

Transzportfehérjék genetikai polimorfizmusainak szerepe akut limfoid leukémiában; farmakogenetikai vizsgálatok

Doktori értekezés

Félné Semsei Ágnes

Semmelweis Egyetem
Molekuláris orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Szalai Csaba, az MTA doktora

Hivatalos bírálók:

Dr. Laczka Csilla, biológus, PhD

Dr. Szelid Zsolt, adjunktus, PhD

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Sasvári Mária, egyetemi tanár, az MTA doktora

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Kralovánszki Judit, biológiai tudomány kandidátusa, PhD

Dr. Rónai Zsolt, egyetemi adjunktus, PhD

Budapest
2011

TARTALOMJEGYZÉK

Rövidítések jegyzéke	4
1. Bevezetés.....	8
2. Irodalmi összefoglaló	11
2.1. A gyermekkori akut limfoid leukémia.....	11
2.2. A gyermekkori akut limfoid leukémiára való hajlam.....	14
2.2.1. Az akut limfoid leukémia kialakulásának környezeti okai.....	14
2.2.2. Az akut limfoid leukémia kialakulásának genetikai okai.....	15
2.3. Az ABC-transzporterek	20
2.3.1. Az ABCB1	21
2.3.2. Az ABCG2.....	24
2.3.3. Az ABCC1	26
2.3.4. Az ABC-transzporterek az akut limfoid leukémia kialakulásában.....	29
2.4. A farmakogenetika tudománya	30
2.5. Az antraciklinek okozta kardiotoxicitás farmakogenetikai vizsgálata	30
2.5.1. Az antraciklinek anyagcsereje	31
2.5.2. Az antraciklinek hatásmechanizmusa	33
2.5.3. Az antraciklinek okozta kardiotoxicitás klinikai vonatkozásai	35
2.5.4. Az antraciklinek okozta kardiotoxicitás kialakulásának rizikófaktorai	36
2.5.5. A kardiotoxicitás megelőzése, kezelése	37
2.5.6. Genetikai polimorfizmusok az antraciklin okozta kardiotoxicitásban.....	38
2.5.7. Egyéb, az ALL kemoterápiájában alkalmazott kardiotoxikus hatású gyógyszerek.....	40
3. Célkitűzés	42
4. Módszerek	44
4.1. A biobank ismertetése: betegek és kontrollok	44
4.2. DNS-kivonás	48
4.3. A vizsgált polimorfizmusok kiválasztása	49
4.4. Genotipizálási módszerek	51
4.4.1. Genotipizálás ABI SnapShot módszerrel (<i>ABCB1</i> és <i>ABCC1</i> rs45511401 SNP-k).....	51

4.4.2. Genotipizálás LightCycler PCR módszerrel (<i>ABCG2</i> polimorfizmusok) ..55	
4.4.3. Genotipizálás KasPar TM technikával (<i>CDKN2A</i> polimorfizmusa)58	
4.4.4. Genotipizálás GenomeLab SNPstream rendszerrel (<i>ABCCI</i> SNP-k).....60	
4.5. Statisztikai analízis65	
5. Eredmények66	
5.1. Az <i>ABCB1</i> és <i>ABCG2</i> gének szerepe a gyermekkori ALL kialakulásában.....66	
5.2. Az ALL-ra való hajlam vizsgálata nemzetközi együttműködés keretében71	
5.3. <i>ABCCI</i> polimorfizmusok szerepe az antraciklinek okozta kardiotoxicitásban ..74	
6. Megbeszélés.....80	
6.1. Az <i>ABCB1</i> és <i>ABCG2</i> gének szerepe a gyermekkori ALL kialakulásában.....80	
6.2. Az ALL-re való hajlam vizsgálata nemzetközi együttműködés keretében84	
6.3. <i>ABCCI</i> polimorfizmusok szerepe az antraciklinek okozta kardiotoxicitásban ..85	
7. Következtetések90	
8. Összefoglalás91	
9. Summary92	
10. Irodalomjegyzék93	
11. Saját publikációk jegyzéke108	
12. Köszönetnyilvánítás110	

Rövidítések jegyzéke

ABC	adenosine triphosphate binding cassette
ABCB1	ATP-binding cassette, sub-family B, member 1
ABCC1	ATP-binding cassette, sub-family C, member 1
ABCC2	ATP-binding cassette, sub-family C, member 2
ABCC3	ATP-binding cassette, sub-family C, member 3
ABCG2	ATP-binding cassette, sub-family G, member 2
ACE	angiotensin I converting enzyme 1
ACO1	aconitase 1
AKR1A1	aldo-keto reductase family 1, member A1
AKR1C2	aldo-keto reductase family 1, member C2
ALL	akut limfoid leukémia
ARID5B	AT-rich interactive domain 5B
ATM	ataxia telangiectasia mutated
ATP2A2	ATPase, Ca ⁺⁺ transporting, cardiac muscle, slow twitch 2
ATP5J	ATP synthetase, H ⁺ transporting, mitochondrial Fo complex, subunit F6
BCRP	breast cancer resistance protein
BFM	Berlin-Frankfurt-Münster munkacsoport
CAT	catalase
CBR1	carbonyl reductase 1
CBR3	carbonyl reductase 3
CD28	CD28 molecule
CDKN2A	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
CEBPE	CCAAT/enhancer binding protein, epsilon
CHEK2	CHK2 checkpoint homolog
CI 95%	95%-os konfidencia intervallum
CNV	copy number variation
CTCAE	Common Terminology Criteria for Adverse Events
CYBA	cytochrome b-245, alpha polypeptide
CYP	cytochrome P450
CYP1A1	cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1

CYP2E1	cytochrome P450, family 2, subfamily E, polypeptide 1
DNMT1	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 1
dNTP	dezoxi-nukleotid-trifoszfát
DOX	doxorubicin
DOXol	doxorubicinol
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
EKG	elektrokardiográfia
ERCC2	excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 2
ERCC5	excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 5
ETT TUKEB Bizottság	Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásért
FAM	6-karboxi-fluoreszcein
FCGR2A	Fc fragment of IgG, low affinity IIa, receptor
FRET	fluoreszcencia rezonancia energia transzfer
GATA3	GATA binding protein 3
GLM	generalized linear model
GSH	glutation
GSTM1	glutathione S-transferase mu 1
GSTP1	glutathione S-transferase pi 1
GSTT1	glutathione S-transferase theta 1
GWA	genome-wide association
GWAS	genome-wide association study
HR	magas rizikócsoporthoz tartozó
HWE	Hardy-Weinberg egyenlőség
IALLGC Consortium	International childhood Acute Lymphoblastic Leukaemia Genetics Consortium
IKZF1	IKAROS family zinc finger 1
IL12A	interleukin 12A
IL2RA	interleukin 2 receptor, alpha
L	linker régió

LCF	Light-Cycler Forward
LCR	Light-Cycler Reverse
linEF	lineáris ejekciós frakció
LR	alacsony rizikócsoport
MDR1	multidrug resistance 1
miR	mikroRNS
MLL	mixed lineage leukemia
MR	közepes rizikócsoport
MRP1	multidrug resistance-associated protein 1
MTHFR	methylenetetrahydrofolate reductase
MTRR	5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase reductase
MUTYH	mutY homolog (E. coli)
NBD	nukleotidkötő domén
NCF4	neutrophil cytosolic factor 4
NDUFS	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 1
NHL	non-Hodgkin-limfóma
NOS2	nitric oxide synthase 2, inducible
NQO1	NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1
NR1I2	nuclear receptor subfamily 1, group I, member 2
OGG1	8-oxoguanine DNA glycosylase
OR	odds ratio
PCR	polimerase chain reaction
PKU	fenilketonúria
PXR	pregnane X-receptor
RAC2	ras-related C3 botulinum toxin substrate 2
RFC1	reduced folate carrier 1
ROS	reaktív oxigén gyökök
rs#	polimorfizmusok azonosítója az NCBI honlapon (reference SNP)
RYR2	ryanodine receptor 2
SAP	shrimp alkaline phosphatase
SBE	single base extension
SD	szórás

SHMT1	serine hydroxymethyltransferase 1
SLC19A1	solute carrier family 19 member 1
SNP	single nucleotid polymorphism
SOD1	superoxide dismutase 1
STAT4	signal transducer and activator of transcription 4
STAT6	signal transducer and activator of transcription 6, interleukin-4 induced
TAMRA	6-karboxi-tetrametil-rodamin
TMD	transzmembrán domén
TYMS	thymidylate synthetase
UTR	nem átírózó régió
VDÁ	végdiasztolés átmérőt
VIC	2-kloro-7-fenil-1,4-dikloro-6-karboxi-fluoreszcein
VSzÁ	végshisztolés átmérő
XDH	xanthine dehydrogenase
XRCC1	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 1
XRCC3	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 3

Megjegyzés 1.: az angol nyelvű rövidítések feloldásánál akkor használtam a magyar nyelvű kifejezést, ha az létezik ismert magyar nyelvű megfelelője.

Megjegyzés 2.: A dolgozatban szereplő összes ábra saját készítésű.

1. Bevezetés

A gyermekkori akut limfoid leukémia (ALL) a ritka betegségek közé tartozik, de ez a leggyakoribb gyermekkori hematológiai betegség Magyarországon [1]. A gyermekkori daganatos betegségek körülbelül 30%-a leukémia, a leukémiák 80%-a akut limfoid leukémia [2,3]. Incidenciája a magyar populációban 3:100000-hez, ez körülbelül évi 60-70 új megbetegedést jelent [4].

Az akut limfoid leukémiában a B- és T-limfocita sejtek megváltozott genetikai információja fokozott sejtosztódást eredményez, a kóros genetikai állományú limfoblasztok klonális felszaporodása jellemzi. A betegség kialakulásában az öröklött genetikai és környezeti tényezők összessége, egymásra hatása játszik szerepet [5,6]. A szervezet számos exogén vagy endogén karcinogén hatásának kitett, ezért az ezek elleni megfelelő védelem kiemelkedően fontos. Az ABC-transzporterek (ABC: adenosine triphosphate binding cassette, azaz ATP-kötő kazetta) ebben a védelemben játszanak szerepet, hiányos működésük tehát a xenobiotikumoknak való nagyobb kitettséget eredményez [7,8]. Az ALL rizikójának jobb megértéséhez fontos vizsgálni ezeknek a géneknek a megfelelő működését, ill. olyan genetikai változatokat, amelyek módosítják az ABC-transzporterek funkcióját.

A betegség kialakulásában közrejátszhatnak olyan genomrégiók, amelyeknek az ALL kialakulásában betöltött szerepét még nem ismerjük. Ennek feltérképezésében használják a genom szintű asszociációs vizsgálatokat (GWAS: genome-wide association study) [9]. Az itt kapott eredményeket több független populáción meg kell ismételni az eredmény bizonyításához. Egy ilyen nemzetközi munkához mi is csatlakoztunk.

Napjainkban a gyermekkori akut limfoid leukémiában megbetegedett gyermekek túlnyomó többsége meggyógyul, az 5 éves túlélés 80-90% [10]. A gyógyulási arány legalább 10 évig követve a betegeket szintén 80% [6]. Ezért ma már nem a túlélési arány növelése az elsődleges cél, hanem a kemoterápia toxikus mellékhatásainak csökkentése és a felnőttkori életminőség javítása, a kemoterápia késői hatásainak felismerése. Ennek érdekében már több protokollban dóziscsökkentést vezettek be bizonyos esetekben [10].

A gyermekkori rák túlélői gyakrabban szenvednek fizikális egészségügyi problémáktól, mint társaik. Egy széles körű tanulmány eredményei szerint a kardiomiopátiával diagnosztizált betegek 15%-a kemoterápiás kezelést kapott korábban.

Mivel a rákos betegségek hosszú távú túlélőinek száma növekszik, fontos a kezelés késői mellékhatásainak vizsgálata. Az eredeti betegségük miatt egyre kevesebben halnak meg, sokkal inkább a késői szövődmények, késői mellékhatások, többek között szívproblémák miatt. A károsodás megelőzése különösen fontos a gyermekekben, mert ők a kezelés után még évtizedekig élhetnek. A kóros eltérések minél hamarabbi felismerése szükséges a károsító terápia felfüggesztéséhez és a korai kezelés elkezdéséhez. Ezért fontos a betegek állandó monitorozása a szubklinikus, azaz diagnosztikus eljárással kimutatható, de klinikai tüneteket nem mutató elváltozások felismerése érdekében [11,12,13].

A farmakogenetikai kutatások célja a terápia további személyre szabása annak érdekében, hogy a terápia hatékonyságát és biztonságosságát növeljék. Ezt a gyógyszerek vagy a gyógyszeradagok egyéni megválasztásával lehet elérni [14].

A fenti folyamatokban közreműködő genetikai eltérések lehetnek például inszerciók, deléciók, kópiaszám eltérések (CNV: copy number variation), az egy pontos nukleotid polimorfizmusok (SNP: single nucleotid polymorphism). Az SNP olyan egy bázist érintő genetikai eltérés, amelynek az allélfrekvenciája nagyobb, mint 1%.

Az SNP-k és egyes fenotípusok megjelenése közötti asszociációt többen leírtak, viszont a legtöbb SNP funkcionális hatása a mai napig nem teljesen tisztázott. Az egy pontos nukleotid polimorfizmusok lehetséges hatását a génbeli lokalizációjuk alapján közelítik meg általában. Az exonban levő és aminosav-cserét okozó mutáció a fehérje aminosav sorrendjét változtatja meg, ami kihatással lehet a protein térszerkezetére, működésére, felületidejére. Az exonban levő, de aminosav cserét nem okozó SNP esetén pl.: az mRNS ritka kodont tartalmazhat, aminek jelentéte befolyásolhatja az átírási sebességét és így a fehérje foldingját. Az intronban és nem átíródó régiókban levő SNP-k esetén leggyakrabban szabályozó vagy transzkripciós faktor kötőhely-megváltozást keresnek, pl.: a 3'UTR régióba kötődő mikroRNS-ek kötőhelyének megváltozott szekvenciáját. Az intergénikus régióban levő SNP-k szintén szabályozó régiót érinthetnek.

A polimorfizmusok előfordulása a xenobiotikus-metabolizáló enzimekben, xenobiotikum-transzporterekben vagy gyógyszer-célpontokban befolyásolhatja a betegség kialakulását, a kezelés hatékonyságát vagy mellékhatások előfordulását [15].

Munkám célja az akut limfoid leukémia kialakulásának genetikai, genomikai hátterének vizsgálata mellett a terápia optimalizálása érdekében végzett farmakogenetikai következtetések megfogalmazása volt.

2. Irodalmi összefoglaló

2.1. A gyermekkori akut limfoid leukémia

A gyermekkori akut limfoid leukémia egy rosszindulatú hematológiai betegség, amit a limfoid progenitor sejtek fejlődésének kóros formája jellemez. Leggyakrabban 2-5 éves kor között jelenik meg [16]. A leukémiasejtek egyetlen transzformált progenitor sejtől származnak, amelynek szomatikus mutációk miatt megváltozott a proliferációs és differenciálódási programja. Ezen sejtek között megkülönböztetünk leukémia őssejteket (limfoblaszt), amelyek osztódásra és érésre is képesek, és leánysejteket, amelyek az őssejtekből keletkeznek, csak korlátozott osztódásra képesek, s a terminális mitózist követően elpusztulnak. A sejtek immunfenotípusát annak a sejtnek a differenciálódási antigénjei jellemzik, amelynek szintjén a transzformáció bekövetkezett. Az éretlen limfoblasztok a csontvelőben és a vérben felhalmozódva kiszorítják a normális vérképző elemeket, ami vérszegénységhez, infekciókhoz, vérzésekhez vezethet. Emellett más parenchymalis szerveket is infiltrálhat, ami a szerv károsodásához vezet.

Az akut limfoid leukémiának különböző altípusait lehet elkülöníteni a leukémiás blasztok genetikai állománya alapján. Ezek közül a legfontosabbak: 50 fölötti kromoszómával rendelkező hiperdiploid kariotípus; a t(12;21) transzlokáció, ami miatt a TEL-AML1 fúziós fehérje jön létre; az MLL (mixed lineage leukemia) fúziós protein keletkezése és a t(9,22) transzlokáció, ami a BCR-ABL fúziós fehérjét hozza létre (ismert néven Philadelphia-kromoszóma).

Hiperdiploidia esetén a pontos patomechanizmus nehezen ismerhető meg. A TEL-AML1 funkciója nem pontosan ismert, de az eredeti géneknek fontos szerepük van a normális hematopoezisben. Az MLL fúziós protein az MLL gén (11q23) és több különböző kromoszómaterület transzlokációjával keletkezik. A BCR-ABL egy konstitutív protein kináz, ami megváltoztatja a hematopoetikus őssejtek proliferációját, a túlélését kontrolláló jelátviteli útvonalat [6,14,17].

A betegség lefolyása nagyon gyors, sok súlyos tünet megjelenik napok, egy-két hét alatt, mielőtt diagnosztizálják. A beteg általában egy-két hete tartó fájdalokra (pl. sokizületi fájdalom), általános gyengeségre panaszkodik. Gyakori a máj, a lép és a nyaki nyirokcsomók megnagyobbodása, sápadtság, bőrvérzések. A diagnózis felállításához általános vérkép és vérkenet vizsgálatot, majd csontvelőbiopsziát

végeznek. A csontvelői sejteket immunfenotipizálásnak és citogenetikai vizsgálatoknak vetik alá [18].

Az ALL diagnosztikájában alapvetően a leukémiás sejtklón eredetét határozzák meg, a kiindulási sejttípustól függően. Ez alapján megkülönböztetünk B- és T-sejtes leukémiát, ami B-, ill. T-limfocita prekursorokból alakult ki. A B-sejtes ALL a gyermekkori akut limfoid leukémia leggyakoribb fajtája, így a leggyakoribb hematológiai betegség gyermekkorban. Prognózisa jó, az eseménymentes túlélés 80% [17].

A leukémia kezelése a normál és leukémiás progenitor sejtek sejtciklusa közötti különbségeken alapszik, ami a leukémiasejtek gyorsabb osztódásából adódik. A kemoterápia kezdetén a lehetséges maximális számú citosztatikumot kell maximális dózisban beadni. Hazánkban a betegeket a Berlin-Frankfurt-Münster (BFM) munkacsoport által kifejlesztett terápiás protokollok szerint kezelik. Ez egy 6-8 hónapos úgynevezett intenzív vagy intravénás kezelési szakaszból, majd további másfél vagy két és fél éves fenntartó orális kezelési szakaszból áll. A kezeléshez a betegeket rizikócsoportha osztják a kezelésre adott kezdeti válasz alapján, ezek: alacsony, közepes és magas rizikócsoportha. A kemoterápia során a betegek többször kapnak intravénásan vinkrisztint, aszparaginázt, daunorubicint, doxorubicint, metotrexátot, ciklofoszfamidot, citozin-arabinozidot. Ezen kívül szájon át prednizolont, dexametazont, merkaptopurint, tioguanint; intratekálisan metotrexátot, prednizolont és ifoszfamidot (csak a magas rizikójúak).

A kezelés célja a remisszió elérése, amikor a beteg tünetmentes és perifériás vérében már nem találhatók limfoblasztsejtek. Ekkor azonban még maradhat leukémiasejt a páciensben, amiből a betegség újra kialakulhat, az eredeti sejtpopuláció megjelenhet, ez a relapszus. Ha öt évig megmarad a remisszió állapota, a beteg gyógyultnak tekinthető, mert ezután már csak ritkán következik be relapszus. Relapszus esetén az ismételt megjelenő sejtklón lehet azonos a diagnóziskorival, vagy ebből alakulhat ki. Kópiaszám eltérések alapján történő összehasonlítással kimutatták, hogy a legtöbb esetben a relapszuskor megjelenő sejtklón a diagnóziskori domináns limfoblasztoknál korábbi sejtől alakult ki vagy a diagnóziskor kis mennyiségben már meglévő alpopulációból származik [19]. Az akut limfoid leukémia altípusainak elkülönítése kezdetben a kromoszóma szintű változások feltérképezésével történt és

ezeknek a citogenetikai eltéréseknek a feltárása ma is fontos része a diagnózis és a prognózis megállapításának. Napjainkban a molekuláris genetikai módszerekkel lehetővé vált a limfoblasztok érettségi stádiumának elkülönítése és a leukémiás transzformációhoz vezető mutációk pontosabb meghatározása, ill. az egyes altípusok génextpressziós mintázatának feltárása, ami közelebb visz a patomechanizmus és a kezelés hatékonyságának megértéséhez [20,21,22]. A kromoszomális transzlokációk sokszor olyan gén kialakulásához vezetnek, ami miatt kialakul a leukémia és amik a betegség prognózisát is meghatározzák [17].

A genetikai háttér a betegség kimenetelét is befolyásolhatja, az egyes altípusoknak eltérő a prognózisa, mert eltérően reagálnak a kemoterápiás szerekre. Az altípusok más-más kemoterápiás szerre érzékenyek. Például a hiperdiploid kariotípusú limfoblasztok esetén az ALL prognózisa nagyon jó (az 5 éves ösztúlélés 90% fölötti), mert ezek a sejtek nagyon érzékenyek a használt antimetabolit alapú kemoterápiára, viszont a hipodiploid kariotípus (45-nél kevesebb kromoszóma) vagy a BCR-ABL, ill. MLL transzlokációs ALL kezelési eredményei rosszabbak [14,17]. Az ALL kimenetelét ezen kívül befolyásolja a beteg életkora is, az egy év alatti gyermekek prognózisa sokkal rosszabb [6,23].

Az ALL kezelése az elmúlt 50 évben nagyon sokat fejlődött. A rizikócsoportok pontos meghatározása, a kombinált terápia alkalmazása, jobb technikai felszereltség a betegség túlélését jelentősen megnövelte. A gyermekeknél az 5 éves túlélés ezek hatására 30%-ról 80%-ra nőtt az elmúlt 50 évben. A terápia javulásához hozzátartozik, hogy egyes, korábban rossz prognózisú rizikócsoportokba tartozók 70-80%-a túlél, ilyenek pl.: T-sejtes ALL, éretlen B-sejtes ALL és a fekete rassz. Az életkor és a diagnóziskori leukocitaszám továbbra is fontos prognosztikus faktor, főleg a B-sejtes ALL-nél, de a a betegség kimenetelét leginkább a (kezdeti) terápiára adott válasz határozza meg [10,12,24].

Sajnálatos módon azonban a hosszú távú túlélés ALL után nem jelenti azt, hogy az egykori beteg teljesen egészséges. A túlélők körülbelül 40%-ánál jelentkezik valamilyen egészségügyi probléma a diagnózis után 30 éven belül [25]. A gyermekkori rák kezelésével összefüggésbe hozható a hosszú távú morbiditás és mortalitás, aminek incidenciája a túlélési idő növekedésével arányos. Egy gyermekkori rák túlélőket követő tanulmányban 20483 túlélőt vizsgáltak. A terápia késői hatásaként másodlagos tumorok,

szívproblémák, légzőrendszeri problémák miatt bekövetkező elhalálozást találtak. A szívet ért sugárterhelés és a nagy dózisú antraciklin kezelés asszociált a késői szívproblémák miatti halállal [12].

2.2. A gyermekkori akut limfoid leukémiára való hajlam

2.2.1. Az akut limfoid leukémia kialakulásának környezeti okai

A gyermekkori akut limfoid leukémia kialakulásának okai még nem teljesen ismertek, de az biztos, hogy környezeti és genetikai tényezők egyaránt hozzájárulnak a betegség kialakulásához. A környezeti hatások leukemogén voltát nehéz meghatározni, a legtöbb esetben ellentmondó eredmények születtek. Fontos vizsgálni nem csak a gyermek, hanem a szülők (anya, ill. apa külön), a magzat, ill. újszülött kitettségét is a környezeti ártalmaknak.

A karcinogenitás szempontjából vizsgált környezeti tényezők egyike az ionizáló sugárzás (ide tartozik a radioaktív és a Röntgen-sugárzás is) és a nem ionizáló sugárzás (pl.: UV-sugárzás). A sugárzásról összességében elmondható, hogy növeli az ALL kialakulásának esélyét [26]. Bár a csernobili katasztrófa előtt, ill. után megbetegedetteket vizsgálva, nem találtak jelentős különbséget a két csoport létszámában [4].

Kemikáliák közül a szénhidrogéneket, pl.: benzin, triklór-etilén, benzol és a rovarirtó szereket vizsgálták. A szénhidrogének a háztartási festékekben, hígítókbán, oldószerekben is vannak, ill. a szülő munkahelyi környezetben szennyeződhet velük. A benzol egyértelműen rákkeltő, az ALL rizikóját is fokozza. A rovarirtó szerekkel kapcsolatban is mutattak ki ALL-re való hajlamosítást. A terhesség alatti alkohol, ill. marihuána fogyasztás is leukemogénnek bizonyult [26,27].

Az ALL kialakulásában meghatározó szerepet játszanak egyéb környezeti hatások, pl.: táplálkozási szokások, ill. az, hogy hányadik gyermek valaki. Az ALL-ről azt is feltételezik, hogy kialakulásának hátterében virális vagy bakteriális fertőzés, ill. az immunrendszer kóros működése áll [26,28]. Az immunrendszer megfelelő tanulmányának hiánya a gyermekkorban abnormális immunválasz kialakulásához vezethet a későbbi életkorban bekövetkező mikrobiális fertőzés esetén. Gyakrabban alakul ki ALL azoknál a gyermekeknél, akik csecsemő és kisgyermek korukban keveset tartózkodtak a többi gyerek társaságában, így kevésbé voltak kitéve mikrobiális fertőzéseknek. Ezt egy

tanulmányban Chang és munkatársai a bölcsődében töltött napok számával és azzal jellemezték, hogy van-e idősebb testvére, azaz hányadik gyermek az illető. Kaukázusi populációban az idősebb testvéreknél több esetben fordult elő ALL, mint a kisebb testvéreknél, és azok a gyermekek is védettebbek, akik több időt töltöttek bölcsődében. De ez utóbbi összefüggést nem lehetett megfigyelni észak-amerikai spanyolajkú gyermekeknél, aminek oka valószínűleg az, hogy ők már otthon is több gyermekkel vannak együtt és később mennek bölcsődébe [28].

Leukémiás egypetűjű ikrek vizsgálata alapján valószínű továbbá, hogy a betegség kifejlődése már a magzati életkorban megkezdődhet. Ez alatt a fejlődési szakasz alatt is jelentős a mutagének hatása a betegség kialakulására. Az MLL génfüzió a csecsemőkori limfoid leukémiás esetekben gyakori, és olyan másodlagos leukémia esetén, amikor topoizomeráz II gátlót adtak a betegnek korábban. Tehát a természetes, ill. mesterséges topoizomeráz II-re ható szerek, pl.: flavonoidok, katekinok, benzol metabolitok, ösztrogének leukemogénnek lehetnek a magzatban. De a Baygon nevű szúnyogriasztó szerről is leírtak leukémiát okozó hatást [6].

2.2.2. Az akut limfoid leukémia kialakulásának genetikai okai

A környezeti ártalmak mellett a betegség kifejlődésében a genetikai háttér is közrejátszik, és több genetikai változás is szükséges hozzá. Az ALL megjelenését az etnikum is befolyásolja, ami egyszerre a környezeti és genetikai háttér befolyásoló szerepére is utal.

A nem és a születési súly is befolyásolja a beteg sejtklón megjelenését. A fiúkban 25%-kal gyakoribb, mint lányokban, ez különösen igaz a T-sejtes ALL esetén, és a nagyobb születési súlyú gyermekek között is gyakrabban alakul ki a betegség. Bár kérdéses, hogy valójában a nagyobb születési súly vagy a nem hajlamosít ALL-re, mert a nem nemcsak a gyermekkori rák rizikójával, hanem a születési súllyal asszociál (a fiúk átlagban 150 grammal nagyobb súlyúak a lányoknál). További kérdés, hogy maga a születési súly a rizikófaktor, vagy van valami egyéb tényező a háttérben, ami a születési súlyt és a rizikót is befolyásolja [26,29].

A gyermekek érzékenyebbek lehetnek a környezeti toxinokra, mint a felnőttek, a nagyobb mértékű relatív expozíció, sejtosztódás és a kevésbé érett anyagcseréjük miatt. A folsavhiány miatt a DNS-be timin helyett uracil épül be. Ennek javítása közben kettős

szálú törések keletkeznek a DNS-ben, ami a transzlokációk, inverziók, deléciók kialakulásának esélyét növelik. A fentiek és a DNS hibajavító enzimek, transzkripciós faktorok hibás működése valóban gyaníthatóan közrejátszik leukémia vagy más ráktípus kialakulásában [30]. Ilyen módon, ill. kóros sejtosztódás útján létrejövő genetikai tényezők a kromoszómákat érintő számbeli és szerkezetbeli eltérések, például kromoszóma-transzlokációk miatt keletkező fúziós gének, amelyek aktív kinázokat vagy megváltozott transzkripciós faktorokat kódolnak, ill. hiperdiploidia vagy proto-onkogének aberráns expresszója. Az ALL citogenetikai osztályozása ezek alapján történik, prognosztikai jelentőségük is van (lásd 2.1 fejezet). Ezek miatt a sejt korlátlan osztódóképességű lesz, a normális kontroll alól kikerül [6,15,31,32]. A beteg sejtklon eredete többféle lehet. Kimutattak már a limfoblasztokra jellemző genetikai elváltozásokat leukémiásokból származó hematopoetikus őssejteken, endoteliális sejteken és mezenhimális őssejteken is [31].

A genetikai hátteret megerősítik azok az ikervizsgálatok, amelyek alapján, ha az egypetűjű ikerpár egyik tagja 7 éves kora előtt leukémiás lett, akkor a másikukban a betegség kétszer akkora valószínűséggel alakult ki, mint a átlagpopulációban [26]. A környezeti és/vagy genetikai ártalmak miatt a magzati élet során létrejött genetikai aberráció után a betegség kialakulásának időpontja változó. A TEL-AML1 transzlokáció jelenlétét kimutatták a betegség kialakulása előtt 5-10 évvel, újszülöttkorban eltett vércseppben is [17]. Az ekkor megjelent mutáció általában még nem okoz leukémiát, hanem másodlagos mutációk szükségesek a betegség kialakulásához, ezért ezt a fúziós gént hordozó ikreknél nagyon eltért a leukémia kialakulásának időpontja. A t(4;11)/MLL-AF4 génnel rendelkező ikreknél pár hónap alatt is kialakulhat a leukémia, ami arra utal, hogy ez a fúzió önmagában leukemogén [6,14,33].

A genetikai aberrációk mellett leukémiához vezethetnek epigenetikai, tehát olyan öröklődő változások, amelyeknél a DNS szekvenciájában nem történik módosulás. Ennek két fő típusa a DNS metilációs állapotát érintő és a hiszton módosítások, amelyek szintén vezethetnek a génexpresszió megváltozásához. Általában is elmondható, hogy a rákos sejtekben a DNS egésze hipometilált az egészséges sejtekhez képest, és a CpG szigetek aberráns metilációja figyelhető meg [34,35]. A transzlokációval keletkező fúziós gének epigenetikai szinten is okozhatnak

változásokat. Például a t(8;21) transzlokációval keletkező AML1-ETO gén többek között a DNS-metiltranszferáz 1 (*DNMT1*: DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 1) gén működését felerősíti, így a DNS-metilációjának módosításával is elősegíti a leukémia kifejlődését [34].

A mikroRNS-ek (miR-ek) működése is hozzájárulhat a leukemogenezishez. A miR-eknek fontos szabályozó szerepe van a normális élettani folyamatokban, a sejtek fejlődésében, apoptózisában, differenciációjában, proliferációjában, így a hematopoetikus sejtekében is. Megváltozott miR expressziót több különböző rák esetén leírtak. Bizonyos microRNS-ek onkogének vagy tumor szupresszor gének lehetnek. A *mir-17-92* policisztron, ami 7 microRNS-t kódol, onkogénként működhet. MLL fúziót tartalmazó leukémiás sejtekben a *mir-17-92* overexpresszióját írták le. Az itt kódolt miR-ek a normális hematopoézist gátolják, tehát fokozott expressziójuk leukémiás sejtek keletkezésének nyit utat. A miR-155 és a miR-196 overexpresszióját is leírták különböző leukémiákban. Transzgenikus egérben a miR-155 megnövekedett szintje esetén preleukémiás pre-B-sejt proliferáció történt, a miR-196 a hematopoetikus őssejtek proliferációját fokozza, miközben gátolja a differenciációjukat. A let-7 mikroRNS család tagjai tumor szupresszor gének, onkogének negatív regulátorai. Akut leukémia esetén downregulálódott let-7b, let-7c szintet találtak. A mikroRNS-ek megváltozott expressziója a túlélést is befolyásolhatja és korrelál az altípusokkal is [34].

Az immunrendszer hibás működésének lehet genetikai háttere is, így az ALL kialakulásához hozzájárulhat az immunrendszer működésében fontos gének megváltozott működése is. Az adaptív immunválaszban, pontosabban a Th1, Th2, regulátoros T sejtek, Th17 sejtek fejlődésében és működésében közreműködő gének polimorfizmusainak szerepét is vizsgálták ALL-es gyermekeknél. Az *IL12A* (interleukin 12A) gén egyik polimorfizmusa és a *CD28* (CD28 molecule), *FCGR2A* (Fc fragment of IgG, low affinity IIa, receptor), *GATA3* (GATA binding protein 3), *IL2RA* (interleukin 2 receptor, alpha), *STAT4* (signal transducer and activator of transcription 4), és *STAT6* (signal transducer and activator of transcription 6, interleukin-4 induced) gének bizonyos haplotípusa közrejátszik az ALL kialakulásában a gyermekek között eltöltött idő mellett [28,34].

A leukémia kialakulásával foglalkozó szakemberek többféle hipotézist is kidolgoztak a leukémia kialakulására. Az egyik a „populációs keveredés” hipotézis.

Eszerint különböző földrajzi területről származó populációk keveredésekor megnő a leukémia rizikója, mert a fertőző és a fertőzésre fogékony (még át nem esett, nem immunis) egyedek keverednek, és ha valamilyen, a leukémia kialakulására hajlamosító fertőzésről van szó, akkor ez növelheti az új esetek előfordulását.

A „késői fertőzés” hipotézis szerint a korai gyermekkorban kapott fertőzések hatására történik az immunrendszer normális fejlődése. Ha ebben valami hiba van, akkor a későbbi életkorban bekövetkező fertőzésre adott abnormális immunológiai válasz leukémia kialakulásához is vezethet [36].

A fentiekben sok hatást bemutattam, ami kisebb vagy nagyobb mértékben befolyásolhatja a gének működését. Az irodalomban több olyan asszociációs vizsgálat található, ahol egy vagy több gén és az ALL rizikója közötti kapcsolatot vizsgálták.

Számos génről leírták már, hogy befolyásolhatja a betegség megjelenését. Előfordulnak közöttük gyógyszermetabolizáló enzimeket kódoló gének pl.: citokróm p450 (CYP: cytochrome P450) család, *NQO1* (NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1), *GSTT1* (glutathione S-transferase theta 1), *GSTM1* (glutathione S-transferase mu 1), *GSTP1* (glutathione S-transferase pi 1) [5,30,37,38,39]. A folsav metabolizmus enzimeit kódoló géneket is többen vizsgálták, ezek pl.: *MTHFR* (methylenetetrahydrofolate reductase), *MTRR* (5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase reductase), *SHMT1* (serine hydroxymethyltransferase 1), *TYMS* (thymidylate synthetase). (Az *MTHFR*-t és az *MTRR*-t velőcsőzáródási rendellenességekkel is kapcsolatba hozták) [5,30,40,41,42,43,44]. DNS károsodást javító enzimek génjei, pl.: *ERCC2* és *ERCC5* (excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 2, ill. 5), *XRCC1* és *XRCC3* (X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 1 és 3), *CHEK2* (CHK2 checkpoint homolog; emlőrákkal kapcsolatban is vizsgálták), *ATM* (ataxia telangiectasia mutated), *OGG1* (8-oxoguanine DNA glycosylase), *MUTYH* (mutY homolog (E. coli)) és jelátviteli útvonalakban fontos, transzkripciós faktor és gyógyszer transzportban szereplő pl.: *SLC19A1* (solute carrier family 19 member 1, másnéven *RFC1*: reduced folate carrier 1) vagy ABC-transzporter gének [45].

Az asszociációs vizsgálatok eredményeit összefoglalja, összegzi egy meta-analízis, amit Vijayakrishnan és munkatársai végeztek el [30]. Ebben 47 korábbi jelölt gén asszociációs vizsgálat adatai alapján végeztek meta-analízist összesen 16 gén 25

polimorfizmusával. Az egyes polimorfizmusok esetén 2-17 tanulmányból 244-2770 ALL-es és 508-4713 kontroll genotípus gyakoriságait hasonlították össze. Az összesített elemzés alapján szignifikánsan hozzájárulnak az ALL kialakulásához a következő gének: *CYP1A1* (cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1), *CYP2E1* (cytochrome P450, family 2, subfamily E, polypeptide 1), *GSTM1*, *MTRR*, *SHMT1*, *XRCC1*, csak a B-sejtes csoportban: *GSTM1* [30].

Egyéb szindrómák, pl.: ataxia telangiectasia, Bloom-szindróma, Down-szindróma esetén is lehet gyakoribb az ALL [6,26].

Ma már az ALL kialakulásának genetikai hátterét vizsgálva genom szintű asszociációs vizsgálatokat (GWA: genome-wide association) is végeznek. A genom szintű asszociációs vizsgálat előnye az, hogy kevésbé függ az előzetes tudásunktól a kísérlettervezés, ezért valószínűleg nem hagy ki a vizsgálatból fontos, de odáig nem vizsgált kromoszóma szakaszokat [30,46]. Az egyik ilyen vizsgálatban az *IKZF1* (IKAROS family zinc finger 1) gén rs4132601 SNP-je jelentette a legerősebb rizikót B-sejtes ALL kialakulására. Ez a gén a limfocita differenciálódás és érés fontos regulátora, a CD4 vs. CD8 irányba történő elköteleződést irányítja. ALL-re való hajlamot okoz az *ARID5B* (AT-rich interactive domain 5B) gén rs7089424 és a *CEBPE* (CCAAT/enhancer binding protein, epsilon) rs2239633 SNP-je is. Az *ARID5B* az embriogenezisben és a növekedés regulálásában fontos transzkripció faktor, a *CEBPE* a mielopoezis regulátora [47]. Az *ARID5B* egy másik kutatócsoport eredményei alapján is befolyásolja az ALL megjelenését [48]. Mivel a GWA tanulmányokban kijött eredményt meg kell erősíteni független beteg és kontroll mintákon, ezért ugyanez a csoport összesen 1384 betegből és 1877 kontrollból álló angliai és német populáción is elvégezte az összehasonlítást. Az *IKZF1* rs4132601 és *ARID5B* rs7089424 polimorfizmusok szignifikánsan hajlamosítanak ALL-re mindkét populáción külön és az összesített populáción is. A *CEBPE* rs2239633 SNP csak a német és összesített populáción hajlamosított ALL-re [49].

2.3. Az ABC-transzporterek

Az ABC-transzporter családba tartozó proteinek a szervezet detoxifikálásában részt vevő transzmembrán fehérjék [50]. Jelen vannak minden szövetben és sejtípusban, és az endogén és xenobiotikus metabolitok széles skálájának szállítására képesek [51,52]. Működésük során ATP-t kötnek, ezt hidrolizálják, és a felszabaduló energia felhasználásával szállítják át a szubsztrátjaikat a sejtmembránon. Transzmembrán doménekből (TMD) - általában 6 vagy 5 transzmembrán régióval - és nukleotidkötő doménekből (NBD: nucleotide binding domain) állnak. Az egyes domének között intracelluláris linker régió (L) fordulhat elő. A legtöbbjük a sejtmembránban vagy sejtkompartimentumok membránjában helyezkedik el. A TMD-k és NBD-k elhelyezkedése egymáshoz képest többféle lehet; az általános modell: TMD0-L0-TMD1-NBD1-L1-TMD2-NBD2 [7,53,54].

Az ABC-transzportereknek fontos funkciójuk van az emlős szövetek xenobiotikumok elleni védekezésében. A bél epiteliális sejtjeiben levő ABC-transzporterek szerepe annak kivédése, hogy a xenobiotikumok a szervezetbe kerüljenek. A vesetubulusokban és a hepatociták epekapilláris felőli membránjában levők a drogok szervezetből való kiürítését végzik, az agyban, herében, méhlepényben található ezeket a szerveket és a magzatot védik az idegen anyagoktól.

A klinikumban a tumorok kezelése közben kialakuló multidrog rezisztens sejt fenotípus ezen transzporterek révén valósul meg [50]. Működésükkel nagyban befolyásolják a gyógyszerek felszívódását, eloszlását, metabolizmusát és kiürülését. Az ABC-transzportereknek nagy szerepe van a gyógyszer rossz felszívódásában és alacsony biológiai hozzáférhetőségében szájon át adagolt gyógyszereknél [55].

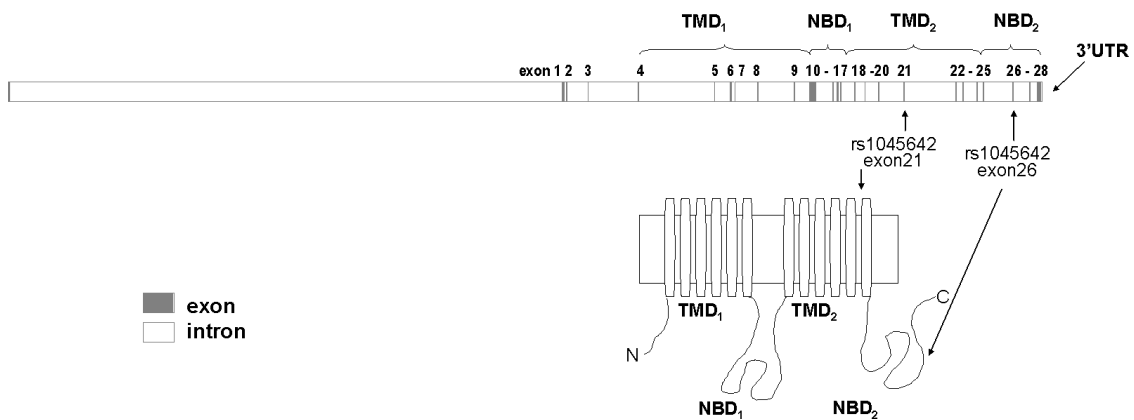
Több ABC-transzporter szubsztrátjai közé tartoznak az antraciklinek (ANT). A kemoterápiás kezelés során a sejtek antraciklin rezisztenssé válhatnak. A rezisztencia egyik lehetséges alapja az ABC-transzporterek expressziójának fokozódása. Ilyenkor a tumorsejtek olyan mértékben képesek a kemoterápiás szer kitranszportálására, hogy az intracelluláris gyógyszerkoncentráció a toxikus szint alá csökken. Ez is bizonyítja, hogy az ABC-transzporterek nagyon fontosak az antraciklinek kiszállításában. Károsodásuk esetén a szív jobban kitett az antraciklinek károsító hatásának [56]. Multidrog rezisztens sejtekben, ha az ABC-transzporterek működését az inhibitorokkal megakadályozták,

akkor a sejtben ismét akkumulálódott az egyik antraciklin, a doxorubicin. Ezáltal a sejtek ismét érzékenyek lettek a doxorubicinre [57].

A gének polimorfizmusai megváltoztathatják a gének expresszióját, szubsztrát felismerését, a transzporter aktivitását és működését [58]. Az általunk vizsgált ABC-transzporterek hasonlóak szubsztrátspektrumukban, funkciójukban ezért a szervezet kémiai védelmében együttes, kiegészítő szerepet töltenek be [55].

2.3.1. Az ABCB1

Az ABCB1 (ATP-binding cassette, sub-family B, member 1) az ABC-transzporter géncsalád B1-es génje, az első ABC-transzporter, amit megtaláltak, mint fehérjét, ami a gyógyszerrezisztenciát okozta multidrog-rezisztens tumoros sejtvonalakban [53]. Ebből származik korábbi neve is: multidrug resistance 1 (MDR1). Génje a 7q21 kromoszómaregióban található, a protein felépítése: TMD1-NBD1-L1-TMD2-NBD2 (lásd 1. ábra) [58].



1. ábra Az ABCB1 protein felépítése és az általunk vizsgált polimorfizmusok elhelyezkedése a génben, ill. proteinben.

Rövidítések: NBD: nukleotidkötő domén, TMD: transzmembrán domén

Az ABCB1 mindenhol expresszálódik a szervezetben. A sejtek apikális membránjában foglal helyet, a legnagyobb mértékben az intestinális sejtekben, vesekapillárisok epitheliális sejtjeiben, a placenta epitheliális sejtjeiben, a hepatociták

epekapilláris felőli membránjában expresszálódik. Az egyes limfocita csoportokon és a CD34+ hematopoetikus őssejteken is kifejeződik [59,60,61,62].

Számos szubsztrátja van, különböző hidrofób és amfipatikus molekulák, méretben az ionoktól a kis peptidekig. Szállít proteáz inhibitorokat, immunszuppresszánsokat, szteroidokat, sztatinokat, antihisztamint, egyéb gyógyszereket. Ide tartoznak a természetes eredetű xenobiotikumok, a sejt metabolitjai, több kemoterápiás gyógyszer is az ALL kezelési protokolljában alkalmazottak közül és rovarirtó szerek [59,63,64]. A bélben, erekben a szubsztrátjainak felszívódása ellen dolgozik, a szállítása a bél, erek lumenébe történik. A májsejtek, ill. vesetubulusok sejtjeiben szubsztrátjainak az epén, ill. vizeleten keresztüli kiválasztásában szerepel, a vér-szövet gátak kialakításában fontos.

Fiziológiás funkciója sokrétű. Szállítja a már említett toxinokat, így a védelemben fontos. A lipidek, koleszterin szállításában is részt vesz. Szerepe lehet az apoptózis regulálásban, mert sok apoptózis indukáló szer ellen rezisztenciát biztosít, így megakadályozva a sejt pusztulását. Szállít citokineket, főleg interleukinokat (IL-2, IL-4) és interferon-gammát, így az immunválasz kialakulásában is részt vesz. Az NK-sejtek és citotoxikus T-sejtek funkciójának, ill. az antigén bemutatásának a szabályozásában is részt vehet. A hematopoetikus őssejtekre kifejtett hatása lehet az önmegújítás fokozása és a differenciáció csökkentése [59,65].

Genetikai változások az *ABCB1* génben a transzporter működésének megváltozását okozhatják, így a szervezet toxinok elleni védekezése csökkenhet, a tumorok keletkezésének esélye nőhet [59,64]. Az *ABCB1* gén több genetikai polimorfizmusát leírták már [58,66], ezek közül a leggyakrabban vizsgált az 3435C>T (Ile1145Ile, rs1045642) szinonim, azaz aminosav cserét nem okozó SNP a 26-os exonban. Erről az SNP-ről leírták, hogy az *ABCB1* megváltozott duodenális expresszióját, transzporter-aktivitását és szubsztrát-specifitását okozza [66,67]. Az SNP kapcsolt más SNP-kkel, például a 2677 G>T/A (rs2032582) polimorfizmussal, ami az exon 21-ben van, és Ala893Ser cserét okoz [68,69,70]. Az SNP jelenléte esetén csökkent transzporter-aktivitást ítak le. Már sokan vizsgálták a polimorfizmusoknak a hatását a protein expressziójára, aktivitására, farmakokinetikai tulajdonságaira és tumorigenezisben betöltött szerepére [59,64]. Bár ellentmondóak az eredmények, a 3435C>T allélcseré valószínűleg csökkenti az *ABCB1* expressziót, megváltozott

szubsztrátspecificitást és tumorokra való fokozott hajlamot eredményez [71]. Az ABCB1 kapcsolt polimorfizmusainak és az ABCB1 mRNS szintnek az összefüggését vizsgálták Wang és csoportja. Az mRNS szint csökkenését írták le, de ezt nem a transzkripciójának megváltozása, hanem az mRNS stabilitásának csökkenése okozta. Különböző haplotípusú plazmidokkal expresszált fehérjékkel kimutatták, hogy a 3435T allél felelős az mRNS stabilitásának csökkenéséért. Az különböző haplotípusú mRNS-ek foldingja eltérő volt, más térszerkezetet eredményezett [72].

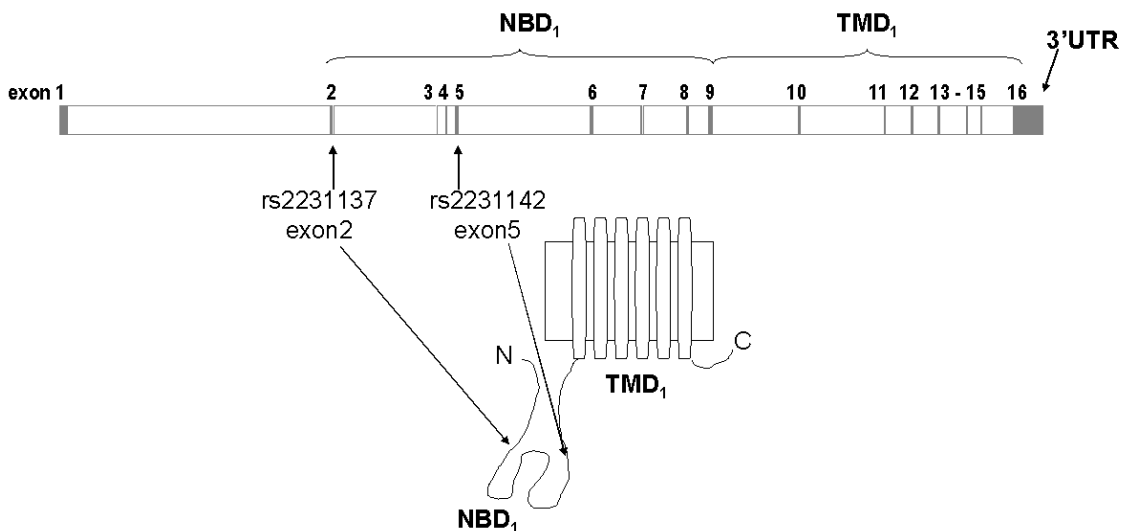
Ezt az eredményt kiegészíti a Kimchi-Sarfaty és csoportja által leírt megfigyelés. Ők megváltozott szubsztrátspektrumot írtak le a variáns allél jelenlétekor olyan haplotípusban, ami tartalmazta a 3435T allélt (C1236T-G2677T-C3435T). Ezt a fehérje megváltozott átíróadási sebessége miatt kialakuló eltérő térszerkezetére vezetik vissza. A 3435T allél esetén az eredeti ATC kód helyett ATT van a DNS-en. Mindkettő izoleucint kódol, de ha az mRNS ritka kodont tartalmaz, ez befolyásolja az átírás sebességét és így a fehérje foldingját. Erre legnagyobb hatása a kodon harmadik nukleotidjának van. Nagy mennyiségű ABCB1 szintézise esetén a ritka kodon használatának lassító hatása még inkább érvényesülhet, főleg ha a megfelelő tRNS tartalék kiürült. A 2677 pozícióban levő SNP GCT (Ala) - TCT (Ser) nukleotid, ill. aminosavcserét okoz, ami szintén egy ritkább kodon (26% helyett 18%). A 3435 pozícióban levő SNP esetén a kodonhasználat 47%-ról 35%-ra csökken [67].

A polimorfizmusok a gyógyszerek felszívódását is befolyásolhatják [73].

Az *ABCB1* tumorokra, hematológiai betegségekre hajlamosító szerepét sok tanulmány vizsgálta már. Az *ABCB1* 3435C>T polimorfizmus fokozta a vesekarcinóma, vastagbélrák, colitis ulcerosa kialakulásának esélyét [71,74]. Hematológia betegségekre való hajlammal kapcsolatban a végzett kevés tanulmány eredménye nem mutat egyértelmű irányt. Több hematológiai betegség kimenetelét is befolyásolják az *ABCB1* gén polimorfizmusai [59].

2.3.2. Az ABCG2

Az *ABCG2* (ATP-binding cassette, sub-family G, member 2) az ABC-transzporter géncsalád G2-es génje, másnéven *BCRP* (breast cancer resistance protein). Ezt az ABC-transzportert először úgy írták le, mint egy transzporter, ami az ABCB1-től független drogrezisztenciát okoz humán emlőrák sejteken [75]. Génje a 4q22 kromoszómaregióban található, a kódolt protein egy N-terminálisan elhelyezkedő NBD-ből és egy TMD-ből áll (lásd 2. ábra). Ez egy „fél-transzporter”, ami működéséhez homodimert képez [51,53,55]. Nagy hibrofób negatív, ill. pozitív töltésű, eltérő szerkezetű molekulákat szállít, köztük citosztatikumokat és a környezetben előforduló toxinokat is [55,76]. Az ABCG2 túlnyomó többségben a vékonybélben, a májban és a placentában található, de kimutatták jelenlétét a vesében, őssejteken is, a hasnyálmirigy Langerhans-szigeteiben, az izomban, a tüdőben, a vér-agy gátban, szívben a mellékvesében, a verejtékmirigyekben, az erek és kapillárisok endotheliumában. Polarizált sejtek esetében az apikális membránban található. A májban a hepatociták epekapilláris felőli membránjában (apikális rész), a bélben az epithelialis sejtek lumen felé eső részén, placentában a syncytiotrophoblast plazmamembránjában helyezkedik el [55].



2. ábra Az ABCG2 protein felépítése és az általunk vizsgált polimorfizmusok elhelyezkedése a génben, ill. proteinben.

Rövidítések: NBD: nukleotidkötő domén, TMD: transzmembrán domén

Az ABCG2 fiziológias funkciója nem teljesen ismert, de valószínűleg fontos az őssejtek védelmében, szabályozásában, a hipoxiás állapot elleni mechanizmusokban és a toxinok intracelluláris felhalmozódásától való védelemben is [55]. Korlátozza a toxikus anyagok, ill. egyéb szubsztrátjai felszívódását a bélben, fokozza epébe történő exkrécióját a májban, és így csökkenti a biológiailag hozzáférhető drog mennyiségét és részt vesz a vér-agy gát kialakításában, a magzat védelmében. Hozzájárulhat az endogén szteroidok és/vagy glukuronidok hepatobiliáris exkréciójához is [77].

Fontossága abban is megnyilvánul, hogy az expressziója a hematopoetikus őssejteken nagyobb, mint az ABCB1-é, az elköteleződött sejteken viszont már downregulálódik. Ez arra utal, hogy fontos szerepe van az őssejtek védelmében. Egyes érett sejteken újra expresszálódhat. Az őssejtek érését is befolyásolhatja azáltal, hogy a differenciációhoz szükséges anyagokat kiszállítja, így a sejt nem indul el az elköteleződés irányába. A sejtek védelmében fontos az is, hogy alacsony oxigénszint esetén a sejt normális hem homeosztázisát fenntartja [75]. Az ABCG2 gén polimorfizmusai közül a két gyakrabban vizsgált SNP a második exonban lévő +34G>A Val12Met (rs2231137) aminosavcserét és az ötödik exonban található +421C>A, Gln141Lys (rs2231142) aminosavcserét okozó polimorfizmus [78,79].

A polimorfizmusok funkcionalitását vizsgálva kimutatták, hogy mindkét variáns esetében csökkent a protein expressziója és a gyógyszerrezisztencia [79]. Humán mintákban az ABCG2 intestinális expressziója nem függött az mRNS szintjétől [80]. A drogrezisztencia tizedére csökkent a vad típusú proteinhez képest, a drogakkumuláció 2-3-szorosára fokozódott, és csökkent efflux volt mérhető. Ennek hátterében az áll, hogy az ABCG2 34G>A polimorfizmus esetén az transzporter apikális membránba való beágyazódása károsodott, az ABCG2 421C>A esetén a fehérje ATP-áz aktivitása csökkent [81]. Az ABCG2 421C>A polimorfizmus csökkent proteinfunkciót eredményez, ezért feltételezték ez SNP szerepét hematológiai betegségekben, köztük az ALL-re való hajlamban [82]. A polimorfizmus befolyásolhatja gyógyszerek farmakokinetikáját is [83].

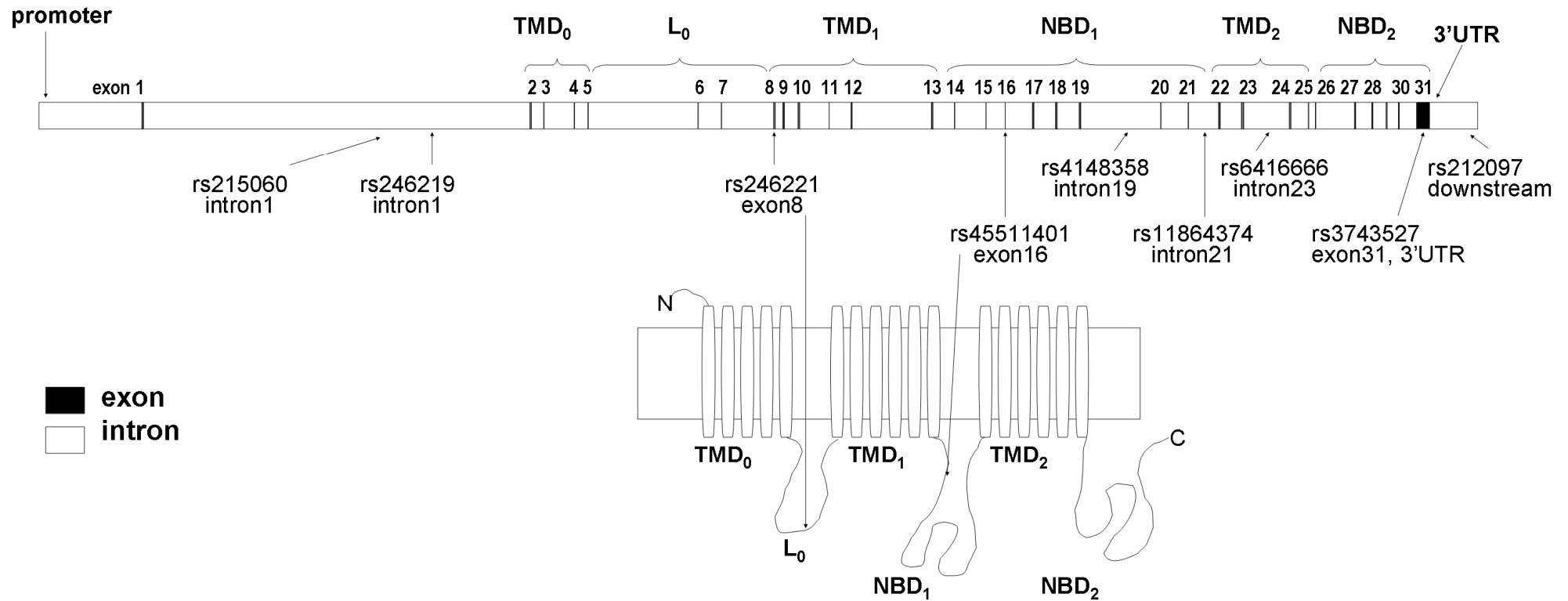
2.3.3. Az ABCC1

Az *ABCC1* (ATP-binding cassette, sub-family C, member 1) az ABC-transzporter géncsalád C1-es génye, másnéven *MRP1* (multidrug resistance-associated protein 1) egy 1531 aminosavból álló fehérje, aminek génye a 16p13.1-es kromoszómarégióban található. Felépítésére jellemző: TMD0-L0-TMD1-NBD1-TMD2-NBD2 (lásd 3. ábra) [51,84].

Minden szövetben expresszálódik, a legnagyobb mértékben a tüdőben, herében, vesében, szívben és placentában. Ennél alacsonyabb az expresszió az intestinális sejtekben, vastagbélben, agyban és a fehérvérsejtekben. A májban nagyon alacsony az expressziója. A szövetekben nem egyenletesen expresszálódik, hanem elsősorban a kifejezetten barrier funkciójú, ill. osztódó fázisban levő sejtekben fejeződik ki. A sejtekben elsősorban a plazmamembránban található, de intracellulárisan is előfordul az endocitotikus vezikulákban, lizoszómákban, transz-Golgi vezikulákban. Ez a plazmamembránon keresztüli kiszállításon túl egy másik detoxifikáló lehetőséget biztosíthat vagy intracelluláris ABCC1 rezervoárként működhet, és innen gyorsan kikerülhet a sejtfelszínre a transzporter [51,84].

Ellentétben az ABCB1, ABCG2 proteinekkal, polarizált sejtekben elsősorban a bazolaterális membránban helyezkedik el, például a vér-agy gátban, a vér-cerebrospinális folyadék gátban, a placentában, a vér-here gátban. Viszont az agyi kapillárisok endoteliális sejtjeiben az apikális membránban található. A bazolaterális elhelyezkedés arra utal, hogy az ABCC1 nem elsősorban a káros anyagok szervezetből való eltávolításában szerepel, hanem a sejteket védi a toxikus hatástól. A vér-szövet gátokban pedig hozzájárul a barrier funkció kialakításához [84].

Az ABCC1 ABC-transzporter szubsztrátspecifitása nagyon tág, hidrofób vegyületeket és glutation (GSH), glukuronát és szulfát konjugátumokat is szállít, többek között a daunorubicint és a doxorubicint is. Működéséhez szükséges glutation jelenléte, ettől függ a szállítás, ill. elősegíti azt. Az egyike azon transzportereknek, amelyek képesek a drog-glutacion konjugátumokat kiszállítani a sejtéből [50,85]. Bizonyos hidrofób vegyületek (pl.: vinkrisztin) és a glutacion kölcsönösen serkentik egymás transzportját. Más vegyületek effluxához szükséges a glutacion, de ezek nem hatnak a GSH-transzportra, ilyen például a daunorubicin [50,84].



3. ábra Az ABCC1 protein felépítése és az általunk vizsgált SNP-k elhelyezkedése a génben, ill. a proteinben.

Rövidítések: L: linker régió, NBD: nukleotidkötő domén, TMD: transzmembrán domén, UTR: nem átíródó régió

Az ABCC1-nek több funkciója is van. Részt vesz a xenobiotikumok és toxikus metabolitok elleni védekezésben, a leukotrién-mediálta gyulladáshoz való válaszban és az oxidatív stressz elleni védekezésben. Az antraciklinek elleni védekezésben betöltött szerepének fontosságára utal az is, hogy először egy doxorubicinnel szelektált multidrog-rezisztens sejtvonalban írták le [51,84]. Az oxidatív stressz elleni védelemben is fontos szerepe van. Az oxidatív stresszben a sejt glutation segítségével redukálja a reaktív oxigénradikálokat, miközben glutation-diszulfát (GSSG) keletkezik. A GSSG-t az ABCC1 szállítja ki a sejtéből, amikor a GSSG szint túl magas lenne. Az oxidatív stresszbeni szerepéhez hozzájárul a glutation-konjugátumok exportálása a sejtéből. Több xenobiotikum kijuttatásához szükséges glutation, pl.: vinkrisztin, daunorubicin [84].

Doxorubicin kezelés hatására az *Abcc1* expresszió megnőtt egér szívizom szövetében [86] és az *Abcc1* gént overexpresszáló transzgénikus egérmodellben nem alakult ki az antraciklinek hatására kardiotoxicitás [87]. Az ABCC1 transzporter antraciklin rezisztenciát tud okozni [88].

Az *ABCC1* gén polimorfizmusainak szerepéről kevés ismeret áll rendelkezésre. Egy vizsgálatban egészséges önkéntesekben a gént szekvenálták, polimorfizmusokat keresve, és az ABCC1 mRNS szintet is meghatározták. Az átlagos expressziós szinthez képest adták meg az adott genotípusú egyének mRNS szintjét. Azonosították az általunk is vizsgált rs2426221 (exon 8, 825C>T, V275V) és rs45511401 (exon 16, 2012G>T, G671V) polimorfizmusokat, és körülbelül felére csökkent mRNS szintet találtak a polimorfizmust hordozókban [89].

Egy tanulmányban aminosavcserét okozó polimorfizmusok és az mRNS szint kapcsolatát vizsgálták, de egyik SNP sem befolyásolta a keletkező mRNS szintjét [90]. Mások szintén az *ABCC1* 10 nem szinonim SNP-jének expresszióját és funkcionalitását vizsgálták egy sejtvonalon. Mi ezek közül a Gly671Val aminosavcserét okozót genotipizáltuk. Egyedül az Ala989Thr aminosavcsere okozott csökkenést az egyik szubsztrát transzportjában [91]. Az *ABCC1* gén szekvenálásával összesen 71 polimorf régiót találtak. A funkcionalitásukat in silico módszerekkel jósolták. A funkcionálisnak jósolt eltérések alacsony allélfrekvenciájúak voltak, ami arra utal, hogy ezek valóban megváltoztathatják a transzporter működését, és ezért negatív szelekciós nyomás alatt vannak [92]. Az *ABCC1* gén expressziójától függhet az ALL kimenetele is [93].

A szakirodalomban egy tanulmány ismert, ami az *ABCCI* rs3743527 polimorfizmus szerepét vizsgálta. Wang és csoportja az *ABCBI* és *ABCCI* gének 5' és 3' nem átíródó régiójában (UTR: untranslated region) található polimorfizmusok tüdőrák kialakulásában betöltött szerepét kereste kínai populáción. Mindkét gén egy-egy SNP-je hajlamosított a betegség kialakulására, de ők nem az *ABCCI* rs3743527 SNP-vel, hanem az ettől kb. 300 bázispárryira levő rs212090-vel kaptak összefüggést [94].

2.3.4. Az ABC-transzporterek az akut limfoid leukémia kialakulásában

Feltételezhető, hogy az ABC-transzporter családba tartozó fehérjék genetikai okokra visszavezethető hibás működése, megváltozott szintje is hozzájárulhat az ALL kialakulásához, mert fiziológus szerepük a szervezet védelme a xenobiotikumoktól. A transzporter gének genetikai különbségei miatt csökkenhet a fehérje aktivitása és az így megnövekedett karcinogén-expozíció vezethet betegség kialakulásához [8,59].

Az *ABCBI* gén polimorfizmusainak szerepét a gyermekkori ALL kialakulásában már többen vizsgálták, de egymásnak ellentmondó eredmények születtek. Néhány tanulmány az *ABCBI* 3435TT genotípusú egyének ALL-re való fokozott hajlamát írta le pl.: Jamroziak és munkatársai, akik 113 kaukázusi beteget és 175 egészséges kontrollt vizsgálva mutatták ki ezt az összefüggést [8].

Szintén az *ABCBI* gén ALL-rizikóban betöltött szerepét vizsgálta Hattori és csoportja [95]. A gén 5'UTR régiójában 3 promoter polimorfizmust (-2352G>A, -934A>G, -692T>C) és a kódoló régióban a 3435C>T polimorfizmust vizsgálták. Az *ABCBI* 2352A allél és 3435TT genotípus hajlamosító szerepét állapították meg japánokban 157 beteg és 96 kontroll összehasonlításával. Ebben a tanulmányban a gén egyik haplotípusával is összefüggést írtak le, de ez nem tartalmazta a 3435 pozícióban levő polimorfizmust, mert csak a promoter polimorfizmusok alapján meghatározott haplotípusokat vizsgálták [95].

Nem találtak összefüggést az *ABCBI* gén polimorfizmusai (-129T>C (rs3213619), 1236C>T (rs1128503), 2677G>T/A, 3435C>T)) és az ALL kialakulása között 294 Kaliforniában élő észak-amerikai spanyolajkú, ill. 135 nem spanyol származású betegben. A 3 kódoló régióban levő polimorfizmus (C1236T-G2677T/A-C3435T) által alkotott haplotípusok közül egyik sem hajlamosított ALL-re. Viszont a CGC haplotípusú gyermekek védettebbek voltak a rovarirtó szerek leukemogén

hatásával szemben, mint az összes többi haplotípusú gyermek. A hiperdiploid ALL-eket külön elemezték és azt találták, hogy az *ABCB1* gén egyes genotípusai és haplotípusa erősen asszociál hiperdiploid ALL kialakulásával. A 3435TT genotípus és a 1236T-2677T-3435T haplotípus asszociált az ALL fokozott rizikójával [67].

Mexikói ALL-es populáció eredményei is azt erősítik meg, hogy az *ABCB1* polimorfizmus önmagában nem hajlamosít ALL-re [96]. Az *ABCG2*-transzporter szerepét az ALL rizikójában előttünk senki sem vizsgálta.

2.4. A farmakogenetika

Az 1950-es években dokumentálták először, hogy a gyógyszerek hatásában mutatkozó különbségek okaiért öröklött tényezők is felelősek, ezzel megindítva a farmakogenetikai kutatásokat [97]. Megfigyelték, hogy különböző emberek eltérő módon reagálnak ugyanarra a gyógyszeres kezelésre és ez az eltérés gyakran nagyobb a populáció egyes tagjai között, mint egy egyénen belül különböző időpontokban. A gyógyszeres kezelés hatását befolyásolja az életkor, szervfunkció, kísérő terápia, droginterakciók, a betegség természete, a nem, de a gyógyszerekre adott válasz különbségének 20-95. -ban genetikai oka van. A legtöbb droghatást számos géntermék kölcsönhatása határozza meg, ezek befolyásolják a gyógyszer farmakokinetikáját és farmakodinamikáját. Különbségek lehetnek a targetmolekulákat, transzporter-molekulákat, metabolizáló enzimeket kódoló génekben, és a variánsok között előfordulhat olyan, ami befolyásolja a gyógyszer hatását, a peptidkötést, felszívódást, disztribúciót, metabolizációt, kiválasztást és így klinikailag szignifikáns. A farmakogenetika és a farmakogenomika az öröklődés szerepét kutatja a gyógyszerekre adott reakció interindividuális különbségeiben [98]

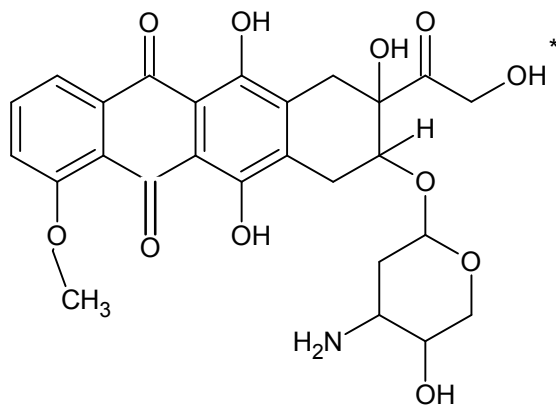
A farmakogenetika egyes genetikai variációkra fókuszál, míg a farmakogenomika genom szintű megfigyeléseket végez. Sok esetben nem elég egyetlen genetikai polimorfizmust vizsgálni, mert pl.: az anyagcsere-enzimek legtöbb variáns formája csak kis mértékben tér el a vad típusútól, de több polimorfizmus kombinációja egy anyagcsere-útvonalon belül már jelentős mértékben befolyásolhatja a terápiás választ [99]. Kapcsolt gének esetében haplotípus meghatározása is fontos, mert a haplotípus struktúra gyakran jobban jelzi a lehetséges fenotípusos következményeket, mint az egyes polimorfizmusok.

A farmakogenetika az egyéni variációkat felhasználva lehetőséget ad a személyre szabott gyógyszerelésre: a megfelelő gyógyszer, megfelelő dózis beállítására, ezzel növelve a kezelés hatékonyságát és csökkentve a toxicitást, mellékhatásokat [100]. Ez azoknál a gyógyszereknél különösen fontos, amelyeknek szűk a terápiás indexük, azaz viszonylag kicsi a különbség a toxikus és a terápiás dózis között, vagy amelyeknek esetében nagy interindividuális különbség van a hatás vagy a mellékhatások tekintetében és ezeket nem lehetne egyénenként megfigyelni ill. nincs más terápiás lehetőség. A fentiek igazak a kemoterápiás szerekre és a daganatos megbetegedések súlyos kimenetele miatt is fontos az onkológiában a farmakogenetika alkalmazása.

2.5. Az antraciklinek okozta kardiotoxicitás farmakogenetikai vizsgálata

Az antraciklinek közül a doxorubicin és daunorubicin természetes vegyületek, amelyeket először mint antibiotikumokat, a *Streptomyces peuceticus* var. *caesius* aktinobaktérium törzsből izolálták. A doxorubicin szerkezeti képletét a 4. ábrán jelenítettem meg. A daunorubicin ettől annyiban különbözik, hogy a csillaggal jelölt –OH csoport helyén egy –H van. A leghatékonyabb rákellenes szerek közé tartoznak, a gyógyszer használatának bevezetése hozzájárult a túlélés 80%-ra való növekedéséhez. A daunorubicint elsősorban hematológiai betegségek, pl.: leukémiák, limfómák, a doxorubicint szolid tumorok, pl.: karcinómák, szarkómák kezeléséhez használják [101,102]. Magyarországon a BMF protokollokkal kezelt ALL-es gyermekek mind a kettőt kapták [103].

Alkalmazásukat korlátozza, hogy a szívizomsejteket nagymértékben károsítják. Ennek patofiziológiája még nem teljesen ismert, de valószínű, hogy az alapvegyület és a metabolitjai is kardiotoxikusak [102]. A gyermekkori rák túlélői között 8-szoros gyakoriságú a szívproblémák miatti halálozás [104].



4. ábra: A doxorubicin képlete.

Daunorubicin esetén a csillaggal jelölt –OH csoport helyén egy –H van.

2.5.1. Az antraciklinek anyagcseréje

Az antraciklinek farmakokinetikáját az adagolás módjától függően általában két- vagy háromkompartmentes modellel írják le. A gyógyszer kiürülése nagy intra- és interindividuális különbségeket mutat. A szervezetben töltött idő fontos mind a toxicitás kialakulása, mind a hatás kifejtése szempontjából [102]. Az antraciklinek lipofil vegyületek, ezért a plazmamembránon való átjutásuk passzív diffúzióval történik [105].

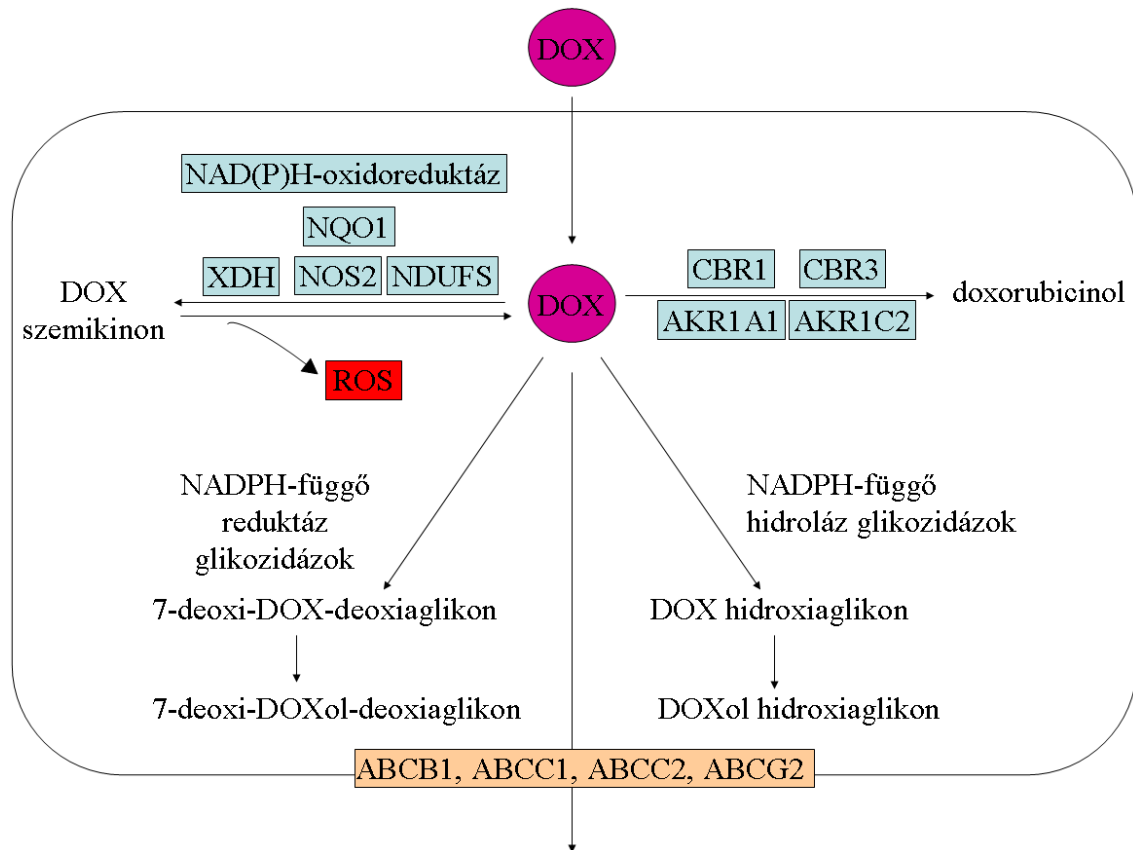
Anyagcseréjüket a doxorubicin példáján szeretném bemutatni (5. ábra). Emberben a szervezetbe került doxorubicin 50%-a változatlan formában kiürül. A fennmaradó mennyiség három úton metabolizálódhat [102].

Az antraciklinek anyagcseréjének fő útja során az eredeti vegyületből két elektron felvételével szekunder alkohol, doxorubicinol, ill. daunorubicinol keletkezik. Ezt a reakciót a citoplazmatikus NADPH-függő oxidoreduktázok katalizálják: karbonil-reduktáz 1 (CBR1: carbonyl reductase 1) és karbonil-reduktáz 3 (CBR3: carbonyl reductase 3), az aldo-keto reduktáz család 1 A1-es génje (AKR1A1: aldo-keto reductase family 1, member A1) és az aldo-keto reduktáz család 1 C2-es génje (AKR1C2: aldo-keto reductase family 1, member C2). Az antraciklin-alkohol metabolitok a plazmában keringenek, az eredeti gyógyszermolekulához hasonló a féléletidejük, de tumorellenes aktivitásuk nincsen [102,106].

A másik anyagcsere út során az antraciklinek C gyűrűjének kinon csoportja egy elektron felvételével redukálódik, így szemikinon keletkezik belőle, számos oxidoreduktáz segítségével. Ezek között vannak citoszolikus enzimek, pl.: NQO1, xantin-dehidrogenáz (XDH: xanthine dehydrogenase), indukálható nitrogén-monoxid szintetáz (NOS2: nitric oxide synthase 2, inducible) és mitokondriális enzimek, pl.: a NAD(P)H oxidoreduktáz multienzim komplex, a NDUFS (NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 1). A szemikinon gyök rögtön egy elektront átad az oxigénnek, így gyorsan visszaalakul kinonná, miközben az oxigénből reaktív oxigén gyökök keletkeznek [101,102,107,108,109].

A harmadik módon az antraciklinek 1-2%-a deglikoziláció során hidroxiaaglikonná vagy dezoxi-aglikonná alakul. A reakció a NADPH-függő hidroláz és reduktáz típusú glikozidázok működésével megy végbe. Keletkezik doxorubicin-hidroxiaaglikon, doxorubicinol-hidroxiaaglikon, illetve 7-dezoxi-doxorubicin-aglikon vagy 7-dezoxi-doxorubicinol-aglikon [101,102].

Eliminációjuk az ABC-transzporterek segítségével történik. Ezért a sejten belüli antraciklin szint fő meghatározója a transzporterek működése [110].



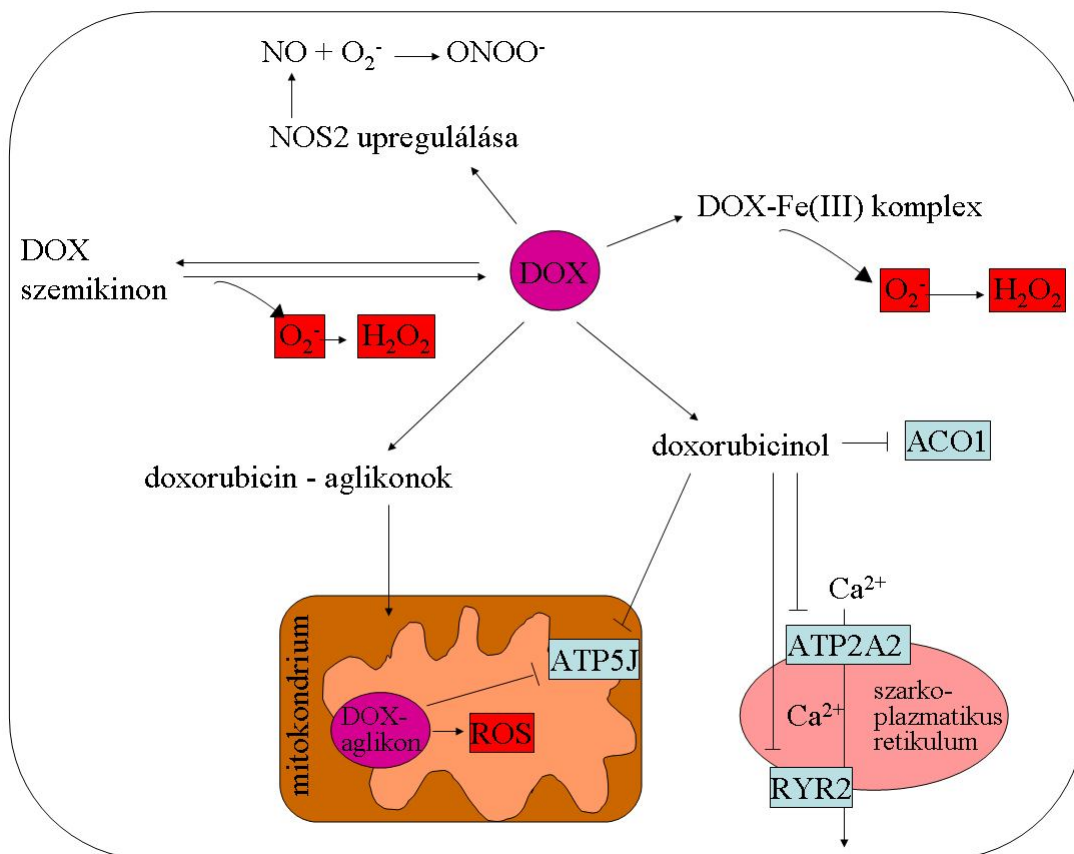
5. ábra: Az antraciklinek anyagcseréje

Rövidítések: ABCB1: ATP-binding cassette, sub-family B, member 1, ABCC1: ATP-binding cassette, sub-family C, member 1, ABCC2: ATP-binding cassette, sub-family C, member 2, ABCG2: ATP-binding cassette, sub-family G, member 2, AKR1A1: aldo-keto reductase family 1, member A1, AKR1C2: aldo-keto reductase family 1, member C2, CBR1: carbonyl reductase 1, CBR3: carbonyl reductase 3, DOX: doxorubicin, DOXol: doxorubicinol, NDUFS: NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 1, NOS2: nitric oxide synthase 2, inducible, NQO1: NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1, ROS: reaktív oxigén gyökök, XDH: xanthine dehydrogenase

2.5.2. Az antraciklinek hatásmechanizmusa

A kiemelkedő klinikai felhasználás mellett még ma sem lehet pontosan tudni, hogy hogyan fejtik ki az antraciklinek a tumorelles hatáukat. Az antraciklin-indukált kardiotoxicitás patofiziológiája sem teljesen ismert, de több mechanizmusról feltételezik, hogy közrejátszik a károsító hatásban. A kardiotoxicitást okozó hatások a tumorelles hatások is valószínűleg. A folyamatok feltehetőleg egymást erősítik, és a korai toxicitás hozzájárul a betegség későbbi kialakulásához [111].

Az antraciklinek egyik hatásmechanizmusa a reaktív oxigén gyökök képzése, ami többféle úton lehetséges. Az enzimátikus úton keletkező szemikinton spontán visszaalakulása során először szuperoxid-anion, majd ebből hidrogén-peroxid keletkezik (6. ábra) [101,102].



6. ábra: Az antraciklinek hatásmechanizmusa

Rövidítések: ACO1: aconitase 1, ATP2A2: ATPase, Ca⁺⁺ transporting, cardiac muscle, slow twitch 2, ATP5J: ATP synthetase NOS2: nitric oxide synthase 2, inducible, ROS: reaktív oxigén gyökök, RYR2: ryanodine receptor 2

Antraciklin-vas komplexek keletkezésekor az antraciklinek vas ionokkal reagálnak, és ez katalizálja a reaktív oxigén gyökök keletkezését. A fent említett módon keletkező szuperoxid-anion feltételezések szerint a ferritinből felszabadítja a Fe^{2+} -iont, miközben Fe^{3+} -ionná alakítja. Az így jelen levő Fe^{3+} -ionokkal az antraciklin komplexet képez, amiben a vas oxidációs állapota oxigén jelenlétében állandóan változik, miközben szuperoxid-anion, ill. hidrogén-peroxid képződik [11,101,102,112,113].

Az antraciklinekről feltételezik továbbá, hogy a mitokondriumba bejutva hozzákapcsolódnak a mitokondrium belső membránjában található kardiolipinhez, így a légzési láncot gátolják. Az antraciklin-aglikonok nagyobb lipofilicitásuk miatt a mitokondriális membránhoz jobban kötődnek, mint az eredeti vegyület, és itt keletkeznek a hatásukra a reaktív oxigén gyökök. A szívizomsejtek ATP-szintézisét is gátolhatják a génexpresszió gátlásával [11,102].

A doxorubicin a nitrogén-oxid termelést is fokozhatja az indukálható nitrogén-monoxid szintetáz (NOS2) up-regulálása révén. Az egyidejű szuperoxid és nitrogén-oxid túltermelés reaktív nitrogén gyökök, pl.: peroxi-nitrit (ONOO^-) képződéséhez vezethet [102].

A doxorubicinol akkumulálódik a szívizomban és egy antraciklin rezervoárt alakíthat ki, ami a szívet hosszú távon károsíthatja. Ezért az alkohol metabolitok a késői kardiotoxicitás kialakulásában játszhatnak szerepet. Ezek a szekunder alkoholok az eredeti vegyületnél hatékonyabban gátolják a mitokondriális ATP szintézist végző ATP szintáz (ATP5J: ATP synthetase, H^+ transporting, mitochondrial Fo complex, subunit F6), a szarkoplazmatikus retikulum Ca-pumpáját: Ca^{2+} -ATP-áz (ATP2A2: ATPase, Ca^{++} transporting, cardiac muscle, slow twitch 2) és Ca^{2+} -csatornáját (RYR2: ryanodine receptor 2). Ezzel a doxorubicin a mitokondriumok Ca-raktározását is gátolja. A doxorubicinol gátolja az akonitáz (ACO1: aconitase 1) is, egy vas-homeosztázisban fontos fehérjét is [101,102].

Mindezek a folyamatok hozzájárulnak az antraciklinek okozta DNS, foszfolipid, tiol-tartalmú fehérjék károsításához, lipid-peroxidációhoz és a tiol-tartalmú fehérjék szintjének a csökkenéséhez [11].

Emellett feltételezik, hogy az antraciklinek a DNS kettős spiráljába interkalálódnak, így meggátolva a DNS-szintézist. Gátolják a topoizomeráz II-t, és így apoptózist indukálnak. Ez a két utóbbi hatás a legismertebb nézet a tumorelles

hatásban. A nagy kardiotoxicitásuk ellenére az antraciklin-alkohol vegyületek nem ennyire hatékonyak a tumorsejtek elleni védelemben. A topoizomerázt kevésbé gátolják, és a sejthalált kevésbé indukálják [111,112].

Az antraciklinek által létrehozott toxicitás valószínűleg minden sejtet érint, de a gyorsan osztódó sejtek az ártalmas hatást valószínűleg könnyebben ki tudják védeni. A szívizomsejtek lassan vagy egyáltalán nem osztódnak, a szív normális szerkezetét inkább hipertrófiával tartják fenn [11].

Az antraciklinek oxidatív károsító hatása ellen fontos védelmi rendszer a glutation redox ciklusa. A glutation a fő intracelluláris antioxidáns, fő védekező mechanizmus az oxidatív stresszel szemben. A kardiomiocitákban mind a glutation-peroxidáz, mind a szuperoxid-dizmutáz, mind a kataláz szint alacsony. Az antraciklinek szívkárosító hatáshoz hozzájárul még az is, hogy a beadásuk után a glutation-peroxidáz szint jelentősen lecsökken az enzim inaktiválódása miatt [11,57]. A szívizomsejtek fogékonyabbak az antraciklinek károsító hatására a kardiolipin magas szintje és a fokozott metabolikus aktivitásuk miatt is. A szívizomszövetben a magas ATP-szükséglet miatt nagyon sok mitokondrium van, ezek funkcióvesztése hozzájárulhat az antraciklinek szívspecifikus károsításához [102].

2.5.3. Az antraciklinek okozta kardiotoxicitás klinikai vonatkozásai

Az antraciklin terápia utáni szívkárosodás korai és késői szakaszra osztható fel. A korai akut kardiotoxicitás a kezelés közben vagy a kezelés utáni egy évben alakul ki. Ebbe az átmeneti rendellenességek is beletartoznak, amiket általában gyógyulás követ. Előfordulhat átmeneti szívritmuszavar (tachycardia), atrioventrikuláris és szár-blokk, nem specifikus elektrokardiográfiás (EKG) változások [104,114,115].

Késői vagy krónikus kardiotoxicitásról akkor beszélünk, ha a tünetek egy évvel a kezelés után jelentkeznek. A fő tünetek: folyamatos miokardiocita vesztés, miokardiális fibrózis, szívizom-növekedés hiánya. A bal kamra működését gyengíti az, hogy a fala elvékonyodik, a végszisztolés nyomás megnövekszik és kitágulhat. Szívultrahangos mérés során csökkent bal kamrai lineáris ejekciós frakció, csökkent végdiasztolés hátsó fal vastagság, kisebb tömeg és kontraktilitás, illetve megnövekedett bal kamrai afterload figyelhető meg. A kardiotoxicitás pangásos szívelégtelenséghez vezethet [11,115,116]. Több tanulmány is igazolja, hogy az antraciklinnel kezelt betegek között gyakran

előfordul szubklinikus szív működés sok évvel a kezelés befejezése után is. Feltételezhető, hogy az antraciklin kezeléshez kapcsolódó nagyon kicsi rendellenesség is maradandó szívizom-károsodáshoz vezet. Az antraciklin okozta kardiotoxicitás lehet aszimptomatikus, amikor csak szívultrahangon követhető változásokat figyelhetünk meg, például a bal kamra tömegének csökkenését vagy lineáris ejekciós frakció csökkenést, de klinikai tünetek nincsenek. Még nem ismert, hogy a szív melyik mérési módszere tud összefüggést kimutatni a korai és késői károsodás között [102,115,117].

A szívfunkció vizsgálatára többféle módszer létezik. Az egyik széles körben használt technika a szívultrahang. Ez egy gyors, gazdaságos, biztonságos módszer. A mérés eredményei alapján határozzák meg többek között a lineáris ejekciós frakció értékét. Ezt a Magyarországon kezelt ALL-s gyermekek esetében a kezelés megkezdése előtt és minden következő antraciklin dózis után elvégzik. A szívfunkció jelentős károsodásáról akkor beszélünk, ha a lineáris ejekciós frakció értéke 10 percentilis értékkel csökken az előző vizsgálatához képest vagy 29% alatt van [115].

2.5.4. Az antraciklinek okozta kardiotoxicitás kialakulásának rizikófaktorai

Az antraciklinek által kiváltott toxicitás mértéke nagy interindividuális különbségeket mutat, ami genetikai háttérre és egyéb kockázati tényezők jelenlétére utal.

A kialakulás fő rizikófaktorai az antraciklin kumulatív dózisa, azaz az összes gyógyszer mennyiség, amit a beteg a kezelése során kapott. Több tanulmány igazolta, hogy 500 mg/m^2 antraciklin összdózis fölött szignifikánsan megnő a kardiotoxicitás kialakulásának gyakorisága. Ezért a legtöbb kezelési protokoll ennél az értéknél limitálja a beadott gyógyszer mennyiségét. Bár tünetmentes rendellenességek akár 45 mg/m^2 dózis után is megjelenhetnek, ami arra utal, hogy az antraciklineknek nincs biztonságos dózisa [11,118].

A többi rizikófaktor: fiatal vagy idős életkor (18 évnél fiatalabb vagy 65 évnél idősebb), a női nem, fekete rassz, genetikai faktorok, korábbi kardiovaszkuláris problémák, cukorbetegség, 21-es kromoszóma triszómiája, egyidejű sugárkezelés vagy kombinált kemoterápia. Sugárterápiát gyakran a kezelési protokoll részeként kapnak a betegek, ami erősítheti az antraciklinek kardiotoxicitását, de még kérdéses, hogy additív vagy szinergista módon. A követési idő növekedésével egyre több betegben alakul ki

szívprobléma, ezért nagyon fontos az antraciklinnel kezelt betegek hosszú távú követése [11,102].

2.5.5. A kardiotoxicitás megelőzése, kezelése

Az antraciklinnel kezelt betegeknél a kardiotoxicitás megelőzéséhez a szívfunkció folyamatos ellenőrzése szükséges. Ennek lehetséges módjai a rendszeres szívultrahang vizsgálat és laboratóriumi vizsgálatok, pl.: szérumban troponin szint mérése [11,104,114].

A kardiotoxicitás megelőzéséhez próbálták a miokardiális antraciklin, ill. antraciklin-metabolit-szint csökkentését dózisredukcióval, illetve az adagolás módosításával. Az antraciklin csúcskoncentráció csökkentése lehetséges elhúzódo infúzió, ill. gyakrabban beadott kisebb adagok alkalmazásával. Ezekről feltételezték, hogy csökkenti a kardiotoxicitást, de a megfigyelés ezt nem bizonyította [11,115].

Kevésbé toxikus szintetikus analógok előállításánál az epirubicin és idarubicin került kipróbálásra. Mindkettőnél elmondható, hogy az azonos hatás eléréséhez szükséges gyógyszeradag kardiotoxikus hatása is azonos volt a korábban használt vegyületekével [115].

Egyik új irányvonal a liposzomális antraciklinek használata. Ezekkel lehetővé válhat a szervspecifikus adagolás, amivel a szisztémás és kardiotoxicitás mérsékelhető lenne, de még több vizsgálat szükséges ennek bizonyítására [115].

A gyakorlatban leginkább alkalmazható védekezési mód a kardioprotektív szerek egyidejű adása annak érdekében, hogy az antracikliek szívkárosító hatását kiküszöböljék. Az egyik nagyon hatékony szívvédő gyógyszer a dexrazoxán, ami egy vas-kelátor. Megköti a szabad és a transferrin-, ill. ferritin-kötött vasat is, így megakadályozza az antraciklin-vas komplexek kialakulását és ezáltal a reaktív oxigén gyökök keletkezését. Rövidtávú védelmet biztosít a betegek többségében még a legintenzívebb antraciklin dózis mellett is. A hosszútávú hatásai még nem bizonyítottak, és még nincs elég klinikai adat ahhoz sem, hogy kötelezően előírják a használatát gyermekeknél [11,115,119,120,121].

A kialakult betegség kezelésére többféle kezelést próbálnak. Angiotenzin 1 konvertáló enzim (ACE: angiotensin I converting enzyme 1) inhibitorok előidéznek javulást a bal kamra szerkezetében és funkciójában, de ez átmeneti. Növekedési hormon

adásával szintén átmeneti javulást lehet elérni. Béta-adrenoceptor antagonisták (béta-blokkolók) adása eredményesnek tűnik; súlyos esetben szívátültetés szükséges [11,115].

2.5.6. Genetikai polimorfizmusok az antraciklin okozta kardiotoxicitásban

Az antraciklinek használata során a betegek között jelentős különbségek figyelhetők meg a szívproblémák kialakulásában, ami genetikai háttér jelenlétére utal. A gyógyszer metabolizmusában, a mellékhatás kialakulásában szerepet játszó gének polimorfizmusai okozhatnak ilyen eltérést. Kutatási eredmények bizonyítják, hogy a szabadgyök-képzésben részt vevő gének (*NQO1*), az antraciklin-transzportját végző ABC-transzporterek (*ABCC1*, *ABCC2*, azaz ATP-binding cassette, sub-family C, member 2) és az antraciklin metabolizáló gének (*CBR1*, *CBR3*, *AKR1A1*) közreműködnek a kardiotoxicitás egyéni különbségeiben [87,102,109].

A humán karbonil-reduktáz 1 (*CBR1*) egy citoszolikus fázis I enzim. Széles szubsztrátspektruma van, NADPH felhasználásával a vegyületek kételektronos redukálását végzi. A génnek két sokat vizsgált polimorfizmusa a Val88Ile és a Pro131Ser. Az előbbi (rs1143663) miatt a fehérje 88. aminosava valin helyett izoleucin lesz, az utóbbi (rs41557318) egy prolin-szerin cserét okoz. A *CBR1* Val88 és Ile88 eltérő katalitikus és termodinamikai tulajdonságokkal rendelkezik. A Val88 magasabb V_{max} értéket képes elérni, ezért hatására több doxorubicinol és daunorubicinol keletkezik. Az eltérés oka az, hogy a 88. pozícióban izoleucint tartalmazó fehérje kevésbé köti a NADPH-t, mint a valin tartalmú. A Pro131Ser polimorfizmus esetén a szerin tartalmú fehérjének sokkal nagyobb az affinitása az antraciklinhez, bár a V_{max} értékben nincs eltérés a vad típusú fehérjéhez képest. Az Ile88 és Ser131 aminosavakat tartalmazó *CBR1* fehérjével rendelkező betegekben kevesebb alkohol-metabolit keletkezik, de emiatt az eredeti vegyület halmozódik fel, és több szabad gyök képződhet [106,122].

A *CBR3* gén Val244Met (rs1056892) aminosavcserét okozó polimorfizmusa befolyásolja a protein katalitikus aktivitását, a valin tartalmú fehérje több alkohol-metabolitot képez. A homozigóta Val244 betegek esetében a súlyos szívprobléma kialakulásának esélye 8-szoros volt a többiekhez képest [109]. A *CBR1* gén befolyásolta a doxorubicin clearance-ét [123]. Az *AKR1A1* gén két aminosavcserét okozó polimorfizmusa az Asn52Ser és a Glu55Asp. Az aszparaginsav, ill. szerin tartalmú

fehérjéknek kb. 50%-kal kisebb a katalitikus hatékonysága, mint a vad-típusú fehérjéknek. A kisebb aktivitású fehérjék csak akkor védenek az antraciklinek károsító hatásával szemben, ha az elsődlegesen toxikus metabolit az alkohol-vegyület [124].

A kataláz (CAT: catalase), szuperoxid-dizmutáz 1 (SOD1: superoxide dismutase 1) overexpressziója egérben védelmet nyújt az antraciklin indukálta szívkárosító hatással szemben. A glutation S transzferáz génnek overexpressziója sejtvonalakban véd az antraciklin hatásaival szemben. Ezért ezen gének polimorfizmusait is érdemes lenne vizsgálni [87].

A szívben több ABC-transzporter is expresszálódik, pl.: ABCB1, ABCC1, ABCC3 (ATP-binding cassette, sub-family C, member 3), ABCG2 [56,125]. ABC-transzporter génkiütött egerek szöveteiben, köztük a szív szöveteiben is, a proteinek által szállított xenobiotikumok szintje megemelkedett. Gyakoribb volt a kardiotoxicitás olyan esetekben, amikor egyszerre adtak ABC-transzporter gátlót és antraciklineket [126]. Kardiomiopátiás szívből származó szövetben az ABCG2 mRNS-ének magasabb szintjét találták [127]. Az ABC-transzporterek csökkent expressziója hozzájárulhat a gyógyszerek szívben levő megváltozott eloszlásához [128].

Az antraciklinek sejtéből történő eliminációjában részt vevő *ABCB1* és *ABCG2* ABC-transzporter gének polimorfizmusait 62 ázsiai betegen vizsgálták Lal és mtsai [129]. Az elemzett *ABCB1* polimorfizmusok a következők: 1236C>T, 2677G>A/T, 3435C>T és az *ABCG2* 421C>A. A doxorubicin szint emelkedett volt azokban a betegekben, akik legalább egy *ABCB1* 1236T allélt hordoztak. Az *ABCB1* 1236-2677-3435 pozíciókban homozigóta, CC-GG-CC genotípusú betegekben szignifikánsan alacsonyabb volt a doxorubicin szint, mint a CT-GT-CT, ill. TT-TT-TT genotípusokat hordozó betegekben. Az első genotípuscsoportban a doxorubicin clearance is fokozottabb volt a többiekhez képest. A doxorubicinol csúcskoncentrációja is alacsonyabb volt a CC-GG-CC háromszoros homozigóta páciensekben, mint a TT-TT-TT csoportban. Az *ABCG2* 421C>A polimorfizmus és doxorubicin szint között nem találtak összefüggést a betegeknél [129].

Az irodalomban idáig egy olyan tanulmány található, ami az *ABCC1* gén szerepét vizsgálta az antraciklin okozta kardiotoxicitásban. Itt non-Hodgkin-limfómás (NHL) kaukázusi betegeknél 82 gén 206 SNP-jét genotipizálták. A betegpopulációban 87 olyan NHL-es egyén volt, akinek szívproblémái jelentkeztek. Az ő adataikat hasonlították

össze 363 olyan NHL-s beteggel, akiknek nem romlott a szívfunkciója. Azt találták, hogy az NAD(P)H oxidáz multienzim komplex p40phox alegységét kódoló *NCF4* (neutrophil cytosolic factor 4) ugyanennek az enzimkomplexnek a p22phox alegységét kódoló *CYBA* (cytochrome b-245, alpha polypeptide) és *RAC2* (ras-related C3 botulinum toxin substrate 2) gének egy-egy polimorfizmusa a krónikus antraciklin-indukálta szívkárosodás megjelenésével függték össze. Az *ABCCI* és az *ABCC2* gének polimorfizmusai szignifikánsan asszociáltak a csökkent szívfunkcióval. Az akut kardiotoxicitást az *ABCCI* Gly671Val SNP (rs45511401) és az *ABCC2* gén V1188Q-C1515Y haplotípusa befolyásolta [107].

A doxorubicin clearance-t közvetetten is befolyásolhatja egy gén. A NR1I2 (nuclear receptor subfamily 1, group I, member 2, másnéven PXR: pregnane X-receptor) indukálja a többi enzim és transzporter, köztük a CYP3A4, CYP3A5 és az ABCB1 expresszióját. A *PXR* egyik haplotípusáról leírták, hogy befolyásolja a doxorubicin clearance-t [130].

2.5.7. Egyéb, az ALL kemoterápiájában alkalmazott kardiotoxikus hatású gyógyszerek

A rákos betegek gyógyítására használt kemoterápiás kezelések ma már magas túlélési arányt biztosítanak, de a túlélők közül sokan szenvednek a terápia mellékhatásaitól. Az egyik mellékhatás a kardiotoxicitás, ami jelentkezhet akut vagy krónikus formában. Az antraciklinek kardiotoxikus hatása jól ismert, de több egyéb szerről is leírták, hogy káros a szívnek. Ilyenek az alkilálószerke, például a ciklofoszfamid, ifoszfamid, ciszplatin, busulfan és mitomycin. De ártalmatlan hatással vannak a szívre a vinka alkaloidok, a fluorouracil, a citarabin, az aszparagináz és az újabb szerek közül a paklitaxel, trastuzumab, etopozid és tenipozid. Ezek a kombinált kemoterápia részeként hozzájárulhatnak a kardiotoxicitás kialakulásához [131].

A kemoterápiás szerek kombinált alkalmazása során a különböző kardiotoxikus szerek egymás hatását felerősíthetik. A felsorolt kardiotoxikus szerek közül azokat ismertetem részletesebben, amelyeket az akut limfoid leukémiás gyermekek kaptak a kezelésük alatt.

A ciklofoszfamid nagyon hatékony daganatgátló és immunszuppresszáns gyógyszer, amit szolid tumorok, leukémiák, limfómák kezelésére használnak. Standard

dózisnál csak kevésbé kardiotoxikus, de nagy dózisnál, 150mg/kg fölött, súlyos kardiális mellékhatásokat okozhat. Az ALL kezelésre használt ALL-BFM 90-95-ös protokollban 1-2 x 1g/m²-t kaptak a gyermekek, ami kevesebb a toxikus dózisnál.

A ciklofoszfamid indukálta kardiotoxicitás előfordulása gyermekekben alacsonyabb, mint felnőttekben, aminek az oka az életkorfüggő rezisztencia és a gyermekeknél alkalmazott alacsonyabb dózis lehet. A kialakulás feltételezett rizikófaktorai az össz-ciklofoszfamid dózis és a korábbi antraciklin kezelés, ill. sugárterápia. A lehetséges ártó mechanizmus a toxikus metabolit extravazációja és az ezt követő szívizomszövet-károsodás az intersticiális vérzés és az ödéma miatt. A ciklofoszfamiddal kezelt betegeknél EKG és szívultrahangos eltérések figyelhetők meg, és pangásos szívelégtelenség vagy szívizomgyulladás alakul ki, specifikus kezelése nem ismert [131,132].

A citarabin vagy citozin arabinozid egy nukleotid-analóg, amit elsősorban kombinált terápia részeként az akut limfoid leukémiás gyermekeknél alkalmaznak. A kardiális komplikációi ritkák és általában csak nagy dózisú infúzió adása után jelentkeznek. A kialakulás mechanizmusa ismeretlen, de azt feltételezik róla, hogy immun-mediált vagy hiperszenzitivitási reakció útján károsít [131].

3. Célkitűzés

Munkám során az alábbi céljaim voltak:

- A szervezet xenobiotikumok elleni védekezésében szerepet játszó ABCB1 és ABCG2 ABC-transzporter gének funkcionális polimorfizmusait vizsgálni az akut limfoid leukémia kialakulásában. Összehasonlítani az ABCB1 génben a 3435C>T, 2677G>T,A és az ABCG2 génben a 34G>A és 421C>A polimorfizmusok allél-, haplotípus frekvenciáit és genotípus kombinációit a beteg és egészséges kontroll populációkban. Vizsgálni a polimorfizmusok hatását a betegség jellemzőire és kimenetelére.

- Egy nemzetközi együttműködés (IALGCG: International childhood Acute Lymphoblastic Leukaemia Genetics Consortium) keretében vizsgálni ALL rizikóját. A gyermekkori ALL-t megfelelő méretű mintapopuláción tanulmányozni és egy korábbi GWAS eredményét ellenőrizni. Elvégezni a betegpopulációnkon az CDKN2A (ciklin-dependens kináz inhibitor 2A) gén rs3731217 polimorfizmusának genotipizálását és hozzájárulni az eredmény hitelességének megerősítéséhez.

- Az ALL gyógyításában nagyon hatékonyan alkalmazott antraciklinek mellékhatásként fellépő kardiotoxicitás kialakulásának genetikai hátterét vizsgálni. A szívfunkciót a lineáris ejekciós frakcióval jellemezni, amit a kezelés során rendszeresen végzett szívvultrahangos mérésből számoltunk. A szívfunkció és az antraciklineket a kardiomiocitákból kiszállító ABCC1 ABC-transzporter polimorfizmusai közötti összefüggést keresni. A lineáris ejekciós frakció csökkenése és az *ABCC1* gén 9 db egy pontos nukleotid polimorfizmusának előfordulása közötti összefüggést vizsgálni.

4. Módszerek

4.1. A biobank ismertetése: betegek és kontrollok

Intézetünkben rendelkezésre áll egy akut limfoid leukémiás betegektől és egészséges véradóktól származó mintagyűjtemény és adatbank. A gyűjtés megszervezése és lebonyolítása főleg Dr. Erdélyi Dániel munkája volt, doktori értekezésében erről részletesen beszámol. Fő célja az ALL Berlin-Frankfurt-Münster (BFM) 90 és 95-ös protokollokkal kezelt teljes magyarországi ALL-es betegpopulációtól csírvonal genetikai vizsgálatokra alkalmas DNS minta gyűjtése volt. A kórlapokból származó klinikai adatokat nagyon részletesen, alaposan és pontosan számítógépes táblázatba rendezte. Ezzel létrehozott egy olyan adatbázist a gyermekekről, ami számos klinikai kérdés elemzésére ad lehetőséget. Az összegyűjtött betegcsoport akut limfoid leukémiás gyermekekből állt, akiket 1990 és 2002 között diagnosztizáltak a tíz magyarországi gyermekhematológiai központ valamelyikében.

Az alábbiakban az általam vizsgált kérdések megértéséhez fontos adatokat részletezem.

Az ALL kialakulására való hajlamot a 2006-ig összegyűjtött populáción vizsgáltuk. Ez 396 beteget és 192 egészséges véradó kontrollt jelentett 2008-ban az *ABCB1* és *ABCG2* gének vizsgálatakor. A betegek diagnóziskori átlagéletkora $6,1 \pm 3,9$ év volt, 0,2-18 éves korukban diagnosztizálták náluk a betegséget. A Magyar Gyermektumor Regiszter adatai szerint az adott periódusban 776 ALL-es gyermeket diagnosztizáltak az országban, így a mi kohortunk a betegek 51%-át tartalmazza. Az 1. táblázatban található a populációk adatai. Nincs szignifikáns különbség a teljes és az általunk vizsgált populáció között az életkor, nem, immunfenotípus megoszlásában, ill. a visszaesett betegek számában. A meghalt betegek száma szignifikánsan alacsonyabb az általunk vizsgált populációban ($p < 0,001$), mert a mintagyűjtési periódusunk megkezdése előtt meghalt betegek közül nem mindenkitől tudtunk mintához jutni. Ők azok, akik nem reagáltak a kezelésre vagy a terápia közben kapott fertőzés vagy toxicitás miatt haltak meg.

Ehhez a tanulmányhoz kontroll populációként 192 egészséges véradónak (95 férfi és 97 nő, átlagéletkor: $36,8 \pm 10,5$ év) a laboratóriumi vizsgálatokból fennmaradt EDTA-s (etilén-diamin-tetraecetsav) csőben eltett vérért dolgoztuk fel. Az Országos Vérellátó Szolgáltatól a véradók nemét és életkorát kértük és kaptuk meg kísérő adatokként.

A véradók személyes és orvosi, kórtörténeti adataival nem rendelkezünk. A kontroll populáció és a betegek etnikai megoszlása megegyezik. Egyik kontroll egyénnek sem volt gyermekkori ALL-je vagy más rákos megbetegedése korábban.

A vizsgálatba bevont emberek a magyar (kaukázusi) populációhoz tartoznak, viszont a populációnk 5%-a roma származású lehet a magyarországi statisztika alapján becsült adatok szerint. A vizsgálathoz írásos beleegyezésüket adták a kontrollok, ill. kiskorú személyek esetén a betegek szülei. A tanulmányt a Magyar Etikai Bizottság (Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottság, azaz ETT TUKEB) hagyta jóvá.

1. táblázat: Az ALL-re való hajlam vizsgálatába bevont populációk adatai

		Betegek n (%)	Kontrollok n (%)	Összes ALL-es ¹ n (%)	p érték ²
Esetszám		396	192	776	
Életkor (átlag ± SD, év) (terjedelem)		6,1±3,9 (0,2-18)	40,0±9,8	6,6±4,3 (0,1-18)	0,053
Nem	férfi	216 (55)	95 (49)	442 (57)	0,47
	nő	180 (45)	97 (51)	334 (43)	
Rizikócsoport	LR	98 (25)	-	185 (23)	0,11
	MR	252 (64)	-	458 (59)	
	HR	46 (12)	-	124 (16)	
Relapszus	nem	334 (85)	-	622 (80)	0,06
	igen	60 (15)	-	154 (19)	
Meghalt	nem	331 (84)	-	539 (69)	<0,0001
	igen	65 (16)	-	237 (31)	
Immunfenotípus	B-sejtes	291 (74)	-	530 (68)	0,14
	T-sejtes	53 (13)	-	113 (15)	
	ismeretlen	52 (13)	-	133 (17)	

¹ A Magyar Gyermektumor Regiszter adatai szerint az összes gyermek, akiket 1990 és 2002 között diagnosztizáltak akut limfoid leukémiával.

² Általunk vizsgált betegek vs. összes ALL-es

Rövidítések: HR: magas rizikócsoporthú (high risk), LR: alacsony rizikócsoporthú (low risk), MR: közepes rizikócsoporthú (medium risk), n: esetszám, SD: szórás (standard deviation)

A nemzetközi együttműködés idején, 2010-ben már 550 beteg és 450 kontroll egyén genotipizálását tudtuk elvégezni. Ebbe a vizsgálatba 1990 és 2002 között diagnosztizált, 15 év alatti ALL-es gyermekeket vontunk be a 10 hematológiai központ betegei közül. Kontrollként a betegekkel azonos etnikumú és azonos földrajzi területen élő 450 felnőtt egészséges véradótól gyűjtöttünk DNS-t. A két populáció adatait a 2. táblázatban tüntettem fel.

2. táblázat: A nemzetközi együttműködésbe bevont beteg- és kontrollcsoport adatai.

		Betegek n (%)	Kontrollok n (%)
Esetszám		550	450
Életkor (átlag \pm SD, év) (terjedelem)		6,0 \pm 3,9 (0,2-15)	38 \pm 14 (17-80)
Nem	férfi	304 (55)	174 (39)
	nő	246 (45)	276 (61)
Immunfenotípus	B-sejtes	424 (77)	-
	T-sejtes	73 (13)	-
	ismeretlen	53(10)	-

Rövidítések: n: esetszám, SD: szórás

A farmakogenetikai vizsgálatokba egy 445 fős szűkebb, viszonylag homogén betegpopulációt vontunk be. Kizártuk a teljes populációból azokat a betegeket, akiknél valami miatt jelentősen eltértek a megadott protokolltól vagy nem fejezték be a kezelést, korai elhalálozás miatt. Kizártuk azokat, akik korábban más betegség miatt már kaptak kemoterápiát és akiknek valamilyen társbetegsége volt, ami kihathat a gyógyszerek farmakokinetikájára, pl.: veleszületett egyoldali vesehiány vagy Down-szindróma. A 445 főtől történt a klinikai adatok retrospektív gyűjtése. A mellékhatások vizsgálatánál az elemezhető betegszámot tovább csökkentette a klinikai adatok hiánya. Retrospektív vizsgálatról lévén szó, csak a kórlapokon megtalálható adatokat lehetett összegyűjteni, ami sok esetben nem bizonyult teljesnek. Nem minden kórházban monitorizáltak minden mellékhatást, a kórlapok gyakran hiányosak voltak. Ezért az antraciklinek kardiotoxikus hatását 6 kórházból összegyűjtött 235 beteg adatai alapján tudtuk vizsgálni. A betegek adatait a 3. táblázatban foglaltam össze.

3. táblázat: Az antraciklinek szívkárosító hatásának tanulmányozásához elemzett betegcsoport adatai. További információkat ld. a szövegben.

A betegek jellemzői	Kategóriák	Vizsgált betegcsoport	Összes beteg	p érték ¹
A betegek száma		235	337	
Nem n (%)	férfi	126 (54)	190 (56)	
	nő	109 (46)	147 (44)	0,6
Életkor (átlag ± SD, év) (terjedelem)		5,7 ± 3,8 (1,2-18,0)	6,2 ± 4,1 (1,0-18,0)	0,1
Rizikócsoporthoz n (%)	LR	61 (26)	69 (20)	
	MR	155 (66)	231 (69)	
	HR	19 (8)	37 (11)	0,2
Kemoterápiás protokoll n (%)	1995 előtt (ALL-BFM 90)	83 (35)	146 (44)	
	1995 után (ALL-BFM 95)	152 (65)	189 (56)	0,06
Dexrazoxán használat n (%)	nem	164 (70)	179 (70)	
	igen	69 (30)	76 (30)	0,9
Össz antraciklin dózis (terjedelem, mg/m ²)	záróvizsgálatkorig kapott	120-360	120-360	
	záróvizsgálatkorig kapott, együtt a relapszussal kezelték dózisaival	120-840	120-840	
Lineáris ejekciós frakció (átlag ± SD, %)	diagnóziskor	39,8 ± 6,0 (n=133)	-	
	záróvizsgálatkor	39,0 ± 6,0 (n=173)	-	
	utolsó követési időpont	38,6 ± 5,2 (n=168)	-	
Szívultrahang időpontja (medián, év); (terjedelem)	záróvizsgálat	2,0 (0,7-3,4)	-	
	utolsó szívultrahang	6,3 (2,4-13,7)	-	

¹ Általunk vizsgált betegek vs. az összes ALL-es

Rövidítések: ALL-BFM: ALL Berlin-Frankfurt-Münster protokoll, HR: magas rizikócsoporthoz, LR: alacsony rizikócsoporthoz, MR: közepes rizikócsoporthoz, SD: szórás

Az antraciklinek okozta kardiotoxicitás vizsgálatához a kórlapokból a szívultrahangos mérések adatait elemeztük. A kemoterápia ismert rövid és hosszútávú szívkárosító hatása miatt a betegek szívfunkcióját rutinszerűen ellenőrzik. A szívultrahanggal mért adatok közül mi a bal kamrai végdiasztolés átmérőt (VDÁ) és a bal kamrai végszisztolés átmérőt (VSzÁ) elemeztük. Az adatokból a bal kamrai lineáris ejekciós frakciót (linEF) számoltunk ki: $\text{linEF} (\%) = (\text{VDÁ} - \text{VSzÁ}) / \text{VDÁ} * 100\%$.

Három időpontban végzett szívultrahang adataival számoltunk. Ezek a diagnózis ideje, a záróvizsgálat ideje, ami átlagosan 2,1 évvel a diagnózis után történt, és az utolsó

követési időpont, átlagban 6,6 évvel a diagnózis után, mert a gyógyulás után is visszahívják évenkénti kontrollra az egykori betegeket.

A szívultrahangot nem mindig végezték el minden betegnél, azért nem minden esetben tudunk lineáris ejekciós frakciót számolni. Hét olyan betegről gyűjtöttünk adatokat, akiknél relapszus történt, náluk az utolsó követési időpont két adattal szerepel, mert a relapszus kezelésében még több antraciklint kaptak. Az egyik időpont a relapszus előtti utolsó szívultrahang, a másik a relapszus utáni legutolsó.

Az antraciklines vizsgálati populáció reprezentatív voltát ellenőriztük azzal, hogy összehasonlítottuk a teljes populációval. Teljes populációnak itt azokat a betegeket tekintettük, akiket ugyanebben a 6 kórházban kezeltek és megélték a kezelés végét. Nincs különbség a vizsgált populáció és az összes beteg klinikai paramétereit között (3. táblázat).

Az ALL Berlin-Frankfurt-Münster (BFM) 90 és 95-ös protokollokban a teljes kezelés során kapott egyéb gyógyszerek: intravénásan több dózis vinkrisztin, Laszparagináz, daunorubicin, doxorubicin, metotrexát, ciklofoszfamid, citozin-arabinozid, szájon át prednizolon, dexametazon, merkaptopurin, tioguanin, intratekálisan metotrexát, és csak magas rizikójú betegek intratekálisan prednizolon és ifoszfamid. Az antraciklinek tekintetében a protokollok alacsony (LR: low risk) és közepes rizikójú (MR: medium risk) ága csak az antraciklin dózisok számában különbözött, a betegek összesen 180-300 mg/m² antraciklin dózist kaptak. A magas rizikócsoporthú (HR: high risk) kezelési ág több mindenben eltér.

4.2. DNS-kivonás

A DNS-t teljes elsősorban remisszió idején EDTA-s csőbe vett perifériás vérből szeparálták korábban, QIAamp DNA Blood Maxi és QIAamp DNA Blood Midi kitékkel (Qiagen), a gyártó leírása szerint. A mintagyűjtés megkezdése előtt meghalt betegeknél a DNS-t mononukleáris sejtszuspenzióból, diagnóziskor vagy remisszióban készített csontvelői kenetkből vontuk ki. Néhány beteg esetében az újszülöttkori PKU (fenilketonúria)-szűréshez használt szűrőpapírba szárított vércseppből izoláltunk DNS-t. A sejtszuspenzióból és kenetkből történő izoláláshoz a High Pure PCR Template Preparation Kitet (Roche) használtuk. Sejtszuspenzióból a gyártó által megadott 2.3 protokoll szerint dolgoztunk, míg a csontvelői kenetkből történő izolálásnál kisebb

változtatásokra volt szükség a 2.7 protokollban. Ezek a következők: kezdetként 200µl PBS-ben felvettük a kenetről lekapart sejteket, ehhez 40µl Proteinase K-t adtunk, és 2 órán keresztül 55°C-on inkubáltuk. Ezután a protokoll 6. lépésétől (200µl Binding puffer hozzáadásával) a leírás szerint folytattuk az izolálást.

Szűrőpapírból Chelex-100 reagens (Bio-Rad) használatával vontunk ki DNS-t. A szűrőpapírba szárított vércseppből az alábbi módon nyertük ki a DNS-t: a szűrőpapír 2x2 mm-es darabját 200µl 5%-os Chelex-100 oldattal inkubáljuk 56°C-on 90 percig, majd 99°C-on 10 percig. Lehűtést követően erősen vortexeltük, majd 10000 rpm-n 2 percig centrifugáltuk. A felülúszó fázist óvatosan leszívtuk, ez tartalmazta a DNS-t.

4.3. A vizsgált polimorfizmusok kiválasztása

Az asszociációs vizsgálatunkban (ALL hajlam) a szakirodalom alapján választottuk ki a vizsgálandó polimorfizmusokat.

A külföldi együttműködés keretében az angol konzorciumi partner által korábbi genomszintű asszociációs vizsgálat elemzésével eredményül kapott, ALL-re való hajlamot befolyásoló polimorfizmust genotipizáltuk.

Az antraciklinek kardiotoxicitásának tanulmányozásánál célunk a kiválasztott gén (*ABCC1*) polimorfizmusokkal történő teljes lefedése volt a kapcsoltsági adatok alapján. A munka kezdetén a „4.4.1. Genotipizálás menete a GenomeLab SNPstream genotipizáló rendszerrel” fejezetben „Kísérlettervezés” címszó alatt leírt lépéseket végeztem el az *ABCC1* gén előtti és utáni 3000bp-nyi szakaszt is belevéve. Ez az NCBI Genome Build 36.3 16. kromoszóma: 15934000-16152000 régiója volt. Ezután a vizsgált kromoszómaszakasz kapcsoltsági adatait, haplotípus blokkjait a HapMap (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>) adatbázisa alapján dolgozó Haploview 4.1 program (<http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview/>) segítségével határoztam meg. A genetikai kapcsoltság miatt egy összefüggés kimutatásához nem szükséges az összes genetikai eltérés vizsgálata. A kapcsoltságot öröklődő polimorfizmusok közül elég egy vagy kettő genotipizálása egy-egy haplotípus blokkból. Haplotípusnak nevezzük a polimorfizmusok alléljainak egy kromoszómán együtt öröklődő kombinációját. Sokszor nem egyes variációk, hanem ezek kombinációja okoz valamilyen fenotípust, ezért is hasznos lehet a haplotípusok vizsgálata. A technikai szűrés után a megmaradt SNP-k közül feltételezett funkcionális sorrend alapján választottam ki minden haplotípus

blokkból egyet vagy kettőt. A sorrend a következő: nem-szinonim (azaz aminosavcserét okozó) SNP, promoter vagy 3' UTR régióban levő SNP, szinonim (azaz aminosavcserét nem okozó) és intronban levő SNP. A 4. táblázatban foglaltam össze a három tanulmányban vizsgált SNP-k adatait. Az *ABCB1*, *ABCG2* és *ABCC1* génben vizsgált SNP-k elhelyezkedése az 1-3. ábrán látható.

4. táblázat: A dolgozatban vizsgált polimorfizmusok adatai.

Gén	SNP	Allélok (1/2) ¹	Kromoszóma	Pozíció ²	Funkció	Egyéb név az irodalomban
<i>ABCB1</i>	rs2032582	G>T/A	7	86998554	A893S	2677G>T/A
<i>ABCB1</i>	rs1045642	C/T	7	86976581	I1145I	3435C>T
<i>ABCG2</i>	rs2231137	G>A	4	89280138	V12M	34G>A
<i>ABCG2</i>	rs2231142	C>A	4	89271347	Q141K	421C>A
<i>CDKN2A</i>	rs3731217	T>G	9	21974661	intron	9477T>G
<i>ABCC1</i>	rs215060	A>G	16	15984788	intron	
<i>ABCC1</i>	rs246219	C>T	16	15993136	intron	
<i>ABCC1</i>	rs246221	T>C	16	16045823	V275V	825T>C
<i>ABCC1</i>	rs45511401	G>T	16	16080733	G671V	2012G>T
<i>ABCC1</i>	rs4148358	C>T	16	16094676	intron	
<i>ABCC1</i>	rs11864374	G>A	16	16109386	intron	
<i>ABCC1</i>	rs6416666	A>G	16	16121463	intron	
<i>ABCC1</i>	rs3743527	C>T	16	16143182	3' UTR	
<i>ABCC1</i>	rs212097	A>G	16	16151630	3' UTR	

¹ Allélok a forward szálon; 1, gyakori allél; 2, ritka allél

² Pozíció a NCBI Genome Build 36.3-en.

4.4. Genotipizálási módszerek

Az egyes technikák kiválasztásánál az adott kutatási időszakban rendelkezésre álló technikai lehetőségek és a költséghatékonyság jelentették a döntő szempontot. Az alábbi táblázatban (5. táblázat) összefoglalom a módszerek előnyeit és hátrányait, amiknek mérlegelésével választottunk.

5. táblázat A használt genotipizálási módszerek előnyei és hátrányai.

Technika	Vizsgált SNP	előny	hátrány
ABI SnaPShot	<i>ABCB1</i> rs1045642, rs2032582 <i>ABCC1</i> rs45511401	multiplexelhető, ezáltal idő- és költséghatékony	multiplex PCR beállítása nehéz
LightCycler PCR	<i>ABCG2</i> rs2231137, rs2231142	gyors PCR, azonnal értékelhető eredmény	kapillárisok érzékenysége, 32 minta mérhető egyszerre
KasPar TM	<i>CDKN2A</i> rs3731217	nagyon olcsó reagens	egyszerre kevés SNP mérésére alkalmas
GenomeLab SNPstream rendszer	<i>ABCC1</i> SNP-k, kivéve rs45511401	multiplex PCR, alacsony SNP-re vetített költség	az SNP-k nagy %-a nem mérhető, egyszerre csak sok mintát és SNP-t tud költséghatékonyan mérni

4.4.1. Genotipizálás ABI SnaPShot módszerrel (*ABCB1* és *ABCC1* rs45511401 SNP-k)

Az *ABCB1* polimorfizmusok genotipizálása multiplex polimeráz lánreakciót (PCR: polimerase chain reaction) követő multiplex miniszekvenálással ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) készülékekkel történt. A genotipizálás Dr. Erdélyi Dániel munkája volt, három *ABCB1* polimorfizmus (rs1045642, rs2032582, rs1128503) multiplex elemzését állította be. Az ALL hajlammal kapcsolatos elemzéseinkbe ebből 2 SNP-t (rs1045642, rs2032582) vettünk bele, de a reprodukálhatóság miatt a teljes multiplex genotipizálást bemutatom röviden.

A módszer lényege egy multiplex PCR, majd azt követő primer extenzió négy különböző fluoreszcens festékkel jelölt nukleotiddal. A primer extenzióhoz használt primerek 5' vége eltérő hosszúságú, ezért hosszúságuk alapján kapilláris elektroforézis készüléken elválaszthatók egymástól.

Az *ABCB1* 3435T>C (rs1045642), 2677G>T/A (rs2032582) és 1236C>T (rs1128503) polimorfizmusokat tartalmazó kromoszómarégió amplifikálása az alábbi reakciókörülmények között történt. A 20µl végtérfogatban lezajlott PCR reakció a következőket tartalmazta: 20ng genomi DNS, 5mM MgCl₂ (Applied Biosystems), 200µM minden dNTP-ből (dezoxi-nukleotid-trifoszfát, Promega), 0,15 pmol/µl, 0,075 pmol/µl és 0,3 pmol/µl a forward és reverz primerekből, 1,5 unit AmpliTaq Gold DNS polimeráz (Applied Biosystems) és 1x PCR puffer (Applied Biosystems). A reakciókörülmények: 95 °C 10 perc, 40 ciklus 95 °C 30 sec, 58 °C 30 sec, 72 °C 60 sec,

és 72 °C 5 perc voltak. A primerek szekvenciái az 6. táblázatban láthatók. A PCR terméket Agilent lab-on-chip készüléken történő elektroforézissel ellenőriztük.

A PCR termék 3 µl-ét 5µl végtérfogatban megtisztítottuk a be nem épült primerektől és dNTP-től 1 unit SAP (shrimp alkaline phosphatase, azaz garnéla alkalikus foszfatáz, USB) és 0,5 unit exonukleáz (USB) használatával. A reakciót 37 °C-on 1 órán keresztül inkubáltuk, majd az enzimeket 75 °C-on 15 perc alatt inaktiváltuk.

6. táblázat: Az *ABCB1*, *ABCC1* és az *ABCC2* gének alábbi polimorfizmusainak genotipizálásához használt primerek szekvenciái.

SNP	Primer	Szekvencia
rs1128503	Forward primer	TCTCACCATCCCCTCTGT
	Reverz primer	TCTTTGTCACTTATCCAGC
	Miniszekvenáló primer	CT(C) ₁₂ GACTCTGCATCTTCAGGTTTCAG
rs2032582	Forward primer	TAGGGAGTAACAAAATAACAC
	Reverz primer	TGCAGGCTATAGGTTCCAGG
	Miniszekvenáló primer	(TGAC) ₆ TTAGTTTACTCACCTTCCCAG
rs1045642	Forward primer	CTTACATTAGGCAGTGAC
	Reverz primer	CTCACAGTAACTTGGCAG
	Miniszekvenáló primer	(TGAC) ₁₂ CTCCTTTGCTGCCCTCAC
rs45511401	Forward primer	GGAATGTTGAGGCCTTCAGT
	Reverz primer	GCTTTTCCTCAGACCACCAG
	Miniszekvenáló primer	(GACT) ₉ CCACCACGGCCACCAAAGCA
rs2273697	Forward primer	GCTTTGTCCATGGGTCCTAA
	Reverz primer	AGGGCTCCAACCTCTCTCCAT
	Miniszekvenáló primer	(GACT) ₁₁ GACCAGGTTCACTGTTTCTCCAA
rs17222723	Forward primer	GGAGCCTCTCATATTCTGC
	Reverz primer	CCTCCCACCGCTAATATCAA
	Miniszekvenáló primer	(C) ₂₀ TCTGGTTGGTGTCAATCCTC

A multiplex miniszekvenáló PCR-t 5 µl végtérfogatban végeztük, aminek tartalma: az előző reakció termékéből 1µl, a miniszekvenáló primerből 0,4 pmol/µl, 0,1 pmol/µl, ill. 0,2 pmol/µl és 2,5µl SNaPshot Multiplex Ready Reaction Mix (Applied Biosystems). A reakciókörülmények: 25 ciklus 96 °C 10 sec, 54 °C 5 sec és 60 °C 30 sec. A be nem épült didezoxi-nukleotidokat a fent ismertetett módon emésztettük.

Ezután a termék 0,7 µl-éhez 9 µl formamidot és 0,5 µl GeneScan-120 LIZ méret standardot adtunk (Applied Biosystems). Az elektroforézist ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) készüléken 17 percig végeztük, a futtatást a Genotyper szoftverrel elemeztük (Applied Biosystems).

Az *ABCC1* rs45511401 (2012G>T, Gly671Val) polimorfizmus genotipizálása szintén a fent ismertetett módszerrel történt, kisebb eltérésekkel. Három polimorfizmus: az *ABCC1* 2012G>T (Gly671Val), *ABCC2* rs2273697 (1249G>A, Val417Ile) és *ABCC2* rs17222723 (3563T>A, Val1188Glu) multiplex elemzését állítottuk be. Az elemzésünkbe ebből az rs45511401 SNP-t vettünk bele, de a reprodukálhatóság miatt a teljes multiplex genotipizálást bemutatom röviden.

Multiplex PCR-t végeztünk a polimorfizmusokat övező régiók amplifikálása céljából. A 20µl végtérfogatban lezajlott PCR reakció a következőket tartalmazta: 20ng genomi DNS, 2,5mM MgCl₂ (Applied Biosystems), 250µM minden dNTP-ből (dezinukleotid-trifoszfát, Promega). *ABCC1* 2012-F, *ABCC1* 2012-R primerekből 0,25 pmol/µl, *ABCC2* 1249-F, *ABCC2* 1249-R primerekből 0,125 pmol/µl és az *ABCC2* 3563-F, *ABCC2* 3563-R primerekből 0,1 pmol/µl, 0,1 unit AmpliTaq Gold DNS polimeráz (Applied Biosystems) és 1x PCR puffer (Applied Biosystems). A reakciókörülmények: 95 °C 10 perc, 35 ciklus 94 °C 30 sec, 56 °C 30 sec, 72 °C 60 sec, és 72 °C 5 perc voltak. A primerek szekvenciái az 6. táblázatban láthatók. A PCR terméket Agilent lab-on-chip készüléken történő elektroforézissel ellenőriztük.

Emésztés SAP és ExoI enzimekkel az *ABCB1* polimorfizmusoknál leírt protokoll szerint.

A multiplex miniszekvenáló (SBE: single base extension) PCR-t 5 µl végtérfogatban végeztük, aminek tartalma: az előző reakció termékéből 1,5µl, a miniszekvenáló primerekből *ABCC1*-2012 0,1 pmol/µl, *ABCC2*-1249 0,4 pmol/µl *ABCC2*-3563 0,05 pmol/µl, ill. 2,5µl SNaPshot Multiplex Ready Reaction Mix (Applied Biosystems). A reakciókörülmények: 25 ciklus 96 °C 10 sec, 50 °C 5 sec és 72 °C 10 sec. A be nem épült didezoxi-nukleotidokat a fent ismertetett módon emésztettük.

Az SBE reakció termékének kapilláris elektroforézise az *ABCB1* polimorfizmusoknál leírt protokoll szerint történt.

4.4.2. Genotipizálás LightCycler PCR módszerrel (*ABCG2* polimorfizmusok)

Az *ABCG2* gén két polimorfizmusának vizsgálatához LightCycler PCR módszert használtunk. A módszer beállítása Dr. Andrikovics Hajnalka munkája [133], a genotipizálás egy részét magam, más részét Dr. Kámory Enikő végezte. A régió amplifikálását célzó PCR reakciót követően olvadáspont-analízissel határoztuk meg a minták genotípusát. A reakcióelegyhez a PCR primerek mellett az amplifikátumra specifikusan bekötődő, fluoreszcens festékkel jelölt két oligonukleotidot, ún. hibridizációs szondát is adtunk. Az egyik szonda, a sensor, az általunk vizsgálni kívánt mutációra komplementer, az 5' végétől két bp-nyi távolságra kötődik a másik szonda, az anchor. A sensor 5' vége Bodipy 630/650 csoporttal jelölt, a 3' végén foszfátcsoport van, ami megakadályozza, hogy erről az oligonukleotidról is kiindulhasson szintézis. Az anchor 3' vége 6-karboxi-fluoreszcein (6-FAM) jelölésű. Az olvadáspont-analízis során a donor-fluorofórt (6-FAM) a LightCycler készülék (Roche) fényforrása folyamatosan gerjeszti (530 nm). A gerjesztési energia egy része átadódik az akceptor fluorofórjának (Bodipy 630/650), melyből az emittált fluoreszcencia megfelelő hullámhosszon (640 nm) mérhető. A reakció elején, alacsony hőmérsékleten, a két szonda a targethez hibridizálódva olyan közel kerül egymáshoz, hogy fluorofórjaik között létrejön a FRET (fluoreszcencia rezonancia energia transzfer) folyamata. A LightCycler készülék a hőmérséklet fokenkénti emelése közben folyamatosan monitorozza a keletkező fluoreszcenciás jelet. Amikor a kapillárisban a hőmérséklet eléri a vizsgált fragmens T_m értékét (T_m , az a hőmérséklet, melyen az adott DNS-fragmentum 50%-a egyszálú), a fluoreszcencia emisszió hirtelen csökkenni kezd, mert a hibridizációs próbák az amplikonról leolvadva már nincsenek többé energiaátadásra alkalmas közelségben. Minden DNS fragmentumra jellemző az olvadáspontja, amit leginkább a fragmens G+C tartalma és a hossza befolyásol. A hibridizációs szondák és a target közötti mismatch a T_m csökkenését okozza, ezért genotipizálásra alkalmas a módszer.

A fluoreszcens jelet a hőmérséklet függvényében vizsgáljuk, pontosabban a görbe második deriváltját. Így a kapott csúcsok a reakcióra jellemző olvadáspontot adják meg, a görbe alatti terület arányos a jel nagyságával.

A genotipizálás üvegapillárisban történt, mindkét polimorfizmus esetén a PCR reakció 10 μ l-ben zajlott, az elegy összetétele: 50 ng genomi DNS, 5 μ l 2x PCR Master Mix (Promega), 0,7 unit *Taq* DNA polimeráz (Finnzyme), 1,5 mM $MgCl_2$, 2,5 - 2,5

pmol a szondákból. Ehhez jött a 34G>A esetén az 5 pmol forward, 1,5 pmol reverz primer; a 421C>A esetén 2 pmol forward és 20 pmol reverz primer. A primerek szekvenciái a 7. táblázatban láthatók.

A PCR reakció körülményei: 94 °C 2 perc, 70 ciklus 94 °C 0 sec, 50 °C 10 sec, 72 °C 15 sec. A reakció után a mintákat 38 °C-ra hűtöttük, hogy a szondák a megfelelő helyre hibridizáljanak. Ezután a hőmérsékletet 85 °C-ig emeltük 0,1 °C/sec sebességgel, közben folyamatosan monitoroztuk a fluoreszcenciás jelet.

7. táblázat: Az *ABCG2* gén polimorfizmusainak genotipizálásához használt primerek szekvenciái.

SNP	Primer	Szekvencia
rs2231137	V12M-LCF	5' ATGTATTGTCACCTAGTGTTC3'
	V12M-LCR	5' AGCTCCTTCAGTAAATGCC3'
	V12M-anchor	5' GCGGGGAAGCCATTGGTGT3'
	V12M-sensor	5' CCTTGTGACACTGGGAT3'
rs2231142	Q141K-LCF	5' TATGTATACTAAACAGTCATGGTCTTAGA3'
	Q141K-LCR	5' TGGAGTCTGCCACTTTATCCA3'
	Q141K-anchor	5' GATGATGTTGTGATGGGCACTCTGACGGTGAGA3'
	Q141K-sensor	5' AAACCTTACAGTTCTCAGCAGCTCTTCGG3'

Rövidítések: LCF: Light-Cycler Forward, LCR: Light-Cycler Reverse

4.4.3. Genotipizálás KasParTM technikával (*CDKN2A* polimorfizmus)

A KasParTM technikát a KBiosciences cég fejlesztette ki. Az allélspecifikus PCR reakcióhoz három jelöletlen primert kell használni, két forward és egy reverz primert. A forward primerek a polimorf nukleotidnál végződnek, a 3' végük erre illeszkedik, a két forward primer 3' vége csak ebben a nukleotidban tér el egymástól. Az egyik az egyik allélra, a másik a másik allélra specifikus. A reakció specificitását az adja, hogy a használt Taq-polimeráz az amplifikációt csak a 3' vég illeszkedésekor tudja elkezdeni. A primerek 5' végén egy 18 bp hosszú egyedi szekvencia van, ez nem hibridizálódik az amplifikálni kívánt kromoszómarégióhoz, viszont a második ciklus után ez is beépül a PCR-termékbe. A következő ciklustól az eltérő szekvenciájú 18bp hosszú szakaszokhoz kötnek a riporter oligonukleotidok. Ezek végén VIC (2-kloro-7-fenil-1,4-dikloro-6-karboxi-fluoreszcein), ill. FAM (6-karboxi-fluoreszcein) fluoreszcens festék található. A

reakció végén lézertűnyel gerjesztjük a festéket. Ha a riporter oligonukleotid nem épült be, akkor hajtű szerkezetet képez, és egy közel lévű quencher molekula és festék között FRET történik, ezért nincs detektálható jel. Ha beépült a riporter, akkor a keletkezett termék arányában detektálunk emissziót.

A genotipizálást 384 lyukű plate-ben végeztem, a reakció 5µl térfogatban zajlott, ennek az összetétele 30ng DNS, KasPar 2x Reaction Mix 1x koncentrációban (KBiosciences, ez tartalmazza a riporter oligonukleotidokat, Taq-polimeráz és 1,8mM MgCl₂-t), forward primerek (12-12 µM) és reverz primer (30 µM). A PCR reakció körülményei: 94 °C 15 perc, 34 ciklus 94 °C 10 sec, 57 °C 60 sec volt. A primerek szekvenciáit a 8. táblázatban tüntettem fel. A reakciót 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Life Technologies) készülékben végeztem. A genotipizálás eredményét a 10. ábrán illusztrálom.

8. táblázat: A *CDKN2A* gén rs3731217 polimorfizmusának genotipizálásához használt primerek szekvenciái.

Primer	Szekvencia
forward 1	5'GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGAATATTAACCTCCACTCCCAGG3'
forward 2	5'GAAGGTCGGAGTCAACGGATTATGAATATTAACCTCCACTCCCAGT3'
reverz	5'GTTCTGAGATAATGTTGAAAGTCACAGATA3'

4.4.4. Genotipizálás GenomeLab SNPstream rendszerrel (*ABCC1* SNP-k)

A GenomeLab SNPstream (Beckman Coulter) genotipizáló rendszer működésének lényege egy multiplex PCR-t követű, egy bázispárnyi primer extenzió, jelölt nukleotidokkal. Elűször az egy pontos nukleotid polimorfizmust tartalmazó génszakaszt polimeráz láncreakcióval amplifikáltuk, majd a terméket megtisztítottuk a maradék nukleotidoktól, primerektől. A követű PCR reakció egy harmadik, ún. extenziós primerrel történt. Ez a primer pontosan a vizsgálni kívánt SNP elűtti nukleotidig illeszkedik az elű PCR-ben keletkezett termékre. A reakció során fluoreszcens festékkel (TAMRA: 6-karboxi-tetrametil-rodamin, ill. Bodipy-fluoreszcein) jelölt didezoxi-nukleotidok épűlnék be a primer 3' végére a polimorf helyen levű allélnak megfelelően. Mivel egyszerre csak két festék alkalmazható, csak egyféle nukleotidcsere és ennek komplementere vizsgálható egyidűben. Egy mintán egyszerre 48 SNP lemérését végezzük, tehát 48-plex PCR beállítása szükséges. A jelölt

nukleotidokkal amlifikált extenziós primerek 5' vége komplementer egy előregyártott oligonukleotidokat tartalmazó 384 lyukú plate megfelelő helyével. A hibridizációt követő mosás és lézeres leolvasás után a két festék aránya alapján állapítottuk meg a genotípusokat.

Az *ABCCI* génben található rs215060, rs246219, rs246221, rs45511401, rs4148358, rs11864374, rs6416666, rs3743527, rs212097 SNP-eket a SNPstream rendszer használatával genotipizáltuk. A munka során összesen 48 SNP genotipizálását végeztem el, de a dolgozatomba ezek közül csak az *ABCCI* gén 9 SNP-jével kapcsolatos elemzést vettem be. A mérés pontosan ugyanígy történt volna, ha egyszerre csak 9 SNP-t genotipizálok, menetét a következőkben mutatom be.

Kísérlettervezés:

A mérendő polimorfizmusok kiválasztásánál körültekintően kell eljárni, több szempontot is figyelembe kell venni. Először a vizsgálni kívánt gén már leírt polimorfizmusait töltöttem le a HapMap adatbázisból (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>) és innen választottam ki a gyakoribb SNP-eket. A minor allél frekvencia legalsó határát 10%-nál határoztam meg. Ennek oka az, hogy a nálunk rendelkezésre álló betegpopuláción ilyen gyakoriságminimum az, amivel várhatóan lesz annyi ritka homozigóta és heterozigóta egyén, amennyivel a statisztikai elemzést még el lehet végezni.

A multiplex PCR miatt az amlifikálni kívánt DNS szakasz GC arányának (guanin és citozin nukleotidok aránya) minden mérendő SNP esetén 40-65% közöttinek kell lennie. Az ismétlődő régiók esetleges előfordulását a RepeatMasker on-line programmal ellenőriztük (<http://www.repeatmasker.org/>), a szekvenciában jelen levő repeatet jelölni kellett. A primerek tervezéséhez az Autoprimer szoftvert (<http://www.autoprimer.com>) (Beckman Coulter) használtuk a gyártó utasításai szerint. Ebben a fázisban az SNP-k 70-80%-a kiesik, nem bizonyul lemérhetőnek. A genotipizáláshoz összesen két PCR primer és egy extenziós primer szükséges. A primerek szekvenciái a 9. táblázatban láthatók. A mérést a gyártó utasításai szerint végeztük.

PCR reakció, tisztítás, primer extenzió

A PCR reakciót 5µl végtérfogatban végeztük, amiben 20ng genomi DNS, 5mM MgCl₂ (Applied Biosystems), 90-90µM a négyféle dNTP-ből (Invitrogen), 50-50nM a két PCR primerből, 0,5 unit AmpliTaq Gold polimeráz (Applied Biosystems) és 1x koncentrációban PCR puffer II (Applied Biosystems) volt. A következő reakció-körülményeket használtuk: kezdeti denaturáció 94 °C 1 perc, majd 40 ciklus 94 °C 30 sec, 55 °C 30 sec és 72 °C 1 perc.

Ezt követően megtisztítottuk a kapott terméket a be nem épült dezoxi-nukleotidoktól és primerektől 3µl of SBE Cleanup Reagent (USB) hozzáadásával, ami exonukleáz I-et és garnéla alkalikus foszfatázt tartalmazott. A reakciót 37 °C-on 30 percig inkubáltuk, majd inaktiváltuk az enzimeket (96 °C 10 perc).

Az egy bázispárnyi primer extenzió elvégzéséhez 7µl extenziós reakcióelegyet adtunk minden mintához. Ez tartalmaz 3,76µl SNPware extenziós puffert (Beckman Coulter), 0,2 µl SNPware extenziós mixet (ebben vannak a jelölt didezoxi-nukleotidok) (SNPware Extension Mix, Beckman Coulter), 2,97µl Ultrapure DNáz/RNáz mentes desztillált vizet (Invitrogen), 0,02µl SNPware DNS polimerázt (Beckman Coulter) és az extenziós primereket (5-5µM). A PCR körülmények: 96 °C 3 perc, majd 46 ciklus 94 °C 20 sec, 40 °C 11 sec.

A felsorolt PCR reakciókat 384-es plate-ben (Bio-Rad) a PKGD PTC 0220 DNA Engine Dyad (Bio-Rad) PCR készülékben végeztük.

Hibridizáció és plate leolvasás

Az extenziós primerek (48 db) 5' végével komplementer oligonukleotidokat tartalmazó 384-lyukú SNPware plate-et (Beckman Coulter) aktiváltuk 1x koncentrációban SNPware mosó puffer 1-gyel (Beckman Coulter) történő előmosással.

A primer extenzió után keletkezett termékhez 8µl hibridizációs mixet adtunk, amiben 7,56µl hibridizációs oldat (SNPware Hybridization Solution, Beckman Coulter) és 0,44 µl SNPware Hybridization Additive, Beckman Coulter) volt. A PCR-termék és hibridizációs mix keverékéből 20µl-t vittünk át az SNPware plate-re. Ezt lezárt kamrában 100%-os páratartalom mellett inkubáltuk 42 °C-on 2 óráig (±15 perc). A jelölt extenziós primerek ekkor hibridizálnak a plate-n levő komplementer oligonukleotidokhoz. Ezután a nem kötődött primereket lemostuk 1x koncentrációban SNPware mosó puffer 2-vel (Beckman Coulter).

A plate-et GenomeLab SNPStream Imager (Beckman Coulter) készülékkel olvastuk le, ami egy két lézerrel működő fluoreszcens leolvasó. A plate-ről készült képet a rendszerhez kapott megfelelő szoftverrel értékeltük ki.

9. táblázat: Az *ABCCI* polimorfizmusainak genotipizálásához használt primerek szekvenciái.

SNP	Primer	Szekvencia
rs215060	PCR primer 1	AGTGTGAAGGGACTGGGG
	PCR primer 2	ACSTAATAAATCTTATCTGCATGACC
	extenziós primer	ACAACACTACCGACGACAAGACTGTTTTGAAGATATCCCCTGTCTGC
rs246219	PCR primer 1	ATTGTCAAGGCAACGAAAG
	PCR primer 2	TTCCTTACCTTGCTGGTC
	extenziós primer	AAGTACCACGTCAACGTCACGAGAAGCATGGTTC AAGGCCACTGC
rs246221	PCR primer 1	CTTGGAACTCTCTTTCGGC
	PCR primer 2	ACAACGGCTTACCTCCT
	extenziós primer	CAGAATAGCCACGCCTAGATGGGCAGGATCCTTG GAGGAGTACAC
rs45511401	PCR primer 1	GGAATGTTGAGGCCTTCAGT
	PCR primer 2	GCTTTTCCTCAGACCACCAG
	extenziós primer	GACTGACTGACTGACTGACTGACTGACTGACTGA CTGACTGACTGACCAGGTTCACTGTTTCTCCAA
rs4148358	PCR primer 1	AACCTATCTGGGGCCAAG
	PCR primer 2	AGGCTACTTTTAGGTGACAATACC
	extenziós primer	CAAGACCGCAACTAGATACAATTTTTTGCTCACCT GGACGGAAGG
rs11864374	PCR primer 1	TGTCTGTTCTGGCTTCTTC
	PCR primer 2	TAACTTCTCTGGCTTCTTC
	extenziós primer	CTAACTAAGCTACGCCGACATTA ACTTGTCATCA GAGTCAGGACC
rs6416666	PCR primer 1	AGAAGACTCTCCATCTGTGGG
	PCR primer 2	AACAAAAAGCATCAATAGCAGC
	extenziós primer	CACCGCTATCAACAGACTTGAATTAACGCCCGTG CCGCCACCCAG
rs3743527	PCR primer 1	TTCATTTCTTGGGGCTG
	PCR primer 2	AAGACCAGATGTTGGTAAGAGG
	extenziós primer	ACGTAAGACCACTCAAGACCTCCAGGGCCCTGGG AACTGCCAAG
rs212097	PCR primer 1	RCACACTGGGCTCTACA
	PCR primer 2	CATGACCAGAACCTGTGG
	extenziós primer	CAGTCAACAATCCAGATCAATGCCGAGAGCCTGG GCTGGTGTCCA

4.5. Statisztikai analízis

Az allélfrekvenciát allélszámolással határoztuk meg. A Hardy-Weinberg egyenlőség (HWE) meglétét az on-line elérhető <http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl> szoftverrel számoltuk ki, a HWE-től való szignifikáns eltérés $p < 0,01$ érték esetén állapítottunk meg.

A kategorikus klinikai adat, az ALL-re való hajlam genetikai hátterének elemzésénél az allél és genotípus frekvenciák különbözőségének ellenőrzéséhez χ^2 -tesztet használtunk. A haplotípus- és genotípus-kombinációk elemzéséhez logisztikus regressziót használtunk az életkor és a nem figyelembevételével, itt 95%-os konfidencia intervallumot (CI 95%) határoztunk meg. A haplotípusra vonatkozó odds ratio (OR) értéket feltételes logisztikus regressziós modellel határoztuk meg. A haplotípusokat és ezek frekvenciáját a Haploview 4.1 (<http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview/>) programmal becsültük meg.

A lineáris ejekciós frakcióval, mint folytonos változóval meghatározott szívfunkció genetikai hátterének meghatározásához többszörösen illesztett GLM-t (generalized linear model) használtunk. Ebbe a többváltozós modellbe a következő kofaktorokat vettük be: nem, diagnóziskori életkor, kezelő kórház, össz-antraciklin dózis, dexrazoxán-használat és kemoterápiás protokoll. A diagnóziskori adatok elemzésekor csak a nem, diagnóziskori életkor, kezelő kórház és a kemoterápiás protokoll szerepelt a modellben. A három genotípust külön elemeztük, amikor megfelelő számú beteg volt minden csoportban. A többszörös összehasonlítás miatt a p értéket az SNP-k számával korrigáltuk, így a $p < 0,0055$ értékeket vettük szignifikánsnak.

Az elemzést SPSS 15.1 (SPSS Inc.), ill. MedCalc 10.0.2 (MedCalc Software) szoftverekkel végeztük.

5. Eredmények

5.1. Az *ABCB1* és *ABCG2* gének szerepe a gyermekkori ALL kialakulásában

Az *ABCB1* és *ABCG2* gének polimorfizmusainak szerepét vizsgáltuk a gyermekkori ALL kialakulásában. Az *ABCB1* 2677G>T/A, 3435C>T és *ABCG2* 34G>A, 421C>A polimorfizmusok gyakoriságát az ALL-es beteg és egészséges kontroll populációban a 10. táblázatban tüntettem fel. A két csoport között nem volt szignifikáns különbség az allélgyakoriságban és a genotípus megoszlásában. A genotípus csoportok megoszlása mindenhol Hardy-Weinberg egyensúlyban volt.

10. táblázat: Az *ABCB1* és *ABCG2* gének polimorfizmusainak allél- és genotípus-frekvenciái a vizsgált populáción

Gén	SNP	Populáció	N össz	Genot. N 11 (%) ¹	Genot. N 12 (%) ¹	Genot. N 22 (%) ¹	p érték ²	HWE (χ^2)	Allél 2 ³	p érték ⁴
ABCB1	2677 G>T/A	beteg	375	96 (25,6)	182 (48,5)	97 (25,9)	0,3	0,6	50,1	0,4
		kontroll	189	48 (25,4)	82 (43,4)	59 (31,2)		0,08	52,9	
ABCB1	3435 C>T	beteg	378	86 (22,8)	177 (46,8)	115 (30,4)	0,3	0,3	53,8	0,2
		kontroll	189	54 (28,6)	84 (44,4)	51 (27,0)		0,1	49,2	
ABCG2	34 G>A	beteg	383	358 (93,5)	25 (6,5)	0 (0)	0,6	1,0	3,3	0,7
		kontroll	149	137 (91,9)	12 (8,1)	0 (0)		1,0	4,0	
ABCG2	421 C>A	beteg	369	294 (79,7)	72 (19,5)	3 (0,8)	0,5	0,8	10,6	0,6
		kontroll	149	121 (81,2)	28 (18,8)	0 (0)		0,4	9,4	

¹ 11: gyakori allélra homozigóta, 12: heterozigóta; 22: ritka allélra homozigóta; kivéve a 2677 G>T/A polimorfizmus esetében, ahol: 11: GG, 12: GA+GT, 22: TT+AT+AA; ² A beteg- és kontrollcsoportok genotípus csoportjai között a statisztikai elemzés p értéke; ³ A második allél frekvenciája; ⁴ A beteg- és kontrollcsoportok allélfrekvenciája közötti a statisztikai elemzés p értéke; Rövidítések: Genot.: genotípus, HWE: eltérés a Hardy-Weinberg egyenlőségtől, χ^2 -próba, N: mintaszám (%)

A polimorfizmusok által alkotott, becsült haplotípusokat is meghatároztuk a beteg és kontroll populációban és a becsült haplotípus frekvenciákat összehasonlítottuk (lásd 11. táblázat). Nincs szignifikáns különbség az *ABCB1* gén két gyakori haplotípusának (TT és GC) frekvenciájában, viszont a ritka haplotípusokat nézve jelentős különbség adódik. A GT haplotípus gyakoribb a betegekben a kontrollokhoz képest: 9,4% vs. 3,9%, $p=0,002$; OR=2,5 (CI 95%: 1,4–4,4), ami arra utal, hogy a GT haplotípus előfordulása hajlamosít ALL kialakulására. A TC haplotípus viszont a kontrollokban gyakoribb (6,7%), mint a betegekben (3,0%), $p=0,006$; OR=0,4 (CI 95%: 0,2–0,8), tehát valószínűsíthetően véd az ALL kialakulásától (lásd 11. táblázat). Az *ABCG2* gén által alkotott haplotípusok megoszlása megegyezett a két csoportban.

11. táblázat: A vizsgált polimorfizmusok által alkotott haplotípusok a populációban.

polimorfizmusok	Haplotípus	Beteg N (%)	Kontroll N (%)	p érték	OR	CI (95%)
ABCB1 2677G>T/A és 3435C>T	TT	44,4	45,3	0,8	1	0,8-1,2
	GC	43,2	44,1	0,8	1	0,8-1,2
	GT	9,4	3,9	0,002	2,5	1,4-4,4
	TC	3,0	6,7	0,006	0,4	0,2-0,8
ABCG2 34G>A és 421C>A	GC	86,1	86,6	1	1	0,6-1,5
	GA	10,6	9,4	0,8	1,1	0,6-1,9
	AC	3,3	4,0	0,9	0,7	0,3-1,8

Rövidítések: CI (95%): 95%-os konfidencia intervallum, OR: odds ratio, N: mintaszám (%)

Az allélok közötti kapcsoltságot is meghatároztuk: az *ABCB1* 2677T és 3435T polimorfizmusok között ez az érték: 0,6; a 2677A és 3435 allélok között: 0,04; *ABCG2* 34A és 421A allélok között ez 0,004-nek adódott. Az eredményeink alapján a 2677T és 3435T allélok között volt kapcsoltság, míg a többi allél között nem.

A két polimorfizmus által alkotott genotípus-kombinációkat is összehasonlítottuk a beteg- és kontrollcsoportban (lásd 12. táblázat). Az *ABCB1* gén két, a 2667 és 3435 pozíciók által meghatározott genotípus-kombinációja gyakrabban fordult elő az ALL-esek között. A 2677GT/3435TT gyakorisága betegekben 8,7% volt, ezzel szemben a kontrollokban 3,2% ($p=0,02$; OR=2,9 (1,2–7,1)); a 2677GG/3435CT genotípus-kombináció 7,4% a betegekben, 2,7% a kontrollokban ($p=0,04$; OR=2,9 (1,1–7,7)). A

2677TT/3435CT genotípus-kombináció gyakoribb volt a kontrollokban (7,9%), mint a betegekben (2,1%) ($p=0,002$; OR=0,3 (0,1–0,6)).

Az *ABCG2* gén alléljai által meghatározott genotípus-kombinációk gyakorisága nem tért el a beteg- és a kontrollcsoportban.

12. táblázat: Az *ABCB1* és *ABCG2* gének polimorfizmusai által meghatározott genotípus-kombinációk

<i>ABCB1</i> 2677G>T/A és 3435C>T	Beteg N (%)	Kontroll N (%)	p érték	OR	CI (95%)
GT/CT	126 (33,3)	59 (31,2)	0,7	1,1	0,8-1,6
TT/TT	76 (20,1)	42 (22,2)	0,6	0,9	0,6-1,3
GG/CC	66 (17,5)	42 (22,2)	0,2	0,7	0,5-1,1
GT/TT	33 (8,7)	6 (3,2)	0,02	2,9	1,2–7,1
GG/CT	28 (7,4)	5 (2,7)	0,04	2,9	1,1–7,7
GT/CC	9 (2,4)	9 (4,8)	0,2	0,5	0,2-1,3
TT/CT	8 (2,1)	15 (7,9)	0,002	0,3	0,1–0,6
AG/CC	8 (2,1)	3 (1,6)	0,9	1,3	1,4-5,1
AG/CT	7 (1,9)	5 (2,7)	0,8	0,7	0,2-2,2
AT/CT	6 (1,6)	0 (0)	0,2	6,6	0,3-118
<i>ABCG2</i> 34G>A és 421C>A	beteg (%)	kontroll (%)	p érték	OR	CI (95%)
GG/CC	269 (73,5)	109 (73,2)	1	1,0	0,7-1,6
GG/AC	69 (18,9)	28 (18,8)	1	1	0,6-1,6
AG/CC	22 (6,0)	12 (8,0)	0,5	0,7	0,4-1,5
AG/AC	3 (0,8)	0 (0,0)	0,07	2,9	0,1-56
GG/AA	3 (0,8)	0 (0,0)	0,07	2,9	0,1-56

Rövidítések: CI (95%): 95%-os konfidencia intervallum, OR: odds ratio, N: mintaszám (%)

Vizsgáltuk továbbá, hogy az SNP-k befolyásolják-e az ALL klinikai jellemzőit és hajlamosítanak-e hiperdiploid ALL-re. A betegeket nemük szerint felosztva (fiú vs. lány) a polimorfizmusok eloszlása nem különbözött a két csoportban. Az SNP-k szintén nem befolyásolták a betegek diagnóziskori életkorát (10 év alatt vs. 10 év fölött), a beteg rizikócsoportját (LR, MR, HR), immunfenotípusát (T-sejtes vs. B-sejtes), a relapszust (rel. igen vs. rel. nem) vagy a leukémia miatti halált (exit igen vs. exit nem). Egyik SNP sem hajlamosított hiperdiploid ALL-re (lásd 13. táblázat).

13. táblázat: Az ALL klinikai jellemzői és az *ABCB1* és *ABCG2* gének polimorfizmusainak allél- és genotípus-frekvenciái.

SNP	csoport	N össz	N 11 (%) ¹	N 12 (%) ¹	N 12 (%) ¹	p érték ²	OR	CI (95%)	MAF ³	P érték ⁴
2677 G>T/A	fiú	208	51 (25)	102 (49)	55 (26)	0,7	1,1	0,8-1,4	51%	0,7
	lány	170	45 (26)	82 (48)	43 (25)				49%	
3435 C>T	fiú	208	46 (22)	97 (47)	65 (31)	0,7	1,1	0,8-1,4	55%	0,7
	lány	170	40 (24)	80 (47)	50 (29)				53%	
34 G>A	fiú	210	198 (94)	12 (6)	0 (0)	0,3	1,3	0,8-2,1	3%	0,5
	lány	173	160 (92)	13 (8)	0 (0)				4%	
421 C>A	fiú	202	155 (77)	47 (23)	0 (0)	0,1	0,7	0,4-1,1	12%	0,3
	lány	167	139 (83)	25 (15)	3 (2)				9%	
2677 G>T/A	1-10 év	308	78 (25)	147 (48)	83 (27)	0,6	0,9	0,6-1,3	51%	0,5
	10 fölött	68	18 (26)	35 (51)	15 (22)				48%	
3435 C>T	1-10 év	308	69 (22)	138 (45)	101 (33)	0,1	0,7	0,5-1,1	55%	0,08
	10 fölött	68	17 (25)	38 (56)	13 (19)				47%	
34 G>A	1-10 év	306	285 (93)	21 (7)	0 (0)	0,7	0,8	0,3-2,4	3%	1
	10 fölött	72	68 (94)	4 (6)	0 (0)				3%	
421 C>A	1-10 év	298	236 (79)	60 (20)	2 (1)	0,6	1,2	0,6-2,4	11%	0,7
	10 fölött	67	55 (82)	11 (16)	1 (1)				10%	
2677 G>T/A	LR	95	30 (32)	44 (46)	21 (22)	0,7	1,2	0,4-3,3	45%	0,2
	MR	243	54 (22)	122 (50)	67 (28)				53%	
	HR	40	12 (30)	18 (45)	10 (25)				48%	
3435 C>T	LR	95	21 (22)	46 (48)	28 (29)	0,6	0,7	0,3-2,0	54%	0,8
	MR	243	53 (22)	115 (47)	75 (31)				55%	
	HR	40	12 (30)	16 (40)	12 (30)				50%	
34 G>A	LR	93	85 (91)	8 (9)	0 (0)	0,7	0,8	0,2-3,1	4%	0,6
	MR	246	232 (94)	14 (6)	0 (0)				3%	
	HR	44	41 (93)	3 (7)	0 (0)				3%	
421 C>A	LR	93	73 (78)	19 (20)	1 (1)	0,3	0,6	0,2-1,7	11%	0,6
	MR	240	190 (79)	48 (20)	2 (1)				11%	
	HR	36	31 (86)	5 (14)	0 (0)				7%	
2677 G>T/A	B-sejtes	280	72 (26)	134 (48)	74 (26)	0,7	0,9	0,6-1,4	50%	0,7
	T-sejtes	51	13 (25)	23 (45)	15 (29)				52%	
3435 C>T	B-sejtes	280	61 (22)	131 (47)	88 (31)	0,6	1,1	0,7-1,7	55%	0,6
	T-sejtes	51	13 (25)	23 (45)	15 (29)				52%	
34 G>A	B-sejtes	282	263 (93)	19 (7)	0 (0)	0,8	1,2	0,3-4,1	3%	1
	T-sejtes	52	49 (94)	3 (6)	0 (0)				3%	
421 C>A	B-sejtes	272	216 (79)	54 (20)	2 (1)	0,6	0,8	0,4-1,7	11%	0,7
	T-sejtes	51	39 (76)	12 (24)	0 (0)				12%	

A táblázat folytatását ld. a következő oldalon.

A 13. táblázat folytatása az előző oldalról.

SNP	csoport	N össz	N 11 (%) ¹	N 12 (%) ¹	N 12 (%) ¹	p érték ²	OR	CI (95%)	MAF ³	p érték ⁴
2677 G>T/A	exit igen	57	16 (28)	27 (47)	14 (25)	0,7	0,9	0,6-1,4	48%	0,6
	exit nem	319	80 (25)	155 (49)	84 (26)				51%	
3435 C>T	exit igen	57	17 (30)	25 (44)	15 (26)	0,2	0,8	0,5-1,2	48%	0,2
	exit nem	319	69 (22)	151 (47)	99 (31)				55%	
34 G>A	exit igen	57	54 (95)	3 (5)	0 (0)	0,7	0,8	0,2-2,6	3%	1
	exit nem	324	302 (93)	22 (7)	0 (0)				3%	
421 C>A	exit igen	42	34 (81)	8 (19)	0 (0)	0,8	0,9	0,4-2,0	10%	0,7
	exit nem	325	258 (79)	64 (20)	3 (1)				11%	
								-		
2677 G>T/A	rel. igen	56	14 (25)	27 (48)	15 (27)	0,9	1,0	0,7-1,5	51%	0,9
	rel. nem	320	82 (26)	155 (48)	83 (26)				50%	
3435 C>T	rel. igen	56	15 (27)	24 (43)	17 (30)	0,7	0,9	0,6-1,4	52%	0,7
	rel. nem	320	71 (22)	152 (48)	97 (30)				54%	
34 G>A	rel. igen	56	53 (95)	3 (5)	0 (0)	0,7	0,8	0,2-2,7	3%	1
	rel. nem	325	303 (93)	22 (7)	0 (0)				3%	
421 C>A	rel. igen	49	39 (80)	10 (20)	0 (0)	1	1	0,5-2,1	10%	0,9
	rel. nem	318	253 (80)	62 (19)	3 (1)				11%	
2677 G>T/A	hiperdipl.	375	96 (26)	182 (49)	97 (26)	0,06	0,5	0,3-1,1	50%	0,4
	kontroll	189	48 (25)	82 (43)	59 (31)				53%	
3435 C>T	hiperdipl.	378	86 (23)	177 (47)	115 (30)	0,7	0,7	0,4-1,3	54%	0,1
	kontroll	189	54 (29)	84 (44)	51 (27)				49%	
34 G>A	hiperdipl.	383	358 (93)	25 (7)	0 (0)	0,3	0,5	0,1-1,7	3%	0,5
	kontroll	149	137 (92)	12 (8)	0 (0)				4%	
421 C>A	hiperdipl.	369	294 (80)	72 (20)	3 (1)	0,3	1,5	0,7-2,9	11%	0,6
	kontroll	149	121 (81)	28 (19)	0 (0)				9%	

¹ 11: gyakori alléllra homozigóta, 12: heterozigóta; 22: ritka alléllra homozigóta; kivéve a 2677 G>T/A polimorfizmus esetében, ahol: 11: GG, 12: GA+GT, 22: TT+AT+AA;

² A beteg kategóriák genotípus csoportjai között a statisztikai elemzés p értéke

³ A második allél frekvenciája

⁴ A beteg kategóriák allélfrekvenciája közötti statisztikai elemzés p értéke

A 421 C>A polimorfizmus esetében a ritka homozigóta és a heterozigóta csoportot összevonva elemeztük.

Rövidítések: hiperdipl: hiperdiploid HR: magas rizikócsoport, HWE: eltérés a Hardy-Weinberg egyenlőségtől χ^2 -próba, LR: alacsony rizikócsoport, MAF: minor allél frekvencia, MR: közepes rizikócsoport, N: mintaszám (%), rel.: relapszus

5.2. Az ALL-ra való hajlam vizsgálata nemzetközi együttműködés keretében

Nemzetközi együttműködés keretében csatlakoztunk az IALLGC (International childhood Acute Lymphoblastic Leukaemia Genetics Consortium) elnevezésű nemzetközi konzorciumhoz, amely a gyermekkori ALL genetikai hátterének kutatására jött létre. A konzorcium első feladata az volt, hogy az angliai kutatócsoport genomszintű asszociációs vizsgálatával [47], kaukázusi populációkon kapott eredményét validáljuk.

A konzorcium egy korábbi, 907 beteg és 2398 kontrollon 291371 tag-SNP (olyan SNP, ami kapcsoltságban van másik SNP-ekkel) genotipizálásával elvégzett GWA tanulmány [47] genotipizálási adatait elemezte. A korábbi eredményeik mellett egyéb polimorfizmusokat kerestek, amik az ALL rizikóját fokozzák. Kiválasztottak 34 SNP-t, amelyek statisztikailag szignifikánsak voltak ($p < 0,0001$), a minor allélfrekvenciájuk nagyobb volt, mint 0,05 és a Hardy-Weinberg egyenlőség a kontrollokban teljesült. Emellett a közelében olyan gének voltak, amik potenciálisan hajlamosíthatnak ALL-re, pl.: a B-limfocitákban vagy a rák keletkezésében van szerepük. Ennek a 34 SNP-nek a genotipizálását végezték el egy 1428 ALL-es betegből és 1516 kontrollból álló független német populáción, ahol egy SNP (rs3731217) maradt szignifikáns ($p = 1,15 \times 10^{-7}$). Ez a polimorfizmus a 9p21.3 kromoszómaregióban található, a ciklin-dependens kináz inhibitor 2A (*CDKN2A*) gén első intronjában.

A kapott eredményt megerősítették egy nagyobb populáción is, amibe az eddigiek mellett európai spanyol (148 beteg és 187 kontroll), magyar (550 beteg és 450 kontroll) és kanadai (260 beteg és 266 kontroll) populáció is beletartozott. A magyar populáció a minta- és adatbankunk része, a genotipizálást én végeztem, ezért dolgozatomban ezt az eredményt is ismertetem.

A *CDKN2A* rs3731217 genotipizálás eredményét a magyar populáción a 14. táblázatban tüntettem fel. Eredményeink alapján csak a magyar populáción elemezve a *CDKN2A* rs3731217G allél nem véd az ALL-lel szemben: OR=0,83 (95% CI: 0,6–1,2, $p=0,1$). Az ALL B- és T-sejtes csoportját külön elemezve, a B-sejtes ALL-esetében a magyar populáció eredményei nem bizonyultak szignifikánsnak: OR=0,9 (95% CI: 0,7–1,2, $p=0,5$). T-sejtes ALL esetében csak a magyar populációt elemezve, a G allél szignifikánsan befolyásolta az ALL rizikóját: OR=0,6 (95% CI: 0,4–0,9, $p=0,046$) (lásd 15. táblázat).

A konzorcium a validáláshoz vizsgált négy populáció (német, kanadai, európai spanyol, magyar) és a korábbi genotipizálás eredményeivel együtt hat populáció (angliából kettő és a már említett négy) genotípus adatait együtt elemezve azt kapta, hogy a G allél szignifikánsan befolyásolja az ALL kialakulásának kockázatát (OR=0,7, 95% CI: 0,6-0,7, $p=3,1 \times 10^{-11}$) [134].

14. táblázat: A *CDKN2A* rs3731217 polimorfizmus által adott genotípus és allélfrekvenciák a beteg és kontroll populáción, a HWE ellenőrzése.

		Betegek N (N _{össz} =550)	Kontrollok N (N _{össz} =450)	HWE (χ^2)	p érték	OR	CI (95%)
allélfrekvencia	T allél	959 (90)	766 (88)	-	0,2	0,8	0,6-1,1
	G allél	111 (10)	108 (12)	-			
genotípus frekvencia	TT	433 (77)	336 (77)	0,8	0,2	0,8	0,6-1,2
	TG	93 (17)	94 (22)				
	GG	9 (2)	7 (2)				

² A beteg- és kontrollcsoportok allél-, ill. genotípus csoportjai között a statisztikai elemzés p értéke

Rövidítések: CI (95%): 95%-os konfidencia intervallum, HWE: eltérés a Hardy-Weinberg egyenlőségtől, OR: odds ratio, N: mintaszám (%)

15. táblázat: A *CDKN2A* rs3731217 polimorfizmus által adott genotípus és allélfrekvenciák a B- és T-sejtes ALL-es beteg és kontroll populációkon.

		B-sejtes ALL N (N _{össz} =424)	p érték B-sejtes ALL	OR	CI (95%)	T-sejtes ALL N (N _{össz} =73)	p érték T-sejtes ALL ¹	OR ¹	CI (95%) ¹
allél- frekvencia	T allél	733 (89)	0,5	0,9	0,7-1,2	133 (92)	0,1	0,6	0,3-1,1
	G allél	93 (11)				11 (8)			
genotípus frekvencia	TT	327 (79)	0,5	0,9	0,7-1,2	63 (88)	0,046	0,6	0,4-0,9
	TG	79 (19)				9 (10)			
	GG	7 (2)				2 (3)			

¹ A T-sejtes csoportban a genotípus frekvencia elemzésnél a TG és a GG genotípusú egyéneket összevonva elemeztük.

T-sejtes ALL esetén a ritka homozigóta és a heterozigóta csoportot összevonva elemeztük. Rövidítések: CI (95%): 95%-os konfidencia intervallum, OR: odds ratio, N: mintaszám (%)

A B-sejtes ALL-eseknél a 6 populáció adatai alapján kapott összesített eredmény szintén az allél rizikó-befolyásoló hatását mutatja: OR=0,7, CI (95%) = 0,6–0,8, $p=5,3 \times 10^{-10}$. Ugyanez elmondható, amikor csak a T-sejtes ALL-eseket nézték: OR=0,7, CI (95%) = 0,6–0,8, $p=1,9 \times 10^{-7}$.

Vizsgálták továbbá annak a lehetőségét, hogy nem ez az SNP, hanem egy esetleges kapcsolatos öröklődő SNP az ALL kockázatot valójában befolyásoló variáns. Az eredmények az mutatják, hogy valóban ez az SNP van összefüggésben az ALL-lel. A polimorfizmus funkcionalitását nem tudták meghatározni. Ezeket nem részletezem, mert ez már nem a mi munkánk része.

5.3. *ABCC1* polimorfizmusok szerepe az antraciklinek okozta kardiotoxicitásban

Az antraciklinek kardiotoxicitásának genetikai hátterének jobb megértéséhez az *ABCC1* gén és a szívfunkció romlása közötti összefüggést vizsgáltuk.

A vizsgált populáció adatait a 3. táblázatban tüntettem fel. Az *ABCC1* gén polimorfizmusainak génen belüli helyét az 3. ábrán ábrázoltam. A kapott genotípus- és allélfrekvenciákat a 16. táblázatban tüntettem fel. A polimorfizmusok Hardy-Weinberg egyensúlyban voltak.

16. táblázat: Az *ABCC1* gén polimorfizmusai, genotípus- és allélfrekvenciái.

Gén	Polimorfimusz	Allél (1/2)	Genotípus N 11 (%) ¹	Genotípus N 12 (%) ¹	Genotípus N 22 (%) ¹	N (%) ²	MAF (%) ³	HWE ⁴
ABCC1	rs215060	A/G	168 (73)	54 (24)	6 (3)	228 (97)	14	0.51
ABCC1	rs246219	C/T	167 (74)	55 (24)	4 (2)	226 (96)	14	0.02
ABCC1	rs246221	T/C	91 (39)	119 (51)	23 (10)	233 (99)	35	0.08
ABCC1	rs45511401	G/T	200 (90)	23 (10)	0 (0)	223 (95)	5	0.41
ABCC1	rs4148358	C/T	146 (64)	72 (32)	10 (4)	228 (97)	20	0.76
ABCC1	rs11864374	A/G	131 (58)	80 (35)	15 (7)	226 (96)	24	0.56
ABCC1	rs6416666	A/G	202 (87)	31 (13)	0 (0)	233 (99)	7	0.28
ABCC1	rs3743527	C/T	140 (61)	75 (33)	13 (6)	228 (97)	22	0.49
ABCC1	rs212097	A/G	63 (27)	122 (52)	48 (21)	233 (99)	47	0.43

¹ 11: az első allélra homozigóta, 12: heterozigóta; 22: a második allélra homozigóta

² N: sikeresen genotipizált betegek száma (%)

³ MAF: Minor allélfrekvencia (%)

⁴ HWE: a Hardy-Weinberg egyensúlytól való eltérés (χ^2 -próba)

Vizsgáltuk, hogy az ALL-es gyermekekben az antraciklinekkel történő kezelés utáni szívfunkció összefügg-e az *ABCC1* gén kilenc polimorfizmusával. A bal kamrai lineáris ejekciós frakcióval (linEF) jellemeztük a szív működését.

A diagnózis időpontjában mért szívultrahangos adatok alapján számolt linEF értékek nem tértek el a három genotípus-csoportban egyik polimorfizmus esetén sem (lásd 17. táblázat, linEF dg.). Ennek mérése azért fontos, hogy ellenőrizni tudjuk, hogy az SNP-k a kezelés előtt nem okoznak-e valamilyen eltérést a vizsgált klinikai paraméterben.

17. táblázat: A lineáris ejekciós frakció értékek az egyes polimorfizmusok szerint a három időpontban.

Gén	Polimorfizmus	Allélok (1/2) ¹	mérés	N össz	linEF 11 ²	SD	N 11 ³	linEF 12 ²	SD	N 12 ³	linEF 22 ²	SD	N 22 ³	p érték
ABCC1	rs215060	A/G	linEF dg.	130	39,1	5,7	93	41,5	6,7	37	-	-	-	0,1
			linEF za.	168	38,8	6,0	118	39,6	5,9	50	-	-	-	0,8
			linEF ut.	163	38,4	4,8	126	39,7	5,4	37	-	-	-	0,2
ABCC1	rs246219	C/T	linEF dg.	128	39,2	6,0	91	40,9	6,2	37	-	-	-	0,1
			linEF za.	166	38,7	6,0	119	39,8	6,3	47	-	-	-	1
			linEF ut.	161	38,3	5,1	123	39,1	5,1	38	-	-	-	0,6
ABCC1	rs246221	T/C	linEF dg.	132	40,0	6,0	57	39,3	6,1	65	42,5	5,0	10	0,1
			linEF za.	171	39,4	6,5	69	38,4	5,6	84	40,0	6,4	18	0,2
			linEF ut.	164	38,4	4,8	62	38,5	5,2	86	40,7	5,6	16	0,027
ABCC1	rs45511401	G/T	linEF dg.	129	39,7	6,2	114	41,3	5,2	15	-	-	-	0,3
			linEF za.	164	39,0	6,1	147	39,2	5,3	17	-	-	-	1
			linEF ut.	155	38,7	5,0	140	38,1	5,8	15	-	-	-	0,3
ABCC1	rs4148358	C/T	linEF dg.	130	39,6	6,1	80	40,2	6,0	50	-	-	-	0,8
			linEF za.	168	39,3	6,4	103	38,7	5,5	65	-	-	-	0,3
			linEF ut.	162	38,5	5,3	112	38,5	4,5	50	-	-	-	0,9
ABCC1	rs11864374	A/G	linEF dg.	129	39,0	6,1	72	41,1	5,7	49	39,3	6,8	8	0,1
			linEF za.	165	39,0	5,7	95	39,0	6,5	57	39,4	6,6	13	0,5
			linEF ut.	162	38,5	4,6	97	38,3	5,2	53	41,5	6,1	12	0,2

A táblázat folytatását ld. a következő oldalon.

A 17. táblázat folytatása az előző oldalról.

Gén	Polimorfizmus	Allélok (1/2) ¹	Mérés	N össz	linEF 11 ²	SD	N 11 ³	linEF 12 ²	SD	N 12 ³	linEF 22 ²	SD	N 22 ³	p érték
<i>ABCC1</i>	rs6416666	A/G	linEF dg.	131	39,7	6,2	112	39,9	5,3	19	-	-		0,7
			linEF za.	170	39,1	6,0	144	38,5	6,4	26	-	-		0,9
			linEF ut.	166	38,7	5,1	148	37,4	5,7	18	-	-		0,3
<i>ABCC1</i>	rs3743527	C/T	linEF dg.	131	39,7	5,6	79	40,1	7,1	43	38,5	4,5	9	0,5
			linEF za.	168	39,5	5,8	103	39,3	6,4	54	34,0	4,4	11	0,001
			linEF ut.	161	38,7	4,9	108	38,9	5,1	47	35,3	3,6	6	0,2
<i>ABCC1</i>	rs212097	A/G	linEF dg.	131	39,9	6,0	38	39,6	6,2	69	40,0	5,9	24	0,9
			linEF za.	170	38,0	6,3	45	39,4	6,0	87	39,5	5,7	38	0,2
			linEF ut.	166	37,8	5,8	40	38,8	4,9	88	38,8	5,2	38	0,8

¹ Allélok a forward szálon. 1: gyakori allél, 2: ritka allél

² A lineáris ejekciós frakció értékek átlaga az adott genotípusú betegeknél. 11: a gyakori alléllra homozigóta, 12: heterozigóta; 22: a ritka alléllra homozigóta. Ha nem volt elég az esetszám a 22 genotípus csoportban, akkor az 12 és 22 genotípusú egyéneket egy csoportban elemeztük.

³ Esetszám az 11, 12, 22 genotípus csoportokban.

A linEF érték a csoport átlagát jelöli (%).

Rövidítések: linEF: lineáris ejekciós frakció, linEF dg.: a diagnóziskor meghatározott linEF; linEF za.: a záróvizsgálatkor meghatározott linEF; linEF ut.: az utolsó szívultranhangos mérés alapján számolt linEF, N: mintaszám, SD: szórás

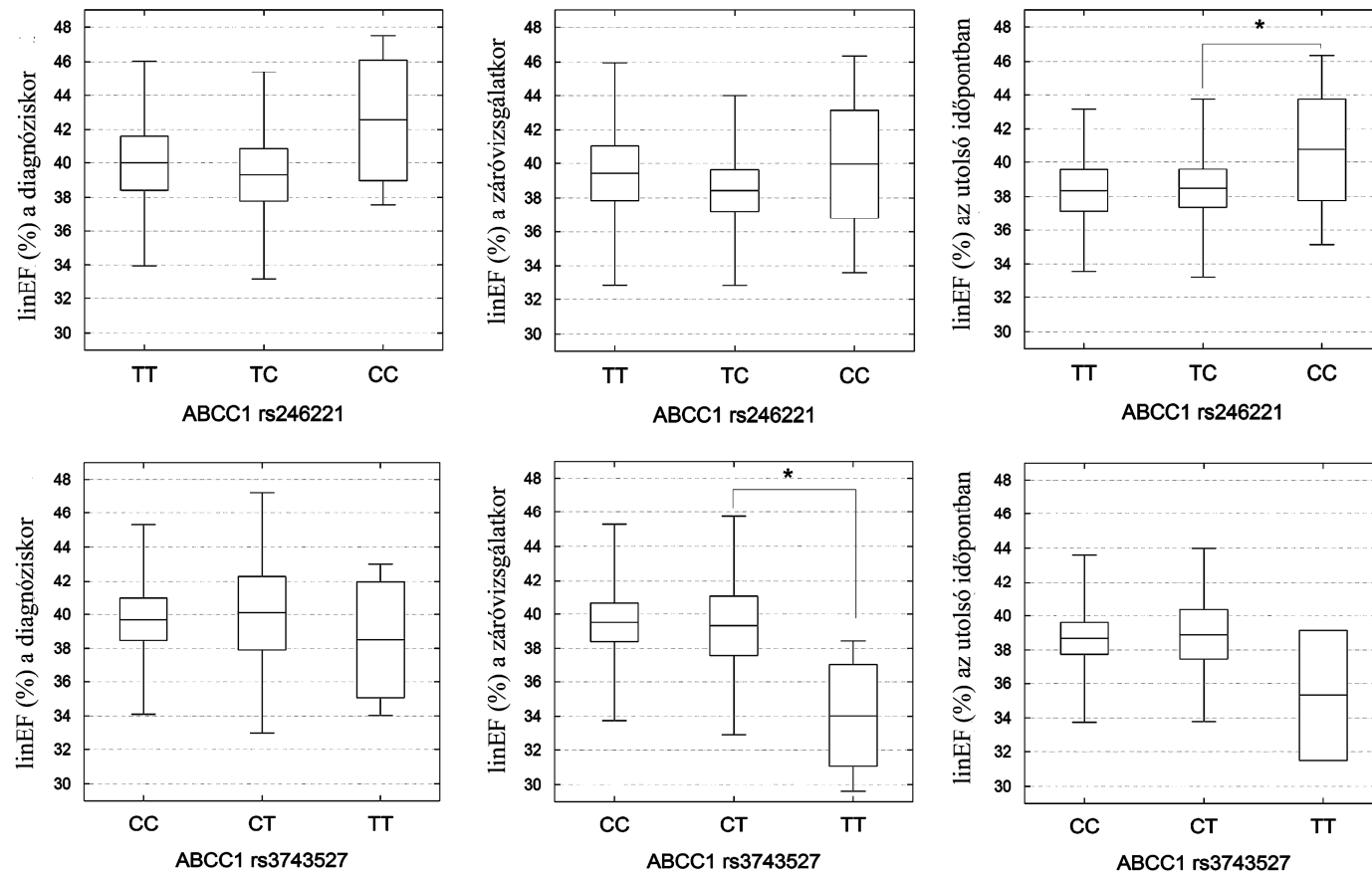
A kemoterápia után, amikor már az antraciklinekkel történt kezelésen is átestek a betegek, a szívfunkció genotípusfüggő eltérését figyeltük meg. Az rs246221 és a rs3743527 jelentősen befolyásolta a linEF-t. Az rs3743527TT genotípusú betegeknél a záróvizsgálatkor mért szívparaméter szignifikánsan alacsonyabb volt (34,0%), mint a CC (39,5%) és CT (39,3 %) genotípusú betegeknél ($p=0,001$) (lásd 17. táblázat, linEF za és 7. ábra).

Hasonló tendenciát figyeltünk meg az utolsó szívultrahang mérés alapján számolt linEF értékeknél. Az rs3743527TT genotípusú betegek utolsó szívultrahangos értéke 35,3%, a heterozigótáké 38,9% a CC homozigótáké 38,7% volt. Ez a különbség nem tért el szignifikánsan, amit az alacsonyabb esetszám is okozhat.

Összefüggött az *ABCC1* rs246221 T allél jelenléte és a diagnózis után átlagban $6,6 \pm 2,7$ évvel végezett utolsó szívultrahangos mérés eredménye is. A TC és TT genotípusú betegeknek alacsonyabb volt a linEF értéke (38,4% and 38,5%), mint a CC genotípusúaknak (40,7%, $p=0,027$) (lásd 17. táblázat, linEF ut és 7. ábra). Ez azonban a többszörös elemzés miatt végzett korrekció miatt csak névlegesen szignifikáns.

A két, szignifikánsnak kapott SNP által meghatározott genotípusok kombinációinak a hatását is vizsgáltuk. Összehasonlítottuk az rs3743527TT és rs246221TC vagy rs246221TT genotípusú egyének (TT-TC/TT, 2. csoport) linEF értékét az összes többi genotípus-kombinációjú betegével (1. csoport). A diagnózis idején meghatározott linEF azonos volt a két csoportban. A záróvizsgálatkor azonban a TT-TC/TT genotípus-kombinációjú gyermekeknek sokkal alacsonyabb volt a linEF értéke (34,0%), mint a többi betegnek (39,4%) ($p=0,001$) (lásd 18. táblázat és 8. ábra).

A többváltozós elemzésbe kofaktorként bevett klinikai változók közül a diagnóziskori életkor, a kezelő kórház és a kemoterápiás protokoll szignifikáns kofaktornak bizonyult. Ezzel szemben a nem, az össz-antraciklin dózis és a dexrazoxán használat nem volt szignifikáns. A két leírt összefüggés esetében a polimorfizmusok hatásánál nem volt nagyobb a szignifikáns kofaktorok hatása.



7. ábra: A három időpontban meghatározott lineáris ejekciós frakció az *ABCC1* rs3743527 és rs246221 genotípus-csoportokban.

A linEF értékét box-plot ábrán jelenítettem meg, ahol a box: átlag \pm 95%CI, whisker: átlag \pm SD; Az *ABCC1* rs3743527 TT genotípusú egyének utolsó időpontban mért linEF értékénél átlag \pm SD egyenlő az átlag \pm 95%CI-val; * statisztikailag szignifikáns különbség; Rövidítések: linEF: lineáris ejekciós frakció;

18. táblázat: Az rs3743527TT és rs246221TC / rs246221TT genotípus_kombináció és a linEF értékek.

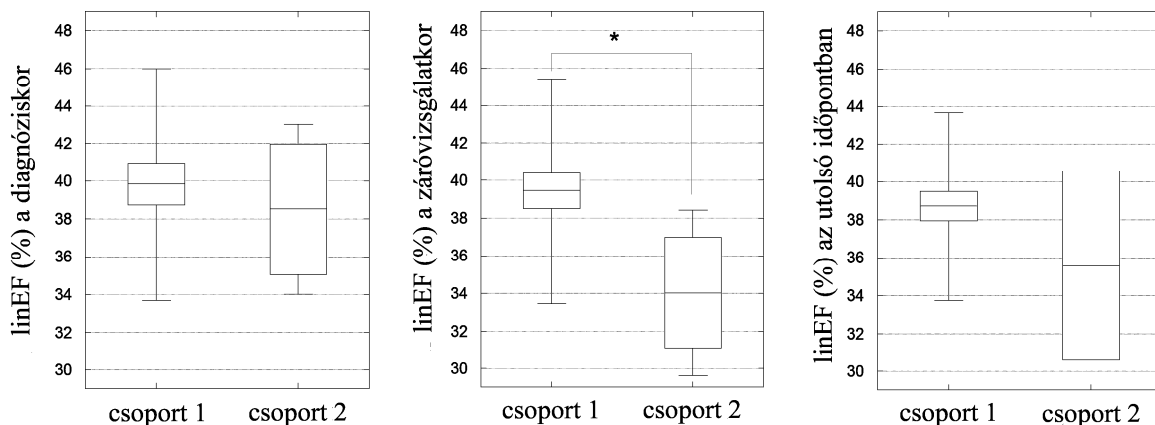
Gén	mérés	N össz	linEF 1. csoport ¹	SD	N 1. csoport	linEF 2. csoport ²	SD	N 2. csoport	p érték
<i>ABCC1</i>	linEF dg.	131	39,8	6,2	122	38,5	4,5	9	0,4
<i>ABCC1</i>	linEF za.	169	39,4	6,0	158	34,0	4,4	11	0,001
<i>ABCC1</i>	linEF ut.	163	38,7	4,9	158	35,6	4,0	5	0,1

¹ 1. csoport: azok a betegek, akiknek a genotípusa nem rs3743527TT és rs246221TC / rs246221TT

² 2. csoport: az rs3743527TT és rs246221TC / rs246221TT genotípusú betegek

A linEF érték a csoport átlagát jelöli (%).

Rövidítések: linEF: lineáris ejekciós frakció, linEF dg.: a diagnóziskor meghatározott linEF; linEF za.: a záróvizsgálatkor meghatározott linEF; linEF ut.: az utolsó szívultranhangos mérés alapján számolt linEF, N: mintaszám, SD: szórás



8. ábra: Az rs3743527TT és rs246221TC/rs246221TT genotípus_kombináció és a három időpontban meghatározott linEF értékek.

1. csoport: azok a betegek, akiknek a genotípusa nem rs3743527TT és rs246221TC / rs246221TT

2. csoport: az rs3743527TT és rs246221TC / rs246221TT genotípusú betegek

A linEF értéket box-plot ábrán jelenítettem meg, ahol a box az átlag \pm 95%CI, whisker az átlag \pm SD; A 2. csoportba tartozó egyének utolsó időpontban mért linEF értékénél az átlag \pm SD egyenlő az átlag \pm 95%CI-val; * statisztikailag szignifikáns különbség

Rövidítések: linEF: lineáris ejekciós frakció

6. Megbeszélés

Munkánk célja az intézetben létrehozott gyermek akut limfoid leukémiás hematológiai mintabank vizsgálata volt, a rendelkezésre álló klinikai adatok kiértékelésével. Először az akut limfoid leukémiára való hajlam genetikai hátterét tanulmányoztuk. Vizsgáltuk ABC-transzporter gének funkcionális polimorfizmusainak szerepét a betegség kialakulásában. Részt vettünk a nemzetközi IALLGC konzorcium létrehozásában, és egy genom szintű asszociációs vizsgálattal szignifikánsnak bizonyuló génvariáns, a *CDKN2A* rs3731217 ALL-re való hajlamosító hatását a mi populációnkon is validáltuk.

A betegpopuláció farmakogenetikai vizsgálatához az antraciklinek okozta kardiotoxicitás kialakulásának genetikai hátterét kerestem. Ehhez az ABC-transzporter *ABCC1* gén haplotípus blokkjait lefedve 9 SNP-t elemeztem a klinikai adatokkal.

6.1. Az *ABCB1* és *ABCG2* gének szerepe a gyermekkori ALL kialakulásában

Az akut limfoid leukémia egy multifaktoriális betegség, amelynek kialakulását környezeti és genetikai tényezők együttesen okozzák. A szervezet xenobiotikumok, karcinogének elleni védekező rendszerének fontos tagjai az ABC-transzporterek, amelyek működése befolyásolhatja az ALL kialakulását, a betegség jelemzőit, kimenetelét. Munkánkban az *ABCB1* és *ABCG2* gének polimorfizmusait vizsgálva azt az eredményt kaptuk, hogy az egyes SNP-k nem befolyásolják a fent felsorolt tényezőket, míg egyes haplotípusok és genotípus-kombinációk frekvenciái eltértek a beteg- és kontrollcsoport között.

Az *ABCB1* gén polimorfizmusainak szerepét az ALL-rizikóban már többen vizsgálták, de egymásnak ellentmondó eredmények születtek. A mi vizsgálatunkban volt a legnagyobb az esetszám ($n=396$), de eredményeink nem igazolták a korábbi tanulmányokban leírt 3435TT genotípus hajlamosító szerepét. Viszont adataink alapján felvetődik a lehetőség, hogy az *ABCB1* gén bizonyos genotípus és haplotípus kombinációi befolyásolhatják az ALL-re való rizikót a vizsgált betegpopuláción.

Az *ABCB1* 3435TT genotípus ALL-re való hajlamosító hatását írta le Jamroziak [8], kaukázusi populáción. Ezt a mi eredményeink nem támasztották alá, de nincs feltétlenül szó ellentmondásról. Ugyanis a pozitív eredményt viszonylag kis létszámú populáción kapták (113 beteg és 157 kontroll), határeset szignifikanciával ($p=0,037$). A

Bonferroni-korrekciót alkalmazva, ha csak a legelső számolásukhoz elvégzett 3 összehasonlítással osztunk ($0,05/3=0,016$) máris nem szignifikáns az eredményük.

Az *ABCB1* 3435TT genotípus hajlamosító szerepét kimutató másik tanulmányban [23] erős szignifikancia értéket kaptak ($p=0,006$), de ez eredmény szintén nem vethető össze a mi adatunkkal, a populációk különbözősége miatt, mert ők japán populáción jutottak erre az eredményre [95]. Indiai populáción szintén az *ABCB1* 3435TT genotípus hajlamosító szerepét találták [135].

Az *ABCB1* 3435TT polimorfizmus önmagában semleges szerepét az ALL kialakulásában megerősíti a 107 ALL-es és 111 kontroll mexikói gyermekben végzett összehasonlítás, miszerint ez az SNP nem függ össze az ALL-el [96]. Az eredmény nem meglepő, mert több tanulmány igazolja, hogy kis hatású polimorfizmusok önmagukban nem, hanem csak egyéb polimorfizmusokkal, ill. környezeti tényezőkkel közösen alakítanak ki beteg fenotípust.

Egy másik munkában nem találtak összefüggést az *ABCB1* gén polimorfizmusai és az ALL kialakulása között észak-amerikai spanyolajkú és nem-spanyol betegpopulációban, továbbá kódoló régióban levő polimorfizmusok által alkotott haplotípusok (C1236T-G2677T/A-C3435T) közül egyik sem hajlamosított ALL-re. A polimorfizmusokkal kapott eredmény a mi eredményünket támasztja alá. A haplotípus analízis eredményei közötti különbség oka lehet az, hogy míg ők három SNP által létrehozott haplotípusokat vizsgáltak, mi csak a 3435 és 2677 pozíciók által meghatározott haplotípus-gyakoriságokat hasonlítottuk össze. A csoport hiperdiploid ALL szubpopuláción kapott eredményeit szintén nem erősítettük meg. Viszont a mi betegcsoportunk jóval nagyobb volt, mint az övék (78 szemben a 27-tel), ami növeli az elvégzett statisztikai próba erejét [63].

Az eredmények közötti különbözőség oka lehet az, hogy viszonylag alacsony a tanulmányokban vizsgált betegpopuláció száma ahhoz, hogy a polimorfizmusok szerény hatását ki lehessen mutatni, és emiatt alacsony a vizsgálat ereje. A multifaktoriális betegségek kialakulásában sok kis hatású allél játszik szerepet, ezért vizsgálatukhoz nagy, homogén és homogén környezetből származó populáció szükséges. Azonban nagyon nehéz azonos környezeti háttérrel és etnikummal rendelkező betegből elegendőt összegyűjteni ahhoz, hogy egy gyenge genetikai hatást megfelelő statisztikai erővel ki tudjunk mutatni [136].

Az ALL kialakulásában közrejátszik a környezeti háttér, ill. a gén-környezet interakció is, ami a különböző etnikumú, különböző helyen, kultúrákban élő populációknál biztosan eltérő. A miénkkel együtt az összesen 5 tanulmány, amelyben az *ABCB1* szerepét vizsgálták, különböző populációkat elemzett. Nagyon valószínű, hogy az észak-amerikai spanyolajkú [63], lengyel [8], japán [95] és mexikói [96] betegeket más környezeti hatások érték, mint a magyarországiakat. A környezeti tényezők fontos szerepére utal Urayama eredménye is, miszerint az egyik haplotípus akkor nyújt védelmet ALL-lel szemben, ha a környezetben rovaritószerrel használnak. Nem ezt a haplotípust hordozó személyek rizikója az ALL-re 3-szor nagyobb volt [63]. A populációk genetikai háttere is különböző, ami okozhatja az eredmények eltéréseit.

A mi, *ABCB1* gén polimorfizmusaival kapcsolatos eredményünket támasztotta alá az öt tanulmány adatai alapján végzett meta-analízis eredménye, miszerint a gén polimorfizmusai önmagukban nem hajlamosítanak ALL-re. Ebben a tanulmányban haplotípus elemzést nem végeztek [30]. A meta-analízis eredményének értelmezéséhez fontos említeni a nem publikált, de valószínűleg elvégzett negatív eredményt adó asszociációs vizsgálatokat és az etnikum meghatározásának hiányát sok esetben. Egy-egy polimorfizmus lehet, hogy csak egy adott populációban hajlamosít, a meta-analízis viszont összemossa ezeket a különbségeket. Fontos szempont még a megfelelő kontrollok gyűjtése és ennek leírása a cikkben. Lehetőleg ne kórházban, hanem az egészséges populációból gyűjtött kontrollokkal készüljön az összehasonlítás, mert a polimorfizmus hozzájárulhat más betegség kialakulásához, amit esetleg nem tekintettek kizáró tényezőnek a kontrollok gyűjtésekor [30].

Az tanulmányainkat limitáló tényezők egyike az, hogy a betegpopulációban alulreprezentált a mintagyűjtési periódusunk előtt meghalt betegek száma. Az eredményeinket módosíthatná, ha az összes betegről tudtunk volna DNS mintát gyűjteni. A másik limitáló tényező az, hogy a beteg- és kontrollcsoportunkat csak nem és etnikum szerint illesztettük, de az életkoruk szignifikánsan eltér. Szerintünk ez azonban nem befolyásolja jelentősen az eredményeinket, mert a beteg- és kontrollcsoportban kapott allél- és genotípus-frekvenciák megegyeznek a kaukázusi populációban leírtakkal. Nem valószínű, hogy azonos etnikumú és azonos környezetből származó csoport genetikailag eltérne csupán az életkori különbözőség miatt. Továbbá a korábban semmilyen rákos megbetegedésben nem szenvedő egészséges véradók felnőtt

kora miatt biztosan nem fog náluk gyermekkori ALL kialakulni később. Ezért szerintünk ők megfelelő kontrollcsoport a betegekhez, az életkoruk nem befolyásolja az eredményeket.

Az ABCB1 transzporter fiziológiás szerepe még ma sem pontosan ismert. Szubsztrátjai közé tartozik sok toxin, ami alapján nagyon valószínű, hogy fontos feladata van a szervezet xenobiotikumok elleni védelmében. Ez alapján feltételezhető, hogy ha az ABCB1 protein funkciója genetikai vagy szerzett okok miatt megváltozik, ez vezethet ahhoz, hogy nagyobb lesz a szervezetet érő toxinterhelés, ami miatt a tumor keletkezésének rizikója megnő. Ezen kívül az ABCB1 apoptózis, immunválasz és őssejtek regulálásában betöltött szerepe is játszhat szerepet a karcinogenezisben [62,137,138]. A protein védelmi funkciója a leukémia, ill. más betegség ellen feltételezhetően nem csak abban nyilvánulhat meg, hogy kipumpálja a karcinogéneket a sejtből. Lehetséges egy drog-efflux független mechanizmus is. Az ABCB1-nek alapvető szerepe van a sejtdifferenciáció, proliferáció és túlélés regulálásában [139].

Legtöbbször azt feltételezték, hogy nem maga a 3435C>T SNP, hanem a vele egy haplotípusban levő, nem-szinonim SNP (azaz aminosavcserét okozó) okozhatja a megfigyelt eltérést. De kimutatták, hogy nem másik, hanem ez az SNP felelős a különbségért [67,72]. Máskor a 3435C>T polimorfizmus nem önmagában okozta a megfigyelt változást a génexpresszióban, protein funkcióban, szubsztrátspecificitásban, hanem adott haplotípus részeként [67].

Szerintünk a negatív szelekció miatt kicsi annak a valószínűsége, hogy gyakori allélok, genotípusok és haplotípusok jelentős szerepet játszanak olyan súlyos, régebben egyértelműen halálos betegségekre való hajlamban, mint az ALL. Az ilyen allélok a populációból kiszelektálódnak, hacsak nincs az allélnak más területeken előnyös hatása. Ez különösen igaz gyermekek esetében, mert még a reprodukív életkor előtt halálos volt a betegség, tehát nem tudta az allélt átadni az utódjának. Viszont az ABCB1 számos különböző fiziológiás szerepe miatt nem is lehetséges csupán megváltozott szubsztrát-specificitással megmagyarázni a haplotípusok és genotípusok szerepét egy ilyen összetett folyamatban. Az ABCB1 különböző alléljának és haplotípusainak szerepét a gyermekkori ALL-ben nagy populáción végzett prospektív tanulmányokkal szükséges ellenőrizni, amelyek a gén-gén és gén-környezet interakciókat is figyelembe veszik.

6.2. Az ALL-re való hajlam vizsgálata nemzetközi együttműködés keretében

Az angliai munkacsoport a saját populációjukon végzett genom szintű asszociációs vizsgálat eredményét megerősítette független német populáción is. A szignifikánsnak kapott SNP, a *CDKN2A* rs3731217 genotipizálását a mi mintáinkon is elvégeztük. Adataink alapján ez az SNP nem hajlamosít ALL-re sem a teljes magyar populáción, sem csak B-sejtes ALL-eseken nézve, viszont a T-sejtes ALL-re való hajlamot befolyásolja. Az együttműködésben részt vevő 6 populáció adatait együtt elemezve az SNP ALL-rizikót befolyásoló hatása elmondható mind a teljes ALL-es betegcsoporton, mind a B-, ill. T-sejtes ALL-es betegeket külön elemezve.

A genom szintű asszociációs vizsgálatoknál először kisebb populáción sok (több százezer) SNP genotipizálását végzik el sokszor, majd a kapott eredményt nagyobb populáción ellenőrzik.

Ennek a kísérleti felépítésnek több oka van. Egyik az, hogy több tízezer mintán nagyon költséges lenne a sok SNP genotipizálása és technikailag is nehezebben kivitelezhető. Másik oka az, hogy az eredmények ellenőrzése, a kísérlet megismétlése elengedhetetlen. A validálás szükségességét az is adja, hogy a nagy számú SNP, azaz a sok összehasonlítás miatt megnő az elsőfajú statisztikai hiba elkövetésének valószínűsége. Azaz olyat is szignifikánsnak mondhatnak, ami valójában nem az. Ez 0,05-ös p érték mellett 100 összehasonlításból 5-ször fordul elő. Ennek kiküszöbölésére használt legegyszerűbb korrekció a Bonferroni-korrekció, amikor az összehasonlítások számával osztják a p értéket. A szignifikánsnak kijött SNP-t így is szükséges független populációkon validálni.

A mi populációnk nem mutatta pontosan ugyanazt az összefüggést, mint az eredeti adatok, csak tendencia szinten, de a hat populáció adatai alapján összességében szignifikánsnak bizonyult az SNP hatása.

A magyar populáció eredményeinek eltérése nem egyedi eset az elemzés során. Az európai spanyol populáció adatai hasonló eredményt mutattak. Az angol populációk közül az egyik nem volt szignifikáns csak a B-sejtes ALL-eseket elemezve, a másik pedig csak a T-sejtes ALL-eseket elemezve. A különbség oka lehet a populációk genetikai különbözősége és az eltérő környezeti háttér.

Az rs3731217 polimorfizmus a 9p21.3 kromoszómaterületen van, egy 174 kb-ás hosszú kapcsolt régióban. A polimorfizmus a tumor-szupresszor *CDKN2A* gén első

intronjában van, ami két fehérjét kódol. Az egyik a p16 (INK4A), ami a ciklinfüggő kinázok negatív regulátora, a másik a p53 aktivátor p14 (ARF) [140].

A polimorfizmussal kapcsolt területen van még a *CDKN2B*, ami szintén egy tumor-szupresszor gén és a nem kódoló antiszenz RNS-t kódoló *CDKN2BAS* régió. A *CDKN2A* (régebbi neve p16) és a *CDKN2B* (p15) gyakran inaktiválódik hematológiai betegségekben [140,141]. A *CDKN2A* mono- vagy biallélikus deléciója az egyik leggyakoribb, gyermekkori B- és T-sejtes ALL-ben és másodlagosan megjelenő mutációként is leírták [33,134,142]. A karcinogenezis során ez a gén általában szomatikus mutációk miatt veszik el, de a csoport angol, ill. német mintáiban levő sejtklonokban nem volt kapcsolat a T allél jelenléte és a génre mono-, ill. biallélikus forma előfordulása között [134].

A csoport vizsgálta az rs3731217 SNP-vel kapcsoltágban levő SNP-k és az ALL közötti asszociációt, de ezzel az SNP-vel volt a legerősebb a kapcsolat. Továbbá ez az SNP nem kapcsolt nem-szinonim polimorfizmussal. A polimorfizmus funkcióját keresve vizsgálták a gén expressziója és az egyes allélok jelenléte között az összefüggést, de nem volt kapcsolat. Transzkripciós faktor kötőhelyet sem találtak itt [134].

A genomszintű asszociációs vizsgálatok nagyon fontosak a betegségek hátterének, patomechanizmusának megértésében. Az előzetes tudástól, feltételezésektől nem függő vizsgálat kiválóan alkalmas eddig funkcionalitását tekintve feltérképezetlen vagy kevésbé ismert genomterületek beazonosításához. Az ALL patomechanizmusa, a kialakulására hajlamosító genetikai tényezők a mai napig nem teljesen ismertek. Ez a vizsgálat hasznos információt nyújt a teljes kép megértéséhez, de még számos további vizsgálat szükséges.

6.3. *ABCCI* polimorfizmusok szerepe az antraciklinek okozta kardiotoxicitásban

Napjainkban a gyermekkori akut limfoid leukémiában szenvedő betegek nagy része meggyógyul és még évtizedekig él a betegsége után. A kemoterápia késői mellékhatásai viszont ekkora alakulnak ki és okoznak újabb egészségügyi problémát a túlélőknek. Az egyik legfontosabb késői mellékhatás a szív károsodása, aminek megjelenésében az antraciklinek nagy szerepet játszanak. Az egyes betegek közt jelentősen eltér a károsodás mértéke és kialakulásának ideje, ami a genetikai háttér befolyásoló szerepére utal. Munkánkban az *ABCCI* gén egy pontos nukleotid polimorfizmusainak és a bal kamra funkciójának az összefüggését vizsgáltuk a kemoterápiás kezelés után.

A záróvizsgálatkor az *ABCCI* rs3743527TT genotípusú és a TT-TC/TT (rs3743527-rs246221) genotípus-kombinációjú betegeknél alacsonyabb szívfunkció értéket találtunk. Az rs246221T alléllal rendelkező betegek szívfunkciója az utolsó szívtultrahangos mérés idején volt alacsonyabb.

Az irodalomban idáig két olyan közlemény jelent meg, ami ABC-transzporterek szerepét vizsgálja az antraciklinek mellékhatásaként kialakuló szívpanaszokban [107,143]. Wojnowski munkacsoportjában non-Hodgkin limfómás felnőtt betegeknél 82 gén 206 polimorfizmusát genotipizálták. A betegek kaukázusi származásúak voltak, közülük 87 egyénnek lett valamilyen szívfunkció-csökkenése. Őket hasonlították össze 363 olyan beteggel, akiknek nem mutatkozott szívproblémájuk. Azt találták, hogy összefüggés van a NAD(P)H-oxidáz multienzim-komplex NFC4 alegységének egyik polimorfizmusa (rs1883112) és a krónikus antraciklin-indukálta kardiotoxicitás kialakulása között. Az akut kardiotoxicitás ugyanennek az enzimnek két másik alegységében található SNP-k jelenlétével (*CYBA* rs4673 és *RAC2* rs13058338) továbbá az *ABCCI* Gly671Val (rs45511401) SNP-vel és az *ABCC2* Val1188Glu-Cys1515Tyr (rs8187694-rs8187710) haplotípusával függött össze [107].

Mi nem találtunk asszociációt az *ABCCI* rs45511401 SNP és a klinikai adataink között. Ennek számos oka lehet, többek között az, hogy az ALL-es és non-Hodgkin limfómás betegeket más protokollal kezelték, valamint a betegek életkora is eltért. Emellett ez az SNP ritka, kicsi a minor allélfrekvenciája, és a vizsgált betegcsoport sem túl nagy egyik esetben sem. Ez a két tényező együttesen azt eredményezi, hogy mindkét

vizsgálatban alacsony a statisztikai próba ereje, a valódi összefüggés kimutatásához ilyen allélfrekvencia mellett nagyobb mintaszámra lenne szükség. Továbbá a non-Hodgkin limfómát vizsgáló kutatócsoport részben olyan adatokkal definiálta a kardiotoxicitás kialakulását, amelyekkel mi nem rendelkezünk. Az akut kardiotoxicitás esetén ezek a következők voltak: aritmia, miokarditisz, perikarditisz és akut szívelégtelenség. A krónikus kardiotoxicitás kritériumait az ejekciós frakció 50% alá vagy a lineáris ejekciós frakció 25% alá csökkenésével definiálták [107]. Az első három állapot rendkívül ritka a gyermekkori ALL-esek között, nincs statisztikai számításokhoz elegendő ilyen adat a mi anyagunkban, és összesen egy betegnek volt a lineáris ejekciós frakciója 25% alatt.

Fontos tényező még, hogy ők az *ABCCI* rs45511401 SNP és az akut kardiotoxicitás között találtak összefüggést, viszont a krónikus kardiotoxicitással nem. Ez utóbbi definiálása áll közelebb a mi munkánkhoz, hiszen mi is lineáris ejekciós frakció csökkenést vizsgáltunk. Összességében a fontos hasonlóság a két tanulmány között az, hogy mindketten találtunk összefüggést szívkárosodás megjelenése és *ABCCI* gén variánsa között. Pontos következtetés levonásához azonban mindkét vizsgálatot meg kell ismételni hasonlóan tervezett, nagyobb, független populáción is több *ABCCI* SNP elemzésével.

A másik tanulmányban többféle, antraciklinekkel is kezelt gyermekkori tumoros beteget vizsgáltak. Eredményeik között szerepelt egy általunk nem vizsgált *ABCCI* polimorfizmus (rs4148350) és az antraciklin-indukálta kardiotoxicitás összefüggése, amit ők is a lineáris ejekciós frakcióval jellemeztek [143].

Az *ABCC1* transzporter fontos a sejtek védelmében. A legtöbb sejten a bazolaterális membránban helyezkedik el, szemben a többi detoxifikálást végző ABC-transzporterrel, amelyek elsősorban az apikális membránba ágyazódnak. Ez alapján feltételezhető, hogy ennek a transzporternek a feladata elsősorban a sejtek védelme a károsító hatásoktól, és nem a felszívódás gátlása és kiválasztás serkentése [84]. A doxorubicin sejtbe történő bejutásához nem szükséges transzporter, ezért a kiszállítás nagyon fontos a sejt védelme érdekében [50,110].

Az *ABCC1* transzporter oxidatív stressz esetén is fontos védelmi feladatot tölt be. Részt vesz a szükséges glutationszint fenntartásában, ami elengedhetetlen a reaktív oxigén gyökök elleni megfelelő védekezéshez. Az antraciklinek szállításához is

szükséges glutation. Ez a két tényező együttesen befolyásolhatja az antraciklinek hatására kialakuló oxidatív stressz elleni hatékony választ [50,54,84,114].

Mindezzel az ismerettel egy irányba mutat a mi eredményünk is, miszerint az ABCC1 fontos a kardiomiociták védelmében.

Idáig nincs sok adat az irodalomban az rs3743527 és rs246221 polimorfizmusok funkcióját illetően. Az *ABCC1* gént több tanulmányban vizsgálták, de általában nem ezeket az SNP-eket [76,92]. Az rs246221 egy exonban található szinonim polimorfizmus (Val275Val), tehát nem okoz aminosav cserét, az ABCC1 protein L0 régiójában található. Egy vizsgálatban az rs2426221 SNP tekintetében polimorf alléllal rendelkező személyek átlagos mRNS szintje csökkent volt. Ebből az adatból azonban nem lehet messzemenő következtetéseket levonni a polimorfizmus hatására vonatkozóan az alacsony mintaszám miatt [89]. Az *ABCC1* gén szekvenálásakor megtalált polimorfizmusok között volt az általunk szignifikánsnak talált rs242261, de ennek nem jósoltak funkcionalitást [92]. Az L0 régió is közreműködik a szubsztrátok megkötésében. Több különböző L0 régióban előforduló aminosavcserét okozó mutáció (W222L, K267M) esetén leírták, hogy a glutation és glukuronid konjugátumokat nem szállítja a mutáns ABCC1 [84].

Az rs3743527 SNP az *ABCC1* gén 3' nem átíródo régiójában (3' UTR) van. Egy olyan közleményt találtam, ami ezt az SNP-t is vizsgálja kínai populáción, tüdőrák hajlammal kapcsolatban [94]. Ők az *ABCBI* és *ABCC1* gének 5' és 3' UTR régiójában levő SNP-eket genotipizálták, és eredményeik alapján az *ABCC1* rs3743527 polimorfizmus kínai populáción tüdőrák kialakulásában nem játszott szerepet. Viszont ettől kb. 300 bázispárnyira levő rs212090 fokozta a tüdőrák rizikóját. Bár a rizikó csak nagyon kismértékű (OR: 1,73, p=0,043, CI 95%: 1,07-2,80), de mégis érdekes ezzel az ennyire közel elhelyezkedő SNP-vel kapott eredmény. A két SNP szomszédos, de nincsenek teljes kapcsoltságban [144]. A két eredmény eltérő populáción, más kérdésfelvetéssel mutatta ki nagyon közeli polimorfizmusok szerepét. Ez megerősíti a funkcionalitás lehetőségét a 3'UTR régióban található polimorfizmusok esetén és az ABCC1 transzporter funkciójának fontos szerepét.

Az SNP-k funkciójának vizsgálatához további tanulmányok szükségesek. Haplotípus-elemzés hasznos lehet, mert előfordulhat, hogy nem pontosan ezek az SNP-k, hanem velük kapcsoltságban levő másik polimorfizmus változtatja meg az ABCC1

működését. A 3' UTR régió szabályozó szerepét is feltételezhetjük. A miRDB mikroRNS adatbázis (<http://mirdb.org/miRDB/>) adatai alapján feltételezett hsa-miR-185, hsa-miR-5480 és hsa-miR-1254 mikroRNS kötőhelyek vannak 500bp távolságon belül az rs3743527 SNP környékén, amiknek szabályozó funkciója lehet. A szabályozó faktorok kötődését is befolyásolja ezzel az SNP-vel egy haplotípusban levő más polimorfizmus. Az ENCODE projekt is azonosított be szabályozó régiókat az SNP-k körül [145]. A CTCF transzkripciós faktor az rs3743527-től 1235bp-ra downstream kötődik, a BAF155 az rs246221-től 893bp távolságra. DNáz hiperszenzitivitás mérésével szintén regulátoros régiókat mutattak ki az SNP-k körül, 3000bp-nyi területen belül.

Eredményünk alapján az antraciklin dózis nem befolyásolja a lineáris ejekciós frakciót. Ennek oka az lehet, hogy a használt antraciklin mennyiség viszonylag alacsony (180-240mg/m²) a populáció kb. 80%-ában.

Meg kell jegyeznünk, hogy a betegpopulációnkban alulreprezentált azoknak a betegeknek a száma, akik mintagyűjtési periódusunk kezdete előtt meghaltak. Ez azonban nem feltétlenül torzít az eredményeinken, hiszen a vizsgált mellékhatás inkább később jelenik meg. Továbbá a meghalt betegek a Magyar Gyerektumor Regiszter adatai alapján nem szívproblémák miatt haltak meg, hanem a kezelés hatástalansága vagy főként fertőzések miatt. Ezért ez a hiányosság valószínűleg nem kérdőjelezi meg az eredményeink hitelességét.

Fontos megjegyezni, hogy a polimorfizmusokkal asszociáló csökkent lineáris ejekciós frakció a normális tartományban van. A National Cancer Institute (USA) Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) v3.0 megállapítása szerint bal kamrai diszfunkciót jelent, ha a lineáris ejekciós frakció értéke 30% alatt van [146]. De több tanulmány szerint a még normális tartományban levő, de alacsonyabb, szubklinikus linEF csökkenés a betegben prognosztikus jelentőségű lehet, későbbi súlyosabb szívprobléma kialakulása szempontjából [11,117].

A kemoterápiás kezelés részeként használt egyéb gyógyszerek, pl.: vinka alkaloidok vagy a metotrexát is okozhatnak kardiotoxicitást. Ezek is ACCC1 szubsztrátok és hatásuk is befolyásolhatta az eredményeinket [131,147]. Azonban általánosan elfogadott, hogy az antraciklinek kardiotoxikus hatása meghaladja az említett gyógyszerekét.

7. Következtetések

- Az *ABCB1* és *ABCG2* gének szerepét vizsgálva a gyermekkori akut limfoid leukémia kialakulásában a következő eredményekre jutottunk. A magyar ALL-es gyermekekben az *ABCB1* és *ABCG2* gének vizsgált polimorfizmusai és ezek leggyakoribb haplotípusai nem befolyásolták a betegség kialakulását. Viszont az *ABCB1* gén 2677G-3435T allélokot tartalmazó, ritka haplotípusa megnövekedett, a 2677T-3435C haplotípus csökkent ALL-rizikóval járt együtt. Ezenkívül az egy génben található, két SNP genotípusai által alkotott ritka genotípus-kombinációk közül a GT/TT és GG/CT (*ABCB1* 2677G>T/A - 3435C>T) az ALL-esekben, a TT/CT a kontrollokban volt gyakoribb.

- A nemzetközi együttműködés keretében végzett vizsgálatunkban a *CDKN2A* gén rs3731217 polimorfizmusának ALL-re való hajlamosító hatását tanulmányoztuk. A polimorfizmus a mi populációnkon nem hajlamosított ALL-re, sem B-sejtes ALL-re. A T-sejtes ALL-eseket külön elemezve az rs3731217 G allél statisztikailag szignifikánsan befolyásolta az ALL-re való hajlamot. A vizsgálatba összesen bevont hat populáció adatai alapján ez a polimorfizmus befolyásolja az ALL kialakulását, mind együtt nézve a betegeket, mind az alpopulációkat (B- és T-sejtes ALL) külön elemezve is.

- Az antraciklinek kardiotoxikus hatásának és az *ABCCI* gén polimorfizmusainak összefüggését vizsgálva az alábbi eredményeket kaptuk. Az rs3743527TT genotípusú betegek záróvizsgálatkori szívvultrahang alapján meghatározott lineáris ejekciós frakciója (linEF) szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a CC és CT genotípusú betegeké. Az *ABCCI* rs246221 T allél jelenléte esetén az utolsó szívvultrahangos mérés időpontjában a betegeknek alacsonyabb volt a linEF értéke, mint a CC genotípusúaknak. Az rs3743527 és rs246221 SNPk által meghatározott genotípus-kombinációk közül az rs3743527TT - rs246221TC/TT-vel rendelkező betegek linEF értéke alacsonyabb volt a záróvizsgálatkor, mint a többi betegnek.

8. Összefoglalás

Napjainkban a gyermekkori akut limfoid leukémia (ALL) az esetek 80%-ában gyógyítható, de kevés ismeret áll rendelkezésre a betegség kialakulásának genetikai okairól. Az elvégzett tanulmányok eredményeit független, nagyobb betegpopuláción meg kell ismételni. Az ALL-es betegek a diagnózis után évtizedekig is élhetnek, viszont sokuk a kezelés késői mellékhatásaitól szenved, például gyakoribb és korábban jelentkezik náluk szívelégtelenség. A kemoterápiás szerek közül az antraciklinek szívkárosító hatása a legjelentősebb. Munkámban a xenobiotikumokat szállító ABC-transzporterek genetikai variánsai és az ALL kialakulása, ill. a csökkent szívfunkció közötti asszociációt kerestem. Ezen kívül részt vettünk egy nemzetközi konzorciumban, egy korábbi genomszintű asszociációs vizsgálat eredményének a megerősítésében.

Saját populációnkon az *ABCB1* és *ABCG2* polimorfizmusok ALL-rizikóban betöltött szerepét vizsgálva azt az eredményt kaptam, hogy az *ABCB1* ritka TC haplotípus gyakoribb volt a kontrollokban, míg a ritka GT haplotípus a betegekben volt gyakoribb. Az *ABCB1* 2677G>T/A és 3435C>T SNP-k GT/TT és a GG/CT genotípus-kombinációja betegekben volt gyakoribb, a TT/CT kontrollokban.

Egy korábbi GWA tanulmány eredményét nagyobb populáción is ellenőrizték. A hat kaukázusi betegpopuláció összesített genotípus adatai alapján a *CDKN2A* rs3731217 SNP befolyásolta a kockázatot ALL-re, mind ALL-re, mint B-, ill. T-sejtes ALL-re. Az rs3731217 a magyar populációban csak a T-sejtes ALL-re való hajlamot befolyásolta.

Az *ABCC1* kardiotoxicitás kialakulásában betöltött szerepét vizsgáló munkámban azt találtam, hogy az *ABCC1* rs3743527TT genotípusú vagy TT-TC/TT (rs3743527-rs246221) genotípus-kombinációjú betegek lineáris ejekciós frakciója a záróvizsgálatkor alacsonyabb volt. Az rs246221T allélt hordozó betegek lineáris ejekciós frakciója csökkent volt az utolsó szívtultrahangos mérés időpontjában.

Eredményeink hozzájárulnak az ALL-kialakulás genetikai hátterének jobb megértéséhez. Az *ABCB1* gén ritka haplotípusai és genotípus-kombinációi befolyásolhatják az ALL rizikóját. A nagyobb populáción történt vizsgálat eredménye szerint a *CDKN2A* gén befolyásolhatja az ALL rizikóját. Eredményeink alapján az *ABCC1* megváltozott működése közrejátszhat az antraciklinek kardiotoxikus mellékhatásában, az *ABCC1* genetikai variánsai összefüggtek a csökkent szívfunkcióval.

9. Summary

Nowadays the childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL) is curable in 80% of the cases, but there is little knowledge on the genetic background of the pathogenesis of this disease. The results of the performed studies must be replicated in larger and independent cohorts. ALL patients survive for decades after the diagnosis, but they may suffer from late side effects of the treatment. The cardiotoxicity are more frequent among them and develops earlier. The anthracyclines are the chemotherapeutic agents with the strongest cardiotoxic effect. In our studies I searched for association of genetic variants in the xenobioticum transporting ABC-transporters with ALL-susceptibility or decreased cardiac function. As a member of an international consortium we also participated in the validation of the result of a previous genome-wide association study.

In our population, studying the possible role of *ABCB1* and *ABCG2* polymorphisms on ALL risk, I have found that the rare TC haplotype of *ABCB1* were more prevalent in controls, and the rare GT haplotype was more frequent in cases. The GT/TT and GG/CT genotype combination of 2677G>T/A, and 3435C>T *ABCB1* SNPs were more frequent in patients, while the TT/CT was more frequent in controls.

The result of a previous GWA study was validated using a larger cohort. The pooled genotype data of six Caucasian patient populations showed the association of *CDKN2A* rs3731217 with ALL, both B- and T-cell ALL. In the Hungarian patient cohort on its own, rs3731217 only influenced the risk of T-ALL.

In our study examining the role of *ABCC1* in the development of cardiotoxicity I have found that patients with *ABCC1* rs3743527TT genotype or with genotype combination TT-TC/TT (rs3743527-rs246221) had reduced left ventricular fractional shortening (LVFS) at the end of treatment. Patients with rs246221T allele had reduced LVFS at the time of latest echocardiography.

Our results provide more understanding of the genetic background of the pathogenesis of ALL as rare haplotypes and genotype combinations of *ABCB1* might influence the ALL risk. The result of *CDKN2A* SNP study on larger population shows that *CDKN2A* gene might influence the ALL risk. According to our results altered function of *ABCC1* transporter might be involved in the development of anthracycline induced cardiotoxicity, as *ABCC1* genetic variants were associated with reduced cardiac function.

10. Irodalomjegyzék

1. Páll G. (2004) Gyermek egészségügyi jelentés, Országos Szakfelügyeleti Módszertani Központ,
http://193.225.50.35/dokumentum/NEJ/nej2004_gyermekesegszsegugy.pdf.
2. Automated Childhood Cancer Information System, <http://www-dep.iarc.fr/accis.htm>.
3. Kaatsch P. (2010) Epidemiology of childhood cancer. *Cancer Treat Rev*, 36: 277-285.
4. Torok S, Borgulya G, Lobmayer P, Jakab Z, Schuler D, Fekete G. (2005) Childhood leukaemia incidence in Hungary, 1973-2002. Interpolation model for analysing the possible effects of the Chernobyl accident. *Eur J Epidemiol*, 20: 899-906.
5. Bolufer P, Barragan E, Collado M, Cervera J, Lopez JA, Sanz MA. (2006) Influence of genetic polymorphisms on the risk of developing leukemia and on disease progression. *Leuk Res*, 30: 1471-1491.
6. Pui CH, Relling MV, Downing JR. (2004) Acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*, 350: 1535-1548.
7. Borst P, Elferink RO. (2002) Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annu Rev Biochem*, 71: 537-592.
8. Jamroziak K, Mlynarski W, Balcerczak E, Mistygacz M, Trelinska J, Mirowski M, Bodalski J, Robak T. (2004) Functional C3435T polymorphism of MDR1 gene: an impact on genetic susceptibility and clinical outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Eur J Haematol*, 72: 314-321.
9. Hirschhorn JN, Daly MJ. (2005) Genome-wide association studies for common diseases and complex traits. *Nat Rev Genet*, 6: 95-108.
10. Pui CH, Evans WE. (2006) Treatment of acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*, 354: 166-178.
11. Lipshultz SE, Alvarez JA, Scully RE. (2008) Anthracycline associated cardiotoxicity in survivors of childhood cancer. *Heart*, 94: 525-533.
12. Armstrong GT, Liu Q, Yasui Y, Neglia JP, Leisenring W, Robison LL, Mertens AC. (2009) Late mortality among 5-year survivors of childhood cancer: a summary from the Childhood Cancer Survivor Study. *J Clin Oncol*, 27: 2328-2338.

13. Sundberg KK, Doukkali E, Lampic C, Eriksson LE, Arvidson J, Wettergren L. (2010) Long-term survivors of childhood cancer report quality of life and health status in parity with a comparison group. *Pediatr Blood Cancer*, 55: 337-343.
14. Rubnitz JE, Pui CH. (2003) Recent advances in the treatment and understanding of childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Cancer Treat Rev*, 29: 31-44.
15. Cheok MH, Lugthart S, Evans WE. (2006) Pharmacogenomics of acute leukemia. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 46: 317-353.
16. Stanczyk M, Sliwinski T, Cuchra M, Zubowska M, Bielecka-Kowalska A, Kowalski M, Szemraj J, Mlynarski W, Majsterek I. (2010) The association of polymorphisms in DNA base excision repair genes XRCC1, OGG1 and MUTYH with the risk of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Mol Biol Rep*.
17. Armstrong SA, Look AT. (2005) Molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*, 23: 6306-6315.
18. Dhingra B, Bhargava R, Mishra P. (2009) Acute lymphoblastic leukaemia with unusual chromosomal abnormality: t(3;9) (p21;p13), del(10p12) [13]. *Leuk Res*, 33: e221-223.
19. Mullighan CG, Phillips LA, Su X, Ma J, Miller CB, Shurtleff SA, Downing JR. (2008) Genomic analysis of the clonal origins of relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Science*, 322: 1377-1380.
20. Ebert BL, Golub TR. (2004) Genomic approaches to hematologic malignancies. *Blood*, 104: 923-932.
21. Ross ME, Zhou X, Song G, Shurtleff SA, Girtman K, Williams WK, Liu HC, Mahfouz R, Raimondi SC, Lenny N, Patel A, Downing JR. (2003) Classification of pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. *Blood*, 102: 2951-2959.
22. Armstrong SA, Hsieh JJ, Korsmeyer SJ. (2002) Genomic approaches to the pathogenesis and treatment of acute lymphoblastic leukemias. *Curr Opin Hematol*, 9: 339-344.
23. Pui CH, Schrappe M, Ribeiro RC, Niemeyer CM. (2004) Childhood and adolescent lymphoid and myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*: 118-145.

24. Gaynon PS, Angiolillo AL, Carroll WL, Nachman JB, Trigg ME, Sather HN, Hunger SP, Devidas M. (2010) Long-term results of the children's cancer group studies for childhood acute lymphoblastic leukemia 1983-2002: a Children's Oncology Group Report. *Leukemia*, 24: 285-297.
25. Marder J. (2010) Cancer research. Childhood's cures haunted by adulthood's 'late effects'. *Science*, 328: 1474-1475.
26. Belson M, Kingsley B, Holmes A. (2007) Risk factors for acute leukemia in children: a review. *Environ Health Perspect*, 115: 138-145.
27. Straube S, Westphal GA, Hallier E. (2010) Comment on: Implications of latency period between benzene exposure and development of leukemia-a synopsis of literature. *Chem Biol Interact*, 186: 248-249; author reply 247.
28. Chang JS, Wiemels JL, Chokkalingam AP, Metayer C, Barcellos LF, Hansen HM, Aldrich MC, Guha N, Urayama KY, Scelo G, Green J, May SL, Kiley VA, Wiencke JK, Buffler PA. (2010) Genetic polymorphisms in adaptive immunity genes and childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 19: 2152-2163.
29. Smith A, Lightfoot T, Simpson J, Roman E. (2009) Birth weight, sex and childhood cancer: A report from the United Kingdom Childhood Cancer Study. *Cancer Epidemiol*, 33: 363-367.
30. Vijayakrishnan J, Houlston RS. (2010) Candidate gene association studies and risk of childhood acute lymphoblastic leukemia: a systematic review and meta-analysis. *Haematologica*, 95: 1405-1414.
31. Shalapour S, Eckert C, Seeger K, Pfau M, Prada J, Henze G, Blankenstein T, Kammertoens T. (2010) Leukemia-associated genetic aberrations in mesenchymal stem cells of children with acute lymphoblastic leukemia. *J Mol Med*, 88: 249-265.
32. Li X, Gounari F, Protopopov A, Khazaie K, von Boehmer H. (2008) Oncogenesis of T-ALL and nonmalignant consequences of overexpressing intracellular NOTCH1. *J Exp Med*, 205: 2851-2861.
33. Bateman CM, Colman SM, Chaplin T, Young BD, Eden TO, Bhakta M, Gratias EJ, van Wering ER, Cazzaniga G, Harrison CJ, Hain R, Ancliff P, Ford AM, Kearney L, Greaves M. (2010) Acquisition of genome-wide copy number

- alterations in monozygotic twins with acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 115: 3553-3558.
34. Chen J, Odenike O, Rowley JD. (2010) Leukaemogenesis: more than mutant genes. *Nat Rev Cancer*, 10: 23-36.
35. Dunwell T, Hesson L, Rauch TA, Wang L, Clark RE, Dallol A, Gentle D, Catchpoole D, Maher ER, Pfeifer GP, Latif F. (2010) A genome-wide screen identifies frequently methylated genes in haematological and epithelial cancers. *Mol Cancer*, 9: 44.
36. Chang JS, Wiemels JL, Buffler PA. (2009) Allergies and childhood leukemia. *Blood Cells Mol Dis*, 42: 99-104.
37. Ulusoy G, Adali O, Tumer TB, Sahin G, Gozdasoglu S, Arinc E. (2007) Significance of genetic polymorphisms at multiple loci of CYP2E1 in the risk of development of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Oncology*, 72: 125-131.
38. Canalle R, Burim RV, Tone LG, Takahashi CS. (2004) Genetic polymorphisms and susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia. *Environ Mol Mutagen*, 43: 100-109.
39. Ye Z, Song H. (2005) Glutathione s-transferase polymorphisms (GSTM1, GSTP1 and GSTT1) and the risk of acute leukaemia: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Cancer*, 41: 980-989.
40. Skibola CF, Smith MT, Hubbard A, Shane B, Roberts AC, Law GR, Rollinson S, Roman E, Cartwright RA, Morgan GJ. (2002) Polymorphisms in the thymidylate synthase and serine hydroxymethyltransferase genes and risk of adult acute lymphocytic leukemia. *Blood*, 99: 3786-3791.
41. Kim HN, Kim YK, Lee IK, Yang DH, Lee JJ, Shin MH, Park KS, Choi JS, Park MR, Jo DY, Won JH, Kwak JY, Kim HJ. (2009) Association between polymorphisms of folate-metabolizing enzymes and hematological malignancies. *Leuk Res*, 33: 82-87.
42. Koppen IJ, Hermans FJ, Kaspers GJ. (2010) Folate related gene polymorphisms and susceptibility to develop childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*, 148: 3-14.

43. Lightfoot TJ, Johnston WT, Painter D, Simpson J, Roman E, Skibola CF, Smith MT, Allan JM, Taylor GM. (2010) Genetic variation in the folate metabolic pathway and risk of childhood leukemia. *Blood*, 115: 3923-3929.
44. Yeoh AE, Lu Y, Chan JY, Chan YH, Ariffin H, Kham SK, Quah TC. (2010) Genetic susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia shows protection in Malay boys: results from the Malaysia-Singapore ALL Study Group. *Leuk Res*, 34: 276-283.
45. Joseph T, Kusumakumary P, Chacko P, Abraham A, Pillai MR. (2005) DNA repair gene XRCC1 polymorphisms in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Lett*, 217: 17-24.
46. Han S, Lee KM, Park SK, Lee JE, Ahn HS, Shin HY, Kang HJ, Koo HH, Seo JJ, Choi JE, Ahn YO, Kang D. (2010) Genome-wide association study of childhood acute lymphoblastic leukemia in Korea. *Leuk Res*, 34: 1271-1274.
47. Papaemmanuil E, Hosking FJ, Vijaykrishnan J, Price A, Olver B, Sheridan E, Kinsey SE, Lightfoot T, Roman E, Irving JA, Allan JM, Tomlinson IP, Taylor M, Greaves M, Houlston RS. (2009) Loci on 7p12.2, 10q21.2 and 14q11.2 are associated with risk of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet*, 41: 1006-1010.
48. Trevino LR, Yang W, French D, Hunger SP, Carroll WL, Devidas M, Willman C, Neale G, Downing J, Raimondi SC, Pui CH, Evans WE, Relling MV. (2009) Germline genomic variants associated with childhood acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet*, 41: 1001-1005.
49. Prasad RB, Hosking FJ, Vijaykrishnan J, Papaemmanuil E, Koehler R, Greaves M, Sheridan E, Gast A, Kinsey SE, Lightfoot T, Roman E, Taylor M, Pritchard-Jones K, Stanulla M, Schrappe M, Bartram CR, Houlston RS, Kumar R, Hemminki K. (2010) Verification of the susceptibility loci on 7p12.2, 10q21.2, and 14q11.2 in precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia of childhood. *Blood*, 115: 1765-1767.
50. Borst P, Evers R, Kool M, Wijnholds J. (2000) A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J Natl Cancer Inst*, 92: 1295-1302.

51. Haimeur A, Conseil G, Deeley RG, Cole SP. (2004) The MRP-related and BCRP/ABCG2 multidrug resistance proteins: biology, substrate specificity and regulation. *Curr Drug Metab*, 5: 21-53.
52. Sparreboom A, Danesi R, Ando Y, Chan J, Figg WD. (2003) Pharmacogenomics of ABC transporters and its role in cancer chemotherapy. *Drug Resist Updat*, 6: 71-84.
53. Klein I, Sarkadi B, Varadi A. (1999) An inventory of the human ABC proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1461: 237-262.
54. Kruh GD, Belinsky MG. (2003) The MRP family of drug efflux pumps. *Oncogene*, 22: 7537-7552.
55. Sarkadi B, Ozvegy-Laczka C, Nemet K, Varadi A. (2004) ABCG2 -- a transporter for all seasons. *FEBS Lett*, 567: 116-120.
56. Couture L, Nash JA, Turgeon J. (2007) Role of ATP-binding cassette transporters in drug distribution to the heart and protection from toxic compounds. *Heart and Metabolism*, 35: 1-6.
57. Li L, Pan Q, Han W, Liu Z, Hu X. (2007) Schisandrin B prevents doxorubicin-induced cardiotoxicity via enhancing glutathione redox cycling. *Clin Cancer Res*, 13: 6753-6760.
58. Kerb R, Hoffmeyer S, Brinkmann U. (2001) ABC drug transporters: hereditary polymorphisms and pharmacological impact in MDR1, MRP1 and MRP2. *Pharmacogenomics*, 2: 51-64.
59. Jamroziak K, Robak T. (2004) Pharmacogenomics of MDR1/ABCB1 gene: the influence on risk and clinical outcome of haematological malignancies. *Hematology*, 9: 91-105.
60. Elferink RO. (2003) Cholestasis. *Gut*, 52 Suppl 2: ii42-48.
61. Klimecki WT, Futscher BW, Grogan TM, Dalton WS. (1994) P-glycoprotein expression and function in circulating blood cells from normal volunteers. *Blood*, 83: 2451-2458.
62. Bunting KD. (2002) ABC transporters as phenotypic markers and functional regulators of stem cells. *Stem Cells*, 20: 11-20.
63. Urayama KY, Wiencke JK, Buffler PA, Chokkalingam AP, Metayer C, Wiemels JL. (2007) MDR1 gene variants, indoor insecticide exposure, and the risk of

- childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 16: 1172-1177.
64. Leschziner GD, Andrew T, Pirmohamed M, Johnson MR. (2007) ABCB1 genotype and PGP expression, function and therapeutic drug response: a critical review and recommendations for future research. *Pharmacogenomics J*, 7: 154-179.
 65. Hoffmann U, Kroemer HK. (2004) The ABC transporters MDR1 and MRP2: multiple functions in disposition of xenobiotics and drug resistance. *Drug Metab Rev*, 36: 669-701.
 66. Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, Arnold HP, Brockmoller J, John A, Cascorbi I, Gerloff T, Roots I, Eichelbaum M, Brinkmann U. (2000) Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97: 3473-3478.
 67. Kimchi-Sarfaty C, Oh JM, Kim IW, Sauna ZE, Calcagno AM, Ambudkar SV, Gottesman MM. (2007) A "silent" polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. *Science*, 315: 525-528.
 68. Sai K, Kaniwa N, Itoda M, Saito Y, Hasegawa R, Komamura K, Ueno K, Kamakura S, Kitakaze M, Shirao K, Minami H, Ohtsu A, Yoshida T, Saijo N, Kitamura Y, Kamatani N, Ozawa S, Sawada J. (2003) Haplotype analysis of ABCB1/MDR1 blocks in a Japanese population reveals genotype-dependent renal clearance of irinotecan. *Pharmacogenetics*, 13: 741-757.
 69. Allabi AC, Horsmans Y, Issaoui B, Gala JL. (2005) Single nucleotide polymorphisms of ABCB1 (MDR1) gene and distinct haplotype profile in a West Black African population. *Eur J Clin Pharmacol*, 61: 97-102.
 70. Brunner M, Langer O, Sunder-Plassmann R, Dobrozemsky G, Muller U, Wadsak W, Krcal A, Karch R, Mannhalter C, Dudczak R, Kletter K, Steiner I, Baumgartner C, Muller M. (2005) Influence of functional haplotypes in the drug transporter gene ABCB1 on central nervous system drug distribution in humans. *Clin Pharmacol Ther*, 78: 182-190.
 71. Schwab M, Schaeffeler E, Marx C, Fromm MF, Kaskas B, Metzler J, Stange E, Herfarth H, Schoelmerich J, Gregor M, Walker S, Cascorbi I, Roots I, Brinkmann U, Zanger UM, Eichelbaum M. (2003) Association between the

- C3435T MDR1 gene polymorphism and susceptibility for ulcerative colitis. *Gastroenterology*, 124: 26-33.
72. Wang D, Johnson AD, Papp AC, Kroetz DL, Sadee W. (2005) Multidrug resistance polypeptide 1 (MDR1, ABCB1) variant 3435C>T affects mRNA stability. *Pharmacogenet Genomics*, 15: 693-704.
 73. Sakaeda T. (2005) MDR1 genotype-related pharmacokinetics: fact or fiction? *Drug Metab Pharmacokinet*, 20: 391-414.
 74. Siegsmond M, Brinkmann U, Schaffeler E, Weirich G, Schwab M, Eichelbaum M, Fritz P, Burk O, Decker J, Alken P, Rothenpieler U, Kerb R, Hoffmeyer S, Brauch H. (2002) Association of the P-glycoprotein transporter MDR1(C3435T) polymorphism with the susceptibility to renal epithelial tumors. *J Am Soc Nephrol*, 13: 1847-1854.
 75. Doyle LA, Yang W, Abruzzo LV, Krogmann T, Gao Y, Rishi AK, Ross DD. (1998) A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95: 15665-15670.
 76. Huang Y. (2007) Pharmacogenetics/genomics of membrane transporters in cancer chemotherapy. *Cancer Metastasis Rev*, 26: 183-201.
 77. Allen JD, Schinkel AH. (2002) Multidrug resistance and pharmacological protection mediated by the breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *Mol Cancer Ther*, 1: 427-434.
 78. Honjo Y, Morisaki K, Huff LM, Robey RW, Hung J, Dean M, Bates SE. (2002) Single-nucleotide polymorphism (SNP) analysis in the ABC half-transporter ABCG2 (MXR/BCRP/ABCP1). *Cancer Biol Ther*, 1: 696-702.
 79. Imai Y, Nakane M, Kage K, Tsukahara S, Ishikawa E, Tsuruo T, Miki Y, Sugimoto Y. (2002) C421A polymorphism in the human breast cancer resistance protein gene is associated with low expression of Q141K protein and low-level drug resistance. *Mol Cancer Ther*, 1: 611-616.
 80. Zamber CP, Lamba JK, Yasuda K, Farnum J, Thummel K, Schuetz JD, Schuetz EG. (2003) Natural allelic variants of breast cancer resistance protein (BCRP) and their relationship to BCRP expression in human intestine. *Pharmacogenetics*, 13: 19-28.

81. Mizuarai S, Aozasa N, Kotani H. (2004) Single nucleotide polymorphisms result in impaired membrane localization and reduced atpase activity in multidrug transporter ABCG2. *Int J Cancer*, 109: 238-246.
82. Krishnamurthy P, Schuetz JD. (2006) Role of ABCG2/BCRP in biology and medicine. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 46: 381-410.
83. de Jong FA, Marsh S, Mathijssen RH, King C, Verweij J, Sparreboom A, McLeod HL. (2004) ABCG2 pharmacogenetics: ethnic differences in allele frequency and assessment of influence on irinotecan disposition. *Clin Cancer Res*, 10: 5889-5894.
84. Bakos E, Homolya L. (2007) Portrait of multifaceted transporter, the multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1/ABCC1). *Pflugers Arch*, 453: 621-641.
85. Zhou SF, Wang LL, Di YM, Xue CC, Duan W, Li CG, Li Y. (2008) Substrates and inhibitors of human multidrug resistance associated proteins and the implications in drug development. *Curr Med Chem*, 15: 1981-2039.
86. Jungsuwadee P, Nithipongvanitch R, Chen Y, Oberley TD, Butterfield DA, St Clair DK, Vore M. (2009) Mrp1 localization and function in cardiac mitochondria after doxorubicin. *Mol Pharmacol*, 75: 1117-1126.
87. Deng S, Wojnowski L. (2007) Genotyping the risk of anthracycline-induced cardiotoxicity. *Cardiovasc Toxicol*, 7: 129-134.
88. Kruh GD, Zeng H, Rea PA, Liu G, Chen ZS, Lee K, Belinsky MG. (2001) MRP subfamily transporters and resistance to anticancer agents. *J Bioenerg Biomembr*, 33: 493-501.
89. Conrad S, Kauffmann HM, Ito K, Deeley RG, Cole SP, Schrenk D. (2001) Identification of human multidrug resistance protein 1 (MRP1) mutations and characterization of a G671V substitution. *J Hum Genet*, 46: 656-663.
90. Oselin K, Mrozikiewicz PM, Gaikovitch E, Pahkla R, Roots I. (2003) Frequency of MRP1 genetic polymorphisms and their functional significance in Caucasians: detection of a novel mutation G816A in the human MRP1 gene. *Eur J Clin Pharmacol*, 59: 347-350.
91. Letourneau IJ, Deeley RG, Cole SP. (2005) Functional characterization of non-synonymous single nucleotide polymorphisms in the gene encoding human

- multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1). *Pharmacogenet Genomics*, 15: 647-657.
92. Wang Z, Sew PH, Ambrose H, Ryan S, Chong SS, Lee EJ, Lee CG. (2006) Nucleotide sequence analyses of the MRP1 gene in four populations suggest negative selection on its coding region. *BMC Genomics*, 7: 111.
 93. Plasschaert SL, de Bont ES, Boezen M, vander Kolk DM, Daenen SM, Faber KN, Kamps WA, de Vries EG, Vellenga E. (2005) Expression of multidrug resistance-associated proteins predicts prognosis in childhood and adult acute lymphoblastic leukemia. *Clin Cancer Res*, 11: 8661-8668.
 94. Wang H, Jin G, Liu G, Qian J, Jin L, Wei Q, Shen H, Huang W, Lu D. (2009) Genetic susceptibility of lung cancer associated with common variants in the 3' untranslated regions of the adenosine triphosphate-binding cassette B1 (ABCB1) and ABCC1 candidate transporter genes for carcinogen export. *Cancer*, 115: 595-607.
 95. Hattori H, Suminoe A, Wada M, Koga Y, Kohno K, Okamura J, Hara T, Matsuzaki A. (2007) Regulatory polymorphisms of multidrug resistance 1 (MDR1) gene are associated with the development of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res*, 31: 1633-1640.
 96. Leal-Ugarte E, Gutierrez-Angulo M, Macias-Gomez NM, Peralta-Leal V, Duran-Gonzalez J, De La Luz Ayala-Madrigal M, Partida-Perez M, Barros-Nunez P, Ruiz-Diaz D, Moreno-Ortiz JM, Peregrina-Sandoval J, Meza-Espinoza JP. (2008) MDR1 C3435T polymorphism in Mexican children with acute lymphoblastic leukemia and in healthy individuals. *Hum Biol*, 80: 449-455.
 97. Evans WE, McLeod HL. (2003) Pharmacogenomics--drug disposition, drug targets, and side effects. *N Engl J Med*, 348: 538-549.
 98. Weinshilboum R. (2003) Inheritance and drug response. *N Engl J Med*, 348: 529-537.
 99. Ulrich CM, Robien K, McLeod HL. (2003) Cancer pharmacogenetics: polymorphisms, pathways and beyond. *Nat Rev Cancer*, 3: 912-920.
 100. Meckley LM, Neumann PJ. (2010) Personalized medicine: factors influencing reimbursement. *Health Policy*, 94: 91-100.

101. Menna P, Recalcati S, Cairo G, Minotti G. (2007) An introduction to the metabolic determinants of anthracycline cardiotoxicity. *Cardiovasc Toxicol*, 7: 80-85.
102. Mordente A, Meucci E, Silvestrini A, Martorana GE, Giardina B. (2009) New developments in anthracycline-induced cardiotoxicity. *Curr Med Chem*, 16: 1656-1672.
103. Erdilyi DJ, Kamory E, Csokay B, Andrikovics H, Tordai A, Kiss C, Filni-Semsei A, Janszky I, Zalka A, Fekete G, Falus A, Kovacs GT, Szalai C. (2008) Synergistic interaction of ABCB1 and ABCG2 polymorphisms predicts the prevalence of toxic encephalopathy during anticancer chemotherapy. *Pharmacogenomics J*, 8: 321-327.
104. Youssef G, Links M. (2005) The prevention and management of cardiovascular complications of chemotherapy in patients with cancer. *Am J Cardiovasc Drugs*, 5: 233-243.
105. Larsen AK, Escargueil AE, Skladanowski A. (2000) Resistance mechanisms associated with altered intracellular distribution of anticancer agents. *Pharmacol Ther*, 85: 217-229.
106. Gonzalez-Covarrubias V, Ghosh D, Lakhman SS, Pendyala L, Blanco JG. (2007) A functional genetic polymorphism on human carbonyl reductase 1 (CBR1 V88I) impacts on catalytic activity and NADPH binding affinity. *Drug Metab Dispos*, 35: 973-980.
107. Wojnowski L, Kulle B, Schirmer M, Schluter G, Schmidt A, Rosenberger A, Vonhof S, Bickeboller H, Toliat MR, Suk EK, Tzvetkov M, Kruger A, Seifert S, Kloess M, Hahn H, Loeffler M, Nurnberg P, Pfreundschuh M, Trumper L, Brockmoller J, Hasenfuss G. (2005) NAD(P)H oxidase and multidrug resistance protein genetic polymorphisms are associated with doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Circulation*, 112: 3754-3762.
108. Deng S, Kruger A, Kleschyov AL, Kalinowski L, Daiber A, Wojnowski L. (2007) Gp91phox-containing NAD(P)H oxidase increases superoxide formation by doxorubicin and NADPH. *Free Radic Biol Med*, 42: 466-473.
109. Blanco JG, Leisenring WM, Gonzalez-Covarrubias VM, Kawashima TI, Davies SM, Relling MV, Robison LL, Sklar CA, Stovall M, Bhatia S. (2008) Genetic polymorphisms in the carbonyl reductase 3 gene CBR3 and the

- NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 gene NQO1 in patients who developed anthracycline-related congestive heart failure after childhood cancer. *Cancer*, 112: 2789-2795.
110. Andreadis C, Gimotty PA, Wahl P, Hammond R, Houldsworth J, Schuster SJ, Rebbeck TR. (2007) Members of the glutathione and ABC-transporter families are associated with clinical outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*, 109: 3409-3416.
 111. Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L. (2004) Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev*, 56: 185-229.
 112. Yan T, Deng S, Metzger A, Godtel-Armbrust U, Porter AC, Wojnowski L. (2009) Topoisomerase II α -dependent and -independent apoptotic effects of dexrazoxane and doxorubicin. *Mol Cancer Ther*.
 113. Vergely C. (2007) [Impact of parent organisations in social aspects of cancer childhood care]. *Rev Prat*, 57: 1104-1108.
 114. Wojtacki J, Lewicka-Nowak E, Lesniewski-Kmak K. (2000) Anthracycline-induced cardiotoxicity: clinical course, risk factors, pathogenesis, detection and prevention--review of the literature. *Med Sci Monit*, 6: 411-420.
 115. Iarussi D, Indolfi P, Casale F, Martino V, Di Tullio MT, Calabro R. (2005) Anthracycline-induced cardiotoxicity in children with cancer: strategies for prevention and management. *Paediatr Drugs*, 7: 67-76.
 116. Adams MJ, Lipshultz SE. (2005) Pathophysiology of anthracycline- and radiation-associated cardiomyopathies: implications for screening and prevention. *Pediatr Blood Cancer*, 44: 600-606.
 117. Kremer LC, van der Pal HJ, Offringa M, van Dalen EC, Voute PA. (2002) Frequency and risk factors of subclinical cardiotoxicity after anthracycline therapy in children: a systematic review. *Ann Oncol*, 13: 819-829.
 118. Brouwer CA, Gietema JA, van den Berg MP, Bink-Boelkens MT, Elzenga NJ, Haaksma J, Kamps WA, Vonk JM, Postma A. (2007) Low-dose anthracyclines in childhood Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL): no cardiac deterioration more than 20 years post-treatment. *J Cancer Surviv*, 1: 255-260.

119. Anderson B. (2005) Dexrazoxane for the prevention of cardiomyopathy in anthracycline treated pediatric cancer patients. *Pediatr Blood Cancer*, 44: 584-588.
120. Kovacs GT, Erlaky H, Toth K, Horvath E, Szabolcs J, Csoka M, Jokuti L, Erdelyi D, Muller J. (2007) Subacute cardiotoxicity caused by anthracycline therapy in children: can dexrazoxane prevent this effect? *Eur J Pediatr*, 166: 1187-1188.
121. Barry EV, Vrooman LM, Dahlberg SE, Neuberg DS, Asselin BL, Athale UH, Clavell LA, Larsen EC, Moghrabi A, Samson Y, Schorin MA, Cohen HJ, Lipshultz SE, Sallan SE, Silverman LB. (2008) Absence of secondary malignant neoplasms in children with high-risk acute lymphoblastic leukemia treated with dexrazoxane. *J Clin Oncol*, 26: 1106-1111.
122. Bains OS, Karkling MJ, Grigliatti TA, Reid RE, Riggs KW. (2009) Two nonsynonymous single nucleotide polymorphisms of human carbonyl reductase 1 demonstrate reduced in vitro metabolism of daunorubicin and doxorubicin. *Drug Metab Dispos*, 37: 1107-1114.
123. Lal S, Sandanaraj E, Wong ZW, Ang PC, Wong NS, Lee EJ, Chowbay B. (2008) CBR1 and CBR3 pharmacogenetics and their influence on doxorubicin disposition in Asian breast cancer patients. *Cancer Sci*, 99: 2045-2054.
124. Bains OS, Takahashi RH, Pfeifer TA, Grigliatti TA, Reid RE, Riggs KW. (2008) Two allelic variants of aldo-keto reductase 1A1 exhibit reduced in vitro metabolism of daunorubicin. *Drug Metab Dispos*, 36: 904-910.
125. Solbach TF, Konig J, Fromm MF, Zolk O. (2006) ATP-binding cassette transporters in the heart. *Trends Cardiovasc Med*, 16: 7-15.
126. Couture L, Nash JA, Turgeon J. (2006) The ATP-binding cassette transporters and their implication in drug disposition: a special look at the heart. *Pharmacol Rev*, 58: 244-258.
127. Meissner K, Heydrich B, Jedlitschky G, Meyer Zu Schwabedissen H, Mosyagin I, Dazert P, Eckel L, Vogelgesang S, Warzok RW, Bohm M, Lehmann C, Wendt M, Cascorbi I, Kroemer HK. (2006) The ATP-binding cassette transporter ABCG2 (BCRP), a marker for side population stem cells, is expressed in human heart. *J Histochem Cytochem*, 54: 215-221.

128. Solbach TF, Paulus B, Weyand M, Eschenhagen T, Zolk O, Fromm MF. (2008) ATP-binding cassette transporters in human heart failure. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 377: 231-243.
129. Lal S, Wong ZW, Sandanaraj E, Xiang X, Ang PC, Lee EJ, Chowbay B. (2008) Influence of ABCB1 and ABCG2 polymorphisms on doxorubicin disposition in Asian breast cancer patients. *Cancer Sci*, 99: 816-823.
130. Sandanaraj E, Lal S, Selvarajan V, Ooi LL, Wong ZW, Wong NS, Ang PC, Lee EJ, Chowbay B. (2008) PXR pharmacogenetics: association of haplotypes with hepatic CYP3A4 and ABCB1 messenger RNA expression and doxorubicin clearance in Asian breast cancer patients. *Clin Cancer Res*, 14: 7116-7126.
131. Simbre VC, Duffy SA, Dadlani GH, Miller TL, Lipshultz SE. (2005) Cardiotoxicity of cancer chemotherapy: implications for children. *Paediatr Drugs*, 7: 187-202.
132. Gharib MI, Burnett AK. (2002) Chemotherapy-induced cardiotoxicity: current practice and prospects of prophylaxis. *Eur J Heart Fail*, 4: 235-242.
133. Fischer S, Lakatos PL, Lakatos L, Kovacs A, Molnar T, Altorjay I, Papp M, Szilvasi A, Tulassay Z, Osztoivits J, Papp J, Demeter P, Schwab R, Tordai A, Andrikovics H. (2007) ATP-binding cassette transporter ABCG2 (BCRP) and ABCB1 (MDR1) variants are not associated with disease susceptibility, disease phenotype response to medical therapy or need for surgery in Hungarian patients with inflammatory bowel diseases. *Scand J Gastroenterol*, 42: 726-733.
134. Sherborne AL, Hosking FJ, Prasad RB, Kumar R, Koehler R, Vijayakrishnan J, Papaemmanuil E, Bartram CR, Stanulla M, Schrappe M, Gast A, Dobbins SE, Ma Y, Sheridan E, Taylor M, Kinsey SE, Lightfoot T, Roman E, Irving JA, Allan JM, Moorman AV, Harrison CJ, Tomlinson IP, Richards S, Zimmermann M, Szalai C, Semsei AF, Erdelyi DJ, Krajcinovic M, Sinnott D, Healy J, Gonzalez Neira A, Kawamata N, Ogawa S, Koeffler HP, Hemminki K, Greaves M, Houlston RS. (2010) Variation in CDKN2A at 9p21.3 influences childhood acute lymphoblastic leukemia risk. *Nat Genet*, 42: 492-494.
135. Rao DN, Anuradha C, Vishnupriya S, Sailaja K, Surekha D, Raghunadharao D, Rajappa S. (2010) Association of an MDR1 gene (C3435T) polymorphism with acute leukemia in India. *Asian Pac J Cancer Prev*, 11: 1063-1066.

136. Jamroziak K, Robak T. (2008) Do polymorphisms in ABC transporter genes influence risk of childhood acute lymphoblastic leukemia? *Leuk Res*, 32: 1173-1175.
137. Smyth MJ, Krasovskis E, Sutton VR, Johnstone RW. (1998) The drug efflux protein, P-glycoprotein, additionally protects drug-resistant tumor cells from multiple forms of caspase-dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95: 7024-7029.
138. Randolph GJ, Beaulieu S, Pope M, Sugawara I, Hoffman L, Steinman RM, Muller WA. (1998) A physiologic function for p-glycoprotein (MDR-1) during the migration of dendritic cells from skin via afferent lymphatic vessels. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95: 6924-6929.
139. Buda G, Orciuolo E, Maggini V, Galimberti S, Barale R, Rossi AM, Petrini M. (2008) MDR1 pump: more than a drug transporter comment on "Regulatory polymorphisms of multidrug resistance 1 (MDR1) gene are associated with the development of childhood acute lymphoblastic leukaemia" by Hattori et al. [*Leuk. Res.* (in press)]. *Leuk Res*, 32: 359-360.
140. Kim M, Yim SH, Cho NS, Kang SH, Ko DH, Oh B, Kim TY, Min HJ, She CJ, Kang HJ, Shin HY, Ahn HS, Yoon SS, Kim BK, Shin HR, Han KS, Cho HI, Lee DS. (2009) Homozygous deletion of CDKN2A (p16, p14) and CDKN2B (p15) genes is a poor prognostic factor in adult but not in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia: a comparative deletion and hypermethylation study. *Cancer Genet Cytogenet*, 195: 59-65.
141. Kim M, Choi JE, She CJ, Hwang SM, Shin HY, Ahn HS, Yoon SS, Kim BK, Park MH, Lee DS. (2011) PAX5 deletion is common and concurrently occurs with CDKN2A deletion in B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood Cells Mol Dis*, 47: 62-66.
142. Dougherty MJ, Wilmoth DM, Tooke LS, Shaikh TH, Gai X, Hakonarson H, Biegel JA. (2011) Implementation of high resolution single nucleotide polymorphism array analysis as a clinical test for patients with hematologic malignancies. *Cancer Genet*, 204: 26-38.
143. Visscher H, Ross CJ, Rassekh SR, Barhdadi A, Dube MP, Al-Saloos H, Sandor GS, Caron HN, van Dalen EC, Kremer LC, van der Pal HJ, Brown AM, Rogers

- PC, Phillips MS, Rieder MJ, Carleton BC, Hayden MR. (2011) Pharmacogenomic Prediction of Anthracycline-Induced Cardiotoxicity in Children. *J Clin Oncol*.
144. Fukushima-Uesaka H, Saito Y, Tohkin M, Maekawa K, Hasegawa R, Kawamoto M, Kamatani N, Suzuki K, Yanagawa T, Kajio H, Kuzuya N, Yasuda K, Sawada J. (2007) Genetic variations and haplotype structures of the ABC transporter gene *ABCC1* in a Japanese population. *Drug Metab Pharmacokinet*, 22: 48-60.
145. Birney E, Stamatoyannopoulos JA, Dutta A, Guigo R, Gingeras TR, Margulies EH, Weng Z, Snyder M, Dermitzakis ET, Thurman RE, Kuehn MS, Taylor CM, Neph S, Koch CM, Asthana S, Malhotra A, Adzhubei I, Greenbaum JA, Andrews RM, Flicek P, Boyle PJ, Cao H, Carter NP, Clelland GK, Davis S, Day N, Dhami P, Dillon SC, Dorschner MO, Fiegler H, Giresi PG, Goldy J, Hawrylycz M, Haydock A, Humbert R, James KD, Johnson BE, Johnson EM, Frum TT, Rosenzweig ER, Karnani N, Lee K, Lefebvre GC, Navas PA, Neri F, Parker SC, Sabo PJ, Sandstrom R, Shafer A, Vetriche D, Weaver M, Wilcox S, Yu M, Collins FS, Dekker J, Lieb JD, Tullius TD, Crawford GE, Sunyaev S, Noble WS, Dunham I, Denoeud F, Reymond A, Kapranov P, Rozowsky J, Zheng D, Castelo R, Frankish A, Harrow J, Ghosh S, Sandelin A, Hofacker IL, Baertsch R, Keefe D, Dike S, Cheng J, Hirsch HA, Sekinger EA, Lagarde J, Abril JF, Shahab A, Flamm C, Fried C, Hackermuller J, Hertel J, Lindemeyer M, Missal K, Tanzer A, Washietl S, Korbelt J, Emanuelsson O, Pedersen JS, Holroyd N, Taylor R, Swarbreck D, Matthews N, Dickson MC, Thomas DJ, Weirauch MT, Gilbert J, Drenkow J, Bell I, Zhao X, Srinivasan KG, Sung WK, Ooi HS, Chiu KP, Foissac S, Alioto T, Brent M, Pachter L, Tress ML, Valencia A, Choo SW, Choo CY, Ucla C, Manzano C, Wyss C, Cheung E, Clark TG, Brown JB, Ganesh M, Patel S, Tammana H, Chrast J, Henrichsen CN, Kai C, Kawai J, Nagalakshmi U, Wu J, Lian Z, Lian J, Newburger P, Zhang X, Bickel P, Mattick JS, Carninci P, Hayashizaki Y, Weissman S, Hubbard T, Myers RM, Rogers J, Stadler PF, Lowe TM, Wei CL, Ruan Y, Struhl K, Gerstein M, Antonarakis SE, Fu Y, Green ED, Karaoz U, Siepel A, Taylor J, Liefer LA, Wetterstrand KA, Good PJ, Feingold EA, Guyer MS, Cooper GM, Asimenos G, Dewey CN, Hou

- M, Nikolaev S, Montoya-Burgos JI, Loytynoja A, Whelan S, Pardi F, Massingham T, Huang H, Zhang NR, Holmes I, Mullikin JC, Ureta-Vidal A, Paten B, Seringhaus M, Church D, Rosenbloom K, Kent WJ, Stone EA, Batzoglou S, Goldman N, Hardison RC, Haussler D, Miller W, Sidow A, Trinklein ND, Zhang ZD, Barrera L, Stuart R, King DC, Ameer A, Enroth S, Bieda MC, Kim J, Bhinge AA, Jiang N, Liu J, Yao F, Vega VB, Lee CW, Ng P, Yang A, Moqtaderi Z, Zhu Z, Xu X, Squazzo S, Oberley MJ, Inman D, Singer MA, Richmond TA, Munn KJ, Rada-Iglesias A, Wallerman O, Komorowski J, Fowler JC, Couttet P, Bruce AW, Dovey OM, Ellis PD, Langford CF, Nix DA, Euskirchen G, Hartman S, Urban AE, Kraus P, Van Calcar S, Heintzman N, Kim TH, Wang K, Qu C, Hon G, Luna R, Glass CK, Rosenfeld MG, Aldred SF, Cooper SJ, Halees A, Lin JM, Shulha HP, Xu M, Haidar JN, Yu Y, Iyer VR, Green RD, Wadelius C, Farnham PJ, Ren B, Harte RA, Hinrichs AS, Trumbower H, Clawson H, Hillman-Jackson J, Zweig AS, Smith K, Thakkapallayil A, Barber G, Kuhn RM, Karolchik D, Armengol L, Bird CP, de Bakker PI, Kern AD, Lopez-Bigas N, Martin JD, Stranger BE, Woodroffe A, Davydov E, Dimas A, Eyras E, Hallgrimsdottir IB, Huppert J, Zody MC, Abecasis GR, Estivill X, Bouffard GG, Guan X, Hansen NF, Idol JR, Maduro VV, Maskeri B, McDowell JC, Park M, Thomas PJ, Young AC, Blakesley RW, Muzny DM, Sodergren E, Wheeler DA, Worley KC, Jiang H, Weinstock GM, Gibbs RA, Graves T, Fulton R, Mardis ER, Wilson RK, Clamp M, Cuff J, Gnerre S, Jaffe DB, Chang JL, Lindblad-Toh K, Lander ES, Koriabine M, Nefedov M, Osoegawa K, Yoshinaga Y, Zhu B, de Jong PJ. (2007) Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. *Nature*, 447: 799-816.
146. Common Terminology Criteria for Adverse Events v3.0 (CTCAE) http://ctep.info.nih.gov/protocolDevelopment/electronic_applications/docs/ctcae_v3.pdf. 2006.
147. Floyd JD, Nguyen DT, Lobins RL, Bashir Q, Doll DC, Perry MC. (2005) Cardiotoxicity of cancer therapy. *J Clin Oncol*, 23: 7685-7696.

11. Saját publikációk jegyzéke

Értekezésben összefoglalt saját közlemények:

Semsei AF, Erdélyi DJ, Ungvári I, Kámory E, Csókay B, Andrikovics H, Tordai A, Cságoly E, Falus A, Kovács GT, Szalai C., Association of some rare haplotypes and genotype combinations in the MDR1 gene with childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Leuk Res.* 2008 Aug;32(8):1214-20. IF: 2,390

Sherborne AL, Hosking FJ, Prasad RB, Kumar R, Koehler R, Vijayakrishnan J, Papaemmanuil E, Bartram CR, Stanulla M, Schrappe M, Gast A, Dobbins SE, Ma Y, Sheridan E, Taylor M, Kinsey SE, Lightfoot T, Roman E, Irving JA, Allan JM, Moorman AV, Harrison CJ, Tomlinson IP, Richards S, Zimmermann M, Szalai C, **Semsei AF**, Erdelyi DJ, Krajcinovic M, Sinnett D, Healy J, Gonzalez Neira A, Kawamata N, Ogawa S, Koeffler HP, Hemminki K, Greaves M, Houlston RS. Variation in CDKN2A at 9p21.3 influences childhood acute lymphoblastic leukemia risk., *Nat Genet.* 2010 Jun;42(6):492-4. IF: 36,377

Semsei AF, Erdelyi DJ, Ungvari I, Csagoly E, Hegyi MZ, Kiszal PS, Lautner-Csorba O, Szabolcs J, Masat P, Fekete G, Falus A, Szalai C, Kovacs GT. ABCC1 polymorphisms in anthracycline induced cardiotoxicity in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cell Biol Int.* 2011 Sep 20. [Epub ahead of print] IF (2010): 1,747

Értekezés témájában megjelent egyéb közlemények:

Erdélyi DJ, Kámory E, Zalka A, **Semsei AF**, Csókay B, Andrikovics H, Tordai A, Borgulya G, Magyarosy E, Galántai I, Fekete G, Falus A, Szalai C, Kovács GT., The role of ABC-transporter gene polymorphisms in chemotherapy induced immunosuppression, a retrospective study in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Cell Immunol.* 2006 Dec;244(2):121-4 IF:1,709

Erdélyi DJ, Kámory E, Csókay B, Andrikovics H, Tordai A, Kiss C, **Félné-Semsei A**, Janszky I, Zalka A, Fekete G, Falus A, Kovács GT, Szalai C. Synergistic interaction of ABCB1 and ABCG2 polymorphisms predicts the prevalence of toxic encephalopathy during anticancer chemotherapy. *Pharmacogenomics J.* 2008 Oct;8(5):321-7. IF: 5,435

Semsei AF, Antal P, Szalai C., Strengths and weaknesses of gene association studies in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res.* 2010 Mar;34(3):269-71. IF(2010): 2,555

Sherborne AL, Hemminki K, Kumar R, Bartram CR, Stanulla M, Schrappe M, Petridou E, **Semsei AF**, Szalai C, Sinnott D, Krajcinovic M, Healy J, Lanciotti M, Dufour C, Indaco S, El-Ghouroury EA, Sawangpanich R, Hongeng S, Pakakasama S, Gonzalez Neira A, Leal Ugarte E, Peralta Leal V, Meza Espinoza JP, Kamel AM, Radwan ER, Ebid GT, Yalin S, Yalin E, Berkosz M, Simpson J, Roman E, Lightfoot T, Hosking FJ, Vijaykrishnan J, Greaves M, Houlston R. Rationale for an international consortium to study inherited genetic susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica.* 2011 Jul;96(7):1049-54., IF: 6,532

Más témában megjelent közlemények:

Ungvári I, Tölgyesi G, **Semsei AF**, Nagy A, Radosits K, Keszei M, Kozma GT, Falus A, Szalai C. CCR5 Delta 32 mutation, Mycoplasma pneumoniae infection, and asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2007 Jun;119(6):1545-7 IF: 8,115

Tölgyesi G, Molnár V, **Semsei AF**, Kiszél P, Ungvári I, Pócza P, Wiener Z, Komlósi ZI, Kunos L, Gálffy G, Losonczy G, Seres I, Falus A, Szalai C. Gene expression profiling of experimental asthma reveals a possible role of paraoxonase-1 in the disease. *Int Immunol.* 2009 Aug;21(8):967-75. IF: 3,403

Aladzcity I, Kovács M, **Semsei A**, Falus A, Szilágyi A, Karádi I, Varga G, Füst G, Várkonyi J. Comparative analysis of IL6 promoter and receptor polymorphisms in myelodysplasia and multiple myeloma. *Leuk Res.* 2009 Nov;33(11):1570-3. IF: 2,358

Srivastava SK, Antal P, Gál J, Hullám G, **Semsei AF**, Nagy G, Falus A, Buzás EI., Lack of evidence for association of two functional SNPs of CHI3L1 gene (HC-gp39) with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int.* 2011 Aug;31(8):1003-7., IF (2010): 1,431

Hegy M, **Semsei AF**, Jakab Z, Antal I, Kiss J, Szendroi M, Csoka M, Kovacs G. Good prognosis of localized osteosarcoma in young patients treated with limb-salvage surgery and chemotherapy. *Pediatr Blood Cancer.* 2011 Sep;57(3):415-22. IF (2010): 1,948

12. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani Prof. Dr. Falus Andrásnak, aki lehetőséget adott arra, hogy a Genetikai-, Sejt- és Immunbiológiai intézetben dolgozhassak és elindított a doktori képzés útján. Köszönöm neki a bizalmat és a bátorítást, amivel mindig támogatott.

Köszönöm témavezetőmnek, Dr. Szalai Csabának, hogy a csoportjában dolgozhattam és az összes kérdésemre válaszolt.

Köszönöm Dr. Erdélyi Dánielnek, hogy ezt a munkát annak idején Dr. Szalai Csaba PhD hallgatójaként elkezdte és szívesen bevett a „csapatba”. A DNS minták kezelésébe, genotipizálásba teljes bizalommal bevont, szervezte a munkámat és mindig minden táblázatot elkészített, amit kértem. Orvosi és statisztikai tudásával számomra megfelelő kontrollt biztosított. Nagyban támogatta munkámat azzal, hogy a nagy család, a sok munka és olykor több ezer km földrajzi távolság mellett mindig szívesen segített.

Köszönöm Dr. Kovács Gábornak, hogy a betegminták gyűjtését támogatta és szaktudásával is segítségemre volt.

Köszönöm Dr. Andrikovics Hajnalkának az *ABCG2* polimorfizmusok genotipizálásának betanítását és felügyeletét.

Köszönöm Ungvári Ildikónak, hogy a kezdeti években nyugodt, szerény magabiztosságával a munkahelyi nehézségekben közvetlen kollégaként mellettem volt és a bioinformatika útvesztőjében segített eligazodnom.

Köszönöm Szilágyiné Dr. Kizsel Petrának, hogy elleshettem tőle a pontos dokumentáció és laborrend rejtelseit és a statisztikai problémáimat is megbeszélhettem vele.

Köszönöm Dr. Cságoly Editnek, hogy a betegadatokat gyűjtését átvette Dr. Erdélyi Dániel távozása után, mert így dolgozhattam fel én is a teljes populáció klinikai adatait.

Köszönöm Dr. Hegyi Mártának, hogy hasonló kutatómunkát végző orvosként sok kérdésemet megbeszélhettem vele.

Köszönöm a Richter Gedeon Nyrt.-nek, hogy a jóvoltából létrejött laborban dolgozhattam 4 és fél évig, megismerhettem egy nagy genotipizáló rendszer és az ezt kiszolgáló automaták használatát.

Köszönöm Sándorné Vángor Mónikának, hogy érkezése után a rengeteg labormunkát átvette tőlem, ezzel biztosítva számomra még több időt a munkámhoz. Köszönöm a mindig precíz, pontos, átgondolt, készséges munkavégzését.

Köszönöm Baráné Gilicze Annának, Dr. Buzás Editnek, Dr. Éder Katalinnak, Dr. Tóth Sárának, Hadadi Évának, Dr. Lajkó Eszternek, Lautner-Csorba Orsolyának, Dr. Molnár Viktornak, Dr. Pál Zsuzsannának, Dr. Sente-Pásztói Máriának, Dr. Tölgyesi Gergelynek, Virág Viktornak és az intézet összes dolgozójának a sokféle, akár baráti, akár szakmai segítségét.

Köszönöm férjemnek, hogy mindvégig mellettem állt, bátorított, elviselte a munkám miatti nehézségeket és kémiai tudásával hozzájárult munkám pontosságához is.

Köszönöm szüleimnek, hogy segítettek abban, hogy eljussak odáig, hogy elkezdhessem ezt a munkát, nekik és férjem szüleinek is köszönöm a családi bátorítást.

Mindenki felett pedig Istennek vagyok hálás az eredményekért, e munka elkészüléséért, mert „nem azé, aki akarja, és nem is azé, aki fut, hanem a könyörülő Istené”.