

SZAKDOLGOZAT

BOROSS SAROLTA

Boross Sarolta

2023

Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem

Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet

Biomérnök és Erjedésipari Technológiai Tanszék

Semmelweis Egyetem, Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet



A BCR-ABL1 fúziós transzkriptum vizsgálata real-time PCR-rel krónikus myeloid leukémiában

Boross Sarolta

Budapest

2023

Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem
Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet

Szak neve: BSc Biomérnöki

Modul neve: Alkalmazott biotechnológiai

Modul szerinti tanszék: Biomérnök és Erjedéssipari Technológia Tanszék

Szakedolgozat készítés helye: Semmelweis Egyetem, Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet

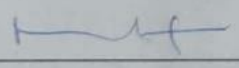
Hallgató: Boross Sarolta

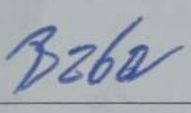
A szakedolgozat címe: A BCR-ABL1 fúziós transzkriptum vizsgálata real-time PCR-rel krónikus myeloid leukémiában

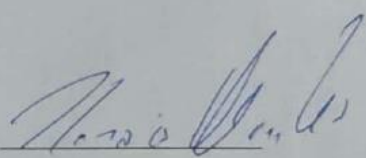
Konzulensek: Dr. Kovács Mónika, egyetemi adjunktus

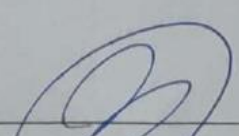
Dr. Bődör Csaba, egyetemi tanár (külső konzulens)

Beadás dátuma: 2023. május 3.


Élelmiszer-mikrobiológia, -higiénia
és -biztonság Tanszék
Mohácsiné Dr. Farkas Csilla


konzulens
Dr. Bődör Csaba


konzulens
Dr. Kovács Mónika


Dr. Nguyen Duc Quang

Biomérnök és Erjedéssipari Technológia Tanszék vezetője

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS	1
2. A MUNKA CÉLJA (CÉLKITŰZÉS)	2
3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	3
3.1. Krónikus myeloid leukémia (CML)	3
3.1.1. A CML kialakulása és tünetei	4
3.1.2. A CML lefolyása	6
3.1.3. A CML kezelése: egy korábban halálos betegségből egy kiválóan kontrollálható betegségig	6
3.2. Molekuláris monitorozás	7
3.2.1. Citogenetika.....	9
3.2.2. FISH	10
3.3. Real-time PCR	11
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	15
4.1. RNS Izolálás vérből, csontvelőből	15
4.2. Reverz transzkripció	16
4.3. Real-Time PCR	18
5. KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK	21
5.1. Eredmények kiértékelése	21
5.1.1. Intercept és Slope értékek.....	21
5.1.2. PCR eredmények kiértékelése	23
5.2. Különleges esetek kiértékelése	26
5.2.1. Különböző eredmények kiértékelésének (leletezésének) menete, eredmények kategorizálása	26
5.2.2. Diagnóziskori eredmény.....	27
5.2.3. Csökkenő eredmény	27
5.2.4. Növekvő eredmény.....	28

5.2.5. Negatív eredmény.....	29
5.2.6. Válasz nélküli eredmény	29
5.3. Mérések grafikus leképezése	30
6. ÖSSZEFOGLALÁS	38
7. IRODALMI HIVATKOZÁSOK	39
8. MELLÉKLET	42
9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	43
10. NYILATKOZAT	44

BOROSS SAROLTA

1. BEVEZETÉS

A krónikus myeloid leukémia (CML) a csontvelői őssejtek daganatos megbetegedése, amely a fehérvérsejtek túlzott képzéséhez vezet. A betegség oka egy reciprok transzlokáció okozta fúziós gén, a BCR-ABL1. A 9-es és 22-es kromoszóma közötti reciprok transzlokáció a Philadelphia kromoszóma kialakulásáért felelős, amely kromoszómán az egymás mellé került BCR és ABL1 génekből keletkezik a BCR-ABL1 fúziós gén. Ez a gén termeli a BCR-ABL1 fehérjét, egy tirozinkináznak nevezett fehérjetípust, amely felelős a CML sejtek növekedéséért és osztódásáért. A felnőtt leukémiás esetek mintegy 15-20%-át teszi a CML. Ez volt az első olyan emberi daganattípus, amelynél kimutatták és bebizonyították, hogy egy ún. visszatérő genetikai rendellenesség okozza.

A krónikus myeloid leukémia korábban halálos betegségnek számított, azonban mára már könnyen kezelhető daganatos betegségnek könyvelhető el; a betegek nagy része az egészséges populációéval megegyező túlélésre számíthat. A megismert genetikai háttér, a tirozinkinázgátló (továbbiakban: TKI: tirozinkináz inhibitor) kezelés a diagnózisban, monitorozásban és kezelésben is hatalmas fejlődést hozott az elmúlt 1-2 évtizedben, ami az onkológián belül a személyre szabott célzott kezelés sikerének kiemelkedő példája. A betegség monitorozása során a valós idejű PCR-vizsgálat eredménye közvetlen hatással van a kezelési stratégiára. Ezáltal a BCR-ABL1 mennyiségi meghatározása onkohematológiai diagnosztikai laboratóriumban történik ún. real-time PCR-rel, amit perifériás vérből vagy csontvelőből történő RNS izolálás, majd reverz transzkripcióval cDNS átírás előz meg.

2. A MUNKA CÉLJA (CÉLKITŰZÉS)

Szakedolgozatom célkitűzése a krónikus myeloid leukémiában szenvedő betegek BCR-ABL1 fúziós transzkriptum diagnosztikája, nyomon követése és eredményeinek kiértékelése a betegek három havi kontroll méréseinek alapján. Összesen 132 beteg mintáját fogom vizsgálni. A laboratóriumi munka első lépéseként a beérkező vér és csontvelő mintákból RNS izolálás, aminek meg kell határozni NanoDrop műszer segítségével a koncentrációját és tisztaságát. Ezt követően reverz transzkripcióval a már izolált és kvantifikált RNS-ről cDNS átírása fog történni. Végül valós idejű PCR-rel az ABL1 és BCR-ABL1 fúziós gén mennyiségének meghatározása a célom, majd ezeknek az értékeknek a segítségével az expressziós szintjének meghatározása, amit az adatok statisztikai kiértékelésével fogok végezni. Továbbá, 5 beteg visszamenőleges mért adatain a betegség nyomon követése is a munka egyik célját képezi. A visszamenőlegesen elkért adatokból látni lehet, hogy a diagnóziskor felállított leletet mennyire befolyásolja az esetleges gyógyszeres kezelés, illetve hogyan változik a beteg mért BCR-ABL1 szintje.

3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

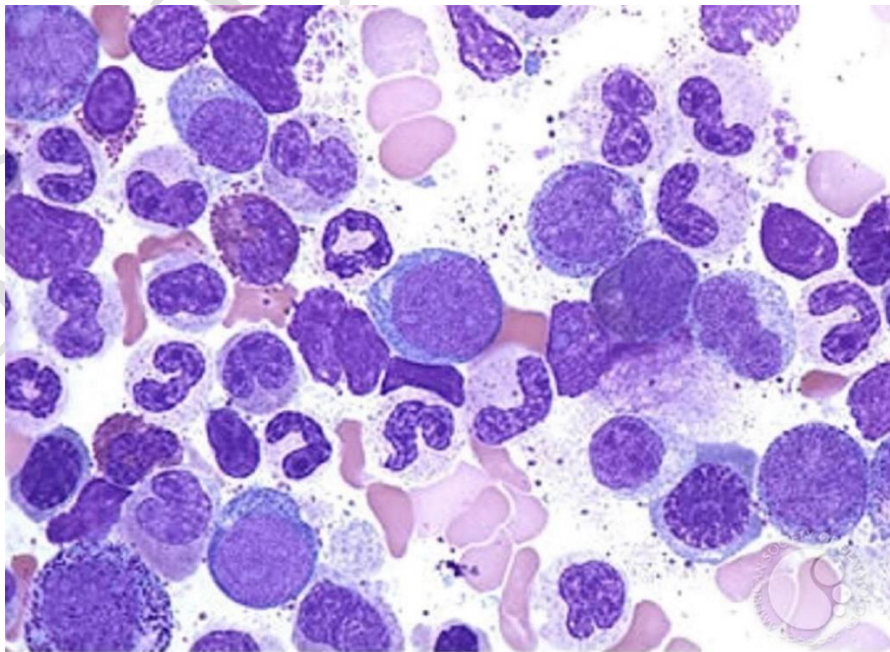
3.1. Krónikus myeloid leukémia (CML)

Egy egészséges, vérképzőszervi megbetegedéssel nem szenvedő emberben a csontvelő őssejteket képez, amik később myeloid vagy lymphoid sejtekké érnek. A myeloid őssejt az érés után vagy vörösvértestekké alakul, vagy vérlemezkékké, vagy fehérvérsejtekké. A vörösvértestek az oxigénszállításért felelősek, a vérlemezkék a véralvadék képzéséért, míg a fehérvérsejt a fertőző megbetegedésektől, illetve az idegen anyagoktól védi a szervezetet.

A krónikus myeloid leukémia (továbbiakban: CML) a csontvelő egyes vérképző sejtjeiből kiinduló dagantos megbetegedés (The American Cancer Society medical and editorial content team/a, 2018).

A CML-ben szenvedő betegek esetén túl sok granulocytá (a leggyakoribb fehérvérsejt) képződik, amelyeknek az érése sem megfelelő, így az eredeti, egészséges állapotában lévő feladatának ellátására sem alkalmas. Ezek a sejtek a leukémiás sejtek (1.ábra), amelyek gyors osztódásuk következtében felhalmozódnak a csontvelőben és vérben, így szorítva ki onnan az egészséges sejteket.

A CML elnevezés a betegség legfontosabb tulajdonságait emeli ki: Chronic (krónikus), mivel a betegség kezdetén lassan haladó, elhúzódó betegség. Myeloid, mivel a myeloid sejteket érinti ez a betegség. Végezetül Leukemia (leukémia), mert a fehérvérsejtek felszaporodásával jár ez a betegség (MTA-SE Lendület Kutatócsoport, 2019).



1.ábra: Krónikus Myeloid Leukémia morfológiai képe. Internet 1

3.1.1. A CML kialakulása és tünetei

A betegség kialakulásáért egy genetikai eltérés (lásd később) felel, aminek az okát nem tudni. Az viszont ismert, hogy nagy dózisu radioaktív sugárzás esetén megnő a CML kialakulásának az esélye. Legtöbbször rutin vérvétel során ismerik fel a betegséget, azonban vannak bizonyos tünetei: gyengeség, fáradtság, éjszakai izzadás, fogyás, láz, csontfájdalom, lépmeagnagyobbodás, hasi telítettség érzet (kis mennyiségű ételkészlet elfogyasztása után is).

A vörösvértestek hiánya, illetve a nem megfelelő működésű fehérvérsejtek és vérlemezkék miatt a CML-nek számos egyéb tünete is van, például vérszegénység a vörösvértestek hiánya miatt, ami okozhatja a gyengeséget, fáradtságot és légszomjat is. A normál fehérvérsejtek hiányának következtében a fertőzések kockázata megnő. A vérlemezkék hiánya vérzékenységet okoz, aminek gyakori és/vagy súlyos orr- és ínyvérzés a következménye. Ezen kívül az átlagnál többször (könnyebben) szerezhet egy CML-es beteg véraláfutást.

Mindezek mellett a krónikus myeloid leukémia leggyakoribb jele az átlagnál magasabb fehérvérsejtszám (The American Cancer Society medical and editorial content team/b, 2018).

1960-ban Nowell és Hungerford, amerikai kutatók CML-es betegek vérmintájának vizsgálatakor észrevették, hogy a 22-es kromoszóma kisebb a megszokottnál. Ezt az abnormális kromoszómát Philadelphia-kromoszómának nevezték el.

1960-ban Peter C. Nowell bebizonyította, hogy genetikai oka lehet a CML kialakulásának.

Peter Nowell, a Pennsylvániai Egyetem Orvostudományi Karának oktatója David Hungerforddal, egy doktorandusz hallgatóval leírtak egy szokatlan kromoszómát, amely jelen van a CML-es betegek fehérvérsejtjeiben. Ezt Philadelphia-kromoszómának nevezték el, a várostól, ahol felfedezték.

Ez a rendellenesség nem található meg a normál leukocitákban (fehérvérsejtben), de jelen van a CML-es betegek rosszindulatú sejtjeiben. Bár korábbi tanulmányokban már kimutattak kromoszóma rendellenességeket emberi daganatokban, az első dokumentált, betegséget definiáló patognómikus (kórjelző) eltérés a Philadelphia-kromoszóma volt. Ez a felfedezés arra készítette Nowellt, hogy egy teóriát fogalmazzon meg arról, hogy ez a genetikai változás valamely módon növekedési előnyt nyújt az abnormális sejteknek.

Nowell által leírt Philadelphia-kromoszóma új fejezetet kezdett a rákkutatásban és az alapját jelentette a később kidolgozott személyre szabott medicina koncepciójának (Koretzky, 2007).

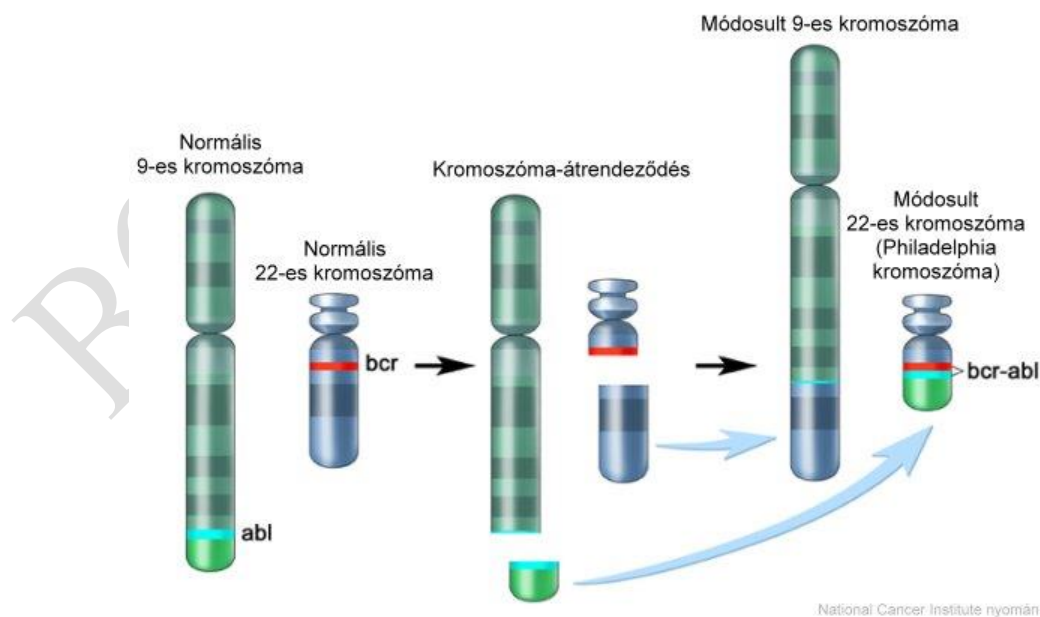
A Philadelphia-kromoszóma kezdeti kapcsolata a rákkal több kérdést vetett fel. A legfontosabb kérdések; A Philadelphia-kromoszóma a CML oka vagy következménye? Mi volt a kromoszóma rendellenesség, ami a betegséghez vezetett? Ha az abnormális géntermék okozója

volt, akkor ennek tudatában lehetséges-e új terápiás beavatkozás? A CML-hez tartozó genetikai változékonyság általánosítható másfajta daganatokra is?

1972-ben a Philadelphia-kromoszóma kialakulását Janet Rowley amerikai kutatóorvos tárta fel. A 22-es kromoszómáról hiányzó rész áthelyeződött a 9-es kromoszómára (ezzel leírta az első kromoszóma-átrendeződés jelenségét, a transzlokációt).

Később, a genetika fejlődésével kiderült, hogy a 9;22-es transzlokáció biológiai jelentőségét az adja, hogy az átrendeződés hatására az eredetileg a 9-es kromoszómán található ABL1-gén és a 22-es kromoszómán található BCR-gén egymás mellé rendeződik, így a két génből egy fúziós, úgynevezett kiméra gén keletkezik. (Sherbenou és Druker, 2007).

Az elmúlt években a tudomány fejlődésének köszönhetően választ kaptunk a fent említett kérdések többségére. A citogenetikai technikák fejlődésével vizualizálni tudták a Nowell és Hungerford által felfedezett kromoszómát, amit a 9 és 22-es karjai közötti reciprok transzlokáció okozott (2.ábra). Kiderült az is, hogy a BCR-ABL1 fúziós fehérje valóban felelős a betegség kialakulásáért, és a kóros fehérje tervezett célzott gyógyszerrel lehetséges a betegség sikeres kezelésére (Koretzky, 2007). Az ABL1 gén egy tirozinkináz-fehérjét kódol, amely az egészséges sejtekben a sejtosztódást és a sejtek növekedését serkenti. A BCR-ABL1 fúziós gén terméke egy olyan kiméra fehérje, amely hatására korlátlanul szaporodnak a sejtek.



2.ábra: A BCR-ABL1 fúziós gén kialakulása. Internet 2

3.1.2. A CML lefolyása

A CML kórlefordyása három fázisba sorolható, amely szerepet játszik a kezelésben és meghatározza az életkilátásokat. A fázisok a vérben vagy csontvelőben lévő éretlen fehérvérsejtek (blasztok) mennyiségétől függenek.

1) Krónikus fázis (CML-CP)

Az első fázisban a blasztok száma általában nem éri el a 10%-ot a CML-es betegek vérében vagy csontvelőjében. Ebben a fázisban a tünetek enyhék, vagy egyáltalán nem jelentkeznek. Akár évekig is elhúzódhat a krónikus fázis, mely idő alatt a betegség lassan előrehalad.

2) Akcelerált fázis (CML-AP)

Ebben a fázisban a betegség felgyorsul, a leukémiás sejtek gyors szaporodásnak kezdenek és megjelennek nagy számban a perifériás vérben, így már kiszorítják a csontvelőből a normális vérképző sejteket. Ennek következtében megjelennek a klinikai tünetek: vérzékenység, vérárvadási zavarok és esetleges fertőzések, illetve rossz étvágy és fogyás.

3) Blasztos fázis/krízis (CML-BP)

Megjelennek az akut leukémia tünetei (a vérárvamba kerülve a kóros sejtek más szöveteket is elérnek, pl. tüdőt, májat, lépét, nyirokszöveteket-és sejteket, izmokat, fogínyt, esetleg agyat, illetve herét), nagyon sok éretlen sejt lepi el a csontvelőt és a perifériás vért. A csontvelői elégtelenség miatt kialakuló vérszegénység, illetve vérzékenység életveszélyes állapotba hozza a beteget (MTA-SE Lendület Kutatócsoport, 2019). Az alább ismertetésre kerülő új terápiás lehetőségeknek köszönhetően azonban ma már nagyon ritka az akcelerált és blasztos fázis kialakulása.

3.1.3. A CML kezelése: egy korábban halálos betegségből egy kiválóan kontrollálható betegségig

Korábban a CML egy súlyos betegség volt korlátozott kezelési lehetőségekkel, amelyek legtöbbször sikertelenek voltak. A betegséget csupán kemoterápiával, citotoxikus gyógyszerekkel és interferon (ami az immunrendszer sejtjei által termelt természetes fehérje, amely termelődését vírusok, paraziták, illetve daganatsejtek is kiválthatják) kezeléssel lehetett visszaszorítani ideig-óráig. Azonban ezek a kezeléseik nem jártak nagy sikerrel, az igazi gyógymód a csontvelő átültetés volt (amit manapság is alkalmaznak nagyon súlyos esetekben, igaz nagyon ritkán), ami viszont igen nagy kockázattal járt, és nem is alkalmazható minden beteg esetében.

2001-ben, több mint 20 éve jelent meg az áttörést hozó gyógyszer, az imatinib, amely egy úgynevezett tirozinkináz-gátló (TKI: tyrosine kinase inhibitor). Ahogy már fentebb említettem, a betegség okozója egy kromoszóma-átrendeződés során kialakuló fúziós gén, a BCR-ABL1, amely létrehoz egy abnormálisan működő, állandóan aktív fehérjét, a BCR-ABL1 fúziós tirozinkinázt, mely a sejtek folyamatos gyarapodásáért és osztódásáért felelős. A TKI gyógyszerek ezekre az enzimekre fejtik ki hatásukat. Mivel a tirozinkináz-gátlók elveszik a leukémiás sejtek előnyét a normális sejtekkel szemben, így azok -ugyan kis számban-, de jelen vannak. Ezért a TKI kezelést a páciens életének végéig folytatnia kell (Xin An és munkatársai, 2010).

Legtöbbször alkalmazott gyógyszerek: imatinib, nilotinib, dasatinib, bosutinib, ponatinib.

A terápia sikerességét több különböző szinten is lehet vizsgálni. Ha a kezelés hatására a CML tünetei eltűnnek, az hematológiai válasznak minősül. Citogenetikai válasznak nevezzük, ha a páciens vérében a Philadelphia-kromoszóma már nem kimutatható. A harmadik és legérzékenyebb vizsgálati módszer a molekuláris monitorozás, amely során a BCR-ABL1 fúziós gén mennyiségét határozzák meg a vérben, viszonyítva egy egészséges génhez. A vizsgálat megadja, hogy milyen arányban található meg a leukémiás sejtek az egészséges sejtekhez képest (MTA-SE Lendület Kutatócsoport, 2019).

Elengedhetetlen a CML-es betegek esetében a precíz, sokszori monitorozás: a tirozinkináz inhibitor kezelés kezdetleges, korai fázisában történő terápiás válaszok alapján a kezelési stratégia megválasztása.

Abban az esetben, ha a beteg stabil mély molekuláris válaszból van a TKI terápia következtében, abbahagyhatja a gyógyszerek szedését, és megkezdheti a kezelésmentes remissziót (TFR). Abban az esetben, ha sikertelen a TFR és a BCR-ABL1 fúziós gén expressziós szintje megemelkedik a terápia leállta után, újra el lehet (ajánlott) kezdeni a gyógyszerek szedését.

A mai gyógyszerekkel, illetve kezelésekkkel a krónikus myeloid leukémiában szenvedő betegek élettartama megegyezik az átlag populációéval.

3.2. Molekuláris monitorozás

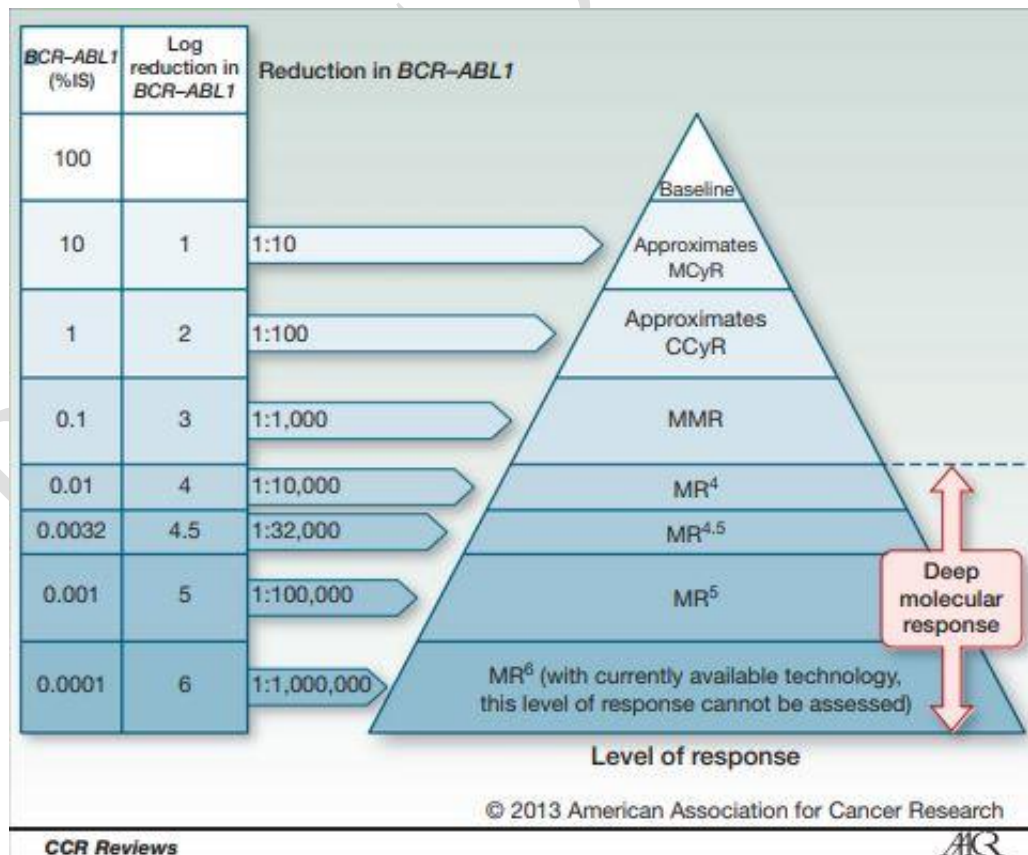
A CML-re jellemző BCR-ABL1 fúzió (9-es és 22-es kromoszómának reciprok transzlokációja) által kialakult Philadelphia-kromoszóma csontvelői mintából történő kimutatásnak kromoszóma-vizsgálattal csak a diagnózis felállításakor van jelentősége.

A 22-es kromoszómán lévő BCR gén töréspontjának helye szerint a reciprok transzlokáció többféle lehet, vagyis többféle BCR-ABL1 fúziós gén kialakulását jelenti.

A leggyakoribb, amikor a BCR gén 13-as vagy 14-es exonja és az ABL1 gén a2-es exonja között történik meg a fúzió. Az így kialakult gének az „e13a2” és az „e14a2”, ezek a major töréspontok. Ritkábban fordul elő (az esetek mintegy 5%-ában) az úgynevezett minor töréspont, ami az „e19a2” fúzió, amely egy nagyobb BCR-ABL1 fúziós transzkriptum kialakulásához vezet. Ennél is ritkább az „e1a2” fúzió, a mikro töréspont.

A major töréspontok kialakulásánál kedvezőbbek a kilátások, mind az „e13a2” és „e14a2” gének esetében. Sajnos a minor és mikro töréspontok nehézséget okozhatnak a betegség monitorozásában (Simmelweis Kiadó, Kiss és munkatársai 2021).

A BCR-ABL1 gének termékét valós idejű PCR-rel lehet számszerűsíteni és vizsgálni. A fúziós transzkriptumok mennyiségét egy kontroll génhez, illetve annak mennyiségéhez viszonyítjuk. Ehhez a kontroll génhez viszonyítva a BCR-ABL1 szint a kezelés elején általában 100% körüli értéket vesz fel. Három nagyságrendnyi csökkenést (0,1%) major molekuláris válasznak (MMR), négy nagyságrendnyi csökkenést (0,01%) MR4.0-nak, míg 4,5 nagyságrendnyi csökkenést (0,0032%) MR4.5-nek, végezetül az 5 nagyságrendnyi csökkenést (0,001%) MR5.0-nak nevezünk (3.ábra) (Kiss és munkatársai, 2017).



3.ábra: Molekuláris válaszok a BCR-ABL1 fúziós gén mennyiségének. Internet 3

Ha a PCR vizsgálat eredménye egy minta esetében negatív, akkor még csak a PCR vizsgálat érzékenysége melletti negativitásról beszélhetünk. Ezért a negatív vizsgálati eredmények esetében a kontroll gén kópiaszáma alapján tudunk tájékozódni és információt szerezni az adott mérés érzékenységéről. Emiatt az eltérő szintű molekuláris válaszok (MR4.0, MR4.5, MR5.0) pontos meghatározásához szükség van az adott mintában meghatározott kontroll gén kópiaszámára.

Ilyenkor szükség van további számítások elvégzésére, amelyhez a következő képletet alkalmazzuk: $\frac{\text{mennyiségi } BCR-ABL1}{\text{kópiaszám}} * 100$.

Erre a képletre akkor is szükségünk lehet, mikor a PCR eredményeket értékeljük ki.

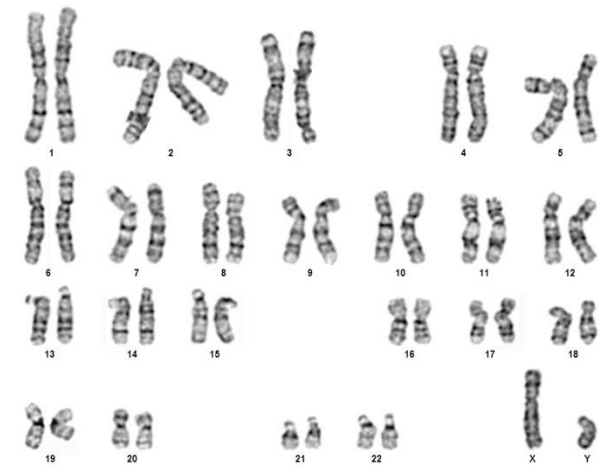
3.2.1. Citogenetika

A citogenetikai vizsgálatok célja a sejtek kromoszóma készletének a vizsgálata annak érdekében, hogy kromoszóma rendellenességeket és szerkezeti eltéréseket határozzunk meg.

Valamennyi CML-es beteg leukémiás sejtjei tartalmazzák a Philadelphia-kromoszómát, és ennek megtalálása a vizsgálat célja.

A citogenetikai tesztelést sok esetben alkalmazzák; szolid tumor, hematológiai daganatok és veleszületett betegségek feltárására. Hasznos lehet a daganatok diagnosztizálásában, a megfelelő terápia kiválasztásában és prognosztikai besorolásban.

A kariotipizálás (a kromoszómák alaki és számbeli eltéréseit mutatja meg, 4.ábra) az egyik leggyakrabban alkalmazott módszer a strukturális és numerikus rendellenességek kimutatására (Ozkan és Lacerda, 2022).



4.ábra: Kariotipizálás. Internet 4

3.2.2. FISH

Ezzel a módszerrel az RNS vagy DNS specifikus szakaszait fluoreszcens festékkel jelölt próbákkal lehet vizsgálni. Ha egyes kromoszómákra specifikus próbákat különböző színű festékekkel jelöljük, akkor a fénymikroszkópban meg lehet különböztetni egymástól az eltérő szerkezetű kromoszómákat (The American Cancer Society medical and editorial content team, 2018).

A FISH (Fluoreszcens In Situ Hibridizáció) a szövetek/sejtek elemzésére alkalmas módszer.

A CML esetében a FISH-t a BCR-ABL1 gén specifikus darabjainak keresésére alkalmazzák.

Előnye, hogy nem szükséges hozzá DNS izolálás, mert közvetlen a szövetekben, sejtekben mutatja ki az esetleges genetikai eltéréseket. Formalinban fixált paraffinba ágyazott minták metszetén is elvégezhető a FISH vizsgálat.

Első lépésként fixálás és permeabilizálás szükséges a sejt átjárhatósága érdekében. A tárgylemezen való rögzülést követően hozzáadjuk a próbát, ami fluoreszcensen van jelölve, majd a nem kötött próbák eltávolítása, mosása következik. Végül a hibridizáció kimutatása fluoreszcens mikroszkóppal, amit az 5.ábra mutat.



5.ábra: A BCR-ABL1 Fluoreszcens In Situ Hibridizációja, nagyított kép. Internet 5

3.3.Real-time PCR

A real-time PCR a gének azonosítására és kvantifikálására szolgál (ebben az esetben a BCR-ABL1 gén azonosítására és a fúziós transzkriptum kvantifikálására). Előnye, hogy kismennyiségű gént (BCR-ABL1-et) is képes kimutatni abban az esetben is, ha a citogenetikai vizsgálat nem volt eredményes (The American Cancer Society medical and editorial content team, 2018).

A PCR a DNS egy meghatározott részletét megsokszorozza, amplifikálja (felerősíti), így detektálhatóvá teszi.

A PCR reakcióhoz több komponensre is szükség van (Rácz és munkatársai, 2019).

- Primerek a sikeres amplifikálandó DNS szakasz kiválasztásához szükségesek. Általában 18-25 bázispárnyi hosszúságúak, és a primer pár tapadási helye jelöli ki a terméket. A primer komplementer az amplifikálandó DNS szakasz elejével és végével.
- Szükség van egy templát DNS-re, amit a reakció kimenetele szerint választunk ki genomi DNS, illetve cDNS (komplementer DNS, ami az amplifikálandó DNS-szekvenciát tartalmazza) közül. A genomi DNS mutációk és különféle mikroorganizmusok jelenlétének kimutatására, valamint igazságügyi vizsgálatokhoz (pl. DNS ujjlenyomat) alkalmazható. A

cDNS adott gén kifejeződésének vizsgálatánál a génről átíródott mRNS mennyiségének meghatározását teszi lehetővé.

- Szükségesek a dNTP-k (dezoxi-ribonukleotid-trifoszfát) használata, mivel ezeket fogja a polimeráz építőkövekként felhasználni, és ezek beépítésével meghosszabbítja a bekapcsolódott primerek után következő szekvenciát, amit szintetizál (→ monomerek a DNS szintézishez).
- DNS-polimeráz enzim használata is elengedhetetlen az új szál szintéziséhez, azonban a PCR reakció egyik lépésénél 95 °C-on kell denaturálni, ezért a Taq polimeráz enzimet használják legtöbbször, mivel ez az enzim képes akár a 100 °C-ot is túlélni.
- Különböző pufferek, amely pl. a DNS-polimeráz működéséhez szükséges megfelelő pH-t és ionerősséget biztosítja.
- Mg^{2+} ion elengedhetetlen kofaktora az enzimnek

A PCR reakció PCR készülékben történik, egy programozható termosztátban.

Elődenaturáció:

1. 95 °C-on, 10 percig tartó szakasz, ahol minden duplaszálú DNS legalább egyszer egyszálúsítva lesz.

Denaturáció: A duplaszálú templát DNS szálait hődenaturációval elválasztjuk egymástól.

2. 95 °C-ra felmelegítjük az elegyet, ami elegendő ahhoz, hogy a DNS két szálát összekötő hidrogén-hidak felszakadjanak, és így kialakuljon az egyszálú DNS (ssDNS). Ez a szakasz 15 másodpercig tart.

Anellálás: A hőmérséklet csökkenés lehetővé teszi a primerek templát DNS-hez való kapcsolódását.

3. (60 °C): A „sense” és „antisense” primerek báziskomplementaritás elve alapján kapcsolódnak az egyszálú DNS-molekula megfelelő szakaszaihoz. 1 percig tart ez a lépés.

Extenzió/Amplifikáció (Lánchosszabbítás): A polimeráz enzim az egyszálúvá denaturált templáthoz kapcsolódó primerek végeit meghosszabbítja, és közben elkészíti a templát DNS kiegészítő szálát.

4. (72 °C): A DNS-polimeráz enzim a templát DNS-nek megfelelően, a primer templát kettős szakaszától kiindulva, 5'-3' irányban elvégzi a lánchosszabbítást, tehát új DNS szakaszt szintetizál.

Végső lánchosszabbítás:

5. (72 °C): Ez a lépés biztosítja, hogy minden megkezdett láncszintézis befejeződjön, általában 5 percig tart ez a szakasz.

Hűtés:

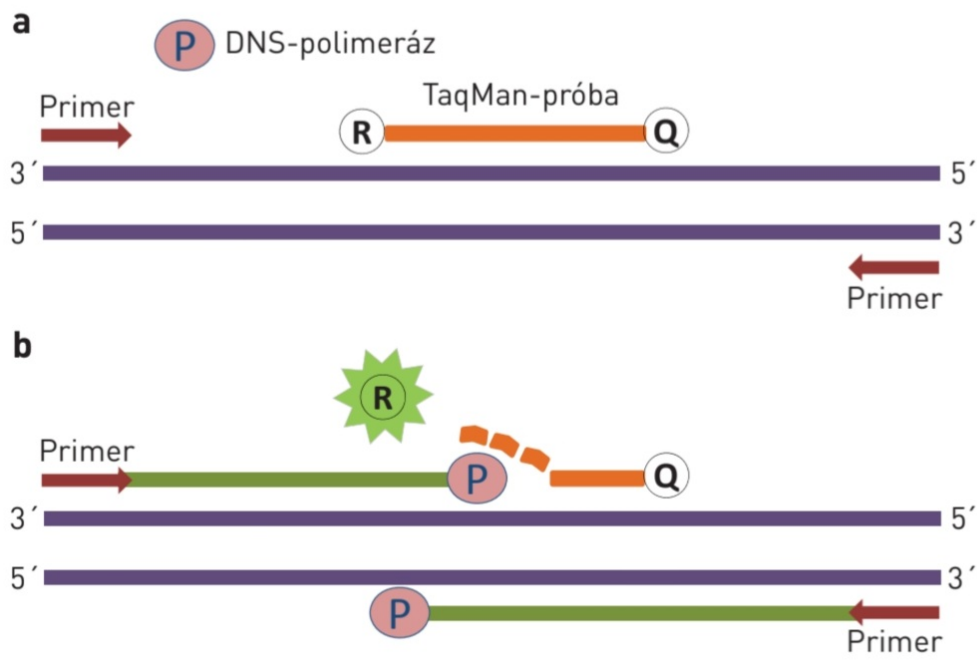
6. 10 °C-on tartja a keletkezett amplikonokat.

A 2-4 szakasz 25-40 ciklusokban ismétlődik, ami a vizsgálni kívánt DNS-szakasz exponenciális amplifikációjához vezet.

A TaqMan-alapú valós idejű mennyiségi polimeráz láncreakció (Q-PCR) alapja:

A TaqMan-próba egy olyan speciális oligonukleotid, amely az általunk vizsgált génszakasz két primer-felismerő helye közötti szakaszon belüli régióval komplementer (amely kb. 25-30 bázispárnyi hosszúságú). A próba 5' vége fluoreszcens festékkel (reporter, R), a 3' vége a fluoreszcens jel elnyelésére képes, úgynevezett quencher (Q) molekulával jelölt, amit a 6. ábra mutat. A próba inakt állapotában a Q molekula kioltja az R molekula által kibocsátott fluoreszcens jelet. A reakció előrehaladtával a komplementer DNS szálakat a DNS-polimeráz felépíti, miközben a 5'-3' exonukleáz aktivitásával elhasítja a TaqMan próbát. Ezáltal a kötött állapotból az R molekula eltávolodik a Q molekulától, továbbá felszabadul az általa kibocsátott fluoreszcens jel a Q molekula gátlása alól (Király és munkatársai, 2015).

A folyamatosan emelkedő fluoreszcens jel intenzitása arányos a vizsgált génszakasz kiindulási mennyiségével, végsősoron az adott génexpresszió mértékével. A valós idejű mennyiségi polimeráz láncreakció (Q-PCR) vizsgálatok esetében a PCR termék ciklusonkénti, valós időben történő detektálása történik. A vizsgált gén expresszióját egy kontroll génexpresszióhoz viszonyítjuk (Király és munkatársai, 2016).



6.ábra: TaqMan alapú PCR sematikus ábrája. Internet 6

BOROSS SÁRKA

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

132 beteg mintáján végeztem reverz transzkripciót és real-time PCR-t a Molekuláris Onkohematológia Laboratóriumban (Semmelweis Egyetem, Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet). A beérkező minták perifériás vér vagy csontvelői minták voltak, amelyekből a munkafolyamatot az alábbi (4.1., 4.2., 4.3. alfejezetek) részletes protokollok alapján végeztem el

4.1. RNS Izolálás vérből, csontvelőből

A vér- és csontvelő minták EDTA csövekben érkeznek. Ezeket regisztrálni kell az úgynevezett PatFlow-ban, ami egy belső informatikai rendszer a patológiai dolgozók részére. Itt tartják nyilván a pácienseket, a hozzájuk tartozó adatokat, ezen keresztül állítják ki a leleteket és itt kell regisztrálni a beérkező mintát, hogy milyen fajta vizsgálatot végeznek belőle.

A mintákat RNS vagy DNS számmal láttuk el a PatFlow segítségével, és inentől kezdve az RNS szám az adott minta azonosítója, mivel RNS izolálás a munkafolyamat első lépése. A mintákat RNS számmal láttuk el, és beírtuk az RNS füzetbe. Maximum 15 ml perifériás vért (vagy csontvelőt) egy RNS számmal ellátott, 50 ml-s Falcon csőbe öntünk. Hemolizálóval 45-50 ml-ig felöntjük, összekeverjük. Minimum 10, maximum 120 percig a hűtőben inkubáljuk, többszöri forgatás mellett. A centrifugát a centrifugálás előtt bekapcsoljuk és beállítjuk 4 °C-ra. Ha lehűlt, 1800 rpm-en 10 percig (4 °C-on) centrifugáljuk. A centrifuga lejárta után a felülúszót leöntjük, a sejtüledékre autoklávozott 1x PBS-t öntünk (kb. 5 ml-t), összeforgatjuk óvatosan, hogy a pellett ne jöjjön fel, majd leöntjük a PBS-t. 15 ml-ig felöntjük PBS-el, összerázzuk, hogy az aljáról feljöjjön a pellett, majd centrifugáljuk 1800 rpm-en, 5 percig, 4 °C-on. A centrifuga után leöntjük a felülúszót, leszívjuk a maradékot pipettával. 1ml Trizol reagenssel felsuszpendáljuk a pelletet, legalább 25-ször fel-le pipettázzuk, míg egy teljesen viszkózus elegyet nem kapunk. A homogenizátumot 1,5 ml-es Eppendorf csőben tároljuk a feldolgozásig -20 °C-on. A mintákat 10 percig szobahőmérsékleten felolvasztjuk (nukleoproteinek bomlása céljából). Termomixerbe helyezük a mintákat 37 °C-ra 10 percig, 1400 rpm-en. Ezalatt 2-4 alkalommal vortexeljük a mintákat. Hozzájuk adunk 200 µl kloroformot, majd vortexelünk 15 másodpercig. Centrifugálunk 10 percig 8 °C-on, 10.600 rpm-en. A centrifuga lejárta után leszívjuk a felső vizes fázist (amely az RNS-t tartalmazza), és egy új, steril, 1,5 ml-es Eppendorf-csőbe transzferáljuk őket.

Az RNS kicsapásához 500 µl hideg, 100%-os etanolt használunk. Ezt követően röviden vortexelünk, majd inkubáljuk a mintákat -20 °C-on 30-60 percig, majd centrifugáljuk 10 percig,

10.600 rpm-en. Az RNS fehér pellett formájában válik láthatóvá a cső alján. Leöntjük a felülúszót. Egyszer átmoszuk a pelletet 1ml 75%-os etanollal. Vortexeljük a mintákat, majd centrifugáljuk 8400 rpm-en. Leöntjük a felülúszót, a cső alján maradó folyadékot pipettával távolítjuk el (ügyelve arra, hogy a pelletet ne szívjuk fel). Az izolálás végén röviden megszáritjuk a pelletet termomixerben 37 °C-on 2-5 percig. (Fontos, hogy a pellet ne száradjon meg teljesen, mert az csökkenti az oldhatóságát.) Azonnal feloldjuk az RNS-t 10-20-30-40-50 µl (a pellet méretétől függően) autoklávozott, membránszűrt vízben.

Az izoláláshoz szükséges oldatok elkészítése/tartalma:

- a) 1x PBS oldat: 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na₂HPO₄, 0,24 g KH₂PO₄ → feloldjuk 800 ml MilliPore vízben, HCl segítségével beállítjuk a pH-t 7,4-re. 1000 ml-ig felöntjük vízzel, majd sterilizáljuk.
- b) 10x Hemolizáló oldat: 82,91 g NH₄Cl, 7,91 g NH₄HCO₃, 2 ml 0,5M EDTA, pH=7,4. Mágneses keverővel elkészítjük az oldatot, majd 1000 ml-ig felöntjük Milli-Q vízzel, így lesz 10x töménységű. 1x hemolizáló oldathoz kimérünk 100 ml 10x-es oldatot, és felöntjük 1000 ml-ig.

4.2. Reverz transzkripció

A reverz transzkripció során RNS-ről írunk át cDNS-t, ami a PCR-reakcióhoz szükséges.

A reakcióhoz szükséges komponensek összemérése az 1. táblázat alapján történik:

1. táblázat: Reverz Transzkripció összemérő táblázat

Komponens	Mennyiség/cső [µl]
Reverz Transzkriptáz Puffer (10x) (50U/µl)	5
dNTP mix (25x) (100µM)	2
Random primerek (10x)	5
MultiScribe Reverz Transzkriptáz	2,5
RNáz mentes víz	10,5
Végtérfogat	25

A reverz transzkripcióhoz a kiválasztott minták RNS számát felvisszük a reverz transzkripciós sablonban lévő Excel táblázatba.

Először a táblázatban meg kell adni a minták RNS számát, a mérés típusát (Biopsz. címszó alatt) → BCR_ABL, illetve a lemerített RNS koncentrációt $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ -ben. Kiszámoljuk a megadott koncentráció alapján az RNS és RNáz mentes víz mennyiségét. Az átírás végtérfogata $50\ \mu\text{l}$. $25\ \mu\text{l}$ RNS és víz, $25\ \mu\text{l}$ Reverz Transzkriptáz mix. A bemérendő RNS-t úgy számoljuk ki, hogy az RNS izolálás után mért (RNS) koncentráció a kiindulási értékünk. Ezeket kell egy egységes koncentrációra hígítani, hogy mindegyik mintába ugyanannyi RNS kerüljön. Ez lesz $5\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$ koncentrációjú. A lemerített RNS koncentrációt át kell váltani $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ -re $\text{ng}/\mu\text{l}$ -ről, ahol 1000 -el kell elosztani. Ezzel az RNS koncentrációval dolgozunk tovább. Az 5 -öt elosztjuk az RNS koncentrációval, így kapjuk meg a bemérendő RNS mennyiségét. Ezt a mennyiséget ki kell vonni 25 -ből, és a maradékot vízzel pótolni. Egy példán bemutatva: ha a lemerített RNS koncentráció $320\ \text{ng}/\mu\text{l}$, akkor átváltjuk $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ -re: $320/1000=0,320\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$. $5/0,320=15,63\ \mu\text{l}$. Ha tehát $15,63\ \mu\text{l}$ RNS kell, akkor $25-15,63=9,37\ \mu\text{l}$ vizet kell bemérni. Ezzel a hígítással egységes koncentrációban lesznek ($5\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$). Ha túl híg az RNS, és többet kéne bemérni, mint $25\ \mu\text{l}$, akkor is csak a maximum térfogatot, $25\ \mu\text{l}$ -t kell bemérni az RNS-ből, és ekkor nem adunk hozzá vizet.

Bemérés ($5\ \mu\text{g}$ RNS): a megadott koncentrációt ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) 5 -el elosztjuk. Bemérés (RNáz mentes víz): $25-(5\ \mu\text{g}$ RNS), mivel a reakciótérfogat $50\ \mu\text{l}$, amiből $25\ \mu\text{l}$ a Reverz Transzkriptáz mix, és $25\ \mu\text{l}$ az RNS illetve RNáz mentes víz együttese. A táblázatot kitöltjük az összes mintákra, majd megadjuk a mintaszámot. A mintaszám alapján felszorozzuk, hogy a Reverz Transzkriptáz mixhez összesen mennyi kell a különböző komponensekből, illetve $2,5$ -szeres ráhagyást számolunk. Az így kapott „plate-térkép” alapján a pre-PCR fülkében összemérjük a Reverz Transzkriptáz mixet és a vizeket. A pre-PCR fülkét a munka megkezdése előtt 5 percig UV-fénnyel sterilizáljuk, benne az RNáz-mentes vízzel. Az UV-s sterilizálás ideje alatt a $-20\ ^\circ\text{C}$ -on tárolt RNS mintákat kivesszük a mélyhűtőből, és mintaszám alapján kiválogatjuk azokat, amelyek kellenek nekünk. Egy hűtő tárolóba helyezünk az Eppendorf csövekben lévő RNS mintákat. Az 5 perc UV-fényes sterilizálás után a fagyasztóban tárolt, Reverz Transzkriptáz mixhez szükséges komponenseket kivesszük, szobahőmérsékleten hagyjuk felolvadni őket, majd vortexelés után a megfelelő mennyiségeket egy Eppendorf csőbe mérjük, majd vortexeljük és centrifugáljuk.

A mintákhoz PCR-csöveket használunk, amit először feliratozunk a mintaszámnak megfelelő, 5 számjegyű RNS szám utolsó 3 számjegyével. A táblázat („plate-térkép”) alapján kimérjük a megfelelő mennyiségű vizeket az adott mintákhoz, majd az összes csőbe $25\ \mu\text{l}$ Reverz Transzkriptáz mixet mérünk. Egy hordozóba (ami nem a pre-PCR fülkébe való) tesszük a

kimért mixet és RNáz mentes vizet tartalmazó PCR-csőveket, majd a post-PCR fülkében dolgozunk tovább (amit a munka megkezdése előtt szintén 5 percig UV fényel sterilizálunk). A „plate-térkép” alapján a megfelelő sorszámú PCR-csővekbe mérjük a megfelelő sorszámú és megfelelő mennyiségű RNS mintákat. (Az RNS mintákat a könnyű roncsolhatósága miatt nem vortexeljük, csak „felpöcköljük”, amit szobahőmérsékleten hagyunk kiolvadni, majd az RNS bemérését követően visszatesszük a hűthető tárolóba.)

Az összemérést követően egy PCR készüléken (Applied Biosystems cég készüléke) beállítjuk a reverz transzkripcióhoz szükséges paramétereket: 25 °C-on 10 perc, 37 °C-on 120 perc.

Az ABI lejárta után a további felhasználásig a cDNS-eket -20 °C-on tároljuk.

4.3. Real-Time PCR

A Real-Time PCR reakciót egy 96 lyukú plate segítségével végezzük el, amiben van egy mintából négy darab; két párhuzamos BCR-ABL major és két párhuzamos ABL belső kontroll minta. Kell egy k562+ kontrollból is ugyan úgy 4 minta, két párhuzamos BCR-ABL major és két párhuzamos ABL1 belső kontroll. Ezen kívül még két ntc, azaz NoTemplateControll is kell, egy BCR-ABL1 major-ra, egy pedig az ABL belső kontrollhoz.

A mintákhoz először el kell készíteni a BCR-ABL1 major, illetve ABL1 belső kontroll oldatot. Az oldatok összemérése a 2. táblázat alapján történik.

2. táblázat: BCR-ABL major összemérő táblázat

BCR-ABL major komponensek	Mennyiség/cső (µl)
2x TaqMan puffer	12,5
Major-BCR (3µM)	2,5
ABL (3µM)	2,5
TaqMan BCR-ABL (5µM)	1
Steril víz (RNáz mentes)	1,5
cDNS	5
Végtérfogat	25

3.táblázat: ABL1 belső kontroll összemérő táblázat

ABL1 belső kontroll komponensek	Mennyiség/cső (μl)
2x TaqMan puffer	12,5
ABL-Forward (3μM)	2,5
ABL-Reverz (3μM)	2,5
TaqMan ABL (5μM)	1
Steril víz (RNáz mentes)	1,5
cDNS	5
Végtérfogat	25

A Real-Time PCR-hez kiválasztott minták számát bevisszük a PCR összemérő sablonba. A mintaszám alapján kiszámoljuk a BCR-ABL major, illetve ABL belső kontrollhoz szükséges komponensek mennyiségét, plusz 1-2 mintányi ráhagyást. Ha megvan a „plate-térkép”, a pre-PCR fülkében elindítunk egy 5 perces UV fényel történő sterilizálást. Míg az UV megy, egy fagyasztható tárolóba kiválogatjuk a cDNS mintákat. Az UV lejártá után a fagyasztóból elővesszük a PCR reakcióhoz szükséges komponenseket (kivéve a TaqMan puffert, azt 4 °C-os hűtőben tárolják) és szobahőmérsékleten hagyjuk felolvadni. Felolvadás után vortexeljük őket. A BCR-ABL major és ABL belső kontroll mixeket összemérjük, majd vortexelünk és centrifugálunk.

20 μl-t bemérünk a plate-térképnek megfelelően a mixekből. A post-PCR fülkében a cDNS-eket mérjük a plate-re a plate-térkép szerint. A felmért, kész plate-et átvisszük a PCR készülékhez, és beállítjuk a megfelelő paramétereket az indításhoz (7. ábra).



7.ábra: A valós-idejű PCR paramétereit

BOROSS

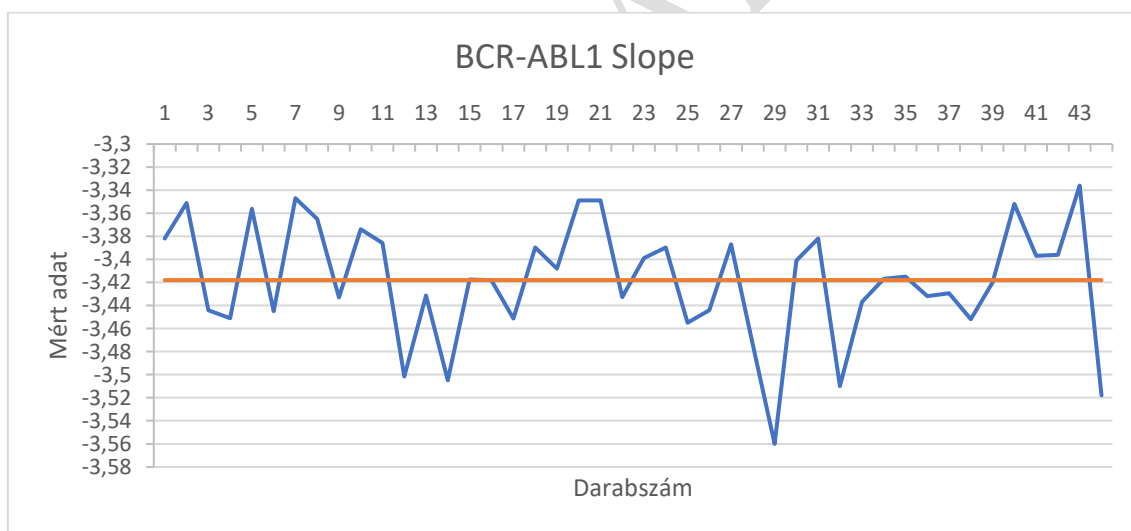
5. KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

A laboratóriumi munkám során 7 db reverz transzkripció és 6 db PCR reakció vizsgálatot végeztem el. Összesen 132 különböző beteg mintáján keresztül mértem a BCR-ABL1 fúziós transzkriptum szintet.

5.1. Eredmények kiértékelése

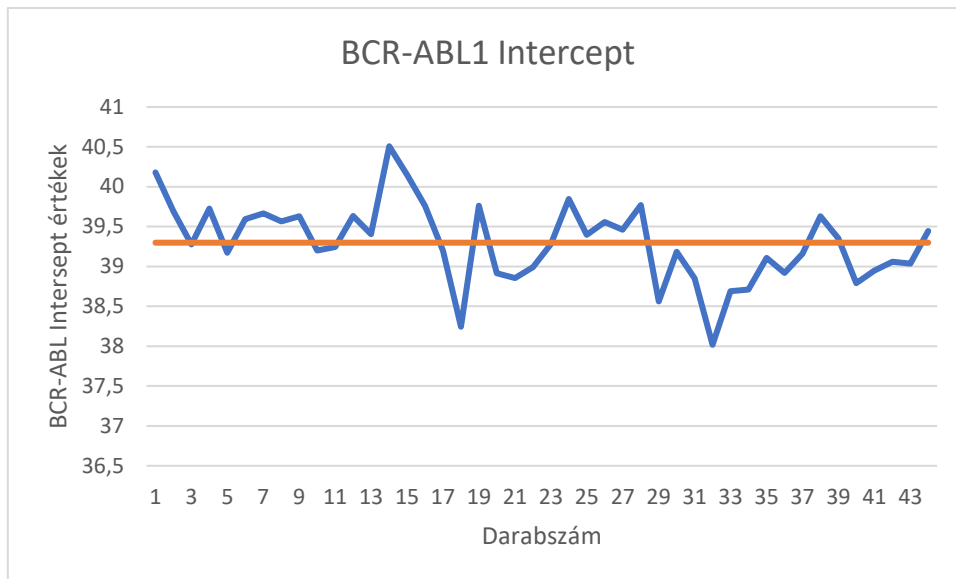
5.1.1. Intercept és Slope értékek

Az Intercept és Slope értéket egy mért BCR-ABL1 és ABL1 plazmid sor alapján határozzák meg. Az Intercept érték a nem detektált gének meghatározásában segít. Megadja, hogy hányadik ciklus után kell nem detektálhatóvá nyilvánítani az adott mintát. A Slope érték a lefutási meredekséget adja meg. Időnként meg kell ismételni ezeket a méréseket, és az így összegyűlt értékekből számolnak átlagot, ami alapján megadják ezt a két értéket, amelyek a 8, 9, 10 és 11-es ábrákon láthatóak.



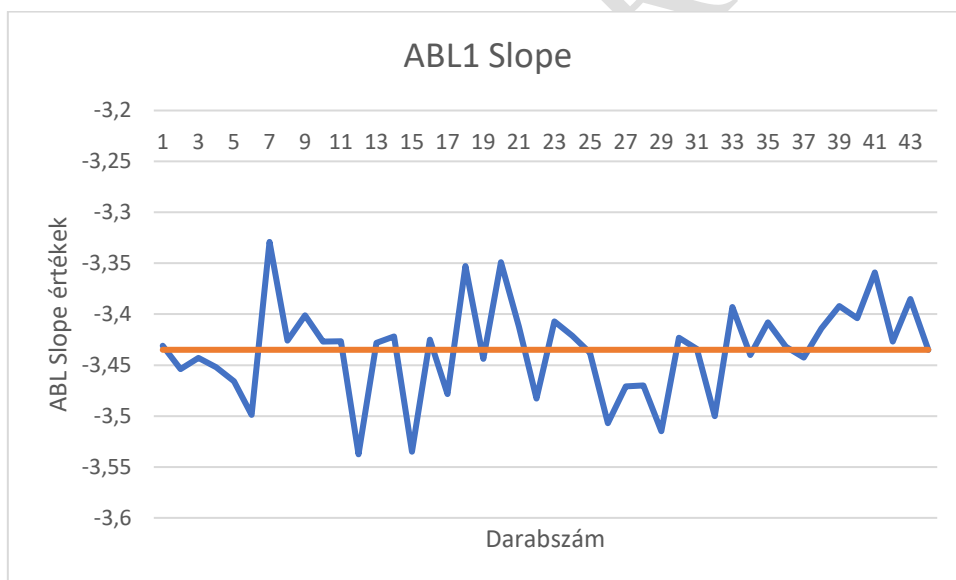
8.ábra: BCR-ABL1 Slope mért eredmények (kék), és az átlag érték (narancssárga)

A narancssárga vonal a BCR-ABL1 Slope átlag értékét jelzi, ami (-3,41).



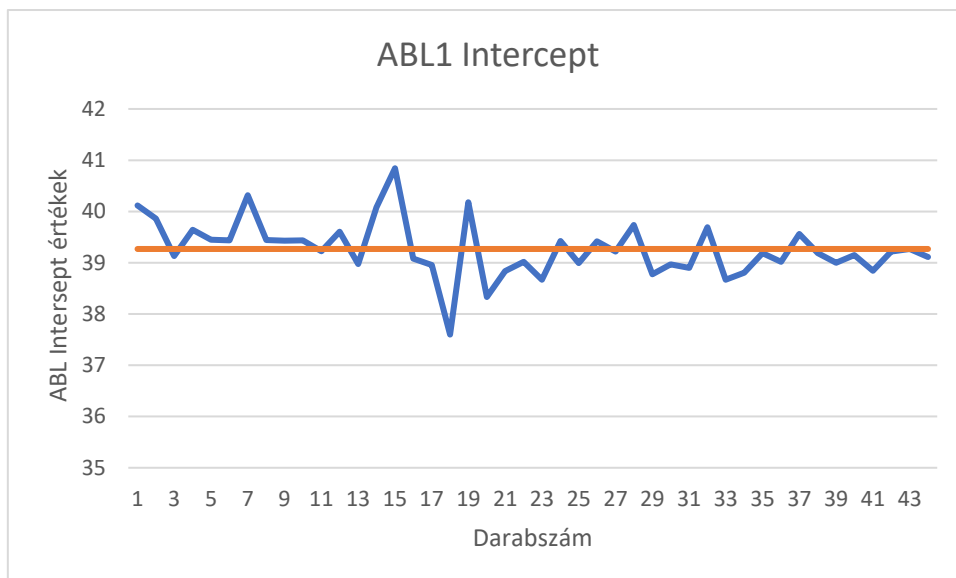
9.ábra: BCR-ABL1 Intercept mért eredmények (kék), és az átlag érték (narancssárga)

A narancssárga vonal itt is a BCR-ABL1 Intercept átlag értékét jelzi, ami 39,29.



10.ábra: ABL1 Slope mért eredmények (kék), és az átlag érték (narancssárga)

Az ABL1 Slope átlag értéke: (-3,43)



11.ábra: ABL1 Intercept mért eredmények (kék), és az átlag érték (narancssárga)

Az ABL1 Intercept átlagértéke: 39,26

5.1.2. A real-time PCR eredmények kiértékelése

A PCR reakció végezte után a PCR gép (Quant Studio3) egy Excel file-ban adja ki az eredményeket, amelyet a 12.ábra mutat.

Sample Name	Target Name	CT érték
29727	BCR-ABL	28,410
29727	BCR-ABL	27,838
29727	ABL	23,665
29727	ABL	23,835
29656	BCR-ABL	25,177
29656	BCR-ABL	25,244
29656	ABL	24,062
29656	ABL	24,333
29738	BCR-ABL	34,453
29738	BCR-ABL	35,142
29738	ABL	30,461
29738	ABL	30,947
29737	BCR-ABL	40,141
29737	BCR-ABL	Undetermined
29737	ABL	23,322
29737	ABL	23,272
29736	BCR-ABL	Undetermined
29736	BCR-ABL	Undetermined
29736	ABL	23,070
29736	ABL	23,089
29735	BCR-ABL	42,095
29735	BCR-ABL	Undetermined
29735	ABL	23,572
29735	ABL	23,742
29733	BCR-ABL	Undetermined
29733	BCR-ABL	Undetermined
29733	ABL	25,482
29733	ABL	25,574

12.ábra: PCR reakció eredményei

A „Sample Name” oszlopban a minták neve (sorszáma) található, a „Target Name” oszlopban a vizsgálat fajtája, a „CT” oszlopban pedig a mért eredmény.

Az eredmények (pl. 28,410) azt mutatják, hogy az adott minta hányadik ciklusban futott fel. Minél kisebb ez az eredmény, annál aktívabb a fúziós gén a betegben. Ha kései szakaszban fut fel a minta (pl. 39-40), akkor kevés a keresett BCR-ABL1 fúziós transzkriptum, tehát nincs sok betegséget okozó BCR-ABL1 fúziós gén. Ha a mintaszám mellett „Undetermined” olvasható (pirossal jelölve), akkor abban a mérésben, a mintában nem fejeződött ki a BCR-ABL1.

Ezekből az adatokból számoljuk az eredményeket (13.ábra).

- Első oszlop: minták sorszáma
- Második oszlop: „Ct érték BCR-ABL1” a PCR készülék által kiadott BCR-ABL1 eredményei (hányadik ciklusban futott fel a minta)
- Harmadik oszlop: A „Mennyiségi BCR-ABL1” oszlopban a BCR-ABL1 mennyiségét adja meg a következő képlettel: $10^{\left(\frac{Ct \text{ érték BCR-ABL1} - BCR-ABL1 \text{ Intercept}}{BCR-ABL1 \text{ Slope}}\right)}$

Számszerűen a 29643-as minta példáján:

$$10^{(20,976518309814 - 39,29775) / (-3,41796)} = 229\,235,8603$$

(A mestertáblában három tizedesig vannak feltüntetve az eredmények, de az egyenlet a pontos érték alapján számol)

- Negyedik oszlop: „Összmennyiség BCR-ABL1”: az egy mintához tartozó párhuzamos Mennyiségi BCR-ABL1 értékeket adjuk össze, és szorozzuk meg kettővel.

A 29643-as minta példáján: $(229\,235,86 + 270\,478,08) * 2 = 999\,427,88$

- Hetedik oszlop: Az Összmennyiség ABL1 az egy mintához tartozó párhuzamos Mennyiségi ABL1 értékeket adjuk össze, és szorozzuk meg kettővel.

- Nyolcadik oszlop: „BCR-ABL1/ABL1 % (Abszolút kvant.)” az Összmennyiség BCR-ABL1-et osztjuk el az Összmennyiség ABL1 értékkel, így egy százalékos értéket kapunk.

A 29643-as minta példáján: $999\,427,88 / 2\,079\,558,26 = 0,480596 \rightarrow 48,0596\%$

Minta	Ct érték BCR-ABL1	Mennyiség BCR-ABL1	Összmennyiség BCR-ABL1	Ct érték ABL1	Mennyiség ABL1	Összmennyiség ABL1	BCR-ABL1/ABL1 % (Abszolút kvant.)	BCR-ABL1/ABL1 % (ddCt módszer)	BCR-ABL1/ABL1 %-IS (Abszolút kvant.)
29643	20,977	229 235,86	999 427,88	19,590	535 361,17	2 079 558,26	48,0596%	42,9634%	27,9226%
	20,731	270 478,08		19,679	504 417,96				
29646	25,087	14 374,95	63 694,73	23,842	30 970,55	120 071,89	53,0472%	48,1939%	30,8204%
	24,798	17 472,41		23,937	29 065,40				
29650	22,251	97 161,88	390 337,99	22,991	54 788,00	204 047,38	191,2917%	181,1720%	111,1440%
	22,238	98 007,12		23,212	47 235,70				
29694	24,313	24 219,56	101 364,56	21,794	122 185,67	485 668,06	20,8712%	18,3876%	12,1261%
	24,181	26 462,72		21,813	120 648,36				
29699	Undetermined	#ÉRTÉKI	#ÉRTÉKI	23,428	40 867,16	165 010,73	#ÉRTÉKI	0,0021%	#ÉRTÉKI
	38,920	1,29		23,400	41 638,21				
29693	27,662	2 536,44	10 466,17	25,874	7 930,76	15 866,94	65,9621%	1851,6042%	38,3240%
	27,571	2 696,65		37,781	2,71				
29697	Undetermined	#ÉRTÉKI	#ÉRTÉKI	23,022	53 675,08	213 932,27	#ÉRTÉKI	0,0051%	#ÉRTÉKI
	37,283	3,89		23,032	53 291,05				
29707	Undetermined	#ÉRTÉKI	#ÉRTÉKI	23,011	54 042,80	206 736,82	#ÉRTÉKI	0,0018%	#ÉRTÉKI
	38,871	1,33		23,148	49 325,61				
29708	39,847	0,69	6,96	22,853	60 094,00	218 740,89	0,0032%	0,0017%	0,0018%
	37,775	2,79		23,149	49 276,44				
29717	33,425	52,27	247,33	22,665	68 163,21	273 278,98	0,0905%	0,0676%	0,0526%
	32,962	71,40		22,658	68 476,28				
29716	35,608	12,01	64,97	23,031	53 334,20	152 428,07	0,0426%	0,0334%	0,0248%
	34,816	20,47		24,294	22 879,83				
29715	39,940	0,65	4,84	22,257	89 641,73	284 020,24	0,0017%	0,0011%	0,0010%
	38,448	1,77		23,058	52 368,39				
29714	33,474	50,55	229,92	24,282	23 062,28	99 686,05	0,2306%	0,1792%	0,1340%
	33,115	64,41		24,059	26 780,74				

13.ábra: Mester táblázat a BCR-ABL1 fúziós gén mennyiségének meghatározásához

- Kilencedik oszlop: „BCR-ABL1/ABL1% (ddCt módszer)” a következő képlet alapján számolunk:

$$2^{-(BCR - ABL1 \text{ párhuzamos Ct érték átlaga egy mintához}) - (ABL1 \text{ párhuzamos Ct érték átlaga egy mintához})}$$

A 29643-as minta példáján: $2^{-\left(\left(\frac{20,977+20,731}{2}\right) - \left(\frac{19,590+19,679}{2}\right)\right)} = 0,429$, azaz 42,96%.

- Tizedik oszlop: „BCR-ABL1/ABL1%-IS (Abszolút kvant.)” egy adott minta BCR-ABL1/ABL1% (Abszolút kvant.) értékét szorozzuk meg a konverziós faktoral, ami 0,5810. Ez a százalékos érték a beteg vizsgálatának a végeredménye.

5.2. Különleges esetek kiértékelése

Amennyiben a BCR-ABL1-nél a Ct érték mindkét párhuzamosnál „Undetermined” (nem detektált), a vizsgálati eredményt negatívnak tekinthetjük. Negatív az eredmény akkor is, ha a párhuzamosok közül az egyik „Undetermined”, de a másik az Intercept érték (39,29775) fölött van. Azonban, ha az „Undetermined” mellett a másik érték az Intercept érték alatt van, számolnunk kell a következő egyenlettel: $\frac{\text{Mennyiségi BCR-ABL1}}{\text{Összmennyiségi ABL1}} * 100$.

Ha az egyik párhuzamos meghaladja az Intercept értéket, de a másik nem, akkor is ugyan ezt a képletet kell alkalmazni.

5.2.1. Különböző eredmények kiértékelésének (leletezésének) menete, eredmények kategorizálása

Ha kiszámoltuk és megkaptuk a mintákhoz tartozó BCR-ABL1 fúziós génhez tartozó expressziós szintet, akkor ezt az értéket viszonyítani kell a korábbi vizsgálati eredményekhez.

Így az ilyen vizsgálati eredményeket, ha leletbe adjuk ki a kezelőorvosnak/patológusnak, meg kell állapítani, hogy az előző mérésekhez képest milyen tendenciát mutat a beteg (4.táblázat).

4. táblázat: Páciensek eredményeinek bekategorizálása

	Optimális	Nem ideális	Rossz
diagnóziskori	NA		NA
3 hónap	≤10%	>10%	>10%
6 hónap	≤1%	>1-10%	>10%
12 hónap	≤0.1%	>0.1-1%	>1%
	≤0.1%	>0.1-1%	>1%

„NA”: not applicable, vagyis nem alkalmazható, mivel nincsen és rossz kiinduló érték.

Ennek alapján öt nagy kategóriába sorolhatjuk a mért eredményeket a korábbi vizsgálatokhoz képest:

- diagnóziskori
- csökkenő
- növekvő
- negatív
- válasz nélküli

5.2.2. Diagnóziskori eredmény

A diagnóziskori eredmény az első mért eredmény, amely a betegség feltárása érdekében történik. Lehet egy betegnek két diagnóziskori lelete, ha más a minta (például csontvelő és perifériás vér).

5.2.3. Csökkenő eredmény

Ha több mért eredménye van a betegnek, akinek a mintáit vizsgáljuk, megfigyelhetünk csökkenő tendenciát, amelyet a 14. ábrán láthatunk. Ez az eredmény azonban nem ideális, ahogy azt a fenti táblázat ábrázolja, mivel egy év után sincsen major molekuláris válasz (≤0.1%).

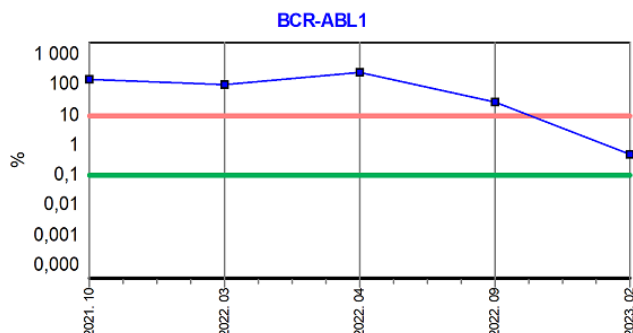
Eredmény:

A vizsgált mintában a BCR-ABL1 fúziós gén expressziós szintje: **0,5%**.

Előző vizsgálatok eredményei:

Vizsgálat ideje	BCR-ABL1 %
2021. 10.	151,000 %
2022. 03.	103,000 %
2022. 04.	248,000 %
2022. 09.	25,900 %
2023. 02.	0,500 %

A táblázat a legutóbbi vizsgálatok eredményét tartalmazza.

**Vélemény :**

Krónikus Myeloid Leukémia. Csökkenő BCR-ABL1 fúziós transzkriptum szint.

14.ábra: Csökkenő tendenciát mutató mért eredmények egy beteg esetén

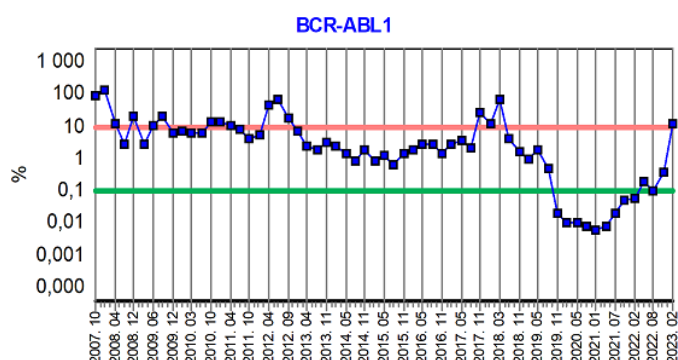
5.2.4. Növekvő eredmény

A 15. ábrán látszik, hogy a beteg eredményei nem egyenletesek, nincs major molekuláris válasz egyáltalán, és a mért értékek fluktuálnak, azonban 2022 augusztus és 2023 február közti időszakban drasztikusan emelkedett, több, mint 10%-kal. Ilyen esetben, ha nincsen major molekuláris válasz érdemes egy szekvenálást végezni, ami esetlegesen ki tudja mutatni, ha a betegnél gyógyszerrezisztencia áll fenn. Ilyenkor (ha rezisztens az alkalmazott gyógyszerre) a kezelőorvos terápiaváltást eszközöl.

Előző vizsgálatok eredményei:

Vizsgálat ideje	BCR-ABL1 %
2020. 08.	0,008 %
2021. 01.	0,006 %
2021. 04.	0,008 %
2021. 07.	0,020 %
2021. 10.	0,050 %
2022. 02.	0,060 %
2022. 05.	0,200 %
2022. 08.	0,100 %
2022. 11.	0,400 %
2023. 02.	12,000 %

A táblázat a legutóbbi 10 vizsgálat eredményét tartalmazza.



15.ábra: Növekvő tendenciát mutató mért eredmények egy beteg esetén

5.2.5. Negatív eredmény

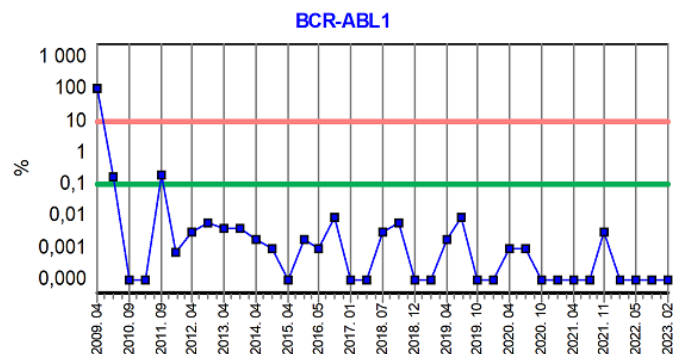
Ennél a betegnél MR5.0 nagyságrend mélységű a molekuláris válasz ($\text{BCR-ABL1} \leq 0,001\%$, vagy a BCR-ABL1 expressziós szint nem éri el a kimutathatósági határt). Ez egy ideális lefolyásnak és válasznak számít, a beteg értéke ugyan néha emelkedik, de az betudható a TFR-nek (Terápia mentes időszak) is. Ha ilyen esetben (TFR mellett/után) emelkedik az érték, akkor érdemes kis időre visszaállni a gyógyszereszedésre.

A negatív a vizsgálati eredmény grafikus értékelését a 16. ábra mutatja.

Előző vizsgálatok eredményei:

Vizsgálat ideje	BCR-ABL1 %
2020. 07.	0,001 %
2020. 10.	0,000 %
2021. 01.	0,000 %
2021. 04.	0,000 %
2021. 07.	0,000 %
2021. 11.	0,003 %
2022. 02.	0,000 %
2022. 05.	0,000 %
2022. 08.	0,000 %
2023. 02.	0,000 %

A táblázat a legutóbbi 10 vizsgálat eredményét tartalmazza.



16.ábra: Negatív eredmények egy beteg esetén

5.2.6. Válasz nélküli eredmény

Az utolsó kategória, amikor a terápiára nem válaszol a beteg szervezete és nem változik jelentősen a BCR-ABL1 fúziós gén expressziós szintje. Ebben az esetben nincs major molekuláris válasz, és az értékek is a kiindulási érték körül mozog, ahogy azt a 17. ábrán is láthatjuk.

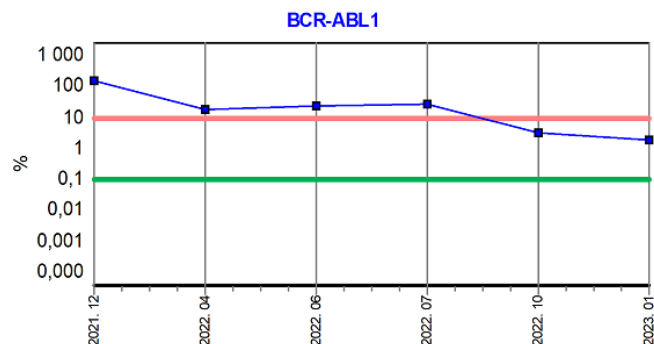
Eredmény:

A vizsgált mintában a BCR-ABL1 fúziós gén expressziós szintje: 2%.

Előző vizsgálatok eredményei:

Vizsgálat ideje	BCR-ABL1 %
2021. 12.	165,000 %
2022. 04.	18,500 %
2022. 06.	24,100 %
2022. 07.	27,000 %
2022. 10.	3,300 %
2023. 01.	2,000 %

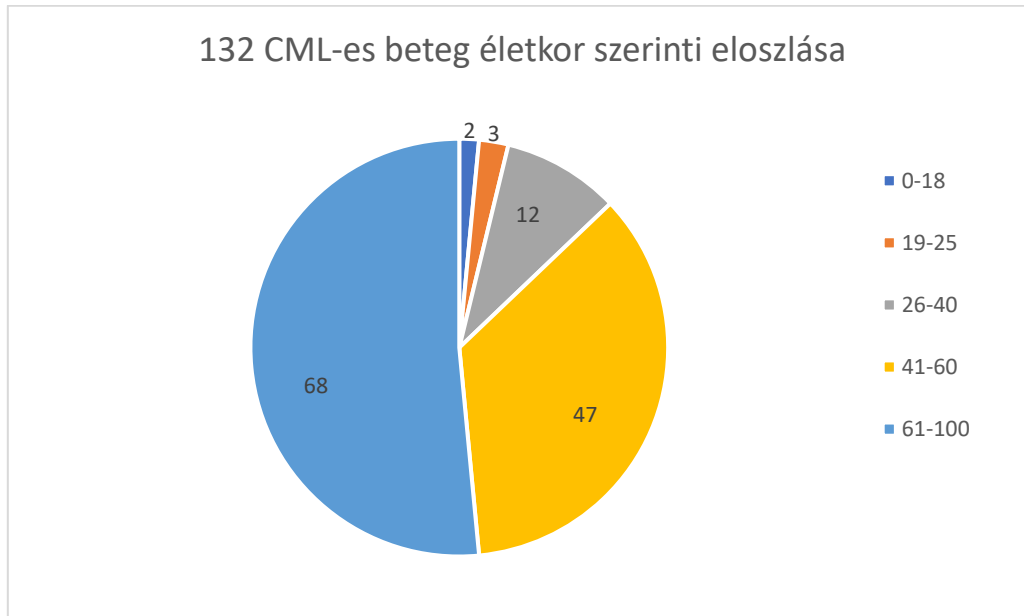
A táblázat a legutóbbi vizsgálatok eredményét tartalmazza.



17.ábra: Válasz nélküli eredmény egy beteg esetén

5.3. Mérések grafikus leképezése

A 132 beteg mintából kigyűjtöttem a betegek életkorát, amit a 18.-as ábra mutat. Ebből általánosan következtethető, hogy a betegek nagyrésze 41 év fölötti. Az általam vizsgált betegek alig több, mint 12%-a van 40 év alatt, és mindössze 3,7%-a 26 évnél fiatalabb.

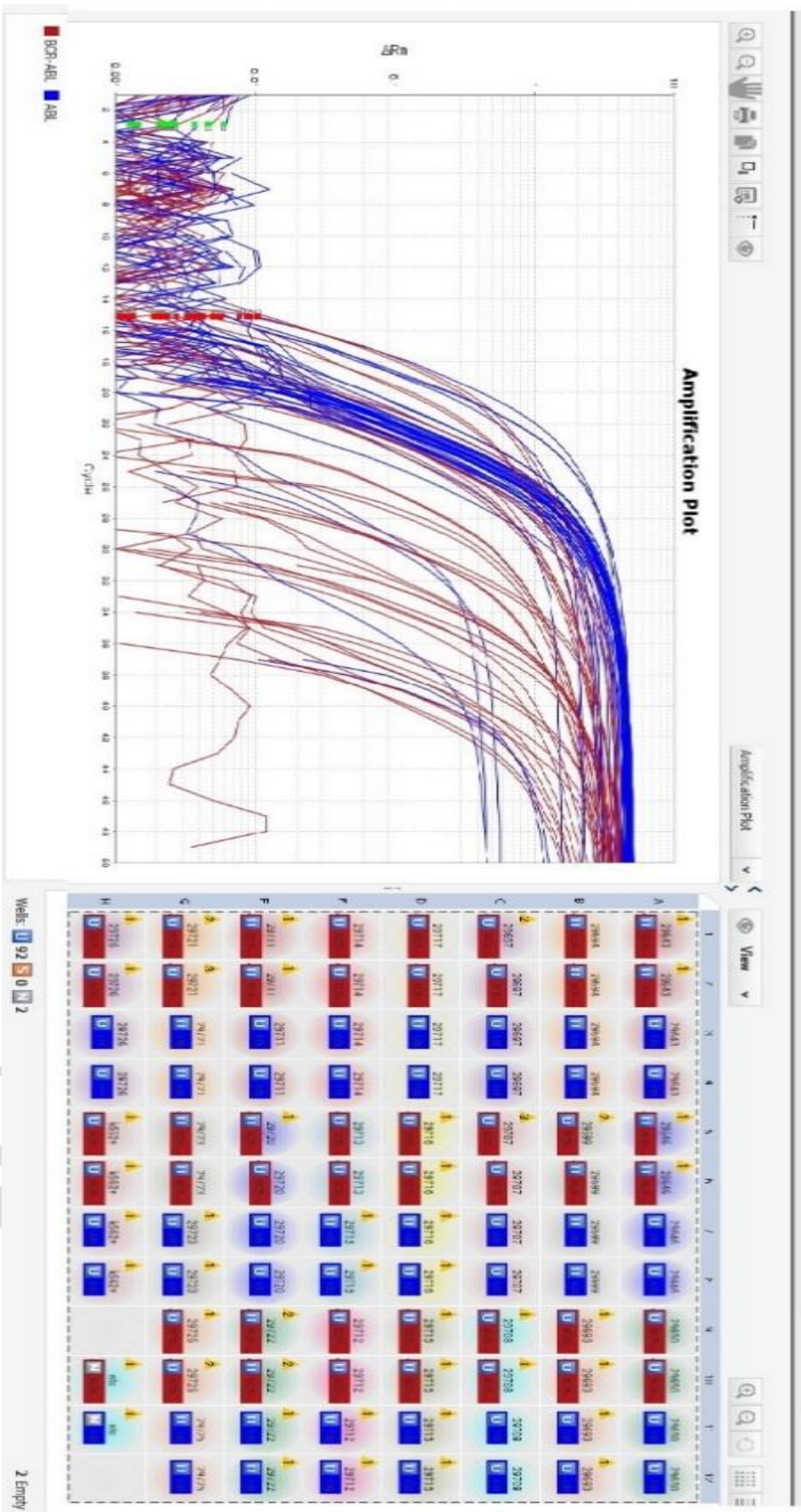


18.ábra: A vizsgált beteg életkor szerinti csoportosítása

A laboratóriumi munkám során hat PCR vizsgálatot indítottam, amelyből egyet emelek ki a 19. ábrán.

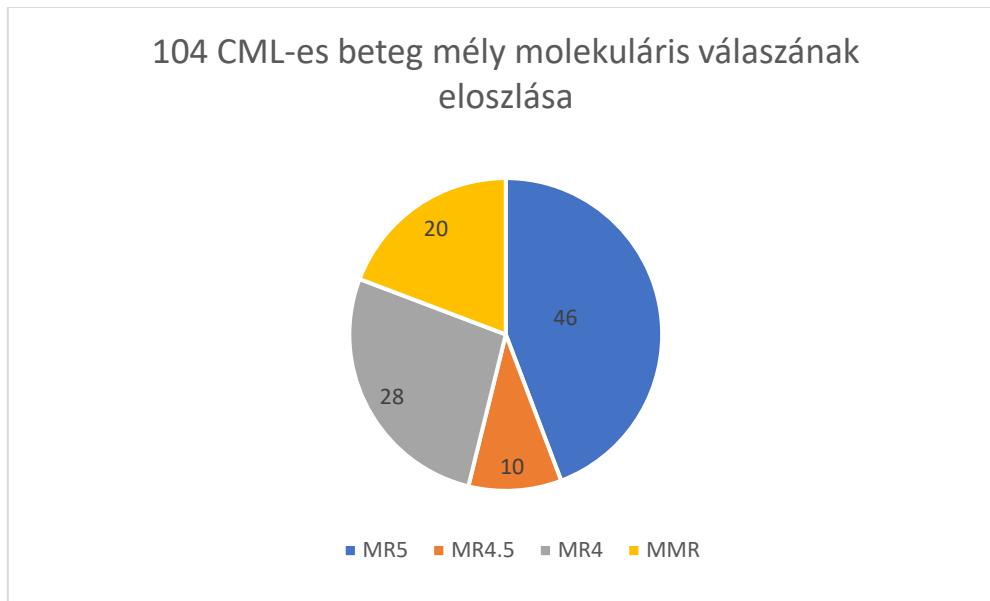
Az „Amplification plot” (amplifikációs görbe) akkor jön létre, amikor az egyes minták fluoreszcens jele a ciklus számának függvényében kerül ábrázolásra. Tehát az erősítési görbén a termék felhalmozódása látható valós idejű PCR kísérlet során.

Az ábrák jobb oldalán, a táblázatban látszik a „plate térkép”, vagyis, hogy melyik minta milyen színnel és hol szerepel.



19.ábra: 2022.11.03. PCR vizsgálat eredménye

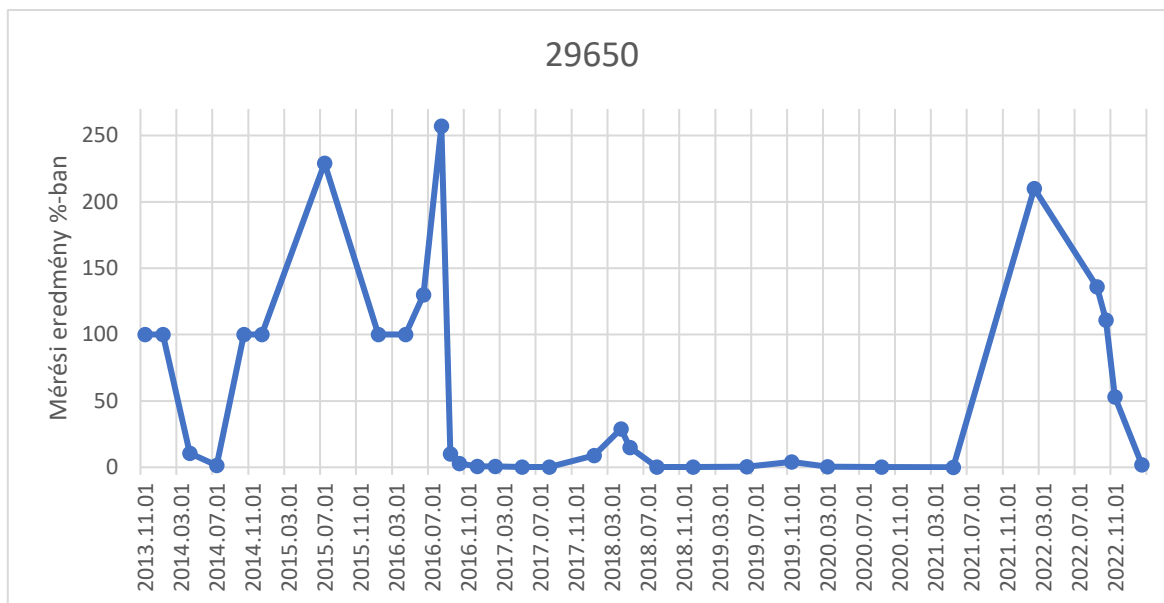
A 132 CML-es beteg közül 104-nek lett mély molekuláris válasza. 46 db MR5 (BCR-ABL1 \leq 0,001%), 10 db MR4.5(BCR-ABL1 \leq 0,0032%), 28 db MR4(BCR-ABL1 \leq 0,01%) és 20 db MMR (BCR-ABL1 \leq 0,1%) (20.ábra).



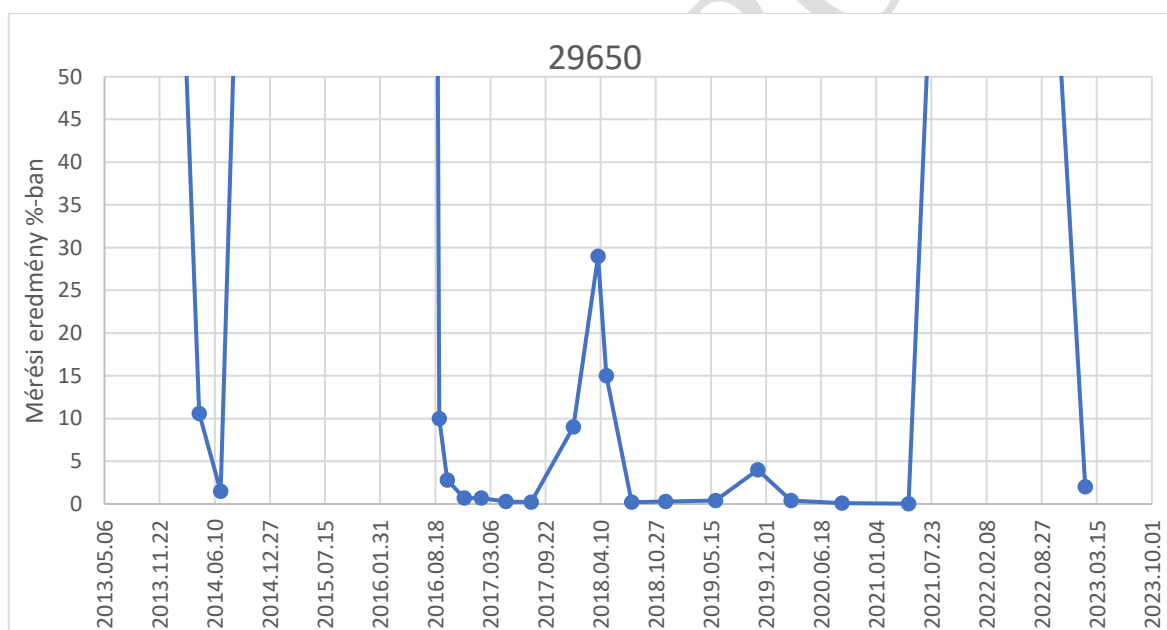
20.ábra:104 db mély molekuláris válasz eloszlása

Öt ember adatait visszamenőlegesen is elkértem annak érdekében, hogy grafikonon tudjam bemutatni, hogy egy leletben egy ember összes mért adatai hogyan néznek ki.

A 21. és 22. ábrán, a 29650-es sorszámmal ellátott betegnek nincsen ideális terápiás válasza, ahogy az látszik is az első 3 évnél mért adatain, illetve 2016.-ban és 2022 februárjában kiugró értékeket mértek nála. 2016.01.-től Tasignát szedett 2016. augusztusig, ami látszólagosan nem hatott. 2016. 09.-óta Sprycel-t szedett 2019.11.-ig, ami szép csökkentő tendenciát adott a mért értékeinek. Az utolsó fél évben (2022.09.-től) sokfajta gyógyszert próbáltak nála valószínűleg a 2022. februári 210%-os értéke után: Bosulif, Imatinib, Dasatinib, Asciminib. Ezeknek a gyógyszereknek köszönhetően 2023.02.01.-re 2%-ra csökkent le a BCR-ABL1 fúziós gén szintje, azonban ez az eredmény még nem esik bele a mély molekuláris válaszba.

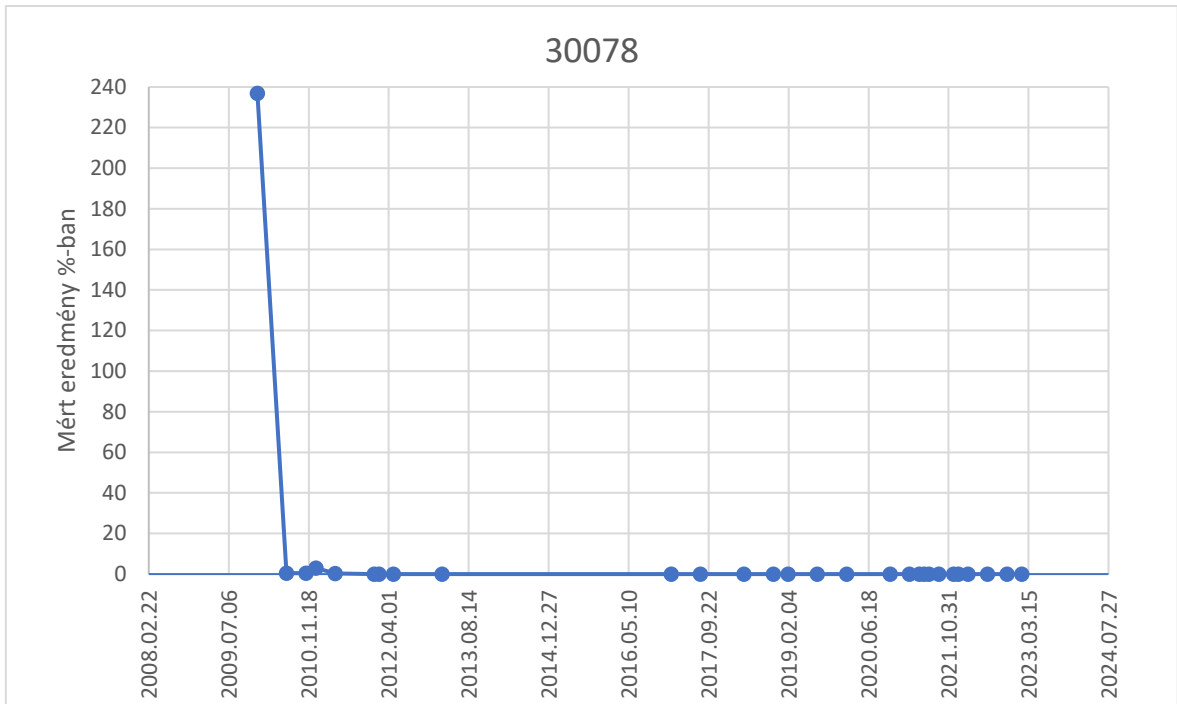


21.ábra: A 29650-es beteg összes eddigi mért eredménye

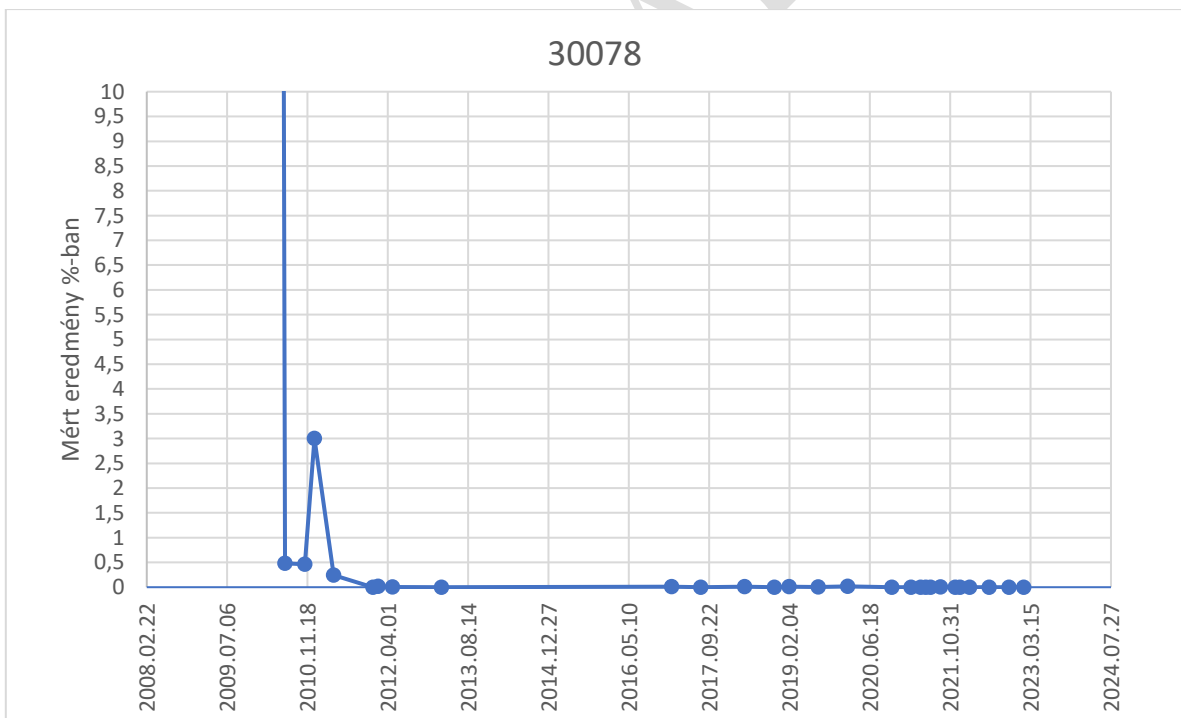


22.ábra: A 29650-es beteg mért eredményei nagyításban

A 30078-as betegnél 2011. áprilisától csökkenő tendenciát mutat, jól reagált a kiválasztott terápiára (Tasigna gyógyszert szed 2017 augusztustól, és terápia mentes időszakon van 2021 májusától). A kezdeti értéke 237% volt. Ez a 23-as és 24-es ábrán látható. Az utolsó (általán) mért BCR-ABL1 fúziós transzkriptum szintje 0% lett, vagyis negatív.



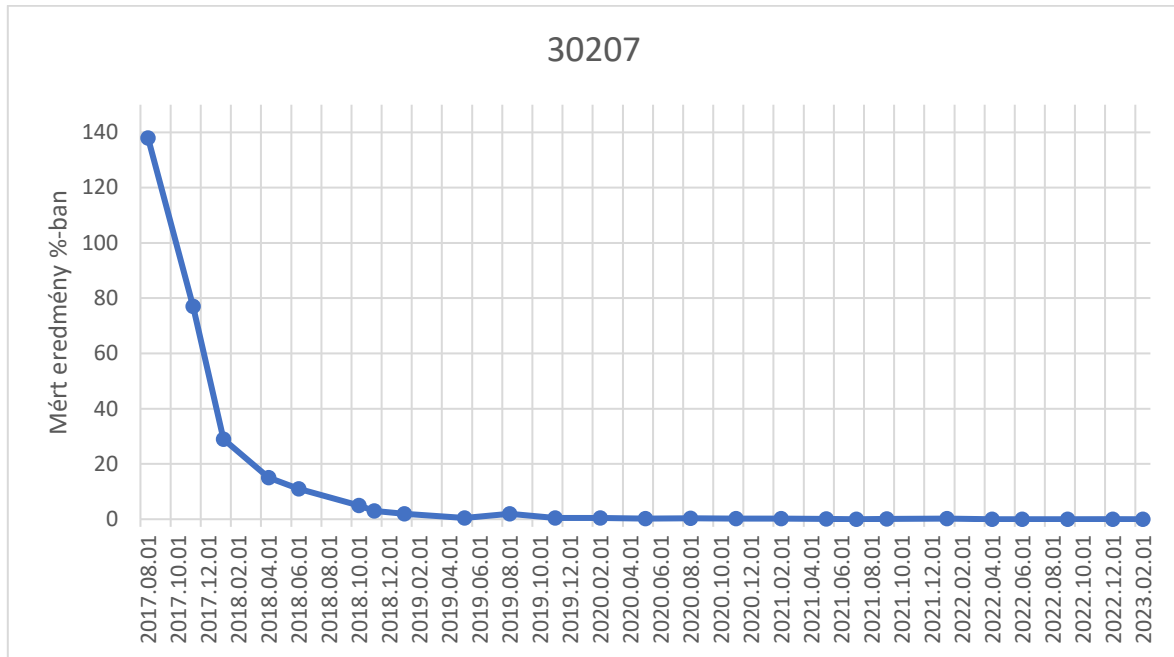
23.ábra: A 30078-as beteg összes eddigi mért eredménye



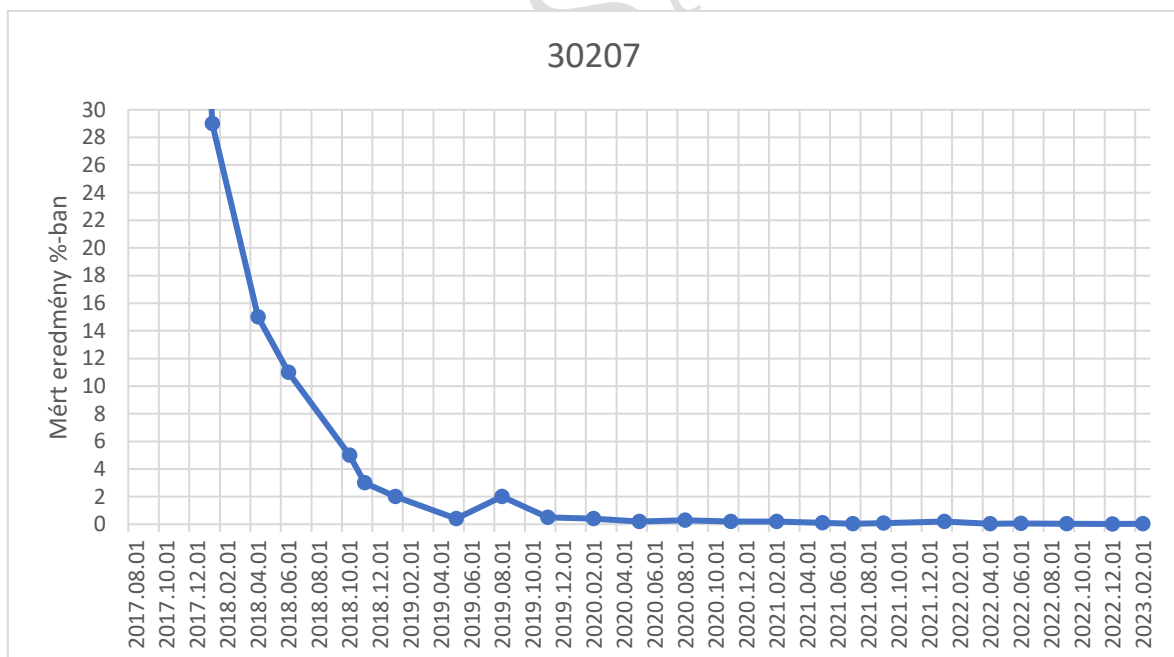
24.ábra: A 30078-as beteg mért eredményei nagyításban

A 30207-es beteg esetében, a 25-ös és 26-os ábrán ábrázolt adatok alapján szabályos, csökkenő tendenciát láthatunk, csak 2019. augusztusában volt egy kiugró értéke, ami 2% volt (a diagnóziskori értéke 138%). Elérte a major molekuláris választ (0,03%). A

gyógyszerszedéséről semmilyen információt nem találtam az orvosi rendszerben, ami vagy azt jelenti, hogy nem kapott gyógyszeres kezelést, vagy nem tüntették fel a kezelőorvosai.



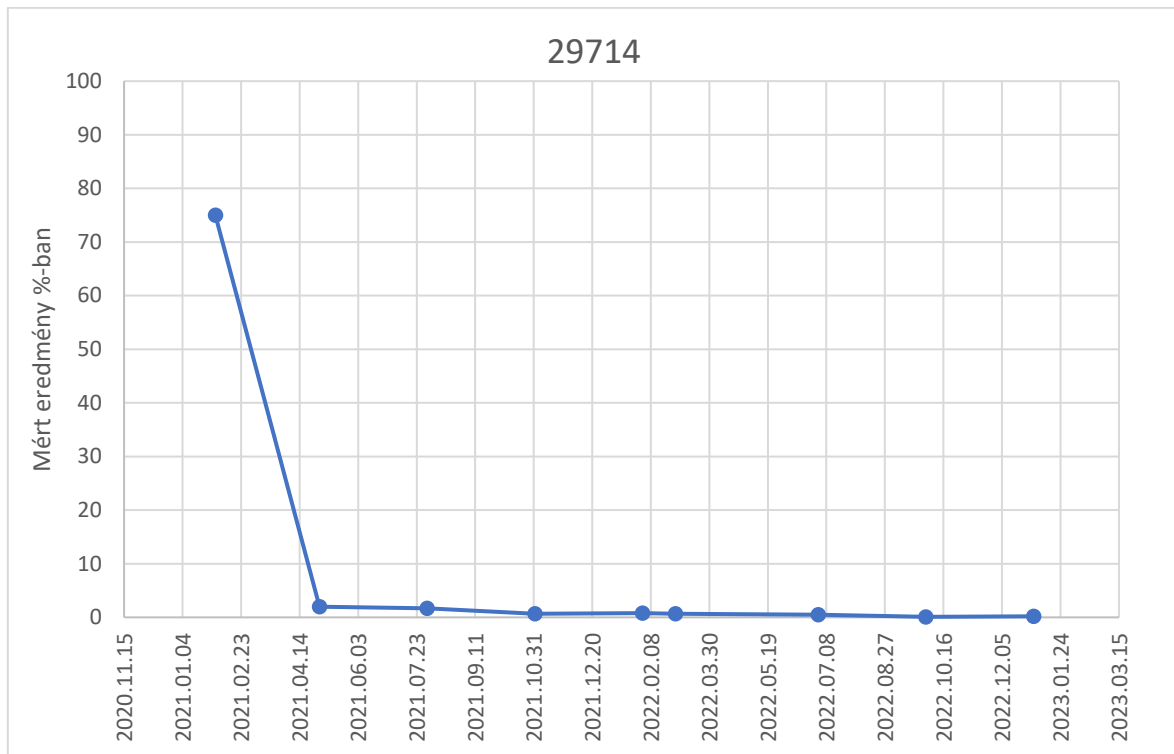
25.ábra: A 30207-es beteg összes eddigi mért eredménye



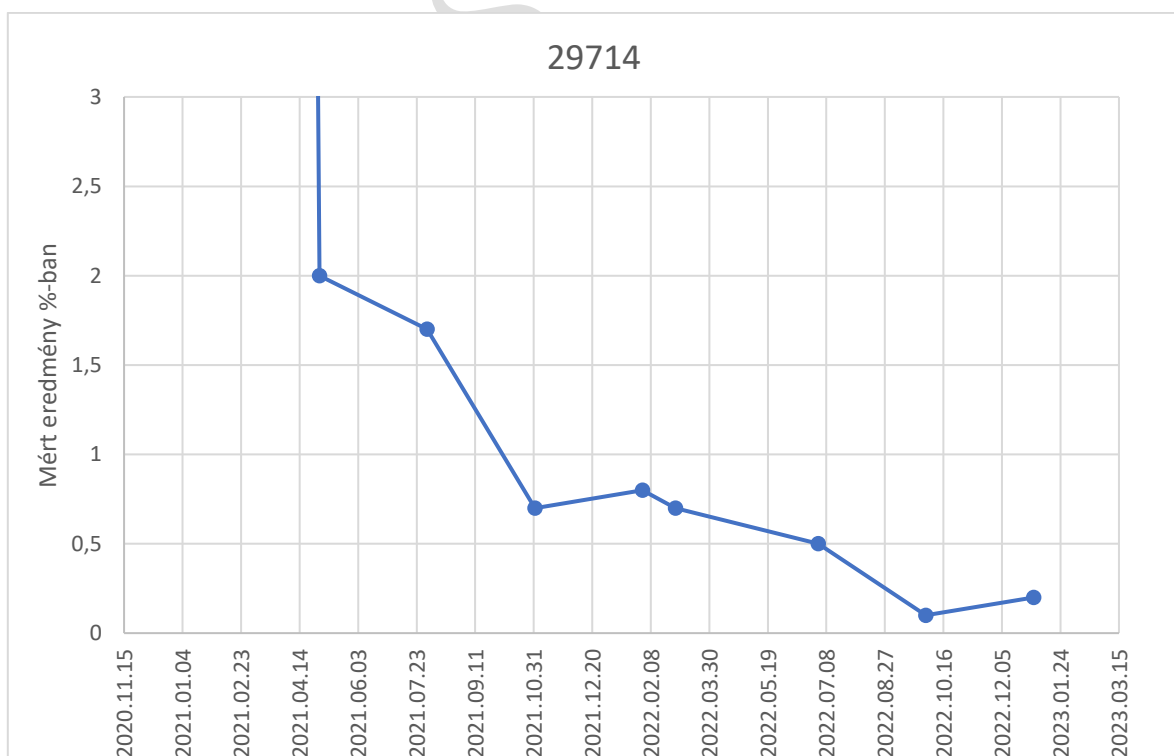
26.ábra: A 30207-es beteg mért eredményei nagyításban

A 29714-es betegnél ugyan nem szabályos, de csökkenő tendenciát láthatunk a 27-es és 28-as ábrán, a mért BCR-ABL1 fúziós transzkriptum szintjénél. A kezdő értéke 75% volt. Nibixet

szedett 2021 májusától, azonban az utolsó vizsgálatkor Imatinib-et írt fel neki a kezelőorvosa. Ebben az esetben sincsen mély molekuláris válasz, ugyanis az utolsó mért eredménye 0,2% lett.

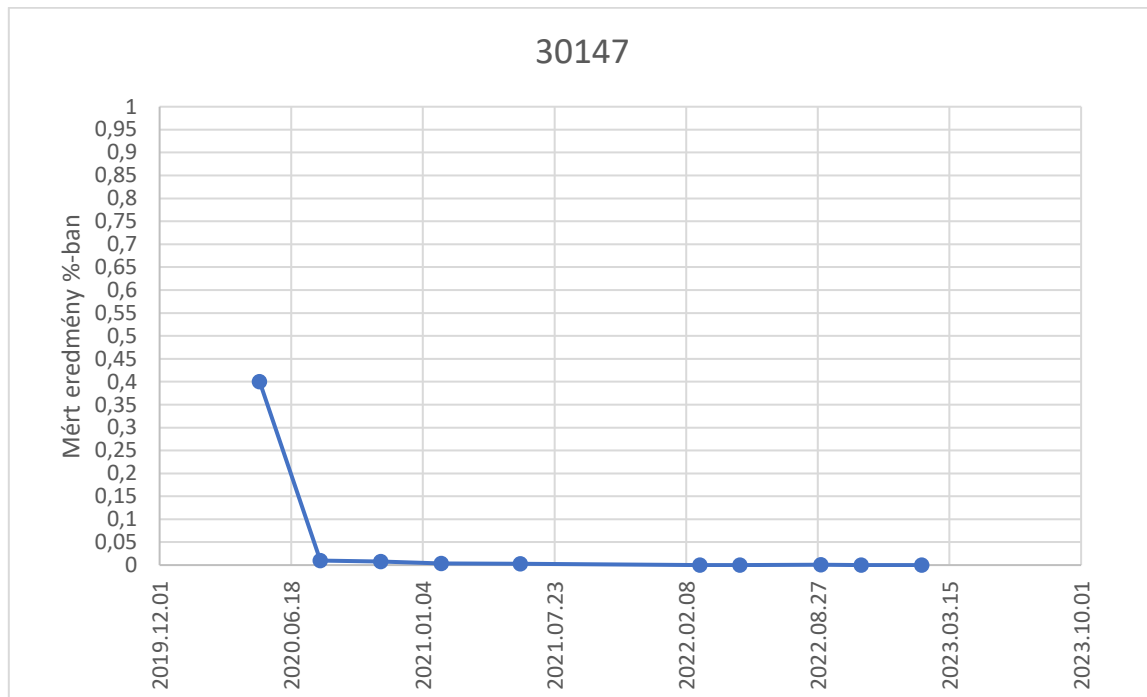


27.ábra: A 29714-es beteg összes eddigi mért eredménye



28.ábra: A 29714-es beteg mért eredményei nagyításban

A 30147 sorszámú ellátott beteg az első alkalomtól kezdve mostanáig Dasatinib gyógyszerkezelést kap, ami láthatólag használt nála. A diagnóziskori értéke sem volt kiemelkedően magas, csupán 0,4%-ot mértek nála, ami a 29. ábrán látható. Az utolsó BCR-ABL1 fúziós gén mérési eredménye negatív lett.



29.ábra: A 30147-es beteg összes eddigi mért eredménye

A fent említett öt beteg esetén kettőnek (30078 és 30147) negatív az általam mért utolsó vizsgálati eredménye. A 30207-es beteg MR4-es kategóriába sorolható, ugyanis a mért BCR-ABL1 fúziós gén szintje 0,03%. A 29714 és 29650 sorszámú betegek esetében nincsen mély molekuláris válasz.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A dolgozatom készítése során a krónikus myeloid leukémia kapcsán végeztem méréseket. A CML a legjobban kontrollálható leukémia típus. Ezt a típusú leukémiát a Philadelphia kromoszómán lévő BCR-ABL1 fúziós gén okozza. A Philadelphia kromoszóma egy reciprok transzlokáció eredménye, amelyen kóros működése során kialakul a BCR-ABL1 fúziós transzkriptum. A BCR-ABL1 megnöveli a tirozinkináz aktivitást, így kontrollálatlanul szaporodnak el a leukémiás sejtek. A TKI, vagyis tirozinkináz-inhibitoroknak (pl. imatinib, dasatinib) köszönhetően kordában tartható a betegség azáltal, hogy a BCR-ABL1 kiméra gén expressziós szintje lecsökken a mély molekuláris fázisba (MR4, MR4.5 és MR5), vagyis 0,1% alatti értéke lesz az expressziónak. A BCR-ABL1 fúziós transzkriptum mennyisége meghatározható valós idejű polimeráz láncreakcióval, amit mértem a laboratóriumi munkám során.

Ennek első lépése perifériás vérből vagy csontvelőből történő RNS izolálása, majd az izolált RNS mennyiségi meghatározása, tisztaságának mérése. Második lépésként reverz transzkripcióval végeztem RNS-ről cDNS átírást. Az így kapott cDNS-ből lehetett elvégezni a real-time PCR-t. Az eredmények kiértékelése után kaptuk meg BCR-ABL1 abszolút mennyiségét. Már egy PCR mérés eredménye is be tudja folyásolni a klinikai döntéshozatalt az adott beteg további terápiája kapcsán. Emiatt három havi monitorozás szükséges a betegnek, ezáltal pontosan nyomon követhető egy esetlegesen újfajta gyógyszer hatása az adott betegre, és lehetővé teszi a célzott terápia meghatározását és értékelését.

Munkám során összesen 132 CML-es beteg mintáján végeztem el BCR-ABL1 fúziós gén expressziós szintjének meghatározását. Öt beteg esetében visszamenőlegesen elkértem az eddigi mérési eredményeket, amelyekből hárman elérték a mély molekuláris választ, ketten nem.

7. IRODALMI HIVATKOZÁSOK

- 1: Czakó M. (2005): DNS hibridizációs módszerek alkalmazása a klinikai cytogenetikában. PTE Orvosi Genetikai és Gyermekejlődéstani Intézet, PhD értekezés
- 2: Demeter, J., Poros, A., Bödör, C., Horváth, L., és Masszi, T. (2016). A krónikus myeloid leukaemia korszerű Diagnosztikája és kezelése. *Orvosi Hetilap*, 157(37), 1459–1468. <https://doi.org/10.1556/650.2016.30521>
- 3: Dobozi Pálma: A célzott daganatterápia sikertörténete a krónikus myeloid leukémiába kezelése (2017)
- 4: Sherbenou, D. W., és Druker, B. J. (2007). Applying the discovery of the Philadelphia chromosome. *Journal of Clinical Investigation*, 117(8), 2067–2074. <https://doi.org/10.1172/jci31988>
- 5: Ozkan E, Lacerda MP. Genetics, Cytogenetic Testing And Conventional Karyotype. (2022). In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK563293/>
- 6: Gaál-Weisinger J., Mucsi O., Körösmezey G., Szili B., H. Eid, Kiss R., Bödör Cs., Tárkányi I., Nagy Zs. és Demeter J. (2017): Újdonságok és tapasztalatok a krónikus mieloid leukémia tirozinkináz-gátló kezelésében. *Magyar Onkológia* 61:67–74, 2017
- 7: H. Ayatollahi, M. R. Keramati, A. Shirdel, M. M. Kooshary, M. Raiszadeh, S. Shakeri és M. H. Sadeghian (2018): BCR-ABL fusion genes and laboratory findings in patients with chronic myeloid leukemia in northeast Iran, *Caspian J Intern Med* 2018; 9(1):65-70
- 8: Zhou, H., és Xu, R. (2015). Leukemia Stem Cells: The root of chronic myeloid leukemia. *Protein és Cell*, 6(6), 403–412. <https://doi.org/10.1007/s13238-015-0143-7>
- 9: Király P. A., Alpár D., Fésüs V., Marosvári D., Matolcsy A. és Bödör Cs. (2015): Az onkohematológia molekuláris diagnosztika vizsgálatmódszereinek alapja. *Magyar Onkológia* 60:88–98, 2016
- 10: Kirschner, G., Balla, B., Kósa, J., Horváth, P., Kövesdi, A., Lakatos, G., Takács, I., Nagy, Z., Tóbiás, B., Árvai, K., és Lakatos, P. (2016). Az Onkohematológiai Betegségek Kezelésében Használt tirozinkináz-gátló imatinib és nilotinib csonthatásainak Irodalmi áttekintése és a saját Kutatási Eredmények BEMUTATÁSA. *Orvosi Hetilap*, 157(36), 1429–1437. <https://doi.org/10.1556/650.2016.30525>

- 11: Kiss R., Király P. A., Gaál-Weisinger J., Marosvári D., Gángó A. P., Demeter J. és Bödör Cs. (2017): A krónikus mieloid leukémia molekuláris monitorozásának aktuális kérdései. *Magyar Onkológia* 61:57–66, 2017
- 12: MTA-SE Lendület Kutatócsoport, CML támogatói oldal: <http://www.cmlinformacio.com/>
- 13: Rácz G., Molnár P. és Nagy N. (2019): Quantitative real-time PCR. Eötvös Lóránd Tudományegyetem Természettudományi Kar, Biológiai Intézet és Kémiai Intézet, laborgyakorlat
- 14: Semmelweis Kiadó (2021): Molekuláris genetikai vizsgálatok jelentősége krónikus myeloid leukaemiában, *Orvos képzés, Molekuláris onkológia* 2021; 3:301-620, (Kiss R., Jenei A., Fatima A. K., Demeter J. és Bödör Cs.)
- 15: The American Cancer Society medical and editorial content team (2018) a): About Chronic Myeloid Leukemia, cancer.org | 1.800.227.2345
- 16: The American Cancer Society medical and editorial content team (2018) b): Chronic Myeloid Leukemia Early Detection, Diagnosis, and Staging, cancer.org | 1.800.227.2345
- 17: An, X., Tiwari, A. K., Sun, Y., Ding, P.-R., Ashby, C. R., and Chen, Z.-S. (2010). BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors in the treatment of philadelphia chromosome positive chronic myeloid leukemia: A Review. *Leukemia Research*, 34(10), 1255–1268. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2010.04.016>
- 18: Kang, Z.-J., Liu, Y.-F., Xu, L.-Z., Long, Z.-J., Huang, D., Yang, Y., Liu, B., Feng, J.-X., Pan, Y.-J., Yan, J.-S., and Liu, Q. (2016). The Philadelphia Chromosome in leukemogenesis. *Chinese Journal of Cancer*, 35(1). <https://doi.org/10.1186/s40880-016-0108-0>
- 19: Király P. A., Alpár D., Fésüs V., Marosvári D., Matolcsy A. és Bödör Cs. (2016): Az onkohematológia molekuláris diagnosztikai vizsgálómódszereinek alapjai, *MAGYAR ONKOLÓGIA* 60:88–98, 2016
- 20: Koretzky, G. A. (2007). The legacy of the Philadelphia chromosome. *Journal of Clinical Investigation*, 117(8), 2030–2032. <https://doi.org/10.1172/jci33032>

Képek, ábrák:

Internet 1: Krónikus Mieloid Leukémia morfológiai képe

<https://www.schoolandyouth.org/research/chronic-myeloid-leukemia-cml>

Internet 2: A BCR-ABL1 fúziós gén kialakulása.

<https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/bcr-abl-fusion-gene>

Internet 3: Molekuláris válaszok a BCR-ABL1 fúziós gén mennyiségének.

<https://www.semanticscholar.org/paper/Deep-Molecular-Response-in-Chronic-Myeloid-The-New-Mahon-%C3%89tienne/bb56fa2d7871abfec958a41d931b38a8e289c42f>

Internet 4: Kariotipizálás

<https://itc-old.semmelweis.hu/moodle/mod/page/view.php?id=137557>

Internet 5: A BCR-ABL1 Fluoreszcens In Situ Hibridizációja, nagyított kép.

<https://imagebank.hematology.org/image/63554/zoom-picture-fluorescence-in-situ-hybridisation-fish-of-bcrabl1-fusion>

Internet 6: TaqMan alapú PCR sematikus ábrája.

<http://www.huon.hu/2016/60/2/0088/0088a.pdf>

8. MELLÉKLET

Excel Mester táblázat:



mestertáblázat.xlsx

BOROSS SAROLTA

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom Dr. Bödör Csabának a lehetőségért, a rengeteg tanácsért és segítségért, amit a szakdolgozatomhoz nyújtott.

Köszönöm Dr. Kovács Mónikának a munkámhoz nyújtott segítséget, iránymutatást és rendszeres konzultációkat.

Köszönöm Sándorné Vángor Mónikának, aki a laboratóriumi munkámat segítette, hogy bármikor fordulhattam hozzá a kérdéseimmel és minden mérés alkalmával kedvesen, nyitottan és türelmesen segített nekem.

Köszönettel tartozom a Molekuláris Onkohematológia Laboratórium minden munkatársának az összes segítségért, amit kaptam tőlük, a nyitottságért és kedvességért, amivel fogadtak.

BOROSS SAROLTA

10. NYILATKOZAT

NYILATKOZAT

a szakdolgozat nyilvános hozzáféréséről és eredetiségéről

A hallgató neve: Boross Sarolta
A Hallgató Neptun kódja: HSXEFY
A dolgozat címe: A BCR-ABL1 fúziós transzkriptum vizsgálata real-time PCR-rel krónikus myleoid leukémiában
A megjelenés éve: 2023
A konzulens tanszék neve: Élelmiszer-mikrobiológia, -higiénia és -biztonság Tanszék

Kijelentem, hogy az általam benyújtott záródolgozat/szakdolgozat/diplomadolgozat/portfólió¹ egyéni, eredeti jellegű, saját szellemi alkotásom. Azon részeket, melyeket más szerzők munkájából vettem át, egyértelműen megjelöltem, s az irodalomjegyzékben szerepeltettem.

Ha a fenti nyilatkozattal valótlan állítottam, tudomásul veszem, hogy a Záróvizsga-bizottság a záróvizsgából kizár és a záróvizsgát csak új dolgozat készítése után tehetek.

A leadott dolgozat, mely PDF dokumentum, szerkesztését nem, megtekintését és nyomtatását engedélyezem.

Tudomásul veszem, hogy az általam készített dolgozatra, mint szellemi alkotás felhasználására, hasznosítására a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem mindenkor szellemi tulajdonkezelési szabályzatában megfogalmazottak érvényesek.

Tudomásul veszem, hogy dolgozatom elektronikus változata feltöltésre kerül a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem könyvtári repozitori rendszerébe.

Kelt: 2023 év 04 hó 28 nap



Hallgató aláírása



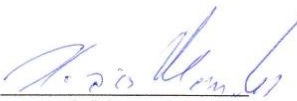
KONZULTÁCIÓS NYILATKOZAT

A Boross Sarolta (név) (hallgató Neptun azonosítója: HSXEFY)
konzulenseként nyilatkozom arról, hogy a
záródolgozat/szakdolgozat/diplomadolgozat/portfólió¹ áttekinttem, a hallgatót az
irodalmi források korrekt kezelésének követelményeiről, jogi és etikai szabályairól
tájékoztattam.

A záródolgozat/szakdolgozat/diplomadolgozat/portfóliót a záróvizsgán történő védelemre
javaslom / nem javaslom².

A dolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz: igen nem^{*3}

Kelt: 2023 év 04 hó 28 nap


Belső konzulens

B