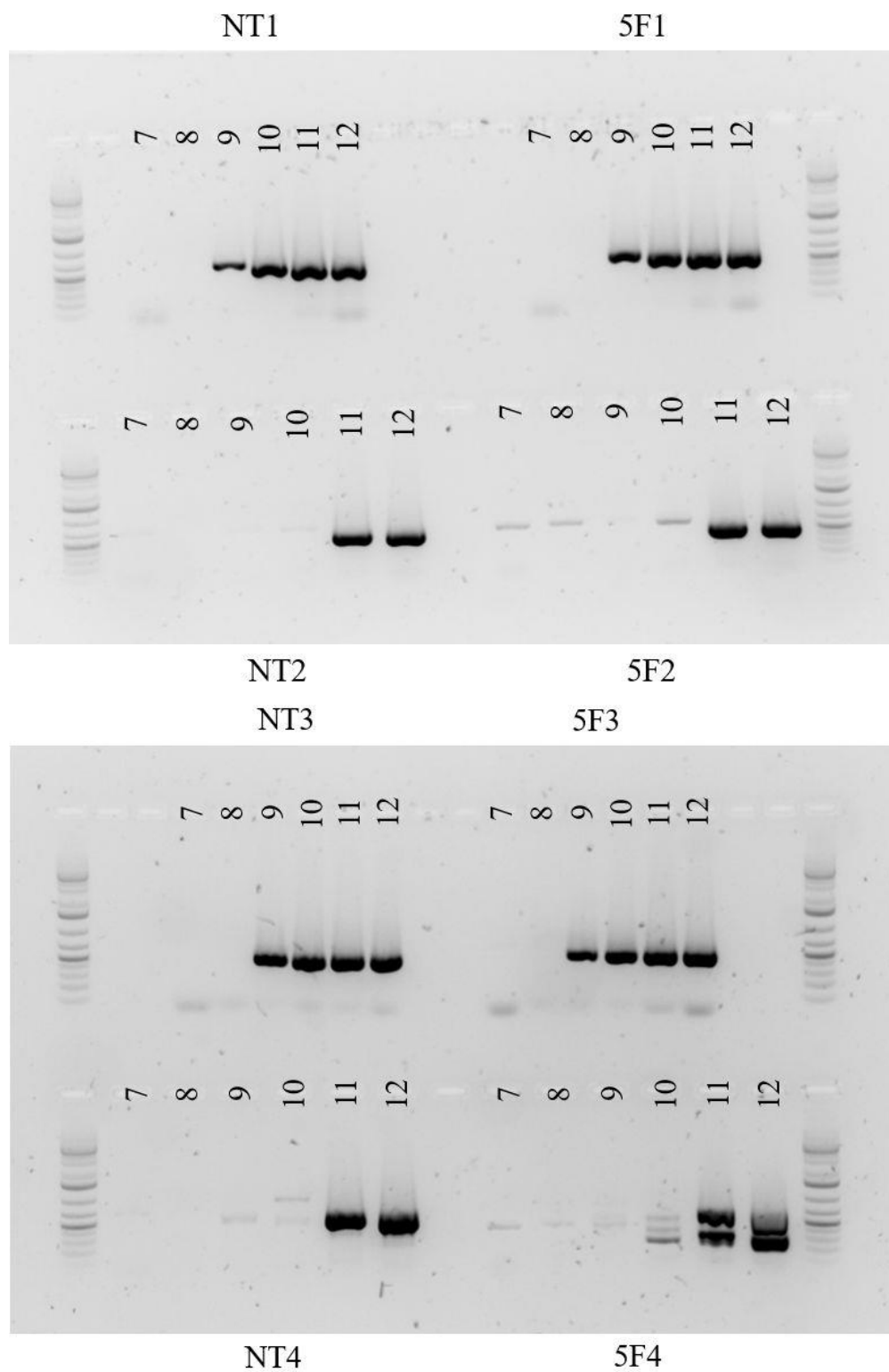
4. NT és 5FdUR-kezelt termékek összehasonlítása

A kísérlet „alanyainak” az első négy szakaszt választottam, mert azoknak egy tartományba esett az olvadási hőmérséklete (9. ábra) (10. táblázat, Gradiens1). A 2pos(1) és a 2negA3B(2)

termékeinek annyira eltér az olvadási hőmérséklete, hogy egyszerre nem is tudtam volna tovább dolgozni velük.

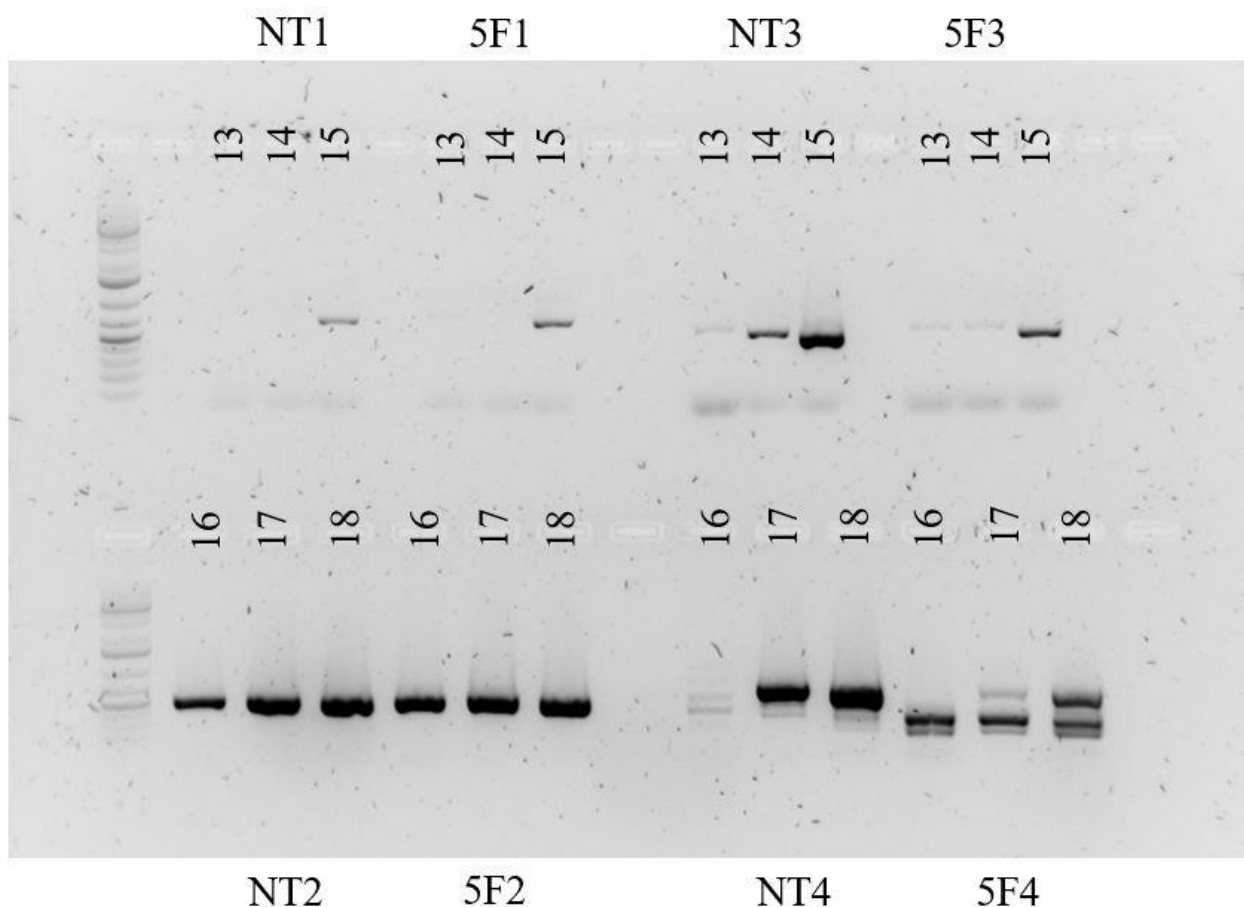
Ehhez a PCR reakcióhoz ugyanúgy raktam össze a reakcióelegyet, mint az előbb a próbareakcióhoz, majd szintén agaróz gélen megfuttatva vizsgáltam meg a termékeket. A különbség a gradiens hőmérséklet volt (10. táblázat, Gradiens2).

A képen (10. ábra) igencsak furcsa eredmények láthatóak. A negatív szakaszok mintáin (az első három) nincs nagy különbség a NT és az 5FdUR-kezelték között. Ebben semmi meglepő nincsen, mert ezt vártuk. Kettő érdekes dolog figyelhető meg itt: az egyik, hogy a 4negTS 5FdUR-kezelt mintája alacsonyabb hőmérsékleten is ad valami halovány terméket. De még furcsább a másik, ami az, hogy a 3pos kezelt mintája aspecifikus terméket ad. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy ez valahol, valamikor szennyezett lett.



10. ábra: Az *1neg(3)*, *4negTS(1)*, *3negDUT(1)*, *3pos(2)* szakaszok NT és 5FdUR-kezelt termékeinek képe.

Ezek után végeztem ugyanezekkel a mintákkal egy finomabb felbontást is, egyúttal azt is ellenőrizve ezzel, hogy az 5F4 most is aspecifikus lesz-e. Összeállítottam még egy reakcióelegyet, és a reakciók végén ezt is megvizsgáltam.

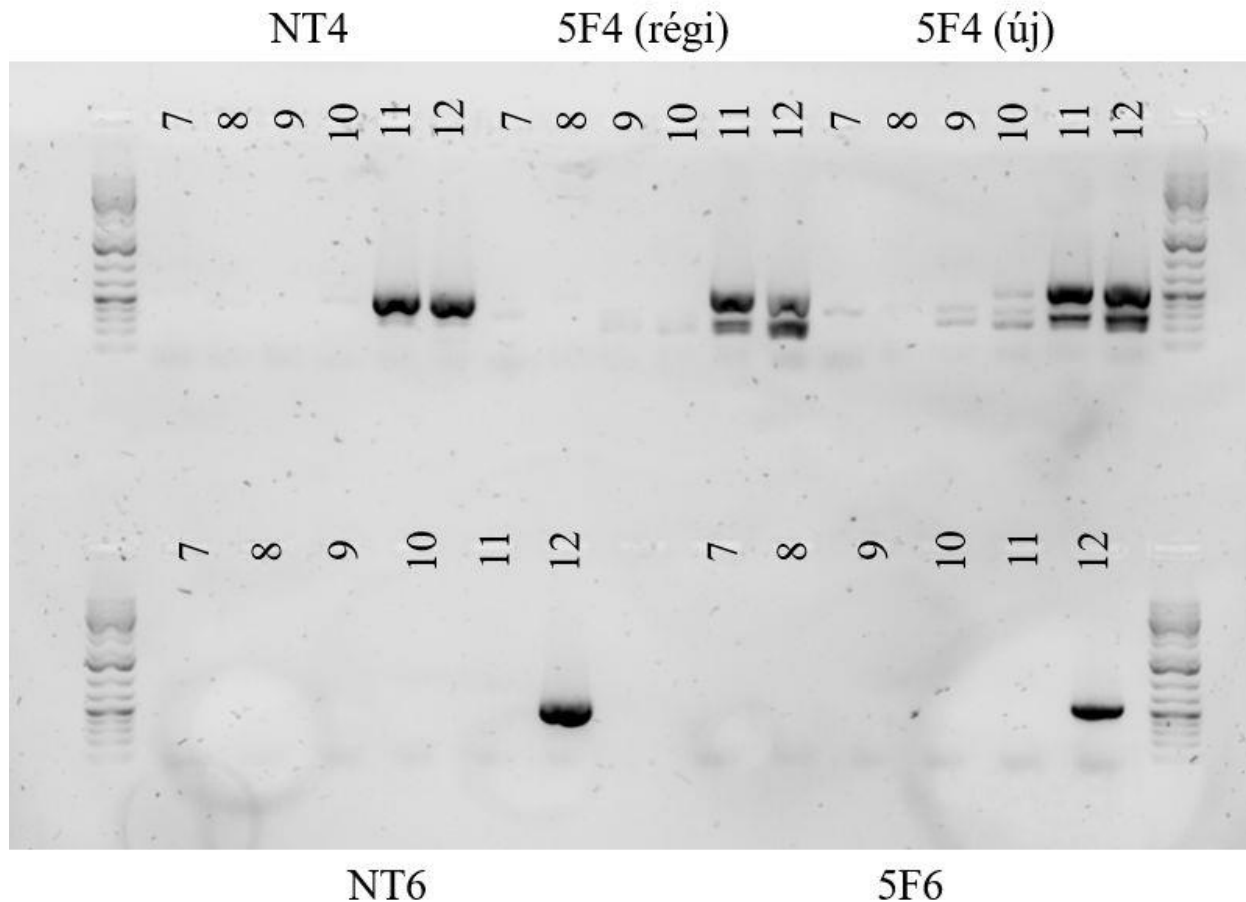


11. ábra: A finomfelbontású 3D-PCR eredménye az 1neg(3), 4negTS(1), 3negDUT(1), 3pos(2) szakaszokra.

A gradiens hőmérséklet itt már elég finom volt (10. táblázat, Gradiens3), ráadásul ketté kellett szednem a négy szakasz mintáit. Ahogy fentebb látható (10. ábra), az 1neg(3) és a 3negDUT(1) mintái (mind a NT, mind az 5FdUR-kezelt) alacsonyabb hőmérsékleten jöttek fel, mint a 4negTS(1) és 3pos(2) mintái.

A képen nem látszik semmi újdonság (11. ábra), a negatív szakaszokon ugyanúgy nincsen különbség a NT és az 5FdUR-kezelt minták között, de az 5F4 megint aspecifikus lett. Ezek az eredmények megerősítik, hogy a negatív szakaszokon 5FdUR hatására nincs mérhető C→T gyakoriság növekedés.

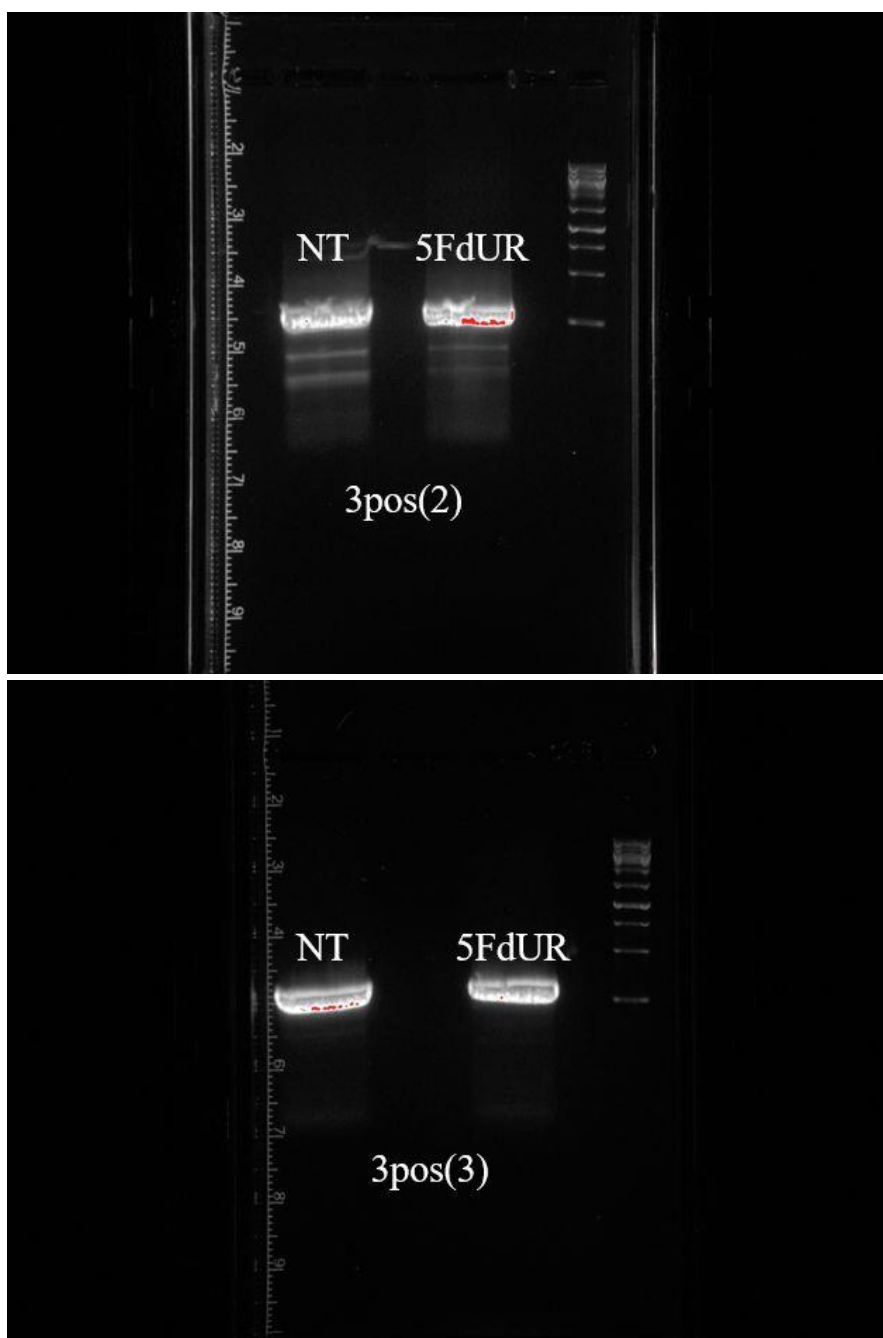
Ez után azt tűztem ki célul, hogy kiderítsem, mi az oka annak, hogy az 5F4 aspecifikusan jön fel. Először azt próbáltam meg, hogy az 5F4 hígítatlan PCR termékét (amit gélből izoláltam) újra kihígítom, és azzal, valamint a régi hígított mintával is párhuzamosan elvégzek egy reakciót. Kontroll gyanánt elvégeztem a folyamatot egy másik pozitív szakasz, az 1pos(1) NT és 5FdUR-kezelt mintáival is, hogy meggyőződjek róla, hogy az aspecifitás csak a 3pos(2)-nél vagy minden pozitív szakasznál megfigyelhető-e.



12. ábra: Az NT4, a régi és új hígítású 5F4 minták, illetve az 1pos(1) NT és 5FdUR-kezelt mintájának képe.

Ahogy az az ábrán is látszik (12. ábra), a 6-os szakasz pozitív volta ellenére nem volt aspecifikus. A gradiens hőmérsékletek 1 °C-ban tértek el egymástól (10. táblázat, Gradiens2). Ezek az eredmények azt mutatják, hogy csak az 5F4 aspecifikus, és nem a hígításkor szennyeződött, tehát már régebben.

Ezért a 3pos(2) és a 3pos(3) primerpárokkal újra elvégeztem az izolálást és tisztítást, utóbbit kontrollként használva, illetve hátha az a jobb választás. Gélképeik alább vannak (13. ábra).

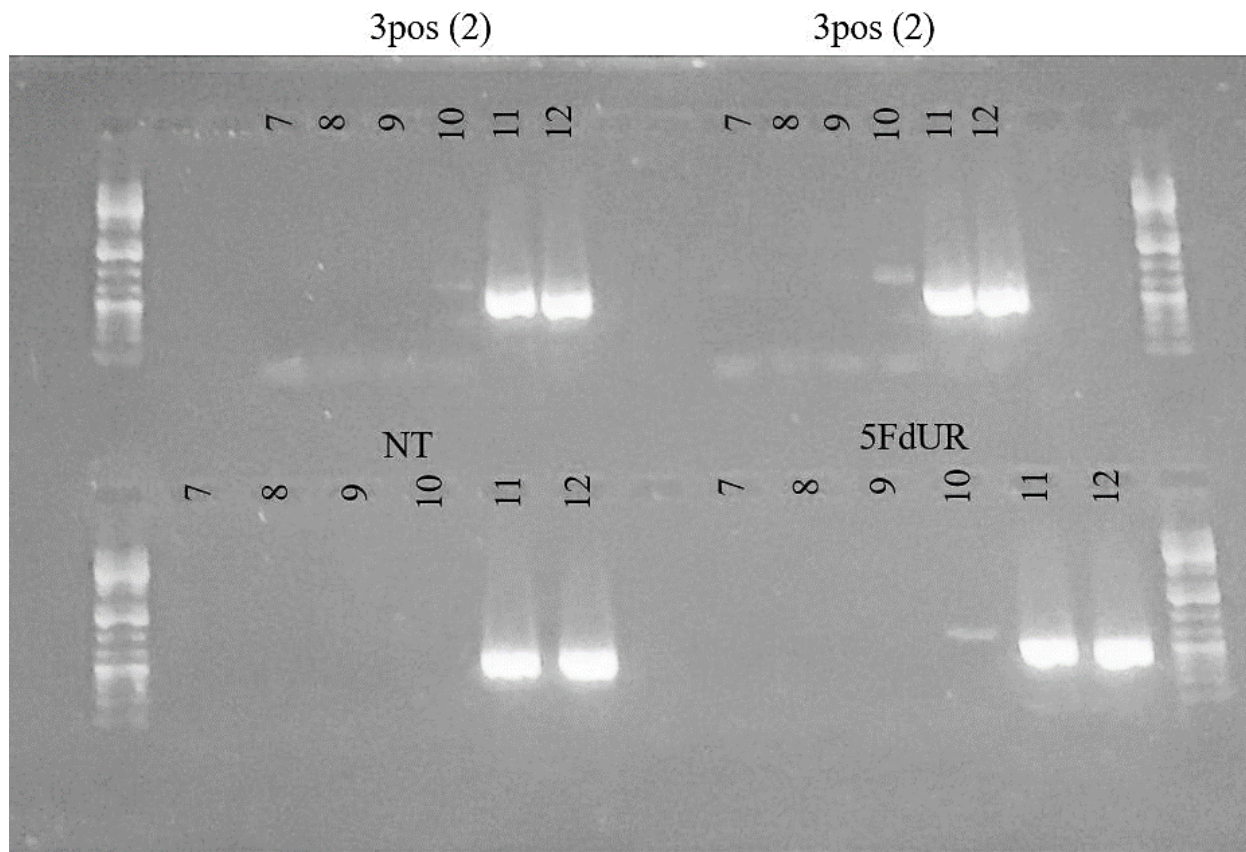


13. ábra: A 3pos(2) és 3pos(3) gélképei az izolálás előtt.

Utána ismét elvégeztem egy mérést 3D-PCR-rel, rögtön az 1 °C-os gradienssel (10. táblázat, Gradiens2).

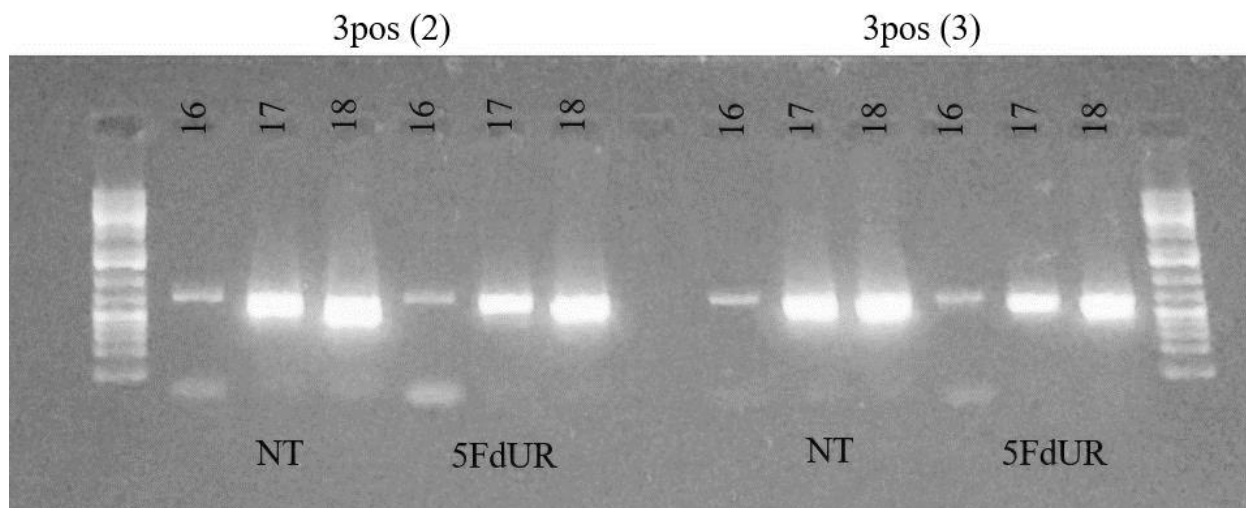
Majd ugyanezekkel elvégeztem a finomfelbontású 3D-PCR-t is. Ahogy alább látható (14. ábra), ezúttal a 3pos(2) is specifikus terméket adott, akárcsak a 3pos(3). Mindkettő NT-mintája 84

és 85 °C között jön fel, de az 5FdUR-kezelt minták már 84 °C-on is adnak egy halvány terméket. Azonban a finomabb felbontású (10. táblázat, Gradiens3) reakció esetén (15. ábra) nem figyelhető meg markáns különbség a NT és 5FdUR-kezelt minták között. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a 3pos(2) régebbi mintája (5F4) nem a híguláskor szennyeződött. Feltételezésem szerint akkor szennyeződhetett, amikor kivágtam a gélből, ugyanis nagyon közel volt az 5F3-hoz (8. ábra).



3pos (3) 3pos (3)

14. ábra: A 3pos(2) és 3pos(3) NT és 5FdUR-kezelt mintáinak géliképe.



15. ábra: A 3pos(2) és 3pos(3) NT és 5FdUR-kezelt mintáinak finomfelbontású reakciójának eredménye.

Mivel még mindig nem volt egyértelmű a különbség a NT és az 5FdUR-kezelt minták között, ezért szükséges volt egy alternatív vizsgálati módszer. Így jött be a képbe a qPCR. Először

a primerek hatásfokát próbáltuk meghatározni, mert annak is szerepe lehet a kétféle minta indifferenciájában.

5. Primerek hatásfokának meghatározása qPCR-rel

Miután elkészítettem a plate-t a technikai párhuzamosokkal (Primer hatásfok kiszámítása), és lefutott a reakció, Microsoft Excel-ben feljegyeztem az eredményeket, és kiszámoltam a primerek hatásfokát (11. táblázat).

Target	Minta	C _{Well} (fg/μl)	Hígítás i tag	lg(hígítási tag)	C _q átlag	Meredekség	Hatásfok (%)	R ²
1neg(3)	NT	100	1	0	18,73	3,991	78,06	0,9938
		10	10	1	22,425			
		1	100	2	26,39			
		0,1	1000	3	31,455			
		0,01	10000	4	34,17			
	5FdUR	100	1	0	19,46	4,031	77,04	0,9962
		10	10	1	22,753			
		1	100	2	27,363			
		0,1	1000	3	31,36			
3pos(2)	NT	100	1	0	17,84	3,9056*	80,32*	0,993*
		10	10	1	20,773			
		1	100	2	25,34			
		0,1	1000	3	29,336			
		0,01	10000	4	35,296			
	5FdUR	100	1	0	16,53	4,2	73,02	0,9903
		10	10	1	20,473			
		1	100	2	25,636			
		0,1	1000	3	30,086			
		0,01	10000	4	32,72			

4negTS(1)	NT	100	1	0	20,363	5,4176	52,96	0,9866
		10	10	1	26,05			
		1	100	2	32,686			
		0,1	1000	3	36,21			
	5FdUR	100	1	0	31,51	5,033*	58,00*	0,939*
		10	10	1	22,023			
		1	100	2	29,276			
		0,1	1000	3	32,09			
3pos(3)	NT	100	1	0	19,926	4,2486	71,94	0,974
		10	10	1	22,77			
		1	100	2	27,31			
		0,1	1000	3	30,39			
		0,01	10000	4	37,36			
	5FdUR	100	1	0	18,155	4,5313	66,22	0,9932
		10	10	1	22,336			
		1	100	2	28,253			
		0,1	1000	3	32,16			
		0,01	10000	4	35,9			

11. táblázat: A primer hatásfok kiszámításának eredményei. Zölddel azok vannak megjelölve, amik az R^2 értékek alapján megfelelőnek vannak minősítve, pirossal azok, amik kívül esnek a kritériumon. *-gal megjelölt értékek azt jelentik, hogy az adatsor nem mindegyik tagja volt beleszámolva a meredekségbe, pirossal lettek ezek megjelölve.

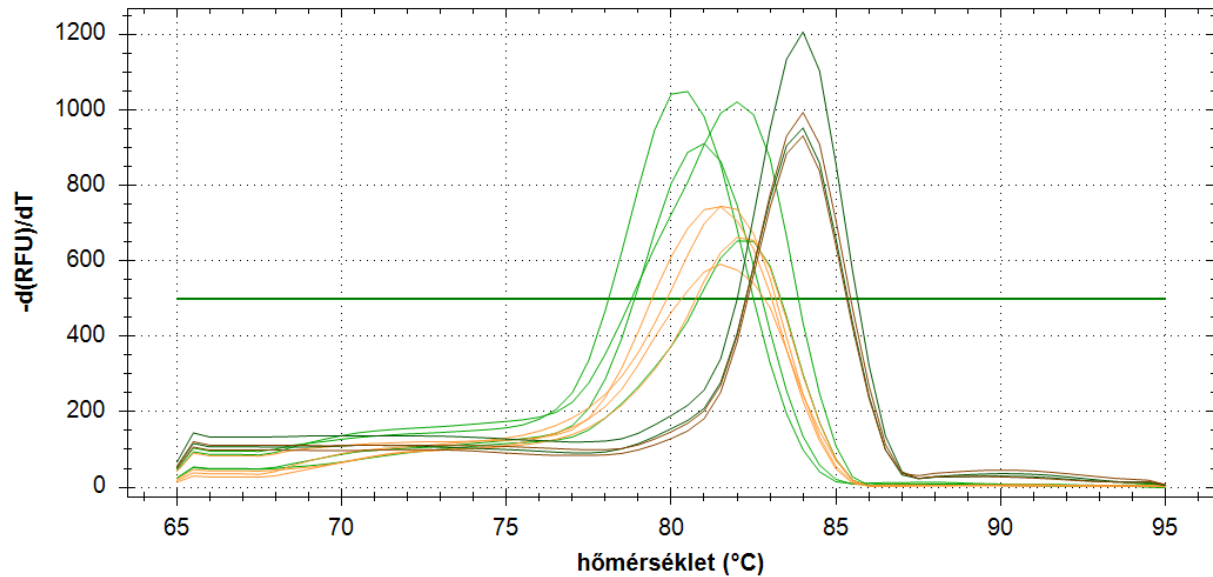
A táblázat alapján az 1neg(3) és a 3pos(2) targetek mintái lettek a legígéretesebbek, mert az R^2 értékük megfelelő és a hatásfokok is nagyobbak, mint 70%. Ezért ezekkel dolgoztam tovább. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy valóban van eltérés a primerek hatásfoka között, és ez is hozzájárulhat ahhoz, hogy a várakozás ellenére nincs jelentős különbség a NT és 5FdUR-kezelt minták között. A következő lépés a qPCR megismétlése volt, de ezúttal gradiens hőmérsékletekkel.

6. Gradiens qPCR a kiválasztott targetekre

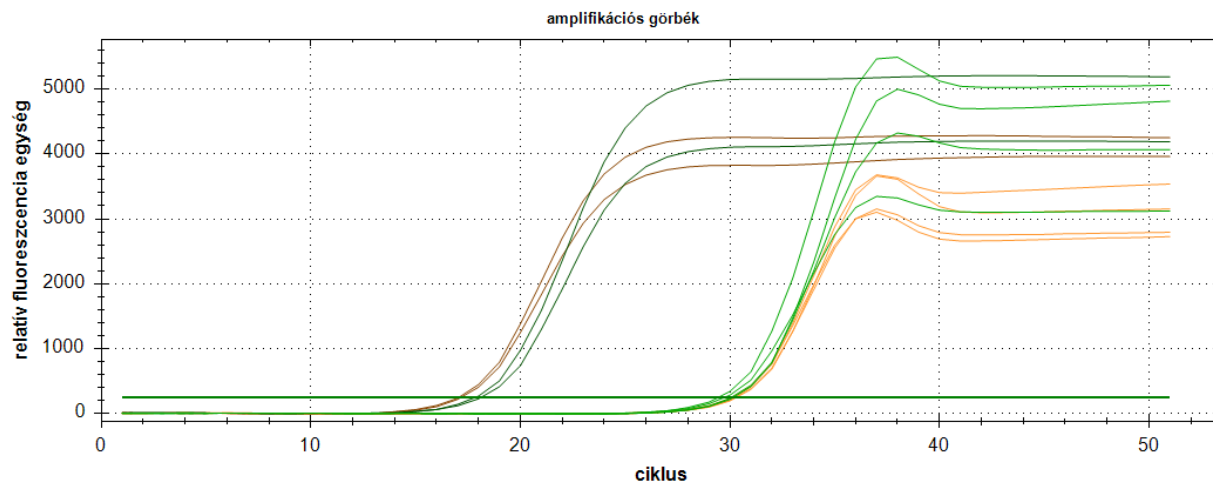
A kiválasztott targetekkel két hőmérsékleten végeztem el a reakciókat: az egyik a megengedő hőmérséklet, azaz 95 °C, amelyen biztosan feljön a termék, a másik az ún. restriktációs

hőmérséklet, ami a 3D-PCR-rel való kísérletezések alapján közel áll a minta denaturációs hőmérsékletéhez.

Összeraktam a reakcióelegyeket a leírtak alapján (Gradiens qPCR), elindítottam a reakciót, majd utána kiértékeltem az olvadási és koncentrációs görbéket.



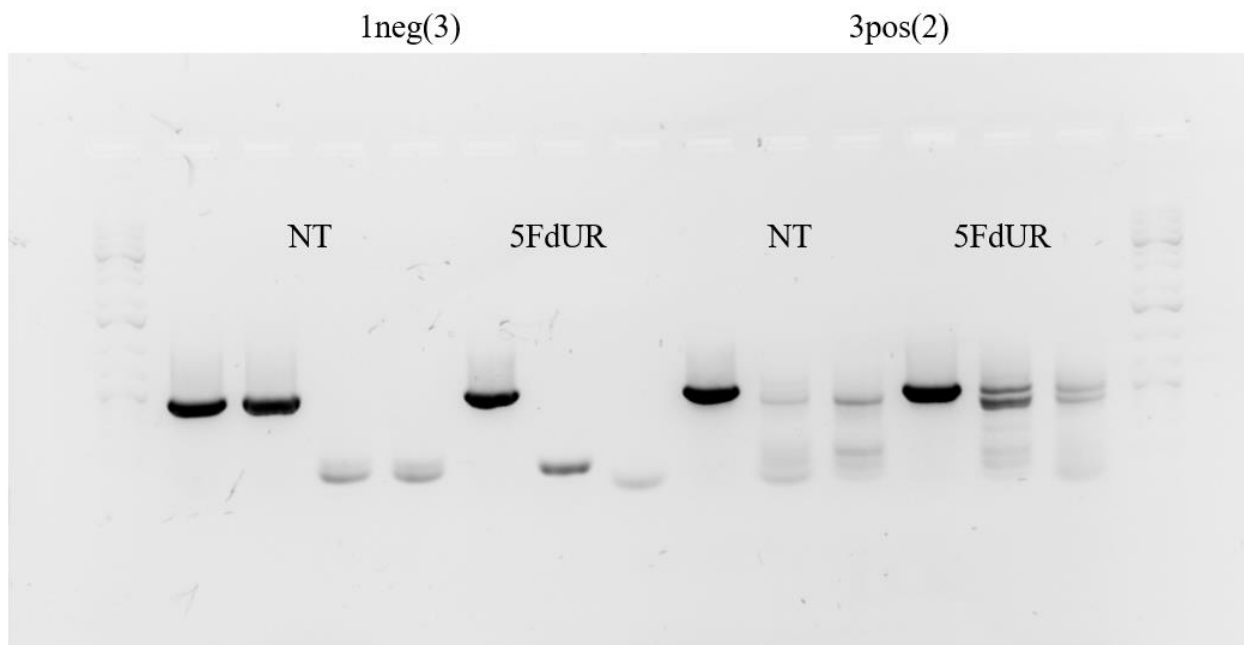
16. ábra: Az *1neg3* és *3pos2* kezelt és kezeletlen mintáinak gradiens qPCR során kapott olvadási görbéje. Narancssárga árnyalatok a kezeletlen, zöld árnyalatok a kezelt minták görbéit mutatják.



17. ábra: Az *1neg3* és *3pos2* kezelt és kezeletlen mintáinak gradiens qPCR során kapott amplifikációs görbéje. Narancssárga árnyalatok a kezeletlen, zöld árnyalatok a kezelt minták görbéit mutatják.

A reakciók lejátszódása után kapott görbék érdekes eredményeket mutatnak. Az olvadási görbén (16. ábra) és az amplifikációs görbén (17. ábra) is észrevehető a különbség a megengedő és a limitáló hőmérsékleten való viselkedés között. A megengedő hőmérséklet mintái sötétebb árnyalattal vannak jelölve, mint a limitáló minták. Az amplifikációs görbén (17. ábra) jól látszik, hogy a megengedő hőmérsékleten a termék hamarabb jött fel, mint a limitálón. Ebben alapvetően nincsen semmi meglepő, sokkal inkább szembetűnő a limitáló hőmérséklet mintáihoz tartozó görbéken lévő „hullámok”. Egyelőre nem tudni, hogy mi okozhatja ezt a jelenséget, de a mérés eredménye szempontjából kevésbé van jelentősége. Vegyük észre, hogy amíg a megengedő hőmérsékleten a kezeletlen termékek jöttek fel hamarabb, a limitáló hőmérsékleten azonban már az 5FdUR-kezelt minták termékei jelentek meg előbb. Ez azt indikálja, hogy a kezelt minták (ha nem is az egész minta) tartalmaznak C→T átmenetet szenvedett DNS-régiót. Az olvadási görbén (16. ábra) megfigyelhető, hogy a limitáló hőmérsékleten a kezelt minták görbéi egy kicsivel balra vannak a kezeletlen mintákétól, azzal együtt, hogy nem lettek egységes termékek.

Ez a mérés azt mutatja, hogy az 5FdUR-kezelésen átesett sejtekből izolált DNS valóban tartalmaz C→T mutációt. Az egyetlen faktor, ami cáfolhatja ezt a feltevést, a termékek tömege. Ha nem egyezik a termékek tömege, akkor a különbség az olvadási görbén a tömegkülönbséggel magyarázható. Ennek eldöntésére a termékekkel végeztem egy agaróz gélelektroforézist. Ha a főtermékek egy vonalban vannak, akkor hasonló a tömeg, és a PCR-hatékonyság, továbbá felmerülhet annak a lehetősége is, hogy a C→T mutáció okozza az eltérést.



18. ábra: Az 1neg3 és 3pos2 qPCR termékeinek agaróz elektroforézisének eredménye. Balról az 1., 2., 5., 8., 11. minták a megengedő hőmérséklet (95°C), a többi a limitáló hőmérsékletek (1neg(3) 82,4 °C, 3pos(2) 84,6 °C) termékei.

Az elektroforézis eredménye (18. ábra) egyszerre zavart keltő és ígéretes. Nem az összes mintát futtattam meg, a megengedő hőmérséklet egy-egy mintáját, és két-két mintát a limitáló hőmérsékletéről. Az 1neg(3) kezeletlen mintáiból a megengedő hőmérsékleten mindkettőt megfuttattam, mert az egyik termék olvadási görbéje egy kicsit más volt, mint a többié. Az elektroforézis eredménye alapján az 1neg(3) kezeletlen és 5FdUR-kezelt mintái között nincsen nagy különbség, illetve a limitáló hőmérséklet termékei alacsonyabb tömegűek, mint a megengedő hőmérsékleté. A 3pos(2) esetében azonban (főleg az 5FdUR-kezelt minták esetében) vannak olyan termékek a limitáló hőmérsékleten, amelyek tömegre hasonlóak a megengedőn lévő termékekhez. Ez az eredmény, ha nem is teljes bizonyossággal, de megerősíti, hogy az olvadási görbék különbsége a pozitív kontroll esetében a C→T mutációból fakadhat.

VIII. Összegzés

Kísérleteim során kezeletlen és 5FdUR-kezelt sejtekből izolált DNS-mintákkal dolgoztam. Elsődleges célom volt validálni azt a genomszekvenálási adatokra alapozott állítást, hogy az 5FdUR kemoterápiás szer növeli a C→T átmenet gyakoriságát, ezen keresztül csökkentve a DNS-szakasz olvadáspontját. Ha több AT-pár van a DNS-ben (2 H-híd), mint CG-pár (3 H-híd), akkor alacsonyabb a denaturációs hőmérséklete. Ezt a törekvésemet 3D-PCR segítségével próbáltam elérni, amely gradiens hőmérsékleti intervallumot létrehozva más-más hőmérsékletre melegíti az egyes mintákat, így kettő hőmérséklet közé (ahol nem jön fel a termék, illetve ahol feljön) be lehet tájolni. Azonban ez a módszer csak numerikus közelítést ad, nem lehet precízen meghatározni a minta denaturációs hőmérsékletét, de finomabb felbontással pontosítani lehet ezt a közelítő értéket.

A munka a specificitás vizsgálattal kezdődött. A megtervezett és megrendelt primerek közül megnéztem PCR-rel és agaróz gélelektroforézissel, hogy melyik ad egycsíkos, specifikus terméket. Amelyek megfeleltek az elvárásoknak, azokkal ismét elvégeztem egy reakciót PCR-rel, és elektroforézist követően izoláltam a mintákat a gélből és tisztítási eljárással megtisztítottam őket. A purifikált minták már készen álltak a 3D-PCR-rel való kísérletezésre, de előtte még meg kellett hígítani őket, mert eddig genomi DNS-t használtam templátnak. A PCR-termékek sokkal rövidebbek a genomi DNS-nél, ezért hígabb állapotban kell alkalmazni őket.

A NT-minták a próbareakció során specifikus termékeket adtak, ebből feltételeztem, hogy a készülék megfelelően működik. Amikor azonban a NT és 5FdUR-kezelt mintákat párhuzamosan reagáltattam, nem jött az átütő különbség a pozitív kontroll minták esetén (a negatív kontrolloknál sem volt jelentős különbség, de ott az volt a várt eredmény is). A 3pos(2) 5FdUR-kezelt mintája feltűnően aspecifikus terméket adott, mind szélesebb, mind finomabb hőmérsékleti felbontás esetén. Először arra gyanakodtam, hogy a hígításkor szennyeződött, ezért újra hígítottam, és egy másik pozitív mintát is használva újra reakciót végeztem el vele. Az eredmény változatlanul aspecifikus termék lett, de a másik pozitív kontroll specifikus volt.

A 3pos(2) mindkét mintáját a fentiek fényében újra kipreparáltam, azaz PCR-rel amplifikáltam, elektroforézis után izoláltam és tisztítottam. Emellett a 3pos(3) mintáit is izoláltam, arra az esetre, ha a 3pos(2) ezúttal is aspecifikus lenne. Hígítás és 3D-PCR-rel való reakció után ugyan specifikus lett valamennyi termék, de így se lehetett látni jelentős különbséget a NT és az

5FdUR-kezelt minták között. Ezért fontolóra vettük, hogy milyen problémák állhatnak a háttérben. Az agaróz elektroforézis csak végpontmérést szolgáltat, a gélbe töltés és a denzitometriás értékelés nagy hibaforrást jelentenek, ahogy a koncentrációk meghatározása és a milliós nagyságrendű hígítás is. Így a kvantitatív PCR-hez, azaz qPCR-hez fordultunk.

A qPCR élő képet ad a termék koncentrációról egy, a termék szerkezetébe interkalálódó és ekkor fényt emittáló festékanyagot érzékelő detektorok segítségével. Kettő negatív és kettő pozitív DNS-szakasz mintáit vizsgáltuk meg ezzel a módszerrel. Először a primerek hatásfokait határoztuk meg abból, hogy a termékek hány ciklus után jelentek meg. Már itt volt különbség az egyes specimenek között. Van, amelyik rendesen reagált, és egyféle terméket adott, de olyan is akadt, ami nagyon furcsa eredményeket produkált. A legígéretesebb mintákkal egy gradiens qPCR műveletet is elvégeztem, ahol mintákat reagáltattam egy megengedő hőmérsékleten, és a restriktós hőmérsékleten, ami közel esik a numerikusan meghatározott denaturációs hőmérsékletéhez. Itt a megengedő hőmérséklethez képest a restriktós hőmérsékleten a pozitív kontrollok termékei hamarabb jöttek fel, mint a negatívak. Hogy alátámasszam, hogy a minták PCR-hatékonysága nem különbözik szignifikánsan, agaróz gélelektroforézisnek vettem alá a mintákat. A restriktós hőmérsékleten reagált minták nem voltak teljesen specifikusak, de a főtermékek azonos hosszúságúak voltak a megengedő hőmérsékleti termékekkel. Ezzel, ha nem is teljes bizonyossággal, de sikerült megerősíteni az 5FdUR feltételezett C→T pontmutációs rátát növelő hatását. A méréseket több biológiai párhuzamos minta analízisével szeretnénk pontosítani.

Ezeket az első eredményeket, melyek a csoport munkájában mindenképp úttörő lépést jelentettek, a jövőben nyilvánvalóan szükséges lesz más módszerekkel is megerősíteni. Továbbá a méréseket szeretnénk a másik TS gátlószerrel, az RTX-szel kezelt mintákra is kiterjeszteni.

IX. Irodalomjegyzék

1. Cooper GM. The Cell: A Molecular Approach. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000. The Development and Causes of Cancer. The Cell: A Molecular Approach. 2000.
2. Krokan HE, Drabløs F, Slupphaug G. Uracil in DNA - Occurrence, consequences and repair. *Oncogene*. 2002.
3. Smith HC, Bennett RP, Kizilyer A, McDougall WM, Prohaska KM. Functions and regulation of the APOBEC family of proteins. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. 2012.
4. Sarno A, Lundbæk M, Liabakk NB, Arne Aas P, Mjelle R, Hagen L, et al. Uracil-DNA glycosylase UNG1 isoform variant supports class switch recombination and repairs nuclear genomic uracil. *Nucleic Acids Res*. 2019;
5. Pettersen HS, Visnes T, Vågbø CB, Svaasand EK, Doseth B, Slupphaug G, et al. UNG-initiated base excision repair is the major repair route for 5-fluorouracil in DNA, but 5-fluorouracil cytotoxicity depends mainly on RNA incorporation. *Nucleic Acids Res*. 2011;
6. Visnes T, Doseth B, Pettersen HS, Hagen L, Sousa MML, Akbari M, et al. Uracil in DNA and its processing by different DNA glycosylases. In: *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2009.
7. Lewis CA, Crayle J, Zhou S, Swanstrom R, Wolfenden R. Cytosine deamination and the precipitous decline of spontaneous mutation during Earth's history. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;
8. Wolfenden R, Snider MJ. The depth of chemical time and the power of enzymes as catalysts. *Acc Chem Res*. 2001;
9. Békési A, Holub E, Pálkás HL, Vértessy BG. Detection of genomic uracil patterns. Vol. 22, *International Journal of Molecular Sciences*. 2021.
10. Blackledge G. New developments in cancer treatment with the novel thymidylate synthase inhibitor raltitrexed ('Tomudex'). *Br J Cancer*. 1998;
11. Lindahl T. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*. 1993.
12. Schaaper RM, Dunn RL. Spontaneous mutation in the *Escherichia coli* lacI gene. *Genetics*. 1991;
13. Schaaper RM, Danforth BN, Glickman BW. Mechanisms of spontaneous mutagenesis: An analysis of the spectrum of spontaneous mutation in the *Escherichia coli* lacI gene. *J Mol Biol*. 1986;
14. Kreutzer DA, Essigmann JM. Oxidized, deaminated cytosines are a source of C → T transitions in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;
15. Roy-Burman S, Roy-Burman P, Visser DW. Studies on the effect of triphosphates of 5-

- aminouridine and 5-hydroxydeoxyuridine on ribonucleic acid and deoxyribonucleic acid polymerases. *Biochem Pharmacol*. 1970;
16. Purmal AA, Kow YW, Wallace SS. Major oxidative products of cytosine, 5-hydroxycytosine and 5-hydroxyuracil, exhibit sequence context-dependent mispairing in vitro. *Nucleic Acids Res*. 1994;
 17. Purmal AA, Kow YW, Wallace SS. 5-Hydroxypyrimidine deoxynucleoside triphosphates are more efficiently incorporated into DNA by exonuclease-free klenow fragment than 8-oxopurine deoxynucleoside triphosphates. *Nucleic Acids Res*. 1994;
 18. Feig DI, Sowers LC, Loeb LA. Reverse chemical mutagenesis: Identification of the mutagenic lesions resulting from reactive oxygen species-mediated damage to DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;
 19. Liu M, Schatz DG. Balancing AID and DNA repair during somatic hypermutation. *Trends in Immunology*. 2009.
 20. Navaratnam N, Sarwar R. An overview of cytidine deaminases. *International Journal of Hematology*. 2006.
 21. Salter JD, Bennett RP, Smith HC. The APOBEC Protein Family: United by Structure, Divergent in Function. *Trends in Biochemical Sciences*. 2016.
 22. Vértessy BG, Tóth J. Keeping uracil out of DNA: physiological role, structure and catalytic mechanism of dUTPases. *Acc Chem Res*. 2009;
 23. Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-Fluorouracil: Mechanisms of action and clinical strategies. *Nature Reviews Cancer*. 2003.
 24. Papamichael D. The Use of Thymidylate Synthase Inhibitors in the Treatment of Advanced Colorectal Cancer: Current Status. *Oncologist*. 1999;
 25. Muramatsu M, Nagaoka H, Shinkura R, Begum NA, Honjo T. Discovery of Activation-Induced Cytidine Deaminase, the Engraver of Antibody Memory. *Advances in Immunology*. 2007.
 26. Pearl LH. Structure and function in the uracil-DNA glycosylase superfamily. *Mutat Res - DNA Repair*. 2000;460(3–4).
 27. Lindahl T. Suppression of spontaneous mutagenesis in human cells by DNA base excision-repair. *Mutat Res - Rev Mutat Res*. 2000;462(2–3).
 28. Danenberg P V., Lockshin A. Fluorinated pyrimidines as tight-binding inhibitors of thymidylate synthetase. *Pharmacol Ther*. 1981;
 29. Hakala MT. Assessment of Growth-Limiting Events Caused by 5-Fluorouracil in Mouse Cells and in Human Cells. *Cancer Res*. 1980;
 30. Ding WX, Liu S, Ma JX, Pu J, Wang HJ, Zhang S, et al. Raltitrexed increases radiation sensitivity of esophageal squamous carcinoma cells. *Cancer Cell Int*. 2019;
 31. Luo Y, Walla M, Wyatt MD. Uracil incorporation into genomic DNA does not predict

- toxicity caused by chemotherapeutic inhibition of thymidylate synthase. *DNA Repair (Amst)*. 2008;7(2).
32. Pálincás HL, Békési A, Róna G, Pongor L, Papp G, Tihanyi G, et al. Genome-wide alterations of uracil distribution patterns in human DNA upon chemotherapeutic treatments. *Elife*. 2020;
 33. Nagy KK, Skurnik M, Vértessy BG. Viruses with u-dna: New avenues for biotechnology. Vol. 13, *Viruses*. 2021.
 34. Weil AF, Ghosh D, Zhou Y, Seiple L, Moira AM, Spivak AM, et al. Uracil DNA glycosylase initiates degradation of HIV-1 cDNA containing misincorporated dUTP and prevents viral integration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(6).
 35. Muha V, Horváth A, Békési A, Pukáncsik M, Hodoscsek B, Merényi G, et al. Uracil-containing DNA in *Drosophila*: Stability, stage-specific accumulation, and developmental involvement. *PLoS Genet*. 2012;8(6).
 36. Kavli B, Otterlei M, Slupphaug G, Krokan HE. Uracil in DNA-General mutagen, but normal intermediate in acquired immunity. *DNA Repair (Amst)*. 2007;6(4).
 37. Peled JU, Fei LK, Iglesias-Ussel MD, Roa S, Kalis SL, Goodman MF, et al. The biochemistry of somatic hypermutation. *Annual Review of Immunology*. 2008.
 38. Maul RW, Saribasak H, Martomo SA, McClure RL, Yang W, Vaisman A, et al. Uracil residues dependent on the deaminase AID in immunoglobulin gene variable and switch regions. *Nat Immunol*. 2011;
 39. Nabel CS, Manning SA, Kohli RM. The curious chemical biology of cytosine: Deamination, methylation, and oxidation as modulators of genomic potential. *ACS Chemical Biology*. 2012.
 40. Shi K, Carpenter MA, Banerjee S, Shaban NM, Kurahashi K, Salamango DJ, et al. Structural basis for targeted DNA cytosine deamination and mutagenesis by APOBEC3A and APOBEC3B. *Nat Struct Mol Biol*. 2017;24(2).
 41. Róna G, Scheer I, Nagy K, Pálincás HL, Tihanyi G, Borsos M, et al. Detection of uracil within DNA using a sensitive labeling method for in vitro and cellular applications. *Nucleic Acids Res*. 2016;
 42. Sang PB, Srinath T, Patil AG, Woo EJ, Varshney U. A unique uracil-DNA binding protein of the uracil DNA glycosylase superfamily. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(17).
 43. Galashevskaya A, Sarno A, Vågbø CB, Aas PA, Hagen L, Slupphaug G, et al. A robust, sensitive assay for genomic uracil determination by LC/MS/MS reveals lower levels than previously reported. *DNA Repair (Amst)*. 2013;
 44. Ren J, Ulvik A, Refsum H, Ueland PM. Uracil in human DNA from subjects with normal and impaired folate status as determined by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chem*. 2002;
 45. Pettersen HS, Galashevskaya A, Doseth B, Sousa MML, Sarno A, Visnes T, et al. AID

- expression in B-cell lymphomas causes accumulation of genomic uracil and a distinct AID mutational signature. *DNA Repair (Amst)*. 2015;
46. Lari SU, Chen CY, Vertéssy BG, Morré J, Bennett SE. Quantitative determination of uracil residues in *Escherichia coli* DNA: Contribution of ung, dug, and dut genes to uracil avoidance. *DNA Repair (Amst)*. 2006;
 47. Kow YW, Dare A. Detection of abasic sites and oxidative DNA base damage using an ELISA-like assay. *Methods*. 2000;
 48. Drohat AC, Jagadeesh J, Ferguson E, Stivers JT. Role of electrophilic and general base catalysis in the mechanism of *Escherichia coli* uracil DNA glycosylase. *Biochemistry*. 1999;
 49. Horváth A, Vértessy BG. A one-step method for quantitative determination of uracil in DNA by real-time PCR. *Nucleic Acids Res*. 2010;
 50. Stewart JA, Schauer G, Bhagwat AS. Visualization of uracils created by APOBEC3A using UdgX shows colocalization with RPA at stalled replication forks. *Nucleic Acids Res*. 2020;48(20).
 51. Anderson MW, Schrijver I. Next generation DNA sequencing and the future of genomic medicine. Vol. 1, *Genes*. 2010.
 52. Hu J, Li W, Adebali O, Yang Y, Oztas O, Selby CP, et al. Genome-wide mapping of nucleotide excision repair with XR-seq. *Nat Protoc*. 2019;14(1).
 53. Jiang L, Yin J, Qian M, Rong S, Zhang S, Chen K, et al. UdgX-Mediated Uracil Sequencing at Single-Nucleotide Resolution. *J Am Chem Soc*. 2022;144(3).
 54. Suspène R, Henry M, Guillot S, Wain-Hobson S, Vartanian JP. Recovery of APOBEC3-edited human immunodeficiency virus G→A hypermutants by differential DNA denaturation PCR. *J Gen Virol*. 2005;
 55. Stenglein MD, Burns MB, Li M, Lengyel J, Harris RS. APOBEC3 proteins mediate the clearance of foreign DNA from human cells. *Nat Struct Mol Biol*. 2010;

X. Függelék

50x TAE-puffer (1 liter):

- 242 g Tris
- 57,1 ml jégcet
- 100 ml 0,5 M EDTA
- desztillált vízzel jelre tölteni
- pH 7,5-7,8 között

1x TAE-puffer (1 liter):

- 20 ml 50x TAE-puffer
- 980 ml desztillált víz

Primerek adatai:

1neg(1)

F: GGTCTGGTTCGTTTCCTCACT

R: AACCATGGAGGAGCTGGTTC

Termék hossza: 646 bp

1neg(2)

F: TGGTCTGGTTCGTTTCCTCA

R: GAACCATGGAGGAGCTGGTT

Termék hossza: 648 bp

1neg(3)

F: TGTCTTATTGGTCTGGTTCGT

R: AAGCTCGAGGTGGATTGCT

Termék hossza: 600 bp

4negTS(1)

F: AGTCGTGTGTTGAGCTGCTA

R: GTCATGAGATGGCCTTAGAGGT

Termék hossza: 513 bp

4negTS(2)

F: GTCAGTCGTGTGTTGAGCTG

R: TGGCCTTAGAGGTCATCTATTACA

Termék hossza: 507 bp

4negTS(3)

F: AGTCAGTCGTGTGTTGAGCTG

R: ATGTCATGAGATGGCCTTAGAGGT

Termék hossza: 519 bp

3negDUT(1)

F: GCAGCATTGCTATGTGGACT

R: TGGTGGTGTGAAGAGATGTCAA

Termék hossza: 501 bp

3negDUT(2)

F: AAGCAAGGTCCATCTCCAGG

R: TTTATGAAGAAGGTAGAGGTGGCT

Termék hossza: 538 bp

3negDUT(3)

F: GTGATCAGCTGTCTCCCTCAG

R: GTTTATGAAGAAGGTAGAGGTGGC

Termék hossza: 508 bp

3pos(1)

F: ATTGGAACCTGGGGTGGGAC

R: AGTGTGCAGCATGAGAGGAG

Termék hossza: 648 bp

3pos(2)

F: GTGTCAAGGGTGAGCTCTGT

R: GGGATTGGCGAGGAAGAGTG

Termék hossza: 642 bp

3pos(3)

F: GTGAGCTCTGTGGCGGAAAT

R: GTGCAGCATGAGAGGAGAAGT

Termék hossza: 614 bp

2pos(1)

F: CCAATTCTGCCGACAAAGGC

R: GCCTCCCTTCCAGTCAGAAC

Termék hossza: 620 bp

2pos(2)

F: CTGGACAAGGGAGAGGGACT

R: GACACTGTGGCAGTGAGTCAT

Termék hossza: 500 bp

2pos(3)

F: TTCTGCCGACAAAGGCAGT

R: GTGGCAGTGAGTCATCCTCT

Termék hossza: 537 bp

1pos(1)

F: CAGCCTCACAGCCCCATTTT

R: GATACGGATAGTCCATGCTTACAGT

Termék hossza: 581 bp

1pos(2)

F: CTCACAGCCCCATTTTGTAGC

R: TGATACGGATAGTCCATGCTTACAG

Termék hossza: 578 bp

1pos(3)

F: TCCTAACCCCTAGTACCTGTGA

R: ACACTTAAAGGTAGCAATTTGGTGA

Termék hossza: 542 bp

2negA3B(1)

F: CGCAGAGTGAAACATCAGGAAG

R: AAGTTTGGGTGGTACCTGGC

Termék hossza: 552 bp

2negA3B(2)

F: GCAGAGTGAAACATCAGGAAGG

R: CCAAAGGAGATTGAGCGGC

Termék hossza: 512 bp

2negA3B(3)

F: CAGGAAGGAATTGAGCTGAAAGG

R: AAGACCCCTGTGTCCCAAAG

Termék hossza: 512 bp