**Pályázó neve: Dr. Pál Ildikó**

**Pályázó munkahelye: DEKK Belgyógyászati Intézet B Épület**

**Kutatási téma címe: A cereblon-ß-katenin és GSTP1 gén polimorfizmusok szerepe a myeloma multiplex kezelésében**

**Pályázott összeg: 355.106**

**KUTATÁSI TERV ÖSSZEFOGLALÁSA EGY OLDALBAN**

A myeloma multiplexben szenvedő betegek terápiára adott válaszát, valamint eseménymentes és teljes túlélési adatait számos tényező befolyásolhatja. Egyre nagyobb hangsúly helyeződik olyan gén polimorfizmusok vizsgálatára, melyek szerepet játszhatnak a kemoterápiás szerek detoxifikálásában és metabolizmusában. A betegség kezelésében jelentős szereppel bíró immunmoduláns szerek –thaildomid, lenalidomid- a cereblon-ß-katenin útvonalon keresztül fejtik ki hatásukat és ezeken az útvonalakon keresztül alakulhat ki a fenti gyógyszerekre rezisztencia is. Vizsgálatunkban a cereblon és ß-katenin gén polimorfizmusainak függvényében értékelnénk a betegség súlyosságát, valamint a terápiás választ, a betegek eseménymentes és teljes túlélését, valamint a terápia mellékhatásait.

Nemcsak a cereblon és ß-katenin gén fontossága hangsúlyozandó, hanem gyógyszermetabolizmus gének polimorfizmusa is jelentős. Tanulmányunkban az ismert gyógyszermetabolizáló gének közül a glutathion-S-transzferáz egyik altípusának (GSTP1) polimorfizmusait vizsgálnánk. A GSTP1 105 és 114 ugyanis szerepet játszhatnak a betegség kialakulásában, a melphalan, cyclophosphamid, vincristin, adriamycin, cisplatin, etoposid, thiotepa, chlorambucil, busulphan terápia hatékonyságában, valamint a betegek eseménymentes és teljes túlélésének alakulásában, továbbá a terápia mellékhatásainak jelentkezésében. A különböző polimorfizmusokat PCR módszerrel határoznánk meg a Debreceni Egyetem Klinikai Központ Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézetében, a kapott eredmények feldolgozása pedig SPSS20 statisztikai program felhasználásával történne.

**RÉSZLETES KUTATÁSI TERV (MAXIMUM 5 OLDAL)**

A myeloma multiplex (MM) olyan malignus hematológiai betegség, mely a daganatos betegségek 1 %-áért tehető felelőssé. A betegség kezelésében egyre jelentősebb szerepe van immunmoduláns szereknek, az úgynevezett IMID-eknek, így a thalidomidnak, lenalidomidnak és pomalidomidnak, ugyanis ezek a terápiás készítmények szignifikánsan javították a betegek túlélési esélyeit. A thalidomid úgy fejti ki hatását, hogy a cereblonhoz kötődik meggátolva ezáltal az E3 ubiquitin ligáz funkciót, valamint pleiotrop hatást is kifejt a myeloma sejtekre, a p21 up- és interleukin-8 down-regulációját és ezáltal a G0/G1 átmenet felfüggesztését okozva. A thalidomid és lenalidomid kezelés egyik legnagyobb korlátozó tényezője az, hogy a myeloma sejtek képesek rezisztenciát kialakítani az említett gyógyszerekkel szemben. A folyamat teljesen még nem tisztázott, de a ß-katenin/Wnt útvonal kóros regulációjának szerepe a lenalidomid rezisztenciában megfigyelhető. A ß-katenin az egyik kulcs szereplője egy fő nukleáris jelátviteli útvonalnak, az ún. Wnt útvonalnak. Az utóbbi útvonalon a transzkripciós koaktivátor ß-katenin foszforilálódik az Axin/CK1a/APC/GSK3 komplex által és degradálódik, majd a ß-katenin akkumulációja és magba történő transzportja megnövelheti a sejtek túlélési esélyeit. Intenzív thalidomid kezelést követően így a ß-katenin akkumuláción kívül számos anti-apoptotikus és túlélést elősegítő faktor fokozott expresszióját is megfigyelhetjük, hozzájárulva a lenalidomid rezisztencia kialakulásához.

A cereblon felelős lehet tehát az immunmoduláns szerek –thalidomid, lenalidomid- aktivitásáért, továbbá a Wnt/ß-katenin útvonal szerepet játszhat a lenalidomid rezisztencia kialakulásában. A cereblont kódoló gén (CRBN) emberekben a 3. kromoszómán helyezkedik el. A ß-katenin gén (CTNNB1) szintén a 3. kromoszómán helyezkedik el. Az rs4135385 polimorfizmus adenin-guanin cserét jelent a 13-as intronban. Egy másik CTNNB1 polimorfizmus, rs4533622 adenin-citozin szubsztitúciót jelent. Egy tanulmány szerint a CTNNB1 rs4533622 polimorfizmus kapcsolatba hozható a myeloma multiplex aktivitásával, súlyosságával. A CTNNB1 rs4135385 polimorfizmus prediszponáló tényező lehet a betegség kialakulását illetően. Megfigyelték, hogy CTNNB1 rs4135385 AA homozigótaság esetén a CTD kezelés hatékonyabb, illetve a progresszió esélye is alacsonyabb, viszont nagyobb eséllyel alakul ki neutropenia a lenalidomid kezelés során. Továbbá a high grade (3-4) neutropenia a CTNNB1 rs4533622 AA homozigóta formájával hozható összefüggésbe. A lenalidomid hatással van a cereblonra, ugyanis képessé teszi transzkripciós faktorok (IKZF1 és IKZF2) degradálására. Továbbá a lenalidomid és thalidomid destabilizálja a Wnt/ß-katenin útvonalat növelve a ß-katenin sejten belüli koncentrációját, előidézve a c-myc és más anti-apoptotikus faktorok expresszióját, és mindezek eredményeképpen lenalidomid/thalidomid rezisztencia alakulhat ki. Az ilyen myeloma sejtekben a CRBN expresszió mértéke is csökken, mely akár lehet a megnövekedett ß-katenin szint következménye is. Összefoglalva elmondható, hogy CTNNB1 gén polimorfizmusa befolyásolhatja a betegség kialakulását, súlyosságát, valamint a kezelés hatékonyságát, ezért további tanulmányok szükségesek a pontos mechanizmus és jelentőség tisztázására.

A cereblonon és ß-kateninen kívül gyógyszermetabolizáló gének polimorfizmusai is szerepet játszhatnak a myeloma multiplex kezelésének hatékonyságában. A glutathion-S-transzferáz (GST) olyan enzimek nagyobb csoportja, melyek számos xenobiotikum és kemoterápiás szer detoxifikálásáért felelősek. A GSTP1 az egyik legjelentősebb tagja a GST családnak, melynek szubsztrátjai közé tartozik számos kemoterápiás szer, így például a melphalan, cyclophosphamid, vincristin, adriamycin, cisplatin, etoposid, thiotepa, chlorambucil, busulphan is. A GSTP1 esetén 2 szubsztitúció jelentős, az Ile105Val és Ala114Val aminosav szubsztitúciók. A GSTP1 105Val variáns alacsonyabb hőstabilitást jelent és megváltozott katalitikus aktivitást. Thiotepa alkalmazásánál például 2x lassabb a katalitikus aktivitás 105Val variáns esetén. A GSTP1 környezeti toxinok detoxifikálásában is szerepel. 105Val variáns esetén nagyobb az emlő, prosztata, húgyhólyag és here daganatok előfordulási gyakorisága. Myeloma multiplexes betegek esetén is tanulmányozták ezeket a polimorfizmusokat és azt találták, hogy azon myeloma multiplexes betegek esetén, akik adriamycin, cyclophosphamid, melphalan kezelésben részesültek, a GSTP1 105 genotípus független prognosztikai marker. A GSTP1 105 variáns esetén az enzim detoxifikáló képessége csökken, ezáltal a kemoterápiás ágensek hatékonysága nő. Az eseménymentes és teljes túlélés tekintetében a GSTP1 105Ile homozigóta formája esetén kedvezőbbek az eredmények. A kemoterápiás szerek detoxifikálása a GSTP1 útvonalon keresztül nemcsak a polimorfizmusoktól, hanem az enzimkoncentrációktól is függ. A GSTP1 expresszió individuális variációt mutat. Számos karcinogén, mint például a benzén, dioxinok, dohányfüst, a GSTP1 szubsztrátjai, de ennek ellenére nem találtak összefüggést a GSTP1 105 és 114 genotípusok és a myeloma multiplex kialakulásának nagyobb rizikója között.

Az említett polimorfizmusok - CRBN, CTNNB1, GSTP1 polimorfizmus- vizsgálata a myeloma multiplex kezelésében nagy segítséget jelenthet, ugyanis ezek a polimorfizmusok összefüggést mutathatnak a betegség súlyosságával, a terápia hatékonyságával, a betegek túlélési adataival, így ismeretük segíthet sikeresebb terápiás terv készítésében.

Módszerek:

100 myeloma multiplex miatt gondozott beteg bevonását tervezzük, akik thalidomid vagy lenalidomid bázisú kezelésben részesültek. A vizsgálat részét képezné a betegség típusának, stádiumának, a kezelésre adott válaszreakciónak, valamint az eseménymentes és teljes túlélési adatoknak a CRBN és CTNNB1, valamint GSTP1 gén polimorfizmusok függvényében történő értelmezése. A polimorfizmus vizsgálatok a Debreceni Egyetem Klinikai Központ Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézetében végezhetőek. A CRBN és CTNNB1 genotípus meghatározása perifériás EDTA-s csőbe levett perifériás vérmintából történne. A CRBN (rs121918368) és ß-katenin (rs4135385 A>G, rs4533622 A>C) polimorfizmusokat Real-Time PCR módszerrel vizsgálhatjuk.

100 olyan myeloma multiplexes beteget is vizsgálnánk, akik cyclophosphamid és adriamycin alapú kezelésben részesültek. Vizsgálatunk tárgyát képezné a betegség stádiumának, az eseménymentes és teljes túlélési adatok GSTP1 polimorfizmusok (GSTP1 105, GSTP1 114) függvényében történő vizsgálata. A polimorfizmusok vizsgálata EDTA-s csőbe levett vérmintából történne allél-specifikus PCR alkalmazásával. 2 szeparált reakcióban a vad típusra és variáns típusra specifikus primereket kombinálnánk egy közös primerrel. GSTP1 105 polimorfizmus vizsgálatánál a következő primereket használnánk: 5’TCAGTTGCCCGGGCACTG, 5’TGGTGTCTGGCAGGAGGC és 5’TGGTGTCTGGCAGGAGGT. A genotípusok meghatározásához 10 ng DNS szükséges egy 20 mikroliteres közegben. A GSTP1 114 polimorfizmus tekintetében a primer szekvenciák: 5’TCAGTTGCCCGGGCAGTG, 5’TGGTGTCCTGGCAGGC, 5’TGGTGTCTGGCAGGAGGT.

Az eredmények feldolgozása SPSS20 statisztikai módszerrel történne.

**KÖLTSÉGTERV**

Megnevezés Mennyiség Listaár

FG,OFF THE SHELF GX SET 2 db 73.880

KIT, HIGH CAPACITY CDNA RT 1 db 248.400

TRI REAGENT 500 ml 32.826

 **355.106**

**A TERVEZETT KUTATÁS HELYSZÍNE ÉS LABORATÓRIUMI HÁTTERE**

Kutatásunkat 2 helyszínen végeznénk. A betegek vizsgálata a DEKK Belgyógyászati Intézet B Épület Hematológiai Tanszéken történne, mely 50 fekvőbeteg ággyal rendelkezik. 12 hematológus szakorvos vesz részt a hematológiai betegek gondozásában, valamint a graduális és posztgraduális oktatásban. Évente kb. 30 új myeloma multiplexes beteget diagnosztizálunk, illetve körülbelül 350 hematológiai beteget gondozunk.

A laboratóriumi vizsgálatokat a Debreceni Egyetem Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézetében végeznénk, ahol több kutatócsoport különféle kutatási területekkel foglalkozik, így megtalálható Apoptosis kutatócsoport, Apoptosis Signaling, Clinical Genomics, Nuclear Hormone Receptor Research, Nucleic Acids Research, Nutritional Bioactivation and Bioanalysis, Retroviral Biochemistry munkacsoport. Számos eszköz, így például Real Time- PCR, tömegspektrométer, áramlási citométerek segítik a kutatócsoportok munkáját.