

XXXII. OTDK
BIOLÓGIA SEKCIÓ

**MEMBRÁN-TRANSPORTEREK GENETIKAI
VARIÁNSAINAK VIZSGÁLATA VÉRKÉPZŐ
SZERVRENDSZERI MEGBETEGEDÉSEKBEN**

OTDK-dolgozat

Készítette: Papp Rita

SZIE-ÁOTK, biológus szak, MSc II. évfolyam

Szent István Egyetem

Témavezető: Dr. Andrikovics Hajnalka

OVSZ, labor szakorvos

Belső konzulens: Szabó Krisztián

SZIE-ÁOTK, biológus

Budapest

2015

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK	2
1. BEVEZETÉS.....	3
1.1 ABC-TRANSPORTEREK – IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	3
1.2 AKUT MYELOID LEUKÉMIA – IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	7
2. CÉLKITŰZÉS	9
3. ANYAG ÉS MÓDSZER.....	10
3.1 VIZSGÁLT EGYÉNEK.....	10
3.2 DNS-KIVONÁS.....	10
3.3 LIGHTCYCLER OLVADÁSI GÖRBE ANALÍZIS	11
3.4 STATISZTIKAI ANALÍZIS	14
4. EREDMÉNYEK	15
5. DISZKUSSZIÓ	21
6. ÖSSZEFOGLALÓ.....	24
7. SUMMARY	25
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	26
IRODALOMJEGYZÉK	27

1. BEVEZETÉS

1.1 ABC-transzporterek – irodalmi áttekintés

Az ABC-transzporterek (ATP-binding cassette transporters) egy nagy fehérjecsaládot alkotnak, melyek tagjai minden fajban megtalálhatóak, a protozoáktól kezdve a halakon át egészen az emlősökig (Sarkadi et al., 2006). A humán genomban összesen negyvennyolc ilyen fehérjét kódoló gén található (egyes adatbázisok szerint negyvenkilenc). Ezeket szekvenciájuk hasonlósága és felépítésük alapján hét alcsoportba sorolták be ABCA-tól ABCG-ig, majd ezeken belül számokkal jelölték a különböző transzportereket. Közös szerkezeti tulajdonságuk elsősorban az ATP-kötő vagy más néven nukleotid-kötő domén, melynek segítségével képesek az adenosin-trifoszfátot megkötni és hidrolizálni, majd ennek segítségével a fehérjét működtetni. A másik két jellegzetességük a transzmembrán domén, mely általában hat membránon áterő hélixből áll, illetve a katalitikus centrummal ezt összekötő és a köztük lévő kommunikációt biztosító intracelluláris domén (Reyes & Chang, 2005). A működőképes ABC-transzporterek általában két homológ félből állnak, melyekben megtalálható egy-egy a fent említett szerkezeti egységekből. Vannak olyan transzporterek azonban, mint az ABCG2 is, hogy a génen csak egy transzmembrán, egy ATP-kötő és egy intracelluláris domén kódolódik, ezeket nevezzük féltranszportereknek. Funkció képes formájukat homo- vagy heterodimerizációval hozzák létre (Sarkadi et al., 2004). A heterodimerizáció folyamatát az ABCG5 és ABCG8 esetében figyelték meg, melyek obligát módon képeznek heterodimert. A membránban már ilyen formában találhatóak meg és a növényi szterolok transzportjára így képesek (Graf et al., 2003).

A család tagjai között találhatunk transzport fehérjéket (pl.: ABCB1, ABCG2), ioncsatornákat (pl.: ABCC7) és regulátor fehérjéket (pl.: ABCF1) (Sarkadi et al., 2006). A transzport fehérjék főfeladata, hogy szubsztrátjaikat be vagy éppenséggel ki juttassák a sejtéből ATP hidrolízis segítségével. Az egészséges sejtekben megkönnyítik különböző anyagok szállítását. A fiziológias szubsztrátok pumpálása mellett részt vehetnek különböző gyógyszerek felszívódásában (adszorpció), szervezetben történő eloszlásában (disztribúció), metabolizmusában, kiválasztásában (exkrécia), ezáltal befolyásolják a szubsztrát gyógyszerek hatását, mellékhatását és toxicitását (ADME-Tox) (Sarkadi et al., 2006). Az ABC-transzporterek megjelennek a rákos sejtek felszínén is, ahol képesek egyszerre több, a daganatos betegségek kezelésében használt kemoterápiás gyógyszerek kipumpálására, ezért felelősek a kemoterápia során fellépő multidrog rezisztencia kialakításáért (Gottesman et al., 2002). A multidrog transzporterek három fő csoportját ismerjük: az ABCB1 [más néven P-glycoprotein

(P-gp), multidrug resistance protein 1 (MDR1)], az ABCC1-10 [multidrug resistance-associated protein (MRP)] és az ABCG2 [breast cancer resistance protein (BCRP), mitoxantrone resistance-associated protein (MXR)]. Ezek közül az ABCB1 és az ABCG2 génekkel foglalkoztunk a dolgozat keretein belül.

Az ABCB1 transzporter a sejtől nagy hidrofób molekulák kipumpálására képes, mint például egyes kemoterápiás szerek, HIV (Human Immunodeficiency Virus) proteáz-inhibitorok, antibiotikumok, antidepresszánsok és altatók (Sarkadi et al., 2006) (1. táblázat).

Szubsztrátok	Legfontosabb példák
Kemoterápiás gyógyszerek	etopozid, daunorubicin, vinblasztin
Fluoreszcens festékek	calcein-AM
HIV proteáz-inhibitorok	indinavir, nelfinavir
Antibiotikumok	eritromicin, sparfloxacin
Egyéb gyógyszerek	cimetidin, morfin, loperamid

1. táblázat Az ABCB1-transzporter szubsztrátjai (Ieiri, 2012; Sharom, 2008).

Az ABCB1 fehérje a testben a fő határvonalak mentén expresszálódik: a vesében, a májban, a vér-agy gátban, a herében, a placentában és az összejteken. A toxikus anyagok kipumpálásán kívül képes a rákos sejtek kaszpáz-függő apoptózisának gátlására is (Johnstone et al., 2000). A két leggyakoribb SNP-je (single nucleotid polymorphism) a fehérjének a G2677T/A (c.2677G>T/A), mely egy alanin-szerin vagy treonin aminosav cserét eredményez a fehérjén a 893. kodonban; és az aminosav cserével nem járó C3435T (c.3435C>T, Ile1145Ile). A G2677T/A TT genotípusa gyakori a kaukázusi populációban és magasabb kockázatot mutattak ki akut limfoid leukémia (ALL) kialakulására a TT homozigóta egyedeknél (Ho et al., 2008; Wang et al., 2013). Az aminosav cserét nem eredményező C3435T polimorfizmus funkcionális hatásával kapcsolatban egymásnak ellentmondó információk olvashatóak. Egyes vizsgálatok során nem találtak különbséget a fehérje expresszióban és aktivitásban (Jamrozik et al., 2006). Az egyik tanulmányban azonban a TT genotípusnak magasabb volt a fehérje expressziója és az aktivitása, mint a CC genotípusnak (Hoffmeyer et al., 2000), egy másikban pedig pont ennek ellenkezőjét sikerült kimutatni (Kim et al., 2006). Kimchi-Sarfaty és munkatársai (2008) megváltozott fehérje funkciót és szubsztrátokkal való interakciót mutattak ki, állandó mRNS és fehérje expressziót mellett. A vizsgálat során kiderült, hogy hogyan lehetséges, hogy egy aminosav cserével nem járó polimorfizmus képes befolyásolni a fehérje aktivitását. A citozin-timin bázis csere egy ritka kodon használatot eredményezett, mely

következtében a fehérje transzlációja lelassult, így megváltozott a harmadlagos szerkezete és a membránba történő beékelődése is (Kimchi-Sarfaty et al., 2007).

Az ABCG2 egy féltranszporter, így csak homodimer formában képes aktívvá válni. Az aktiváció után olyan szubsztrátokat pumpál ki a sejtől, mint a kemoterápiás szerek, fluoreszcens festékek, antivirális szerek, antibiotikumok, koleszterin, cimetidin, folsav és az urát (Sarkadi et al., 2006) (2. táblázat).

Szubsztrátok	Legfontosabb példák
Fiziológiás szubsztrátok	koleszterin, urát, ösztrogén
Kemoterápiás gyógyszerek	daunorubicin, mitoxantron, etopozid
Fluoreszcens festékek	Hoechst 33342, BODIPY-prazosin
Antivirális szerek	zidovudin, lamivudin
Antibiotikumok	ciprofloxacín, norfloxacín
Egyéb gyógyszerek	cimetidin, pravastatin

2. táblázat Az ABCG2-transzporter szubsztrátjai (Ieiri, 2012; Sharom, 2008).

A szervezetben fontos barrierék mentén expresszálódik: a májban, a placentában, a vér-agy gátban és különféle őssejteken. A hematopoietikus őssejteken is megtalálható, ahol feltételezhetően a sejtek védelmében játszik szerepet a toxikus anyagok kipumpálásával, valamint olyan fiziológiás szubsztrátok transzportjával, mint a szteroidok részt vesz a sejtciklus szabályozásában is (Sarkadi et al., 2004). Alacsony oxigén tartalmú környezetben megnő az ABCG2 expresszió, hogy megóvja a sejteket a protoporfirin akkumulációjától. Transzporter alulműködés/működésképtelenség esetén porfirin toxicitás következhet be hipoxiás környezetben (Krishnamurthy et al., 2006). Az ABCG2 kódoló régiójában található két gyakran vizsgált SNP megváltoztatja egy-egy aminosavját a fehérjének. A G34A (c.34G>A) a 12. kodon valin-metionin, a C421A (c.421C>A) pedig a 141. kodon glutamin-lizin cseréjét eredményezi. Korábbi kutatások során a G34A csökkent transzport kapacitást eredményezett a fehérje normálistól eltérő membrán elhelyezkedésével, valamint más kutatásban a fehérje csökkent expresszióját mutatták ki (Imai et al., 2002; Mizuarai et al., 2004). A C421A esetében csökkent ATPáz aktivitást, a fehérje csökkent expresszióját és transzport aktivitását mutatták ki in vitro (Morisaki et al., 2005). Egyes kemoterápiás szerek esetén a fehérje alacsonyabb transzport kapacitását figyelték meg (Sparreboom et al., 2004), illetve csökkent sejt felszíni expressziót in vivo (vörösvérsejt membránon) (Kasza et al., 2012).

Mivel a transzporterek megjelennek az őssejteken, beleértve a haematopoietikus őssejteken is, ahol a feltételezett fiziológiai szerepük a védelem különböző exogén

xenobiotikumokkal szemben az élet során, ezért felmerült, hogy polimorfizmusaik szerepet játszhatnak eltérő rákos megbetegedésekre (így a leukémiára) való hajlam öröklődésében is. Az ABCB1 és ABCG2 fehérjék polimorfizmusait kapcsolatba hozták már különböző rákos megbetegedések magasabb kialakulásának kockázatával, mint például a mellrák, veserák vagy leukémia (Chen et al., 2012; Qian et al., 2012; Wang et al., 2012). A leukémia és a transzporterek kapcsolatát többen vizsgálták, ezek eredményeit metaanalízisek szerzői próbálták összegezni. Az ABCB1 3435T hordozók esetében magasabb krónikus limfoid leukémia (CLL) (Qian et al., 2012), a 2677T/A allélt hordozókkal kapcsolatban pedig magasabb akut limfoid leukémia (ALL) kockázatot írtak le (Wang et al., 2013). Az ABCG2 esetében azt találták, hogy a 421A allélt hordozók védettebbek voltak a rák kialakulása ellen (Chen et al., 2012). Akut myeloid leukémia esetében általában kétszáz alatti esetszámmal dolgoztak és nem találtak különbséget a beteg és nem betegcsoportok között az ABCB1 allél és haplotípus frekvenciáinak vizsgálatakor (Jamroziak et al., 2006; Monzo et al., 2006; Rund et al., 2005). Egy nagyobb volumenű kutatásban azonban arra a következtetésre jutottak a szerzők, hogy a 2677TT és 3435TT genotípus növelheti az AML-re való hajlamot (Illmer et al., 2002). Az ABCG2 C421A variáns nem befolyásolta a betegség kialakulását (Müller et al., 2008).

A daganatos megbetegedésekre való hajlamosítás mellett az ABC-transzporterek befolyásolhatják a kezelések során alkalmazott kemoterápiás szerek farmakokinetikáját (ADME-Tox), így áttételesen hatással lehetnek a kezelés kimenetelére. Az akut myeloid leukémiás sejtek emelkedett ABCB1 fehérje expressziója vagy aktivitása összefüggést mutatott az AML csökkent gyógyulási arányával, a rövidebb betegség-mentes és teljes túléléssel (Benderra et al., 2005; Damiani et al., 2006; Ho et al., 2008). Több vizsgálat nem talált összefüggést az ABCB1 polimorfizmusai és a kezelés kimenetele között (Hur et al., 2008; van der Holt et al., 2006). Más tanulmányokban azonban a 2677GG és 3435CC genotípusok csökkentették a túlélés valószínűségét (Gréen et al., 2012; Illmer et al., 2002). A magas ABCG2 fehérje vagy mRNS expresszió rossz prognosztikai faktornak bizonyult, ami befolyásolta a gyógyulás és/vagy a visszaesési rátát, valamint a teljes túlélést (Damiani et al., 2006, 2010, 2013; Steinbach et al., 2002). Müller et al. az ABCG2 C421A variáns esetében nem mutatott ki kapcsolatot a polimorfizmusok és a túlélés között, azonban egy 261 betegből álló tanulmány során jobb túlélést és magasabb toxicitást mutattak ki a 34A allélt hordozó betegek csoportjában (Hampras et al., 2010; Müller et al., 2008).

1.2 Akut myeloid leukémia – irodalmi áttekintés

A leukémia, azaz fehérvérűség, a vérképző rendszer olyan rosszindulatú daganatos megbetegedése, mely során a hibás vérképzősejtek kontrollálatlanul szaporodnak. A létrejövő rákos sejtek kiszorítják az egészséges sejteket a csontvelőben, így gátolják a normális vérképzést és a vérben kóros fehérvérsejtszám emelkedést okozhatnak (innen ered a neve a betegségnek). A leukémiák négy fő csoportba oszthatóak a betegség lefolyásának gyorsasága és a kiindulási sejtípustól függően: akut vagy krónikus limfoid leukémia és akut vagy krónikus myeloid leukémia. Az akut leukémiák hirtelen kezdődnek és gyors lefolyásúak. A perifériás vérben vagy a csontvelőben, éretlen vérképzősejtek (blasztok) szaporodnak fel, melyek aránya a csontvelőben meghaladja a 20%-ot. A krónikus leukémiák általában lassú lefolyásúak, tüneteik lappangó kezdetűek, gyakran tünetmentes állapotban laborvizsgálattal kerülnek felismerésre. A krónikus leukémiák esetében az érett sejtek felszaporodása figyelhető meg a perifériás vérben. A limfoid leukémiákra a limfociták kóros felszaporodása, míg a myeloid leukémiák esetében a neutrofil, bazofil, eozinofil leukocitákat és monocitákat létrehozó sejtek sokszorozódása a jellemző (Beers & Fletcher, 2003).

Az akut myeloid leukémia a csontvelői hematopoietikus őssejtek rosszindulatú klonális megbetegedése. Különböző szerzett genetikai eltérések következtében a myeloid hematopoietikus őssejtek osztódása és érése egyaránt kóros, emiatt az éretlen myeloid előalakok akut felszaporodása a jellemző. A leggyakoribb leukémia a felnőttek körében, az életkor növekedésével párhuzamosan nő a gyakorisága, de gyerekekben is megjelenhet. Százezer felnőttből nagyjából öt-hat embert érint ez a betegség. Gyorsan súlyosbodik és kezelés nélkül a beteg halálát okozhatja (Beers & Fletcher, 2003).

Fő tünetei közé tartoznak a visszatérő fertőzések, a vérszegénység, vérzékenység, az étvágytalanság, és a fáradékonyság. Egy teljes vérkép segítheti a betegség korai felismerését, mivel a vörösvértestek és vérlemezkék alacsony száma könnyen detektálható ezzel a módszerrel. A vér mikroszkópos ellenőrzésekor éretlen fehérvérsejtek láthatóak. A diagnózis felállításához szükség van csontvelő biopsziára, melyből az orvosok az akut myeloid leukémiát képesek elkülöníteni a többi leukémiától (Beers & Fletcher, 2003).

A kezelés során kemoterápiás készítményeket alkalmaznak (daunorubicin, cytarabin). A kezelés célja a teljes remisszió (complete remission, CR), azaz a teljes tünetmentesség elérése, ekkor a kezelést követő 28. nap után a blaszt sejtek száma 5% alatt van a csontvelőben és normális vérkép figyelhető meg. A kezelést követő 28. napon, ha nem áll fenn remisszió, akkor lehetséges, hogy a beteg rezisztens a kezelésre, ekkor erőteljesebb indukciós kezelés következik. Korai halálozás is beállhat a kezelést követő 28. napon belül. A teljes remissziót

elért beteg esetében is további fenntartó kemoterápiás kezelések (cytarabin) vagy hatvan éves kor alatt hematopoietikus őssejtek átültetése (régi nevén csontvelő-átültetés) szükséges a teljes gyógyulás eléréséhez. A remisszió után a fenntartó kezelések ellenére elképzelhető, hogy relapszus következik be, azaz ismét visszatér az akut myeloid leukémia és felszaporodnak a csontvelőben a blaszt sejtek, ekkor az életkortól, az első remisszió hosszától és citogenetikai kockázattól függően végeznek ismét kemoterápiás kezelést.

Az AML heterogén genetikai háttérű betegség. Eddig több mint 200 különböző, ismétlődő citogenetikai eltérést, valamint számos csak molekuláris genetikai módszerekkel kimutatható mutációt azonosítottak AML-ben. Az azonosított citogenetikai vagy molekuláris genetikai eltérések nem fordulnak elő az egészséges testi sejtekben, így a normál csontvelői sejtekben sem. Az élet során a hematopoietikus őssejtekben kialakult genetikai eltérések felelősek a leukémiás sejtek fokozott proliferációja és csökkent differenciációjáért. A mutációkat hordozó leukémiás sejtklón fokozott proliferációja révén túlnövi az egészséges csontvelői sejtpopulációt.

A leukémiás blaszt sejtek citogenetikai eltérései nagymértékben befolyásolják a kezelés kimenetelét. A citogenetikai abnormalitásokat prognosztikai szempontból három csoportba sorolhatjuk: kedvező, közepes, kedvezőtlen. A kedvező citogenetikai csoportba a t(15;17), t(8;21) reciprok, kiegyensúlyozott ismétlődő transzlokációkat vagy az inv(16) inverziót hordozó betegek tartoznak. Ezek a genetikai eltérések megközelítően a betegek 15%-ában fordulnak elő. A kedvezőtlen citogenetikai prognosztikai csoportba (betegek 25%-a) az 5, 5q, 7, 7q, vagy 17q deléciókat, valamint inv(3) inverziót vagy t(3;3) transzlokációt hordozó betegek tartoznak. A csoporton belül található egy komplex kariotípusú alcsoport, amelybe a több mint három citogenetikai eltérést hordozó betegek kerülnek. A közepes kockázatú citogenetikai csoportba azok tartoznak, akik nem kerültek be a másik két csoportba (AML 60%-a). Citogenetikai rendellenességgel nem rendelkező betegek a normális kariotípusú csoportba tartoznak (betegek 50%-a), akik szintén besorolhatóak a közepes citogenetikai kockázatú csoportba (Döhner et al., 2010). Normális kariotípusú AML (NK-AML) esetén molekuláris, genetikailag azonosítható mutációk felelősek a leukémiás őssejtek fokozott sejtosztódásáért.

2. CÉLKITŰZÉS

A dolgozat során két ABC-transzporter polimorfizmusait (ABCB1 G2677T/A és C3435T; ABCG2 G34A és C421A) vizsgáltuk akut myeloid leukémiában szenvedő betegek és egészséges kontroll emberek csoportjában. Célunk az volt, hogy LightCycler olvadási görbe analízis segítségével megállapítsuk a beteg és az egészséges emberek esetében, hogy a transzporterek polimorf helyeire nézve vad típusú, heterozigóta vagy recesszív homozigóta genotípusúak.

A legutóbbi kutatások során bebizonyosodott, hogy az ABCB1 és ABCG2-transzporterek kifejeződnek a csontvelői vérképzésért felelős őssejteken. Feltehető fiziológias szerepük az őssejtek védelme különböző xenobiotikumokkal szemben. Az egészséges egyének és AML betegcsoportban megfigyelt allél, genotípus és becsült haplotípus gyakoriságok összehasonlításával elemeztük annak a lehetőségét, hogy ezek a funkcionális polimorfizmusok hajlamosítanak-e az akut myeloid leukémia kialakulására emberben.

Az ABCB1 és az ABCG2-transzporterek a leukémiás sejtekben a kemoterápiás gyógyszerek kipumpálásával részt vehetnek a multidrog rezisztencia kialakításában. Tanulmányunk második célkitűzéseként elemeztük, hogy a vizsgált ABC-transzporterek polimorfizmusai befolyásolják-e az akut myeloid leukémia kezelésének kimenetelét.

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1 Vizsgált egyének

Akut myeloid leukémiás (AML) csoport: összesen 389 akut myeloid leukémiával diagnosztizált beteget (183 férfi és 206 nő; átlagéletkor: 50 év; tartomány: 16-93 év) vizsgáltunk. A betegeket 2001-2009 között a Fővárosi Egyesített Szt. István és Szt. László Kórház Hematológiai és Össejt-transzplantációs Osztályán diagnosztizálták és kezelték. Az AML pontos, Egészségügyi Világszervezet által előírt besorolása céljából a diagnóziskor észlelt kariotípust rögzítettük (369 esetben történt sikeres kariotípus vizsgálat). A kedvező citogenetikai csoportba a t(15;17) (n=34), a t(8;21) (n=19) transzlokációt és az inv(16) (n=13) inverziót hordozó betegek (összesen 18%) tartoztak. A közepes citogenetikai rizikójú csoportba 214 (58%) beteg tartozott, akikből 153 normális kariotípusú volt. A kedvezőtlen csoportból (n=89, 24.%) 52 beteg komplex kariotípus eltérést hordozott. Háromszázhet, 65 évesnél fiatalabb, kemoterápiás protokollokkal, kuratív céllal kezelt AML beteg esetén (140 férfi és 167 nő; átlagéletkor: 47 év; tartomány: 16-62 év), a vizsgált polimorfizmusok prognosztikai szerepét is megvizsgáltuk. A retrospektív klinikai vizsgálatban a következő paraméterekre vonatkozó információkat gyűjtöttük: teljes remisszió (complete remission, CR), korai halál (kevesebb, mint 28 nappal a kezelés kezdete után), terápia-rezisztencia, a betegségmentes túlélés (disease-free survival, DFS) és összesített túlélés (overall survival, OS) a nemzetközi ajánlások szerint (Döhner et al., 2010). A DFS az az időtartam, mely a teljes remisszió napjától a visszaesés napjáig telik el, az összesített túlélés pedig a diagnózistól a halálig vagy az utolsó nyomon követés napjáig eltelt idő.

Kontroll csoport: 202 véletlenszerűen kiválasztott, egymással rokoni kapcsolatban nem álló, egészséges, magyar személyből (intézeti dolgozókból) állt.

A vizsgálatok az Egészségügyi Tudományos Tanács Humán Reprodukciós Bizottság etikai engedélyével a résztvevő személyek írásos beleegyező nyilatkozatával történtek.

3.2 DNS-kivonás

A DNS-t a frissen levett vagy a -20°C-on tárolt, alvadásgátolt perifériás vérmintából izoláltuk. A módszer lényege, hogy a vörösvérsejtek hipozmotikus lízisét követően a fehérvérsejteket is lizáltuk, fagyott kiindulási vérminta esetén proteináz K-val is emésztettük, a fehérjéket sóoldattal, majd ezt követően a DNS-t etanollal csaptuk ki a gyári reagenskészlet leírása alapján (Qiagen Gentra Blood Kit). A DNS-oldatot felhasználásig 4°C-on, majd a későbbiekben -20°C-on tároltuk.

3.3 LightCycler olvadási görbe analízis

A transzporterek polimorfizmusainak vizsgálatához szükségünk volt egy olyan módszerre, amellyel kimutathatunk egy nukleotidos eltéréseket, ebben volt segítségünkre az olvadási görbe analízis (melting curve analysis), amelyet a polimeráz láncreakciót követően (PCR) LightCycler 480 (Roche) készüléken végeztünk. A LightCycler 480 egy valós idejű (real-time) PCR készülék, amely mennyiségi PCR és olvadási görbe analízisre egyaránt alkalmas. Az olvadási görbe analízisre a PCR-t követően kerül sor. A PCR terméket fluoreszcens DNS jelölés (esetünkben fluoreszcensen jelölt hibridizációs próbák) jelenlétében „olvasztjuk”, azaz denaturáljuk.

A jelöletlen primerek mellett a PCR elegyben található még két oligonukleotid hibridizációs próba, melyek egymástól egy-három bázispárra kötődnek az amplifikált DNS-en. Azért lényeges ez a távolság közöttük, mert a próbák egymás felé néző végükön kovalensen kötött fluorofórt viselnek, és ha egymás közelében vannak, akkor gerjesztés hatására az egyik fluoreszcens molekula energiát ad át a másiknak (fluoreszcencia rezonancia energia transzfer jelenség, FRET), ami pedig egy jellemző hullámhosszúságú fényt bocsát ki, amit a LightCycler készülék észlelni és regisztrálni képes. A próbák egyike az általunk választott SNP-t tartalmazó szakaszhoz képes kötni (sensor próba), a másik pedig annak a közelébe (anchor próba). A PCR reakció végén olvadási görbe analízis végezhető, mely során a mintát 32 C°-ra lehűtjük (próbák a DNS szálra hibridizálnak), majd 0,1-0,3 C°/másodperc sebességgel melegítjük 85 C°-ig. A próbák leválnak a DNS szálról az adott bázissorrendre jellemző hőmérsékletnél. A szenzor oligonukleotid próba az egy nukleotid eltérést tartalmazó DNS-szálról előbb olvad le, mint a vele teljesen komplementer szálról, hiszen ott hiányzik egy erős kötés a bázispárok között. A próbák denaturációjakor a fluoreszcens jel csökken. A készülék folyamatosan méri az olvadási görbe analízis során a fluoreszcens jelet és meghatározza egyes mintákban a hibridizációs próbák olvadáspontját. Ennek a módszernek a segítségével meg lehet határozni az adott minta genotípusát, mivel az olvadáspont eltér a teljesen komplementer vagy az egy nukleotid eltérést tartalmazó szekvenciájú minták esetén.

Fontos megemlíteni, hogy aszimmetrikus PCR-t végeztünk az olvadási görbe analízis előtt. Ez annyit jelent, hogy a primereket nem egy-egy arányban alkalmaztuk, hanem az egyik primer mennyiségét csökkentettük, míg a másik primert többszörös feleslegben adtuk a reakcióhoz. A PCR során mindkét szál exponenciálisan sokszorozódik egy darabig, de miután a kisebb mennyiségű primer elfogyott, csak a másik primerről induló szál amplifikálódik tovább lineáris ütemben. A PCR beállításakor azt a primert alkalmaztuk nagyobb mennyiségben, amelyikről a próbák kitapadására szolgáló lánc szintézise indult (Szilvási és mtsai, 2005).

A PCR elegyet kilencvenhatos platekbe mértük össze, az egy reakcióhoz szükséges anyagok mennyisége a 3. táblázatban látható. A Promega Mastermix tartalmazza a polimeráz láncreakcióhoz szükséges Taq DNS polimerázt, puffert, dNTP-t és MgCl₂-ot. A használt primerek (LCF és LCR) és próbák (ANC és SENS) az ABCG2 esetében saját tervezésűek voltak, míg az ABCB1 génnél az irodalomban ismertett primer- és próbaszekvenciákat alkalmaztuk (Arjomand-Nahad et al., 2004; Oselin et al., 2003). A nukleotid sorrendeket a 4. táblázat tartalmazza.

PCR összetevők	ABCB1 G2677T/A	ABCB1 C3435T	ABCG2 G34A	ABCG2 C421A
Promega Mastermix (2x)	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
dH ₂ O	2,1 µl	2,6 µl	2,85 µl	2,85 µl
Forward primer (LCF) (10 pmol/µl)	1,25 µl	0,15 µl	0,5 µl	0,15 µl
Reverse primer (LCR) (10 pmol/µl)	0,15 µl	0,75 µl	0,15 µl	0,5 µl
Anchor próba (ANC) (10 pmol/µl)	0,25 µl	0,25 µl	0,25 µl	0,25 µl
Sensor próba (SENS) (10 pmol/µl)	0,25 µl	0,25 µl	0,25 µl	0,25 µl
DNS (50 ng/µl)	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl

3. táblázat A polimeráz láncreakció elegyek összetétele a különböző vizsgált polimorfizmusok szerint. A táblázatban az egy reakcióra szükséges mennyiségek kerültek felsorolásra. A feltüntetett mennyiségek mintaszámtól függően sokszorozandók. A vizsgálni kívánt minták mellett minden reakció tartalmazott egy ismert heterozigóta genotípusú mintát (pozitív kontroll) és egy DNS-templátot nem tartalmazó mintát (negatív, vizkontroll)

Gén	Elnevezés	Nukleotid sorrend
ABCB1	G2677T/A-LCF	5'-ATGGTTGGCAACTAACACTGT-3'
	G2677T/A-LCR	5'-AGAGCATAGTAAGCAGTAGGGAG-3'
	G2677T/A-ANC	5'-/LC640/TTCTTTCTTATCTTTCAGTGCTTGTCCAG- -/3'Phos/-3'
	G2677T/A-SENS	5'-TTCCCAG- <u>T(LNA)</u> -ACCTTCT-/3'Fluorescein/-3'
ABCB1	C3435T-LCF	5'-GTTTCAGTGGCTCCGAGC-3'
	C3435T-LCR	5'-GCAGTGACTCGATGAAGGC-3'
	C3435T-ANC	5'-GACAACAGCCGGGTGGTGTCA-/3'Fluorescein/-3'
	C3435T-SENS	5'-/LC705/GGAAGAGAT <u>C</u> GTGAGGGCAG-/3'Phos/-3'
ABCG2	G34A-LCF	5'-ATGTATTGTCACCTAGTGTTTGC-3'
	G34A-LCR	5'-AGCTCCTTCAGTAAATGCC-3'
	G34A-ANC	5'-GCGGGGAAGCCATTGGTGT-/36-FAM/-3'
	G34A-SENS	5' -Cy5-CCTTGTGACA <u>C</u> TGGGAT-/3'Phos/-3'
ABCG2	C421A-LCF	5'- CTTTACCTTAGTTATGTTATCTTTGTGG-3'
	C421A-LCR	5'- GACCTAACTCTTGAATGACCC-3'
	C421A-ANC	5'- Cy5-TTCGGCTTGCAACAACATGACGA- -/3'Phos/-3'
	C421A-SENS	5'- TTAC <u>C</u> AGTTCTCAGCAGC-6FAM 3'

4. táblázat Az ABCB1 és ABCG2 jelöletlen primer (LCF, LCR) és fluoreszcensen jelölt próbák (ANC, SENS) nukleotid sorrendje. A szenzor próba vastag betűtípussal kiemelt pozíciója jelöli a vizsgált polimorfizmus helyét.

Az 5. táblázatban látható program alapján ment végbe az ABCG2 polimorfizmusait kimutató PCR reakció, majd az olvadási görbe analízis. Az ABCB1 esetében ettől eltérő az olvadási görbe analízis, nem 40 °C-ról, hanem 32°C-ról indul és 85 °C-ig tart. Az ABCB1 G2677T/A szenzor próbáján található zárt nukleinsav (locked nucleid acid, LNA) miatt szükséges az alacsonyabb hőmérsékletről való kezdés. Az LNA alkalmazásával rövidebb a próba, nagyobb olvadáspont különbséget eredményez alkalmazásakor az egy nukleotid különbség (mismatch), de emiatt alacsonyabb volt az olvadáspontja.

Kiemelendő, hogy mind a négy SNP vizsgálatok az aszimmetrikus PCR miatt a ciklusszám az általános 35 helyett 70. A PCR-ben miután a kismennyiségű primer elhasználódott, az amplifikáció lineáris ütemben folytatódik a feleslegben adott másik primerről, ezért sokkal több ciklusra van szükségünk, hogy megfelelő mennyiségű PCR-terméket kapjunk

Ciklusnév	Ciklusszám	Hőmérséklet (°C)	Idő (másodperc)	Fűtési sebesség (°C/másodperc)	Detektálás típusa
Denaturáció	1x	95	180	4,4	-
Amplifikáció	70x	85	20	4,4	-
		50	30	2,2	Egyszeri
		72	45	4,4	-
Olvadási görbe	1x	95	10	4,4	-
		40	40	2,2	-
		80	0	0,11	Folyamatos
Hűtés	1x	40	30	2,2	-

5. táblázat Az ABCG2 variánsait kimutató PCR program.

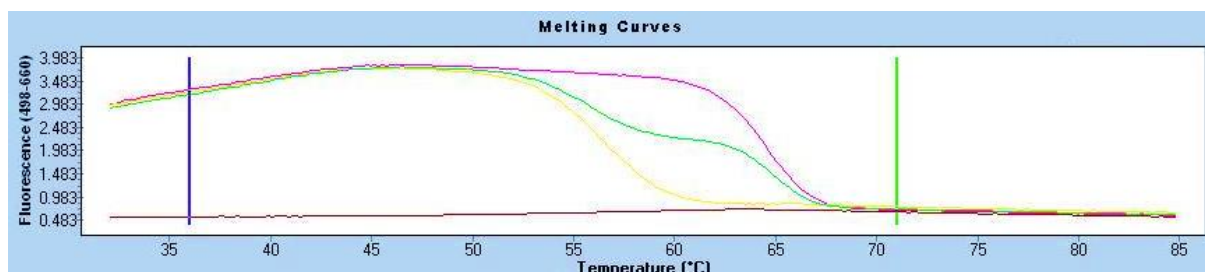
3.4 Statisztikai analízis

A statisztikai analízist a Statistical Package for the Social Science (SPSS) 13.0-ás verziójával végeztük. Az allélfrekvenciák esetében megadtuk a hozzájuk tartozó 95%-os konfidencia-intervallumot is ($AF \pm 95\% CI$). A diszkrét valószínűségi változók (pl. allélfrekvenciák, genotípus gyakoriságok) esetében Fisher-féle egzakt tesztet vagy Khi-négyzet próbát használtunk a változók számától függően. Hardy Weinberg egyensúly (HWE) meglétét Khi-négyzet próbával és SNPStats programmal is ellenőriztük. A beteg és az egészséges csoportban mért genotípusokat többféle elemzés szerint is összevetettük. Az allélikus modellben a vad típusú és a variáns allélok arányát vetettük össze Fisher-féle egzakt teszttel. A genotípus gyakoriságokat Khi-négyzet próbával hasonlítottuk össze a beteg és a kontroll, valamint az egyes beteg alcsoportok között. A domináns modell szerinti elemzésekkor a vad típusú egyének gyakoriságát vetettük össze a heterozigóta és homozigóta variáns hordozókkal, míg a recesszív modell szerinti elemzésekkor a vad típusú és heterozigóta egyének kerülnek egy csoportba a homozigóta variánsokkal szemben. A haplotípus frekvenciák becslését az SNPStats nevű, web felülettel rendelkező programmal végeztük (Solé et al., 2006). Az SNPStats program az egyes csoportok összehasonlításakor a csoportok nem- és korelációját is figyelembe veszi az esélyhányados és 95%-os CI kiszámításakor. Az összesített túlélést log rank teszttel hasonlítottuk össze.

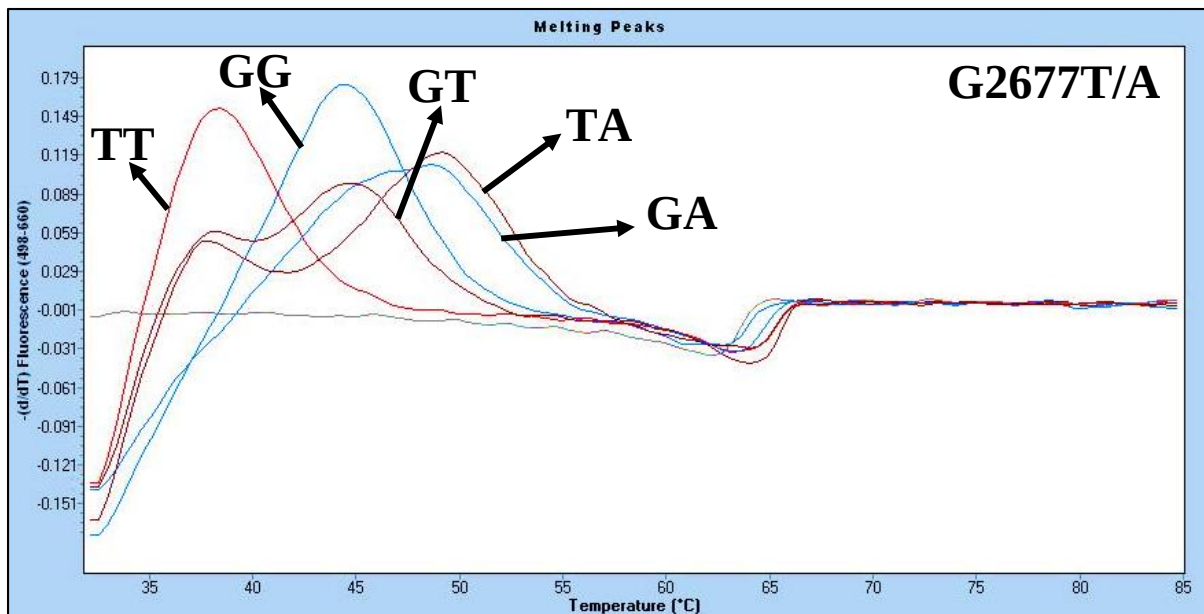
4. EREDMÉNYEK

Összesen 389 AML-ben szenvedő beteg és 202 egészséges kontroll ember véréből izoláltuk és végeztünk rajtuk olvadási görbe analízist. A módszer segítségével megállapítható volt, hogy az adott minta, az adott polimorfizmusra nézve milyen genotípusú. Az 1. ábrán egy olvadási görbe látható, mely a hőmérséklet függvényében ábrázolja a LightCycler készülék által detektált fluoreszcens jelet (32-85°C között). Jól megfigyelhető, hogy alacsony hőmérsékleten (32-50°C) maximális a fluoreszcens jel, mivel a szondák annealálódtak a cél szekvenciákhoz. A hőmérséklet további emelésével a szondák denaturálódnak és a fluoreszcens jel csökken. 70-85°C között már teljes a denaturáció. Az 1. ábrán 50-70°C között következik be a denaturáció, itt különülnek el egymástól a hibridizációs szondára komplementer és 1 nukleotid eltérést hordozó minták. A 2-5. ábrákon láthatóak az olvadási „csúcsok”, amelyek alapján megállapíthatóak az ABCB1 és ABCG2 polimorf helyein a különböző genotípusok. A 2-5 ábrákon az olvadási görbék fluoreszcencia változási sebessége ábrázolódik, ahol az olvadáspontok (T_m) leolvashatóak.

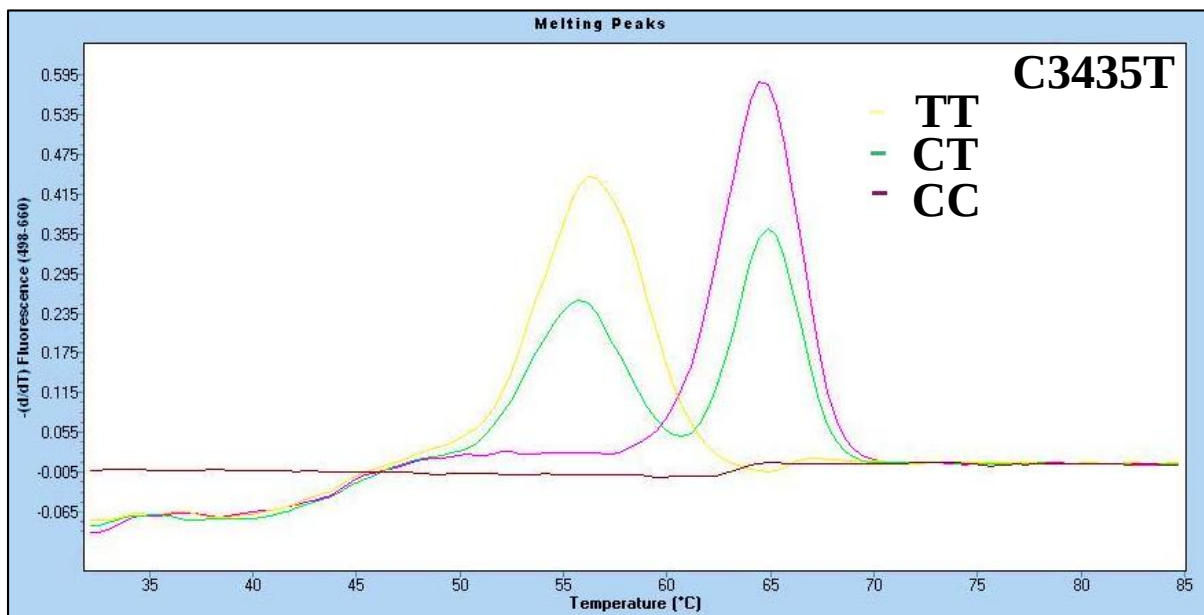
Az ABCB1 G2677T/A esetében a hibridizációs szenzor próba a 2677AA genotípusú szekvenciával komplementer, ezért a 2677AA genotípusnak legmagasabb az olvadáspontja 49 °C. A 2677GG genotípus olvadáspontja 45 °C, és a 2677TT genotípusé pedig 38 °C (2. ábra). Heterozigóta genotípus esetén mindig két olvadáspont észlelhető a további ábrák esetében is. A 3435CC genotípus olvadáspontja 65 °C, a 3435TT genotípusé 56 °C (3. ábra). Az ABCG2 transzporter esetében a 34GG genotípus olvadáspontja 58 °C, a 34AA genotípusé 47 °C (4. ábra). A 421CC genotípus olvadáspontja 55 °C, a 421AA genotípusé pedig 48 °C (5. ábra).



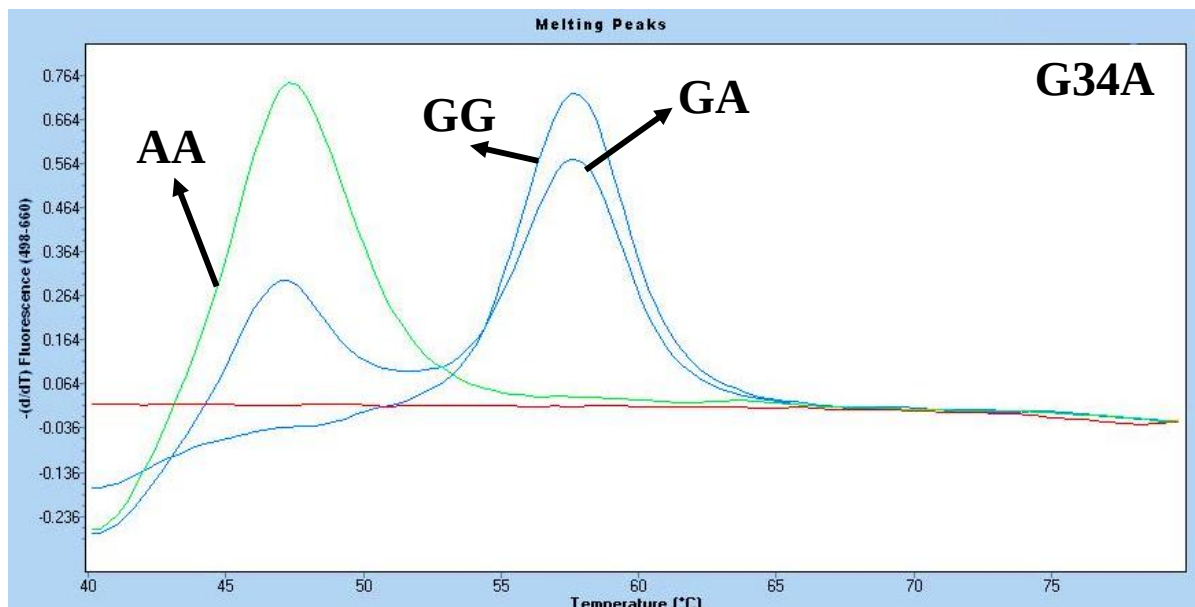
1. ábra ABCB1 C3435T variánsának olvadási görbéi



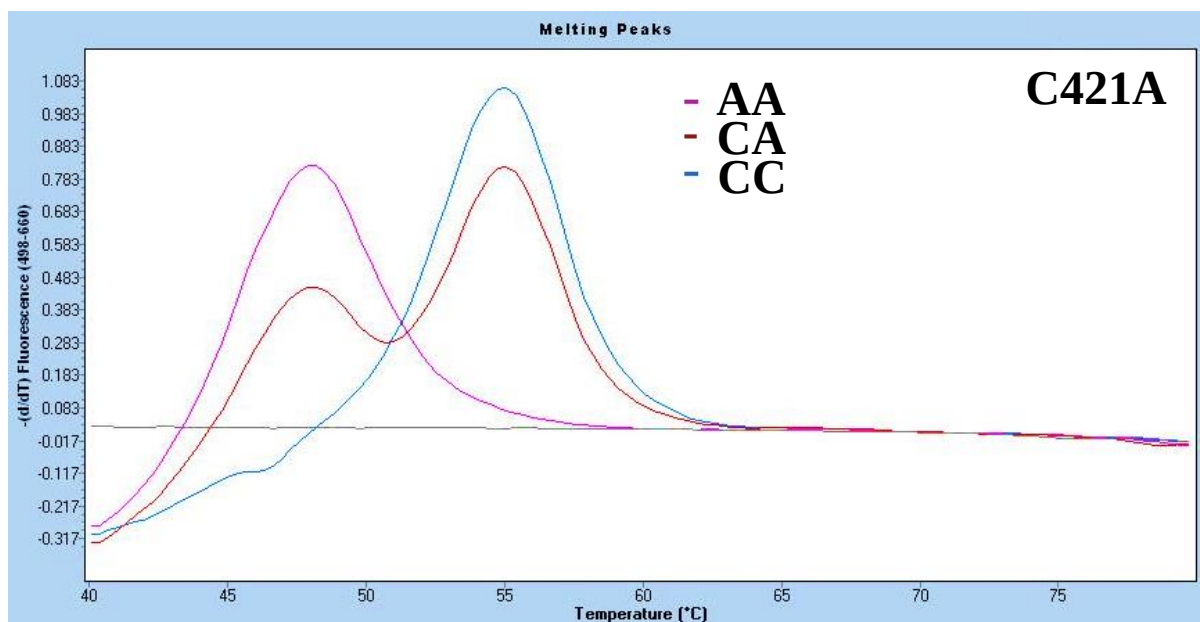
2. ábra Az ABCB1 G2677T/A variánsának olvadási csúcsai



3. ábra Az ABCB1 C3435T variánsának olvadási csúcsai



4. ábra Az ABCG2 G34A variánsának olvadási csúcsai



5. ábra Az ABCG2 C421A variánsának olvadási csúcsai

Az ABCB1 és az ABCG2 genetikai variánsainak allélfrekvenciáit ($AF \pm 95\% CI$) és a genotípusainak eloszlását az 6. táblázatban foglaltuk össze, a beteg és a kontroll csoportra nézve.

Kontroll/betegcsoport	n	AF $\pm$ 95%CI (%)	Genotípusok száma	HWE	p*
ABCB1 G2677T/A (genotípusok: GG/GT/TT/GA/TA)					
Kontroll	202	T: 44,8 $\pm$ 4,9; A: 3,2 $\pm$ 1,8	58/88/43/6/7	0,89	-
Akut myeloid leukémia (AML)	389	T: 42,9 $\pm$ 3,5; A: 1,8 $\pm$ 1,0	112/196/67/10/4	0,60	0,15
ABCB1 C3435T (genotípusok: CC/CT/TT)					
Kontroll	202	T: 50,0 $\pm$ 5,0	51/100/51	0,89	-
Akut myeloid leukémia (AML)	389	T: 50,3 $\pm$ 3,6	95/197/97	0,80	1,00
ABCG2 G34A (genotípusok: GG/GA/AA)					
Kontroll	202	A: 4,0 $\pm$ 1,9	186/16/0	0,55	-
Akut myeloid leukémia (AML)	389	A: 4,2 $\pm$ 1,4	358/29/2	0,10	1,00
ABCG2 C421A (genotípusok: CC/CA/AA)					
Kontroll	202	A: 10,1 $\pm$ 3,0	161/41/0	0,23	-
Akut myeloid leukémia (AML)	389	A: 8,1 $\pm$ 2,0	330/55/4	0,32	0,13

6. táblázat Az ABCB1 és ABCG2 allélfrekvenciái és a genotípusaiknak eloszlásai. A p* érték az allélikus modell szerinti összehasonlítás eredménye.

A genotípusok eloszlása a Hardy-Weinberg egyensúlytól nem tért el ($p>0,05$) sem a beteg, sem a kontroll csoportban. A minor allélfrekvenciák ($AF \pm 95\% CI$) nem mutattak különbséget a betegek és a kontrollok között.

Az ABCB1 transzporter 2677G-3435C és 2677T-3435T variánsai (genotípusra nézve: GG/CC, GT/CT, TT/TT) gyakran együtt fordultak elő, míg az ezzel ellentétes kombinációk (GG/TT, TT/CC genotípusok) ritkák voltak, ami feltételezhetően a két lókuszt közötti kapcsoltsági egyensúlytól való eltérés (Linkage Disequilibrium, LD) következménye. A ritka 2677A alléllal rendelkező egyéneket ($n=591/27$) kihagytuk a számításból. Az egyensúlytól való eltérés jelzőszáma $D=-0,19$ lett, mely szignifikáns eltérést jelentett a kapcsoltsági egyensúlytól ($p<0,001$). Az ABCG2 G34A és C421A variánsok esetében nem találtunk eltérést az egyensúlytól. A haplotípus becslés eredményeit a 7. táblázat mutatja.

Kontroll/betegcsoport	ABCB1 G2677T/C3435T				ABCG2 G34A/C421A		
	G/C	T/T	G/T	T/C	G/C	G/A	A/C
Kontroll	48,3	43,9	6,1	1,7	85,9	10,2	3,9
Akut myeloid leukémia (AML)	46,6	40,3	9,9 ¹	3,2	87,7	8,1	4,2
AML normális kariotípussal	42,0	44,2	10,4 ²	3,1	87,0	7,1	5,8
AML abnormális citogenetikával	48,4	38,9	9,4	3,2	87,5	9,0	3,5

7. táblázat Az ABCB1 és az ABCG2 becsült haplotípus frekvenciák a kontroll és az AML csoportban

¹ABCB1 GT haplotípus frekvenciája AML vs. kontroll (OR [95%CI]: 2,04 [1,14-3,57]; p=0,017.

²ABCB1 GT haplotípus frekvenciája AML normális kariotípussal vs. kontroll (OR [95%CI]: 2,44 [1,18-5,26]; p=0,02.

Az ABCB1 egy ritka haplotípusa (2677G/3435T=GT haplotípus) szignifikánsan nagyobb arányban fordult elő az AML csoportban, mint a kontroll csoportban [9,9% vs 6,1%, p=0,017; OR (95% CI) = 2,03 (1,14-3,62)]. A GT haplotípust tartalmazó genotípusok (GG/TT, GG/CT, GT/TT) is gyakrabban fordultak elő az AML betegek csoportjában, mint az egészséges kontroll csoportban [18% vs 11%(kontroll); p=0,043, OR (95% CI) = 1,71 (1,03-2,83)]. A becsült haplotípusok az ABCG2 gén esetében nem mutattak különbséget a két csoport között. Összehasonlítva az ABCB1 és ABCG2 allélfrekvenciáit és a becsült haplotípus frekvenciáit nem találtunk eltérést a fiatal és idős betegek között, illetve a férfiak vagy a nők csoportjában.

Az akut myeloid leukémia (AML) heterogén genetikai háttérrel rendelkezik, ezért a különböző genetikai hátterű AML alcsoportokban külön-külön végezhetünk összehasonlításokat. A leukémiás sejtekben megfigyelhető citogenetikai eltérések alapján a 153 normál kariotípusú és 218 abnormális kariotípusú beteg volt. A citogenetikai eltérések befolyásolják az AML kimenetelét, prognosztikai szempontból három nagy csoportba sorolhatóak az eltérések: kedvező (n=66), közepes (n=214) és kedvezőtlen (n=89). A kedvező citogenetikai prognosztikai csoportba tartoznak a t(15;17) (n=34), a t(8;21) (n=19) ismétlődő transzlokációk vagy az inv(16) (n=13) inverzió. A közepes citogenetikai csoporton belül vannak normál és abnormális kariotípusok, a kedvezőtlen csoporton belül pedig egy komplex kariotípusú alcsoport volt megkülönböztetve (n=52), ahova azok tartoztak, akiknek több, mint három kromoszóma változása volt.

A komplex kariotípusú, kedvezőtlen citogenetikai csoport 2677T allélt hordozók (GT és TT genotípusok együtt, domináns modell) szignifikánsan kevesebben voltak, mint a kontroll csoportban lévők [56% vs. 69%, p=0,025, OR (95% CI)=0,40 (0,18-0,90)] és hasonló tendencia volt megfigyelhető a 3435T hordozók esetében (domináns modell, 67% vs.74%, p=0,08). Az abnormális és a normális kariotípusú betegeket összehasonlítva különbség mutatkozott az

ABCB1 C3435T genotípus eloszlásában: a TT és a CT genotípusok együtt (domináns modell) gyakrabban fordultak elő a normális kariotípusúakban, mint az abnormálisban [82,4% vs. 71,0%, $p=0,025$, OR (95% CI)= 0,55 (0,33-0,92)].

Az alcsoport elemzés kimutatta, hogy a t(8;21) transzlokációt hordozó alcsoport a kontrollhoz képes magasabb a 34A allélfrekvenciával rendelkezik [$18,4\pm 12,6\%$ vs. $4,0\pm 1,9\%$, $p=0,002$ allélikus modell szerint]. A domináns modellel való számítás esetében is gyakoribb volt az allélt hordozók száma (GA és AA genotípusok együtt) a transzlokációt hordozókban [31,6% vs. 7,9%, $p=0,006$, OR (95% CI)= 5,37 (1,80-16,02)]. Összehasonlítva az alcsoportokat, az ABCG2 homozigóta hordozók (34AA és 421AA, recesszív modell) gyakrabban fordultak elő az abnormális kariotípusú AML csoportban, mint a normál kariotípusúban ($p=0,045$). Az ABCB1 és az ABCG2 többi alcsoportjai az allélfrekvenciákban és a becsült haplotípus frekvenciákban nem különböztek.

A kezelés kimenetelét 307 (167 nő és 140 férfi), 60 évesnél fiatalabb, kemoterápiával kezelt beteg esetében elemeztük. Az összesített túlélésben (overall survival, OS) nem volt különbség az ABCB1 és ABCG2 genotípusaiban a betegek között, azonban egy tendencia volt megfigyelhető, túlélési előnyt találtunk az ABCG2 421A variánst hordozók körében (CA és AA genotípusok együtt, domináns modell). A klinikai jellemzők és a kezelési lehetőségek nem különböztek a 421A hordozók és nem hordozók között. Ahhoz, hogy tovább vizsgálhassuk a lehetséges faktorokat, amelyek befolyásolhatják ezt a tendenciát a túlélésben, alcsoport elemzéseket végeztük a homogén kezelési protokollokkal kezelt betegek csoportjában. Először a legnagyobb homogénen kezelt alcsoportot vizsgáltuk, azokat akik daunorubicin és cytarabin kemoterápiás kezelést kaptak ($n=212$). Az ABCG2 421A hordozók (CA, AA genotípus, $n=31$) esetében hosszabb volt az OS, mint a vad típusú allélt hordozóké (CC genotípus, $n=181$) (48 hónapos OS= $46,7\pm 9,3$ vs. $26,9\pm 3,4\%$, $p=0,027$).

Miután kizártuk az AML betegek közül a hematopoietikus őssejt-transzplantációval (hematopoietic stem cell transplantation, HSCT) is kezelt AML betegeket az elemzésből, az ABCG2 421A allélt hordozók ($n=24$) hosszabb túlélési trendet mutattak, mint a vad típusú allélt hordozók ($n=152$) a daunorubicint és cytarabint kapó csoportban ($n=176$). Csak az egyszeri daunorubicin és cytarabin indukciós kezelési ciklusban részesülő betegcsoportban az ABCG2 421A hordozók ($n=9$) hosszabb túlélést mutattak, mint a CC genotípusúak ($n=63$) (48 hónapos OS= $50,0\pm 18,6\%$ vs. $12,4\pm 4,8\%$, $p=0,011$). Ugyanez a túlélési előny már nem volt megfigyelhető a dupla daunorubicin és cytarabin indukciós kezelési ciklusban részesülő betegeknél. Hasonló alcsoport elemzéseket végeztünk el az ABCB1 G2677T/A, C3534T és az ABCG2 G34A esetekben is, de ezek a genetikai variánsok nem befolyásolták a túlélést.

5. DISZKUSSZIÓ

A megfigyelt allélfrekvenciák megegyeztek a korábbi európai populációval foglalkozó tanulmányokban leírtaknak. Az ABCB1 esetében a 2677T allél frekvenciája 33,9-46,9%, 3435T-nél 46,8-62,5% közé esik, míg az ABCG2 transzporter génjénél a 34A 0-4,6% és a 421A allél esetében pedig 4,5-11,7% (Ieiri, 2012). A minor allélfrekvenciák ($AF \pm 95\%$ CI, allélikus modell) a beteg és a kontroll csoport között nem különböztek. A genotípusok eloszlása a Hardy-Weinberg egyensúlytól nem tért el sem a beteg, sem a kontroll csoportokban.

Az ABC-transzporterek fontos szerepet játszanak a sejtek védelmében, mivel a toxikus anyagokat nem hagyják bejutni a sejtbe, kipumpálják az extracelluláris térbe. Mivel ezek a fehérjék az őssejtek membránján is megjelennek és megóvják őket az endogén és exogén karcinogén anyagoktól, ezért érdemes vizsgálni a funkcionális polimorfizmusait, melyek részt vehetnek az öröklődő, rákbetegségek kialakulására való hajlamban. Az ABC-transzporterekkel az utóbbi évek során nagyon sok kutatócsoport foglalkozott, újabb és újabb metaanalízisek íródtak a transzporterek variánsainak és a rák vagy leukémiás megbetegedésekre való hajlamosság kapcsolatáról. Az ABCG2 esetében azt találták, hogy a 421A allélt hordozók védettebbek a rák kialakulása ellen (Chen et al., 2012). Az ABCB1 3435T hordozóknál magasabb volt a kockázata a krónikus limfoid leukémia kialakulásának (Qian et al., 2012), a 2677T/A allélt hordozókkal kapcsolatban pedig magasabb akut limfoid leukémia és rák kockázatot írtak le (Wang et al., 2013). Az ABCB1 és ABCG2 variánsokat főleg akut limfoid leukémiában elemezték, míg az akut myeloid leukémiában ezeket kevésbé intenzíven tanulmányozták. Főleg kétszáz alatti esetszámmal dolgoztak és azt találták, hogy az ABCB1 allél és haplotípus frekvenciái nem különböztek a beteg és nem beteg csoportok között (Jamroziak et al., 2006; Monzo et al., 2006; Rund et al., 2005). Egy négyszázöt beteget tartalmazó kutatásban azonban pozitív összefüggést mutattak ki az ABCB1 homozigóta mutánsok és az akut myeloid leukémia között (Illmer et al., 2002). A fiatalabb korban diagnosztizált, sok 2677TT vagy 3435TT genotípusú betegekből arra következtettek, hogy a homozigótaság növelheti az AML-re való hajlamot. A vizsgálat során nem találtunk ilyen összefüggést az ABCB1 genotípusok és a között, hogy hány éves volt a páciens a diagnózisakor. Az AML betegek között azonban a kutatás során, az egyik ritka ABCB1 2677G/3435T haplotípus gyakoribb volt, mint az egészséges kontrollok között. Az ABCG2 variánsait AML-ben egy 112 beteget tartalmazó tanulmány vizsgálta, ahol a C421A nem befolyásolta a betegségre való hajlamot (Müller et al., 2008). Ezt az eredményt kaptuk mi is az ABCG2 G34A és C421A esetében a beteg és az egészséges csoport összehasonlításakor, azonban az alcsoport

elemzés kimutatta, hogy a 34A variáns hajlamosíthat egy ritka t(8;21)(q22;q22) transzlokációt hordozó AML kialakulására (AML esetek 5-10%-a).

Az ABC-transzporterek azon polimorfizmusai, melyek csökkent fehérje expressziót és funkciót eredményeznek összefüggésbe hozhatóak a megnövekedett gyógyulási és csökkent visszaesési rátával, hiszen csökken a leukémiás sejtek védelme a kemoterápiás szerek ellen, a csökkent efflux miatt. Ugyanakkor a szomatikus sejtekben megnőhet a gyógyszerek toxikus hatása a csökkent pumpálás miatt. A különböző kezelési módok (pl.: anthracyclin az indukciós terápiában vagy kapott gyógyszerek a transzplantáció alatt) hatása más és más lehet az ABCB1 vagy az ABCG2 genotípusoktól függően (Kimchi-Sarfaty et al., 2007).

Az AML sejtek emelkedett ABCB1 fehérje expressziója vagy aktivitása összefüggést mutatott az akut myeloid leukémia csökkent gyógyulási arányával, a rövidebb betegségmentes (disease-free survival, DFS) és teljes túléléssel (overall survival, OS) (Bender et al., 2005; Damiani et al., 2006; Ho et al., 2008). Másrészt az emelkedett ABCB1 expresszió egyéb kedvezőtlen prognosztikai faktorokkal, mint az idősebb kor vagy citogenetikai abnormalitás jelenlétével társult. A 3435TT csökkent fehérje expressziót eredményezett (Seedhouse et al., 2007). A szerzők arra a következtetésre jutottak, hogy a számos leukémia-specifikus tényező (pl.: fehérvérsejtszám a perifériás vérben, citogenetika) meghatározhatja az ABCB1 fehérje expresszióját, a 3435T polimorfizmust pedig ezekhez képest kisebb módosító tényezőnek javasolták. Csak akkor kimutatható a 3435T polimorfizmus csökkent expresszióval járó hatása, ha az ABCB1 expresszálódik a leukémiás sejteken.

Számos tanulmány vizsgálta az ABCB1 genetikai variánsainak hatását, akut myeloid leukémiában, a kezelés kimenetelére. A mi eredményeinkhez hasonlóan sokan szintén nem találtak összefüggést a fehérje polimorfizmusai és a kezelés kimenetele között (Hur et al., 2008; van der Holt et al., 2006). Azonban más tanulmányok a vad típusú homozigóta genotípusokat (2677GG, 3435CC) rossz prognosztikai faktornak írták le AML-ben, ami csökkentheti a túlélés valószínűségét (Gréen et al., 2012; Illmer et al., 2002). In vitro toxicitás vizsgálatok azt mutatták, hogy a 2677TT genotípusú ABCB1-el rendelkező leukémiás sejtek érzékenyebbek a mitoxantron, etopozid és daunorubicin szerekre, de a cytarabinra nem (Gréen et al., 2012). Egy ázsiai populáción pont ezzel ellentétes megállapítást tettek, ott a vad típusú homozigótákra hatottak jobban a drogok (Kim et al., 2006). A vizsgálatunkban nem volt kimutatható hatása az ABCB1 polimorfizmusoknak a kezelés kimenetelére akut myeloid leukémiában.

Az ABCG2 SNP-k és a kezelés kimenetelének kapcsolatáról a tanulmányok szintén ellentmondóak. A magas ABCG2 fehérje vagy mRNS expresszió rossz prognosztikai faktor, mely befolyásolta a gyógyulás és/vagy a visszaesési rátát, valamint a túlélést (Damiani et al.,

2006, 2010, 2013; Steinbach et al., 2002). A legutóbbi cikkek az ABCG2 polimorfizmusok és a kezelési kimenetek közötti kapcsolatról ellenmondásosak. Egy 112 betegből álló vizsgálat nem mutatott ki kapcsolatot a polimorfizmusok és a túlélés között, azonban egy nagy részt kaukázusi 261 betegből álló tanulmány során jobb túlélést és magasabb toxicitást mutattak a cytarabinnal és anthracinnal kezelt 34A allélt hordozó betegek csoportjában (Hampras et al., 2010; Müller et al., 2008). Az általunk vizsgált betegek között a t(8;21) transzlokációt hordozókban gyakran fordult elő a 34A variáns. Az ABCG2 421AA homozigóta betegeknek (n=3) magasabb volt a kockázatuk a halálra, mint a 421CC genotípusúaknak, bár ez ilyen kis létszám mellett nem volt szignifikánsan kimutatható. Egy kínai betegekből álló tanulmányban (n=141) a 34A hordozók nem kedvező túlélést mutattak az előbb említett vizsgálattal szemben, ahol ennek pont az ellenkezője volt a jellemző (Wang et al., 2011). Tiribelli et al. idarubicinnal kezelt betegek esetében kedvezőtlen prognózissal járt az ABCG2 421A allél jelenléte (Tiribelli et al., 2013). Az ABCG2 overexpressziója daunorubicin rezisztenciát eredményezett, de az idarubicinét nem, habár mind a kettő anthracyclin és szubsztrátjai az ABCG2 fehérjének (Abbott et al., 2002). A fehérje mRNS-ének expressziós szintjének emiatt prognosztikai jelentősége volt a daunorubicinnal kezelt betegeknél, de az idarubicinnal kezelt betegek esetében nem. Ugyan ebben a tanulmányban nem volt különbség a túlélésben a 421A allélt hordozók és nem hordozók között, a genotípus adatokat az expresszió függvényében vizsgálták. Ellentmondásos, hogy a 421A hordozók csökkent ABCG2 expressziót mutatnak, de hasonló a túlélésük a magasabb fehérje expressziót mutató betegekkal. Az eredményeink arra utalnak, hogy a nagyon elterjedt ABCG2 polimorfizmus, a C421A, befolyásolja az AML kezelés kimenetelét a genetikai háttértől és az alkalmazott kemoterápiától függően.

6. ÖSSZEFOGLALÓ

Az ABC (ATP-binding cassette) transzporterek minden fajban megtalálható, sejtek védelmében és anyagcseréjében résztvevő pumpafehérjék. A fő feladatuk szubsztrátjaik extracelluláris térbe való pumpálása ATP-függő módon. A hematopoietikus őssejteken is kifejeződő ABCB1 és ABCG2 feltételezhető biológiai szerepe az őssejtek védelme különböző toxikus anyagokkal szemben. Fiziológias szubsztrátjaik (pl. szteroidok) transzportjával szerepet játszhatnak az őssejtek sejtciklusának szabályozásában. Mindemellett részt vesznek különböző gyógyszerek felszívódásában, szervezetben történő eloszlásában, metabolizmusában, kiválasztásában, valamint a daganatos betegségek kezelése során fellépő multidrog rezisztencia kialakításában.

Fő kérdésünk az volt, hogy a multidrog rezisztencia kialakulásért leginkább felelős ABCB1 és az ABCG2 transzporterek gyakori, funkcionális polimorfizmusai hajlamosítanak-e humán akut myeloid leukémia (AML) kialakulására, valamint befolyásolják-e a betegség klinikai megjelenését és a kezelés kimenetelét.

Vizsgálatunkba 389 AML beteget és 202 egészséges kontrollt vontunk be. A terápia kimenetelét 307, 60 évesnél fiatalabb, kemoterápiával kezelt beteg esetében elemeztük. Az ABCB1 (c.2677G>T/A és c.3435C>T) és az ABCG2 (c.34G>A és c.421C>A) polimorfizmusait Light Cycler készüléken végzett olvadási görbe analízissel vizsgáltuk.

A különböző allélfrekvenciák nem mutattak szignifikáns eltérést a teljes AML csoport és az egészséges kontrollok között, de érdemes megemlíteni, hogy egy ritka ABCB1 haplotípus (2677G/3435T) gyakoribb volt a beteg csoport esetében (9,9 vs. 6,1%; $p=0,017$). Az ABCG2 c.34G>A variánsa egy ritka kromoszóma transzlokációt [t(8;21)] hordozó AML kialakulására hajlamosított (18,4% vs. 4,0%; $p=0,002$). Az ABCB1 transzporter génjének polimorfizmusai nem befolyásolták a kezelés kimenetelét. Az ABCG2 421A-t hordozó, daunorubicint és cytarabint kapó betegek hosszabb túlélést mutattak, mint a nem hordozók (összesített túlélés 48 hónapnál: $47\pm 9\%$ vs. $27\pm 3\%$; $p=0,027$).

Összefoglalva, tehát az ABCB1 transzporter ritka 2677G/3435T haplotípusa hajlamosíthat az akut myeloid leukémia kialakulására, míg az ABCG2 c.421C>A polimorfizmusa befolyásolhatja a kezelés kimenetelét a kemoterápia függvényében.

7. SUMMARY

ATP-binding cassette (ABC) transporters, present in all living organisms, take part in cell protection and metabolism. Their main task is to pump their substrates in the extracellular space with an ATP-dependent manner. ABCB1 and ABCG2 transporters appear to be expressed in hematopoietic stem cells, and presumed to play a protective role against a broad spectrum of toxic substrates. They are also responsible for the efflux of physiological substrates, such as steroids, and their expression may play a regulatory role in stem cells' cell cycle. Both transporters participate in the absorption, distribution, metabolism, excretion of drugs and in the multidrug resistance during chemotherapy.

Our main question was that the common, functional polymorphisms of ABCB1 and ABCG2 transporters may have an effect on susceptibility to acute myeloid leukemia (AML), as well as influencing the clinical presentation and treatment outcome of the disease in humans.

We studied 389 AML patients and 202 healthy controls. The outcome of therapy were analysed for 307 patients younger than 60 years and treated with curative intention. Single nucleotide polymorphisms of ABCB1 (c.2677G>T/A and c.3435C>T) and ABCG2 (c.34G>A and c.421C>A) were analysed by Light Cycler melting curve technique.

Allele frequencies (AF) were not different in AML patients as a whole cohort compared to controls, but it is worth pointing that a rare haplotype of ABCB1 (2677G/3435T) was more frequent in the AML group (9.9 vs. 6.1%; $p=0.017$). AML subgroup analysis revealed that t(8;21) translocation positive patients in ABCG2 c.34G>A variants showed higher AF compared to control individuals (18.4% vs. 4.0%; $p=0.002$). ABCB1 polymorphism tested in this study did not alter disease predisposition or treatment outcome. Among AML patients receiving daunorubicin and cytarabine treatment, ABCG2 c.421C>A carriers displayed longer survival compared to individuals carrying the major allele (48 month overall survival: $47\pm 9\%$ vs. $27\pm 3\%$, $p=0.027$).

Our results suggest that a rare haplotype (2677G/3435T) of ABCB1 transporter has an effect on acute myeloid leukemia disease susceptibility and the c.421C>A variant of ABCG2 might influence treatment outcome depending on chemotherapy applied.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsősorban szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Andrikovics Hajnalkának a vizsgálatban és a dolgozat megírásában nyújtott segítségét. Köszönet jár Magdalena Koszarska és Bors András, az OVSZ Molekuláris Diagnosztikai Laboratórium munkatársainak, a munkámban nyújtott segítségéért, valamint dr. Tordai Attila, laborvezetőnek a tanácsaiért.

Köszönet illeti az Országos Vérellátó Szolgálat Molekuláris Diagnosztikai Laborjának további munkatársait. Köszönöm belső konzulensemnek, Szabó Krisztiánnak a segítséget, valamint a kar tanárainak a témabeszámolókon adott javaslatokat, illetve hozzászólásokat, amellyel segítették a szakdolgozatom előrehaladását.

Külön köszönöm családomnak, barátomnak és a barátaimnak a támogatást és a bátorítást.

IRODALOMJEGYZÉK

- Abbott, B. L., Colapietro, A.-M., Barnes, Y., Marini, F., Andreeff, M., & Sorrentino, B. P. (2002). Low levels of ABCG2 expression in adult AML blast samples. *Blood*, 100(13), 4594–4601. doi:10.1182/blood-2002-01-0271
- Arjomand-Nahad, F., Diefenbach, K., Landt, O., Gaikovitch, E., & Roots, I. (2004). Genotyping of the triallelic variant G2677T/A in MDR1 using LightCycler with locked-nucleic-acid-modified hybridization probes. *Analytical Biochemistry*, 334(1), 201–203. doi:10.1016/j.ab.2004.07.030
- Beers, M. H., & Fletcher, A. J. (Eds.). (2003). *The Merck manual of medical information* (2nd home ed., [all new & completely rev.]). Whitehouse Station, NJ: Merck Research Laboratories.
- Benderra, Z., Faussat, A. M., Sayada, L., Perrot, J.-Y., Tang, R., Chaoui, D., ... Legrand, O. (2005). MRP3, BCRP, and P-glycoprotein activities are prognostic factors in adult acute myeloid leukemia. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 11(21), 7764–7772. doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-1895
- Chen, P., Zhao, L., Zou, P., Xu, H., Lu, A., & Zhao, P. (2012). The contribution of the ABCG2 C421A polymorphism to cancer susceptibility: a meta-analysis of the current literature. *BMC Cancer*, 12(1), 383. doi:10.1186/1471-2407-12-383
- Damiani, D., Tiribelli, M., Calistri, E., Geromin, A., Chiarvesio, A., Michelutti, A., ... Fanin, R. (2006). The prognostic value of P-glycoprotein (ABCB) and breast cancer resistance protein (ABCG2) in adults with de novo acute myeloid leukemia with normal karyotype. *Haematologica*, 91(6), 825–828.
- Damiani, D., Tiribelli, M., Franzoni, A., Michelutti, A., Fabbro, D., Cavallin, M., ... Damante, G. (2013). BAALC overexpression retains its negative prognostic role across all

- cytogenetic risk groups in acute myeloid leukemia patients. *American Journal of Hematology*, 88(10), 848–852. doi:10.1002/ajh.23516
- Damiani, D., Tiribelli, M., Michelutti, A., Geromin, A., Cavallin, M., Fabbro, D., ... Fanin, R. (2010). Fludarabine-based induction therapy does not overcome the negative effect of ABCG2 (BCRP) over-expression in adult acute myeloid leukemia patients. *Leukemia Research*, 34(7), 942–945. doi:10.1016/j.leukres.2010.01.008
- Döhner, H., Estey, E. H., Amadori, S., Appelbaum, F. R., Büchner, T., Burnett, A. K., ... European LeukemiaNet. (2010). Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*, 115(3), 453–474. doi:10.1182/blood-2009-07-235358
- Gottesman, M. M., Fojo, T., & Bates, S. E. (2002). Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nature Reviews. Cancer*, 2(1), 48–58. doi:10.1038/nrc706
- Graf, G. A., Yu, L., Li, W.-P., Gerard, R., Tuma, P. L., Cohen, J. C., & Hobbs, H. H. (2003). ABCG5 and ABCG8 are obligate heterodimers for protein trafficking and biliary cholesterol excretion. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(48), 48275–48282. doi:10.1074/jbc.M310223200
- Gréen, H., Falk, I. J., Lotfi, K., Paul, E., Hermansson, M., Rosenquist, R., ... Nahi, H. (2012). Association of ABCB1 polymorphisms with survival and in vitro cytotoxicity in de novo acute myeloid leukemia with normal karyotype. *The Pharmacogenomics Journal*, 12(2), 111–118. doi:10.1038/tpj.2010.79
- Hampras, S. S., Sucheston, L., Weiss, J., Baer, M. R., Zirpoli, G., Singh, P. K., ... Moysich, K. B. (2010). Genetic polymorphisms of ATP-binding cassette (ABC) proteins, overall survival and drug toxicity in patients with Acute Myeloid Leukemia. *International Journal of Molecular Epidemiology and Genetics*, 1(3), 201–207.

- Hoffmeyer, S., Burk, O., von Richter, O., Arnold, H. P., Brockmöller, J., John, A., ... Brinkmann, U. (2000). Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(7), 3473–3478. doi:10.1073/pnas.050585397
- Ho, M. M., Hogge, D. E., & Ling, V. (2008). MDR1 and BCRP1 expression in leukemic progenitors correlates with chemotherapy response in acute myeloid leukemia. *Experimental Hematology*, 36(4), 433–442. doi:10.1016/j.exphem.2007.11.014
- Hur, E.-H., Lee, J.-H., Lee, M. J., Choi, S.-J., Lee, J.-H., Kang, M. J., ... Lee, K.-H. (2008). C3435T polymorphism of the MDR1 gene is not associated with P-glycoprotein function of leukemic blasts and clinical outcome in patients with acute myeloid leukemia. *Leukemia Research*, 32(10), 1601–1604. doi:10.1016/j.leukres.2007.12.013
- Ieiri, I. (2012). Functional significance of genetic polymorphisms in P-glycoprotein (MDR1, ABCB1) and breast cancer resistance protein (BCRP, ABCG2). *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 27(1), 85–105.
- Illmer, T., Schuler, U. S., Thiede, C., Schwarz, U. I., Kim, R. B., Gotthard, S., ... Schaich, M. (2002). MDR1 gene polymorphisms affect therapy outcome in acute myeloid leukemia patients. *Cancer Research*, 62(17), 4955–4962.
- Imai, Y., Nakane, M., Kage, K., Tsukahara, S., Ishikawa, E., Tsuruo, T., ... Sugimoto, Y. (2002). C421A polymorphism in the human breast cancer resistance protein gene is associated with low expression of Q141K protein and low-level drug resistance. *Molecular Cancer Therapeutics*, 1(8), 611–616.
- Jamrozik, K., Balcerczak, E., Cebula, B., Janus, A., Mirowski, M., & Robak, T. (2006). No influence of 3435C>T ABCB1 (MDR1) gene polymorphism on risk of adult acute

- myeloid leukemia and P-glycoprotein expression in blast cells. *Therapeutic Drug Monitoring*, 28(5), 707–711. doi:10.1097/01.ftd.0000245770.75097.3f
- Johnstone, R. W., Ruefli, A. A., & Smyth, M. J. (2000). Multiple physiological functions for multidrug transporter P-glycoprotein? *Trends in Biochemical Sciences*, 25(1), 1–6.
- Kasza, I., Várady, G., Andrikovics, H., Koszarska, M., Tordai, A., Scheffer, G. L., ... Sarkadi, B. (2012). Expression Levels of the ABCG2 Multidrug Transporter in Human Erythrocytes Correspond to Pharmacologically Relevant Genetic Variations. *PLoS ONE*, 7(11), e48423. doi:10.1371/journal.pone.0048423
- Kimchi-Sarfaty, C., Oh, J. M., Kim, I.-W., Sauna, Z. E., Calcagno, A. M., Ambudkar, S. V., & Gottesman, M. M. (2007). A “silent” polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. *Science (New York, N.Y.)*, 315(5811), 525–528. doi:10.1126/science.1135308
- Kim, D. H., Park, J. Y., Sohn, S. K., Lee, N. Y., Baek, J. H., Jeon, S. B., ... Lee, K. B. (2006). Multidrug resistance-1 gene polymorphisms associated with treatment outcomes in de novo acute myeloid leukemia. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, 118(9), 2195–2201. doi:10.1002/ijc.21666
- Krishnamurthy, P., & Schuetz, J. D. (2006). Role of ABCG2/BCRP in biology and medicine. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 46, 381–410. doi:10.1146/annurev.pharmtox.46.120604.141238
- Mizuarai, S., Aozasa, N., & Kotani, H. (2004). Single nucleotide polymorphisms result in impaired membrane localization and reduced atpase activity in multidrug transporter ABCG2. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, 109(2), 238–246. doi:10.1002/ijc.11669
- Monzo, M., Brunet, S., Urbano-Ispizua, A., Navarro, A., Perea, G., Esteve, J., ... CETLAM. (2006). Genomic polymorphisms provide prognostic information in intermediate-risk

- acute myeloblastic leukemia. *Blood*, 107(12), 4871–4879. doi:10.1182/blood-2005-08-3272
- Morisaki, K., Robey, R. W., Ozvegy-Laczka, C., Honjo, Y., Polgar, O., Steadman, K., ... Bates, S. E. (2005). Single nucleotide polymorphisms modify the transporter activity of ABCG2. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 56(2), 161–172. doi:10.1007/s00280-004-0931-x
- Müller, P., Asher, N., Heled, M., Cohen, S. B., Risch, A., & Rund, D. (2008). Polymorphisms in transporter and phase II metabolism genes as potential modifiers of the predisposition to and treatment outcome of de novo acute myeloid leukemia in Israeli ethnic groups. *Leukemia Research*, 32(6), 919–929. doi:10.1016/j.leukres.2007.10.011
- Oselin, K., Gerloff, T., Mrozikiewicz, P. M., Pähkla, R., & Roots, I. (2003). MDR1 polymorphisms G2677T in exon 21 and C3435T in exon 26 fail to affect rhodamine 123 efflux in peripheral blood lymphocytes. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 17(4), 463–469.
- Qian, X., Cao, S., Yang, G., Dong, J., Jin, G., Shen, Y., & Hu, Z. (2012). Variant genotypes of MDR1 C3435T increase the risk of leukemia: evidence from 10 case–control studies. *Leukemia & Lymphoma*, 53(6), 1183–1187. doi:10.3109/10428194.2011.641179
- Reyes, C., & Chang, G. (2005). Structure of ABC Transporter MsbA in Complex with ATP·Vi and Lipopolysaccharide: Implications for Lipid Flipping. *Science Highlight*, 308, 1028–31.
- Rund, D., Krichevsky, S., Bar-Cohen, S., Goldschmidt, N., Kedmi, M., Malik, E., ... Ben-Yehuda, D. (2005). Therapy-related leukemia: clinical characteristics and analysis of new molecular risk factors in 96 adult patients. *Leukemia*, 19(11), 1919–1928. doi:10.1038/sj.leu.2403947

- Sarkadi, B., Homolya, L., Szakacs, G., & Varadi, A. (2006). Human Multidrug Resistance ABCB and ABCG Transporters: Participation in a Chemoimmunity Defense System. *Physiological Reviews*, 86(4), 1179–1236. doi:10.1152/physrev.00037.2005
- Sarkadi, B., Ozvegy-Laczka, C., Németh, K., & Váradi, A. (2004). ABCG2 -- a transporter for all seasons. *FEBS Letters*, 567(1), 116–120. doi:10.1016/j.febslet.2004.03.123
- Seedhouse, C. H., Grundy, M., White, P., Li, Y., Fisher, J., Yakunina, D., ... National Cancer Research Network. (2007). Sequential influences of leukemia-specific and genetic factors on p-glycoprotein expression in blasts from 817 patients entered into the National Cancer Research Network acute myeloid leukemia 14 and 15 trials. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 13(23), 7059–7066. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-1484
- Sharom, F. J. (2008). ABC multidrug transporters: structure, function and role in chemoresistance. *Pharmacogenomics*, 9(1), 105–127. doi:10.2217/14622416.9.1.105
- Solé, X., Guinó, E., Valls, J., Iniesta, R., & Moreno, V. (2006). SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 22(15), 1928–1929. doi:10.1093/bioinformatics/btl268
- Sparreboom, A., Gelderblom, H., Marsh, S., Ahluwalia, R., Obach, R., Principe, P., ... McLeod, H. L. (2004). Diflomotecan pharmacokinetics in relation to ABCG2 421C>A genotype. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 76(1), 38–44. doi:10.1016/j.clpt.2004.03.003
- Steinbach, D., Sell, W., Voigt, A., Hermann, J., Zintl, F., & Sauerbrey, A. (2002). BCRP gene expression is associated with a poor response to remission induction therapy in childhood acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 16(8), 1443–1447. doi:10.1038/sj.leu.2402541

- Szilvási, A., Andrikovics, H., Kalmár, L., Bors, A., & Tordai, A. (2005). Asymmetric PCR increases efficiency of melting peak analysis on the LightCycler. *Clinical Biochemistry*, 38(8), 727–730. doi:10.1016/j.clinbiochem.2005.04.015
- Tiribelli, M., Fabbro, D., Franzoni, A., Fanin, R., Damante, G., & Damiani, D. (2013). Q141K polymorphism of ABCG2 protein is associated with poor prognosis in adult acute myeloid leukemia treated with idarubicin-based chemotherapy. *Haematologica*, 98(3), e28–e29. doi:10.3324/haematol.2012.075895
- Van der Holt, B., Van den Heuvel-Eibrink, M. M., Van Schaik, R. H. N., van der Heiden, I. P., Wiemer, E. A. C., Vossebeld, P. J. M., ... Sonneveld, P. (2006). ABCB1 gene polymorphisms are not associated with treatment outcome in elderly acute myeloid leukemia patients. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 80(5), 427–439. doi:10.1016/j.clpt.2006.07.005
- Wang, F., Liang, Y., Wu, X., Chen, L., To, K. K. W., Dai, C., ... Fu, L. (2011). Prognostic value of the multidrug resistance transporter ABCG2 gene polymorphisms in Chinese patients with de novo acute leukaemia. *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)*, 47(13), 1990–1999. doi:10.1016/j.ejca.2011.03.032
- Wang, J., Wang, B., Bi, J., Li, K., & Di, J. (2012). MDR1 gene C3435T polymorphism and cancer risk: a meta-analysis of 34 case–control studies. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 138(6), 979–989. doi:10.1007/s00432-012-1171-9
- Wang, L.-H., Song, Y.-B., Zheng, W.-L., Jiang, L., & Ma, W.-L. (2013). The association between polymorphisms in the MDR1 gene and risk of cancer: a systematic review and pooled analysis of 52 case-control studies. *Cancer Cell International*, 13(1), 46. doi:10.1186/1475-2867-13-46

Tételes szerzői hozzájárulás

Alulírott Papp Rita a dolgozatban leírt munkafolyamatok közül a:

- DNS kivonást (részt vettem az eljárásban),
 - LightCycler genotipizálást,
 - statisztikai analízist (SPSS, SNPStats programok)
- végeztem el.

Budapest, 2015. 01. 06.

.....

aláírás