

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Nikola M. Kotur

**FARMAKOGENETIKA 6-MERKAPTOPURINA I  
METOTREKSATA U DEČJOJ AKUTNOJ  
LIMFOBLASTNOJ LEUKEMIJI**

doktorska disertacija

Beograd, 2015

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Nikola M. Kotur

**PHARMACOGENETICS OF 6-MERCAPTOPURINE  
AND METHOTREXATE IN CHILDHOOD ACUTE  
LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2015

## **Komisija**

**dr Branka Zukić**, mentor

Naučni saradnik

Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo

Univerzitet u Beogradu

**dr Sonja Pavlović**, mentor

Naučni savetnik

Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo

Univerzitet u Beogradu

**dr Dušanka Savić Pavićević**, član komisije

Vanredni profesor

Biološki fakultet

Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane: \_\_\_\_\_

*Ovaj doktorat je realizovan u Laboratoriji za molekularnu biomedicinu Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo Univerziteta u Beogradu.*

*Zahvaljujem se mentorki dr Sonji Pavlović što me je (dva puta) primila u Laboratoriju i omogućila mi da počnem da se bavim naukom. Takođe bih se zahvalio Sonji na kritičkom čitanju ove doktorske teze, na podstreku da dovršim započeto, kao i na savetima vezanim za nauku i život.*

*Posebno se zahvaljujem mojoj neposrednoj mentorki dr Branki Zukić što me je (dva puta) pozvala da radimo zajedno i vodila još od diplomskog rada kada sam se prvi put susreo sa TRMT-om i VNTR-om. Branka, hvala Ti na našim razgovorima i što sam od tebe puno naučio, od eksperimenata do naučnog pisanja. Hvala Ti na isrpnim sugestijama i komentarima tokom pisanja poslednjig rada i teze. Zaista sam dosta naučio!*

*Dr Dušanki Savić Pavićević se zahvaljujem na konstruktivnim i dobronamernim sugestijama koje sa dobio tokom pisanja projekata na doktorskim studijama i tokom pisanja doktorske disertacije.*

*Zahvaljujem se celom timu odeljenja za hematoonkologiju Univerzitetske dečje klinike na odličnoj saradnji. Hvala dr Dragani Janić i dr Lidiji Dokmanović-Krivokapić, a posebno Srđi, Jeleni i Goranu.*

*Hvala svim kolegama sa IMGGI što su uvek nalazili vremena da pomognu, a posebno Vanjici, Alex, Jeleni i Kiki.*

*Zahvaljujem se Goci, Nataši, Teodori, Tanji, Milevi, Maji, Vesni i Jeleni za sve laboratorijske razgovore, duhovite opaske i za svu pomoć.*

*Zahvaljujem se mlađima „mlađima“ Aniti, Miši, Ani, Marini, Jovani, Ljubici i Dariji na druženju i za sav posao koji su preuzele tokom dugog i teškog pisanja radova i doktorata.*

*Zahvaljujem se nekadašnjim članovima Laba 01, Eni, Kseniji i Katarini, a posebno a posebno Peđi i Mladenu koji su mi puno pomogli da završim doktorate, kao i na prijateljstvu i druženju.*

*Veliko hvala Bici, Kristel, Samdži i Ireni za svu nesebičnu pomoć, druženje i svemu lepom i manje lepom što smo zajedno proživeli od vremena kad smo zajedno počeli doktorate do sad.*

*Posebno se zahvaljujem svojim roditeljima, sestri, prijateljima van i sa IMGGI, rođacima, kolegama za sve....*

*Ovaj doktorat posvećujem svojim roditeljima na koje sam uvek mogao da se oslonim i koji su mi uvek bili podrška. Hvala vam i što ste me izdržavali i trpeli svih ovih godina.*

## **Farmakogenetika 6-merkaptopurina i metotreksata u dečjoj akutnoj limfoblastnoj leukemiji**

### **Rezime**

Farmakogenomika proučava odnos između genetičkog sklopa individue i njegovog odgovora na lekove i jedan je od stubova personalizovane medicine. Dosadašnji princip lečenja da se standardna doza leka daje svim pacijentima sa istom dijagnozom po unapred utvrđenom protokolu se napušta. Za veliki broj pacijenta ta doza leka često nije efikasna i/ili sigurna za upotrebu. Cilj farmakogenomičkih studija je da identifikuju farmakogenomičke markere, varijacije u genomu koje mogu pouzdano da predvide odgovor na terapiju, što je osnov za individualizaciju terapije.

Model sistemi bolesti za analizu farmakogenomičkih markera korišćeni u ovom radu su dečja akutna limfoblastna leukemija (ALL) i reumatoidni artritis (RA). Lečenje ovih bolesti uključuje imunosupresivne i citotoksične lekove 6-merkaptopurin (6-MP), metotreksat (MTX), antibiotik baktrim, antimikotik nistatin, kao i anti-TNF lekove. Genetičke varijacije koje modulišu metaboličke puteve povezane sa ovim lekovima su kandidati za farmakogenomičke markere.

Cilj ove studije je da ispita učestalosti genetičkih varijanti u genima *TPMT*, *ITPA*, *ABCB1*, *ABCC4*, *TYMS*, *MTHFR*, *SLC19A1*, *DHFR*, *TNF* i *IL-6*, kao i da oceni farmakogenomički potencijal ovih varijanti u srpskoj populaciji. Biće ispitana i uloga ovih farmakogenomičkih markera kao faktora rizika za razvoj dečje ALL. Ispitaće se i uticaj terapije održavanja, gde okosnicu terapije čine lekovi 6-MP i MTX, kao i pola i uzrasta dece sa ALL na ekspresiju gena *TPMT*. Biće funkcionalno okarakterisane varijante u genu *TPMT*, potencijalni modulatori ekspresije gena *TPMT*, sa posebnom pažnjom na ulogu VNTR regiona u promotoru gena *TPMT*.

U studiju je bilo uključeno 174 pedijatrijskih ALL pacijenata, 73 RA pacijenata i 104 kontrolnih zdravih ispitanika. Genetičke varijacije u svim gorepomenutim genima su

određene metodama baziranim na PCR-u. Uticaj 6-MP tretmana i VNTR regiona na nivo transkripcije gena *TPMT* je određen funkcionalnim CAT esejima *in vitro* koristeći K562 ćelijsku liniju. Nivo ekspresije gena *TPMT* u mononuklearnim ćelijama krvi i kosne srži ALL pacijenata analiziran je *real-time* PCR metodom.

Rezultati populacione studije su pokazali da je učestalost alela u genima *TPMT*, *ABCB1*, *TYMS*, *MTHFR*, *SLC19A1*, *DHFR*, *IL-6* i *TNF* slična kao kod drugih evropskih populacija. Alel c.94A u genu *ITPA* ima manju učestalost, dok alel rs9516519, nukleotid G, u genu *ABCC4* ima veću učestalost u srpskoj populaciji u odnosu na druge evropske populacije. Ovaj podatak može biti važan prilikom procene njihovog farmakogenomičkog potencijala. Kod RA pacijenata, varijacije u genima *IL-6* i *TNF* su se pokazale farmakogenimički relevantne za terapiju anti-TNF lekom.

Učestalosti genotipova u genima *ITPA*, *ABCB1*, *ABCC4*, *TYMS*, *MTHFR*, *SLC19A1* i *DHFR* koji kodiraju enzime i transportere metaboličkih puteva lekova 6-MP-a i MTX-a su bile slične u grupi zdravih kontrolnih ispitanika i ALL pacijenata. Ovaj rezultat ide u prilog tezi da izučavane varijacije ne učestvuju u etiologiji dečje ALL.

Tretman K562 ćelija lekom 6-MP-om smanjuje *TPMT* transkripciju *in vitro* i to smanjenje je zavisno od VNTR arhitekture u promotoru ovog gena. VNTR aleli mogu uticati na malo smanjenje ( $AB_4C$ ), intermedijarno smanjenje ( $A_2B_3C$ ,  $A_4BC$ ,  $AB_2C$ ,  $A_5BC$ ,  $A_2BC$  i  $A_3BC$ ) i veliko smanjenje ( $A_6BC$ ,  $AB_5C$ ,  $A_3B_2C$  i  $A_2B_2C$ ) transkripcije gena *TPMT*. Sa povećanjem broja A ponovaka *TPMT* transkripcija se izraženije smanjuje kod K562 ćelija tretiranim lekom 6-MP-om *in vitro*.

Ekspresija *TPMT* gena kod dečjih ALL pacijenata je oko 3.3 puta veća u toku terapije održavanja, kada oni dobijaju lekove 6-MP i MTX, nego pre početka hemoterapije. Povećanje nivoa *TPMT* ekspresije je bilo najizraženije za nosioce VNTR\*5a/\*5a genotipa, dok je najmanje povećanje *TPMT* ekspresije zabeleženo kod nosilaca VNTR\*7a alela. Veći broj ponovaka tipa A u okviru VNTR regiona u promotoru gena *TPMT* smanjuje nivo ekspresije gena *TPMT* u toku terapije održavanja kod dečjih ALL pacijenata.

Rezultati ove studije doprinose razumevanju složenog problema personalizacije terapije lekovima kojima se dečji ALL pacijenti leče u toku terapije održavanja. Istaknut je značaj populacione specifičnosti farmakogenomičkih markera. Povećanje ekspresije gena *TPMT* u toku terapije održavanja kod dečjih ALL pacijenata, ukazuje da bi od velikog značaja bilo razmotriti varijante u genu *TPMT* na samom početku terapije održavanja kod ALL pacijenata naročito kod nosilaca određena četiri VNTR alela koji doprinose velikom smanjenju transkripcije gena *TPMT in vitro*. Na osnovu farmakogenomičke analize varijacija u genima *TNF* i *IL-6* kod RA pacijenata, moglo bi se razmotri uvođenje anti-TNF terapije kod pedijatrijskih ALL pacijenata kod kojih se bolest teško klinički kontroliše.

Ključne reči: akutna limfoblastna leukemija (ALL), reumatoidni artritis (RA), farmakogenomika, 6-merkaptopurin (6-MP), metotreksat (MTX), tiopurin S-metiltransferaza (TPMT), promenljiv broj tandemskih ponovaka (VNTR), ekspresija gena *TPMT*

Naučna oblast: molekularna biologija

Uža naučna oblast: molekularna biologija eukariota

UDK broj: 577.21:[615.277:575.22](043.3)



## **Pharmacogenetics of 6-mercaptopurine and methotrexate in childhood acute lymphoblastic leukemia**

### **Abstract**

Pharmacogenomics is focused on exploring the relation between the genomic signature of an individual and their drug response. It is the basis for implementation of personalized medicine. The old-fashioned therapeutic paradigm of »one protocol dose fits all patients with the same diagnosis« is getting abandoned. The standard drug dose is often not efficient and/or safe for many of patients. Pharmacogenomic studies identify pharmacogenomic markers, genomic variations that could reliably predict the drug response, which is the basis for therapy individualization.

In order to analyze pharmacogenomic markers, childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL) and rheumatoid arthritis (RA) are used as disease model systems. ALL and RA therapy protocols include cytotoxic and immunosuppressive drugs 6-mercaptopurine (6-MP) and methotrexate (MTX), antibiotic bactrim and antimycotic nystatin, as well as anti-TNF drugs. Genetic variations that modulate metabolic pathways related to these drugs are candidate pharmacogenomic markers.

The aim of this study is to analyze frequencies of genetic variants in *TPMT*, *ITPA*, *ABCB1*, *ABCC4*, *TYMS*, *MTHFR*, *SLC19A1*, *DHFR*, *TNF* and *IL-6* genes in Serbian population and to evaluate the pharmacogenomic potential of these variants. Also, the role of these pharmacogenomic markers as risk factors for development of childhood ALL will be assessed. Influence of the maintenance therapy, which includes 6-MP and MTX as most important drugs, as well as the age and gender of patients will be analyzed in regard to *TPMT* gene expression. Functional assays will be carried out in order to identify potential modifiers of *TPMT* expression with a special focus on VNTR region in promoter of *TPMT* gene.

In this study, 174 pediatric ALL patients, 73 RA patients and 104 healthy subjects were enrolled. Genetic variants in above-mentioned genes were detected using PCR-based

methodology. The influence of 6-MP treatment and VNTR region on *TPMT* transcription was evaluated using functional CAT assays *in vitro* in K562 cell line. The level of *TPMT* expression in blood and bone marrow mononuclear cells was analyzed using the real-time PCR method.

Population analysis revealed that allelic frequencies of *TPMT*, *ABCB1*, *TYMS*, *MTHFR*, *SLC19A1*, *DHFR*, *IL-6* and *TNF* studied genetic variants are similar in comparison to other European populations. Variant *ITPA* c.94C allele is less frequent, while *ABCC4* rs9516519, nucleotide G, is more frequent in Serbian population in comparison to other European populations. This result might be important when assessing their pharmacogenomic potential. In RA patients, *IL-6* i *TNF* genetic variations were relevant pharmacogenomics markers for anti-TNF therapy.

Genotype frequencies in *ITPA*, *ABCB1*, *ABCC4*, *TYMS*, *MTHFR*, *SLC19A1* and *DHFR*, genes that encode enzymes and transporters of 6-MP and MTX drugs, were similar for pediatric ALL patients and healthy individuals. This result suggests that analyzed variants are not involved in etiology of childhood ALL.

In 6-MP-treated K562 cells, *TPMT* transcription level decreased in VNTR architecture dependent manner *in vitro*. Various VNTR constructs can be categorized in three different groups, depending on the level of *TPMT* transcription decrease, namely minor decrease (AB<sub>4</sub>C), intermediate decrease (A<sub>2</sub>B<sub>3</sub>C, A<sub>4</sub>BC, AB<sub>2</sub>C, A<sub>5</sub>BC, A<sub>2</sub>BC i A<sub>3</sub>BC) or major decrease (A<sub>6</sub>BC, AB<sub>5</sub>C, A<sub>3</sub>B<sub>2</sub>C i A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C). In 6-MP-treated K562 cells, higher number of type A repeats resulted in more prominent decrease of *TPMT* transcription.

*TPMT* gene expression level was 3.3 times higher during the maintenance therapy when 6-MP and MTX drugs are given to childhood ALL patients, than before chemotherapy. During the maintenance therapy VNTR\*5a/\*5a carriers showed considerable elevation while VNTR\*7a allele carriers showed the least prominent elevation of *TPMT* expression level. Higher number of type A repeats in VNTR region of *TPMT* promoter, decreases level of *TPMT* gene expression both before chemotherapy and during the maintenance therapy.

Results of this study could fill in some pieces in the complicated puzzle of the maintenance therapy individualization for childhood ALL patients. This study highlights importance of population-specificity of pharmacogenomic markers. It could be of great importance to consider *TPMT* genetic variants at the very beginning of the maintenance therapy for childhood ALL patients, especially for carriers of one of specific four VNTR alleles that contribute to major decrease of *TPMT* transcription *in vitro*. Taking into consideration pharmacogenomic analysis of *TNF* and *IL-6* variants in RA patients, it might be beneficial to introduce anti-TNF therapy for childhood ALL patients with refractory disease.

Keywords: acute lymphoblastic leukemia (ALL), rheumatoid arthritis (RA), pharmacogenomics, 6-mercaptopurine (6-MP), methotrexate (MTX), thiopurine S-methyltransferase, variable number of tandem repeats (VNTR), *TPMT* gene expression.

Research area: molecular biology

Area of special interest: molecular biology of Eukaryotes

UDC number: 577.21:[615.277:575.22](043.3)

## Sadržaj

1. Uvod.....	1
1.1. Farmakogenetika i farmakogenomika.....	2
1.2. Model sistemi bolesti .....	3
1.2.1. Dečija akutna limfoblastna leukemija (ALL) .....	4
1.2.2. Reumatoidni artritis (RA).....	5
1.3. Lek 6-merkaptopurin (6-MP).....	6
1.3.1. Tiopurin S-metiltransferaza ( <i>TPMT</i> ) .....	9
1.3.1.1. Promotor gena <i>TPMT</i> .....	13
1.3.2. Inozin trifosfataza ( <i>ITPA</i> ) .....	16
1.4. Lek metotreksat (MTX).....	18
1.4.1. Timidilat sintaza ( <i>TYMS</i> ) .....	21
1.4.2. Metilentetrahidrofolat reduktaza ( <i>MTHFR</i> ) .....	23
1.4.3. Dihidrofolat reduktaza ( <i>DHFR</i> ) .....	25
1.4.4. <i>SLC19A1</i> (eng. solute carrier family 19 (folate transporter), member 1) .....	27
1.4.5. ATP vezujuća kasetna protein supfamilija C, član 4 ( <i>ABCC4</i> ) .....	28
1.4.6. ATP vezujuća kasetna protein supfamilija B, član 1 ( <i>ABCB1</i> ) .....	29
1.5. Isti farmakogenetički markeri kao genetički modifikatori u različitim terapijskim odgovorima.....	31
2. Ciljevi.....	34
3. Materijal i metode .....	38
3.1. Materijal .....	39
3.1.1. Ispitanici.....	39
3.1.2. K562 ćelijska linija.....	40
3.1.3. Plazmidni vektori .....	40
3.1.4. Prajmeri i probe .....	41
3.2. Metode .....	45
3.2.1. Metode za izolaciju DNK.....	45
3.2.1.1. Izolacija DNK iz krvi izoliranjem.....	45

3.2.1.2. Izolacija DNK na koloni iz krvi ili kosne srži.....	45
3.2.1.3. Izolacija DNK na koloni sa razmaza krvi ili kosne srži .....	46
3.2.1.4. Izolacija DNK na koloni iz bukalnog brisa .....	46
3.2.2. Metode za određivanje genetičkih varijanti.....	47
3.2.2.1. Lančana reakcija polimerizacije.....	47
3.2.2.2. Analiza DNK fragmenata elektroforezom na agaroznom gelu.....	51
3.2.2.3. Analiza DNK fragmenata elektroforezom na poliakrilamidnom gelu .....	51
3.2.2.4. Određivanje broja tandemskih ponovaka i indel-ova PCR metodom praćenom gel elektroforezom.....	52
3.2.2.5. Detekcija genetičkih varijanti PCR-RFLP metodom.....	52
3.2.2.6. Određivanje genetičkih varijanti alel-specifičnim PCR-om .....	53
3.2.2.7. Određivanje genetičkih varijacija sekvenciranjem PCR produkata.....	54
3.2.3. Metode za izvođenje funkcionalnih eseja sa reporterskim vektorom.....	55
3.2.3.1. Uslovi gajenja ćelija u kulturi.....	55
3.2.3.2. Zamrzavanje ćelija .....	56
3.2.3.3. Odmrzavanje ćelija .....	57
3.2.3.4. Transfekcija K562 ćelija .....	57
3.2.3.5. Pripremanje ćelijskih ekstrakata .....	58
3.2.3.6. $\beta$ -galaktozidazni esej .....	58
3.2.3.7. CAT esej .....	59
3.2.4. Metode za izučavanje genske ekspresije .....	61
3.2.4.1. Izolacija mononuklearnih ćelija pomoću fikola .....	61
3.2.4.2. Izolacija RNK iz mononuklearnih ćelija u Tri Reagent® rastvoru.....	61
3.2.4.3. Sinteza cDNK.....	62

3.2.4.4. Provera kvaliteta cDNK.....	62
3.2.4.5. Kvantifikacija ekspresije gena <i>TPMT</i> <i>real-time</i> PCR metodom .....	62
3.2.5. Statistička obrada rezultata.....	63
4. Rezultati .....	65
4.1. Populaciona analiza genetičkih varijacija koje potencijalno utiču na metabolizam i transport lekova 6-MP-a i MTX-a .....	66
4.1.1. Analiza genetičkih varijacija potencijalno važnih za odgovor na terapiju lekom 6-MP-om .....	66
4.1.2. Analiza genetičkih varijacija potencijalno važnih za toksičnost leka MTX-a .....	69
4.2. Analiza genetičkih varijacija potencijalno važnih za odgovor na terapiju lekovima baktrimom, nistatinom i anti-TNF agensima.....	73
4.3. Uticaj terapije održavanja na ekspresiju gena <i>TPMT</i> u zavisnosti od arhitekture VNTR regiona u promotoru gena <i>TPMT</i> .....	74
4.3.1. Uticaj pretretmana lekom 6-MP-om na nivo <i>TPMT</i> transkripcije u zavisnosti od VNTR arhitekture gena <i>TPMT</i> u K562 ćelijskoj liniji <i>in vitro</i> .....	74
4.3.2. Uticaj terapije održavanja kod pedijatrijskih ALL pacijenata na ekspresiju gena <i>TPMT</i> u zavisnosti od VNTR arhitekture promotora gena <i>TPMT</i> .....	77
4.3.2.1. Ekspresija gena <i>TPMT</i> u uzorcima mononuklearnih ćelija krvi i kosne srži pre početka hemoterapije .....	77
4.3.2.2. Ekspresija gena <i>TPMT</i> u toku terapije održavanja .....	77
4.3.2.3. Uticaj VNTR arhitekture u promotoru gena <i>TPMT</i> na <i>TPMT</i> ekspresiju pre početka hemoterapije .....	79
4.3.2.4. Uticaj VNTR arhitekture u promotoru gena <i>TPMT</i> na <i>TPMT</i> ekspresiju u toku terapije održavanja.....	83
4.4. Uticaj uzrasta i pola dece obolele od ALL na <i>TPMT</i> ekspresiju pre početka hemoterapije i u toku terapije održavanja.....	85
4.4.1. Uticaj uzrasta ALL pacijenata na ekspresiju gena <i>TPMT</i> .....	85
4.4.2. Uticaj pola ALL pacijenata na ekspresiju gena <i>TPMT</i> .....	85
4.5. Uticaj genetičkih varijacija gena <i>TPMT</i> na <i>TPMT</i> ekspresiju pre hemoterapije i u toku terapije održavanja.....	86

4.5.1. Uticaj genetičkih varijacija u promotoru, egzonima i sekvencama koje okružuju egzone gena <i>TPMT</i> na <i>TPMT</i> ekspresiju pre hemoterapije i u toku terapije održavanja .....	86
4.5.2. Analiza haplotipova .....	88
5. Diskusija .....	89
5.1. Genetičke varijacije koje utiču na metabolizam i transport lekova 6-MP-a i MTX-a 90	
5.1.1. Farmakogenomički potencijal genetičkih varijacija koje utiču na metabolizam i transport lekova 6-MP-a i MTX-a .....	90
5.1.2. Genetičke varijacije koje utiču na metabolizam i transport lekova 6-MP-a i MTX-a kao faktori rizika za razvoj dečje ALL .....	94
5.2. Uticaj genetičkih varijacija u genu <i>TPMT</i> i terapije održavanja na ekspresiju gena <i>TPMT</i> kod ALL pacijenata.....	97
5.2.1. Uticaj terapije održavanja na ekspresiju gena <i>TPMT</i> .....	97
5.2.2. Polne i uzrasne razlike ALL pacijenata u relaciji sa <i>TPMT</i> ekspresijom pre hemoterapije i u toku terapije održavanja .....	101
5.2.3. Varijacije u genu <i>TPMT</i> i ekspresija gena <i>TPMT</i> .....	102
5.3. Isti farmakogenomički markeri u različitim terapijskim protokolima: genetičke varijacije u genima <i>IL-6</i> i <i>TNF</i> kao mogućnost primene novih farmakogenomičkih markera u terapiji ALL .....	106
6. Zaključci .....	109
7. Literatura .....	114

## Lista skraćenica

6-MP – 6-merkaptopurin

6-TG – 6-tioguanin

*ABCB1*<sup>#</sup> – ATP vezujući kasetni protein supfamilija B, član 1

*ABCC4*<sup>#</sup> – ATP vezujući kasetni protein supfamilija C, član 4

AICAR – aminoimidazol karboksamid ribonukletid

ALL – akutna limfoblastna leukemija

AO – aldehidna oksidaza

AZA – azatioprin

DHF – dihidrofolat

*DHFR*<sup>#</sup> – dihidrofolat reduktaza

HPRT – hipoksantin fosforiboziltransferaza

IBD – inflamatorne bolesti creva

IL – interleukin

*IL-6*<sup>#</sup> – interleukin 6

Indel – genetička varijacija koja predstavlja inserciju, odnosno deleciju

*ITPA* (gen) – inozin trifosfataza

*ITPA* (enzim)- inozin trifosfat pirofosfohidrolaza

GAR – glicinamid ribonukleotid

MDR1 – eng. multidrug resistance protein 1

MNĆ – mononuklearne ćelije

*MTHFR*<sup>#</sup> – metilentetrahidrofolat reduktaza

MTX – metotreksat

(d)NTP – (deoksi) nukleotid monofosfat

(d)NTP – (deoksi) nukleotid trifosfat

RA – reumatoidni artritis



RFC1 – transporter redukovanih folata

SAM – S-adenozilmetionin

SAH – S-adenozilhomocistein

*SLC19A1* – eng. solute carrier family 19 (folate transporter), member 1

SNV – varijacija nukleotidnog mesta

TGN – tioguaninski nukleotidi

THF – tetrahidrofolat

tGMP – tioguanozin monofosfat

tIMP – tioinozin monofosfat

*TNF*<sup>#</sup> – faktor nekroze tumora

*TPMT*<sup>#</sup> – tiopurin S-metiltransferaza

*TYMS*<sup>#</sup> – timidilat sintaza

VNTR – varijabilan broj tandemskih ponovaka

UTR – eng. untranslated region

XO – ksantin oksidaza

<sup>#</sup> Enzim ima istu skraćenicu kao i gen koji ga kodira, ali se simbol enzima se ne piše u *kurzivu*

# **1. Uvod**

## 1.1. Farmakogenetika i farmakogenomika

Naučna disciplina koja se bavi proučavanjem značaja genetičkog materijala individue u odgovoru organizma na lekove se zove farmakogenetika odnosno farmakogenomika. Ova mlada grana nauke u usponu je nastala spajanjem dve naučne discipline: farmakologije koja se bavi dejstvom lekova na organizam (farmakodinamika) i njihovim metabolizmom (farmakokinetika), i genetike, koja proučava nasleđivanje osobina. Između značenja termina farmakogenetika i farmakogenomika ne postoji jasna granica. Termin farmakogenetika se koristi kada se govori o varijacijama u jednom ili malom broju gena koje utiču na odgovor na terapiju jednim lekom, dok se termin farmakogenomika koristi kada posmatramo uticaj velikog broja gena ili značajnog dela genoma na odgovor na lečenje jednog ili više lekova (McMillin 2007).

Primećeno je da ljudi slične veličine, godina, pola i iste etničke pripadnosti mogu različito da reaguju na jednake doze istog leka. Neki ljudi mogu da imaju preneglašena nepoželjna dejstva lekova, dok se kod drugih ne postiže optimalan terapijski efekat. Pored polnih, uzrasnih i razlika u opštem zdravstvenom stanju, ove razlike mogu biti uslovljene individualnim razlikama u genetičkom materijalu (Wang & Weinshilboum 2006). Najčešće razlike u genetičkom materijalu koje su uzrok različitog odgovora različitih ljudi na određene lekove mogu biti varijacije nukleotidnog sastava (SNV), varijacije u broju tandemskih ponovaka ili insercija, odnosno delecija nukleotidnih sekvenci, koje nazivamo indeli. Koristeći individualne genetičke karakteristike često se može predvideti odgovor pojedinca na terapiju. Genetičke varijacije od interesa se obično nalaze u genima koji kodiraju proteine važne za metabolizam i transport samog leka ili predstavljaju „metu“ terapeutika. Genetičke varijacije mogu uticati na ekspresiju, strukturu, stabilnost i aktivnost proteina kojeg kodiraju. Cilj farmakogenomike je da uspostavi uzročno-posledičnu vezu između određenih genetičkih varijacija kod čoveka i efekta leka na njegov organizam. Ono što je važnije je da se u skladu sa prisustvom genetičkih varijanti može predvideti odgovor na terapiju (efikasnost i toksičnost leka) i da se u skladu sa genetičkim karakteristikama svakog pacijenta terapija modifikuje, odnosno personalizuje. Genetičke varijacije za koje je pokazano da se mogu

koristiti za predviđanje odgovora i personalizaciju terapije nazivaju se farmakogenomički markeri.

Najviše proučavani farmakogenomički markeri su genetičke varijante u genima koji kodiraju proteine koji učestvuju u metabolizmu leka. Metabolizam leka podrazumeva biohemijsku modifikaciju leka koja može uticati na njegovu aktivnost, distribuciju ili eliminaciju. Aktivnost nekih enzima koji metabolišu lekove može se razlikovati i više od 1000 puta između ljudi koji pripadaju istoj populaciji (McMillin 2007).

Međutim, prilikom individualizacije terapije pitanje doze leka nije uvek primarno. Primer za to su neki lekovi koji se koriste u terapiji malignih bolesti, koji ciljano deluju na određeni mehanizam koji maligne ćelije koriste za svoju propagaciju. Maligne bolesti su u osnovi genetičke bolesti, pa se analizom genetičkog zapisa i obrasca genske ekspresije ćelija tumora može identifikovati da li tumor uopšte poseduje obrazac koji predstavlja „metu“ za terapiju. Na primer, anti-kancer lek trastuzumab se koristi u lečenju raka dojke samo kod pacijentkinja koje imaju prekomerno ekspimiran *HER2* gen (Krejsa et al. 2006). Slično, lekovi imatinib i desimatinib se koriste samo kod pacijenata kod kojih je pokazano prisustvo Filadelfija hromozoma t(9;22), odnosno fuzionog transkripta koji kodira jednu izmenjenu tirozin kinazu. Pomenuti lekovi su primer ciljane terapije i kao antitela blokiraju receptor/površinski protein visoko specifično. Za razliku od konvencionalne terapije, primena ovakvih testova i potom ciljane terapije trastuzumabom kod *HER2* pozitivnih pacijentkinja obolelih od raka dojke veoma povećava uspešnost lečenja (Widmer et al. 2014).

## **1.2. Model sistemi bolesti**

Model sistemi bolesti za analizu farmakogenomičkih markera korišćeni u ovom radu su dečja akutna limfoblastna leukemija (ALL) i reumatoidni artritis (RA).

### 1.2.1. Dečija akutna limfoblastna leukemija (ALL)

ALL je grupa malignih bolesti koje se odlikuju prekomernom i deregulisanom proliferacijom nezrelih B ili T limfocita – limfoblasta. Ovi limfoblasti se akumuliraju u kosnoj srži gde ometaju produkciju normalnih krvnih ćelija. ALL se češće javlja kod dece, nego kod odraslih i predstavlja najčešće pedijatrijsko maligno oboljenje. Oko 25% svih maligniteta kod dece otpada na ALL. Godišnje se registruje oko 9-10 novoobolele dece na 100000 dece, što ovu bolest svrstava u retke bolesti ([www.eurordis.org](http://www.eurordis.org)). Dečja ALL se najčešće javlja između 2. i 6. godine starosti (Kaatsch 2010).

Etiologija dečje ALL nije poznata. Postoje nagoveštaji da maligna transformacija počinje još tokom prenatalnog razvića. Do sada su identifikovani pojedini faktori rizika za nastanak dečje ALL, u koje između ostalih spada izloženost nepovoljnim faktorima spoljašnje sredine, kao što je jonizujuće zračenje. Pored toga, kod dece sa Daunovim sindromom postoji veliki rizik da u toku života razviju ALL (Eden 2010). Istraživanja pokazuju da postoje i drugi faktori rizika, čija je uloga u nastanku ALL manja, kao što je prisustvo određenih naslednih bolesti, socio-ekonomski status i etnička pripadnost (Eden 2010). Osim toga, poslednjih godina se dosta izučava uloga gena koji kodiraju enzime i transportere folatnog metaboličkog puta u nastanku dečje ALL (Koppen et al. 2010).

Lečenje dečje akutne limfoblastne leukemije je precizno definisano protokolima lečenja koje lekari primenjuju u zavisnosti od određenih kliničkih parametara i podeljeno je u nekoliko faza. Iako postoje izvesne razlike u protokolima, terapija dečje ALL uvek počinje fazom indukcije, koju prati faza konsolidacije ili intenzifikacije terapije, a na kraju je faza održavanja, koja je ujedno i najduža faza lečenja. Nakon prve faze terapije pacijent bi trebalo da uđe u fazu remisije kada bolest više nije klinički aktivna. Ako u toku terapije dođe do pogoršanja osnovne bolesti, tada kažemo da je pacijent ušao u relaps. Više citotoksičnih agenasa se koristi u ranijim fazama lečenja, među koje spadaju metotreksat (MTX), tiopurinski lekovi, asparginaza, glukokortikoidi i vinkristin, kao i radio-terapija. U fazi održavanja, koja obično traje 18 do 24 meseca, deca obolela od ALL dobijaju skoro isključivo samo imunosupresivne lekove 6-merkaptopurin (6-MP) i MTX (Pui & Evans

2006), antibiotik baktrim i po potrebi antimikotik nistatin. U Srbiji se deca obolela od ALL leče po Berlin-Frankfurt-Münster (BFM) protokolu, koji uključuje sve navedene faze.

### **1.2.2. Reumatoidni artritis (RA)**

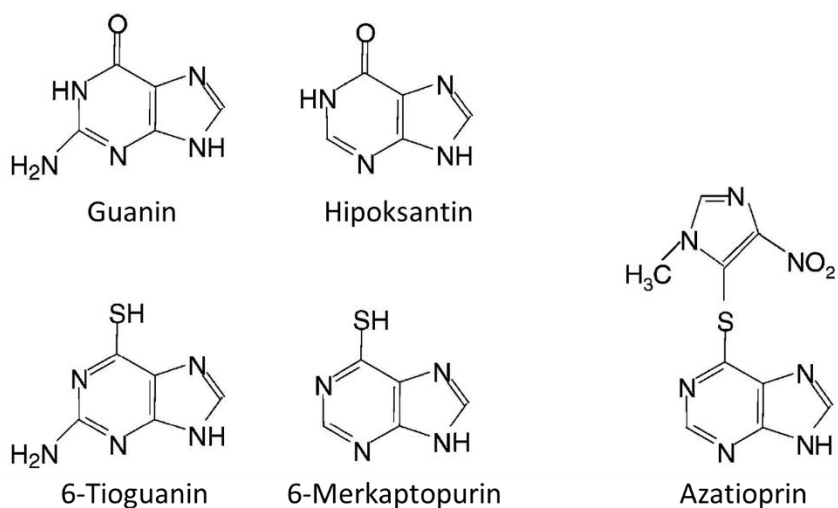
RA je hronična, sistemska, autoimuna bolest koja uglavnom zahvata male zglobove u šakama i stopalima. RA se javlja 3 puta češće kod žena nego kod muškaraca i ima učestalost od oko 1% u opštoj populaciji. Određene genetičke varijante u HLA lokusu, kao i izloženost antigenima i toksinima nekih mikroorganizama su povezane sa povećanim rizikom za razvoj RA, ipak, etiologija ove multifaktorijalne bolesti je umnogome nepoznata (Terato et al. 2015)

Izlečenje RA za sada nije moguće, ali je u upotrebi veliki broj lekova koji imaju za cilj da smanje simptome i uspore progresiju bolesti. Trenutno je u upotrebi nekoliko klasa lekova: nesteroidni antiinflamatorni lekovi, kortikosteroidi, antireumatski lekovi koji menjaju tok bolesti, u koje spada lek MTX, kao i biološka terapija. Biološka terapija uključuje terapeutike koji ciljano inhibiraju molekule ili ćelije imunog sistema. Od biološke terapije, za lečenje RA se najviše koristi anti-TNF terapeutici, u koje se ubraja i lek etanercept (Koenders & van den Berg 2015).

Kombinovana terapija lekovima MTX-om i etanerceptom se pokazala efikasnijom u lečenju RA pacijenata u poređenju sa drugim kombinacijama lekova (Moreland et al. 2012). Povećanje efikasnosti ove kombinovane terapije, kao i izbegavanje neželjenih efekata povezanim sa ovim lekovima mogla bi da se postigne upotrebom farmakogenomičkih markera.

### 1.3. Lek 6-merkaptopurin (6-MP)

Tiopurinski lekovi su u upotrebi preko 60 godina. Za lečenje akutnih leukemija koriste se analozi ksantina i guanina, lekovi 6-MP i 6-tioguanin (6-TG), dok se lek azatioprin (AZA) prevashodno koristi kao imunosupresivni lek za lečenje inflamatornih bolesti creva (eng. inflammatory bowel disease, IBD), RA, različitih autoimunih bolesti i nakon transplantacije organa (Coulthard & Hogarth 2005). Sva tri leka su purinski analozi (slika 1.1) i kao takvi koriste metaboličke puteve koji kontrolišu homeostazu purinskih nukleotida. To im omogućava da naruše sintezu DNK i RNK (Coulthard & Hall 2001).



Slika 1.1. Hemijske strukture purina i njihovih tiopurinskih analoga. Preuzeto i modifikovano iz rada Coulthard i Hogarth-a iz 2005. godine (Coulthard & Hogarth 2005).

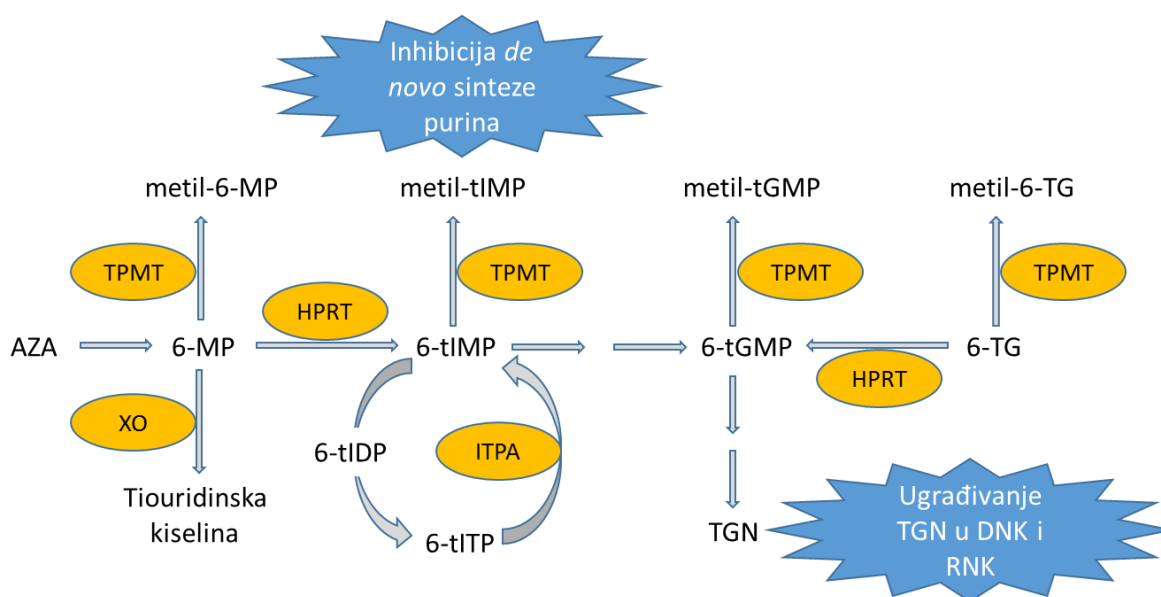
Tiopurinski lekovi su neaktivni u svom izvornom obliku. AZA se po ulasku u organizam neenzimski prevodi u 6-MP i imidazolnu grupu. Značajnoj metaboličkoj obradi pre ispoljavanja svog citotoksičnog dejstva bivaju podvrgnuti 6-MP i 6-TG: oksidaciji, S-metilaciji i fosforibozilaciji (Lennard 1992). Da bi citotoksični efekat bio postignut, potrebno je da se ovi lekovi prevedu u tioguaninske nukleotide (TGN) koji se umesto pravih guaninskih nukleotida ugrađuju u nukleinske kiseline i tako izazivaju zaustavljanje ćelijskog

ciklusa i ćelijsku smrt (Swann et al. 1996). U prvom koraku, pod uticajem intraćelijskog enzima hipoksantin fosforibozil transferaze (HPRT) 6-MP se prevodi u tiiozin monofosfat (tIMP), a kasnije delovanjem još dva enzima u tioguanozin monofosfat (tGMP). Pod uticajem istog HPRT enzima 6-TG se direktno prevodi u tGMP. Adenozin kinaza ovo jedinjenje prevodi u TGN, toksične nukleotide koji se ugrađuju u nukleinske kiseline (Coulthard & Hogarth 2005). Manje metaboličkih koraka je potrebno da se 6-TG prevedu u TGN, u poređenju sa 6-MP ili AZA (slika 1.2).

Na tiopurine, kao i na njihove metabolite deluju ksantin oksidaza (XO) i aldehidna oksidaza (AO), kao i tiopurin S-metiltransferaza (TPMT). Smatra se da proizvodi oksidacije putem XO i AO nemaju citotoksičnu aktivnost, ali se XO i ne eksprimira u koštanoj srži i krvnim ćelijama (Lennard et al. 1987; Coulthard & Hogarth 2005). U ovim metabolički veoma aktivnim tkivima, TPMT je glavni enzim odgovoran za metabolizam tiopurinskih lekova. Zato je kod pacijenata pod terapijom tiopurinskim lekovima, nivo aktivnosti TPMT enzima obrnuto srazmeran koncentraciji TGN u eritrocitima (Lennard et al. 1987). Visok nivo tioguaninskih nukleotida u ćelijama je potreban i poželjan za dobar ishod lečenja ALL kod dece, dok su niske koncentracije ovog metabolita dovedene u vezu sa povećanim rizikom od pogoršanja osnovne bolesti. Međutim, pokazano je da smanjena aktivnost TPMT enzima može da se dovede u vezu sa velikim rizikom od toksičnosti izazvane upotrebom tiopurinskih lekova, čak i fatalnom, kao i sa pojavom sekundarnih maligniteta kod ALL pacijenata (Relling et al. 1998; Bo et al. 1999).

U toku terapije lekom 6-TG-om koncentracija TGN je višestruko veća u eritrocitima ALL pacijenata, nego u toku terapije lekom 6-MP-om (Erb et al. 1998). U *in vitro* studiji je pokazano da je ćelijska linija koja ima višu TPMT aktivnost osetljivija na lek 6-MP, a rezistentnija na lek 6-TG (Dervieux et al. 2001). Ova pojava se objašnjava dodatnim citotoksičnim efektom metilovanih metabolita 6-MP-a, za koje je dokazano da inhibiraju *de novo* sintezu purina (Hogarth et al. 2008; Bökkerink et al. 1993). Takođe, predloženo je da lekovi 6-MP i 6-TG delimično svoj citotoksični efekat ostvaruju i smanjenjem ukupne metilacije DNK u ćeliji. Ipak, ugradnja TGN-a u DNK/RNK se smatra glavnim mehanizmom citotoksičnosti tiopurinskih lekova (slika 1.2) (Fotoohi et al. 2010).



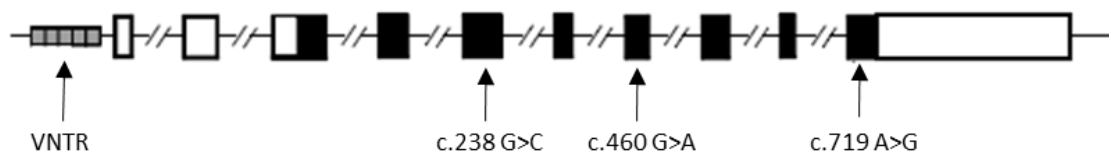


Slika 1.2. Metabolički put tiopurina i njihovo citotoksično dejstvo. 6-MP – 6-merkaptopurin, 6-TG – 6-tioguanin, 6-tIMP – 6-tioinozitolmonofosfat, 6-tIDP – 6-tioinozitol difosfat, 6-tITP – 6-tioinozitoltrifosfat, 6-tGMP – 6-tioguanozinmonofosfat, AZA – azatioprin, TGN – tioguaninski nukleotidi, ITPA – inozin trifosfat pirofosfathidrolaza, HPRT – hipoksantin fosforiboziltransferaza, TPMT – tiopurin S-metiltransferaza, XO – ksantin oksidaza.

Genetičke varijacije koje bi mogle biti izuzetno važne za individualizaciju terapije lekom 6-MP-om koje su u ovom radu izučavane nalaze se u genima: *TPMT*, inozin trifosfataza (*ITPA*), ATP vezujuća kasetna supfamilija B, član 1 (*ABCB1*), ATP vezujuća kasetna supfamilija C, član 4 (*ABCC4*), kao i metilentetrahidrofolat reduktaza (*MTHFR*). Transporteri leka 6-MP, *ABCB1* i *ABCC4*, takođe prenose i lek metotreksat (MTX) iz ćelije. Enzim *MTHFR* je jedan od glavnih u metaboličkom putu folata i leka MTX-a. Zbog toga će varijacije u genima *ABCB1*, *ABCC4* biti razmatrane zasebno, a varijacije u genu *MTHFR*, u delu koji opisuje metabolizam leka MTX-a.

### 1.3.1 Tiopurin S-metiltransferaza (*TPMT*)

Gen *TPMT* se nalazi se na kratkom kraku hromozoma 6, sadrži 10 egzona i dugačak je 34kb (Szumlanski et al. 1996) (slika 1.3). Drugi egzon ovog gena najčešće ne ulazi u sastav iRNK, nego se iseca splajsovanjem. Protein TPMT gradi 245 aminokiselina sa molekulskom masom od 35kD (Coulthard & Hogarth 2005). Identifikovan je i mapiran i pseudogen koji ne sadrži intronske sekvence na kratkom kraku hromozoma 18 koji je 96% homolog genu *TPMT* (Lee et al. 1995).



Slika 1.3. Šematski prikaz gena *TPMT*. Egzoni su predstavljeni pravougaonicima, kodirajući deo je crno obojen. Lokacije varijabilnog broja tandemskih ponovaka (VNTR) u promotoru i tri najčešće varijacije u kodirajućem regionu gena su označene strelicama. Preuzeto i modificirano iz rada Wang-a i Weinshilboum-a iz 2006. godine (Wang & Weinshilboum 2006).

TPMT je citosolni enzim koji katalizuje S-metilaciju aromatičnih i heterocikličnih sulfhidrilnih jedinjenja uključujući i tiopurinske lekove (Tai et al. 1996). Ovaj metabolički put predstavlja jedan od najvažnijih puteva detoksifikacije tiopurinskih lekova, posebno u tkivima gde se drugi enzimi za detoksifikaciju ne eksprimiraju. TPMT enzim prenosi metil grupu sa kofaktora S-adenozilmetionina (SAM) na supstrat, a SAM se zauzvrat prevodi u S-adenozilhomocistein (SAH). Pokazano je da SAM stabilizuje TPMT enzim i da je, stoga, njegova koncentracija u ćeliji pozitivno korelisana sa aktivnošću TPMT enzima (Milek et al. 2009; Milek et al. 2012).

Tiopurinski lekovi se koriste u lečenju mnogih bolesti a podnošenje i terapijski efekat ovih lekova zavisi prevashodno od aktivnosti TPMT enzima. Aktivnost ovog enzima moguće je

predvideti određivanjem najčešćih varijacija u kodirajućem regionu gena *TPMT* (Spire-Vayron de la Moureyre et al. 1998; Schaeffeler et al. 2004), što je metod izbora u kliničkoj praksi jer je merenje aktivnosti enzima u eritrocitima skuplji i zahtevniji proces. Takođe, izmerena aktivnost *TPMT* enzima pre predstavlja trenutno stanje aktivnosti samog enzima, nego trajnu karakteristiku, a veoma zavisi od toga da li pacijent dobija terapiju u momentu samog merenja i da li je u skorije vreme primio transfuziju krvi. Zbog toga je, ako se ova metoda koristi za praćenje aktivnosti *TPMT* enzima, poželjno odrediti *TPMT* aktivnost u više uzoraka krvi prikupljenih tokom dužeg vremenskog perioda (McMillin 2007).

Varijacije u genu *TPMT* i to u kodirajućem regionu gena su najvažnije za funkciju samog enzima, a samim tim i značajni farmakogenomički markeri. To su na prvom mestu nesinonimne zamene nukleotida koje utiču na promenu primarne strukture *TPMT* enzima. Mutacije na granicama između egzona i introna koje narušavaju obradu primarnog transkripta i delecije egzona se ređe javljaju (Wang & Weinshilboum 2006).

*TPMT* aktivnost nasleđuje se autozomalno kodominantno (Weinshilboum & Sladek 1980). Funkcionalni alel, označava se sa *TPMT*\*1 i povezuje se sa visokom aktivnošću enzima ako se nađe u homozigotnom stanju. Homozigotno stanje podrazumeva da se isti alel nađe na oba homologa hromozoma. Prijavljeno je 37 varijantnih alela koji se označavaju od *TPMT*\*2 – *TPMT*\*38 (<http://www.imh.liu.se/tpmtalleles?l=en>, podaci iz januara 2015. godine). Za veliku većinu ovih varijantnih alela važi da ako se nađu u heterozigotnom stanju sa neizmenjenim alelom, ovi izmenjeni aleli uslovljavaju nešto smanjenu aktivnost *TPMT* enzima. Heterozigotno stanje podrazumeva da se kod jedne osobe različiti aleli nađu na dva homologa hromozoma. Međutim, ako se izmenjeni aleli nađu na oba homologa hromozoma, tada je aktivnost *TPMT* enzima izrazito niska, često nemerljivo mala (Weinshilboum & Sladek 1980).

Određivanje *TPMT* statusa, merenjem aktivnosti samog enzima iz uzorka krvi pacijenta ili genotipizacijom gena *TPMT*, se preporučuje pre početka terapije tiopurinima. Na osnovu dobijenih rezultata se prepisuje početna doza tiopurinskih lekova za pojedinačnog pacijenta i/ili modifikuje terapijska doza u slučaju ispoljene toksičnosti povezane sa terapijom,

odnosno detekcije farmakogenomičkih markera koji se dovode u vezu sa smanjenom aktivnošću TPMT enzima ([www.pharmgkb.org](http://www.pharmgkb.org)). Iako korisno u kliničkoj praksi, TPMT testiranje ne može da zameni praćenje toksičnosti tiopurinske terapije. Pacijenti nosioci homozigotnog funkcionalnog *TPMT* alela, kojih ima oko 90% u belim populacijama, najčešće dobijaju punu dozu tiopurinskih lekova propisanu protokolima i tada obično ne dolazi do ispoljavanja toksičnih efekata samog leka. Heterozigotni nosioci varijantnih *TPMT* alela, čija je učestalost u belim populacijama oko 10%, dobijaju doze lekova na početku terapije umanjene za 30 – 70%, koje se posle određenog vremena postepeno mogu povećati do pune doze (Dokmanovic et al. 2006; Relling et al. 1999). Ukoliko dođe do toksičnosti uzrokovane tiopurinskom terapijom, terapija se obavezno prekida, saniraju se posledice toksičnosti pa se nakon toga ponovo uključuju ali ovog puta umanjene doze tiopurinskih lekova. Ovakva toksičnost se najčešće manifestuje pojavom febrilnih neutropenijskih epizoda, po život opasnom leukopenijom, toksičnošću gastrointestinalnog trakta ili infekcija (Karas-Kuzelicki et al. 2009). U populaciji ima 0.3 – 0.6% ljudi koji na oba homologa hromozoma nose nefunkcionalne *TPMT* alele. Za njih je preporučeno da počnu lečenje 20 puta manjom dozom od standardne ili da uopšte ne koriste tiopurinske lekove. Kod 1 – 2% pacijenata detektovana je izrazito visoka aktivnost TPMT enzima (Schaeffeler et al. 2004; Weinshilboum & Sladek 1980). Takvi pacijenti dobijaju i do 50% veće doze tiopurinskih lekova od standardne, pa čak i tako, često ne odgovaraju adekvatno na terapiju. Treba naglasiti da iako smanjenje doze 6-MP-a na početku terapije kod ALL pacijenata koji su nosioci bar jednog nefunkcionalnog *TPMT* alela smanjuje rizik od toksičnosti i sekundarnih maligniteta, u isto vreme se povećava i rizik od ponovne pojave veoma aktivne bolesti tj. relapsa (Levinsen et al. 2014).

Funkcionalni *TPMT*\*1 alel se u belim populacijama javlja sa učestalošću od oko 95 %, manje učestalo nego u azijskim, pa se nameće pitanje da li iz nekog razloga prirodna selekcija ima ulogu u oblikovanju ovakvog stanja (Collie-Duguid et al. 1999). Do tog odgovora naučnici još uvek nisu došli jer i dalje nije otkriveno koji je prirodni supstrat TPMT enzima, odnosno koja je uloga ovog enzima kada osoba ne unosi tiopurinske lekove u organizam (Fotoohi et al. 2010). Tri najčešće nesinonimne promene u kodirajućem delu gena *TPMT*, c.238 G>C,

c.460 G>A i c.719 A>G, čine 80 – 95% svih nefunkcionalnih *TPMT* varijanti u belim populacijama. Među izmenjenim *TPMT* alelima, u čijem sastavu su jedna ili dve od ove tri promene, najčešće se javljaju *TPMT*\*2 (c.238 G>C), *TPMT*\*3A (c.460 G>A i c.719 A>G), *TPMT*\*3B (c.460 G>A) i *TPMT*\*3C (c.719 A>G) (Spire-Vayron de la Moureyre et al. 1998; Tai et al. 1996). U belim populacijama i populacijama jugoistočne Azije najčešće se javlja *TPMT*\*3A, dok se u Kini i kod Afroamerikanaca (Hon et al. 1999) najčešće javlja *TPMT*\*3C alel (Collie-Duguid et al. 1999).

Najčešće varijacije u genu *TPMT* povezane sa smanjenom aktivnošću enzima su po tipu SNV. Kada se nađu u homozigotnom stanju, ove varijante dovode do nemerljivo male aktivnosti enzima, mada je razlika između „normalnog“ i izmenjenog enzima u samo jednoj ili dve aminokiseline. Pogrešno uvijanje varijantnih alozima praćeno ubikvitinizacijom i degradacijom na proteozomu je glavni mehanizam ovako smanjene aktivnosti (Tai et al. 1997).

Varijacije u genima se inače najčešće detektuju metodama baziranim na lančanoj reakciji polimerizacije (PCR-u) koristeći genomsku DNK izolovanu iz uzorka krvi, biopsije tkiva ili bukalnog brisa pacijenta. Ukoliko se detektuje više varijanti u istom genu u heterozigotnom stanju, bez dodatnih analiza pripadnika porodice pacijenta nije moguće odrediti haplotip, odnosno genetičke varijante na svakom od dva homologa hromozoma. Ova činjenica otežava genotipizaciju gena *TPMT* u kliničkoj praksi. Naime, ako se kod pacijenta detektuju varijacije na pozicijama 460 i 719 u heterozigotnom stanju, nije moguće bez dodatnih porodičnih studija utvrditi da li se radi o *TPMT*\*1/*TPMT*\*3A alelskoj kombinaciji povezanoj sa intermedijarnom aktivnošću ili o *TPMT*\*3C/*TPMT*\*3B koja utiče na zanemarljivo malu aktivnost *TPMT* enzima (Weinshilboum & Sladek 1980). Ipak, ukoliko je poznato kojoj populaciji pacijent pripada, nekad se može odrediti verovatnija kombinacija alela. Na primer, u belim populacijama *TPMT*\*1 i *TPMT*\*3A aleli su znatno češći od *TPMT*\*3C i *TPMT*\*3B alela. To znači da ukoliko se kod osobe evropskog porekla detektuju varijacije na pozicijama c.460 i c.719 u heterozigotnom stanju, najverovatnije se radi o *TPMT*\*1/*TPMT*\*3A alelskoj kombinaciji povezanoj sa intermedijarnom *TPMT* aktivnošću. Ovaj podatak svakako ne isključuje neophodnost porodičnih studija.

Distribucija aktivnosti TPMT enzima kod ljudi je trimodalna (Weinshilboum & Sladek 1980), međutim ne postoji jasna granica između visoke i intermedijarne TPMT aktivnosti. Čak i među pacijentima koji ne nose najčešće varijante u kodirajućem regionu gena *TPMT*, postoji značajna varijabilnost u enzimskoj TPMT aktivnosti. (Alves et al. 2001). Takođe, nađeni su nosioci *TPMT\*1/TPMT\*1* genotipa koji imaju intermedijarnu aktivnost enzima, kao i nosioci jednog nefunkcionalnog alela koji pokazuju visoku aktivnost (Spire-Vayron de la Moureyre et al. 1998). Sve ovo dovodi do zaključka da postoje faktori van kodirajućeg regiona gena *TPMT*, faktori modifikatori, koji utiču na aktivnost TPMT enzima. Ovi faktori mogu biti varijacije u aktivnosti enzima folatnog puta od kojih zavisi koncentracija kofaktora TPMT enzima, SAM-a, ili retke varijante u kodirajućem regionu gena *TPMT* koje se rutinskim farmakogenomičkim analizama ne detektuju. Takođe, varijante u regulatornom regionu gena *TPMT*, kao što je promotor ovog gena, mogu značajno da utiču na nivo genske ekspresije tj. na količinu sintetisanog TPMT enzima i konačno na TPMT aktivnost.

#### 1.3.1.1.Promotor gena *TPMT*

Promotor gena *TPMT* ne sadrži ni TATA ni CCAAT element. Međutim, proksimalnih 873bp promotorskog regiona ima 71% GC bazni sastav i sadrži GC blokove za koje se vezuje Sp1 transkripcioni faktor (eng. stimulating protein 1). Ovaj protein je široko eksprimiran u humanim tkivima, a poznato je da može da pokrene transkripciju mnogih promotora koji ne sadrže TATA blok. U promotoru se nalaze vezujuća mesta za Erg-1 i njemu slične faktore kao i za AP-2 i NF-κB transkripcione faktore. Takođe, poznato je nekoliko transkripcionih start pozicija koje su vrlo bliske prvootkrivenoj poziciji koja nosi +1 obeležje (Krynetski et al. 1997; Fessing et al. 1998).

Minisatelitski ili region varijabilnog broja tandemskih ponovaka (VNTR) promotora gena *TPMT* prostire se distalno od -43 baznog para u odnosu na start transkripcije i ukupne je dužine između 52 i 160bp (Spire-Vayron de la Moureyre et al. 1999). VNTR region je izrazito GC bogat i pokazano je da se za njega vezuju Sp1 i Sp3 transkripcioni faktori (Zukic et al. 2010). Ovaj region sadrži između 3 i 9 nesavršenih tandemskih ponovaka. Postoji

ukupno 3 tipa ponovaka nazvanih A, B i C koji se razlikuju po dužini i nukleotidnoj sekvenci (tabela 1.1). A ponovak je dužine 18bp, dok su B i C dugački po 17bp. Prvih 14bp je identično u svim tipovima ponovaka, a razlikuju se po preostala 3 ili 4bp. U svakom VNTR alelu, ponovci su poređani na isti način: prvo A, sledeći je B i na kraju C, bez umetnutih sekvenci između.

Tabela 1.1. Tip i sekvenca ponovaka u VNTR regionu promotora gena *TPMT*

Tip ponovka	Sekvenca ponovka*
Ponovak A	5'-GAGGCGGGGCGCGGGAAA-3'
Ponovak B	5'-GAGGCGGGGCGCGGGCG-3'
Ponovak C	5'-GAGGCGGGGCGCGGAGA-3'

\*Sekvence po kojima se ponovci međusobno razlikuju su **podebljane**

Broj A i B ponovaka varira kod različitih VNTR alela, dok je C ponovak uvek jedan. Tako se može desiti da aleli imaju isti broj ponovaka, ali različitu internu strukturu – arhitekturu. Arhitektura do sada opisanih VNTR alela bi se mogla ukratko opisati sledećom formulom:  $A_nB_mC$ , gde n može imati vrednosti od 1 do 7, a m od 1 do 6. Usvojena je nomenklatura prema kojoj se tip VNTR alela obeležava ukupnim brojem jedinica, iza kojeg sledi slovo koje se odnosi na redosled otkrivanja alela sa istim ukupnim brojem ponovaka (tabela 1.2). Iako A, odnosno B ponovaka u alelu može da bude i 7, odnosno 6, zanimljivo je da su izuzetno retki VNTR aleli koji imaju po 3 ili više i A i B ponovaka. Aleli koji se najčešće javljaju su VNTR\*4a sa učestalošću od oko 50% i VNTR\*5a sa učestalošću oko 30%. Posle njih slede VNTR\*6a sa učestalošću oko 10 % i VNTR\*7a sa učestalošću od oko 6%. Ostali aleli su znatno manje učestali (Marinaki et al. 2003; Alves et al. 2001).

Do sada je objavljeno više studija o uticaju VNTR regiona promotora gena *TPMT* na njegovu ekspresiju. Uglavnom je merena aktivnost TPMT enzima u eritrocitima koja je poređena sa tipom VNTR koju pacijent nosi, pri tom su ispitivane osobe koje ne nose varijacije u kodirajućem regionu gena *TPMT*. Treba istaći da se su neke studije uzimale u obzir samo uticaj ukupnog broja ponovaka na aktivnost TPMT enzima ili transkripciju gena *TPMT*, bez

zadiranja u unutrašnju strukturu VNTR regiona (Yan et al. 2000; Spire-Vayron de la Moureyre et al. 1998).

Tabela 1.2. VNTR aleli promotora gena *TPMT*

VNTR alel	Broj A ponovaka	Broj B ponovaka	Broj C ponovaka
VNTR*3	1	1	1
VNTR*4a	2	1	1
VNTR*4b	1	2	1
VNTR*5a	2	2	1
VNTR*5b	3	1	1
VNTR*6a	2	3	1
VNTR*6b	1	4	1
VNTR*6c	4	1	1
VNTR*6d	3	2	1
VNTR*7a	5	1	1
VNTR*7b	1	5	1
VNTR*7c	4	2	1
VNTR*8a	6	1	1
VNTR*8b	2	5	1
VNTR*9a	7	1	1
VNTR*9b	2	6	1

Preuzeto iz rada Zukić i saradnika iz 2010 godine (Zukic et al. 2010)

Pokazano je da pacijenti nosioci više od 10 VNTR ponovaka na oba hromozoma imaju povećane šanse da iskuse neželjene efekte pri lečenju azatioprinom nego oni sa 10 ili manje VNTR ponovaka u promotoru gena *TPMT* (Fabre et al. 2004). Sa povećanjem ukupnog broja VNTR ponovaka smanjuje se aktivnost TPMT enzima (Spire-Vayron de la Moureyre et al. 1998). Trend potvrđuju i dve studije koje povezuju smanjenu aktivnost TPMT enzima sa alelima sa više od 5 VNTR ponovaka (Yan et al. 2000; Alves et al. 2001). Pored toga, genotip



VNTR\*4/VNTR\*5 (VNTR\*4 i VNTR\*5 su aleli sa ukupno 4, odnosno 5 ponovaka, bez obzira na arhitekturu) doveden je u vezu sa najvećom aktivnošću TPMT enzima (Yan et al. 2000). Alves i saradnici dovode u vezu prisustvo VNTR\*6a alela sa smanjenom TPMT aktivnošću (Alves et al. 2001). Osim toga, pokazano je da VNTR alel sa ukupno 7 ponovaka ima inhibitorni efekat na transkripciju gena *TPMT*, dok su stimulatorni efekat na transkripciju gena *TPMT* pokazali promotori gena *TPMT* sa 8 VNTR ponovaka (Spire-Vayron de la Moureyre et al. 1999). Međutim, studija Marinaki i saradnika ne pokazuje statistički značajan uticaj ukupnog broja A, B ili totalnog broja ponovka na ekspresiju gena *TPMT* (Marinaki et al. 2003).

Na poziciji -327 u promotoru gena *TPMT* nalaze se tandemski trinukleotidni GCC ponovci kojih najčešće ima 6. Međutim, postoje aleli sa 5, odnosno 7 ponovaka koji se dovode u vezu sa povećanom ekspresijom reporterskog gena *in vitro* (Roberts et al. 2008). Takođe, retki aleli sa 5 odnosno 7 GCC ponovaka su detektovani kod ljudi koji imaju izrazito visoku TPMT aktivnost (Roberts et al. 2008). Ova studija je napravila pomak u razumevanju velike varijabilnosti u aktivnosti TPMT enzima kod ljudi koji nose funkcionalne *TPMT* alele.

### 1.3.2 Inozin trifosfataza (*ITPA*)

Gen *ITPA* se nalazi na kratkom kraku hromozoma 20 i kodira enzim inozin trifosfat pirofosfohidrolazu (*ITPA*). Ovaj enzim katalizuje pirofosfohidrolizu nekanonskih (deoksi) nukleotid trifosfata, (d)NTP, u (deoksi)nukleotid monofosfate, (d)NMP, sprečavajući akumulaciju genotoksičnih jedinjenja koja mogu biti ugrađena u nukleinske kiseline. Na ovaj način *ITPA* enzim spasava ćeliju od oštećenja DNK koja mogu dovesti do apoptoze ili neoplastične transformacije ćelije (Stocco et al. 2013).

Nekanonske baze kao što su inozin i ksantin mogu da se sparuju sa kanonskim. Njihovi nukleotidi predstavljaju supstrate za DNK i RNK polimeraze. Poznato je da inozin formira vodonične veze sa citozinom, i zato što se formiraju samo dve vodonične veze, ova veza je slabija nego kad se sparuju kanonske baze (Martin et al. 1985). Inkorporacija dITP sama po

sebi ne oštećuje DNK, jer se dITP najčešće ugrađuje nasuprot citozina, ponašajući se kao guanin tokom replikacije. Međutim, aktiviranjem sistema popravke DNK, na mestu ugrađenog ITP, uvode se jednolančani prekidi na DNK ili dolazi do homologe rekombinacije, što može dovesti do hromozomskih rearanžmana. Ksantinski nukleotid, takođe, može da se ugradi u DNK nasuprot citozina, ali sa manjom efikasnošću (Suzuki et al. 1998). Prepoznavanje ugrađenog ksantinskog nukleotida u DNK dovodi do zaustavljanja replikacione mašinerije što zahteva aktivaciju sistema popravki DNK ili se oštećenje toleriše, pa može doći do promene DNK sekvence (Simone et al. 2013).

Nekanonski (d)NTP se prirodno u ćeliji nalaze u niskim koncentracijama zahvaljujući aktivnosti ITPA enzima. Međutim, varijacije u genu *ITPA* mogu uticati na smanjenje aktivnosti ovog enzima, što za posledicu ima povećanje koncentracije ITP nukleotida u citoplazmi (Vanderheiden 1969). Za razliku od miševa gde je nokautiranjem gena *ITPA* znatno povećana smrtnost ovih životinja, kod ljudi koji nose nefunkcionalne *ITPA* alele nema očiglednih posledica po zdravlje. Ipak, odavno je pokazano da postoji povećan rizik od duševnih bolesti kod ljudi koji imaju smanjenu aktivnost ITPA enzima u eritrocitima (Vanderheiden & Zarate-Moyano 1976).

Najviše proučavana genetička varijacija u genu *ITPA* je c.94 C>A koja dovodi do aminokiselinske zamene Pro32Thr u ITPA proteinu. ITPA enzim je homodimer, a ova promena destabilizuje kompleks dimera čak i kada samo jedan od monomera nosi Pro32Thr promenu. Tako dolazi do drastičnog smanjenja ITPA aktivnosti i kod heterozigotnih nosilaca ove promene, za oko 75%. Drugi SNV, *ITPA* c.124+21A>C smešten u intronu gena dovodi do smanjenja ITPA aktivnosti narušavajući pravilan splajsing (Arenas et al. 2007).

Varijacije u genu *ITPA* su proučavane u vezi sa toksičnošću izazvanom tiopurinskim lekovima kod pacijenata obolelih od dečje ALL kao i od inflamatornih bolesti creva. Pokazano je da pedijatrijski ALL bolesnici koji nose bar jedan nefunkcionalni *ITPA* alel imaju veću verovatnoću da razviju mijelotoksičnost (Stocco et al. 2009), ali zato imaju manju šansu da uđu u relaps (Smid et al. 2014). Postoji više kontroverzi o uticaju varijacija u genu

*ITPA* na uspešnost i sigurnost azatioprina kod pacijenata sa inflamatornim bolestima creva (Simone et al. 2013).

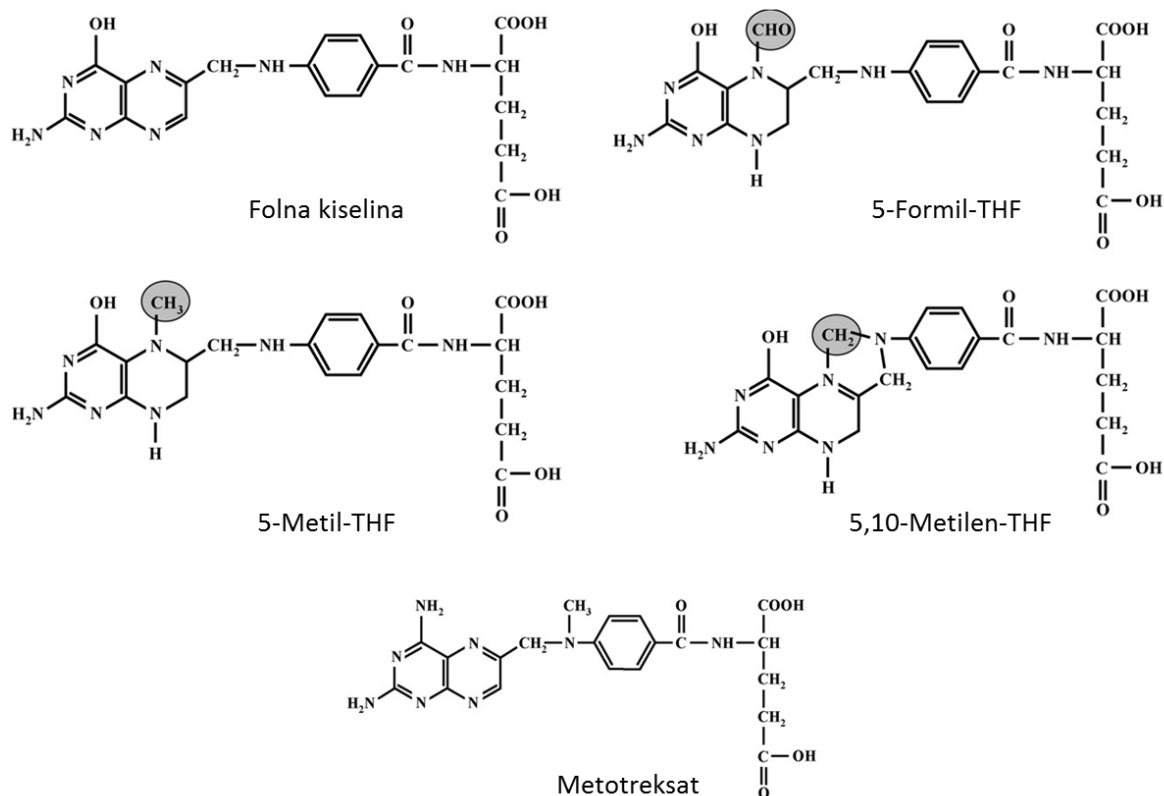
Postoje nagoveštaji da *ITPA* c.94 C>A varijacija ima uticaj na uspešnost lečenja artritisa lekom MTX-om. Kod pacijenata koji nose varijantni *ITPA* c.94A alel, ili imaju smanjenu *ITPA* aktivnost iz nekog drugog razloga, smanjena je efikasnost lečenja inflamatornih bolesti MTX-om (Pastore et al. 2014; Wessels et al. 2006). Smatra se da je razlog u tome što *ITPA* enzim, indirektno, utičući na koncentraciju IMP-a i AMP-a, može da poveća koncentraciju adenzina, koji je endogeni, antiinflamatorni agens. Ukoliko je *ITPA* enzim manje aktivan, adenzin će biti manje dostupan, pa će njegov antiinflamatorni efekat biti umanjen (Simone et al. 2013).

#### **1.4. Lek metotreksat (MTX)**

Pre više od 65 godina je prvi put opisano stanje remisije kod dece obolele od ALL, stanje u kome je osnovna bolest neaktivna, i to nakon upotrebe folatnih antagonista u lečenju ove bolesti (Farber & Diamond 1948). Prvi antifolatni agensi su bili analozi folata aminopterin i njegov homolog 4-amino-10-metilfolna kiselina poznatija kao lek MTX. Lek MTX se danas koristi u lečenju miliona pacijenata obolelih od različitih malignih, inflamatornih i autoimunih bolesti (Assaraf 2007).

MTX inhibira ključni enzim u metabolizmu folata, dihidrofolat reduktazu (DHFR) mehanizmom kompetitivne inhibicije. MTX se čvrsto veže za enzim DHFR, skoro ireverzibilno, onemogućavajući vezivanje prirodnih supstrata. DHFR enzim obnavlja rezerve redukovane forme folata tako što prevodi folnu kiselinu i dihidrofolat (DHF) u tetrahidrofolat (THF). Postoji više aktivnih formi folata (slika 1.4), 5,10-metilen-THF, 10-formil-THF i 5-metil-THF koje u ćeliji služe kao donori monokarbonskih jedinica - metilen, formil i metil grupa. Koriste se za sintezu timidilata u reakciji koju katalizuje enzim timidilat sintaza (TYMS), za sintezu purina uz pomoć enzima glicinamid ribonukleotid (GAR) transamilaze i aminoimidazol karboksamid ribonukleotid (AICAR) transformilaze, kao i za prevođenje

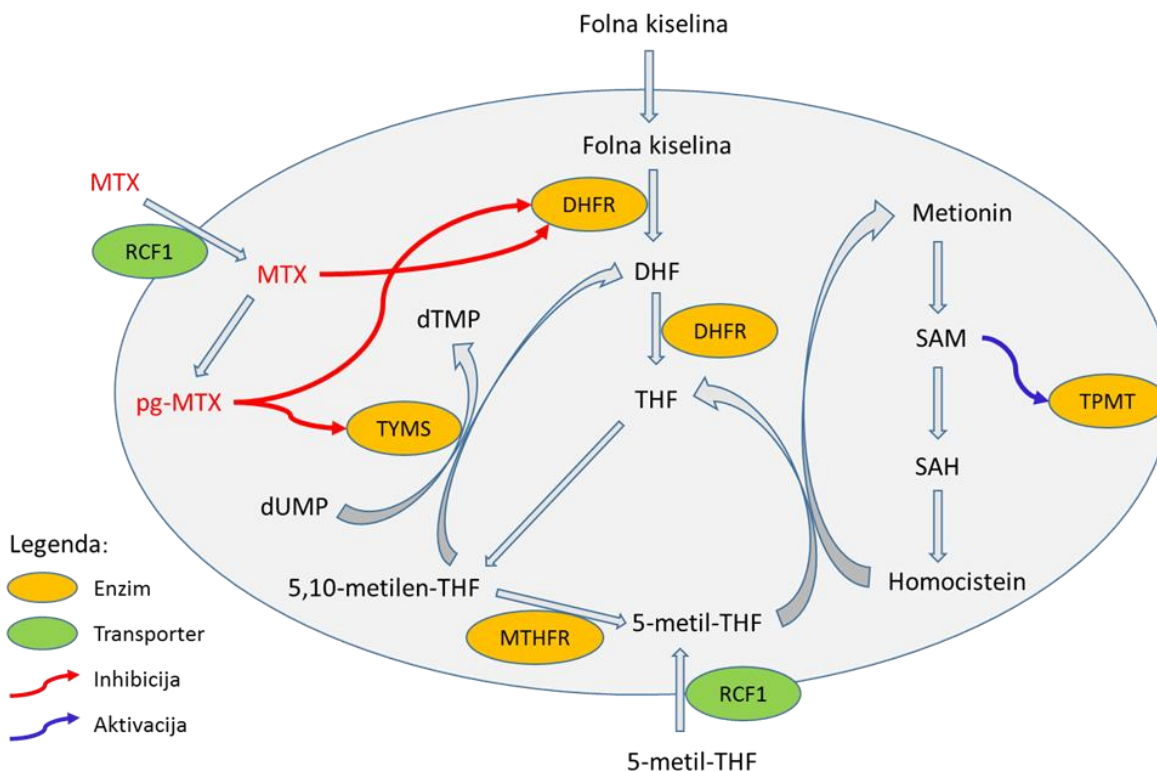
homocisteina u metionin (slika 1.5). Metionin je prekursor SAM-a, koji se koristi za reakcije metilacije, uključujući i metilaciju DNK. Nedostatak THF inhibira ove procese u ćeliji nakon čega dolazi do sprečavanja sinteze DNK, smanjenja DNK metilacije, porasta koncentracije homocisteina i konačno smrti same ćelije (Assaraf 2006).



Slika 1.4. Hemijske strukture folne kiseline, redukovanih folata (sa istaknutim aktivnim grupama) i strukturnog analoga folata – metotreksata. THF – tetrahidrofolat. Preuzeto i modifikovano iz rada Yehuda G. Assaraf-a iz 2006 godine (Assaraf 2006).

Folati predstavljaju derivate vitamina B9 koji ćelije sisara ne mogu da sintetišu, nego ih moraju unositi hranom. Folati vrlo slabo difunduju kroz ćelijsku membranu, te da bi ušli u ćeliju moraju ih preneti specifični transporter. Transporter redukovanih folata (RFC1) unosi u ćeliju i prirodne folate i MTX (Hou & Matherly 2014). Nakon unosa folata i MTX-a u ćeliju, na njih se enzimski katalizovano dodaju glutamatne jedinice – proces poliglutaminacije. Na ovaj način se prirodni i anti-folati zadržavaju u ćeliji i povećava im se

afinitet za enzime folatnog puta. MTX u poliglutamatnoj formi se efikasnije vezuje i tako inhibira enzime folatnog puta: DHFR, AICAR transformilazu i TYMS (Assaraf 2006; Allegra et al. 1985) (slika 1.5).



Slika 1.5. Metabolički put folata i njegova inhibicija lekom MTX-om. DHF – dihidrofolat, DHFR – dihidrofolat reduktaza, dTMP – deoksitimidinmonofosfat, dUMP – deoksiuridinmonofosfat MTHFR – metilentetrahidrofolat reduktaza, pg-MTX – poliglutamatna forma MTX-a, RCF1 – transporter redukovanih folata, SAM – S-adenozilmonofosfat, SAH – S-adenozilhomocistein THF – tetrahidrofolat, TPMT – tiopurin S-metiltransferaza.

Kao što je već pomenuto, okosnicu terapije održavanja u lečenju ALL kod dece čine lekovi 6-MP i MTX. Zanimljivo je što u delovanju lekova 6-MP-a i MTX-a postoji sinergizam. Naime, lek MTX inhibira enzim XO, učesnika metaboličkog puta tiopurinskih lekova, direktno se vezujući za ovaj enzim, i tako povećava dostupnost leka 6-MP-a. Osim toga, inhibirajući DHFR enzim, lek MTX smanjuje koncentraciju aktivnih formi folata, što utiče

na smanjenje koncentracije SAM-a, kofaktora koji stabilizuje TPMT enzim. I na ovaj način lek MTX povećava citotoksični potencijal samog leka 6-MP-a. Na kraju, i jedan i drugi lek inhibiraju sintezu purina, 6-MP preko svojih metilovanih metabolita, a MTX direktno, inhibirajući enzim AICAR transformilazu i indirektno, smanjujući dostupnost neophodnih formi folata (Giverhaug et al. 1999).

Genetičke varijacije koje bi mogle biti izuzetno važne za individualizaciju terapije lekom MTX koje smo u ovom radu izučavali nalaze se u genima: *TYMS*, *MTHFR*, *DHFR*, *SLC19A1*, *ABCBI* i *ABCC4*.

#### **1.4.1. Timidilat sintaza (TYMS)**

Gen *TYMS* nalazi se na kratkom kraku hromozoma 18. TYMS enzim katalizuje prevođenje dUMP (uridin monofosfat) u dTMP (timidin monofosfat), nukleotid koji je neophodan za DNK replikaciju i popravku DNK. Za ovu reakciju je neophodno prisustvo folatnog kofaktora, 5,10-metilen-THF-a koji se u ovom koraku oksiduje do dihidrofolata. Zbog važne funkcije koju enzim TYMS obavlja kod ćelija koje se brzo dele, inhibicija ovog enzima je od interesa kao mehanizam lečenja različitih vrsta kancera i inflamatornih bolesti. Među inhibitorima TYMS enzima su analozi pirimidina, fluoropirimidini, i folatni analozi, u koje spada i MTX (Lurje et al. 2009; Lima et al. 2013).

Aktivnost TYMS enzima zavisi od genetičkih varijacija u genu *TYMS*. Do sada su najviše proučavane bile varijacije u 5'UTR i 3'UTR regionima (eng. UTR = untranslated region) ovog gena. Ovi regioni okružuju kodirajuću sekvencu iRNK (informacione RNK), te stoga, mogu da utiču na stabilnost iRNK ili na efikasnost translacije (Lynch et al. 2005).

U 5'UTR regionu gena *TYMS* se nalazi minisatelitski region koga čine ponovci dugački 28bp. Ovih ponovaka najčešće ima 3 ili 2, mada su nađeni aleli sa 4 ili više ponovaka. Iako mehanizam nije sasvim jasan, pokazano je da alel sa 2 ponovka (2R) uslovljava slabiju translaciju *TYMS*-a u odnosu na alel sa 3 ponovka (3R) (Kawakami et al. 2001).

U 3'UTR regionu gena *TYMS* se nalazi 6bp dugačak indel, odnosno genetička varijacija gde jedan alel na određenom lokusu ima umetnutu (insertovanu), određenu sekvencu, dok je kod drugog alela ta sekvenca izbačena (deletirana). Učestaliji alel sadrži sekvencu od 6bp, 5' – TTAAAG – 3', dok je kod ređeg alela ova sekvenca odsutna. Alel sa deletiranom sekvencom uslovljava slabiju ekspresiju gena, verovatno usled smanjene stabilnosti iRNK (Pullmann et al. 2006). Međutim, zanimljivo je da se alel iz 5'UTR regiona gena *TYMS* koji uslovljava povećanu ekspresiju (3R) obično nasleđuje sa alelom iz 3'UTR regiona koji uslovljava smanjenu ekspresiju (6bp-), i *vice versa* (Lima et al. 2014).

Za nosioce alela koji utiču na smanjenu *TYMS* ekspresiju se očekuje da u svojoj DNK imaju povećan sadržaj deoksiuridinskih nukleotida. Stoga postoji povećana verovatnoća da se ovi nukleotidi pogrešno ugrade u DNK prilikom DNK replikacije ili popravke DNK. Ovakva oštećenja DNK mogu uzrokovati pojavu malignih oboljenja, pa se može očekivati da genetičke varijante koje se dovode u vezu sa smanjenom ekspresijom gena *TYMS* budu faktori rizika za razviće kancera. Neke studije pokazale da postoji povećan rizik za nastanak malignih oboljenja kod nosioca *TYMS* 2R alela, većina nije ove navode potvrdila, a neke studije su čak pokazale suprotno (de Jonge et al. 2009). Kada je proučavan uticaj 6bp indel promene u 3'UTR regionu gena *TYMS* na rizik za nastanak malignih oboljenja rezultati su takođe bili kontraverzni (Lima et al. 2013; Koppen et al. 2010).

Farmakogenomički značaj varijacija u genu *TYMS* prilikom lečenja pacijenata obolelih od različitih malignih i autoimunih bolesti antifolatnim i fluourouridinskim lekovima je već neko vreme u fokusu istraživanja. Lek MTX, posebno kada je poliglutamatoj formi, kao i lek 5-fluorouracil direktno se vezuju za *TYMS* enzim i tako ga inhibiraju (Allegra et al. 1985). Ukoliko ovog enzima u ćeliji prirodno ima više, što može da bude i usled prisustva *TYMS* alela koji uslovljavaju povećanu gensku ekspresiju, za takve pacijente se očekuje da će pomenuti lekovi biti manje toksični ali i da će efikasnost terapije biti slabija. Zaista, pokazano je da deca obolela od ALL koja nose *TYMS* 3R3R genotip imaju povećan rizik od relapsa (Krajinovic et al. 2005), dok RA pacijenti koji nose *TYMS* 3R3R genotip pokazuju slabiji odgovor na terapiju lekom MTX-om (Lima et al. 2014). Međutim, kod adultnih ALL

pacijenata nosilaca *TYMS* 3R3R genotipa, ova genetička varijanta se dovodi u vezu sa nastankom anemije tokom lečenja lekom MTX-om (Ongaro et al. 2009).

#### 1.4.2. Metilentetrahidrofolat reduktaza (MTHFR)

Gen *MTHFR* se nalazi na kratkom kraku prvog hromozoma i kodira istoimeni enzim koji katalizuje ireverzibilno prevođenje 5,10-metilen-THF-a u 5-metil-THF. Kofaktor 5-metil-THF je neophodan za prevođenje homocisteina u metionin. Metionin podleže S-adenilaciji i formira SAM. SAM je glavni donor metil grupe u svim reakcijama metilacije u ćeliji, uključujući metilaciju i proteina i DNK (Ganguly & Alam 2015).

Manjak 5-metil-THF-a utiče na povećanje nivoa homocisteina u krvnoj plazmi – homocisteinemiju. Količina homocisteina u plazmi je obrnuto srazmerna nivou folata i vitamina B12, a zavisi i od uzrasta, pola, kao i od varijacija u genu *MTHFR* (Mahfouz et al. 2012).

Dve relativno česte nesinonimne nukleotidne zamene u genu *MTHFR* su dosta izučavane. Varijacija *MTHFR* c.677 C>T dovodi do aminokiselinske zamene alanina u valin na poziciji 222 MTHFR enzima i tako značajno utiče na smanjenje aktivnosti MTHFR enzima kao i povećanje nivoa homocisteina u plazmi, homocistinemiju (Yamada et al. 2001). Nešto blaže smanjenje aktivnosti MTHFR enzima i razvoj blaže homocisteinemije uzrokuje *MTHFR* c.1298 A>C varijacija, koja uslovljava aminokiselinsku zamenu glutamina u alanin na poziciji 429 na MTHFR proteinu (Böttiger et al. 2007). Preciznije, nosioci *MTHFR* c.677TT genotipa imaju za oko 65% smanjenu aktivnost MTHFR enzima, *MTHFR* c.1298CC nosioci imaju za oko 40% smanjenu MTHFR aktivnost, dok nosioci složenog heterozigotnog stanja za ove dve varijacije imaju za 40-50% smanjenu MTHFR aktivnost (Weisberg et al. 1998; Frosst et al. 1995).

Varijacije u genu *MTHFR* i homocisteinemija su najviše proučavane u kontekstu etiologije kardiovaskularnih bolesti, ateroskleroze i tromboze. Homocisteinemija najverovatnije



predstavlja faktor rizika za ove bolesti jer uzrokuje oksidativni stres, oštećenje tkiva i inflamaciju (Ganguly & Alam 2015). Budući da varijantni aleli gena *MTHFR* uzrokuju povećanje nivoa homocisteina, ovi aleli su povezani sa povećanim rizikom za dobijanje kardiovaskularnih bolesti (Liew & Gupta 2015).

Od gena koji kodiraju enzime folatnog puta, gen *MTHFR* je najviše izučavan u svetlu rizika za pojavu malignih bolesti. Pokazano je da *MTHFR* c.677 C>T varijacija asocirana sa pojavom ALL. Zanimljivo je da se pokazalo da nefunkcionalni, *MTHFR* c.677T alel ima protektivni efekat, odnosno da nosioci ovog alela imaju manju verovatnoću da razviju ALL. Ovaj nalaz se objašnjava činjenicom da nosioci *MTHFR* c.677T alela imaju više dostupan metilen-THF za sintezu dTMP od dUMP. Tako se kod nosilaca nefunkcionalnog *MTHFR* alela, dUTP manje ugrađuje u DNK, samim tim je i manje oštećenja DNK, za koja je jasno pokazano da su u vezi sa etiologijom kancera (Koppen et al. 2010).

Genetičke varijacije *MTHFR* c.677 C>T i u nešto manjoj meri *MTHFR* c.1298 A>C su naročito izučavane u svetlu toksičnosti i efikasnosti terapije lekom MTX-om. Izgleda da ni jedna od dve varijacije nije dobar klinički marker toksičnosti, niti efikasnosti terapije ovim lekom kod dece obolele od ALL (E Lopez-Lopez et al. 2013). Međutim, prisustvo *MTHFR* c.677T varijante izgleda da povećava rizik od relapsa kod ALL pacijenata nosilaca ove genetičke promene (Aplenc et al. 2005; Sepe et al. 2012). Naime, prilikom terapije lekom MTX-om, smanjenje aktivnosti enzima MTHFR povećava rizik od relapsa tako što povećava koncentraciju 5,10 metilen-THF-a. Ova forma folata je neophodna za sintezu dTMP i DNK, što je u suprotnosti sa citotoksičnim efektom leka MTX-a (Aplenc et al. 2005).

Pored značaja za terapiju lekom MTX-om, gen *MTHFR* je izučavan i kao farmakogenomički marker za terapiju lekom 6-MP-om. Naime, aktivnost TPMT enzima, glavnog metabolizera 6-MP-a, zavisi od koncentracije njegovog kofaktora, SAM-a (Milek et al. 2009; Milek et al. 2012). Koncentracija ovog kofaktora, sa druge strane, zavisi od aktivnosti MTHFR enzima. Tako se najviša aktivnost enzima TPMT očekuje kod pacijenata koji nose funkcionalne alele oba ova gena. Zaista, pokazano je da ALL pacijenti koji nose *MTHFR* alele koji uslovljavaju smanjenu aktivnost MTHFR enzima imaju povećani rizik za razvoj hematotoksičnosti i

infekcija. Takođe, primećeno je pacijenti koji nose alele koji uslovljavaju smanjenu aktivnost i enzima TPMT i MTHFR su u najvećem riziku da iskuse toksičnost 6-MP leka (Karas-Kuzelicki et al. 2009).

### 1.4.3. Dihidrofolat reduktaza (DHFR)

Gen *DHFR* se nalazi na dugom kraku hromozoma 5 i kodira istoimeni enzim. Identifikovano je više transkripata ovog gena, od kojih neki se ne transliraju u proteine, nego imaju regulatornu ulogu. Naime, regulatorni transkript je kodiran DNK sekvencom koja se nalazi uzvodno od glavnog, protein-kodirajućeg DNK regiona. Takođe, nađeno je i više obrađenih pseudogena na različitim hromozomima (Chen et al. 1982).

DHFR enzim ima ključnu ulogu u metabolizmu monokarbonskih grupa jer katalizuje prevođenje oksidovanih, neaktivnih formi folata, folne kiseline i dihidrofolata, u aktivnu, redukovanu formu, THF. Za ovu reakciju se troši redukovani NADPH koenzim, koji se za uzvrat, prevodi u oksidovanu formu. THF služi kao polazni supstrat za sintezu ostalih aktivnih formi folata, 5-metil-THF, 5,10-metilen-THF i 10-formil-THF koji služe za remetilaciju homocisteina u metionin, sintezu timidilata iz uridilata i *de novo* sintezu purina. Budući da ima važnu ulogu u ćeliji, nedostatak DHFR enzima dovodi se u vezu sa različitim bolestima. Zbog uloge u sintezi DNK, inhibitori ovog enzima se koriste kao anti-kancer, antiinflamatorni agensi, ali i kao antibiotici (Askari & Krajinovic 2010; Assaraf 2006).

Gen *DHFR* je izrazito varijabilan. Funkcionalne varijacije su nađene u svim regionima ovog gena. Ipak, gen *DHFR* je manje proučavan od drugih gena koji kodiraju enzime folatnog puta, kao što su *MTHFR* i *TYMS*. Najviše proučavana varijacija u ovom genu je delecija od 19bp u prvom intronu koja utiče na povećanu ekspresiju gena *DHFR* (Xu et al. 2007) i povećanje koncentracije folata, a smanjenje koncentracije homocisteina u plazmi (Gellekink et al. 2007). Varijacije u promotoru nekodirajućeg transkripta, na pozicijama -1680 i -317 u odnosu na početak transkripcije regulatornog transkripta, utiču na ekspresiju gena *DHFR* (Dulucq et al. 2008).

Odgovarajući unos i metabolizam folata obezbeđuje adekvatnu DNK sintezu i DNK metilaciju. Nedovoljna aktivnost ključnog enzima u folatnom putu, DHFR enzima, dovodi se u vezu sa pojavom različitih bolesti. Zatvaranje neuralne tube tokom embrionalnog razvića zahteva intenzivnu proliferaciju ćelija, pa je potreba za aktivnim formama folata u ćeliji povećana. Tako je nađeno da *DHFR* alel povezan sa visokom *DHFR* ekspresijom štiti od defekta neuralne tube (NTD) (Parle-McDermott et al. 2007). Ono što je zanimljivo je da ne samo nedostatak, nego i višak aktivnih formi folata može biti štetan. Naime, pokazano je da su žene koje koriste multivitaminske suplemente, a imaju genotip povezan sa visokom *DHFR* ekspresijom u većem riziku da obole od raka dojke (Xu et al. 2007).

DHFR enzim je glavna meta različitih anti-folatnih agenasa, uključujući lek MTX. Ovaj lek se ireverzibilno vezuje za DHFR enzim i na taj način ga inhibira. Veća količina ovog enzima u ćeliji bi mogla da smanji toksičnost izazvanu ovim lekom, ali i da ugrozi terapijski efekat samog leka. Na primer, u 3'UTR gena *DHFR* je identifikovana varijanta koja smanjuje afinitet siRNK za *DHFR* transkript i tako utiče na povećanje *DHFR* ekspresije, što za posledicu ima loš odgovor na lek MTX (Mishra et al. 2007). Takođe, kod RA pacijenata, nosilaca *DHFR* -317AA genotipa, pokazana je slabija efikasnost delovanja leka MTX-a, bez uticaja na toksičnost samog leka (Milic et al. 2012). Isti genotip, *DHFR* -317AA, udružen sa genotipom *DHFR* -1610CC, doveden je u vezu sa smanjenjem vremenskog perioda posle ciklusa terapije malignih bolesti u kome nema očiglednih kliničkih znakova pogoršanja osnovne bolesti (eng. EFS, event-free survival) (Dulucq et al. 2008). Nasuprot tome, u studiji u koju je bio uključen manji broj ALL pacijenata, nađeno je da je *DHFR* -317GG genotip povezan sa većom verovatnoćom od relapsa (Gómez-Gómez et al. 2012). Osim toga, prijavljeno je da genetička varijanta povezana sa povećanom ekspresijom, delecija od 19bp u intronu 1 gena *DHFR*, utiče na povećanje hepatotoksičnosti kod adultnih ALL pacijenata koji dobijaju MTX (Ongaro et al. 2009). Suprotstavljeni rezultati otvaraju put daljim istraživanjima brojnih varijacija u genu *DHFR* i njihovom značaju za odgovor na terapiju lekom MTX-om.

#### 1.4.4. *SLC19A1* (eng. solute carrier family 19 (folate transporter), member 1)

Gen *SLC19A1* je lociran na dugom kraku hromozoma 21 i kodira RFC1 transporter. Folati kao hidrofilni molekuli koji su u formi anjona na fiziološkim pH vrednostima, kroz ćelijske membrane vrlo teško prolaze difuzijom. Glavni put unosa folata se obavlja aktivnim transportom pomoću folatnih transportera, u koje spada i RFC1 (Hou & Matherly 2014).

RFC1 je široko eksprimiran u humanim tkivima i smatra se najvažnijim transportnim sistemom za unos folata u sisarske ćelije. Najzastupljenija forma folata u cirkulaciji je 5-metil-THF, koji se kao i lek MTX efikasno unosi u ćeliju ovim transporterom. Nasuprot tome, folna kiselina, oksidovana forma folata, se sa manjim afinitetom prenosi RFC1 transporterom (Hou & Matherly 2014; Matherly et al. 2007).

Česta i najistraženija varijacija u genu *SLC19A1* je SNV *SLC19A1* c.80 G>A koji utiče na zamenu arginina histidinom u proteinu a nalazi se u kodonu 27. Varijantni alel c.80A utiče na povišeni nivo folata i homocisteina u plazmi (Chango et al. 2000). Smatra se da ova varijacija smanjuje efikasnost prenosa kako prirodnih folata, tako i leka MTX-a, međutim funkcionalni značaj i mehanizam u osnovi ovog zapažanja nije poznat (Laverdière et al. 2002). Kao rezultat prisustva ove genetičke varijante, može da dođe do promene u kinetici RFC1 supstrata i na taj način ova genetička varijanta utiče na pojavu određenih bolesti odnosno moduliše efikasnost i toksičnost leka MTX-a.

Budući da ima važnu fiziološku funkciju, smanjena aktivnost RFC1 transportera može da dovede do oboljenja koja se dovode u vezu sa manjkom folata u ćelijama, kao što su kardiovaskularne i neurološke bolesti, ali i kanceri. Tako je nađeno da homozigotni nosioci manje funkcionalnog *SLC19A1* c.80A alela imaju nešto povećan rizik za dobijanje raka želuca i jednjaka (Wang et al. 2006), ali smanjen rizik za dobijanje raka glave i vrata (Galbiatti et al. 2011). Oprečni rezultati su dobijeni i što se tiče prisustva genetičke varijante *SLC19A1* c.80A i rizika za nastanak ALL kod dece. U jednoj studiji je nađeno da od svih proučavanih genetičkih varijacija povezanim sa folatnim putem prisustvo *SLC19A1* c.80AA genotipa nosi

najveći rizik za razvoj ALL (de Jonge et al. 2009), dok je druga studija pokazala suprotne rezultate, odnosno protektivni efekat *SLC19A1* c.80AA genotipa (Silva et al. 2013).

Farmakogenomički značaj *SLC19A1* c.80 G>A varijacija je takođe izučavan. Pacijenti koji se leče lekom MTX-om i nose *SLC19A1* c.80AA genotip, usled smanjene aktivnosti RFC1 transportera imaju povećanu koncentraciju ovog leka u plazmi, što može da utiče na efikasnost lečenja (Laverdière et al. 2002). Deca obolela od ALL koja nose *SLC19A1* c.80AA genotip su u većem riziku za dožive relaps i imaju lošiju prognozu (Laverdière et al. 2002; Leyva-Vázquez et al. 2012). Međutim, skorašnja meta-studija je pokazala da ova genetička varijacija nije dobar marker za predvođenje toksičnosti lekom MTX prilikom lečenja dece obolele od ALL (He et al. 2014).

#### **1.4.5. ATP vezujuća kasetna protein supfamilija C, član 4 (*ABCC4*)**

Gen *ABCC4* se nalazi na dugom kraku hromozoma 13 i kodira istoimeni transporter, koji se naziva još i MRP4 (multidrug resistance-associated protein 4). *ABCC4* pripada ATP vezujućoj kasetnoj (ABC, eng. ATP binding cassette) superfamiliji transportera koje imaju sličnu strukturu i funkciju. Ovi transporteri vrše efluks različitih supstrata, koristeći energiju dobijenu hidrolizom ATP-a. Do sada je identifikovano 48 humanih ABC gena koji su klasifikovani u 7 supfamilija – od ABCA do ABCG (Brambila-Tapia 2013).

*ABCC4* se eksprimira u brojnim tkivima i igra ulogu u farmakokinetici velikog broja endogenih i egzogenih jedinjenja. Ovaj transporter ispumpava iz ćelije različita fiziološki važna jedinjenja kao što su ciklični nukleotidi, ADP i eikozanoidi, potencijalno modulišući prenos signala (Russel et al. 2008). Takođe, izbacuje ksenobiotike i anti-viralne agense uključujući nukleozidne analoge, 6-MP i 6-TG, kao i MTX (Keppler 2011). Na ovaj način transporter MRP4 ima značajnu ulogu kao učesnik krvno-moždane barijere i štiti kosnu srž od nukleozidnih analoga iz cirkulacije (Belinsky et al. 2007), a budući da se eksprimira u

apikalnoj membrani ćelija bubrežnih tubula učestvuje u urinarnoj ekskreciji nukleozidnih analoga (Imaoka et al. 2007).

Gen *ABCC4* je verovatno najvarijabilniji gen u ABCC supfamiji (Saito et al. 2002). Neke od genetičkih varijacija u genu *ABCC4* su povezane sa smanjenom aktivnošću transportera. Okarakterisan je SNV u kodirajućem regionu (rs3765534) koji menja aminokiselinsku sekvencu i uslovljava drastično smanjenje funkcije transportera, što za posledicu ima povećani rizik od leukopenije kod pacijenata koji dobijaju tiopurinske lekove (Krishnamurthy et al. 2008; Ban et al. 2010). Ovaj SNV je učestao u azijskim populacijama, dok je u evropskim populacijama vrlo malo zastupljen (<http://www.ensembl.org>).

Neke studije su ispitivale regulatorni region gena *ABCC4*, a posebno se pokazao zanimljiv 3'UTR region gena. U skorašnjoj GWA (eng. genome-wide association) studiji je pokazano da je prisustvo nukleotida T varijacije *ABCC4* rs9516519 asocirano sa većom koncentracijom leka MTX-a u plazmi pedijatrijskih ALL bolesnika (Elixabet Lopez-Lopez et al. 2013), što je pokazatelj toksičnosti ovog leka. Međutim, izgleda da varijacije u 3'UTR regionu gena *ABCC4* ne utiču na vezivanje si-RNK (male interferirajuće RNK) za koje je dokazano da smanjuju aktivnost *ABCC4* transportera (Markova & Kroetz 2014).

#### **1.4.6. ATP vezujuća kasetna supfamilija B, član 1 (*ABCB1*)**

Gen *ABCB1* nalazi se na dugom kraku hromozoma 7. Kodira istoimeni protein, koji se još naziva i MDR1 (eng. Multidrug resistance protein 1) ili P-glikoprotein i pripada ABC superfamiliji efluksnih transportera (Brambila-Tapia 2013).

*MDR1* se predominantno eksprimira na ćelijskoj membrani gde deluje kao ATP zavisna, efluksna pumpa koja prepoznaje strukturno različite ksenobiotike i hemoterapeutike. *MDR1* se eksprimira u normalnim ćelijama različitih organa i tkiva kao što su krvne ćelije, jetra, bubrezi, mozak i placenta gde vrši ekskreciju ksenobiotika u žuč, urin, lumen creva i plazmu a učestvuje i u krvno-moždanoj barijeri. Budući da štiti organe i tkiva od toksičnog dejstva

različitih štetnih agenasa, smanjena aktivnost ovog transportera može biti faktor rizika za pojavu različitih bolesti (Zhang et al. 2013; Ieiri 2012).

Do sada je nađeno više od 66 različitih varijacija u kodirajućem regionu gena *ABCB1*. Ove varijacije mogu da utiču na aktivnost MDR1 transportera tako da predstavljaju potencijalan rizik za nastanak bolesti ili mogu da utiču na odgovor na terapiju različitim lekovima. Najviše izučavane varijacija u ovom genu je sinonimna *ABCB1* c.3435 C>T u egzonu 26. Smatra se da funkcionalne posledice ove promene nastaju usled promene genske ekspresije (Wang et al. 2005) ili zbog uvođenja slabo korišćenog kodona koji usporava translaciju proteina (Hoffmeyer et al. 2000). Nesinonimna c.2677 G>A/T varijacija u egzonu 21 dovodi do aminokiselinske zamene u proteinu alanina u serin ili treonin, pošto 3 različita nukleotida u kodonu mogu da se nađu na ovoj poziciji. Zanimljivo je da se ove dve genetičke varijacije nalaze u gametskoj neravnoteži vezanosti (LD), tako da se retke varijante oba lokusa uglavnom nasleđuju zajedno (Siegmond et al. 2002; Brambila-Tapia 2013).

Promene u genu *ABCB1* su do sada dosta izučavane u kontekstu podložnosti različitim bolestima. Intenzivno je proučavan rizik za pojavu inflamatornih bolesti creva kod ljudi sa varijantama u *ABCB1* genu i nađeno je da je ovaj rizik malo povećan kod nosilaca pomenutih genetičkih varijanti (Onnie et al. 2006). Takođe, pokazano je da je malo povećan rizik za razviće različitih vrsta kancera kod ljudi koji nose *ABCB1* c.3435T varijantu (Sheng et al. 2012). Iako se radi o multifaktorijalnim bolestima, genetička promena *ABCB1* c.3435T ima klinički značaj.

Farmakogenomički značaj genetičkih varijanti MDR1 transportera je dugo u fokusu. Anti-kancer lekovi, antibiotici, kortikosteroidi, imunosupresori, anti-viralni lekovi, itd. nalaze se među supstratima ovog transportera. Međutim, čak i nakon velikog broja studija, za sada nije ustanovljena jasna asocijacija između odgovora na terapiju lekovima i *ABCB1* genetičkih varijacija (Stępień et al. 2012; Ieiri 2012).

Do sada je slabo proučavan odgovor na terapiju tiopurinskim lekovima i lekom MTX-om u svetlu varijacija u genu *ABCB1*. Čelije u kojima je gen *ABCB1* prekomerno ekspimiran

pokazale su značajno veću rezistenciju na lek 6-MP u odnosu na kontrolne ćelije (Peng et al. 2011). Pacijenti oboleli od Kronove bolesti koji su nosili varijantne *ABCB1* alele su pokazali lošiji odgovor na terapiju azatioprinom, tačnije, sam lek je pokazao manju efikasnost (Mendoza et al. 2007). Kod RA pacijenata, nosilaca *ABCB1* c.3435 C>T varijacije, pokazano je da ova varijacija ima klinički značaj na terapiju lekom MTX-om (Takatori et al.; Drozdik et al. 2006). Ovi rezultati ohrabruju istraživanja varijacija u genu *ABCB1* kod dece obolele od ALL, a sve u cilju unapređenja terapije lekovima 6-MP-om i MTX-om.

### **1.5. Isti farmakogenetički markeri kao genetički modifikatori u različitim terapijskim odgovorima**

Okosnicu terapije u fazi održavanja lečenja akutne limfoblastne leukemije čine imunosupresivni lekovi 6-MP i MTX. U ovoj fazi terapije se takođe koriste i antibiotik baktrim i antimikotik nistatin. Iako se na prvi pogled čini da široko korišćeni antibiotik i antimikotik ne bi trebalo da imaju farmakogenetički značaj, ipak bi trebalo obratiti pažnju i na ove lekove.

Lek baktrim ili kotrimoksazol je kombinacija aktivnih jedinjenja sulfametoksazola i trimetoprima. Nedavno je pokazano da se lek baktrim odlično pokazao kao monoterapija u lečenju autoimunih bolesti, naročito RA (Rozin et al. 2001). Antiinflamatorno dejstvo ovog leka je dokazano u lečenju još jedne inflamatorne bolesti, Vegnerove granulomatoze (Roberts & Curd 1990). Mehanizam antiinflamatornog dejstva leka baktrima je takav da utiče na smanjenje nivoa slobodnih receptora za citokine interleukin 2 (IL-2) i za interleukin 6 (IL-6) (Ohtake et al. 2001). Tako je dokazano da neki antibiotici, osim svoje primarne antibiotske uloge, mogu da se koriste i kao imunosupresivni ili imunomodulatorni agensi. To je posebno izraženo kod grupe antibiotika u koje spadaju i sulfoni i sulfonamidi (sastavni deo leka baktrima) koji se koriste u lečenju duži vremenski period (Labro 2000).



IL-6 je proinflamatorni citokin koji ima značajnu ulogu u pokretanju imunskog odgovora, inflamaciji i kancerogenezi (Naugler & Karin 2008). U populacijama belaca je relativno učestala genetička varijacija *IL-6* -174 G>C koja utiče na nivo ekspresije ovog gena (Fishman et al. 1998). Urođene razlike u ekspresiji gena *IL-6* koje zavise od varijacija u ovom genu mogu uticati na razvoj malignih i inflamatornih bolesti, kao i na odgovor na terapiju antiinflamatornim lekovima (Di Renzo et al. 2012; Liu et al. 2015).

Lek nistatin se u fazi održavanja dečje ALL najčešće daje lokalno po potrebi. To je antigljivični lek koji ima moćno proinflamatorno dejstvo. Nistatin indukuje sintezu citokina IL-1 $\beta$ , IL-8 i faktora nekroze tumora (TNF) preko aktivacije TLR1 i TLR2 receptora (Razonable et al. 2005) i to jeste molekularni mehanizam proinflamatornog dejstva leka nistatina. TNF stimuliše NF-kB odgovor, koji podstiče preživljavanje ćelija (Tartaglia et al. 1991) i aktivira IL-6 (Baxter et al. 1999). TNF aktivira fosfatidilinozitol-3 kinaza/p-Act signalni put koji podstiče preživljavanje ćelija (Ozes et al. 1999). TNF može imati važnu ulogu u lečenju ALL kod dece. Naime, pronađeno je da se u ćelijama pacijenata obolelih od ALL eksprimiraju određeni citokini i da poremećena ekspresija naročito TNF citokina može da se dovede u vezu sa tokom bolesti koji je teško klinički kontrolisati (eng. refractory disease) (Kobayashi et al. 1997; Zhou et al. 1991). Ovakvi pacijenti ne odgovaraju dobro na terapiju već u fazi indukcije ili veoma brzo uđu u relaps posle kratke remisije (Gu et al. 2006). U nekim terapeutskim protokolima za lečenje autoimunih i inflamatornih bolesti, između ostalih i RA (Curković 2008), psorijaze i Kronove bolesti (Bank et al. 2015), se već duže vreme uspešno koriste anti-TNF agensi, u koje spada i etanercept (Krejsa et al. 2006). Možda bi trebalo razmisliti o uvođenju anti-TNF terapije u lečenju ALL kod dece kod koje se teško postiže dobar odgovor na standardnu terapiju.

Varijacija u promotoru gena *TNF*, *TNF* -308 G>A, utiče na nivo ekspresije ovog citokina (Louis et al. 1998). Ova varijacija predstavlja potencijalni biološki marker kako za odgovor na terapiju anti-TNF terapeutcima (Padyukov et al. 2003), tako i za predikciju razvoja različitih autoimunih i inflamatornih bolesti (Han et al. 2010).

IL-6 i TNF su citokini važni u procesima regulacije imunskog odgovora, inflamacije, kao i razvoja i progresije inflamatornih bolesti. Međutim, ovi citokini igraju ulogu u nastanku, promociji i prognozi malignih bolesti. TNF važi za faktor rasta velikog broja tumora (Vanden Berghe et al. 2000). TNF može da ima dvostruku funkciju, sa jedne strane stimulaciju proliferacije ćelija, ali i inhibiciju proliferacije i indukciju apoptoze, sa druge. Preciznije, pokazano je da TNF stimuliše proliferaciju ćelija koje se nalaze u stanju zastoja u rastu (eng. growth arrest), dok kod ćelija koje se aktivno dele, TNF izaziva apoptozu (Baxter et al. 1999). TNF stimuliše NF- $\kappa$ B odgovor, koji podstiče preživljavanje ćelija (Tartaglia et al. 1991) i aktivira IL-6 (Baxter et al. 1999), koji igra ulogu u progresiji tumora (Guo et al. 2012). Uloga TNF i IL-6 kao važnih regulatora tumorigeneze i inflamacije asocirane sa tumorom, čine ih atraktivnim metama za dodatnu anti-kancer terapiju (Grivennikov & Karin 2011).

## **2. Ciljevi**

U fokusu ove studije je farmakogenetički značaj genetičkih varijacija koje potencijalno modulišu odgovor na terapiju lekovima koji se koriste prilikom lečenja dečje ALL u fazi održavanja, poslednjoj i najdužoj fazi lečenja. U ovoj fazi lečenja koriste se dva citotoksična leka, 6-MP i MTX, a po potrebi i antibiotik, baktrim, kao i antimikotik, nistatin. Postoje velike razlike u odgovoru na terapiju ovim lekovima, koje se delimično mogu objasniti genetičkim varijacijama koje modulišu njihove metaboličke puteve. Uspešna predikcija odgovora na terapiju ovim lekovima, omogućava modifikaciju terapijskih protokola kako bi terapija bila efikasnija i sa manje neželjenih efekata.

Dosadašnje farmakogenomičke studije u dece obolele od ALL su bile uglavnom fokusirane na varijacije u kodirajućem regionu gena *TPMT*, za koje je poznato da utiču na aktivnost TPMT enzima i na odgovor na terapiju tiopurinskim lekovima, odnosno lekom 6-MP-om. Iako su ove varijante priznati farmakogenomički markeri, razlike u kodirajućem regionu gena *TPMT* nisu jedine koje utiču na odgovor na terapiju lekovima koje se koriste u fazi održavanja. Faktori koji mogu uticati na TPMT aktivnost su pol, uzrast, terapija, kao i genetičke varijacije van kodirajućeg regiona gena *TPMT*. Ekspresija gena *TPMT* nije do sada bila izučavana kao farmakogenomički marker u dečjoj ALL. Takođe, varijante u drugim genima koje modulišu metaboličke puteve lekova koji se koriste u lečenju dečje ALL, u fazi održavanja, su predmet intenzivnih izučavanja.

Mnoge studije su pokazale da postoje razlike u učestalostima farmakogenomičkih varijanti među populacijama. Takvi podaci su dragoceni jer ukazuju na neophodnost testiranja na specifične farmakogenomičke markere u određenoj populaciji.

Genetičke varijante koje potencijalno modulišu odgovor na terapiju lekovima 6-MP-om i MTX-om mogu se posmatrati i kao molekularno epidemiološki markeri za razvoj dečje ALL, jer mogu da modulišu važne procese u ćeliji kao što su sinteza i metilacija DNK. Ove genetičke varijante mogu takođe da utiču na stopu oštećenja DNK molekula. Zbog toga bi ove varijante mogle da modulišu procese kao što je neoplastična transformacija ćelija i da budu faktori rizika za razvoj malignih bolesti, kao što je dečja ALL.

Studije farmakogenomičkih markera počinju analizom genetičkih varijacija u relevantnim genima za određenu populaciju (populacione studije), zatim funkcionalnim analizama u *in vitro* uslovima odabranih markera, i na kraju se dobijeni rezultati validiraju u kliničkoj praksi.

Ciljevi ove studije su bili:

1. Utvrditi učestalost dve najčešće varijante gena *TPMT* u srpskoj populaciji ALL pacijenata.
2. Odrediti učestalost varijacija u genima *ITPA*, *MTHFR*, *ABCB1* i *ABCC4* koji potencijalno modulišu odgovor na terapiju lekom 6-MP-om u srpskoj populaciji ALL pacijenata i u kontrolnoj grupi.
3. Odrediti učestalost varijacija u genima *TYMS*, *MTHFR*, *DHFR*, *SLC19A1*, *ABCB1* i *ABCC4* koji potencijalno modulišu odgovor na terapiju lekom MTX-om u srpskoj populaciji ALL pacijenata i u kontrolnoj grupi.
4. Odrediti učestalost i farmakogenomički značaj varijacija u genima *IL-6* i *TNF* koji potencijalno modulišu odgovor na terapiju lekovima baktrimom i nistatinom, kao i anti-TNF agensima u srpskoj populaciji RA pacijenata i u kontrolnoj grupi.
5. Analizirati varijacije u genima *TPMT*, *ITPA*, *TYMS*, *MTHFR*, *DHFR*, *SLC19A1*, *ABCB1* i *ABCC4* u svetlu rizika za razvoj dečje ALL u srpskoj populaciji ALL pacijenata i u kontrolnoj grupi.
6. Ispitati uticaj 6-MP tretmana i VNTR arhitekture promotora gena *TPMT* na transkripciju gena *TPMT in vitro* funkcionalnim CAT esejima koristeći K562 ćelijsku liniju.
7. Analizirati ekspresiju gena *TPMT* kod pedijatrijskih ALL pacijenata pre uvođenja hemoterapije i u toku terapije održavanja.
8. Ispitati uticaj arhitekture VNTR regiona u promotoru gena *TPMT* na ekspresiju gena *TPMT* kod pedijatrijskih ALL pacijenata pre uvođenja hemoterapije i u toku terapije održavanja.
9. Ispitati uticaj varijanti u promotoru i prvom egzonu, kao i kodirajućim egzonima i sekvencama koje okružuju kodirajuće egzone gena *TPMT* kod pedijatrijskih ALL

pacijenata na ekspresiju gena *TPMT* pre uvođenja hemoterapije i u toku terapije održavanja.

10. Ispitati uticaj pola i uzrasta pedijatrijskih ALL pacijenata na ekspresiju gena *TPMT* pre uvođenja hemoterapije i u toku terapije održavanja.

# **3. Materijal i metode**

### 3.1. Materijal

#### 3.1.1. Ispitanici

U ovu studiju je bilo uključeno ukupno 174 dece (62% dečaka) obolelih od ALL uzrasta od 3 meseca do 17.6 godina, medijana 5.5 godina. Uzorci i klinički parametri pedijatrijskih ALL pacijenata obezbeđeni su u saradnji sa Univerzitetском dečjom klinikom (UDK) u Beogradu. U ovoj studiji, korišćeni su i uzorci krvi 104 zdravih ljudi (kontrolni ispitanici), pripadnika srpske populacije. Studiju je odobrio etički komitet UDK.

Uzorci krvi, kosne srži, bukalni brisevi kao i razmazi krvi i kosne srži na mikroskopskim pločicama služili su za izolovanje DNK pacijenata i zdravih ljudi. DNK je korišćena za određivanje prisustva genetičkih varijanti pacijenata i kontrolnih ispitanika metodama baziranim na lančanoj reakciji polimerizacije (PCR). Sto pedeset-troje pacijenata i kontrolnih ispitanika je bilo uključeno u deo studije koja se ticala analize toksičnosti i efikasnosti terapije ALL pacijenata lekom MTX-om. U deo studije koji se odnosio na analizu toksičnosti i efikasnosti terapije lekom 6-MP-om, bilo je uključeno 68 pacijenata i 69 kontrola.

Trideset svežih uzoraka krvi i 27 svežih uzoraka kosne srži prikupljeno je od 57 ALL pacijenata pre početka hemoterapije. U ovoj podgrupi pacijenata, uzrast je bio između 1.4 i 17.6 godina, medijana 4.7 godina. Uzorci krvi od 27 pacijenata iz ove podgrupe su takođe prikupljeni u toku terapije održavanja. Pre nego što su uzorkovani po drugi put, ovih 27 pacijenata je bilo pod režimom terapije održavanja od 11 do 494 dana (medijana 167 dana). U toku faze terapije održavanja, pacijenti dobijaju lekove 6-MP i MTX, a po potrebi i lekove baktrim i nistatin u skladu sa Berlin-Frankfurt-Munster (BFM) protokolom. Sveži uzorci krvi i kosne srži su korišćeni za izolaciju mononuklearnih ćelija (MNC) iz kojih je izolovana RNK. RNK pacijenata je služila za analizu ekspresije gena *TPMT*.

U studiju efikasnosti terapije anti-TNF lekom etanerceptom bilo je uključeno 73 pacijenta sa RA i 91 kontrolni ispitanik. Pacijenti su lečeni etanerceptom, 50mg nedeljno, u kombinaciji



sa kortikosteroidima (33 pacijenta), ili drugim antireumaticima: metotreksatom (60 pacijenta), leflunomidom (5 pacijenata), hlorokinom (5 pacijenta) ili sulfasalzinom (3 pacijenta). Tokom praćenja, doze kortikosteroida i antireumatika su održavane na istom nivou. Kliničko stanje pacijenata je praćeno brojanjem upaljenih i bolnih zglobova u skladu sa DAS28 skorom (eng. Disease Activity Score in 28 joints) (Kearsley-Fleet et al. 2014).

### 3.1.2. K562 ćelijska linija

K562 je permanentna, eritroleukemijska ćelijska linija dobijena od pacijentkinje obolele od hronične mijeloidene leukemije (Lozzio & Lozzio 1975). U ovoj studiji K562 ćelijska linija je korišćena u eksperimentima transfekcije plazmidnim vektorima sa reporterskim genom.

### 3.1.3. Plazmidni vektori

U ovoj studiji su korišćeni ranije napravljeni plazmidni konstrukti dobijeni insercijom dela regulatornog regiona gena *TPMT* ispred reporterskog CAT gena u pCATbasic vektor (Promega) (Zukic et al. 2010). Uklonirani deo gena *TPMT* obuhvatao je deo promotora, 1. egzona i deo 1. introna između pozicija -180 i +165 u odnosu na start transkripcije.

Kao pozitivna kontrola u eksperimentima tranzijentne transfekcije korišćen je pBLCAT5 vektor koji sadrži promotor timidin kinaze *Herpes simplex* virusa (HSV) čime je omogućena ekspresija CAT reporterskog gena (Boshart et al. 1992). Za kontrolu efikasnosti transfekcije korišćen je pCH110 plazmid koji kodira gen za  $\beta$ -galaktozidazu (Amersham Pharmacia).

Kao pozitivna kontrola digestije *AccI* enzimom korišćen je pUC18 plazmid (Vieira & Messing 1982)

## 3.1.4. Prajmeri i probe

Tabela 3.1. Prajmeri korišćeni za PCR i PCR-RFLP metode za određivanje genetičkih varijanti

Naziv prajmera	Sekvenca prajmera u 5' - 3' smeru	Referenca	Varijanta
2677MDR1-1RA	TGCAGGCTATAGGTTCCAGG	(Penna et al. 2011)	<i>ABCB1</i> c.2677 G>T
2677MDR1-1F	TTTAGTTTGACTCACCTTCCCG		
ABCC4_Fwd	GCTTTTTAAGGCTTCACTCAATAAAACAGC	Ova studija	<i>ABCC4</i> rs9516519
ABCC4_Rev	GTGTCACCTCCCTGAAATTGC		
ITPA_C94A-F	CAGGTCGTTTCAGATTCTAGGAGAAAAGT	(Maeda et al. 2005)	<i>ITPA</i> c.94 C>A
ITPA_C94A-R	CAAGAAGAGCAAGTGTGGGACAAG		
MTHFR_677_Fwd	TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA	(Frosst et al. 1995)	<i>MTHFR</i> c.677 C>T
MTHFR_677_Rev	AGGACGGTGCGGTGAGAGTG		
TPMT_460F	ATAACAGAGTGGGGAGGCTGC	(Yates et al. 1997)	<i>TPMT</i> c.460 G>A
TPMT_460R	CTAGAACCCAGAAAAAGTATAG		
TPMT_719R	TGTTGGGATTACAGGTGTGAGCCAC	(Yates et al. 1997)	<i>TPMT</i> c.719 A>G
TPMT_719F	CAGGCTTTAGCATAATTTTCAATTCCTC		
TYMS_28bp_Fwd	GTGGCTCCTGCGTTTCCCC	(Dotor et al. 2006)	<i>TYMS</i> , broj ponovaka u 5'UTR-u
TYMS_28bp_Rev	TCCGAGCCGGCCACAGGCAT		
TYMS_6del_Fwd	CAAATCTGAGGGAGCTGAGT	(Dotor et al. 2006)	<i>TYMS</i> , Indel u 3' UTR-u
TYMS_6del_Rev	CAGATAAGTGGCAGTACAGA		
TNF-F	AGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT	(Wilson et al. 1992)	<i>TNF</i> -308 G>A
TNF-R	ACACTCCCCATCCTCCCTGCT		
IL-6F	GGAGTCACACACTCCACCT	(Pascual et al. 2000)	<i>IL-6</i> -174 G>C
IL-6R	CTGATTGGAAACCTTATTAAG		

Tabela 3.2. Prajmeri korišćeni za AS-PCR reakcije

Naziv prajmera	Sekvenca prajmera u 5' - 3' smeru*	Referenca	Genetička varijanta koja se određuje
RCF1_80_Fwd	TGGCTCCCAGTTTGGTGCTA	(Herrlinger et al. 2005)	c.80 G>A u genu <i>SLC19A1</i>
RCF1_80_Rev_C	CAAAGGTAGCACACGAGGC		
RCF1_80_Rev_T	GCAAAGGTAGCACACGAGGT		
MTHFR_1289_Fwd_C	GGAGCTGACCAGTGAAGC	(Herrlinger et al. 2005)	c.1298 A>C u genu <i>MTHFR</i>
MTHFR_1289_Fwd_A	AGGAGCTGACCAGTGAAGA		
MTHFR_1289_Rev	CTGGGGCGACCATCAG		
Control_ARMS_Fwd	TGCCAAGTGGAGCACCCAA	(Herrlinger et al. 2005)	-
Control_ARMS_Rev	GCATCTTGCTCTGTGCAGAT		

\*Nukleotidi na 3' kraju alel specifičnih prajmera su **podebljani**

Tabela 3.3. Prajmeri korišćeni za detekciju genetičkih varijanti metodom PCR praćenom sekvenciranjem.

Naziv prajmera	Sekvenca prajmera u 5' - 3' smeru	Lokacija prajmera	Referenca	DNK region koji se ispituje
VNTRGCCF*	CCCAAGCTTGGGCAACGCTGTCACCCGA AATC	Promotor	Ova studija	Promotor gena <i>TPMT</i>
VNTR2	GGGCTGATTGCTAGGCTGTCTAC	Intron 1	(Zukic et al. 2010)	
VNTR1	GCGCTCGCTCCGCCCTGCCCATTT	Promotor	(Zukic et al. 2010)	Promotor gena
VNTR2*	GGGCTGATTGCTAGGCTGTCTAC	Intron 1		<i>TPMT</i>
TPMT3F	ACTGCTAAGAATAATAGGTTTTTCATTTA GTTT	Intron 2	(Otterness et al. 1997)	Egzon 3 gena
TPMT3R*	GCCACAGATGCACTGTGACTCGGGAG	Intron 3		<i>TPMT</i>
TPMT4F	TACCACTGACTGGGTGTGTGTCTGA	Intron 3	(Otterness et al. 1997)	Egzon 4 gena
TPMT4R*	CTCAATCCAGAAAGACTTCATACCTGTT	Intron 4		<i>TPMT</i>
TPMT5F*	CCTGCATGTTCTTTGAAACCCTATGAA	Intron 4	(Otterness et al. 1997)	Egzon 5 gena
TPMT5R	TAAATAGGAACCATCGGACAC	Intron 5		<i>TPMT</i>
TPMT6F	TGTCCTCTGTGATATTCCTCTGAGTTG	Intron 5	(Otterness et al. 1997)	Egzon 6 gena
TPMT6R*	GTGGATGTTACACAGGAGGAAGAGAG	Intron 6		<i>TPMT</i>
TPMT7F*	ATAACAGAGTGGGGAGGCTGC	Intron 6	(Yates et al. 1997)	Egzon 7 gena
TPMT7R	CTAGAACCCAGAAAAAGTATAG	Intron 7		<i>TPMT</i>
TPMT8F*	CCCAGCTTAGGCAGGGGCCATAA	Intron 7	(Otterness et al. 1997)	Egzon 8 gena
TPMT8R	TCCAAACTGGAATTATCTCCATGTA	Intron 8		<i>TPMT</i>
TPMT9F*	GAGAAGAACATGCCACATCATCACCTA	Intron 8	(Otterness et al. 1997)	Egzon 9 gena
TPMT9R	TTTGTTTAAAAAGTTACAGCATAAGT	Intron 9		<i>TPMT</i>
TPMT10F*	TGTTGGGATTACAGGTGTGAGCCAC	Intron 9	(Tai et al. 1996)	Egzon 10 gena
TPMT10R	CAGGCTTTAGCATAATTTTCAATTCCTC	Egzon 10		<i>TPMT</i>
DHFR- 771_F*	CGAAAGGAACAAGATTTTGAAGCACCC	Promotor	Ova studija	Promotor gena
DHFR-225_R	TCCTGACTCCCATTCTGATGAGGG	Promotor		<i>DHFR</i>

\* - Prajmer korišćen u reakciji PCR-a za sekvenciranje

Table 3.4. Sekvenca prajmera i proba korišćenih za *real-time* PCR i za proveru cDNK

Naziv prajmera	Sekvenca prajmera u 5' - 3' smeru	Referenca
TPMT_qRTPCR_Fwd	AACAAGGACATCAGCTATTAAAGAAG	(Lindqvist et al. 2003)
TPMT_qRTPCR_Rev	CACTGATTCCACACCAACTACA	(Lindqvist et al. 2003)
qAbl-F	TGGAGATAACACTCTAAGCATAACTAAAGGT	(Beillard et al. 2003)
qAbl-R	GATGTAGTTGCTTGGGACCCA	(Beillard et al. 2003)
Ia	ATCTGCCTGAAGCTGGTGGGCT	nepoznata
D	TGTGATTATAGCCTAAGACCCGGAG	nepoznata
Naziv probe	Sekvenca probe u 5' - 3' smeru	Referenca
qTPMT-P	FAM- TCCCCGG <sup>^</sup> TCTGCAAACCATTTTCAT - TAMRA	(Lindqvist et al. 2003)
qAbl-P	FAM - CCATTTTTTGGTTTGGGCTTCACACCATT - TAMRA	(Beillard et al. 2003)

## 3.2. Metode

### 3.2.1. Metode za izolaciju DNK

#### 3.2.1.1. Izolacija DNK iz krvi isoljavanjem

U tubu od 1.5ml se sipa 300 $\mu$ l krvi. Doda se 700 $\mu$ l ELB pufera (10.95% saharoza; 0.01M tris-HCl pH=7.5; 0.01% Triton X; 0.005M MgCl<sub>2</sub>) i promeša nastavkom. Centrifugira se 30s/13,000rpm\* (\*rpm - rotacija u minuti). Talog se rastvori aspiracijom sa dodatnih 1,000 $\mu$ l ELB pufera i centrifugira 30s/13,000rpm. Talog se rastvori aspiracijom u 300 $\mu$ l LLB pufera (0.01M tris-HCl pH=8.0; 0.4M NaCl; 0.002M Na<sub>2</sub>EDTA, pH=8.0), a zatim se doda 20 $\mu$ l 10% SDS i 20 $\mu$ l proteinaze K (1 $\mu$ g/ml). Nakon temeljnog mešanja na vorteksu, suspenzija se inkubira 1h na 56°C. Doda se 120 $\mu$ l 5M NaCl, promeša vorteksovanjem i centrifugira 3min/13,000rpm. Supernatant se prelije ili prebaci nastavkom u nove 1.5ml tube. DNK se precipitira dodavanjem 1ml apsolutnog etanola, promeša se invertovanjem tube tridesetak puta i centrifugira 2min/13,000rpm. Talog se prelije 70% etanolom, promeša invertovanjem 30ak puta i centrifugira 2min/13,000rpm. Zatim se talog osuši i resuspenduje u 200 $\mu$ l destilovane vode. Uzorak se čuva na -20°C.

#### 3.2.1.2. Izolacija DNK na koloni iz krvi ili kosne srži

DNK je izolovana pomoću *QIAamp DNA Blood Mini Kita* (Qiagen) prema uputstvu proizvođača. U tubu od 1.5ml se sipa 20 $\mu$ l *Qiagen* proteaze K. Doda se 200 $\mu$ l pune venske krvi ili kosne srži i 200 $\mu$ l AL pufera. Nakon mešenja na vorteksu, inkubira se 56°C, 10min. Uzorak se kratko centrifugira da bi se uklonile kapljice sa unutrašnje strane poklopca tube. Doda se 200 $\mu$ l 100% etanola, promeša se na vorteksu i kratko centrifugira. Uzorak se prenese na kolonu i centrifugira 1min/8,000rpm da bi se DNK vezala za kolonu. Eluat se odbaci. Zatim se doda 500 $\mu$ l AW1 pufer i kolona se centrifugira 1min/8,000rpm, a eluat se odbaci. ispiranje DNK se ponavlja 500 $\mu$ l AW2 puferom, centrifugira se 3min/13,000rpm i eluat se

odbaci. Zatim se kolona prenese u 1.5ml tubu, doda se 200µl destilovane vode ili AE pufera, i inkubira 5min na sobnoj temperaturi. Centrifugiranjem 1min/8,000rpm se DNK eluira u 1.5ml tubu. Uzorak se čuva na -20°C.

#### 3.2.1.3. Izolacija DNK na koloni sa razmaza krvi ili kosne srži

DNK je izolovana pomoću *QIAamp DNA Blood Mini Kita* (Qiagen) prema modifikovanom uputstvu proizvođača za izolaciju DNK sa osušenih krvnih mrlja. Razmaz krvi ili kosne srži je potrebno ukloniti sa staklene pločice i preneti u tubu. To se postiže pomoću parčića papirne vate natopljenih destilovanom vodom kojima se pločica ogrebe. Parčići papirne vate sa uzorkom se prenese u 1.5ml tubu. Vata sa uzorkom se osuši i u tubu se doda se 180µl ATL pufera. Tuba se inkubira 10min na 85°C. Zatim se doda 20µl proteaze K, promeša vorteksovanjem i inkubira 1h na 56°C. Nakon kratkog centrifugiranja, doda se 200µl AL pufera, temeljno promeša na vorteksu i inkubira 10min na 70°C. Uzorak se kratko centrifugira da bi se uklonile kapljice sa unutrašnje strane poklopca tube. Doda se 200µl 100% etanola, promeša se na vorteksu i kratko centrifugira. Uzorak se prenese na kolonu i centrifugira 1min/8,000rpm da bi se DNK vezala za kolonu. Eluat se odbaci. Zatim se doda 500µl AW1 pufer i kolona se centrifugira 1min/8,000rpm, a eluat se odbaci. Ispiranje DNK se ponavlja 500µl AW2 puferom, centrifugira se 3min/13,000rpm i eluat se odbaci. Zatim se kolona prenese u 1.5ml tubu, doda se 200µl destilovane vode ili AE pufera, i inkubira 5min na sobnoj temperaturi. Centrifugiranjem 1min/8,000rpm se DNK eluira u 1.5ml tubu. Uzorak se čuva na -20°C.

#### 3.2.1.4. Izolacija DNK na koloni iz bukalnog brisa

DNK je izolovana pomoću *QIAamp DNA Blood Mini Kita* (Qiagen) prema uputstvu proizvođača. Bukalni bris se prenese u 1.5ml tubu. Doda se 400µl 1xPBS u tubu. Doda se 20µl proteaze K i 400µl AL pufera. Nakon temeljnog mešanja na vorteksu, uzorak se inkubira

10 min na 56°C. Uzorak se kratko centrifugira da bi se uklonile kapljice sa unutrašnje strane poklopca tube. Doda se 200µl 100% etanola, promeša se na vorteksu i kratko centrifugira. Uzorak se prenese na kolonu i centrifugira 1min/8,000rpm da bi se DNK vezala za kolonu. Eluat se odbaci. Zatim se doda 500µl AW1 pufer i kolona se centrifugira 1min/8,000rpm, a eluat se odbaci. Ispiranje DNK se ponavlja 500µl AW2 puferom, centrifugira se 3min/13,000rpm i eluat se odbaci. Zatim se kolona prenese u 1.5ml tubu, doda se 150µl destilovane vode ili AE pufera, i inkubira 5min na sobnoj temperaturi. Centrifugiranjem 1min/8,000rpm se DNK eluira u 1.5ml tubu. Uzorak se čuva na -20°C.

### **3.2.2. Metode za određivanje genetičkih varijanti**

#### 3.2.2.1. Lančana reakcija polimerizacije

Lančana reakcija polimerizacije – PCR (eng. polymerase chain reaction) je tehnika bazirana na enzimskoj, *in vitro* replikaciji DNK. Ova tehnika omogućava da se mala količina polaznog DNK molekula (DNK matrica) eksponencijalno umnoži, čime se dobija dovoljno željenog PCR fragmenta za dalje analize. Dužina i sekvenca PCR fragmenta se definiše izborom para prajmera, tj. oligonukleotida dužine oko 25 baznih parova (bp), koji su komplementarni različitim lancima DNK matrice. PCR fragment ima dužinu i sekvencu DNK matrice koja se nalazi između 5' krajeva para prajmera. Sinteza DNK katalizovana je termostabilnom DNK polimerazom u prisustvu DNK matrice, deoksinukleotid trifosfata (dNTP) koji služe kao gradivni blokovi i odgovarajućeg pufera koji sadrži MgCl<sub>2</sub>. Ponavljanje ciklusa, od kojih se svaki sastoji od denaturacije DNK, hibridizacije prajmera i ekstenzije hibridizovanih prajmera od strane termostabilne DNK polimeraze, za rezultat ima eksponencijalnu amplifikaciju specifičnog DNK fragmenta. Tehniku je razvio Kary Mullis 1983. godine i za ovo otkriće je dobio Nobelovu nagradu za hemiju.

Sastav PCR smeša je dat u tabeli 3.5, zajedno sa specifičnostima temperaturnih profila – temperaturom anilinga i trajanjem ekstenzije. Temperaturni profil PCR reakcija je bio



sledeći: Inicijalna denaturacija: 5min (15min, ako je korišćena Qiagen polimeraza sa *Hot startom*); 35 ciklusa (30 sekundi/95°C, 30 sekundi/temperatura anilinga data u tabeli 3.5, vreme ekstenzije dato u tabeli 3.5/72°C); 7min/72°C.

Tabela 3.5. Uslovi PCR reakcija: finalne koncentracije komponenti PCR smeše i specifičnosti temperaturnih profila.

Gen	Varijanta ili region gena	DNK (ng)	Q rastvor	Pufer	MgCl <sub>2</sub> (mM)	dNTP (mM)	Prajmeri (μM)	Polimeraza	Finalni volumen (μl)	Temp. Anilinga (°C)	Trajanje ekstenzije (sekunde)
<i>TPMT</i>	VNTR u promotoru	150	1x	1x (Qia)	2.75	0.33	0.50	0.4U (Qia)	10	53.5	90
<i>TPMT</i>	GCC ponovci	150	1x	1x (Qia)	1.5	0.40	0.80	1U (Qia)	25	52	45
<i>TPMT</i>	c.460 G>A	100	1x	1x (Qia)	2.83	0.33	0.67	1U (Qia)	30	57	30
<i>TPMT</i>	c.719 A>G	100	1x	1x (Qia)	2.83	0.33	0.33	1U (Qia)	30	57	30
<i>TPMT</i>	3 egzon	100	1x	1x (Qia)	2.5	0.40	0.40	1U (KAPA)	25	54	30
<i>TPMT</i>	4 egzon	100	1x	1x (Qia)	1.5	0.40	0.40	1U (KAPA)	25	54	30
<i>TPMT</i>	5 egzon	80	1x	1x (Qia)	1.5	0.20	0.40	1U (KAPA)	25	54.5	30
<i>TPMT</i>	6 egzon	150	1x	1x (Qia)	1.5	0.40	0.40	0.8U (KAPA)	20	50	30
<i>TPMT</i>	7 egzon	60	1x	1x (Qia)	2.5	0.40	0.60	0.5U (Qia)	10	58	30
<i>TPMT</i>	8 egzon	100	1x	1x (Qia)	2.5	0.40	0.40	1U (KAPA)	25	54	30
<i>TPMT</i>	9 egzon	100	1x	1x (Qia)	2.5	0.40	0.40	1U (KAPA)	25	52	30
<i>TPMT</i>	10 egzon	90	1x	1x (Qia)	1.5	0.20	0.40	1U (Qia)	25	60	30
<i>TYMS</i>	28bp ponovci	70	1x	1x (Qia)	1.5	0.4	0.8	0.5U (KAPA)	20	66	30
<i>TYMS</i>	Indel u 3'UTR	70	1x	1x (Qia)	3	0.4	0.4	0.75U (KAPA)	25	61	20

Gen	Varijanta ili region gena	DNK (ng)	Q rastvor	Pufer	MgCl <sub>2</sub> (mM)	dNTP (mM)	Prajmeri (μM)	Polimeraza	Finalni volumen (μl)	Temp. anilinga	Trajanje ekstenzije
<i>MTHFR</i>	c.677 C>T	70	-	1x (KAPA)	2.5	0.2	0.4	0.6U (KAPA)	20	62	20
<i>DHFR</i>	promotor	60	1x	1x (Qia)	3	0.2	0.32	0.4U (Qia)	10	<i>Touchdown</i> program*	
<i>ITPA</i>	c.94 C>A	80	1x	1x (Qia)	3	0.4	0.8	1U (KAPA)	25	55	30
<i>ABCC4</i>	rs9516519 T>G	80	1x	1x (Qia)	3	0.2	0.8	1U (KAPA)	25	60	20
<i>ABCB1</i>	2677 G>T	50	1x	1x (Qia)	3	0.2	0.25	0.5U (KAPA)	20	58	30
<i>TNF</i>	-308 G>A	80	1x	1x (Qia)	2.75	0.5	1	0.5 (KAPA)	20	56	45
<i>IL-6</i>	-174 G>C	80	-	1x (Qia)	2.75	0.5	0.5	0.5 (KAPA)	20	56	45

\* *Touchdown* program: 15min/94°C, 20x(30s/94°C, 30s/60°C (u svakom ciklusu se temperatura anilinga smanjuje za po 0.5°C), 60s/72), 25x(30s/94°C, 30s/60°C, 60s/72°C), 7min/72°C. Qia- Qiagen; KAPA – KAPA Biosystems.

### 3.2.2.2. Analiza DNK fragmenata elektroforezom na agaroznom gelu

Analiza DNK vrši se elektroforetskim razdvajanjem na horizontalnom agaroznom gelu. Kraći DNK fragmenti putuju brže kroz gel u električnom polju, što omogućava razdvajanje fragmenata po veličini. Koncentracija gela, koja se obično kreće između 1% – 4% i zavisi od potrebne rezolucije i očekivane dužine DNK fragmenata. Za pripremanje gelova i za elektroforezu koristi se 1xTAE pufer (40mM Tris-acetat, 1 mM EDTA pH=8.0). U gel se dodaje fluorescentna boja etidijum bromid (u finalnoj koncentraciji 0.575-0.75µg/ml) koja se interkalira u DNK i omogućava njenu vizuelizaciju pod UV svetlom. Elektroforeza se izvodi pri jačini struje od 100mA i naponu od 100V. Veličina fragmenata DNK, kao i procena prinosa reakcije se određuje poređenjem sa komercijalnim markerom – DNK lestvicom.

### 3.2.2.3. Analiza DNK fragmenata elektroforezom na poliakrilamidnom gelu

Ukoliko je potrebna veća rezolucija razdvajanja DNK fragmenata, umesto agarozne, koristi se vremenski zahtevnija poliakrilamidna gel elektroforeza. Analiza PCR fragmenata vršena je na vertikalnom 12% poliakrilamidnom gelu. Poliakrilamid se sastoji od niti nastalih polimerizacijom akrilamidnih subjedinica, povezanih N,N'-metilenbisakrilamidom. Za pripremanje gela koristi se 12% rastvor akrilamida i N,N'-metilenbisakrilamida u odnosu 29:1. Za elektroforezu i za pripremanje gela služi 1xTBE pufer (100mM Tris, 83mM borna kiselina, 1mM EDTA pH=8.0). Kao inicijatori polimerizacije koriste se 0.1% amonijumpersulfat i 0.01% TEMED. Elektroforeza se izvodi pri jačini struje od 60mA i naponu od 300V u toku 3.5h.

Vizuelizacija PCR fragmenata na poliakrilamidnim gelovima vršena je bojenjem srebronitratom (Radojkovic & Kusic 2000). Poliakrilamidni gel je potapan u rastvor 10% etanola i 0.5% sirćetne kiseline. Nakon toga, gel je bojen 0.1% rastvorom AgNO<sub>3</sub> 10 minuta, uz neprekidno mešanje. Višak AgNO<sub>3</sub> je uklanjao ispiranjem najpre u destilovanoj vodi, dva puta, a zatim u razvijaju sledećeg sastava: 1.5% NaOH, 0.01% NaBH<sub>4</sub> i 0.048% formaldehid.

Gelovi su u razvijaju držani 15-20 minuta, do pojave traka. Razvijanje je stopirano potapanjem gelova u 0.75% rastvor  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ .

#### 3.2.2.4 Određivanje broja tandemskih ponovaka i indel-ova PCR metodom praćenom gel elektroforezom

Određivanje broja tandemskih ponovaka i indelova elektroforezom nakon PCR reakcije se bazira na razlici u dužini PCR fragmenata kod različitih alela. Ovom metodom su određivane varijante u genu *TYMS* – broj ponovaka od 28bp u promotoru i indel od 6bp u 3' UTR-u. Sekvence prajmera i uslovi PCR reakcije predstavljeni su u tabelama 3.1. i 3.5. Broj ponovaka od 28bp je detektovan na osnovu dužine traka nakon 3% agarozne elektroforeze. Očekivane dužine PCR produkata od 212, 240 i 268bp odgovaraju alelima sa 2, 3, odnosno 4 ponovka. Indel od 6bp je detektovan na osnovu dužine PCR fragmenata nakon PAA elektroforeze. Očekivana dužina PCR produkata od 148bp odgovaraju deleciji (6bp-), dok dužina od 154bp odgovara inserciji (6bp+).

#### 3.2.2.5. Detekcija genetičkih varijanti PCR-RFLP metodom

PCR-RFLP metoda je korišćena za određivanje varijanti tipa SNV. Najpre se umnoži region u kome se nalazi tačkasta varijanta, a zatim se PCR fragmenti podvrgnu restrikcionoj digestiji odgovarajućom endonukleazom. Endonukleaza se bira tako da PCR fragment seče ukoliko je prisutna određena genetička varijanta, a da ne seče ukoliko nije. Nekad je potrebno PCR-om uvesti jednu ili čak nekoliko baznih zamena u okolini varijabilnog mesta koje se izučava da bi se formiralo mesto prepoznavanja (konsenzus sekvenca) birane endonukleaze.

Ovom metodom su određivane sledeće genetičke varijacije: *TPMT* c.460 G>A, *TPMT* c.719 A>G, *ITPA* c.94 C>A, *ABCC4* rs9516519, *ABCB1* 2677 G>T, *MTHFR* c.677 C>T, *TNF* -308 G>A i *IL-6* -174 G>C . Sekvence prajmera i uslovi PCR reakcije napisani su u tabelama

3.1. i 3.5. Između 150 i 200ng PCR fragmenata sa restrikcijom enzimom i odgovarajućim puferom za digestiju dodati su u restrikcijonu smešu finalnog volumena od 15 $\mu$ l. Za detekciju c.719 A>G varijacije, pored osnovnih komponenti, dodavan je i pUC18 plazmid, kao pozitivna kontrola digestije. Enzim *AccI* seče ovaj plazmid jedanput, što je dokaz da je restrikcijoni enzim bio aktivan. Specifični uslovi restrikcijone digestije, zajedno sa očekivanim dužinama fragmenata nakon restrikcijone digestije date su u tabeli 3.6.

Tabela 3.6. Određivanje genetičkih varijanti PCR-RFLP metodom

Genetička varijanta	Očekivana dužina PCR fragmenta (bp)	Enzim i proizvođač	Očekivane dužine fragmenata nakon digestije (bp)
<i>TPMT</i> c.460 G>A	365	<i>MwoI</i> (Biolabs)	Alel G: 267 + 98 Alel A: 365
<i>TPMT</i> c.719 A>G	290	<i>AccI</i> (Biolabs)	Alel A: 290 Alel G: 201 + 89
<i>ITPA</i> c.94 C>A	256	<i>PdmI</i> ( <i>XmnI</i> ) (Thermoscientific)	Alel C: 228 + 28 Alel A: 256
<i>ABCC4</i> rs9516519	147	<i>PvuII</i> (Pharmacia Biotech)	Alel T: 118+29 Alel G: 147
<i>ABCB1</i> 2677 G>T	224	<i>BanI</i> (Biolabs)	Alel T: 224 Alel G: 200 + 24
<i>MTHFR</i> c.677 C>T	198	<i>HinfI</i> (Thermoscientific)	Alel C: 198 Alel T: 175 + 14
<i>TNF</i> -308 G>A	117	<i>Nco I</i> (Thermoscientific)	Alel G: 97 + 20 Alel A: 117
<i>IL-6</i> -174 G>C	527	<i>HinI II</i> (Thermoscientific)	Alel G: 331+167+29 Alel C: 331+122+45+29

### 3.2.2.6. Određivanje genetičkih varijanti alel-specifičnim PCR-om

Alel-specifični PCR (AS-PCR ili ARMS) se koristi za detekciju baznih zamena ili malih delecija. Kod Alel specifičnog PCR-a određeni region se umnožava samo ako je prisutna

DNK pacijenta koji nosi određeni alel. Jedan od prajmera (uzvodni ili nizvodni prajmer) je dizajniran je tako da svojim 3' krajem obuhvata varijabilno mesto od interesa i specifičan je za svaki od alela. Za svakog ispitanika su pripremljene 2 reakcione smeše za PCR, u kojima se nalazi po jedan alel-specifični prajmer. Obe reakcione smeše sadrže „zajednički“ prajmer, kao i par prajmera kojima se umnožava „kontrolni“ PCR fragment, koji služi kao pozitivna kontrola PCR reakcije. Nakon AS-PCR reakcije prisustvo ili odsustvo PCR produkta govori da li ispitanik nosi ili ne nosi određeni alel. AS-PCR-om su detektovane *MTHFR* c.1298 A>C i *SLC19A1* c.80 G>A genetičke varijacije. Sekvence prajmera su date u tabeli 3.2.

PCR smeša za detekciju *MTHFR* c.1298 A>C varijante, zapremine 25µl je bila sledećeg sastava: 80ng DNK, 0.5xQ rastvor (Qiagen), 1xpuffer (KAPA), 0.4M dNTP-a, 1U KAPA Taq polimeraze, po 1.2µM alel-specifičnog i zajedničkog prajmera i po 0.4 µM kontrolnih prajmera. Program: 1min/96°C, 5x(20sec/96°C, 45sec/70°C, 25sec/72°C), 21x(25sec/96°C, 50sec/65°C, 30sec/72°C), 4x(30sec/96°C, 60sec/55°C, 90sec/72°C), 2min/20°C.

PCR smeša za detekciju *SLC19A1* c.80 G>A varijante, zapremine 25µl je bila sledećeg sastava: 80ng DNK, 0.5xQ rastvor (Qiagen), 1xpuffer (KAPA), 0.4M dNTP-a, 1U KAPA Taq polimeraze, po 0.4µM alel-specifičnog i zajedničkog prajmera i po 0.4 µM kontrolnih prajmera. Program: 1min/96°C, 5x(20sec/96°C, 45sec/70°C, 30sec/72°C), 21x(25sec/96°C, 50sec/65°C, 40sec/72°C), 4x(30sec/96°C, 60sec/60°C, 90sec/72°C), 2min/20°C

### 3.2.2.7. Određivanje genetičkih varijacija sekvenciranjem PCR produkata

Sekvenciranjem amplifikovanih fragmenata mogu da se detektuju sve genetičke varijante u određenom regionu. Ova metoda se bazira na upotrebi modifikovanih, dideoksi nukleotidtrifosfata (ddNTP) koji po ugrađivanju u DNK lanac zaustavljaju PCR reakciju. Svaki od četiri ddNTP je obeležen posebnom fluorescentnom bojom, što omogućava da se reakcija sekvenciranja uradi u jednoj tubi. Specifičnost PCR-a za sekvenciranje je u tome što pored obeleženih ddNTP-ova, sadrži samo jedan prajmer i što se kao matrica koristi ranije

umnoženi DNK fragment. Po završetku PCR reakcije za sekvenciranje, dobijaju se fragmenti različite dužine obeleženi različitim fluorescentnim bojama koji odgovaraju poziciji i tipu nukleotida na 3' kraju fragmenta. Nakon razdvajanja obeleženih PCR fragmenata elektroforezom visoke rezolucije i njihove vizualizacije, DNK sekvenca se direktno očitava.

Direktnim sekvenciranjem su određivane varijacije u promotoru, prvom egzonu, kodirajućem regionu gena *TPMT* (3' kraj 3. egzona, 4, 5, 6, 7, 8, 9 i 5' kraj 10. egzona), kao i varijacije u okolnim, nekodirajućim sekvencama koje okružuju kodirajuće regione. Ova metoda je korišćena i za detekciju varijanti u promotoru gena *DHFR*. Sekvence prajmera i uslovi PCR reakcije dati su u tabelama 3.3. i 3.5. PCR za sekvenciranje je rađen u finalnom volumenu od 5 $\mu$ l i sadržao je: PCR produkt, 2pmola jednog od prajmera za umnožavanje fragmenta, 0.5 $\mu$ l miksa za PCR za sekvenciranje (BigDye<sup>TM</sup> Terminator v.3.1 Ready Reaction Kit, Applied Biosystems, CA, USA). Volumen PCR produkta koji se dodaje u PCR za sekvenciranje zavisi od dužine i količine PCR fragmenta, što se procenjuje nakon agarozne gel elektroforeze upoređivanjem sa standardom.

Produkti PCR-a za sekvenciranje se prečišćavaju dodavanjem 40 $\mu$ l rastvora (37.5 mM Na-acetat, 78% etanol). Smeša se promućka na vorteksu i centrifugira 20min/13,000rpm. Supernatant se odbaci, a ispiranje se ponovi pomoću 200 $\mu$ l 70% etanola. Talog se potpuno osuši i rastvori u 25 $\mu$ l Hi-Di formamida. Celokupni volumen se nanese u bunarić na mikrotitarskoj ploči i analizira pomoću *3130 Genetic Analyzer*-a (Applied Biosystems, CA, USA).

### **3.2.3. Metode za izvođenje funkcionalnih eseja sa reporterskim vektorom**

#### 3.2.3.1. Uslovi gajenja ćelija u kulturi

K562 ćelije su krupne, okruglog oblika i rastu u suspenziji (razmnožavaju se u tečnom medijumu bez lepljenja za podlogu), a po deobi ostaju zajedno formirajući „grozdove“. Ćelije se gaje u petri posudama za kultivisanje ili u Falcon plastičnim sudovima u termostatu na



37°C i u vazduhu sa 5% CO<sub>2</sub>. Medijum za gajenje ćelija sadrži 1x Eagle MEM (Torlak), 10% fetalni teleći serum – FCS (PAA), 0.21% NaHCO<sub>3</sub> (Torlak), 0.01M HEPES-a pH 7-7.2, 0.03% glutamina (Torlak), 1x neesencijalnih amino kiselina (Sigma-Aldrich), streptomicina 100µg/ml i penicilina 100U/ml. Pre dodavanja seruma, medijum se sterilise tako što se provlači kroz filter sa porama veličine 0.22µl. Nakon filter sterilizacije, serum se dodaje u medijum. Medijum se čuva na +4°C.

Na svaka 2 – 3 dana ćelije je potrebno prebaciti u svež medijum – pasažirati. Ćelije se najpre sakupe u sterilnu epruvetu od 10 ml i centrifugiraju 10min/1,800rpm. Supernatant se odbaci, a talog se resuspenduje u 1 ml PBS-a da bi se odredila koncentracija ćelija brojanjem. Ćelije se zasade u koncentraciji  $2 \cdot 10^{-5}$ /ml u medijumu za gajenje. Posude sa ćelijama se prebace u termostat na 37°C sa 5% CO<sub>2</sub>.

Za određivanje koncentracije ćelija u suspenziji korišćena je Burker–Turk-ova pločica. Ćelijska suspenzija se razblaži sa 0.1% tripan-plavo boje za bojenje u razmeri 1:1 i nanese na pločicu za brojanje. Tripan-plavo ulazi u mrtve ćelije i boji ih, dok žive ostaju svetle sa zlatnim oreolom. Koncentracija živih ćelija u suspenziji se računa po sledećoj formuli:

Izbrojan broj živih ćelija na n polja/n x 0.5 = broj ćelija u suspenziji x 10<sup>6</sup>/ml

### 3.2.3.2. Zamrzavanje ćelija

Ćelije koje se zamrzavaju treba da budu u fazi eksponencijalnog rasta - log fazi, oko 24h nakon pasažiranja. Centrifugiraju se 10min/1800rpm (klinička centrifuga Hereus) i odbaci se supernatant. Zatim se talog od 1-2 x 10<sup>6</sup> ćelija opere u PBS-u. To podrazumeva nalivanje 1xPBS-a, resuspenduju i centrifugiranje ćelija 10min/1800rpm, nakon čega se supernatant odbaci. Talog se resuspenduje u 1 – 1.5 ml medijuma za zamrzavanje koji sadrži 90% medijuma za gajenje i 10% dimetilsulfoksid (DMSO) koji služi kao krioprotektant. Nakon toga se suspenzija prebaci u kriotube i postepeno hladi. To se postiže držanjem prvo na ledu

(1 sat), zatim na  $-20^{\circ}\text{C}$  (1 – 16 sati), pa na  $-80^{\circ}\text{C}$  (16 – 72 sata) i nakon toga se prebacuju u tečni azot na  $-196^{\circ}\text{C}$  gde ćelije mogu dugo da se čuvaju do sledećeg korišćenja.

### 3.2.3.3. Odmrzavanje ćelija

Odmrzavanje je stresno za ćelije i zato treba brzo uraditi ovu proceduru da bi se obezbedio što veći procenat preživljavanja. Ćelije se odmrzavaju u 10ml medijuma za gajenje zagrejanog do  $37^{\circ}\text{C}$ , zatim se centrifugiraju 10min/1800rpm. Mrtve ćelije ostaju u supernatantu, a žive se istalože. Talog se rastvori u medijumu za rast. Poželjno je ćelije gušće zasaditi da bi se obezbedio brži oporavak. Suspenzija se prebaci u posudu za kultivisanje i ostavi da raste u termostatu na  $37^{\circ}\text{C}$  sa 5%  $\text{CO}_2$ . K562 linija dobro podnosi zamrzavanje i odmrzavanje tako da nije potreban poseban postupak oporavka.

### 3.2.3.4. Transfekcija K562 ćelija

Tranzijentna transfekcija ima za cilj uvođenje stranog genetičkog materijala u ćeliju bez njegovog inkorporiranja u hromozom domaćina. Za ovaj eksperiment su korišćeni ranije pripremljeni konstrukti, tj. pCAT-basic (Promega) plazmidi bez promotora, u koje je ispred reporterskog, CAT gena ukloniran deo promotora gena *TPMT*. Napravljeno je bilo ukupno 11 različitih konstrukata koji su se razlikovali jedino po arhitekturi VNTR regiona nađenih u promotoru gena *TPMT*.

Pre tranzijentne transfekcije pCAT konstruktima, K562 ćelije su bile tretirane  $10\mu\text{M}$  6-MP-om (Sigma Aldrich) u MEM medijumu u trajanju od 72h, na sledeći način. Ćelije su najpre gajene 48h sa 6-MP-om, a zatim su pasažirane u svež medijum sa 6-MP-om i tako gajene dodatnih 24h.

Sledećeg dana, ćelije su oprane PBS-om i zasađene u 2ml medijuma za gajenje bez antibiotika u koncentraciji  $10^6$  ćelija/ml. Za svaku petri posudu rastvoreno je po  $6\mu\text{g}$  konstrukta i  $2\mu\text{g}$  pCH 110 plazmida u  $250\mu\text{l}$  OptiMEM-a (GibcoBRL), medijuma za rast bez antibiotika i seruma. Za svaku petri posudu, rastvoreno je i po  $20\mu\text{l}$  lipofektamina (Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 Transfection Reagent, Invitrogen) u  $250\mu\text{l}$  OptiMEM-a i inkubirano 5 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon 5 minuta pomešana je rastvorena DNK i rastvoren lipfektamin. Smeša je inkubirana na sobnoj temperaturi 20 minuta. Nakon toga, nakapan je DNK-lipofektamin kompleks u posude sa ćelijama uz blago mućkanje. U ovako pripremljenom medijumu, ćelije su gajene još 24h.

#### 3.2.3.5. Pripremanje ćelijskih ekstrakata

Dvadeset četiri sata od transfekcije, ćelije se ispiraju PBS-om, a zatim resuspenduju u 1ml TEN pufera (40mM Tris HCl pH=7.5; 1 mM EDTA pH=8; 150mM NaCl). Nakon centrifugiranja 2min na 13,000rpm (mikrofuga Eppendorf), ćelijski talog se vorteksovanjem resuspenduje u  $100\mu\text{l}$  0.25M Tris HCl pH=8. Liziranje ćelija se postiže njihovim naizmeničnim stavljanjem u tečni azot ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) i vodeno kupatilo ( $+37^{\circ}\text{C}$ ) uz vorteksovanje nakon svakog koraka. Nakon centrifugiranja 5min/13,000rpm ( $+4^{\circ}\text{C}$ ) (mikrofuga Eppendorf), supernatant se alikvotira i prebacuje u nove mikrotube. Pripremljene ekstrakte bi trebalo odmah koristiti za CAT i  $\beta$ -galktozidazni esej ili odmah zalediti i čuvati na  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### 3.2.3.6. $\beta$ -galaktozidazni esej

Svrha  $\beta$ -galaktozidaznog esreja je da normalizuje rezultate CAT esreja u odnosu na efikasnost transfekcije u pojedinačnom uzorku. Iz tog razloga se, uz plazmid koji nosi CAT reporter gen, ćelije istovremeno transfekuju i sa kontrolnim plazmidom pCH110, koji eksprimira  $\beta$ -galktozidazu.

Esej se zasniva na sposobnosti  $\beta$ -galaktozidaze da hidrolizuje bezbojni supstrat o-nitrofenil- $\beta$ -D-galaktopiranozid (ONPG). Kao produkt reakcije nastaje o-nitrofenol koji je žute boje i može se kvantifikovati kolorimetrijski.

Priprema za esej odvija se na ledu. Čelijski ekstrakti (50  $\mu$ l) pomešaju se sa istim volumenom 2X pufera za esej (200mM natrijum-fosfatni pufer pH 7.3; 2mM MgCl<sub>2</sub>; 100mM  $\beta$ -merkaptotanol; 1.33mg/ml ONPG) i inkubiraju u pokrivenoj mikrotitar ploči sa ravnim dnom do razvijanja boje (30-45 min) na 37°C. Merenje apsorbance na talasnoj dužini od 420nm vrši se pomoću *Microplate reader Multiskan RC* (Labsystems) aparata.

Radi određivanja koncentracije  $\beta$ -galaktozidaze u uzorku, neophodno je napraviti standardnu kalibracionu krivu tako što se poznata razblaženja  $\beta$ -galaktozidaze, uključujući blank, pripremaju i mere na identičan način. Kao referentne vrednosti za konstrukciju standardne kalibracione krive i određivanje vrednosti  $\beta$ -galaktozidaze u ispitivanim čelijskim lizatima korišćena su standardna razblaženja ovog enzima: 1.5625mU, 3.125mU, 6.25mU, 12.5mU, 25mU, 50mU, i 100mU.

#### 3.2.3.7. CAT esej

CAT esej je kolorimetrijski enzimski imunoesej za kvantifikaciju ekspresije hloramfenikol acetiltransferaze (eng. Chloramphenicol acetyltransferase, CAT) u eukariotskim ćelijama transfekovanim plazmidom koji nosi CAT reporter gen. Esej se izvodi prema uputstvu proizvođača.

CAT esej bazira se na principu „sendvič“ ELISA-e. Anti-CAT antitelo vezano je za površinu mikrotitar ploče (Roche kit). Za njega se specifično vezuje ukupna hloramfenikol acetiltransferaza prisutna u uzorku ili standardu. Primarno antitelo je obeleženo digoksinom (anti-CAT-DIG) i specifično se vezuje za hloramfenikol acetiltransferazu, a za njega sekundarno antitelo koje je konjugovano sa peroksidazom (anti-DIG-POD). Kvantifikacija hloramfenikol acetiltransferaze obezbeđuje se dodavanjem supstrata

peroksidaze (ABTS). Naime, peroksidaza razlaže supstrat dajući obojeni produkt. Aporbance uzorka određuje se pomoću čitača za mikrotitar ploče i direktno je proporcionalna nivou hloramfenikol acetiltransferaze prisutne u uzorku.

Pripremljeni ćelijski ekstrakti se pomešaju sa puferom za uzorak (Roche kit) do finalne zapremine od 200  $\mu$ l, zatim se nanese u bunariće na mikroploči i pokriveni inkubiraju 1h sa 37°C. Nakon vezivanja hloramfenikol acetiltransferaze iz uzorka, bunarići se pet puta ispiraju sa po 250  $\mu$ l pufera za ispiranje (Roche kit). Zatim se u bunariće dodaje po 200  $\mu$ l anti-CAT-DIG antitela (Roche kit) i inkubira pokriveno 1h sa 37°C. Nakon vezivanja primarnog antitela, bunarići se pet puta ispiraju sa po 250  $\mu$ l pufera za ispiranje (Roche kit). Zatim se u bunariće dodaje po 200  $\mu$ l anti-DIG-POD antitela (Roche kit) i inkubira pokriveno 1h sa 37°C. Nakon vezivanja sekundarnog antitela, bunarići se pet puta ispiraju sa po 250  $\mu$ l pufera za ispiranje (Roche kit). Na kraju se u bunariće dodaje po 200  $\mu$ l supstrata (Roche kit) i inkubira pokriveno do razvijanja boje (10-40 min) na sobnoj temperaturi. Merenje aporbance na talasnoj dužini od 405nm vrši se pomoću *Microplate reader Multiskan RC* (Labsystems) čitača za mikrotitar ploče.

Radi određivanja koncentracije proteina u uzorku, neophodno je napraviti standardnu kalibracionu krivu tako što se poznata razblaženja CAT enzima (Roche kit), uključujući blank, pripremaju i mere na identičan način. Kao standardi za određivanje aktivnosti CAT-a u ispitivanim ćelijskim lizatima (za konstrukciju standardne kalibracione krive) korišćena su sledeća razblaženja CAT enzima E coli: 1.5625 pg, 3.125 pg, 6.25 pg, 12.5 pg, 25 pg, 50 pg, i 100 pg.

Vrednosti dobijenih aktivnosti CAT enzima normalizovane su u odnosu na aktivnost  $\beta$ -galaktozidaze poreklom sa pCH110 plazmida. Relativne aktivnosti promotorskih konstrukata su preračunate procentualno u odnosu na pBLCAT5 plazmid (100%) i predstavljene kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija iz najmanje tri nezavisna eksperimenta.

### 3.2.4. Metode za izučavanje genske ekspresije

#### 3.2.4.1. Izolacija mononuklearnih ćelija pomoću fikola

U tubu od 10ml se sipa 3ml rastvora fikola (Ficoll-Paque Plus, GE Healthcare). Krv ili kosna srž se razblaže fiziološkim rastvorom (0.9% NaCl) u odnosu 1:1 i pažljivo nanese na rastvor fikola, tako da se faze tečnosti ne mešaju. Nakon centrifugiranja (25min/1,500rpm) pokupe se MNC (beličast sloj na granici faza fikola i plazme) i prenesu u nove tube od 10ml. MNC se ispiraju nalivanjem 8ml 1xPBS rastvora (137mM NaCl, 2.7mM KCl, 10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). Smeša se promeša invertovanjem tube i centrifugira 15min/1,500rpm. Talog MNC se rastvori u 1ml Tri Reagent® rastvora (Ambion) i prebaci u tubu od 1.5ml. Uzorak se čuva na -80°C.

#### 3.2.4.2. Izolacija RNK iz mononuklearnih ćelija u Tri Reagent® rastvoru

Uzorak se ostavi 5-10 minuta na sobnoj temperaturi da se odmrzne. Špricom i iglom (Ø 0.7mm) lizirati ćelije provlačenjem ćelija 5-10 puta kroz iglu. Doda se 200µl hloroforma i snažno promućka rukom. Uzorak se ostavi 15min i centrifugira 15min/12,000rcf/4°C. Gornja, vodena faza sa RNK se pažljivo pokupi i prenese u novu tubu od 1.5ml, ostatak može da se čuva radi izolacije DNK ili proteina. U rastvor RNK se doda 1ml izopropanola, promeša invertovanjem i ostavi 15 minuta. Smeša se centrifugira 15min/12,000rcf/4°C, posle čega se talog prelije 70% etanolom koji je razblažen destilovanom vodom tretiranom 0.1% dietilpirokarbonatom (DEPC)\*. Nakon centrifugiranja 10min/12,000rcf/4°C, etanol se potpuno ukloni. Talog se osuši na vazduhu i rastvori u 20-50µl destilovane vode tretirane DEPC-om. Uzorak se čuva na -80°C.

\* Tretman destilovane vode DEPC-om je potreban da bi se inaktivirali enzimi RNaze, koji mogu da oštete RNK molekule. Protokol: 0.1% rastvor DEPC-a se inkubira na 37°C preko noći, nakon čega se podvrgava temperaturi od 100°C sat vremena u autoklavu.

#### 3.2.4.3. Sinteza cDNK

Sinteza cDNK je rađena pomoću RevertAid Reverse Transcriptase (Thermo Scientific) reakcijom reverzne transkripcije. Smeša ukupnog volumena od 11µl koja sadrži 600ng totalne RNK i 9.09µM mešavinu oligonukleotida od 6bp (Random Hexamer Primer) se inkubira 5min/70°C, a zatim prebaci na led. Držeći uzorke na ledu, ovoj smeši se dodaje još 9µl drugih komponenti, tako da finalni volumen od 20µl sadrži 600ng RNK, 5µM mešavinu oligonukleotida od 6bp, 1xRT pufera (Thermo Scientific), 20U „Ribo-Lock“ RNaznog inhibitora (Thermo Scientific), 1mM dNTP i 200U RevertAid Reverse Transcriptase (Thermo Scientific). Smeša se inkubira 10min/25°C, a zatim 1h/42°C. Reakcija se zaustavlja inkubiranjem 10min/70°C. Uzorak se čuva na -20°C.

#### 3.2.4.4. Provera kvaliteta cDNK

Kvalitet cDNK je proveravan umnožavanjem regiona gena ABL protoonkogen 1, nereceptorska tirozin kinaza (*ABL1*) koristeći Ia i D prajmere (Tabela 3.4). U reakciju volumena 25 µl je dodavano 30-60ng cDNK, 1xQ, 1xpufer (Qiagen), 3mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2µM dNTP, oba prajmera po 0.4 µM i 1U KAPA Taq polimeraze (KAPA Biosystems). Ukoliko bi se u PCR reakciji dobio fragment očekivane dužine od 277bp, smatralo bi se da je cDNK odgovarajućeg kvaliteta za analizu ekspresije *real-time* PCR metodom.

#### 3.2.4.5. Kvantifikacija ekspresije gena *TPMT* *real-time* PCR metodom

*Real-time* ili kvantitativni PCR je tehnika koja je dobila naziv po tome što se količina PCR produkata meri u realnom vremenu. Ova metoda u kombinaciji sa reverznom transkripcijom se koristi za kvantifikaciju genske ekspresije. Za kvantifikaciju ekspresije gena *TPMT*

korišćena je  $\Delta\Delta\text{CT}$  metoda (Lindqvist et al. 2003). „Housekeeping“ gen, ABL protoonkogen 1 (ABL1) je korišćen kao endogena kontrola da bi se normalizovala količina RNK dodata u reakciju reverzne transkripcije. Kao kalibrator je odabrana medijana normalizovanih vrednosti za ekspresiju gena *TPMT* kod uzoraka ALL pacijenata prikupljenih pre terapije. Na osnovu vrednosti za kalibrator koji po definiciji ima vrednost 1, izračunate su vrednosti za sve ostale uzorke. Svi eksperimenti su rađeni u duplikatu. Ukoliko su se Ct vrednosti (ciklus u kojem je intenzitet fluorescencije prešao zadati prag intenziteta) za isti uzorak značajno razlikovale, eksperiment je ponavljan u duplikatu.

Ekspresija gena *TPMT* je praćena na 7500 *Real-time PCR* aparatu (Applied Biosystems) upotrebom TaqMan tehnike. Nukleotidne sekvence prajmera i proba navedene su u tabeli 3.4. Reakciona smeša finalnog volumena 10  $\mu\text{l}$  je sadržala sledeće komponente: 1x *KAPA PROBE FAST Universal qPCR Master Mix* (KAPA Biosystems), 2x *Rox Low* referentne boje (KAPA Biosystems), 30ng cDNK, 2 prajmera i fluorescentno obeleženu probu. Ciljni gen, *TPMT*, je umnožavan odvojeno od gena koji je služio kao endogena kontrola, ABL1. U reakciju za umnožavanje gena *TPMT* je dodavano 0.3 $\mu\text{M}$  uzvodnog, 0.05 $\mu\text{M}$  nizvodnog prajmera i 0.175 $\mu\text{M}$  probe. U reakciju za umnožavanje ABL1 gena je dodavano po 0.3 $\mu\text{M}$  prajmera i 0.2 $\mu\text{M}$  probe. Temperaturni profil PCR reakcije je bio sledeći: 2min/50°C, 3min/95°C, 40 ciklusa 15s/95°C, 1min/60°C.

### 3.2.5. Statistička obrada rezultata

Rezultati koji se odnose diskretne varijable, genotipove i alele, su predstavljeni kao frekvencije i u procentima. Hardy-Vajnbergova ravnoteža za svaki lokus kod ALL pacijenata i kontrola je proverena  $\chi^2$  testom sa 1 stepenom slobode ili egzaktnim testom uzimajući u obzir dobijene i očekivane frekvencije genotipova. Isti testovi su korišćeni da se odredi da li postoje razlike u zastupljenosti genotipova između pacijenata i kontrola. Egzaktni testovi su rađeni prema Wigginton-u i saradnicima (2005) i primenjeni su ukoliko uslovi za primenu  $\chi^2$  testa nisu bili ispunjeni (Wigginton et al. 2005).



Kao mera centralne tendencije kontinuiranih varijabli korišćena je srednja vrednost sa 95% intervalom poverenja, dok je varijabilnost predstavljena standardnom devijacijom. Normalnost raspodele je proveravana Šapiro-Vilkovim i Kolgomorov-Smirnovim testom. Od statističkih testova za poređenje grupa korišćeni su parametrijski testovi (t-test, jednofaktorijalna i dvofaktorijalna ANOVA) i neparametrijski testovi (Man-Vitnjev test, Kruskal-Valisov i Vilkoksonov test ekvivalentnih parova). Spirmanov koeficijent korelacije sa 95% intervalom poverenja je korišćen kao mera korelacije između dve kontinuirane varijable.

Statistička analiza i crtanje grafikona je urađena pomoću SPSS (IBM SPSS Statistics v.20) i MS Excel (verzija 2010 i 2013) softvera. Analiza haplotipova je urađena pomoću Arlequin softvera (verzija 3.5.1.3). Nivo statističke značajnosti je bio 0.05, a svi testovi su bili nedirekcionni (dvostrani).

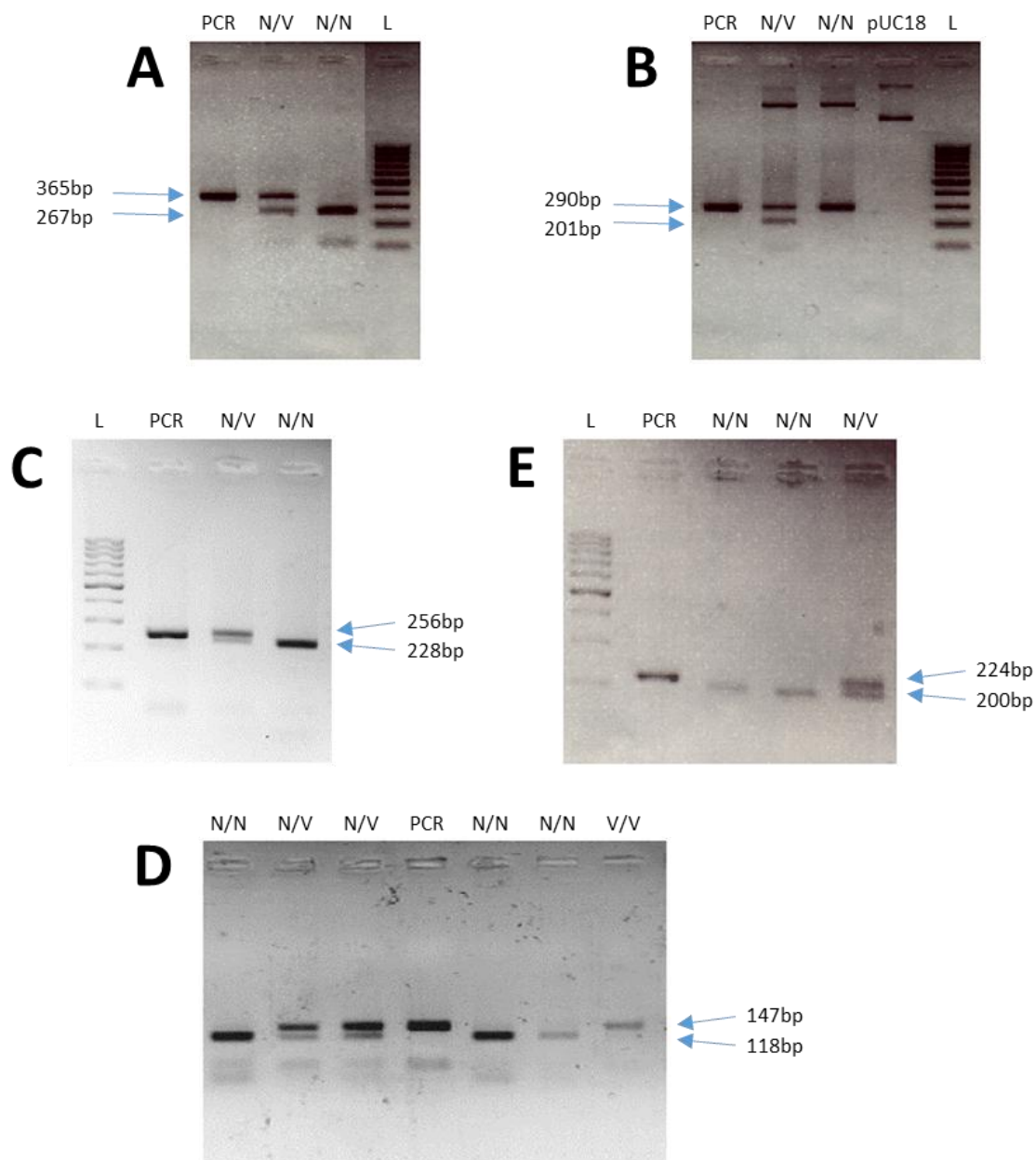
# 4. Rezultati

#### **4.1. Populaciona analiza genetičkih varijacija koje potencijalno utiču na metabolizam i transport lekova 6-MP-a i MTX-a**

Za deo studije koja se bavi odgovorom na terapiju lekom 6-MP-om, izučavane su varijacije u genima *TPMT* i *ITPA*, kao i *MTHFR* dok su varijacije u genima *TYMS*, *MTHFR*, *SLC19A1* i *DHFR* izučavane u okviru studije koja se bavi odgovorom na terapiju lekom MTX-om. Rezultati koji se odnose na varijacije u genu *MTHFR* će biti prikazani u delu koji bavi odgovorom na terapiju lekom MTX-om, jer je *MTHFR* enzim učesnik folatnog metaboličkog puta. Varijacije u genima *ABCC4* i *ABCB1*, koji kodiraju efluksne transportere oba leka, razmatrane su u svetlu odgovora na terapiju i jednog i drugog leka. Sve pomenute genetičke varijacije izučavane su kod grupe pedijatrijskih pacijenata obolelih od ALL i kontrolne grupe zdravih ljudi.

##### **4.1.1. Analiza genetičkih varijacija potencijalno važnih za odgovor na terapiju lekom 6-MP-om**

U ovaj deo studije, bila je uključena celokupna grupa od 174 dece obolele od ALL kod kojih su izučavane varijacije *TPMT* c.460 G>A, *TPMT* c.719 A>G. Kod 68 dece obolele od ALL i 69 zdravih, kontrolnih ispitanika, izučavane su i *ITPA* c.94 C>A, *ABCC4* rs9516519 T>G i *ABCB1* c.2677 G>T genetičke varijacije. Sve genetičke varijacije su određene PCR-RFLP metodom (slika 4.1). Ni u jednoj grupi pacijenta ni u kontrolnoj grupi nije došlo do odstupanja od Hardi-Vajnbergove ravnoteže za bilo koju od izučavanih varijacija. Pored toga, učestalosti genotipova kod pedijatrijskih ALL pacijenata i u kontrolnoj grupi su bili vrlo slične (tabela 4.1.).



Slika 4.1. Detekcija genetičkih varijacija potencijalno važnih za odgovor na terapiju lekom 6-MP-om korišćenjem PCR-RFLP metode. Prikazano je određivanje sledećih genetičkih varijacija: **(A)** *TPMT* c.460 G>A, **(B)** *TPMT* c.719 G>A, **(C)** *ITPA* c.94 C>A, **(D)** *ABCC4* rs9516519 i **(E)** *ABCB1* c.2677 G>T. PCR – nedigerirani PCR fragment. N/N – homozigotni nosilac referentnog alela. V/V – homozigotni nosilac varijantnog (ređeg) alela. N/V – heterozigotni nosilac. L – molekulska lestvica (Gene Ruler 100bp DNA Ladder, Thermo Scientific). pUC18 – neisečeni pUC18 plazmid korišćen kao kontrola digestije

Tabela 4.1. Učestalosti genotipova genetičkih varijacija potencijalno važnih za odgovor na terapiju lekom 6-MP-om kod ALL pacijenata i zdravih ljudi (kontrolna grupa)

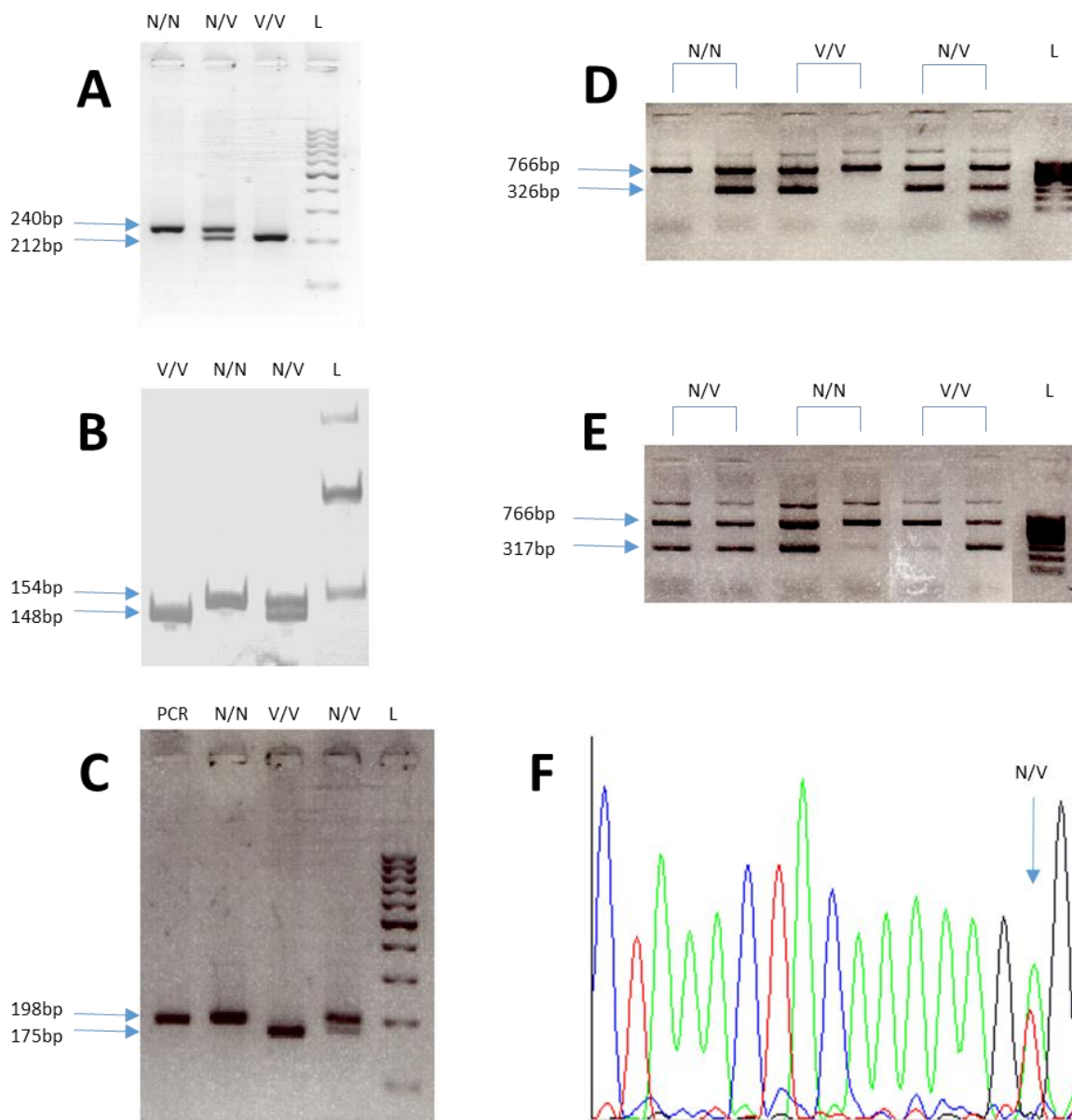
Genetička varijacija	Genotip	ALL pacijenti			Kontrolna grupa			
		N	%	*HW	N	%	*HW	#p
<i>TPMT</i> <i>c.460 G&gt;A</i> <i>rs1800460</i>	G/G	165	94.9%	0.12	-	-	-	-
	G/A	8	4.5%		-	-		
	A/A	1	0.6%		-	-		
<i>TPMT</i> <i>c.719 A&gt;G</i> <i>rs1142345</i>	A/A	164	94.3%	0.15	-	-	-	-
	A/G	9	5.2%		-	-		
	G/G	1	0.6%		-	-		
<i>ITPA</i> <i>c.94 C&gt;A</i> <i>rs1127354</i>	C/C	63	92.6%	1	60	92.3%	1	1
	C/A	5	7.4%		5	7.7%		
	A/A	-	0.0%		-	0.0%		
<i>ABCC4</i> <i>rs9516519</i> <i>T&gt;G</i>	T/T	41	60.3%	0.87	45	65.2%	0.71	0.87
	T/G	24	35.3%		21	30.4%		
	T/G	3	4.4%		3	4.3%		
<i>ABCB1</i> <i>c.2677 G&gt;T</i> <i>rs2032582</i>	G/G	29	42.6%	0.12	24	44.4%	0.34	0.65
	G/T	26	38.2%		23	42.6%		
	T/T	13	19.1%		7	13.0%		

\*HW –  $\chi^2$  ili egzaktnim testom testirano je da li distribucija genotipova odgovara Hardy-Vajnbergovoj (HW) ravnoteži (ako je  $p < 0,05$ , populacija nije u HW ravnoteži). #p –  $\chi^2$  ili Fišerovim egzaktnim testom testirana je razlika između učestalosti genotipova kod pedijatrijskih ALL pacijenata i kontrolne grupe.

#### 4.1.2. Analiza genetičkih varijacija potencijalno važnih za toksičnost leka MTX-a

U ovaj deo studije je bilo uključeno 153 dece obolele od ALL i 104 zdravih, kontrolnih ispitanika. Genetičke varijacije u genu *TYMS* su bile određene PCR metodom, *MTHFR* c.677 C>T PCR-RFLP metodom, *MTHFR* c.1298 A>C i *SLC19A1* G>A AS-PCR metodom i varijacije u promotoru gena *DHFR* (-680 C>A, -675 A>G, -556 T>C, -464 A>T, -317 A>G) metodom PCR-a praćenog sekvenciranjem (slika 4.2). U tabeli 4.2, date su učestalosti genotipova nađenih kod ALL pacijenata i kontrolnoj grupi. Ni kod grupe pacijenta niti u kontrolnoj grupi nije došlo do odstupanja od Hardi-Vajnbergove ravnoteže za bilo koju od izučavanih varijacija, osim za *MTHFR* c.677 C>T varijaciju u kontrolnoj grupi. Pored toga, učestalosti genotipova kod ALL pacijenata i u kontrolnoj grupi su bile vrlo slične (tabela 4.2). Rezultati učestalosti genetičkih varijacija u genima koji kodiraju transportere za lek MTX, *ABCB1* c.2677 G>T i *ABCC4* rs9516519 T>G, su prikazani u tabeli 4.1.

Za predviđanje odgovora na terapiju, pored detekcije pojedinačnih varijacija u genu, može biti važno koje genetičke varijante pacijent nosi na svakom od pojedinačnih hromozoma. Zato je potrebno odrediti da li se neke genetičke varijacije nalaze u gametskoj neravnoteži vezanosti (eng. LD – linkage disequilibrium). U genima *TYMS*, *MTHFR* i *DHFR* izučavano je više od jedne genetičke varijacije. Grupisanje nađenih genetičkih varijacija u haplotipove urađeno je pseudo-bajesovskim algoritmom pomoću Arlequin softvera. Određene su učestalosti najčešćih haplotipova, kao i jačina veze između genetičkih varijanti. Budući da su učestalosti genotipova slične u grupi kontrolnih ispitanika i ALL pacijenata, za haplotip analizu su svi ispitanici posmatrani kao jedna grupa. Učestalosti najčešćih haplotipova su dati u tabeli 4.3. U genu *TYMS* je dobijeno da je dupli tandemski ponovak u promotoru (*TYMS* 2R) asociran sa insercijom od 6bp u 3'UTR-u (*TYMS* 6bp+), kao i trostruki tandemski ponovak (*TYMS* 3R) sa delecijom od 6bp u 3'UTR-u (*TYMS* 6bp-) ( $r^2=0.14$ ). U genu *MTHFR*, varijanta c.677C je asocirana sa c.1298C, kao i varijanta c.677T sa c.1298A varijantom ( $r^2=0.14$ ). U genu *DHFR* je nađeno da postoji najjača asocijacija između -680 C>A i -317 A>G ( $r^2=0.69$ ) sa jedne strane i -675 A>G, -556 T>C i -464 A>T (vrednosti za  $r^2$  su bile između 0.94 i 0.96), sa druge.



Slika 4.2. Detekcija genetičkih varijacija potencijalno važnih za odgovor na terapiju lekom MTX-om. Prikazana je detekcija (A) broja ponovaka u 5'UTR-u gena *TYMS* i (B) *TYMS* indel u 3'UTR-u PCR metodom; (C) detekcija *MTHFR* c.677 C>T PCR-RFLP metodom; (D) detekcija *MTHFR* c.1298 A>C i (E) *SLC19A1* c.80 G>A AS-PCR-om; (F) detekcija *DHFR* -464 A>T metodom sekvenciranja (prikazan je elektroferogram dobijen sekvenciranjem dela promotora gena *DHFR*, a varijabilno mesto je označeno strelicom). N/N – homozigotni nosilac referentnog alela. V/V – homozigotni nosilac varijantnog (redeg) alela. N/V – heterozigotni nosilac. L – molekulska lestvica (Gene Ruler 100bp DNA Ladder, Thermo Scientific). PCR – nedigerirani PCR fragment.

Tabela 4.2. Učestalosti genotipova potencijalno važnih za odgovor na terapiju lekom MTX-om kod ALL pacijenata i zdravih ljudi (kontrolna grupa)

Genetičke varijacije	Genotip	ALL pacijenti			Kontrolna grupa			#p
		N	%	*HW	N	%	*HW	
<i>TYMS broj ponovaka</i> rs34743033	3/3	50	32.7%	0.06	33	31.7%	0.81	0.38
	3/2	64	41.8%		51	49.0%		
	2/2	38	24.8%		19	18.3%		
	3/4	1	0.7%		1	1.0%		
<i>TYMS 6bp indel</i> rs34489327	Ins/Ins	70	45.8%	0.62	47	45.2%	0.92	0.99
	Ins/Del	65	42.5%		45	43.3%		
	Del/Del	18	11.8%		12	11.5%		
<i>MTHFR c.677 C&gt;T</i> rs1801133	C/C	75	49.0%	0.39	53	51.0%	0.02	0.45
	C/T	61	39.9%		35	33.7%		
	T/T	17	11.1%		16	15.4%		
<i>MTHFR c.1298 A&gt;C</i> rs1801131	A/A	75	49.0%	0.18	60	57.7%	0.13	0.38
	A/C	59	38.6%		34	32.7%		
	C/C	19	12.4%		10	9.6%		
<i>SLC19A1 c.80 G&gt;A</i> rs1051266	G/G	41	26.8%	0.37	27	26.0%	0.54	0.51
	G/A	71	46.4%		55	52.9%		
	A/A	41	26.8%		22	21.2%		
<i>DHFR -680 C&gt;A</i> rs442767	C/C	65	43.6%	0.84	45	43.3%	0.86	1.0
	C/A	66	44.3%		46	44.2%		
	A/A	18	12.1%		13	12.5%		
<i>DHFR -675 A&gt;G</i> rs1643641	A/A	78	52.3%	0.45	55	52.9%	0.31	0.37
	A/G	57	38.3%		44	42.3%		
	G/G	14	9.4%		5	4.8%		
<i>DHFR -556 T&gt;C</i> rs1650695	T/T	78	52.3%	0.64	55	52.9%	0.52	0.67
	T/C	58	38.9%		43	41.3%		
	C/C	13	8.7%		6	5.8%		
<i>DHFR -464 A&gt;T</i> rs1650696	A/A	78	52.3%	0.64	55	52.9%	0.52	0.67
	A/T	58	38.9%		43	41.3%		
	T/T	13	8.7%		6	5.8%		
<i>DHFR -317 A&gt;G</i> rs408626	A/A	52	34.9%	0.69	37	35.6%	0.99	0.97
	A/G	74	49.7%		50	48.1%		
	G/G	23	15.4%		17	16.3%		

\*HW –  $\chi^2$  testom testirano je da li distribucija genotipova odgovara Hardi-Vajnbergovoj (HW) ravnoteži (ako je  $p < 0.05$ , populacija nije u HW ravnoteži). #p –  $\chi^2$  testom testirana je razlika između učestalosti genotipova kod pedijatrijskih ALL pacijenata i u kontrolnoj grupi.



Tabela 4.3. Učestalosti haplotipova u genima *TYMS*, *MTHFR* i *DHFR*

<i>TYMS</i> *	H1	H2	H3	H4
Broj ponovaka u 5'UTR-u	2	3	3	2
Indel u 3'UTR-u	Ins	Ins	Del	Del
Učestalost	36.3%	30.4%	24.6%	8.2%
<i>MTHFR</i>	H1	H2	H3	H4
c.677 C>T	C	T	C	T
c.1298 A>C	A	A	C	C
Učestalost	40.2%	30.4%	28.3%	1.1%
<i>DHFR</i> *	H1	H2	H3	H4
-680 C>A	A	C	C	C
-675 A>G	A	A	A	G
-556 T>C	T	T	T	C
-464 A>T	A	A	A	T
-317 A>G	G	A	G	A
Učestalost	32.4%	31.6%	7.1%	26.1%

\*Prikazana su 4 najčešća haplotipa (H1 – H4).

## 4.2. Analiza genetičkih varijacija potencijalno važnih za odgovor na terapiju lekovima baktrimom, nistatinom i anti-TNF agensima

U ovaj deo studije bila je uključena 91 zdrava osoba i 73 RA pacijenta kod kojih je određena učestalost *IL-6* -174 G>C i *TNF* -308 G>A (tabela 4.4). Ni kod grupe pacijenta niti u kontrolnoj grupi nije došlo do odstupanja od Hardi-Vajnbergove ravnoteže ni za jednu od izučavanih varijacija.

Odgovor na terapiju lekom etanerceptom, anti-TNF agensom, kod RA pacijenata je određen koristeći DAS28 skor za ocenu kliničkog stanja, u skladu sa kriterijumima EULAR (eng. The European League Against Rheumatism) organizacije (Kearsley-Fleet et al. 2014). Smatralo se su dobro odgovorili na terapiju pacijenti kod kojih je DAS28 skor poboljšán za najmanje 1.2 jedinice.

Pokazano je da je *IL-6* -174G varijanta povezana sa većom efikasnošću anti-TNF terapije, odnosno dobrim odgovorom na terapiju (Jančić et al. 2015). Pored toga, najveća efikasnost terapije je dobijena kod pacijenata koji su nosili kombinovani *IL-6* -174 GG i *TNF* -308 GG genotip (Jančić et al. 2015). U našoj populaciji, oko 40% ljudi nosi kombinovani *IL-6* -174 GG i *TNF* -308 GG genotip koji je povezan sa dobrim odgovorom na anti-TNF terapiju kod RA pacijenata.

Tabela 4.4. Učestalosti genotipova genetičkih varijacija u genima *IL-6* i *TNF*

Genetička varijacija	Genotip	RA pacijenti			Kontrole		
		N	%	*HW	N	%	*HW
<i>IL-6</i> -174 G>C rs1800795	G/G	23	31.5%	0.16	46	50,5%	0.13
	G/C	41	56.2%		33	37,6%	
	C/C	9	12.3%		12	12,9%	
<i>TNF</i> -308 G>A rs1800629	G/G	54	74.0%	1	72	79.1%	1
	G/A	18	24.7%		18	19.8%	
	A/A	1	1.4%		1	1.1%	

\*HW – $H_i^2$  ili egzaktnim testom testirano je odstupanje od Hardi-Vajnbergove (HW) ravnoteže (ako je  $p < 0.05$ , populacija nije u HW ravnoteži).

### **4.3. Uticaj terapije održavanja na ekspresiju gena *TPMT* u zavisnosti od arhitekture VNTR regiona u promotoru gena *TPMT***

#### **4.3.1. Uticaj pretretmana lekom 6-MP-om na nivo *TPMT* transkripcije u zavisnosti od VNTR arhitekture gena *TPMT* u K562 ćelijskoj liniji *in vitro***

Najpre smo hteli da proverimo da li lek 6-MP ima uticaj na ekspresiju gena *TPMT* u ćelijskoj kulturi *in vitro*. U ranijim reporterskim esejima kada smo ispitivali jačinu promotora gena *TPMT* koji sadrže različite VNTR alele koristili smo K562 ćelijsku liniju (Zukic et al. 2010). Sada su K562 ćelije su tretirane 10 $\mu$ M koncentracijom leka 6-MP-a u trajanju od 72h, nakon čega su transfekovane konstruktima sa CAT reporterskim genom. Izabrana koncentracija leka 6-MP-a kojima su tretirane K562 ćelije je određena eksperimentalno (Zukic et al. 2010). Preko količine sintetisanog CAT proteina, CAT esejom, posredno je utvrđena aktivnost svakog pojedinačnog konstrukta kada su ćelije bile pod dejstvom leka 6-MP-a. Korišćeno je 11 konstrukata prethodno napravljenih insercijom dela promotora gena *TPMT* sa različitim VNTR alelima (AB<sub>4</sub>C, A<sub>2</sub>B<sub>3</sub>C, A<sub>4</sub>BC, AB<sub>2</sub>C, A<sub>5</sub>BC, A<sub>2</sub>BC, A<sub>3</sub>BC, A<sub>6</sub>BC, AB<sub>5</sub>C, A<sub>3</sub>B<sub>2</sub>C i A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C) ispred CAT gena u pCAT-basic reporterski vektor koji ne sadrži sopstveni promotor (Zukic et al. 2010).

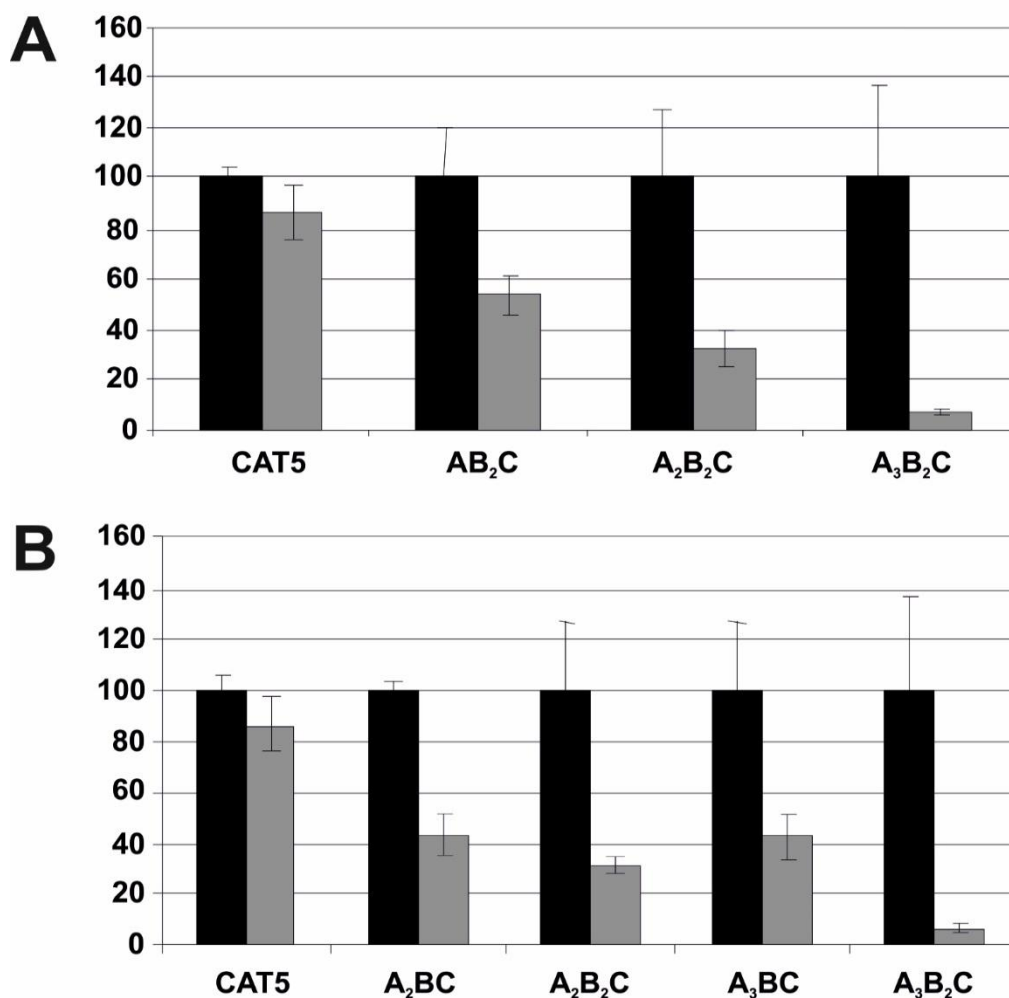
Naši rezultati su pokazali da je za svaki VNTR konstrukt smanjena CAT aktivnost u K562 ćelijama pretretiranim lekom 6-MP-om u odnosu na netretirane ćelije, od čega je 9 od 11 konstrukata imalo statistički značajno smanjenje (tabela 4.5). Različiti VNTR konstrukti su svrstani u tri kategorije, u skladu sa nivoom smanjenja CAT aktivnosti pod tretmanom leka 6-MP-a: manje od 33% (malo smanjenje), između 34 i 66% (srednje smanjenje) i više od 66% (veliko smanjenje). Za samo jedan konstrukt (AB<sub>4</sub>C) je smanjenje aktivnosti reporterskog vektora bilo manje od 34% prilikom tretmana lekom 6-MP-a, dok je za 6 konstrukata (A<sub>2</sub>B<sub>3</sub>C, A<sub>4</sub>BC, AB<sub>2</sub>C, A<sub>5</sub>BC, A<sub>2</sub>BC i A<sub>3</sub>BC) smanjenje bilo od 34 do 66%. Ono što je zanimljivo je da je za 4 konstrukta (A<sub>6</sub>BC, AB<sub>5</sub>C, A<sub>3</sub>B<sub>2</sub>C i A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C) izmereno izrazito smanjenje aktivnosti reporterskog vektora, više od 67%, kod pretretiranih u odnosu na netretirane ćelije (tabela 4.5).

U K562 ćelijama pretretiranim lekom 6-MP-om kod konstrukata koji imaju po dva B ponovka, sa povećanjem broja A ponovaka pokazano je da se ekspresija reporterskog gena izraženije smanjuje (AB<sub>2</sub>C, A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C i A<sub>3</sub>B<sub>2</sub>C) (slika 4.3A). Pored toga, tretman lekom 6-MP-om više smanjuje nivo transkripcije reporterskog gena kod konstrukata koji imaju dva B ponovaka, u odnosu na konstrukte sa jednim B ponovkom – veće je smanjenje CAT aktivnosti kod A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C i A<sub>3</sub>B<sub>2</sub>C u odnosu na A<sub>2</sub>BC i A<sub>3</sub>BC konstrukte u K562 ćelijama tretiranim lekom 6-MP-om u odnosu na netretiratne ćelije (slika 4.3B).

Tabela 4.5. CAT aktivnosti konstrukata koji sadrže promotor gena *TPMT* sa različitim VNTR alelima u netretiranim, odnosno 6-MP-om pretretiranim K562 ćelijama *in vitro*

Konstrukt	Pre tretmana*	Posle tretmana 6-MP-om *	P vrednost	Smanjenje promotorske aktivnosti (%)	Kategorija
AB <sub>4</sub> C <sup>†</sup>	14.2 ± 6.2	11.0 ± 1.2	0.388	22	Malo smanjenje (MS)
A <sub>2</sub> B <sub>3</sub> C	28.8 ± 5.4	16.1 ± 1.6	0.013	44	Intermedijarno smanjenje (IS)
A <sub>4</sub> BC	15.2 ± 4.2	8.2 ± 2.4	0.040	46	
AB <sub>2</sub> C	62.6 ± 12.9	33.2 ± 4.9	0.045	47	
A <sub>5</sub> BC <sup>†</sup>	19.0 ± 7.5	8.4 ± 2.0	0.057	55	
A <sub>2</sub> BC	11.9 ± 0.4	5.2 ± 1.7	0.016	56	
A <sub>3</sub> BC	55.7 ± 15.1	23.6 ± 5.1	0.006	58	Veliko smanjenje (VS)
A <sub>2</sub> B <sub>2</sub> C	49.4 ± 13.3	15.8 ± 3.5	0.012	68	
A <sub>6</sub> BC	46.0 ± 8.0	13.0 ± 2.3	0.014	72	
AB <sub>5</sub> C	33.8 ± 21.0	7.1 ± 6.0	0.040	79	
A <sub>3</sub> B <sub>2</sub> C	38.0 ± 13.9	2.5 ± 0.5	0.015	93	

\*CAT aktivnosti su predstavljene kao srednja vrednost ± standardna devijacija iz najmanje 3 nezavisna eksperimenta. Kotransfekovani pCH110 vektor koji eksprimira β-galaktozidazu je korišćen da usaglasi razlike u efikasnosti transfekcije. Normalizovane CAT aktivnosti konstrukata su predstavljene kao procenat CAT aktivnosti pBLCAT5 konstrukta u netretiranim ćelijama, čija vrednost je uzeta da bude 100%. CAT aktivnosti u netretiranim ćelijama kao i na tretiranim ćelijama transfekovanim konstruktima sa A<sub>2</sub>BC i AB<sub>2</sub>C alelima *TPMT* promotora su preuzeti iz rada Zukić i saradnika (Zukic2010). <sup>†</sup>Konstrukti koji nisu pokazali statistički značajnu razliku između CAT aktivnosti u netretiranim i 6-MP-om pretretiranim ćelijama. 6-MP: 6-merkaptopurin.



Slika 4.3. Funkcionalna analiza različitih motiva VNTR regiona promotora gena *TPMT* pre i nakon tretmana lekom 6-MP-om. Crni stubići se odnose na CAT aktivnosti u netretiranim ćelijama, a sivi stubići na CAT aktivnosti u pretretiranim ćelijama. CAT aktivnosti su predstavljene kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija iz najmanje 3 nezavisna eksperimenta. Vektor pBLCAT5 koji sadrži promotor timidin kinaze je korišćen kao pozitivna kontrola transfekcije. Kotransfekovani pCH110 vektor koji eksprimira  $\beta$ -galaktozidazu je korišćen da usaglasi razlike u efikasnosti transfekcije. Normalizovane CAT aktivnosti konstrukata u tretiranim ćelijama su predstavljene kao procenat CAT aktivnosti istog konstrukta u netretiranim ćelijama, čija je vrednost postavljena da bude 100%. **(A)** Smanjenje aktivnosti *TPMT* promotora u ćelijama pretretiranim 6-MP-om kod konstrukata koji imaju rastući broj A ponovaka, a isti broj B ponovaka (AB<sub>2</sub>C, A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C i A<sub>3</sub>B<sub>2</sub>C). **(B)** Poređenje smanjenja aktivnosti *TPMT* promotora kod konstrukata koji imaju isti broj A ponovaka, a različit broj B ponovaka (A<sub>2</sub>BC u poređenju sa A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C i A<sub>3</sub>BC u poređenju sa A<sub>3</sub>B<sub>2</sub>C). 6-MP: 6-merkaptopurin.

### **4.3.2. Uticaj terapije održavanja kod pedijatrijskih ALL pacijenata na ekspresiju gena *TPMT* u zavisnosti od VNTR arhitekture promotora gena *TPMT***

#### 4.3.2.1. Ekspresija gena *TPMT* u uzorcima mononuklearnih ćelija krvi i kosne srži pre početka hemoterapije

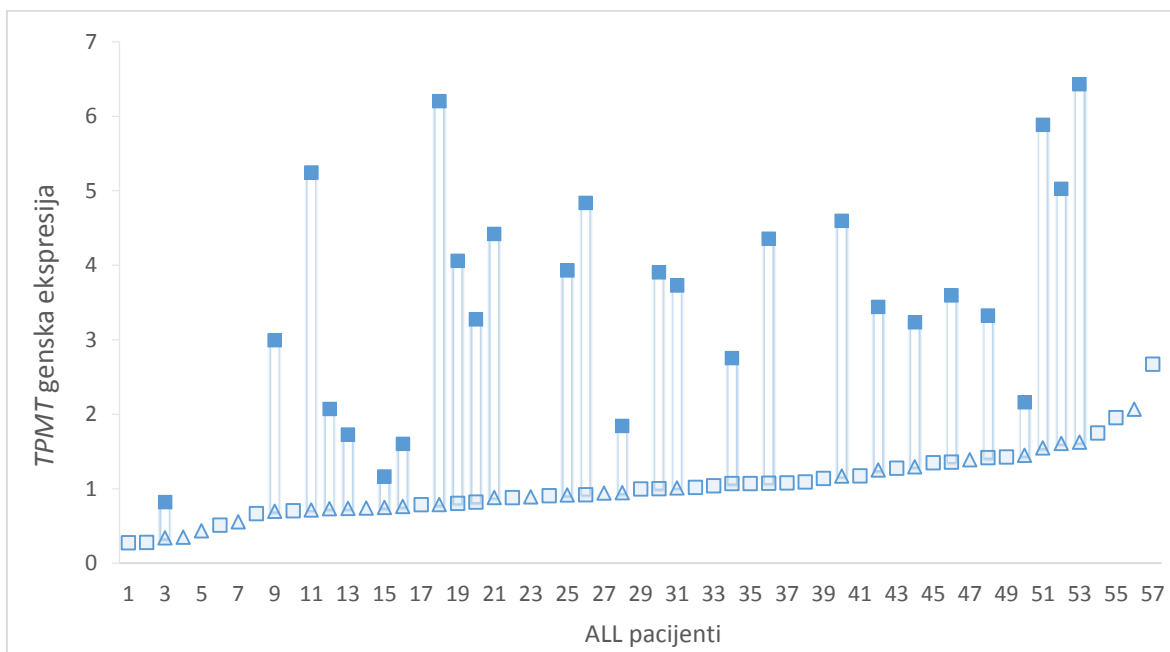
Ekspresija gena *TPMT* je merena u MNC izolovanim iz 30 uzoraka krvi i 27 uzoraka kosne srži prikupljenih od 57 pedijatrijskih ALL pacijenata pre početka hemoterapije. Kao kalibrator, čija je vrednost *TPMT* ekspresije postavljena da bude 1, poslužila je medijana *TPMT* ekspresije u uzorcima prikupljenim pre početka hemoterapije. Srednje vrednosti ekspresije za uzorke krvi bile su 1.09 [0.93 – 1.26] i 0.98 [0.82 – 1.15] za uzorke iz kosne srži. Prosečna *TPMT* ekspresija u krvi je bila za oko 10% viša u odnosu na prosečnu *TPMT* ekspresiju iz kosne srži. Međutim, razlika u distribuciji nije bila statistički značajna (Man-Vitni U test,  $p=0.30$ ) (slika 4.4). Ovi rezultati pokazuju da između uzoraka poreklom iz krvi i kosne srži razlika ili ne postoji ili da ima veoma male razlike u *TPMT* ekspresiji kod pedijatrijskih ALL pacijenata pre uvođenja hemoterapije.

#### 4.3.2.2. Ekspresija gena *TPMT* u toku terapije održavanja

Da bi se odredio uticaj terapije održavanja na *TPMT* ekspresiju, poređeni su nivoi *TPMT* ekspresije između 30 uzoraka krvi prikupljenih pre uvođenja hemoterapije i 27 uzoraka krvi prikupljenih u toku terapije održavanja. Prosečan nivo *TPMT* ekspresije je bila 1.09 [0.93 – 1.26] pre hemoterapije i 3.59 [3.04 – 4.14] tokom terapije održavanja. Ovo pokazuje da je prosečan nivo *TPMT* ekspresije tokom terapije održavanja bio oko 3.3 puta veći nego pre hemoterapije (Man-Vitni U test,  $p<10^{-7}$ ) (slika 4.4).

Osim toga, poređeni su nivoi ekspresije gena *TPMT* pre hemoterapije i tokom terapije održavanja kod uparenih uzoraka, tj. dva uzorka istog pacijenta. Naime, od svakog od 27 pacijenata je dva puta prikupljen uzorak: pre uvođenja hemoterapije, u momentu postavljanja dijagnoze, i u toku terapije održavanja. Nađena je pozitivna korelacija između nivoa *TPMT*

ekspresije pre hemoterapije i u toku terapije održavanja,  $rs=0.41$  ( $p=0.035$ ). Što je još važnije, za svakog pacijenta, nivo ekspresije je bio viši u toku terapije održavanja nego pre hemoterapije i to između 1.5 i 7.9 puta (Vilkoksonov test ekvivalentnih parova,  $p<10^{-10}$ ) (slika 4.4).



Slika 4.4. *TPMT* ekspresija kod 57 dece obolele od ALL. *TPMT* ekspresija je izmerena qRT-PCR tehnikom i izračunata  $\Delta\Delta Ct$  metodom u odnosu na ekspresiju *ABL1* gena, koji je poslužio kao endogena kontrola. Pacijenti su predstavljeni u rastućem poretku uzimajući u obzir njihovu *TPMT* ekspresiju pre hemoterapije. Vertikalne linije povezuju *TPMT* ekspresiju pre hemoterapije i u toku terapije održavanja izmerene kod istog pacijenta.

$\Delta$  – *TPMT* ekspresija u MNC kosne srži pre hemoterapije,

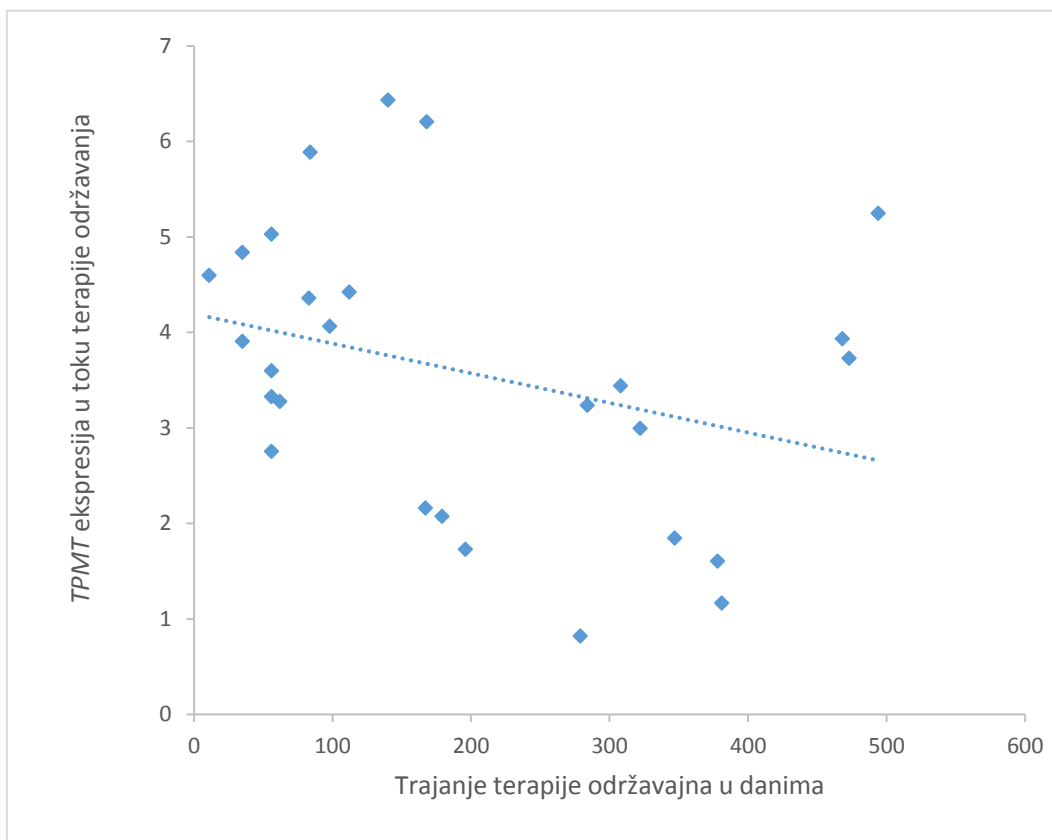
$\square$  – *TPMT* ekspresija u MNC krvi pre hemoterapije,

$\square$  – *TPMT* ekspresija u MNC krvi u toku terapije održavanja.

MNC – mononuklearne ćelije

Dvadeset sedam ALL pacijenata čiji su uzorci krvi prikupljeni u toku terapije održavanja, bili su ovoj fazi lečenja između 11 i 494 dana (medijana 167 dana) pre prikupljanja uzorka za analizu ekspresije. Negativna korelacija je nađena između dužine trajanja terapije održavanja i nivoa *TPMT* ekspresije kod pedijatrijskih ALL pacijenata,  $rs=-0.35$  [-0.66 –

0.03], ali nije dostignut nivo statističke značajnosti ( $p=0.077$ ). Ovaj rezultat pokazuje da je *TPMT* ekspresija najviša u ranim fazama terapije održavanja, i da njen nivo vremenom polako opada (slika 4.5).



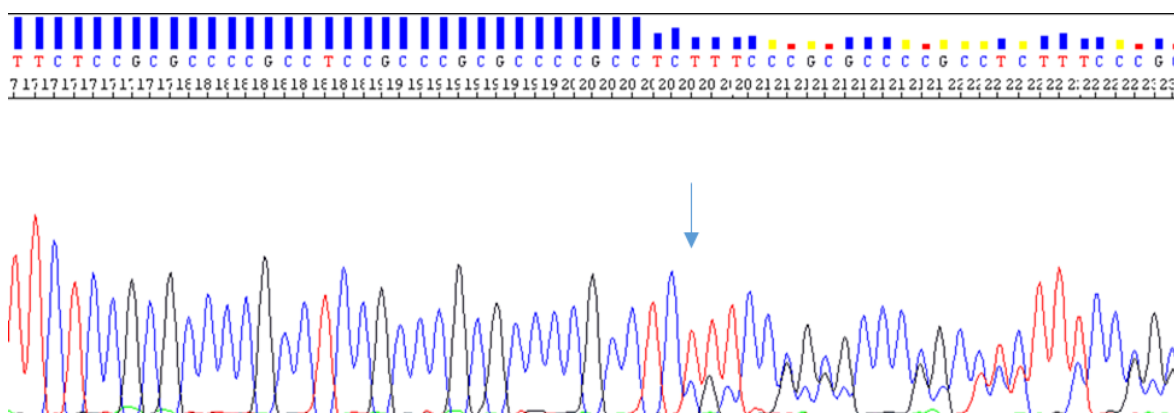
Slika 4.5. Korelacija između *TPMT* ekspresije i trajanja terapije održavanja kod pedijatrijskih ALL pacijenata

#### 4.3.2.3. Uticaj VNTR arhitekture u promotoru gena *TPMT* na *TPMT* ekspresiju pre početka hemoterapije

VNTR arhitektura u promotoru gena *TPMT* kod pedijatrijskih ALL pacijenata, odnosno broj i tip tandemskih ponovaka, je određena direktnim sekvenciranjem (slika 4.6). U našem uzorku od 57 pedijatrijskih ALL pacijenata, najučestaliji VNTR aleli su bili \*4a (53.5%) i \*5a (32.5%) (tabela 4.6). Dvanaest različitih genotipova u VNTR regionu gena *TPMT* je



nađeno. Tri najčešća genotipa, \*4a/\*4a, \*4a/\*5a i \*5a/\*5a je nosilo 18 (31.6%), 18 (31.6%), odnosno 7 (12.3%) pacijenata, redom. Više od 75% pacijenata je nosilo neki od 3 najčešća VNTR genotipa. Retki VNTR genotipovi su razmatrani kao 3 grupe. Detektovano je 3 nosioca alela sa 4 i 5 VNTR ponovaka (ne računajući \*4a/\*5a), 5 nosilaca alela \*6a i 6 nosilaca alela \*7a.



Slika 4.6. Elektroferogram dobijen sekvenciranjem dela promotora gena *TPMT* analizom DNK pacijenta koji nosi \*4a/\*5a VNTR genotip. Na mestu označenom strelicom počinju da se razaznaju paralelne sekvence tandemskih ponovaka sa različitih alela.

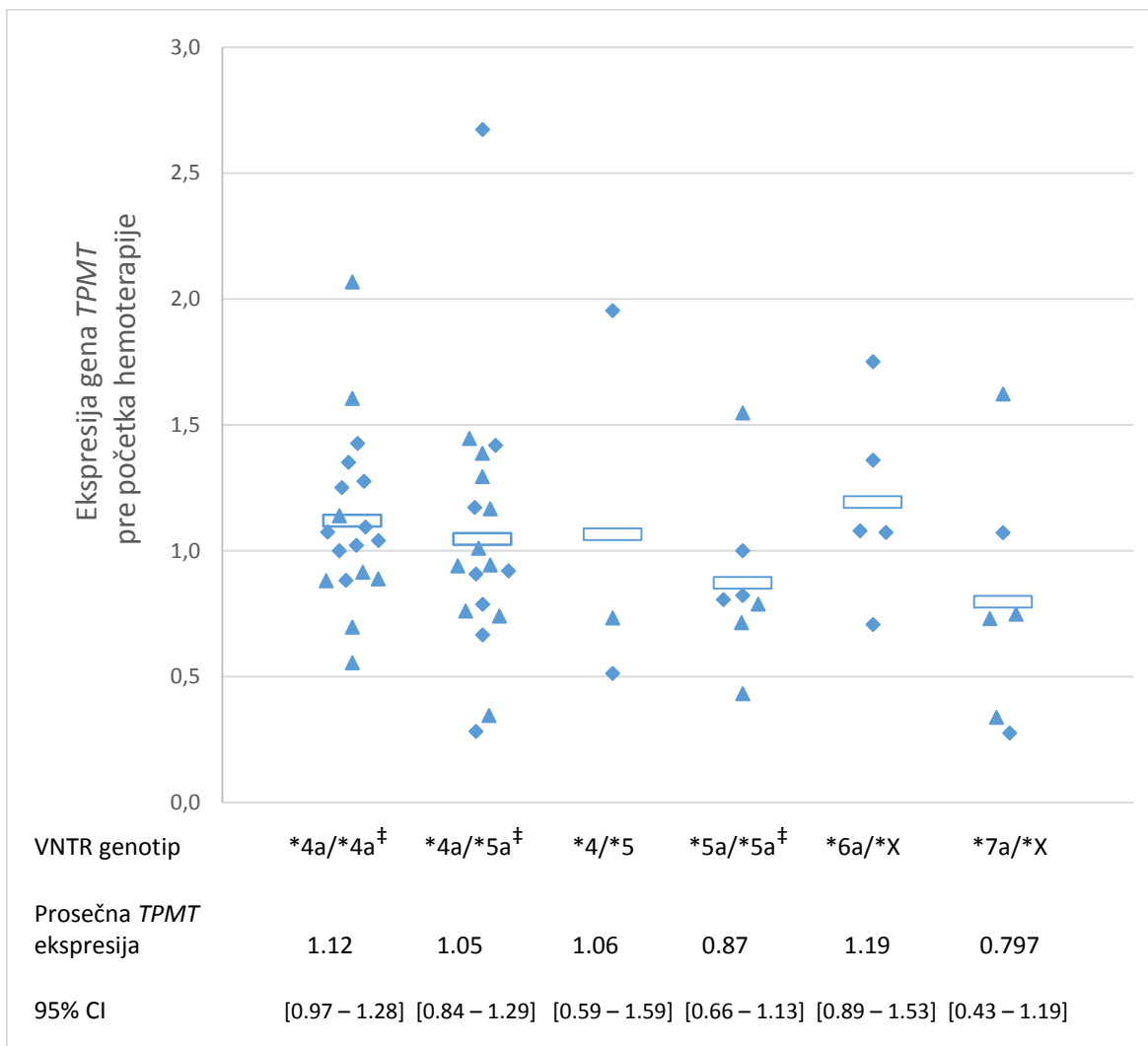
Tabela 4.6. Učestalost VNTR alela u promotoru gena *TPMT* kod 57 dece obolele od ALL

VNTR alel	VNTR arhitektura	Broj alela (Ukupno= 114)	Učestalost (Ukupno = 100%)
VNTR*4a	A <sub>2</sub> BC	61	53.5%
VNTR*4b	AB <sub>2</sub> C	2	1.8%
VNTR*5a	A <sub>2</sub> B <sub>2</sub> C	37	32.5%
VNTR*5b	A <sub>3</sub> BC	1	0.9%
VNTR*5c	AB <sub>3</sub> C	1	0.9%
VNTR*6a	A <sub>2</sub> B <sub>3</sub> C	6	5.3%
VNTR*7a	A <sub>5</sub> BC	6	5.3%

U proseku, nosioci \*4a/\*4a i \*6a/X VNTR genotipova su pokazali visoku, dok su nosioci \*5a/\*5a i \*7a/X pokazali nisku *TPMT* ekspresiju (slika 4.9). Ako se posmatraju samo 3 najčešća VNTR genotipa (\*4a/\*4a, \*4a/\*5a i \*5a/\*5a), jedine homogene i najbrojnije među grupama pacijenata, \*4a/\*4a nosioci su pokazali visok nivo *TPMT* ekspresije, \*4a/\*5a nosioci intermedijaran, a \*5a/\*5a nosioci nizak nivo *TPMT* ekspresije. Međutim, statistički značajna razlika između svih ovih grupa nije nađena (Kruskal-Valisov test,  $p=0.23$ ) (slika 4.7).

Razmotrena je i *TPMT* ekspresija u kontekstu ukupnog broja tandemskih ponovaka. Nivo *TPMT* ekspresije je bio negativno, ali ne i statistički značajno korelisan sa ukupnim brojem ponovaka,  $rs=-0.18$  [-0.43–0.09]. Takođe, ekspresija *TPMT* nije bila korelisana ni sa ukupnim brojem A ponovaka,  $rs=-0.21$  [-0.50–0.13], niti sa ukupnim brojem B ponovaka,  $rs=-0.05$  [-0.32–0.21].

Naši rezultati nisu pokazali da VNTR region promotora gena *TPMT* utiče na *TPMT* ekspresiju pre početka hemoterapije.



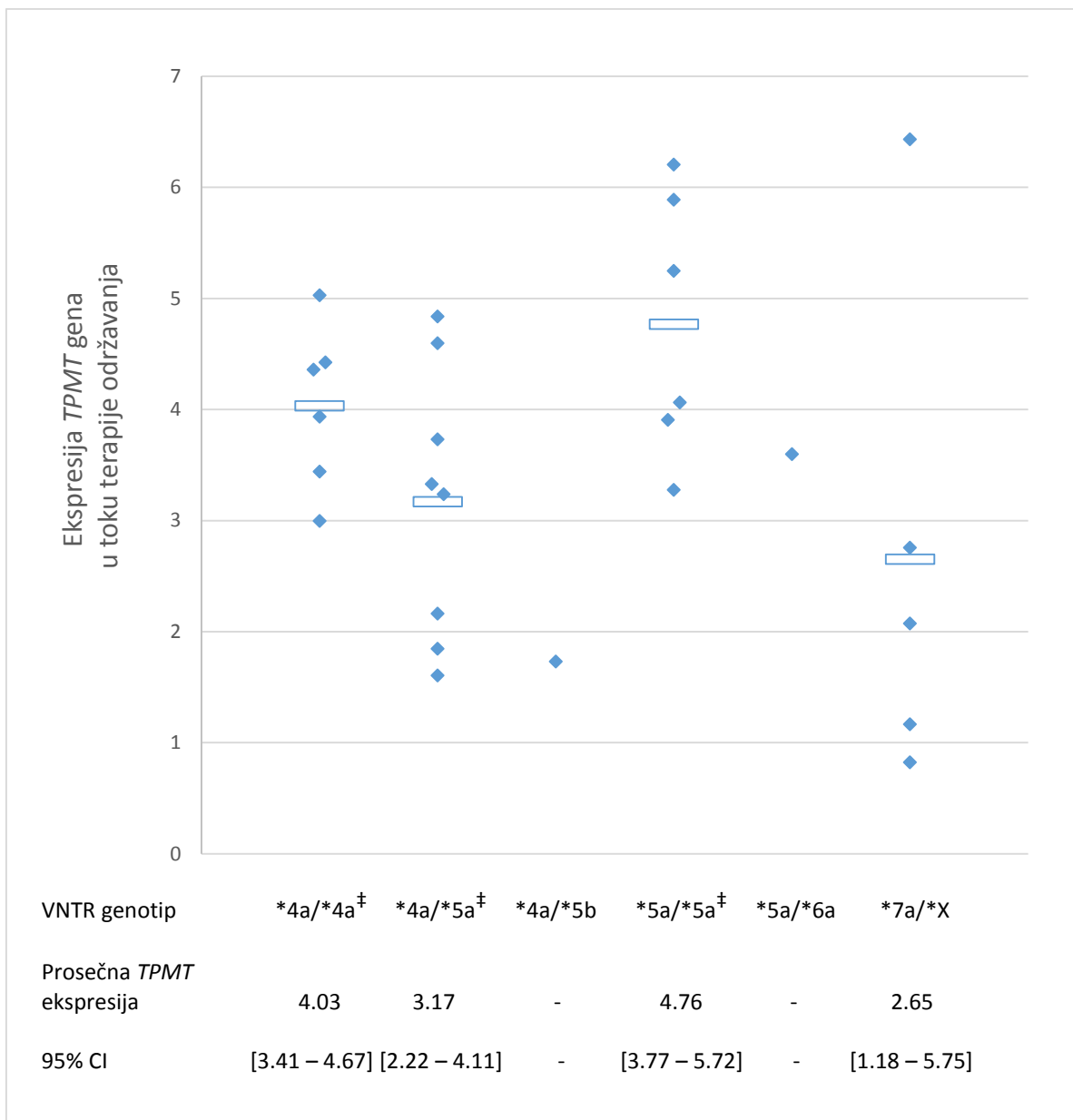
Slika 4.7. *TPMT* ekspresija u zavisnosti od VNTR genotipa pre hemoterapije u MNČ krvi (♦) i kosne srži (▲). Nosioi \*4a/\*5b, \*4a/\*5c i \*4b/\*5a su združeni u grupu označenu kao \*4/\*5. \*X predstavlja bilo koji VNTR alel. Srednje vrednosti su označene horizontalnom linijom na grafiku, kao i brojem ispod grafika zajedno sa 95% intervalom poverenja (95% CI). ‡ - označava 3 najčešća VNTR genotipa u promotoru gena *TPMT*.

#### 4.3.2.4. Uticaj VNTR arhitekture u promotoru gena *TPMT* na *TPMT* ekspresiju u toku terapije održavanja

Od 27 ALL pacijenata su sakupljeni uzorci krvi u toku terapije održavanja. U toku terapije održavanja nosioci \*5a/\*5a alela su imali najviši nivo ekspresije, dok su \*7a/\*X nosioci imali najnižu prosečnu *TPMT* ekspresiju (slika 4.9).

U okviru 3 najčešća VNTR genotipa (\*4a/\*4a, \*4a/\*5a i \*5a/\*5a), nosioci \*5a/\*5a genotipa su imali najvišu, a nosioci \*4a/\*5a najnižu *TPMT* ekspresiju (jednofaktorijalna ANOVA,  $p=0.045$ ) (slika 4.8). Budući da su nosioci \*5a/\*5a VNTR genotipa pokazivali nisku ekspresiju pre uvođenja hemoterapije, a najvišu u toku terapije održavanja, nađena je interakcija između VNTR genotipa i terapije održavanja koja utiče na *TPMT* ekspresiju (dvofaktorijalna ANOVA,  $p=0.048$ ). To znači da je najviše povećanje ekspresije u toku terapije održavanja, u odnosu na nivo pre hemoterapije zabeleženo kod nosioca \*5a/\*5a VNTR genotipa.

Razmotrena je i *TPMT* ekspresija u kontekstu ukupnog broja tandemskih ponovaka u toku trajanja terapije održavanja. Nivo *TPMT* ekspresije nije bio statistički značajno korelisan sa ukupnim brojem tandemskih ponovaka ( $r_s=-0.13$ ), niti sa ukupnim brojem B ponovaka ( $r_s=0.17$ ). Nasuprot tome, detektovana je negativna korelacija između prisustva ukupnog broja A ponovaka u VNTR regionu i nivoa *TPMT* ekspresije,  $r_s=-0.39$   $[-0.73-(-0.11)]$ ,  $p=0.046$ . Tokom terapije održavanja \*7a VNTR alel, koji u sadrži 5 A ponovaka, je pokazao najniži nivo ekspresije gena *TPMT*. Ovaj rezultat pokazuje da veći broj A ponovaka utiče na smanjenje *TPMT* ekspresije u toku terapije održavanja.



Slika 4.8. *TPMT* ekspresija u toku terapije održavanja u MNC krvi u zavisnosti od VNTR genotipa. \*X predstavlja bilo koji VNTR alel. Srednje vrednosti su označene horizontalnom linijom na grafiku, kao i brojem ispod grafika zajedno sa 95% intervalom poverenja (95% CI). ‡ - označava 3 najčešća VNTR genotipa u promotoru gena *TPMT*. MNC – mononuklearne ćelije

#### **4.4. Uticaj uzrasta i pola dece obolele od ALL na *TPMT* ekspresiju pre početka hemoterapije i u toku terapije održavanja**

Uticaj uzrasta dece obolele od ALL i pola na ekspresiju gena *TPMT* je razmotrena odvojeno za uzorke sakupljene pre početka hemoterapije od uzoraka sakupljenih u toku terapije održavanja.

##### **4.4.1. Uticaj uzrasta ALL pacijenata na ekspresiju gena *TPMT***

Pre uvođenja hemoterapije kod dece obolele od ALL, nivo *TPMT* ekspresije je bila negativno korelisan sa uzrastom pacijenata,  $r_s = -0.20$ , ali statistička značajnosti nije dosegnuta,  $p = 0.14$ . Nasuprot tome, u toku terapije održavanja, nađeno je da *TPMT* ekspresija pozitivno koreliše sa uzrastom pacijenata,  $r_s = 0.40$  [0.0–0.68],  $p = 0.041$ . Ovaj rezultat pokazuje da postoji tendencija da u toku terapije održavanja deca obolela od ALL starijeg uzrasta imaju veći nivo *TPMT* ekspresije.

##### **4.4.2. Uticaj pola ALL pacijenata na ekspresiju gena *TPMT***

Razlika u nivou *TPMT* ekspresije između dečaka i devojčica obolelih od ALL je takođe razmatrana. Pre uvođenja hemoterapije, ove razlike praktično nije bilo. Srednje vrednosti ekspresije gena *TPMT* su bile 1.02 [0.88 – 1.16] kod dečaka i 1.05 [0.87 – 1.27] kod devojčica (Man-Vitni U test,  $p = 0.86$ ). Slično, i tokom terapije održavanja, razlike među polovima su bile neznatne. Srednja vrednost ekspresije gena *TPMT* za dečake je bila 3.61 [2.92 – 4.31], a za devojčice 3.56 [2.57 – 4.50] (t test,  $p = 0.94$ ).

## **4.5. Uticaj genetičkih varijacija gena *TPMT* na *TPMT* ekspresiju pre hemoterapije i u toku terapije održavanja**

### **4.5.1. Uticaj genetičkih varijacija u promotoru, egzonima i sekvencama koje okružuju egzone gena *TPMT* na *TPMT* ekspresiju pre hemoterapije i u toku terapije održavanja**

Promotorski region, prvi egzon, *TPMT* c.460 G>A i *TPMT* c.719 A>G varijacije gena *TPMT* su određene kod svih 57 pedijatrijskih ALL pacijenata kod kojih je proučavana *TPMT* ekspresija. Za 27 ALL pacijenata su određene pomenute genetičke varijacije kao i varijacije u kodirajućim egzonima i sekvencama koji okružuju kodirajuće egzone. Detekcija genetičkih varijacija je urađena direktnim sekvenciranjem PCR fragmenata, osim *TPMT* c.460 G>A i *TPMT* c.719 A>G, koje su detektovane PCR-RFLP metodom. U genu *TPMT* je detektovano ukupno 12 varijabilnih lokusa, od toga 10 SNV i 2 varijacije u broju ponovaka. Učestalosti svih genotipova, zajedno sa prosečnom vrednošću *TPMT* ekspresije pre hemoterapije i u toku terapije održavanja su predstavljene u tabeli 4.7. Rezultati vezani za uticaj VNTR regiona u promotoru gena *TPMT* i njegove arhitekture na ekspresiju gena *TPMT* su detaljno analizirani u prethodnom odeljku, pa nisu predstavljani u tabeli 4.7. Generalno, nosioci ređih alela (7 GCC ponovaka, +90T, c.233+96T, c.367-25T, c.460A, c.475C, c.580+14T, c.719G) su u proseku imali manju *TPMT* ekspresiju (tabela 4.7). Izuzetak su bili nosioci ređe -114T varijante, koji su u proseku imali veću *TPMT* ekspresiju. Međutim, uticaj ovih varijacija na *TPMT* ekspresiju pre i u toku terapije nije bio statistički značajan.

Tabela 4.7. Varijacije gena *TPMT* i njihov uticaj na nivo *TPMT* ekspresije.

Genetička varijacija	Lokacija	Genotip	Pre hemoterapije		U toku terapije održavanja	
			n	Prosečna <i>TPMT</i> ekspresija [95% CI]	n	Prosečna <i>TPMT</i> ekspresija [95% CI]
<b>-279 to -262 (GCC)6&gt;7 ponovaka</b>	Promotor	6/6	55	1.02 [0.92 -1.13]	26	3.67 [3.06-4.28]
		6/7	1	0.75 [-]	1	1.17 [-]
		7/7	0	-	0	-
<b>-114 A&gt;T rs11331021</b>	Promotor	A/A	54	1.01 [0.91-1.12]	25	3.57 [2.98-4.17]
		A/T	2	1.18 [1.09-1.27]	2	3.75 [3.67-3.83]
		T/T	0	-	0	-
<b>+90 C&gt;T rs141028204</b>	Egzon 1	C/C	56	1.04 [0.93-1.16]	26	3.65 [3.07-4.21]
		C/T	1	0.73 [-]	1	1.73 [-]
		T/T	0	-	0	-
<b>c.233 +35 C&gt;T rs4449636</b>	Intron 4	C/C	8	0.95 [0.72-1.19]	8	4.06 [2.74-5.25]
		C/T	13	1.06 [0.91-1.21]	13	3.29 [2.51-4.18]
		T/T	6	1.04 [0.80-1.30]	6	3.58 [2.61-4.47]
<b>c.233 +96 G&gt;T rs17839845</b>	Intron 4	G/G	25	1.04 [0.92-1.17]	25	3.65 [3.09-4.23]
		G/T	2	0.78 [0.75-0.80]	2	2.67 [2.37-2.98]
		T/T	0	-	0	-
<b>c.366+58 T&gt;C rs2518463</b>	Intron 5	T/T	8	0.95 [0.72-1.19]	8	4.06 [2.74-5.25]
		T/C	13	1.06 [0.91-1.21]	13	3.29 [2.51-4.18]
		C/C	6	1.04 [0.80-1.30]	6	3.58 [2.61-4.47]
<b>c.367-25 A&gt;T rs56245893</b>	Intron 5	A/A	19	1.05 [0.92-1.19]	19	3.83 [3.12-4.52]
		A/T	8	0.99 [0.79-1.14]	8	3.00 [2.21-3.76]
		T/T	0	-	0	-
<b>c.460 G&gt;A rs1800460 (Ala154Thr)</b>	Egzon 7	G/G	53	1.04 [0.92-1.17]	26	3.59 [3.03-4.14]
		G/A	4	0.95 [0.86-1.04]	1	2.07 [-]
		A/A	0	-	0	-
<b>c.475 T&gt;C rs2842914 (Ile158Ile)</b>	Egzon 7	T/T	21	1.03 [0.88-1.19]	21	3.71 [3.11-4.34]
		T/C	5	0.92 [0.78-1.14]	5	3.06 [2.00-4.10]
		C/C	1	1.13 [-]	1	3.44 [-]
<b>c.580+14 G&gt;T rs2842949</b>	Intron 8	T/T	18	1.04 [0.89-1.20]	18	3.85 [2.99-4.66]
		T/G	9	0.96 [0.81-1.18]	9	3.05 [2.40-3.66]
		G/G	0	-	0	-
<b>c.719 A&gt;G rs1142345 (Tyr240Cys)</b>	Egzon 10	A/A	52	1.05 [0.93-1.17]	25	3.65 [3.09-4.23]
		A/G	5	0.90 [0.79-1.02]	2	2.67 [2.37-2.98]
		G/G	0	-	0	-



#### 4.5.2. Analiza haplotipova

Uzimajući u obzir 12 detektovanih varijacija u genu *TPMT*, za analizu haplotipova su proučavane 3 grupe varijacija. Unutar svake od 3 grupa, genetičke varijante su bile međusobno vezane, odnosno, nalazile su se u LD-u (tabela 4.8). U Grupi 1, c.233 +35 C>T i c.366+58 T>C su bile u perfektnom LD-u,  $r^2=1.0$  i povezani sa VNTR alelima \*4a ( $r^2=0.73$ ), \*5a ( $r^2=0.525$ ) i \*7a ( $r^2=0.09$ ). U Grupi 2, najjača veza je bila između c.367-25 A>T i c.580+14 G>T ( $r^2=0.87$ ). Grupa 3 se sastojala od c.460 G>A i c.719 A>G. Analiza haplotipova za ovaj blok je urađena na celokupnoj grupi pacijenata. Nađeno je da je da je genetička varijanta c.460G povezana sa c.719A, kao i c.460A sa c.719G ( $r^2=0.91$ ).

Nijedan od haplotipova nije bio asociran sa nivoom *TPMT* ekspresije ni pre niti u toku trajanja terapije održavanja kod dece obolele od ALL.

Tabela 4.8. Učestalosti haplotipova sačinjenih od genetičkih varijanti gena *TPMT*

Grupa 1* (N=27)	H1	H2	H3
VNTR	4a	5a	7a
c.233 +35 C>T	T	C	C
c.366 +58 T>C	C	T	T
Učestalost	40.7%	40.7%	9.6%
Grupa 2* (N=27)	H1	H2	H3
c.367-25 A>T	A	T	T
c.475 T>C	T	C	T
c.580+14 G>T	T	G	G
Učestalost	80.5%	9.3%	5.6%
Grupa 3 (N=174)	H1	H2	H3
c.460 G>A	G	A	G
c.719 A>G	A	G	G
Učestalost	96.8%	2.9%	0.3%

\*Prikazana su 3 najčešća haplotipa (H1 – H3)

# 5. Diskusija

## 5.1. Genetičke varijacije koje utiču na metabolizam i transport lekova 6-MP-a i MTX-a

Kod pedijatrijskih ALL pacijenata i zdravih ispitanika određene su varijacije u genima koji kodiraju važne enzime i transportere metaboličkih puteva lekova 6-MP-a i MTX-a. Smisao ovog dela istraživanja jeste da se ustanovi odnos između genetičkih varijacija i odgovora pedijatrijskih ALL pacijenata na terapiju lekovima 6-MP-om i MTX-om, odnosno da se pokaže koje od tih varijacija bi bile pouzdani farmakogenomički markeri koji bi mogli da uđu u rutinsku kliničku upotrebu. Međutim, klinički parametri vezani za odgovor ALL pacijenata na terapiju su izvan okvira ovog rada. Ipak, podaci o učestalostima pojedinih genetičkih varijanti mogu da nagoveste njihov farmakogenetički potencijal.

### 5.1.1. Farmakogenomički potencijal genetičkih varijacija koje utiču na metabolizam i transport lekova 6-MP-a i MTX-a

Varijacije u genima *TPMT*, *ITPA*, *ABCC4*, *ABCB1* i *MTHFR* su potencijalno važne za odgovor na terapiju tiopurinskim lekovima. Farmakogenomički potencijal varijacija u genu *MTHFR*, je obrađen zajedno sa ostalim varijacijama u genima za enzime folatnog puta. U našoj grupi pedijatrijskih ALL pacijenata, varijantni aleli *TPMT* c.460A, *TPMT* c.719G, *ITPA* c.94A, *ABCC4* rs9516519, nukleotid G i *ABCB1* c.2677T detektovani su sa učestalošću od 2.9%, 3.2%, 3.7%, 22.1% i 38.2%, redom, što je veoma slično rezultatima dobijenim za kontrolnu grupu. U našoj grupi ispitanika, varijantni aleli u genu *TPMT* su imali sličnu učestalost kao u drugim evropskim populacijama ([www.1000genomes.org](http://www.1000genomes.org)). Nosiocima varijantnih *TPMT* alela, priznatim farmakogenomičkim markerima, *TPMT* c.460A i *TPMT* c.719G, kojih je u našoj grupi ALL pacijenata bilo oko 6%, je preporučena modifikovana terapija tiopurinskim lekovima (Dokmanovic et al. 2006; Relling et al. 1999).

Dobijeni rezultati analize haplotipova su potvrdili da se ređe varijante gena *TPMT*, c.460A i c.719G, uglavnom nasleđuju zajedno. Ove dve varijante definišu *TPMT*\*3A alel, koji je u našoj grupi ALL pacijenata bio zastupljen sa 2.9%. *TPMT*\*3A alel je najzastupljeniji

varijantni alel čije prisustvo uslovljava smanjenu aktivnost TPMT enzima u evropskim populacijama (Weinshilboum & Sladek 1980). Za razliku od evropskih, u azijskim populacijama je najzastupljeniji *TPMT\*3C* alel koji se karakteriše prisustvom *TPMT* c.719G varijante (Chen et al. 2009). Ali kao što je već od ranije poznato, farmakogenomički markeri jesu populaciono specifični i uvek bi trebalo uzeti u obzir etničku komponentu (Papadopoulos et al. 2014).

Varijantni alel, *ITPA* c.94A, je bio nešto manje zastupljen u našoj studiji, dok je varijantni alel u genu *ABCC4* (rs9516519 nukleotid G) bio za koji procenat učestaliji u našoj grupi ALL pacijenata nego u drugim evropskim populacijama ([www.1000genomes.org](http://www.1000genomes.org)). Nefunkcionalni *ITPA* c.94A alel se dovodi u vezu sa povećanom toksičnošću 6-MP-a prilikom lečenja ALL, iako je farmakogenetički značaj ove varijante manji u odnosu na varijante gena *TPMT* (Stocco et al. 2009). Manja zastupljenost varijante *ITPA* c.94A zabeležena u našoj studiji bi mogla da znači da ova varijanta ima manji klinički značaj u srpskoj populaciji u odnosu na druge evropske populacije.

Pored SNV u kodirajućem regionu gena *TPMT*, koji se već dosta koriste prilikom određivanja režima terapije tiopurinskim lekovima, treba razmotriti kliničku primenu ostalih genetičkih markera koji modulišu metabolički put leka 6-MP-a. Dobar primer za to predstavljaju varijante u genima *ITPA* i *ABCC4*, za koje postoje dokazi da utiču na odgovor na terapiju lekom 6-MP-om (Stocco et al. 2013). Potrebno je uraditi prospektivne studije koje bi uključile veći broj pacijenata da bi se potvrdio klinički značaj ovih varijanti.

Geni *TYMS*, *MTHFR* i *DHFR* kodiraju enzime folatnog puta i *SLC19A1* kodira transporter folata i leka MTX-a. Kod pedijatrijskih ALL pacijenata i u kontrolnoj grupi je detektovano ukupno 11 genetičkih varijacija u ova 4 gena. U našoj grupi ALL pacijenata, alelska distribucija je bila vrlo slična u poređenju sa rezultatima dobijenim na kontrolnoj grupi ispitanika. Takođe, zastupljenost alela u pomenuta četiri gena među našim ispitanicima je bila slična kao za ispitanike drugih evropskih populacija ([www.1000genomes.org](http://www.1000genomes.org)).

U našoj grupi ALL pacijenata, detektovano je oko 33% homozigotnih nosilaca alela sa 3 ponovka, 3R, u minisatelitskom lokusu 5'UTR-a gena *TYMS*. ALL pacijenti koji nose ovaj genotip imaju povećan rizik da dožive pogoršanje osnovne bolesti (Krajinovic et al. 2005), ali manji rizik od toksičnosti izazvane terapijom lekom MTX-om (Lima et al. 2013). U našoj grupi ispitanika, minisatelitski region u 5'UTR-u i 6bp indel u 3'UTR-u gena *TYMS* su bili u LD-u, što je poznato i za druge evropske populacije (Lima et al. 2014). Relativno redak haplotip definisan duplim ponovkom (2R) i delecijom od 6bp (6bp-), zastupljen je sa 8.2% kod naših ispitanika. U jednoj studiji ovaj haplotip je doveden u vezu sa smanjenim rizikom od pogoršanja osnovne bolesti kod pedijatrijskih ALL pacijenata (Krajinovic et al. 2005). Na osnovu učestalosti varijanti u genu *TYMS*, možemo zaključiti da u srpskoj populaciji ima oko 33% pacijenata koji su kandidati za pojačanu terapiju lekom MTX-om, dok za oko 8% pacijenata treba razmotriti smanjenje doze ovog leka.

Varijacije u genu *MTHFR* se dovode u vezu i sa odgovorom na terapiju lekom MTX-om, jer MTHFR enzim učestvuje u folatnom metaboličkom putu i sa odgovorom na terapiju tiopurinskim lekovima, jer ovaj enzim utiče na koncentraciju SAM-a, kofaktora enzima TPMT. U našoj grupi ALL pacijenata, bilo je oko 11% nosilaca *MTHFR* c.677TT genotipa, koji se povezuje sa smanjenom aktivnošću MTHFR enzima. ALL pacijenti koji nose ovaj genotip imaju veću verovatnoću da dožive pogoršanje osnovne bolesti (Aplenc et al. 2005). ALL pacijenti koju su složeni heterozigoti za varijante *MTHFR* c.677T i c.1298C takođe imaju nisku aktivnost MTHFR enzima pa mogu biti podložniji pogoršanju osnovne bolesti. Rezultati naše analize haplotipova su potvrdili od ranije poznatu činjenicu (Skibola et al. 2004) da se ove varijante, c.677T i c.1298C, koje menjaju aminokiselinski sastav MTHFR enzima retko nalaze na istom hromozomu. Nosilaca *MTHFR* c.677TT i složenih heterozigota za varijante c.677T i c.1298C u našoj grupi ALL pacijenata je ukupno bilo 26%. Za ove pacijente bi mogli očekivati da su podložniji pogoršanju osnovne bolesti, pa bi za njih trebalo razmotriti povećanje doze leka MTX-a.

U našoj studiji je detektovano 5 varijacija u promotoru gena *DHFR*. Ovih 5 varijacija su u izraženom LD-u, tako da smo među našim ispitanicima detektovali samo 4 relativno učestala haplotipa. Samo jedna od varijacija u genu *DHFR* koja je analizirana u našoj studiji, *DHFR*

-317 A>G, je dovedena u vezu sa odgovorom na terapiju lekom MTX-om (Dulucq et al. 2008; Gómez-Gómez et al. 2012). Međutim, i genotip *DHFR* -317GG (Gómez-Gómez et al. 2012) i genotip *DHFR* -317AA (Dulucq et al. 2008) su dovedeni u vezu sa povećanim rizikom od pogoršanja osnovne bolesti kod dečjih ALL pacijenata. Genotip *DHFR* -317GG je u našoj grupi ALL pacijenata imao učestalost oko 15%, dok je genotip *DHFR* -317AA imao učestalost od oko 35%. Budući da je učestalost navedenih genotipova dosta visoka u belim populacijama, vredelo bi sprovesti studiju kojom bi se utvrdilo koji od genotipova SNV *DHFR* -317 A>G utiče na pogoršanje, odnosno poboljšanje osnovne bolesti.

U genu *SLC19A1* analizirali smo klinički najrelevantniju varijaciju, *SLC19A1* c.80 G>A. U našoj grupi ALL pacijenata genotip c.80AA, povezan sa smanjenom aktivnošću RFC1 transportera (Chango et al. 2000), bio je zastupljen sa oko 27%. Pedijatrijski ALL pacijenti koji nose ovaj genotip imaju lošiju prognozu, verovatno zbog smanjenog unosa leka MTX-a u ćelije kancera (Laverdière et al. 2002; Leyva-Vázquez et al. 2012). Za nosioce c.80AA genotipa koji manje efikasno unose i lek MTX, veća doza ovog leka bi mogla da poboljša prognozu lečenja. Takođe, ukoliko dođe do neželjene toksičnosti lekom MTX-om, nosiocima c.80AA genotipa bi možda trebalo povećati dozu prirodnog folata, 5-formil-THF-a, da bi se smanjio toksični efekat leka MTX-a.

Metabolički put folata/MTX-a uključuje veliki broj enzima i transportera. Većina dosadašnjih studija je uključivala mali broj pacijenata i analizirao se jedan do nekoliko genetičkih varijanti koje modulišu odgovor na terapiju lekom MTX-om. Primenom sekvenciranja druge generacije moguće je za kratko vreme ispitati veliki broj genetičkih varijanti. Ovaj pristup je već našao primenu u ispitivanju asocijacije između farmakokinetke leka MTX-a i varijacija u genima za transportere kod dece obolele od ALL (Elixabet Lopez-Lopez et al. 2013; Treviño et al. 2009). GWA studije predstavljaju odličan pristup za identifikaciju genetičkih varijanti koje mogu da modulišu složene metaboličke puteve, kakav je put leka MTX-a.

Transporter ABCC4 može da transportuju iz ćelije i lek 6-MP i lek MTX. Varijantni alel ABCC4 rs9516519, nukleotid G, je u našoj studiji je bio nešto zastupljeniji, nego u drugim

evropskim populacijama ([www.1000genomes.org](http://www.1000genomes.org)). Varijanta rs9516519, nukleotid G, je povezana sa manjom koncentracijom leka MTX-a u plazmi ALL pacijenata (Elixabet Lopez-Lopez et al. 2013). Ova varijanta bi mogla da ima efekat i na farmakokinetiku leka 6MP-a. Budući da je u našoj populaciji zastupljenija nego u drugim evropskim populacijama, genetičku varijaciju rs9516519 bi vredelo dodatno ispitati u kliničkim studijama.

I transporter ABCB1 može da transportuje lekove 6-MP i MTX iz ćelije. Za neke varijante ovog gena je pokazano da mogu da utiču na prognozu bolesti pedijatrijskih ALL pacijenata (Lu et al. 2014; Gregers et al. 2015; Wang et al. 2005). Varijanta *ABCB1* c.2677T u našoj populaciji je imala sličnu zastupljenost kao u drugim evropskim populacijama ([www.1000genomes.org](http://www.1000genomes.org)). Ova varijanta je bila povezana sa lošijom prognozom bolesti pedijatrijskih ALL pacijenata (Lu et al. 2014), mada ovaj rezultat nije potvrđen u drugim studijama (Gregers et al. 2015; Wang et al. 2005). Potrebno je sakupiti dodatne dokaze o uticaju *ABCB1* c.2677 G>T na prognozu ALL da bi se utvrdilo da li ova varijacija ima klinički značaj kod pedijatrijskih ALL pacijenata.

### **5.1.2. Genetičke varijacije koje utiču na metabolizam i transport lekova 6-MP-a i MTX-a kao faktori rizika za razvoj dečje ALL**

Uloga svih gorepomenutih varijanti može da se posmatra i u svetlu rizika za nastanak dečje ALL. Ove varijante se nalaze u genima koji kodiraju enzime važne za metabolizam i transport lekova, te je očekivano da mogu da imaju farmakogenomički potencijal. Međutim, neke od ovih varijanti se dovode u vezu sa oštećenjima DNK, pa je moguć njihov doprinos u razvoju malignih bolesti, kakva je dečja ALL.

Kako prirodni supstrat enzima TPMT još uvek nije identifikovan, niti je utvrđena njegova funkcija kod ljudi koji ne primaju tiopurinske lekove (Azimi et al. 2014), ne očekuje se da bi varijacije u ovom genu mogle doprineti razvoju same bolesti (Chen et al. 2009). Zbog toga smo varijacije u genu *TPMT* isključili iz analize koja se tiče etiologije dečje ALL.

Da bi se procenio rizik za razvoj ALL kod dece u zavisnosti od prisustva genetičkih varijanti, varijacije u ostalim genima (*ITPA*, *ABCC4*, *ABCBI*, *TYMS*, *MTHFR*, *SLC19A1*, *DHFR*) su analizirane i kod pedijatrijskih ALL pacijenata i kod zdravih ispitanika. Varijacije u genima *TYMS*, *MTHFR* i *DHFR*, koji kodiraju enzime folatnog puta i *SLC19A1* koji kodira transporter folata i MTX-a su detektovane kod 154 ALL pacijenata i 104 zdravih ljudi. Učestalosti varijantnih alela u našem radu u genima *TYMS*, *MTHFR*, *SLC19A1* i *DHFR* između ALL pacijenata i kod kontrolnih ispitanika je bila vrlo slična, što sugeriše na zaključak da dostupnost različitih formi folata nema ulogu u nastanku ALL.

Varijacije *MTHFR* c.677 C>T i *MTHFR* c.1298 A>C su najviše proučavane u svetlu rizika za razvoj ALL. Ovim pitanjem se bavilo nekoliko meta studija, a poslednja, koja je obuhvatila najveći broj ispitanika je pokazala da prisustvo varijantnog, c.677T alela, blago smanjuje rizik za pojavu ALL (Yan et al. 2012). Varijacija *MTHFR* c.1298 A>C u ovom slučaju nije pokazala asocijaciju sa nastankom ALL (Yan et al. 2012). Manje funkcionalni *MTHFR* alocim kodiran c.677T alelom sporije prevodi 5,10-metilen-THF u 5-metil-THF, što ostavlja više slobodnog 5,10-metilen-THF za sintezu dTMP od dUMP. Na ovaj način se smanjuje stopa ugrađivanja uracila u DNK, što predstavlja oštećenje DNK, i samim tim se smanjuje verovatnoća za razvoj kancera (Koppen et al. 2010).

Za varijante koje povećavaju ekspresiju gena *TYMS* bi se očekivalo da smanjuju rizik od nastanka malignih bolesti, jer visoko ekspimirani gen *TYMS* smanjuje koncentraciju deoksiuridinskih nukleotida koji mogu da oštete DNK. Međutim, studije koje su analizirale ponovke od 28bp u genu *TYMS* pokazale su oprečne rezultate. Naime, povećan rizik za razvijanje ALL je pokazan i za varijantu sa 3 ponovka (Skibola et al. 1999) i za varijantu sa 2 ponovka od 28bp u genu *TYMS* (de Jonge et al. 2009).

Veća aktivnost enzima *DHFR*, ključnog enzima folatnog puta, i visok nivo unosa folata u ćeliju RFC1 transporterom su povezani sa visokim nivoom aktivnih formi folata u ćeliji, što omogućava efikasnu sintezu dTMP-a iz dUMP i adekvatan nivo metilacije DNK. Očekivalo bi se, stoga, da varijante u ovim genima koje uslovljavaju visoku aktivnost ovih proteina budu povezane sa smanjenim rizikom od razvoja ALL. Zaista, izučavajući varijacije u genu *DHFR* kod ALL pacijenta i u kontrolnoj grupi, pokazana je protektivna uloga alela koji



uslovljava veću ekspresiju gena *DHFR* (Gemmati et al. 2009). Međutim, oprečni rezultati su dobijeni što se tiče *SLC19A1* c.80 G>A varijacije i rizika za dobijanje ALL (de Jonge et al. 2009; Silva et al. 2013). Naime, de Jonge i saradnici su pokazali da je rizik za nastanak ALL značajno povišen kod dece koja nose *SLC1A1* c.80AA genotip (de Jonge et al. 2009), dok je u drugoj studiji pokazano da je ovaj genotip povezan sa smanjenim rizikom za nastanak ALL (Silva et al. 2013).

Povišena stopa mutacija i deregulacija ekspresije određenih gena u ćeliji mogu povećati rizik za nastanak neoplastičnih promena. Folatni put u ćelijama je izuzetno važan za procese sinteze DNK i DNK metilacije. Genetičke varijante koje modulišu ove procese, mogu modulirati i rizik za nastanak malignih oboljenja. Za sada je jedino ustanovljeno da varijanta *MTHFR* c.677T smanjuje rizik od dečje ALL, ali je efekat ove varijante vrlo skroman (Yan et al. 2012). Potrebne su dodatne studije da bi se odgovorilo na pitanje da li osim varijacija u genu *MTHFR*, varijacije u drugim genima koji modulišu folatni metabolički put, utiču na rizik za dobijanje dečje ALL. Dosadašnjih studije su malobrojne, a njihovi rezultati često kontroverzni.

Kod 68 pedijatrijskih ALL pacijenata i 69 zdravih ljudi određene su varijacije u genima *ITPA*, *ABCB1* i *ABCC4*, gde je, takođe, učestalost varijantnih alela između pacijenata i u kontrolnoj grupi je bila veoma slična. Sa izuzetkom gena *ABCB1*, varijacije u gorepomenutim genima su malo izučavane u svetlu rizika za razvijanje hematoloških maligniteta ili malignih bolesti uopšte. Smatra se da slabija aktivnost *ABCB1* transportera povećava izloženost ćelije kancerogenima i toksinima, pa otud povećan rizik od malignih bolesti kod nosilaca manje funkcionalnih alela ovog gena. Zaista, neke studije su pokazale asocijaciju između razvitka ALL i veće učestalosti varijanti u genu *ABCB1* koje doprinose manjoj funkcionalnosti samog transportera (Jamroziak et al. 2004; Rao et al. 2010), dok jedna studija koja je obuhvatila veliki broj pacijenata i zdravih ispitanika nije pokazala takvu asocijaciju (Gregers et al. 2015). Potrebno je sprovesti studije sa velikim brojem ispitanika da bi se utvrdilo da li varijacije u genima *ITPA*, *ABCB1* i *ABCC4* koje menjaju funkciju proteina imaju ikakav uticaj na razvoj dečje ALL.

## 5.2. Uticaj genetičkih varijacija u genu *TPMT* i terapije održavanja na ekspresiju gena *TPMT* kod ALL pacijenata

### 5.2.1. Uticaj terapije održavanja na ekspresiju gena *TPMT*

TPMT je najvažniji enzim za detoksifikaciju tiopurinskih lekova u hematopoetskom tkivu. Na TPMT aktivnost i *TPMT* ekspresiju mogu da utiču lekovi koju pacijent dobija, što može da se odrazi na efikasnost i toksičnost tiopurinske terapije.

Za ovaj deo studije, analizirana je *TPMT* ekspresija u mononuklearnim ćelijama izolovanih iz 57 svežih uzoraka krvi i kosne srži ALL pacijenata prikupljenih pre početka hemoterapije. Dobili smo da razlike u *TPMT* ekspresiji između uzoraka krvi i kosne srži ili ne postoje ili da ima vrlo malo razlike. Iz tog razloga i zbog činjenice da krvne ćelije vode poreklo iz kosne srži, za dalje analize nismo uzimali u obzir da li je uzorak prikupljen iz krvi ili kosne srži.

*TPMT* ekspresija je određena i u mononuklearnim ćelijama iz svežih uzoraka krvi prikupljenih od 27 pacijenata kojima je uzorak krvi prikupljen drugi put, u toku terapije održavanja, kada dobijaju lekove 6-MP i MTX. Naši rezultati su pokazali da je prosečni nivo *TPMT* ekspresije povećan i to za više od 3 puta u toku terapije održavanja, u odnosu na nivo pre hemoterapije. Osim toga, za svakog pacijenta, nivo ekspresije je bio viši tokom terapije održavanja, nego pre hemoterapije. Takođe, ustanovili smo pozitivnu korelaciju između nivoa *TPMT* ekspresije pre uvođenja hemoterapije i u toku terapije održavanja. To znači da ako je pacijent imao visok nivo ekspresije pre hemoterapije, možemo očekivati da će ostati u grupi pacijenata sa visokim nivoom ekspresije i u toku terapije održavanja.

Od ranije se znalo da je aktivnost TPMT enzima u eritrocitima oko 30% veća kod pedijatrijskih ALL pacijenata koji dobijaju terapiju održavanja, nego kod zdravih ljudi ili kod ALL pacijenata koji ne dobijaju terapiju (Lennard et al. 1990; Wennerstrand et al. 2013; McLeod et al. 1995; Chrzanowska et al. 2012; Pettersson et al. 2002). Do sada nije bilo poznato da li i kakav uticaj može da ima terapija održavanja na ekspresiju ili transkripciju gena *TPMT* kod dece obolele od ALL. Povećanje ekspresije gena *TPMT* tokom terapije

održavanja od više od 3 puta koju smo mi zabeležili, bi moglo barem donekle da se objasni povećanje aktivnosti TPMT enzima oko 30% ranije zabeleženo kod ovih pacijenata. Ukoliko su ekspresija gena *TPMT* i aktivnost TPMT enzima, ključnog faktora za detoksifikaciju tiopurinskih lekova, povećani, to može da bude važno prilikom uvođenja terapije ovim lekovima. Tako je pokazano da su ALL pacijenti, heterozigotni nosioci nefunkcionalnih varijanti u genu *TPMT* (*TPMT*\*2 i *TPMT*\*3 alela), nakon smanjenih doza tiopurinskih lekova u početku terapije održavanja, mogli kasnije da tolerišu pune doze 6-MP-a bez razvoja toksičnosti i to sve dok su druge citotoksične lekove koji se inače koriste u ovoj fazi terapije primali u punoj dozi (Dokmanovic et al. 2006). To znači da bi bilo od izuzetne važnosti da se uzmu u obzir funkcionalne genetičke varijacije na samom početku terapije održavanja, dok bi povećanje *TPMT* ekspresije u kasnijoj fazi lečenja bilo u mogućnosti da bar delimično kompenzuje prvobitno nisku aktivnost TPMT enzima. Ovo bi moglo da objasni zašto su čak i heterozigotni nosioci nefunkcionalnih varijanti u genu *TPMT*, posle nekoliko nedelja od početka terapije održavanja, mogli da tolerišu punu dozu 6-MP-a (Dokmanovic et al. 2006).

Kao što je i očekivano, postoji pozitivna korelacija između *TPMT* genske ekspresije i TPMT enzimske aktivnosti (Lindqvist et al. 2003). Međutim, povećanje TPMT enzimske aktivnosti samo donekle prati povećanje transkripcije gena *TPMT* tokom faze održavanja kod ALL pacijenata. Tokom faze održavanja ALL pacijentima se pored leka 6-MP-a, daje i lek MTX. Dokazano je da lek MTX može da smanji aktivnost TPMT enzima na barem 2 načina. Lek MTX utiče na smanjenje koncentracije SAM-a u ćeliji, kofaktora TPMT enzima koji stabilizuje sam enzim i tako povećava njegovu aktivnost (Milek et al. 2009; Milek et al. 2012; Karas-Kuželički et al. 2014). Osim toga, pokazano je da zbog visoke doze leka MTX-a koju neki pedijatrijski ALL pacijenti dobijaju u fazi terapije održavanja a predviđene su terapijskim protokolom, može da dođe do direktnog vezivanja samog leka MTX-a za TPMT enzim, što za posledicu ima smanjenje TPMT enzimske aktivnosti (Wennerstrand et al. 2013).

Treba naglasiti da hemoterapija koja se primenjuje u fazi održavanja, može na još jedan način da utiče na izmerenu aktivnost TPMT enzima. Naime, aktivnost TPMT enzima se rutinski meri u eritrocitima. Uzorci krvi su veoma lako dostupan biološki materijal i od pacijenata se

uzimaju u određenim vremenskim intervalima za rutinske kliničke analize. Međutim, aktivnost TPMT enzima u eritrocitima nije uvek dobar pokazatelj aktivnosti TPMT enzima i u drugim ćelijama. Tokom hemoterapije, životni vek eritrocita je smanjen. Pošto se aktivnost TPMT enzima smanjuje sa starošću eritrocita, to može da bude razlog da se izmeri povećana TPMT aktivnost tokom terapije održavanja. Pored toga, kod ALL pacijenata je pre početka terapije veoma često poremećen proces eritropoeze, zbog čega su eritrociti u proseku stariji, što može da bude delimično uzrok smanjenja izmerene aktivnosti TPMT enzima u ovim ćelijama kod novodijagnostikovanih ALL pacijenata (Lennard et al. 2001; Schmiegelow et al. 2014). Starost eritrocita, koja je u vezi sa različitim fazama bolesti pedijatrijskih ALL pacijenata, predstavlja ometajući faktor prilikom merenja aktivnosti TPMT enzima.

Naši rezultati su pokazali da terapija održavanja utiče na ekspresiju gena *TPMT* i želeli smo da ispitamo da li vreme koje je proteklo od početka terapije održavanja važno za ovaj proces. Uzorci krvi za analizu *TPMT* ekspresije su od pedijatrijskih ALL pacijenata pod terapijom održavanja su bili prikupljeni različito vreme od početka ove faze terapije – između 11 i 494 dana. Naši rezultati su pokazali trend ka smanjenju *TPMT* ekspresije kako faza održavanja odmiče. Ekspresija gena *TPMT* je ipak, kod svih analiziranih pacijenata i dalje bila visoka u odnosu na ekspresiju analiziranu pre uvođenja hemoterapije. Za razliku od *TPMT* ekspresije, pokazano je da aktivnost TPMT enzima malo varira tokom trajanja terapije održavanja (McLeod et al. 1995).

Pacijenti oboleli od inflamatornih i autoimunih bolesti se takođe leče tiopurinskim lekovima. Nekoliko studija je pokazalo da se kod pacijenata obolelih od inflamatornih i autoimunih bolesti aktivnost TPMT enzima povećava nakon uvođenja tiopurinske terapije (Gisbert et al. 2007; Thervet et al. 2001; Mircheva et al. 1995; Pettersson et al. 2002), dok druge studije nisu pronašle značajan uticaj tiopurinske terapije na aktivnost TPMT enzima (Arenas et al. 2004; Lindqvist et al. 2006; Chouchana et al. 2014). Za razliku od aktivnosti TPMT enzima, *TPMT* genska ekspresija opada kod pacijenata sa inflamatornom bolešću creva (eng. inflammatory bowel disease - IBD) nakon uvođenja tiopurinske terapije (Lindqvist et al. 2006; Hindorf et al. 2006). Ovi rezultati se donekle razlikuju od rezultata dobijenih analizom ekspresije kod ALL pacijenata i razlog se verovatno krije u činjenici da se terapijski protokoli

za ove bolesti razlikuju. Naime, IBD pacijenti uglavnom dobijaju manje doze tiopurinskih lekova u odnosu na ALL pacijente i umesto 6-MP-a, većina ovih pacijenata dobija AZA, retko u kombinaciji sa drugim imunosupresivnim lekovima. ALL pacijenti, za razliku od IBD pacijenata, uvek uporedo sa lekom 6-MP-om u toku trajanja terapije održavanja dobijaju i lek MTX.

U našoj *in vitro* studiji pokazali smo da kada eritroleukemijsku, K562 ćelijsku liniju tretiramo lekom 6-MP-om u trajanju od 72h aktivnost *TPMT* promotora se smanjuje (Kotur et al. 2012). Mogući razlog za to je što prilikom tretiranja K562 ćelija lekom 6-MP-om, dolazi do regrutovanja različitih transkripcionih faktora ili kompleksa transkripcionih faktora u odnosu na stanje bez terapije, što su nam pokazali eseji usporene elektroforetske pokretljivosti i South-western esej (Kotur et al. 2012). Ovaj rezultat izgleda u suprotnosti sa rezultatima analize *TPMT* ekspresije kod dece obolele od ALL gde je detektovano povećanje *TPMT* ekspresije u toku trajanja terapije održavanja. Tretman K562 ćelija 6-MP-om *in vitro* je trajao samo 72h, što nije dovoljno vremena da se indukuje visoka *TPMT* ekspresija. Još jedno objašnjenje bi se moglo naći osvrtnom na studiju gde se *TPMT* ekspresija pratila kod pacijenata obolelih od IBD-a koji su dobijali samo tiopurinske lekove (Hindorf et al. 2006). Kod ovih pacijenata je zabeležen pad *TPMT* ekspresije nakon početka tretmana tiopurinskim lekovima. Niži nivo *TPMT* ekspresije se zadržao do kraja praćenja odgovora na terapiju održavanja, koje je trajalo 20 nedelja. Zanimljivo je da aktivnost *TPMT* enzima nije opala sa smanjenjem transkripcije gena *TPMT* tokom celog perioda terapije (Hindorf et al. 2006).

Ovo je prva studija koja se bavi uticajem terapije održavanja na ekspresiju gena *TPMT* kod ALL pacijenata. Naši rezultati mogu da doprinesu unapređenju lečenja tiopurinskim lekovima, budući da je *TPMT* ključni enzim za njihovu detoksifikaciju. Ranije studije se jesu bavile uticajem terapije na aktivnost *TPMT* enzima u eritrocitima, ali izmerena aktivnost *TPMT* enzima nije uvek dobar marker globalne aktivnosti *TPMT* enzima. U toku trajanja terapije održavanja kod pedijatrijskih ALL pacijenata potvrđeno je da se aktivnost *TPMT* enzima povećava i to povećanje je barem delom posledica povećanja *TPMT* transkripcije u toku trajanja terapije u odnosu na period pre terapije. Izgleda da kombinovana terapija lekovima 6-MP-om i MTX-om podstiče *TPMT* transkripciju u toku trajanja terapije

održavanja. Nasuprot tome, *in vitro* i *in vivo* rezultati ukazuju da monoterapija tiopurinskim lekovima utiče na smanjenje transkripcije gena *TPMT*.

### **5.2.2. Polne i uzrasne razlike ALL pacijenata u relaciji sa *TPMT* ekspresijom pre hemoterapije i u toku terapije održavanja**

Razlike u polu i uzrastu dece obolele od ALL mogle bi biti važne za određivanje doze tiopurinskih lekova koji se koriste u fazi terapije održavanja. Naši rezultati sugerišu da mlađi pacijenti imaju višu *TPMT* ekspresiju pre uvođenja hemoterapije u odnosu na nivo ekspresije *TPMT* gena u toku terapije održavanja, ali ova razlika nije dostigla statističku značajnost, verovatno zbog relativno malog broja ispitanika. Nekoliko studija je pokazalo da je u eritrocitima odojčadi detektovana veća aktivnost *TPMT* enzima nego kod starije dece ili odraslih (Chouchana et al. 2014; Serpe et al. 2009; McLeod et al. 1995; Ferroni et al. 1996) i da deca generalno imaju višu *TPMT* aktivnost u eritrocitima nego odrasli (Serpe et al. 2009; Pettersson et al. 2002). Međutim, druge studije nisu potvrdile da postoje razlike u aktivnosti *TPMT* enzima kod pacijenata različite životne dobi (Gisbert et al. 2007; Cooper et al. 2008; Loit et al. 2011). Interesantno je što su naši rezultati pokazali da u toku terapije održavanja postoji pozitivna korelacija između uzrasta pedijatrijskih ALL pacijenata i nivoa *TPMT* ekspresije. Ovaj rezultat je potrebno potvrditi na većoj grupi pacijenata i ispitati povezanost sa aktivnošću *TPMT* enzima.

Naši rezultati govore u prilog činjenici da praktično nema razlike u nivoima *TPMT* ekspresije između polova kod dece obolele od ALL ni pre početka hemoterapije niti tokom terapije održavanja. Nekoliko studija je pokazalo da je blago povišena aktivnost *TPMT* enzima dovedena u vezu sa muškim polom (Chouchana et al. 2014; Gisbert et al. 2007; Pettersson et al. 2002; Szumlanski et al. 1992), druge studije ovakvu vezu nisu pokazale (Ferroni et al. 1996; Weinshilboum & Sladek 1980; Loit et al. 2011). Izgleda da su mlađa životna dob i muški pol povezani sa nešto povišenom aktivnošću *TPMT* enzima u eritrocitima pacijenata pod terapijom tiopurinskim lekovima, ali je klinički značaj ovog zapažanja diskutabilan (Chouchana et al. 2014).

### 5.2.3. Varijacije u genu *TPMT* i ekspresija gena *TPMT*

U genu *TPMT* detektovano je 12 varijacija kod pedijatrijskih ALL pacijenata, od čega su 2 varijacije bile u broju tandemskih ponovaka, obe locirane u promotoru ovog gena. Ostalih 10 genetičkih varijacija predstavljaju varijacije nukleotidnog mesta.

Najviše proučavana genetička varijacija van kodirajućeg regiona je promenljivi broj tandemskih ponovaka, VNTR region, u promotoru gena *TPMT*. Dva najučestalija alela u našoj populaciji su bila \*4a (53.5%) i \*5a (32.5%), što je u saglasnosti sa prethodnom studijom prikazanoj za srpsku populaciju (Zukic et al. 2010), kao i sa rezultatima više studija objavljenih za ostale bele populacije (Yan et al. 2000; Marinaki et al. 2003; Alves et al. 2001; Kotur et al. 2012). Nasuprot tome, u kineskoj populaciji je jedan od najčešćih VNTR alela je \*3 (Cao et al. 2013), koga u evropskim populacijama praktično ni nema. U našoj grupi ALL pacijenata, tri najčešća VNTR genotipa su bili \*4a/\*4a, \*4a/\*5a i \*5a/\*5a koje je nosilo preko 75% pacijenata. Ostali VNTR genotipovi su bili znatno manje zastupljeni.

Rezultati ove studije su pokazali da je pre hemoterapije prosečna *TPMT* ekspresija visoka kod nosilaca \*4a/4a genotipa i \*6a alela, dok je niska kod nosilaca \*5a/\*5a genotipa i \*7a alela. Statistički značajna razlika između ovih grupa pacijenata nije dobijena, verovatno zbog velike razlike u ekspresiji između nosilaca istog genotipa i zbog relativno malog broja pacijenata. Druge studije nisu proučavale ekspresiju gena *TPMT*, nego je merena aktivnost *TPMT* enzima u eritrocitima, i onda korelisana sa brojem i tipom VNTR ponovaka u promotoru gena *TPMT*. Budući da VNTR arhitektura može da utiče na aktivnost *TPMT* enzima preko ekspresije gena *TPMT*, merenje ekspresije gena *TPMT* zaista može da bude pristup za funkcionalnu karakterizaciju ovog regiona. Osim toga, mereći ekspresiju umesto aktivnost, izbegava se uticaj ometajućih faktora (eng. confounding factors), kao što je nivo SAM-a u samim ćelijama.

Nekoliko studija je pokazalo da VNTR arhitektura moduliše aktivnost *TPMT* enzima *in vivo* (Yan et al. 2000; Alves et al. 2001; Spire-Vayron de la Moureyre et al. 1998). Rezultati jesu

pokazali povezanost između niže aktivnosti TPMT enzima i VNTR alela koji imaju ukupno veći broj ponovaka. Pri tome je dobijeno da najvišu TPMT aktivnost imaju nosioci \*4a/\*5a (Yan et al. 2000), odnosno \*5a/\*5a genotipa (Alves et al. 2001). Takođe je pokazano da su pacijenti koji imaju više od ukupno 10 ponovaka u VNTR regionu promotora gena *TPMT* na oba hromozoma podložniji toksičnom dejstvu tiopurinskih lekova (Fabre et al. 2004). Međutim, u jednoj studiji koja je obuhvatala veći broj ispitanika, nije pronađen uticaj VNTR regiona na aktivnost TPMT enzima (Marinaki et al. 2003). Neke od navedenih studija nisu zadirale u arhitekturu VNTR regiona nego su razmatrale samo ukupan broj tandemskih ponovaka (Fabre et al. 2004; Spire-Vayron de la Moureyre et al. 1998), dok je kod jedne studije nije razmatrano da li je uzorak za analizu prikupljen pre ili nakon početka terapije (Yan et al. 2000).

Uticaj VNTR arhitekture na aktivnost TPMT enzima ili *TPMT* ekspresiju tokom terapije tiopurinskim lekovima je do sada slabo izučavana. Jedna studija je obuhvatila 58 IBID pacijenata koji su dobijali lek AZA (Arenas et al. 2004). Posle 3 meseca od početka terapije aktivnost TPMT enzima je ostala praktično nepromenjena, mada se kod pojedinih pacijenata dosta promenila aktivnost TPMT enzima u odnosu na nivo pre početka terapije. Što je važnije, zaključeno je da se poznavanjem VNTR regiona nije mogla predvideti promena TPMT aktivnosti nakon 3 meseca terapije (Arenas et al. 2004). Tokom faze održavanja rezultati naše analize su pokazali da su, u proseku, nosioci \*5a/\*5a genotipa pokazali najizraženije povećanje, \*4a/\*4a intermedijarno, a nosioci \*4a/\*5a genotipa i \*7a alela najmanje povećanje *TPMT* ekspresije u odnosu na nivo pre hemoterapije. Treba naglasiti da su pre terapije nosioci \*5a/\*5a genotipa su imali nisku, a u toku terapije najvišu *TPMT* ekspresiju. Ovo zapažanje sugerše da postoji interakcija između VNTR regiona i faktora povezanog sa terapijom održavanja koji utiče na *TPMT* ekspresiju.

Rezultati eseja usporene elektroforetske pokretljivosti i South-western esej naše prethodne *in vitro* studije idu u prilog zaključku da postoji interakcija između terapije održavanja i VNTR regiona gena *TPMT* (Kotur et al. 2012). Tretman K562 ćelija lekom 6-MP-om uslovljava da se za probe koje se sastoje od delova različitih VNTR alela, vezuju različiti transkripcioni faktori ili kompleksi transkripcionih faktora (Kotur et al. 2012). Preciznije,



proba koja se sastoji od BBC ponovaka vezuje dodatne komplekse nuklearnih proteina izolovanih iz ćelija tretiranih 6-MP-om, u odnosu na probu koja se sastoji od ABC kombinacije VNTR ponovaka. Interakciju između VNTR regiona i 6-MP tretmana smo uočili i u esejima sa reporterskim vektorom. Naime, K562 ćelije transfekovane konstruktima koji sadrže dva B ponovka su pokazale izraženiji odgovor na 6-MP tretman u odnosu na K562 ćelije transfekovane konstruktima koji sadrže samo jedan B ponovak. Takođe, pokazali smo da sa povećanjem broja A ponovaka dolazi do izraženijeg uticaja 6-MP tretmana na transkripciju gena *TPMT* (Kotur et al. 2012). Jedanaest izučavanih VNTR alela se može podeliti u 3 kategorije, u zavisnosti od nivoa smanjenja aktivnosti reporterskog gena pod uticajem tretmana 6-MP-om: manje od 33% (malo smanjenje), između 33 i 66% (intermedijarno smanjenje) i više od 66% (veliko smanjenje). Među alele koji su pokazali veliko smanjenje aktivnosti *TPMT* promotora pod uticajem 6-MP tretmana *in vitro*, spada i u našoj populaciji čest \*5a alel. Oko 10% pacijenata nosi ovaj alel u homozigotnom stanju, te oni mogu biti u opasnosti da iskuse veću toksičnost prilikom monoterapije tiopurinskim lekovima. Stoga se ovo odnosi pre svega na pacijente obolele od autoimunih bolesti koji su često na režimu monoterapije tiopurinskim lekovima, mada bi i u lečenju ALL kod dece moglo da ima značajnu ulogu.

Većina studija koja je proučavala VNTR region je došla do zaključka da je pre terapije aktivnost *TPMT* enzima negativno korelisana sa ukupnim brojem tandemskih ponovaka (Yan et al. 2000; Alves et al. 2001; Fabre et al. 2004; Spire-Vayron de la Moureyre et al. 1998; Spire-Vayron de la Moureyre et al. 1999). Takođe, nivo ekspresije gena *TPMT* je negativno korelisana sa brojem A ponovaka *in vitro* (Zukic et al. 2010). Naša sledeća *in vitro* studija je pokazala da se sa porastom broja A ponovaka, smanjuje nivo *TPMT* transkripcije kod ćelija tretiranih 6-MP-om (Kotur et al. 2012). Rezultati analize nivoa *TPMT* ekspresije kod pedijatrijskih ALL pacijenata su pokazali da nosioci \*7a alela, VNTR varijante koja sadrži 5 A ponovaka u svom sastavu, imaju najnižu prosečnu *TPMT* ekspresiju i pre hemoterapije i u toku terapije održavanja. Ovim se *in vitro* nalaz da povećanje broja A ponovaka smanjuje *TPMT* ekspresiju potvrđuje i kod ALL pacijenata.

Minisatelitski region trinukleotidnih ponovaka u promotoru gena *TPMT* se obično sastoji od 6 GCC ponovaka, ali su nađeni i aleli sa 5, odnosno 7 ponovaka. Ranije je pokazano *in vitro* da ređi aleli uslovljavaju povišenu aktivnost TPMT enzima, u odnosu na referentnu varijantu sa 6 ponovaka (Roberts et al. 2008). Pri tome su ređi aleli nađeni kod nekoliko pacijenata kod kojih je izmerena vrlo visoka TPMT aktivnost, te su autori sugerisali da upravo retke varijante GCC regiona uzrokuju vrlo visoku aktivnost TPMT enzima kod ovih pacijenata (Roberts et al. 2008). Među našim pacijentima sa visokom ekspresijom gena *TPMT* nije bilo nosilaca varijantnih alela GCC regiona. Samo kod jednog pacijenta je detektovan alel sa 7 ponovaka u heterozigotnom stanju, dok su ostali nosili isključivo referentni alel. Ovaj pacijent je imao nizak nivo *TPMT* ekspresije i pre i u toku terapije održavanja, što nije u saglasnosti sa zaključkom Roberts-a i saradnika da retke varijante u GCC regionu uslovljavaju visoku TPMT aktivnost.

Osim varijacija u broju tandemskih ponovaka, detektovano je 10 varijacija nukleotidnog mesta u egzonima i delovima introna koji okružuju kodirajući deo gena *TPMT*. Identifikovano je tri grupe varijacija čije su varijante grupisane u haplotipove, od čega je povezanost nekih varijanti od ranije već bila poznata (Jones et al. 2007; Tamm et al. 2008). Ispitan je i uticaj svih ovih varijacija i haplotipova na nivo *TPMT* ekspresije, ali nije dobijeno da bilo koji SNV ili haplotip može da predvidi nivo *TPMT* ekspresije bilo pre hemoterapije ili u toku terapije održavanja. U nekim slučajevima statistička analiza nije bila moguća zbog malog broja pacijenata koji su nosili varijantne alele.

Dobro je poznato da su nesinonimne varijante u genu *TPMT*, kao i varijante koje su LD-u sa ovim varijantama, povezane sa smanjenom aktivnošću TPMT enzima (Tamm et al. 2008; Jones et al. 2007). Pored toga, nađene su varijante u genu *TPMT* koje utiču na TPMT aktivnost, a nisu u LD-u sa nesinonimnim varijacijama (Jones et al. 2007). Ove varijacije mogu biti važne za regulaciju genske ekspresije i dodatne studije bi mogle to i da potvrde. Naša studija ekspresije, iako nedovoljne snage da potvrdi ili odbaci neki od proučavanih SNV kao funkcionalnog markera *TPMT* ekspresije, ipak je pokazala da određene varijacije, kao što je *TPMT* c.233+96 G>T u intronu 4, imaju potencijal da postanu farmakogenetički markeri.

### **5.3. Isti farmakogenomički markeri u različitim terapijskim protokolima: genetičke varijacije u genima *IL-6* i *TNF* kao mogućnost primene novih farmakogenomičkih markera u terapiji ALL**

U lečenju različitih bolesti se primenjuju specifični terapijski protokoli u kojima se mogu koristiti isti lekovi. Određeni farmakogenomički marker u različitim terapijskim protokolima ne mora da ima isti funkcionalni i klinički značaj. Iako je neki farmakogenomički marker priznat za dati terapijski protokol, uvek bi trebalo da se njegova upotreba validira prilikom rutinskog kliničkog korišćenja za neki drugi terapijski protokol. Dosada nije razmatran odgovor na terapiju široko korišćenih antibiotika baktrima i antimikotika nistatina u fazi održavanja kod dečje ALL. Stoga bi trebalo uzeti u obzir i njihovo dejstvo i potencijalne neželjene efekte na pacijente. U tom smislu bi bilo i korisno i poželjno da se razmotri mogućnost upotrebe genetičkih varijacija u genima *IL-6* i *TNF* kao markera za praćenje odgovora na terapiju ovim lekovima. Anti-citokinske terapije su već našle primenu u lečenju autoimunih i inflamatornih bolesti. Blokiranje signalnih puteva koji uključuju citokine generalno predstavlja potencijalnu terapijsku strategiju za lečenje malignih bolesti (Guo et al. 2012).

U ovom radu je analiziran potencijal za primenu genetičkih varijanti *IL-6* -174 G>C i *TNF* -308 G>A kao mogućih farmakogenomičkih markera prilikom upotrebe leka baktrima, odnosno nistatina, kao i anti-TNF agenasa u lečenju dečje ALL.

Varijantni alel *IL-6* -174C je bio detektovan u hetero- ili homozigotnom stanju kod 50% kontrolnih ispitanika, kod 13% u homozigotnom stanju. Sam lek baktrim, tačnije njegova komponenta sulfametoksazol, ima antiinflamatorni dejstvo i utiče na smanjenje nivoa slobodnih receptora za *IL-6* (Ohtake et al. 2001). Za varijantni *IL-6* -174 G>C alel je pokazano da uslovljava smanjenu ekspresiju gena *IL-6* (Fishman et al. 1998). Sam *IL-6* je proinflamatorni citokin koji ima značajnu ulogu u pokretanju imunskog odgovora, inflamaciji i kancerogenezi (Naugler & Karin 2008). Prisustvo genetičkih varijacija u ovom

genu može uticati na razvoj malignih i inflamatornih bolesti, kao i na odgovor na terapiju antiinflamatornim lekovima (Di Renzo et al. 2012; Liu et al. 2015). Obzirom da je učestalost varijantnog *IL-6* -174 G>C alela u našoj populaciji relativno velika, bilo bi dobro da se uticaj ove genetičke varijante ispita klinički u svetlu farmakogenomičkog markera kod dece obolele od ALL koja između ostalih dobijaju i lek baktrim. Pokazano je lekovi baktrim i metotreksat interaguju međusobno (Al-Quteimat & Al-Badaine 2013). Naime, u kombinaciji ova dva leka, može doći do izraženije toksičnosti, ozbiljne pancitopenije, izazvane MTX-om.

Varijantni alel *TNF* -308A je u kontrolnoj grupi ispitanika u našoj studiji detektovan u homou ili heterozigotnom obliku sa oko 20% učestalosti. Prisustvo ovog alela utiče na nivo ekspresije TNF citokina (Louis et al. 1998). Ova varijacija predstavlja potencijalni biološki marker kako za odgovor na terapiju anti-TNF terapeutima (Padyukov et al. 2003), tako i za predikciju razvoja različitih autoimunih i inflamatornih bolesti (Han et al. 2010). Lek nistatin indukuje sintezu citokina TNF preko aktivacije TLR1 i TLR2 receptora (Razonable et al. 2005). Nađeno je da anti-TNF terapija inhibira aktivaciju proto-onkogeno, p-Akt u ćelijama ALL (Gu et al. 2006). Anti-TNF terapija bi mogla da nađe primenu i u lečenju ALL. Osim toga, pacijenti oboleli od akutne leukemije kod kojih je izmerena visoka ekspresija TNF u leukemijskim ćelijama, slabije su odgovarali na hemoterapiju (Kobayashi et al. 1997). Stratifikacija pacijenata obolelih od dečje akutne limfoblastne leukemije u skladu sa endogenom produkcijom citokina i prisustvom urođenih genetičkih varijacija u genima *IL-6* i *TNF*, mogla bi da identifikuje pacijente koji bi imali korist od primene anti-citokinske terapije. Treba ispitati prednosti i neželjene efekte uvođenja anti-TNF terapije u lečenju ALL kod dece kod koje se teško postiže dobar odgovor na standardnu terapiju.

Zanimljivo je da genetička varijanta *IL-6* -174C za koju je pokazano da uslovljava smanjenu ekspresiju gena *IL-6* (Fishman et al. 1998) može da se dovede u vezu sa lošijom efikasnošću terapije koja uključuje i anti-TNF komponentu (Jančić et al. 2015). Uticaj varijacija u genu *IL-6* na anti-TNF terapiju može se objasniti međuzavisnošću ova dva citokina. Preciznije, signalni put pokrenut vezivanjem TNF liganda aktivira transkripciju gena *IL-6* posredstvom NF- $\kappa$ B faktora (Vanden Berghe et al. 2000). Varijanta *TNF* -308A, koja uslovljava višu aktivnost samog TNF (Louis et al. 1998), nije povezana sa razlikama u odgovoru na anti-

TNF terapiju (Jančić et al. 2015). Međutim, kod nosilaca kombinovanog genotipa *IL-6* - 174GG i *TNF* -308GG anti-TNF terapija se pokazala najefikasnijom kod RA pacijenata (Jančić et al. 2015). Nosilaca ovog kombinovanog genotipa u srpskoj populaciji ima oko 40%. Na osnovu farmakogenomičke analize varijacija u genima *TNF* i *IL-6* kod RA pacijenata, moglo bi se razmotri uvođenje anti-TNF terapije kod pedijatrijskih ALL pacijenata, nosilaca *IL-6* -174GG i *TNF* -308GG kombinacije genotipova, kod kojih se bolest teško klinički kontroliše.

# 6. Zaključci

1. U genu *TPMT* detektovane su dve najčešće i farmakogenetički najznačajnije varijacije u kodirajućem regionu, c.460 G>A i c.719 A>G. Učestalost ovih varijanti je slična kao kod drugih evropskih populacija.
  - a. Varijanta c.460A je imala učestalost od 2.9% u grupi ALL pacijenata
  - b. Varijanta c.719G je imala učestalost od 3.2% u grupi ALL pacijenata
  - c. Potvrđeno je da se ove dve varijante, c.460A i c.719G, nasleđuju zajedno češće nego što je očekivano, nalaze se u LD-u ( $r^2=0.91$ )
2. U genu *ITPA* detektovana je varijacija c.94 C>A. Varijanta c.94A je imala učestalost od 3.7% u grupi ALL pacijenata i 3.9% u kontrolnoj grupi. Učestalost ove varijante je nešto manja nego kod drugih evropskih populacija.
3. U genu *ABCC4* detektovana je varijacija rs9516519. Varijanta rs9516519, nukleotid G, je imala učestalost od 22.1% u grupi ALL pacijenata i 19.6% u kontrolnoj grupi. Učestalost ove varijante je nešto veća nego kod drugih evropskih populacija.
4. U genu *ABCBI* detektovana je varijacija c.2677 G>T. Varijanta c.2677T je imala učestalost od 38.2% u grupi ALL pacijenata i 34.3% u kontrolnoj grupi. Učestalost ove varijante je slična kao kod drugih evropskih populacija.
5. U genu *TYMS* detektovan je minisatelitski region od 28bp u 5'UTR-u i indel od 6bp u 3'UTR regionu gena *TYMS*. Učestalost ovih varijanti je slična kao kod drugih evropskih populacija.
  - a. Varijanta 2R u 5'UTR-u je imala učestalost od 45.8% u grupi ALL pacijenata i 42.8% u kontrolnoj grupi. Varijanta 4R u 5'UTR-u je imala učestalost od 0.3% u grupi ALL pacijenata i 0.5% u kontrolnoj grupi.
  - b. Varijanta 6bp- u 3'UTR-u je imala učestalost od 33.0% u grupi ALL pacijenata i 33.2% u kontrolnoj grupi.
  - c. Utvrđeno je da se varijante *TYMS* 2R i 6bp+, kao i *TYMS* 3R i 6bp- nasleđuju zajedno češće nego što je očekivano, nalaze u LD-u ( $r^2=0.14$ ).
6. U genu *MTHFR* detektovane su varijante c.677 C>T i c.1298 A>C. Učestalost ovih varijanti je slična kao kod drugih evropskih populacija.
  - a. Varijanta c.677T je imala učestalost od 31.1% u grupi ALL pacijenata i 32.2% u kontrolnoj grupi.

- b. Varijanta c.1298C je imala učestalost od 31.1% u grupi ALL pacijenata i 32.2% u kontrolnoj grupi.
  - c. Varijante c.677T i c.1298A i c.677C i c.1298C se nasleđuju češće nego što je očekivano.
7. U genu *DHFR* detektovano je 5 genetičkih varijacija, -680 C>A, -675 A>G, -556 T>C, -464 A>T, -317 A>G. Učestalost ovih varijanti je slična kao kod drugih evropskih populacija
- a. Varijanta -680A je imala učestalost od 34.2% u grupi ALL pacijenata i 34.6% u kontrolnoj grupi.
  - b. Varijanta -675G je imala učestalost od 28.5% u grupi ALL pacijenata i 26.0% u kontrolnoj grupi.
  - c. Varijanta -556C je imala učestalost od 28.2% u grupi ALL pacijenata i 26.4% u kontrolnoj grupi.
  - d. Varijanta -464T je imala učestalost od 28.2% u grupi ALL pacijenata i 26.4% u kontrolnoj grupi
  - e. Varijanta -317 je imala učestalost od 40.3% u grupi ALL pacijenata i 40.4% u kontrolnoj grupi.
  - f. Najjača vezanost je bila između SNV -680 C>A i -317 A>G ( $r^2=0.69$ ) sa jedne strane i SNV -675 A>G, -556 T>C i -464 A>T (vrednosti za  $r^2$  su bile između 0.94 i 0.96), sa druge.
8. U genu *SLC19A1* detektovana je varijacija c.80 G>A. Varijanta c.80A je imala učestalost od 50.0% u grupi ALL pacijenata i 47.6% u kontrolnoj grupi. Učestalost ove varijante je slična kao kod drugih evropskih populacija.
9. U genu *IL-6*, detektovana je genetička varijacija -174 G>C. Varijanta c.80A je imala učestalost od 31.3% u kontrolnoj grupi. Učestalost ove varijante je slična kao kod drugih evropskih populacija.
10. U genu *TNF*, detektovana je genetička varijacija -308 G>A. Varijanta -308A je imala učestalost od 11.0% u kontrolnoj grupi. Učestalost ove varijante je slična kao kod drugih evropskih populacija.



11. Učestalosti alela u genima *TPMT*, *ABCBI*, *TYMS*, *MTHFR*, *SLC19A1*, *DHFR*, *IL-6* i *TNF* je slična kao kod drugih evropskih populacija. Alel c.94A u genu *ITPA* ima manju učestalost, dok alel rs9516519, nukleotid G, u genu *ABCC4* ima veću učestalost u srpskoj populaciji u odnosu na druge evropske populacije. Na osnovu učestalosti alela, možemo zaključiti da za srpsku populaciju SNV *ABCC4* rs9516519 ima veći, dok *ITPA* c.94 C>A ima manji farmakogenomički potencijal.
12. Dobijene su slične učestalosti genotipova u grupi zdravih ljudi i ALL pacijenata u genima *ITPA*, *ABCBI*, *ABCC4*, *TYMS*, *MTHFR*, *SLC19A1* i *DHFR* koji kodiraju enzime i transportere metaboličkih puteva lekova 6-MP-a i MTX-a. Ovaj rezultat ne ide u prilog tezi da izučavane varijacije učestvuju u etiologiji dečje ALL.
13. Terapija anti-TNF agensom etanerceptom se pokazala najefikasnijom kod RA pacijenata, nosilaca *IL-6* -174GG i *TNF* -308GG anti-TNF kombinovanog genotipa. Nosilaca ovog kombinovanog genotipa u srpskoj populaciji ima oko 40%, te bi pre svega kod ove grupe trebalo razmotriti upotrebu anti-TNF agensa, kako za lečenje RA, tako i potencijalno ALL, kod pacijenata kod kojih se bolest teško klinički kontroliše.
14. Tretman K562 ćelija 10 $\mu$ M lekom 6-MP-om u trajanju od 72h smanjuje *TPMT* transkripciju. Smanjenje transkripcije je zavisno od VNTR arhitekture, te je VNTR alele moguće podeliti u tri grupe. VNTR aleli mogu biti povezani sa malim smanjenjem (*AB<sub>4</sub>C*), intermedijarnim smanjenjem (*A<sub>2</sub>B<sub>3</sub>C*, *A<sub>4</sub>BC*, *AB<sub>2</sub>C*, *A<sub>5</sub>BC*, *A<sub>2</sub>BC* i *A<sub>3</sub>BC*) i velikim smanjenjem (*A<sub>6</sub>BC*, *AB<sub>5</sub>C*, *A<sub>3</sub>B<sub>2</sub>C* i *A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C*) transkripcije gena *TPMT*.
15. Sa povećanjem broja A ponovaka *TPMT* transkripcija se izraženije smanjuje kod K562 ćelija tretiranim lekom 6-MP-om. Pored toga, tretman K562 ćelija 10 $\mu$ M lekom 6-MP-om u trajanju od 72h je povezan sa izraženijim smanjenjem *TPMT* transkripcije kod VNTR alela koji imaju dva B ponovaka, u odnosu na VNTR alele sa jednim B ponovkom.
16. Prosečna *TPMT* ekspresija kod dečjih ALL pacijenata je oko 3.3 puta veća u toku terapije održavanja, kada pacijenti dobijaju lekove 6-MP i MTX, nego pre početka

- hemoterapije. Kod svakog pacijenta je zabeleženo povećanje *TPMT* ekspresije u toku terapije održavanja, u odnosu na nivo *TPMT* ekspresije pre početka hemoterapije
17. Detektovano je 12 poznatih varijacija u promotoru, kodirajućem regionu i sekvencama koje okružuju kodirajući region gena *TPMT*. Dve varijacije su po tipu varijacije u broju tandemskih ponovaka, dok je 10 po tipu SNV. Osam varijacija je svrstano u 3 grupe haplotipova. Nijedna od varijanti ili haplotipova nije statistički značajno uticala na ekspresiju gena *TPMT*, osim VNTR-a u promotoru gena *TPMT*.
  18. Efekat koju terapija održavanja ima na ekspresiju gena *TPMT* moduliran je arhitekturom VNTR regiona u promotoru gena *TPMT*. Povećanje nivoa *TPMT* ekspresije u toku terapije održavanja je bilo najizraženije za nosioce VNTR\*5a/\*5a genotipa, dok je najmanje povećanje *TPMT* ekspresije zabeleženo kod nosilaca VNTR\*7a genotipa.
  19. Broj ponovaka tipa A u okviru VNTR regiona u promotoru gena *TPMT* je negativno korelisan sa nivoom ekspresije gena *TPMT* u toku terapije održavanja.
  20. Povećanje nivoa *TPMT* ekspresije u toku terapije održavanja zavisi od dužine trajanja terapije. Postoji tendencija da se tokom terapije održavanja *TPMT* ekspresija vremenom smanjuje, ali ipak ostaje viša u odnosu na nivo pre početka hemoterapije.
  21. Postoji tendencija da starija deca obolela od ALL imaju veći nivo *TPMT* ekspresije u toku terapije održavanja. Pre uvođenja hemoterapije, uzrast dece ne utiče statistički značajno na nivo *TPMT* ekspresije.
  22. Pol pedijatrijskih ALL pacijenata ne utiče na nivo ekspresije gena *TPMT* ni pre početka hemoterapije ni u toku terapije održavanja.

# 7. Literatura

- Allegra, C.J. et al., 1985. Enhanced inhibition of thymidylate synthase by methotrexate polyglutamates. *The Journal of biological chemistry*, 260(17), pp.9720–6.
- Al-Quteimat, O.M. & Al-Badaineh, M.A., 2013. Methotrexate and trimethoprim-sulphamethoxazole: extremely serious and life-threatening combination. *Journal of clinical pharmacy and therapeutics*, 38(3), pp.203–5.
- Alves, S. et al., 2001. Pharmacogenetics and genomics: Influence of the variable number of tandem repeats located in the promoter region of the thiopurine methyltransferase gene on enzymatic activity. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 70(2), pp.165–174.
- Aplenc, R. et al., 2005. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and therapy response in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Cancer research*, 65(6), pp.2482–7.
- Arenas, M. et al., 2004. Genetic determinants of the pre- and post-azathioprine therapy thiopurine methyltransferase activity phenotype. *Nucleosides, nucleotides & nucleic acids*, 23(8-9), pp.1403–5.
- Arenas, M. et al., 2007. The ITPA c.94C>A and g.IVS2+21A>C sequence variants contribute to missplicing of the ITPA gene. *Biochimica et biophysica acta*, 1772(1), pp.96–102.
- Askari, B.S. & Krajinovic, M., 2010. Dihydrofolate reductase gene variations in susceptibility to disease and treatment outcomes. *Current genomics*, 11(8), pp.578–83.
- Assaraf, Y.G., 2007. Molecular basis of antifolate resistance. *Cancer metastasis reviews*, 26(1), pp.153–81.
- Assaraf, Y.G., 2006. The role of multidrug resistance efflux transporters in antifolate resistance and folate homeostasis. *Drug Resistance Updates*, 9(4-5), pp.227–246.
- Azimi, F. et al., 2014. Assessment of Thiopurine-based drugs according to Thiopurine S-methyltransferase genotype in patients with Acute Lymphoblastic Leukemia. *Iranian journal of pediatric hematology and oncology*, 4(1), pp.32–8.
- Ban, H. et al., 2010. The multidrug-resistance protein 4 polymorphism is a new factor accounting for thiopurine sensitivity in Japanese patients with inflammatory bowel disease. *Journal of gastroenterology*, 45(10), pp.1014–21.
- Bank, S. et al., 2015. Effectiveness of anti-tumour necrosis factor- $\alpha$  therapy in Danish patients with inflammatory bowel diseases. *Danish medical journal*, 61(3).

- Baxter, G.T. et al., 1999. Tumor necrosis factor-alpha mediates both apoptotic cell death and cell proliferation in a human hematopoietic cell line dependent on mitotic activity and receptor subtype expression. *The Journal of biological chemistry*, 274(14), pp.9539–47.
- Beillard, E. et al., 2003. Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using “real-time” quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) - a Europe against cancer program. *Leukemia*, 17(12), pp.2474–86.
- Belinsky, M.G. et al., 2007. Multidrug resistance protein 4 protects bone marrow, thymus, spleen, and intestine from nucleotide analogue-induced damage. *Cancer research*, 67(1), pp.262–8.
- Vanden Berghe, W. et al., 2000. Signal transduction by tumor necrosis factor and gene regulation of the inflammatory cytokine interleukin-6. *Biochemical pharmacology*, 60(8), pp.1185–95.
- Bo, J. et al., 1999. Possible carcinogenic effect of 6-mercaptopurine on bone marrow stem cells: relation to thiopurine metabolism. *Cancer*, 86(6), pp.1080–6.
- Bökkerink, J.P. et al., 1993. 6-Mercaptopurine: cytotoxicity and biochemical pharmacology in human malignant T-lymphoblasts. *Biochemical pharmacology*, 45(7), pp.1455–63.
- Boshart, M. et al., 1992. Reporter constructs with low background activity utilizing the cat gene. *Gene*, 110(1), pp.129–30.
- Böttiger, A.K. et al., 2007. Association of total plasma homocysteine with methylenetetrahydrofolate reductase genotypes 677C>T, 1298A>C, and 1793G>A and the corresponding haplotypes in Swedish children and adolescents. *International journal of molecular medicine*, 19(4), pp.659–65.
- Brambila-Tapia, A.J.L., 2013. Functional Effects and Clinical Implications. , 65, pp.445–454.
- Cao, L. et al., 2013. [The effect of the adverse events with thiopurine S-methyltransferase gene mutation on outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia]. *Zhonghua xue ye xue za zhi = Zhonghua xueyexue zazhi*, 34(3), pp.247–52.
- Chango, A. et al., 2000. A polymorphism (80G->A) in the reduced folate carrier gene and its associations with folate status and homocysteinemia. *Molecular genetics and metabolism*, 70(4), pp.310–5.

- Chen, M.J. et al., 1982. Intronless human dihydrofolate reductase genes are derived from processed RNA molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79(23), pp.7435–9.
- Chen, X. et al., 2009. [Studies on the mutation and polymorphism of the TPMT gene in Chinese children with acute leukemia]. *Zhonghua yi xue yi chuan xue za zhi = Zhonghua yixue yichuanxue zazhi = Chinese journal of medical genetics*, 26(4), pp.457–60.
- Chouchana, L. et al., 2014. Interindividual variability in TPMT enzyme activity: 10 years of experience with thiopurine pharmacogenetics and therapeutic drug monitoring. *Pharmacogenomics*, 15(6), pp.745–57.
- Chrzanowska, M. et al., 2012. Thiopurine S-methyltransferase phenotype-genotype correlation in children with acute lymphoblastic leukemia. *Acta poloniae pharmaceutica*, 69(3), pp.405–10.
- Collie-Duguid, E.S. et al., 1999. The frequency and distribution of thiopurine methyltransferase alleles in Caucasian and Asian populations. *Pharmacogenetics*, 9(1), pp.37–42.
- Cooper, S.C. et al., 2008. Ethnic variation of thiopurine S-methyltransferase activity: a large, prospective population study. *Pharmacogenomics*, 9(3), pp.303–9.
- Coulthard, S. & Hogarth, L., 2005. The thiopurines: an update. *Investigational new drugs*, 23(6), pp.523–32.
- Coulthard, S.A. & Hall, A.G., 2001. Recent advances in the pharmacogenomics of thiopurine methyltransferase. *The pharmacogenomics journal*, 1(4), pp.254–61.
- Curković, B., 2008. [Treatment strategy for rheumatoid arthritis in Croatia]. *Reumatizam*, 55(2), pp.39–44.
- Dervieux, T. et al., 2001. Differing contribution of thiopurine methyltransferase to mercaptopurine versus thioguanine effects in human leukemic cells. *Cancer research*, 61(15), pp.5810–6.
- Dokmanovic, L. et al., 2006. Analysis of thiopurine S-methyltransferase polymorphism in the population of Serbia and Montenegro and mercaptopurine therapy tolerance in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Therapeutic drug monitoring*, 28(6), pp.800–6.
- Dotor, E. et al., 2006. Tumor thymidylate synthase 1494del6 genotype as a prognostic factor in colorectal cancer patients receiving fluorouracil-based adjuvant treatment.

- Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 24(10), pp.1603–11.
- Drozdik, M. et al., 2006. The effect of 3435C>T MDR1 gene polymorphism on rheumatoid arthritis treatment with disease-modifying antirheumatic drugs. *European journal of clinical pharmacology*, 62(11), pp.933–7.
- Dulucq, S. et al., 2008. DNA variants in the dihydrofolate reductase gene and outcome in childhood ALL. *Blood*, 111(7), pp.3692–700.
- Eden, T., 2010. Aetiology of childhood leukaemia. *Cancer treatment reviews*, 36(4), pp.286–97.
- Erb, N., Harms, D.O. & Janka-Schaub, G., 1998. Pharmacokinetics and metabolism of thiopurines in children with acute lymphoblastic leukemia receiving 6-thioguanine versus 6-mercaptopurine. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 42(4), pp.266–72.
- Fabre, M. a et al., 2004. The impact of thiopurine S-methyltransferase polymorphisms on azathioprine dose 1 year after renal transplantation. *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation*, 17(9), pp.531–9.
- Farber, S. & Diamond, L., 1948. Temporary remissions in acute leukemia in children produced by folic acid antagonist, 4-aminopteroyl-glutamic acid (aminopterin). ... *Journal of Medicine*.
- Ferroni, M. a. et al., 1996. Variability in the rate of 6-mercaptopurine methylation in the erythrocytes, liver and kidney in an Italian population. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 51(1), pp.23–29.
- Fessing, M.Y. et al., 1998. Functional characterization of the human thiopurine S-methyltransferase (TPMT) gene promoter. *European journal of biochemistry / FEBS*, 256(3), pp.510–7.
- Fishman, D. et al., 1998. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *The Journal of clinical investigation*, 102(7), pp.1369–76.
- Fotoohi, A.K., Coulthard, S.A. & Albertioni, F., 2010. Thiopurines: factors influencing toxicity and response. *Biochemical pharmacology*, 79(9), pp.1211–20.
- Frosst, P. et al., 1995. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nature genetics*, 10(1), pp.111–3.

- Galbiatti, A.L.S. et al., 2011. A80G polymorphism of reduced folate carrier 1 (RFC1) gene and head and neck squamous cell carcinoma etiology in Brazilian population. *Molecular biology reports*, 38(2), pp.1071–8.
- Ganguly, P. & Alam, S.F., 2015. Role of homocysteine in the development of cardiovascular disease. *Nutrition journal*, 14(1), p.6.
- Gellekink, H. et al., 2007. Molecular genetic analysis of the human dihydrofolate reductase gene: relation with plasma total homocysteine, serum and red blood cell folate levels. *European journal of human genetics : EJHG*, 15(1), pp.103–9.
- Gemmati, D. et al., 2009. DHFR 19-bp insertion/deletion polymorphism and MTHFR C677T in adult acute lymphoblastic leukaemia: is the risk reduction due to intracellular folate unbalancing? *American journal of hematology*, 84(8), pp.526–9.
- Gisbert, J.P. et al., 2007. Thiopurine methyltransferase activity in Spain: a study of 14,545 patients. *Digestive diseases and sciences*, 52(5), pp.1262–9.
- Giverhaug, T., Loennechen, T. & Aarbakke, J., 1999. The interaction of 6-mercaptopurine (6-MP) and methotrexate (MTX). *General pharmacology*, 33(4), pp.341–6.
- Gómez-Gómez, Y. et al., 2012. Survival and risk of relapse of acute lymphoblastic leukemia in a Mexican population is affected by dihydrofolate reductase gene polymorphisms. *Experimental and therapeutic medicine*, 3(4), pp.665–672.
- Gregers, J. et al., 2015. Polymorphisms in the ABCB1 gene and effect on outcome and toxicity in childhood acute lymphoblastic leukemia. *The pharmacogenomics journal*, (October 2014), pp.1–8.
- Grivennikov, S.I. & Karin, M., 2011. Inflammatory cytokines in cancer: tumour necrosis factor and interleukin 6 take the stage. *Annals of the rheumatic diseases*, 70 Suppl 1(Suppl\_1), pp.i104–8.
- Gu, L. et al., 2006. Endogenous TNFalpha mediates cell survival and chemotherapy resistance by activating the PI3K/Akt pathway in acute lymphoblastic leukemia cells. *Leukemia*, 20(5), pp.900–4.
- Guo, Y. et al., 2012. Interleukin-6 signaling pathway in targeted therapy for cancer. *Cancer treatment reviews*, 38(7), pp.904–10.
- Han, Z. et al., 2010. Meta-analysis: polymorphisms in TNF-alpha gene promoter and Crohn's disease. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 32(2), pp.159–70.



- He, H.-R. et al., 2014. Association between reduced folate carrier G80A polymorphism and methotrexate toxicity in childhood acute lymphoblastic leukemia: a meta-analysis. *Leukemia & lymphoma*, 55(12), pp.2793–800.
- Herrlinger, K.R. et al., 2005. The pharmacogenetics of methotrexate in inflammatory bowel disease. *Pharmacogenetics and genomics*, 15(10), pp.705–11.
- Hindorf, U. et al., 2006. Pharmacogenetics during standardised initiation of thiopurine treatment in inflammatory bowel disease. *Gut*, 55(10), pp.1423–31.
- Hoffmeyer, S. et al., 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), pp.3473–8.
- Hogarth, L.A. et al., 2008. The effect of thiopurine drugs on DNA methylation in relation to TPMT expression. *Biochemical Pharmacology*, 76(8), pp.1024–1035.
- Hon, Y.Y. et al., 1999. Polymorphism of the thiopurine S-methyltransferase gene in African-Americans. *Human molecular genetics*, 8(2), pp.371–6.
- Hou, Z. & Matherly, L.H., 2014. Biology of the major facilitative folate transporters SLC19A1 and SLC46A1. *Current topics in membranes*, 73, pp.175–204.
- 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), pp.85–105.
- Imaoka, T. et al., 2007. Functional involvement of multidrug resistance-associated protein 4 (MRP4/ABCC4) in the renal elimination of the antiviral drugs adefovir and tenofovir. *Molecular pharmacology*, 71(2), pp.619–27.
- Jamroziak, K. et al., 2004. Functional C3435T polymorphism of MDR1 gene: an impact on genetic susceptibility and clinical outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. *European journal of haematology*, 72(5), pp.314–21.
- Jančić, I. et al., 2015. Influence of Promoter Polymorphisms of the TNF- $\alpha$  (-308G/A) And IL-6 (-174G/C) Genes On Therapeutic Response To Etanercept In Rheumatoid Arthritis. *Journal of Medical Biochemistry*, pp.1–8.
- Jones, T.S. et al., 2007. Using HapMap tools in pharmacogenomic discovery: the thiopurine methyltransferase polymorphism. *Clinical pharmacology and therapeutics*, 81(5), pp.729–734.

- De Jonge, R. et al., 2009. Polymorphisms in folate-related genes and risk of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 113(10), pp.2284–9.
- Kaatsch, P., 2010. Epidemiology of childhood cancer. *Cancer treatment reviews*, 36(4), pp.277–85.
- Karas-Kuzelicki, N. et al., 2009. Heterozygosity at the TPMT gene locus, augmented by mutated MTHFR gene, predisposes to 6-MP related toxicities in childhood ALL patients. *Leukemia*, 23(5), pp.971–4.
- Karas-Kuželicki, N. et al., 2014. From pharmacogenetics to pharmacometabolomics: SAM modulates TPMT activity. *Pharmacogenomics*, 15(11), pp.1437–49.
- Kawakami, K. et al., 2001. Different lengths of a polymorphic repeat sequence in the thymidylate synthase gene affect translational efficiency but not its gene expression. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 7(12), pp.4096–101.
- Kearsley-Fleet, L. et al., 2014. The EULAR Study Group for Registers and Observational Drug Studies: comparability of the patient case mix in the European biologic disease modifying anti-rheumatic drug registers. *Rheumatology (Oxford, England)*.
- Keppler, D., 2011. Multidrug resistance proteins (MRPs, ABCs): importance for pathophysiology and drug therapy. *Handbook of experimental pharmacology*, (201), pp.299–323.
- Kobayashi, D. et al., 1997. Endogenous tumor necrosis factor as a predictor of doxorubicin sensitivity in leukemic patients. *Blood*, 89(7), pp.2472–9.
- Koenders, M.I. & van den Berg, W.B., 2015. Novel therapeutic targets in rheumatoid arthritis. *Trends in pharmacological sciences*, 36(4), pp.189–195.
- Koppen, I.J.N., Hermans, F.J.R. & Kaspers, G.J.L., 2010. Folate related gene polymorphisms and susceptibility to develop childhood acute lymphoblastic leukaemia. *British Journal of Haematology*, 148, pp.3–14.
- Kotur, N. et al., 2012. 6-mercaptopurine influences TPMT gene transcription in a TPMT gene promoter variable number of tandem repeats-dependent manner. *Pharmacogenomics*, 13(3), pp.283–95.
- Krajinovic, M. et al., 2005. Combining several polymorphisms of thymidylate synthase gene for pharmacogenetic analysis. *The pharmacogenomics journal*, 5(6), pp.374–80.

- Krejsa, C., Rogge, M. & Sadee, W., 2006. Protein therapeutics: new applications for pharmacogenetics. *Nature reviews. Drug discovery*, 5(6), pp.507–21.
- Krishnamurthy, P. et al., 2008. Transporter-mediated protection against thiopurine-induced hematopoietic toxicity. *Cancer research*, 68(13), pp.4983–9.
- Krynetski, E.Y. et al., 1997. Promoter and intronic sequences of the human thiopurine S-methyltransferase (TPMT) gene isolated from a human PAC1 genomic library. *Pharmaceutical research*, 14(12), pp.1672–8.
- Labro, M.T., 2000. Interference of antibacterial agents with phagocyte functions: immunomodulation or “immuno-fairy tales”? *Clinical microbiology reviews*, 13(4), pp.615–50.
- Laverdière, C. et al., 2002. Polymorphism G80A in the reduced folate carrier gene and its relationship to methotrexate plasma levels and outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 100(10), pp.3832–4.
- Lee, D. et al., 1995. Thiopurine methyltransferase pharmacogenetics. Cloning of human liver cDNA and a processed pseudogene on human chromosome 18q21.1. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, 23(3), pp.398–405.
- Lennard, L. et al., 1990. Genetic variation in response to 6-mercaptopurine for childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*, 336(8709), pp.225–9.
- Lennard, L., 1992. The clinical pharmacology of 6-mercaptopurine. *European journal of clinical pharmacology*, 43(4), pp.329–39.
- Lennard, L. et al., 1987. Thiopurine pharmacogenetics in leukemia: correlation of erythrocyte thiopurine methyltransferase activity and 6-thioguanine nucleotide concentrations. *Clinical pharmacology and therapeutics*, 41(1), pp.18–25.
- Lennard, L., Chew, T.S. & Lilleyman, J.S., 2001. Human thiopurine methyltransferase activity varies with red blood cell age. *British journal of clinical pharmacology*, 52(5), pp.539–46.
- Levensen, M. et al., 2014. Pharmacogenetically based dosing of thiopurines in childhood acute lymphoblastic leukemia: influence on cure rates and risk of second cancer. *Pediatric blood & cancer*, 61(5), pp.797–802.
- Leyva-Vázquez, M.A. et al., 2012. Polymorphism G80A in the reduced folate carrier gene and its relationship to survival and risk of relapse in acute lymphoblastic leukemia. *Journal of investigative medicine : the official publication of the American Federation for Clinical Research*, 60(7), pp.1064–7.

- Liew, S.-C. & Gupta, E. Das, 2015. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism: Epidemiology, metabolism and the associated diseases. *European Journal of Medical Genetics*, 58(1), pp.1–10.
- Lima, A. et al., 2013. Current approaches for TYMS polymorphisms and their importance in molecular epidemiology and pharmacogenetics. *Pharmacogenomics*, 14(11), pp.1337–51.
- Lima, A. et al., 2014. Role of key TYMS polymorphisms on methotrexate therapeutic outcome in portuguese rheumatoid arthritis patients. *PloS one*, 9(10), p.e108165.
- Lindqvist, M. et al., 2006. No induction of thiopurine methyltransferase during thiopurine treatment in inflammatory bowel disease. *Nucleosides, nucleotides & nucleic acids*, 25(9-11), pp.1033–7.
- Lindqvist, M. et al., 2003. Real-time RT-PCR methodology for quantification of thiopurine methyltransferase gene expression. *European journal of clinical pharmacology*, 59(3), pp.207–11.
- Liu, Z. et al., 2015. Association between the interleukin-6 gene polymorphisms and renal cancer risk. *Immunology letters*, 164(2), pp.125–8.
- Loit, E. et al., 2011. Pre-analytic and analytic sources of variations in thiopurine methyltransferase activity measurement in patients prescribed thiopurine-based drugs: A systematic review. *Clinical biochemistry*, 44(10-11), pp.751–7.
- Lopez-Lopez, E. et al., 2013. A systematic review and meta-analysis of MTHFR polymorphisms in methotrexate toxicity prediction in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *The pharmacogenomics journal*, 13(6), pp.498–506.
- Lopez-Lopez, E. et al., 2013. Polymorphisms in the methotrexate transport pathway: a new tool for MTX plasma level prediction in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenetics and genomics*, 23, pp.53–61.
- Louis, E. et al., 1998. Tumour necrosis factor (TNF) gene polymorphism influences TNF-alpha production in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated whole blood cell culture in healthy humans. *Clinical and experimental immunology*, 113(3), pp.401–6.
- Lozzio, C.B. & Lozzio, B.B., 1975. Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood*, 45(3), pp.321–34.
- Lu, Y. et al., 2014. Host genetic variants of ABCB1 and IL15 influence treatment outcome in paediatric acute lymphoblastic leukaemia. *British journal of cancer*, 110(6), pp.1673–80.

- Lurje, G. et al., 2009. Thymidylate synthase gene variations: predictive and prognostic markers. *Molecular cancer therapeutics*, 8(5), pp.1000–7.
- Lynch, M., Scofield, D.G. & Hong, X., 2005. The evolution of transcription-initiation sites. *Molecular biology and evolution*, 22(4), pp.1137–46.
- Maeda, T. et al., 2005. Genetic basis of inosine triphosphate pyrophosphohydrolase deficiency in the Japanese population. *Molecular genetics and metabolism*, 85(4), pp.271–9.
- Mahfouz, R.A. et al., 2012. Correlation of methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms with homocysteine metabolism in healthy Lebanese adults. *Gene*, 504(2), pp.175–80.
- Marinaki, A.M. et al., 2003. Genetic determinants of the thiopurine methyltransferase intermediate activity phenotype in British Asians and Caucasians. *Pharmacogenetics*, 13(2), pp.97–105.
- Markova, S.M. & Kroetz, D.L., 2014. ABCC4 is regulated by microRNA-124a and microRNA-506. *Biochemical Pharmacology*, 87(3), pp.515–522.
- Martin, F.H. et al., 1985. Base pairing involving deoxyinosine: implications for probe design. *Nucleic acids research*, 13(24), pp.8927–38.
- Matherly, L.H., Hou, Z. & Deng, Y., 2007. Human reduced folate carrier: translation of basic biology to cancer etiology and therapy. *Cancer metastasis reviews*, 26(1), pp.111–28.
- McLeod, H.L. et al., 1995. Polymorphic thiopurine methyltransferase in erythrocytes is indicative of activity in leukemic blasts from children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 85(7), pp.1897–902.
- McMillin, G.A., 2007. Pharmacogenetics. In D. E. Bruns, E. R. Ashwood, & C. A. Burtis, eds. *Fundamentals of Molecular Diagnostics*. pp. 197–215.
- Mendoza, J.L. et al., 2007. MDR1 polymorphisms and response to azathioprine therapy in patients with Crohn's disease. *Inflammatory bowel diseases*, 13(5), pp.585–90.
- Milek, M. et al., 2012. Post-translational stabilization of thiopurine S-methyltransferase by S-adenosyl-L-methionine reveals regulation of TPMT\*1 and \*3C allozymes. *Biochemical pharmacology*, 83(7), pp.969–76.

- Milek, M. et al., 2009. S-adenosylmethionine regulates thiopurine methyltransferase activity and decreases 6-mercaptopurine cytotoxicity in MOLT lymphoblasts. *Biochemical pharmacology*, 77(12), pp.1845–53.
- Milic, V. et al., 2012. Association of dihydrofolate reductase (DHFR) -317AA genotype with poor response to methotrexate in patients with rheumatoid arthritis. *Clinical and Experimental Rheumatology*, 30(2), pp.178–183.
- Mircheva, J. et al., 1995. Monitoring of azathioprine-induced immunosuppression with thiopurine methyltransferase activity in kidney transplant recipients. *Transplantation*, 60(7), pp.639–42.
- Mishra, P.J. et al., 2007. A miR-24 microRNA binding-site polymorphism in dihydrofolate reductase gene leads to methotrexate resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(33), pp.13513–8.
- Moreland, L.W. et al., 2012. A randomized comparative effectiveness study of oral triple therapy versus etanercept plus methotrexate in early aggressive rheumatoid arthritis: the treatment of Early Aggressive Rheumatoid Arthritis Trial. *Arthritis and rheumatism*, 64(9), pp.2824–35.
- Naugler, W.E. & Karin, M., 2008. The wolf in sheep's clothing: the role of interleukin-6 in immunity, inflammation and cancer. *Trends in molecular medicine*, 14(3), pp.109–19.
- Ohtake, T. et al., 2001. Generalized Wegener's granulomatosis responding to sulfamethoxazole-trimethoprim monotherapy. *Internal medicine (Tokyo, Japan)*, 40(7), pp.666–70.
- Ongaro, A. et al., 2009. Gene polymorphisms in folate metabolizing enzymes in adult acute lymphoblastic leukemia: effects on methotrexate-related toxicity and survival. *Haematologica*, 94(10), pp.1391–8.
- Onnie, C.M. et al., 2006. Associations of allelic variants of the multidrug resistance gene (ABCB1 or MDR1) and inflammatory bowel disease and their effects on disease behavior: a case-control and meta-analysis study. *Inflammatory bowel diseases*, 12(4), pp.263–71.
- Ottersness, D. et al., 1997. Human thiopurine methyltransferase pharmacogenetics: gene sequence polymorphisms. *Clinical pharmacology and therapeutics*, 62(1), pp.60–73.
- Ozes, O.N. et al., 1999. NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature*, 401(6748), pp.82–5.

- Padyukov, L. et al., 2003. Genetic markers for the efficacy of tumour necrosis factor blocking therapy in rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*, 62(6), pp.526–9.
- Papadopoulos, P. et al., 2014. Developments in FINDbase worldwide database for clinically relevant genomic variation allele frequencies. *Nucleic acids research*, 42(Database issue), pp.D1020–6.
- Parle-McDermott, A. et al., 2007. The 19-bp deletion polymorphism in intron-1 of dihydrofolate reductase (DHFR) may decrease rather than increase risk for spina bifida in the Irish population. *American journal of medical genetics. Part A*, 143A(11), pp.1174–80.
- Pascual, M. et al., 2000. IL-6 promoter polymorphisms in rheumatoid arthritis. *Genes and immunity*, 1(5), pp.338–40.
- Pastore, S. et al., 2014. 5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide-transformylase and inosine-triphosphate-pyrophosphatase genes variants predict remission rate during methotrexate therapy in patients with juvenile idiopathic arthritis. *Rheumatology international*.
- Peng, X.-X. et al., 2011. Up-regulation of P-glycoprotein confers acquired resistance to 6-mercaptopurine in human chronic myeloid leukemia cells. *Oncology letters*, 2(3), pp.549–556.
- Penna, G. et al., 2011. MDR-1 polymorphisms (G2677T and C3435T) in B-chronic lymphocytic leukemia: an impact on susceptibility and prognosis. *Medical oncology (Northwood, London, England)*, 28(4), pp.1549–54.
- Pettersson, B. et al., 2002. Differences between children and adults in thiopurine methyltransferase activity and metabolite formation during thiopurine therapy: possible role of concomitant methotrexate. *Therapeutic drug monitoring*, 24(3), pp.351–8.
- Pui, C.-H. & Evans, W.E., 2006. Treatment of acute lymphoblastic leukemia. *The New England journal of medicine*, 354(2), pp.166–78.
- Pullmann, R. et al., 2006. Differential stability of thymidylate synthase 3'-untranslated region polymorphic variants regulated by AUF1. *The Journal of biological chemistry*, 281(33), pp.23456–63.
- Radojkovic, D. & Kusic, J., 2000. Silver staining of denaturing gradient gel electrophoresis gels. *Clinical chemistry*, 46(6 Pt 1), pp.883–4.

- Rao, D.N. et al., 2010. Association of an MDR1 gene (C3435T) polymorphism with acute leukemia in India. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*, 11(4), pp.1063–6.
- Razonable, R.R. et al., 2005. Nystatin induces secretion of interleukin (IL)-1beta, IL-8, and tumor necrosis factor alpha by a toll-like receptor-dependent mechanism. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49(8), pp.3546–9.
- Relling, M. V et al., 1998. Etoposide and antimetabolite pharmacology in patients who develop secondary acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 12(3), pp.346–52.
- Relling, M. V et al., 1999. Mercaptopurine therapy intolerance and heterozygosity at the thiopurine S-methyltransferase gene locus. *Journal of the National Cancer Institute*, 91(23), pp.2001–8.
- Di Renzo, L. et al., 2012. -174G/C IL-6 gene promoter polymorphism predicts therapeutic response to TNF- $\alpha$  blockers. *Pharmacogenetics and Genomics*, 22(2), pp.134–142.
- Roberts, D.E. & Curd, J.G., 1990. Sulfonamides as antiinflammatory agents in the treatment of Wegener's granulomatosis. *Arthritis and rheumatism*, 33(10), pp.1590–3.
- Roberts, R.L. et al., 2008. Trinucleotide repeat variants in the promoter of the thiopurine S-methyltransferase gene of patients exhibiting ultra-high enzyme activity. *Pharmacogenetics and genomics*, 18(5), pp.434–8.
- Rozin, A. et al., 2001. Cotrimoxazole treatment for rheumatoid arthritis. *Seminars in arthritis and rheumatism*, 31(2), pp.133–41.
- Russel, F.G.M., Koenderink, J.B. & Masereeuw, R., 2008. Multidrug resistance protein 4 (MRP4/ABCC4): a versatile efflux transporter for drugs and signalling molecules. *Trends in pharmacological sciences*, 29(4), pp.200–7.
- Saito, S. et al., 2002. Identification of 779 genetic variations in eight genes encoding members of the ATP-binding cassette, subfamily C (ABCC/MRP/CFTR). *Journal of human genetics*, 47(4), pp.147–71.
- Schaeffeler, E. et al., 2004. Comprehensive analysis of thiopurine S-methyltransferase phenotype-genotype correlation in a large population of German-Caucasians and identification of novel TPMT variants. *Pharmacogenetics*, 14(7), pp.407–17.
- Schmiegelow, K. et al., 2014. Mercaptopurine/Methotrexate maintenance therapy of childhood acute lymphoblastic leukemia: clinical facts and fiction. *Journal of pediatric hematology/oncology*, 36(7), pp.503–17.



- Sepe, D.M. et al., 2012. Germline genetic variation and treatment response on CCG-1891. *Pediatric blood & cancer*, 58(5), pp.695–700.
- Serpe, L. et al., 2009. Thiopurine S-methyltransferase pharmacogenetics in a large-scale healthy Italian-Caucasian population: differences in enzyme activity. *Pharmacogenomics*, 10(11), pp.1753–65.
- Sheng, X. et al., 2012. MDR1 C3435T polymorphism and cancer risk: a meta-analysis based on 39 case-control studies. *Molecular biology reports*, 39(7), pp.7237–49.
- Siegmund, W. et al., 2002. The effects of the human MDR1 genotype on the expression of duodenal P-glycoprotein and disposition of the probe drug talinolol. *Clinical pharmacology and therapeutics*, 72(5), pp.572–83.
- Silva, R.M.S. et al., 2013. Polymorphisms involved in folate metabolism pathways and the risk of the development of childhood acute leukemia. *Genetic testing and molecular biomarkers*, 17(2), pp.147–52.
- Simone, P.D., Pavlov, Y.I. & Borgstahl, G.E.O., 2013. ITPA (inosine triphosphate pyrophosphatase): From surveillance of nucleotide pools to human disease and pharmacogenetics. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, 753(2), pp.131–146.
- Skibola, C.F. et al., 2004. Polymorphisms and haplotypes in folate-metabolizing genes and risk of non-Hodgkin lymphoma. *Blood*, 104(7), pp.2155–62.
- Skibola, C.F. et al., 1999. Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene are associated with susceptibility to acute leukemia in adults. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(22), pp.12810–5.
- Smid, A. et al., 2014. Association of ITPA Genotype with Event-Free Survival and Relapse Rates in Children with Acute Lymphoblastic Leukemia Undergoing Maintenance Therapy. , 9(10), pp.1–10.
- Spire-Vayron de la Moureyre, C. et al., 1999. Characterization of a variable number tandem repeat region in the thiopurine S-methyltransferase gene promoter. *Pharmacogenetics*, 9(2), pp.189–98.
- Spire-Vayron de la Moureyre, C. et al., 1998. Genotypic and phenotypic analysis of the polymorphic thiopurine S-methyltransferase gene (TPMT) in a European population. *British journal of pharmacology*, 125(4), pp.879–87.
- Stępień, K.M. et al., 2012. The multidrug transporter P-glycoprotein in pharmacoresistance to antiepileptic drugs. *Pharmacological reports : PR*, 64(5), pp.1011–9.

- Stocco, G. et al., 2009. Genetic polymorphism of inosine triphosphate pyrophosphatase is a determinant of mercaptopurine metabolism and toxicity during treatment for acute lymphoblastic leukemia. *Clinical pharmacology and therapeutics*, 85(2), pp.164–72.
- Stocco, G. et al., 2013. Multilocus genotypes of relevance for drug metabolizing enzymes and therapy with thiopurines in patients with acute lymphoblastic leukemia. *Frontiers in Genetics*, 3(January), pp.1–9.
- Suzuki, T. et al., 1998. Misincorporation of 2'-deoxyxanosine 5'-triphosphate by DNA polymerases and its implication for mutagenesis. *Biochemistry*, 37(33), pp.11592–8.
- Swann, P.F. et al., 1996. Role of postreplicative DNA mismatch repair in the cytotoxic action of thioguanine. *Science (New York, N.Y.)*, 273(5278), pp.1109–11.
- Szumanski, C. et al., 1996. Thiopurine methyltransferase pharmacogenetics: human gene cloning and characterization of a common polymorphism. *DNA and cell biology*, 15(1), pp.17–30.
- Szumanski, C.L. et al., 1992. Human liver thiopurine methyltransferase pharmacogenetics: biochemical properties, liver-erythrocyte correlation and presence of isozymes. *Pharmacogenetics*, 2(4), pp.148–59.
- Tai, H.L. et al., 1997. Enhanced proteolysis of thiopurine S-methyltransferase (TPMT) encoded by mutant alleles in humans (TPMT\*3A, TPMT\*2): mechanisms for the genetic polymorphism of TPMT activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(12), pp.6444–9.
- Tai, H.L. et al., 1996. Thiopurine S-methyltransferase deficiency: two nucleotide transitions define the most prevalent mutant allele associated with loss of catalytic activity in Caucasians. *American journal of human genetics*, 58(4), pp.694–702.
- Takatori, R. et al., ABCB1 C3435T polymorphism influences methotrexate sensitivity in rheumatoid arthritis patients. *Clinical and experimental rheumatology*, 24(5), pp.546–54.
- Tamm, R. et al., 2008. Thiopurine S-methyltransferase (TPMT) pharmacogenetics: Three new mutations and haplotype analysis in the Estonian population. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 46(7), pp.974–979.
- Tartaglia, L.A. et al., 1991. The two different receptors for tumor necrosis factor mediate distinct cellular responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(20), pp.9292–6.

- Terato, K., Do, C.T. & Shionoya, H., 2015. Slipping through the Cracks: Linking Low Immune Function and Intestinal Bacterial Imbalance to the Etiology of Rheumatoid Arthritis. *Autoimmune diseases*, 2015, p.636207.
- Thervet, E. et al., 2001. Long-term results of TPMT activity monitoring in azathioprine-treated renal allograft recipients. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 12(1), pp.170–6.
- Treviño, L.R. et al., 2009. Germline genetic variation in an organic anion transporter polypeptide associated with methotrexate pharmacokinetics and clinical effects. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 27(35), pp.5972–8.
- Vanderheiden, B.S., 1969. Genetic studies of human erythrocyte inosine triphosphatase. *Biochemical genetics*, 3(3), pp.289–97.
- Vanderheiden, B.S. & Zarate-Moyano, C., 1976. Erythrocyte ITP pyrophosphohydrolase deficiency in a psychiatric population. *Biological psychiatry*, 11(6), pp.755–65.
- Vieira, J. & Messing, J., 1982. The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene*, 19(3), pp.259–68.
- Wang, D. et al., 2005. Multidrug resistance polypeptide 1 (MDR1, ABCB1) variant 3435C>T affects mRNA stability. *Pharmacogenetics and genomics*, 15(10), pp.693–704.
- Wang, L. et al., 2006. Reduced folate carrier gene G80A polymorphism is associated with an increased risk of gastroesophageal cancers in a Chinese population. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, 42(18), pp.3206–11.
- Wang, L. & Weinshilboum, R., 2006. Thiopurine S-methyltransferase pharmacogenetics: insights, challenges and future directions. *Oncogene*, 25(11), pp.1629–38.
- Weinshilboum, R.M. & Sladek, S.L., 1980. Mercaptopurine pharmacogenetics: monogenic inheritance of erythrocyte thiopurine methyltransferase activity. *American journal of human genetics*, 32(5), pp.651–62.
- Weisberg, I. et al., 1998. A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. *Molecular genetics and metabolism*, 64(3), pp.169–72.

- Wennerstrand, P. et al., 2013. Methotrexate binds to recombinant thiopurine S-methyltransferase and inhibits enzyme activity after high-dose infusions in childhood leukaemia. *European journal of clinical pharmacology*, 69(9), pp.1641–9.
- Wessels, J.A.M. et al., 2006. Relationship between genetic variants in the adenosine pathway and outcome of methotrexate treatment in patients with recent-onset rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism*, 54(9), pp.2830–9.
- Widmer, N. et al., 2014. Review of therapeutic drug monitoring of anticancer drugs part two--targeted therapies. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, 50(12), pp.2020–36.
- Wigginton, J.E., Cutler, D.J. & Abecasis, G.R., 2005. A note on exact tests of Hardy-Weinberg equilibrium. *American journal of human genetics*, 76(1), pp.887–893.
- Wilson, A.G. et al., 1992. Single base polymorphism in the human tumour necrosis factor alpha (TNF alpha) gene detectable by NcoI restriction of PCR product. *Human molecular genetics*, 1(5), p.353.
- Xu, X. et al., 2007. A functional 19-base pair deletion polymorphism of dihydrofolate reductase (DHFR) and risk of breast cancer in multivitamin users. *The American journal of clinical nutrition*, 85(4), pp.1098–102.
- Yamada, K. et al., 2001. Effects of common polymorphisms on the properties of recombinant human methylenetetrahydrofolate reductase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(26), pp.14853–8.
- Yan, J. et al., 2012. A meta-analysis of MTHFR C677T and A1298C polymorphisms and risk of acute lymphoblastic leukemia in children. *Pediatric Blood & Cancer*, 58(4), pp.513–518.
- Yan, L. et al., 2000. Thiopurine methyltransferase polymorphic tandem repeat: genotype-phenotype correlation analysis. *Clinical pharmacology and therapeutics*, 68(2), pp.210–9.
- Yates, C.R. et al., 1997. Molecular diagnosis of thiopurine S-methyltransferase deficiency: genetic basis for azathioprine and mercaptopurine intolerance. *Annals of internal medicine*, 126(8), pp.608–14.
- Zhang, D., Wang, C. & Zhou, Z., 2013. Meta-Analysis of ABCB1 3435C>T polymorphism and colorectal cancer. *Pakistan Journal of Medical Sciences*, 29(5), pp.1269–1274.
- Zhou, M.X. et al., 1991. Effect of tumor necrosis factor-alpha on the proliferation of leukemic cells from children with B-cell precursor-acute lymphoblastic leukemia

(BCP-ALL): studies of primary leukemic cells and BCP-ALL cell lines. *Blood*, 77(9), pp.2002–7.

Zukic, B. et al., 2010. Functional analysis of the role of the TPMT gene promoter VNTR polymorphism in TPMT gene transcription. *Pharmacogenomics*, 11(4), pp.547–57.

## Biografija

Nikola Kotur je rođen 01.04.1983. godine u Beogradu. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu, studijska grupa Molekularna biologija i fiziologija, upisao je školske 2002/2003. godine, a diplomirao je u septembru 2009. godine sa prosečnom ocenom 8.83 i diplomskim radom pod nazivom „Uticaj različite arhitekture VNTR\*4 ponovaka u promotoru i merkaptopurinskih lekova na transkripciju gena za TPMT“. Za ovaj rad je dobio nagradu „Goran Ljubijankić“ za najbolji diplomski rad iz oblasti molekularne biologije u Srbiji. Doktorske studije je upisao školske 2010/2011. godine na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, studijski program Molekularna biologija, modul Molekularna biologija eukariota. Od januara 2011. je zaposlen u Laboratoriji za molekularnu hematologiju (od 2013. godine Laboratorija za molekularnu biomedicinu), Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo Univerziteta u Beogradu. Učesnik je na nacionalnom projektu “Retke bolesti: molekularna patofiziologija, dijagnostički i terapijski modaliteti i socijalni, etički i pravni aspekti“ (MNTRS, broj III 41004, 2011-2015), bilateralnom projektu između republike Slovenije i republike Srbije „Farmakogenomički markeri u imunosupresivnoj i imunomodulatorskoj terapiji: od validiranih markera do kitova za genotipizaciju i kliničkih algoritama“ (451-03-3095/2014-09/45, 2014-2015) i evropskim projektima za popularizaciju nauke FP7 Researchers' Night za 2012. i 2013. godinu i H2020-MSCA-NIGHT za 2014. i 2015. godinu. Nikola Kotur je do sada objavio 5 radova u časopisima međunarodnog značaja i imao 20 saopštenja na međunarodnim naučnim skupovima.

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а Никола М Котур

број уписа М3004/2010

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Фармакогенетика б-меркаптопурина и метотрексата у дечјој акутној лимфобластној леукемији“

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 11.05.2015.

Никола Котур

Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора \_\_\_\_\_ Никола Котур \_\_\_\_\_

Број уписа \_\_\_\_\_ М3004/2010 \_\_\_\_\_

Студијски програм \_\_\_\_\_ Молекуларна биологија еукариота \_\_\_\_\_

Наслов рада \_\_\_\_\_ „Фармакогенетика 6-меркаптопурина и метотрексата у дечјој  
акутној лимфобластној леукемији“

Ментор \_\_\_\_\_ др Бранка Зукић и др Соња Павловић \_\_\_\_\_

Потписани \_\_\_\_\_ Никола Котур \_\_\_\_\_

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, \_\_\_\_\_ 11.05.2015. \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
*Никола Котур*



Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

„Фармакогенетика 6-меркаптопурина и метотрексата у дечјој акутној лимфобластној леукемији“

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 11.05.2015.

Милана Косић