

**UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET**

Branka Zukić


**KOMPONENTE SISTEMA REGULACIJE EKSPRESIJE
GENA ZA TIOPURIN S-METILTRANSFERAZU ČOVEKA
KAO FARMAKOGENETIČKI MARKERI**

Doktorska disertacija

Beograd, novembar 2009. godine

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Branka Zukić



KOMPONENTE SISTEMA REGULACIJE EKSPRESIJE
GENA ZA TIOPURIN S-METILTRANSFERAZU ČOVEKA
KAO FARMAKOGENETIČKI MARKERI

Doktorska disertacija

Beograd, novembar 2009. godine

Komisija za pregled i ocenu doktorske disertacije:

Dr Sonja Pavlović, viši naučni saradnik, mentor
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Beograd

Prof. dr Gordana Matic, redovni profesor, mentor
Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu

Dr Dragica Radojković, naučni savetnik,
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Beograd

Mami, tati i Vladi

ZAHVALNICA

Ovaj rad je realizovan u Laboratoriji za molekularnu hematologiju na Institutu za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo u Beogradu. Najveću zahvalnost dugujem Dr Sonji Pavlović koja mi je ukazala svoje poverenje i pružila mogućnost da se bavim jednom ovako zanimljivom temom. Sonja, hvala Vam na podršci i pomoći u eksperimentalnom radu i u toku pisanja ove teze. Od Vas sam mnogo naučila kako o nauci tako i drugim stvarima koje život znače. Hvala na razumevanju i ogromnoj pozitivnoj energiji bez koje sigurno ne bih uspela da prevaziđem svakodnevne izazove i da korak po korak stignem do mesta na kome sam sad. Nadam se da ćemo napraviti još mnogo zajedničkih koraka, radovati se zajedno svakom eksperimentu i ličnim malim i velikim uspesima.

Hvala Prof. dr Gordani Matić na podršci i pomoći koju mi je pružila u toku doktorskih studija na Biološkom fakultetu i u toku izrade ovog rada.

Hvala Dr Dragici Radojković na savetima, pomoći i kritičkom čitanju ove teze.

Veliko hvala mojim ZMZG prijateljima, saputnicima i kolegama Jeleni U, Jeleni P, Nataši, Maji, Dori, Tanji, Mileni, Vesni, Biljani. Devojke, hvala na razgovorima, hvala na atmosferi u kojoj je bilo prijatno raditi, hvala na pomoći i razumevanju za sve moje probleme. Hvala mojim diplomcima koji su ostavili trag i u mom radu i u mom srcu, Mari, Mileni, Nikoli. Hvala svima koji su bar neko vreme boravili u našoj laboratoriji i koje sam upoznala a sad više nisu u Srbiji i pomažu mi na svoj način. Anči, Maro, Sanja, Marija, Tamara, Tanja Đ, Ljubice, Ana hvala na druženju, radovima iz belog sveta i ponekoj ependorfici.

Moje kolege i prijatelji sa IMGGI, šta bih ja bez vas... Hvala na pomoći, savetima, odgovorima na moja pitanja, ćaskanjima i druženjima uz kafu koje učine da stvari ne izgledaju tako nemoguće kao na prvi progled. Svarno ne znam da li bih nekoga zaboravila ako počnem da nabrajam. SVIMA VAM HVALA, ponosna sam što sam deo jednog takvog Instituta i što vas poznajem.

Hvala dr Lidiji Dokmanovic sa Hematoorikološkog odeljenja Univerzitetske dečje klinike u Beogradu na saradnji i pomoći da ova teza dobije i kliničku potporu.

Mali deo eksperimenata urađen je u Erasmus MC, Faculty of Medicine and Health Sciences, MGC-Department of Cell Biology and Genetics, Rotterdam, Holandija. Profesoru George Patrinosu hvala što mi je omogućio da boravim u njegovoj laboratoriji mesec dana i da iskoristim priliku da uradim značajan deo mojih eksperimenata zahvaljujući antitelima koje je obezbedio. Hvala na konstantnom interesovanju za moj rad i radujem se daljoj saradnji i novim zajedničkim projektima. George, thank you for being my friend.

Hvala mojim prijateljima koji su uz mene Jeleni D, Jeleni B, onima koji su daleko odavde i onima koji su i dalje u Srbiji.

Veliko hvala mojim mami i tati, njihovoj bezuslovnoj ljubavi i što su mi omogućili da radim ono što volim. Hvala sto ste me naučili da se borim i da stalno gledam napred.

Mom životnom saputniku, mom Goranu, hvala na ogromnom strpljenju, podršci i pomoći. Bez tebe moj život ne bi bio potpun.

Najviše hvala mom Vladi, mojoj konstantnoj podršci u životu i radu. Ti si neko bez koga ja ne bih bila ja.

Apstrakt

Tiopurin S-metiltransferaza (TPMT; EC 2.1.1.67) je jedan od najboljih primera primene farmakogenetike u individualizaciji terapije. TPMT je enzim koji metaboliše imunosupresivne tiopurinske lekove (6-MP), koji se koriste u lečenju kancera, autoimunih bolesti i u transplantacionoj medicini. Aktivnost TPMT enzima je polimorfna i u beloj populaciji je zabeležena trimodalna distribucija TPMT aktivnosti: postoje ljudi koji su slabi, umereni ili jaki „metilatori“. Ipak, ne postoji jasna granica u aktivnosti TPMT između ovih definisanih grupa. Pokazano je da određeni polimorfizmi u genu za TPMT utiču na aktivnost TPMT enzima. Promotor gena za TPMT čoveka je veoma polimorfan. Sadrži promenljiv broj tandemskih ponovaka, od tri do devet, koji imaju veliki procenat GC baznih parova. Postoje tri tipa ponovaka, A, B i C. Arhitektura ovog promotorskog regiona je uvek AnBmC.

U ovom radu smo ispitivali da li genotipizacija polimorfizama u genu za TPMT može biti osnova za modifikaciju tiopurinske terapije u lečenju akutne limfoidne leukemije (ALL) kod dece. Takođe smo analizirali distribuciju alela i genotipova VNTR ponovaka promotora gena za TPMT u srpskoj populaciji. Istraživali smo uticaj broja i tipa tandemskih ponovaka u promotoru na transkripciju gena za TPMT čoveka, koristeći eksperimente tranzijentne transfekcije. Ispitali smo i koji se transkripcioni faktori vezuju za VNTR region esejima usporene elektroforetske pokretljivosti (EMSA) i „superšift“ esejima, analizirali metilacioni status promotora, cis-regulatorne elemente u promotorskom regionu i ispitivali potencijalni uticaj 6-MP na transkripciju gena za TPMT.

Naša studija je pokazala da je genotipizacija TPMT neophodna i efikasna i da je osnova za modifikaciju tiopurinske terapije kod ALL pacijenata, čak i kod heterozigotnih nosilaca polimorfizama u genu za TPMT.

Detektovali smo 11 različitih tipova VNTR u promotoru gena za TPMT u srpskoj populaciji. Broj ponovaka je bio od 4 do 8. Unutar promotora gena za TPMT sa istim brojem ponovaka, detektovana je različita arhitektura VNTR regiona, AnBmC, gde je $n = 1-5$ i $m = 1-6$. Detektovali smo 17 različitih TPMT VNTR genotipova u srpskoj populaciji. Funkcionalni esejii su pokazali da najveću aktivnost TPMT promotora ima onaj sa VNTR*4b tipom (AB₂C). Promotori sa 5, 6 i 7 VNTR alela su imali manje aktivnosti. Aktivnost VNTR*8 alela je bila dva

puta veća od aktivnosti VNTR*7 tipova. Utvrdili smo da postoje razlike u aktivnostima promotora između konstrukata koji su imali isti broj ali različiti tip tandemskih ponovaka. Najveća razlika detektovana je između VNTR*4 varijanti (A₂BC i AB₂C). Takođe je nađeno da je promotorski region uzvodno od VNTR ponovaka, na poziciji od -180 do -130, transkripcioni aktivator.

Potvrdili smo da se za VNTR region direktno vezuju transkripcioni faktori Sp1 i Sp3.

Promotor gena za TPMT je specifično odgovorio na tretman ćelija dozom od 10 µM 6-MP, i to na VNTR-zavistan način, smanjenjem ekspresije reporterskog gena za 40-50%. U ovaj odgovor uključeni su transkripcioni faktori Sp3 i KLF1.

Pokazali smo da broj i tip VNTR ponovaka u promotoru gena za TPMT utiče na nivo TPMT transkripcije. Arhitektura VNTR regiona (konfiguracija i broj nukleotida između A i C ponovaka) moduliše transkripciju gena za TPMT. VNTR region može biti odgovoran za raznolikost u aktivnosti TPMT enzima unutar tri definisane grupe metilatora.

Naši rezultati pokazuju da su VNTR genotipovi koji doprinose TPMT fenotipu slabih „metilatora“ zastupljeni u jednoj trećini srpske populacije. Zbog toga bi tandemski ponovci u promotoru gena za TPMT mogli biti kandidat za farmakogenetički marker. Dalja istraživanja bi potvrdila da li je ovaj region od kliničkog značaja za individualizaciju tiopurinske terapije.

Ključne reči: TPMT (tiopurin S-metiltransferaza), VNTR (promenljiv broj tandemskih ponovaka), TATA-less promotor, farmakogenetika, 6-MP (6-merkaptopurin).

Abstract

Thiopurine S-methyltransferase (TPMT; EC 2.1.1.67) represents one of the examples of pharmacogenetics applied for individualizing drug therapy. It is an enzyme that metabolizes immunosuppressive thiopurine medications, used in treatment of autoimmune diseases, cancer and in transplantation medicine. TPMT activity is polymorphic and trimodal distribution has been demonstrated in Caucasians, namely low, intermediate and high methylator groups. However, there is no clear separation between these patient groups. It was shown that certain TPMT gene polymorphisms affect TPMT enzyme activity. Human TPMT gene promoter is highly polymorphic. It contains a variable number of 3 GC-rich tandem repeats, namely A, B and C, ranging from 3 to 9 in length, but maintaining a A_nB_mC architecture.

Here, we investigated if the TPMT genotypization could be an efficient tool for guiding of thiopurine therapy in acute lymphoblastic leukemia (ALL) patients, carriers of TPMT polymorphism. We also analyzed the promoter tandem repeat distribution of alleles and genotypes in Serbian population. We investigated the influence of number and type of promoter tandem repeats on transcription of human TPMT gene using transient transfection experiments, addressed the interaction of transcription factor binding to the VNTRs by EMSA and supershift assays, analyzed the methylation status of VNTR region, cis-regulatory elements in promoter region and investigated potential influence of 6-MP on TPMT gene transcription.

Our study has confirmed that TPMT genotyping is necessary and efficient for modification of thiopurine therapy in ALL patients, even if they are heterozygous carriers of TPMT polymorphism.

We have detected 11 different types of VNTRs in the TPMT gene promoter in the Serbian population. Number of repeats ranged from 4 to 8. Within the TPMT promoters containing the same number of tandem repeats, different architecture of VNTRs has been determined, namely A_nB_mC , where n ranged from 1-5 and m ranged from 1-6. We have determined 17 different TPMT VNTR genotypes in Serbian population. Functional assays revealed that TPMT promoter with the highest activity was the one with VNTR*4b type (AB_2C). Promoters

with 5, 6 and 7 VNTR alleles all had successively lower activities. VNTR*8 activity was two times higher than activity of VNTR*7 types. We found differences in activity between the constructs containing the same number, but different type of tandem repeats. The most prominent difference was observed between VNTR*4 variants (A₂BC and AB₂C). The results of functional analysis demonstrate that the activity of TPMT promoter depends not only on the overall number of tandem repeats but also on the type of the repeat. The 5' TPMT promoter region from -180 to -130 is a transcriptional activator.

We have confirmed that transcription factors Sp1 and Sp3 directly bind to VNTR region.

TPMT gene promoter demonstrated a specific response to 6-MP treatment (10 μM) of the cells in a VNTR-specific manner, namely reduction of reporter gene expression from 40-50%. Transcription factors Sp3 and KLF1 are involved in this response.

We have shown that number and type of VNTRs in the TPMT gene promoter determine level of TPMT transcription. VNTR architecture (distance and configuration from A to C repeats) probably spatially and in sequence specific manner, modulate TPMT transcription. VNTR region may be responsible for diversity in TPMT activity among defined groups of TPMT methylators.

Our results showed that VNTR genotypes that contributed to low- methylator TPMT phenotype, comprised one third of Serbian population. For that reason promoter tandem repeats could be considered as candidate pharmacogenetic marker. Further investigation will confirm if it could be of clinical importance for individualizing thiopurine therapy.

Keywords: TPMT (thiopurine S-methyltransferase), VNTR (variable number of tandem repeats), TATA-less promoter, pharmacogenetics, 6-MP (6-mercaptopurine).

SADRŽAJ

UVOD.....	1
FARMAKOGENETIKA	2
<i>Razvoj farmakogenetike</i>	3
<i>Farmakogenetika populacija</i>	4
<i>Farmakogenetika ka farmakogenomici</i>	5
<i>Jedan od najboljih primera primene farmakogenetičkih principa u praksi: tiopurin S-metiltransferaza (TPMT)</i>	7
ANTIMETABOLITI (STRUKTURNI ANALOZI)	8
<i>Metabolizam tiopurinskih lekova</i>	10
TPMT.....	13
<i>Gen za TPMT</i>	16
<i>Polimorfizmi u genu za TPMT</i>	17
<i>Učestalost TPMT alela</i>	20
<i>Funkcionalne analize TPMT alozima</i>	20
<i>Struktura TPMT enzima</i>	22
<i>TPMT u kliničkoj praksi</i>	24
PROMOTOR EUKARIOTSKIH GENA.....	25
<i>Transkripcioni faktori Sp/KLF familije</i>	27
Sp grupa	28
KLF grupa.....	30
PROMOTOR GENA ZA TPMT	30
TPMT U SRBIJI	35

CILJ RADA	36
MATERIJAL I METODE	39
MATERIJAL.....	40
<i>Biološki materijal – DNK</i>	<i>40</i>
<i>Biološki materijal – ćelijske linije.....</i>	<i>40</i>
<i>Biološki materijal – bakterijski soj.....</i>	<i>40</i>
<i>Plazmidni vektori.....</i>	<i>41</i>
<i>Prajmeri.....</i>	<i>41</i>
<i>Oligonukleotidne probe.....</i>	<i>42</i>
<i>Antitela.....</i>	<i>44</i>
METODE	46
<i>IZOLACIJA DNK IZ PERIFERNE KRVI ISOLJAVANJEM.....</i>	<i>46</i>
<i>IZOLACIJA DNK IZ PERIFERNE KRVI FENOL/HLOROFORM/IZOAMIL ALKOHOLOM.....</i>	<i>46</i>
<i>IZOLACIJA DNK IZ PERIFERNE KRVI NA KOLONI.....</i>	<i>47</i>
<i>PCR analiza.....</i>	<i>48</i>
<i>Detekcija mutacija u kodirajućem regionu gena za TPMT.....</i>	<i>48</i>
<i>Alel specifični PCR (eng. allele refractory mutation system - ARMS) – detekcija mutacije c.238G>C.....</i>	<i>48</i>
<i>Detekcija mutacija c.460G>A i c.719A>G metodom PCR-RFLP.....</i>	<i>49</i>
<i>Umnožavanje promotorskog regiona gena za TPMT.....</i>	<i>51</i>
<i>Umnožavanje GCC ponovaka promotorskog regiona gena za TPMT.....</i>	<i>52</i>
<i>Pravljenje CAT-konstrukata za eksperimente tranzijentne transfekcije.....</i>	<i>52</i>
<i>KULTIVISANJE BAKTERIJA.....</i>	<i>55</i>

PRIPREMANJE KOMPETENTNIH ČELIJA <i>E. Coli DH5α</i>	56
TRANSFORMACIJA <i>E. Coli DH5α</i> KOMPETENTNIH ČELIJA	57
DETEKCIJA ŽELJENOG KONSTRUKTA.....	57
BRZA LIZA (<i>lysis gel electrophoresis</i>).....	58
IZOLOVANJE PLAZMIDNE DNK NA MALOJ SKALI (<i>MINI PREP</i>).....	59
IZOLOVANJE PLAZMIDNE DNK NA MALOJ SKALI	60
IZOLOVANJE PLAZMIDNE DNK NA VELIKOJ SKALI	61
ČUVANJE TRANSFORMANATA	62
ANALIZA DNK NA AGAROSNOM GELU.....	63
ANALIZA DNK NA POLIAKRILAMIDNOM GELU	63
BOJENJE POLIAKRILAMIDNIH GELOVA SREBRONITRATOM	63
SEKVENCIJANJE PCR PRODUKATA/CAT KONSTRUKATA.....	64
USLOVI GAJENJA ČELIJA U KULTURI	65
ODMRZAVANJE ČELIJA.....	66
ZAMRZAVANJE ČELIJA	66
SUBKULTIVACIJA ČELIJA.....	67
BROJANJE ČELIJA	68
VIJABILNOST K562 ČELIJA POD UTICAJEM 6-MERKAPTOPURINA (6-MP)	68
BROJANJE ČELIJA NA AUTOMATSKOM BROJAČU.....	69
MTT TEST.....	69
IZOLOVANJE JEDARNIH PROTEINA	70
BRADFORD METODA	70

ANALIZA INTERAKCIJE DNK I JEDARNIH PROTEINA	71
<i>In silico</i> analiza promotora gena za TPMT	71
ANALIZA DIREKTNE INTERAKCIJE DNK I JEDARNIH PROTEINA	71
OBELEŽAVANJE OLIGONUKLEOTIDNE PROBE	72
METODA USPORENE ELEKTROFORETSKE POKRETLJIVOSTI.....	73
SOUTH-WESTERN METODA.....	74
Denaturišući SDS poliakrilamidni gel.....	74
Polusuvi transfer proteina na membranu.....	75
Ostvarivanje interakcije DNK probe i proteina.....	76
TRANZIJENTNA TRANSFEKCIJA K562 ĆELIJA LIPOFEKTAMINOM.....	77
PRIPREMA ĆELIJSKIH EKSTRAKTA.....	77
β-GALAKTOZIDAZNI ESEJ	78
CAT ELISA ESEJ.....	79
METILACIONI ESEJ	80
REZULTATI	82
FARMAKOGENETIČKA STUDIJA - DETEKCIJA NAJČEŠĆIH MUTACIJA U GENU ZA TPMT KOD DECE OBOLELE OD ALL I INDIVIDUALIZACIJA TIOPURINSKE TERAPIJE	83
<i>Detekcija mutacije c.238G>C u genu za TPMT</i>	83
<i>Detekcija mutacije c.460G>A u genu za TPMT</i>	84
<i>Detekcija mutacije c.719A>G u genu za TPMT</i>	85
<i>Određivanje genotipa TPMT</i>	85
<i>Individualizacija tiopurinske terapije u dece sa ALL u skladu sa genotipom TPMT</i>	86
ANALIZA POLIMORFIZAMA PROMOTORSKOG REGIONA GENA ZA TPMT	87

<i>Analiza VNTR regiona promotora gena za TPMT u srpskoj populaciji</i>	87
<i>Molekularna analiza promotora gena za TPMT</i>	91
<i>Funkcionalna analiza VNTR tipova promotora gena za TPMT</i>	92
Priprema CAT-konstrukata	92
Funkcionalna analiza promotorskog regiona gena za TPMT	94
<i>Deleciona analiza promotora</i>	96
<i>Funkcionalna analiza promotora gena za TPMT u obrnutoj orijentaciji</i>	97
<i>Analiza vezivanja transkripcionih faktora za promotor gena za TPMT</i>	98
In silico analiza promotora gena za TPMT	98
Analiza interakcija VNTR promotorskog regiona gena za TPMT i transkripcionih faktora	100
METILACIONI STATUS PROMOTORA GENA ZA TPMT	105
ANALIZA FARMAKOGENETIČKOG POTENCIJALA VNTR REGIONA PROMOTORA GENA ZA TPMT.....	106
<i>Ostali polimorfizmi u promotoru gena za TPMT i njihov uticaj na transkripciju</i>	107
UTICAJ 6-MPA NA TRANSKRIPCIJU GENA ZA TPMT	108
DISKUSIJA	116
FARMAKOGENETIČKA STUDIJA - DETEKCIJA NAJČEŠĆIH MUTACIJA U GENU ZA TPMT KOD DECE OBOLELE OD ALL I MODIFIKACIJA TIOPURINSKE TERAPIJE.....	117
<i>ALL pacijenti koji su heterozigotni nosioci mutiranog alela TPMT zahtevaju modifikaciju tiopurinske terapije</i>	117
<i>Farmakogenetički markeri u genu za TPMT u različitim populacijama</i>	118
ANALIZA POLIMORFIZAMA PROMOTORSKOG REGIONA GENA ZA TPMT	119
<i>VNTR genotip</i>	119
<i>Regulacija transkripcije gena za TPMT: funkcionalna analiza promotorskog regiona</i>	120

<i>Promotorski region gena za TPMT lociran 5' od VNTR regiona je transkripcioni aktivator</i>	<i>122</i>
<i>Promotor gena za TPMT je aktivan u oba smera</i>	<i>123</i>
<i>Da li hipermetilatori imaju polimorfizam GCC ponovaka u promotoru gena za TPMT?</i>	<i>123</i>
<i>Interakcija transkripcionih faktora sa promotorskim regulatornim elementima gena za TPMT</i>	<i>124</i>
<i>Kako konformaciona arhitektura VNTR regiona u promotoru utiče na regulaciju transkripcije gena za TPMT?.....</i>	<i>126</i>
METILACIJA KAO MEHANIZAM TRANSKRIPCIONE REGULACIJE PROMOTORA GENA ZA TPMT	127
UTICAJ 6-MP NA TRANSKRIPCIJU GENA ZA TPMT.....	127
DA LI JE VNTR REGION PROMOTORA GENA ZA TPMT – NOVI FARMAKOGENETIČKI MARKER?.....	129
ZAKLJUČCI.....	131
LITERATURA.....	134

UVOD



FARMAKOGENETIKA

Ulogu genetike u odgovoru na lekove predvideo je još 1931. godine Sir Archibald Garrod u svojoj knjizi "Urođeni faktori i bolesti" (Garrod 1931). Farmakogenetika, kakvu je danas poznajemo, nastala je kasnih 1950-tih godina kao nova naučna disciplina spajanjem starijih: farmakologije i genetike.

Farmakogenetika izučava ulogu nasleđenih individualnih razlika u odgovoru na različite lekove. To je grana nauke koja objašnjava varijabilnost u odgovoru na lekove i genetičku osnovu kao uzrok te varijabilnosti. U početku su poređene individualne razlike kod ljudi, ali vremenom se oblast interesovanja ove nauke proširila i na genetičke različitosti između populacija. Mnogi farmakogenetičari se bave isključivo ljudima, ali ova nauka svoje principe primenjuje na sva živa bića, primitivna ili složena, sposobna da odgovore na lek ili neku drugu hemijsku supstancu.

Zanimljivo je da su još 1971. godine primećene razlike u odgovoru organizama na toksične materije iz životnog okruženja. Tako je nastao izraz "ekogenetika" ukazujući prvenstveno na različite odgovore ljudi na određenu hranu (npr. netolerancija na laktozu iz mleka) (Motulsky 1991). Kasnije se ovaj termin upotrebljavao da ukaže na toksične faktore sredine koji izazivaju različite odgovore organizma čoveka. Svetska zdravstvena organizacija je 1989. godine održala konferenciju o ekogenetici i time je ekogenetika postala nova grana nauke (Grandjean *et al.*, 1991). Međutim, farmakogenetika i ekogenetika se zasnivaju na identičnim principima. Dodatne nedoumice da li je ekogenetika deo farmakogenetike ili ne, potkrepljuje i mali lingvistički problem. Naime, reč farmakogenetika vodi poreklo od grčke reči "pharmakon", koja u isto vreme označava i lek (terapeutski agens) i toksičnu materiju. Zato se izraz "farmakologija" najčešće upotrebljava u smislu interakcije organizma i sa lekovima i toksinima. Neki naučnici smatraju da se isključivo ekogenetika bavi toksičnim faktorima iz spoljne sredine, a da je farmakologija ograničena samo na istraživanje lekova. Većina smatra da je ekogenetika nepotreban izraz, i da je ono čime se ona bavi već predmet izučavanja farmakogenetike.

U farmakogenetici se u najnovije vreme, za sve strane materije koje ne bi trebalo da budu prirodno prisutne u organizmu a dovode do različitog odgovora organizma na njih, koristi

izraz ksenobiotik. Ksenobiotici obuhvataju terapijske agense (lekove), materije koje se koriste u prehrambenoj industriji prisutne u hrani, prirodne supstance koje se u datom organizmu ne proizvode, supstance koje su u organizmu prisutne u mnogo većoj koncentraciji nego što bi trebalo, zagađivače prirodne sredine – toksične materije koje je čovek veštački sintetisao.

Razvoj farmakogenetike

Pionirski radovi iz oblasti farmakogenetike bavili su se objašnjenjima pojava uočenim u medicinskoj praksi za vreme i posle Drugog svetskog rata. U Nemačkoj je primećeno da neki pacijenti imaju teška, po život opasna trovanja lekom prokainom koji se široko koristio kao lokalni anestetik. Pokazano je da enzim butirilholinesteraza koja hidrolizuje prokain, pokazuje bimodalnu aktivnost, visoku ili nisku, u plazmi pacijenata lečenih ovim lekom (Herken *et al.*, 1951; Kalow 1952). Niska aktivnost enzima zbog koje dolazi do trovanja lekom posledica je poremećene kinetike enzimske reakcije. Zbog veoma redukovane afiniteta enzima butirilholinesteraze za supstrat čini se kao da je aktivnost enzima niska. Promena u kinetici se objašnjava jednom promenom u strukturi enzima, a promena u strukturi je posledica promene u genetičkom kodu (Kalow 1956). Među prvim farmakogenetičkim saznanjima je potvrda da je antimalarični lek primakvin, zbog deficijencije u enzimu glukozo-6-fosfat dehidrogenazi (G6PD), kod nekih američkih vojnika 1940-tih godina izazivao hemolizu (Waldenstrom 1937). Opisana je i genetički determinisana razlika u metabolizmu tada revolucionarnog anti-tuberkuloznog leka izoniazida (Motulsky 1957; Bonicke *et al.*, 1957).

Najveće otkriće, koje je farmakogenetiku kao nauku postavilo na veoma visoko mesto među prirodnim naukama je saznanje o genetički uslovljenoj deficijenciji u metabolizmu leka debrisoquina, derivata guanidina, široko korišćenog u terapiji povišenog krvnog pritiska (Mahgoub *et al.*, 1977; Smith 1986) kao i genetički uslovljene deficijencije u metabolizmu antireumatskog leka sparteina (Eichelbaum 1975). Obe deficijencije su posledica polimorfizama u genu za citohrom P450 2D6 (CYP2D6). Gen za CYP2D6 kodira enzim debrisoquin hidrosilazu koji učestvuje u metabolizmu preko 50 lekova koji se koriste u

Uvod

terapiji mnogih psihijatrijskih, neuroloških i kardiovaskularnih oboljenja (imipramin, klozopin, dezipramin, haloperidol, propranolol itd.) (Meyer *et al.*, 1997; Wolf *et al.*, 2000). Od više od 70 opisanih varijanti CYP2D6 proteina, mnoge ne pokazuju nikakvu aktivnost (Marez *et al.*, 1997). Sa druge strane, opisane su i duplikacije ili multiplikacije ovog gena koje za posledicu imaju izuzetno visoku CYP2D6 aktivnost (Dahl *et al.*, 1995). Medicinski značaj otkrića da genetičke varijacije u samo jednom genu mogu da imaju posledice na lečenje mnogih bolesti može se uvideti i iz činjenice da je varijabilnost u CYP2D6 genu do sada bila tema u preko 3000 objavljenih naučnih radova. CYP2D6 enzim pokazuje najveću varijabilnost među citohrom P450 enzimima (CYP). Još 11 različitih CYP, osim CYP2D6, pokazuju genetičke varijacije koje za posledicu imaju različitost u metabolizmu lekova (Cascorbi 2003).

Farmakogenetika populacija

Farmakogenetika je uglavnom orijentisana na razlike u metabolizmu lekova i odgovoru na njih između pojedinačnih ljudi. Ako bismo pogledali manje kompleksnije organizme možda bi naša slika o farmakogenetičkim varijacijama kao protektivnom faktoru za određenu populaciju bila jasnija. Na primeru farmakogenetičke rezistencije bakterije na antibiotik vidimo da će bakterija u okruženju koje taj antibiotik sadrži preživeti, njeni potomci će se umnožiti i nastaće rezistentan bakterijski soj (Bennett 1995). Kod čoveka ovaj dramatični efekat nije na prvi pogled uočljiv jer otrovne materije iz spoljnog sveta ne ubijaju tako direktno, ceo sistem je mnogo kompleksniji a i generacijsko vreme kod čoveka je duže.

Farmakogenetičke razlike su karakteristične za populacije ljudi (Engen *et al.*, 2006). Primer već pomenute deficijencije u enzimu glukozo 6-fosfat dehidrogenazi (G6PD) koja je odgovorna za hemolitički toksični odgovor na lek primakvin, može nam ilustrovati farmakogenetičke razlike između populacija ljudi. Primećena je veća učestalost G6PD-deficijentnih nosilaca u populaciji crnaca iz Afrike u odnosu na populaciju populaciju belaca iz Amerike. Biološki smisao ovog genetičkog markera je sposobnost afričkog naroda da preživi malariju (Alving *et al.*, 1956). Do sada proučavani farmakogenetički markeri, kako kvalitativni tako i kvantitativni, se po učestalosti razlikuju između određenih rasnih i etničkih grupa.

Uvod

Individualizacija terapije se, kao praktična primena farmakogenetičkih dostignuća, istorijski bazirala na populacionim studijama sprovedenim na populacijama belaca. Kako su vremenom i druge etničke grupe uključivane u klinička ispitivanja, postalo je jasno da pripadnost određenoj etničkoj zajednici može uticati na odgovor osobe na terapiju lekovima. Ako se metabolizam leka razlikuje između različitih etničkih grupa, onda se podaci iz populacionih studija jedne populacije ne mogu ekstrapolirati na neku drugu populaciju bez prethodne provere. Još jedan primer već pomenute genetičke deficijencije u metabolizmu antituberkuloznog leka izoniazida može nam približiti značaj populacionih istraživanja u farmakogenetici. Lek izoniazid se u organizmu čoveka acetiluje. Genetičke promene u NAT2 genu su odgovorne za slabu acetilaciju ovog leka i za posledicu imaju povećani rizik za zapaljenje nerava. Populacione studije NAT2 gena su pokazale da čak 90% Marokanaca ima predispoziciju za slabo acetilovanje ovog leka. U populacijama severne Amerike i Evrope detektovano je 40-70% nosilaca deficijentnog NAT2 gena, dok je u populaciji Azije i Inuita (Eskimi iz arktičkih i subarktičkih oblasti Kanade i Grenlanda) detektovano 10-20%, odnosno 5% nosilaca deficijentnog gena (Evans 1989; Hein *et al.*, 2000).

Poznavanje farmakogenetičkih razlika između populacija može biti od velikog značaja za farmaceutsku industriju.

Farmakogenetika ka farmakogenomici

U današnje vreme moguće je sagledati obim genetičkih varijacija. Ako znamo da genom čoveka izgrađuje oko 3 milijarde baznih parova i da su nukleotidne zamene (SNP eng. single nucleotide polymorphism) u genomu čoveka prisutne sa prosečnom učestalošću 1/1000 baza (Zhao *et al.*, 2003), možemo samo zamisliti koliko proteina čoveka pokazuje genetičke varijacije. Efikasnost jednog leka u organizmu zavisi od više faktora. Od farmakokinetike leka zavisi šta organizam "uradi" leku, dok od farmakodinamike šta lek "uradi" organizmu (Varagić 1999). Metabolizam leka može biti promenjen zbog promene genetičkog koda odgovarajućeg enzima koji ga metaboliše. Zbog greške u transkripciji ili translaciji može se desiti da nije sintetisano dovoljno enzima, ali da je on funkcionalan, pa se opet čini da je

Uvod

njegova aktivnost niska. Ključni regulatorni gen može biti promenjen pa se taj protein ne sintetiše dovoljno ili se previše brzo razgrađuje. Takođe, promotorski region regulatornog gena može da ne odgovara na inducer ili supresor. Zbog previše ili premalo albumina ili drugih transportera vezanih za odgovarajući enzim lek ne može da stigne na pravo mesto. Sve ove varijacije u metabolizmu leka, varijacije u receptoru leka, različitosti u transporteru leka na mestu njegove apsorpcije, krvno-moždanoj barijeri ili ćelijskoj membrani specifičnog tipa ćelija, različit obim absorpcije, nejednaka eliminacija leka preko bubrega ili jetre, imaju uticaj na odgovor organizma na taj lek. Činjenica je da su razlike između ljudi najčešće posledica razlika u velikom broju gena, ali dodatni uticaj mogu imati epigenetski faktori i faktori sredine. Sve ove mogućnosti i kombinacije genetičkih varijacija i različite odgovore na lekove kao posledicu varijacija proučava farmakogenetika.

U novije vreme, sve više je uz izraz farmakogenetika prisutan i izraz farmakogenomika. Zbog ubrzanog tehnološkog razvoja i velikog uspeha projekta sekvenciranja humanog genoma, ukazuje se na višestruke varijacije i interakcije gena kao uzročnike različitog odgovora organizma čoveka na lekove, pre nego na pojedinačne gene (O'Brien *et al.*, 1999; Kennedy *et al.*, 2003). Metode genotipizacije, primena mikročipova (microarray) i GWAS analize (GWAS eng. genome wide association studies) koje koristi farmakogenomika pružaju uvid u veliki broj pojedinačnih gena u jednom trenutku, njihove moguće interakcije, prvenstveno obraćajući pažnju na promene u ekspresiji gena. Konačni cilj farmakogenomike je individualizacija terapije pacijenata u skladu sa njegovim genotipom. Tako se adekvatnim terapeutikom, adekvatnom dozom, bez neželjenih efekata, najjeftinije, postiže najbrže i najefikasnije lečenje pacijenata. Pacijenti se ne suočavaju sa komplikacijama, ne gubi se vreme i novac na dodatne lekove i bolničke dane zbog lečenja komplikacija, dok osnovna bolest napreduje. Nažalost, zbog još nerazvijenih pravih široko dostupnih farmakogenomičkih testova za određene bolesti, u medicinskoj praksi se individualizacija terapije i dalje, ako se uopšte i sprovodi, vodi na osnovu farmakogenetičkih dostignuća, testiranjem polimorfizama u jednom genu.

Istraživanja na polju farmakogenetike se trenutno razvijaju u dva glavna pravca: prvi, identifikacija specifičnih gena i produkata gena povezanih sa različitim bolestima koji bi mogli predstavljati metu za nove terapeutike, i drugi, identifikacija gena i alelskih varijanti

gena koji bi mogli uticati na odgovor organizma na već postojeće lekove. (Wolf *et al.*, 2000). Farmakogenetika je u početku bila uglavnom orijentisana na bezbednu upotrebu lekova, a sada se istraživanja usmeravaju i ka poboljšavanju efikasnosti lekova koji se već koriste.

Jedan od najboljih primera primene farmakogenetičkih principa u praksi: tiopurin S-metiltransferaza (TPMT)

Jedan od najboljih primera primene farmakogenetike u kliničkoj praksi je otkriće da su za različite individualne odgovore na terapiju antagonistima purina odgovorne individualne varijacije u aktivnosti enzima tiopurin S-metiltransferaze (TPMT) (Weinshilboum *et al.*, 1980). Pacijenti koji imaju urođenu smanjenu aktivnost TPMT enzima mogu razviti toksične efekte pri primeni standardnih doza ovih lekova (Weinshilboum *et al.*, 1980). Sa druge strane, postoje i pacijenti kod kojih je aktivnost ovog enzima izrazito visoka i oni ne odgovaraju na standardne doze lekova (Weinshilboum *et al.*, 1980).

Karakterizacija mutacija u TPMT genu omogućila je objašnjavanje ovakvih interindividualnih razlika u aktivnosti enzima, a i delimično približila farmakogenetiku svom cilju – individualizaciji terapije.

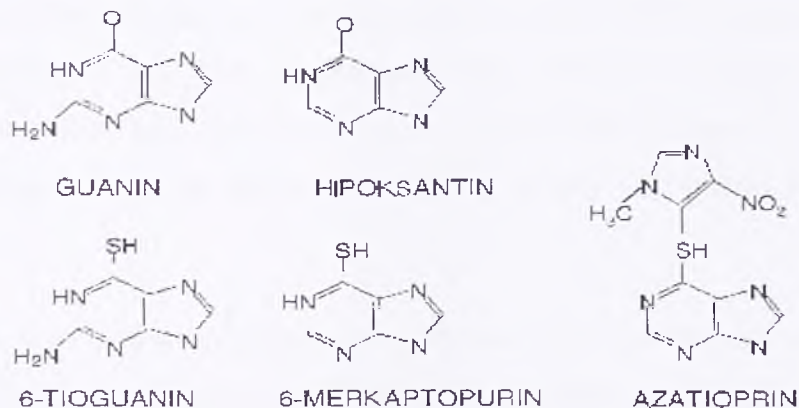
Karakterizacija mutacija u genu za TPMT je takođe i model sistem koji ilustruje proces u kome se saznanja iz oblasti farmakogenetike uspešno koriste u kliničkoj praksi. Istovremeno se na ovom primeru može videti put koji je farmakogenetika kao nauka prešla od fenotipske do genotipske karakterizacije.



ANTIMETABOLITI (STRUKTURNI ANALOZI)

Antimetaboliti ili strukturni analozi su jedinjenja analogna prirodnim jedinjenjima ćelije kao što su folna kiselina, purini ili pirimidini (Varagić 1999). Mehanizam njihovog dejstva zasniva se na tome da oni vrše zamenu prirodnih metabolita u biohemijskim procesima ćelije. Biohemijski putevi na koje antimetaboliti imaju najvećeg uticaja su oni uključeni u metabolizam nukleotida i nukleinskih kiselina. Upravo ova odlika je iskorišćena za terapiju kancera (Katzung 2004). Bitna biohemijska odlika ćelije kancera je prekomerna sinteza nukleinskih kiselina. Antimetaboliti zaustavljaju ovu sintezu, a samim tim su u mogućnosti da zaustave umnožavanje više tipova neoplastičnih ćelija (Katzung 2004).

Antagonisti purina se kao tiopurinski lekovi već preko 50 godina široko primenjuju u medicinskoj praksi. U strukturne analoge purina spadaju 6-merkaptopurin (6-MP), 6-tioguanin (6-TG) i azatioprin (AZA) (Slika 1) (Coulthrad *et al.*, 2005). 6-MP i 6-TG se uglavnom koriste u lečenju dečje akutne limfoblastne leukemije (ALL), pritom se 6-TG prevashodno koristi u fazi indukcione a 6-MP u fazi konsolidacine terapije ALL. AZA je imunosupersiv izbora u lečenju inflamatornih bolesti creva, autoimune hemolitičke anemije, sistemskog eritemskog lupusa, kao i za održavanje presađenih organa.



Slika 1. Strukturni analozi purina (6-tioguanin, 6-TG; 6-merkaptopurin, 6-MP; azatioprin, AZA).

Tiopurinski lekovi su sintetisani 1967. godine supstitucijom kiseonika sumporom na ugljeniku 6 guanina, za 6-TG, ili hipoksantina, za 6-MP. Pokazano je da novosintetisani lekovi inhibiraju korišćenje prirodnih purina i deluju na povlačenje nekih tumora kod pacova (Elion

1967). Ubrzo je aktivnost ovih lekova potvrđena i kod dečjih ALL. U to vreme, prognoza ove bolesti je bila izuzetno loša. Otkriće da 6-MP može da dovede do kompletne remisije kod dečje ALL, iako je većina dece kasnije relapsirala, dovelo je do odobravanja korišćenja ovih lekova u medicinskoj praksi od strane Američke agencije za hranu i lekove već 1953. godine (Burchenal *et al.*, 1953). AZA je u terapiju uveden kasnije, 1963. godine, nakon što se pokazao kao uspešan lek u održavanju presađenog bubrega (Murray *et al.*, 1963).

Tiopurinski lekovi su prekursori aktivnog leka tzv. pro-lekovi i da bi ispoljili svoje terapeutsko dejstvo treba prvo da se metabolišu (Lennard 1992). AZA se najpre neenzimatski razgradi na 6-MP i imidazolnu grupu. 6-MP i 6-TG trpe intenzivne metaboličke promene pre ispoljavanja svog citotoksičnog dejstva. 6-MP i 6-TG se posle metaboličke konverzije ugrađuju u DNK i RNK molekule kao tioguaninski nukleotidi (6-TGN) (Bertino 1991). 6-MP može i da inhibira *de novo* sintezu purinskih nukleotida (Dervieux *et al.*, 2001; Coulthard *et al.*, 2002). 6-TGN se u DNK ugrađuju kao "lažne" baze i pri tom dolazi do ozbiljnog oštećenja DNK. Ova oštećenja obuhvataju unakrsne veze DNK i proteina, jednolančane prekide u DNK, unakrsne veze između lanaca DNK, rekombinacije između sestrinskih hromatida (Tay *et al.*, 1969; Maybaum *et al.*, 1981; Maybaum *et al.*, 1983; Christie *et al.*, 1984; Pan *et al.*, 1990; Bodell 1991). Takođe, može doći do inhibicije normalne replikacije DNK posredstvom delimične inhibicije enzima DNK polimeraze i DNK ligaze (Ling *et al.*, 1992) i značajnom inhibicijom RNA-ze H (Krinetskaia *et al.*, 1999). Ugradnju 6-TGN u DNK može da prepozna sistem za reparaciju DNK u ćeliji (eng. mismatch repair system- MMR) (Swann *et al.*, 1996) pa i defekti u ovom sistemu mogu biti povezani sa smanjenom rezistencijom na 6-TG (Karran 2001).

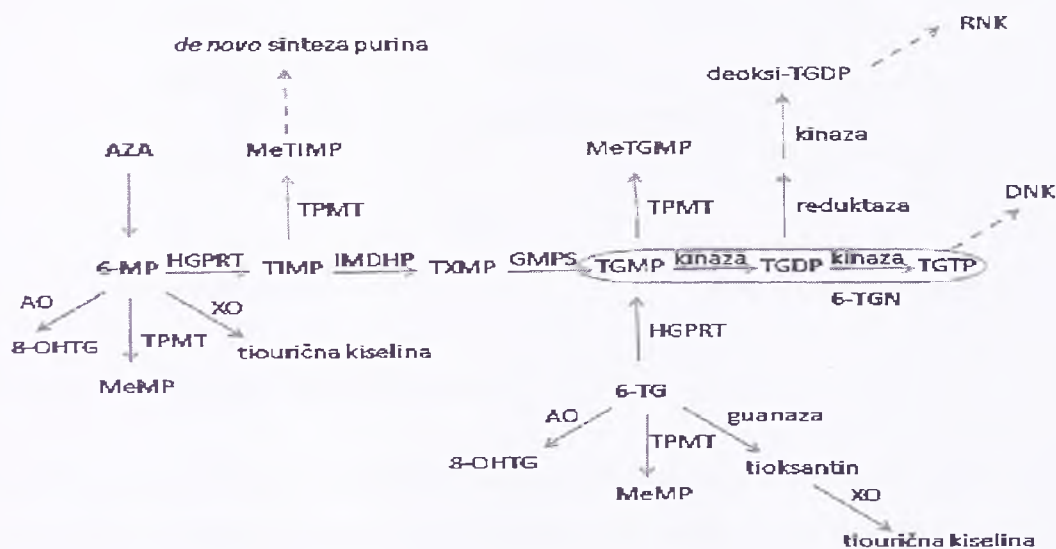
Tiopurinski lekovi se primenjuju oralno. Za 6-MP se obično koriste doze od 75 mg/m^2 , a koncentracije leka u plazmi su $0.3\text{-}1.8 \text{ }\mu\text{M}$ posle 2.2 sata (Zimm *et al.*, 1983). Iskorišćenost 6-MP je 5-37% a poluživot leka kod dece oko 20 minuta (Loo *et al.*, 1968). Lek 6-TG se daje u dozi od 20 mg/m^2 , a najveća koncentracija u plazmi je $0.03\text{-}5 \text{ }\mu\text{M}$ četiri sata posle primene (Brox *et al.*, 1981). Iskorišćenost 6-TG je takođe slaba, 14-46% (LePage *et al.*, 1971), a njegov poluživot iznosi oko 90 minuta (Konits *et al.*, 1982). AZA je zapravo 55% 6-MP i daje se u dozi od 2 mg/kg/dan . Koncentracija 6-MP u serumu, kao prvog metabolita AZA, je 75 ng/ml a poluživot je manji od dva sata (Chan *et al.*, 1990). Apsorpcija AZA u crevnom sistemu kreće

Uvod

se od 50-72% i kad se apsorbuje, 88% leka se brzo konvertuje u 6-MP i imidazolnu grupu (Ding *et al.*, 1979).

Metabolizam tiopurinskih lekova

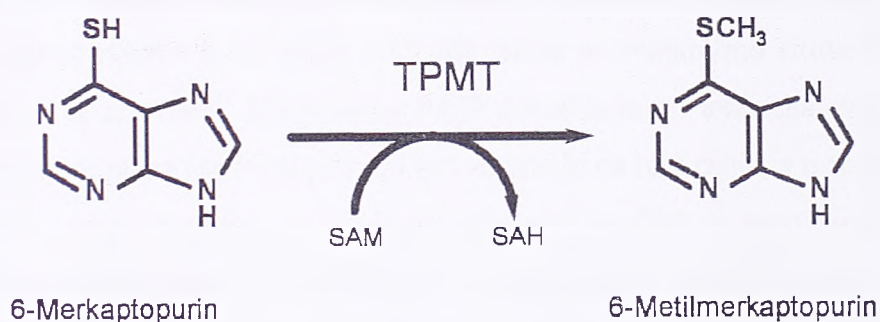
Kao što je već pomenuto, 6-MP i 6-TG se metabolički konvertuju do 6-TGN pre ispoljavanja svog citotoksičnog efekta. Metabolička konverzija započinje enzimom hipoksantin-guanin fosforiboziltransferazom (HGPRT, EC: 2.4.2.8). Nakon niza metaboličkih koraka se na kraju formiraju 6-TGN koji se ugrađuju u DNK i RNK. Svoj efekat inhibicije *de novo* sinteze purina, posle početne aktivacije HGPRT-om, 6-MP postiže konverzijom preko drugog metaboličkog puta (Slika 2).



Slika 2. Metabolizam tiopurinskih lekova. Skraćenice: AZA, azatioprin; 6-MP, 6-merkaptopurin; 6-TG, 6-tioguanin; AO, aldehydna oksidaza; XO, ksantin oksidaza; TPMT, tiopurin S-metiltansferaza; HGPRT, hipoksantin-guanin fosforiboziltransferaza; TGMP, tioguanozin monofosfat; TGDP, tioguanozin difosfat; TGTP, 6-tioguanozin trifosfat; 6-TGN, tioguaninski nukleotidi; deoksi-TGTP, deoksi-tioguanozin trifosfat; IMPDH, inozin monofosfat dehidrogenaza; TIMP, tiinozin monofosfat; TXMP, tioksantin monofosfat; GMPS, monofosfat sintetaza; MeTIMP, S-metil tiinozin monofosfat; MeMP, metil-

merkaptopurin; MeTGMP, metil tioguanozin monofosfat; MeTG, metil-tioguanin; 8-OHTG, 8-hidroksitioguanin.

Enzimi koji u početnom metabolizmu kompetiraju za supstrate 6-TG i 6-MP su HGPRT, tiopurin S-metiltransferaza (TPMT, EC 2.1.1.67), aldehidna oksidaza (AO, EC 1.1.3.13) i ksantin oksidaza (XO, EC 1.1.3.22). XO i AO proizvode metabolite koji imaju mali ili nikakav citotoksični efekat. Ako se 6-TG enzimom guanazom prevede u tioksantin, XO može da metaboliše ovakav supstrat i prevede ga u tiouričnu kiselinu. Aktivnost XO u hematopojetskom tkivu je veoma niska, praktično beznačajna. Zbog toga glavni put inaktivacije tiopurinskih lekova ide preko TPMT enzima. TPMT enzim u reakciji metilacije 6-MP koristi S-adenozil-L-metionin (SAM) kao donora metil grupe. Kao produkti reakcije nastaju S-adenozil-L-homocistein (SAH) i metil-6-MP (MeMP) (Slika 3) (Remy 1963).



Slika 3. S-metilacija 6-MP TPMT enzimom.

Nakon konverzije 6-TG enzimom HGPRT nastaje 6-tioguanozin monofosfat (TGMP) koji se uz pomoć fosfokinaza dalje prevodi do 6-tioguanozin difosfata i trifosfata (TGDP i TGTP) (slika 2) (Erb *et al.*, 1998; Coultard *et al.*, 1998). TGMP, TGDP i TGTP se jednim imenom nazivaju tioguaninski nukleotidi (6-TGN). TGDP se redukuje, potom kinazira i novonastali deoksi-6-TGTP se ugrađuje u DNK. Ugrađivanje 6-TGTP u RNK i deoksi-6-TGTP u DNK dovodi do smrti ćelije (Swann *et al.*, 1996). Metabolizam 6-MP do TGMP uključuje nekoliko enzima u svom putu. Posle početnog prevođenja 6-MP u TIMP (tioinozin monofosfat) koje obavlja HGPRT, enzim inozin monofosfat dehidrogenaza (IMPDH) prevodi TIMP do tioksantin monofosfata (TXMP). Uz pomoć guanozin monofosfat sintetaze (GMPS) TXMP postaje TGMP. Dalje je put do 6-TGN isti kao u metabolizmu 6-TG. TIMP može biti supstrat TPMT enzimu i nastali produkt S-metil tioinozin monofosfat (MeTIMP) ima jako inhibitorno dejstvo u *de novo*



sintezi purina (Tay *et al.*, 1969; Evans *et al.*, 1991; Vogt *et al.*, 1993; Erb *et al.*, 1998). Ovaj metabolički put ima veoma značajan doprinos citotoksičnom dejstvu 6-MP. Supstrat za TPMT enzim može biti i TGMP. Na ovaj način se toksični 6-TGN mogu inaktivirati izbacivanjem iz metaboličkog puta preko nastalog metabolita metil tioguanozin monofosfata (MeTGMP).

Uticaj nivoa aktivnosti TPMT enzima na citotoksičnost izazvanu tiopurinskim lekovima primećena je još 1987. godine (Van Loon *et al.*, 1987). Korišćene su primarne kulture leukocita ljudi kod kojih je aktivnost TPMT enzima bila poznata i upoređivan je citotoksični efekat 6-MP. Čelije sa niskom TPMT aktivnošću su bile otpornije na 6-MP nego one sa srednjom ili visokom. Pretpostavka je bila da je glavni mehanizam citotoksičnog dejstva 6-MP onaj preko metaboličkog puta inhibicije *de novo* sinteze purina. Novija istraživanja podržala su ovu hipotezu. Studija na humanoj limfoblastnoj T-ćelijskoj liniji MOLT-4 sa različitim koncentracijama 6-MP (2 μ M i 10 μ M) otkrila je mehanizme citotoksičnosti ovog leka (Bökkerink *et al.*, 1993). Manja doza 6-MP dovodila je do inhibicije *de novo* sinteze purina povećanjem nivoa MeTIMP i samim tim uticala je na rast ćelija, a u značajno manjoj meri do smrti ćelija. Dolazilo je do smanjenja sinteze DNK u koju su se ugrađivali novosintetisani 6-TGN. Sve ovo dovodilo je do zaustavljanja ćelijskog ciklusa u G2+M fazi. Sinteza RNK se prvobitno smanjila, potom se delimično oporavila. Kompletna konverzija 6-MP u 6-TIMP izvršena je u roku od 6 sati. Veća doza 6-MP dovodila je do citotoksičnosti već nakon 24 sata usled potpune inhibicije *de novo* sinteze purina i velike koncentracije MeTIMP. Sve ovo izazvalo je drastičniju inhibiciju sinteze DNK i zaustavljanje ćelijskog rasta u G2+M fazi, kao i citotoksičnost već 48 sati kasnije u S fazi (Bökkerink *et al.*, 1993). Eksperimenti overekspresije TPMT gena na humanoj leukemičnoj T-ćelijskoj liniji CCRF-CEM pokazali su da su ćelije koje ekspimiraju više TPMT proteina zaista manje osetljive na 6-TG. Obrnuto je primećeno kod tretmana lekom 6-MP. Čelije koje su ekspimirale više TPMT enzima bile su osetljivije na 6-MP (Dervieux *et al.*, 2001). Druga studija na model sistemu humane embrionske ćelijske linije bubrega HEK293 sa inducibilnom ekspresijom TPMT gena, pokazala je da su ćelije osetljivije na 6-MP i manje osetljive na 6-TG kad je nivo TPMT proteina u ćeliji visok (Coulthard *et al.*, 2002). U oba prethodna slučaja, porast u aktivnosti TPMT enzima bio je u direktnoj vezi sa porastom nivoa MeTIMP u ćelijama i smanjenjem inhibicije *de novo* sinteze purina. Na osnovu ovih rezultata može se zaključiti da je inhibicija

Uvod

de novo sinteze purina mehanizam citotoksičnosti za 6-MP kod ćelija koje eksprimiraju normalne ili visoke nivoe TPMT enzima.

Lek 6-MP ima uticaja na DNK i preko DNK metilacije. Otkako je otkriveno da je kod mnogih kancera poremećena normalna metilacija DNK i da hipermetilacija promotorskih regiona gena može da ima za posledicu aktivaciju onkogena ili supersiju tumor supresujućih gena (Baylin 2006), postalo je važno proveriti moguće dejstvo postojećih terapijskih agensa na redukciju DNK metilacije (Szyf 2005; Lyko *et al.*, 2005; Stresemann *et al.*, 2006; Yoo *et al.*, 2006). Lekovi azanukleotidi koji se koriste u terapiji hematoloških maligniteta, inhibiraju DNK metiltransferaze (DNMT) koje DNK metiluju (Hermann *et al.*, 2004; Buryanov *et al.*, 2005; Bhalla 2005; Brenner *et al.*, 2006). DNMT koriste S-adenozilmetionin (SAM) kao donora metil grupe za metilaciju citozinskih nukleotida u DNK, i tada se SAM konvertuje u S-adenozilhomocistein (SAH) (Chiang *et al.*, 1996). Nekoliko studija je pokazalo da nivoi SAM i SAH, tačnije SAM/SAH odnos, utiču na promene u metilaciji DNK (Garcea *et al.*, 1989; Yi *et al.*, 2000; Castro *et al.*, 2005), kao i da SAH inhibitorno deluje na aktivnost DNMT (Hoffman *et al.*, 1979). 6-MP utiče na metilaciju DNK posredno. Naime, porast nivoa MeTIMP intermedijera u metabolizmu 6-MP utiče na smanjenje adenzin trifosfata (ATP) u ćeliji (Vogt *et al.*, 1993; Stet *et al.*, 1995). ATP je prekursor SAM pa smanjenje ATP utiče na smanjenje SAM i samim tim na smanjenje metilacije DNK kod ćelijske linije MOLT-4 pod tretmanom 6-MP (Stet *et al.*, 1994). Pošto nivo TPMT enzima u ćeliji tretiranoj tiopurinskim lekovima utiče na inhibiciju *de novo* sinteze purina, moguće je i da utiče na SAM/SAH nivo i posredno na metilaciju DNK. I zaista, pokazano je da i 6-MP i 6-TG utiču na globalno smanjenje metilacije DNK u ćelijama i da je važniji mehanizam smanjenje DNMT aktivnosti, pre nego uticaj na promene u SAM/SAH odnosu (Hogarth *et al.*, 2008).

TPMT

Tiopurin S-metiltransferaza (TPMT: EC 2.1.1.67) je monomerni citosolni enzim koji katalizuje S-metilaciju aromatičnih heterocikličnih sulfhidrilnih jedinjenja. U ova jedinjenja spadaju i citotoksični i imunosupresivni tiopurinski lekovi kao 6-merkaptopurin (6-MP), azatioprin (AZA) i tioguanin (6-TG) (Weinshilboum *et al.*, 1978; McLeod *et al.*, 1995a; Krynetski *et al.*,

1996; Weinshilboum *et al.*, 1980). Molekulska težina TPMT proteina je 28,18 kDa i izgrađuje ga 245 aminokiselina. Tiopurinski lekovi se primenjuju u terapiji mnogih bolesti uključujući dečiju akutnu limfoblastnu leukemiju (ALL), inflamatorne bolesti creva i prilikom transplantacije organa (Paterson *et al.*, 1975; Lennard 1992). Kao i mnogi drugi citotoksični lekovi, merkaptopurinski lekovi imaju relativno mali terapijski indeks (odnos između količine terapeutika koji utiče na povoljan ishod terapije i količine koja dovodi do smrti ćelija). Najčešće, i po život ozbiljne komplikacije izazvane toksičnošću ovih lekova su hematopoetske komplikacije – mijelosupresija (Lennard *et al.*, 1987; Evans *et al.*, 1991; Lennard 1992).

Tiopurinski lekovi ubrzo nakon unošenja u organizam čoveka podležu S-metilaciji kao metaboličkom putu njihove inaktivacije (Elion 1967). Prve studije o enzimu koji katalizuje ove reakcije rađene su ranih 1960-tih na pacovskim tkivima (Remy 1963). Ubrzo, već kasnih 1970-tih, aktivnost TPMT enzima je potvrđena i u tkivima čoveka i to najpre u lako dostupnim ćelijama - eritrocitima (Weinshilboum *et al.*, 1978). Prva velika farmakogenetička studija na populaciji belaca pokazala je trimodalnu distribuciju aktivnosti ovog enzima: 89% populacije ima visoku (eng. high methylators-HM, jaki metilatori), 11% srednju (eng. intermediate methylators-IM, umereni metilatori) i 0.3% nisku ili čak nemerljivu aktivnost TPMT enzima (eng. low methylators-LM, slabi metilatori) (Weinshilboum *et al.*, 1980). Ovako pravilna distribucija aktivnosti TPMT enzima može se objasniti klasičnim Mendelovim genetičkim zakonima o dominantno-recesivnom nasleđivanju, odnosno postojanjem genetičkih polimorfizama. Međutim, populaciona studija o aktivnosti TPMT enzima u eritrocitima u populaciji istočne Azije se drastično razlikovala od prethodne, nije pokazala istu trimodalnu distribuciju (Jang *et al.*, 1996; Park-Hah *et al.*, 1996). Distribucija TPMT aktivnosti u populaciji istočne Azije bila je bimodalna. Usledili su eksperimenti koji su imali za cilj biohemijsku karakterizaciju osobina TPMT enzima (Woodson *et al.*, 1983a; Woodson *et al.*, 1983b; Ames *et al.*, 1986). Potvrđeno je takođe da genetički utvrđena aktivnost TPMT enzima u eritrocitima pokazuje direktnu srazmernost nivou aktivnosti TPMT enzima i drugih imunoreaktivnih proteina u ćelijama bubrega, jetre i limfocita čoveka (Szumlanski *et al.*, 1992; Van Loon *et al.*, 1982; Woodson *et al.*, 1982).

Prirodni supstrat TPMT enzima nije poznat, iako se enzim eksprimira u skoro svim tkivima čoveka (Weinshilboum *et al.*, 1978). Jedino istraživanje koje je delimično pokrenulo ovo pitanje je studija u kojoj je u plazmi bolesnika sa hroničnim oboljenjem bubrega dokazano prisustvo metil-akceptorskog supstrata TPMT enzima (Pazmino *et al.*, 1980). Nije potvrđeno jedino da li je taj supstrat bio endogenog ili egzogenog porekla.

Upredo sa istraživanjima biohemijskih svojstava TPMT enzima paralelno se radilo i na proučavanju biotransformacije tiopurinskih lekova kod čoveka. Pokazano je da su tiopurini pro-lekovi koji se metabolički aktiviraju prevođenjem u 6-tioguaninske nukleotide (6-TGN) (Lennard *et al.*, 1983a). Izmereni nivo 6-TGN u eritrocitima je u direktnoj srazmeri sa tiopurinskim terapijskim efektom i izazvanom toksičnošću (Lennard *et al.*, 1983b). Primećeno je da pacijenti koji su uzimali iste ili slične doze tiopurinskih lekova imaju vrlo različite koncentracije 6-TGN u eritrocitima. Iako su tiopurini supstrat za nekoliko metaboličkih puteva definitivno je potvrđeno da je za individualne razlike u koncentracijama 6-TGN odgovorna genetički determinisana aktivnost TPMT enzima (Lennard *et al.*, 1987; Lennard *et al.*, 1990). Konkretno, veća aktivnost enzima TPMT znači da će nivo 6-TGN u eritrocitima biti manji i obrnuto. Ubrzo su studije na pacijentima pokazale da kod onih sa genetički determinisanom niskom ili nemerljivom aktivnošću TPMT enzima tretiranih "standardnim" dozama ovih lekova dolazi do razvoja po život opasne tiopurinske toksičnosti (Lennard *et al.*, 1989). Pacijenti sa genetički determinisanom veoma visokom TPMT aktivnošću tretirani "standardnim" dozama ovih lekova kao da nemaju nikakvu reakciju na lek (Lennard *et al.*, 1990). Sve ovo navodi na mogućnost da bi nivo aktivnosti TPMT enzima možda mogao nekako biti indukovan prilikom davanja hronične terapije pacijentima. Utvrđeno je da nivo enzimske aktivnosti u eritrocitima opada 25% posle završetka terapije pacijenata obolelih od leukemije, što ukazuje da je tokom hronične terapije bio povećan (Lennard *et al.*, 1990). Utvrđeno je takođe da je aktivnost TPMT enzima za 8.3% veća kod zdravih muškaraca nego kod žena (Klemetsdal *et al.*, 1993).

Studije na velikom broju pacijenata i kod različitih oboljenja kod kojih se u terapiji koriste tiopurinski lekovi: ALL (Evans *et al.*, 1991; Weinshilboum *et al.*, 1999; Relling *et al.*, 1999; McLeod *et al.*, 2000; Kham *et al.*, 2002), dermatološke bolesti (Anstey *et al.*, 1992), transplantacije srca (Schutz *et al.*, 1993) i bubrega (Escousse *et al.*, 1995), reumatoidni

artritis (Kerstens *et al.*, 1995), autoimuni hepatitis (Ari *et al.*, 1995), inflamatorne bolesti creva (Colombel *et al.*, 2000; Schwab *et al.*, 2002; Kaskas *et al.*, 2003) su redom sve potvrdile vezu između niske aktivnosti TPMT enzima u eritrocitima i tiopurinske toksičnosti. Ova toksičnost je posledica prisustva mutacija u genu za TPMT u homozigotnoj formi. Iako neke studije ne podržavaju ovu tvrdnju (McLeod *et al.*, 1999), u skorije vreme je pokazano da heterozigotni nosioci neke od mutacija u genu za TPMT takođe imaju povećan rizik od pojave hematopoetske toksičnosti (Black *et al.*, 1998; Relling *et al.*, 1999; Dokmanovic *et al.*, 2006).

Tokom biohemijske karakterizacije TPMT enzima 1980-tih godina primećeno je da derivati benzojeve kiseline kao što je salicilna kiselina pokazuju veoma snažnu inhibiciju TPMT enzima (Woodson *et al.*, 1983b, Ames *et al.*, 1986). Prve studije o mogućim interakcijama tiopurina i TPMT inhibitora (derivati aminosalicilne kiseline) na pacijentima, rađene su kod bolesnika obolelih od inflamatorne bolesti creva (Griffin *et al.*, 1995; Hanauer 1996). Lek sulfasalazin i drugi slični derivati aminosalicilne kiseline koji se koriste u terapiji ove bolesti *in vitro* su veoma jaki inhibitori rekombinantnog humanog TPMT enzima (Szumlanski *et al.*, 1995). Prijavljen je i jedan slučaj gde je pacijent imao mijeloidnu toksičnost zbog istovremene primene tiopurina sa lekovima derivatima aminosalicilne kiseline (Lewis *et al.*, 1997). Ovakvi pacijenti se tretiraju kao osobe sa genetski determinisanom niskom aktivnošću TPMT enzima, "fenokopije".

TPMT polimorfizmi mogu da imaju i druge medicinske implikacije. Naime, nekoliko studija je pokazalo da je smanjeni nivo TPMT aktivnosti faktor rizika za pojavu sekundarnih mijelodisplastičnih sindroma ili akutne mijeloidne leukemije kod pacijenata "izlečenih" od dečije akutne limfoblastne leukemije (Relling *et al.*, 1998; Thomsen *et al.*, 1999).

Gen za TPMT

Gen za TPMT čoveka otkriven je primenom "klasične" strategije molekularne biologije. Najpre je prečišćen i afinitetno obeležen TPMT enzim iz bubrega čoveka i dobijena je parcijalna aminokiselinska sekvenca (Van Loon *et al.*, 1992). Ovako dobijena informacija

poslužila je za uspješno kloniranje cDNK TPMT čoveka (Honchel *et al.*, 1993). Northern blot analiza sa cDNK TPMT kao probom pokazala je da se ovaj enzim eksprimira u mnogim tkivima čoveka (Lee *et al.*, 1995). Okarakterisan je prvo pseudogen za TPMT na hromozomu 18q.21.1 sa sekvencom veoma sličnom sekvenci gena za TPMT, samo bez introna (Lee *et al.*, 1995). Gen za TPMT čoveka kloniran je, mapiran i sekvenciran korišćenjem egzon- i intron-specifičnih prajmera iz kozmidne biblioteke hromozoma 6 (Szumlanski *et al.*, 1996). FISH analize su pokazale prisustvo TPMT-homologe sekvence na kratkom kraku hromozoma 6 čoveka, tačnije gen za TPMT je mapiran na hromozomu 6p22.3 (Szumlanski *et al.*, 1996). Gen obuhvata region od 34 kb i 10 egzona, od kojih 8 kodira protein. PCR pretraživanjem fagne biblioteke, PAC biblioteke, (eng. PAC- phage artificial chromosome) izolovana su dva različita PAC klona i oba su sadržala isti region od 25 kb sa 9 egzona koji obuhvataju ceo TPMT otvoreni okvir čitanja (Krynetski *et al.*, 1997). Strukturne karakteristike su pokazale izvesne razlike u poređenju sa genom za TPMT prethodno izolovanim iz humane genomske biblioteke hromozoma 6 (Szumlanski *et al.*, 1996). Naime, postojalo je dodatnih 17 bp u 5' nekodirajućem regionu - pretpostavljenom promotoru na mestu koje je 77 nukleotida uzvodno od mesta početka transkripcije (Krynetski *et al.*, 1997). Takođe je intron 8 bio 5 kb kraći od prethodno prijavljenog, a postojalo je i nekoliko nukleotidnih razlika u TPMT otvorenom okviru čitanja.

Sekvenca gena za TPMT čoveka može se pronaći u bazama podataka dostupnim na internetu NCBI Reference Sequence: [NG_012137](#) (DNK) | [NM_000367](#) (mRNK), GeneBank: 7172 ili MIM: 187680.

Polimorfizmi u genu za TPMT

Polimorfizmi u genu za TPMT su uglavnom povezani sa smanjenom aktivnošću TPMT enzima. U ovom radu ćemo koristiti i termin mutacija, naročito ako polimorfizam ima uticaja na promenu u aktivnosti enzima. Do sada je identifikovano 25 polimorfizama. Usvojena je konvencija po kojoj se nemutirani gen (normalni alel) označava sa TPMT*1. Takođe se još dva alela smatraju nemutiranim jer oba imaju promene koje ne dovode do zamene aminokiselina u TPMT proteinu, tzv. tihe mutacije (eng. silent mutations). To su TPMT*1A sa

tranzicijom c.178C>T u egzonu 1 koji se inače ne translira (Spire-Vayron de la Moureyre *et al.*, 1998b) i TPMT*1S koji ima tranziciju c.474T>C u egzonu 7, p.Ile¹⁵⁸ (Alves *et al.*, 1999). Polimorfni geni (polimorfni aleli) se označavaju TPMT*2-26 po redosledu kojim su ovi polimorfizmi otkriveni:

- ✓ TPMT*2: Transverzija c.238G>C, p.Ala80Pro (Krynetski *et al.*, 1995). Ekspresija ovog mutiranog alela u kvascu pokazuje 20 puta manju koncentraciju iRNK u poređenju sa normalnim alelom takođe eksprimiranim u kvascu (Tai *et al.*, 1997). Ova mutacija utiče na ubranu degradaciju TPMT proteina i nema uticaja na procese transkripcije i translacije.
- ✓ TPMT*3A: Dve udružene tranzicije c.460G>A (p.Ala¹⁵⁴Thr) i c.719A>G (p.Tyr²⁴⁰Cys). Ekspresija ovog mutiranog alela u kvascu pokazuje 200 puta manju koncentraciju proteina ali istu koncentraciju iRNK u poređenju sa normalnim alelom takođe eksprimiranim u kvascu (Tai *et al.*, 1997). Period poluraspada ovako mutiranog proteina iznosi 15 minuta za razliku od normalnog proteina kod koga je period poluraspada 18 sati.
- ✓ TPMT*3B: Tranzicija c.460G>A, p.Ala154Thr (Szulmanski *et al.*, 1996; Tai *et al.*, 1996). Ekspresija ovako mutiranog alela u kvascu pokazuje 4 puta manju koncentraciju TPMT proteina u poređenju sa normalnim alelom takođe eksprimiranom u kvascu.
- ✓ TPMT*3C: Tranzicija c.719A>G, p.Tyr²⁴⁰Cys (Szulmanski *et al.*, 1996; Tai *et al.*, 1996).
- ✓ TPMT*3D: TPMT*3A alel sa dodatnom transverzijom c.292G>T dovodi do preranog formiranja stop kodona (Otterness *et al.*, 1997).
- ✓ TPMT*4: Tranzicija G>A na granici između devetog introna i desetog egzona (Otterness *et al.*, 1998). Mutacija kreira novo kriptično splajs mesto u intronu 9.
- ✓ TPMT*5: Tranzicija c.146T>C, p.Leu⁴⁹Ser (Otterness *et al.*, 1997).
- ✓ TPMT*6: Transverzija c.539A>T, p.Tyr¹⁸⁰Phe (Otterness *et al.*, 1997). Ova mutacija pronađena je kod pacijenta iz Koreje.
- ✓ TPMT*7: Transverzija c.681T>G, p.His²²⁷Glu (Spire-Vayron de la Moureyre *et al.*, 1998b). Ova mutacija pronađena je kod samo jednog pacijenta iz Evrope.
- ✓ TPMT*8: Tranzicija c.644G>A, p.Arg215His (Hon *et al.*, 1999).
- ✓ TPMT*9: Transverzija c.356A>C, p.L^{ys119}Thr (Schaeffeler *et al.*, 2004).
- ✓ TPMT*10: Transverzija c.430G>C, p.Gly¹⁴⁴Arg (Colombel *et al.*, 2000).

- ✓ TPMT*11: Tranzicija c.395G>A, p.Cys¹³²Tyr (Schaeffeler *et al.*, 2003).
- ✓ TPMT*12: Tranzicija c.374C>T, p.Ser¹²⁵Leu (Hamdan-Khalil *et al.*, 2003).
- ✓ TPMT*13: Transverzija c.83A>T, p.Glu²⁸Val (Hamdan-Khalil *et al.*, 2003)
- ✓ TPMT*14: Tranzicija c.1A>G, p.Met¹Val (Lindqvist *et al.*, 2004). Dolazi do poremećaja translacionog inicijacionog kodona.
- ✓ TPMT*15: Delecija nukleotida 419 do 494 u egzonu 7 za posledicu ima gubitak 25 aminokiselina u TPMT proteinu od 140 do 165. Dolazi do isecanja celog egzona 7 (Lindqvist *et al.*, 2004).
- ✓ TPMT*16: Tranzicija c.488G>A, p.Arg¹⁶³His (Schaeffeler *et al.*, 2004).
- ✓ TPMT*17: Transverzija c.124C>G, p.Gln⁴²Glu (Schaeffeler *et al.*, 2004).
- ✓ TPMT*18: Transverzija c.211C>A, p.Gly⁷¹Arg (Schaeffeler *et al.*, 2004).
- ✓ TPMT*19: Transverzija c.365A>C, p.Lys¹²²Thr (Hamdan-Khalil *et al.*, 2005). *In vitro* studija pokazala je da je aktivnost TPMT enzima koji nosi ovaj polimorfizam u nivou sa aktivnošću enzima koji nema nikakvu mutaciju, što je potvrđeno i upoređivanjem sa kliničkim podacima kod pacijenta kod koga je otkriven. Zbog toga se TPMT*19 može smatrati funkcionalno aktivnim alelom.
- ✓ TPMT*20: Tranzicija c.712A>G, p.Lys²³⁸Glu (Schaeffeler *et al.*, 2006). Zanimljivo je da je grupa iz Japana u isto vreme opisala novi TPMT*20 alel, potpuno drugačiji od ovog: transverzija c.106G>A, p.Glu³⁶Ser (Sasaki *et al.*, 2006). Rad Schaeffeler *et al.* 2006. objavljen je 27. februara 2006, a grupa iz Japana je predala svoj rad časopisu 10. februara 2006. Grupa iz Japana je u istom radu opisala još dva nova polimorfizma koja ne dovode do aminokiselinske zamene u proteinu i oni nisu dobili TPMT* brojeve. Prvi polimorfizam nalazi se u egzonu 10, c.967A>G, a drugi u intronu 8, -87C>T.
- ✓ TPMT*21: Transverzija c.205C>G, p.Leu⁶⁹Val (Schaeffeler *et al.*, 2006).
- ✓ TPMT*22: Transverzija c.488G>C, p.Arg¹⁶³Pro (Schaeffeler *et al.*, 2006).
- ✓ TPMT*23: Transverzija c.500C>G, p.Ala¹⁶⁷Gly (Lindqvist *et al.*, 2007).
- ✓ TPMT*24: Transverzija c.537G>T, p.Gln¹⁷⁹His (Garat *et al.*, 2008).
- ✓ TPMT*25: Tranzicija c.634T>C, p.Cys²¹²Arg (Garat *et al.*, 2008).
- ✓ TPMT*26: Tranzicija c.622T>C, p.Phe²⁰⁸Leu (Kham *et al.*, 2009). Mutacija je otkrivena kod tri blizanca u Kini.

Učestalost TPMT alela

Nemutirani TPMT*1 alel javlja se sa učestalošću od oko 93% u populacijama belaca (Spire-Vayron de la Moureyre *et al.*, 1998a). Dosadašnja populaciona istraživanja su pokazala da 3 mutirana alela (TPMT*2, TPMT*3A i TPMT*3C) čine 80-95% svih dijagnostifikovanih slučajeva sa srednjom ili niskom aktivnošću TPMT enzima (Yates *et al.*, 1997; McLeod *et al.*, 2000). U populaciji belaca, najučestaliji mutirani alel je TPMT*3A (Yates *et al.*, 1997; Spire-Vayron de la Moureyre *et al.*, 1998a), i on predstavlja 85% svih mutiranih alela. Alel TPMT*3C je najučestaliji u populaciji Laponaca u severnoj Norveškoj (Loennechen *et al.*, 2001) i jedini mutirani alel detektovan u populacijama Afrike i crnaca u Americi (Hon *et al.*, 1999) i populacijama Azije (Otterness *et al.*, 1997; Ameyaw *et al.*, 1999; Collie-Duguid *et al.*, 1999; McLeod *et al.*, 1999; Hongeng *et al.*, 2000; Kham *et al.*, 2002). Postavlja se pitanje zašto je to tako i koje je poreklo ove dve najčešće alelske varijante. Studija koja je razmatrala učestalosti TPMT varijanti širom sveta pokazala je da je TPMT*3A mlađi alel od TPMT*3C. Alel TPMT*3A je nastao pre 5700 godina u doba neolita u periodu za koji je bilo karakteristično širenje populacija najverovatnije iz njihovih mesta porekla, zapadnih Evroazijskih populacija (Alves *et al.*, 2004). Širom sveta rasprostranjeni alel TPMT*3C je nastao ranije, pre oko 14000 godina (Ameyaw *et al.*, 1999; Alves *et al.*, 2004).

Funkcionalne analize TPMT alozima

Funkcionalnom karakterizacijom i ekspresijom u humanim ćelijama i kvašćevom sistemu (Tai *et al.*, 1997; Otterness *et al.*, 1997, Hamdan-Khalil *et al.*, 2003, Lindqvist *et al.*, 2004, Schaeffeler *et al.*, 2006, Ujiie *et al.*, 2008), pokazano je da aleli TPMT*2, TPMT*3A, TPMT*5, TPMT*12, TPMT*14, i TPMT*22 kodiraju TPMT enzime koji imaju veoma smanjenu aktivnost u odnosu na nemutirani TPMT*1 alel, a TPMT*18 alel kodira enzim koji ima neznatno smanjenu aktivnost u odnosu na nemutirani alel. Aleli TPMT*9, TPMT*19 i TPMT*24 eksprimiraju TPMT proteine čija se aktivnost statistički ne razlikuje od aktivnosti normalnog enzima (Hamdan-Khalil *et al.*, 2005; Garat *et al.*, 2008). Mutacije u alelima TPMT*4 i TPMT*15 uzrokuju alternativnu obradu TPMT iRNK i kao posledicu toga smanjenje u

Uvod

ekspresiji TPMT enzima. Oni spadaju u tzv. kvantitativne mutacije (Otterness *et al.*, 1998; Lindqvist *et al.*, 2004).

Molekularni mehanizam koji utiče na smanjenje TPMT aktivnosti je izučavan kod najčešćih mutiranih TPMT varijanti. Studije ekspresije TPMT*2 i TPMT*3A alela pokazale su da oba alela imaju oko 100 puta manju ekspresiju od nemutiranog TPMT*1 alela (Tai *et al.*, 1997). Takođe, ekspresija mutiranih gena za TPMT*2 i TPMT*3A nije bila u korelaciji sa aktivnošću proteina TPMT*2 i TPMT*3A. Mehanizam ubrzane degradacije proteina TPMT*2 i TPMT*3A je odgovoran za smanjenje nivoa TPMT proteina i samim tim za smanjenje katalitičke moći enzima (Tai *et al.*, 1997). Detaljnija istraživanja potvrdila su da u ubrzanoj degradaciji TPMT*3A proteina preko ubikvitin-posredovanog sistema učestvuju molekularni šaperoni iz familije heat shock proteina: hsp70 i hsp90 i košaperon hop (eng. Hsp70/Hsp90 organizing protein - hop) (Wang *et al.*, 2003). Šaperon hsp90 je najvažniji za obeležavanje proteina za degradaciju preko ubikvitin-posredovanog sistema kako nemutiranog TPMT proteina tako i mutiranih TPMT alozima. Ova saznanja navela su na ideju da je TPMT*3A protein pogrešno savijen u svojoj nativnoj konformaciji (eng. misfolded) i da ga sistem kontrole kvaliteta ćelije prepoznaje i obeležava za degradaciju (Weinshilboum *et al.*, 2004). Pokazano je da pogrešno savijeni proteini mogu da se nakupljaju u agregomima, citoplazmatičnim strukturama u kojima se agregiraju ovakvi višestruko ubikvitirani proteini (Johnston *et al.*, 1998). I zaista, za TPMT*3A alozim je dokazano da pogrešno savijanje proteina dovodi do formiranja agregoma u COS-1 ćelijama (Wang *et al.*, 2005). Rezultat ovakvih procesa u ćeliji je dinamički balans između pravilnog savijanja proteina, njegove degradacije i formiranja agregata (Wickner *et al.*, 1999). Identifikovani su i geni koji učestvuju u balansiranju ovih procesa. Korišćenjem genske delecione biblioteke kvasca *Saccharomyces cerevisiae* identifikovano je 24 gena u nekoliko funkcionalnih kategorija koji su odgovorni za balans između agregacije i degradacije TPMT*3A proteina (Li *et al.*, 2008). Identifikovani geni kodiraju proteinske produkte uključene u sistem ubikvitin-zavisne degradacije proteina, transport vezikula kroz ćeliju i degradaciju molekula u lizozimima. Ovi nalazi ukazali su na mehanizam autofagije kao jedan od važnijih mehanizama degradacije TPMT*3A proteina (Li *et al.*, 2008).

Struktura TPMT enzima

Protein TPMT je kristalisan samostalno ili u kompleksu sa donorom metil grupe (SAM) i određena mu je 3D struktura u rezoluciji 1.89 i 1.58 Å, respektivno (PDB: 2BZG) (Slika 4) (Wu *et al.*, 2007). Aminokiselinske zamene u TPMT proteinu kao posledica polimorfizama u TPMT genu rasute su po celom proteinu. Međutim, aminokiseline čijom zamenom se ostvaruje najveći uticaj na smanjenje aktivnosti TPMT enzima su one koje učestvuju u interakcijama intra-molekulske stabilizacije proteina (uglavnom van der Waalsove interakcije). Molekularni mehanizam smanjenja aktivnosti TPMT proteina proučen je i na atomskom nivou, molekularno-dinamičkim simulacijama. TPMT*2 protein ima Ala⁸⁰Pro zamenu koja narušava α 3 heliks na granici aktivnog mesta i prekida nekoliko jonskih veza što za posledicu ima otvaranje veoma velikog žljeba na proteinu (Rutherford *et al.*, 2008). TPMT*3B protein ima Ala¹⁵⁴Thr zamenu koja se nalazi unutar mesta vezivanja proteina za supstrat. Ovaj Thr takođe menja pozicije drugih aminokiselina uključenih u vezivanje supstrata (Pro⁶⁸, Leu⁶⁹, Tyr¹⁶⁶) i tako se površina ovog polimorfnog mesta izložena rastvaraču povećava. Ovaj rearanžman mesta za vezivanje supstrata je uzrok skoro potpune neaktivnosti proteina TPMT*3B. TPMT*3C protein ima Tyr²⁴⁰Cys zamenu koja se nalazi u β -ploči 9, udaljenoj od aktivnog mesta enzima. TPMT*3A protein, koji sadrži udružene zamene Ala¹⁵⁴Thr i Tyr²⁴⁰Cys, je u odnosu na nemutirani protein zaravnjen, blago deformisan sa velikom površinom na mestu vezivanja supstrata za enzim izloženom rastvaraču. Aminokiseline na mestima 154 i 240, koje pogađaju mutacije u TPMT*3A alozimu su međusobno vezane vodoničnim vezama (Rutherford *et al.*, 2008).



Slika 4. Trakasti (eng. ribbon) model strukture TPMT enzima čoveka (PDB: 2BZG). β ploče su predstavljene zelenom bojom i obeležene brojevima, α heliksi su predstavljeni svetlo plavom i obeleženi latiničnim slovima, a N-terminalni α A i heliks α H umetnuti između ploča β 8 i β 9 su prikazani žutom bojom. Najčešći polimorfizmi su predstavljeni crvenom bojom. Vezani SAM je prikazan klasičnim modelom pomoću kuglica i štapića (ugljenikovi atomi – sivo, azot – plavo, kiseonik – crveno i sumpor - žuto).

Proučen je i mehanizam vezivanja supstrata za TPMT enzim. Korišćene su kristalne strukture mišijeg TPMT (mTPMT) proteina (PDB 3BGI) (Peng *et al.*, 2008). Mišiji protein je dobar model sistem s obzirom da prethodni pokušaji ko-kristalizacije sa akceptorskim supstratom za humani protein nisu uspeli a 80% sekvence mišijeg i humanog TPMT (hTPMT) proteina je identično (Wu *et al.*, 2007). Dobijene su dve kristalne strukture mTPMT, binarni kompleks sa SAM u rezoluciji 1.8 Å, i tercijarni kompleks sa SAM i 6-MP kao supstratom, u rezoluciji 2 Å (Peng *et al.*, 2008). Poređenjem ovih struktura otkriveno je da po vezivanju 6-MP za enzim, aktivno mesto enzima postaje više uređeno. Reakcija metilacije teče po modelu standardne bimolekularne nukleofilne supstitucije. Aminokiseline Arg¹⁵² i Arg²²¹ (u hTPMT), jedine polarne aminokiseline u blizini 6-MP, su najverovatniji učesnici u deprotonizaciji supstrata. Ako je jedna od ove dve aminokiseline izmenjena, druga to na neki način kompenzuje. Arg¹⁵² stupa u interakciju sa supstratom direktno (Peng *et al.*, 2008).

TPMT u kliničkoj praksi

TPMT fenotip i genotip se mogu odrediti na više načina. Fenotipska analiza aktivnosti TPMT enzima može biti urađena putem eseja radiohemijske aktivnosti (McLeod *et al.*, 1995b; Weinshilboum *et al.*, 1978), ili esejem zasnovanom na HPLC metodi (Kroplin *et al.*, 1998). Genotipizacija se vrši metodama zasnovanim na PCR-u (Yates *et al.*, 1997; Coulthard *et al.*, 1998), denaturišućem HPLC-u (Hall *et al.*, 2001; Schaeffeler *et al.*, 2001), RQ-PCR-u (Lindqvist *et al.*, 2003), kombinaciji mikročipa i sekvenciranja (eng. arrayed primer extension - APEX) (Yi *et al.*, 2002), molekularnoj haplotipskoj analizi (McDonald *et al.*, 2002) i pirosekvenciranju (Haglund *et al.*, 2004).

Metode zasnovane na PCR reakciji koriste se za detekciju najčešćih varijantnih TPMT alela koji pokazuju smanjene aktivnosti za određenu populaciju. Ove analize su od velike pomoći kod identifikovanja osoba sa velikim rizikom od razvoja potencijalno fatalne hematotoksičnosti izazvane tiopurinskim lekovima. Naime, pacijenti sa smanjenom aktivnošću TPMT enzima tretirani standardnim dozama lekova će u 100% slučajeva razviti mijelosupresiju (Schwab *et al.*, 2001; Evans *et al.*, 2001; Schwab *et al.*, 2002; Slanar *et al.*, 2008). Zato je od ogromnog značaja pre tretmana tiopurinima odrediti aktivnost TPMT enzima, merenjem u eritrocitima ili genetički. Merenje aktivnosti TPMT enzima u eritrocitima je do nedavno bilo veoma skupo i relativno nedostupno pacijentima. Saglasnost između merenja aktivnosti i predikcije aktivnosti korišćenjem metoda molekularne genetike je čak 95% (McLeod *et al.*, 2000; Schwab *et al.*, 2001). Zato se metodama molekularne genetike brzo i uspešno može odrediti prisustvo polimorfizama u genu za TPMT i tako primeniti odgovarajuće lečenje. Pacijentima heterozigotnim nosiocima mutacija u genu za TPMT se doza tiopurinskih lekova umanjuje za 25-50% (Weinshilboum 2001, Krynetski *et al.*, 2003 ; Weinshilboum 2003; Dokmanović *et al.*, 2008), a posle nekog vremena se povećava postepeno do pune doze (Dokmanović *et al.*, 2006). Kod 1 – 2% pacijenata koji imaju izrazito visoku aktivnost TPMT enzima daju se i do 50% veće doze lekova od standardne. Čak i tako, često ne reaguju na terapiju (Spire-Vayron de la Moureyre *et al.*, 1998a; Schaeffeler *et al.*, 2004; Dokmanović *et al.*, 2006).

Iako većina varijantnih alela gena za TPMT menja enzim u samo jednoj aminokiselini u odnosu na normalni, trimodalna distribucija aktivnosti enzima je kontinuirana. Ne postoji jasna

granica između niske i srednje, odnosno srednje i visoke TPMT aktivnosti. Čak i osobe sa normalno visokom aktivnošću enzima pokazuju različite enzimске aktivnosti, i te razlike jesu genetički determinisane (Vuchetich *et al.*, 1995). Sve ovo dovodi do zaključka da postoje polimorfizmi van kodirajućeg regiona gena za TPMT koji utiču na aktivnost enzima. Istraživanja su se pre svega usredsredila na promotorski region gena za TPMT.

PROMOTOR EUKARIOTSKIH GENA

Kod eukariota, transkripciju gena koji kodiraju proteine vrši kompleksna mreža faktora koji uključuju DNK-vezujuće proteine koji prepoznaju specifične sekvence na DNK, transkripcione koregulatore, faktore koji remodeluju hromatin, enzime koji kovalentno modifikuju histone i druge proteine, i bazalnu transkripcionu mašineriju (Struhl 1999). Najviše informacija o regulaciji transkripcije nekog gena zapisano je u DNK sekvenci promotorskog regiona. Ovaj regulatorni region nalazi se u neposrednoj blizini mesta na kome započinje transkripcija gena. Promotor gena, po pravilu, čine dve klase regulatornih elemenata: jezgro promotora i regulatorni elementi uzvodno od promotorskog jezgra za koje se vezuju specifični transkripcioni faktori. Jezgro promotora obuhvata mesto početka transkripcije i sastoji se od funkcionalnih elemenata u koje spadaju TATA-blok, inicijator (Inr), faktor koji prepoznaje transkripcioni faktor IIB (BRE eng. transcription factor IIB recognition element), nizvodni promotorski element (DPE eng. downstream promoter element), MTE (MTE eng. motif ten element).

TATA-blok je po pravilu lociran oko 30 nukleotida uzvodno od mesta otpočinjanja transkripcije i za ovu sekvencu se vezuje TATA-vezujući protein, TBP (TBP eng. TATA-box binding protein), subjedinica TFIID kompleksa. TBP je univerzalni transkripcioni faktor i uključen je u transkripcije posredovane RNK polimerazama I, II i III. Njegov karboksiterminalni domen kojim se direktno vezuje za DNK je konzervisan kod različitih vrsta i ova interakcija izaziva savijanje molekula DNK oko TATA-bloka. Aminoterminalni domeni TBP kod različitih vrsta učestvuju u interakcijama sa drugim transkripcionim faktorima (Hernandez 1993). TBP ima ulogu organizacionog centra za formiranje preinicijacionog kompleksa za otpočinjanje transkripcije. Osim TBP, sedam subjedinica TFIID je poznato. To

Uvod

su opšti transkripcioni faktori, TAF-ovi (TAF eng. TBP-associated factors). Kada je TBP vezan za promotor i kada je otpočela organizacija preinicijacionog kompleksa, TAF-ovi se vezuju tačno određenim redosledom: D, B, F, polimeraza II, E, H, J. TFIIA se može u bilo kom trenutku vezati za DNK posle TFIID, dok se polimeraza II i TFIIF vezuju istovremeno.

Inicijatorski region se obično preklapa sa mestom otpočinjanja transkripcije i interaguje sa različitim transkripcionim faktorima, IBP (IBP eng. Inr binding proteins) (Smale *et al.*, 1989). Inicijatorski element može takođe da bude organizacioni centar oko koga će komponente TFIID kompleksa formirati preinicijacioni kompleks. Inr može ovo da radi nezavisno ili u kombinaciji sa TATA-blokom, tako pojačavajući jačinu promotora i precizno otpočinjanje transkripcije (Lo *et al.*, 1996).

Drugi, distalniji deo promotora, sadrži regulatorne sekvence koje predstavljaju vezivna mesta za specifične transkripcione faktore. Specifični transkripcioni faktori nose naziv i regulatorni transkripcioni faktori, aktivatori, represori. Ovi faktori nisu uvek neophodni za transkripciju, ali je bez njih frekvencija inicijacije transkripcije veoma mala. U ove regulatorne sekvence spadaju GC-blok i CCAAT-blok. Utvrđeno je koji se transkripcioni faktori vezuju za ove elemente i mnogo je prikupljenih podataka od uticaju ovih faktora na transkripciju. U ovom regionu moguće je pronaći i mnogo drugih regulatornih elemenata koji mogu biti uključeni u regulaciju transkripcije zavisnu od fizioloških signala kao što su toplotni stres, faktori rasta, hormoni. Njihovo prisustvo karakteriše pojedine promotore i varira u zavisnosti od tipa ćelija u kojima dati gen treba da se eksprimira.

GC-blok ima konsenzusnu sekvencu za koju se vezuje Sp1 transkripcioni faktor. CCAAT-blok prepoznaju i za njega se vezuju više transkripcionih faktora CTF/NF-1 (Oikarinen *et al.*, 1987; Jones *et al.*, 1987), CP1, CP2 (Chodosh *et al.*, 1988).

Specifični transkripcioni faktori mogu uticati na transkripciju i sa pozicija koje su veoma udaljene od promotora. Na udaljenim DNK sekvencama postoji veliki broj regulatornih elemenata koji preko transkripcionih faktora koje za sebe vežu utiču na aktivnost transkripcije. Udaljeni regulatorni elementi mogu biti stimulatorski nizovi odnosno enhnenseri (eng. enhancer) ili inhibitorni nizovi odnosno sajlerseri (eng. silencer). Ovi regulatorni elementi veoma često kao medijatori fino regulišu kompleksnu transkripcionu

mašineriju. DNK između promotora i ovih medijatornih sekvenci napravi petlju (eng. loop) i tako proteini vezani za njih mogu da interaguju direktno sa nekim od opštih transkripcionih faktora (Ptashne 1988).

Formiranje TFIID kompleksa i otpočinjanje transkripcije moguće je i odsustvu TATA-bloka. Ovakvi promotori se nazivaju TATA-less promotorima. Čak više od 80% protein-kodirajućih gena kod sisara transkripciju otpočinje sa TATA-less promotora (FitzGerald *et al.*, 2004; Bajic *et al.*, 2006; Tokusumi *et al.*, 2007). Potvrđeno je da u većini promotorskih regiona sisarskih gena postoje multipna mesta otpočinjanja transkripcije i da 72% promotora čoveka sadrži u sebi CpG ostvca (Bajic *et al.*, 2004; Sandelin *et al.*, 2007). Prisustvo multipnih mesta otpočinjanja transkripcije i CpG ostrvaca u promotoru korelira sa genima koji se eksprimiraju u veoma velikom broju tipova ćelija, dok promotori sa jednim mestom početka transkripcije uglavnom poseduju TATA-blok i eksprimiraju se tkivno-specifično (Carninci *et al.*, 2006). Dosada je najviše proučavana regulacija transkripcije upravo gena koji imaju tzv. "tipični" promotor sa jednim mestom otpočinjanja transkripcije i TATA-blokom. Sada se postavlja pitanje da li 10-20% promotora sa strukturom koju smo nazivali tipičnom zaista treba da nosi ovaj naziv? I dalje su ostala otvorena pitanja koja se tiču mehanizma kojim jedan promotor bez TATA-bloka koristi više mesta otpočinjanja transkripcije: 1. da li svako mesto početka transkripcije ima svoj tačno određeni element jezgra promotora na kom se formira preinicijacioni kompleks, 2. kako jedan element može da vodi transkripciju sa više mesta, 3. kako se efikasno reguliše transkripcija unutar promotorskog regiona sa više mesta otpočinjanja transkripcije, 4. koji opšti transkripcioni faktori učestvuju u regulaciji pojedinog mesta otpočinjanja transkripcije, 5. da li se stabilan preinicijacioni kompleks formira na svakom mestu početka transkripcije?

Transkripcioni faktori Sp/KLF familije

Transkripcioni faktor Sp1 (eng. specificity protein 1) je među prvima identifikovan, kloniran i okarakterisan (Dyran *et al.*, 1983; Kadonaga *et al.*, 1987). Pokazano je da Sp1 faktor specifično prepoznaje i vezuje se za GC-bogata mesta u promotoru SV40 virusa (simian virus 40) preko svoja tri cinkana prstića. Sličan DNK-vezujući domen pronađen je i u mnogim

Uvod

regulatorima embrionalnog razvića, među koje spada i Krüppel, regulator embrionalnog razvića kod *Drosophila* (Kadonaga *et al.*, 1987). Kasnije su identifikovani mnogi transkripcioni faktori koji su imali DNK motive koji kodiraju cinkane prstiće veoma slične kao i Sp1 faktor i tako je nastala nova klasa "Sp1-like" proteina, proteina sličnih Sp1 ili „Krüppel-like" faktora, faktora sličnih Krüppel faktorima (KLFs) (Turner *et al.*, 1999).

Sp1/KLF familija transkripcionih faktora ima mnogo članova i oni su podeljeni u dve grupe: Sp-grupa ili podgrupa I u koje spadaju Sp1-Sp6 i KLF grupa koja obuhvata podgrupe II i III u koju spadaju svi ostali, KLF1-KLF16. Sp/KLF proteini su prisutni od nematoda *Caenorhabditis elegans* do čoveka i evoluitivno su nastali višestrukim genskim duplikacijama (Brown *et al.*, 1996; Ossipova *et al.*, 2002). Vinska mušica, npr. ima tri Sp1-like proteina (Schöck *et al.*, 1999; Wimmer *et al.*, 1993) dok je kod čoveka identifikovano čak 21 Sp/KLF gena.

Članovi familije transkripcionih faktora Sp/KLF prepoznaju i vezuju se za GC-bogate DNK elemente i učestvuju u regulaciji transkripcije mnogih gena. Tu spadaju geni uključeni u precese regulacije rasta i kontrole puteva koji regulišu morfogenezu (Black *et al.*, 1999; Marin *et al.*, 1997). Ovi geni nisu organizovani u genske grupe tzv. klastere nego su rasuti po genomu i njihovi proteinski produkti svoje funkcije ispoljavaju nezavisno, izuzetak je lokus koji sadrži dva gena ove familije koji kodiraju KLF2 (LKLF) i KLF1 (EKLF).

Sp grupa

Sp1 transkripcioni faktor je prototip ove grupe. Ima dva glutaminom bogata funkcionalna regiona A i B, koja oba imaju aktivacionu ulogu (Courey *et al.*, 1988). Sinergistička aktivacija promotora pomoću Sp1 faktora preko multipnih GC-bogatih DNK sekvenci obavlja se preko C terminalnog domena (Pascal *et al.*, 1991). Sp1 faktor može biti fosforilisan (Jackson *et al.*, 1990) i glikozilovan (Jackson *et al.*, 1988), i može ostvarivati homotipne interakcije koje vode do stvaranja multimernih kompleksa (Mastrangelo *et al.*, 1991; Pascal *et al.*, 1991). Heterotipne interakcije sa drugim klasama jedarnih proteina Sp1 faktor može da ostvaruje sa pripadnicima opšte transkripcione mašinerije (TBP, TAFII110/TAFII130, TAFII55) (Hoey *et al.*, 1993; Emili *et al.*, 1994; Chiang *et al.*, 1995), regulatorima ćelijskog ciklusa

(retinoblastoma-related protein p107) (Datta *et al.*, 1995), E2F (Karlseder *et al.*, 1996). Sp1 može da se veže za sekvencu koju prepoznaje i kad je ona u sklpou nukleozoma (Li *et al.*, 1994). Sp1 transkripcioni faktor ima najčešće aktivacionu ulogu u regulaciji transkripcije različitih gena ali može isto tako biti i represor.

Transkripcioni faktor Sp2 nije toliko dobro proučen kao Sp1. Sadrži glutaminom bogati domen pa se smatra da bi mogao imati aktivatorsku ulogu. Pokazano je da se veže za GT-bogate elemente u promotoru TCR α gena (TCR α eng. T-cell antigen receptor) (Kingsley *et al.*, 1992).

Transkripcioni faktor Sp3 postoji u tri izoforme, protein od 110-115 kDa i dve vrste od 60-70 kDa. Ovo je rezultat postojanja više mesta početka translacije na iRNK (Kingsley *et al.*, 1992). Pokazano je da je Sp3, slično kao Sp1, može imati aktivatorsku ulogu u transkripciji različitih gena (Liang *et al.*, 1996; Ihn *et al.*, 1997) kao i da može biti veoma slab aktivator (Majello *et al.*, 1994; Kumar *et al.*, 1997). Ukoliko se Sp3 i Sp1 u ćeliji eksprimiraju u istom obimu Sp3 često neće biti jak aktivator, ova dva faktora će kompetirati za isto vezivno mesto i biće umanjena Sp1- posredovana aktivacija. Ako promotor ima jedno mesto aktivacije, biće aktiviran, ako ima više mesta aktivacije, neće biti aktiviran ili će veoma slabo odgovarati na Sp3 (Birnbbaum *et al.*, 1995; Dennig *et al.*, 1996). Od ćelijskog konteksta najčešće zavisi da li će Sp3 transkripcioni faktor biti aktivator ili represor, naime u ćelijskoj liniji Ntera2-D Sp3 faktor je aktivator a u HeLa i insekatskim ćelijama je represor istog long terminal repeats HERV-H elementa (Sjøttem *et al.*, 1996). Sumnjalo se da su dve manje forme Sp3 proteina ustvari represori a da je veća forma aktivator (Kennett *et al.*, 1997). Ipak, ove tvrdnje nisu bile tačne. Veća forma Sp3 faktora može da ima represorsku ulogu u transkripciji gena (Dennig *et al.*, 1996).

Transkripcioni faktor Sp4 eksprimira se samo u nekoliko tkiva, najviše u mozgu (Hagen *et al.*, 1992). U svojim aktivirajućim svojstvima se malo razlikuje od Sp1 i Sp3 faktora. Nije u stanju da sinergistički aktivira promotor preko višestrukih GC-mesta ali je za njega može da se veže Sp1 i tako aktivira gensku transkripciju (Hagen *et al.*, 1995).

KLF grupa

Članovi KLF grupe se prvenstveno vezuju za GT-bogate sekvence i mogu imati kako aktivatorsku tako i represornu ulogu u regulacije transkripcije različitih gena (Philipsen *et al.*, 1999).

Jednu podgrupu čine faktori veoma bliski Sp grupi: BTEB1 (eng. basic transcription element binding protein), TIEG1 (eng. TGF β -inducible early gene) i TIEG2 koji prepoznaju GC-bogate DNK elemente ali se strukturno razlikuju od Sp faktora (Imataka *et al.*, 1992; Fautschet *al.*, 1998).

Drugu podgrupu čine XKLFs, različiti KLF faktori, X je obično tip ćelije gde se ovaj protein eksprimira. Tu spadaju EKLF, koji se eksprimira u eritroidnim ćelijama, GKLF koji se eksprimira u crevu (eng. gut) takođe poznat i kao EZF (eng. epithelial zink finger protein), IKLF iz intestinuma, LKLF iz pluća (eng. lung), UKLF koji se eksprimira u različitim tkivima (eng. ubiquitous), FKLF, fetalni KLF... Ovi nazivi ne moraju tačno da odslikavaju mesta ekspresije ovih proteina pa su uvedene oznake KLF1-16 kojima se proteini iz ove grupe obeležavaju.

EKLF transkripcioni faktor ili KLF1, se eksprimira uglavnom u eritroidnim ćelijama (Miller *et al.*, 1993). On je značajan aktivator β -globinskog gena i vezuje se za CACC-blok u njegovom promotoru (Feng *et al.*, 1994).

PROMOTOR GENA ZA TPMT

Promotor gena za TPMT spada u grupu TATA-less eukariotskih promotora. Prilikom identifikacije gena za TPMT primećeno je da se prva objavljena sekvenca gena izolovanog iz biblioteke hromozoma 6 (Szulmanski *et al.*, 1996) neznatno razlikuje od onih izolovanih iz fagne biblioteke (Krynetski *et al.*, 1997). Detektovano je postojanje dodatnih 17 bp u 5' nekodirajućem regionu - pretpostavljenom promotoru na mestu koje je 77 nukleotida uzvodno od mesta početka transkripcije (Krynetski *et al.*, 1997). Za 5' nekodirajući region (-873 do +736) je eksperimentima tranzijentne transfekcije potvrđeno da ima transkripcionu

aktivnost u humanim HepG2 i CCRF-CEM ćelijama. Ovaj region je 71% GC-bogat, sadrži multiple GC-blokove i ne sadrži konzensusna mesta za TATA-boks ili CCAAT elemente. Identifikovano je mesto početka transkripcije (+1 mesto) kao i dva druga mesta početka transkripcije (-2 i +4 mesta) (Szulmanski *et al.*, 1996; Fessing *et al.*, 1998), ali je usvojeno da je +1 mesto ono prvo objavljeno u literaturi. Delecione analize pretpostavljenog promotora gena za TPMT (-873 do +736) pokazale su da delecija -873 do -116 ne menja aktivnost promotora. Najveći efekat na smanjenje aktivnosti promotora imaju GC - bogati regioni -85 do -75 i -68 do -51 u odnosu na +1 mesto. Kontransfekcija u *Drosophila* Schneider SL2 ćelije (ove ćelije ne eksprimiraju Sp1 protein i moguće ga je uneti u ćelije samo kotransfekcijom sa plazmidom koji nosi sekvencu za Sp1 protein) pokazala je da se Sp1 transkripcioni faktor vezuje za promotor gena za TPMT i snažno ga aktivira (Fessing *et al.*, 1998). Kompjuterska predikcija pretpostavila je vezivna mesta za nekoliko transkripcionih faktora: Egr-1, NF-kB, AP-2 i MED-1 (Fessing *et al.*, 1998; Krynetski *et al.*, 1997).

Detaljnija karakterizacija polimorfizama u promotorskom regionu gena za TPMT pokazala je da se unutar ovog promotora nalazi polimorfni lokus. Njega čini promenljiv broj tandemskih ponovaka, VNTR region (eng. VNTR - variable number of tandem repeats) (Spire-Vayron de la Moureyre *et al.*, 1999). Broj ponovaka može biti od 3 do 9 (Spire-Vayron de la Moureyre *et al.*, 1999; Yan *et al.*, 2000; Alves *et al.*, 2000). Svaki ponovak je dugačak 17 ili 18 bp, GC je bogat i sadrži potencijalna mesta za vezivanje transkripcionih faktora. Najčešći broj ponovaka je 4 ili 5 i oni se nasleđuju po Mendelovom principu (Spire-Vayron de la Moureyre *et al.*, 1999; Yan *et al.*, 2000). Ovi ponovci mogu se svrstati u minisatelite, iako je njihova prosečna dužina (52-155 bp) manja od klasične dužine minisatelitskih ponovaka (Alves *et al.*, 2002). VNTR region karakteriše složena unutrašnja organizacija sa tri tipa ponovaka: A, B i C tip. Ovi ponovci imaju identičnu sekvencu u prvih 14 bp a razlikuju se u poslednja 3 odnosno 4 nukleotida (B i C ponovci su dugi 17 bp, A ponovak je dugačak 18 bp) (Alves *et al.*, 2002). Sekvence ponovaka date su u Tabeli 1.

Tabela 1. Sekvence ponovaka A, B i C VNTR regiona promotora gena za TPMT.

Ponovak A	5'-GAGGCGGGGCGCGGGAAA-3'
Ponovak B	5'-GAGGCGGGGCGCGGGCG-3'
Ponovak C	5'-GAGGCGGGGCGCGGAGA-3'

Tamnije su označeni nukleotidi koji se razlikuju kod ova tri tipa ponovaka.

Ponovci su sistematski poređani unutar svakog VNTR alela, prvo A, zatim B i na kraju C ponovak. Između ponovaka nema umetnutih sekvenci. C ponovak je uvek prisutan samo u jednoj kopiji, dok broj A i B ponovaka varira. Arhitektura ponovaka može se predstaviti kao AnBmC (Alves *et al.*, 2002; Marinaki *et al.*, 2003). VNTR aleli se označavaju arapskim brojem, npr. VNTR*5 ili V*5. Za one ponovke koji imaju identične dužine a različitu unutrašnju strukturu, malim slovom se obeležava tip ponovaka, npr. VNTR*5a, VNTR*5b, gde "a" uvek označava najčešći tip ponovaka a ostali dobijaju slovo po redosledu otkrivanja (Alves *et al.*, 2002). Identifikovani brojevi i tipovi ponovaka predstavljeni su u Tabeli 2.

Tabela 2. Tipovi tandemskih ponovaka u promotoru gena za TPMT.

Tip ponovka	Arhitektura ponovka	GenBank broj	Literatura
VNTR*3	ABC		Alves <i>et al.</i> , 1999
VNTR*4a	A ₂ BC	AF039825	Spire-Vayron de la Moureyre <i>et al.</i> , 1999
VNTR*4b	AB ₂ C		Alves <i>et al.</i> , 1999
VNTR*5a	A ₂ B ₂ C	AF039826	Spire-Vayron de la Moureyre <i>et al.</i> , 1999
VNTR*5b	A ₃ BC	AF060074	Spire-Vayron de la Moureyre <i>et al.</i> , 1998a
VNTR*5c	AB ₃ C		Alves <i>et al.</i> , 2002
VNTR*6a	A ₂ B ₃ C	AF039827	Spire-Vayron de la Moureyre <i>et al.</i> , 1999
VNTR*6b	AB ₄ C		Alves <i>et al.</i> , 1999
VNTR*6c	A ₄ BC		Marinaki <i>et al.</i> , 2003
VNTR*6d	A ₃ B ₂ C		Marinaki <i>et al.</i> , 2003
VNTR*7a	A ₅ BC	AF039828	Spire-Vayron de la Moureyre <i>et al.</i> , 1999
VNTR*7b	AB ₅ C		Alves <i>et al.</i> , 2002
VNTR*7c	A ₄ B ₂ C		Marinaki <i>et al.</i> , 2003
VNTR*7d	A ₂ B ₄ C		Alves <i>et al.</i> , 2002
VNTR*8a	A ₆ BC	AF039829	Spire-Vayron de la Moureyre <i>et al.</i> , 1999
VNTR*8b	A ₂ B ₅ C		Alves <i>et al.</i> , 2002
VNTR*9a	A ₇ BC		Marinaki <i>et al.</i> , 2003
VNTR*9b	A ₂ B ₆ C		Alves <i>et al.</i> , 2002

U promotorskom regionu gena za TPMT identifikovane su i dve tačkaste mutacije na mestima g.-91A>G i g.-168T>G. Funkcionalna analiza promotora gena za TPMT u različitim ćelijskim linijama (K562, A549 i COS-1) pokazala je da različit broj ponovaka pokazuje

različite aktivnosti promotora. Samim tim tandemski ponovci bi mogli uticati na varijacije u aktivnosti TPMT enzima (Spire-Vayron de la Moureyre *et al.*, 1999). Korelacija genotip-fenotip pokazala je da najveću aktivnost TPMT enzima u eritrocitima imaju osobe sa VNTR*4/VNTR*5 genotipom. Najmanju TPMT aktivnost imaju osobe sa zbirom tandemskih ponovaka većim od 5. Utvrđeno je postojanje neravnoteže vezanosti gena (eng. linkage disequilibrium) između TPMT*3A i VNTR*5a alela (Yan *et al.*, 2000). Pokazano je da je alel VNTR*6a u vezi sa smanjenim nivoom TPMT aktivnosti (Alves *et al.*, 2001). Ponovci A i B izgleda ne doprinose podjednako ekspresiji gena za TPMT, pri tom B ponovci predstavljaju motiv koji na ekspresiju gena za TPMT utiču smanjujući njegovu transkripciju (Alves *et al.*, 2001). Utvrđeno je postojanje neravnoteže vezanosti gena između TPMT*3A i VNTR*6a alela (Alves *et al.*, 2001), kao i između TPMT*3A i VNTR*6b, TPMT*3C i VNTR*4b i TPMT*1 i VNTR*6a (Marinaki *et al.*, 2003).

Identifikovano je postojanje još jednog polimorfizma u promotoru gena za TPMT. To su trinukleotidni ponovci GCC na mestu -327 do -345 bp od početka starta transkripcije. Pacijenti oboleli od inflamatorne bolesti creva sa normalnom aktivnošću TPMT enzima imali su 6 ovih trinukleotidnih ponovaka. Kod pacijenata koji su pokazivali veoma visoke aktivnosti enzima uočeno je postojanje 5, odnosno 7 ponovaka. Funkcionalni eseji sa konstruktima reporter gena koji su sadržavali 5, 6 i 7 GCC ponovaka pokazali su značajno povećanu aktivnost promotora kod konstrukata (GCC)₅ i (GCC)₇ u odnosu na (GCC)₆ konstrukte. Promena u broju GCC ponovaka mogla bi biti odgovorna za veoma velike aktivnosti TPMT enzima kod pacijenata koji ne odgovaraju na terapiju merkaptopurinima zbog izuzetno velike aktivnosti TPMT enzima (Roberts *et al.*, 2008).

Pokušaji da se broj i tip tandemskih ponovaka u promotoru gena za TPMT dovede u vezu sa kliničkim odgovorom na terapiju merkaptopurinima bili su kontroverzni. Kod pacijenata obolelih od inflamatorne bolesti creva tretiranih 3 meseca azatioprinom nije bilo moguće objasniti smanjenje ili povećanje aktivnosti TPMT enzima konfiguracijom VNTR ponovaka u promotoru gena za TPMT (Arenas *et al.*, 2004). Sa druge strane, statistički značajna korelacija je utvrđena između prisustva više od 11 tandemskih ponovaka u promotoru gena za TPMT i smanjenja doze azatioprina kod pacijenata godinu dana nakon transplantacije bubrega (Fabre *et al.*, 2004).

Uvod

Tačan uticaj varijabilnog broja tandemskih ponovaka na ekspresiju gena za TPMT još uvek nije definisan. Velika je verovatnoća da bi određeni broj i tip ponovaka u datoj populaciji mogao da bude farmakogenetički marker. Zato su naša istraživanja usmerena u pravcu procene VNTR tipova kao potencijalnog farmakogenetičkog markera i njihovog mogućeg uticaja na ekspresiju gena za TPMT u našoj populaciji. Otkriće da bi ovaj novi farmakogenetički marker mogao da doprinese boljoj kontroli primene tiopurinskih lekova, doprinelo bi približavanju farmakogenetike svom cilju - individualizaciji terapije.

TPMT U SRBIJI

U Laboratoriji za molekularnu hematologiju, Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo u Beogradu, od 2001. godine se rutinski sprovodi molekularna dijagnostika najčešćih mutacija u genu za TPMT (c.238G>C, c.460G>A i c.719A>G) koje obuhvataju oko 95% svih mutiranih TPMT alela (Dokmanović *et al.*, 2006). Rezultati pokazuju da je u našoj populaciji učestalost TPMT*2 alela 0.2%, TPMT*3A alela 3.2% i TPMT*3B alela 0.5%. Do sada kod nas nije detektovan TPMT*3C alel.

CILJ RADA

Cilj rada

Primena farmakogenetike u individualizaciji terapije doprinosi uspešnijem lečenju mnogih bolesti. Polimorfizmi u genu za tiopurin S-metiltransferazu (TPMT) su najbolji primer farmakogenetičkih markera. Genotipizacija određenih polimorfizama TPMT je postala deo terapijskih protokola. Jedan od ciljeva ovog rada je:

1. ispitati da li genotipizacija najčešćih polimorfizama u genu za TPMT može biti osnova za modifikaciju terapije u lečenju akutne limfoblastne leukemije kod dece u cilju smanjenja toksičnosti izazvane tiopurinskim lekovima.

Takođe smo pokušali da identifikujemo nove polimorfizme u genu za TPMT, kandidate za farmakogenetičke markere. Promotor gena za TPMT ima karakteristični polimorfizam, varijabilni broj tandemskih ponovaka, VNTR region, koji bi preko transkripcije mogao uticati na ukupnu količinu TPMT proteina sintetisnog u ćeliji. Naš cilj je bio:

2. utvrditi koji su VNTR aleli promotora gena za TPMT prisutni u srpskoj populaciji,
3. proceniti uticaj svakog od tih VNTR alela (različitih po broju i tipu tandemskih ponovaka) na transkripciju gena za TPMT,
4. analizirati cis- regulatorne elemente u okviru VNTR regiona funkcionalnim esejima *in vitro*,
5. utvrditi koji transkripcioni faktori posreduju u transkripciji regulisanoj VNTR promotorskim fragmentom,
6. utvrditi da li je metilacija mehanizam preko kojeg se odvija regulacija transkripcije gena za TPMT,
7. proceniti da li je VNTR region promotora gena za TPMT kandidat za farmakogenetički marker.

Fenomen modulacije aktivnosti enzima TPMT pri dužoj primeni tiopurinskih lekova, do sada nije objašnjen na molekularnom nivou. Cilj ovog rada je:

Cilj rada

8. ispitati da li se tolerancija na merkaptopurin kod pacijenata može delimično objasniti dejstvom leka na transkripciju.

MATERIJAL I METODE

Materijal i metode

MATERIJAL

Biološki materijal – DNK

DNK koja je korišćena u ovom radu izolovana je iz pune krvi 50 dobrovoljnih davaoca krvi, 73 dece obolele od dečje akutne limfoblastne leukemije (ALL) i 30 odrasla bolesnika obolelih od akutne mijeloidne leukemije (AML). Dijagnoza ALL je postavljena na Hematoonkološkom odeljenju Univerzitetske dečje klinike u Beogradu. Dijagnoza AML je postavljena na Hematološkoj klinici Kliničkog centra Srbije.

Krv je uzimana sa 3,8% Na-citratom kao antikoagulansom, u odnosu 9:1 i transportovana do Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo gde je vršena izolacija DNK.

Svi ispitanici su dali pismenu saglasnost za obavljanje molekularnih analiza. Za ovo istraživanje postoji odobrenje etičkog komiteta Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Biološki materijal – ćelijske linije

Za dobijanje jedarnih ekstrakata za EMSA eksperimente korišćene su: humana K562 eritroleukemična ćelijska linija (Lozzio *et al.*, 1973; Lozzio *et al.*, 1975) i humana HeLa ćelijska linija poreklom od kancera cerviksa. (Scherer *et al.*, 1953). U eksperimentima tranzijentne transfekcije korišćena je samo K562 ćelijska linija.

Biološki materijal – bakterijski soj

U ovom radu je korišćen bakterijski soj DH5 α *E. coli* (Gough *et al.*, 1983).

Materijal i metode

Plazmidni vektori

Za pravljenje konstrukata za ispitivanje uticaja broja i tipa ponovaka u promotorskom regionu gena za TPMT korišćen je pCATbasic vektor (Promega). Kao pozitivna kontrola u eksperimentima tranzijentne transfekcije korišćen je pBLCAT5 vektor (Boshart *et al.*, 1992). Kao kontrola efikasnosti transfekcije korišćen je pCH110 plazmid (Amersham Pharmacia Biotech) koji eksprimira gen za β -galaktozidazu. Kao kontrola digestije PCR produkata korišćen je pUC18 vektor (Vieira *et al.*, 1982; Messing 1983).

Prajmeri

U različitim PCR reakcijama korišćeni su odgovarajući specifični prajmeri, čiji su nazivi i sekvence navedeni u tabelama 3 - 5. U reakcijama sekvenciranja korišćeni su prajmeri upotrebljeni u PCR reakciji.

Tabela 3. Prajmeri korišćeni za detekciju mutacija u kodirajućem regionu gena za TPMT (Collie-Duguid *et al.*, 1999).

Naziv prajmera	Sekvenca prajmera	Pozicija prajmera
P2W	5`-GTATGATTTTATGCAGGTTTG-3`	na granici između 4I i 5E
P2M	5`-GTATGATTTTATGCAGGTTTC-3`	na granici između 4I i 5E
P2C	5`-TAAATAGGAACCATCGGACA-3`	5I
P460F	5`-ATAACAGAGTGGGGAGGCTGC-3`	6I
P460R	5`-CTAGAACCCAGAAAAAGTATAG-3`	7I
P719F	5`-CAGGCTTTAGCATAATTTTCAATTCCTC-3`	6I
P719R	5`-TGTTGGGATTACAGGTGTGAGCCAC-3`	7I

Napomena: I je oznaka za intron, E je oznaka za egzon

Materijal i metode

Tabela 4. Prajmeri korišćeni za detekciju polimorfizama u promotorskom regionu gena za TPMT (Yan *et al.*, 2000).

Naziv prajmera	Sekvenca prajmera
VNTR1*	5'-GCGCTCGCTCCGCCCTGCCCATTT-3'
VNTR2*	5'-GGGCTGATTGCTAGGCTGTCTAC-3'
VNTRGCCF	5'- <u>CCCAAGCTTGGGCAACGCTGTCACCCGAAATC</u> -3'

Napomena: podvučeni region predstavlja mesto sečenja *HindIII* restrikcionog enzima

Tabela 5. Prajmeri korišćeni za kloniranje promotorskih regiona gena za TPMT u pCATbasic plazmidni vektor.

Naziv prajmera	Sekvenca prajmera
VNTRHXF	5'- <u>CCCAAGCTTGGGTGGAGTCTGTTCAACGAGGTA</u> -3'
VNTRHXR	5'- <u>GTCCTAGAGCGGGCTGTGATTGCTAGGCTGTCTAC</u> -3'
VNTRXHF	5'- <u>GTCCTAGAGCGGTGGAGTCTGTTCAACGAGGTA</u> -3'
VNTRXHR	5'- <u>CCCAAGCTTGGGGGGCTGATTGCTAGGCTGTCTAC</u> -3'
VNTR3DEL	5'- <u>CCCAAGCTTGGGGCGCGGGCG</u> -3'
VNTR4DEL	5'- <u>CCCAAGCTTGGGGCGCGGAAA</u> -3'
VNTR5DEL	5'- <u>CCCAAGCTTGGGGCGGGAACT</u> -3'

Napomena: podvučeni regioni predstavljaju mesta sečenja *HindIII* i *XbaI* restrikcionih enzima

Oligonukleotidne probe

Oligonukleotidi korišćeni u EMSA i South-Western esejima, navedeni su u Tabeli 6.

Materijal i metode

Tabela 6. Oligonukleotidi korišćeni u EMSA i South-Western esejima

Naziv oligonukleotida	Sekvenca oligonukleotida
C coding	5`-GCGGAGGCGGGGCGCGGAGAAGTG-3`
C noncoding	5`-CACTTCTCCGCGCCCCGCCTCCGC-3`
AA coding	5`-ACTGAGGCGGGGCGCGGAAAGAGGCGGGGCGCGGGAAAGAGG-3`
AA noncoding	5`-CCTCTTTCCCGCGCCCCGCCTCTTTCCCGCGCCCCGCCTCAGT-3`
AB coding	5`-ACTGAGGCGGGGCGCGGAAAGAGGCGGGGCGCGGGCGGAGG-3`
AB noncoding	5`-CCTCCGCCCCGCGCCCCGCCTCTTTCCCGCGCCCCGCCTCAGT-3`
BB coding	5`-AAAGAGGCGGGGCGCGGGCGGAGGCGGGGCGCGGGCGGAGG-3`
BB noncoding	5`-CCTCCGCCCCGCGCCCCGCCTCCGCCCCGCGCCCCGCCTCTTT-3`
BC coding	5`-GCGGAGGCGGGGCGCGGGCGGAGGCGGGGCGCGGAGAAGTG-3`
BC noncoding	5`-CACTTCTCCGCGCCCCGCCTCCGCCCCGCGCCCCGCCTCCGC-3`
ABC coding	5`- ACTGAGGCGGGGCGCGGAAAGAGGCGGGGCGCGGGCGGAGGGCGGGG CGCGGAGAAGT-3`
ABC noncoding	5`- ACTTCTCCGCGCCCCGCCTCCGCCCCGCGCCCCGCCTCTTTGCCGCGCCCCGCC TCAGT-3`
BBC coding	5`- GAAAGAGGCGGGGCGCGGGCGGAGGCGGGGCGCGGGCGGAGGCGGGGC GCGGAGAAGTG-3`
BBC noncoding	5`- CACTTCTCCGCGCCCCGCCTCCGCCCCGCGCCCCGCCTCCGCCCCGCGCCCCGC CTCTTTC-3`
ABBC coding	5`- GAAAGAGGCGGGGCGCGGAAAGAGGCGGGGCGCGGGCGGAGGCGGGG CGCGGGCGGAGGCGGGGCGCGGAGAAGTG-3`
ABBC noncoding	5`- CACTTCTCCGCGCCCCGCCTCCGCCCCGCGCCCCGCCTCCGCCCCGCGCCCCGC CTCTTTCCCGCGCCCCGCCTCTTTC-3`

Materijal i metode

AABBC coding	5` - GAACTGAGGCGGGGCGCGGGAAAGAGGCGGGGCGCGGGAAAGAGGCGG GGCGCGGGCGGAGGCGGGGCGCGGGCGGAGGCGGGGCGCGGAGAAGTG -3`
AABBC noncoding	5` - CACTTCTCCGCGCCCCGCCTCCGCCCCGCGCCCCGCCTCCGCCCCGCGCCCCGC CTCTTTCCGCGCCCCGCCTCTTTCCGCGCCCCGCCTCAGTTC-3`
-890 coding *	5` -GCCAGGGCCGAGAAGGGGTGGACTCCAGAGACTCTC-3`
-890 noncoding	5` -GAGAGTCTCTGGAGTCCACCCCTTCTCGGCCCTGGC-3`
Sp1 oligo coding **	5` -ATTCGATCGGGGCGGGGCGAGC-3`
Sp1 oligo noncoding	5` -GCTCGCCCCGCCCCGATCGAAT-3`

Napomena: * -890 oligonukleotid je preuzet iz Pruzina *et al.*,1991. ** Sp1 oligonukleotid je sintetisan po ugledu na Sp1 Gel Shift Oligonucleotide, Santa Cruz Biotechnology, sc-2502;

Antitela

Spisak antitela i njihove karakteristike date su u Tabeli 7. U ovom radu je korišćeno nekomercijalno KLF1 antitelo koje nam je ljubazno ustupio prof. Sjaak Phillipsen, Department of Cell Biology, Erasmus Medical Center, Rotterdam, Netherlands.

Materijal i metode

Tabela 7. Spisak antitela korišćenih u ovom radu.

Naziv antitela	Proizvođač	Kat. broj	Poreklo	Konc.
Sp1 (1C6)	Santa Cruz Biotechnology	sc-420	miš, monoklonsko IgG ₁	200 μg/ml
Sp3 (H-225)	Santa Cruz Biotechnology	sc-13018	zec, poliklonsko IgG	200 μg/ml
Sp4 (V-20)	Santa Cruz Biotechnology	sc-645	zec, poliklonsko IgG	200 μg/ml
α KLF1	nekomercijalno	-	zec, poliklonsko	

METODE

IZOLACIJA DNK IZ PERIFERNE KRVI ISOLJAVANJEM

(Goossens *et al.*, 1983)

U corex epruvetu od 30 ml sipa se 2.5 ml nekoagulisano uzorka krvi i doda se 22.5 ml Lysis pufera (0.32 M saharoza, 10 mM Tris HCl pH 7.5, 5 mM MgCl₂, 1% Triton X100). Ovo se nežno promućka i inkubira na ledu u trajanju od 15 min. Zatim se vrši centrifugiranje na 4000 rpm na 4°C (centrifuga SORVALL, rotor SS-34) u trajanju od 10 min. Talog se ispira dva puta sa po 5 ml Fizio pufera (75 mM NaCl, 25 mM EDTA). Posle svakog ispiranja vrši se centrifugiranje (10 min, 4000 rpm, +4°C). Na kraju se talog rastvori u 750 µl 1xTE (10 mM Tris HCl pH 7.5, 1 mM EDTA) i prebaci u ependorf epruvetu, a zatim se doda 25 µl 20% SDS-a i 125 µl proteinaze K (10 mg/ml u 1%SDS, 2mM EDTA) i inkubira se jedan sat na 65°C. Posle inkubacije se doda 250 µl zasićenog NaCl-a (6M), vorteksuje se 15 sekundi, i vrši se centrifugiranje na 6000 rpm na +4°C u trajanju od 15 min (mikrofuga Eppendorf). Supernatant se prebaci u nove ependorf epruvete i ostavi da stoji preko noći na +4°C. Ponovo se izvrši centrifugiranje 15 min na 6000 rpm na +4°C. Supernatant se prebaci u novu ependorf epruvetu, doda se jedna zapremina izopropanola, i inkubira jedan sat na sobnoj temperaturi. DNK se zatim namotava uz pomoć staklenog štapića, koji se potom potopi u 70% etanol, kratko suši, i rastvori u 250 µl 1xTE pufera.

IZOLACIJA DNK IZ PERIFERNE KRVI FENOL/HLOROFORM/IZOAMIL ALKOHOLOM

(Budowle 2000)

U ependorf epruvetu se sipa 400 µl Stain extraction buffer-a (100 mM NaCl, 10 mM Tris HCl, 10 mM EDTA pH 8.0, 2% SDS), 10µl proteinaze K (20 mg/ml u 1% SDS, 2 mM EDTA) i doda 3 µl nekoagulisano uzorka krvi. Promućka se i inkubira preko noći na 56°C. Zatim se rastvoru doda 500 µl smeše fenol/hloroform/izoamil alkohol (25:24:1) i vorteksuje 20 sekundi. Posle

Materijal i metode

2 min centrifugiranja na 13000 rpm (mikrofuga Eppendorf), gornja faza, koji sadrži DNK, prebaci se u novu epruvetu. Zatim se doda 1 ml apsolutnog etanola, promućka i inkubira 30 min na -20°C. Sledi centrifugiranje u trajanju od 15 min na 13000 rpm, a zatim se apsolutni etanol odlije. Talog se ispere dodavanjem 1 ml 70% etanola, centrifugira 5 min na 13000 rpm i etanol ponovo odlije. Posle sušenja, talog je rastvaran u 36 µl 1xTE pufera.

IZOLACIJA DNK IZ PERIFERNE KRVI NA KOLONI

(Prema uputstvu QIAGEN-a)

U eppendorf epruvetu se sipaju 20 µl QIAGEN proteaze, 200 µl nekoagulisanog uzorka krvi i 200 µl pufera AL. Smeša se meša vorteksovanjem u toku 15 sek i zatim inkubira na 56°C u toku 10 min da bi se obezbedilo liziranje ćelija i oslobađanje DNK od proteina. Nakon toga se dodaje 200 µl 100% etanola i smeša ponovo meša vorteksovanjem u toku 15 sek. Smeša se pažljivo nanosi na QIAamp kolonu i vrši se centrifugiranje na 8000 rpm (mikrofuga Eppendorf) u toku 1 min da bi sadržaj prošao kroz kolonu. Eluat se odbacuje jer se DNK afinitetno vezala za kolonu, a kolona se prebacuje u novu tubu za sakupljanje eluata. Zatim se dodaje 500 µl pufera AW1 i vrši centrifugiranje na 8000 rpm u toku 1 min. U ovom koraku se DNK, koja je vezana za kolonu, ispira od nečistoća. Eluat se ponovo odbacuje, a kolona se prebacuje u novu tubu za sakupljanje eluata. U sledećem koraku, dodaje se pufer AW2 koji dodatno oslobađa DNK od nečistoća i vrši centrifugiranje na 14000 rpm u toku 3 min. Eluat se odbacuje, kolona prebacuje u novu tubu i ponavlja centrifugiranje na istoj brzini u toku 1 min kako bi se uklonili i poslednji tragovi pufera. Konačno se kolona prebacuje u čistu eppendorf epruvetu i dodaje se 200 µl pufera AE koji će osloboditi DNK sa kolone. Korisno je inkubirati kolonu na sobnoj temperaturi u toku 1 min kako bi se povećao prinos DNK. Centrifugiranjem na 6000 rpm u toku 1 min dobija se 190-200 µl eluata u kome je rastvorena DNK.

Materijal i metode

PCR analiza

PCR (polymerase chain reaction) je *in vitro* amplifikacija definisane DNK sekvence i predstavlja imitaciju procesa DNK replikacije. Reakcija koristi dva oligonukleotida komplementarna krajevima sekvence koja se umnožava (prajmeri), koji su međusobno suprotno orijentisani i dugački 15-20 nukleotida. Sinteza DNK katalizovana je termostabilnom DNK polimerazom. 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. Krajevi amplifikovanog fragmenta su definisani 5' krajevima prajmera, a njihova veličina određena je rastojanjem između sekvenci koje prajmeri prepoznaju. PCR reakciona smeša mora sadržati u sebi komponente potrebne za *in vitro* sintezu DNK: matrica (DNK koja se kopira), prajmeri (oligonukleotidi komplementarni krajevima sekvence koja se kopira), nukleotidi (gradivni elementi DNK), *Taq* polimeraza (termostabilna DNK polimeraza koja katalizuje ugradnju nukleotida po principu komplementarnosti sa matricom), joni magnezijuma i pufer (neophodni za optimalni rad *Taq* polimeraze).

PCR-RFLP (eng. Polymerase chain reaction - Restriction fragment length polymorphism) je metoda koja se koristi za direktnu detekciju mutacije koja menja, kreira novo ili ukida postojeće mesto prepoznavanja nekog restriktionog enzima.

Detekcija mutacija u kodirajućem regionu gena za TPMT
(Yates *et al.*, 1997; Dokmanović *et al.*, 2006)

Alel specifični PCR (eng. allele refractory mutation system - ARMS) – detekcija mutacije c.238G>C

Zahvaljujući velikoj specifičnosti PCR-a, moguće je tako dizajnirati prajmer da on u sebi sadrži tačkastu mutaciju. Takav mutirani prajmer će se vezati samo za mutiranu sekvencu, odnosno produkt reakcije će se dobiti samo u slučaju prisustva mutacije.

Materijal i metode

Za detekciju tačkastih mutacija ARMS PCR-om, PCR reakcije se rade u dve odvojene ependorf epruvete. U jednoj ependorf epruveti je prisutan mutirani prajmer (prajmer sa tačkastom mutacijom) a u drugoj normalan prajmer (prajmer komplementaran sekvenci normalnog alela). Ova dva prajmera se razlikuju samo u jednom nukleotidu. Oba prajmera se kombinuju sa istim, zajedničkim prajmerom. Izvođenje PCR reakcije u dve ependorf epruvete je važno jer omogućava detekciju heterozigotnih nosilaca mutacija. Ovim PCR-om je vršena detekcija c.238G>C mutacije u genu za TPMT. Dobijeni produkt reakcije je dug 254 bp.

Finalna PCR smeša od 50 µl sadrži sledeće komponente: 0.5-1 µg DNK, 6.7 mM MgCl₂, 16.6 mM (NH₄)₂SO₄, 67 mM Tris-HCl pH 8.5, 10 mM β-merkaptotanol, 100 µg/ml BSA, 200 µM dNTP, prajmeri 5 pmol svaki (Tabela 3), 1.5 U Amply Taq (Perkin Elmer). Prva ependorf epruveta ima P2M (prajmer sa tačkastom mutacijom) i P2C (zajednički prajmer), a druga ependorf epruveta P2W (prajmer komplementaran sekvenci normalnog alela) i P2C (zajednički prajmer).

Temperaturni profil PCR reakcije:

10 min/ 98°C (hot start)

3 min/ 72°C (međukorak za dodavanje polimeraze)

(1 min/ 94°C, 2 min/ 57°C, 1 min/ 72°C) ponovljeno 30 puta

10 min/ 72°C

Analiza PCR produkata se vrši na 2% agaroznom gelu vizualizacijom pod UV-svetlom.

Detekcija mutacija c.460G>A i c.719A>G metodom PCR-RFLP

Prvo se PCR-om pomoću specifičnih prajmera umnožava region DNK u kojem se nalazi određena mutacija, a zatim se tako dobijeni fragment DNK seče odgovarajućim restrikcionim enzimom. Produkti digestije analiziraju se elektroforezom na poliakrilamidnom gelu, a rezultati interpretiraju u zavisnosti od toga da li restrikcioni enzim seče ili ne seče DNK fragment.

Materijal i metode

Finalna PCR smeša od 50 μ l sadrži sledeće komponente: 0.5-1 μ g DNK, 6.7 mM $MgCl_2$, 16.6 mM $(NH_4)_2SO_4$, 67 mM Tris-HCl (pH 9.5 za mutaciju c.460G>A, pH 10.0 za mutaciju c.719A>G), 10 mM β -merkaptoetanol, 100 μ g/ml BSA, 200 μ M dNTP, prajmeri 25 pmol svaki (Tabela 3) (P460F i P460R za mutaciju c.460G>A, P719F i P719R za mutaciju c.719A>G), 1.5 U Amply Taq (Perkin Elmer).

Temperaturni profil PCR reakcije:

10 min/ 98°C (hot start)

3 min/ 72°C (međukorak za dodavanje polimeraze)

(1 min/ 94°C, 2 min/ 55°C (za c.460G>A) odnosno 2 min/ 53 (za c.719A>G)°C, 1 min/ 72°C)

ponovljeno 30 puta

10 min/ 72°C

Produkt PCR reakcije za mutaciju c.460G>A je 365 bp. Detekcija mutacije se vrši digestijom ovako dobijenog PCR fragmenta restrikcionim enzimom *MwoI* (BioLabs). Prisustvo mutacije narušava restrikciono mesto za ovaj enzim, tako da će se seći samo nemutirani fragmenti. U slučaju digestije dobijamo produkte dužina 267 bp i 98 bp.

Smeša za digestiju sadrži sledeće komponente:

20 μ l PCR produkta

1 x pufer

0.75 U *MwoI* (BioLabs)

Uslovi digestije su 12 sati na 60°C. Analiza fragmenata se vrši na 8% poliakrilamidnom gelu.

Produkt PCR reakcije za mutaciju c.719A>G je 290 bp. Detekcija mutacije se vrši digestijom ovako dobijenog PCR fragmenta restrikcionim enzimom *AccI* (Pharmacia Biotech). Prisustvo mutacije kreira restrikciono mesto za ovaj enzim, tako da će se seći samo mutirani fragmenti. U slučaju digestije dobijamo produkte dužina 201 bp i 89 bp.

Smeša za digestiju sadrži sledeće komponente:

20 μ l PCR produkta

1 x pufer

4 U *AccI* (Pharmacia Biotech)

Materijal i metode

150 ng pUC18 plazmid (pozitivna kontrola). S obzirom da je prisustvo mutacije c.719A>G retko, neophodno je koristiti pozitivnu kontrolu. Plazmid pUC18 poseduje samo jedno restrikciono mesto za *AccI* i prilikom digestije doći će do linearizacije plazmida.

Uslovi digestije su 12 sati na 37°C. Analiza fragmenata se vrši na 8% poliakrilamidnom gelu.

Umnožavanje promotorskog regiona gena za TPMT

U cilju analize broja i tipova tandemskih ponovaka u promotorskom regionu gena za TPMT bilo je potrebno PCR metodom isti i umnožiti.

Finalna PCR smeša od 30 µl sadrži sledeće komponente: 200-500 ng DNK, 1 x PCR pufer sa 1.5 mM MgCl₂, 1 x Q pufer, 200 µM dNTP, prajmeri VNTR1 i VNTR2 20 pmol svaki, 1U Qiagen HotStart Taq DNA polimeraza.

Temperaturni profil PCR reakcije:

10 min/ 95°C (aktivacija polimeraze)

(1 min/ 94°C, 1.5 min/ 53°C, 2 min/ 72°C) ponovljeno 30 puta

10 min/ 72°C

PCR produkt koji sadrži VNTR*4 alel ima dužinu od 422 bp a kako se povećava broj ponovaka povećava se i dužina fragmenta za 17 odnosno 18 bp. Prvih 243 bp sa 5' kraja fragmenta pripada proksimalnom promotoru u okviru koga se nalazi i VNTR region a ostatak obuhvata prvi egzon TPMT gena. Zbog prisustva različitog broja ponovaka, obično se mogu detektovati dve različite dužine promotorskog regiona gena za TPMT kod jednog ispitanika. Analiza PCR produkata se vrši na 2% agaroznom gelu. Dobijeni PCR produkti se prečišćavaju na koloni (QIAquick PCR Purification kit, Qiagen) prema uputstvu proizvođača. Kada je DNK matrica pripremljena, pristupa se reakciji sekvenciranja u kojoj su korišćeni isti prajmeri kao i za PCR reakciju.

Materijal i metode

Umnožavanje GCC ponovaka promotorskog regiona gena za TPMT

U cilju analize broja GCC ponovaka u promotorskom regionu gena za TPMT bilo je potrebno PCR metodom isti i umnožiti.

Finalna PCR smeša od 30 μ l sadrži sledeće komponente: 200-500 ng DNK, 1 x PCR pufer sa 1.5 mM $MgCl_2$, 1 x Q pufer, 200 μ M dNTP, prajmeri VNTRGCCF i VNTRHXR 20 pmol svaki, 1U Qiagen HotStart Taq DNA polimeraza.

Temperaturni profil PCR reakcije:

10 min/ 95°C (aktivacija polimeraze)

(1 min/ 94°C, 1.5 min/ 52°C, 2 min/ 72°C) ponovljeno 30 puta

10 min/ 72°C

Očekivani produkt reakcije je dug 689 bp. Analiza PCR produkta se vrši na 2% agaroznom gelu. Dobijeni PCR produkti se prečišćavaju na koloni (QIAquick PCR Purification kit, Qiagen) prema uputstvu proizvođača. Kada je DNK matrica pripremljena, pristupa se reakciji sekvenciranja u kojoj su korišćeni isti prajmeri kao i za PCR reakciju.

Pravljenje CAT-konstrukata za eksperimente tranzijentne transfekcije

Za pravljenje konstrukata za ispitivanje uticaja broja i tipa tandemskih ponovaka u promotorskom regionu gena za TPMT korišćen je pCATbasic vektor (Promega). Ovaj vektor naziva se i reporterski i služi za ispitivanje aktivnosti promotora. Naime, ispred CAT gena se nalazi polilinkerski region u koji se uklonira željeni promotor i posle tranzijentne transfekcije u odabranu ćelijsku liniju CAT esejom se meri količina CAT proteina (reporter), direktno proporcionalna aktivnosti promotora.

Prvo se PCR reakcijom umnože promotorski region gena za TPMT.

Finalna PCR smeša od 30 μ l sadrži sledeće komponente: 200-500 ng DNK, 1 x PCR pufer sa 1.5 mM $MgCl_2$, 1 x Q pufer, 200 μ M dNTP, prajmeri VNTRHXF i VNTRHXR 20 pmol svaki

Materijal i metode

(prajmeri sadrže veštački dodate sekvence tzv. "repiće" za mesta sečenja restrikcionim enzimima *HindIII* i *XbaI*, Tabela 5), 1U Qiagen HotStart Taq DNA polimeraza

Temperaturni profil PCR reakcije:

10 min/ 95°C (aktivacija polimeraze)

(1 min/ 94°C, 1.5 min/ 52°C, 2 min/ 72°C) ponovljeno 30 puta

10 min/ 72°C

Dobijeni PCR produkt VNTRHX je veličine 365 bp. Ukoliko je broj ponovaka veći od četiri, PCR produkt je veće dužine. Analiza PCR fragmenta se vrši na 2% agaroznom gelu. Dobijeni PCR produkti se prečišćavaju na koloni (QIAquick PCR Purification kit, Qiagen) prema uputstvu proizvođača. Nakon toga se digestijom restrikcionim enzimima *HindIII* i *XbaI* omogućava stvaranje tzv. lepljivih krajeva. Plazmid pCATbasic, ispred CAT gena, ima polilinkerski region koji, pored drugih, ima i mesta za sečenje restrikcionim enzimima *HindIII* i *XbaI*.

Smeša za digestiju finalne zapremine 20µl sadrži sledeće komponente:

400 ng pCATbasic plazmida ili 300-800ng prečišćene PCR smeše

1 x M pufer

0.01% BSA

3 U *HindIII*, Pharmacia

3 U *XbaI*, Pharmacia

Smeše za digestiju inkubirane su 16h na 37°C. Produkti digestije analizirani su elektroforezom na 1% agaroznom gelu u slučaju digestije plazmida, odnosno 2% agaroznom gelu u slučaju digestije PCR produkta.

Istovremeno su pripremane i kontrolne digestije u kojima je plazmid sečen samo sa jednim enzimom. Linearizacija plazmida u obe jednostruke digestije je potvrda aktivnosti oba restrikciona enzima.

Radi sprečavanja recirkularizacije plazmida vrši se reakcija defosforilacije kojom se sa 5' kraja plazmida uklanja fosfatna grupa. Defosforilacija se vrši alkalnom fosfatazom

Materijal i metode

izolovanom iz creva teleta (Calf Intestine Alkaline Phosphatase, CIAP, Fermentas) prema uputstvu proizvođača.

Smeša za defosforilaciju finalne zapremine 35 μ l sadrži sledeće komponente:

1.5-2 μ g pCATbasic plazmida

1 x pufer

2 U CIAP, Fermentas

Smeša za defosforilaciju se inkubira 30 minuta na 37°C. Dejstvo alkalne fosfataze se zaustavlja izlaganjem smeše temperaturi od 85°C u trajanju od 15 minuta.

Formiranje rekombinantnog DNK molekula spajanjem plazmida i PCR fragmenta sa komplementarnim lepljivim krajevima vrši se u ligacionoj reakciji.

Ukupna količina DNK u ligacionoj smeši ne bi trebalo da pređe 200 ng. Molarni odnos vektora i fragmenta je varijabilan. Za fragmente veličine slične vektoru, preporučuje se odnos 1 : 1, dok u slučaju fragmenata manjih od vektora odnos raste 1:2, 1:3, 1:5 i tako dalje.

Ligaciona smeša finalne zapremine 10 μ l sadrži sledeće komponente:

100 ng digeriranog, defosforilovanog, prečišćenog pCATbasic vektora

50 ng digeriranog prečišćenog PCR fragmenta (molarni odnos plazmida i fragmenta je 1:5)

1 x pufer, sadrži Mg i ATP

4 U T4 DNK Ligaza, Biolabs

Ligaciona smeša se inkubira 16h na 16°C. Produkte ligacije moguće je analizirati elektroforezom na 1% agaroznom gelu.

Napravljeni konstrukti koji sadrže ceo promotorski region gena za TPMT nazvani prema tipu ponovaka koji sadrže u sebi: A₂BC, AB₂C, A₂B₂C, A₃BC, A₄BC, A₂B₃C, A₃B₂C, AB₄C, A₅BC, AB₅C i A₆BC.

U cilju izučavanja aktivnosti promotora gena za TPMT u obrnutom smeru, napravljen je konstrukt u kome je promotorski region gena za TPMT u obrnutoj orijentaciji od prirodne, sekvenca promotorskog regiona ispred CAT gena je orijentisana 3'-5'. Korišćeni su

Materijal i metode

prethodno navedeni uslovi PCR reakcije sa prajmerima VNTRXHF i VNTRXHR (Tabela 5). Ovaj konstrukt nazvan je XH.

PCR fragmenti za pravljenje delecionih konstrukata $\Delta 3$, $\Delta 4$ i $\Delta 5$ dobijeni su u PCR reakcijama istim kao gore opisanim korišćenjem sledećih parova prajmera (Tabela 5): VNTR2DEL i VNTRXHR, VNTR4DEL i VNTRXHR, VNTR5DEL i VNTRXHR. Napravljeni konstrukti nazvani su $\Delta 3$, $\Delta 4$ i $\Delta 5$. Konstrukt $\Delta 3$ imao je sa 5' kraja ponovke BBC i ceo fragment do 3' kraja promotora (+165 bp). Konstrukti $\Delta 4$ i $\Delta 5$ su slično imali ABBC i AABBC ponovke i ceo fragment do 3' kraja promotora.

KULTIVISANJE BAKTERIJA

(Sambrook *et al.*, 1989)

U toku rada sa bakterijama neophodno je održati sterilne uslove. Iz tog razloga, sve manipulacije odvijaju se u neposrednoj blizini plamenika. Takođe, svi rastvori, posude (petri šolje, menzure itd.) i alatke (eža, nastavak, čačkalica itd.) moraju biti sterilni.

E. coli bakterije soja DH5 α kultivisane su u tečnom LB (Luria-Bertani) medijumu (1% tripton, 1% NaCl, 0,5% ekstrakt kvasca) ili na čvrstoj LA podlozi (1% tripton, 1% NaCl, 0,5% ekstrakt kvasca i 1,5% bacto-agar). Svi medijumi za kultivisanje se sterilisu autoklaviranjem.

Bakterije se kultivisu na temperaturi od 37°C. I u tečni i u čvrsti medijum dodaje se odgovarajući antibiotik. S obzirom da pCATbasic nosi rezistenciju na ampicilin, ovaj antibiotik je dodavan u finalnoj koncentraciji 100 $\mu\text{g/ml}$.

Materijal i metode

PRIPREMANJE KOMPETENTNIH ĆELIJA *E. Coli DH5α*

(Sambrook *et al.*, 1989)

Ovom metodom se bakterije pripremaju za transformaciju stranom DNK. Ćelijska membrana bakterija se učini propustljivijom, a pritom se ne sme umanjiti vijabilnost samih ćelija i njihova sposobnost umnožavanja.

Sa čvrste LB podloge se pojedinačna bakterijska kolonija prenese u 5 ml tečnog LB medijuma bez antibiotika (DH5α soj nije rezistentan na antibiotike). Kultivacija se vrši preko noći, uz aeraciju i mućkanje na 37°C. Narednog dana, u svež LB medijuma (20 ml) inokulira se 1 ml prekonoćne kulture. Bakterije se gaje na 37°C do postizanja gustine od 0,3 - 0,5 OD/ml, koja se određuje merenjem spektrofotometrom na talasnoj dužini od 620 nm. Bakterije iz ove kulture razblažuju se inokuliranjem (2 ml) u svež tečni LB medijum (20 ml). Rast bakterijske kulture se nastavlja na 37°C do gustine 0,5 OD₆₂₀/ml. Na ovaj način dobijamo veliki broj bakterijskih ćelija koje se nalaze u eksponencijalnoj fazi rasta.

Taloženje bakterija se vrši centrifugiranjem na 7000 rpm na +4°C u trajanju od 10 minuta (Sorvall centrifuga, SS-34). Dobijeni talog bakterija se resuspenduje u 10 ml hladnog 0,1 M CaCl₂, inkubira na ledu 10 minuta i ponovo centrifugira pri istim uslovima. Bakterijski talog se resuspenduje u 2 ml ohlađenog rastvora sačinjenog od 0,1 M CaCl₂ i 15% glicerola. Kompetentne bakterijske ćelije čuvaju se u alikvotima od 200 µl na -80°C.

Poželjno je izvršiti proveru kompetentnih ćelija njihovim zasejavanjem na čvrstu LB podlogu (očekuje se rast) i na čvrstu LB podlogu sa antibiotikom (ne očekuje se rast). Takođe, poželjno je isprobati efikasnost transformacije ovih ćelija plazmidom koji nosi rezistenciju i njihovim sejanjem na podlogu koja sadrži odgovarajući antibiotik (očekuje se rast).

Materijal i metode

TRANSFORMACIJA *E. Coli DH5α* KOMPETENTNIH ĆELIJA

(Cohen *et al.*, 1972)

Transformacija kompetentnih bakterijskih ćelija plazmidom u koji je ukloniran željeni fragment DNK je ključna metoda genetičkog inženjerstva, i obezbeđuje velike količine DNK potrebne za naredne eksperimente. Bakterije se u ovom postupku koriste, zbog svoje značajne reproduktivne sposobnosti, kao recipijent za stranu DNK koju replikuju jednako efikasno kao i svoju sopstvenu.

Kompetentne ćelije (200 μ l) se otapaju na ledu i dodaje im se produkt ligacije plazmida i DNK fragmenta uz veoma pažljivo, blago mešanje. Smeša se inkubira 30 min na ledu.

Izlaganjem smeše temperaturnom šoku: led - 42°C (2min)- led (10min), propustljivost bakterijskih membrana dostiže maksimum što omogućava efikasnu transformaciju kompetentnog soja *E. coli* bakterija plazmidnom DNK.

Transformisanim ćelijama dodaje se 800 μ l tečnog LB bez antibiotika i njihov oporavak se favorizuje rastom u aerisanim uslovima na 37°C u toku 30-60 min. Oporavak se nastavlja dodavanjem svežeg LB medijuma sa antibiotikom (1 ml) i rastom u aerisanim uslovima na 37°C u toku 1-2 sata.

Nakon toga se alikvot bakterijske kulture (20-100 μ l) razmazuje po čvrstoj LB podlozi koja sadrži antibiotik. Rast bakterija odvija se preko noći na 37°C, posle čega se uočavaju pojedinačne kolonije na petri šoljama. S obzirom na selektivnost podloge, samo bakterije koje su primile plazmidnu DNK tj. transformanti, mogu da izrastu.

DETEKCIJA ŽELJENOG KONSTRUKTA

Sekvenciranje konstrukta je konačna potvrda da plazmid sadrži željeni DNK fragment i da u čitavoj sekvenci ne postoji promena nastala usled eventualne greške u DNK replikaciji. Sekvenciranje je vršeno pomoću prajmera korišćenih za umnožavanje željenog fragmenta za kloniranje.

Materijal i metode

U slučaju transformacije bakterija ovako pripremljenim konstruktima dobije se veliki broj transformanata. Otežavajuća okolnost je što pCATbasic plazmid nosi samo jedan gen koji mu daje rezistenciju na ampicilin, pa znamo da israsli transformant ima u sebi ovaj plazmid. Ono što ne znamo je da li taj plazmid sadrži u sebi fragment koji smo želeli da ukloniramo ili je "prazan". Da bi se smanjio broj onih transformanta koji će se proveravati digestijom restrikcionim enzimima i sekvenciranjem, radjena je preliminarna analiza velikog broja transformanata metodom brze lize.

BRZA LIZA (lysis gel electrophoresis)

(Barnes 1977)

Ovom metodom se u nekoliko koraka, brzo i efikasno, može uočiti postojanje plazmidnih molekula u velikom broju bakterija koje se analiziraju.

Za postupak brze lize su nam uvek potrebni "sveži" transformanti. Zato već dobijene transformante zasadimo na nove petri šolje sa ampicilinom, ostavimo ih da izrastu preko noći na 37°C i sutradan ih analiziramo. Prvo je potrebno lizirati bakterije.

U ependorf epruvetu sa 25 μ l 10 mM EDTA sterilnom čačalicom prenese se bakterijska kolonija i vorteksuje zajedno sa čačalicom. Čačalica se ukloni i doda se 25 μ l sveže napravljenog 2x cracking pufera sledećeg sastava: 0.2 M NaOH, 0.5% SDS, 0.5 M saharoza. Smeša se inkubira 10 minuta na 70°C, a zatim postepeno hladi na sobnoj temperaturi. Zatim se doda 1.5 μ l 4 M KCl i inkubira 5 minuta na ledu. Nakon inkubacije se centrifugira (13000 rpm, 5min, +4°C, mikrofuga Eppendorf). U talogu ostaje hromozomska DNK, a u supernatantu plazmidna DNK koja se analizira na 1% agaroznom gelu (100 V, 100 mA, 90 min).

Pored transformanata koje obrađujemo ovim postupkom, potrebno je, takođe, uraditi brzu lizu nekoliko bakterija za koje znamo da nose plazmide određenih veličina i koji nam služe kao standardi za određivanje veličine plazmida koje treba da identifikujemo. Plazmide koji na gelu koji imaju trake odgovarajuće veličine, treba dalje ispitivati da bi se potvrdilo da

Materijal i metode

nose željenu sekvencu. Međutim plazmidi izolovani brzom lizom nisu dovoljno čisti i samim tim nepogodni su za dalju analizu. Za dobijanje relativno male količine plazmida koji je dovoljno prečišćen da se na njemu mogu raditi analize restrikcionim enzimima, koristimo metodu mini prep.

IZOLOVANJE PLAZMIDNE DNK NA MALOJ SKALI (MINI PREP)

(Zhou *et al.*, 1990)

Za dobijanje relativno male količine plazmida zadovoljavajuće čistoće i kvaliteta da se na njemu mogu raditi analize restrikcionim enzimima, koristimo metodu "mini prep".

Sa čvrste selektivne podloge pojedinačna bakterijska kolonija se prenese u 2 ml tečnog LB medijuma sa antibiotikom i inkubira preko noći na 37°C uz aeraciju. Prekonoćna kultura se prebaci u ependorf epruvetu i centrifugira 5 min na 13000 rpm (mikrofuga Eppendorf). Bakterijski talog se resuspenduje vorteksovanjem i suspenziji se dodaje 300 µl svežeg TENS pufera (1x TE, 0,1 N NaOH, 0.5% SDS) koji lizira bakterije. Nakon kratkog vorteksovanja dodaje se 150 µl 3M Na-acetat pH 5,2. Nakon snažnog vorteksovanja centrifugira se 2 minuta na 13000 rpm. Supernatant u kome se nalazi DNK prebacuje se u čistu ependorf epruvetu, dok proteini ostaju u talogu. Dodaje se 1 ml hladnog 95% etanola, promeša i centrifugira pri istim uslovima. DNK talog se ispira hladnim 70% etanolom i nakon centrifugiranja pri istim uslovima suši u vakuum centrifugi. DNK se resuspenduje u 30 µl pufera 1x TE koji sadrži RNK-azu (finalna koncentracija 10 µg/ml).

Plazmidna DNK se može proveriti elektroforezom na 1% agaroznom gelu. Ova metoda daje plazmidnu DNK koja je dovoljno čista da bi se konstrukt proverio digestijom restrikcionim enzimima kojima je PCR fragment i kloniran. Na ovaj način se PCR fragment "izbacuje" iz plazmida i to se proverava elektroforezom na 1% agaroznom gelu.

Ovako izolovana plazmidna DNK nije dovoljno čista da bi se željeni konstrukt proverio sekvenciranjem. Iz transformanata kod kojih smo detektovali izbacivanje fragmenta,

Materijal i metode

izolovana je plazmidna DNK na maloj skali pomoću kita QIAGEN-a, prema uputstvu proizvođača.

IZOLOVANJE PLAZMIDNE DNK NA MALOJ SKALI

(Prema uputstvu QIAGEN-a)

Za dobijanje male količine plazmidne DNK koja može uspešno da se sekvencira, koristi se QIAprep Spin Miniprep Kit.

Sa čvrste selektivne podloge pojedinačna bakterijska kolonija se prenese u 5 ml tečnog LB medijuma sa antibiotikom i inkubira preko noći na 37°C uz aeraciju. Prekonoćna kultura se prebaci u ependorf epruvetu i centrifugira 5 min na 13000rpm. Bakterijski talog se resuspenduje vorteksovanjem u 250 µl pufera P1. Zatim se dodaje 250 µl pufera P2 i sadržaj se meša prevrtanjem tube 4 do 6 puta. I nakon dodavanja 350 µl pufera N3 neophodno je momentalno i temeljno promešati sadržaj na isti način. Ovi koraci omogućili su lizu bakterija. Zatim se smeša centrifugira na 13000 rpm u toku 10 min. Supernatant se direktnim presipanjem iz ependorf epruvete nanosi na QIAprep kolonu. Nakon toga se vrši centrifugiranje na 13000 rpm u toku 1 min i eluat se odbacuje. U ovom koraku DNK je ostala vezana za kolonu i potrebno ju je isprati od nečistoća. To se postiže dodavanjem 0.5 ml pufera PB i centrifugiranjem u toku 1 min. Ovaj korak nije neophodan u slučaju DH5α bakterijskog soja, ali s obzirom da ne ometa izolaciju i ne smanjuje prinos reakcije ne mora se preskočiti. Dodavanje 0.75 ml pufera PE i centrifugiranje na 13000 rpm u toku 1 min takođe oslobađa DNK od nečistoća. Posle svakog od do sada navedenih centrifugiranja, eluat se odbacuje. Da bi se odstranili i poslednji tragovi pufera, kolona se prebacuje u čistu ependorf epruvetu i ponovo centrifugira na 13000 rpm u toku 1 min. Kolona se ponovo prebacuje u čistu ependorf epruvetu i dodaje se 100 µl pufera EB koji će osloboditi DNK sa kolone. Korisno je inkubirati kolonu na sobnoj temperaturi u toku 1 min kako bi se povećao prinos DNK. Centrifugiranjem na 13000 rpm u toku 1 min dobija se 95-100 µl eluata u kome je rastvorena plazmidna DNK.

IZOLOVANJE PLAZMIDNE DNK NA VELIKOJ SKALI

(Prema uputstvu QIAGEN-a)

Za dobijanje velike količine plazmidne DNK dobrog kvaliteta, potrebne za eksperimente transfekcije, koristi se QIAGEN EndoFree Plasmid Purification Maxi Kit.

Sa čvrste selektivne podloge pojedinačna bakterijska kolonija se prenese u 500 ml tečnog LB medijuma sa antibiotikom i inkubira preko noći na 37°C uz aeraciju. Ukoliko bakterijski soj nije dostupan na petri šolji, može se koristiti i glicerolski stok. Glicerolski stok nije potrebno otapati, dovoljno je zagrebat i sterilnim nastavkom po površini i nastavak ubaciti u tečni medijum. Prekonoćnu kulturu je potrebno podeliti na dva dela i prebaciti u sterilnu plastičnu tubu od 250 ml. Centrifugiranje se vrši na 6000 rpm u toku 20 min na +4°C (Sorvall centrifuga, rotor SA-3), nakon čega se supernatant prosipa, a bakterijski talog resuspenduje u 10 ml pufera P1 da bi se obezbedila liza bakterijskih ćelija. Od ovog koraka pa nadalje, sve se radi na ledu. Zatim se dodaje 10 ml pufera P2 a sadržaj se meša prevrtanjem 4 do 6 puta. Mešanje vorteksovanjem se ne preporučuje da ne bi došlo do mešanja plazmidne i genomske DNK i kidanja plazmidne DNK. Nakon toga, smeša se inkubira na sobnoj temperaturi u toku 5 min. Za to vreme, priprema se QIAfilter Cartridge tako što se zatvori poklopac na izlazu iz kertridža i kertridž smesti u odogovarajuću epruvetu (50 ml) na odgovarajući stalak. Zatim se dodaje 10 ml pufera P3, prethodno ohlađenog na +4°C, nakon čega je potrebno momentalno i temeljno promešati smešu prevrtanjem 4 do 6 puta. Lizat se sipa u otvor na kertridžu i inkubira se bez pomeranja na sobnoj temperaturi 10 minuta. Tokom ovog vremena, nastali precipitati koji sadrže proteine, genomsku DNK i deterdžent će isplivati na površinu rastvora i formirati sloj. Skine se poklopac sa donjeg dela kertridža i gurne deo za potiskovanje tečnosti. Nakon filtracije se dobije oko 25 ml lizata. Doda se 2.5 ml ER pufera, izmeša prevrtanjem 10 puta i inkubira na ledu 30 minuta. Ovaj pufer služi za uklanjanje endotoksina. Za to vreme, pripremi se QIAGEN-tip 500 kolona nanošenjem 10 ml pufera QBT i pusti se da se kolona isprazni pod dejstvom sile gravitacije. Nanese se lizat koji se inkubirao na ledu i takođe pusti da se kolona isprazni pod dejstvom sile gravitacije. Plazmidna DNK se vezala za kolonu. DNK se ispira od nečistoća dva puta dodavanjem 30 ml pufera QC. Svi eluati se do ovog trenutka bacaju. Od sledećeg koraka se koristi samo "endotoxin-free" i "pyrogen-free" posuđe. Mi smo koristili stakleno posuđe pečeno na

Materijal i metode

180°C tokom 12 sati, a moguće je koristiti i nove sterilne polipropilenske tube. Pre dodavanja sledećeg pufera, potrebno je kolonu učvrstiti za novu epruvetu. DNK se pomoću gravitacije eluira sa kolone sa 15 ml pufera QN i skuplja u prethodno pečene COREX staklene epruvete od 30 ml. DNK se taloži dodavanjem 10.5 ml (0.7 volumena) izopropanola na sobnoj temperaturi. Nakon dodavanja, smešu je potrebno promešati prevrtanjem i centrifugirati na 9000 rpm u toku 45 min na +4°C (Sorvall centrifuga, rotor SS-34). Supernatant se pažljivo odliva, a DNK talog se ispira sa 5 ml 70% etanola. Nakon centrifugiranja na 9000 rpm u toku 20 min, supernatant je potrebno ukloniti do poslednje kapi, kako bi se talog što pre osušio. DNK talog se rastvara u 500 µl 1xTE ili vode. Nije poželjno da se DNK talog presuši, jer se takva DNK teško rastvara. Kako bi se DNK bolje rastvorila poželjno je da se ostavi na +4°C u toku noći.

ČUVANJE TRANSFORMANATA

(Sambrook *et al.*, 1989)

Transformanti su nekoliko nedelja vijabilni na čvrstim LB podlogama suplementiranim sa antibiotikom, ukoliko su petri šolje zatvorene parafilmom i čuvaju se na +4°C okrenute naopako.

Za duže čuvanje transformanata, pripremaju se glicerolski stokovi: 150 µl sterilnog 100% glicerola i 850 µl tečne prekonoćne kulture. Najbolje je koristiti istu prekonoćnu kulturu koja se koristi za izolaciju plazmidne DNK na maloj skali pomoću QIAGEN kita. Na taj način pouzdano znamo da se u glicerolskom stoku nalazi upravo ona bakterijska kultura kod koje je konstrukt potvrđen sekvenciranjem.

Glicerolski stokovi su vijabilni nekoliko godina na -20°C i duži niz godina na -80°C.

Materijal i metode

ANALIZA DNK NA AGAROSNOM GELU

(Sambrook *et al.*, 1989)

Analiza DNK vrši se na horizontalnom agaroznom gelu odgovarajuće koncentracije (1 - 2%), u zavisnosti od veličine molekula DNK koje treba razdvojiti. Kao pufer za pripremanje gelova koristi se 1xTAE pufer (40 mM Tris-acetat, 1 mM EDTA pH 8.0). Isti pufer koristi se i za elektroforezu. U gel se dodaje fluorescentna boja etidijum bromid (u finalnoj koncentraciji 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) koja se interkalira u DNK i omogućava njenu vizuelizaciju pod UV svetlom. Elektroforeza se izvodi pri jačini struje od 80 mA i naponu od 80 V. Veličina fragmenata DNK određuje se pomoću adekvatnih komercijalnih markera (Fermentas).

ANALIZA DNK NA POLIAKRILAMIDNOM GELU

(Sambrook *et al.*, 1989)

Analiza DNK vrši se na vertikalnom 8% poliakrilamidnom gelu (akrilamid : N,N'-metilenbisakrilamid, u odnosu 29 : 1). Kao pufer za elektroforezu a i za pripremanje gela koristi se 1x TBE (100 mM Tris, 83mM borna kiselina, 1 mM EDTA pH 8.0). Kao inicijatori polimerizacije koriste se 0,1% amonijumpersulfat i 0,01% TEMED. Elektroforeza se izvodi pri jačini struje od 20mA i naponu od 120V u toku 90min. Gel se zatim boji srebronitratom.

BOJENJE POLIAKRILAMIDNIH GELOVA SREBRONITRATOM

(Radojkovic *et al.*, 2000)

Vizuelizacija DNK na poliakrilamidnim gelovima vrši se bojenjem pomoću srebronitrata. Gel se posle elektroforeze fiksira rastvorom 10% etanola i 0.5% glacijalne sirćetne kiseline, uz mućkanje na klackalici 20-30min. Posle toga se ovaj rastvor odlije, a gel se prelije 0.1% rastvorom srebronitrata i mućka na klackalici 10min. Sledi nekoliko sekundi ispiranje vodom. Trake u gelu postaju vidljive nakon dodavanja rastvora 1.5% NaOH, 0.01% NaBH₄ i 0.048%

Materijal i metode

formaldehid (15 do 20min, u zavisnosti od količine uzorka u gelu). Bojenje se stopira dodavanjem 0.75% rastvora Na_2CO_3 .

SEKVENCIJANJE PCR PRODUKATA/CAT KONSTRUKATA

Sekvenciranje DNK je rađeno BigDye™ Terminators Version 3.1 Ready Reaction Kit-om (Applied Biosystems) kapilarnom elektroforezom na automatskom sekvenceru (3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems). Ovaj kit omogućava sekvenciranje u PCR reakciji u kojoj se pored deoksinukleotida koriste i 2',3'-dideoksinukleotidi (Sanger *et al.*, 1977). DNK polimeraza kopira jedan lanac DNK matrice ugrađujući nukleotide na 3' kraj prajmera sve dok u rastući lanac ne ugradi neki od dideoksinukleotida. Dideoksinukleotidi nemaju OH-grupu na 3' poziciji, zbog čega nemaju sposobnost vezivanja sledećeg nukleotida, pa njihovom ugradnjom dolazi do terminacije polimerizacije. Reakcije se rade sa samo jednim prajmerom (asimetrični PCR) tako da se dobija serija fragmenata različitih dužina koji se završavaju dideoksinukleotidom. Svaki od 4 dideoksinukleotida obeležen je različitom fluorescentnom bojom čime je omogućena detekcija fragmenata u sekvenceru. Za razliku od kitova u kojima su dideoksinukleotidi obeleženi jednom istom fluorescentnom bojom, ovaj kit omogućava da se sekvenciranje jednog uzorka radi u jednoj PCR reakciji umesto u četiri odvojene.

Prvo se PCR reakcijom umnoži region DNK koji želimo da sekvenciramo. Ova procedura je opisana u delu *Umnožavanje promotorskog regiona gena za TPMT* i *Umnožavanje GCC ponovaka promotorskog regiona gena za TPMT*. Nakon provere PCR produkta na 2% agaroznom gelu, vrši se njegovo prečišćavanje na koloni (QIAquick PCR Purification kit, Qiagen) prema uputstvu proizvođača. Kada je DNK matrica pripremljena, pristupa se reakciji sekvenciranja za koju su u izradi ovog rada korišćeni isti prajmeri kao i za PCR reakciju.

Na isti način se sekvenciraju i CAT-konstrukti dobijeni kloniranjem da bi se potvrdilo da su ispravni. Plazmidi su izolovani pomoću QIAGEN kita na način opisan u delu **IZOLOVANJE PLAZMIDNE DNK NA MALOJ SKALI**.

Smeša za sekvenciranje finalne zapremine 8 μ l sadrži sledeće komponente:

Materijal i metode

3-10 ng prečišćenog PCR produkta (za dužine 200-500bp)/ 150-300 ng CAT-konstrukta
prajmer za sekvenciranje 3.2 pmol
3µl Ready Reaction Mix (Applied Biosystems)

Temperaturni profili PCR reakcije za sekvenciranje:

96°C/1min

(96°C/10s, 50°C/5s, 60°C/4min) ponovljeno 25 puta

4°C/ ∞

Posle završene reakcije sekvenciranja u uzorke se doda 40 µl Na-acetata, promućka se i centrifugira 20 min na 13000 rpm (mikrofuga Eppendorf) posle čega se supernatant uklanja. Talogu se doda 200 µl 70% etanola i centrifugira 10 min na 13000 rpm, posle čega se supernatant uklanja. Ovaj korak se ponavlja još jednom. Nakon drugog ispiranja etanolom talog je neophodno u potpunosti osušiti. Osušeni talog se rastvara u 25 µl HiDi i celokupna količina se nanosi na plejt za sekvenciranje.

Manji broj CAT konstrukata (10) je sekvenciran u kompaniji „Makrogen“ u Južnoj Koreji, <http://dna.macrogen.com/eng>.

USLOVI GAJENJA ČELIJA U KULTURI

(Shannon et al 1973)

K562 (ATCC br. CCL-243, DSMZ br. ACC 10) i HeLa (ATCC br. CCL-2, DSMZ br. ACC 57) su ustaljene (permanentne) ćelijske linije. K562 ćelije su okruglog oblika i rastu u suspenziji (razmnožavaju se u tečnom medijumu bez lepljenja za podlogu) i po deobi ostaju zajedno formirajući "grozdove". HeLa ćelije se lepe za podlogu i rastu dok se ne formira jednoćelijski "tepih" na donjoj površini posude za kultivisanje, kada, usled kontaktne inhibicije, ulaze u stacionarnu fazu rasta (mirovanje).

Ove ćelijske linije se gaje u Petri šoljama ili Falcon plastičnim sudovima u termostatu sa automatskim protokom 5% CO₂ u vazduhu i na temperaturi od 37°C. Koristi se medijum koji sadrži sve komponente neophodne za neprekidno razmnožavanje ćelija (Eagle MEM sa

Materijal i metode

dodatkom 10% fetalnog telećeg seruma, FCS). Jedan litar ovog medijuma sadrži 100 ml 10x Eagle MEM-a, 100 ml fetalnog telećeg seruma, 28 ml 7,5% NaHCO₃, 10 ml 1 M HEPES-a pH 7-7.2, 10 ml 3% glutamina (0.03% finalno), 10 ml 100x neesencijalnih aminokiselina, 10 ml antibiotika (penicilin - streptomycin).

ODMRZAVANJE ĆELIJA

Ćelije treba brzo odmrznuti, prenoseći ih sa -196°C u topli medijum (37°C). Brzim otapanjem, kristalne strukture brzo nestaju i smanjuje se opasnost da probiju ćelijske membrane.

DMSO koji je prisutan u medijumu za zaleđivanje uklanja se centrifugiranjem na 1800 obr/min, 7 min (klinička centrifuga Hereus). Međutim, neposredno nakon otapanja ćelije su veoma osetljive. S obzirom da je koncentracija DMSO-a veoma niska nakon dodavanja svežeg medijuma, ovaj korak je poželjno odložiti. DMSO je inertan u medijumu za gajenje ćelija ali postoji izvesna verovatnoća da može svojim prisustvom da navede ćelije da promene svoje prvobitne karakteristike. Ćelijske linije korišćene u ovom radu nisu mnogo osetljive i mi prilikom odmrzavanja ćelija uklanjali DMSO.

Potrebno je da prođe izvesno vreme da bi se ćelije oporavile posle odmrzavanja i ušle u normalni tempo rasta.

ZAMRZAVANJE ĆELIJA

Ćelije se zamrzavaju kad su u fazi logaritamskog rasta, ni pre (*lag* faza - neposredno posle pasaziranja dok se ćelije oporavljaju i neznatno umnožavaju), ni posle (*stacionarna* faza koja se karakteriše sve većim umiranjem ćelija zbog prevelikog broja ćelija po mililitru medijuma za rast).

Ćelije se pripremaju za zamrzavanje na sledeći način:

Materijal i metode

Ćelije koje se lepe ispiraju se od medijuma u kome su rasle i tripsinizuju, i resuspenduju u svežem medijumu. U slučaju ćelija koje rastu u suspenziju, ovaj korak ne postoji. Nezavisno od karakteristika, ćelijska suspenzija se prebacije u tubu i vrši se centrifugiranje na 1800 obr/min, 7 minuta na sobnoj temperaturi (klinička centrifuga Heraeus). Medijum se pažljivo usisa da ne bi došlo do odlepljivanja taloga, ćelije se resuspenduju u PBS-u (ispiranje) i ponovo talože pod istim uslovima. Talog od $1-2 \times 10^6$ ćelija se rastvori u 0.5-1 ml medijuma za zamrzavanje i sipa u već ohlađene i obeležene epruvete za zamrzavanje. Medijum za zamrzavanje sadrži krioprotektivni agens, DMSO-a (dimetilsulfoksid) i fetalni teleći serum (ili MEM) u odnosu 1:9. Prisustvo krioprotektivnog agensa je neophodno zbog njegove funkcije da veže vodu i smanji verovatnoću stvaranja kristala leda pogubnih za ćelije.

Ćelijska suspenzija se mora zamrznuti polako (temperatura treba da opada $1-3^\circ\text{C}/\text{min}$) jer se tada preferencijalno stvaraju ekstra-, a ne intracelularni kristali leda, pa ćelije ostaju neoštećene. To se postiže držanjem ćelija prvo na $+4^\circ\text{C}$ (1 sat), zatim na -20°C (1 do 16 sati), i konačno na -80°C (16 do 72 sata). Tek tada se ćelije smeštaju u tečni azot (-196°C), gde su hemijske i fizičke aktivnosti u ćeliji na zanemarljivom nivou, i one ostaju vijabilne godinama.

SUBKULTIVACIJA ĆELIJA

K562 ćelije rastu u suspenziji. Prilikom deobe dve ćelije ostaju u blizini formirajući grozove. Prvo se staklenom pipetom ili automatskom pipetom (plavim nastavkom) grozdovi "razbiju" blagim uvlačenjem i izvlačenjem medijuma. Zatim se skupe u tubu od 10 ml i centrifugiraju u kliničkoj centrifugi 7 minuta na 1800 rpm. Supernatant se usisa vakumskom pumpom a talog ćelija rastvori u 1 ml 1xPBS-a (phosphate buffer saline) koji na 1 litar sadrži: 8 g NaCl, 0.2 g KCl, 0.2 g KH_2PO_4 i 1.15 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$. Ćelije se resuspenduju i broje. Zasađuju se 2×10^5 ćelija/ml i presađuju jednom u 2-3 dana u 1:3 ili 1:5 odnosu.

HeLa ćelije se pasażiraju kada formiraju konfluentni sloj, svaka 3 - 4 dana. Medijum se usisava pasterovom pipetom pomoću vakuuma, nakon čega se konfluentan sloj ćelija ispira 1x PBS-om. Ćelije isprane od medijuma odvajaju se od podloge pomoću 0,1% rastvora tripsina u PBS-u. Tripsin je proteolitički enzim koji često sadrži i elastazu, te oba enzima u

Materijal i metode

sadejstvu degraduju proteinski matriks koji vezuje ćelije i doprinose disocijaciji ćelija. Tripsinizacija ćelija traje 5-10 minuta, u zavisnosti od aktivnosti tripsina. Alikvot tripsina poželjno je predhodno zagrejati na 37°C kako bi se povećala enzimska aktivnost. Inkubacija ćelija sa tripsinom može da se odvija na sobnoj temperaturi ili na 37°C. Disocijacija ćelija se potvrđuje pod mikroskopom. Pod mlazem šprica, ćelije se potpuno odvajaju od podloge. Dodavanjem medijuma za gajenje ćelija inaktiviše se dejstvo tripsina. Pre subkultivisanja, ćelije je neophodno temeljno resuspendovati u medijumu. Time se obezbeđuje da se ćelije koje se lepe za podlogu pravilno rasporede po čitavoj površini petri šolje. Subkultivacija se najčešće vrši u odnosu 1:3.

BROJANJE ĆELIJA

(Meryman 1963; Ristić 1979)

Ćelije se broje uz pomoć mikroskopa i pločice za brojanje. U izradi ovog rada korišćena je Bürker-Türk-ova pločica i sledeća formula za izračunavanje broja ćelija:

broj ćelija na pločici/64 x 0.5= broj ćelija u suspenziji (10^6)/ml.

Da bi brojanje bilo verodostojno, neophodno je dobro resuspendovati ćelije. Mešanjem 100 μ l ćelija iz suspenzije sa istim volumenom 0,1% tripan-plavo boje omogućava se razlikovanje živih od mrtvih ćelija. Tripan-plavo ulazi u mrtve ćelije i boji ih, dok žive ćelije ostaju svetle, sa zlatnim oreolom.

VIJABILNOST K562 ĆELIJA POD UTICAJEM 6-MERKAPTOPURINA (6-MP)

6-merkaptopurin (6-mercaptopurine monohydrate 99%, Sigma Aldrich) je korišćen za tretiranje K562 ćelija pre tranzijentne tranfekcije i za izolovanje jedarnih proteina za EMSA i South-Western eksperimente. Čvrsti 6-MP je rastvoren u 0.1N NaOH, razblaženja su pravljeni sa 1xPBSom i čuvana na -20°C. Raspon koncentracija 6-MP je bio sledeći: 0.001 μ M, 0.01 μ M, 0.1 μ M, 1 μ M, 10 μ M, 100 μ M, 250 μ M, 500 μ M i 1000 μ M. Ćelije su gajene

Materijal i metode

48 sati u MEM medijumu sa ovim koncentracijama 6-MP. Nakon ovog vremena ćelije su skupljene, oprane 1x PBS-om i brojane na automatskom brojaču ćelija ili je procena vijabilnosti rađena MTT testom.

BROJANJE ĆELIJA NA AUTOMATSKOM BROJAČU

U eksperimentima procene vijabilnosti K562 pod dejstvom različitih koncentracija 6-MP, za brojanje ćelija korišćen je automatski brojač ćelija (The Countess™ automated cell counter, Invitrogen).

Pomeša se 10 µl suspenzije ćelija i 10 µl 0.4% boje tripan-plavo, sipa u komoricu za brojanje i stavi u predviđeno mesto za komoricu na aparatu. Žive ćelije imaju svetli centralni deo i tamne ivice a mrtve ćelije imaju uniformnu tamno-plavu boju. Aparat broji ćelije i izračunava njihovu vijabilnost.

MTT TEST

Vijabilnost K562 ćelija pod uticajem različitih koncentracija 6-MP-a je merena MTT testom. To je kolorimetrijski esej koji detektuje konverziju žute tetrazolijumske soli MTT (dimetiltiazol difenil tetrazolijum bromid) u ljubičasti formazan koju vrše enzimi mitohondrijalne reduktaze živih ćelija. Ova konverzija je u direktnoj srazmeri sa brojem živih ćelija. Kristali formazana nisu rastvorljivi u vodenom rastvoru. Količina formazana se određuje njegovim rastvaranjem u DMSO i merenjem spektrofotometrijski na čitaču za mikroploče.

K562 ćelije su 48 sati rasle pod tretmanom 6-MP i to u sledećim koncentracijama: 0.001 µM, 0.01 µM, 0.1 µM, 1 µM, 10 µM, 100 µM, 250 µM, 500 µM i 1000 µM. Ćelije su oprane 1x PBS-om, izbrojane i zasejane 0.5×10^6 K562 ćelija u 100 µl MEM medijuma u 96-well plejtu. Reakcije su postavljane u triplikatu, uključujući netretirane ćelije kao i sam medijum (blank). Sutradan je u svaki bunarić dodato MTT rastvora u finalnoj koncentraciji 0.5 mg/ml. Nakon 4 sata inkubacije u svaki bunarić je dodato 100 µl DMSO koji rastvara nastale kristale

Materijal i metode

formazana. Absorbanca je merena na talasnoj dužini 620 nm na čitaču za mikroploče Microplate reader Multiskan RC (Labsystems).

IZOLOVANJE JEDARNIH PROTEINA

(Schreiber *et al.*, 1989)

Za izolaciju jedarnih proteina iz HeLa i K562 ćelijskih linija obično se polazi od $0.5-1 \times 10^6$ ćelija. Ćelije se resuspenduju u 1 ml 1x TBS (0.05M Tris Base, 0.9% NaCl, pH 8.4) i prebacuju u ependorf epruvetu. Nakon kratkog centrifugiranja na 10000 rpm (Eppendorf mikrofuga), talog se resuspenduje u 400 μ l u hladnog pufera A (10 mM HEPES pH 7.9, 10 mM KCl, 0.1mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF) laganim provlačenjem kroz žuti nastavak. Ćelije se inkubiraju 15 minuta na ledu, nakon čega im se dodaje 25 μ l 10% rastvora Nonidet NP-40. Nakon intenzivnog vorteksovanja, homogenat se centrifugira 30 sekundi na 10000 rpm. Talog jedara se resuspenduje u 50 μ l hladnog pufera C (20mM HEPES pH7.9, 0.4M NaCl, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 1mM DTT, 1mM PMSF) i ependorf epruveta se snažno protresa 15 minuta na +4°C (MultiBio RS-24, LKB). Jedarni ekstrakt se centrifugira 5 min na 10000 rpm na +4°C (Eppendorf mikrofuga) i supernatant se u alikvotima (oko 55 μ l) čuva na -70°C.

BRADFORD METODA

(Bradford 1976)

Bradford metoda se koristi za utvrđivanje koncentracije proteina u uzorku. U smešu finalne zapremine 1 ml stavlja se 10 μ l proteinskog uzorka i 200 μ l Bradford reagensa (Protein Assay Due Reagent, Bio Rad). Nakon mešanja smeše, apsorpcija se određuje spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 595nm (Ultrospec 3300 Pro, Amersham Biosciences).

Materijal i metode

Radi određivanja koncentracije proteina u uzorku, neophodno je napraviti standardnu krivu tako što se poznata razblaženja BSA proteina (1 mg/ml), uključujući blank, pripremaju i mere na identičan način.

ANALIZA INTERAKCIJE DNK I JEDARNIH PROTEINA

In silico analiza promotora gena za TPMT

Za *in silico* analizu promotora gena za TPMT korićena su dva kompjuterska algoritma dostupna na internetu. Prvi je program MatInspector (Cartharius *et al.*, 2005) i zadati uslov je bio kriterijum da verovatnoća vezivanja transkripcionog faktora iz biblioteke vertebrata za ispitivanu sekvencu bude 0.75. Drugi program je TFSEARCH, verzija 1.3 (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>). Program omogućava identifikaciju sekvenci koje pokazuju visoku korelaciju u odnosu na TFMATRIX bazu podataka (verzija 3.3) u kojoj su sakupljena okarakterisana mesta vezivanja transkripcionih faktora (Heinemeyer *et al.*, 1998). Pretraga je bila ograničena na mesta vezivanja transkripcionih faktora prisutnih kod vertebrata i na nivo značajnosti preko 85%.

ANALIZA DIREKTNE INTERAKCIJE DNK I JEDARNIH PROTEINA

Radi proučavanja promotorskog regiona gena za TPMT čoveka, sintetisane su po dve komplementarne jednolančane oligonukleotidne probe (Tabela 6). S obzirom da u *in vivo* uslovima regulatorne sekvence postoje u obliku dvolančane DNK, od dva komplementarna jednolančana oligonukleotida, renaturacijom je pravljena dvolančana proba. U ovom radu korišćene su dvolančane probe koje su se međusobno razlikovale po broju i tipu tandemskih ponovaka u promotorskom regionu gena za TPMT.

Za proučavanje interakcija promotorskih DNK sekvenci i transkripcionih faktora koristili smo dve metode: metodu usporene elektroforetske pokretljivosti (electrophoretic mobility shift assay, EMSA) i South-Western metodu (South-Western blotting).

Materijal i metode

U slučaju South-Western blota, gde se jedarni ekstrakti prvo razdvajaju prema svojoj molekularnoj težini, ostvaruje se finija detekcija proteina koji stupaju u direktnu interakciju sa analiziranim fragmentom.

OBELEŽAVANJE OLIGONUKLEOTIDNE PROBE

Reakcija obeležavanja 5' kraja oligonukleotida vršena je pomoću Ready-To-Go T4 Polinukleotidne kinaze (Amersham Bioscience) prema preporuci proizvođača.

Reakcija obeležavanja finalne zapremine 50 μ l sadrži sledeće komponente:

5 pmol jednolančanog coding oligonukleotida, navedenog u Tabeli 4.

1-2 μ l γ -³²P ATP-a

Ready-To-Go T4 Polinukleotidne kinaze (Amersham Bioscience) rastvorena u vodi.

Reakcija se inkubira na 37°C u toku 30 min, nakon čega se oligonukleotid prečišćava od neugrađenog aktiviteta propuštanjem kroz G-50 kolonu (GE Healthcare). Specifični aktivitet oligonukleotidne probe određuje se merenjem na scintilacionom brojaču.

Obeleženi jednolančani coding oligonukleotid se uparava u vakuum centrifugi i rastvara u 25 μ l 10 puta razblaženom puferu za renaturaciju (10 mM Tris-Cl pH 7.5, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM EDTA i 1 mM DTT). Zatim se dodaje komplementarni noncoding oligonukleotid u 10x višku (50 pmol), radi sigurnosti da će sve jednolančane obeležene probe biti uključene u reakciji renaturacije. Reakcija hibridizacije obeleženog i neobeleženog oligonukleotida postiže se kratkom denaturacijom na temperaturi od 90°C u toku 3 minuta i renaturacijom - sporim hlađenjem do sobne temperature. Specifični aktivitet oligonukleotidne probe određuje se merenjem na scintilacionom brojaču.

Reakcija prevođenja neobeleženih proba i neobeleženih specifičnih kompetitora u dvolančanu formu se vrši na isti način.

METODA USPORENE ELEKTROFORETSKE POKRETLJIVOSTI

(Fried *et al.*, 1981; Wall *et al.*, 1988)

Interakcija jedarnih proteina sa odabranim promotorskim regionom analizirana je modifikovanom standardnom metodom usporene elektroforetske pokretljivosti.

Pri određenim uslovima, jedarni proteini se, ukoliko imaju afinitet za određene sekvence DNK, vezuju za iste, formirajući komplekse koji se u električnom polju kreću sporije nego slobodan DNK fragment. Nakon razdvajanja na 4% poliakrilamidnom gelu, formirani kompleksi se detektuju u vidu traka čija je elektroforetska pokretljivost manja u poređenju sa onom koju ima slobodan fragment.

Reakcione smeša finalne zapremine 25 μ l sadrži sledeće komponente:

1-5 ng 32 P obeležene dvolančane probe (specifična aktivnost oko 10000 cpm)

2-5 μ g jedarnih proteina

1 x pufer (50 mM Tris, pH 8.0; 250 mM NaCl; 5 mM DTT, 5 mM EDTA; 50 % glicerol)

Po potrebi, smeši se dodaju i sledeće komponente:

Nespecifični dvolančani kompetitor (20 ng/ μ l Poly(dI-dC):Poly(dI-dC) Pharmacia)

Specifični kompetitor (ista, ali neobeležena dvolančana proba, dodavaje se u velikom višku - 50 ili 100x većem molarnom odnosu u odnosu na obeleženu probu)

Kompetitor koji sadrži konsenzus sekvencu za određeni transkripcioni faktor, naveden u Tabeli 6 (proba Sp1 koja sadrži konsenzus sekvencu za vezivanje transkripcionog faktora Sp1 (Santa Cruz katalog), proba -890 koja sadrži mesta vezivanja transkripcionih faktora KLF1 i Sp1 (Pruzina *et al.* 1991), takođe dvolančana neobeležena proba.

Antitelo (u ovom radu su korišćena antitela na Sp1, Sp3, Sp4 i KLF1 transkripcione faktore)

Smeša se priprema na ledu, dok se reakcija vezivanja transkripcionih faktora za DNK probu odvija na 37°C tokom 30 min. Nakon isteka tog vremena, reakciona smeša se meša sa 6 μ l boje (0.25%, brom fenol plavo, 0.25% ksilen cijanol, 30% glicerol) i nanosi na 4% poliakrilamidni gel. Elektroforeza se odvija u 0.5x TBE puferu, pri konstantnom naponu od 250 V i struji od 55 mA u toku sat i dvadeset minuta. Poliakrilamidni gel se suši i analizira na fosfoimidžeru (Cyclone, Perkin Elmer) ili autoradiografski. Za eksperimente supersifta

Materijal i metode

korišćen je i polikarilamidni gel koji je u donje dve trećine bio 4% a u gornjoj trećini 3% akrilamidni.

Za eksperimente supersifta napravljen je gel koji je bio kombinacija 0.5% agaroznog i 2% poliakrilamidnog gela. Za polimerizaciju se koristi akrilamid : N,N'-metilenbisakrilamid, u odnosu 29 : 1, a za inicijatore polimerizacije 0,1% amonijumpersulfat i 0,01% TEMED. Korišćena je agarozna sa niskom tačkom topljenja u finalnoj koncentraciji od 0.5%. Kao pufer za elektroforezu a i za pripremanje gela koristi se 0.5x TBE.

SOUTH-WESTERN METODA

(Michael *et al.*, 1988)

Interakcija između fragmenta DNK i pojedinačnih proteina može se detektovati South-Western metodom. Metoda obuhvata: razdvajanje jedarnih proteina na denaturišućem SDS-poliakrilamidnom gelu, transfer razdvojenih proteina na nitroceluloznu membranu, inkubaciju proteina na membrani sa radioaktivno obeleženom probom nakon čega se detekcija uspostavljenih interakcija vrši autoradiografski.

Denaturišući SDS poliakrilamidni gel

Denaturišući SDS poliakrilamidni gel sastoji se iz gela za koncentrovanje (eng. sticking gel) i gela za razdvajanje (eng. running gel).

Prvo se priprema 10% poliakrilamidni SDS gel u kome će se proteini iz uzorka razdvojiti (running gel). Kao pufer za pripremanje gela koristi se 1.5 M Tris HCl pH 8.8. Kao denaturišući agens koristi se SDS (0.1%), a kao inicijatori polimerizacije amonijumpersulfat (0,1%) i TEMED (0,01%). Nakon njegove polimerizacije priprema se 4% poliakrilamidni SDS gel na koji se uzorci nanose i ukoncentruju pre razdvajanja (sticking gel). Kao pufer za pripremanje ovog gela koristi se 0.5 M Tris HCl pH 6.8. Kao denaturans se koristi SDS (0.1%), a kao inicijatori polimerizacije amonijumpersulfat (0,1%) i TEMED (0,01%).

Materijal i metode

Jedarni ekstrakti se pre nanošenja na gel mešaju sa denaturišućim puferom za uzorak (0.125 M Tris HCl pH 6.8; 4% SDS; 20% glicerol; 10% β - merkaptoetanol) i bojom (0.25%, brom fenol plavo, 0.25% ksilen cijanol, 30% glicerol), denaturišu na 95°C u toku 5 min i drže na ledu do nanošenja na gel.

U South-Western eksperimentima, u jedan bunar na gelu, nanošeno je 5-20 μ g proteina. Proteini se elektroforetski razdvajaju u prisustvu pufera (0.025 M Tris HCl pH 8.3; 0.192M glicin; 0.1% SDS). Kroz gel za nanošenje uzorci putuju pri konstantnom naponu od 100 V i struji od 20 mA 30 min, dok kroz gel za razdvajanje putuju pod naponom od 170 V i 25 mA 60 min.

Polusuvi transfer proteina na membranu

Proteini se sa gela prenose na membranu (Imobilon P, Milipore) uz pomoć električne struje (FASTBLOT, Biometra). Nitrocelulozna membrana se koristi jer proteine različitih karakteristika vezuje podjednako dobro. Sa membranom se manipuliše veoma obazrivo, pomoću pincete hvata se samo za krajeve.

Nakon elektroforeze, dimenzije gela se precizno izmere kako bi membrana i papiri odgovarajuće površine mogli da se pripreme. Gel, papiri (3 mm) i membrana se nakon potapanja u odgovarajuće pufere postavljaju jedan preko drugog formirajući "sendvič" i struja protiče od katode, na kojoj se nalazi gel, ka anodi, tj. ka membrani. Preciznost dimenzija membrane i papira je u slučaju polusuvog transfera bitna jer se tako onemogućava rasipanje struje.

Donja površina aparata – anoda, kvasi se anodnim puferom I (300 mM Tris HCl pH 10.4; 20% (v/v) metanol) i na nju se postavljaju 2 sloja papira predhodno takođe natopljenih anodnim puferom I. Nakon dodavanja svakog sledećeg sloja, sendvič se ravna staklenim štapićem da bi se uklonilo eventualno prisustvo mehurića vazduha. Membrana se aktivira kratkom inkubacijom u metanolu. Zatim se ispira u vodi 5 min i inkubira u anodnom puferu II (25 mM Tris HCl pH 10.4; 20% (v/v) metanol) 5 min posle čega se dodaje na sendvič. Direktno na membranu dodaje se gel, koji je predhodno inkubiran najmanje 5 min u katodnom puferu

Materijal i metode

(25 mM Tris HCl pH 9.4; 40 mM glicin 20% (v/v) metanol). Preko gela se stavljaju 3 sloja papira predhodno natopljenih katodnim puferom. Sendvič se preklapa gornjom površinom aparata za transfer – katodom. Transfer proteina se odvija 45 min pri jačini struje koja zavisi od površine membrane (5 mA po 1cm^2). Transfer se smatra uspešnim ukoliko je proteinski marker (prestained Bio Rad protein ladder) u potpunosti sa gela prešao na membranu.

Ostvarivanje interakcije DNK probe i proteina

Membrana se najpre ispira tri puta po 45 minuta u puferu A (10 mM Tris-Cl pH 7.5; 5% mleko bez masti; 10% glicerol; 0.1 mM DTT; 150 mM NaCl; 2.5% Nonidet P40; pH podešen na 7.5) uz neprekidno klackanje, a zatim kratko u puferu B (10 mM Tris-Cl pH 7.5; 0.125% mleko bez masti; 8% glicerol; 1 mM DTT; 40 mM NaCl; 1 mM EDTA; pH podešen na 7.5). Membrana se zatim zatapa u plastičnu kesicu zajedno sa puferom B. Količina pufera se preračunava u odnosu na površinu membrane ($0,15\text{ ml pufera/cm}^2$ membrane) i zato je neophodno da kesica bude tek nešto malo veća od membrane. Prilikom zatapanja membrane treba eliminisati mehuriće vazuha. Blokiranje nespecifičnog vezivanja postiže se preinkubacijom membrane u puferu B u toku 1 sata.

U pufer B se dodaju radioaktivno obeležena proba (200000 do 500000 cpm/ml) i nespecifični kompetitori (Poly(dI-dC):Poly(dI-dC) u finalnoj koncentraciji od $20\text{ ng}/\mu$). Ova smeša se zajedno sa membranom zatapa u plastičnu kesicu i inkubira preko noći uz neprekidno klackanje.

Nakon ostvarivanja interakcije između proteina na membrani i probe u puferu, membrana se ispira od nevezane probe inkubacijom u puferu C (10 mM Tris-Cl pH 7,5, 50 mM NaCl) 6 puta po 30 min.

Nakon kratkog sušenja na vazduhu, formirani kompleksi se vizualizuju na fosfoimidžeru ili autoradiografski. Molekulsku težinu proteina koji su interagovali sa probom određujemo uz pomoć proteinskog markera koji je zajedno sa uzorcima prenet na nitroceluloznu membranu.

TRANZIJENTNA TRANSFEKCIJA K562 ĆELIJA LIPOFEKTAMINOM

U eksperimentima tranzijentne transfekcije K562 ćelije su dan pre transfekcije zasejavane u petri šolje prečnika 10 cm pod normalnim uslovima u MEM medijumu sa 10% FCS. Sutradan su ćelije skupljene, centrifugirane, oprane 1x PBS-om, brojane i zasejane 2×10^6 ćelija u petri šolje prečnika 3.56 cm (površine 10 cm^2) u 2 ml MEM medijuma bez antibiotika.

Prilikom tretmana K562 ćelija sa 6-MP, ćelije su 48h pre transfekcije gajene uz dodatak 6-MP-a u dve različite koncentracije: $10 \mu\text{M}$ i $500 \mu\text{M}$ 6-MP. Dan pre transfekcije, ćelije su skupljene, centrifugirane, oprane 1x PBS-om, brojane i zasejane kao i obično sa dodatkom ove dve koncentracije 6-MP-a. Sutradan su ćelije skupljene, centrifugirane, oprane 1x PBS-om, brojane i zasejane 2×10^6 ćelija u petri šolje prečnika 3.56 cm (površine 10 cm^2) u 2 ml MEM medijuma bez antibiotika.

Za svaku šolju se rastvori 8 μg plazmidne DNK (6 μg CAT konstrukta i 2 μg pCH110 plazmida) u 250 μl Opti-MEM-a (GibcoBRL) i blago promeša. Zatim se, za svaku šolju, 20 μl Lipofektamina 2000 (Invitrogen) rastvori u 250 μl Opti-MEM-a, blago promeša i inkubira 5 min na sobnoj temperaturi. Konačno se ove dve smeše sjedine, blago promešaju i inkubiraju 20 min na sobnoj temperaturi, čime se omogućava formiranje kompleksa između lipofektamina i DNK.

Nakon isteka ovog vremena, u svaku petri šolju se, kap po kap, dodaje 500 μl smeše za transfekciju. Petri šolja se zatim blago zaljublja da bi se medijum bolje sjedinio sa smešom za transfekciju.

Ćelije se u prisustvu smeše za transfekciju inkubiraju 24 sata. Nakon ovog vremena ćelije se pokupe i pripreme za β -galaktozidazni i CAT esej.

PRIPREMA ĆELIJSKIH EKSTRAKTA

Nakon 24 sata od transfekcije, ćelije se ispiraju dva puta 1x PBS-om od medijuma. Talog ćelija se resuspenduje u 1 ml TEN pufera (40 mM Tris HCl pH 7.5; 1 mM EDTA pH 8; 150 mM NaCl). Nakon centrifugiranja 2 min na 13000 rpm (Eppendorf mikrofuga), ćelijski talog se

Materijal i metode

vorteksovanjem resuspenduje u 100 μ l 0.25 M Tris HCl pH 8. Liziranje ćelija se postiže tokom tri ciklusa naizmeničnim stavljanjem ćelija u tečni azot (-196°C) i vodeno kupatilo (+37°C) uz vorteksovanje nakon svakog koraka. Nakon centrifugiranja 5 minuta na 13000 rpm (+4°C), supernatant se alikvotira i prebacuje u nove mikro tube.

Pripremljene ekstrakte bi trebalo odmah koristiti za CAT i β -galktozidazni esej ili odmah zalediti i čuvati na -80°C. Da bi se izbegla degradacija CAT enzima i β -galaktozidaze, uzorak bi trebalo brzo zalediti kratkotrajnom inkubacijom u tečnom azotu, i tek tada skladištiti na -80°C.

β -GALAKTOZIDAZNI ESEJ

(prema uputstvu proizvođača Promega)

Svrha β -galaktozidaznog esejja je da normalizuje rezultate CAT esejja u odnosu na efikasnost transfekcije u pojedinačnom uzorku. Iz tog razloga se, uz plazmid koji nosi CAT reporter gen, ćelije istovremeno transfekuju i sa β -galaktozidaza reporterskim vektorom - pCH110. Aktivnost ovog enzima merena je pomoću esejja β -galaktozidazne aktivnosti (" β -galactosidase Enzyme Assay System"), Promega.

Priprema za esej odvija se na ledu. Standardni esej se izvodi tako što se uzorku razblaženom u Tris-HCl pH 7.8 doda jednaka količina 2x Assay pufera koji sadrži 200 mM natrijum fosfatni pufer pH 7.3, 2 mM $MgCl_2$, 100 mM β -merkaptetoanol i 1.33 mg/ml supstrata ONPG (*o*-nitrofenil- β -D-galaktopiranozid). Uzorci se inkubiraju na 37°C najmanje 30 minuta. Tokom ovog vremena β -galaktozidaza hidrolizuje bezbojan supstrat u *o*-nitrofenil koji ima žutu boju. Absorbanca je merena na Microplate reader Multiskan RC (Labsystems) aparatu na talasnoj dužini 420 nm.

Kao referentne vrednosti za konstrukciju standardne kalibracione krive i određivanje vrednosti β -galaktozidaze u ispitivanim ćelijskim lizatima korišćena su standardna razblaženja ovog enzima: 1,5625 mU, 3,125 mU, 6,25 mU, 12,5 mU, 25 mU, 50 mU, i 100 mU.

Materijal i metode

CAT ELISA ESEJ

(prema uputstvu proizvođača Roche)

Aktivnosti CAT enzima (hloramfenikol-acetil-transferaza) su određivane "CAT ELIZA esejem" (CAT Enzyme Linked Immunosorbent Assay), Roche. Esej se izvodi prema uputstvu proizvođača.

CAT ELIZA esej je enzimski imunoesej za kvantifikaciju hloramfenikol-acetil-transferaze (CAT) iz *E. coli* u transfekovanim eukariotskim ćelijama. CAT ELIZA se koristi za kvantifikovanje ekspresije CAT-a u eukariotskim ćelijama koje su transfekovane plazmidima koji sadrže CAT reporterski gen.

CAT ELISA se bazira na „sendvič“ ELISA principu. Anti-CAT antitelo vezano je za površinu bunarića mikrotitar ploče (Roche kit). Za njega se specifično vezuje ukupna hloramfenikol acetiltransferaza prisutna u uzorku (ili standardu). Primarno antitelo je obeleženo digoksigeninom (anti-CAT-DIG) i specifično se vezuje za hloramfenikol acetiltransferazu. Za njega se vezuje 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. Absorbanca 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 μ l, zatim se nanese u bunariće na mikroploči i pokriveni inkubiraju 1h na 37°C. Nakon vezivanja hloramfenikol acetiltransferaze iz uzorka, bunarići se pet puta ispiraju sa po 250 μ l pufera za ispiranje (Roche kit). Zatim se u bunariće dodaje po 200 μ l anti-CAT-DIG antitela (Roche kit) i inkubira pokriveno 1h na 37°C. Nakon vezivanja primarnog antitela, bunarići se pet puta ispiraju sa po 250 μ l pufera za ispiranje (Roche kit). Zatim se u bunariće dodaje po 200 μ l anti-DIG-POD antitela (Roche kit) i inkubira pokriveno 1h na 37°C. Nakon vezivanja sekundarnog antitela, bunarići se pet puta ispiraju sa po 250 μ l pufera za ispiranje (Roche kit). Na kraju se u bunariće dodaje po 200 μ l supstrata (Roche kit) i inkubira

Materijal i metode

pokriveno do razvijanja boje (10-40 min) na sobnoj temperaturi. Absorbanca je merena na Microplate reader Multiskan RC (Labsystems) aparatu na talasnoj dužini 405/492 nm.

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 β -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. Srednje vrednosti relativnih aktivnosti CAT enzima poređene su Studentovim *t*-testom, a statistička analiza je urađena programom MSEXcel. Korišćeni su uslovi uparenog *t*-testa, dvostrani interval poverenja (eng. two-tailed) sa nivoom poverenja 95% i poređene su grupe uzoraka čija varijansa nije bila unapred poznata. Samo u slučajevima kada je *p* vrednost bila manja od 0,05 rezultat je smatran statistički značajnim.

METILACIONI ESEJ

(prema uputstvu proizvođača Applied Biosystems)

Metilacioni status promotora gena za TPMT kod pacijenata obolelih od dečije ALL određivan je pomoću metilacionog eseja korišćenjem kita MethyISeq Bisulfite Conversion Kit, Applied Biosystems.

Ovaj kit omogućuje konverziju genomske DNK Na-bisulfitom, pri čemu se u reakciji desulfonizacije efikasno konvertuju nemetilovani citozini (C) u uracile (U). Metilovani citozini su zaštićeni od konverzije. Nemetilovani citozini se detektuju kao tranzicija citozina u timine (T) u sekvenci tretirane genomske DNK.

Najpre se genomska DNK izoluje iz krvi nekom od opisanih standardnih metoda i odredi se koncentracija sprektrofotometrijski.

Materijal i metode

Potom se u ependorf epruveti pripremi smeša finalne zapremine 50 μ l koja sadrži 300 ng DNK u 45 μ l dejonizovane vode i 5 μ l methylSEQ pufera za denaturaciju. Smeša se jako promućka i inkubira na 37°C najmanje 15 minuta. Nakon toga se smeši dodaje 100 μ l sveže napravljenog methylSEQ pufera za konverziju. Uzorak se inkubira u mraku na 50°C 16 sati.

Po isteku vremena, sastavi se methylSEQ kolonica, u nju doda 300 μ l dejonizovane vode, pažljivo u vodu doda 150 μ l inkubiranog uzorka i uvlačenjem i izvlačenjem uzorka pipetom se sve blago promeša. Centrifugira se 20 minuta na 500 rcf na sobnoj temperaturi (Eppendorf mikrofuga). DNK se vezala za kolonicu. Svi eluati se bacaju. Slede nova centrifugiranja na 500 rcf u trajanju od 20 minuta i to sledećim redosledom: 350 μ l vode, ponovo 350 μ l vode, 350 μ l 0.1 M NaOH i na kraju 350 μ l vode. Dodaje se 50 μ l 1x TE pufera i inkubira 5 minuta na sobnoj temperaturi. Kolona se sada invertuje i postavi u novu ependorf epruvetu i bisulfitom tretirana genomska DNK se eluira centrifugiranjem na 1000 rcf u trajanju od 30 sekundi.

Ovakva DNK se čuva na +4°C do godinu dana i koristi se za PCR.

PCR reakcija se izvodi prema uputstvu iz dela *Umnožavanje promotorskog regiona gena za TPMT*. PCR reakcija se takođe izvodi i sa DNK koja nije prošla tretman Na-bisulfitom.

Ovako dobijeni PCR produkti se provere elektroforezom na 2% agaroznom gelu, prečiste QIAGEN kolonicama prema uputstvu proizvođača i sekvenciraju na način opisan u delu SEKVENCIRANJE PCR PRODUKATA/CAT KONSTRUKATA.

Nakon PCR-a, sekvenca bisulfitom konvertovane DNK sadrži citozine samo ako su oni prethodno bili metilovani. Svi ostali citozini se detektuju kao timini. Znači, nemetilovana DNK neće imati citozine u svojoj sekvenci. Poređenjem sekvenci Na-bisulfitom tretirane genomske DNK sa netretiranom DNK omogućena je precizna identifikacija svih metilovanih citozina u nekom DNK regionu.

REZULTATI

FARMAKOGENETIČKA STUDIJA - DETEKCIJA NAJČEŠĆIH MUTACIJA U GENU ZA TPMT KOD DECE OBOLELE OD ALL I INDIVIDUALIZACIJA TIOPURINSKE TERAPIJE

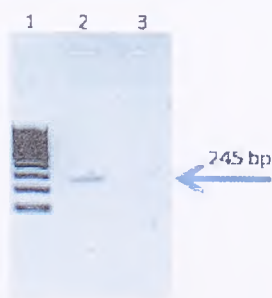
Akutna limfoidna leukemija je najčešće maligno oboljenje kod dece. Moderni terapijski pristupi doveli su do visokog stepena uspešnosti u lečenju ove bolesti. Ipak, određen broj bolesnika ne odgovori dobro na standardni terapijski protokol. Mi smo ispitivali da li genotipizacija najčešćih polimorfizama u genu za TPMT može uticati na uspešnost u lečenju akutne limfoblastne leukemije kod dece. Klinički deo ove studije je realizovan na Hematoonkološkom odeljenju Dečje univerzitetske bolnice u Beogradu.

Kod 50 dece obolele od ALL lečene ALL IC-BFM 2002 protokolom (Stary 2003), pre uključivanja 6-MP u terapiji održavanja, određivano je prisustvo tri najčešće mutacije u genu za TPMT (c.238G>C, c.460G>A i c.719A>G) koje dovode do smanjenja enzimske aktivnosti i samim tim do hematopoetske toksičnosti.

Detekcija mutacije c.238G>C u genu za TPMT

Mutacija c.238G>C nastaje zamenom guanina citozinom na poziciji 238 (c.238G>C) i dovodi do zamene alanina prolinom na položaju 80 (p.Ala⁸⁰Pro) u TPMT enzimu. Mutirani alel koji nosi ovu mutaciju označava se kao TPMT*2.

Detekcija mutacije c.238G>C vršena je pomoću ARMS PCR reakcije kako je opisano u poglavlju Materijal i metode (Slika 5).



Slika 5. Detekcija mutacije c.238G>C u genu za TPMT metodom ARMS PCR. 1. DNK marker 100 bp ladder; 2. PCR produkt dobijen u reakciji umnožavanja prajmerima P2W i P2C kod

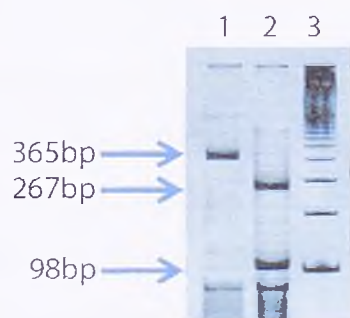
Rezultati

pacijenta koji nije nosilac mutacije c.238G>C (normalni alel); 3. odsustvo PCR produkta u reakciji umnožavanja prajmerima P2M i P2C kod pacijenta koji je nosilac mutacije c.238G>C (mutirani alel).

Detekcija mutacije c.460G>A u genu za TPMT

Mutacija c.460G>A predstavlja nukleotidnu zamenu guanina adeninom na mestu 460, što u TPMT proteinu znači zamenu alanina treoninom na mestu 154 (p.Ala¹⁵⁴Thr). Mutirani alel koji nosi ovu mutaciju označava se kao TPMT*3B.

Detekcija mutacije c.460G>A vršena je pomoću PCR-RFLP reakcije kako je opisano u poglavlju Materijal i metode (Slika 6).



Slika 6. Detekcija mutacije c.460G>A u genu za TPMT metodom PCR-RFLP. 1. PCR produkt regiona gena za TPMT koji potencijalno sadrži mutaciju c.460G>A umnožen prajmerima P460F i P460R; 2. digestija PCR produkta regiona gena za TPMT koji ne sadrži mutaciju c.460G>A enzimom *MwoI* – homozigotni nosilac normalnog alela; 3. DNK marker 100 bp ladder.

Rezultati

Detekcija mutacije c.719A>G u genu za TPMT

Mutacija c.719A>G označava nukleotidnu zamenu adenina guaninom na mestu 719, što u TPMT proteinu predstavlja zamenu tirozina cisteinom na mestu 240 (p.Tyr²⁴⁰Cys). Mutirani alel koji nosi ovu mutaciju označava se kao TPMT*3C.

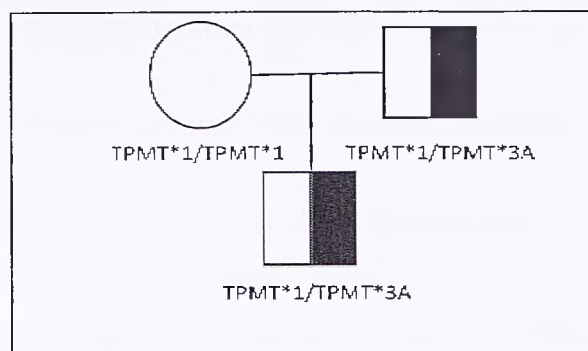
Detekcija mutacije c.719A>G vršena je pomoću PCR-RFLP reakcije kako je opisano u poglavlju Materijal i metode (Slika 7).



Slika 7. Detekcija mutacije c.719A>G u genu za TPMT metodom PCR-RFLP. 1. marker 100 bp ladder; 2. PCR produkt regiona gena za TPMT koji potencijalno sadrži mutaciju c.719A>G umnožen prajmerima P719F i P719R; 3. digestija PCR produkta regiona gena za TPMT koji sadrži mutaciju c.719A>G enzimom *AccI* – heterozigotni nosilac mutacije, uočava se linearizovani plazmid pUC18 – kontrola digestije.

Određivanje genotipa TPMT

Analizom najčešćih mutacija u genu za TPMT obuhvaćeno je 50 dece sa ALL. Ni kod jednog deteta nije detektovana mutacija c.238G>C. Kod četvoro dece je utvrđeno istovremeno prisustvo mutacija c.460G>A i c.719A>G u genu za TPMT, TPMT*3A alel. Analizom DNK njihovih roditelja na prisustvo ove dve mutacije (porodična studija, Slika 8) isključena je mogućnost da se ove dve mutacije nalaze na različitim hromozomima. Jedan od roditelja je uvek bio nosilac obe mutacije. Ova deca su heterozigotni nosioci TPMT*3A alelske varijante i imaju jedan funkcionalan TPMT*1 alel. Učestalost TPMT*3A alela u našoj studiji je 4%.



Slika 8. Utvrđivanje TPMT genotipa kod heterozigotnih nosilaca TPMT*1/ TPMT*3A i dvostrukih heterozigota TPMT*3B/ TPMT*3C se vrši porodičnim studijama.

Individualizacija tiopurinske terapije u dece sa ALL u skladu sa genotipom TPMT

Deca kod kojih su otkrivene TPMT varijante tokom terapije održavanja, lečena su modifikovanim ALL IC-BFM 2002 protokolom. Faza održavanja po ovom protokolu, zavisno od ostalih kliničkih parametara koji određuju grupu rizika i izbor terapijskog protokola, iznosi 57-74 nedelje. Modifikacija protokola se sastojala u tome da je doza 6-MP kod heterozigotnih nosilaca TPMT*3A mutacije u terapiji održavanja bila svedena na 50% od standardne doze (Dokmanović *et al.*, 2006; Dokmanović *et al.*, 2008), bez promene ostalih lekova koji se u isto vreme primenjuju. Ni kod jednog bolesnika, nosilaca TPMT*3A mutacije, terapija nije prekidana zbog mijelotoksičnosti. Posle 12, 14, 16 i 19 nedelja lečenja smanjenim dozama merkaptopurina, kod sva četiri bolesnika je, zbog dobrog podnošenja na ovaj način dozirane terapije, postepeno počela da se primenjuje puna doza ovog leka (Dokmanović *et al.*, 2006; Dokmanović *et al.*, 2008). Između dece bez detektovanih mutacija i dece heterozigotnih nosilaca mutacija u genu za TPMT nije postojala razlika u trajanju terapije.

Iz naše prospektivne kliničke studije može se zaključiti da je primena farmakogenetike u kliničkoj praksi opravdana i neophodna i kod heterozigotnih nosilaca mutacija u genu za TPMT.

ANALIZA POLIMORFIZAMA PROMOTORSKOG REGIONA GENA ZA TPMT

Analiza VNTR regiona promotora gena za TPMT u srpskoj populaciji

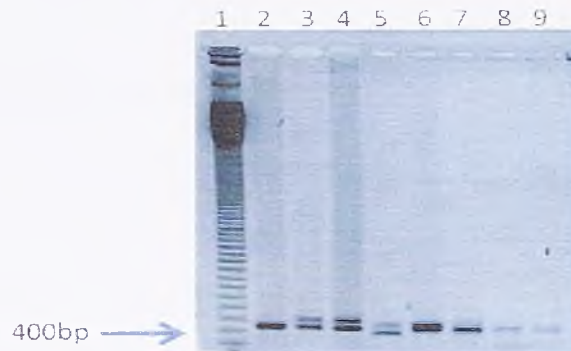
Međutim, tokom praćenja bolesnika tokom celog ciklusa terapije održavanja, primećeno je da neki bolesnici, kod kojih mutacije u genu za TPMT nisu detektovane, ipak imaju neželjene reakcije na tiopurinsku terapiju, ili čak uopšte na nju ne reaguju. To nam je ukazalo na postojanje nekih drugih genetskih uzročnika koji izazivaju smanjenu TPMT aktivnost, ili veću aktivnost TPMT enzima od normalne. Moguće je da ovi bolesnici imaju retku ili novu mutaciju u genu za TPMT. I promotorski region gena za TPMT je mogući modulator transkripcije gena. Tako bi, utičući na količinu sintetisanog proteina, promotor gena za TPMT menjao aktivnost TPMT enzima. Istraživanja promotora gena za TPMT u kliničkom kontekstu dala su kontroverzne rezultate, te nije bilo jasno da li bi ovaj regulatorni element mogao postati novi farmakogenetički marker. Promotor gena za TPMT ima karakteristični polimorfizam, varijabilni broj tandemskih ponovaka, VNTR region, koji bi preko transkripcije mogao uticati na ukupnu količinu TPMT proteina sintetisnog u ćeliji, odnosno na TPMT enzimsku aktivnost (Spire-Vayron de la Moureyre *et al.*, 1999; Alves *et al.*, 2001). Iz ovih razloga odlučili smo da utvrdimo broj i tip VNTR ponovaka u našoj populaciji, kao i da procenimo uticaj svakog broja i tipa tandemskih ponovaka detektovanog u našoj studiji na transkripciju gena za TPMT. Želeli smo i da utvrdimo da li se tolerancija na merkaptopurin kod pacijenata hipo- i hipermetilatora može delimično objasniti pomoću broja i tipa tandemskih ponovaka u promotoru gena za TPMT.

Tandemski ponovci u promotoru gena za TPMT analizirani su kod 73 pacijenta obolela od dečje akutne limfoblastne leukemije (ALL), 30 odraslih pacijenata obolelih od akutne mijeloblastne leukemije (AML), 50 dobrovoljnih davalaca krvi (kontrolna grupa) i u jednoj ćelijskoj liniji - K562 koja je kasnije korišćena i u *in vitro* eksperimentima funkcionalne karakterizacije VNTR regiona.

PCR metodom je promotorski region gena za TPMT umnožavan, prinos proveravan elektroforezom na 2% agaroznom gelu i potom sekvenciran na automatskom sekvenceru (3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems), kako je i opisano u poglavlju Materijal i metode.

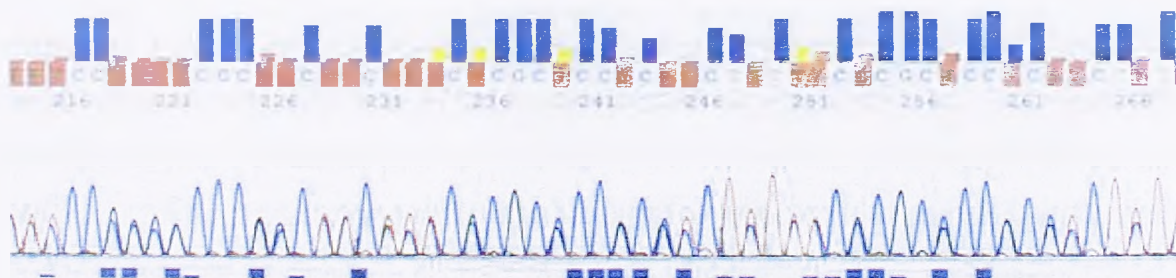
Rezultati

Na dva homologa hromozoma čoveka broj tandemskih ponovaka često nije isti (Slika 9). U našoj studiji detektovani su ponovci dužine od VNTR*4 do VNTR*8.



Slika 9. Analiza broja VNTR ponovaka u delu promotorskog regiona gena za TPMT. 1. marker 50 bp ladder; 2. nosilac genotipa VNTR*5/VNTR*5 (kontrolna DNK proverena sekvenciranjem promotorskog regiona gena za TPMT); 3. nosilac genotipa VNTR*5/VNTR*7; 4. nosilac genotipa VNTR*5/VNTR*7; 5. nosilac genotipa VNTR*4/VNTR*6; 6. nosilac genotipa VNTR*5/VNTR*6; 7. nosilac genotipa VNTR*5/VNTR*7; 8. nosilac genotipa VNTR*5/VNTR*5; 9. nosilac genotipa VNTR*5/VNTR*5.

Sekvenciranjem PCR produkata umnoženih promotorskih regiona gena za TPMT određivani su tip i arhitektura ponovaka. U reakcijama sekvenciranja kao DNK matrica korišćen je i prečišćeni PCR produkt koji je sadržao dve različite dužine tandemskih ponovaka. Sa sekvence je bilo moguće čitati heterozigotne nosioce tandemskih ponovaka (Slika 10). Broj i tip ponovaka detektovanih u našoj studiji prikazan je u Tabeli 8.



Slika 10. Deo sekvence promotora gena za TPMT pacijenta heterozigotnog za VNTR region.

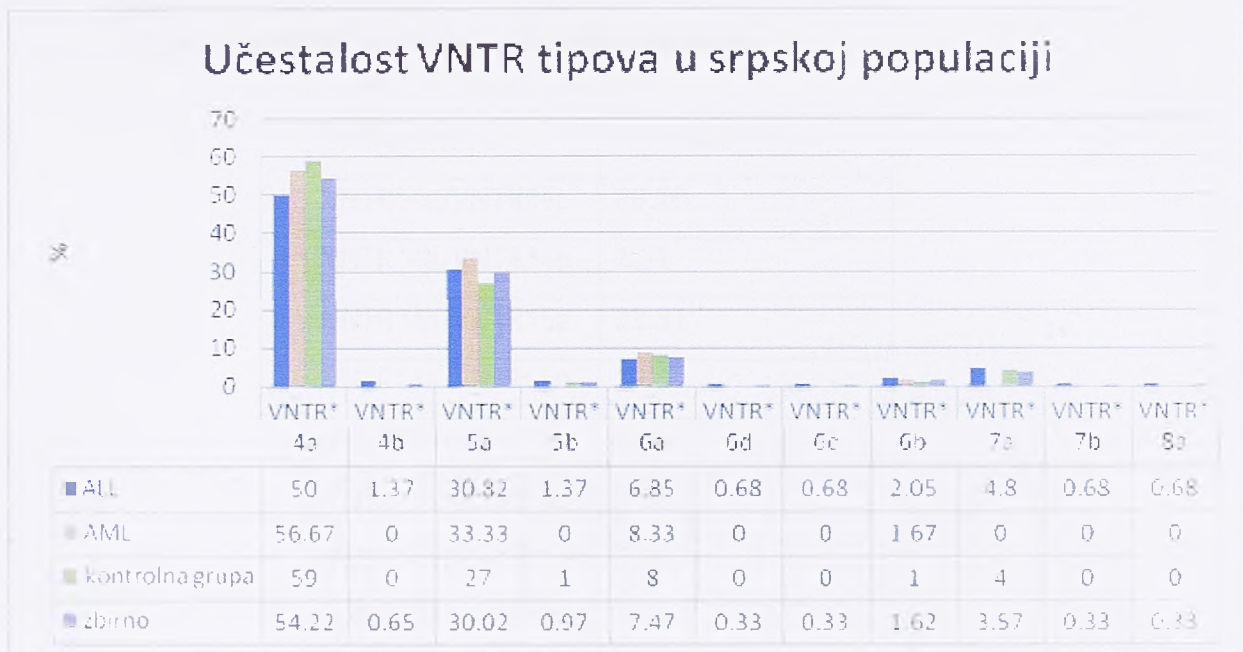
Rezultati

U okviru istog broja tandemskih ponovaka u promotoru gena za TPMT detektovani su i oni sa različitom arhitekturom. Detektovano je ukupno 11 različitih tipova tandemskih ponovaka prikazanih u Tabeli 8.

Tabela 8. Broj i tip tandemskih ponovaka detektovanih u srpskoj populaciji.

tandemski ponovci		ALL	AML	kontrolna grupa	ćelijska linija K562	Zbirno
arhitektura	Tip					
A ₂ BC	VNTR*4a	73	34	59	1	167
AB ₂ C	VNTR*4b	2	0	0	0	2
A ₃ BC	VNTR*5b	45	20	27	1	93
A ₂ B ₂ C	VNTR*5a	2	0	1	0	3
A ₂ B ₃ C	VNTR*6a	10	5	8	0	23
A ₃ B ₂ C	VNTR*6d	1	0	0	0	1
A ₄ BC	VNTR*6c	1	0	0	0	1
AB ₄ C	VNTR*6b	3	1	1	0	5
A ₅ BC	VNTR*7a	7	0	4	0	11
AB ₅ C	VNTR*7b	1	0	0	0	1
A ₆ BC	VNTR*8a	1	0	0	0	1
broj hromozoma (aleli)		146	60	100	2	308

Učestalosti tandemskih ponovaka u našoj populaciji se međusobno veoma razlikuju (Slika 11). Najčešći tip tandemskih ponovaka je VNTR*4a sa učestalošću od 54.22%. Drugi po učestalosti je VNTR*5a (30.02%), dok su ostali tipovi znatno manje zastupljeni. U grupi ALL pacijenata detektovano je svih 11 tipova tandemskih ponovaka. U grupi AML pacijenata detektovano je 4, a u kontrolnoj grupi 6 različitih tipova ponovaka. Učestalosti VNTR alela po grupama i zbirno predstavljane su na Slici 11. TPMT polimorfizmi još uvek nisu dovedeni u direktnu vezu sa etiologijom akutnih leukemija. Zbog toga su u populacionoj studiji predstavljeni rezultati dobijeni analizom svih ispitanika.



Slika 11. Učestalost VNTR tipova u srpskoj populaciji.

U našoj populaciji je detektovano 17 različitih TPMT VNTR genotipova. Najzastupljeniji su bili genotipovi VNTR*4a/VNTR*5a (33.3%), VNTR*4a/VNTR*4a (28.7%), VNTR*5a/VNTR*5a (9.15%), VNTR*4a/VNTR*6a (8.50%) i VNTR*5a/VNTR*6a (5.88%). Ostalih 12 VNTR genotipova je bilo manje zastupljeno (Tabela 9).

Tabela 9. Učestalost VNTR genotipova u srpskoj populaciji.

VNTR genotip	učestalost (%)
VNTR*4a/VNTR*4a	28.70
VNTR*4a/VNTR*4b	1.31
VNTR*4a/VNTR*5a	33.31
VNTR*4a/VNTR*5b	1.96
VNTR*4a/VNTR*6a	8.50
VNTR*4a/VNTR*6b	0.65
VNTR*4a/VNTR*7a	3.27
VNTR*4a/VNTR*8a	0.65
VNTR*5a/VNTR*5a	9.15
VNTR*5a/VNTR*6a	5.88
VNTR*5a/VNTR*6b	0.65
VNTR*5a/VNTR*7a	1.96
VNTR*5a/VNTR*7b	0.65
VNTR*6a/VNTR*6b	0.65
VNTR*6a/VNTR*7a	1.31
VNTR*6b/VNTR*6b	0.65
VNTR*7a/VNTR*7a	0.65

Molekularna analiza promotora gena za TPMT

Da bismo došli do odgovora da li polimorfnost promotora može uticati na sveukupni potencijal TPMT enzima, prvo smo ispitivali transkripcioni potencijal promotora gena za TPMT sa različitim tipom i brojem tandemskih ponovka, detektovanim u našoj populaciji u *in vitro* uslovima. Takođe smo izučavali dodatne cis- regulatorne sekvence u samom promotoru. Analizirali smo koji transkripcioni faktori posreduju u transkripciji regulisanoj promotorskim fragmentom koji smo ispitivali. Tandemski ponovci u promotoru kao i ceo

Rezultati

promotor su veoma GC-bogati pa smo stoga ispitivali i da li je metilacija mehanizam preko kojeg se odvija regulacija transkripcije gena za TPMT.

Funkcionalna analiza VNTR tipova promotora gena za TPMT

Promotorske regione gena za TPMT sa svim detektovanim VNTR tipovima u smo uklonirali u pCATbasic reporterski vektor. Posle tranzijentne transfekcije ovih CAT-konstrukata u K562 ćelije, CAT ELIZA esejom smo upoređivali aktivnosti TPMT promotora koji su sadržali različite VNTR tipove. Regulatorne cis-elemente smo izučavali pomoću funkcionalnih eseja sa delecionim CAT-konstruktima.

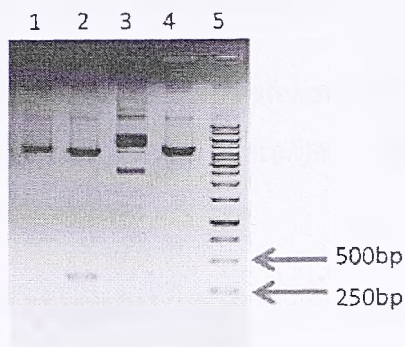
Priprema CAT-konstrukata

Promotorski regioni gena za TPMT ALL pacijenata koji su sadržali sve detektovane različite tipove VNTR ponovaka, umnoženi su i uklonirani u reporterski vektor pCATbasic (Slike 12 i 13). Sve korišćene metode su detaljno objašnjene u poglavlju Materijal i metode.



Slika 12. Detekcija transformanata sa insertovanim fragmentom u pCATbasic plazmid metodom brze lize. 1. pCATbasic plazmid (kontrolni plazmid bez inserta); 2-4. potencijalni klonovi; 5. pCATbasic plazmid (kontrolni plazmid bez inserta).

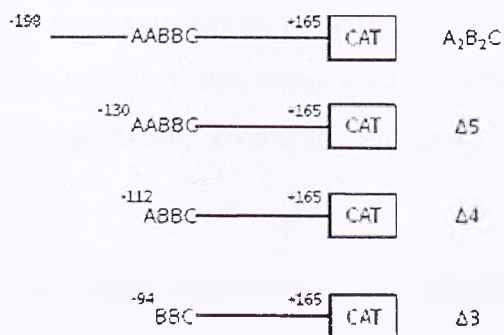
Rezultati



Slika 13. Detekcija insertovanog fragmenta iz potencijalnog klona digestijom plazmidne DNK izolovane mini prepom. 1. linearizovana plazmidna DNK potencijalnog klona (DNK je digerirana restrikcijom enzimom *HindIII*); 2. plazmidna DNK potencijalnog klona digerirana restrikcijom enzimima *HindIII* i *XbaI*; 3. plazmidna DNK potencijalnog klona izolovana mini prepom; 4. linearizovan pCATbasic plazmid (sečen restrikcijom enzimom *HindIII*); 5. DNK marker 1 kbp ladder.

Dobijeni CAT-konstrukti nazvani su prema arhitekturi VNTR ponovaka koju su sadržali: A₂BC, AB₂C, A₂B₂C, A₃BC, A₂B₃C, A₃B₂C, A₄BC, AB₄C, A₅BC, AB₅C i A₆BC.

Na identičan način su napravljeni CAT-konstrukti za eksperimente delecione analize promotora gena za TPMT, nazvani Δ3, Δ4 i Δ5, kao i CAT-konstrukt koji je promotor tipa A₂B₂C imao u obrnutoj orijentaciji od prirodne. Ovaj CAT-konstrukt je nazvan XH. Šema CAT-deletanata prikazana je na Slici 14.



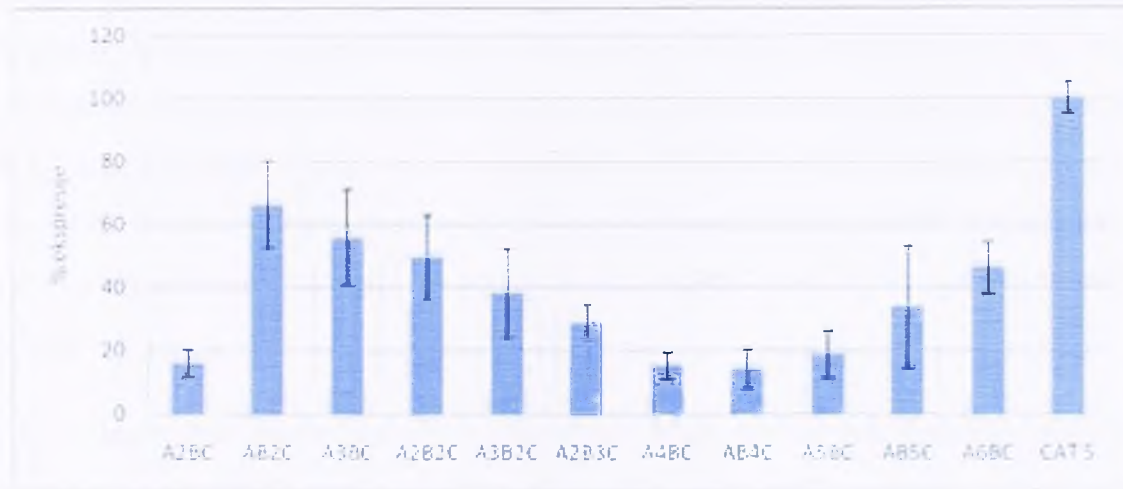
Slika14. Šema delecionih konstrukata.

Rezultati

Funkcionalna analiza promotorskog regiona gena za TPMT

Svi prethodno opisani CAT-konstrukti su kotransfekovani sa pCH110 plazmidom u ćelijsku liniju K562, na način opisan u poglavlju Materijal i metode. Aktivnost pojedinačnih promotora je merena CAT ELIZA esejem.

Rezultati dobijeni trasfekcijom 11 različitih VNTR tipova predstavljani su na Slici 15.



Slika 15. Aktivnosti promotora gena za TPMT koji sadrže različiti tip VNTR ponovaka. K562 ćelije su tranzijentno kotransfekovane odgovarajućim konstruktom i pCH110 plazmidom i CAT vrednosti su normalizovane na osnovu β -galaktozidazne aktivnosti. Kao pozitivna kontrola u eksperimentu korišćen je vektor pBLCAT5 (CAT5) (timidin kinazni promotor HSV virusa omogućava ekspresiju CAT gena). Normalizovana CAT aktivnost pojedinačnog konstrukta izražena je procentualno u odnosu na aktivnost CAT5 plazmida, čija aktivnost je označena sa 100%. Prikazane vrednosti su srednja vrednost \pm standardna devijacija dobijena iz najmanje tri nezavisne transfekcije. Vrednosti relativnih CAT aktivnosti su poređene Studentovim *t*-testom.

Iz rezultata transfekcije može se videti da je aktivnost promotora gena za TPMT zavisi od broja tandemskih ponovaka. Najveća CAT aktivnost uočena je kod VNTR*4b tipa i postepeno opada kod VNTR*5, VNTR*6 i VNTR*7 tipova. CAT aktivnost VNTR*8 tipa je povećana u odnosu na VNTR*6 i VNTR*7 tipove, ali manja od VNTR*4b tipa.

Rezultati

Štaviše, primećene su i razlike u aktivnosti promotora gena za TPMT i u okviru istog broja a različitog tipa ponovaka. Aktivnost promotora gena za TPMT zavisi i od tipa tandemskih ponovaka. Najveća razlika u aktivnosti je u okviru VNTR*4 grupe gde se A_2BC i AB_2C tipovi značajno statistički razlikuju ($p < 0.01$). Aktivnost A_2BC tipa ponovaka je četiri puta manja od aktivnosti AB_2C . U okviru VNTR*5 grupe statistička značajnost u aktivnosti promotora između tipova ponovaka A_2B_2C i A_3BC nije detektovana. Grupa VNTR*6 pokazuje međusobne različite CAT aktivnosti. Aktivnosti tipova A_2B_3C i A_3B_2C međusobno se statistički ne razlikuju ($p > 0.05$). Isto važi i za A_4BC i AB_4C tipove. Međutim, statistički značajne razlike detektovane su između CAT aktivnosti A_2B_3C i A_4BC , zatim između A_2B_3C i AB_4C , između A_3B_2C i A_4BC kao i A_3B_2C i AB_4C tipova tandemskih ponovaka ($p < 0.05$), i aktivnost promotora je uvek bila veća kod A_2B_3C odnosno A_3B_2C tipova ponovaka. U okviru VNTR*7 grupe između promotorske aktivnosti tandemskih ponovaka tipova A_5BC i AB_5C nije uočena statistička značajnost.

U okviru statističke analize aktivnosti promotora tipova tandemskih ponovaka kojima je zajedničko prisustvo BC motiva (A_2BC , A_3BC , A_4BC , A_5BC i A_6BC) značajno se međusobno razlikuju aktivnosti A_2BC i A_3BC ($p < 0.01$), A_2BC i A_6BC ($p < 0.05$), A_3BC i A_4BC ($p < 0.01$) kao i A_4BC i A_6BC tipova ($p < 0.05$). U ovom slučaju nije bilo moguće zaključiti o pojedinačnom doprinosu ponovaka aktivnosti promotora.

Statistička analiza aktivnosti promotora tipova tandemskih ponovaka kojima je zajedničko prisustvo B_2C motiva (AB_2C , A_2B_2C i A_3B_2C) pokazala je da se međusobno razlikuju jedino AB_2C i A_3B_2C tipovi ponovaka ($p < 0.05$). Kod ovih konstrukata primećen je pad u aktivnosti promotora kada broj A ponovaka raste. Prema tome, A ponovak bi mogao imati repersornu ulogu na transkripciju.

Na osnovu ovih rezultata, nije bilo moguće utvrditi jasnu korelaciju između CAT aktivnosti i različite VNTR arhitekture. Tražili smo motiv unutar VNTR regiona, kasetu, koja daje konzistentan doprinos CAT aktivnosti.

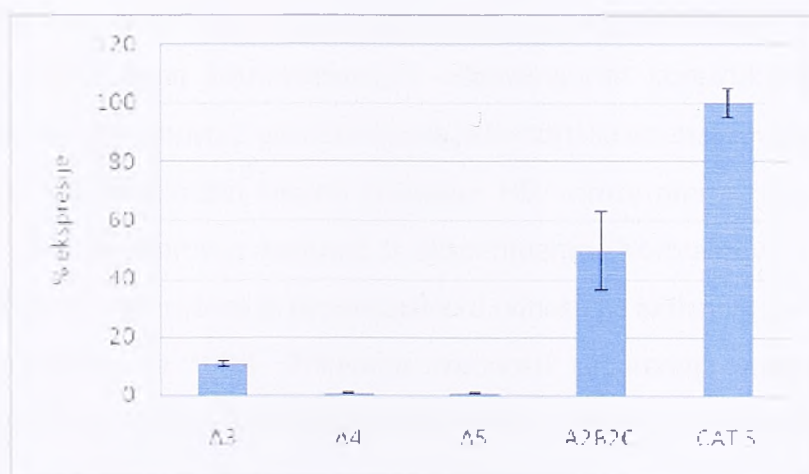
Deleciona analiza promotora

Velika razlika u CAT aktivnosti između ponovaka A₂BC i AB₂C, navela nas je na ideju da bi motiv B₂C mogao imati značajnu ulogu u povećanoj aktivnosti promotora gena za TPMT. Zbog toga su rađeni eksperimenti delecione analize tandemskih ponovaka, gde je minimalna VNTR kasete sadržala ovaj BBC motiv.

Rezultati dobijeni transfekcijom sa $\Delta 3$, $\Delta 4$ i $\Delta 5$ CAT-konstruktima kao i A₂B₂C konstruktom od koga su deletanti i napravljeni, prikazani su na Slici 16.

Deleciona analiza je pokazala da je B₂C kaseta transkripciono aktivna. Dodatak jednog ili dva A ponovka dovodi do jedva detektabilne CAT aktivnosti. Aktivnosti delecionih konstrukata $\Delta 4$ i $\Delta 5$ se međusobno statistički ne razlikuju ($p > 0.05$). Ovi rezultati potkrepljuju prethodno zapažanje da A ponovak ima represornu ulogu.

Dodatnih 50 bp sa 5' kraja, prisutnih u CAT-konstruktu A₂B₂C a deletiranih u konstruktu $\Delta 5$, značajno aktivira promotor gena za TPMT ($p < 0.01$). 5' region od -180 do -130 sadrži pozitivni regulatorni element.

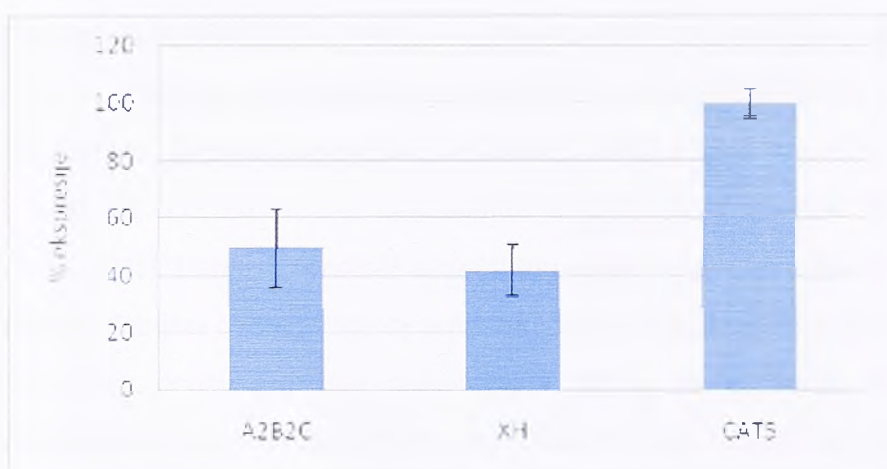


Slika 16. Deleciona analiza promotora gena za TPMT. K562 ćelije su tranzijentno kotransfekovane odgovarajućim delecionim konstruktom ($\Delta 3$, $\Delta 4$ i $\Delta 5$), konstruktom A₂B₂C i pCH110 plazmidom i na osnovu β -galaktozidazne aktivnosti su normalizovane CAT vrednosti. Vektor pBLCAT5 (CAT5) (timidin kinazni promotor HSV virusa omogućava ekspresiju CAT gena) korišćen je kao pozitivna kontrola u eksperimentu. Normalizovana CAT aktivnost

Rezultati

pojedinačnog konstrukta izražena je procentualno u odnosu na aktivnost CAT5 plazmida, čija aktivnost je označena sa 100%. Prikazane vrednosti su srednja vrednost±standardna devijacija dobijena iz najmanje tri nezavisne transfekcije. Vrednosti relativnih CAT aktivnosti su poređene Studentovim *t*-testom.

Funkcionalna analiza promotora gena za TPMT u obrnutoj orijentaciji



Slika 17. Analiza promotora A2B2C tipa i obrnutog istog tipa promotora (XH) gena za TPMT. K562 ćelije su tranzijentno kotransfekovane odgovarajućim konstruktom (A₂B₂C, XH) i pCH110 plazmidom i na osnovu β-galaktozidazne aktivnosti su normalizovane CAT vrednosti. Vektor pBLCAT5 (CAT5) (timidin kinazni promotor HSV virusa omogućava ekspresiju CAT gena) korišćen je kao pozitivna kontrola u eksperimentu. Normalizovana CAT aktivnost pojedinačnog konstrukta izražena je procentualno u odnosu na aktivnost CAT5 plazmida, čija aktivnost je označena sa 100%. Prikazane vrednosti su srednja vrednost±standardna devijacija dobijena iz najmanje tri nezavisne transfekcije. Vrednosti relativnih CAT aktivnosti su poređene Studentovim *t*-testom.

Rezultat funkcionalnih eseja *in vitro* pokazao da se aktivnosti promotora A₂B₂C i istog tipa VNTR ponovaka ali u obrnutoj orijentaciji – XH konstrukt, statistički ne razlikuju (*p*>0.05) (Slika 17). Ovi rezultati pokazuju da VNTR region promotora gena za TPMT radi u oba smera.

Rezultati

Analiza vezivanja transkripcionih faktora za promotor gena za TPMT

U ovom istraživanju, opredelili smo se za *in silico* analizu promotora gena za TPMT pomoću kompjuterskih programa: TFSEARCH i MatInspector.

In silico analiza promotora gena za TPMT

U cilju identifikacije proteina koji se vezuju za sekvence DNK u promotoru gena za TPMT region od -180 do +165 bp je analiziran na prisustvo potencijalnih mesta za vezivanje transkripcionih faktora. Takođe je posebno analiziran i VNTR region koga čine tandemski ponovci tipa A₂BC od -112 do -42 bp. Ova analiza je urađena programom MatInspector (Cartharius *et al.*, 2005). Dobijeni rezultati za pretragu tandemskih ponovaka su prikazani u Tabeli 10. Rezultati dobijeni ovom analizom pokazuju da se u VNTR regionu promotora gena za TPMT u svakom ponovku nalaze potencijalna mesta za vezivanje velikog broja transkripcionih faktora. Pored opštih transkripcionih faktora (Sp1, familije KLF, Myc) prisutni su i faktori koji su aktivatori/medijatori/glavni vezivni elementi za vezivanje RNK polimeraze II i odpočinjanje transkripcije kod TATA-less promotora (RNK polimeraza II TF II B).

Rezultati

Tabela 10. Tabela prikaz potencijalnih mesta za vezivanje transkripcionih faktora za tandemske ponovke promotora VNTR*4a tipa gena za TPMT.

ponovak	pozicija	transkripcioni faktor čija se vezivna mesta nalaze u ponovku
A	-108/-92	E2F
	-104/-98	RNK polimeraza II transkripcioni faktor II B
	-103/-93	aktivator/medijator i TBP-zavisni element za RNK pol. II transkripciju sa TATA-less promotora
A	-95/-81	Sp1
	-95/-79	XKLF
	-94/-82	Myc
	-86/-80	RNK polimeraza II transkripcioni faktor II B
	-85/-75	aktivator/medijator i TBP-zavisni element za RNK pol. II transkripciju sa TATA-less promotora
B	-77/-63	Sp1
	-77/-61	XKLF
	-76/-64	Myc
C	-60/-53	Sp1
	-60/-52	XKLF
	-59/-53	Myc
	-52/-48	RNK polimeraza II transkripcioni faktor II B

Pretraga promotora gena za TPMT od -180 do +165 bp programom MatInspector za rezultat je imala vezivna mesta za 92 transkripciona faktora. Među njima su najčešći oni koji se vezuju za GC-bogate regione (faktori iz Sp/KLF familije), oni koji regulišu transkripciju posredovanu RNK polimerazom II (opšti TAF IID, TFIIB), faktori koji vezuju CCAAT mesta, E2F, Myc.

U delu promotora gena za TPMT od -180 do -130, za koji je u eksperimentima delecione analize pokazano da sadrži pozitivni regulatorni element, predikcija je pokazala i vezivno mesto za aktivatorski element za RNK II transkripciju sa TATA-less promotora.

Rezultati

Drugi program kojim je urađena *in silico* analiza celog promotora gena za TPMT kao i posebno VNTR*4a regiona, bio je TFSEARCH (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>). Rezultat analize je pokazao da je u svakom VNTR ponovku gena za TPMT prisutno mesto za vezivanje Sp1, Adr1, E2F i HSF faktora. Analiza celog promotorskog regiona ovog gena pokazala je 84 mesta za vezivanje različitih transkripcionih faktora. Među njima su najčešći faktori: Sp1, Adr1, HSF, E2F, NF-Y, CREBP.

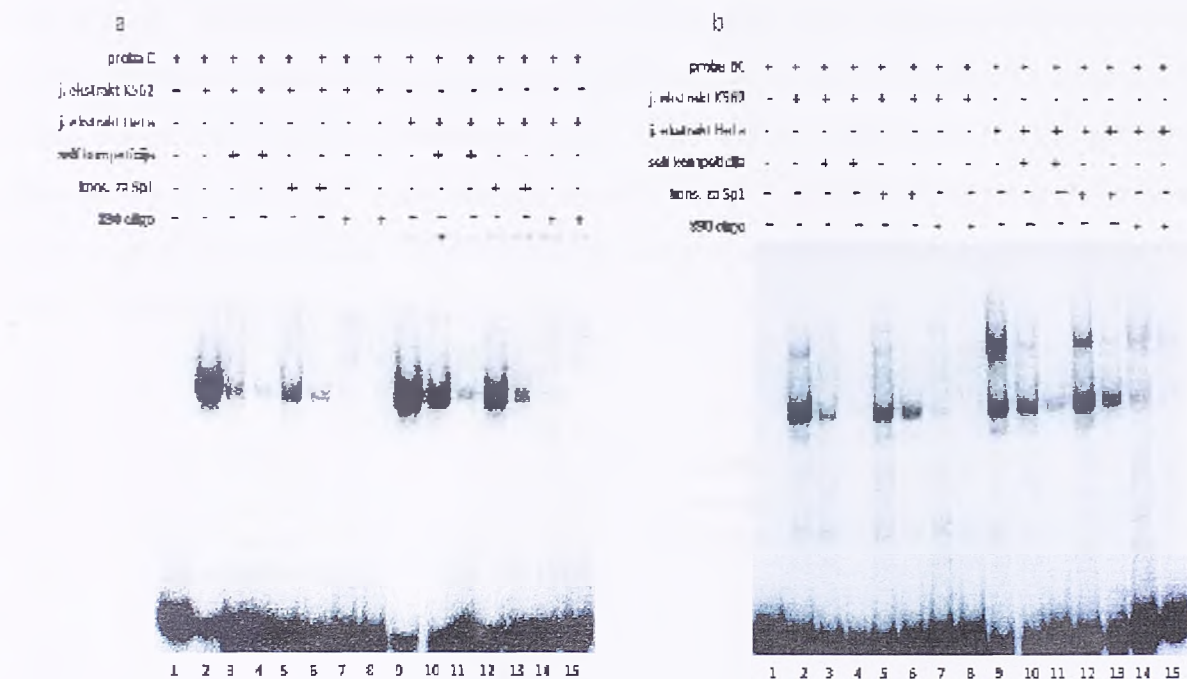
Analiza interakcija VNTR promotorskog regiona gena za TPMT i transkripcionih faktora

Eksperimentima usporene elektroforetske pokretljivosti (EMSA) analizirane su interakcije jedarnih proteina sa promotorom gena za TPMT. Korišćene su dvolančane oligonukleotidne probe dobijene hibridizacijom (eng. annealing) *coding* i *noncoding* odgovarajućih oligonukleotida čije se sekvence prikazane u Tabeli 4. poglavlja Materijal i metode. Jedarni proteini za ove analize izolovani su iz K562 i HeLa ćelija.

Prvi EMSA eksperimenti rađeni su sa različitim brojem VNTR ponovaka i jedarnim proteinima iz K562 ćelija. Korišćene su probe: C, BC, BBC, ABBC i AABBC. Probe BC, BBC, ABBC i AABBC su sve imale isti patern traka na gelu. Kao primer je navedena analiza C i BC probe (Slika 18, A i B deo). Proba C sa proteinima iz K562 ćelija formira jedan glavni kompleks (Slika 18, A, kolona 2). Kompeticija sa hladnom self-probom pokazala je da je ovo vezivanje specifično (Slika 18, A, kolone 3 i 4). Kompeticija sa probom koja obuhvata konsenzusno mesto za vezivanje Sp1 transkripcionog faktora pokazuje hlađenje kompleksa (Slika 18, A, kolone 5 i 6). Kompeticija sa oligonukleotidnom probom -890, za koju je dokazano da vezuje transkripcione faktore Sp1 i KLF1, pokazuje da se u višku -890 probe kompleks potpuno "hladi". Isti patern traka na gelu može se primetiti i u slučaju kada se za probu C vezuju jedarni ekstrakti iz HeLa ćelija (Slika 18, A, kolone 9-15). Jedina razlika koju je moguće uočiti je što je u slučaju vezivanja proteina iz HeLa ćelija afinitet vezivanja proteina za probu veći nego kod vezivanja proteina iz K562 ćelija. Na Slici 18, B, je prikazan isti eksperiment ali sa probom BC. Pri interakciji probe BC i jedarnih proteina iz K562 ćelija formiraju dva glavna kompleksa. Kompeticioni eseji ukazuju na vezivanje Sp1 proteina i u ovom regionu, ali u više

Rezultati

različitih kompleksa. Probe BBC, ABBC i AABBC su analizirane istim ovakvim EMSA esejom. Sve tri probe su se u kompeticionim esejima sa hladnom-self i -890 probom ponašale isto kao i prethodno opisana BC proba (radiografije nisu prikazane).



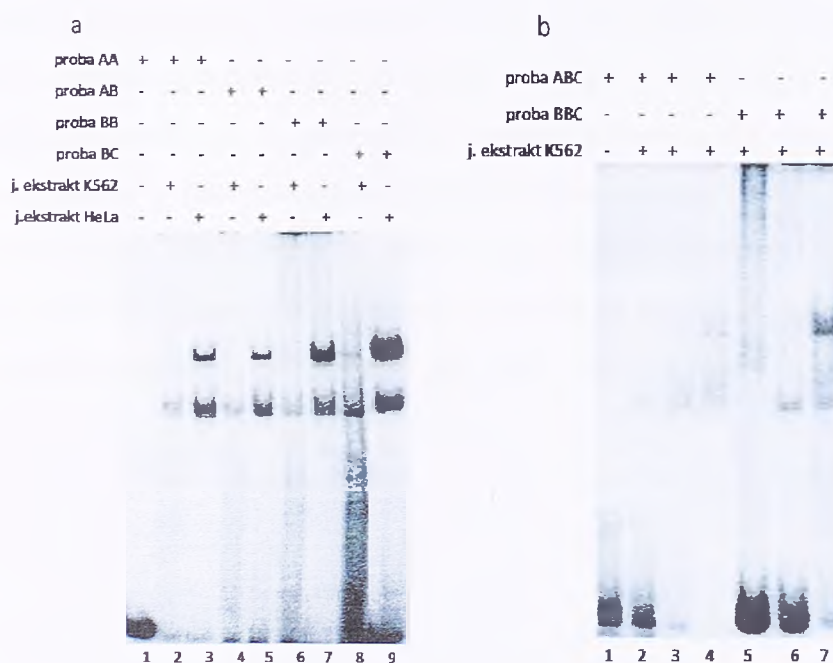
Slika 18. EMSA esej sa probama C i BC i jedarnim ekstraktima iz K562 i HeLa ćelija. A) EMSA esej sa probom C; 1. slobodna proba; 2. shift sa j. ekstraktima iz K562 ćelija; 3-4. kompeticija sa hladnom self-probom; 5-6. kompeticija sa probom koja sadrži konsenzusno mesto za vezivanje Sp1; 7-8. kompeticija sa probom koja vezuje Sp1 i KLF1 transkripcione faktore (-890); 9. shift sa j. ekstraktima iz HeLa ćelija; 10-11. kompeticija sa hladnom self-probom; 12-13. kompeticija sa probom koja sadrži konsenzusno mesto za vezivanje Sp1; 14-15. kompeticija sa probom koja vezuje Sp1 i KLF1 transkripcione faktore (-890); B) EMSA esej sa probom BC; 1-15. raspored reakcija je potpuno isti kao i u delu a.

EMSA eksperimenti sa probama koje su sadržale različite kombinacije dva i tri VNTR ponovka pokazali su da različite kombinacije dva i tri ponovka različitim afinitetom vezuju jedarne proteine iz K562 i HeLa ćelija. Korišćeni su oligonukleotidi kombinacija AA, AB, BB i BC (Slika 19, A) i ABC i BBC ponovaka (Slika 19, B). AC kombinacija u prirodi ne postoji, pa stoga nije analizirana. Probe AA i AB imaju mali afinitet vezivanja jedarnih proteina K562 i HeLa. Najveći afinitet vezivanja jedarnih proteina od VNTR proba sa različitim

Rezultati

kombinacijama dva ponovka ima proba BC (Slika 19, A). Proba BBC ima veći afinitet vezivanja jedarnih proteina iz K562 i HeLa ćelija od ABC probe (Slika 19, B).

Na osnovu eksperimenata u kojima su korišćeni oligonukleotidi sa dva ponovka možemo zaključiti da C ponovak ima poseban značaj za interakciju VNTR regulatornog regiona sa transkripcionim faktorima. Dva različita oligonukleotida sa tri ponovka koja smo koristili oba imaju po jedan C ponovak. Međutim, uvek je jači afinitet vezivanja jedarnih proteina pokazivala proba sa B (BBC) od probe sa A ponovkom (ABC). Ovo zapažanje još jednom ide u prilog hipotezi da A ponovak, usled smanjenog vezivanja jedarnih proteina, ima inhibitornu ulogu u transkripciji gena za TPMT.

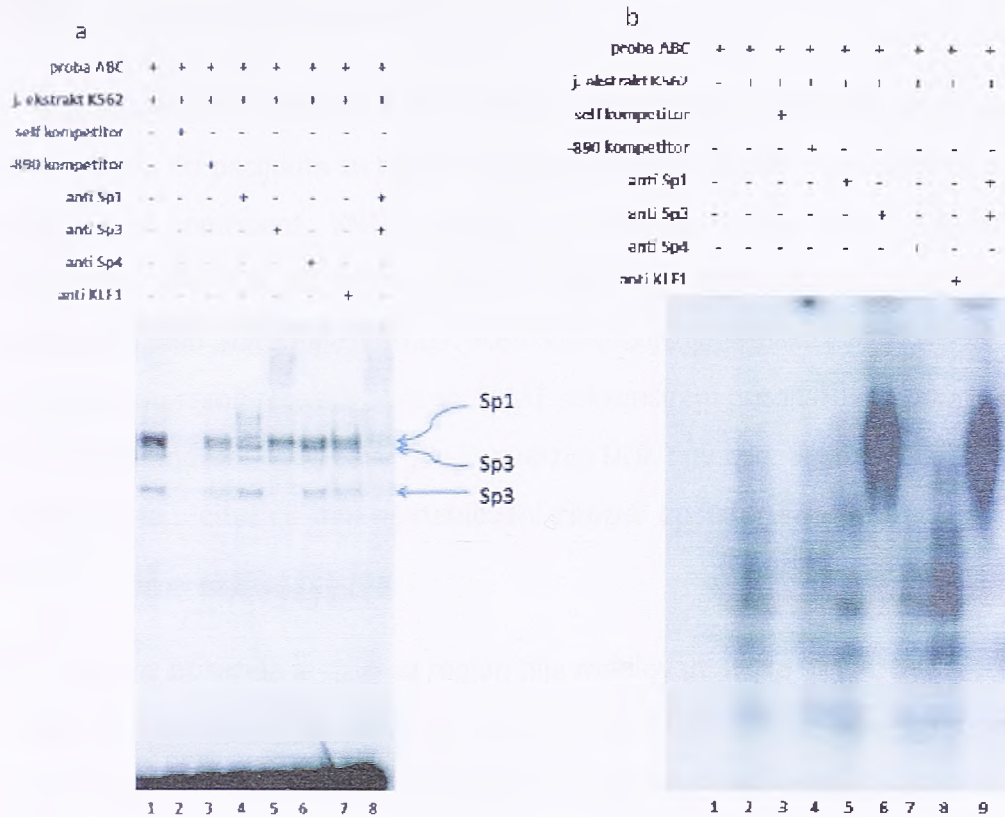


Slika 19. EMSA eseji sa probama različitih kombinacija dva i tri tandemska ponovka. A) 1. slobodna proba AA; 2. vezivanje K562 jedarnih proteina za probu AA; 3. vezivanje HeLa proteina za probu AA; 4. vezivanje K562 jedarnih proteina za probu AB; 5. vezivanje HeLa jedarnih proteina za probu AB; 6. vezivanje K562 jedarnih proteina za probu BB; 7. vezivanje HeLa jedarnih proteina za probu BB; 8. vezivanje K562 jedarnih proteina za probu BC; 9. vezivanje HeLa jedarnih proteina za probu BC; B) 1. slobodna proba ABC; 2-3. vezivanje K562 jedarnih proteina u rastućoj koncentraciji za probu ABC; 4-5. vezivanje K562 jedarnih proteina u rastućoj koncentraciji za probu BBC.

Rezultati

U eksperimentima "supersifta" sa probom ABC i jedarnim proteinima iz K562 ćelija korišćena su antitela na transkripcione faktore Sp1, Sp3, Sp4 i KLF1. Ovaj eksperiment urađen je na gelu koji je kombinacija 4% i 3% akrilamidnog gela. Dve trećine gela sa donje strane je 4% akrilamidni gel dok je gornja jedna trećina gela 3% akrilamid. Ovakva kombinacija je napravljena da bi se vrlo veliki kompleksi i fina hlađenja mogli uočiti na gelu. Antitela na Sp1 i Sp3 dovode do hlađenja pojedinih kompleksa u gelu (Slika 20, A, kolone 4 i 5). Eseji sa antitelima na Sp4 i KLF1 ne pokazuju razlike u odnosu na esej bez ovih antitela (Slika 20, A, kolone 6 i 7). U koloni 8 ovog gela u reakciji su oba antitela i na Sp1 i na Sp3 transkripcioni faktor. Na Slici 20 može se videti isti eksperiment "supersifta" kao prethodno opisan, samo na kombinaciji agaroznog i akrilamidnog gela (2% akrilamid + 0.5% agaroz). Raspored kolona je identičan kao na A delu ove slike. Može se uočiti da je supersift koji je antitelo na Sp3 formiralo sa probom BC i jedarnim proteinima iz K562 ćelija zaista ogroman kompleks (Slika 20, B, kolona 6). Sa oba antitela u reakciji kompleks koji zaostaje u koloni 9 je veći od onog u koloni 6. Ovo dokazuje da se transkripcioni faktori Sp1 i Sp3 istovremeno vezuju za VNTR region. EMSA eseji se obično ne rade na agaroznim gelovima zbog kompleksa koji izgledaju veoma mutno. Mi smo se odlučili za ovakav gel da bismo proverili istovremeno vezivanje transkripcionih faktora Sp1 i Sp3.

Rezultati



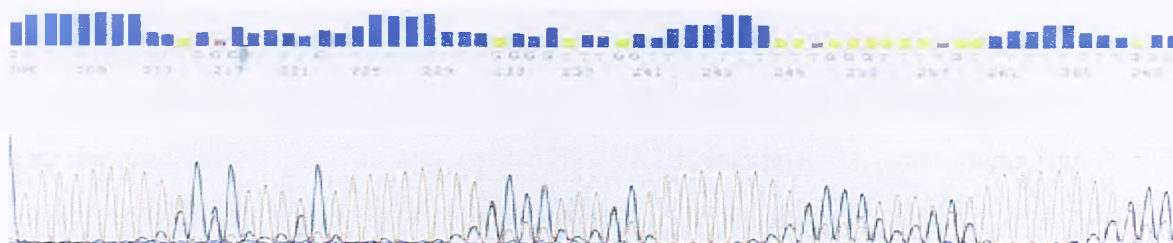
Slika 20. Supersift esej sa probom ABC i jedarnim proteinima iz K562 ćelija. A) kombinacija 3% i 4% akrilamidnog gela 1. vezivanje K562 jedarnih proteina za probu ABC; 2. kompeticija sa hladnom self-probom; 3. kompeticija sa sekv. specifičnom probom -890 4. supersift sa antitelom na Sp1; 5. supersift sa antitelom na Sp3; 6. supersift sa antitelom na Sp4; 7. supersift sa antitelom na KLF1; 8. supersift sa antelima na Sp1 i Sp3. B) 0.5% agarozni gel 1. slobodna proba ABC; 2. vezivanje K562 jedarnih proteina za probu ABC; 3. kompeticija sa hladnom self-probom; 4. kompeticija sa sekv. specifičnom probom -890 5. supersift sa antitelom na Sp1; 6. supersift sa antitelom na Sp3; 7. supersift sa antitelom na Sp4; 8. supersift sa antitelom na KLF1; 9. supersift sa antelima na Sp1 i Sp3.

Rezultati esejja supersift su pokazali da se transkripcioni faktori Sp1 i Sp3 direktno i istovremeno vezuju za VNTR region.

METILACIONI STATUS PROMOTORA GENA ZA TPMT

Metilacioni status promotora gena za TPMT analiziran je na genomskoj DNK četiri pacijenta obolela od dečje ALL. Tri pacijenta su bila heterozigoti za VNTR region u promotoru gena za TPMT, jedan je bio homozigot. VNTR genotipovi pacijenata bili su VNTR*5a/VNTR*7b, VNTR*6a/VNTR*7a, VNTR*6b/VNTR*6b i VNTR*4a/VNTR*5a. Metilacioni status je analiziran kao što je opisano u delu Materijal i metode. Posle konverzije genomске DNK Na-bisulfitom i umnožavanja promotorskog regiona gena za TPMT sekvencirani produkti su upoređivani sa sekvencama istih promotora ovog gena gde konverzije DNK nije bilo. Svi metilovani citozini, posle konverzije ostaju citozini, dok nemetilovani citozini postaju uracili, odnosno u DNK sekvenci timini.

Analiza VNTR regiona pokazala je da ovaj region nije metilovan. (Slika 21). Analiza distalnog dela promotora je pokazala da je jedno CpG ostrvce na poziciji +78 od starta transkripcije bilo zaštićeno do konverzije bisulfitom. Potrebne su dodatne funkcionalne analize da bi se dokazalo da je ovo mesto zaista metilovano i da li ova modifikacija ima uticaj na transkripciju gena za TPMT *in vivo*.



Slika 21. Deo sekvence VNTR regiona promotora gena za TPMT posle konverzije Na-bisulfitom.

Naša istraživanja promotorskog regiona gena za TPMT na molekularnom nivou dala su nam dosta podataka o polimorfnom regionu tandemskih ponovaka. Utvrdili smo da je transkripcija ovog gena posredovana transkripcionim faktorima Sp1 i Sp3 i da na transkripciju gena za TPMT utiče ne samo broj, već i tip tandemskih ponovaka. Pokazali smo postojanje pozitivnog regulatornog elementa na poziciji -180 do -130 od starta transkripcije. Ovaj pozitivni regulatorni element je od ključnog značaja za bazalnu transkripciju gena za

Rezultati

TPMT, što je pokazano u delecionim analizama. Tip A ponovaka verovatno ima inhibitorski uticaj na transkripciju. Preliminarni rezultati metilacionih eseja su pokazali da metilacija nije mehanizam transkripcione regulacije gena za TPMT.

Na osnovu podataka dobijenih *in vitro* eksperimentima pokušali smo da procenimo da li su tandemski ponovci u promotorskom regionu gena za TPMT kandidati za farmakogenetički marker.

ANALIZA FARMAKOGENETIČKOG POTENCIJALA VNTR REGIONA PROMOTORA GENA ZA TPMT

Rezultati funkcionalnih eseja sa CAT konstruktima koji sadrže najčešće tipove tandemskih ponovaka pokazali su da se ove varijante mogu grupisati u tri različite kategorije, i to: hipometilatori (A_2BC tip, VNTR*4a), normalni metilatori (A_2B_3C tip, VNTR*6a) i hipermetilatori (A_2B_2C , VNTR*5a) čija je zastupljenost u populaciji 54.22%, 7.47% i 30.02%, redom ($p < 0.05$). Većina preostalih reporterskih konstrukata su bili ekspimirani kao normalni metilatori. Izuzetak su jedino konstrukti sa AB_4C (VNTR*6b) i A_5BC (VNTR*7a) tipom tandemskih ponovaka čija je ekspresija bila u kategoriji hipometilatora. Učestalosti VNTR genotipova u našoj populaciji ukazuje da genotipovi koji bi mogli biti okarakterisani kao hipometilatori, obuhvataju oko 33%: VNTR*4a/VNTR*4a, zastupljen sa 28,70%; VNTR*4a/VNTR*6b, zastupljen sa 0,65%; VNTR*4a/VNTR*7a, zastupljen sa 3,27%.

Na osnovu naših rezultata o aktivnosti različitih VNTR u *in vitro* uslovima, i rezultata populacione studije o zastupljenosti pojedinih VNTR alela u našoj populaciji, možemo uočiti da su kod trećine osoba u našoj populaciji prisutni VNTR genotipovi koji doprinose hipometilacionom TPMT fenotipu. Zbog toga bi u našoj populaciji VNTR genotip mogao biti kandidat za farmakogenetički marker. Naravno, ovakva istraživanja zahtevaju najpre potvrdu u kliničkim ispitivanjima, da bi se primenila individualizovana terapija. Retke su populacione studije objavljene za polimorfizam tandemskih ponovaka u promotorskom regionu gena za TPMT, i važno je da se populaciona istraživanja nastave i prošire. Rezultati naših populacionih istraživanja i funkcionalnih analiza *in vitro*, su samo prvi korak ka potvrdi da li

Rezultati

je promotorski region VNTR gena za TPMT novi farmakogenetički marker. Dodatna istraživanja se moraju sprovesti na osobama kod kojih polimorfizam broja i tipa tandemskih ponovaka u promotorskom regionu gena za TPMT u što većoj meri samostalno utiče na aktivnost TPMT enzima (isključenje postojanje drugih mutacija, dokaz da postoji promena na RNK nivou).

Ukoliko se potvrdi da je određeni polimorfizam broja i tipa tandemskih ponovaka u promotorskom regionu gena za TPMT nezavisni modulator aktivnosti TPMT, populacione studije bi pokazale da li je on i farmakogenetički marker u toj populaciji.

Ostali polimorfizmi u promotoru gena za TPMT i njihov uticaj na transkripciju

Bolesnici prepoznati kao hipermetilatori u našoj prospektivnoj studiji analizirani su na još jedan polimorfizam u promotoru gena za TPMT koji bi mogao biti odgovoran za prekomernu sintezu TPMT proteina. To je 5 ili 7 GCC ponovaka u okviru promotorskog regiona gena za TPMT na mestu -327 do -345 bp od početka starta transkripcije (Roberts *et al.*, 2008). Kod dva ovakva bolesnika - hipermetilatora kao i kod dva nasumično odabrana ALL bolesnika koji su dobro reagovali na terapiju, uradili smo analizu GCC ponovaka kako je opisano u poglavlju Materijal i metode.

Kod sva četiri analizirana ALL bolesnika utvrđeno je prisustvo 6 GCC trinukleotidnih ponovaka u promotorskom regionu gena za TPMT. GCC ponovci, bar kako preliminarni rezultati pokazuju, nisu odgovorni za hipermetilaciju u našoj populaciji.

Sekvence promotorskih regiona gena za TPMT kod svih analiziranih osoba pružile su informacije i o dodatnim tačkastim polimorfizmima u ovom regionu. Kod jednog ALL bolesnika koji nije reagovao na terapiju i koji je prepoznat kao izuzetno visoki metilator detektovana je nukleotidna zamena citozina adeninom na mestu -183 (g.-183C>A) od početka starta transkripcije u homozigotnom obliku. Kod ovog bolesnika utvrđen je normalni TPMT genotip u homozigotnoj formi (TPMT*1/TPMT*1) kao i VNTR genotip VNTR*5a/VNTR*5a. Još je kod jednog ALL bolesnika sa normalnim TPMT genotipom u

Rezultati

homozigotnoj formi (TPMT*1/TPMT*1) detektovana ista promena g.-183C>A, vezana za VNTR*8a alel.

Polimorfizam g.-183C>A je veoma redak, a u našoj populaciji je detektovan kod dva bolesnika.

UTICAJ 6-MPa NA TRANSKRIPCiju GENA ZA TPMT

U nastavku istraživanja smo pokušali da objasnimo fenomen modulacije aktivnosti enzima TPMT pri dužoj primeni tiopurinskih lekova, primećen u našoj kliničkoj prospektivnoj studiji. Naš nalaz je bio u skladu sa podacima da je u eritrocitima nivo TPMT enzima za oko 30% veći kod dece sa leukemijom kada su pod terapijom merkaptopurinima, a da se po prestanku terapije vraća na prvobitni nivo (Lennard *et al.*, 1990).

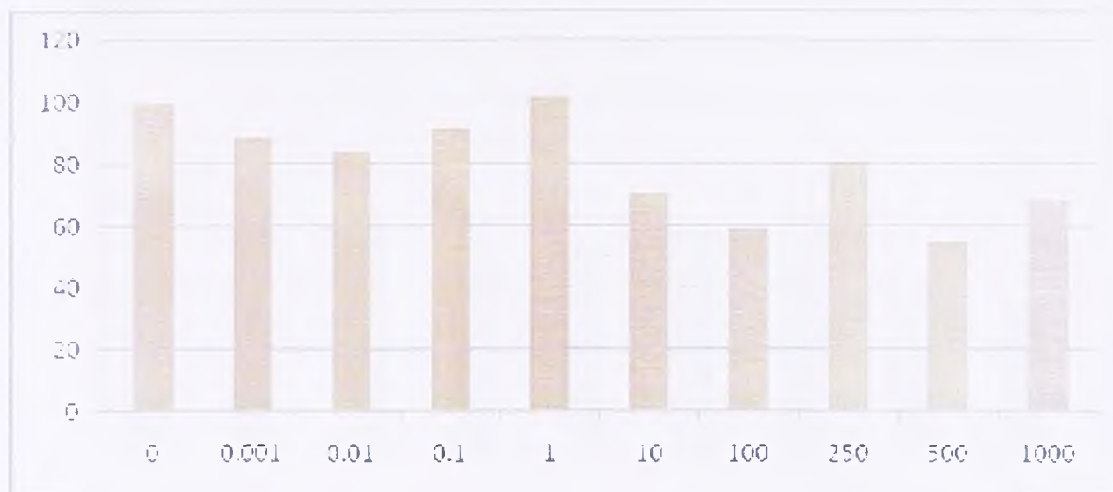
Zbog mogućeg odgovora promotora na merkaptopurin, u funkcionalnim esejima smo ispitivali i uticaj 6-MP-a na transkripciju. Takođe smo pokušali da utvrdimo koji transkripcioni faktori bi mogli biti posrednici u ovom odgovoru. Postavili smo hipotezu da se sam lek ponaša kao modulator koji deluje preko promotora gena za TPMT.

Lek 6-MP (6-merkaptopurin monohidrat, 98%, Sigma Aldrich) u svojoj čistoj aktivnoj formi korišćen je u različitiom opsegu doza za tretiranje K562 ćelija koje su tranzijentno tranfekovane reporterskim konstruktima sa različitim tipom VNTR ponovaka.

Za optimizaciju eksperimentalne doze 6-MP korišćen je opseg doza od 0.001 μ M do 1000 μ M 6-MP u trajanju od 48 sati. Terapeutske doze 6-MP se, u zavisnosti od primenjenih protokola za lečenje, kreću od 2 do 10 μ M 6-MP (Bökkerink *et al.*, 1993; Zimm *et al.*, 1983; Loo *et al.*, 1968). K562 ćelije podvrgnute su testovima preživljavanja i tako je procenjena doza pri kojoj su ćelije dovoljno vijabilne i metabolički aktivne. Vijabilnost je proveravana MTT testom.

Preživljavanje K562 ćelija pod tretmanom različitim dozama 6-MP u trajanju od 48 sati, prikazano je na Slici 22. Doza od 10 μ M leka smanjuje normalan rast ćelija za oko 30%, a doza od 500 μ M 6-MP za oko 45%.

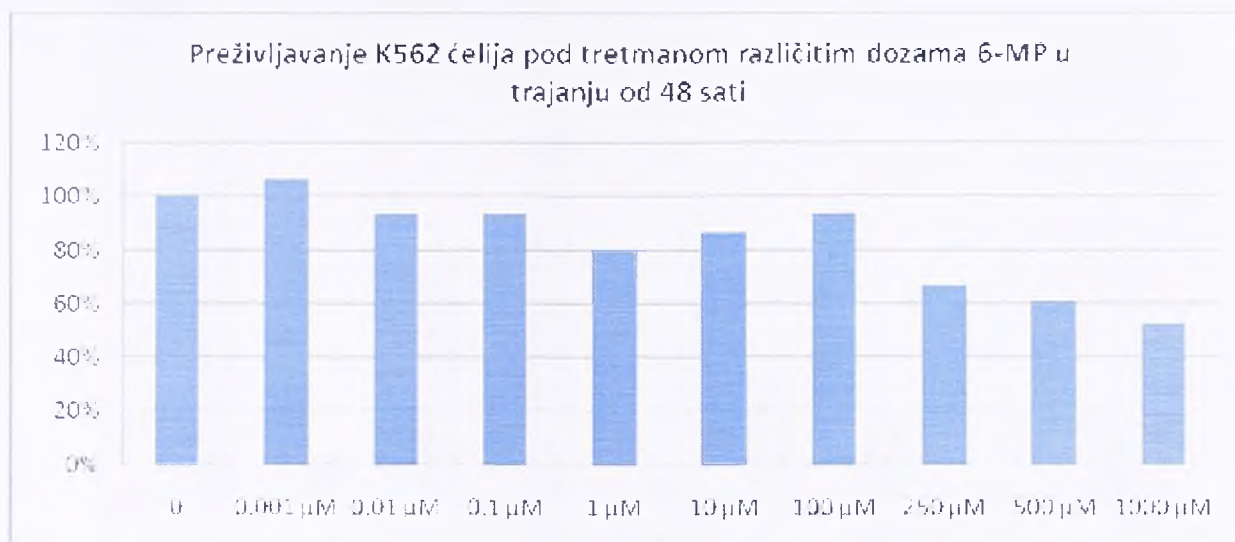
Rezultati



Slika 22. Vijabilnost K562 ćelija pod tretmanom 48 sati različitim dozama 6-MP određeno MTT testom. Na apscisi su označene doze 6-MP kojima su ćelije tretirane u μM , dok je na ordinati procentualno izražen broj preživelih ćelija gde je za netretiran uzorak izabrano 100%.

Ćelije su posle 48 sati tretmana datom dozom brojane i na automatskom brojaču ćelija (The Countess™ automated cell counter, Invitrogen). Metode su detaljnije objašnjene u poglavlju Materijal i metode.

Brojanje tretiranih ćelija automatskim brojačem ćelija je pokazalo da doze od 10 μM i 500 μM 6-MP usporavaju rast ćelija za oko 20% i 40% u odnosu na netretirane K562 ćelije, redom (Slika 23).



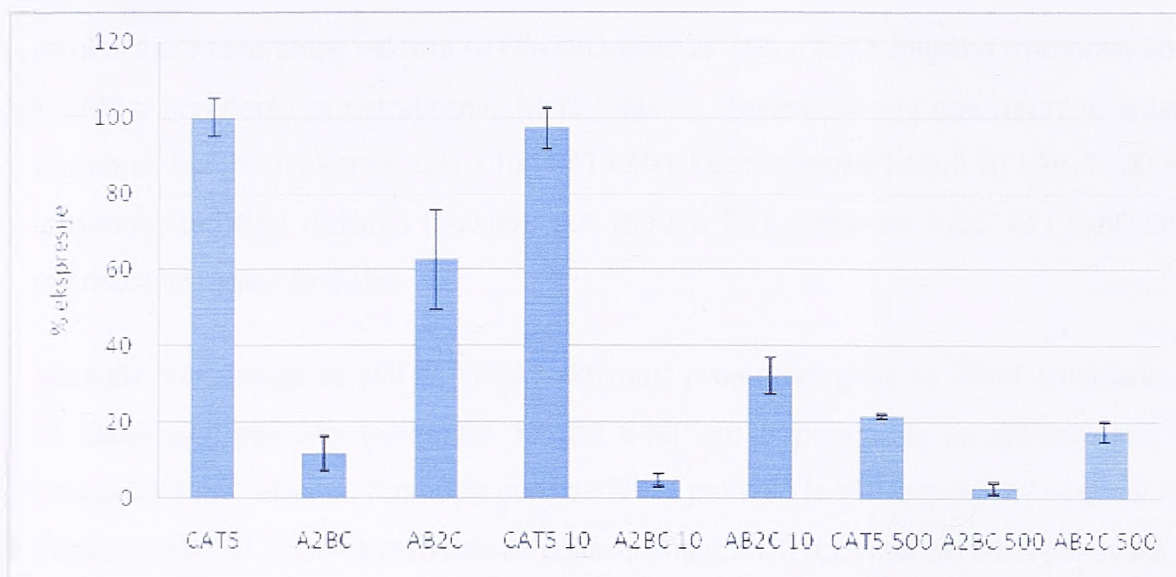
Slika 23. Preživljavanje K562 ćelija tretiranih 48 sati različitim dozama 6-MP određeno brojanjem K562 ćelija na automatskom brojaču ćelija. Na apscisi su označene doze 6-MP kojima su ćelije tretirane u μM , dok je na ordinati procentualno izražen broj preživelih ćelija gde je za netretiran uzorak izabrano 100%.

Obe metode su pokazale da se eksperimenti sa K562 ćelijama mogu izvoditi korišćenjem odabranih doza u opsegu od 10 μM do 500 μM 6-MP. Doza od 10 μM odgovara fiziološkom opsegu doza, a doza od 500 μM je mnogo veća od fiziološke. Nisu bile uočene promene u morfologiji K562 ćelija, samo je njihov rast bio sporiji.

Metod tranzijentne transfekcije K562 ćelija kada su tretirane 6-MP-om objašnjen je u poglavlju Materijal i metode. K562 ćelije su tretirane 48 sati dvema odabranim dozama: 10 i 500 μM 6-MP. Nakon toga su oprane 1xPBS-om i ponovo zasejane pod istim tretmanom. Sutradan su rađeni eksperimenti transfekcije K562 lipofektaminom. Odabrani CAT-konstrukti kod kojih će se ispitivati uticaj 6-MP na transkripcionom nivou su oni iz VNTR*4 grupe: A₂BC i AB₂C tipovi. Ovi konstrukti pokazuju najveće međusobne različitosti u aktivnostima promotora. AB₂C tip ima najveću CAT aktivnost od svih izučavanih CAT-konstrukata. A₂BC tip tandemskih ponovaka je najučestaliji VNTR tip u našoj populaciji.

Rezultati transfekcije K562 ćelija pod tretmanom dvema dozama 6-MP odabranim CAT-konstruktima prikazani su na Slici 24.

Rezultati



Slika 24. Analiza uticaja 6-MP na transkripcionu aktivnost promotora gena za TPMT. K562 ćelije su tranzijentno kotransfekovane konstruktima A_2BC i AB_2C i pCH110 plazmidom i na osnovu β -galaktozidazne aktivnosti su normalizovane CAT vrednosti. Vektor pBLCAT5 (CAT5) (timidin kinazni promotor HSV virusa omogućava ekspresiju CAT gena) korišćen je kao pozitivna kontrola u eksperimentu. Normalizovana CAT aktivnost pojedinačnog konstrukta izražena je procentualno u odnosu na aktivnost CAT5 plazmida, čija aktivnost je označena sa 100%. Oznaka samog konstrukta označava transfekciju bez tretmana, oznaka 10 pored konstrukta je transfekcija K562 kada su ćelije prethodno bile tretirane dozom od 10 μM 6-MP, a oznaka 500 pored konstrukta kada su K562 ćelije bile prethodno tretirane dozom od 500 μM 6-MP. Prikazane vrednosti su srednja vrednost \pm standardna devijacija dobijena iz najmanje tri nezavisne transfekcije. Vrednosti relativnih CAT aktivnosti su poređene Studentovim *t*-testom.

Iz rezultata transfekcije se može videti da aktivnost promotora gena za TPMT zavisi od doze merkaptopurina kojom su K562 ćelije prethodno tretirane. Statističkom analizom potvrđeno je da kontrolni plazmidi CAT5 bez i sa tretmanom 10 μM 6-MP ne pokazuju značajne razlike ($p > 0.05$). Između A_2BC i A_2BC 10, i AB_2C i AB_2C 10 postoje statistički značajne razlike ($p < 0.05$). CAT aktivnosti A_2BC i AB_2C u K562 ćelijama bez i sa tretmana 10 μM 6-MP pokazale su da su promotorske aktivnosti A_2BC i AB_2C konstrukata smanjene za 40%, odnosno za 50%. Statistički značajne razlike su detektovane između svih konstrukata u netretiranim K562 ćelijama i njihovim parnjacima u K562 sa tretmanom 500 μM 6-MP ($p < 0.05$). Aktivnosti oba

Rezultati

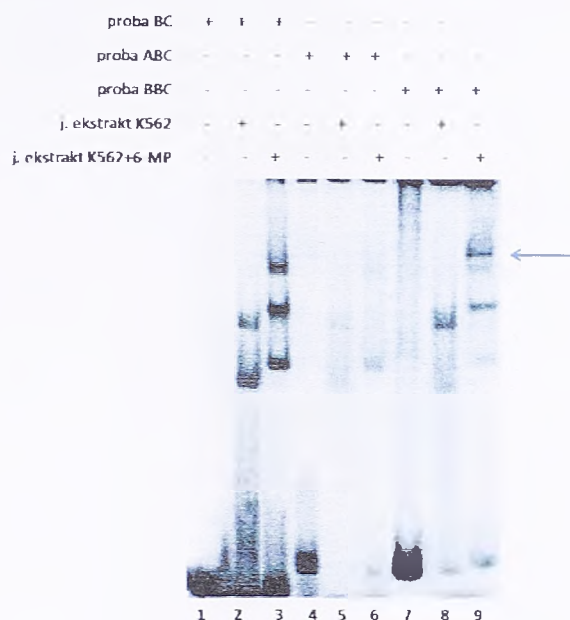
konstrukta kao i kontrolnog vektora su bile smanjene za 75% u K562 ćelijama tretiranim 500 μM 6-MP u poređenju sa netretiranim K562 ćelijama. Analizirane su i obe tretirane grupe međusobno. Kontrolni plazmidi CAT5 10 i CAT5 500, kao i konstrukti AB₂C 10 i AB₂C 500 se međusobno statistički razlikuju ($p < 0.05$), dok između CAT aktivnosti A₂BC 10 i A₂BC 500 nema značajne razlike ($p > 0.05$).

Iz rezultata transfekcija se vidi da je CAT aktivnost promotora gena za TPMT smanjena u K562 ćelijama prethodno tretiranim 10 μM 6-MP-om u poređenju sa aktivnostima u netretiranim K562 ćelijama. Promotor gena za TPMT pokazao je VNTR-specifični odgovor na ovu dozu leka 6-MP. Naši rezultati takođe pokazuju da različiti tipovi tandemskih ponovaka u promotoru gena za TPMT, A₂BC i AB₂C, odgovaraju na 6-MP različitim smanjenjem CAT aktivnosti.

Pad CAT aktivnosti kod kontrolnog vektora kao i kod oba VNTR*4 konstrukta za 75% u K562 ćelijama tretiranim dozom od 500 μM 6-MP u odnosu na njihove aktivnosti u netretiranim K562 ćelijama, verovatno je posledica sistemskog odgovora transkripcione mašinerije ćelije na veoma visoke doze tiopurina.

Mogući uticaj 6-MP na promotor gena za TPMT analiziran je i EMSA eksperimentima. Korišćeni su jedarni proteini iz K562 i K562 ćelija tretiranih 500 μM 6-MP u trajanju od 48 sati. Ova doza leka je izabrana da bismo u K562 ćelijama simulirali stanje ćelija pacijenata pod dugotrajnom merkaptopurinskom terapijom. Može se videti da vezivanje proteina za probu BC iz K562 ćelija tretiranih 6-MP-om dovodi do formiranja kompleksa koji se u gelu kreću sporije od onih koji nastaju vezivanjem proteina iz netretiranih ćelija (Slika 25, kolone 2 i 3). Dodatno, vezivanjem jedarnih proteina iz K562 ćelija tretiranih 6-MP-om formira se treći, najteži kompleks (Slika 25, kolona 3). Proba ABC pokazuje isti patern vezivanja proteina iz K562 ćelija tretiranih i netretiranih 6-MP-om, kao proba BC. Prilikom vezivanja jedarnih proteina K562 ćelija tretiranih 6-MP-om za BBC probu formira još jedan, četvrti, najteži kompleks, koji se ne uočava kod ostalih proba (Slika 25, kolona 9). Ovaj novonastali kompleks označen je strelicom na Slici 25.

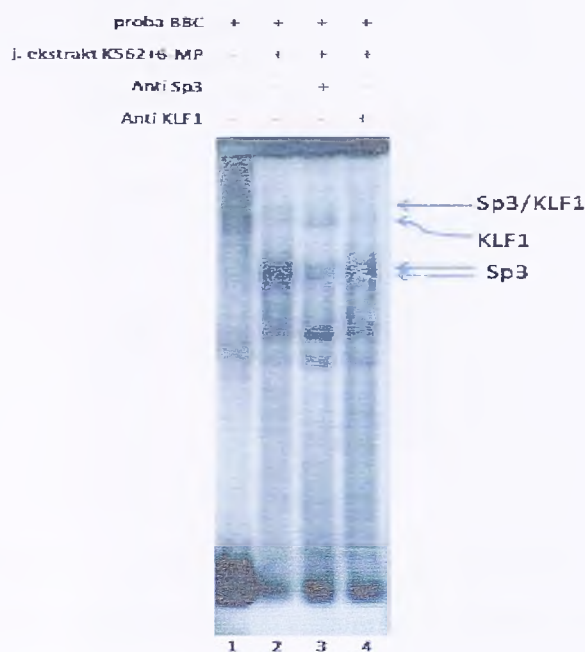
Rezultati



Slika 25. EMSA esej sa probama BC, ABC i BBC i jedarnim proteinima iz K562 i K562 ćelija tretiranih 48 sati 6-MPom. 1. slobodna proba BC; 2. vezivanje jedarnih proteina iz K562 ćelija za BC probu; 3. vezivanje jedarnih proteina iz K562 ćelija tretiranih 6-MPom za BC probu; 4. slobodna proba ABC; 5. vezivanje jedarnih proteina iz K562 ćelija za ABC probu; 6. vezivanje jedarnih proteina iz K562 ćelija tretiranih 6-MPom za ABC probu; 7. slobodna proba BBC; 8. vezivanje jedarnih proteina iz K562 ćelija za BBC probu; 9. vezivanje jedarnih proteina iz K562 ćelija tretiranih 6-MPom za BBC probu.

U eksperimentima "supersifita" sa probom BBC i jedarnim proteinima iz K562 ćelija tretiranih 48 sati 500 μ M 6-MP-om korišćena su antitela na transkripcione faktore Sp3 i KLF1. Vezivanje antitela na Sp3 dovodi do hlađenja gornjih kompleksa i donjih označenih strelicama na Slici 26 (kolona 3). Antitelo na transkripcioni faktor KLF1 sa jedarnim proteinima iz K562 ćelija tretiranih 6-MPom i probom BBC pokazuje hlađenje gornjeg kompleksa (Slika 26, kolona 4).

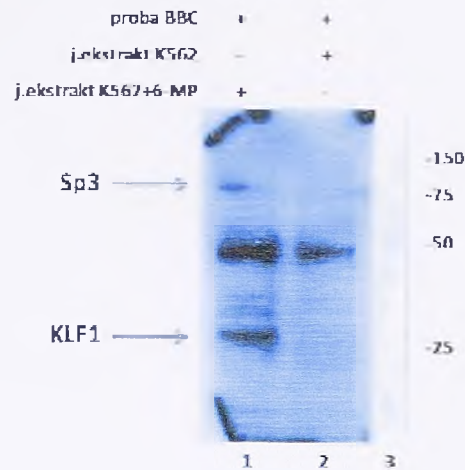
Rezultati



Slika 26. Supersift esej sa probom BBC, jedarnim ekstraktima iz K562 ćelija tretiranih 6-MPom i antitelima na Sp3 i KLF1 transkripcione faktore. 1. slobodna proba BBC; 2. vezivanje jedarnih ekstrakata za probu BBC; 3. supersift sa antitelom na Sp3; 4. supersift sa antitelom na KLF1.

Dodatna analiza proteina koji stupaju u interakciju sa probom BBC izvršena je South-Western metodom (Slika 27). U ovom slučaju protein-protein interakcije među jedarnim proteinima narušene su razdvajanjem proteina na denaturišućem poliakrilamidnom gelu. Uz pomoć proteinskog standarda, moguće je proceniti molekulske težine proteina koji su stupili u direktnu interakciju sa obeleženim probama. Korišćeni su jedarni proteini iz K562 ćelija tretiranih 48 sati dozom od 500 μ M 6-MP i K562 ćelije bez tretmana lekom. Na molekulskoj visini od oko 80 kDa u koloni sa jedarnim proteinima iz K562 ćelija tretiranih 6-MP-om uočava se traka koja bi mogla biti poreklom od Sp3 transkripcionog faktora (molekulska težina jedne izoforme Sp3 TF je 81.925 kDa). Ova traka se nazire i u koloni sa jedarnim proteinima iz K562 ćelija. Na molekulskoj visini od oko 30 kDa u koloni sa jedarnim proteinima iz K562 ćelija tretiranih 6-MP-om uočava se traka koja bi mogla biti poreklom od KLF1 transkripcionog faktora (molekulska težina KLF1 TF je 36 kDa). Vezivanje KLF1 nije uočeno u koloni gde su jedarni proteini iz netretiranih K562 ćelija.

Rezultati



Slika 27. Vezivanje probe BBC za proteine iz K562 ćelija netretiranih i tretiranih 48 h 500 μ M 6-MP-om razdvojene na SDS elektroforezi. 1. vezivanje probe BBC za jedarni ekstrakt K562 ćelija tretiranih 48h 500 μ M 6-MP-om; 2. vezivanje probe BBC za jedarni ekstrakt K562 ćelija; 3. proteinski marker.

Funkcionalnim esejima i eksperimentima usporene elektroforetske pokretljivosti (EMSA), South-Western esejom i superšift eksperimentima pokazali smo da lek 6-MP utiče na VNTR region promotora gena za TPMT posredstvom transkripcionih faktora Sp3 i KLF1.

DISKUSIJA

Diskusija

TPMT je jedan od najboljih primera primene farmakogenetike u individualizaciji mekaptopurinske terapije. Ipak, dosada se svi toksični efekti ne mogu do kraja objasniti postojećim TPMT mutacijama koje se rutinski koriste u kliničkoj praksi. Pronalaženje novih TPMT farmakogenetičkih markera može doprineti boljoj i efikasnijoj kontroli primene tiopurinskih lekova i dovesti do individualizovane terapije.

FARMAKOGENETIČKA STUDIJA - DETEKCIJA NAJČEŠĆIH MUTACIJA U GENU ZA TPMT KOD DECE OBOLELE OD ALL I MODIFIKACIJA TIOPURINSKE TERAPIJE

ALL pacijenti koji su heterozigotni nosioci mutiranog alela TPMT zahtevaju modifikaciju tiopurinske terapije

TPMT je glavni enzim koji u hematopoetskim tkivima metaboliše tiopurine, lekove koji se široko primenjuju u lečenju akutnih leukemija kod dece. Gen za TPMT kodira enzim određene aktivnosti, nasleđuje se kodominantno i ispoljava genetski polimorfizam, što je potvrđeno u svim dosad objavljenim studijama koje su obuhvatile veliki broj ispitanika (Weinshilboum *et al.*, 1980; Yates *et al.*, 1997; Otterness *et al.*, 1997; Spire-Vayron de la Moureyre *et al.*, 1998a; Hon *et al.*, 1999; Ameyaw *et al.*, 1999; Collie-Duguid *et al.*, 1999; Hongeng *et al.*, 2000; McLeod *et al.*, 1999; McLeod *et al.*, 2000).

Dosadašnja populaciona istraživanja su pokazala da 3 mutirana alela (TPMT*2, TPMT*3A i TPMT*3C) čine 80-95% svih dijagnostifikovanih slučajeva sa srednjom ili niskom aktivnošću TPMT enzima (Yates *et al.*, 1997; McLeod *et al.*, 2000). Ovi mutirani aleli su prepoznati kao farmakogenetički markeri (kao homozigoti i dvostruki heterozigoti) i koriste se u kliničkoj praksi.

Naša studija je pokazala da je lečenje ALL bolesnika, heterozigotnih nosilaca TPMT mutiranog alela, smanjenim dozama merkaptopurina, bilo uspešno. Kod ovih bolesnika terapija nije odlagana, i nakon 12-19 nedelja primene smanjenih doza merkaptopurina, lek se davao u punim dozama do kraja terapije. Za vreme trajanja merkaptopurinske terapije ovi bolesnici nisu imali hematopoetske komplikacije. Takođe, trajanje terapije kod ovih bolesnika nije se vremenski razlikovalo od trajanja terapije bolesnika sa normalnim TPMT

Diskusija

genotipom. Naša modifikacija terapije je podrazumevala davanje ostalih lekova u punoj dozi, ovo se prvenstveno odnosi na metotretksat. To je naročito značajno jer bolesnici ne gube drugi deo terapije koji je kod lečenja ovako kompleksnih bolesti veoma važan (Relling *et al.*, 1999; Dokmanovic *et al.*, 2006).

Naši rezultati potvrđuju da bi pre uvođenja merkaptopurinske terapije bolesnicima trebalo odrediti TPMT genotip i u skladu sa TPMT genotipom modifikovati dozu leka 6-merkaptopurina. Protokol je neophodno modifikovati i kod heterozigotnih nosilaca mutiranog alela TPMT. Naši nalazi su potvrđeni i u drugim studijama (Black *et al.*, 1998; Relling *et al.*, 1999).

Farmakogenetički markeri u genu za TPMT u različitim populacijama

Ispitivanja učestalosti mutiranih TPMT alela su pokazala da postoje velike međuetničke razlike u njihovoj raspodeli. Naročito uočljive razlike su primećene u učestalosti mutiranih TPMT alela između pripadnika bele rase i populacija sa Dalekog istoka. Kod belaca je najčešći mutirani TPMT alel TPMT*3A i nešto manju učestalost ima TPMT*3B (Ameyaw *et al.*, 1999; Hon *et al.*, 1999; Rossi *et al.*, 2001; Ganiere-Monteil *et al.*, 2004; Schaffeler *et al.*, 2004). U populacijama Dalekog istoka najčešći mutirani TPMT alel je TPMT*3C (Collie-Duguid *et al.*, 1999; Kubota *et al.*, 2001; Kham *et al.*, 2002; Srimartpirom *et al.*, 2004). U našoj studiji učestalost mutiranog alela TPMT*3A je 4%, a u našoj ranijoj populacionoj studiji kod zdravih ispitanika u Srbiji zabeležena je učestalost TPMT*3A alela od 3,25% (Dokmanovic *et al.*, 2006). U našoj populaciji učestalost TPMT*2 alela 0.2% i TPMT*3B alela 0.5%. Do sada kod nas nije detektovan TPMT*3C alel.

Ovi rezultati su u skladu sa ranije objavljenim podacima o učestalostima mutiranih TPMT alela za susedne slovenske narode (3,6% kod Bugara i 4,1% kod Slovenaca) (Indjova *et al.*, 2003; Milek *et al.*, 2006).

Za sve bolesnike kod kojih je detektovan mutirani TPMT*3A alel urađena je i analiza kod roditelja (porodična studija). Mutirani alel TPMT*3A nosi dve mutacije na istom hromozomu (c.460G>A i c.719A>G) i PCR analizom nije moguće utvrditi da li su obe mutacije na istom

Diskusija

hromozomu. Postoji i verovatnoća da se ove dve mutacije nalaze na različitim hromozomima i u tom slučaju bi oba TPMT alela bila mutirana a genotip bolesnika bio bi TPMT*3B/TPMT*3C. Ovaj podatak je veoma važan prilikom modifikovanja tiopurinske terapije. Bolesnici sa TPMT*3B/TPMT*3C genotipom imaju nižu TPMT aktivnost u odnosu na bolesnike sa TPMT*3A/TPMT*1 genotipom koji imaju jedan funkcionalan TPMT alel. Kod dvostrukih heterozigota tiopurinsku terapiju bi trebalo modifikovati značajnim smanjenjem doze upravo zato što su oba TPMT alela pogođena mutacijom. Analiza obe mutacije i kod roditelja (porodične studije) je neophodna kada se otkrivaju udružene c.460G>A i c.719A>G mutacije.

ANALIZA POLIMORFIZAMA PROMOTORSKOG REGIONA GENA ZA TPMT

Prethodne studije VNTR regiona promotora gena za TPMT bile su orijentisane uglavnom ka analizi korelacije ukupnog broja VNTR ponovaka na oba hromozoma ili VNTR genotipa, i aktivnosti TPMT u eritrocitima (Yan *et al.*, 2000; Alves *et al.*, 2001; Marinaki *et al.*, 2003; Arenas *et al.*, 2004; Fabre *et al.*, 2004). Ovo je prva *in vitro* studija koja je proučavala i uticaj različitog broja i tipova tandemskih ponovaka unutar promotorskog regiona gena za TPMT kod čoveka na njegovu transkripciju.

VNTR genotip

Otkada je otkriveno postojanje tandemskih ponovaka u promotoru gena za TPMT (Spire-Vayron de la Moureyre *et al.*, 1999), nekoliko studija izučavalo je učestalosti određenih VNTR tipova u populaciji. U evropskoj populaciji najučestaliji VNTR aleli u promotoru gena za TPMT su VNTR*4a (55%) i VNTR*5a (34%) (Spire-Vayron de la Moureyre *et al.*, 1998a). Ostala četiri VNTR alela koja su detektovana, od 5 do 8 ponovaka, bila su znatno manje zastupljena. U američkoj beloj populaciji dužina TPMT VNTR regiona bila je između 3 i 9 ponovaka, a najučestaliji aleli VNTR*4 i VNTR*5 (učestalosti 0.54 i 0.36, respektivno) (Yan *et al.*, 2000). Grupa istraživača koja je analizirala učestalosti VNTR alela u populaciji Portugalije pronašla je devet različitih VNTR alela, dužine od 3 do 8 ponovaka. Najučestaliji među njima

Diskusija

su VNTR*4a (44.1%), VNTR*5a (35.3%) i VNTR*6 (9.8%) (Alves *et al.*, 2001). Isti autori su utvrdili da se distribucija VNTR alela u populacijama Portugalije i Mozambika statistički razlikuje (Alves *et al.*, 2002). Britanska studija na VNTR regionu koja je uključivala Azijate koji žive u Britaniji i belce, pokazala je da se učestalosti VNTR alela između ove dve grupe ne razlikuju (Marinaki *et al.*, 2003). Naši rezultati o učestalostima TPMT VNTR alela i genotipova su prvi podaci za jednu populaciju sa Balkana, i u saglasnosti su sa prethodno objavljenim podacima za populacije belaca. U srpskoj populaciji detektovano je 11 različitih tipova TPMT VNTR alela i najučestaliji su: VNTR*4a (54.22%), VNTR*5a (30.02%) i VNTR*6a (7.47%). U grupi ALL pacijenata koju smo analizirali, detektovano je svih 11 tipova tandemskih ponovaka. U kontrolnoj grupi (dobrovoljni davaoci krvi) je detektovano šest VNTR alela, dok je u grupi AML pacijenata detektovano samo četiri različita VNTR alela. Utvrđene su i učestalosti TPMT VNTR genotipova za populaciju Srbije. Najučestaliji VNTR genotipovi su VNTR*4a/VNTR*5a (33.3%), VNTR*4a/VNTR*4a (28.7%) i VNTR*5a/VNTR*5a (9.15%). Učestalosti VNTR alela i genotipova se ne razlikuju između ALL i AML pacijenata kao i kontrolne grupe. Primećuje se ipak da je u ALL grupi bolesnika detektovano svih 11 tipova tandemskih ponovaka. Moguće je da je manja heterogenost VNTR tipova kod AML i kontrolne grupe posledica manjeg broja ispitanika, ali takođe bi mogla biti i posledica poremećene regulacije gena koji regulišu popravke na DNK i tako doprinose nestabilnosti ovog minisatelitskog regiona. Po našim saznanjima, do danas nisu sprovedena istraživanja povezanosti VNTR regiona promotora gena za TPMT i etiologije ALL. Stoga su neophodna dalja istraživanja da bi se ispitala ova hipoteza.

Regulacija transkripcije gena za TPMT: funkcionalna analiza promotorskog regiona

Ranije je pokazano da postoji korelacija između ukupnog broja VNTR ponovaka na oba hromozoma i TPMT enzimske aktivnosti (Spire-Vayron de la Moureyre *et al.*, 1999). Još jedna studija je analizirala ukupan broj VNTR ponovaka na oba hromozoma ne uzimajući u obzir arhitekturu VNTR regiona (Fabre *et al.*, 2004). Fabre i saradnici su zaključili da je više od 11 VNTR ponovaka u promotoru gena za TPMT odgovorno za smanjivanje tiopurinske terapije kod transplantiranih bubrežnih bolesnika.

Diskusija

Studija Spire-Vayron de la Moureyre i saradnika je pokazala da broj tandemskih ponovaka ima modulatorni efekat na transkripciju gena za TPMT *in vitro* (uzimajući u obzir samo broj ponovaka), ali nije nađena korelacija sa aktivnošću TPMT enzima *in vivo* (Spire-Vayron de la Moureyre *et al.*, 1999). Naše istraživanje predstavlja prvu studiju u kojoj se *in vitro* izučava uticaj i tipa i broja tandemskih ponovaka na transkripciju gena za TPMT. U funkcionalnim esejima je korisceno 11 različitih CAT konstrukata koji su se razlikovali i po broju i po tipu tandemskih ponovaka su dali prve podatke o uticaju broja i tipa tandemskih ponovaka na transkripciju gena za TPMT. Pokazali smo da broj tandemskih ponovaka utiče na transkripciju gena za TPMT. VNTR konstrukti su imali različiti broj ponovaka i pokazali različite CAT aktivnosti. Ako bismo posmatrali aktivnosti samo VNTR*a tipova u funkcionalnim esejima, sa izuzetkom VNTR*4a konstrukta, naši rezultati bi bili vrlo slični rezultatima Spire-Vayron i saradnika (Spire-Vayron de la Moureyre *et al.*, 1999). Moguće da su reporterski konstrukti korišćeni u studiji Spire-Vayron de la Moureyre bili isključivo VNTR*a tipa, s obzirom na učestalosti VNTR*a tipova u svim populacijama objavljenim do sada. Međutim, u našoj studiji je i tip VNTR ponovka imao uticaja na transkripciju gena za TPMT, jer je u grupi konstrukata sa istim brojem a različitim tipom ponovaka detektovana različita CAT aktivnost. Najveća razlika u CAT aktivnostima unutar jedne grupe zabeležena je unutar grupe VNTR*4 alela. CAT aktivnost alela VNTR*4a je bila četiri puta manja od aktivnosti VNTR*4b alela. VNTR*4b alel je redak u našoj populaciji, kao i u populacijama za koje su rezultati o učestalostima VNTR alela objavljeni (Alves *et al.*, 2002; Marinaki *et al.*, 2003), i moguće je da je upravo to razlog zbog čega je on bio izvan fokusa istraživanja. Ovaj VNTR alel ima najveću CAT aktivnost među svim VNTR alelima koje smo analizirali. Arhitektura ovog VNTR alela je AB₂C i on ima u sebi BBC kasetu i minimalan broj (jedan) A ponovaka.

Upoređujući CAT aktivnosti konstrukata koji su kao zajednički motiv imali BBC kasetu i rastući broj A ponovka (AB₂C, A₂B₂C, A₃B₂C) uočen je trend opadanja aktivnosti promotora povećanjem broja A ponovaka. Na osnovu toga pretpostavljamo da bi A ponovak mogao imati inhibitornu ulogu u regulaciji transkripcije TPMT gena.

Različit tip ponovaka nije ranije analiziran kao transkripcioni modulator. Alves i saradnici su analizirali A i B ponovke posmatrajući ih kao dva odvojena lokusa. Veći genski diverzitet je

Diskusija

ispoljavao B lokus, pa su pretpostavili da on najviše utiče na ukupnu raznovrsnost VNTR regiona (Alves *et al.*, 2002). Ova grupa istraživača je takođe pretpostavila da konfiguracija ponovaka može igrati važniju ulogu u modulaciji TPMT enzimske aktivnosti od ukupnog broja tandemskih ponovaka. Rezultati ove studije sugerišu da je konfiguracija od tri B ponovka, prisutna u VNTR*6a alelu (A₂B₃C) u jednog pacijenta, izrazitog hipometilatora, udružena sa smanjenom TPMT enzimskom aktivnošću (Alves *et al.*, 2002).

Sve dosadašnje studije su navele da broj VNTR ponovaka ima skroman uticaj na TPMT enzimsku aktivnost (Spire-Vayron de la Moureyre *et al.*, 1999; Arenas *et al.*, 2004; Fabre *et al.*, 2004). Potrebno je istaći da u ovim studijama nije razmatran tip ponovaka, niti je razmatrano postojanje drugih modulatora TPMT aktivnosti (od transkripcije do protein foldinga). Naši rezultati nedvosmisleno pokazuju da pored broja na transkripciju gena za TPMT utiče i tip tandemskih ponovaka.

Promotorski region gena za TPMT lociran 5' od VNTR regiona je transkripcioni aktivator

Naše istraživanje regulacije transkripcije gena za TPMT je prošireno i na promotorske regione izvan regiona VNTR. Da bi se ispitao region uzvodno od tandemskih ponovaka urađena je deleciona analiza promotora gena za TPMT i napravljeni su CAT konstrukti deletanti od A₂B₂C tipa ponovaka, kod kojih je 5' kraj promotorskog regiona bio isljučen iz analize. Rezultati pokazuju da je sama BBC kasetna transkripciono aktivna. Dodatak jednog ili dva A ponovka BBC kaseti dovodio je do jedva detekabilne CAT aktivnosti. Ovo ide u prilog našoj pretpostavci da bi A ponovak mogao da ima inhibitornu ulogu u transkripciji gena za TPMT. Sama BBC kasetna ima pet puta manju transkripcionu aktivnost od promotora sa A₂B₂C tipom tandemskih ponovaka koji se od BBC kasete razlikuje po dodatnih 50 bp na 5' kraju. Ovaj rezultat pokazuje da deletirani 5' region od -180 do -130 sadrži pozitivni regulatorni element za transkripciju gena za TPMT. Studija Fessing i saradnika u kojoj je funkcionalno okarakterisan promotor gena za TPMT izučavala je veliki fragment promotora gena za TPMT (-873 do +262) (Fessing *et al.*, 1998). U to vreme nije bilo definisano postojanje VNTR regiona u promotoru gena za TPMT. Upoređujući naše rezultate sa delecionim analizama iz

Diskusija

ove studije, možemo primetiti da je i u analizi Fessing i saradnika deletirani deo promotora od -184 do -116 ukazivao na prisustvo pozitivnog regulatornog elementa.

Promotor gena za TPMT je aktivan u oba smera

Promotor gena za TPMT sa A₂B₂C tipom tandemskih ponovaka pokazuje transkripcionu aktivnost i u obrnutom smeru i ta aktivnost se statistički ne razlikuje od normalno orijentisanog promotora. Jedno od mogućih tumačenja ovakvog rezultata je da aktivnost detektovana *in vitro* nema značaj u *in vivo* uslovima. Međutim, promotorska aktivnost ovakvog tipa promotora detektovana u *in vitro* uslovima u obrnutoj orijentaciji od prirodne nije neobična. Građa promotora gena za TPMT sa višestrukim GC-bogatim sekvencama koje nisu uvek simetrične, omogućava transkripcionim faktorima koji se za ova mesta vezuju da pokrenu transkripciju i u drugom smeru (Gidoni *et al.*, 1985). Postoje eukariotski promotori koji mogu biti aktivirani u suprotnom smeru u izuzetnim uslovima (Lowndes *et al.*, 1989).

Da li hipermetilatori imaju polimorfizam GCC ponovaka u promotoru gena za TPMT?

Naša prospektivna studija ukazala nam je na dva ALL bolesnika koja ne reaguju na terapiju merkaptopurinima i koje smo prepoznali kao izuzetno jake metilatore (eng. ultra high methylators). U studiji pacijenata obolelih od inflamatorne bolesti creva koji nisu odgovarali na merkaptopurinsku terapiju pokazano je da u promotorskom regionu gena za TPMT imaju 5 odnosno 7 GCC trinukleotidnih ponovaka na mestu -327 do -345 bp od početka starta transkripcije (Roberts *et al.*, 2008). *In vitro* analiza promotorskih konstrukata reporterskog gena koji su imali 5, 6, i 7 GCC ponovaka pokazala je da konstrukti sa 5 i 7 ponovaka imaju veću promotorsku aktivnost od onih sa 6 ponovaka. Iz ove studije se može zaključiti da bi za povećanu ekspresiju gena za TPMT mogli biti odgovorni broj trinukleotidnih GCC ponovaka različit od šest. Povećana ekspresija gena za TPMT znači da je nivo TPMT proteina u ćeliji visok i izuzetno visoka TPMT enzimska aktivnost mogla bi biti ovako objašnjena. Stoga smo kod naša dva ALL bolesnika koji nisu imali nikakav terapijski efekat primenom merkaptopurinske terapije kao i kod još dva ALL pacijenta koja su

Diskusija

normalno odgovarala na terapiju analizirali broj GCC ponovaka u okviru promotorskog regiona gena za TPMT. U sva četiri analizirana bolesnika broj GCC ponovaka bio je šest. Moguće je da ovi ponovci nisu odgovorni za povećanu ekspresiju gena za TPMT. Takođe je moguće da postoji još neki neotkriveni polimorfizam u okviru promotorskog regiona gena za TPMT koji doprinosi povećanoj ekspresiji ovog gena. Analiza na većem broju ispitanika bi utvrdila da li postoji veza između povećanog/smanjenog broja GCC ponovaka u promotorskom regionu gena za TPMT i povećane ekspresije ovog proteina odgovorne za njegovu povećanu aktivnost.

Interakcija transkripcionih faktora sa promotorskim regulatornim elementima gena za TPMT

Promotor gena za TPMT spada u TATA-less eukariotske promotore koji obuhvataju više od 80% eukariotskih promotora koji kodiraju proteine (Bajic *et al.*, 2004). Analiza interakcije transkripcionih faktora za VNTR region do sada je uglavnom rađena *in silico*, kompjuterskom predikcijom vezivnih mesta (Krynetski *et al.*, 1997i, Fessing *et al.*, 1998). Tako su identifikovana potencijalna vezivna mesta za transkripcione faktore Egr-1, NF-kB, AP-2 i MED-1. Jedini indirektni dokaz da je u regulaciju transkripcije gena za TPMT uključen Sp1 transkripcioni faktor pružio je rad Fessing i saradnika (Fessing *et al.*, 1998). Kotransfekcija TPMT promotor-luciferaznog konstrukta i vektora koji eksprimira Sp1 u *Drosophila* Schneider SL2 ćelije (model sistem za izučavanje ekspresije Sp1 faktora jer one same ne ekspimiraju Sp1) pokazala je da Sp1 transkripcioni faktor snažno aktivira promotor gena za TPMT.

U ovom istraživanju je po prvi put pokazano da se za VNTR region promotora gena za TPMT direktno vezuju transkripcioni faktori Sp1 i Sp3. VNTR region je veoma GC-bogat i zaista ne iznenađuje što se članovi familije Sp/KLF vezuju za njega. Transkripcioni faktori Sp1 i Sp3 su 90% homologni u sekvenci DNK-vezujućeg domena i oni se i vezuju za srodne DNK-elemente. Ipak, njihove DNK vezujuće osobine i regulatorne funkcije se razlikuju i zavise od samog promotora za koji se vezuju kao i ćelijskog konteksta (Li *et al.*, 2004). U kompeticionim EMSA esejima uvek je dolazilo da hladjenja svih kompleksa u reakciji sa oligonukleotidnom probom koja obuhvata konsenzusno mesto za vezivanje Sp1 faktora.

Diskusija

Superšift esej je pokazao da se antitela na Sp1 i Sp3 direktno vezuju za VNTR region promotora gena za TPMT. Transkripcioni faktori Sp1 i Sp3 obično imaju sasvim suprotne regulatorne funkcije, Sp1 je najčešće transkripcioni aktivator a Sp3 ima represornu ulogu (Hagen *et al.*, 1994). Takođe, promotor gena za TPMT je TATA-less, i poznato je da transkripcija sa ovakvog promotora može biti vođena i u odsustvu TATA i CAAT sekvenci. Transkripciju zavisnu od RNK polimeraze II mogu pokrenuti faktori iz Sp/KLF familije transkripcionih faktora (Ping *et al.*, 2007). Za promotore koji sadrže multipna Sp-vezujuća mesta, pokazano je da Sp1 faktori mogu sinergistički pomoću direktnih protein-protein interakcija da aktiviraju transkripciju gena (Mastrangelo *et al.*, 1991; Su *et al.*, 1991). Takođe je pokazano da Sp3 faktori ne mogu sinergistički da transkripciono aktiviraju promotore koji sadrže multipna Sp-vezujuća mesta (Yu *et al.*, 2003). Nekoliko studija je pokazalo da Sp3 efikasno represuje Sp1-zavisnu transkripciju sa promotora koji sadrže multipna Sp1-vezujuća mesta. U ovom slučaju, Sp3 kompetira sa Sp1, vezujući GC-blokove i tako blokirajući sinergističku aktivaciju Sp1 faktora (Dennig *et al.*, 1996; Majello *et al.*, 1997; Yu *et al.*, 2003). Takođe, u nekim slučajevima, Sp3 faktor može da bude i jači aktivator transkripcije od Sp1 faktora (Sowa *et al.*, 1999; Gartel *et al.*, 2000). U našem istraživanju nismo utvrđivali da li transkripcioni faktori Sp1 i Sp3 imaju aktivacionu ili represivnu ulogu u regulaciji transkripcije promotora gena za TPMT.

Diskusija

Kako konformaciona arhitektura VNTR regiona u promotoru utiče na regulaciju transkripcije gena za TPMT?

Kompjuterska predikacija vezivnih mesta unutar VNTR regiona promotora gena za TPMT programom MathInspector, pored Sp1 i drugih faktora koji vezuju GC-bogate sekvence, otkrila je potencijalna vezivna mesta za proteine koji učestvuju u transkripciji zavisnoj od RNK polimeraze II. RNK polimeraza TFIIIB i aktivator/medijator/TBP-zavisni element za transkripciju sa TATA-less promotora zavisnu od RNK polimeraze II imaju potencijalna vezivna mesta u A ponovku, a TFIIIB vezivna mesta u ponovcima B i C. Ovi faktori, kao učesnici kompleksa TFIID, uključeni su u pravilno pozicioniranje transkripcione mašinerije na TATA-less promotorima (Bo-Shiun *et al.*, 2002). Kooperativna interakcija između aktivatora vezanog za uzvodnu aktivatorsku sekvencu UAS (eng. upstream activation sequence) i kompleksa TFIID je obično neophodna za otpčinjanje transkripcije kod TATA-less promotora kod transkripcije posredovane TFIID kompleksom (Li *et al.*, 2002; Mencía *et al.*, 2002; Baek *et al.*, 2002). U promotoru gena za TPMT od -180 do -130, pronašli smo pozitivni regulatorni element. Baš u tom regionu MathInspector *in silico* predikcija pokazala je prisustvo potencijalnog vezivnog mesta aktivatorskog faktora kod RNK-zavisne transkripcije sa TATA-less promotora. Ova sekvenca bi mogla imati ulogu UAS. Udruženi aktivatorski faktor vezan za UAS i faktori učesnici TFIID kompleksa vezani za A i C ponovke, mogli bi da vode punu TPMT transkripciju. Različita konformaciona arhitektura VNTR regiona ima za posledicu različit prostorni odnos prvog A i C ponovka, i tako utiče na efikasno pozicioniranje RNK polimeraznog kompleksa za početak transkripcije a samim time i na efikasnost RNK polimeraze II.

Naša hipoteza je da je uzvodni regulatorni element najverovatnije odgovoran za konstantnu aktivaciju transkripcije, dok je prostorni odnos između prvog A i C ponovaka (broj A i B ponovaka) i konfiguracija celog VNTR regiona bitna za fine razlike u TPMT transkripciji.

Ponovci A i B se razlikuju u četiri/tri nukleotida sa 5' kraja, i to A ponovak ima GAAA na 5' kraju, dok B ponovak ima GCG nukleotide. VNTR*4b arhitektura tandemskih ponovaka (AB₂C) verovatno ima najpovoljniju prostornu DNK organizaciju za najefikasniju transkripciju gena za TPMT. Promena jednog od B ponovaka u A ponovak, kao kod VNTR*4a (A₂BC) dodaje jedan nukleotid i menja GC sastav i milje za koji se vezuju transkripcioni faktori.

Diskusija

Naša hipoteza o ključnoj ulozi prostorne organizacije VNTR regiona u transkripciji može da ukaže na razlog zbog kojeg nismo mogli da utvrdimo linearnu zavisnost između broja i tipa tandemskih ponovaka i CAT aktivnosti u našim funkcionalnim esejima sa 11 različitih VNTR CAT konstukata.

METILACIJA KAO MEHANIZAM TRANSKRIPCIONE REGULACIJE PROMOTORA GENA ZA TPMT

Kao veoma GC-bogat region, promotor gena za TPMT mogao bi biti regulisan metilacijom citozina u CpG ostrvcima, mehanizmom koji je pokazan da ima uticaja na transkripciju mnogih gena. Hipermetilacija promotorskih regiona gena može da ima za posledicu aktivaciju onkogena ili supersiju tumor supresujućih gena (Baylin 2006). Hipermetilacija uglavnom utiče na utišavanje promotora i smanjuje gensku transkripciju (Jiang *et al.*, 2008). Smanjenje transkripcije gena za TPMT dovelo bi do manje količine sintetisanog TPMT proteina i doprinelo bi hipometilacionom TPMT fenotipu. Preliminarna studija metilacionog statusa VNTR regiona promotora gena za TPMT pokazala je da metilacija najverovatnije nije mehanizam preko kojeg ovaj regulatorni region doprinosi transkripcionoj regulaciji gena za TPMT.

UTICAJ 6-MP NA TRANSKRIPCIJU GENA ZA TPMT

Nekoliko studija proučavalo je nivo aktivnosti TPMT enzima i citotoksičnost 6-MP *in vitro*. One su pokazale da su ćelije sa nižom TPMT aktivnošću bolje preživljavaju tretman određenom 6-MP dozom, od onih sa srednjom ili visokom TPMT aktivnošću (Van *et al.*, 1987; Dervieux *et al.*, 2001; Coulthard *et al.*, 2002). Uloga promotora gena za TPMT u kliničkom kontekstu je još uvek kontroverzna i nije potvrđeno da li polimorfizmi u promotoru ovog gena doprinose toleranciji na 6-MP (Arenas *et al.*, 2004; Fabre *et al.*, 2004).

Rezultati našeg istraživanja su pokazali da lek 6-MP može da moduliše nivo transkripcije gena za TPMT preko promenljivog broja tandemskih ponovaka.

Diskusija

U eksperimentima su korišćene fiziološke doze leka ($10 \mu\text{M}$) koje se koriste u terapiji, kao i višestruko veće doze (od $500 \mu\text{M}$). Promotor gena za TPMT sa VNTR*4 tipom ponovaka pokazao je specifičan odgovor na tretman ćelija 6-MPom, ali je on varirao u zavisnosti od tipa ponovaka u VNTR regionu. Doza od $10 \mu\text{M}$ 6-MP uticala je na smanjenje transkripcije gena za TPMT kod promotora sa VNTR*4a i VNTR*4b tipom ponovaka. Kod VNTR*4a tipa CAT aktivnost se u K562 ćelijama tretiranim $10 \mu\text{M}$ 6-MPom smanjila za 50% u odnosu na netretirane ćelije, dok se CAT aktivnost kod VNTR*4b tipa u odnosu na netretirane K562 ćelije smanjila za 40%. Ovaj nalaz ukazuje da 6-MP utiče na transkripciju gena za TPMT u zavisnosti od tipa VNTR ponovaka.

Veća doza od $500 \mu\text{M}$ 6-MP imala je uticaja na opštu gensku transkripciju. CAT aktivnosti oba VNTR konstrukta kao i kontrolnog plazmida kod K562 ćelija tretiranih $500 \mu\text{M}$ 6MP-om bila je za 75% manja nego kod netretiranih ćelija.

K562 ćelijska linija je eritroidno-leukemijska humana ćelijska linija i kao takva predstavlja dobar model sistem za proučavanje promotora gena za TPMT. K562 ćelije eksprimiraju TPMT gen i koliko nam je poznato, nemaju nijedan polimorfizam u kodirajućem regionu gena za TPMT. U našem model sistemu, K562 ćelijskoj liniji, prisutan je VNTR*4a/VNTR*5a genotip. Ovaj genotip je najčešći u našoj populaciji (33.3%). Pacijenti sa ovim genotipom imaju najveću TPMT enzimsku aktivnost kako je pokazano korelacijama fenotip-genotip (Yan *et al.*, 2000). Zato se u našem model sistemu eksprimira visok nivo TPMT enzima i ove ćelije su u testu vijabilnosti iskazale značajne razlike pri delovanju različitih doza 6-MP.

Naši eksperimenti pokazuju da dejstvo 6-MP na aktivnost enzima delimično može biti objašnjeno njegovim delovanjem na transkripcionom nivou.

Štaviše, EMSA eksperimenti sa VNTR probom BBC i jedarnim ekstraktima iz K562 ćelija prethodno tretiranih $500 \mu\text{M}$ 6-MP pokazali su jedinstven kompleks na gelu. Ovaj podatak, takođe ide u prilog našoj hipotezi da 6-MP utiče na transkripciju gena za TPMT preko VNTR regiona promotora.

Takodje smo pokazali da transkripcioni faktori Sp3 i KLF1 učestvuju u regulaciji transkripcije gena za TPMT kada je ćelija izložena dejstvu merkaptopurina. Transkripcioni faktor Sp3

Diskusija

učestvuje i u bazalnoj transkripciji gena za TPMT, dok se KLF1 transkripcioni faktor u eritoridnim ćelijama pod dejstvom metkaptopurinskih lekova aktivira.

Tačan mehanizam preko kojeg 6-MP utiče na promotor gena za TPMT nije poznat. Poznato je da 6-MP metaboliti mogu da inhibiraju *de novo* sintezu purinskih nukleotida i da se ugrađuju u DNK i RNK kao toksični tioguaninski nukleotidi (Bertino 1991; Dervieux *et al.*, 2001). Pokazano je takođe da 6-MP i njegovi metaboliti mogu da svoje dejstvo ispoljavaju i u jedru ćelije i da efikasno aktiviraju nuklearne receptore "siročiće" NOR-1, Nurr1 i Nur77, članove podgrupe NR4A nuklearnih receptora (Wansa *et al.*, 2003; Ordentlich *et al.*, 2003; Pires *et al.*, 2007). Ova grupa NR4A receptora je uključena u procese proliferacije ćelija, diferencijacije, apoptozu T-ćelija, hondrosarkome, neurološke poremećaje, zapaljenske procese i arterogenezu. 6-MP moduliše aktivnost koaktivatora ovih receptora TRAP220 i to na dozno-zavistan način, i tako utiče na aktivaciju NR4A podgrupe nuklearnih receptora (Wansa *et al.*, 2005). Pokazano je takođe da metaboliti merkaptopurina mogu specifično i efikasno da inhibiraju protein kinazu N, uključenu u signalni put rasta nerava (Volonte *et al.*, 1992).

Mi smo pokazali da lek 6-MP ima uticaja na transkripciju gena za TPMT, i tako može biti potencijalni modulator aktivnosti TPMT enzima kod bolesnika koji su pod terapijom merkaptopurinskim lekovima. Mišljenja smo da bi i ovaj podatak trebalo uzeti u razmatranje pri određivanju terapijskih protokola u terapiji merkaptopurinskim lekovima.

DA LI JE VNTR REGION PROMOTORA GENA ZA TPMT – NOVI FARMAKOGENETIČKI MARKER?

Rezultati naših funkcionalnih eseja sa CAT konstruktima koji sadrže 11 tipova tandemskih ponovaka pokazali su da četiri VNTR alela, VNTR*4a, VNTR*6b, VNTR*6c i VNTR*7a, imaju nisku aktivnost promotora i mogu se uvrstiti u grupu hipometilatora. Ukupna učestalost ovih alela u našoj populaciji iznosi oko 59%. Međutim, VNTR genotipovi, kombinacije ova četiri VNTR alela, koji mogu da doprinesu hipometilacionom TPMT fenotipu, obuhvataju jednu trećinu naše populacije, 33%.

Diskusija

Na osnovu rezultata o aktivnosti različitih tandemskih ponovaka u *in vitro* uslovima, i rezultata populacione studije o zastupljenosti pojedinih VNTR alela u našoj populaciji, uočava se da su kod trećine osoba u našoj populaciji prisutni VNTR genotipovi koji mogu da doprinesu hipometilacionom fenotipu. Naše istraživanje je početni korak u proceni farmakogenetičkog potencijala VNTR regiona i rezultati ukazuju da bi VNTR genotip u našoj populaciji zaista mogao biti kandidat za farmakogenetički marker. Pre nego što se VNTR genotip, kao farmakogenetički marker primeni u individualizaciji terapije, neophodno je sprovesti dodatne kliničke studije. Ove kliničke studije bi procenile nezavisni doprinos VNTR genotipa aktivnosti TPMT enzima, kao i uočeni modulatorski efekat merkaptopurinskih lekova preko VNTR regiona promotora gena za TPMT kod bolesnika.

Ukoliko se potvrdi da određeni VNTR alel u promotorskom regionu gena za TPMT samostalno modulise aktivnost TPMT enzima, populacione studije bi pokazale da li je on i farmakogenetički marker u pojedinim populacijama.

ZAKLJUČCI

Zaključci

1. Genotipizacija najčešćih polimorfizama u genu za TPMT je opravdana i osnova je za modifikaciju terapije u lečenju akutne limfoblastne leukemije kod dece. Terapeutski protokol je neophodno modifikovati i kod heterozigotnih nosilaca mutacija u genu za TPMT.
2. U VNTR regionu promotora gena za TPMT detektovano je ukupno 11 različitih VNTR alela u srpskoj populaciji. Detektovani VNTR aleli su sadržali od 4 do 8 ponovaka. Najčešća dva VNTR alela u našoj populaciji su VNTR*4a (zastupljen sa 54.22%) i VNTR*5a (zastupljen sa 30.02%). Ostali VNTR aleli su manje zastupljeni.
3. Detektovano je 17 različitih TPMT VNTR genotipova u našoj populaciji. Najveću učestalost imali su genotipovi VNTR*4a/VNTR*5a (33.3%), VNTR*4a/VNTR*4a (28.7%), VNTR*5a/VNTR*5a (9.15%), VNTR*4a/VNTR6a (8.50%) i VNTR*5a/VNTR6a (5.88%). Ostali VNTR genotipovi su bili manje zastupljeni.
4. Broj tandemskih ponovaka u VNTR regionu gena za TPMT utiče na nivo transkripcije gena za TPMT. Najveća aktivnost uočena je kod promotora gena za TPMT sa četiri ponovka (VNTR*4b) i postepeno opada kod promotora sa 5, 6 i 7 ponovaka. Aktivnost promotora sa 8 VNTR ponovaka je povećana u odnosu na promotore sa 7 ponovaka.
5. Različita konfiguracija, odnosno tip ponovaka unutar istog broja VNTR, takođe utiče na nivo transkripcije. Najveća razlika u aktivnosti promotora uočena je u grupi VNTR*4 alela. Aktivnost promotora sa VNTR*4b tipom ponovaka je četiri puta veća od aktivnosti promotora sa VNTR*4a tipom.
6. Promotorski region gena za TPMT lociran 5' od VNTR regiona, od -180 do -130 od početka starta transkripcije, je transkripcioni aktivator.
7. Transkripcioni faktori Sp1 i Sp3 se direktno i istovremeno vezuju za VNTR region promotora gena za TPMT.
8. Naša rezultati ukazuju da metilacija nije mehanizam uključen u transkripcionu regulaciju gena za TPMT.
9. Pozitivni regulatorni element lociran 5' od VNTR regiona je odgovoran za konstitutivnu aktivaciju transkripcije, dok konformaciona arhitektura VNTR ponovka (broj i tip ponovaka) utiče na fine razlike u TPMT transkripciji. VNTR*4b arhitektura tandemskih ponovaka (AB₂C) ima najpovoljniju konformacionu arhitekturu za efikasnu transkripciju gena za TPMT.

Zaključci

10. Naša studija je pokazala da su kod trećine osoba u našoj populaciji prisutni VNTR genotipovi koji doprinose hipometilacionom TPMT fenotipu. Zbog toga bi u našoj populaciji VNTR genotip mogao biti kandidat za farmakogenetički marker.
11. Lek 6-MP utiče na transkripciju gena za TPMT preko transkripcionih faktora Sp3 i KLF1.

LITERATURA

Literatura

Alves S, Amorim A, Ferreira F, Prata MJ. Influence of the variable number of tandem repeats located in the promoter region of the thiopurine methyltransferase gene on enzymatic activity. *Clin Pharmacol Ther.* 2001 Aug;70(2):165-74.

Alves S, Amorim A, Prata MJ. Evolution of a VNTR located within the promoter region of the thiopurine methyltransferase gene: inferences from population and sequence data. *Hum Genet.* 2002 Aug;111(2):172-8.

Alves S, Ferreira F, Prata MJ, Amorim A. Characterization of three new VNTR alleles in the promoter region of the TPMT gene. *Hum Mutat.* 2000 Jan;15(1):121

Alves S, Prata MJ, Ferreira F, Amorim A. Thiopurine methyltransferase pharmacogenetics: alternative molecular diagnosis and preliminary data from northern Portugal. *Pharmacogenetics.* 1999;(9):257-261.

Alves S, Rocha J, Amorim A, Prata MJ. Tracing the origin of the most common thiopurine methyltransferase (TPMT) variants: preliminary data from the patterns of haplotypic association with two CA repeats. *Ann Hum Genet.* 2004 Jul;68(Pt 4):313-23.

Alving AS, Carson PE, Flangan CL, Ickes CE. Enzymatic deficiency in primaquine-sensitive erythrocytes. *Science.* 1956 Sep 14;124(3220):484-5.

Ames MM, Selassie CD, Woodson LC, Van Loon JA, Hansch C and Weinshilboum RM. Thiopurine methyltransferase: Structure-activity relationships for benzoic acid inhibitors and thiophenol substrates. *J Med Chem.* 1986;29:354–358.

Ameyaw MM, Collie-Duguid ES, Powrie RH, Ofori-Adjei D, McLeod HL. Thiopurine methyltransferase alleles in British and Ghanaian populations. *Hum Mol Genet.* 1999 Feb;8(2):367-70.

Anstey A, Lennard L, Mayou SC and Kirby JD. Pancytopenia related to azathioprine—an enzyme deficiency caused by a common genetic polymorphism: A review. *J Royal Soc Med.* 1992;85:752–756.

Arenas M, Duley JA, Ansari A, Shobowale-Bakre EA, Fairbanks L, Soon SY, Sanderson J, Marinaki AM. Genetic determinants of the pre- and post-azathioprine therapy thiopurine methyltransferase activity phenotype. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* 2004 Oct;23(8-9):1403-5.

Ari ZB, Mehta A, Lennard L and Burroughs AK. Azathioprine-induced myelosuppression due to thiopurine methyltransferase deficiency in a patient with autoimmune hepatitis. *J Hepatol.* 1995;23:351–354.

Baek HJ, Malik S, Qin J, Roeder RG. Requirement of TRAP/mediator for both activator-independent and activator-dependent transcription in conjunction with TFIID-associated TAF(II)s. *Mol Cell Biol.* 2002 Apr;22(8):2842-52.

Literatura

Bajic VB, Tan SL, Christoffels A, Schönbach C, Lipovich L, Yang L, Hofmann O, Kruger A, Hide W, Kai C, Kawai J, Hume DA, Carninci P, Hayashizaki Y. Mice and men: their promoter properties. *PLoS Genet*. 2006 Apr;2(4):e54.

Barnes WM. Plasmid detection and sizing in single colony lysates. *Science*. 1977 Jan 28;195(4276):393-4.

Baylin SB, Ohm JE. Epigenetic gene silencing in cancer—a mechanism for early oncogenic pathway addiction? *Nat Rev Cancer*. 2006; 6:107-16.

Bennett PM. The spread of drug resistance. In: Baumberg S, Young JPW, Wellington EMH, Saunders JR, eds. *Population Genetics of Bacteria*. Cambridge: Cambridge University Press, 1995;317–344.

Bertino JR. Improving the curability of acute leukemia: Pharmacologic approaches. *Seminars in Hematology*. 1991;28(3): 9–11.

Bhalla KN. Epigenetic and chromatin modifiers as targeted therapy of hematologic malignancies. *J Clin Oncol*. 2005;23:3971–93.

Birnbaum MJ, van Wijnen AJ, Odgren PR, Last TJ, Suske G, Stein GS, Stein JL. Sp1 trans-activation of cell cycle regulated promoters is selectively repressed by Sp3. *Biochemistry*. 1995 Dec 19;34(50):16503-8.

Black AR, Jensen D, Lin SY, Azizkhan JC. Growth/cell cycle regulation of Sp1 phosphorylation. *J Biol Chem*. 1999 Jan 15;274(3):1207-15.

Black AJ, McLeod HL, Capell HA, Powrie RH, Matowe LK, Pritchard SC, Collie-Duguid ES, Reid DM. Thiopurine methyltransferase genotype predicts therapy-limiting severe toxicity from azathioprine. *Ann Intern Med*. 1998 Nov 1;129(9):716-8.

Bodell WJ. Molecular dosimetry of sister chromatid exchange induction in 9L cells treated with 6-thioguanine. *Mutagenesis*. 1991;6(3): 175–177.

Bökkerink JP, Stet EH, De Abreu RA, Damen FJ, Hulscher TW, Bakker MA, van Baal JA. 6-Mercaptopurine: cytotoxicity and biochemical pharmacology in human malignant T-lymphoblasts. *Biochem Pharmacol*. 1993 Apr 6;45(7):1455-63.

Bonicke R, Lisboa BP. Über die Erbedingtheit der intraindividuellen Konstanz der Isoniazidausscheidung beim Menschen. *Naturwissenschaften*. 1957; 44:314.

Boshart M, Klüppel M, Schmidt A, Schütz G, Luckow B. Reporter constructs with low background activity utilizing the cat gene. *Gene*. 1992;110: 129-130.

Bo-Shiun Chen, Michael Hampsey. Transcription Activation: Unveiling the Essential Nature of TFIID. *Current Biology*. 2002 Sep 17; 12, R620–R622.

Literatura

Bouwman P, Göllner H, Elsässer HP, Eckhoff G, Karis A, Grosveld F, Philipsen S, Suske G. Transcription factor Sp3 is essential for post-natal survival and late tooth development. *EMBO J*. 2000 Feb 15;19(4):655-61.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976 May 7;72:248-54.

Brenner C, Fuks F. DNA methyltransferases: facts, clues, mysteries. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2006;301:45–66.

Brown DD, Wang Z, Furlow JD, Kanamori A, Schwartzman RA, Remo BF, Pinder A. The thyroid hormone-induced tail resorption program during *Xenopus laevis* metamorphosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996; Mar 5;93(5):1924-9.

Brox LW, Birkett L, Belch A: Clinical pharmacology of oral thioguanine in acute myelogenous leukemia. *Cancer Chemotherapy & Pharmacology*. 1981;6(1): 35–38.

Budowle B. DNA typing protocols: Molecular biology and forensic analysis. Natick: Eaton Publishing. 2000; p117-8.

Burchenal JH, Murphy ML, Ellison RR. Clinical evaluation of a new antimetabolite, 6-mercaptopurine, in the treatment of acute leukaemia and allied diseases. *Blood*. 1953; 8: 965–999.

Buryanov YI, Shevchuk TV. DNA methyltransferases and structural–functional specificity of eukaryotic DNA modification. *Biochemistry (Mosc)*. 2005;70:730–42.

Carninci P, Sandelin A, Lenhard B, Katayama S, Shimokawa K, Ponjavic J, Semple CA, Taylor MS, Engström PG, Frith MC, Forrest AR, Alkema WB, Tan SL, Plessy C, Kodzius R, Ravasi T, Kasukawa T, Fukuda S, Kanamori-Katayama M, Kitazume Y, Kawaji H, Kai C, Nakamura M, Konno H, Nakano K, Mottagui-Tabar S, Arner P, Chesi A, Gustincich S, Persichetti F, Suzuki H, Grimmond SM, Wells CA, Orlando V, Wahlestedt C, Liu ET, Harbers M, Kawai J, Bajic VB, Hume DA, Hayashizaki Y. Genome-wide analysis of mammalian promoter architecture and evolution. *Nat Genet*. 2006;38: 626–635.

Cartharius K, Frech K, Grote K, Klocke B, Haltmeier M, Klingenhoff A, Frisch M, Bayerlein M, Werner T. MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics*. 2005;21: 2933-42.

Cascorbi I. Pharmacogenetics of cytochrome p4502D6: genetic background and clinical implication. *Eur J Clin Invest*. 2003;13(suppl 2):17–22.

Castro R, Rivera I, Martins C, Struys EA, Jansen EE, Clode N, Graça LM, Blom HJ, Jakobs C, de Almeida IT. Intracellular S-adenosylhomocysteine increased levels are associated with DNA hypomethylation in HUVEC. *J Mol Med*. 2005; 83:831–6.

Literatura

Chan GL, Erdmann GR, Gruber SA, Matas AJ, Canafax DM. Azathioprine metabolism: Pharmacokinetics of 6-mercaptopurine, 6-thiouric acid and 6-thioguanine nucleotides in renal transplant patients. *J Clin Pharmacol.* 1990; 30(4): 358–363.

Chiang PK, Gordon RK, Tal J, Zeng GC, Doctor BP, Pardhasaradhi K. S-adenosylmethionine and methylation. *FASEB J.* 1996; 10:471-80.

Chiang CM, Roeder RG. Cloning of an intrinsic human TFIID subunit that interacts with multiple transcriptional activators. *Science.* 1995 Jan 27; 267(5197):531-6.

Chodosh LA, Baldwin AS, Carthew RW, Sharp PA. Human CCAAT-binding proteins have heterologues subunits. *Cell.* 1988;53:11-24.

Christie NT, Drake S, Meyn RE, Nelson JA. 6-Thioguanine induced DNA damage as a determinant of cytotoxicity in cultured chinese hamster ovary cells. *Cancer Research.* 1984; 44(9): 3665–3671.

Cohen SN, Chang AC, Hsu L. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1972 Aug;69(8):2110-4.

Collie-Duguid ES, Pritchard SC, Powrie RH, Sludden J, Collier DA, Li T, McLeod HL. The frequency and distribution of thiopurine methyltransferase alleles in Caucasian and Asian populations. *Pharmacogenetics.* 1999 Feb;9(1):37-42.

Colombel JF, Ferrari N, Debuysere H, Marteau P, Gendre JP, Bonaz B, Soulé JC, Modigliani R, Touze Y, Catala P, Libersa C, Broly F. Genotypic analysis of thiopurine S-methyltransferase in patients with Crohn's disease and severe myelosuppression during azathioprine therapy. *Gastroenterology.* 2000 Jun;118(6):1025-30.

Coulthard SA, Hogarth LA, Little M, Matheson EC, Redfern CP, Minto L, Hall AG: The effect of thiopurine methyltransferase expression on sensitivity to thiopurine drugs. *Mol Pharmacol.* 2002 ; 62(1): 102–109.

Coulthard S, Hogarth L. The thiopurines: an update. *Invest New Drugs.* 2005 Dec;23(6):523-32.

Coulthard SA, Howell C, Robson J, Hall AG. The relationship between thiopurine methyltransferase activity and genotype in blasts from patients with acute leukemia. *Blood.* 1998 Oct 15;92(8):2856-62.

Courey AJ, Tjian R. Analysis of Sp1 in vivo reveals multiple transcriptional domains, including a novel glutamine-rich activation motif. *Cell.* 1988 Dec 2;55(5):887-98.

Dahl ML, Johansson I, Bertilsson L, Ingelman-Sundberg M, Sjoqvist F. Ultrarapid hydroxylation of debrisoquine in a Swedish population. Analysis of the molecular genetic basis. *J Pharmacol Exp Ther.* 1995; 274:516–520.

Literatura

Datta PK, Raychaudhuri P, Bagchi S. Association of p107 with Sp1: genetically separable regions of p107 are involved in regulation of E2F- and Sp1-dependent transcription. *Mol Cell Biol*. 1995 Oct;15(10):5444-52.

Dennig J, Beato M, Suske G. An inhibitor domain in Sp3 regulates its glutamine-rich activation domains. *EMBO J*. 1996 Oct 15;15(20):5659-67.

Dervieux T, Blanco JG, Krynetski EY, Vanin EF, Roussel MF, Relling MV. Differing contribution of thiopurine methyltransferase to mercaptopurine versus thioguanine effects in human leukemic cells. *Cancer Research*. 2001; 61(15): 5810–5816.

Ding TL, Benet LZ. Comparative bioavailability and pharmacokinetic studies of azathioprine and 6-mercaptopurine in the rhesus monkey. *Drug Metab Dispos*. 1979; 7(6): 373–377.

Dokmanovic L, Urosevic J, Janic D, Jovanovic N, Petrucev B, Tosic N, Pavlovic S. Analysis of thiopurine S-methyltransferase polymorphism in the population of Serbia and Montenegro and mercaptopurine therapy tolerance in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Ther Drug Monit*. 2006 Dec;28(6):800-6.

Dokmanović L, Janić D, Krstovski N, Zukić B, Tosić N, Pavlović S. Importance of genotyping of thiopurine S-methyltransferase in children with acute lymphoblastic leukaemia during maintenance therapy *Srp Arh Celok Lek*. 2008 Nov-Dec;136(11-12):609-16.

Dynan WS, Tjian R. The promoter-specific transcription factor Sp1 binds to upstream sequences in the SV40 early promoter. *Cell*. 1983 Nov;35(1):79-87.

Eichelbaum M. Ein neuentdeckter Defekt im Arzneimittel-stoffwechsel des Menschen: Die fehlende N-Oxidation des Spartein. Bonn: Medizinische Fakultät Rheinischen Friedrich Wilhelms-Universität, 1975.

Elion GB: Symposium on immunosuppressive drugs. Biochemistry and pharmacology of purine analogues. *Federation Proceedings* 1967; 26(3): 898–904.

Emili A, Greenblatt J, Ingles CJ. Species-specific interaction of the glutamine-rich activation domains of Sp1 with the TATA box-binding protein. *Mol Cell Biol*. 1994 Mar;14(3):1582-93.

Engen RM, Marsh S, Van Booven DJ, McLeod HL. Ethnic differences in pharmacogenetically relevant genes. *Curr Drug Targets*. 2006 Dec;7(12):1641-8.

Erb N, Harms DO, Janka-Schaub G. Pharmacokinetics and metabolism of thiopurines in children with acute lymphoblastic leukemia receiving 6-thioguanine versus 6-mercaptopurine. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1998;42(4):266-72.

Escousse A, Mousson C, Santona L, Zanetta G, Mounier J, Tanter Y, Duperray F, Rife G, Chevet D. Azathioprine-induced pancytopenia in homozygous thiopurine methyltransferase-deficient renal transplant recipients: A family study. *Transplant Proc*. 1995; 27:1739–1742.

Evans DA. N-acetyltransferase *Pharmacol Ther*. 1989;42(2):157-234.

Literatura

Evans WE, Hon YY, Bomgaars L, Coutre S, Holdsworth M, Janco R, Kalwinsky D, Keller F, Khatib Z, Margolin J, Murray J, Quinn J, Ravindranath Y, Ritchey K, Roberts W, Rogers ZR, Schiff D, Steuber C, Tucci F, Kornegay N, Krynetski EY, Relling MV. Preponderance of thiopurine S-methyltransferase deficiency and heterozygosity among patients intolerant to mercaptopurine or azathioprine. *J Clin Oncol.* 2001 Apr 15;19(8):2293-301.

Evans WE, Horner M, Chu YQ, Kalwinsky D, Roberts WM. Altered mercaptopurine metabolism, toxic effects and dosage requirement in a thiopurine methyltransferase-deficient child with acute lymphoblastic leukemia. *J Pediatr.* 1991; 119:985–989.

Fabre MA, Jones DC, Bunce M, Morris PJ, Friend PJ, Welsh KI, Marshall SE. The impact of thiopurine S-methyltransferase polymorphisms on azathioprine dose 1 year after renal transplantation. *Transpl Int.* 2004 Oct;17(9):531-9.

Fautsch MP, Vrabel A, Subramaniam M, Hefferen TE, Spelsberg TC, Wieben ED. TGF β -inducible early gene (TIEG) also codes for early growth response alpha (EGR α): evidence of multiple transcripts from alternate promoters. *Genomics.* 1998; 51, 408–416.

Feng WC, Southwood CM, Bieker JJ. Analyses of β -thalassemia mutant DNA interactions with erythroid Krüppel-like factor (EKLF), an erythroid cell-specific transcription factor. *J. Biol.Chem.* 1994; 269, 1493–1500.

Fessing MY, Krynetski EY, Zambetti GP, Evans WE. Functional characterization of the human thiopurine S-methyltransferase (TPMT) gene promoter. *Eur J Biochem.* 1998 Sep 15;256(3):510-7.

FitzGerald PC, Shlyakhtenko A, Mir AA, Vinson C. Clustering of DNA sequences in human promoters. *Genome Res.* 2004; 14: 1562–1574.

Fried MG, Crothers DM. Equilibria and kinetics of lac repressor-operator interactions by polyacrilamide gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res.* 1981; 9: 6505 - 6521.

Garat A, Cauffiez C, Renault N, Lo-Guidice JM, Allorge D, Chevalier D, Houdret N, Chavatte P, Lorient MA, Gala JL, Broly F. Characterisation of novel defective thiopurine S-methyltransferase allelic variants. *Biochem Pharmacol.* 2008 Aug 1;76(3):404-15.

Garcea R, Daino L, Pascale R, Simile MM, Puddu M, Ruggiu ME, Seddaiu MA, Satta G, Sequenza MJ, Feo F. Protooncogene methylation and expression in regenerating liver and preneoplastic liver nodules induced in the rat by diethylnitrosamine: effect of variations of S-adenosylmethionine:S-adenosylhomocysteine ratio. *Carcinogenesis* 1989;10:1183–92.

Ganiere-Monteil C, Medard Y, Lejus C, Bruneau B, Pineau A, Fenneteau O, Bourin M, Jacqz-Aigrain E. Phenotype and genotype for thiopurine methyltransferase activity in the French Caucasian population: impact of age. *Eur J Clin Pharmacol.* 2004 Apr;60(2):89-96.

Garrod AE. Inborn factors in disease: an essay. New York: Oxford University, Press, 1931.

Literatura

Gartel AL, Goufman E, Najmabadi F, Tyner AL. Sp1 and Sp3 activate p21 (WAF1/CIP1) gene transcription in the Caco-2 colon adenocarcinoma cell line. *Oncogene*. 2000; 19: 5182–5188.

Gidoni D, Kadonaga JT, Barrera-Saldaña H, Takahashi K, Chambon P, Tjian R. Bidirectional SV40 transcription mediated by tandem Sp1 binding interactions. *Science*. 1985 Nov 1;230(4725):511-7.

Goossens M, Dumez Y, Kaplan L, Lupker M, Chabret C, Henrion R, Rosa J. Prenatal diagnosis of sickle-cell anemia in the first trimester of pregnancy. *N Engl J Med*. 1983 Oct 6;309(14):831-3.

Gough JA, Murray NE. Sequence diversity among related genes for recognition of specific targets in DNA molecules. *J Mol Biol*. 1983 May 5;166(1):1-19.

Grandjean P, Kello D, Rohrborn G, Tarkowski S. *Ecogenetics. Genetic Predisposition to the Toxic Effects of Chemicals*. New York: World Health Organization/ Chapman & Hall, 1991.

Griffin MG, Miner PB. Conventional drug therapy in inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am*. 1995; 24:509–521.

Hagen G, Dennig J, Preiss A, Beato M, Suske G. Functional analyses of the transcription factor Sp4 reveal properties distinct from Sp1 and Sp3. *J Biol Chem*. 1995 Oct 20;270(42):24989-94.

Hagen G, Müller S, Beato M, Suske G. Cloning by recognition site screening of two novel GT box binding proteins: a family of Sp1 related genes. *Nucleic Acids Res*. 1992 Nov 11;20(21):5519-25.

Hagen G, Müller S, Beato M, Suske G. Sp1-mediated transcriptional activation is repressed by Sp3. *EMBO J*. 1994 Aug 15; 13(16):3843-51

Haglund S, Lindqvist M, Almer S, Peterson C, Taipalensuu J. Pyrosequencing of TPMT alleles in a general swedish population and in patients with inflammatory bowel disease. *Clinical Chemistry*. 2004;50:2,285-294.

Hamdan-Khalil R, Allorge D, Lo-Guidice JM, Cauffiez C, Chevalier D, Spire C, Houdret N, Libersa C, Lhermitte M, Colombel JF, Gala JL, Broly F. In vitro characterization of four novel non-functional variants of the thiopurine S-methyltransferase. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003 Oct 3;309(4):1005-10.

Hamdan-Khalil R, Gala JL, Allorge D, Lo-Guidice JM, Horsmans Y, Houdret N, Broly F. Identification and functional analysis of two rare allelic variants of the thiopurine S-methyltransferase gene, TPMT*16 and TPMT*19. *Biochem Pharmacol*. 2005 Feb 1;69(3):525-9.

Hanauer SB. Drug therapy: Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med*. 1996;334:841–848.

Literatura

Hall AG, Hamilton P, Minto L, Coulthard SA: The use of denaturing high-pressure liquid chromatography for the detection of mutations in thiopurine methyltransferase. *J Biochem Biophys Methods*. 2001;47(1-2): 65-71.

Hein DW, Grant DM, Sim E. Update on consensus arylamine N-acetyltransferase gene nomenclature. *Pharmacogenetics*. 2000 Jun;10(4):291-2.

Heinemeyer T, Wingender E, Reuter I, Hermjakob H, Kel AE, Kel OV, Ignatieva EV, Ananko EA, Podkolodnaya OA, Kolpakov FA, Podkolodny NL, Kolchanov NA. Databases on transcriptional regulation: TRANSFAC, TRRD and COMPEL. *Nucleic Acids Res*. 1998 Jan 1;26(1):362-7.

Herken H, Kalow W. Photometrische Bestimmung der Enzymatischen Novocain-Hydrolyse. *Klin Wochenschr* 1951; 29:90-91.

Hernandez N. TBP, a universal eukaryotic transcription factor? *Genes and Dev*. 1993;7: 1291-1308.

Hermann A, Gowher H, Jeltsch A. Biochemistry and biology of mammalian DNA methyltransferases. *Cell Mol Life Sci* 2004;61:2571-87.

Hoey T, Weinzierl RO, Gill G, Chen JL, Dynlacht BD, Tjian R. Molecular cloning and functional analysis of Drosophila TAF110 reveal properties expected of coactivators. *Cell*. 1993 Jan 29;72(2):247-60.

Hoffman DR, Cornatzer WE, Duerre JA. Relationship between tissue levels of S-adenosylmethionine, S-adenylhomocysteine, and transmethylation reactions. *Can J Biochem*. 1979;57:56-65.

Hogarth LA, Redfern CP, Teodoridis JM, Hall AG, Anderson H, Case MC, Coulthard SA. The effect of thiopurine drugs on DNA methylation in relation to TPMT expression. *Biochem Pharmacol*. 2008 Oct 15;76(8):1024-35.

Hon YY, Fessing MY, Pui CH, Relling MV, Krynetski EY, Evans WE. Polymorphism of the thiopurine S-methyltransferase gene in African-Americans. *Hum Mol Genet*. 1999 Feb;8(2):371-6.

Honchel R, Aksoy I, Szumlanski C, Wood TC, Otterness DM, Wieben ED, Weinshilboum RM. Human thiopurine methyltransferase: Molecular cloning and expression of T84 colon carcinoma cell cDNA. *Mol Pharmacol*. 1993;43:878-887.

Hongeng S, Sasanakul W, Chuansumrit A, Pakakasama S, Chattananon A, Hathirat P. Frequency of thiopurine S-methyltransferase genetic variation in Thai children with acute leukemia. *Med Pediatr Oncol*. 2000 Oct;35(4):410-4.

Ihn H, Trojanowska M. Sp3 is a transcriptional activator of the human alpha2(I) collagen gene. *Nucleic Acids Res*. 1997 Sep 15;25(18):3712-7.

Literatura

- Imataka H, Sogawa K, Yasumoto K, Kikuchi Y, Sasano K, Kobayashi A, Hayami M, Fujii-Kuriyama Y. Two regulatory proteins that bind to the basic transcription element (BTE), a GC box sequence in the promoter region of the rat P-4501A1 gene. *EMBO J.* 1992; 11, 3663–3671.
- Indjova D, Atanasova S, Shripkova M, Armstrong VW, Oerlich M, Svinarov D. Phenotypic and genotypic analysis of thiopurine S-methyltransferase polymorphism in the Bulgarian population. *Ther Drug Monit.* 2003;25(5):505-13.
- Jackson SP, MacDonald JJ, Lees-Miller S, Tjian R. GC box binding induces phosphorylation of Sp1 by a DNA-dependent protein kinase. *Cell.* 1990 Oct 5;63(1):155-65.
- Jackson SP, Tjian R. O-glycosylation of eukaryotic transcription factors: implications for mechanisms of transcriptional regulation. *Cell.* 1988 Oct 7;55(1):125-33.
- Jang IJ, Shin SG, Lee KH, Yim DS, Lee MS, Koo HH, Sohn DR. Erythrocyte thiopurine methyltransferase activity in a Korean population. *Br J Pharmacol* 1996;42:638–641.
- Jiang SW, Li J, Podratz K, Dowdy S. Application of DNA methylation biomarkers for endometrial cancer management. *Expert Rev Mol Diagn.* 2008 Sep;8(5):607-16.
- Johnston JA, Ward CL, Kopito RR. Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. *J Cell Biol.* 1998 Dec 28;143(7):1883-98.
- Jones KA, Kadonaga JT, Rosenfeld PJ, Kelly TJ, Tjian R. A cellular DNA-binding protein that activates eucaryotic transcription and DNA replication. *Cell* 48: 79-89, 1987.
- Kadonaga JT, Carner KR, Masiarz FR, Tjian R. Isolation of cDNA encoding transcription factor Sp1 and functional analysis of the DNA binding domain. *Cell.* 1987 Dec 24;51(6):1079-90.
- Kalow W. Hydrolysis of local anesthetics by human serum cholinesterase. *J Pharmacol Exp Ther* 1952; 104:122–134.
- Kalow W. Familial incidence of low pseudocholinesterase level. *Lancet* 1956; 2:576–577.
- Karlseder J, Rotheneder H, Wintersberger E. Interaction of Sp1 with the growth- and cell cycle-regulated transcription factor E2F. *Mol Cell Biol.* 1996 Apr;16(4):1659-67.
- Karran P: Mechanisms of tolerance to DNA damaging therapeutic drugs. *Carcinogenesis* 2001;22(12): 1931–1937.
- Kaskas BA, Louis E, Hindorf U, Schaeffeler E, Deflandre J, Graepler F, Schmiegelow K, Gregor M, Zanger UM, Eichelbaum M, Schwab M. Safe treatment of thiopurine S-methyltransferase deficient Crohn's disease patients with azathioprine. *Gut.* 2003 Jan;52(1):140-2.
- Katzung B. Basic and clinical pharmacology. 9th Ed. London. : McGraw-Hill, 2004.

Literatura

Kennett SB, Udvardia AJ, Horowitz JM. Sp3 encodes multiple proteins that differ in their capacity to stimulate or repress transcription. *Nucleic Acids Res.* 1997 Aug 1;25(15):3110-7.

Kennedy GC, Matsuzaki H, Dong S, Huang J, Liu G, Su X, Cao M, Chen W, Zhang J, Liu W, Yang G, Di X, Ryder T, He Z, Surti U, Phillips MS, Boice-Jacino MT, Fodor SP, Jones KW. Large-scale genotyping of complex DNA. *Nat Biotechnol* 2003; 21:1233–1237.

Kerstens PJSM, Stolk JN, De Abreu RA, Lambooy LHJ, van de Putte LBA, Boerbooms AAMT. Azathioprine-related bone marrow toxicity and low activities of purine enzymes in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1995;38:142–145.

Kham SK, Tan PL, Tay AH, Heng CK, Yeoh AE, Quah TC. Thiopurine methyltransferase polymorphisms in a multiracial asian population and children with acute lymphoblastic leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2002 Jun-Jul;24(5):353-9.

Kham SK, Soh CK, Aw DC, Yeoh AE. TPMT*26 (208F-->L), a novel mutation detected in a Chinese Br *J Clin Pharmacol.* 2009 Jul;68(1):120-3.

Kingsley C, Winoto A. Cloning of GT box-binding proteins: a novel Sp1 multigene family regulating T-cell receptor gene expression. *Mol Cell Biol.* 1992 Oct;12(10):4251-61.

Klemetsdal, B, Wist E, Aarbakke J. Gender difference in red blood cell thiopurine methyltransferase activity. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 1993;53: 747-749.

Konits PH, Egorin MJ, Van Echo DA, Aisner J, Andrews PA, May ME, Bachur NR, Wiernik PH: Phase II evaluation and plasma pharmacokinetics of high-dose intravenous 6-thioguanine in patients with colorectal carcinoma. *Cancer Chemotherapy & Pharmacology* 1982;8(2): 199–203.

Kroplin T, Weyer N, Gutsche S, Iven H. Thiopurine S-methyltransferase activity in human erythrocytes: A new HPLC method using 6-thioguanine as substrate. *Eur J Clin Pharmacol.* 1998;54(3): 265–271.

Krynetskaia NF, Krynetski EY, Evans WE. Human RNase H-mediated RNA cleavage from DNA-RNA duplexes is inhibited by 6-deoxythioguanosine incorporation into DNA. *Mol Pharmacol.* 1999 Oct;56(4):841-8.

Krynetski E, Evans WE. Drug methylation in cancer therapy: lessons from the TPMT polymorphism. *Oncogene.* 2003 Oct 20;22(47):7403-13.

Krynetski EY, Fessing MY, Yates CR, Sun D, Schuetz JD, Evans WE. Promoter and intronic sequences of the human thiopurine S-methyltransferase (TPMT) gene isolated from a human PAC1 genomic library. *Pharm Res.* 1997 Dec;14(12):1672-8.

Krynetski EY, Tai HL, Yates CR, Fessing MY, Loennechen T, Schuetz JD, Relling MV, Evans WE. Genetic polymorphism of thiopurine S-methyltransferase: clinical importance and molecular mechanisms. *Pharmacogenetics.* 1996 Aug;6(4):279-90.

Literatura

Krynetski EY, Schuetz JD, Galpin AJ, Pui CH, Relling MV, Evans WE. A single point mutation leading to loss of catalytic activity in human thiopurine S-methyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Feb 14;92(4):949-53.

Kubota T, Chiba K. Frequencies of thiopurine S-methyltransferase mutant alleles (TPMT*2, *3A, *3B and *3C) in 151 healthy Japanese subjects and the inheritance of TPMT*3C in the family of a propositus. *Br J Clin Pharmacol*. 2001 May;51(5):475-7.

Kumar AP, Butler AP. Transcription factor Sp3 antagonizes activation of the ornithine decarboxylase promoter by Sp1. *Nucleic Acids Res*. 1997 May 15;25(10):2012-9.

Lee D, Szumlanski C, Houtman J, Honchel R, Rojas K, Overhauser J, Wieben ED, Weinshilboum RM. Thiopurine methyltransferase pharmacogenetics: Cloning of human liver cDNA and presence of a processed pseudogene on human chromosome 18q21.1. *Drug Metab Dispos*. 1995;23:398-405.

Lennard L: The clinical pharmacology of 6-mercaptopurine. *Eur J Clin Pharmacol*. 1992;43(4):329-339.

Lennard L, Lilleyman JS, Van Loon J, Weinshilboum RM. Genetic variation in response to 6-mercaptopurine for childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*. 1990; 336:225-229.

Lennard L, Maddocks J. Assay of 6-thioguanine nucleotide, a major metabolite of azathioprine, 6-mercaptopurine and 6-thioguanine, in human red blood cells. *J Pharm Pharmacol*. 1983a;35:15-18.

Lennard L, Rees CA, Lilleyman JS, Maddocks JL. Childhood leukemia: A relationship between intracellular 6-mercaptopurine metabolites and neutropenia. *Br J Clin Pharmacol*. 1983b;16:359-363.

Lennard L, Van Loon JA, Lilleyman JS, Weinshilboum RM. Thiopurine pharmacogenetics in leukemia: Correlation of erythrocyte thiopurine methyltransferase activity and 6-thioguanine nucleotide concentrations. *Clin Pharmacol Ther*. 1987;41:18-25.

Lennard L, Van Loon JA, Weinshilboum RM. Pharmacogenetics of acute azathioprine toxicity: Relationship to thiopurine methyltransferase genetic polymorphism. *Clin Pharmacol Ther*. 1989;46:149-154.

LePage GA, Whitecar JP: Pharmacology of 6-thioguanine in man. *Cancer Research* 1971;31(11): 1627-1631.

Lewis LD, Benin A, Szumlanski C, Otterness DM, Lennard L, Weinshilboum RM, Nierenberg DW. Olsalazine and 6-mercaptopurine-related hematologic suppression: A possible drug-drug interaction. *Clin Pharmacol Ther*. 1997;62:464-475.

Li XY, Bhaumik SR, Zhu X, Li L, Shen WC, Dixit BL, Green MR. Selective recruitment of TAFs by yeast upstream activating sequences. Implications for eukaryotic promoter structure. *Curr Biol*. 2002 Jul 23;12(14):1240-4.

Literatura

Li B, Adams CC, Workman JL. Nucleosome binding by the constitutive transcription factor Sp1. *J Biol Chem*. 1994 Mar 11;269(10):7756-63.

Li L, He S, Sun JM, Davie JR. Gene regulation by Sp1 and Sp3 *Biochem Cell Biol*. 2004 Aug; 82(4):460-71.

Li F, Wang L, Burgess RJ, Weinshilboum RM Thiopurine S-methyltransferase pharmacogenetics: autophagy as a mechanism for variant allozyme degradation. *Pharmacogenet Genomics*. 2008 Dec;18(12):1083-94.

Liang Y, Robinson DF, Dennig J, Suske G, Fahl WE. Transcriptional regulation of the SIS/PDGF-B gene in human osteosarcoma cells by the Sp family of transcription factors. *J Biol Chem*. 1996 May 17;271(20):11792-7.

Lindqvist M, Almer S, Peterson C, Soderkvist P. Real-time RTPCR methodology for quantification of thiopurine methyltransferase gene expression. *Eur J Clin Pharmacol* 2003;59(3): 207–211.

Lindqvist M, Haglund S, Almer S, Peterson C, Taipalensu J, Hertervig E, Lyrenäs E, Söderkvist P. Identification of two novel sequence variants affecting thiopurine methyltransferase enzyme activity. *Pharmacogenetics*. 2004 Apr;14(4):261-5.

Lindqvist M, Skoglund K, Karlgren A, Söderkvist P, Peterson C, Kidhall I, Almer S. Explaining TPMT genotype/phenotype discrepancy by haplotyping of TPMT*3A and identification of a novel sequence variant, TPMT*23. *Pharmacogenet Genomics*. 2007 Oct;17(10):891-5.

Ling YH, Chan JY, Beattie KL, Nelson JA. Consequences of 6-thioguanine incorporation into DNA on polymerase, ligase, and endonuclease reactions. *Mol Pharmacol*. 1992 Nov;42(5):802-7.

Lo K, Smale ST. Generality of a functional initiator consensus sequence. *Gene*. 1996 Dec 5;182(1-2):13-22.

Loennechen T, Utsi E, Hartz I, Lysaa R, Kildalsen H, Aarbakke J. Detection of one single mutation predicts thiopurine S-methyltransferase activity in a population of Saami in northern Norway. *Clin Pharmacol Ther*. 2001 Aug;70(2):183-8.

Loo TL, Luce JK, Sullivan MP, Frei E 3d: Clinical pharmacologic observations on 6-mercaptopurine and 6-methylthiopurine ribonucleoside. *Clinical Pharmacology&Therapeutics*. 1968; 9(2): 180–194.

Lowndes NF, Paul J, Wu J, Allan M. c-Ha-ras gene bidirectional promoter expressed in vitro: location and regulation. *Mol Cell Biol*. 1989 Sep;9(9):3758-70.

Lozzio CB, Lozzio BB. Cytotoxicity of a factor isolated from human spleen. *J Natl Cancer Inst*. 1973 Feb;50(2):535-8.

Literatura

Lozzio CB, Lozzio BB. Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood*. 1975 Mar;45(3):321-34.

Lyko F, Brown R. DNA methyltransferase inhibitors and the development of epigenetic cancer therapies. *J Natl Cancer Inst*. 2005;97:1498–506.

Mahgoub A, Dring LG, Idle JR, Lancaster R, Smith RL. Polymorphic hydroxylation of debrisoquine in man. *Lancet*. 1977; 2:584–586.

Majello B, De Luca P, Hagen G, Suske G, Lania L. Different members of the Sp1 multigene family exert opposite transcriptional regulation of the long terminal repeat of HIV-1. *Nucleic Acids Res*. 1994 Nov 25;22(23):4914-21.

Majello B, De Luca P, Lania L. Sp3 is a bifunctional transcription regulator with modular independent activation and repression domains. *J. Biol. Chem*. 1997;272: 4021–4026.

Marez D, Legrand M, Sabbagh N, Lo Guidice JM, Spire C, Lafitte JJ, Meyer UA, Broly F. Polymorphism of the cytochrome P450 CYP2D6 gene in a European population: characterization of 48 mutations and 53 alleles, their frequencies and evolution. *Pharmacogenetics* 1997; 7:193–202.

Marin M, Karis A, Visser P, Grosveld F, Philipsen S. Transcription factor Sp1 is essential for early embryonic development but dispensable for cell growth and differentiation. *Cell*. 1997 May 16;89(4):619-28.

Marinaki AM, Arenas M, Khan ZH, Lewis CM, Shobowale-Bakre el-M, Escuredo E, Fairbanks LD, Mayberry JF, Wicks AC, Ansari A, Sanderson J, Duley JA. Genetic determinants of the thiopurine methyltransferase intermediate activity phenotype in British Asians and Caucasians. *Pharmacogenetics*. 2003 Feb;13(2):97-105.

Mastrangelo IA, Courey AJ, Wall JS, Jackson SP, Hough PV. DNA looping and Sp1 multimer links: a mechanism for transcriptional synergism and enhancement. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Jul 1;88(13):5670-4.

Maybaum J, Mandel HG. Differential chromatid damage induced by 6-thioguanine in CHO cells. *Experimental Cell Research*. 1981;135(2): 465–468.

Maybaum J, Mandel HG. Unilateral chromatid damage: A new basis for 6-thioguanine cytotoxicity. *Cancer Research*. 1983;43(8): 3852–3856.

McDonald OG, Krynetski EY, Evans WE. Molecular haplotyping of genomic DNA for multiple single-nucleotide polymorphisms located kilobases apart using long-range polymerase chain reaction and intramolecular ligation. *Pharmacogenetics*. 2002;12(2): 93–99.

McLeod HL, Coulthard S, Thomas AE, Pritchard SC, King DJ, Richards SM, Eden OB, Hall AG, Gibson BES. Analysis of thiopurine methyltransferase variant alleles in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*. 1999; 105, 696–700.

Literatura

McLeod HL, Krynetski EY, Relling MV, Evans WE. Genetic polymorphism of thiopurine methyltransferase and its clinical relevance for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2000 Apr;14(4):567-72.

McLeod HL, Krynetski EY, Wilimas JA, Evans WE. Higher activity of polymorphic thiopurine S-methyltransferase in erythrocytes from neonates compared to adults. *Pharmacogenetics*. 1995a Oct;5(5):281-6.

McLeod HL, Relling MV, Liu Q, Pui C-H, Evans WE. Polymorphic thiopurine methyltransferase in erythrocytes is indicative of activity in leukemic blasts from children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1995b;85(7): 1897–1902.

Menciá M, Moqtaderi Z, Geisberg JV, Kuras L, Struhl K. Activator-specific recruitment of TFIIID and regulation of ribosomal protein genes in yeast. *Mol Cell*. 2002 Apr;9(4):823-33.

Meryman HT. Preservation of living cells. *Fed Proc*. 1963 Jan-Feb;22:81-9.

Messing J. New M13 vectors for cloning. *Methods Enzymol*. 1983;101:20-78.

Meyer UA, Zanger UM. Molecular mechanisms of genetic polymorphisms of drug metabolism. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1997; 37:269–296.

Michael N, Spector D, Mavromara-Nazos P, Kristie TM, Roizman B. The DNA-binding properties of the major regulatory protein alpha 4 of herpes simplex viruses. *Science*. 1988 Mar 25;239(4847):1531-4.

Milek M, Murin J, Jaksic Z, Lukac-Bajalo J, Jazbec J, Mlinaric-Rascan I. Thiopurine S-methyltransferase pharmacogenetics: genotype to phenotype correlation in the Slovenian population. *Pharmacology* 2006; 77(3):105-14.

Miller IJ, Bieker JJ. A novel, erythroid cell-specific murine transcription factor that binds to the CACCC element and is related to the Krüppel family of nuclear proteins. *Mol. Cell. Biol*. 1993; 13, 2776–2786.

Motulsky AG. Drug reactions, enzymes, and biochemical genetics. *JAMA* 1957; 165:835–837.

Motulsky AG. Pharmacogenetics and ecogenetics in 1991. *Pharmacogenetics* 1991; 1:2–3.

Murray JE, Merrill JP, Harrison JH, Wilson RE, Dammin GJ. Prolonged survival of human kidney homografts by immunosuppressive drug therapy. *New England Journal of Medicine*. 1963;268: 1315–1323.

O'Brien SJ, Menotti-Raymond M, Murphy WJ, Nash WG, Wienberg J, Stanyon R, Copeland NG, Jenkins NA, Womack JE, Marshall Graves JA. The promise of comparative genomics in mammals. *Science*. 1999; 15: 458–481.

Literatura

Oikarinen J, Hatamochi A, de Crombrugge B. Separate binding sites for nuclear factor 1 and a CCAAT DNA binding factor in the mouse $\alpha 2(I)$ collagen promoter. *J Bio Chem.* 1987;262:11064-11070.

Ordentlich P, Yan Y, Zhou S, Heyman RA. Identification of the antineoplastic agent 6-mercaptopurine as an activator of the orphan nuclear hormone receptor Nurr1. *J Biol Chem.* 2003 Jul 4; 278(27):24791-9.

Ossipova O, Stick R, Pieler T. XSPR-1 and XSPR-2, novel Sp1 related zinc finger containing genes, are dynamically expressed during *Xenopus* embryogenesis. *Mech Dev.* 2002 Jul;115(1-2):117-22.

Otterness C, Szumlanski C, Lennard L, Klemetsdal B, Aarbakke J, Park-Hah JO, Iven H, Schmiegelow K, Branum E, O'Brien J, Weinshilboum R. Human thiopurine methyltransferase pharmacogenetics: gene sequence polymorphisms. *Clin Pharmacol Ther.* 1997;62:60-73.

Otterness DM, Szumlanski CL, Wood TC, Weinshilboum RM. Human thiopurine methyltransferase pharmacogenetics. Kindred with a terminal exon splice junction mutation that results in loss of activity. *J Clin Invest.* 1998 Mar 1;101(5):1036-44.

Pan BF, Nelson JA. Characterization of the DNA damage in 6-thioguanine-treated cells. *Biochemical Pharmacology.* 1990; 40(5): 1063–1069.

Park-Hah JO, Klemetsdal B, Lysaa R, Choi KH, Aarbakke J. Thiopurine methyltransferase activity in a Korean population sample of children. *Clin Pharmacol Ther.* 1996; 60:68–74.

Pascal E, Tjian R. Different activation domains of Sp1 govern formation of multimers and mediate transcriptional synergism. *Genes Dev.* 1991 Sep;5(9):1646-56.

Paterson ARP, Tidd DM. 6-Thiopurines. Springer Verlag: New York, 1975.

Pazmino PA, Sladek SL, Weinshilboum RM. Thiol S-methylation in uremia: Erythrocyte enzyme activities and plasma inhibitors. *Clin Pharmacol Ther.* 1980; 28:356–367.

Peng Y, Feng Q, Wilk D, Adjei AA, Salavaggione OE, Weinshilboum RM, Yee VC. Structural basis of substrate recognition in thiopurine s-methyltransferase. *Biochemistry.* 2008 Jun 10;47(23):6216-25.

Philipsen S, Suske G. A tale of three fingers: the family of mammalian Sp/XKLF transcription factors. *Nucleic Acids Res.* 1999 Aug 1;27(15):2991-3000.

Ping Hua, Hua Xu, Jennifer K. Uno, Maciej A. Lipko, Jiali Dong, Pawel R. Kiela, Fayez K. Ghishan. Sp1 and Sp3 mediate NHE2 gene transcription in the intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2007; 293: G146–G153.

Pires NM, Pols TW, de Vries MR, van Tiel CM, Bonta PI, Vos M, Arkenbout EK, Pannekoek H, Jukema JW, Quax PH, de Vries CJ. Activation of nuclear receptor Nur77 by 6-mercaptopurine protects against neointima formation. *Circulation.* 2007 Jan 30; 115(4):493-500.

Literatura

Pruzina S, Hanscombe O, Whyatt D, Grosveld F, Philipsen S. Hypersensitive site 4 of the human β -globin locus control region. *Nucleic Acids Res.* 1991; 19, 1413-1418.

Ptashne M. How eukaryotic transcriptional activators work. *Nature.* 1988; 335: 683-689.

Radojkovic D, Kusic J. Silver staining of denaturing gradient gel electrophoresis gels. *Clin Chem.* 2000 Jun;46(6 Pt 1):883-4.)

Relling MV, Hancock ML, Rivera GK, Sandlund JT, Ribeiro RC, Krynetski EY, Pui CH, Evans WE. Mercaptopurine therapy intolerance and heterozygosity at the thiopurine S-methyltransferase gene locus. *J Natl Cancer Inst.* 1999 Dec 1;91(23):2001-8.

Relling MV, Yanishevski Y, Nemeč J, Evans WE, Boyett JM, Behm FG, Pui C-H. Etoposide and antimetabolite pharmacology in patients who develop secondary acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 1998;12:346–352.

Remy CN. Metabolism of thiopyrimidines and thiopurines. S-Methylation with S-adenosylmethionine transmethylase and catabolism in mammalian tissues. *J Biol Chem.* 1963 Mar;238:1078-84.

Ristić M. Hematologija za III i IV razred medicinske škole. Beograd: Zavod za udžbenike i nastavna sredstva. 1979;p242-243.

Roberts RL, Garry RB, Bland MV, Sies CW, George PM, Burt M, Marinaki AM, Arenas M, Barclay ML, Kennedy MA. Trinucleotide repeat variants in the promoter of the thiopurine S-methyltransferase gene of patients exhibiting ultra-high enzyme activity. *Pharmacogenet Genomics.* 2008 May;18(5):434-8.

Rossi AM, Bianchi M, Guarnieri C, Barale R, Pacifici GM. Genotype-phenotype correlation for thiopurine S-methyltransferase in healthy Italian subjects. *Eur J Clin Pharmacol.* 2001 Apr;57(1):51-4.

Rutherford K, Daggett V. Four human thiopurine s-methyltransferase alleles severely affect protein structure and dynamics *J Mol Biol.* 2008 Jun 13;379(4):803-14.

Sambrook J, Fritsch E.F, T. Maniatis. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual.* Second edition. 1989; Cold Spring Harbor Laboratory Press.pp6.3-6.13.

Sandelin A, Carninci P, Lenhard B, Ponjavic J, Hayashizaki Y, Hume DA. Mammalian RNA polymerase II core promoters: insights from genome-wide studies. *Nat Rev Genet.* 2007; 8: 424–436.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977 Dec;74(12):5463-7.

Sasaki T, Goto E, Konno Y, Hiratsuka M, Mizugaki M. Three novel single nucleotide polymorphisms of the human thiopurine S-methyltransferase gene in Japanese individuals. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2006 Aug;21(4):332-6.

Literatura

Schaeffeler E, Eichelbaum M, Reinisch W, Zanger UM, Schwab M. Three novel thiopurine S-methyltransferase allelic variants (TPMT*20, *21, *22)—association with decreased enzyme function. *Hum Mutat.* 2006;27:976.

Schaeffeler E, Fischer C, Brockmeier D, Wernet D, Moerike K, Eichelbaum M, et al. Comprehensive analysis of thiopurine S-methyltransferase phenotype–genotype correlation in a large population of German-Caucasians and identification of novel TPMT variants. *Pharmacogenetics.* 2004;14:407–17.

Schaeffeler E, Lang T, Zanger UM, Eichelbaum M, Schwab M: High-throughput genotyping of thiopurine S-methyltransferase by denaturing HPLC. *Clinical Chemistry* 2001;47(3): 548–555.

Schaeffeler E, Stanulla M, Greil J, Schrappe M, Eichelbaum M, Zanger UM, Schwab M. A novel TPMT missense mutation associated with TPMT deficiency in a 5-year-old boy with ALL. *Leukemia.* 2003 Jul;17(7):1422-4.

Scherer WF, Syverton JT, Gey GO. Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *J Exp Med.* 1953 May;97(5):695-710.

Schöck F, Purnell BA, Wimmer EA, Jäckle H. Common and diverged functions of the *Drosophila* gene pair D-Sp1 and buttonhead. *Mech Dev.* 1999 Dec;89(1-2):125-32.

Schreiber E, Matthias P, Müller MM, Schaffner W. Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res.* 1989 Aug 11;17(15):6419.

Schutz E, Gummert J, Mohr F, Oellerich M. Azathioprine-induced myelosuppression in thiopurine methyltransferase deficient heart transplant recipient. *Lancet.* 1993; 341:436.

Schwab M, Schaeffeler E, Marx C, Fischer C, Lang T, Behrens C, Gregor M, Eichelbaum M, Zanger UM, Kaskas BA. Azathioprine therapy and adverse drug reactions in patients with inflammatory bowel disease: impact of thiopurine S-methyltransferase polymorphism. *Pharmacogenetics.* 2002 Aug;12(6):429-36.

Schwab M, Schaeffeler E, Marx C, Zanger U, Aulitzky W, Eichelbaum M. Shortcoming in the diagnosis of TPMT deficiency in a patient with Crohn's disease using phenotyping only. *Gastroenterology.* 2001; 121:498–499.

Sjøttem E, Anderssen S, Johansen T. The promoter activity of long terminal repeats of the HERV-H family of human retrovirus-like elements is critically dependent on Sp1 family proteins interacting with a GC/GT box located immediately 3' to the TATA box. *J Virol.* 1996 Jan;70(1):188-98.

Slanar O, Chalupná P, Novotný A, Bortlík M, Krska Z, Lukás M. Fatal myelotoxicity after azathioprine treatment. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* 2008 Jun;27(6):661-5.

Literatura

Smale, S.T, Baltimore, D. The 'initiator' as a transcription control element. *Cell*. 1989; 57: 103–113.

Smith RL. Introduction: human genetic variations in oxidative drug metabolism. *Xenobiotica* 1986; 16:361–365.

Sowa Y, Orita T, Minamikawa-Hiranabe S, Mizuno T, Nomura H, Sakai T. Sp3, but not Sp1, mediates the transcriptional activation of the p21/WAF1/Cip1 gene promoter by histone deacetylase inhibitor. *Cancer Res*. 1999; 59: 4266–4270.

Spire-Vayron de la Moureyre C, Debuysere H, Mastain B, Vinner E, Marez D, Lo Guidice JM, Chevalier D, Brique S, Motte K, Colombel JF, Turck D, Noel C, Flipo RM, Poi A, Lhermitte M, Lafitte JJ, Libersa C, Broly F. Genotypic and phenotypic analysis of the polymorphic thiopurine S-methyltransferase gene (TPMT) in a European population. *Br J Pharmacol*. 1998a Oct;125(4):879-87.

Spire-Vayron de la Moureyre C, Debuysère H, Sabbagh N, Marez D, Vinner E, Chevalier ED, Lo Guidice JM, Broly F. Detection of known and new mutations in the thiopurine S-methyltransferase gene by single-strand conformation polymorphism analysis. *Hum Mutat*. 1998b;12(3):177-85.

Spire-Vayron de la Moureyre C, Debuysère H, Fazio F, Sergent E, Bernard C, Sabbagh N, Marez D, Lo Guidice JM, D'halluin JC, Broly F. Characterization of a variable number tandem repeat region in the thiopurine S-methyltransferase gene promoter. *Pharmacogenetics*. 1999 Apr;9(2):189-98.

Srimartpirom S, Tassaneeyakul W, Kukongviriyapan V, Tassaneeyakul W. Thiopurine S-methyltransferase genetic polymorphism in the Thai population. *Br J Clin Pharmacol*. 2004 Jul;58(1):66-70.

Stary J. Moderni lecba detske leukemie. *Vox Paediatricae*. 2003;9:16-20.

Stet EH, De Abreu RA, Bokkerink JP, Blom HJ, Lambooy LH, Vogels-Mentink TM, de Graaf-Hess AC, van Raay-Selten B, Trijbels FJ. Decrease in S-adenosylmethionine synthesis by 6-mercaptopurine and methylmercaptopurine ribonucleoside in Molt F4 human malignant lymphoblasts. *Biochem J*. 1994;304(Pt 1):163–8.

Stet EH, De Abreu RA, Bokkerink JP, Lambooy LH, Vogels-Mentink TM, Keizer-Garritsen JJ, Trijbels FJ. Reversal of methylmercaptopurine ribonucleoside cytotoxicity by purine ribonucleosides and adenine. *Biochem Pharmacol*. 1995;49:49–56.

Stresemann C, Brueckner B, Musch T, Stopper H, Lyko F. Functional diversity of DNA methyltransferase inhibitors in human cancer cell lines. *Cancer Res*. 2006;66:2794–800.

Struhl K. Fundamentally different logic of gene regulation in eukaryotes and prokaryotes. *Cell*. 1999; 98: 1–4.

Literatura

Levine M, Tjian R. Transcription regulation and animal diversity. *Nature*. 2003; 424: 147–151.

Su W, Jackson S, Tjian R, Echols H. DNA looping between sites for transcriptional activation: self-association of DNA-bound Sp1. *Genes Dev*. 1991;5: 820–826.

Swann PF, Waters TR, Moulton DC, Xu Y-Z, Zheng Q, Edwards M, Mace R. Role of postreplicative DNA mismatch repair in the cytotoxic action of thioguanine. *Science*. 1996; 273(5278): 1109–1112.

Szumlanski CL, Honchel R, Scott MC, Weinshilboum RM. Human liver thiopurine methyltransferase pharmacogenetics: Biochemical properties, liver-erythrocyte correlation and presence of isozymes. *Pharmacogenetics*. 1992; 2:148–159.

Szumlanski C, Otterness D, Her C, Lee D, Brandriff B, Kelsell D, Spurr N, Lennard L, Wieben E, Weinshilboum R. Thiopurine methyltransferase pharmacogenetics: human gene cloning and characterization of a common polymorphism. *DNA Cell Biol*. 1996 Jan;15(1):17-30.

Szumlanski C, Weinshilboum RM. Sulphasalazine inhibition of thiopurine methyltransferase: Possible mechanism for interaction with 6-mercaptopurine and azathioprine. *Br J Clin Pharmacol*. 1995; 39:456–459.

Szyf M. DNA methylation and demethylation as targets for anticancer therapy. *Biochemistry (Mosc)*. 2005;70:533–49.

Tai HL, Krynetski EY, Schuetz EG, Yanishevski Y, Evans WE 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. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Jun 10;94(12):6444-9.

Tai HL, Krynetski EY, Yates CR, Loennechen T, Fessing MY, Krynetskaia NF, Evans WE. Thiopurine S-methyltransferase deficiency: two nucleotide transitions define the most prevalent mutant allele associated with loss of catalytic activity in Caucasians. *Am J Hum Genet*. 1996 Apr;58(4):694-702.

Tay BS, Lilley RM, MurrayAW, Atkinson MR. Inhibition of phosphoribosyl pyrophosphate amidotransferase from ehrlich ascitestumour cells by thiopurine nucleotides. *Biochemical Pharmacology*. 1969; 18(4): 936–938.

Thomsen JB, Schroder H, Kristinsoon J, Szumlanski C, Weinshilboum R, Andersen JB and Schmiegelow J. Possible carcinogenic effect of 6-mercaptopurine on bone marrow stem cells: Relation to thiopurine metabolism. *Cancer*. 1999; 86:1080–1086.

Tokusumi Y, Ma Y, Song X, Jacobson RH, Takada S. The new core promoter element XCPE1 (X Core Promoter Element 1) directs activator-, mediator-, and TATA-binding protein-dependent but TFIID-independent RNA polymerase II transcription from TATA-less promoters. *Mol Cell Biol*. 2007; 27: 1844–1858.

Literatura

Turner J, Crossley M. Mammalian Krüppel-like transcription factors: more than just a pretty finger. *Trends Biochem Sci.* 1999 Jun;24(6):236-40.

Ujiie S, Sasaki T, Mizugaki M, Ishikawa M, Hiratsuka M. Functional characterization of 23 allelic variants of thiopurine S-methyltransferase gene (TPMT*2-*24). *Pharmacogenet Genomics.* 2008 Oct;18(10):887-93.

Van Loon JA, Weinshilboum RM. Thiopurine methyltransferase biochemical genetics: Human lymphocyte activity. *Biochem Genet.* 1982; 20:637-658.

Van Loon JA, Weinshilboum RM. Human lymphocyte thiopurine methyltransferase pharmacogenetics: Effect of phenotype on 6-mercaptopurine-induced inhibition of mitogen stimulation. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 1987; 242(1): 21-26.

Varagić V, Milošević M. *Farmakologija*. XV izdanje, Elit Medica, Beograd, 1999.

Vieira J, Messing J. The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene.* 1982; 19: 259-268.

Vogt MH, Stet EH, De Abreu RA, Bokkerink JP, Lambooy LH, Trijbels FJ. The importance of methylthio-IMP for methylmercaptapurine ribonucleoside (Me-MPR) cytotoxicity in Molt F4 human malignant T-lymphoblasts. *Biochim Biophys Acta.* 1993;1181:189-94.

Volonte C, Greene LA. 6-Methylmercaptapurine riboside is a potent and selective inhibitor of nerve growth factor-activated protein kinase N. *Journal of Neurochemistry.* 1992; 58: 700-708.

Vuchetich JP, Weinshilboum RM, Price RA. Segregation analysis of human red blood cell thiopurine methyltransferase activity. *Genet Epidemiol.* 1995;12(1):1-11.

Waldenstrom J. Studien uber Porphyrrie. *Acta Med Scand* 1937; 82:1-254.

Wall L, deBoer E, Grosveld F. The human beta-globin gene 3' enhancer contains multiple binding sites for an erythroid-specific protein. *Genes Dev.* 1988 Sep;2(9):1089-100.

Wang L, Nguyen TV, McLaughlin RW, Sikkink LA, Ramirez-Alvarado M, Weinshilboum RM. Human thiopurine S-methyltransferase pharmacogenetics: variant allozyme misfolding and aggresome formation *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Jun 28;102(26):9394-9.

Wang L, Sullivan W, Toft D, Weinshilboum R. Thiopurine S-methyltransferase pharmacogenetics: chaperone protein association and allozyme degradation. *Pharmacogenetics.* 2003 Sep;13(9):555-64.

Wansa KD, Harris JM, Yan G, Ordentlich P, Muscat GE. The AF-1 domain of the orphan nuclear receptor NOR-1 mediates trans-activation, coactivator recruitment, and activation by the purine anti-metabolite 6-mercaptopurine. *J Biol Chem.* 2003 Jul 4; 278(27):24776-90.

Literatura

Wansa KD, Muscat GE. TRAP220 is modulated by the antineoplastic agent 6-Mercaptopurine, and mediates the activation of the NR4A subgroup of nuclear receptors. *J Mol Endocrinol*. 2005 Jun; 34(3):835-48.

Weinshilboum R. Thiopurine pharmacogenetics: clinical and molecular studies of thiopurine methyltransferase. *Drug Metab Dispos*. 2001 Apr;29(4 Pt 2):601-5.

Weinshilboum R. Inheritance and drug response. *N Engl J Med*. 2003 Feb 6;348(6):529-37.

Weinshilboum RM, Otterness DM, Szumlanski CL. Methylation pharmacogenetics: Catechol O-methyltransferase, thiopurine methyltransferase, and histamine N-methyltransferase. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1999; 39:19-52.

Weinshilboum RM, Raymond FA, Pazmiño PA. Human erythrocyte thiopurine methyltransferase: radiochemical microassay and biochemical properties. *Clin Chim Acta*. 1978 May 2;85(3):323-33.

Weinshilboum RM, Sladek SL. Mercaptopurine pharmacogenetics: monogenic inheritance of erythrocyte thiopurine methyltransferase activity. *Am J Hum Genet*. 1980 Sep;32(5):651-62.

Weinshilboum R, Wang L. Pharmacogenetics: inherited variation in amino acid sequence and altered protein quantity *Clin Pharmacol Ther*. 2004 Apr;75(4):253-8.

Wickner S, Maurizi MR, Gottesman S. Posttranslational quality control: folding, refolding, and degrading proteins. *Science*. 1999 Dec 3;286(5446):1888-93.

Wimmer EA, Jäckle H, Pfeifle C, Cohen SM. A *Drosophila* homologue of human Sp1 is a head-specific segmentation gene. *Nature*. 1993 Dec 16;366(6456):690-4.

Wolf CR, Smith G, Smith RL. Science, medicine, and the future: Pharmacogenetics. *BMJ* 2000; 320: 987-990.

Woodson LC, Dunnette JH, Weinshilboum RM. Pharmacogenetics of human thiopurine methyltransferase: Kidney-erythrocyte correlation and immunotitration studies. *J Pharmacol Exp Ther*. 1982;222:174-181.

Woodson LC, Weinshilboum RM. Human kidney thiopurine methyltransferase: Purification and biochemical properties. *Biochem Pharmacol*. 1983a; 32:819-826.

Woodson LC, Ames MM, Selassie CD, Hansch C, Weinshilboum RM. Thiopurine methyltransferase: Aromatic thiol substrates and inhibition by benzoic acid derivatives. *Mol Pharmacol*. 1983b; 24:471-478.

Wu H, Horton JR, Battaile K, Allali-Hassani A, Martin F, Zeng H, Loppnau P, Vedadi M, Bochkarev A, Plotnikov AN, Cheng X. Structural basis of allele variation of human thiopurine-S-methyltransferase Proteins. 2007 Apr 1;67(1):198-208.

Literatura

Yan L, Zhang S, Eiff B, Szumlanski CL, Powers M, O'Brien JF, Weinshilboum RM. Thiopurine methyltransferase polymorphic tandem repeat: genotype-phenotype correlation analysis. *Clin Pharmacol Ther.* 2000 Aug;68(2):210-9.

Yates CR, Krynetski EY, Loennechen T, Fessing MY, Tai HL, Pui CH, Relling MV, Evans WE: Molecular diagnosis of thiopurine Smethyltransferase deficiency: Genetic basis for azathioprine and mercaptopurine intolerance. *Annals of Internal Medicine.* 1997;126(8): 608–614.

Yi P, Melnyk S, Pogribna M, Pogribny IP, Hine RJ, James SJ. Increase in plasma homocysteine associated with parallel increases in plasma S-adenosylhomocysteine and lymphocyte DNA hypomethylation. *J Biol Chem* 2000;275:29318–23.

Yi L, Tan PL, Hen CK, Huang LQ, Li FY, Quah TC, Yeoh EJ. Arrayed primer extension (APEX): A solid-phase four-color DNA minisequencing to detect the mutations on the human beta-globin and thiopurine methyltransferase (TPMT) genes. *Blood.* 2002; 100(11): 896.

Yoo CB, Jones PA. Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. *Nat Rev Drug Discov* 2006;5:37–50.

Yu B, Datta PK, Bagchi S. Stability of the Sp3-DNA complex is promoter-specific: Sp3 efficiently competes with Sp1 for binding to promoters containing multiple Sp-sites. *Nucleic Acids Res.* 2003;31: 5368–5376.

Zhao Z, Fu YX, Hewett-Emmet D, Boerwinkle E. Investigating single nucleotide polymorphism (SNP) density in the human genome and its implications for molecular evolution. *Gene.* 2003; 312:207–213.

Zhou C, Yang Y, Jong AY. Mini-prep in ten minutes. *Biotechniques.* 1990 Feb;8(2):172-3.

Zimm S, Collins JM, Riccardi R O'Neill D, Narang PK, Chabner B, Poplack DG. Variable bioavailability of oral mercaptopurine. Is maintenance chemotherapy in acute lymphoblastic leukemia being optimally delivered? *New England Journal of Medicine.* 1983; 308(17): 1005–1009.



