

Magyar Agrár és Élettudományi Egyetem

Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet

Alkalmazott Biotechnológia modul

Biomérnök és Erjedésipari Tanszék

Semmelweis Egyetem, Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet

Boross Sarolta

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

A szakdolgozatom célja a krónikus myeloid leukémiában (CML) szenvedő betegek három havi monitorozásának vizsgálata, nyomon követése és eredményeinek kiértékelése. Ez a BCR-ABL1 fúziós transzkriptum meghatározásával valósult meg. A BCR-ABL1 fúziós gén egy reciprok transzlokációnak köszönhető, amely a 9-es és 22-es kromoszómák között jön létre. A reciprok transzlokáció a Philadelphia-kromoszóma kialakulásáért felelős, amelyen az egymás mellé került BCR és ABL1 génekből keletkezik a BCR-ABL1 fúziós gén. Az ABL1 gén egy tirozinkináz-fehérjét kódol, amely egy egészséges ember esetében a sejtszétválást és a sejtek növekedését serkenti. A kialakult BCR-ABL1 terméke egy olyan kiméra fehérje, amely hatására kontrollálhatatlan szaporodásnak indulnak a sejtek. A tirozinkináz fehérje felelős tehát a CML sejtek növekedéséért és osztódásáért. A CML esetén alkalmazott gyógyszeres terápia a tirozinkináz-gátló (TKI) gyógyszerekre épül. Ezek a típusú gyógyszerek hátráltatják a rosszindulatú sejtek fejlődését, így azok ugyan csak kis számban, de jelen vannak. A TKI kezelést a páciens élete végéig folytatnia kell, azonban a kezelés mellett a CML-es betegek az egészséges populációéval megegyező túlélésre számíthatnak.

A BCR-ABL1 meghatározása perifériás vérből vagy csontvelő mintából történik. A vizsgálat első lépése a mintákból történő RNS izolálás. A kapott RNS-t tisztítani és kvantifikálni kell. Ezután reverz transzkripcióval az RNS-ről cDNS átírás történik. A meglévő cDNS-ből pedig Taqman alapú valós idejű polimeráz láncreakcióval valósul meg a mennyiségi meghatározás. Már egy PCR mérés eredménye is befolyásolni tudja a klinikai döntéshozatalt az adott beteg további terápiája kapcsán. Emiatt szükséges a három havi monitorozás, hogy pontosan nyomon követhető legyen például egy új gyógyszer hatása az adott betegre. Ez lehetővé teszi a célzott terápia meghatározását és értékelését.

A fúziós transzkriptumok mennyiségét egy kontroll génhez, illetve annak mennyiségéhez viszonyítjuk. Ez alapján a kezelés elején (diagnóziskor) a BCR-ABL1 szintje 100%, vagy afölötti érték. A krónikus myeloid leukémia régebben egy halálos betegségnek számított, azonban mára egy könnyen kezelhető daganatos betegség. Célunk egy célzott terápiás kezeléssel, a tirozinkináz-gátlókkal a BCR-ABL1 fúziós gén értéknek a visszaszorítása. A TKI kezelés után a kapott eredményeket bekezelhetjük százalékos érték alapján. Három nagyságrendnyi csökkenést, vagyis 0,1%-ot major molekuláris válasznak (MMR), négy nagyságrendnyi csökkenést, vagyis 0,01%-ot MR4.0-nak, míg 4,5 nagyságrendnyi csökkenést (0,0032%) MR4.5-nek nevezünk. Végül az 5 nagyságrendnyi csökkenést (0,001%) MR5.0-nak nevezünk. Ezt az öt fajta választ nevezzük együttesen mély molekuláris válasznak. Ideális

esetben a beteg a TKI kezelés következtében eléri a mély molekuláris választ. Ha azonban mégsem, gyógyszerváltás szükséges.

Ha egy beteg összes mért adatát látjuk, öt kategóriába lehet sorolni a mért eredményeket (a korábbi vizsgálatokhoz képest): diagnóziskori, csökkenő, növekvő, negatív és válasz nélküli.

A diagnóziskori eredmény a beteg esetében az első mért eredmény, amelynek a betegség feltárásában van jelentős szerepe. A legtöbb esetben ez 100% fölötti érték. A csökkenő tendenciát mutató betegek esetében a mért BCR-ABL1 fúziós génhez tartozó expressziós szint minden vizsgálatnál egyre alacsonyabb. Ideális esetben eléri a mély molekuláris választ. Növekvő eredmények esetén a mért értékek fluktuálnak. Ebben az esetben érdemes egy szekvenálást elvégezni, amely feltárja az esetleges gyógyszerrezisztanciát. Ebben az esetben, ha rezisztens az aktuális gyógyszerre a beteg, a kezelőorvos terápiaváltást eszközöl. Negatív eredménynél ideálisnak mondható a betegség lefutása. Ebben az esetben a kezelőorvos terápiamentes remissziót (TFR) javasolhat, vagyis elhagyja ideiglenesen a szedett gyógyszert. Az utolsó kategória a válasz nélküli, amikor a terápiára nem válaszol a beteg szervezete, ezáltal a BCR-ABL1 fúziós gén expressziós szintje sem változik jelentősen. Ebben az esetben nincsen major molekuláris válasz, és általában a mérési eredmények a kiindulási érték körül mozog.

Összesen 132 beteg mintáját vizsgáltam, amelyből 104 esetben lett mély molekuláris válasz. Visszamenőlegesen elkértem 5 páciens összes eddigi mért eredményét, amelyből látni lehet a gyógyszeres kezelés hatását, illetve a mért eredmények be kategorizálását tette lehetővé.