

Transzportfehérjék genetikai polimorfizmusainak szerepe akut limfoid leukémiában és más betegségekben; farmakogenetikai vizsgálatok

Doktori tézisek

Félné Semsei Ágnes

Semmelweis Egyetem
Molekuláris orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Szalai Csaba, DSc

Hivatalos bírálók: Dr. Laczka Csilla
Dr. Szelid Zsolt

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Sasvári Mária
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Kralovánszki Judit
Dr. Rónai Zsolt

Budapest
2011

Bevezetés

Az akut limfoid leukémia (ALL) a leggyakoribb gyermekkori hematológiai betegség Magyarországon. Kialakulásának okai még nem teljesen ismertek, de az biztos, hogy környezeti és genetika tényezők egyaránt hozzájárulnak a betegség kialakulásához. Több génről leírták már, hogy befolyásolhatja a betegség megjelenését. Az ABC-transzportereknek (ABC: adenosine triphosphate binding cassette, azaz ATP kötő kazetta) fontos funkciójuk van az emlős szövetek xenobiotikumok elleni védekezésében, ezért feltételezhető, hogy genetikai okokra visszavezethető hibás működésük, megváltozott expressziójuk hozzájárulhat az ALL kialakulásához. Az ALL rizikójának jobb megértéséhez olyan genetikai változatokat tanulmányoztunk, amelyek módosítják az *ABCB1* és *ABCG2* ABC-transzporterek működését. Ezek az *ABCB1* génben a 3435C>T (rs1045642, szinonim) és 2677 G>T/A (rs2032582, Ala893Ser), ill. az *ABCG2* génben a 34G>A (rs2231137, Val12Met) és 421C>A (rs2231142, Gln141Lys) egy pontos nukleotid polimorfizmusok, azaz SNP-k (single nucleotid polymorphism). Az *ABCB1* 3435C>T egy ritka kodont határoz meg, ami miatt az mRNS-ek foldingja eltérő és csökken a fehérje szintje. A 2677 G>T/A SNP-nél csökkent transzporter-aktivitást írtak le. Az *ABCG2* 34G>A polimorfizmus esetén az transzporter apikális membránba való beágyazódása károsodott, az *ABCG2* 421C>A SNP miatt a fehérje ATP-áz aktivitása csökkent.

Az ALL kialakulásában közrejátszhatnak olyan genomrégiók, melyeknek a betegség megjelenésében betöltött szerepét még nem ismerjük. Ennek feltérképezésében használják a genom szintű asszociációs vizsgálatokat (GWAS: genome-wide association study). Az itt kapott eredményeket több független populáción meg kell ismételni a megerősítéséhez. Egy angliai munkacsoport által végzett GWAS alapján a *CDKN2A* (ciklin-dependens kináz inhibitor 2A) gén első intronjában található rs3731217 befolyásolja az ALL kialakulását. Az eredmény megerősítéséhez nagyobb populáción is vizsgálták ezt az összefüggést, amiben a magyar ALL-es betegcsoport is szerepelt.

Napjainkban az akut limfoid leukémiában megbetegedett gyermekek túlnyomó többsége, 80-90%-a meggyógyul, azonban a hosszú távú túlélés ALL után nem jelenti azt, hogy az egykori beteg teljesen egészséges. A túlélők körülbelül 40%-ánál jelentkezik valamilyen egészségügyi probléma a diagnózis után 30 éven belül. A betegek gyakran a késői szövődmények, többek között szívproblémák miatt halnak meg. A gyermekkori rák túlélői között 8-szoros gyakoriságú a szívproblémák miatti halálozás. A károsodás megelőzése különösen fontos a gyermekekben, mert ők a kezelés után még évtizedekig élhetnek. Az eltérő szív működés minél korábbi felismerése szükséges a károsító terápia felfüggesztéséhez és a korai kezelés elkezdéséhez. Ezért fontos a betegek állandó monitorozása a subklinikus, azaz diagnosztikus eljárással kimutatható, de klinikai tüneteket nem mutató elváltozások felismerése érdekében. Genetikai eltérések, például SNP-k megváltoztathatják a xenobiotikum-metabolizáló enzimek, xenobiotikum-transzporterek vagy gyógyszer-célpontok expresszióját, működését. A farmakogenetikai kutatások célja a terápia személyre szabása a gyógyszerek vagy a gyógyszeradagok genetikai háttér alapján történő egyéni megválasztásával annak érdekében, hogy a kezelés hatékonyságát és biztonságosságát növeljék. A gyermekkori ALL kezelésében használt egyik gyógyszer-csoport az antraciklinek. Ezek a leghatékonyabb rák ellenes szerek közé tartoznak, viszont alkalmazásukat korlátozza, hogy a szívizomsejteket nagymértékben károsítják vélhetően reaktív oxigén gyökök képzése révén. A plazmamembránon való átjutásuk passzív diffúzióval, eliminációjuk az ABC-transzporterek segítségével történik, ezért a sejten belüli antraciklin szint fő meghatározója az ABC-transzporterek működése. Az ABCC1 transzporter részt vesz az antraciklinek transzportjában és oxidatív stressz esetén is fontos védelmi feladatot tölt be. A genetikai polimorfizmusai miatt megváltozott fehérjeműködés befolyásolhatja az antraciklinek hatására kialakuló oxidatív stressz elleni hatékony választ és kardiomiociták megfelelő védelmét.

Célkitűzés

Munkám során az alábbi céljaim voltak:

- A szervezet xenobiotikumok elleni védekezésében szerepet játszó *ABCB1* és *ABCG2* ABC-transzporter gének funkcionális polimorfizmusait vizsgálni az akut limfoid leukémia kialakulásában. Összehasonlítani az *ABCB1* génben a 3435C>T, 2677G>T,A és az *ABCG2* génben a 34G>A és 421C>A polimorfizmusok allél-, haplotípus frekvenciáit és genotípus kombinációit a beteg és egészséges kontroll populációkban. Vizsgálni a polimorfizmusok hatását a betegség jellemzőire és kimenetelére.
- Egy nemzetközi együttműködés (IALLGC: International childhood Acute Lymphoblastic Leukaemia Genetics Consortium) keretében vizsgálni ALL rizikóját. A gyermekkori ALL-t megfelelő méretű mintapopuláción tanulmányozni és egy korábbi GWAS eredményét ellenőrizni. Elvégezni a betegpopulációnkon az *CDKN2A* (ciklin-dependens kináz inhibitor 2A) gén rs3731217 polimorfizmusának genotipizálását és hozzájárulni az eredmény hitelességének megerősítéséhez.
- Az ALL gyógyításában nagyon hatékonyan alkalmazott antraciklinek mellékhatásként fellépő kardiotoxicitás kialakulásának genetikai hátterét vizsgálni. A szívfunkciót a lineáris ejekciós frakcióval jellemezni, amit a kezelés során rendszeresen végzett szívultrahangos mérésből számoltunk. A szívfunkció és az antraciklineket a kardiomiocitákból kiszállító *ABCC1* ABC-transzporter polimorfizmusai közötti összefüggést keresni. A lineáris ejekciós frakció csökkenése és az *ABCC1* gén 9 db egy pontos nukleotid polimorfizmusának előfordulása közötti összefüggést vizsgálni.

Módszerek

Betegpopulációnk a 1990 és 2002 között diagnosztizált magyarországi akut limfoid leukémiás gyermekekből állt, akiket az ALL Berlin-Frankfurt-Münster (BFM) 90 és 95-ös protokollokkal kezeltek. A rendelkezésre álló DNS minta és klinikai adatbankból az összes meglevő adatot elemeztük az egyes vizsgálatok során. Kontrollként a egészséges véradóktól nyert DNS mintát használtunk.

Az *ABCB1* és *ABCG2* gének ALL kialakulására való hajlamosító szerepét 396 beteg és 192 kontroll főből álló populáción vizsgáltuk. A szakirodalom alapján választottuk ki a vizsgálandó polimorfizmusokat. Az *ABCB1* 3435C>T és 2677 G>T/A polimorfizmusok genotipizálása multiplex miniszekvenálással történt SNaPSHOT módszerrel. Az *ABCG2* gén 34G>A és 421C>A polimorfizmusait LightCycler PCR módszerrel genotipizáltuk. A haplotípusokat és ezek frekvenciáját a Haploview 4.1 szoftverrel becsültük meg. Az adatok statisztikai kiértékelését χ^2 -teszttel ill. logisztikus regresszióval végeztük.

A nemzetközi együttműködéshez 550 beteg és 450 kontroll egyén genotipizálását végeztük el KasParTM technikával. Az IALLGC konzorciumban egy korábbi genom szintű asszociációs vizsgálat adatait elemezték újra. Az eredményül kapott ALL-re való hajlamot befolyásoló *CDKN2A* rs3731217 SNP-t genotipizáltuk a munka során. Az adatokat χ^2 -teszttel és logisztikus regresszióval elemeztük.

Az antraciklinek kardiotoxikus hatásának vizsgálatához a betegek kórlapjaiból retrospektíven gyűjtött adatokat elemeztük. A szívultrahangos mérésekből lineáris ejekciós frakciót számoltunk. Összesen 235 beteg lineáris ejekciós frakció adata állt rendelkezésre. Az *ABCCI* gén minden haplotípus blokkjából 1-2 polimorfizmust választottunk. A kiválasztott 9 *ABCCI* SNP-t SNPstream módszerrel genotipizáluk. A adatok statisztikai kiértékeléséhez többszörösen illesztett GLM-t (general linear model) használtunk.

Eredmények

Az *ABCB1* 3435C>T és 2677 G>T/A és az *ABCG2* 34G>A és 421C>A polimorfizmusok szerepét vizsgáltuk a gyermekkori ALL kialakulásában. A beteg és kontroll csoport között nem volt szignifikáns különbség az allélgyakoriságban és a genotípus megoszlásában. A becsült haplotípus frekvenciákat összehasonlítva azt kaptuk, hogy nincs szignifikáns különbség a két gyakori *ABCB1* haplotípus (TT és GC) frekvenciájában, viszont a ritka GT haplotípus gyakoribb a betegekben a kontrollokhoz képest: 9,4% vs. 3,9%, $p=0,002$; $OR=2,5$ (CI 95%: 1,4–4,4). A TC haplotípus a kontrollokban gyakoribb (6,7%), mint a betegekben (3,0%), $p=0,006$; $OR=0,4$ (CI 95%: 0,2–0,8). Az *ABCG2* gén által alkotott haplotípusok megoszlása megegyezett a két csoportban.

Az *ABCB1* gén 2667 és 3435 pozíciók által meghatározott 2677GT/3435TT és 2677GG/3435CT genotípus kombinációja gyakrabban fordult elő az ALL-esek között. A gyakoriságok betegekben 8,7%, a kontrollokban 3,2% ($p=0,02$; $OR=2,88$ (1,19–7,11)) ill. 7,4% a betegekben és 2,7% a kontrollokban ($p=0,04$; $OR=2,97$ (1,12–7,77)). A 2677TT/3435CT genotípuskombináció a kontrollokban volt gyakoribb (7,9%), mint a betegekben (2,1%) ($p=0,002$; $OR=0,26$ (0,11–0,61)). Az *ABCG2* gén által meghatározott genotípuskombinációk gyakorisága nem tért el a beteg és a kontroll csoportban.

Vizsgáltuk továbbá, hogy az allélok, haplotípusok és a genotípus kombinációk befolyásolják-e az ALL klinikai jellemzőit. Egyik genetikai variáns sem befolyásolta a betegek diagnóziskori életkorát, nemét, immunfenotípusát, a hiperdiploiditást, a beteg rizikócsoportját, a relapszust vagy a leukémia miatti halált.

Nemzetközi együttműködés keretében egy angliai kutatócsoport genomszűréssel, kaukázusi populációkon kapott eredményét nagyobb populáción validálta, amiben a magyar gyermekkori akut limfoid leukémiás betegpopuláció is szerepelt. Újraelemezték egy korábban 907 betegen és 2398 kontrollon 291371 SNP genotipizálásával elvégzett genom szintű asszociációs tanulmány genotipizálási adatait. Összesen 34 statisztikailag szignifikáns ($p < 0,0001$) SNP-t genotipizáltak nagyobb, 1428 ALL-es betegből és 1516 kontrollból álló független német populáción, ahol egy SNP (rs3731217) maradt szignifikáns ($p = 1,15 \times 10^{-7}$). Ez a polimorfizmus a 9p21.3 kromoszómarégióban található, a *CDKN2A* (ciklindependens kináz inhibitor 2A) gén első intronjában.

A kapott eredményt megerősítették spanyol (148 beteg és 187 kontroll) magyar (550 beteg és 450 kontroll) és kanadai (260 beteg és 266 kontroll) populáción is. A magyar populáció a minta-, és adatbankunk része, a genotipizálást a csoportunk végezte, ezért dolgozatomban ezt az eredményt is ismertetem.

Eredményeink alapján a magyar populáción elemezve a *CDKN2A* rs373121G allél nem védett ALL-lel szemben: OR=0,83 (95% CI: 0,58–1,17, $p=0,1$). Az ALL B-, és T-sejtes csoportját külön elemezve a B-sejtes ALL-esetében a magyar populáció eredményei nem bizonyultak szignifikánsnak: OR=0,91 (95% CI: 0,68–1,22, $p=0,5$). T-sejtes ALL esetében csak a magyar populációt elemezve a G allél szignifikánsan befolyásolta az ALL rizikóját: OR=0,60 (95% CI: 0,38–0,93, $p=0,046$).

Az összes vizsgált populáció genotípus adatainak együttes elemzésével kapott eredmény alapján a G allél szignifikánsan befolyásolja az ALL kialakulásának kockázatát (OR=0,71, 95% CI: 0,64–0,78, $p=3,1 \times 10^{-11}$). A csak B-sejtes ill. T-sejtes ALL-eseknél az összes populáció adatai alapján kapott eredmény szintén az allél rizikó befolyásoló hatását mutatja: OR=0,72, 95% CI 0,64–0,80, $p=5,29 \times 10^{-10}$ ill. OR=0,68, 95% CI 0,58–0,79, $p=1,88 \times 10^{-7}$.

Az antraciklinek kardiotoxicitásának genetikai hátterének jobb megértéséhez vizsgáltuk, hogy az ALL-es gyermekekben az antraciklinekkel történő kezelés után az *ABCCI* gén kilenc polimorfizmusa befolyásolta-e a szív funkcióját. A szív működését a bal kamrai lineáris ejekciós frakcióval (linEF) jellemeztük, amit a diagnózis, a záróvizsgálat és az utolsó szívvultrahangos mérés időpontjában elemeztünk.

A diagnózis időpontjában mért szívvultrahangos adatok alapján számolt linEF értékek nem tértek el a három genotípus csoportban egyik polimorfizmus esetén sem. A kemoterápia után az rs3743527TT genotípusú betegek záróvizsgálatkor mért linEF értéke szignifikánsan alacsonyabb volt (34,0%), mint a CC (39,5%) és CT (39,3 %) genotípusú betegeké ($p=0,001$). Hasonló tendenciát figyeltünk meg az utolsó szívvultrahang mérés alapján számolt linEF értékeknél. Az rs3743527TT genotípusú betegek utolsó linEF értéke 35,3%, a heterozigótáké 38,9% a CC homozigótáké 38,7% volt. Összefüggött az *ABCCI* rs246221 T allél jelenléte és a diagnózis utáni utolsó szívvultrahangos mérés eredménye is. A TC és TT genotípusú betegeknek alacsonyabb volt a linEF értéke (38,4% ill. 38,5%), mint a CC genotípusúaknak (40,7%, $p=0,027$).

A két szignifikánsnak kapott SNP által meghatározott genotípusok kombinációinak a hatását is vizsgáltuk. Összehasonlítottuk az rs3743527TT és rs246221TC vagy rs246221TT genotípusú egyének (TT-TC/TT) linEF értékét az összes többi genotípuskombinációjú betegével. A diagnózis idején meghatározott linEF azonos volt a két csoportban. A záróvizsgálatkor azonban a TT-TC/TT genotípus kombinációjú gyermekeknek sokkal alacsonyabb volt a linEF értéke (34,0%), mint a többi betegnek (39,4%) ($p=0,001$).

A többváltozós elemzésbe kofaktorként bevett klinikai változók közül a diagnóziskori életkor, a kezelő kórház és a kemoterápiás protokoll szignifikáns kofaktornak bizonyult. Ezzel szemben a nem, össz antraciklin dózis és a dexrazoxán használat nem volt szignifikáns. A két leírt összefüggés esetében a polimorfizmusok hatásánál nem volt nagyobb a szignifikáns kofaktorok hatása.

Következtetések

Az *ABCB1* és *ABCG2* gének vizsgált polimorfizmusai és ezek leggyakoribb haplotípusai nem befolyásolták a gyermekkori akut limfoid leukémia kialakulását a vizsgált populáción. Az *ABCB1* gén ritka GT haplotípusa megnövekedett, a TC haplotípusa csökkent ALL rizikóval járt együtt. Az *ABCB1* génben található két SNP genotípusai által alkotott ritka genotípus kombinációk közül a GT/TT és GG/CT (2677G>T/A-3435C>T) ALL-esekben, a TT/CT kontrollokban gyakoribb. Ez alapján valószínűsíthető, hogy a xenobiotikumok elleni védekezésben fontos *ABCB1* polimorfizmusai kombinációban befolyásolják az ALL kialakulását.

A nemzetközi együttműködés keretében vizsgált *CDKN2A* rs3731217 polimorfizmus a mi populációnkon nem hajlamosított ALL-re, sem B-sejtes ALL-re. Viszont a T-sejtes ALL kialakulását az rs3731217 G allél statisztikailag szignifikánsan befolyásolta. Az vizsgálatba összesen bevont hat populáció adatai alapján ez a polimorfizmus befolyásolja az ALL kialakulását mind együtt nézve a betegeket mind az alpopulációkat (B- és T-sejtes ALL) külön elemezve is. Ez alapján a *CDKN2A* gén polimorfizmusa befolyásolhatja az ALL kialakulását.

Az antraciklinek kardiotoxikus hatását jellemző bal kamrai lineáris ejekciós frakció (linEF) csökkenése és az *ABCC1* gén polimorfizmusai között összefüggést kaptunk. Az *ABCC1* rs3743527TT genotípusú betegek záróvizsgálatkori szívultrahang alapján meghatározott lineáris ejekciós frakciója szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a CC és CT genotípusú betegeké. Az *ABCC1* rs246221 T allél jelenléte esetén az utolsó szívultrahangos mérés időpontjában a betegeknek alacsonyabb volt a linEF értéke, mint a CC genotípusúaknak. Az rs3743527 és rs246221 SNPk által meghatározott genotípus kombinációk közül az rs3743527TT -rs246221TC/TT-vel rendelkező betegek linEF értéke alacsonyabb volt a záróvizsgálatkor, mint a többi betegnek. Az *ABCC1* variánsai befolyásolhatják a szervezet antraciklinek ellen védekezését és a szívfunkció csökkenését okozhatják.

Saját publikációk jegyzéke

Értekezésben összefoglalt saját közlemények:

Semsei AF, Erdélyi DJ, Ungvári I, Kámory E, Csókay B, Andrikovics H, Tordai A, Cságoly E, Falus A, Kovács GT, Szalai C., Association of some rare haplotypes and genotype combinations in the MDR1 gene with childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Leuk Res.* 2008 Aug;32(8):1214-20. IF: 2,390

Sherborne AL, Hosking FJ, Prasad RB, Kumar R, Koehler R, Vijaykrishnan J, Papaemmanuil E, Bartram CR, Stanulla M, Schrappe M, Gast A, Dobbins SE, Ma Y, Sheridan E, Taylor M, Kinsey SE, Lightfoot T, Roman E, Irving JA, Allan JM, Moorman AV, Harrison CJ, Tomlinson IP, Richards S, Zimmermann M, Szalai C, **Semsei AF**, Erdelyi DJ, Krajinovic M, Sinnett D, Healy J, Gonzalez Neira A, Kawamata N, Ogawa S, Koeffler HP, Hemminki K, Greaves M, Houlston RS. Variation in CDKN2A at 9p21.3 influences childhood acute lymphoblastic leukemia risk., *Nat Genet.* 2010 Jun;42(6):492-4. IF: 36,377

Semsei AF, Erdelyi DJ, Ungvari I, Csagoly E, Hegyi MZ, Kizsel PS, Lautner-Csorba O, Szaboles J, Masat P, Fekete G, Falus A, Szalai C, Kovacs GT. ABCC1 polymorphisms in anthracycline induced cardiotoxicity in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cell Biol Int.* 2011 Sep 20. [Epub ahead of print] IF (2010): 1,747

Értekezés témájában megjelent egyéb közlemények:

Erdélyi DJ, Kámory E, Zalka A, **Semsei AF**, Csókay B, Andrikovics H, Tordai A, Borgulya G, Magyarosy E, Galántai I, Fekete G, Falus A, Szalai C, Kovács GT., The role of ABC-transporter gene polymorphisms in chemotherapy induced immunosuppression, a retrospective study in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Cell Immunol.* 2006 Dec;244(2):121-4 IF:1,709

Erdélyi DJ, Kámory E, Csókay B, Andrikovics H, Tordai A, Kiss C, **Félné-Semsei A**, Janszky I, Zalka A, Fekete G, Falus A, Kovács GT, Szalai C. Synergistic interaction of ABCB1 and ABCG2 polymorphisms predicts the prevalence of toxic encephalopathy during anticancer chemotherapy. *Pharmacogenomics J.* 2008 Oct;8(5):321-7. IF: 5,435

Semsei AF, Antal P, Szalai C., Strengths and weaknesses of gene association studies in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res.* 2010 Mar;34(3):269-71. IF: 2,555

Sherborne AL, Hemminki K, Kumar R, Bartram CR, Stanulla M, Schrappe M, Petridou E, **Semsei AF**, Szalai C, Sinnott D, Krajcinovic M, Healy J, Lanciotti M, Dufour C, Indaco S, El-Ghouroury EA, Sawangpanich R, Hongeng S, Pakakasama S, Gonzalez Neira A, Leal Ugarte E, Peralta Leal V, Meza Espinoza JP, Kamel AM, Radwan ER, Ebid GT, Yalin S, Yalin E, Berkoz M, Simpson J, Roman E, Lightfoot T, Hosking FJ, Vijayakrishnan J, Greaves M, Houlston R. Rationale for an international consortium to study inherited genetic susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica.* 2011 Jul;96(7):1049-54., IF: 6,532

Egyéb témában megjelent közlemények:

Ungvári I, Tölgyesi G, **Semsei AF**, Nagy A, Radosits K, Keszei M, Kozma GT, Falus A, Szalai C. CCR5 Delta 32 mutation, *Mycoplasma pneumoniae* infection, and asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2007 Jun;119(6):1545-7 IF: 8,115

Tölgyesi G, Molnár V, **Semsei AF**, Kizsel P, Ungvári I, Pócza P, Wiener Z, Komlósi ZI, Kunos L, Gálffy G, Losonczy G, Seres I, Falus A, Szalai C. Gene expression profiling of experimental asthma reveals a possible role of paraoxonase-1 in the disease. *Int Immunol.* 2009 Aug;21(8):967-75. IF: 3,403

Aladzsity I, Kovács M, **Semsei A**, Falus A, Szilágyi A, Karádi I, Varga G, Füst G, Várkonyi J. Comparative analysis of IL6 promoter and receptor polymorphisms in myelodysplasia and multiple myeloma. *Leuk Res.* 2009 Nov;33(11):1570-3. IF: 2,358

Srivastava SK, Antal P, Gál J, Hullám G, **Semsei AF**, Nagy G, Falus A, Buzás EI., Lack of evidence for association of two functional SNPs of CHI3L1 gene (HCGp39) with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int.* 2011 Aug;31(8):1003-7., IF (2010): 1,431

Hegyi M, **Semsei AF**, Jakab Z, Antal I, Kiss J, Szendroi M, Csoka M, Kovacs G. Good prognosis of localized osteosarcoma in young patients treated with limb-salvage surgery and chemotherapy. *Pediatr Blood Cancer.* 2011 Sep;57(3):415-22. IF (2010): 1,948