

Új perspektíva a krónikus mieloid leukémia kezelésében? Géncsendesítőes terápia

Kiss-Tóth Éva¹, Juhászné Szalai Adrienn¹, Koska Péter¹, Szebeni János^{1,4,5},
Kiss-Tóth Emőke³, Barkai László², Fodor Bertalan¹

Miskolci Egyetem Egészségügyi Kar, ¹Nanobiotechnológiai és Regeneratív Medicina Tanszék, ²Elméleti Egészségtudományi Tanszék, ³Védőnői Tanszék, Miskolc, ⁴Semmelweis Egyetem, Nanomedicina Kutató és Oktató Központ, ⁵Bay Zoltán Alkalmazott Kutatási Közalapítvány, Budapest

A krónikus mieloid leukémia egy lassan progrediáló, mieloid őssejteket érintő fehérvérsejtes gyógyíthatatlan betegség. Hátterében a 22-es kromoszóma megrövidülése során létrejött fúziós onkogén áll, melynek terméke, a Bcr-Abl onkoprotein egy folyamatosan expresszálandó tirozinkináz fehérje. A betegség kezelésére a kemoterápiás, őssejt-transzplantációs és interferon- α -terápiás lehetőségek mellett elterjedt a tirozinkináz-gátlók alkalmazása. A T315I pontmutációt hordozó betegek azonban rezisztenciát mutatnak minden tirozinkináz-gátlóval szemben, amire megoldást jelenthet a napi hatóanyagadózis emelése vagy a terápia kombinálása. Az RNS-inteferencia vagy géncsendesítés felfedezése új megvilágításba helyezte a CML terápia lehetőségeit. Az anti-bcr-abl siRNA in vitro alkalmazása biztató eredményeket mutatott a betegség oki kezelésében, alkalmas a betegséggel kapcsolt új célgének azonosítására, azonban humán terápiában biztonságossága és hatékonysága még nem bizonyított. Magyar Onkológia 56:16-22, 2012

Kulcsszavak: krónikus mieloid leukémia, fúziós onkogén, tirozinkináz-gátlók, siRNA, géncsendesítés

Chronic myeloid leukemia is an incurable white blood cell disease with slow progression which affects myeloid stem cells. In the course of chromosome 22 shortening a fusion oncogene arises whose product, a Bcr-Abl oncoprotein, is a continuously expressed tyrosine kinase protein. Beside the opportunity of chemotherapy, stem cell therapy and interferon- α therapy, the application of tyrosine kinase inhibitors also became widespread in the treatment of the disease. Patients bearing the T315I point mutation, however, show resistance against all tyrosine kinase inhibitors, which can be managed by dose escalation or the combination of therapies. The discovery of RNA interference or gene silencing put the therapeutic opportunity of CML in new light. The in vitro application of anti-bcr-abl siRNA showed promising results in the causal treatment of the disease, feasible for identification of new genes associated to the disease, but we do not have sufficient evidence for the safety and efficacy of this method in human therapy.

Kiss-Tóth É, Juhászné Szalai A, Koska P, Szebeni J, Kiss-Tóth E, Barkai L, Fodor B. New perspective in the treatment of chronic myeloid leukemia? Gene silencing therapy. Hungarian Oncology 56:16-22, 2012

Keywords: chronic myeloid leukemia, fusion oncogene, tyrosine kinase inhibitor, siRNA, gene silencing

Levelezési cím: Kiss-Tóth Éva, Miskolci Egyetem, Egészségügyi Kar, Nanobiotechnológiai és Regeneratív Medicina Tanszék, 3515 Miskolc-Egyetemváros, B3/B4 ép., II. em., Telefon: (06-46) 565-111/2237, e-mail: evakisstoth@gmail.com

BEVEZETÉS

A fehérvérsejtes daganatok csoportjának egyik ritka, lassan progrediáló, ugyanakkor nehezen diagnosztizálható fajtája a krónikus mieloid leukémia (CML). A mieloid őssejteket érintő kromoszomális aberráció következtében a granulociták keletkezése kitér a szabályozási folyamatok alól, és abnormális szaporodásuk indul el. A túlsúlyba kerülő éretlen granulocita-előalakok mindamellett, hogy kiszorítják a többi vérsejtet a csontvelőből, képtelenek ellátni funkciójukat a szervezetben, így megnő a fertőzések kockázata. A folyamat pontos kiváltó oka nem ismert, de tudjuk, hogy kialakulásában egy genetikai hiba is szerepet játszik.

A betegséggel kapcsolatos legelső feljegyzések 1845-ből származnak, ahol két beteget jellemeztek leukocitózissal járó lépmegnagyobbodással, de a jelenség nem volt magyarázható az akkoriban elterjedt tuberkulózis patogenezisével (14).

Az 1960-as években teret hódító sejtbiológiai technikáknak köszönhetően sikerült azonosítani egy addig ismeretlen kromoszóma-rendellenességet, amely felelőssé tehető a betegség kialakulásáért. Egészen az 1980-as évekig gyógyíthatatlan betegséggként tartotta számon az orvostudomány, de ma már számos terápiás megoldás áll a betegek rendelkezésére, és ez a repertoár a jövőben tovább bővíthet a molekuláris biológia vívmányainak köszönhetően (16).

A CML ELŐFORDULÁSA ÉS FELISMERÉSE

A krónikus mieloid leukémia viszonylag ritka előfordulású (2), és többnyire a középkorú-idős populációt érinti, de fiatal korban sem zárható ki a megjelenése. Mivel a betegségnek lassú kezdeti fázisában nincsenek specifikus jelei, a diagnózisra gyakorta csak más okból készített rutin vérvékapszán kerül sor. Klinikai kivizsgálás során a csontvelőbiopszia elvégzése mellett további fontos lépést jelenthet a citogenetikai és molekuláris biológiai diagnosztika is, mely segítheti a pontos diagnózis felállítását és a megfelelő, célzott terápia kiválasztását.

A molekuláris diagnosztika egyre nagyobb hangsúlyt kap nemcsak a kezelés kiválasztásában, hanem a betegség kezelés alatti és azt követő monitorozásában is. Elmaagacli hívja fel a figyelmet arra, hogy fontos a bcr-abl transzkriptumok számának követése kvantitatív PCR-módszer alkalmazásával allogén őssejt-transzplantációt követően is. Segítségével prediktálható és megkülönböztethető a molekuláris, citogenetikai és hematológiai relapszus, illetve a terápia esetleges felfüggesztésének vagy helyettesítésének szükségessége (13, 15).

A CML MOLEKULÁRIS HÁTTERE

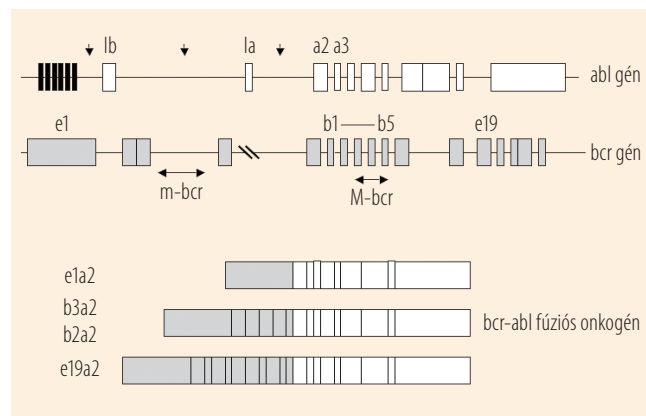
Ez a vérképzőszervi betegség genetikai rendellenességre vezethető vissza, melynek természete ma már jól ismert. A CML-ben szenvedők mieloid progenitor sejtjeiben a 22-es kromoszóma megrövidülése figyelhető meg, melyet Philadelphia-kromoszómaként emleget a szakirodalom.

1973-ban Rowley figyelte meg, hogy az aberráció hátterében egy reciprok kromoszómatranszlokáció áll, ami a 9-es és a 22-es kromoszómák között t(9; 22) megy végbe (31). A reciprok transzlokáció során a 22-es kromoszóma bcr gént kódoló szakaszának egy része átkerül a 9-es kromoszóma abl gént kódoló régiójába, így az meghosszabbodik, szemben a 22-es kromoszóma rövidülésével. A kicserélődés során a 9-es kromoszómáról is visszakerül egy kis abl-génszakasz a 22-es kromoszómára, létrehozva a rendellenes bcr-abl fúziós gént (16, 25).

A rendellenes gén kialakulásában fontos szempont, hogy transzlokáció során bekövetkező kromoszómatörés különböző helyeken is megtörténhet egy adott génen belül, eltérő hosszúságú és összetételű fúziós géneket eredményezve. Az abl génen belüli törés bárhol végbemehet az 5' végen számított >300 kb szegmensben belül, leggyakrabban az Ib exon előtt upstream, az Ib és az Ia exon között vagy az Ia és a2 exon között (1. ábra). Ezzel szemben a bcr génen belüli leggyakoribb töréspont az 5,8 kb régióban játszódik le, a nagyobbik törés klaszter régióban (M-bcr). Ez egy 5 exont átfogó, korábban b1-b5 jelű régió, mai használatban a bcr 12-16. exon régiójának felel meg. A keletkezett hibrid gén neve a törési pontok jelölésével történik a fentiek szerint b3a2 vagy b2a2 kapcsolódási pontokkal. A génről átíródó protein 210 kDa nagyságú fúziós protein (p210Bcr-Abl).

Ritka esetekben a bcr génen a törés végbemehet az úgynevezett kis bcr régióban is (m-bcr), az upstream elhe-

1. ábra. A bcr és abl gének transzlokációs törési helyeinek illetve a bcr-abl fúziós onkogén variánsok sematikus képe



lyezkedő hosszú (54,4 kb) intronon belül (7). Ennek eredményeként egy 190 kDa Bcr-Abl fúziós protein keletkezik (p190Bcr-Abl) (16, 25). A legnagyobb fúziós onkogén terméként keletkezik a p230Bcr-Abl (e19a2) onkoprotein, de ez ritkán jelenik meg a klasszikus CML-ben.

A törési pontok variabilitásának következményeként különféle fúziós proteinváltozatok keletkeznek. A p210 típusú onkoprotein variánsra jellemző a granulociták és a megakariociták neoplasztikus expansziója. A sejtek mielocita/metamielocita köztes fázisban rekednek, meggátolva azokat a differenciálódási és érési folyamataikban (9). A p190Bcr-Abl onkoproteinhez kapcsolható fenotípust ellenben a monocitózis jellemzi, alacsony neutrofil/monocita arány mellett. A p190 variáns esetében a progenitorsejtek egy mieloproliferatív defektust szenvednek el, míg a p210 variáns következtében a granulociták differenciálódási útvonalai hibásodnak meg.

A BCR-ABL GÉN MANIFESZTÁCIÓJA

A betegség kialakulásáért felelőssé tehető aberráns gén terméke egy fúziós onkoprotein. Az Abl fehérje normális esetben egy szabályozott tirozinkináz enzim, mely ingázik a sejtmag és a citoplaszma között, szerepét ellátva. Proapoptotikus funkciója többnyire sejtválaszt és genotoxikus válaszreakciók során nyilvánul meg (16). A kiméra onkoproteinben a Bcr fehérje rész, mely a két fehérje dimerizációját idézi elő. Egy mást foszforilálva egy folyamatosan aktív tirozinkináz enzimet hoznak létre. Funkciójánál fogva többnyire a citoplazmában helyezkedik el, számos fehérje foszforilálását okozva. Részt vesz olyan jelátviteli útvonalak szabályozásában is, ahol növekedési faktortól független proliferációt okoz, illetve antiapoptotikus hatása révén a differenciálatlan sejtek túlélését segíti. Csökkenti a leukémiás sejtek csontvelői stroma-hoz való kitapadási képességét, ezáltal nőhet a véráramban keringő éretlen blasztos sejtek száma (10).

A fent említett folyamatok következtében a csontvelői progenitor sejtekből nem alakulnak ki differenciált vesejtek, hanem azok differenciálatlan állapotban megakadva korlátlanul szaporodni kezdenek, kiszorítva a többi vesejtet. Végül soron a funkciójukat ellátni nem képes, kóros működésű sejtek kerülnek többségbe. A betegség tünetei nem specifikusak, és a progressziója viszonylag lassú, ezért legtöbbször már csak a krónikus fázisban diagnosztizálják, innen ered az elnevezésben a „krónikus” megjelölés is.

A CML TERÁPIÁS LEHETŐSÉGEI

A betegség felismerését követő kezdeti terápiás megoldásként szolgált a kemoterápia és radioterápia kombinált alkalmazása. Az 1950-ben elsőként alkalmazott kemoterápiás szer a busulfan

volt, majd felváltotta a hydroxyurea. A kemoterapeutikumok a fehérvérsejtszám szabályozásában és tüneti kezelésben játszottak szerepet, többnyire a krónikus fázisban. Akcelerált és blasztos fázisban hatásuk elenyészőnek bizonyult, mindemellett számos mellékhatásuk is jelentkezett.

Új lehetőséget biztosított az őssejt-transzplantációs terápia azoknak, akik rezisztenssé váltak a klasszikus kemoterápiával szemben. A donortól származó egészséges (allogén) vagy saját kezelt (autológ) őssejtek betegbe való juttatásával helyettesíthetővé váltak a problémát okozó őssejtek a CML-es betegekben. A transzplantációt követően azonban gyakran tapasztalták a relapszus jelenségét, melynek fő közvetítői az allogén T-sejtek (16).

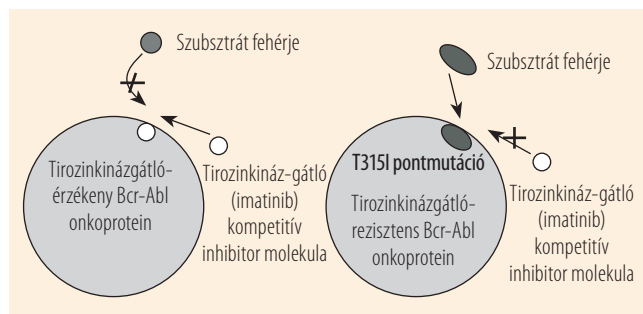
A transzplantációra nem reagáló betegek kiegészítő kezelésére alkalmazzák az interferon-alfa-terápiát. A betegek 10–30%-ában teljes gyógyulás érhető el általa, teljes citogenetikai választ és hosszabb túlélést biztosítva, szemben az addigi terápiákkal. Hátránya azonban, hogy a betegek 90%-ánál komoly mellékhatásokkal kell számolni (8).

A betegség genetikai hátterét megismerve egyre nagyobb lett a törekvés újabb, specifikus molekuláris alapú terápiás szerek kifejlesztésére. Az 1990-es években számos tirozinkináz-gátló kis molekulát sikerült izolálni illetve szintetizálni, de a legelterjedtebb az imatinib (Gleevec vagy Glivec) lett. Ez a kis molekula képes specifikusan gátolni minden Abl-tartalmú fehérjét, illetve Abl-rokon (ARG) fehérjét, ezáltal gátolja a kóros sejtek növekedését, és apoptózist indukál (5, 28). Az imatinibet legelsőként 1998-ban alkalmazták azoknál a betegeknél, akik az interferont már nem tolerálták. Eredményeképpen a betegek 95%-ánál sikerült teljes hematológiai, illetve 40–50%-nál teljes citogenetikai választ elérni krónikus fázisban (11, 12). Az új szer hamarosan élvonalbeli terápiás ágensként jelent meg, és jelenleg is primer terápiás megoldásként alkalmazzák. Egy hét évig tartó tanulmány (IRIS) szerint a betegek 74%-a teljes citogenetikai választ mutatott napi 400 mg dózis mellett (27), 81%-os teljes túlélési mutatóval (3). A sikerek ellenére azonban bizonyos betegekben imatinib-intolerancia illetve -rezisztencia jelei mutatkoztak.

TIROZINKINÁZINHIBITOR-REZISZTENCIA

Imatinib-terápia alkalmazása során akkor beszélhetünk rezisztencia kialakulásáról, amikor a kezelés megkezdésétől számított 6–18 hónapon belül nem jelentkezik a hematológiai és citogenetikai válaszreakció a betegben. A primer vagy elsődleges hematológiai rezisztencia ritka és kevésbé ismert, szemben a citogenetikai rezisztenciával, melyben a rezisztens betegek 15–25%-a érintett lehet. A primer rezisztencia jelenléte rizikófaktoraként vehető figyelembe egy másodlagos rezisztencia kialakulásában (33).

2. ábra. A Bcr-Abl onkoprotein ATP-kötő zsebében kialakult pontmutáció következménye a tirozinkináz-gátlók hatására nézve



A másodlagos rezisztencia olyan molekuláris folyamatokat foglal magában, amelyek hozzájárulnak az imatinib-érzékenység kialakulásához. A kináz doménben megjelenő pontmutációk – például Bcr-Abl/T315I, melynek következtében a 315. threonin aminosav isoleucinra cserélődik – olyan konformációváltozással járnak, amely következtében a hatóanyag nem képes kötődni és kifejteni hatását az enzim adezozin-trifoszfát-kötő zsebében (2. ábra) (4). A T315I az egyik leggyakoribb, rezisztenciát kiváltó pontmutációs jelenség. Nagy problémát jelent a tirozinkináz-gátlók alkalmazása során, hiszen meglete kizárja az imatinib és bizonyos második generációs tirozinkináz-gátlók alkalmazását is (nilotinib, dasatinib).

A molekuláris rezisztencia hátterében állhat a Bcr-Abl fehérje túlermelődése, vagy a Philadelphia kromoszóma nagyobb számban való jelenléte is a sejtben (17, 21). Mesterségesen létrehozott mutagenézis vizsgálatok során azt is kimutatták, hogy a sejtek képesek alternatív jelátviteli útvonalakat is aktiválni, amelyek segítségével „áthidalják” az imatinib általi gátlást, de a kináz doménen kívül is létrejöhetnek spontán pontmutációk (1). Továbbá nem szabad megfeledkeznünk annak a lehetőségéről sem, hogy a gyógyszer hatása csökkenhet, ha annak mennyisége a terápiás koncentráció határértéke alá csökken. Ebben szerepe lehet az import fehérjék csökkent működésének, multidrug-rezisztencia gén (MDR-1) jelenlétének, esetleg gyógyszer-kölcsönhatásoknak (3).

Az imatinib-rezisztencia okainak ismeretében felmerült az igény a második generációs tirozinkináz-gátlók kifejlesztésére annak érdekében, hogy a korábbinál nagyobb hatékonyságú, és az imatinib-rezisztenciát okozó mutáns Bcr-Abl variánsal szemben is potens hatóanyagot alkalmazhassanak a CML-es betegek kezelésére. A dasatinib és nilotinib hatékonynak bizonyult számos pontmutációval szemben kisebb napi dózisban is, azonban ezek sem jelentettek végleges megoldást a T315I pontmutációt hordozó betegek kezelésében.

A második generációs tirozinkináz-inhibitorok sikertelensége után az Ambit Bioscience cég fejlesztette ki a harmadik generációs terméket, az Aurora kináz-inhibitor VX-680-at, célzottan a korábban említett, erős rezisztenciát okozó mutáns Bcr-Abl onkoproteinnel szemben (33). Az I/II. fázisú klinikai vizsgálatok biztató eredményeket mutatnak hatékonyságát illetően, de a további vizsgálatokat beállították szívproblémát okozó mellékhatása miatt.

A CML-es betegek terápiás kezelésében imatinib-rezisztencia esetén az első opció a napi dózis emelése, ami bizonyos esetekben (alacsony hatóanyag dózis, csökkent import folyamatok) elégséges lehet. Második generációs szerekkel való helyettesítése esetén figyelembe kell venni a beteg kórtörténetét, illetve egyéb betegségeit a mellékhatások elkerülése érdekében (3). Végül felmerül a lehetősége az önmagukban nem elég hatékony tirozinkináz-gátlók kombinált adásának. Ezek a megoldások azonban még további vizsgálatokat igényelnek a kombinált alkalmazás biztonságosságának meghatározására (33).

GÉNTERÁPIA A CML KEZELÉSÉBEN?

A korábbi sikertelen terápiás próbálkozások további megoldások keresésére sarkallták a kutatókat. A 2000-es évek elején felfedezett RNS-interferencia újabb reményre adhat okot a CML-ben szenvedőknek.

Az RNS-interferencia jelensége az eukarióta sejtek sajátos védekezési mechanizmusa a sejtbe bekerülő idegen (pl. vírus) örökítő anyagok illetve a sejtben keletkezett hibás nukleinsav-termékek hatástalanítására. Az interferencia a gének átírását követően, poszttranszkripció szinten játszódik le. A folyamatot a sejtben keletkező vagy bejuttatott dupla szálú kis RNS-szakaszok (siRNS) antisense hatás révén közvetítik. A citoplazmában bekapcsolódnak az RNS-indukálta csendesítő komplexbe (RISC), ahol a sense (vezető) szál lebomlik, az antisense (követő) szál pedig bekötődik a komplex katalitikus egységébe. Az antisense szál részleges vagy teljes homológia révén felismeri és megköti a kiegészítő mRNS-szakaszokat, és azok feldarabolását, lebomlását váltja ki. A lebontás egy sorozatos hidrolízis, ennek során Mg^{2+} ionok jelenlétében a hasító enzim feldarabolja az mRNS foszfodiészter láncát és 5'-PO₄ valamint 3'-OH csoportok felszabadulását eredményezi (22). Végül a sejtben lévő exonukleázok kötődnek az RNS-fragmentekhez és befejezik a lebontásukat (29). A folyamat lebonyolításában a komplex egyik fő alkotóeleme, az Ago2 protein aktívan vesz részt. Ezt a jelenséget próbálja felhasználni a molekuláris biológia nemcsak betegségmodellek létrehozásában, hanem számos gyógyíthatatlan betegség kezelésében és a rákterápiában is.

A rák multifaktoriális betegség, melyben alapvetően mutációs vagy epigenetikai változások hatására a sejtek

szaporodási és elhalási folyamatai kilépnek a szabályozási kontroll alól, és korlátlan sejtburjánzás indul el. A mutációk kialakulásáért felelősek lehetnek a vírusok által közvetített onkogének, illetve a sejt saját genomjában fellelhető proto-onkogének. A krónikus mieloid leukémiában a kromoszómatranszlokáció során keletkező fúziós gén is egy onkogén, amely kizárólagosan a mieloid sejtekben fejeződik ki (18).

Génterápia vagy géncsendesítés során az RNS-interferenciát használják fel arra, hogy a sejtbe juttatott mesterséges siRNS-szakaszok segítségével hatástalanítsák a fúziós onkogénről átíródott mRNS-molekulákat és végső soron a róluk keletkező hibás fehérjéket. A szintetikus siRNS-ek 21 nukleotid hosszúságú szakaszok, gyakran tartalmaznak kémiai módosításokat a stabilitásuk és a sejtbe való könnyebb bejutásuk érdekében. A szintetikus kis RNS-szakaszok hatékonysága szempontjából fontos a bcr-abl génnel való teljes homológia. Murao leírta, hogy a Bcr-Abl (p210) ellen tervezett siRNS 3' végének kémiai módosítása mind a vezetős, mind a követő szálaikon hatékonyabb géncsendesítést eredményezett K562 leukémia-sejtvonalon (26).

Az első génterápiás próbálkozások CML kezelésében in vitro a bcr-abl onkogént kifejező K562 leukémia-sejtvonalon történtek. Wilda és munkatársai az M-bcr-abl variáns ellen tervezett siRNS hatását hasonlította össze a tirozinkináz-inhibitor kezelés hatékonyságával szemben. Az onkogén ellen tervezett siRNS hatása mRNS- és fehérjeszinten jelentős gátlást eredményezett. Mindemellett a leukémias sejtek apoptotikus folyamatait is felerősítette. Az imatinibbel közel azonos hatást váltott ki az siRNS-kezelés is, bár ez időben később jelentkezett a Bcr-Abl onkoprotein hosszú féléletidejének köszönhetően. A kétféle terápia közös alkalmazása nem hozott additív hatásfokozódást (37). Ezen a gondolatmeneten továbbhaladva Scherr és munkatársai a kísérletet kiterjesztették 6 CML-ben szenvedő beteg véréből nyert primer sejtekre is. A korábbiakhoz hasonló mértékű gátlást kaptak bcr-abl mRNS- és fehérjeszinten, ellenben ez a normális c-bcr és c-abl mRNS mennyiségét nem befolyásolta. A Bcr-Abl-függő sejtprolifерáció mértéke is lecsökkent a géncsendesítés hatására (32).

Az RNSi gyakorlati alkalmazásának lehetőségei tovább bővültek a CML kezelésében. Számos olyan irodalmat olvashatunk a témában, ahol a géncsendesítést a betegséggel szorosan kapcsolódó gének, jelátviteli útvonalak „feltérképezésére” használják fel, ami a betegség patomechanizmusának megértéséhez közelebb viheti jelenlegi ismereteinket.

A krónikus mieloid leukémia egy fontos, de nem teljesen tisztázott folyamata a blasztos sejtek korlátlan szaporodása, amely révén ezek a sejtek „túlnövik” a normálisan működő, funkcionális vérsejteket, és átveszik azok helyét. Ma már tudjuk, hogy a C/EBPa transzkripciós faktor fontos szere-

pet játszik a mieloid progenitor sejtek differenciálódási és osztódási folyamataiban, és a mieloid leukémiák több típusában az expressziós szintje lecsökken (35). A C/EBPa által downstream regulált két gén, a c-myb és a GATA-2 szintén szerepet játszik a normális és leukémiás hematopoietikus sejtek differenciálódásában, proliferációjában és túlélési folyamataiban (6, 36). K562 leukémia-sejtvonalon siRNS segítségével csendesítették egymástól függetlenül a c-myb illetve a GATA-2 gént. Ennek segítségével tisztázták a gének szabályozási sorrendjét, és megfigyelték, hogy C/EBPa-aktiválódás esetében a GATA-2 és a c-myb szintje lecsökken. Mivel a GATA-2 szintje hamarabb csökken és a c-myb gátlása nincs hatással rá, feltételezhető, hogy a C/EBPa közvetve a GATA-2-n át fejt ki gátló hatását a c-myb expressziójára. A c-myb/GATA-2 gátlása és a C/EBPa aktiválása siRNS segítségével hatékonyan bizonyult a K562 sejtek proliferációjának gátlásában, melyből az következik, hogy a C/EBPa expresszióját visszaállítani képes siRNS stratégia potenciális terápiás lehetőséggel szolgálhat a leukémiás betegségek gyógyításában (34).

Új molekuláris targetnek tekinthető imatinib-rezisztens betegekben a hőshockprotein 32 (Hsp32) is. Folyamatos termelődése miatt fontos szerepe van a CML-sejtek túlélésében anti-apoptotikus és sejtvédő hatása révén (23). A Hsp32 géncsendesítése siRNS-technikával a leukémiás sejtek növekedésnek gátlását és apoptózis indukcióját eredményezte. Imatinibbel és nilotinibbel kombinálva szinergikus növekedésgátló hatást értek el vele imatinib-rezisztens sejtekben (24). Hasonló anti-apoptotikus szerepet töltenek be a különböző neurohormonok és a Bcl-2 fehérje is a sejtek túlélésében, amelyek lehetséges targetként vehetőek számba a CML molekuláris terápiájában (30).

A T315I pontmutációt hordozó betegek valamennyi tirozinkináz-inhibitorral szemben rezisztenciát mutatnak, ami jelentősen nehezíti a terápiás kezelést. Az siRNS-terápia segítséget nyújthat a hatóanyagokkal szembeni érzékenyítésben is. A bcr-abl siRNS imatinibbel/nilotinibbel való kombinálása során a kutatók 27–30%-os expressziócsökkenést figyeltek meg a gyógyszer-rezisztenciáért felelős MDR1 gén esetében. Ráadásul javult a hatóanyag sejtmembrán-transzportja is. A kétféle terápia együttes alkalmazása tehát újrat nyithat a tirozinkináz-inhibitorok sikeres alkalmazása felé (20).

GÉNCSENDESÍTÉS HUMÁN TERÁPIÁS ALKALMAZÁSA: ÚJABB KEZELÉSI LEHETŐSÉG?

Az RNS-interferencia hatékony terápiás módszernek tűnik a CML kezelésében in vitro alkalmazása során. A figyelem ez által egyre inkább az in vivo kipróbálásra és potenciális lehetőségeire összpontosít.

Koldehoff 2009-ben közölt egy esettanulmányt, melyben siRNS-terápiát alkalmazott egy imatinib-rezisztens CML-ben szenvedő betegen. Az akcelerált fázisban lévő (Ph+) b3a2 Bcr-Abl (p210) variánst hordozó 47 éves beteg első kezelésként allogén sejttranszplantációt kapott, de 155 nappal később citogenetikai és molekuláris visszaesést mutatott. Ezt követően a 247. napon megkezdtek az imatinib-terápiát, ami alatt a Bcr-Abl-titer folyamatosan emelkedett, és megjelentek kitapintható nyirokcsomó-duzzanatok is a betegben. 421 nappal a transzplantációt követően a betegben kialakult az imatinib-terápiával szembeni rezisztencia egy Y253F pontmutáció következtében, ezért a 426. napon megkezdtek az siRNS-terápia alkalmazását párhuzamosan a tirozinkináz-gátló alkalmazásával.

A lipidburokba csomagolt siRNS nem okozott mellékhatásokat és hatékonyan csökkentette a bcr-abl mRNS-szintet. A kezelést még két alkalommal ismételték meg a lecsökkent bcr-abl mRNS szinten tartása miatt. Mindezek ellenére a beteg 455 nappal a transzplantáció után 70%-os blasztos sejtarány mellett elhunyt. A harmadik siRNS-kezelés beadását követően már elmaradt a várt hatás, amiből arra következtethetünk, hogy egy esetleges rezisztencia jelent meg, vagy a transzfekció hatékonysága csökkent a szérumban RNázok aktiválódása miatt. Mindemellett az in vitro kísérletek ígéretes eredményeiben megfigyelhetjük, hogy a betegség modelljeként alkalmazott K562 sejtvonal eltérő mértékű válaszokkal reagál az siRNS-terápiára, mint a betegekből származó primer CML-sejtek. Mindezek előrevetítik az apoptózis hátterében álló, különféle jelátviteli útvonalak aktiválódásának lehetőségét, illetve a szervezeten belüli nonspecifikus hatásreakciókat (19).

MEGBESZÉLÉS

A CML korábbi kezelési módjai közül sokáig a csontvelő-átültetés volt az elsődleges terápiás módszer. 2002-ben hazánkban is megjelentek az első tirozinkináz-inhibitor gyógyszerek. Sikeres alkalmazásuk mellett néhány esetben felléphet rezisztencia, amire a citogenetikai és molekuláris szintű változások hívják fel a figyelmet. A rezisztencia mielőbbi felismerése illetve a relapszus korai jeleinek detektálása szempontjából fontos tehát a molekuláris biológiai szintű monitorozás. További terápiás lehetőséget biztosítanak az új generációs tirozinkináz-gátlók, illetve ezek kombinálása más terápiás módszerekkel.

A géncsendesítés, mint CML-terápiás lehetőség jelenleg csak in vitro mutatott leukémiasejteken szignifikáns, reprodukálható eredményeket, humán vonatkozású felhasználásával kapcsolatosan számos kérdés megválaszolása és körültekintő alkalmazása szükséges. Gyakorlati jelentősége

lehet azonban a CML patomechanizmusával kapcsolatba hozható gének azonosításában és új terápiás célpontok keresésében.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A jelen munka a TÁMOP-4. 2. 1. B-10/2/KONV-2010-0001 jelű projekt részeként az Európai Unió rész támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósult meg.

IRODALOM

1. Azam M, Latek RR, Daley GQ. Mechanisms of autoinhibition and STI-571/imatinib resistance revealed by mutagenesis of BCR-ABL. *Cell* 112:831–843, 2003
2. Baccarani M, Dreyling M. Chronic myelogenous leukemia: ESMO Clinical Recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 20:105–107, 2009
3. Bödör Cs. A krónikus myeloid leukaemia kezelésének aktuális kérdései a tirozinkináz-gátlók korszakában. *LAM* 19:781–785, 2009
4. Branford S, Rudzki Z, Walsh S, et al. High frequency of point mutations clustered within the adenosine triphosphate-binding region of BCR/ABL in patients with chronic myeloid leukemia or Ph-positive acute lymphoblastic leukemia who develop imatinib (STI571) resistance. *Blood* 99:3472–3475, 2002
5. Buchdunger E, Zimmermann J, Mett H, et al. Inhibition of the Abl protein-tyrosine kinase in vitro and in vivo by a 2-phenylaminopyrimidine derivative. *Cancer Res* 56:100–104, 1996
6. Caracciolo D, Venturelli D, Valtieri M, et al. Stage-related proliferative activity determines c-myc functional requirements during normal hematopoiesis. *J Clin Invest* 85:55–61, 1990
7. Chisoe SL, Bodenteich A, Wang YF, et al. Sequence and analysis of the human ABL gene, the BCR gene, and regions involved in the Philadelphia chromosomal translocation. *Genomics* 27:67–82, 1995
8. Chronic Myeloid Leukemia Trialists' Collaborative Group. Interferon alfa versus chemotherapy for chronic myeloid leukemia: a meta-analysis of seven randomized trials. *J Natl Cancer Inst* 89:1616–1620, 1997
9. Clarkson B, Strife A. Linkage of proliferative and maturational abnormalities in chronic myelogenous leukemia and relevance to treatment. *Leukemia* 7:1683–1721, 1993
10. Deininger MW, Goldman JM, Melo JV. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood* 96:3343–3356, 2000
11. Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, et al. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 344:1031–1037, 2001
12. Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat Med* 2:561–566, 1996
13. Elmaagacli AH, Freist A, Hahn M, et al. Estimating the relapse stage in chronic myeloid leukaemia patients after allogeneic stem cell transplantation by the amount of BCR-ABL fusion transcripts detected using a new real-time polymerase chain reaction method. *Br J Haematol* 113:1072–1075, 2001
14. Geary CG. The story of chronic myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 110:2–11, 2000
15. Goldman JM, Kaeda JS, Cross NCP. Clinical decision making in chronic myeloid leukemia based on polymerase chain reaction analysis of minimal residual disease. *Blood* 94:1484–1486, 1999
16. Goldman JM, Melo JV. Chronic myeloid leukemia — advances in biology and new approaches to treatment. *N Engl J Med* 349:1451–1464, 2003

17. Gorre ME, Mohammed M, Ellwood K. Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science* 293:876–880, 2001
18. Heidenreich O. Targeting oncogenes with siRNAs. In: *siRNA and miRNA Gene Silencing: From Bench to Bedside*. Ed.: Sioud M. Humana Press, New York 2009, pp. 221–242
19. Koldehoff M, Elmaagacli AH. Therapeutic targeting of gene expression by siRNAs directed against BCR-ABL transcripts in a patient with imatinib-resistant chronic myeloid leukemia. In: *siRNA and miRNA Gene Silencing: From Bench to Bedside*. Ed.: Sioud M. Humana Press, New York 2009, pp. 451–466
20. Koldehoff M, Kordelas L, Beelen DW, et al. Small interfering RNA against BCR-ABL transcripts sensitize mutated T315I cells to nilotinib. *Haematologica* 95:388–397, 2010
21. le Coutre P, Tassi E, Varella-Garcia M. Induction of resistance to the Abelson inhibitor STI571 in human leukemic cells through gene amplification. *Blood* 95:1758–1766, 2000
22. Liu J, Carmell MA, Rivas FV, et al. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* 305:1437–1441, 2004
23. Mayerhofer M, Florian S, Krauth MT, et al. Identification of heme oxygenase-1 as a novel BCR/ABL-dependent survival factor in chronic myeloid leukemia. *Cancer Res* 64:3148–3154, 2004
24. Mayerhofer M, Gleixner KV, Mayerhofer J, et al. Targeting of heat shock protein 32 (Hsp32)/heme oxygenase-1 (HO-1) in leukemic cells in chronic myeloid leukemia: a novel approach to overcome resistance against imatinib. *Blood* 111:2200–2210, 2008
25. Melo JV. The diversity of BCR-ABL fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype. *Blood* 88:2375–2384, 1996
26. Murao S, Diala I, Fujii M. Suppression of bcr-abl mRNA by chemically modified siRNA. *Nucleic Acids Symp Ser* 52:499–500, 2008
27. O'Brien SG, Guilhot F, Larson RA, et al. Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 348:994–1004, 2003
28. Okuda K, Weisberg E, Gilliland DG, et al. ARG tyrosine kinase activity is inhibited by STI571. *Blood* 97:2440–2448, 2001
29. Orban TI, Izaurralde E. Decay of mRNAs targeted by RISC requires XRN1, the Ski complex, and the exosome. *RNA* 11:459–469, 2005
30. Röszer T, Bánfalvi G. FMRFamide-related peptides: Anti-opiate transmitters acting in apoptosis. *Peptides* doi:10.1016/j.peptides.2011.04.011, 2011
31. Rowley JD. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* 243:290–293, 1973
32. Scherr M, Battmer K, Winkler T, et al. Specific inhibition of bcr-abl gene expression by small interfering RNA. *Blood* 101:1566–1569, 2003
33. Shah NP. Medical Management of CML. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 371–375, 2007
34. Soliera AR, Lidonnici MR, Ferrari-Amorotti G, et al. Transcriptional repression of c-Myb and GATA-2 is involved in the biologic effects of C/EBPα in p210BCR/ABL-expressing cells. *Blood* 112:1942–1950, 2008
35. Tenen DG. Disruption of differentiation in human cancer: AML shows the way. *Nat Rev Cancer* 3:89–101, 2003
36. Tsai FY, Orkin SH. The transcription factor GATA-2 is required for proliferation/survival of early hematopoietic cells and mast cell formation, but not erythroid and myeloid terminal differentiation. *Blood* 84:3636–3643, 1997
37. Wilda M, Fuchs U, Wossmann W. Killing of leukemic cells with a BCR/ABL fusion gene by RNA interference (RNAi). *Oncogene* 21:5716–5724, 2002