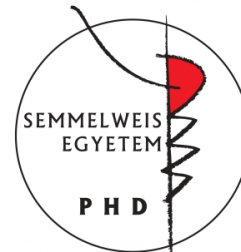


# A gyermekkori akut limfoid leukémiára való hajlam genetikai, valamint a kezelésre adott válasz farmakogenetikai vizsgálata

Doktori értekezés

**Lautner-Csorba Orsolya**

Semmelweis Egyetem  
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Szalai Csaba egyetemi tanár, az MTA doktora

Hivatalos bírálók:

Dr. Boér Katalin osztályvezető főorvos, PhD

Dr. Rónai Zsolt egyetemi adjunktus, PhD

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Sasvári Mária egyetemi tanár, az MTA doktora

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Mészáros Tamás egyetemi adjunktus, PhD

Dr. Kralovánszky Judit biológiai tudomány kandidátusa, PhD

Budapest  
2013

## Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke .....	3
1 Bevezetés .....	8
2 Irodalmi összefoglaló.....	9
2.1 A gyermekkori akut limfoid leukémia jellemzői .....	9
2.2 Az akut limfoid leukémia kialakulását befolyásoló hajlamosító tényezők: genetikai és környezeti faktorok .....	11
2.3 Az akut limfoid leukémia farmakogenetikai háttere .....	24
2.4 A statisztikai adatelemzés szerepe: frekventista és bayes-i statisztika .....	29
3 Célkitűzések.....	33
4 Anyagok és Módszerek.....	34
4.1 Mintapopuláció .....	34
4.1.1 Betegek .....	34
4.1.2 Kontrollok.....	37
4.2 DNS szeparálás .....	38
4.3 A vizsgált gének és genetikai eltérések kiválasztása .....	39
4.4 A vizsgált gének és genetikai eltérések genotipizálása.....	47
4.4.1 Klasszikus Multiplex PCR reakcióval történő genotipizálás.....	47
4.4.2 Sequenom iPLEX Gold MassARRAY technikával történő genotipizálás	48
4.4.3 GenomeLab SNPstream rendszerrel történő genotipizálás .....	49
4.5 A kiválasztott polimorfizmusok túlélésre gyakorolt hatásának vizsgálata a betegpopulációban .....	51
4.6 Statisztikai elemző módszerek .....	51
4.6.1 Frekventista alapú statisztika .....	51
4.6.2 Bayes-háló alapú bayes-i többszintű relevancia analízis statisztika....	53
5 Eredmények .....	54
5.1 Jelölt gén asszociációs vizsgálat I – <i>GSTT1</i> , <i>GSTM1</i> , <i>CCR5</i> .....	54
5.2 Jelölt gén asszociációs vizsgálat II – <i>ARID5B</i> , <i>IKZF1</i> , <i>STAT3</i> .....	57
5.2.1 A frekventista elemzés eredménye .....	57

5.2.2	A bayes-i elemzés eredménye.....	62
5.3	Jelölt gén asszociációs vizsgálat III – Folát anyagcsere gének.....	68
5.3.1	A frekventista elemzés eredménye .....	68
5.3.2	A bayes-i elemzés eredménye.....	76
5.4	Farmakogenetikai vizsgálat– <i>ABCCI</i> .....	85
5.5	A kiválasztott polimorfizmusok túlélésre gyakorolt hatásának vizsgálata a betegpopulációban .....	87
5.5.1	A frekventista elemzés eredménye .....	87
5.5.2	A bayes-i elemzés eredménye.....	91
6	Megbeszélés.....	94
6.1	Jelölt gén asszociációs vizsgálat I – <i>GSTT1</i> , <i>GSTM1</i> , <i>CCR5</i> .....	94
6.2	Jelölt gén asszociációs vizsgálat II – <i>ARID5B</i> , <i>IKZF1</i> , <i>STAT3</i> .....	96
6.3	Jelölt gén asszociációs vizsgálat III – Folát anyagcsere gének.....	100
6.4	Farmakogenetikai vizsgálat– <i>ABCCI</i> .....	105
6.5	A kiválasztott polimorfizmusok túlélésre gyakorolt hatásának vizsgálata a betegpopulációban .....	108
7	Következtetések.....	110
8	Összefoglalás .....	113
9	Summary.....	114
10	Irodalomjegyzék .....	115
11	Saját publikációk jegyzéke .....	148
12	Köszönetnyilvánítás.....	150

**RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE**

<b>Rövidítés</b>	<b>Angol elnevezés</b>	<b>Magyar elnevezés</b>
ABC	ATP-binding cassette transporter family	ATP-kötő domén, membránfehérje család
ABCB1	ATP-Binding Cassette, Sub-Family B (MDR/TAP), Member 1, Multidrug Resistance Protein 1	ABC kötő domén, B membránfehérje alcsalád (MDR/TAP), 1.tagja
ADARB2	adenosine deaminase, RNA-specific, B2; RNA-editing enzyme	RNS működést szabályozó enzim
AHR	aryl hydrocarbon receptor	aromás szénhidrogén receptor család
ALL	acute lymphoid leukemia	akut limfoid leukémia
ALL-BFM protokoll	acute lymphoid leukemia Berlin-Frankfurt-Münster protocol	akut limfoid leukémia Berlin-Frankfurt-Münster protokoll
ARID5B	AT-rich interactive domain 5B	AT gazdag interaktív domén 5B család
ASMTL	acetylserotonin o-methyltransferase-like protein	az enzimet kódoló gén az X és Y kromoszóma pszeudoautoszomális régiójában (PAR1) helyezkedik el
BAK	BCL2-Antagonist/Killer 1	BCL2-antagonista X fehérje
BAX	BCL2-associated X protein	BCL2-kapcsolt X fehérje család
BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2 apoptosis regulator	B-sejtes CLL/limfóma apoptózis szabályozó molekula család
BCR-ABL	breakpoint cluster region - c-abl oncogene 1, non-receptor tyrosine kinase	Philadelphia kromoszóma, fúziós fehérje
BN-BMLA	Bayesian network-based Bayesian multilevel analysis of relevance	Bayes-háló alapú bayes-i többszintű relevancia analízis
CBS	cystathionine-beta-synthase	cisztation-béta-szintáz
CCR5	C-C-chemokine receptor 5	C-C-kemokin receptor 5
CCR5	C-C chemokine receptor type 5	C-C kemokin receptor 5 család
CD	cluster of differentiation	sejtfelszíni molekulák összefoglaló elnevezése
CDKN	cyclin-dependent kinase inhibitor	ciklin-függő kináz inhibitor
CEBPA	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha	CCAAT- kötő alfa fehérje család

Rövidítés	Angol elnevezés	Magyar elnevezés
CEBPE	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), epsilon	CCAAT- kötő epszilon fehérje család
CGAS	candidate gene association study	jelölt gén asszociációs vizsgálat
CGAS	candidate gene associatoin study	jelölt gén asszociációs vizsgálat
CLL	chronic lymphoid leukaemia	krónikus limfoid leukémia
CML	chronic myeloid leukeamia	krónikus mieloid leukémia
CR	credibility region interval/credible interval	megbízhatósági tartomány, a konfidencia intervallum bayes-i megfelelője
CREBBP	CREB binding protein	transzkripciós faktorok koaktivátora
CYP	cytochrome P450 xenobiotic monooxygenase polypeptide	citokróm P450 xenobiotikum monooxygenáz polipeptid család
DHFR	dihydrofolate reductase	dihidrofolát reduktáz
HWE	Hardy-Weinberg equilibrium	Hardy-Weinberg egyenlőség
dNTP	desoxy-nucleotide-triphosphate	dezoxi nukleotid trifoszfát
<i>E2A-PBX1</i>	transcription factor 3 (TCF3) - pre-B-cell leukemia homeobox 1	fúziós gén
EBF	early B-cell transcription factor	korai B-sejtes transzkripciós faktor
EED	embryonic ectoderm development polycomb protein	transzkripciós represszív polikomb fehérje
EFS	event-free survival	eseménymentes túlélés
ENOF51	regulating the expression of TYMS in the DNA synthesis pathway	a TYMS expresszióját szabályozó molekula
EZH2	enhancer of zeste homolog 2	hiszton-lizin-N-metiltranszferáz polikomb fehérje
FDR	false discovery rate	hamis elfogadási arány
FLT3	Fms-related tyrosine kinase 3	tirozin-kináz receptor
FPGS	folylpolyglutamate synthase	folilpoli-gamma-glutamil-szintetáz
GATA3	GATA binding protein	GATA szekvenciához-kötő transzkripciós faktor
GGH	gamma-glutamyl hydrolase (conjugase, folylpolygammaglutamyl hydrolase)	gamma-glutamil-hidroláz
GST	glutathione-S-transferase	glutation-S-transzferáz
GSTP1	glutathion-S-transferase pi 1	glutation-S-transzferáz pi detoxifikáló enzim család

Rövidítés	Angol elnevezés	Magyar elnevezés
GWAS	genome-wide association study	genomszintű asszociációs vizsgálat
GWAS	genom wide association study	genomszintű asszociációs vizsgálatok
Hiperdiploiditás	hyperdiploid	kromoszómaszám>50
Hipodiploiditás	hypodiploid	kromoszómaszám<44
HIV	human immunodeficiency virus	emberi immunhiány-előidéző vírus (AIDS kórokozója)
HOX11	TLX1; T-Cell Leukemia/Lymphoma Protein, T-Cell Leukemia, Homeobox 1	T-sejtes leukémia homeobox fehérje 1
HOX11L2	TLX3; T-cell leukemia homeobox protein 3	T-sejtes leukémia homeobox fehérje 3
HR	high risk	magas rizikójú csoport
<i>IGH-CRLF2</i>	immunoglobulin heavy locus - cytokine receptor-like factor 2	citokin receptor-like faktor fúziós gén az IGH lókusszal
IKZF	Ikaros family zinc finger protein	Ikaros limfoid transzkripciós faktor fehérjecsald
IL7R	interleukin 7 receptor	interleukin-7-receptor
IFN $\gamma$	interferon gamma	interferon gamma
IR	interaction ratio	kölcsönhatási hányados
JAK	Janus kinase family	Janus (kétarcú) tirozin kináz család
KRAS	V-ki-Ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog	onkogén kódoló Ras fehérje (GTPáz aktivitással)
linEF	fractional shortening	lineáris ejekciós frakció
LR	low risk	alacsony rizikójú csoport
LR, MR, HR	low/medium/high risk	alacsony/közepes/magas rizikójú csoport
LYL1	lymphoblastic leukemia derived sequence 1	limfoid leukémia transzkripciós faktor
MALDI-TOF MS	matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry	mátrix közvetítésével végzett lézer deszorpciós ionizációs tömegspektrometria
MBG	Markov-blanket graph	Markov-takaró gráfja
MBM	Markov-blanket membership	Markov-takaróbeliség; egy változó szerepel-e egy másik változó Markov-takarójában
MBS	Markov-blanket set	Markov-takaró halmaz tagjai
MLL	mixed lineage leukemia	vegyes eredetű leukémia
MR	medium risk	közepes rizikójú csoport
MRD	minimal residual disease	minimális reziduális betegség
MTHFD1	methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP+ dependent) 1	metiléntetrahidrofolát-dehidrogenáz 1 (NADP <sup>+</sup> függő)

Rövidítés	Angol elnevezés	Magyar elnevezés
MTHFR	methylenetetrahydrofolate reductase (NAD(P)H)	5,10-metiléntetrahydrofolát-reduktáz (NAD(P)H)
MTR	5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase	5-metiltetrahydrofolát-homocisztein-metiltranszferáz, Vitamin-B12-függő metioninszintáz
MTRR	5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase reductase	5-metiltetrahydrofolát-homocisztein-metiltranszferáz-reduktáz
MUC4	mucin 4, cell surface associated	epiteliális sejtek védelmét ellátó glikozilálát fehérje
MYC	myelocytomatosis viral oncogene homolog	transzkripció faktor P64
NAT2	N-acetyltransferase 2	N-acetiltranszferáz 2
NGS	new generation sequencing	új generációs szekvenálás
NOTCH	transmembrane protein family	transzmembrán fehérje család
NQO	NAD(P)H quinone oxidoreductase	NAD(P)H kinon oxidoreduktáz
NRAS	neuroblastoma RAS viral (V-Ras) oncogene homolog	N-ras onkogén kódoló membránfehérje
NT5C2	5'-nucleotidase, cytosolic II	purin nukleotidáz enzim (nukleotidokból>nukleozidok)
OR	odds ratio	esélyhányados
OS	overall survival	össztúlélés
<i>P2RY8-CRLF2</i>	purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 8 - cytokine receptor-like factor 2	citokin receptor-like faktor fúziós gén a purinerg receptor lókusszal
PAX5	B-cell-specific transcription factor (paired box 5)	B-sejt specifikus transzkripció faktor
PBS	phosphate-buffered saline	foszfáttal pufferált sóoldat
PDGFRB	platelet-derived growth factor receptor, beta polypeptide	sejtfelszíni tirozin-kináz receptor
PHF6	plant homeo domain (PHD) finger protein 6	PHD transzkripció fehérje
RB1	retinoblastoma 1; osteosarcoma	tumor szupresszor fehérje
RR	redundancy ratio	redundancia hányados/arány
SAP	shrimp alkaline phosphatase	<i>Pandalus borealis</i> -ből kivont alkalikus foszfátáz enzim
SBE	single base extension	egy bázispárnai extenzió
SD	standard deviation	szórás
SHMT1	serine hydroxymethyltransferase 1	szerin-hidroximetiltranszferáz 1
SLC19A1(=RFC)	solute carrier family 19 member 1 (reduced folate carrier)	SLC transzporter fehérjék 19.családjának 1.tagja, redukált folát hordozó

Rövidítés	Angol elnevezés	Magyar elnevezés
SLC22A8	solute carrier family 22 member 8 (organic anion transporter),	SLC transzporter fehérjék 22.családjának 8.tagja
SLCO1B1	solute carrier organic anion transporter family, member 1B1= SLC21A6	SLC transzporter fehérjék 21.családjának 6.tagja (=SLC21A6)
SNP	single nucleotide polymorphism	egy pontos nukleotid polimorfizmus
STAT	signal transducer and activator of transcription	jelátvivő és transzkripció aktivátor család
SUZ12	suppressor of zeste 12 homolog	transzkripció represszív polikomb fehérje
TAL1	T-cell acute lymphocytic leukemia 1 protein	T-sejtes ALL fehérje
TBE puffer	tris-borat-EDTA buffer	tris-bórsav-EDTA puffer
TBL1XR1	transducin (beta)-like 1 X-linked receptor 1	nukleáris receptort szabályozó korepresszor
TE	tris-EDTA buffer	tris-EDTA puffer
TEL-AML1	ETV6-RUNX1; ets variant 6 - runt-related transcription factor 1	fúziós fehérje
TP53	tumor protein P53	tumor szupresszor fehérje
TPMT	thiopurine S-methyltransferase	tiopurin-S-metiltranszferáz
TYMS	thymidylate synthetase	timidilát-szintáz
UGT1A1	UDP-glucuronosyltransferase 1 family, polypeptide A1	uracil-difoszfát-glükóz-glükuronil-transzferáz
WT	Wilms-tumor protein	Wilms-tumor fehérje

A szövegben rövidített formában említett génnevek, fogalmak feloldása a fenti listában található.

A dolgozat összes ábrája a szerző munkája.



## 1 BEVEZETÉS

A genetikai vizsgálatok egyre nagyobb teret hódítanak a 21. századi orvostudomány területén. Az embert meghatározó genetikai „háttértár” megfejtése iránti kutatói érdeklődés (pl. Humán Genom Projekt) óriási tudományos és technológiai forradalmat indított el. Ennek eredményeképpen számos, a klinikumban is alkalmazható prognosztikai, diagnózist segítő, vagy a terápiás hatékonyságot, így a túlélést befolyásoló genetikai markert sikerült meghatározni. Napjaink kihívása ezeknek a tényezőknek a bonyolult és speciális egymásra hatását feltérképezni, illetve azokat értelmezhető és használható rendszerré alakítani.

A genetikai tanulmányoknak különösen fontos szerepe van a malignus kórképek vizsgálatában, a betegségre való hajlam jobb megértésében, a különböző rizikótényezők meghatározásában, és a pontosabb terápiás protokollok kidolgozásában, ily módon a minél személyre szabottabb terápia kialakításában.

A gyermekkori akut limfoid leukémia (ALL) az egyik leggyakoribb gyermekkori malignitás. Etiológiája és patomechanizmusa még napjainkban sem teljesen ismert. A betegség patogenezisét feltételezhetően a DNS szintézis-, a különböző (kemoterápiát érintő) anyagcsere és farmakogenetikai útvonalak szabályozásában fontos, valamint a limfocita előalakok differenciálódásáért felelős gének és variánsaik sokszor egymással kölcsönhatva befolyásolhatják. A legelterjedtebb módszer a betegség genetikai hátterének elemzésére az ún. jelölt gén asszociációs vizsgálatok (CGAS) csoportja, majd a technikai fejlődéssel párhuzamosan egyre nagyobb teret nyertek a teljes genom szűrések, illetve a teljes genom asszociációs vizsgálatok (GWAS) is.

Munkám során a kiválasztott génvariánsok segítségével a gyermekkori akut limfoid leukémia kialakulásának és a kezelés során kapott terápiás válasznak a hátterében álló genetikai faktorok befolyásoló szerepét vizsgáltam. Az eredmények megbízhatósága érdekében a kiértékelés során kétféle statisztikai módszert is alkalmaztam, a klasszikus frekventista alapút és a bayes-i technikát.

## 2 IRODALMI ÖSSZEFOGLALÓ

### 2.1 A GYERMEKKORI AKUT LIMFOID LEUKÉMIA JELLEMZŐI

A leukémiát eredetileg a felnőttekben írták le, és csak a 19. század vége felé ismerték fel a gyermekekben. A leukémia nem egyetlen betegség, hanem számos rendellenességből álló csoport, a vérképző szervek malignus megbetegedése, ahol az éretlen, illetve a kóros fehérvérsejtek burjánzása túlnőve a normális sejteket, infiltrálja a különböző szerveket (pl. csontvelőt, májat, lépét, központi idegrendszert, herét stb.). A leukémiás sejtpopulációt egyetlen kóros őssejt, vagy progenitor sejt klonális proliferációja hozza létre (1, 2).

A rosszindulatú, gyermekkori malignitások alapvetően ritka betegségnek számítanak Magyarországon (kb. 300-350 új eset/év 14 éves kor alatt), azonban jelentőségük mégis igen nagy, hiszen a gyermekkori halálozásban a balesetek után a második helyen állnak. A gyermekkori rosszindulatú megbetegedések közül a leukémia a leggyakoribb. A leukémiák döntő többsége az akut limfoid leukémia típusba tartozik (ALL, ~80%), ezután a gyakorisági sorrendben az akut mieloid (AML, ~15%) és a krónikus mieloid leukémia (CML, ~5%) következik, míg krónikus limfoid leukémia (CLL) csak nagyon ritkán fordul elő gyermekkorban. A gyermekkori leukémiák incidenciája a 0-14 éves korosztályban, azon belül is a 2-6 év között a leggyakoribb (Magyarországon évi 50-70 új eset) (3).

Az egyre pontosabb rizikócsoporthoz (alacsony, közepes, magas) besorolásnak, a folyamatos gyógyszerfejlesztéseknek, a szupportív terápia és az őssejt-transzplantáció fejlődésének köszönhetően napjainkban a magyarországi 5-éves ösztülélés már 80%-85% feletti (3).

A túlélést befolyásoló főbb rizikófaktorok a nem, az életkor, a sejtek immunfenotípusa, a betegség diagnóziskori kiterjedtsége (kezdeti perifériás fehérvérsejtszám), a genetikai abnormalitások típusa és halmozódása, a kezelésre adott terápiás válasz (4). Hazánkban az ALL kezelését a német Berlin-Frankfurt-Münster (BFM) munkacsoport által folyamatosan fejlesztett protokollok alapján végzik. A terápia alapvetően két fő szakaszból áll: a diagnózistól számított intenzív intravénás (kb.8 hónap) és az ezt követő fenntartó (kb. 1,5-2 év) kezelésből. Az intenzív fázis az indukciós,

intenzifikációs, konszolidációs, reindukciós és reintenzifikációs alszakaszokból áll, melyeknek pontos gyógyszer felhasználása, adagolása eltérő lehet a rizikócsoporthoz besorolásától függően. A teljes kezelés során a protokollok előírásait követve intravénásan több dózis vinkrisztint, L-aszparaginázt, daunorubicint, doxorubicint, metotrexátot, ciklofoszfamidot, citozin-arabinozidot, szájon át prednizolont, dexametazont, 6-merkaptopurint, tioguanint, intratekálisan metotrexátot, és a magas rizikójú betegek kaphatnak még etopozidot, vinblasztint és ifoszfamidot is (3, 5), illetve a ritka Philadelphia transzlokáció pozitív betegek tirozin kináz inhibitorokat. Továbbá minden beteg kap még intratekális kemoterápiát, egy kis hányadék pedig craniospinális sugárkezelést is.

A gyermekkori akut limfoid leukémia morfológiai (French-American-British-FAB besorolás (6)), immunológiai és genetikai megjelenését és klinikai lefolyását tekintve heterogén betegcsoport. Az elmúlt évtizedben számos törekvés irányult a prognosztikai faktorok meghatározására. A diagnóziskor meghatározott klinikai és laboratóriumi jellemzők fontos szerepet játszanak, mert megjósolják a betegség lefolyását és a kezelés kimenetelét.

Az *életkor* prognosztikai szerepe az ALL-s gyermekek túlélésében régóta ismert. Az egy év alatti és a tíz év feletti gyermekek életkilátásai rosszabbak, mint a többi korosztályé. A csecsemőkori leukémia gyakran magas fehérvérsejt számmal indul, és a t(4;11) transzlokáció (MLL/AF4 fúzió), a CD10 negativitás, a kezdeti rossz terápiás válasz, mind tovább csökkentik a kezelés sikerét (7-11). A túlélési esélyeket napjainkban a korai nagy-dózisú kemoterápiával és csecsemőknél különösen az allogén hemopoetikus őssejt terápiával igyekeznek javítani (12-14). A *kezdeti fehérvérsejtszám* szintén fontos prognosztikai tényező. A magas fehérvérsejt számmal (egyes elemzések szerint 50 000/mm<sup>3</sup> felett, mások szerint 20 000/mm<sup>3</sup> felett) induló leukémiáknál figyelték meg, hogy az intenzív kezelés ellenére nehezen hozhatók remisszióba, és így a betegek túlélése sokkal kedvezőtlenebb (9, 15). A terápiás eredmények rámutattak többek között a *nem* szerepére is. A nemek közötti megoszlás szerint az összes gyermekkori ALL beteg 55-60%-a fiú. Ez az ALL minden típusára igaz, de a T-sejtes ALL-ban kifejezettebb, ami ebben a típusban 80% körüli előfordulási arányt jelentett. Kezdetben a lányokkal azonos arányban kerülnek teljes remisszióba, de a remisszió időtartama rövidebb (2, 16). A kezelés első évében és a

kezelés befejezését követően is több a visszaesés a fiúknál (17). Ennek feltételezhető oka pl. hogy a nők genetikailag jobban védettek az akut leukémiát (AL) okozó környezeti, toxikus anyagok hatása ellen, mint a férfiak. Egy malajziai felmérés szerint a nullás vércsoportú nők AL védelmét a 9-es kromoszómán az AB0 vércsoport meghatározásáért felelős lókuszt közelében elhelyezkedő gén adja. Más tanulmányok szerint a nemi hormonok által termelt szteroidoknak a leukémiás sejtek proliferációjában betöltött szerepével magyarázható, hogy a férfiakban nagyobb valószínűséggel alakul ki ALL. Ezt erősíti az a tanulmány is, ahol a 17- $\beta$ -ösztadiol és a tesztoszteron antiproliferatív hatását vizsgálták humán monoblasztos sejtvonalnál (U937). Az eredmény szerint a 17- $\beta$ -ösztadiol antiproliferatív hatása többszöröse volt a tesztoszteronéhoz képest. Nagy valószínűséggel a polimorfizmusok nemenkénti eltérő hatásaival magyarázható az ALL-es fiúgyermek kemoterápiás kezelésre adott gyengébb válasza is (18).

Fiúknál idősebb életkorban gyakoribb a magas fehérvérsejtszám, a mediastinális tumor. E kórképnél valószínűleg a leukémiás limfoblasztok egy fajtája olyan membrán tulajdonságokkal rendelkezik, mely a sejtek illetve szövetek közötti gyors terjedést segíti elő. Az intenzív kezelés következtében gyermekkorban, a T-sejtes leukémia prognózisa közel hasonló, mint a B sejtesé (19, 20). Megfigyelések szerint a CD2 antigén jelenléte szintén jó prognosztikai jel a T-ALL-n belül (21, 22).

Továbbá az *etnikai jelleg* is befolyásolhatja a betegségre való hajlamot és később a terápiás választ. Amerikai szerzők azt találták, hogy a színesbőrű gyermekek túlélése valamivel alacsonyabb a fehérbőrű betegekkel összehasonlítva (17, 23).

A gyermekkori akut limfoid leukémiában elért viszonylag magas túlélési arány további javítása mellett elengedhetetlen a túlélők későbbi életminőségének javítása is. Ennek elérése érdekében nagy jelentőségűek a genetikai tanulmányok.

## **2.2 AZ AKUT LIMFOID LEUKÉMIA KIALAKULÁSÁT BEFOLYÁSOLÓ HAJLAMOSÍTÓ TÉNYEZŐK: GENETIKAI ÉS KÖRNYEZETI FAKTOROK**

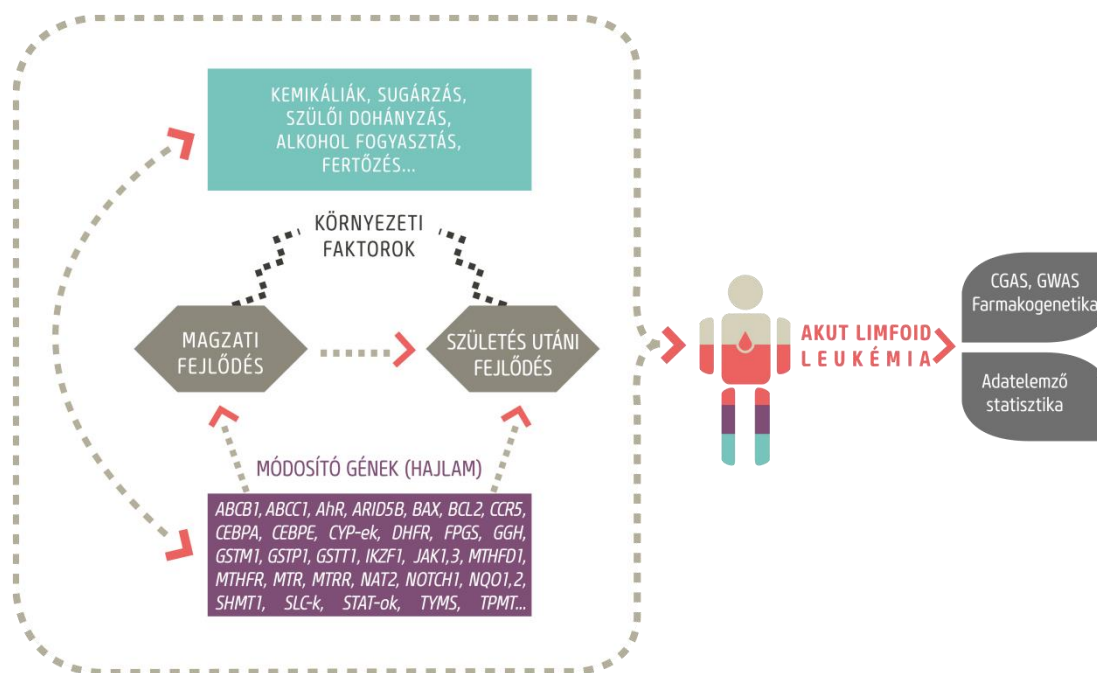
A multifaktoriális betegségek, - mint pl. az akut limfoid leukémia (ALL) - jellemzője, hogy exogén-, és endogén - pl. genetikai - faktorok együttesen befolyásolják a

betegség kialakulását, a tünetek súlyosságát, vagy akár a terápia hatékonyságát, illetve az azzal szembeni rezisztenciát.

A betegség etiológiájának felderítése napjainkban is zajlik a háttérben álló rendkívül komplex gén-gén, gén-környezeti kölcsönhatások rendszere miatt.

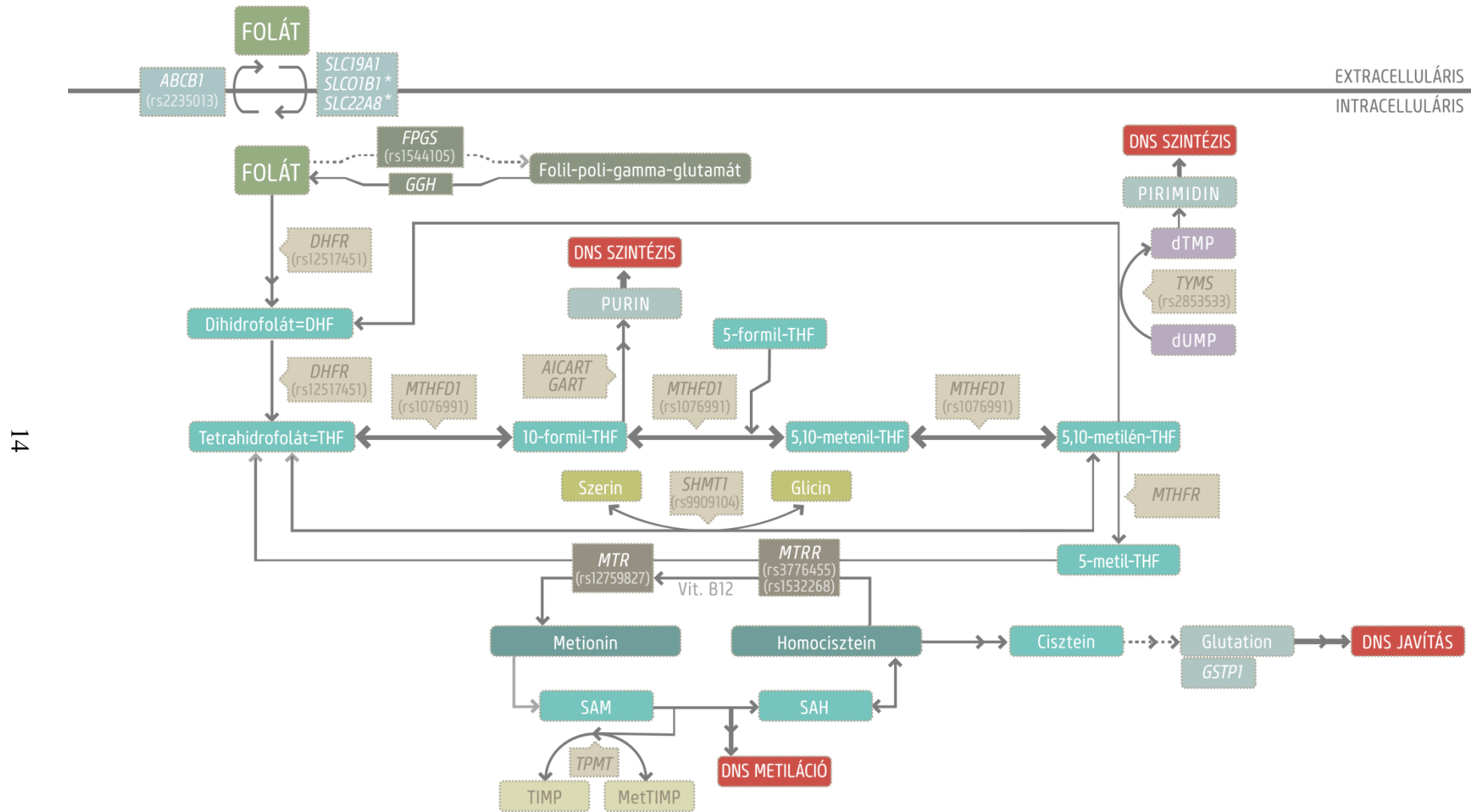
Az ALL esetében hemopoetikus sejtek proliferációja, differenciálódása során a szabályozás többlépcsős zavara jön létre. A klinikai tünetek a diagnózis felállítása előtt általában néhány héttel, ritkán néhány hónappal jelennek meg. Az ALL kialakulása során tehát a kezdet és a tünetek megjelenése között valószínűleg van egy rejtett vagy klinikailag tünetmentes időszak.

Epidemiológiai tanulmányok arra a következtetésre jutottak, hogy a különböző környezeti hatások a prenatális és posztnatális korban is érvényesülve, hatással lehetnek a betegség kialakulására (24, 25). Eszerint a gyermekkori ALL oka valószínűleg az egymást követő prenatális és posztnatális események valamilyen kombinációjában rejlik (26). Figyelembe véve az ALL-es gyermekek nagy részének fiatal életkorát és a daganat klonális fejlődésének latenciáját, elképzelhető, hogy a betegség in utero fejlődik ki. Ezen hipotézis szerint a terhesség során fellépő vírusfertőzés (EBV, HIV), sugárhatás (pl. radioterápia), kemikáliák (pl. benzol→AML), drogok (pl. alkiláló szerek), szülői alkoholfogyasztás, dohányzás rizikó tényezőként szerepelhet a betegség patomechanizmusában (27-31) (1. ábra).



**1. ábra: A gyermekkori ALL kialakulásának kockázati tényezői: genetikai és környezeti faktorok (génnevek magyarázata a *Rövidítésjegyzék*-ben)**

Az édesanya szervezetében képződő reaktív oxigén gyökök közrejátszhatnak a gyermekkori ALL kialakulásában, mivel a képződő gyökök befolyásolhatják a magzat méhen belüli (intrauterin) környezetét. Ezt támasztották alá ikergyermek vizsgálatainak eredményei és az ún. Guthrie-teszt céljából levett (vér)mintákon végzett vizsgálatok is, melyek szerint a gyermekkori leukémia az anyai, illetve környezeti hatások miatt, már születés előtt, az anyaméhben kialakulhat (32-34) (**1. ábra**). Számos vizsgálat bizonyította továbbá, hogy a magzati és/vagy a korai gyermekkorban fellépő környezeti hatások rizikóját bizonyos karcinogén-metabolizáló génvariánsok módosíthatják (30, 31, 35-38), azaz a genetikai háttér vagy az öröklött érzékenység és a külső hatások egymással átfedve hajlamosíthatnak a betegségre. Ennek lehetséges biológiai magyarázata, hogy a karcinogének az anyai keringésen keresztül bejuthatnak a placentába, ahol a májban lezajló folyamatok hasonló metabolizmuson mehetnek keresztül (39, 40). Ebből következően a placenta megváltozott metabolizációs képessége befolyásolhatja a magzatra károsan ható elektrofilek expozícióját. A fejlődő magzat folát metabolizmusában kulcsfontosságú enzimfehérje a metilén-tetrahidrofolátreduktáz (MTHFR), melynek jelentős szerepe van a DNS metiláció és a DNS szintézis/javítás mechanizmusaiban (**1. ábra**).



2. ábra: Az intracelluláris folát útvonal sematikus ábrája (rövidítések magyarázata a következő oldalon).

**Folytatás 2. ábra: Az intracelluláris folát útvonal sematikus ábrája.** A folát metabolizmus kulcsfontosságú molekulái és származékaik ellipszisben, a szabályozó enzimek egyszerű téglalapban, az útvonal által érintett DNS mechanizmusok pedig dupla keretű téglalapban láthatók. A dolgozatban vizsgált, szignifikáns polimorfizmusokat a génnév alatt jelöltem. dUMP=deoxiuridin monofoszfát, dTMP=deoxitimidin monofoszfát, Vit.B<sub>12</sub>=B<sub>12</sub> vitamin, SAM=S-adenozilmetionin, SAH=S-adenozilhomocisztein, TIMP=tioinozin monofoszfát, MetTIMP=metil-tioinozin monofoszfát, AICART=AICAR (5-aminoimidazol-4-karboxamid ribonukleotid) formiltranszferáz, GART=GAR (glicinamid ribonukleotid) formiltranszferáz. \*Az SLCO1B1 és SLC22A8 molekulák a májban és a vesében történő folát transzportot szabályozzák elsősorban.

A kutatási eredmények rendkívül nagy heterogenitást mutatnak, azonban többségük szerint feltételezhető, hogy azok az gyermekek, akik az *MTHFR* polimorfizmusok közül a két legtöbbet vizsgált 677C>T (rs1801133) és 1298A>C (rs1801131) variáns allél valamelyikét hordozzák, a csökkent enzimaktivitás miatt, kisebb eséllyel betegszenek meg ALL-ben (41-50). Ezzel szemben állnak azok a tapasztalatok, ahol hajlamosító szerepet tulajdonítanak a variáns alléloknak (51), vagy ahol egyáltalán nem találtak szignifikáns összefüggést (52-55). Az *MTHFR* variánsainak a malignus kórképpel szembeni „védő” szerepét azzal magyarázzák, hogy a csökkent *MTHFR* működés jobb minőségű DNS-t eredményezhet. Azaz az *MTHFR* variáns gátolja az enzim megfelelő működését, aminek következtében az 5-,10-metiléntetrahidrofolát (MTHF) pool megnövekszik. Az 5-,10-MTHF segítségével a timidilát-szintáz (TYMS) (48) szabályozza a dUMP-nek dTMP-vé alakulását. Az *MTHFR* csökkent enzimműködése így gátolja az uracil DNS láncba történő beépülését. A nagy mennyiségű uracil beépülés rosszabb minőségű, „töredezett” DNS láncot eredményezhet a sejtekben, így az uracil beépülés csökkenésével jobb minőségű DNS keletkezhet, és ezáltal csökkenhet az esély az ALL kialakulására. Az *MTHFR* 677C>T polimorfizmus továbbá asszociál a szérumban mért emelkedett homocisztein szinttel, ami az alacsony metilációs aktivitásnak köszönhető (56, 57).

A folát metabolizmus további fontosabb képviselőit és szabályozó elemeinek kapcsolódási hálózatát az **2. ábra**, a molekulák funkcióját pedig az **1. táblázat** foglalja össze. A folát metabolizmus génvariánsainak több okból is figyelemreméltó szerepük van: egyrészt a leukémiára való hajlomot, másrészt pedig az ALL terápiában alkalmazott gyógyszerek - pl. metotrexát – farmakogenetikáját befolyásolhatják.



**1. táblázat: A folát metabolizmus kulcsfontosságú enzimjei és transzporterei**

Enzimek és transzporterek		Funkció
ABCB1	ABC kötő domén, B membránfehérje alcsalád (MDR/TAP), 1.tagja	Folát (ki)szállítása az extra- és intracelluláris tér között
DHFR	dihidrofolát reduktáz	Dihidrofolát redukált tetrahydrofoláttá alakítása
FPGS	folil-poli-gamma-glutamil-szintetáz	Folát poliglutamát származékokká alakítása
GGH	gamma-glutamil-hidroláz	A folil-poli-gamma-glutamát hidrolízisének katalizálása pteroil-alfa-glutamáttá (folsav) és szabad glutamáttá
MTHFD1	metiléntetrahydrofolát-dehidrogenáz 1 (NADP <sup>+</sup> függő)	A tetrahydrofolát származékok (10-formiltetrahydrofolát, 5,10-meteniltetrahydrofolát, 5,10-metiléntetrahydrofolát) átalakítását katalizálja
MTHFR	5,10-metiléntetrahydrofolát-reduktáz (NAD(P)H)	Az 5,10-metiléntetrahydrofolát átalakítását segíti 5-metiltetrahydrofoláttá, amely kosubsztrát a homocisztein metioninná történő remetilációjában
MTR	5-metiltetrahydrofolát-homocisztein-metiltransferáz, Vitamin-B12-függő metionin-szintáz	A homocisztein metioninná történő remetilációját végzi 5-metiltetrahydrofolát és B12 vitamin felhasználásával
MTRR	5-metiltetrahydrofolát-homocisztein-metiltransferáz-reduktáz	A B12 vitaminnak, mint az MTR kofaktorának redukív regenerációját végzi így biztosítva az MTR megfelelő működését
SHMT1	szerin-hidroximetiltransferáz 1	A szerin glicinné és a tetrahydrofolát 5,10-metiléntetrahydrofoláttá történő reverzibilis átalakítását katalizálja
SLC19A1(=RFC)	SLC transzporter fehérjék 19.családjának 1.tagja, Redukált folát hordozó	Folát szállítása az extra- és intracelluláris tér között
SLC22A8	SLC transzporter fehérjék 22.családjának 8.tagja	Endogén és exogén (pl. metotrexát) szerves molekulák veséből történő szállítását és kiválasztását végzi
SLCO1B1	SLC transzporter fehérjék 21.családjának 6.tagja (=SLC21A6)	Szerves anionok és különböző gyógyszerek főleg májban történő felvételét és kiválasztását végzi

Enzimek és transzporterek		Funkció
TPMT	tiopurin-S-metiltranszferáz	A tiopurin alapú gyógyszereket (pl. azatioprin, 6-merkaptopurin) az S-adenozil-L-metionin (metildonor) és az S-adenozil-L-homocisztein (melléktermék) segítségével metabolizálja
TYMS	timidilát-szintáz	A deoxiuridilát deoxitimidiláttá történő metilációját végzi, kofaktora az 5,10-metiléntetrahidrofolát, amely a DNS replikációs és javító mechanizmusokhoz elengedhetetlen dTMP* pool fenntartását segíti

\*dTMP=Deoxitimidin- monofoszfát

Az egyik tanulmány szerint (58) a *CBS* gén rs400660 és rs11909493, az *MTHFR* gén rs1537515, a *TYMS* gén rs1059393 és az *ENOF51* gén rs2612092 polimorfizmusa szignifikáns ( $p < 0,05$ ) asszociációt mutatott az ALL hajlammal. Az etnikai csoportokat vizsgálva az észak-amerikai spanyol ajkú gyermekek körében az rs6586281 és rs234705 (*CBS*), valamint az rs162031 és rs10380 (*MTRR*) variánsok esetében, továbbá az *MTRR* rs2287779-re heterozigótáknál kaptak szintén szignifikáns összefüggést. Az *SLC19A1*, *MTHFD1*, *MTHFR*, *MTR*, *MTRR* gének többi SNP-jénél nem találtak releváns asszociációt. A haplotípus blokkok elemzésekor szintén az észak-amerikai spanyol ajkú populáció körében az *MTHFD1* gén egyik blokkjában lévő SNP-k (rs3783731, rs1950902 rs11627525) ritka alléljai, az *MTRR* (rs162037, rs2287779, rs10380) GAG, és a *TYMS* (rs3744962, rs11081251, rs2260821, rs495139) AAAC haploblokkjai mutattak fokozott rizikót a betegséggel. Egy másik kutatás eredményei szintén feltételezték a folát anyagcserében közreműködő gének és variánsaik szerepét az ALL kialakulásában (59). Eszerint az *MTHFD1* A1958 variáns az ALL-re való fokozott hajlammal és rosszabb túlélési aránnyal párosult (60). Azonban más klinikai prognosztikai faktorokkal (betegcsoport, sejttípus, kezelés karakterisztika) történő együttes elemzésekor kiderült, hogy az *MTHFD1* A1958 variáns hatása nem független tőlük, azokkal kölcsönhatva befolyásolja kisebb vagy nagyobb mértékben a betegségre való hajlamot. Rosszabb kimenetelt eredményezett továbbá ugyanennek a variánsnak és a *TYMS* gén trinukleotid ismétlődésének (homozigóta forma) egyidejű hordozása.

A mindenütt jelenlévő karcinogének hatására a *GSTM1* null, *CYP1A1*\*2A és/vagy a *NAT2* variáns polimorfizmusait hordozó kiskorú gyermekek (magzat is) DNS-e jóval nagyobb eséllyel károsodik, így nagyobb kockázattal betegszenek is meg leukémiában (ALL). Egy hipotézis szerint a *CYP1A1*\*2A variáns allél a CYP1A1 enzim fokozott aktivitását okozva, jelentős mértékben járulhat hozzá a malignus folyamatok kialakulásához (61-63). A variáns allélt hordozók ugyanis sokkal érzékenyebbek a karcinogén hatásokra (64). Ezt igazolják azok a vizsgálatok is, ahol a cigarettafüst és egyéb policiklusos aromás szénhidrogén-forrás által indukált placéntaris CYP1A1 aktivitás megnövekedett rizikóval asszociált (65, 66). Ezek alapján tehát kijelenthető, hogy a *CYP1A1*\*2A vagy \*2B allélt hordozó és a várandósság idején peszticidek káros hatásának kitett édesanyák gyermekeinél kb. hatszor gyakrabban várható malignus folyamatok kialakulása (50, 67).

Az *NQO1*\*2 609C>T polimorfizmus (Prolin187Szerin) ALL kialakulásában betöltött szerepét igazolja az a tanulmány, ahol kimutatták az SNP szignifikáns hatását, amely férfiakban még kifejezettebb volt, mint nőkben. Az *NQO1* fehérjét kódoló gén mutációit számos tumornál megtalálták. Ezek a génmutációk ugyanis növelik a hematotoxicitás és az egyéb tumoros megbetegedések kialakulásának kockázatát a szervezetben. Az ALL kockázatát tovább növeli, ha az említett *NQO1*\*2 polimorfizmus mellett a *GSTT1* (glutathion-S-transzferáz, theta 1) gén deléciós polimorfizmusa is jelen van az adott férfinél (18). A *GST* gének a szervezetben képződött karcinogének és bizonyos kemoterápiás gyógyszerek metabolizmusában játszanak fontos szerepet. A *GSTT1* és *GSTM1* gének által kódolt enzimfehérjék funkciója igen hasonló. Mindkettő gátolja a xenobiotikumok (pl. mutagének, antraciklinek) toxikus hatásának kifejeződését azáltal, hogy közvetlenül lebontja (detoxifikálja) őket, illetve gátolja a MAP kináz-utat (68). A *GST* géncsalád két leggyakoribb variánsa a *GSTT1* és *GSTM1* (glutathion-S-transzferáz, mu 1) inaktív null deléciója. Az említett polimorfizmus(ok) következménye a fehérje (enzim) detoxifikáló funkciójának csökkenése, amely a daganatos elváltozások kialakulásának esélyét növelheti (69). Ez az elmélet támaszthatja alá azokat a vizsgálatokat, ahol a *GST* polimorfizmusainak (null delécióinak) hajlamosító hatását találták. *Pongstaporn* és munkatársai a *GSTO1*\*A140D és *GSTO2*\*N142D gének SNP-it vizsgálva szignifikáns összefüggést mutattak az ALL hajlammal, illetve utóbbi esetében a magas

rizikójú ALL alcsoporttal (70), vagy *Krajinovic*, illetve *Sinnett* és munkacsoportja a *GSTM1* null deléciójának, vagy a *NAT2*, a *CYP1A1\*2A* és a *GSTM1* null gének variáns alléljainak együttes hatását tapasztalták a betegség fokozott rizikója szempontjából (68, 71, 72). Ezzel szemben más eredmények szerint nincs statisztikailag szignifikáns szerepe a *GST* polimorfizmusoknak, vagy pl. *GSTM1* esetében az egyik funkcionális allél megléte már védő faktort jelenthet a betegség kialakulásával szemben (72-75). Ezek a tanulmányok továbbá a *GST* géncsalád variánsainak etnikum-függő tulajdonságára is felhívják a figyelmet.

Az utóbbi időben számos GWAS tanulmány jutott arra az eredményre, hogy a vérképzésben, a sejtek kialakulásában, proliferációjában, differenciálódásában, a sejtciklus szabályozásában, vagy a tumorszupresszióban fontos *IKZF1*, *ARID5B*, *CEBPE*, *CEBPA*, *CDKN2A*, *PAX5*, *EBF1* gének és variánsaik (76-79) jelentős mértékben növelik az ALL kockázatát. Eszerint együttes megjelenésük a hordozókban 50%-kal, míg homozigóta formában már akár 10x-esére is növelhetik az ALL kialakulásának rizikóját (80). Ezek az eredmények azt is mutatják, hogy a fokozott rizikóval járó génvariánsok alacsonyabb expressziós szinttel társulnak, továbbá az örökölt allélvariációk a terápiás választ is jelentős mértékben befolyásolják (77, 80, 81).

A fenti variánsok gyakoriságát az alpopulációkra lebontva az alábbiakat tapasztaljuk: a B-ALL-es esetek 2/3-ában a transzkripciót és a limfoid fejlődést szabályozó *PAX5*, *IKZF1* és *EBF1* gének, valamint módosulásaik, míg a T-ALL-es betegek több mint 80%-ában a *CDKN2A/2B* tumorszupresszor génvariánsok és az általuk kódolt tumorszupresszorok (INK4/ARF), vagy a *WT1*, *PHF6*, *NOTCH1* gének mutációinak megjelenése a jellemző (82, 83).

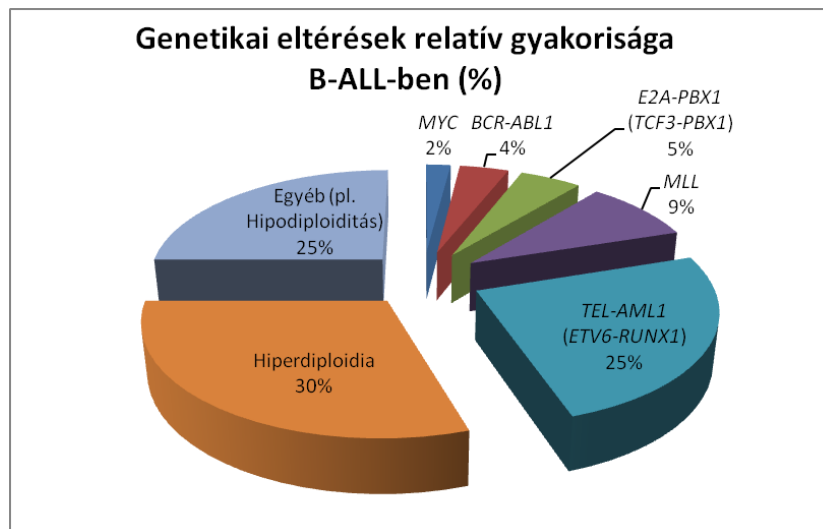
A különböző gének és variánsaik vizsgálata mellett számos olyan citogenetikai tényezőt is megfigyeltek, amelyek jellemzően gyakrabban fordultak elő leukémiában, vagy a már meglévő kórkép kimenetelét tekintve kedvező vagy kedvezőtlen irányba befolyásolni tudták azt. A kromoszóma anomáliák közül pl. Down-kórban (84, 85), Bloom-szindrómában, Fanconi-anémiában meglehetősen nagy gyakoriságban írták le a kórképet.

A 2-5 év közötti B-sejtes ALL-es gyermekeknél a leggyakrabban tapasztalt molekuláris rendellenességek közé tartozik a hiperdiploidia (30%) és a *TEL* és *AML1* gének t(12;21)(p13;q22) transzlokációja (25%) (**3. ábra**) (80, 86). A *TEL-AML1* fúziós gén egy szerzett vagy nem konstitutív leukémiás klón-specifikus genetikai rendellenesség, melyről feltételezik, hogy kulcsfontosságú szerepet játszik a gyermekkori ALL kialakulásában (86). Ennek a génnek születéskori megléte közvetlen bizonyítékul szolgálhat a betegség in utero eredetére nézve (87), azonban csak akkor lehet a leukémiás klón egyedi markereként használni, ha ismert a fúziós gén pontos szekvenciája (88).

A gyermekkori B-ALL-re leginkább a korábban már említett hiperdiploidia (30%), valamint *TEL-AML1* (*ETV6-RUNX1*, 25%) génfúzió jellemző (**3. ábra**). A hiperdiploid esetekben legtöbbször az X, 4, 6, 10, 14, 17, 18, 21 kromoszómák közül legalább 5-nek a nem-random felhalmozódása történik (89).

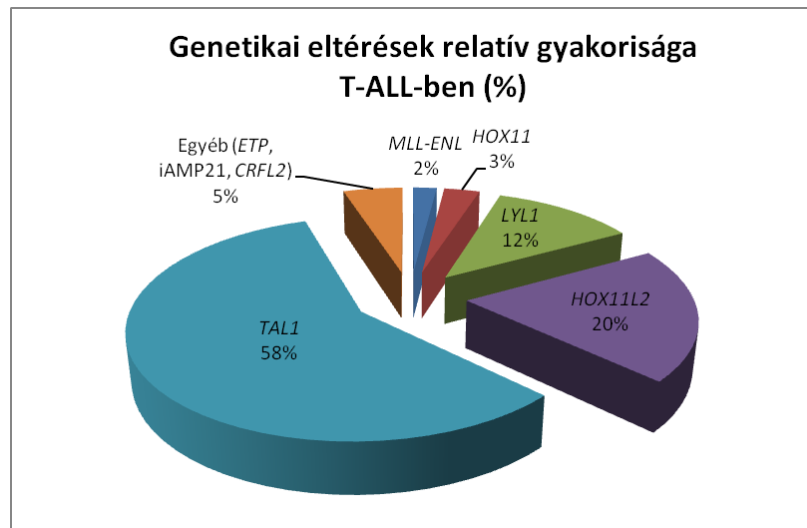
Kisebbszázalékban ugyan, de szintén jelentős hatással bír a BCR-ABL1 (4%) és az E2A-PBX1 (5%) genetikai eltérések, valamint a *MYC* génnek az antigén receptort kódoló génekkel (2%) és az *MLL* gén 11q23 kromoszómarégióban egyéb társ génekkel történő (9%) átrendeződése is.

A *TEL-AML1* és a BCR-ABL1-re jellemző, hogy késői gyermekkorban alakulnak ki és általában 6-8 további genetikai eltéréssel párosulnak (80).



**3. ábra: Genetikai eltérések relatív gyakoriságának eloszlása B-ALL-es gyermekekben (génévek feloldása „Rövidítésjegyzék”-ben)**

A TAL1 (58%), HOX11L2 (20%), HOX11 (3%), és LYL1 (12%) molekulákat kódoló gének szabályozási zavara, különösen a géneknek a T-sejt antigénreceptort kódoló régiójával történő átrendeződése gyakran vezet T-ALL kialakulásához (**4. ábra**). Ezek a változások sarkalatos pontjai az ALL patogenezisének és a kórkép klinikai kezelésének, egyfajta markerként jellemezve a limfoblasztos leukémiákat.



**4. ábra: Genetikai eltérések relatív gyakoriságának eloszlása T-ALL-es gyermekekben.** *iAMP*=a 21. kromoszóma intrakromoszómális amplifikációja, *ETP*=korai T-ALL prekursor gének

A különböző kromoszomális génátrendeződések megzavarhatják ugyanis a normál hematopoézist és a limfoid elemek fejlődését szabályozó gének működését (pl. *RUNX1*, *ETV6*), továbbá aktiválhatják az onkogéneket (pl. *MYC*), vagy indukálhatják a tirozin-kináz rendszert (pl. *ABL1*) (80). A transzlokációk nagy része befolyásolja (különösen B-ALL esetében) a rizikócsoport besorolást, a kezelés kimenetelét, ezáltal a túlélési esélyeket is. A nagyobb ploiditás, vagy az *ETV6-RUNX1* fúziós gén kedvezőbb, míg a hipodiploidia és az *MLL* (mixed lineage leukemia gén) átrendeződés vagy a *BCR-ABL1* (Philadelphia kromoszóma) pozitívitás rosszabb prognózist mutatnak gyermekekben és felnőttekben egyaránt (90). A tapasztalatok azonban azt mutatják, hogy ezek a változások nem önmagukban idézik elő a betegséget, sokkal inkább szubmikroszkópikus genetikai módosulásokkal együtt vesznek részt a leukémia patogenezisében. A DNS kópiaszám változásokat (deléciók, többszörösen ismétlődő szekvenciák) nagy felbontású microarray-vel és szekvenálással (új

generációs-, transzkriptom-mRNS, exom és teljes genom szekvenálás) vizsgálták. Ennek eredményeképpen többféle, új, strukturális genetikai változást és szekvencia mutációt sikerült azonosítani, amelyek közül számos prognosztikai markerként, vagy akár terápiás célpontként is szerepelhet. Továbbá új leukémiás alcsoportok meghatározásával nagyobb hatékonysággal alakítható ki a betegek egyénre szabott terápiája (91-96).

Az akut limfoid leukémia vonatkozásában több mint 50 különböző szubmikroszkópikus genetikai régiót azonosítottak a DNS kópiaszám változások vizsgálatának köszönhetően (92, 93, 97-101). A B-ALL-re jellemzőek pl. a B-limfoid sejtek fejlődéséért felelős, TP53-RB1 tumor szupresszor, Ras szignalizációs, Januskináz útvonalakat érintő változások, vagy pl. *ETV6*, *TBL1XR1*, *CREBBP*, *MUC4*, *ASMTL*, *ADARB2* génmutációk (102), a T-sejtes leukémiánál pedig szintén nagy gyakorisággal találtak a Ras és citokin receptor szignalizációs útvonal (*NRAS*, *KRAS*, *FLT3*, *JAK1*, *JAK3*, *IL7R*), továbbá a hematopoézist szabályozó gének (*GATA3*, *ETV6*, *RUNX1*, *IKZF1*) és a kromatin-módosító gének, különösen a polycomb represszor komplex 2 (*EZH2*, *EED*, *SUZ12*) esetében deléziós mutációs változásokat (103).

Egyes tanulmányok továbbá kimutatták bizonyos gének – pl. a már említett *ETV6*-*RUNX*, *DNMT1*, *MLLT3*, *PTEN*, *KRAS*, *CDKN2A*, *CDKN2B* – promotor régiójában fellépő, illetve a BCR (B-ALL) és a TCR (T-ALL) szignalizációt érintő, különböző epigenetikai változások – mint pl. a citozin metiláció – szerepét is (104-108). Ezek alapján a gének DNS metilációjának prognosztikus jelentősége lehet a malignus folyamatok – pl. AML és ALL – kialakulásában (109, 110), ami feltételezi, hogy az epigenetikai módosulások nem egyfajta passzív másodlagos folyamatként jönnek létre, sokkal inkább a leukemogenezist aktívan befolyásoló tényezőkként (108, 111).

Az akut limfoid leukémiás gyermekpopulációban új leukémiás alcsoportnak számítanak az Xp/Yp pseudoautoszómális régió 1 (PAR1) *CRLF2* átrendeződését hordozók (kb.8%-uk). A *CRLF2* a thymikus limfopoetin receptort kódolja (91, 94). Mind az immunoglobulin nehéz láncának 14q32 lókusza és a *CRLF2* közötti átrendeződés, mind pedig a gén deléciója a gén szabályozásának megváltozásához vezet, ami két új fúziós gén (*IGH-CRLF2*, *P2RY8-CRLF2*) létrejöttét eredményezi. Mindkét esemény a *CRLF2* gén kontroll nélküli expressziójához vezet, ezáltal pedig a

limfoblasztok fokozott termelését teszi lehetővé (112). A *CRLF2* genetikai variánsai különösen a Down-szindrómás gyermekekben (>50%) figyelhetők meg. Az esetek több mint felében a *CRLF2* génátrendeződéssel egyidőben a *JAK1* és *JAK2* mutációk (91, 94, 113), valamint *IKZF1* variánsok aktiválódását figyelték meg, mindezek mellett pedig a rosszabb prognózist (114-116).

B-ALL-ben eddig csak a *BCR-ABL1* fúziós gén jelentőségét ismerték, azonban a szubmikroszkópikus genetikai és expressziós vizsgálatoknak köszönhetően egy új, a *BCR-ABL1* fúzióhoz hasonló csoportot (*BCR-ABL1-like*) tudtak megkülönböztetni. A B-ALL-es populáció 10-12%-ában figyelhetők meg ez az újfajta fúziós csoport, ami ugyancsak kedvezőtlen túlélési kimenettel párosul (114, 117). A *BCR-ABL1-like* variánsal bíró esetek 50%-ában szintén megtalálható a *CRLF2*, a különböző *JAK* és *IKZF1* mutációk (118).

Több helyen is említésre került az adott genetikai variációknak a terápia sikerességére, a pozitív vagy negatív kimenetelére gyakorolt hatása. A relapszus lehetséges okairól azonban kevesebb szó esett. Kutatók arra lettek figyelmesek, hogy a leukémiás mintákat citogenetikai és genomikai profilozással vizsgálva (119) diagnóziskor és relapszuskor is, a két állapot között jelentős különbség mutatkozott a genetikai módosulások természetében. Arra a következtetésre jutottak, hogy a relapszus oka nagy valószínűséggel és az esetek többségében egy kisebb leukémiás szubklón, amelynek genetikai profilja jelentősen eltért a diagnóziskori predomináns sejtpopulációtól (120-122). A legtöbb esetben közös genetikai eltéréseket is találtak a kétféle sejtpopuláció között, ami arra enged következtetni, hogy a predomináns- és a relapszusért felelős szubklónok közös preleukémiás eredettel rendelkeznek. Nagy érzékenységgű assay segítségével további vizsgálatokat végeztek, és azt tapasztalták, hogy a szubklón már diagnóziskor is jelen lehet, azonban szinte észrevehetetlen „mennyiségben”. Ez az eredmény azt feltételezheti, hogy a relapszust okozó szubklón genetikai módosulásai más variációkkal együtt (pl. *IKZF1*, *CDKN2A/2B* deléciók) nem csak a kezeléssel szembeni rezisztenciáért, hanem a rosszabb terápiás kimenetelért is felelősek lehetnek. Kisebb arányban ugyan, de a vizsgálatok során előfordult olyan eset is, ahol diagnóziskor az eredeti leukémiás sejtpopulációtól teljesen különböző relapszus szubklónt azonosítottak, amit pl. a transzkripció



koaktivátort kódoló *CREBBP* vagy a *TP53* gén funkcióvesztést okozó mutációinak feldúsulása (95, 123, 124), illetve az *NT5C2* variánsai (125, 126) jellemzett.

A komplex és változó terjedelmű genetikai eltérések diagnosztikai szintű detektálásához elengedhetetlen az NGS (New Generation Sequencing-új generációs szekvenálás) technikák alkalmazása. A kutatások központi témájának számító nem-kódoló génmutációkat, vagy a különböző genetikai, epigenetikai és transzkripció faktorok kölcsönhatását is csak nagy érzékenységgű és áteresztőképességű technikával lehet megfelelően azonosítani. Így nem véletlen, hogy ezeknek a technikáknak kulcsfontosságú szerepe van és lesz, a jelenlegi és jövőbeni ALL kutatásban egyaránt. Továbbá ahhoz, hogy a jövőben megfelelően robosztus eredményeket, és így a betegség etiológiáját tekintve prediktív markereket határozhassunk meg, szükséges a GWAS-ok több különböző (akár kisebb) populáción történő visszaválidálása, illetve a megfelelően szigorú szignifikancia szint meghatározása (általában  $p_{\text{GWAS}} < 10E-07$ ) (76-79) is.

### 2.3 AZ AKUT LIMFOID LEUKÉMIA FARMAKOGENETIKAI HÁTTERE

A gyermekkori ALL kezelése az onkológia egyik „sikertörténete”, hiszen az 1960-as években még csak 30%-os 5-éves túlélési arány az elmúlt 50 év alatt 80-85% feletti értékre ugrott napjainkra (127). Azonban jelenleg ez a rohamosan javuló tendencia elakadt. Ennek megoldása lehetne új gyógyszerek, gyógyszer célpontok kifejlesztése és azonosítása, továbbá egyénre szabott, kíméletesebb terápiás protokoll(ok) kialakítása. Ily módon tovább lehetne javítani nemcsak a túlélési esélyeken, de különösen a késői mellékhatások okozta rosszabb életminőségen (127-130).

Az antileukémiás szerek hatékonyságát számtalan gén és azok komplex egymásra hatása határozza meg. Befolyásolhatják a gyógyszerek farmakokinetikáját (abszorpció, disztribúció, metabolizáció, és exkréció) és farmakodinamikáját (terápiás hatékonyság, toxicitás) is egyben.

A farmakogenetika különösen a gyógyszer metabolizáló enzimeket, a gyógyszer célpontokat és transzportereket kódoló génvariánsok hatásaira fókuszál. A módosult genetikai „tartalom” akár önmagában, de többnyire egymással kölcsönhatva specifikus (gyógyszerkapcsolt) fenotípusokat hozhat létre. Ezen túlmenően potenciális genetikai markerekként a finomabb leukémiás csoportbesorolást, és így már a kezdeti terápiás lépéseket is segíthetik. A (farmako)genetikai háttér vizsgálatával új

gyógyszercélpontokhoz, illetve a terápiás kezelést pozitív irányba terelő módosító faktorokhoz juthatunk, amelyekkel a kemoterápia során fellépő mellékhatásokat, gyógyszerrezisztenciát, vagy éppen a gyógyszer toxicitást tudjuk mérsékelni vagy elkerülni.

A gyermekkori akut limfoid leukémia már a farmakogenetikai kutatások legelejétől kezdve kedvelt modellrendszernek számított több okból is. Egyrészt a gyermekeket ért környezeti hatások még elenyészőek a felnőttkorihoz képest, másrészt a terápia során alkalmazott készítmények hatását, általában nem befolyásolja még semmilyen szervi funkciózavar, vagy egyéb társbetegség, továbbá a nemzetközi standardizált protokollokban foglalt szempontok egységes rendszere miatt jól kiszűrhető az egyes genetikai tényezők szerepe (131).

Alapvetően minden főbb humán gyógyszermetabolizáló enzim katalizálja a gyógyszermolekulák funkciós csoportjainak megváltozását (Fázis I. reakciók), vagy az endogén anyagokkal történő konjugációját (Fázis II. reakciók) azok könnyebb kiürülése céljából. A farmakogenetika vizsgálati célpontjai tehát, az ezen enzimeket kódoló gének és variánsaik, amelyek jelentős mértékben képesek a gyógyszerek metabolizmusát és kiválasztását befolyásolni (132). Fontos fázis I enzimek a citokróm P450 enzimcsalád és a quinon-oxidoreduktázok, a fázis II. csoport jelentős képviselői pedig a glutation S-transzferázok (GST-k), a tiopurin S-metiltranszferázok (TPMT), továbbá az UDP-glükuronil-transzferáz (UGT).

A legutóbbi átfogó farmakogenetikai tanulmányok főleg a releváns SNP-k (egyszeres vagy többszörös CGAS) egymásra hatását, együttes megjelenésük következményeit vizsgálták az alkalmazott terápia vonatkozásában (133-136). Az egyik ilyen kutatásban 246 ALL-es gyermek DNS-ét 13 gén 16 SNP-jére vizsgálták meg a terápiás kimenetellel és az antileukémiás gyógyszer toxicitással kapcsolatosan (135, 136). Eredményeik alapján a *GSTM1* vad (nem-null) genotípus szignifikánsan asszociált a megnövekedett relapszus kockázatával magas-rizikójú betegeknél. Továbbá 4 csírvonalbeli polimorfizmus és az antileukémiás gyógyszerek okozta toxicitás közötti szignifikáns asszociációt mutattak ki. Az ALL terápia indukciós fázisa során

elsődlegesen a CYP3A, az ABCB1 és rajtuk keresztül a D-vitamin receptor (VDR) útvonalak érintettek. Az eredmények alapján a *CYP3A5*\*3 (22893G>A, rs776746) GG genotípus (alacsonyabb CYP3A5 aktivitás) a gasztrointesztinális toxicitással és fertőzésekkel korrelált. A konszolidációs és kontinuációs szakaszban, - ahol az antifolátok alkalmazása a domináns terápiás eszköz – az *RFC1* (*SLC19A1*; 80A>G, rs61510559) AA és AG genotípusa szintén az emésztőrendszeri toxicitást prediktálja. Megfigyelték továbbá, hogy mindhárom terápiás szakaszban az *UGT1A1* promoter repeat polimorfizmusa (*UGT1A1* 7/7) hiperbilirubinémiával függött össze.

A kemoterápia során alkalmazott legfontosabb gyógyszerek között vannak a tiopurinok (6-merkaptopurin, tioguanin), a metotrexát, az antraciklinek (doxorubicin, daunorubicin) és természetesen a kezelések okozta rövid (hányás, tumorlízis szindróma, fertőzésekre való hajlam)- és hosszútávú (kardio-, neuro-, hepato-, nefrotoxicitás) mellékhatások elkerülését célzó kiegészítő készítmények (pl. razburikáz - tumorlízis szindróma ellen, dexrazoxán - kardiotoxicitás ellen) is.

Az antifolátként működő metotrexát (MTX) alapvető komponense a gyermekkori ALL kezelésnek. Az optimális dózis meghatározása még napjainkban sem teljesen egyértelmű. Nagy - dózisú MTX-ot a konszolidációs, alacsony - dózisú (szájon át) MTX-ot pedig a kontinuációs terápia során alkalmaznak általában. A MTX-nak a sejtek által történő elsődleges felvételét az *SLC19A1* (*RFC1*) segíti, míg a sejtekből történő kiszállítását az ABC transzporterek végzik (*137, 138*). A sejtbe jutva a MTX egy gyors poliglutamációs lépésen megy keresztül a folil-poli-gamma-glutamát szintetáz (FPGS) enzim segítségével (*139*). Az ALL-es sejtek MTX akkumulációs képessége meghatározónak bizonyult a terápia sikerességében és így a túlélésben (*140, 141*). Napjainkban CGAS és GWAS vizsgálatokkal próbálják meghatározni a poliglutamált MTX *in vivo* akkumulációját és citotoxikus hatását befolyásoló genetikai tényezőket (*142, 143*). Az *E2A-PBX1*, a *TEL-AML1* genetikai eltérések által meghatározott és a T-ALL alcsoportok esetében alacsonyabb MTX akkumulációt tapasztaltak. A MTX a DHFR, a TYMS és a GART enzimek gátlásával fejt ki citotoxikus hatását elsősorban (*144, 145*), továbbá a poliglutamált MTX-ot a GGH enzim alakítja vissza MTX-tá, így ezen enzimek polimorfizmusai szintén jelentős mértékben befolyásolhatják a betegség kimenetelét (*146*). Egy genomszintű vizsgálat során az ALL blaszt sejtekben 48 gén expressziós mintázatát vizsgálták. A vizsgálatba

bevont *TYMS* és *DHFR* gének expressziója szorosan összefüggött a metotrexát kezelésre adott *in vivo* terápiás válasszal, amely prediktív jelleggel bírhat a hosszú távú eseménymentes túléléssel kapcsolatosan (143). A természetesen jelen lévő *DHFR* 829C>T (rs1677669) polimorfizmus a gén 3'UTR régiójában megváltoztatta a miR-24 kötőhely funkcióját és fokozott *DHFR* expressziót, ezáltal a metotrexát kezeléssel szembeni rezisztenciát okozott (147). Egy másik közlemény szintén a *DHFR* gén egyik SNP-je és a gén megnövekedett expressziója, illetve az alacsonyabb eseménymentes túlélési hányad között talált kapcsolatot (148).

A minimális reziduális betegség (MRD-minimal residual disease) (2, 149) elkerülése érdekében az intenzifikációs szakaszban többek között nagy dózisu (pl. 1-8 g/m<sup>2</sup>) antifolátot, metotrexátot adnak a betegeknek. A metotrexát aktív metabolitjának leukémiás sejtekben történő akkumulációját antileukémiás aktivitással hozták összefüggésbe.

A tiopurinok egy citotoxikus gyógyszercsoport, melyet főleg a kemoterápia intenzifikációs, konszolidációs fázisában használnak. A gyógyszer alkalmazása során tioguanin épül be a DNS láncba, így idézve elő a sejtciklus zavarát és az apoptózist. A gyógyszer metabolizmusát a TPMT enzim szabályozza. Az enzim genetikai variánsai felelősek lehetnek a gyógyszer metabolizmusának megváltozásáért (150, 151). Egyes tanulmányok összefüggést találtak *TPMT* variánsok (*TPMT\*2*, *TPMT\*3A* és *TPMT\*3C*) és a tiopurinnal kezelt betegekben kialakult, különböző mértékű mieloszuppresszió között (152). Nagy dózisu (pl. 75 mg/m<sup>2</sup>/nap) tioguanin kezelés esetén pedig másodlagos malignitást is megállapítottak (153). Ezért a gyógyszercímkén – bár nem kötelező jelleggel – ajánlják ezeknek a variánsoknak a genotipizálását a terápia megkezdése előtt (2).

Az antraciklinek használata során a betegek között jelentős különbségek figyelhetők meg a szívproblémák kialakulásában, ami genetikai háttér jelenlétére utal. Kutatási eredmények bizonyítják, hogy a szabadgyökképzésben részt vevő gének, az antraciklin-transzportját végző ABC-transzporterek és az antraciklin metabolizáló gének hozzájárulnak a kardiotoxicitás egyéni különbségeihez.

Az antraciklinek több ABC-transzporternek is szubsztrátjai, amelyek nagyon fontosak ezeknek a gyógyszereknek a sejtől történő kiszállításában. Ezek közül egyik az

*ABCC1* (ATP-binding cassette, sub-family C, member 1), az ABC-transzporter géncsalád C1-es génye.

*Wojnowski* és munkacsoportja non-Hodgkin-limfómás felnőtteket vizsgált. Eredményeik alapján feltételezhető, hogy az *ABCC1* rs45511401 egy pontos nukleotid polimorfizmusa és az akut antraciklin okozta kardiotoxicitás kialakulása között szignifikáns összefüggés van (154). Egy másik vizsgálatban több különböző gyermekkori malignus betegpopulációt elemeztek. Eredményeik az előző munkacsoporttal egy irányba mutatva, szintén az *ABCC1* adott rs4148350 SNP-je és az antraciklin okozta kardiotoxicitás közötti asszociációt mutattak ki (155). Mindezek ismeretében az *ABCC1* gén és variánsai fontos szerepet játszhatnak az antraciklinek szívkárosító hatásában, így prediktív vizsgálatuk sarkalatos pontja lehet a kemoterápia optimalizálásban és a toxikus mellékhatások elkerülésében.

A farmakogenetika „erejét” számos eddig is alkalmazott, illetve a gyógyszermetabolizmus genetikai hátterének mélyrehatóbb vizsgálata révén újonnan kifejlesztett terápiás készítmények adják. Ilyenek pl. a Janus kináz gátlók (pl. ruxolitinib), amelyek különösen hatékonyak a *JAK* vagy *CRLF2* genetikai módosulásokat hordozó ALL-es betegekben (96), vagy az *ABL1* és *PDGFRB* inhibitorok (pl. imatinib, dasatinib) a *BCR-ABL1-like* eseteknél (118). Továbbá a DNS (azacitidin)- és hiszton-metiltranszferáz, illetve hiszton-deacetiláz inhibitorok (trichosztatin-A), amelyek egyes tumorszupresszorok reaktivációját, vagy a kemoterápiára való megnövekedett érzékenységet eredményezhetik különösen a *CREBBP* mutációkat, vagy *MLL* génátrendeződést hordozóknál (156, 157). Meg kell említenünk még – a teljesség igénye nélkül – a sokkal agresszívebb és rosszabb prognózisú T-ALL hatékony terápiás eszközeit is. Ilyenek pl. a CD19 és CD3ε sejtfelszíni antigénekre bispecifikus (blinatumomab), vagy a CD19, CD20, CD22, CD52 specifikus monoklonális antitesteket nem-konjugált (epratuzumab), és konjugált (moxetumomab, inotuzumab ozogamicin) formában tartalmazó készítmények (158).

Az újonnan diagnosztizált akut limfoid leukémiás betegek vizsgálata alapján egyre több bizonyíték mutat afelé, hogy a már kezdetekor jelenlévő leukémiás szubklónok

tehetők felelőssé a kemorezisztencia kialakulásáért. Ennek jelentősége különösen a magas rizikójú betegeknél van, ahol ezek a diagnóziskor is meglévő leukémiás alpopulációk különböző genetikai módosulásokat hordozva felelősek lehetnek a későbbi relapszusért, vagy a terápia kimenetelért (120-122). Éppen ezért a jövőbeni protokolloknak ezen szubklónok pontos azonosítását és megfelelő kezelését kell megcéloznia a magas rizikójú csoport túlélésének és későbbi életminőségének javítása érdekében.

Összességében tehát elmondható, hogy az ALL farmakogenetika fő célja olyan poligénes és személyre szabható modellek kidolgozása, amelyek pontosan prediktálhatják az egyes betegek egyéni gyógyszerválasztát és a lehetséges toxicitás veszélyeit, ezáltal növelve a terápia hatékonyságát és a túlélési esélyeket, valamint támogatva a kezelés utáni jobb életminőség elérését.

#### **2.4 A STATISZTIKAI ADATELEMZÉS SZEREPE: FREKVENTISTA ÉS BAYES-I STATISZTIKA**

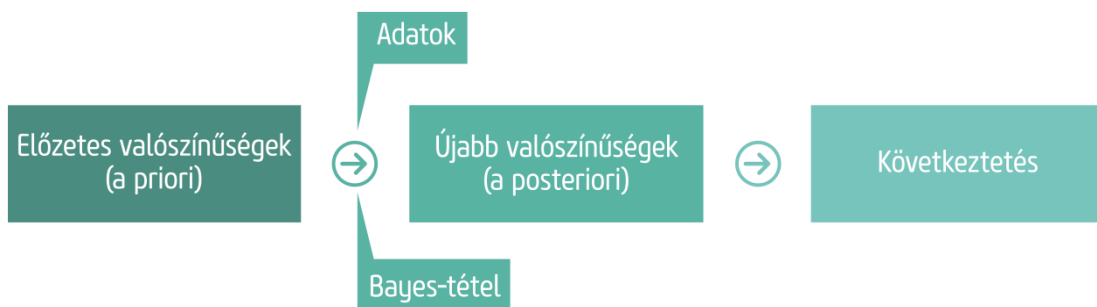
A különböző genetikai anomáliák, mutációk, polimorfizmusok detektálását a napjainkban egyre elterjedtebb nagy áteresztőképességű módszerek segítik. Ezek a technikák a korábbiakhoz képest igen rövid idő alatt, rendkívül nagy mennyiségű adatot „termelnek”. Legtöbbször pedig már egymással kölcsönható, komplex kapcsolati rendszerek feltérképezése a cél. Éppen ezért elengedhetetlen az adatfeldolgozást segítő módszerek szemléletváltása, illetve a tradicionális statisztika mellett az inverz gondolkodású kiértékelő technikák - akár kiegészítő - alkalmazása is. Dolgozatomban két adatfeldolgozó rendszer lehetőségeit is igyekeztem kihasználni: a klasszikus frekventista és a Bayes-háló alapú bayes-i többszintű relevanciaanalízis statisztikáét.

A két statisztikai módszert összehasonlítva elmondható, hogy a frekventista statisztikánál az esemény valószínűsége a megfigyelésekből számított, relatív gyakoriságon alapul, egyéb, külső információ felhasználása nélkül. Az így felállított hipotézisekről nem nyújt direkt megállapításokat (**5. ábra**). A frekventista statisztika kulcsfogalmai a becslés bizonytalanságát mérő konfidencia intervallum (ami általában 95% CI), a statisztikai hipotézisek vizsgálata, és a torzítatlan becslés (159). Hátránya a többszörös hipotézis tesztelési probléma.



**5. ábra: A frekventista statisztika elvének sematikus ábrája.** A klasszikus statisztika felállít egy nullhipotézist (pl. nincs kapcsolat az SNP és betegség között), amelynek valószínűtlenségét az adatok függvényében igazolja és vonja le a következtetéseket (kis valószínűségi érték esetén nem igaz a null hipotézis, azaz van összefüggés SNP-betegség között).

A bayes-i statisztika ezzel szemben egy fordított valószínűségi modellt alkalmaz (6. ábra). Tehát itt nem konfidencia-intervallumot, hanem megbízhatósági tartományt (credibility region-t) lehetne mondani. A kettő közti különbség, hogy a konfidencia-intervallum az a tartomány, amelybe - ha a kísérletemet végtelenszer megismételném, akkor az esetek pl. 95%-ában az OR (odds-ratio, esélyhányados) esne. A megbízhatósági tartomány az a tartomány, amelybe az OR 95%-os valószínűséggel beleesik az *a priori* feltevések és az adataink alapján.

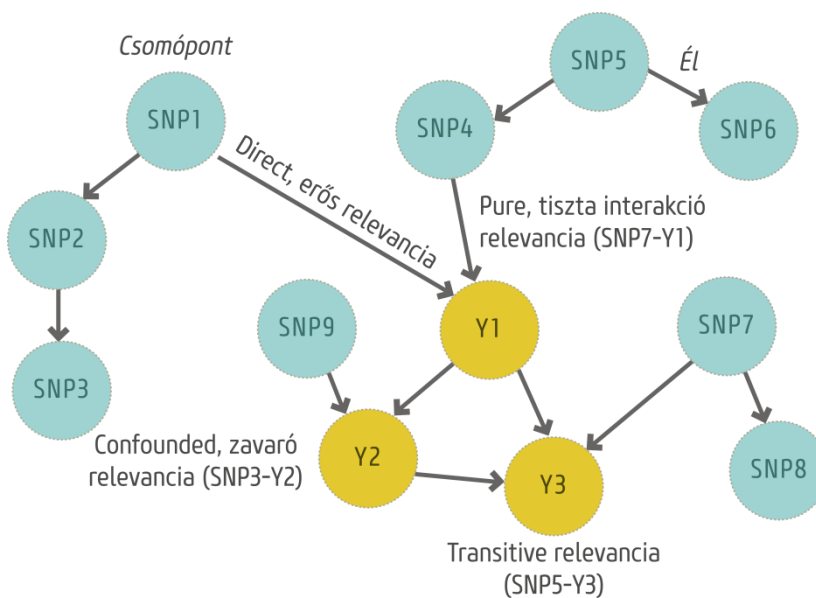


**6. ábra: A bayes-i statisztika elvének sematikus ábrája.** A bayes-i statisztika előzetes valószínűségeket állapít meg, amelyekből az adatok és Bayes-tétele segítségével újabb valószínűségeket határoz meg. Ezekből vonja le a végső következtetéseket.

A Bayes-háló (BN) egy valószínűségi grafikai modell, amely valószínűségi változók közötti, feltételezett függőségi viszonyt, kapcsolati struktúrát ábrázol (egy irányított körmentes gráf segítségével – directed acyclic graph, DAG). A Bayes-háló hatékonyan tudja leírni a változók együttes valószínűségi eloszlását (7. ábra). A gráf csomópontja

a változót, az él pedig a változók közötti kapcsolati struktúrát, függőségi viszonyt mutatja.

Az **7. ábra** egy általános Bayes-hálót mutat be, ahol az élek a fenotípusos változók (pl. ALL–Y1, ALL-alcsoportjai-Y2, immunfenotípus-Y3) és az egyes prediktor változók (pl. SNP-k) közötti direkt összefüggéseket reprezentálják. A hálóban szereplő útvonalak további függőségi viszonyokat eredményeznek (pl. a SNP5, SNP4, Y1 és Y3 változók közötti él egy irányított utat definiálnak, amelynek következtében az SNP5 és az Y3 változó között ún. tranzitív relevancia áll fenn).



**7. ábra: Általános Bayes-háló kapcsolati struktúrája**

A bayes-i elemzés során a célunk az, hogy meghatározzuk az egyes összefüggések *a posteriori* (az esetleges *a priori* ismeretek és a megfigyelési adatok alapján megállapított) valószínűségeit.

Egy kiválasztott változó (a továbbiakban: célváltozó, pl. ALL megléte/hiánya) Markov-takarója azokból a minimális számú, ún. *erősen releváns* változókból áll, amelyek az összes többi változó hatását elfedik. Azaz ezen változók értékének ismeretében a többi változó értéke nem befolyásolja a célváltozó értékét. A bayes-i elemzés egyik legfontosabb célja annak meghatározása, hogy egy kiválasztott célváltozónak mely változóhalmazok, mekkora valószínűséggel alkotják a Markov-takaróját (Markov Blanket Set, MBS). Ez alapján minden egyes változóra kiszámítható az a valószínűség, hogy az adott változó szerepel a célváltozó Markov-



takarójában (Markov-határbeliség, Markov Blanket Membership, MBM). Ez nem más, mint annak az *a posteriori* valószínűsége, hogy a változó a célváltozó szempontjából erősen releváns. A Markov-takarót alkotó változók közötti kapcsolatrendszer is tartalmazó algráf az ún. Markov-takaró algráf (Markov Blanket SubGraph, MBG). Ezekon felül az elemzés során további függőségi viszonyok *a posteriori* valószínűségét is meghatározzuk (**7. ábra**), ezek a következők: direkt erős relevancia (Y1 és SNP1 között), tranzitív relevancia (Y3 és SNP5 között), zavaró relevancia (Y2 és SNP3 között), valamint tiszta interakció (Y1 és SNP7 között, közös gyermekük az Y3).

Az elemzés során uniform priorokat (előzetes információk) használtunk, hogy csak az adat hatása érvényesüljön, azaz nem voltak speciális beállítások. Az előzetes információk származhatnak korábbi futtatásokból, tudásbázisokból, szakirodalomból. A bayes-i módszerek nagy előnye, hogy ezeket viszonylag könnyen be lehet építeni a modellbe szemben más módszerekkel.

Összefoglalva elmondható tehát, hogy a fő különbség a két módszer között a kérdésfeltevés iránya, azaz más szemszögből közelítik meg a problémát. A frekventista statisztika kérdése: "Adott paraméter mellett, mekkora a valószínűsége, hogy az adat megjelenik?", míg a bayes-i kérdés így hangozna: "Az adatok ismeretében, mit tudunk mondani a paraméterről?"

A bayes-i módszer (BN-BMLA) matematikai háttérének részletesebb magyarázata a munkacsoport korábbi cikkeiben (159-167) és a releváns szakirodalomban (168-171) olvasható. Dolgozatomban a módszer lényeges tulajdonságait és az asszociációs vizsgálatok kiértékelésénél betöltött fontos szerepét szerettem volna hangsúlyozni.

### 3 CÉLKITŰZÉSEK

PhD munkám során a következő célkitűzéseim voltak:

1. A kemoterápiás gyógyszerek detoxifikációjában fontos GSTM1 és GSTT1 molekulák deléciós variánsainak gyermekkori akut limfoid leukémia (ALL) kialakulásában betöltött szerepének vizsgálata.
2. A hematopoézisben, transzkripcióban, folát metabolizmusban jelentős 33 gén 126 csírvonalbeli genetikai polimorfizmusának vizsgálata gyermekkori ALL-es és egészséges kontroll populáció eredményeit összevetve bizonyos klinikai paraméterek (nem, életkor, citogenetikai jellemzők) és ALL-es alcsoportok (B-sejtes-ALL, T-sejtes-ALL, hiperdiploid-ALL) figyelembevételével.
3. Ugyanezen populációban az össz (OS)-, és eseménymentes túlélés (EFS) szempontjából a különböző génvariánsok szerepének vizsgálata, tehát a kiválasztott, jelentős szignalizációs-, és anyagcsereútvonalat érintő, valamint a transzkripció szabályozásában szerepet játszó polimorfizmusok közül, melyek befolyásolják szignifikáns módon a túlélési esélyt.
4. A gyermekkori akut limfoid leukémia terápiája során alkalmazott antraciklinek kardiotoxikus hatásának és azok genetikai vetületének tanulmányozása az *ABCCI* polimorfizmusok segítségével.
5. A napjainkban leginkább elterjedt statisztikai gyakoriságon alapuló (frekventista) és a munkacsoport által kifejlesztett Bayes-háló alapú bayes-i többszintű relevancia analízis (BN-BMLA) módszereinek egymást segítő, kiegészítő alkalmazása az adatelemzés során. A különböző klinikai, illetve genetikai tényezők és a gyermekkori akut limfoid leukémia közötti kapcsolati struktúrák bayes-i modellezése és ezek valószínűségének becslése az ún. *a posteriori* valószínűségi értékek (P) megadásával.

## **4 ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK**

### **4.1 MINTAPOPULÁCIÓ**

Vizsgálataim során a Semmelweis Egyetem, Genetikai, Sejt-, és Immunbiológiai Intézetében található biobank mintáit és adatait használtam fel. A mintabankban összesen több mint ezer egyén, a magyar (európai eredetű) populációhoz tartozó akut limfoid leukémiás gyermek és egészséges kontroll véradó, illetve a Budai Gyermekkórház Ortopédiai Osztályáról és a Heim Pál Gyermekkórház Urológiai Osztályáról véletlenszerűen kiválasztott gyermek DNS mintája található. A mintabank létrejöttében kulcsszerepe volt Dr. Erdélyi Dánielnek, a Semmelweis Egyetem, II.sz. Gyermekgyógyászati Klinika szakorvosának.

A kutatási projekt a Magyar Etikai Bizottság (Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottság, azaz ETT TUKEB; Esetszám: 8-374/2009-1018EKU 914/PI/08) engedélyével jöhetett létre, melynek egyik feltétele volt a bevont személyek, illetve kiskorú személyek esetén a betegek szüleinek írásos beleegyezése. A különböző kísérletekbe bevont mintapopuláció minden esetben a biobankból származott, azonban a vizsgálatok időbeni eltérése és a biobank folyamatos bővítése, illetve néhány esetben a minták fogyása miatt azok összetétele (beteg-kontroll arány, életkor eloszlás) kis mértékben eltér egymástól.

#### **4.1.1 BETEGEK**

A betegek mintái elsősorban a Semmelweis Egyetem, II.sz. Gyermekgyógyászati Klinikájáról, illetve az ország többi kilenc hematológiai központjából származnak. Vizsgálataimban az 1990 és 2010 között diagnosztizált személyek mintáit elemeztem, akiket az ALL Berlin-Frankfurt-Münster (BFM) 90 és 95-ös, valamint ALL IC 2002-es protokollal kezeltek. A betegek rizikócsoport besorolása a protokollokban meghatározott paraméterek alapján történt.

A különböző kemoterápiás gyógyszerek detoxifikációjában (*GSTM1*, *GSTT1*) és a limfoid sejtek szöveti infiltrációjában (*CCR5*) jelentős gének és variánsaik szerepét 439 ALL-es gyermek és 359 egészséges kontroll minta bevonásával vizsgáltam (I.

jelölt gén asszociációs vizsgálat) (**2. táblázat**). Céлом a *GSTM1* és *GSTT1* gének null és a pozitív kontrollként alkalmazott *CCR5* gén delta32 polimorfizmusainak vizsgálata és összehasonlítása volt gyermekkori akut limfoid leukémiás és egészséges populációban. A *GSTM1* és *GSTT1* deléciós polimorfizmusok genotipizálásakor nem lehetett különbséget tenni a vad homozigóta és a heterozigóta egyének között, így a statisztikai kiértékelés során az ún. recesszív modellt alkalmaztam. A recesszív modellben a vad homozigóta és heterozigóta genotípus csoport eloszlásának összehasonlítása történik a ritka (mutáns) homozigóta csoporttal szemben beteg és egészséges populációban.

**2. táblázat: I. vizsgálatban elemzett betegcsoport adatai**

	<b>Betegek</b>	<b>Kontrollok</b>
<b>Teljes populáció</b>	439	359
<b>Nem (%)</b>		
Nő	189 (43,1)	152 (42,3)
Férfi	250 (56,9)	207 (57,7)
<b>Diagnóziskori életkor</b>		
Átlag ( $\pm$ SD)	6,2 ( $\pm$ 4,2)	21,3 ( $\pm$ 14,3)
Median (Tartomány)	4,7 (0,2-18)	20,0 (1,5-63)
<b>Sejtmorfológiai alcsoport (%)</b>		
B-ALL	335 (76,3)	-
T-ALL	65 (14,8)	-
<b>Citogenetika (%)</b>		
Hiperdiploiditás	81 (18,5)	-

A limfocita differenciálódásban, transzkripcióban, sejt proliferációban (II. jelölt gén asszociációs vizsgálat) és a folát anyagcserében (III. jelölt gén asszociációs vizsgálat) kulcsfontosságú génpolimorfizmusok vizsgálatokhoz azonos mintapopulációval (**3. táblázat**) dolgoztam. A genotipizálás egyazon időben és módszerrel történt. A genotipizálás során 144 polimorfizmusból 129-et sikerült meghatározni és a populáción elemezni. Az I. tanulmányhoz képest mind a betegek, mind pedig a kontrollok száma is növekedett a biobank folyamatos bővítése révén, így összesen 543 leukémiás gyermek és 529 kontroll mintáját vizsgálhattam.

**3. táblázat: A II. és III. vizsgálatban elemzett betegcsoport adatai**

	<b>Betegek</b>	<b>Kontrollok</b>
<b>Teljes populáció</b>	543	529
<b>Nem (%)</b>		
Nő	308 (56,7)	305 (57,7)
Férfi	235 (43,3)	224 (42,3)
<b>Diagnóziskori életkor</b>		
Átlag ( $\pm$ SD)	6,4 ( $\pm$ 4,2)	16,1 ( $\pm$ 12,4)
Median (Tartomány)	5,1 (1-18)	12,5 (1,5-59)
<b>Rizikócsoport (%)</b>		
Alacsony rizikójú, LR	96 (17,7)	-
Közepes rizikójú, MR	309 (56,9)	-
Magas rizikójú, HR	55 (10,1)	-
<b>Sejtmorfológiai alcsoport (%)</b>		
B-ALL	390 (71,8)	-
T-ALL	78 (14,4)	-
<b>Citogenetika</b>		
Hiperdiploiditás	79 (14,5)	-

LR: Low risk-alacsony, MR: Medium risk-közepes; HR: High risk-magas rizikójú csoport

A farmakogenetikai tanulmány célja az *ABCCI* gén polimorfizmusai és az antraciklinek szívkárosító mellékhatása közötti összefüggés vizsgálata volt. Jelen dolgozatban csak a legrelevánsabbnak bizonyult *ABCCI* rs3743527 polimorfizmust és a hozzá tartozó elemzést mutatom be.

A farmakogenetikai vizsgálat során adathiány, illetve kizáró klinikai okok miatt leszűkített betegpopulációt vizsgáltunk. A vizsgálatba nem kerültek bele azon betegek mintái, akiknél nem fejezték be, vagy nem megfelelően alkalmazták a protokollban leírtakat. További kizáró ok volt: a korai elhalálozás, bármilyen korábbi kemoterápiás kezelés, vagy bármilyen meglévő társbetegség, amely ismert módon befolyásolhatta a terápiás gyógyszerek hatását, farmakokinetikáját (pl.: veleszületett egyoldali vesehiány vagy Down-szindróma). Ezért az antraciklinek kardiotoxikus hatását 6 kórházból összegyűjtött 235 betegből álló populáción vizsgáltuk. A populáció adatait a **4. táblázat** tartalmazza.

Az antraciklin kezelés esetleges szívkárosító hatását különböző időpontokban mért szívultrahangos vizsgálattal ellenőrizték. A kezelési protokoll több ultrahangos vizsgálatot ír elő a betegek részére, mi ezek közül 3 időpont adatait elemeztük: 1. diagnóziskor, 2. záróvizsgálatkor, 3. utolsó követési időpontban (évenkénti kontroll).

A szívultrahangos vizsgálat mérőszáma a bal kamrai lineáris ejekciós frakció (linEF), amelyet az ultrahanggal mért bal kamrai végdiasztolés átmérőből (VDÁ) és a bal kamrai végszisztolés átmérőből (VSzÁ) határoztak meg és a mérési adatok alapján a következő képlet segítségével lehetett kiszámítani:  $\text{linEF}(\%) = (\text{VDÁ} - \text{VSzÁ}) / \text{VDÁ} * 100\%$ .

Az antraciklinekkel (doxorubicin, daunorubicin) történő kemoterápiás kezelés során a különböző rizikócsoportú betegeknél eltérő volt az antraciklinek adagolása. Az alacsony és közepes rizikójú betegeknél kismértékű (eltérő dózisszám; összesen 180-300 mg/m<sup>2</sup> antraciklin), míg a magas kockázatú betegeknél nagyobb fokú eltérés volt.

#### 4. táblázat: A farmakogenetikai vizsgálat során elemzett betegcsoport adatai

A betegek jellemzői		Vizsgált betegcsoport
A betegek száma (fő)		235
Nem (fő, %)	férfi	126 (54)
	nő	109 (46)
Életkor (átlag ± SD, terjedelem, év)		5,7 ± 3,8 (1,2-18,0)
Össz antraciklin dózis (terjedelem, mg/m <sup>2</sup> )	záróvizsgálatig kapott	120-360
	záróvizsgálatig kapott + együtt a relapszussal kezelték dózisaival	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, terjedelem;év)	záróvizsgálat	2,0 (0,7-3,4)
	utolsó szívultrahang	6,3 (2,4-13,7)

#### 4.1.2 KONTROLLOK

A kontroll perifériás vérminták véletlenszerűen kiválasztott egészséges véradóktól, illetve a Budai Gyermekkorház Ortopédiai és a Heim Pál Gyermekkorház Urológiai Osztályának járóbetegeitől származtak.

A kontroll csoport minden tagja az európai eredetű (kaukázusi) populációhoz és földrajzi régióhoz tartozik, továbbá egyiküknek sem volt korábban regisztrált gyermekkori ALL-je vagy más rákos megbetegedése.

## 4.2 DNS SZEPARÁLÁS

A DNS szeparálás célja a csírvonal genetikai vizsgálatára alkalmas DNS minta gyűjtése volt, ezért a DNS kivonása remisszióban lévő betegektől, retrospektív módon, EDTA-s csőbe gyűjtött, perifériás vérmintákból történt. A leukémiás betegek genomiális DNS-ének izolálása QIAmp DNA Blood Midi/Maxi Kittel (Qiagen, Hilden, Németország), míg a kontrolloké az iPrep Purification készülék segítségével és a hozzá tartozó iPrep PureLink gDNA Blood Kittel (Invitrogen, Life Technologies, Grand Island, USA) történt, a gyártók által előírt protokollok alapján.

A QIAmp DNA Blood Midi és Maxi Kit DNS izolálási lépései lényegében megegyeznek, a különbség a kiindulási vérmennyiségben (Midi:0,3-2,0 ml, Maxi: 3-10 ml) és az egyes lépésekben ezzel arányos vegyszerfelhasználásban volt.

Az Intézet biobankjába érkező vérminták átlagosan 2-3 ml vért tartalmaztak, így a 2 ml kiindulási vérmennyiségre vonatkozó DNS kivonási lépéseket ismertetem.

A 2 ml vérmintához (ha kicsit kevesebb lenne, PBS oldattal kiegészítjük) 200 µl Proteináz K oldat hozzáadása szükséges, majd az alapos összerázás után 2,4 ml AL pufferrel kell összeforgatni. A lizátumhoz 10 perces 70 °C-os inkubálás után 2ml 96%-os etanolt kellett hozzáadni és szintén jól összerázni, majd az oszlopra felvinni. Az elegyet több lépésben 3 percig 300 rpm sebességgel kell centrifugálni, a lecentrifugált részt (filtrátumot, alsó folyadék részt) mindig elöntve. Ezt követte az oszlop két lépcsős, 2-2 ml AW1 és AW2 mosópufferral történő mosása. A mosási lépés hatékonyságát az 1, majd 15 perces 5000 rpm sebességű centrifugálás növelte. Ezután következett az oszlopon maradt DNS leoldása, amit 300 µl a gyártó által előírt ún. AE pufferrel, vagy desztillált vízzel végezhetünk el. Az oszlop 5 perces szobahőmérsékleten történő „pihentetése” után, 5000 rpm sebességgel történő 2 perces centrifugálási lépés következett. A maximális hozam érdekében még egyszer ajánlatos elvégezni az utolsó lépést. A DNS minta koncentrációja és tisztasága ezután NanoDrop® ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, USA) készülékkel határozható meg.

Az iPrep PureLink gDNA Blood Kittel történő DNS izolálás egy mágneses ágy segítségével történt. Ez egy automatizált rendszer, amiben még a vegyszerek is

pontosan mintánként kimérve, előrecsomagolva találhatók. A készülékkel egyszerre 350 µl kiindulási térfogatú, 1-13 különböző minta dolgozható fel.

#### 4.3 A VIZSGÁLT GÉNEK ÉS GENETIKAI ELTÉRÉSEK KIVÁLASZTÁSA

A vizsgálat tárgyát képező géneket és azok polimorfizmusait a releváns tudományos irodalom, illetve a különböző genetikai adatbázisokban történő keresés eredményei alapján állítottam össze.

A polimorfizmusok kiválasztása során először a jelölt gén asszociációs (CGAS) és teljes genom szintű vizsgálatok (GWAS) eredményeit néztem át, amelyek segítségével már komplex, átfogó képet kaptam az akut limfoid leukémiához kapcsolódó és vizsgált genetikai eltérésekről. A kevésbé ismert, a terület újonnan felfedezett polimorfizmusairól az esettanulmányok, mint tudományos közlemények alapján tájékozódtam, továbbá a genetikai adatbázisok segítségével választottam ki őket. A **HapMap** adatbázis (International HapMap Project <http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/> elérhető: 2013.08.28.) segítségével lehetett felmérni az adott polimorfizmus előfordulási gyakoriságát európai eredetű populációban, azaz, hogy mely polimorfizmusokat érdemes vizsgálni a magyar populáción belül is. Az adatbázison keresztül töltöttem le a kiválasztott génben megtalálható összes polimorfizmus listáját (release #28 HapMap Genome Browser). A polimorfizmusok szerepét, funkcióját az **OMIM®** (Online Mendelian Inheritance in Man, McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University Baltimore, MD <http://omim.org/> elérhető: 2013.08.28.), a **Genecards** (The Human Gene Compendium, The Crown Human Genomics Center and the Bioinformatics Unit of the Weizmann Institute of Science in Rehovot, Israel <http://www.genecards.org/> elérhető: 2013.08.28.), a **dbSNP** (U.S. National Library of Medicine, National Institute of Health public Single Nucleotide Polymorphism Database, 8600 Rockville Pike, Bethesda, MD 20894 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/> elérhető: 2013.08.28.), az **UCSC Genome Browser** (Genome Bioinformatics Group, Center for Biomolecular Science and Engineering, University of California Santa Cruz <http://genome.ucsc.edu/> elérhető: 2013.08.28.), és a **SNP Finder** (Alberto Riva © 2006-2011, University of Florida <http://snpper.chip.org> elérhető: 2013.08.28.) adatbázisokban ellenőriztem.

A HaploView 4.2 programmal vizsgáltam az SNP-k közötti kapcsoltsági viszonyokat, az ún. haplotípusokat (haplotípus = lókus, - itt egy kromoszómán lévő



polimorfizmusok - együtt öröklődő allélkombinációja). Erre azért volt szükség, mert több egymással genetikai kapcsoltságban lévő polimorfizmus közül elegendő az adott haplotípusblokkban csak egy vagy néhány polimorfizmus (tagSNP) vizsgálata egy adott összefüggés kimutatásához. A szoftver az adott markerek közötti kapcsoltsági viszony számszerűsítésére az ún. kapcsolt egyensúlytalanság (linkage disequilibrium, LD) standardizált ( $D'$ ) és a korrelációs koefficiens ( $r^2$ ) értékét adta meg. Egy populációban vizsgált két marker kapcsolt egyensúlytalanságban van (LD), ha a két marker egyik alléljának a másik marker alléljával való előfordulási valószínűsége nagyobb, mint a várható véletlenszerű előfordulásuk (172).

Amennyiben a két polimorfizmus közötti kapcsoltsági viszonyt jellemző  $D'$  (vagy  $r^2$ ) érték 0, ez azt jelenti, hogy a két allél egymástól függetlenül öröklődik (egyensúlyban vannak), míg, ha a koefficiens értéke 1-hez közeli, az erős kapcsoltságot jelent (1= teljes egyensúlytalanság).

A kapcsoltsági viszonyok alapján történő szűrés, így egyrészt a kísérlettervezés idő- és költséghatékonysága miatt volt fontos, másrészt pedig a polimorfizmusokat egyfajta „kontrollként” alkalmazva, - egy haplotípusblokkon belüli genotipizálásukkal - megerősíthetőek voltak a feltárt összefüggések.

A szakirodalom és az adatbázisok alapján történő szűrés után az SNP-eket feltételezett funkciójuk szerint választottam ki a következő sorrend alapján: 1. aminosavcserét okozó – nem szinonim/missense, 2. promoter, 3. 3'-UTR, 4. aminosavcserét nem okozó – szinonim/coding-synon, 4.intron. A vizsgált SNP-k listáját és tulajdonságait az **5. táblázat** foglalja össze.

A statisztikai elemezhetőség feltétele volt továbbá a (10 – 90)% közötti minor allél frekvencia (MAF) is. Ez a határ biztosította a ritka homozigóta és heterozigóta egyének várhatóan megfelelő gyakoriságát az általunk vizsgált európai eredetű populációban.

A farmakogenetikai vizsgálat (IV.) polimorfizmusainak kiválasztásánál a fenti, általános szűrési szempontok mellett továbbiakat is figyelembe kellett venni:

- a kiválasztott polimorfizmusokkal az antraciklinek kardiotoxicitásának vizsgálatában fontos szerepet játszó *ABCCI* gént szerettük volna átfogóan tanulmányozni a kapcsoltsági adatok figyelembevételével

- minden kiválasztott SNP-nél a mérendő szekvenciában a használt genotipizálási módszer igényei miatt, 40-65% között lehetett a guanin és citozin nukleotidok aránya (túl alacsony GC arány esetén a primer kötődése a DNS-hez nem stabil, magas GC arány esetén pedig erősebb a kötődés a DNS más, kevésbé komplementer részeihez)
- a vizsgált régióban meglévő ismétlődő szekvenciákat jelölni kellett
- primer tervezéshez a Beckman Coulter Autoprimer szoftvert (<http://www.autoprimer.com>, elérhető: 2013.08.28.) használtuk

Az I. jelölt gén asszociációs vizsgálatban 3 gén 3 polimorfizmusát elemeztem. A *GSTM1* és *GSTT1* gének esetében a gén teljes deléciójából (null polimorfizmus) következő aktív illetve inaktív, míg a *CCR5* gén esetében a gén egy adott szakaszának deléciójából eredő aktív és frameshiftet okozó variánsait genotipizáltam a rendelkezésre álló populációban.

A II. és a III. jelölt gén asszociációs vizsgálat polimorfizmusait az alábbi szempontok szerint válogattam össze: II. csoportba a leukémiára való hajlamban, mint a DNS szintézist, javító mechanizmusokat befolyásoló főbb gének és variánsaik, míg a III. csoportba a folát anyagcserében, transzportjában direkt vagy indirekt módon szerepet játszó polimorfizmusok kerültek. A II. esetben 1072 mintán 18 kandidáns gén, 62 SNP-jét, míg a III. esetben ugyanezen a populáción 15, a folát metabolizmusban meghatározó szerepet betöltő gén 64 egy pontos nukleotid polimorfizmusát elemeztem. A hajlamosító tényezők és a GST, mint gyökfogó molekulacsalád génvariánsai mellett kíváncsiak voltunk a folsav anyagcseréhez is kapcsolódó, az ALL-es gyermekek kemoterápiás kezelésénél alkalmazott antraciklinek farmakogenetikáját befolyásoló tényezőkre is. Jelen dolgozatban az *ABCC1* transzportfehérjét kódoló *ABCC1* gén 9 polimorfizmusának farmakogenetikai vonatkozását vizsgáltam.

5. táblázat: A I., II., III., IV. vizsgálatok génpolimorfizmusainak listája

SNP(rs#)	Gén	Allél (1/2) <sup>a</sup>	Pozíció <sup>b</sup>	Funkció
<b>I. jelölt gén asszociációs vizsgálat</b>				
null	<i>GSTMI<sup>c</sup></i>	+/-	chr1p13.3	aktív/inaktív (null)
null	<i>GSTT1<sup>c</sup></i>	+/-	chr22q11.23	aktív/inaktív (null)
rs333 (delta32)	<i>CCR5<sup>d</sup></i>	+/-	chr3:46414947-46414978	frameshift
<b>II. jelölt gén asszociációs vizsgálat</b>				
rs2066853	<i>AHR</i>	G/A	chr7:17345635	missense, Arg>Lys
rs713150*		C/G	chr7:17306682	intron
rs2282885		T/C	chr7:17312139	intron
rs2282883		G/A	chr7:17322872	intron
rs2237297		C/T	chr7:17326119	intron
rs10994982*	<i>ARID5B</i>	A/G	chr10:63380110	intron
rs10821936		T/C	chr10:63393583	intron
rs7089424		T/G	chr10:63422165	intron
rs4948502		T/C	chr10:63509423	intron
rs4948496		T/C	chr10:63475623	intron
rs4948487		A/C	chr10:63339871	intron
rs4506592		G/A	chr10:63397193	intron
rs4509706		T/C	chr10:63331346	promoter
rs3817074	<i>BAX</i>	C/T	chr19:54151024	intron
rs7259013		A/C	chr19:54155096	intron
rs11667351		T/G	chr19:54147966	promoter

SNP(rs#)	Gén	Allél (1/2) <sup>a</sup>	Pozíció <sup>b</sup>	Funkció
<b>II. jelölt gén asszociációs vizsgálat</b>				
rs12457893	<i>BCL2A</i>	A/C	chr18:59077141	intron
rs11876772		A/G	chr18:58968686	intron
rs2850761		A/G	chr18:59117377	intron
rs8092560		T/A	chr18:58954673	intron
rs4987845		G/A	chr18:58946168	3'UTR
rs1801018	<i>BCL2B</i>	A/G	chr18:59136859	coding-synon, Thr>Thr
rs1893806		T/G	chr18:59135944	3'UTR
rs1799988	<i>CCR5</i>	C/T	chr3:46387263	promoter
rs3087253		T/C	chr3:46393693	3'UTR
rs11575815		T/A	chr3:46395174	ismeretlen
rs10403561	<i>CEBPA</i>	A/G	chr19:38482342	3'UTR
rs874966		A/G	chr19:38481237	3'UTR
rs2239633		C/T	chr14:22658897	promoter
rs8015478		C/A	chr14:22655858	3'UTR
rs12434881		G/A	chr14:22658482	promoter
rs11978267	<i>IKZF1</i>	A/G	chr7:50433798	intron
rs4132601		T/G	chr7:50438098	3'UTR
rs6954833		A/G	chr7:50425940	intron
rs10235796		C/T	chr7:50430131	intron
rs6964969		A/G	chr7:50440745	3'UTR
rs11208538**	<i>JAK1</i>	G/C	chr1:65161877	intron
rs310225		G/A	chr1:65097271	intron
rs12063205		A/G	chr1:65144640	intron
rs3212713	<i>JAK3</i>	G/A	chr19:17816001	intron
rs11888		T/C	chr19:17796626	3'UTR
rs2229974	<i>NOTCH1</i>	T/C	chr9:138511457	coding-synon, Asp>Asp
rs3124596		A/G	chr9:138521325	intron
rs3124999		C/T	chr9:138515294	intron
rs3124603		T/C	chr9:138529998	intron
rs1800566	<i>NQO1</i>	C/T	chr16:68302646	missense, Pro>Ser
rs1469908		A/G	chr16:68321913	ismeretlen

SNP(rs#)	Gén	Allél (1/2) <sup>a</sup>	Pozíció <sup>b</sup>	Funkció
<b>II. jelölt gén asszociációs vizsgálat</b>				
rs1143684	<i>NQO2</i>	T/C	chr6:2955389	missense, Leu>Phe
rs2756075		C/T	chr6:2949532	intron
rs4149352		C/T	chr6:2947237	intron
rs2070999		G/A	chr6:2944728	promoter
rs4149360*		G/A	chr6:2951806	intron
rs2030171	<i>STAT1</i>	G/A	chr2:191577408	intron
rs10208033		T/C	chr2:191587662	promoter
rs3088307		G/C	chr2:191537657	3'UTR
rs12949918	<i>STAT3</i>	T/C	chr17:37779799	intron
rs3809758		G/A	chr17:37725506	intron
rs3816769		T/C	chr17:37751799	intron
rs17405722		G/A	chr17:37796027	promoter
rs7217728	<i>STAT5A</i>	T/C	chr17:37700927	intron
rs3198502		G/T	chr17:37716520	3'UTR
rs9906933	<i>STAT5B</i>	G/A	chr17:37663571	intron
rs4029774		A/G	chr17:37682487	promoter
rs703817	<i>STAT6</i>	G/A	chr12:55776095	3'UTR
rs3024979		T/A	chr12:55774560	intron
rs324015		G/A	chr12:55776367	3'UTR
<b>III. jelölt gén asszociációs vizsgálat</b>				
rs10280101	<i>ABCBI</i>	A/C	chr7:86991521	intron
rs1202179		A/G	chr7:87042215	intron
rs2235013		G/A	chr7:87016562	intron
rs9282564		A/G	chr7:87067376	missense, Asn>Asp
rs11742668	<i>DHFR</i>	T/C	chr5:79975660	intron
rs1222809		T/C	chr5:79953273	ismeretlen
rs12517451		C/T	chr5:79955829	3'UTR
rs1478834		C/A	chr5:79985331	intron
rs1650723		G/A	chr5:79957786	3'UTR
rs1677626		G/C	chr5:79985201	intron
rs10106	<i>FPGS</i>	A/G	chr9:129615896	3'UTR
rs1544105		G/A	chr9:129602546	ismeretlen
rs4451422		A/C	chr9:129616418	3'UTR
rs10957267	<i>GGH</i>	T/A	chr8:64106805	intron
rs11545078		C/T	chr8:64101318	missense, Thr>Ile
rs3780127		C/T	chr8:64103693	intron
rs719235		G/T	chr8:64114235	promoter

SNP(rs#)	Gén	Allél (1/2) <sup>a</sup>	Pozíció <sup>b</sup>	Funkció
<b>III. jelölt gén asszociációs vizsgálat</b>				
rs1695	<i>GSTP1</i>	A/G	chr11:67109265	missense, Ile>Val
rs749174		C/T	chr11:67109829	intron
rs7941395		A/G	chr11:67103993	ismeretlen
rs1076991	<i>MTHFD1</i>	A/G	chr14:63924794	promoter
rs1950902		C/T	chr14:63952133	missense, Lys>Arg
rs2236225		C/T	chr14:63978598	missense, Arg>Gln
rs745686		A/G	chr14:64000385	promoter
rs13306561	<i>MTHFR</i>	T/C	chr1:11788391	intron
rs1801131		A/C	chr1:11777063	missense, Glu>Ala
rs1801133		C/T	chr1:11778965	missense, Ala>Val
rs10380	<i>MTRR</i>	C/T	chr5:7950191	missense, His>Tyr
rs1532268		G/A	chr5:7931179	missense, Ser>Leu
rs162036		A/G	chr5:7938959	missense, Lys>Arg
rs1801394		G/A	chr5:7923973	missense, Ile>Met
rs2966952		C/T	chr5:7921030	promoter
rs326120		A/G	chr5:7927847	intron
rs3776455		A/G	chr5:7949511	intron
rs10925257	<i>MTR</i>	A/G	chr1:235112783	intron
rs12759827		A/G	chr1:235038809	intron
rs1805087		A/G	chr1:235115123	missense, Asp>Gly
rs2853523		C/A	chr1:235128821	3'UTR
rs3768142		T/G	chr1:235095187	intron
rs4659724		G/A	chr1:235040747	intron
rs1979277	<i>SHMT1</i>	G/A	chr17:18172821	missense, Leu>Phe
rs643333		C/A	chr17:18207764	promoter
rs9909104		T/C	chr17:18188746	intron
rs1051266	<i>SLC19A1<sup>e</sup></i>	G/A	chr21:45782222	missense, His>Arg
rs4819128		T/C	chr21:45774077	intron
rs7499		G/A	chr21:45756756	3'UTR

SNP(rs#)	Gén	Allél (1/2) <sup>a</sup>	Pozíció <sup>b</sup>	Funkció
<b>III. jelölt gén asszociációs vizsgálat</b>				
rs2276299	<i>SLC22A8</i>	A/T	chr11:62523007	coding-synon, Thr>Thr
rs3809069		T/C	chr11:62540348	promoter
rs4149183		T/C	chr11:62522445	intron
rs10841769	<i>SLCO1B1<sup>f</sup></i>	G/A	chr12:21286286	ismeretlen
rs11045818		G/A	chr12:21221028	coding-synon, Ser>Ser
rs11045819		C/A	chr12:21221080	missense, Pro>Thr
rs11045823		G/A	chr12:21225012	intron
rs17328763		T/C	chr12:21173837	promoter
rs4149056		T/C	chr12:21222816	missense, Val>Ala
rs4363657		T/C	chr12:21259989	intron
rs2518463		<i>TPMT</i>	C/T	chr6:18251748
rs2842951	C/T		chr6:18243662	intron
rs4449636	A/G		chr6:18255998	intron
rs1004474	<i>TYMS</i>	A/G	chr18:650383	intron
rs2612100		G/A	chr18:662363	intron
rs2853533		G/C	chr18:648064	intron
rs2853741		C/T	chr18:647352	promoter
rs9967368		G/C	chr18:646020	promoter
<b>IV. Farmakogenetikai vizsgálat</b>				
rs3743527	<i>ABCC1</i>	C/T	chr16:16143182	3'UTR
rs215060		A/G	chr16:15984788	intron
rs246219		C/T	chr16:15993136	intron
rs246221		T/C	chr16:16045823	coding-synon, Val>Val
rs45511401		G/T	chr16:16080733	coding-synon, Gly>Val
rs4148358		C/T	chr16:16094676	intron
rs11864374		A/G	chr16:16109386	intron
rs6416666		A/G	chr16:16121463	intron
rs212097		A/G	chr16:16151630	3' UTR

<sup>a</sup>Allél a forward szálon; 1- gyakori(vad) allél; 2-ritka(mutáns) allél; <sup>b</sup>Pozíció az NCBI Genome Build 36.0 alapján; <sup>c</sup>GSTM1 és GSTT1 null polimorfizmus a gén teljes delécióját jelenti; <sup>d</sup>CCR5 delta32 polimorfizmus leolvasási keret eltolódást (frameshift) okoz; +/- = inzerció/deléció; a deletálódó szakasz: GTCAGTATCAATTCTGGAAGAATTTCCAGACA; <sup>e</sup>RFC=SLC19A1, <sup>f</sup>SLCO1B1=SLC21A6

\*Sikertelen genotipizálás, elemzésből kizárva

\*\*Monomorf, elemzésből kizárva

#### 4.4 A VIZSGÁLT GÉNEK ÉS GENETIKAI ELTÉRÉSEK GENOTIPIZÁLÁSA

##### 4.4.1 KLASSZIKUS MULTIPLEX PCR REAKCIÓVAL TÖRTÉNŐ GENOTIPIZÁLÁS

A *GSTT1* és *GSTM1* gének null, valamint a *CCR5* gén delta32 polimorfizmusának genotipizálását klasszikus PCR-t követő gélelektroforézissel végeztem el.

A PCR reakcióhoz felhasznált anyagok és maga a reakcióparaméterek is igen hasonlóak voltak a *GST* gének és *CCR5* null illetve delta32 génpolimorfizmusának vizsgálatakor. A PCR reakció során a szekvenciaspecifikus primer párok (forward és reverse) és a kontroll reakció esetében voltak különbségek. A kontroll PCR reakció *GSTT1* esetén az *APO-V*, a *GSTM1* esetén pedig maga a *CCR5* gén volt.

A PCR reakció működésének alapja a megfelelő ún. master mix elegy. Az egy mintára vonatkozó, azaz 1x-es master mix 36 µl RNáz mentes desztillált vízből (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, USA), 5 µl, MgCl<sub>2</sub>-ot is tartalmazó 10x-es koncentrációjú PCR pufferből (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, USA), 2mM-os dNTP mixből (Qiagen, Hilden, Németország), 1-1 µl 15-15 pmol/µl primermixből (10-10 µl 150 pmol/µl *GSTT1* vagy *GSTM1* forward és reverse primerek (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, USA) és 80 µl desztillált víz, valamint 10-10 µl 150 pmol/µl kontroll *APOA-V* (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, USA) + 80 µl desztillált víz és 7,5-7,5 µl 200 pmol/µl *CCR5* forward és reverse primerek (Gibco BRL, Life Technologies, Carlsbad, USA) 85 µl desztillált víz; lsd. **6. táblázat**) és 0,5 µl DyNAzyme-ból (Thermo Scientific, Wilmington, USA) állt. A teljes kb. 50 µl-nyi reakcióelegy egy mintára vonatkoztatva így 48,5 µl master mixből és 2 µl DNS mintából állt.

A PCR készülék (Esco Swift<sup>TM</sup> Maxi Thermal Cycler, Hartboro, USA) hőmérséklet programjának lefutása az alábbi beállítás szerint történt: 94°C – 4 perc, 35x (95°C – 30 másodperc, 53°C – 1 perc, 72°C – 30 másodperc), 72°C – 5 perc, 4°C – hűtés. A 35 ciklus 109 perc alatt futott le.

A PCR reakciót, tehát a kívánt génszakasz felszorzását, a PCR termékek elválasztása, azaz gélelektroforézis követte.



A gélfuttatás előtt el kellett készíteni magát a gélt, ami 1,2g agaróz gél porból (Sigma Aldrich, St.Louis, USA) állítottam össze 0,5x-es TBE (Sigma Aldrich, St.Louis, USA)-vel 40g-ra kiegészítve.

A futtatáshoz szükséges volt a PCR termék megfestése: a 10 µl PCR termékhez 2 µl ficollal hígított brómfenolkékből és xilencianolból álló festéket adtam hozzá, majd a megfelelő beállítási paraméterek (U=120 V, I= 300 mA) mellett elindítottam a gélelektroforézist.

A gélfuttatás 0,5x-es TBE-pufferben történt kb. 30-35 perc alatt. A futtatáshoz használt géleket etidium-bromidos puffer (Sigma Aldrich, St.Louis, USA) oldatban áztattam a következő felhasználásig legkevesebb egy éjszakán át.

#### 6. táblázat: A klasszikus multiplex PCR reakció primerszekvenciái

Gén	Primer szekvencia	Kiindulási koncentráció (pmol/ml)
GSTT1-Forward	TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC	150
GSTT1-Reverse	TCACCGGATCATGGCCAGCA	150
APO-V-Forward	GATTGATTCAAGATGCATTTAGGAC	150
APO-V-Reverse	CCCCAGGAACTGGAGCGAAATT	150
GSTM1-Forward	GAACTCCCTGAAAAGCTAAAGC	150
GSTM1-Reverse	GTTGGGTCAAATATACGGTGG	150
CCR5-Forward	CTTCATTACACCTGCAGCTCTCA	200
CCR5-Reverse	CACAGCCCTGTGCCTCTTCTTCTCA	200

#### 4.4.2 SEQUENOM IPLEX GOLD MASSARRAY TECHNIKÁVAL TÖRTÉNŐ GENOTIPIZÁLÁS

Az II. és III. jelölt génasszociációs vizsgálathoz kiválasztott összesen 141 génpolimorfizmus genotipizálása, Sequenom iPLEX Gold MassARRAY technikával történt a kanadai McGill Egyetem és Génome Québec Innovációs Központban.

A módszer a nagy specificitású és érzékeny tömegspektrometriás detektálással történő multiplex PCR reakción alapszik.

A genotipizálás első lépése a kísérlet (assay) megtervezése volt, tehát a szükséges PCR és extenziós primerpárok tervezése a mintaszám és a meghatározni kívánt markerek függvényében. A multiplex PCR-t (amplifikációs lépés) követően a nem kötődött, feleslegben lévő dNTP molekulákat defoszforilálják a SAP (Shrimp Alkaline

Phosphatase) enzimmel, hogy elkerüljék a tömegspektrumon megjelenő álsúcsok keletkezését. Ezek után egy „templát (minta) – irányította” egy bázispárnyi extenziós (SBE) lánctermináció megy végbe a próba felhasználásával (iPlex reakció). Az így kapott mintát egy ún. SpectroCHIP® bioarray-re viszik át, amin a reakciótermékek (PCR) elválasztása és detektálása történik egy mátrix közvetítésével végzett lézer deszorpciós ionizációs tömegspektrometriai (MALD-TOF MS) technikával az egyes nukleotidok eltérő tömege alapján. Az így kapott tömegspektrumot egy előhívó szoftver dolgozza fel és alakítja át a számunkra is értelmezhető genotípus információvá.

A DNS minták genotipizálási feltétele a 30 µl-nyi térfogat és 20 µg/ul-es és koncentráció volt, így a mintabankból összesen 1193 ALL-es és kontroll mintát lehetett genotipizáltatni.

A kiértékelés során összesen 1072 minta (543 ALL és 529 Kontroll) genotípusát és klinikai adatait használtam fel. A statisztikai analízisből ki kellett zárnom a sikertelen genotipizálású, a monomorf genotípusú, és a 10%-nál nagyobb genotípus hiánnyal rendelkező mintákat, így végül a 141 SNP-ből 126 SNP-t elemzését tudtam elvégezni.

#### **4.4.3 GENOMELAB SNPSTREAM RENDSZERREL TÖRTÉNŐ GENOTIPIZÁLÁS**

A farmakogenetikai vizsgálat során az *ABCC1* gén 9 polimorfizmusának (rs215060, rs246219, rs246221, rs45511401, rs4148358, rs11864374, rs6416666, rs3743527, rs212097) genotipizálását GenomeLab SNPstream (Beckman Coulter, Brea, USA) rendszerrel végeztük el, azonban a dolgozatban a legrelevánsabb rs3743527 polimorfizmus adatai és eredményei kerülnek csak bemutatásra.

A mérés több lépésből állt: 1. PCR reakció, 2. tisztítás, 3. primer extenzió, 4. hibridizáció, 5. lézeres plate leolvasás.

A PCR reakciókat 384-es plate-en (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) a PKGD PTC 0220 DNA Engine Dyad (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) PCR készülék segítségével végeztük. Az első lépésben egy multiplex PCR reakció megy végbe, mely során egy mintán, egyidőben 48 egyponos nukleotid polimorfizmus lemerését végeztük, a vizsgált SNP-t tartalmazó génszakaszt amplifikáltuk. Az 5µl végtérfogatú reakcióhoz szükséges volt 5mM MgCl<sub>2</sub> (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, USA), 1x-es koncentrációban PCR puffer II (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, USA), 90-90 µM a négyféle dNTP-ből (Invitrogen, Life

Technologies, Carlsbad, USA), 50-50 nM a két PCR primerből (**7. táblázat**), 0,5 unit AmpliTaq Gold polimeráz (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, USA) és 20ng genomiális DNS. A PCR reakcióhoz az alábbi hőmérséklet programot használtuk: 94 °C 1 perc (kezdeti denaturáció), majd 40 cikluson keresztül 94 °C 30 másodperc, 55 °C 30 másodperc és 72 °C 1 perc. Ezután következett a PCR termék megtisztítása, 3 µl exonukleáz I és SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase) enzimet tartalmazó ún. SBE Cleanup reagens (Beckman Coulter, Brea, USA) hozzáadásával. Az elegyet 30 percig inkubáltuk 37 °C-on, majd 10 percig 96 °C-on tartva inaktívtuk az enzimeket. Az egy bázispárnyi primer extenzió során (**7. táblázat**), az extenziós primer 3' végével a vizsgált SNP előtti nukleotidig illeszkedik a PCR templátra. Ide épülnek be a fluoreszcensen (TAMRA: 6-karboxi-tetrametil-rodamin, ill. Bodipy-fluoreszcein) jelölt didezoxi-nukleotidok (dNTP) a polimorf helyen levő allélnak megfelelően.

Minden mintához 7µl extenziós reakcióelegyet (3,76µl Beckman Coulter SNPware extenziós puffer, 0,2 µl SNPware extenziós mix – ami tartalmazza a jelölt didezoxi-nukleotidokat, 2,97µl ultrapure DNáz/RNáz mentes desztillált víz (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, USA), 0,02µl Beckman Coulter SNPware DNS polimeráz és az 5-5µM extenziós primer (Beckman Coulter, Brea, USA)) adtunk, majd az extenziós PCR reakciót az alábbi program szerint futtatuk le: 96 °C 3 perc, 46 cikluson keresztül 94 °C 20 másodperc, 40 °C 11 másodperc.

A hibridizációs lépés előkészítéseként a 384-lyukú SNPware plate-et (Beckman Coulter, Brea, USA), - ami már gyárilag tartalmazta a 48 db extenziós primer 5' végével komplementer oligonukleotidokat - aktiváltuk 1x-es koncentrációjú SNPware előmosó puffer 1-gyel (Beckman Coulter, Brea, USA). Hibridizációkor az extenziós termékhez 8µl hibridizációs mixet (7,56µl Beckman Coulter SNPware Hybridization Solution hibridizációs oldat és 0,44 µl SNPware Hybridization Additive) adtunk. Ebből az elegyből 20µl-nyit vittünk át a már előzőleg előmosással aktivált SNPware lemezre (Beckman Coulter, Brea, USA), amit 100%-os páratartalom mellett inkubáltunk 2 óráig 42 °C-on. Ezzel a lépéssel történt meg a jelölt extenziós primerek hibridizációja a platen immobilizált komplementer oligonukleotidokhoz. A reakcióhoz feleslegben hozzáadott és így nem kötődött primereket 1x koncentrációjú SNPware mosó puffer 2-vel (Beckman Coulter, Brea, USA) mostuk le.

A lemezt ezután a minták fluoreszcenciáját mérő, két lézert tartalmazó Beckman Coulter GenomeLab SNPStream Imager készülékkel (Beckman Coulter, Brea, USA) olvastuk le és a hozzá tartozó szoftverrel, a két fluoreszcens festék aránya alapján állapítottuk meg az egyes polimorfizmusok genotípusait.

**7. táblázat: Az *ABCCI* rs3743527 polimorfizmusának genotipizálásához használt primerszekvenciák**

SNP	Primer*	Szekvencia
rs3743527	PCR primer 1	TTCATTCCTTGGGGCTG
	PCR primer 2	AAGACCAGATGTTGGTAAGAGG
	extenziós primer	ACGTAAGACCACTCAAGACCTCCAGGGCCCTGGG ACACTGCCAAG

\*Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, USA

**4.5 A KIVÁLASZTOTT POLIMORFIZMUSOK TÚLÉLÉSRE GYAKOROLT HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA A BETEGPOPULÁCIÓBAN**

A terápia hatékonyságának egyik mérőszáma a túlélési ráta meghatározása. A betegek 5-éves össz-, és eseménymentes túlélését is vizsgáltam a Magyar Gyermekek Tumor Regiszter legfrissebb adatai alapján. A tanulmányba bevont ALL-es populáció (543 fő) – amely a II. és III. vizsgálat betegeit tartalmazza elsősorban, átfedve az I. és IV. vizsgálatával - egy szűkebb csoportjának (516, 95%) adatait tudtam elemezni. Ennek oka, hogy a retrospektív vizsgálat miatt a terápiára rezisztenssé váló, vagy egy fellépő fertőzés, illetve gyógyszer toxicitás miatt elhalálozott betegek adatait nem tudtam felhasználni.

Az adatok elemzését Kaplan-Meier módszerrel, IBM SPSS 21.0 statisztikai szoftver segítségével végeztem. Log-rank teszttel a túlélés és a kategorizált paraméterek, úgy, mint rizikócsoporthoz, nem, alkalmazott protokoll típus, immunfenotípus közötti asszociációt vizsgáltam.

**4.6 STATISZTIKAI ELEMZŐ MÓDSZEREK**

**4.6.1 FREKVENTISTA ALAPÚ STATISZTIKA**

A Hardy-Weinberg egyensúlyt (HWE)  $\chi^2$  teszttel ellenőriztem egy online program (<http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>) segítségével. A további statisztikai elemzésbe csak azok az SNP kerültek bele, amelyek teljesítették a Hardy-Weinberg egyensúlyt.

Az első három eset-kontroll tanulmánynál nemmel korrigált logisztikus regressziós analízist alkalmaztam a polimorfizmusok és a betegség, azaz az akut limfoid leukémia közötti asszociáció vizsgálatára. A teljes leukémiás populáció mellett, a különböző klinikai alcsoportok (B-, T-sejtes, hiperdiploid ALL) adatait külön is elemeztem.

A genotípus frekvenciák összehasonlítását és az allélhordozás (allél pozitivitást) értékét minden SNP-re az IBM SPSS 21.0 statisztikai programmal végeztem.

Az allélfrekvenciák közötti eltérés szignifikancia értékét (p) és az esélyhányadosokat (OR-odds ratio) a MedCalc 12.4.0 program segítségével számoltam.

A statisztikai számolásokat 95%-os konfidencia intervallum mellett végeztem.

A kapcsoltsági egyenlőtlenség és a haplotípusok vizsgálatát a Haploview 4.2 programmal végeztem, a hozzájuk tartozó esélyhányadosokat pedig MedCalc 12.4.0 programmal számoltam.

A II. és III. jelölt gén asszociációs vizsgálatban a számos statisztikai összehasonlítás miatt szükséges volt az eredmények többszörös tesztelési korrekciója, amelyet a Benjamini-Hochberg – féle hamis elfogadási arány (FDR-false discovery rate) számolásának módszerével végeztem  $\alpha=1\%$ -os ( $p \leq 3,42 \cdot 10^{-4}$ ) és  $\alpha=5\%$ -os ( $p \leq 1,21 \cdot 10^{-3}$ ) elsőfajú hiba határ (FDR( $\alpha$ )) mellett (173, 174). Az FDR( $\alpha$ ) határérték a vizsgált populációra specifikus, azaz függ a legnagyobb elfogadott „p” értéktől, az összehasonlítások számától, és az összes legnagyobb „p” érték alatti szignifikáns „p” értékek számától.

Ezekből következően az asszociációs vizsgálatokban az  $FDR(\alpha) \leq p \leq 0,05$  szignifikancia értékek nominálisan szignifikánsnak tekinthetők.

A többszörös tesztelés miatt szintén korrigált statisztikai erő (power) számolását R programmal végezte a Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem Méréstechnika és Információs Rendszerek Tanszékén, dr. Antal Péter kutatócsoportja, a Purcell és Sham genetikai power kalkulátorának (175) egy saját fejlesztésű verziójával. A powert minden SNP-hez tartozó allélfrekvencia és OR értékre is megadtuk (167), továbbá az összes frekventista statisztikai modellre (additív, recesszív, domináns), alpopulációra és a genotípusok relatív rizikójára vonatkoztatott, általános powert is számoltunk (167).

A farmakogenetikai vizsgálat statisztikai értékeléséhez többszörösen illesztett általánosított lineáris modellt (GLM - generalized linear model) alkalmaztunk.

Folytonos változónak tekintettük a kezelt lineáris ejekciós frakcióval meghatározott szívfunkció értékét. A többváltozós modellben a folytonos változó mellett kofaktorok bevonásával is elemeztük az adatokat. Ilyen kofaktorok voltak a nem, diagnóziskori életkor, kezelő kórház, össz-antraciklin dózis, dexrazoxán-használat és kemoterápiás protokoll.

A többszörös összehasonlítás miatt Bonferroni-korrekciót alkalmaztunk, azaz a „p” értéket az SNP-k számával korrigáltuk, így az eredményeket a  $p < 0,0055$  határ alatt fogadtuk el szignifikánsnak.

#### **4.6.2 BAYES-HÁLÓ ALAPÚ BAYES-I TÖBBSZINTŰ RELEVANCIA ANALÍZIS STATISZTIKA**

A bayes-i statisztikai számításokat a Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem Méréstechnika és Információs Rendszerek Tanszékén, dr. Antal Péter kutatócsoportja végezte a két csoport által közösen kidolgozott Bayes-háló alapú bayes-i többszintű relevancia analízis (BN-BMLA - Bayesian network based Bayesian multilevel analysis of relevance) módszerével.

A módszerrel csak diszkrét, azaz kategorikus változók (pl. beteg v. kontroll, nem, immunfenotípus, SNP-k) elemzését végeztük el jelen dolgozatban. A folytonos változók (pl. farmakogenetikai vizsgálatban) elemzésének lehetősége, még fejlesztés alatt áll.

A bayes-i statisztikával meghatároztuk a különböző változók célváltozóhoz viszonyított erős relevanciájának *posterior* (P) valószínűségi értékeit, a változók feltételezett kapcsolati struktúráját, az interakciókat (két SNP együttes előfordulása valószínűbb, mint külön-külön) és redundanciákat (az SNP-k azonos módon hatnak, de előfordulások valószínűbb külön-külön, mint egyszerre), illetve a bayes-i hatáserősség-elemzést (effect size analysis) is, a bayes-i esélyhányadosok és a hozzájuk tartozó 95%-os megbízhatósági tartományok (OR, credibility region), kiszámításával.

Az *a posteriori* valószínűség értéke 0 és 1 közötti értéket vehet fel. A  $0,5 \leq P \leq 1$  érték azt jelenti, hogy egy prediktor változó az adatok alapján relevánsnak tekinthető a célváltozó függvényében. A „P” minél jobban megközelíti az 1 értéket, annál relevánsabb.

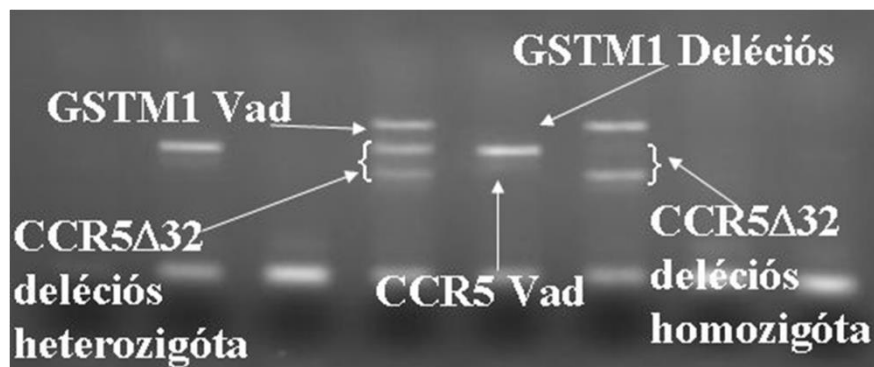
## 5 EREDMÉNYEK

Az első három vizsgálat fő célja a gyermekkori akut limfoid leukémiára hajlamosító tényezők vizsgálata volt, amelyek elemzése kétféle statisztikai módszerrel történt. A IV. vizsgálat célja a betegek gyógyszeres kezelésére adott terápias válasz genetikai hátterének és az azt befolyásoló faktorok hatásának tanulmányozása volt.

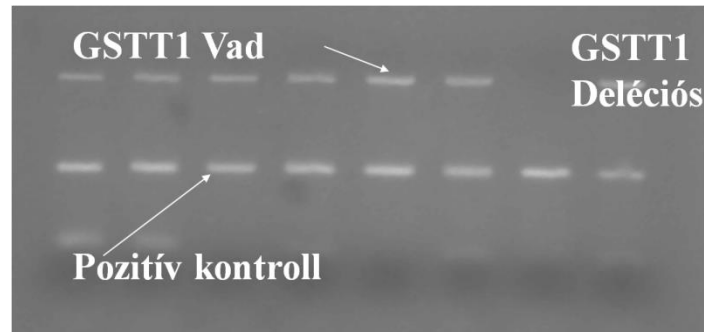
A betegek túlélését nagyban befolyásolja a genetikai „hátterük”, így az előzőekben tanulmányozott paraméterek, polimorfizmusok szerepének meghatározása, a betegség és a faktorok közötti komplex kapcsolati rendszernek a leírása fontos lehet a gyermekkori ALL etiológiájának jobb megértésében.

### 5.1 JELÖLT GÉN ASSZOCIÁCIÓS VIZSGÁLAT I – *GSTM1*, *GSTM1*, *CCR5*

Az I. tanulmány génpolimorfizmusainak genotípusait klasszikus multiplex PCR-t követő gélelektroforézissel határoztam meg. A futtatásra jellemző gélképeket a **8. ábra** és **9. ábra** mutatja.



**8. ábra:** A *GSTM1* és *CCR5* gének polimorfizmusait bemutató gélkép, ahol pozitív kontrollként a *CCR5* szerepel



**9. ábra: A *GSTT1* gén null (deléció) polimorfizmusát bemutató gélkép, ahol pozitív kontrollként az *APOA5* szerepel**

A képeken látható, hogy a *GSTM1* és *GSTT1* gének esetében a vad homozigóta és heterozigóta genotípusok nem elkülöníthetők egymástól ezzel a technikával. A heterozigóta egyedeknél is megjelenik ugyanis az adott PCR termék. A kiértékelés szempontjából azonban ez nem jelentett hátrányt, hiszen a gén(ek) által kódolt szolubilis enzim(ek) működéséhez, elegendő a heterozigóta egyed által hordozott egészséges allél. A statisztikai kiértékelésnél természetesen ezt a ténytet figyelembe vettem, így az ún. recesszív modellt alkalmaztam, azaz a (vad + heterozigóta) csoportot hasonlítottam össze a mutáns genotípusúakkal. A *GSTT1* és a *GSTM1* gének deléció variánsai valamint a *CCR5* delta32 polimorfizmusa, ill. genotípus kombinációik és a magyar gyermekpopuláció ALL-re való hajlama közötti összefüggéseket logisztikus regresszióval vizsgáltam.

A *GSTT1* gén null polimorfizmusára homozigótákat – a heterozigótákkal együtt – és az egészséges csoportot összehasonlítva  $OR=0,70$  ( $0,49-1,00$ );  $p=0,05$  értéket kaptam. Az eredmény a *GSTT1* deléció variánsa gyenge védő hatásának irányába mutat. Bár a „p” érték és a hozzá tartozó konfidencia intervallum a szignifikancia határon van, azonban a statisztikai korrekció után, nem vonható le messzemenő következtetés a *GSTT1* deléció polimorfizmusával kapcsolatban. Egy újabb, nagyobb számú populáció vizsgálata lenne szükséges, hogy a kérdésben releváns választ adhassunk. Az adatok alapján a *GSTM1* gén null mutációjára homozigóta, valamint a *CCR5* delta32 polimorfizmus deléció allélgyakorisági értékeinek beteg és kontroll populációja között sem tapasztaltam szignifikáns eltérést (**8. táblázat**).

A két gén inaktív variánsait együtt vizsgálva sem kaptam szignifikáns különbséget a beteg és kontroll csoport között.

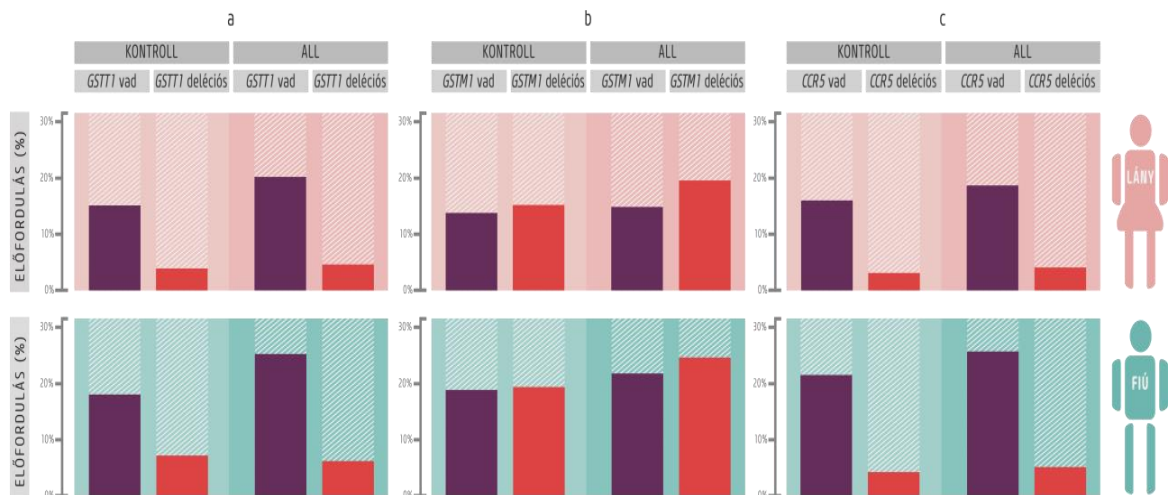


**8. táblázat: A vizsgált magyar populáció deléciós génpolimorfizmusainak százalékos megoszlása (p<0,05; szignifikáns)**

Génpolimorfizmus	<i>GSTT1</i> null		<i>GSTM1</i> null		<i>CCR5</i> Delta32	
	ALL	Kontroll	ALL	Kontroll	ALL	Kontroll
<b>Incidencia (%)</b>	18,9%	25,0%	54,6%	51,6%	9,0%	8,8%
<b>p (-)</b>	0,05		0,41		0,78	
<b>OR (odds ratio, CI=95%)</b>	0,70(0,49-1,00)		1,13 (0,85-1,50)		1,06 (0,72-1,54)	

A kérdéses génpolimorfizmusok feltételezhető hajlamosító szerepét az immunfenotípus (B-, T-sejtes), a citogenetikai tényezők (t(12;21) transzlokáció, hiperdiploidia) és a nem összefüggésében is vizsgáltam (**10. ábra**).

A nem vizsgálata során szignifikáns eredményt nem kaptunk ugyan, de az elmondható, hogy a beteg csoport nagyobb százalékát fiúk alkották, ami egy nem-által befolyásolt mechanizmus lehetőségét veti fel (**10. ábra**).



**10. ábra: A *GSTT1*, *GSTM1*, *CCR5* gén vad és mutáns allélfrekvenciáinak leukémiás (ALL) és kontroll csoporton belüli, valamint a nemek szerinti megoszlása**

Az eredmények alapján feltételezhető, hogy magyar populációban a *GSTT1* gén deléciós polimorfizmusa szerepet játszhat az ALL kialakulásának kockázatában, bár pontos szerepét nem sikerült sem megerősíteni, sem pedig megcáfolni. A *GSTM1* és *CCR5* delta32 deléciós génpolimorfizmusok ill. a tanulmányozott genotípus kombinációk, valamint az immunfenotípus, a citogenetikai paraméterek sem

befolyásolták szignifikánsan az általunk vizsgált populáción a betegségre való hajlamot.

## 5.2 JELÖLT GÉN ASSZOCIÁCIÓS VIZSGÁLAT II – *ARID5B*, *IKZF1*, *STAT3*

A gyermekkori akut limfoid leukémia kialakulásáért felelős, vagy azt befolyásoló genetikai tényezők, csiravonalbeli polimorfizmusok vizsgálata volt a cél. Ehhez retrospektív módon gyűjtött remissziós vérminták (normál leukocita szám  $>5$  G/l;  $10E-09$  sejtszám/liter) DNS-ének felhasználására volt szükség, amely gyakorlatilag nem tartalmazott már tumoros sejtet.

A kapott adatok statisztikai elemzése kétféle módszerrel történt. Az egyik a klasszikus, napjainkban leginkább elterjedt frekventista technika, a másik pedig a munkacsoport által közösen fejlesztett Bayes-háló alapú bayes-i többszintű relevancia analízis (továbbiakban bayes-i vagy BN-BMLA) módszere volt.

A vizsgált 66 SNP-ből 62 SNP statisztikai értékelését végeztük el. Négy SNP a nem megfelelő genotipizálási eredmény, vagy a nem teljesült HWE egyensúly miatt esett ki.

### 5.2.1 A FREKVENTISTA ELEMZÉS EREDMÉNYE

A leukémiás (ALL) és egészséges populáció genotípus és minor allél frekvencia (MAF) értékeit a **9. táblázat** tartalmazza.

**9. táblázat: A II. vizsgálat polimorfizmusainak genotípus és minor allél frekvencia (MAF) adatai a beteg és kontroll populációban\***

SNP	Genotípus frekvencia kontollokban			MAF <sub>Kontroll</sub>	Genotípus frekvencia betegekben			MAF <sub>ALL</sub>
	0	1	2		0	1	2	
rs2066853	0,851	0,146	0,004	0,077	0,811	0,172	0,017	0,103
rs2237297	0,862	0,136	0,002	0,070	0,827	0,158	0,015	0,094
rs2282883	0,436	0,453	0,112	0,338	0,381	0,457	0,161	0,390
rs2282885	0,369	0,490	0,142	0,387	0,411	0,469	0,120	0,355
rs10821936	0,448	0,433	0,119	0,336	0,332	0,496	0,172	0,420
rs4506592	0,418	0,457	0,125	0,353	0,317	0,500	0,183	0,433
rs4509706	0,762	0,221	0,017	0,128	0,825	0,170	0,006	0,090
rs4948487	0,280	0,507	0,214	0,467	0,262	0,518	0,221	0,480

SNP	Genotípus frekvencia kontrollokban			MAF <sub>Kontroll</sub>	Genotípus frekvencia betegekben			MAF <sub>ALL</sub>
	0	1	2		0	1	2	
rs4948496	0,258	0,506	0,237	0,490	0,263	0,497	0,239	0,488
rs4948502	0,372	0,486	0,142	0,385	0,384	0,469	0,148	0,382
rs7089424	0,446	0,433	0,121	0,337	0,328	0,506	0,166	0,419
rs11667351	0,792	0,189	0,019	0,114	0,788	0,201	0,011	0,111
rs3817074	0,815	0,166	0,019	0,102	0,808	0,183	0,009	0,101
s7259013	0,311	0,506	0,183	0,436	0,358	0,454	0,187	0,414
rs11876772	0,302	0,486	0,212	0,455	0,285	0,475	0,239	0,477
rs12457893	0,269	0,531	0,199	0,465	0,292	0,472	0,235	0,472
rs2850761	0,290	0,477	0,233	0,472	0,271	0,525	0,204	0,467
rs4987845	0,856	0,134	0,009	0,077	0,866	0,131	0,004	0,069
rs8092560	0,701	0,274	0,025	0,162	0,704	0,259	0,037	0,166
rs1801018	0,320	0,479	0,201	0,440	0,294	0,485	0,221	0,463
rs1893806	0,280	0,495	0,225	0,473	0,306	0,513	0,181	0,438
rs11575815	0,401	0,484	0,115	0,357	0,424	0,471	0,105	0,341
rs1799988	0,306	0,512	0,181	0,438	0,337	0,481	0,182	0,423
rs3087253	0,319	0,497	0,183	0,432	0,304	0,472	0,223	0,459
rs10403561	0,333	0,469	0,198	0,433	0,323	0,466	0,211	0,444
rs874966	0,329	0,468	0,203	0,437	0,321	0,463	0,216	0,448
rs12434881	0,297	0,469	0,234	0,469	0,336	0,485	0,179	0,422
rs2239633	0,287	0,484	0,229	0,471	0,318	0,512	0,170	0,426
rs8015478	0,516	0,427	0,057	0,270	0,477	0,429	0,094	0,308
rs10235796	0,677	0,292	0,030	0,176	0,692	0,264	0,044	0,176
rs11978267	0,582	0,342	0,076	0,247	0,456	0,424	0,120	0,332
rs4132601	0,581	0,341	0,078	0,248	0,453	0,421	0,126	0,336
rs6954833	0,576	0,380	0,043	0,233	0,620	0,327	0,053	0,216
rs6964969	0,580	0,340	0,079	0,250	0,449	0,427	0,124	0,338
rs12063205	0,756	0,233	0,011	0,128	0,770	0,210	0,020	0,125
rs310225	0,484	0,442	0,074	0,295	0,506	0,413	0,081	0,288
rs11888	0,367	0,484	0,149	0,391	0,424	0,454	0,122	0,349
rs3212713	0,509	0,417	0,074	0,282	0,486	0,444	0,070	0,292
rs2229974	0,336	0,480	0,184	0,424	0,340	0,481	0,180	0,420
rs3124596	0,295	0,465	0,240	0,473	0,280	0,501	0,219	0,469
rs3124603	0,401	0,465	0,134	0,367	0,408	0,472	0,120	0,356
rs3124999	0,405	0,467	0,129	0,362	0,377	0,460	0,163	0,393
rs1469908	0,338	0,507	0,155	0,408	0,379	0,475	0,146	0,384
rs1800566	0,671	0,293	0,036	0,182	0,657	0,320	0,022	0,182
rs1143684	0,580	0,372	0,047	0,233	0,620	0,332	0,048	0,214
rs2070999	0,333	0,489	0,178	0,422	0,302	0,522	0,176	0,437
rs2756075	0,384	0,482	0,134	0,375	0,396	0,455	0,150	0,377
rs4149352	0,538	0,402	0,061	0,261	0,601	0,348	0,051	0,225

SNP	Genotípus frekvencia kontrollokban			MAF <sub>Kontroll</sub>	Genotípus frekvencia betegekben			MAF <sub>ALL</sub>
	0	1	2		0	1	2	
	rs10208033	0,382	0,451		0,167	0,393	0,362	
rs2030171	0,497	0,405	0,098	0,301	0,465	0,445	0,090	0,313
rs3088307	0,272	0,471	0,257	0,492	0,250	0,527	0,223	0,486
rs12949918	0,350	0,474	0,176	0,413	0,409	0,440	0,151	0,371
rs17405722	0,850	0,140	0,009	0,080	0,899	0,096	0,006	0,053
rs3809758	0,633	0,314	0,053	0,210	0,664	0,310	0,026	0,181
rs3816769	0,400	0,462	0,138	0,369	0,460	0,427	0,112	0,326
rs3198502	0,625	0,323	0,051	0,213	0,659	0,313	0,028	0,184
rs7217728	0,496	0,419	0,085	0,295	0,536	0,388	0,076	0,270
rs4029774	0,491	0,419	0,089	0,299	0,525	0,402	0,073	0,274
rs9906933	0,490	0,416	0,095	0,302	0,524	0,403	0,073	0,274
rs3024979	0,798	0,190	0,011	0,106	0,784	0,203	0,013	0,115
rs324015	0,565	0,360	0,075	0,255	0,554	0,378	0,067	0,257
rs703817	0,289	0,501	0,210	0,460	0,276	0,524	0,200	0,462

\*0=vad/gyakori homozigóta, 1=heterozigóta, 2=mutáns/ritka homozigóta

A beteg és kontroll csoport genotípus és minor allél frekvencia (MAF) értékeinek összehasonlító vizsgálata során 19 SNP bizonyult nominálisan szignifikánsnak ( $FDR(\alpha)=1\% \leq p < 0,05$ ). A nemmel korrigált logisztikus regressziós elemzés után és az  $FDR(\alpha)=1\%$  korrigált szignifikancia határ mellett azonban már csak 2 gén 6 SNP-je (rs10821936, rs7089424 és rs4506592 *ARID5B*, ill. rs6964969, rs11978267 és rs4132601 *IKZF1*) maradt valóban szignifikáns (azaz  $p \leq 3,42E-04$ ; **10. táblázat**). Az eredmények alapján az *IKZF1* és *ARID5B* gének adott polimorfizmusai, asszociálnak az ALL-re való hajlammal ( $1,4 \leq OR-k \leq 1,5$ ) a teljes beteg populációt tekintve. Az ALL hajlammal két tagSNP az rs4132601 (*IKZF1*) és az rs10821936 (*ARID5B*) mutatta az egyik legerősebb asszociációt ( $p_{IKZF1}=1,69E-05$ ,  $OR_{IKZF1}=1,50$  és  $p_{ARID5B}=7,31E-05$ ,  $OR_{ARID5B}=1,43$ ).

A klinikai alcsoportokat elemezve a B-sejtes ALL-ben (B-ALL) a teljes populációhoz képest emelkedettebb rizikó tényezőt ( $1,51 \leq OR-k \leq 1,7$ ) jelenthetnek ezek az SNP-k, míg T-ALL-ben nem találtam semmilyen összefüggést. Hiperdiploid akut limfoid leukémiás (HD-ALL;  $\geq 50$  kromoszóma) populációban egy új gén, a *STAT3* két SNP-je, az rs12949918 és az rs3816769 szignifikánsan alacsonyabb rizikóval asszociált ( $p=2,32E-04$ ,  $OR=0,64$  és  $p=1,34E-04$ ,  $OR=0,62$ ), míg általánosságban ezek a variánsok nem befolyásolták az ALL-re való hajlamot. Összességében elmondható,

hogy a szignifikánsnak bizonyult, hajlammal asszociált polimorfizmusok esetében a homozigóta állapot járt nagyobb rizikóval, semmint a hordozó státusz.

Vizsgáltam a nemet, az életkort, a protokollokat, mint az ALL hajlam kialakulását befolyásolható kofaktorokat is, de nem tapasztaltam szignifikáns hatást egyik esetében sem.

A fenti SNP-k géenként kapcsoltsági egyenlőtlenségben (LD) voltak ((160)), így tulajdonképpen redundánsak, helyettesíthetők egymással. A jelen tanulmányban egyfajta kontrollként szerettem volna őket párhuzamosan vizsgálni.

10. táblázat: A II. vizsgálat frekventista elemzésének összefoglalása\*

		ALL rizikó		B-ALL rizikó		T-ALL rizikó		HD-ALL rizikó	
Génnév	SNP	p	OR; 95% CI	p	OR; 95% CI	p	OR; 95% CI	p	OR, 95% CI
<i>IKZF1</i>	rs6964969	<b>1,67E-05</b>	1,50;1,25-1,80	<b>1,17E-07</b>	1,70;1,40-2,08	0,18	0,76;0,50-1,14	8,72E-02	1,36;0,96-1,94
<i>IKZF1</i>	rs11978267	<b>2,46E-05</b>	1,50;1,24-1,79	<b>2,97E-07</b>	1,68;1,38-2,05	0,21	0,77;0,51-1,16	5,08E-02	1,42;1,00-2,02
<i>IKZF1</i>	<b>rs4132601</b>	<b>1,69E-05</b>	1,50;1,25-1,80	<b>2,22E-07</b>	1,69;1,38-2,06	0,34	0,83;0,55-1,23	9,13E-02	1,36;0,95-1,94
<i>ARID5B</i>	<b>rs10821936</b>	<b>7,31E-05</b>	1,43;1,20-1,71	<b>1,95E-05</b>	1,53;1,26-1,85	0,39	1,17;0,82-1,66	5,72E-03	1,61;1,15-2,27
<i>ARID5B</i>	rs7089424	<b>1,17E-04</b>	1,42;1,19-1,69	<b>2,68E-05</b>	1,52;1,25-1,84	0,41	1,16;0,81-1,65	6,70E-03	1,60;1,14-2,24
<i>ARID5B</i>	rs4506592	<b>1,72E-04</b>	1,40;1,18-1,67	<b>3,35E-05</b>	1,51;1,24-1,83	0,67	1,08;0,76-1,54	1,24E-02	1,55;1,10-2,19
<i>STAT3</i>	rs3816769	3,76E-02	0,83;0,69-0,98	4,23E-02	0,82;0,67-0,99	0,58	0,91;0,64-1,29	<b>1,34E-04</b>	0,62;0,49-0,79
<i>STAT3</i>	<b>rs12949918</b>	5,15E-02	0,84;0,71-1,00	6,37E-02	0,84;0,69-1,01	0,55	0,90;0,64-1,27	<b>2,32E-04</b>	0,64;0,50-0,81

\*Félkövér kiemeléssel a  $p \leq 3,42E-04$  értékek a korrekció utáni FDR( $\alpha$ )= 1% szignifikancia határ mellett, HD=hiperdiploid

A haplotípus analízis során az *IKZF1* génben 2 haplotípust (TGATA és TGGGG) találtam szignifikánsnak az ALL hajlamot tekintve, azonban a haplotípusok esélyhányadosa nem volt nagyobb, mint az SNP-ké külön-külön. Továbbá az *IKZF1* polimorfizmusok közül 3 „hajlamosító” SNP (rs11978267, rs4132601, rs6964969) is alkotta azt a haplotípust (TGATA), amely gyenge védő hatást mutatott ALL-lel szemben (**11. táblázat**).

**11. táblázat: Az ALL hajlamot szignifikánsan befolyásoló haplotípusok frekvenciái beteg (ALL) és kontroll populációban**

Gene	SNP	Haplotípus	Kontroll	ALL	p	OR; 95% CI
<i>IKZF1</i>	rs6954833	TGATA	0,524	0,445	3,0E-04	0,73;0,62-0,86
	rs10235796					
	rs11978267					
	rs4132601					
	rs6964969					
	rs6954833	TGGGG	0,244	0,333	5,3E-06	1,55;1,28-1,87
	rs10235796					
	rs1197826					
	rs4132601					
	rs6964969					

### 5.2.2 A BAYES-I ELEMZÉS EREDMÉNYE

A bevezető részben már említésre került, hogy a bayes-i elemzés során az egyik legfontosabb kapcsolati típus az erős relevancia. Ennek *posterior* valószínűségét a célváltozó (ALL, B-ALL, T-ALL, HD-ALL) függvényében minden prediktor változóra (pl. SNP-k, nem) kiszámoltuk. Az *a posteriori* valószínűség 0 és 1 közötti értéket vehet fel. Az értéke 0, ha nem releváns, 0,5 fölött pedig releváns a változó a célváltozót tekintve. 0,5-0,75 közötti értéknél mérsékelt, 0,75 fölött pedig „meggyőző” relevanciáról beszélhetünk.

Az ALL hajlammal kapcsolatosan a legrelevánsabb SNP-nek az rs10821936 (*ARD15B*) és az rs4132601 (*IKZF1*) bizonyultak. A valószínűség, hogy ezek az SNP-k direkt módon asszociálnak az ALL hajlammal 0,76 az rs10821936 és 0,97 az rs4132601 esetében. A direkt asszociáció még valószínűbb volt a B-ALL

alpopulációban (0,95 az rs10821936 és 1,0 az rs4132601-nél). Az említett genetikai variánsoknak a teljes ALL-es populációban tapasztalt magas direkt asszociációs valószínűségi értékei, a szűkebb B-sejtes populációban tapasztalt még erősebb valószínűség miatt lehetségesek (**11. ábra, 12. táblázat**).

**12. táblázat: Az erősen releváns változók *posterior* valószínűségi értékei a teljes és az alpopulációkban**

Fenotípus	ALL	B-ALL	T-ALL	HD-ALL	Rizikócsoport
Nem	0,01	0,06	0,85*	0,07	0,08
rs10821936 <i>ARID5B</i>	0,76*	0,95*	0,02	0,14	0,05
rs12949918 <i>STAT3</i>	0,01	0,00	0,01	0,60*	0,00
rs17405722 <i>STAT3</i>	0,23	0,24	0,21	0,37	0,09
rs12457893 <i>BCL2</i>	0,02	0,01	0,24	0,57*	0,05
rs1893806 <i>BCL2</i>	0,02	0,00	0,02	0,01	0,42
rs3212713 <i>JAK3</i>	0,03	0,11	0,17	0,56*	0,01
rs3087253 <i>CCR5</i>	0,03	0,10	0,15	0,56*	0,00
rs2282883 <i>AHR</i>	0,01	0,00	0,11	0,08	0,42
rs2066853 <i>AHR</i>	0,06	0,04	0,25	0,34	0,04
rs4132601 <i>IKZF1</i>	0,97*	1,00*	0,02	0,02	0,00

\*releváns *posterior* valószínűségi értékek ( $P \geq 0,5$ ), HD=hiperdiploid

A fenti SNP-k és a ritkább T-sejtes ALL hajlam közötti direkt asszociáció valószínűsége, nullához közeli értéket ( $\sim 0,02$ ) adott a számítások alapján. Csak a nemnek, mint prediktor változónak volt magas a direkt asszociációs valószínűsége a T-ALL hajlamra (0,85). A frekventista eredményt a bayes-i modell eredményével kiegészítve megállapítható, hogy a fiúgyermekek 2,28x hajlamosabbak T-ALL-re, mint a lányok (95% CI 1,32-3,93).

A hiperdiploid akut limfoid leukémiás alcsoportot vizsgálva, a legrelevánsabb SNP-kenél (*STAT3* rs12949918, *BCL2* rs12457893, *JAK1* rs3212713 és *CCR5* rs3087253) mérsékelt valószínűségi értékeket (0,6; 0,57; 0,56; 0,56) kaptunk (**12. táblázat**).





**11. ábra:** Az akut limfoid leukémia, mint célváltozó és a prediktor változók (*IKZF1*-, *ARID5B* polimorfizmusok, nem) függőségi kapcsolati hálójá, valamint a hozzá tartozó *posterior* valószínűségi grafikon. A hálózati struktúrában piros színnel jelöltük az ALL hajlamot, lilával a nemet, kékkel az *ARID5B* és sárgával az *IKZF1* génpolimorfizmusokat. A nyilak (élek) vastagsága arányos az *a posteriori* valószínűségükkel. Az élek iránya csak a valószínűségi kapcsolatokra utal, nem jelent feltétlenül ok okozati összefüggést. Az alsó grafikonon a prediktor- és a célváltozók közötti különböző asszociációtípusok *posterior* valószínűsége látható. Kékkel az erős relevanciát, pirossal a direkt erős relevanciát, sárgával a tranzitív relevanciát, barnával a zavaró relevanciát, lilával az asszociációs relevanciát, zölddel pedig a tiszta interakciót ábrázoltuk.

A vizsgált géneken belüli polimorfizmusok együttes erős relevancia jellegét (direkt vagy tiszta relevancia) és erejét is vizsgáltuk az akut limfoid leukémiával kapcsolatosan.

Az *ARID5B* gének vizsgált SNP-i (rs4509706, rs4948487, rs10821936, rs4948496, rs4948502) együttesen közelítően 0,8 valószínűséggel relevánsak az ALL-hajlam tekintetében. Közülük azonban csak a már említett rs10821936 tűnik valóban direkt módon relevánsnak, mert míg a többi SNP-nél az erős relevanciának egyenként 0,13 körüli *posterior* értéket kaptunk, addig ennél 0,76-nek adódott ez az érték. Ez alapján valószínűsíthető az rs10821936 közvetlen hatása, és a többi SNP nem közvetlen okozati (indirekt) szerepe az ALL kialakulásában (**11. ábra**).

Hasonló tendenciát mutatott az *IKZF1* gén variánsainak részletesebb kapcsolati rendszer elemzése is. Ebben az esetben az rs4132601-nek 0,97-es valószínűséget kaptunk, ami megegyezik a génben vizsgált összes SNP közös direkt relevancia valószínűségével. Ennek oka, hogy az rs4132601 SNP-nél önmagában is magas, direkt relevancia *posterior* valószínűsége (0,97) kaptunk, ellenben a többi két SNP-vel (rs6954833, rs10235796), ahol ez az érték 0,1 volt (**11. ábra**). Még kifejezettebb hatást mutattak az együttes asszociációs vizsgálatok B-sejtes alpopulációban.

A célváltozó (pl. ALL, B-ALL) szerinti tiszta interakció valószínűsége igen alacsonynak (0,1) bizonyult szinte mindegyik gén variánsai esetében, azonban az rs3212713 (*JAK3*) és az rs2282883 (*AHR*) SNP-kenél megfigyeltünk tiszta interakciós hatást a hiperdiploid alpopulációban, illetve a rizikócsoport függvényében (0,43 és 0,42).

A bayes-i elemzés (BN-BMLA) lehetőséget nyújtott a változók közötti kölcsönhatások (interakció) és helyettesíthetőség (redundancia) vizsgálatára is. A kölcsönhatás ebben az esetben azt jelenti, hogy két változó együttes előfordulása a célváltozó Markov-takarójában valószínűbb, mint azt várnánk, azaz két SNP együttes erős relevanciájának nagyobb a valószínűsége, mint ahogyan az egyváltozós relevancia értékek alapján adódna.

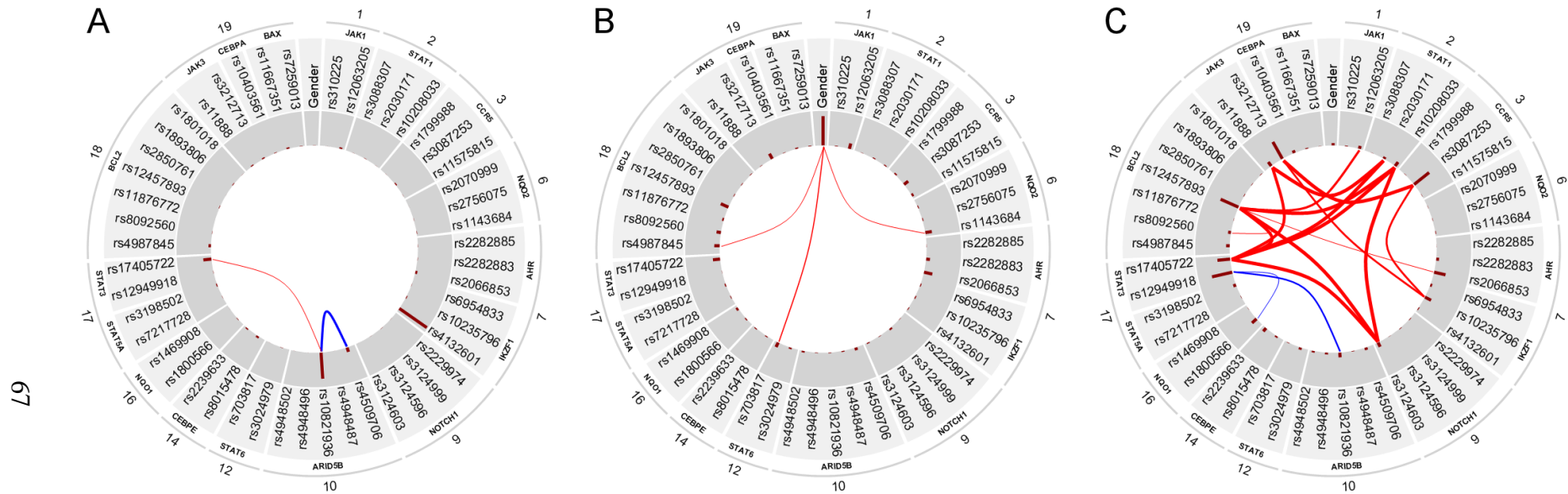
A redundancia értelmezése szerint két SNP együttes erős relevanciájának valószínűsége kisebb, mint azt várnánk.

A teljes illetve alpopulációkban a változók közötti redundancia és interakció értékek BN-BMLA elemzésének grafikai megjelenítése az alábbi ábrán (**12. ábra**) látható.

Az ALL hajlamra vonatkozó értékelés során az *ARID5B* rs10821936 és *STAT3* rs17405722 SNP-k között (interaction ratio, IR=0,15) gyenge interakciót, az *ARID5B* rs10821936 és rs4509706 között pedig mérsékelt redundanciát (redundancy ratio, RR=0,33) tapasztaltunk. Az *IKZF1* és *ARID5B*, a két legerősebb univariáns erős relevancia valószínűséget mutató gén SNP-i között sem kölcsönhatást, sem pedig redundanciát nem találtunk.

A T-sejtes-ALL alpopuláció vizsgálatokor a nem mutatott gyenge kölcsönhatást három másik polimorfizmussal, az rs703817 (*STAT6*; IR=0,16), az rs4987845 (*BCL2*;

IR=0,1), és az rs1143684 (*NQO2*; IR=0,11). A frekventista elemzéssel együtt ez az eredmény is alátámaszthatja azt a feltevést, miszerint a fiúk hajlamosabbak a T-sejtes akut limfoid leukémiára. A hiperdiploid populáció elemzésekor 3 különböző interakciós csoportot kaptunk, amelyeknek relatíve magas volt az interakciós rátája. Az első csoportot 4 különböző gén (*STAT3*, *BCL2*, *STAT1*, *NOTCH1*) 4 variánsa (rs17405722, rs12457893, rs10208033, rs3124603) alkotta, itt az IR=3,06 volt. A második legmagasabb csoportos kölcsönhatási tényezőt (2,72) az rs17405722 (*STAT3*), rs11888 (*JAK3*), és az rs2030171 (*STAT1*) adta. Végül pedig az rs3212713 (*JAK3*), az rs3087253 (*CCR5*), és az rs10235796 (*IKZF1*) interakciós hányadosa 0,86-nak adódott. Ezek az elemzések azonban egy viszonylag kisméretű populáció (HD-ALL) alapján születtek, így szükséges lenne további validálásuk egy nagyobb populáción is.



**12. ábra: A vizsgált változók közötti interakciót (piros görbe) és redundanciát (kék görbe) bemutató térkép. Az ábra a prediktor változók között fellépő kölcsönhatásokat (pirossal) és redundanciákat (kékkel) mutatja be a teljes (A)-, T (B)-, HD (C)-ALL populáción. A görbék vastagsága arányos a hatások erősségével. A sötétszürke belső körön látható bordó oszlopok magassága arányos a változók erős relevanciájának a *posteriori* valószínűségével. A vizsgált polimorfizmusok gén, ill. kromoszóma szerinti elhelyezkedése a külső, halványoszürke gyűrűn látható.**

### 5.3 JELÖLT GÉN ASSZOCIÁCIÓS VIZSGÁLAT III – FOLÁT ANYAGCSERE GÉNEK

Hasonlóan a II. tanulmányhoz a biobank vizsgálatba bevont beteg és egészséges populációjának genetikai és klinikai adatainak értékelése itt is kétféle statisztikai technikával, a frekventista és a Bayes-háló alapú bayes-i többszintű relevancia analízis (továbbiakban bayes-i vagy BN-BMLA) történt.

A III. esetben 64 egyponos nukleotid polimorfizmust vizsgáltam az eredetileg kiválasztott 67-ből. Három SNP a nem megfelelő genotipizálási eredmény, vagy a nem teljesült HWE egyensúly miatt esett ki.

#### 5.3.1 A FREKVENTISTA ELEMZÉS EREDMÉNYE

A genotípus és allélfrekvenciákat a **13. táblázat** tartalmazza. A nemmel korrigált logisztikus regressziós elemzés során 8 különböző gén (*ABCBI*, *DHFR*, *FPGS*, *MTHFD1*, *MTR*, *SHMT1*, *TYMS*, *MTRR*) 9 SNP-je (rs2235013, rs12517451, rs1544105, rs1076991, rs12759827, rs9909104, rs2853533, rs3776455, rs1532268) mutatott szignifikáns összefüggést az ALL hajlammal (**14. táblázat**). Statisztikai korrekciót ( $FDR(\alpha)=5\%$ ;  $p \leq 1,21E-03$ ) alkalmazva azonban már csak 2 gén 2 SNP-je (*MTHFD1* rs1076991, *MTRR* rs3776455) maradt szignifikáns (**15. táblázat**).

Az *MTHFD1* rs1076991 SNP GG (mutáns homozigóta) genotípuseloszlása szignifikánsan különbözött ( $p=1,94E-04$ ; OR=1,94 (1,37-2,76), power=0,64) a beteg és a kontroll populáció között (additív modell). Ez a jelentős különbség a B-sejtes alpopulációban is jelentkezett ( $p=3,52E-04$ ; OR=2,00 (1,37-2,94); power=0,59), ellenben a T-sejtes vagy a hiperdiploid csoportban nem tapasztaltam.

A további elemzések (allélpozitivitás, domináns/recesszív modell) során már a G allélhordozás (50% vs. 41,8%;  $p=1,30E-04$ ; OR=1,39 (1,18-1,65)) is rizikónövelő tényező volt, amit a domináns modellel (AA vs. AG/GG;  $p=4,90E-04$ ; OR=1,61 (1,23-2,10)) történő elemzés is megerősített. A különböző statisztikai modellekkel történő számolás azért hasznos és fontos, mert több oldalról körbejárva fontolhatjuk meg a kapott eredmény valóságát és értelmét, ami akár annak tényleges relevanciáját bizonyíthatja.

Az *MTRR* rs3776455 polimorfizmus esetében szintén a ritka homozigóta GG genotípus eloszlásában volt különbség az ALL-es és az egészséges csoport között

( $p=4,49E-03$ ; OR=0,57 (0,38-0,84); power=0,51), azonban itt a genotípus rizikócsökkenéssel asszociált. A recesszív modell alapján kapott GG genotípus eloszlásbeli szignifikáns különbség szintén ezt támasztotta alá (AA/AG vs. GG;  $p=1,21E-03$ ; OR=0,55 (0,38-0,79)).

13. táblázat: Genotípus és minor allél frekvencia (MAF) a beteg és egészséges populációban (III.)\*

Gén	SNP	Allél**	ALL				Kontroll			
			0	1	2	MAF	0	1	2	MAF
<i>ABCBI</i>	rs10280101	A/C	0,841	0,151	0,009	0,084	0,811	0,169	0,020	0,105
	rs1202179	A/G	0,519	0,397	0,083	0,282	0,507	0,410	0,083	0,288
	rs2235013	G/A	0,271	0,477	0,252	0,491	0,248	0,490	0,261	0,507
	rs9282564	A/G	0,811	0,182	0,008	0,098	0,771	0,218	0,011	0,120
<i>DHFR</i>	rs11742668	T/C	0,887	0,104	0,010	0,062	0,858	0,138	0,004	0,073
	rs1222809	T/C	0,562	0,372	0,067	0,252	0,548	0,384	0,068	0,260
	rs12517451	C/T	0,545	0,385	0,070	0,262	0,577	0,361	0,062	0,243
	rs1478834	C/A	0,550	0,382	0,068	0,259	0,541	0,388	0,072	0,266
	rs1650723	G/A	0,735	0,239	0,026	0,145	0,712	0,271	0,017	0,152
<i>FPGS</i>	rs1677626	G/C	0,552	0,381	0,067	0,257	0,541	0,388	0,072	0,266
	rs10106	A/G	0,392	0,446	0,163	0,385	0,390	0,461	0,149	0,379
	rs1544105	G/A	0,372	0,459	0,169	0,398	0,388	0,465	0,147	0,380
<i>GGH</i>	rs4451422	A/C	0,400	0,443	0,156	0,378	0,388	0,464	0,148	0,380
	rs10957267	T/A	0,732	0,240	0,028	0,148	0,712	0,267	0,021	0,155
	rs11545078	C/T	0,853	0,144	0,004	0,076	0,843	0,151	0,006	0,081
	rs3780127	C/T	0,853	0,144	0,004	0,076	0,843	0,151	0,006	0,081
<i>GSTPI</i>	rs719235	G/T	0,528	0,395	0,077	0,274	0,510	0,394	0,096	0,293
	rs1695	A/G	0,494	0,414	0,092	0,299	0,514	0,388	0,098	0,292
	rs749174	C/T	0,496	0,411	0,092	0,298	0,508	0,396	0,097	0,295
	rs7941395	A/G	0,423	0,448	0,129	0,353	0,431	0,439	0,130	0,350

Gén	SNP	Allél**	ALL				Kontroll			
			0	1	2	MAF	0	1	2	MAF
<i>MTHFD1</i>	rs1076991	A/G	0,241	0,517	0,241	0,500	0,338	0,488	0,174	0,418
	rs1950902	C/T	0,713	0,257	0,030	0,158	0,725	0,241	0,034	0,154
	rs2236225	C/T	0,359	0,462	0,179	0,410	0,331	0,459	0,210	0,440
	rs745686	A/G	0,485	0,406	0,109	0,312	0,473	0,422	0,104	0,315
<i>MTHFR</i>	rs13306561	T/C	0,726	0,262	0,011	0,142	0,741	0,246	0,013	0,136
	rs1801131	A/C	0,488	0,422	0,090	0,301	0,501	0,403	0,096	0,298
	rs1801133	C/T	0,397	0,463	0,140	0,372	0,407	0,464	0,129	0,361
<i>MTRR</i>	rs10380	C/T	0,854	0,144	0,002	0,074	0,844	0,153	0,004	0,080
	rs1532268	G/A	0,389	0,466	0,145	0,378	0,450	0,425	0,125	0,337
	rs162036	A/G	0,813	0,183	0,004	0,095	0,805	0,183	0,011	0,103
	rs1801394	G/A	0,280	0,525	0,195	0,458	0,295	0,490	0,216	0,460
	rs2966952	C/T	0,665	0,304	0,031	0,183	0,677	0,285	0,038	0,181
	rs326120	A/G	0,660	0,311	0,030	0,185	0,675	0,285	0,040	0,182
<i>MTR</i>	rs3776455	A/G	0,428	0,472	0,100	0,336	0,410	0,420	0,170	0,380
	rs10925257	A/G	0,631	0,327	0,042	0,206	0,648	0,308	0,044	0,198
	rs12759827	A/G	0,579	0,360	0,061	0,241	0,522	0,397	0,081	0,280
	rs1805087	A/G	0,633	0,322	0,044	0,206	0,645	0,308	0,047	0,201
	rs2853523	C/A	0,383	0,483	0,134	0,376	0,352	0,473	0,176	0,412
	rs3768142	T/G	0,372	0,490	0,139	0,384	0,346	0,474	0,180	0,417
	rs4659724	G/A	0,378	0,497	0,125	0,373	0,415	0,467	0,118	0,351
<i>SHMT1</i>	rs1979277	G/A	0,480	0,434	0,087	0,304	0,503	0,408	0,089	0,293
	rs643333	C/A	0,498	0,420	0,081	0,292	0,537	0,391	0,072	0,267
	rs9909104	T/C	0,597	0,344	0,059	0,231	0,541	0,406	0,053	0,256
<i>SLC19A1</i>	rs1051266	G/A	0,312	0,504	0,184	0,436	0,319	0,484	0,197	0,439



Gén	SNP	Allél**	ALL				Kontroll			
			0	1	2	MAF	0	1	2	MAF
<i>SLC19A1</i>	rs4819128	T/C	0,335	0,481	0,184	0,424	0,342	0,473	0,184	0,421
	rs7499	G/A	0,340	0,482	0,178	0,419	0,385	0,463	0,152	0,383
<i>SLC22A8</i>	rs2276299	A/T	0,679	0,286	0,035	0,178	0,660	0,318	0,023	0,181
	rs3809069	T/C	0,678	0,293	0,029	0,176	0,686	0,282	0,032	0,173
	rs4149183	T/C	0,580	0,374	0,046	0,233	0,626	0,324	0,049	0,212
<i>SLC21A6</i>	rs10841769	G/A	0,273	0,491	0,236	0,482	0,259	0,503	0,238	0,490
	rs11045818	G/A	0,772	0,207	0,021	0,125	0,732	0,261	0,008	0,138
	rs11045819	C/A	0,781	0,203	0,016	0,117	0,732	0,260	0,008	0,138
	rs11045823	G/A	0,759	0,218	0,023	0,132	0,730	0,263	0,008	0,139
	rs17328763	T/C	0,723	0,250	0,028	0,152	0,693	0,271	0,036	0,172
	rs4149056	T/C	0,661	0,304	0,035	0,187	0,660	0,295	0,045	0,193
	rs4363657	T/C	0,643	0,317	0,041	0,199	0,644	0,297	0,059	0,207
	rs2518463	C/T	0,237	0,511	0,252	0,507	0,285	0,480	0,235	0,475
<i>TPMT</i>	rs2842951	C/T	0,566	0,360	0,074	0,254	0,582	0,344	0,074	0,246
	rs4449636	A/G	0,242	0,506	0,251	0,505	0,284	0,477	0,239	0,477
<i>TYMS</i>	rs1004474	A/G	0,298	0,479	0,223	0,462	0,272	0,531	0,197	0,462
	rs2612100	G/A	0,446	0,431	0,123	0,339	0,440	0,448	0,112	0,336
	rs2853533	G/C	0,717	0,251	0,031	0,157	0,779	0,202	0,019	0,120
	rs2853741	C/T	0,464	0,432	0,104	0,320	0,496	0,428	0,076	0,290
	rs9967368	G/C	0,320	0,515	0,165	0,422	0,349	0,496	0,155	0,403

\*0=gyakori homozigóta, 1=heterozigóta, 2=ritka homozigóta; \*\*gyakori/ritka allél a forward szálon

14. táblázat: A frekventista elemzés nominálisan szignifikáns eredményei (III.)\*

SNP (rs#)	Allélok	Teljes		B-ALL		T-ALL		HD-ALL	
		p	OR(95% CI)	p	OR(95% CI)	p	OR(95% CI)	p	OR(95% CI)
<b>Genotípus frekvencia</b>									
<b>rs2235013</b>	GG	Referencia**							
<b>(ABCB1)</b>	GA	0,44	0,89(0,66-1,19)	0,67	0,93(0,68-1,29)	<b>0,04</b>	<b>0,57(0,33-0,97)</b>	0,46	1,26(0,68-2,34)
	AA	0,46	0,88(0,63-1,23)	0,71	0,93(0,65-1,35)	<b>0,02</b>	<b>0,45(0,23-0,89)</b>	0,44	1,31(0,66-2,60)
<b>rs12517451</b>	CC	Referencia**							
<b>(DHFR)</b>	CT	0,35	1,13(0,88-1,45)	0,29	1,16(0,88-1,53)	0,56	1,16(0,70-1,94)	<b>0,04</b>	<b>1,68(1,03-2,75)</b>
	TT	0,49	1,19(0,73-1,95)	0,61	1,15(0,67-1,99)	0,16	1,83(0,78-4,28)	0,63	1,28(0,47-3,49)
<b>rs1544105</b>	GG	Referencia**							
<b>(FPGS)</b>	GA	0,84	1,03(0,79-1,34)	0,63	1,07(0,80-1,43)	0,19	0,70(0,41-1,20)	0,06	1,71(0,98-2,98)
	AA	0,35	1,19(0,83-1,70)	0,41	1,18(0,80-1,75)	0,54	1,23(0,64-2,36)	0,13	1,76(0,85-3,63)
<b>rs12759827</b>	AA	Referencia**							
<b>(MTR)</b>	AG	0,12	0,82(0,64-1,05)	0,13	0,81(0,61-1,06)	0,19	0,71(0,42-1,19)	0,17	0,70(0,42-1,16)
	GG	0,11	0,68(0,42-1,10)	0,08	0,62(0,36-1,06)	0,77	0,87(0,35-2,18)	0,24	0,53(0,18-1,53)
<b>rs1532268</b>	GG	Referencia**							
<b>(MTRR)</b>	GA	0,07	1,27(0,98-1,64)	0,19	1,21(0,91-1,60)	0,08	1,61(0,95-2,72)	0,26	1,34(0,81-2,25)
	AA	0,12	1,35(0,93-1,96)	0,13	1,37(0,91-2,06)	0,31	1,48(0,69-3,16)	0,46	1,32(0,63-2,78)
<b>rs9909104</b>	TT	Referencia**							
<b>(SHMT1)</b>	TC	<b>0,04</b>	<b>0,77(0,59-0,99)</b>	<b>0,03</b>	<b>0,73(0,55-0,96)</b>	0,43	0,81(0,49-1,36)	0,11	0,65(0,38-1,10)
	CC	0,97	1,01(0,59-1,72)	0,70	0,89(0,49-1,61)	0,28	1,64(0,67-4,02)	0,35	1,53(0,63-3,69)
<b>rs2853533</b>	GG	Referencia**							
<b>(TYMS)</b>	GC	<b>0,04</b>	<b>1,35(1,01-1,81)</b>	0,21	1,23(0,89-1,69)	<b>0,02</b>	<b>1,85(1,09-3,13)</b>	0,24	1,40(0,80-2,43)
	CC	0,15	1,79(0,81-3,96)	0,24	1,68(0,71-3,94)	0,11	2,98(0,77-11,50)	0,22	2,27(0,60-8,54)

SNP (rs#)	Allélok	Teljes		B-ALL		T-ALL		HD-ALL	
		p	OR(95% CI)	p	OR(95% CI)	p	OR(95% CI)	p	OR(95% CI)
<b>Allél pozitivitás</b>									
<b>rs2235013</b>	GG vs GA+AA	0,39	0,89(0,67-1,17)	0,65	0,93(0,69-1,26)	<b>0,01</b>	<b>0,53(0,32-0,87)</b>	0,41	1,28(0,71-2,29)
<b>rs12517451</b>	CC vs CT+TT	0,30	1,14(0,89-1,45)	0,27	1,16(0,89-1,51)	0,34	1,26(0,78-2,04)	<b>0,05</b>	<b>1,62(1,01-2,61)</b>
<b>rs1544105</b>	GG vs GA+AA	0,61	1,07(0,83-1,37)	0,49	1,10(0,84-1,44)	0,44	0,83(0,51-1,34)	<b>0,04</b>	<b>1,72(1,01-2,93)</b>
<b>rs12759827</b>	AA vs AG+GG	0,06	0,79(0,62-1,01)	0,06	0,77(0,59-1,01)	0,22	0,74(0,45-1,20)	0,10	0,67(0,41-1,09)
<b>rs1532268</b>	GG vs GA+AA	<b>0,04</b>	<b>1,29(1,01-1,64)</b>	0,11	1,25(0,95-1,62)	0,07	1,58(0,96-2,61)	0,24	1,34(0,82-2,18)
<b>rs9909104</b>	TT vs TC+CC	0,06	0,79(0,62-1,01)	<b>0,03</b>	<b>0,75(0,57-0,98)</b>	0,70	0,91(0,56-1,47)	0,25	0,75(0,46-1,22)
<b>rs2853533</b>	GG vs GC+CC	<b>0,02</b>	<b>1,39(1,05-1,84)</b>	0,13	1,27(0,93-1,72)	<b>0,01</b>	<b>1,93(1,16-3,21)</b>	0,15	1,47(0,87-2,49)
<b>Allél frekvencia</b>									
<b>rs2235013</b>	G/A	0,46	0,94(0,79-1,11)	0,78	0,97(0,81-1,17)	<b>0,01</b>	<b>0,64(0,46-0,91)</b>	0,46	1,14(,081-1,59)
<b>rs12517451</b>	C/T	0,30	1,11(0,91-1,35)	0,33	1,11(0,90-1,37)	0,16	1,30(0,90-1,89)	0,10	1,36(0,94-1,96)
<b>rs1544105</b>	G/A	0,39	1,08(0,91-1,29)	0,37	1,09(0,90-1,32)	0,91	1,02(0,72-1,44)	0,07	1,36(0,97-1,91)
<b>rs12759827</b>	A/G	<b>0,04</b>	<b>0,82(0,67-0,99)</b>	<b>0,03</b>	<b>0,79(0,64-0,98)</b>	0,27	0,80(0,54-1,19)	0,09	0,71(0,47-1,06)
<b>rs1532268</b>	G/A	<b>0,05</b>	<b>1,20(1,00-1,43)</b>	0,07	1,19(0,99-1,45)	0,14	1,30(0,92-1,83)	0,30	1,20(0,85-1,70)
<b>rs9909104</b>	T/C	0,18	0,87(0,72-1,06)	0,08	0,83(0,67-1,03)	0,86	1,04(0,71-1,52)	0,67	0,92(0,62-1,36)
<b>rs2853533</b>	G/C	<b>0,01</b>	<b>1,37(1,07-1,75)</b>	1,26	0,09(0,96-1,66)	<b>7E-03</b>	<b>1,82(1,18-2,81)</b>	0,10	1,45(0,93-2,32)

\*félkövér kiemeléssel a nominálisan szignifikáns ( $p \leq 0,05$ ) eredmények láthatók

\*\*referencia=a vad homozigóta genotípushoz viszonyítva

15. táblázat: A különböző frekventista statisztikai modellek eredményei (III.)

Statisztikai modell		ALL		B-ALL		T-ALL		HD <sup>a</sup> -ALL	
		p <sup>b</sup>	OR (95%CI)	p <sup>b</sup>	OR (95%CI)	p <sup>b</sup>	OR (95%CI)	p <sup>b</sup>	OR (95%CI)
<b>rs1076991 (MTHFD1)</b>									
Genotípus frekvencia	AA	Referencia*							
	AG	0,01	1,49(1,12-1,97)	0,01	1,52(1,12-2,08)	0,29	1,37(0,77-2,43)	0,77	1,08(0,63-1,85)
	GG	<b>1,94E-04</b>	<b>1,94(1,37-2,76)</b>	<b>3,52E-04</b>	<b>2,01(1,37-2,94)</b>	0,07	1,90(0,96-3,76)	0,66	1,17(0,59-2,33)
Allél pozitivitás	AA vs AG/GG	<b>4,90E-04</b>	<b>1,61(1,23-2,1)</b>	<b>8,84E-04</b>	<b>1,65(1,23-2,22)</b>	0,14	1,51(0,88-2,59)	0,70	1,11(0,67-1,83)
	AA/AG vs GG	0,01	1,51(1,12-2,03)	0,01	1,53(1,11-2,12)	0,13	1,56(0,88-2,76)	0,72	1,12(0,67-2,04)
Allél frekvencia	A vs G	<b>1,30E-04</b>	<b>1,39(1,18-1,65)</b>	<b>2,10E-04</b>	<b>1,42(1,18-1,71)</b>	0,08	1,36(0,97-1,90)	0,65	1,08(0,77-1,51)
<b>rs3776455 (MTRR)</b>									
Genotípus frekvencia	AA	Referencia*							
	AG	0,57	1,08(0,83-1,40)	0,79	1,04(0,78-1,38)	0,14	1,48(0,88-2,48)	0,43	1,22(0,74-2,02)
	GG	4,49E-03	0,57(0,38-0,84)	0,01	0,57(0,37-0,87)	0,26	0,61(0,26-1,45)	0,01	0,15(0,04-0,65)
Allél pozitivitás	AA vs AG/GG	0,57	0,93(0,73-1,19)	0,46	0,90(0,69-1,18)	0,42	1,23(0,74-2,02)	0,73	0,92(0,56-1,50)
	AA/AG vs GG	<b>1,21E-03</b>	<b>0,55(0,38-0,79)</b>	0,01	0,56(0,37-0,83)	0,09	0,49(0,22-1,11)	0,01	0,14(0,03-0,57)
Allél frekvencia	A vs G	0,04	0,83(0,69-0,99)	0,04	0,82(0,67-0,99)	0,70	0,93(0,66-1,32)	0,05	0,69(0,48-1,01)

<sup>a</sup>HD: hiperdiploid; <sup>b</sup>félkövér kiemeléssel a szignifikáns értékek, ahol  $p \leq 1,21E-03$ ;  $FDR(\alpha) = 4,0\%$  szignifikancia szint

\*referencia: a vad homozigóta genotípushoz viszonyítva

A haplotípusok vizsgálatokor nominálisan szignifikánsnak csak az *MTHFD1* gén két haploblokkja (ACTA, GCCA) bizonyult. Az ACTA ( $p=0,003$ ; OR=0,74 (0,61-0,90)) haplotípus az alacsonyabb ALL rizikóval asszociál, míg a GCCA ( $p=0,009$ ; OR=1,38 (1,08-1,76)) haploblokkal rendelkező egyéneknek 1,4x nagyobb eséllyel alakulhat ki a betegség (**16. táblázat**).

**16. táblázat: Az *MTHFD1* gén polimorfizmusainak (rs1076991, rs1950902, rs2236225, rs745686) haplotípus frekvenciái a beteg és kontroll populációban**

Haplotípus	ALL	Kontroll	p	OR (95% C,I)
ACTA	248 (23%)	302 (29%)	0,003	0,741 (0,610-0,900)
GCCA	181 (17%)	134 (13%)	0,009	1,380 (1,083-1,756)

A kapcsoltsági egyenlőtlenségi (LD) értékek ( $D'$ ,  $r^2$  (167)) alapján az *MTRR* rs3776455 SNP erős kapcsoltságban van további 6 másik SNP-vel (rs2966952, rs1801394, rs326120, rs1532268, rs162036, és rs10380), így az rs3776455 polimorfizmus vizsgálata és eredményei a többi 6 esetről is információt nyújthatanak. Az rs3776455 így tagSNP-ként is funkcionált.

### 5.3.2 A BAYES-I ELEMZÉS EREDMÉNYE

A BN-BMLA módszer folyamatos fejlesztése révén lehetőség nyílt a III. vizsgálatnál a bayes-i hatásereősségek (effect size) elemzésére is, az ún. bayes-i esélyhányadosok (bayes-i OR), illetve megbízhatósági tartományok (CR) kiszámításával.

Ezzel a technikával így most már nemcsak az ALL hajlam és a változók közötti erős relevancia és egyéb asszociációs relevanciák *posterior* valószínűségét, a változók közötti redundanciát és interakciót tudtuk jellemezni, hanem számos új eredménnyel egészülhetett ki a munkacsoport által fejlesztett statisztikai módszer.

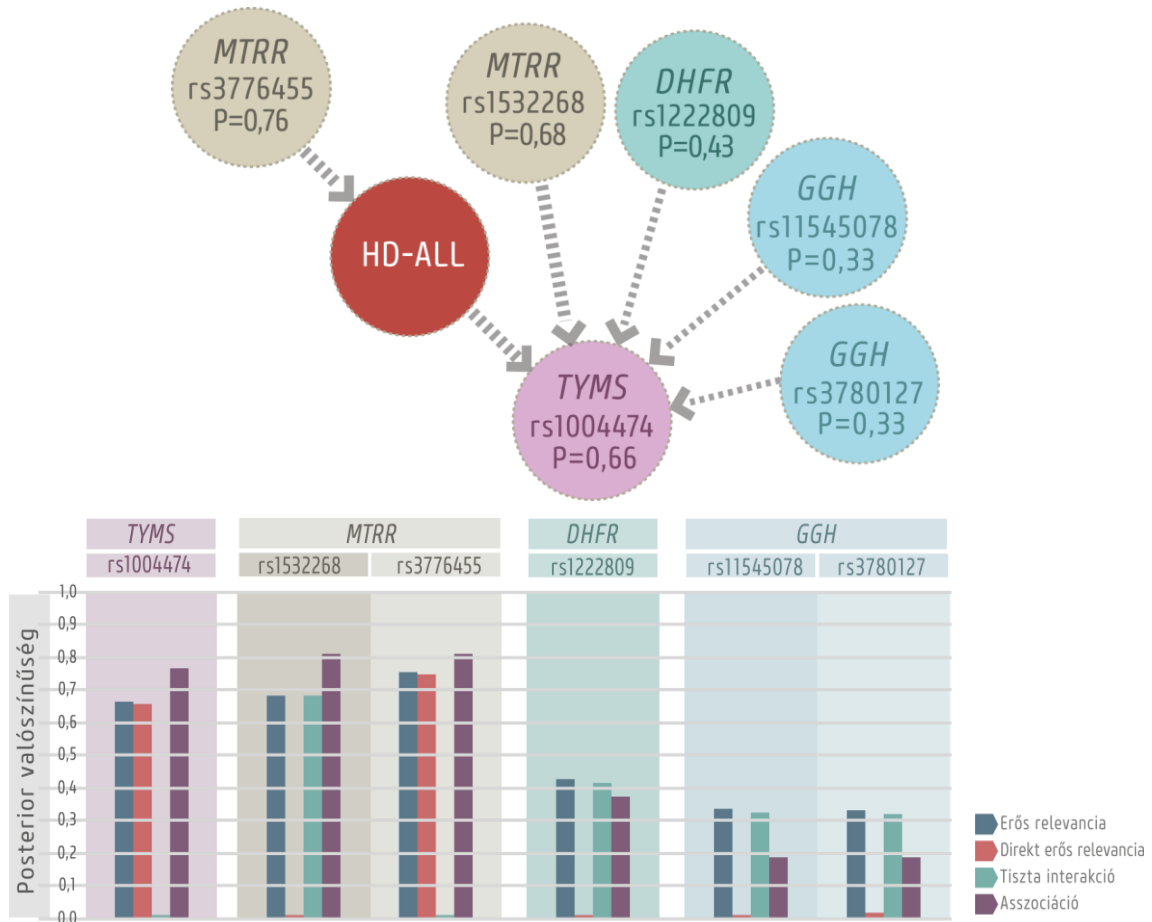
A legrelevánsabb változók számszerűsített *a posteriori* értékét a **17. táblázat** foglalja össze. A frekventista eredményekhez hasonlóan itt is az rs1076991 (*MTHFD1*) bizonyult a legrelevánsabbnak. A *posteriori* valószínűsége 0,65-nek adódott a teljes populációt vizsgálva, 0,53-nak B-ALL, 0,13-nak T-ALL és nullához közeli értéknek pedig a HD-ALL alcsoport elemzésekor.

**17. táblázat: Az erősen releváns változók *posterior* valószínűségi értékei a teljes és az alpopulációkban\***

Változók		ALL hajlam	B-ALL hajlam	T-ALL hajlam	HD-ALL hajlam
	Nem	0,01	0,05	<b>0,71</b>	0,05
rs1076991	<i>MTHFD1</i>	<b>0,65</b>	<b>0,53</b>	0,13	0,00
rs1004474	<i>TYMS</i>	0,00	0,00	0,26	<b>0,66</b>
rs1532268	<i>MTRR</i>	0,00	0,03	0,21	<b>0,68</b>
rs3776455	<i>MTRR</i>	0,35	0,08	0,02	<b>0,76</b>
rs1222809	<i>DHFR</i>	0,00	0,01	0,12	0,43
rs11545078	<i>GGH</i>	0,03	0,06	0,16	0,33
rs3780127	<i>GGH</i>	0,03	0,06	0,16	0,33

\*félkövér kiemeléssel *posterior* valószínűség>0,5

Hiperdiploid ALL hajlamra azonban az *MTRR* gén (rs3776455, rs1532268) és a *TYMS* (1004474) gén SNP-i bizonyultak relevánsnak 0,76; 0,68; ill. 0,66 *posterior* valószínűséggel (**13. ábra**). A hiperdiploid akut limfoid leukémia és a *GGH* génvariánsok (rs11545078, rs3780127) közötti relevancia valószínűségi értékei azonban igen alacsonyak voltak (**17. táblázat, 13. ábra**).



**13. ábra: A hiperdiploid akut limfoid leukémia (HD-ALL), mint célváltozó és a prediktor változók (polimorfizmusok) függőségi kapcsolati hálójának, valamint a hozzá tartozó posterior valószínűségi grafikon.** A hálózati struktúrában piros színnel jelöltük az HD-ALL hajlamot, a többivel pedig a génpolimorfizmusokat. A nyilak (élek) vastagsága arányos az *a posteriori* valószínűségükkel. Az alsó grafikonon a prediktor- és a célváltozók közötti különböző asszociációtípusok *posterior* valószínűsége látható. Kékkel az erős relevanciát, pirossal a direkt erős relevanciát, lilával az asszociációt, zölddel pedig a tiszta interakciót ábrázoltuk.

Az asszociációk részletesebb vizsgálatok a változók közötti különböző függőségi viszonyokat jellemezték. Az *MTHFD1* 2 SNP-je, az rs2236225 és rs745686 az ALL hajlammal 0,71 együttes valószínűséggel asszociált, annak ellenére, hogy az erős relevanciájuk valószínűsége nullához közeli értéknek bizonyult, a tranzitív relevanciájuk számolásakor pedig 0,61 értéket kaptunk. Ezek alapján feltételezhetjük, hogy a 2 SNP a legrelevánsabb rs1076991 (*MTHFD1*) polimorfizmuson keresztül fejti ki hatását a betegségre való hajlamban.

Hasonló tendenciát figyelhetünk meg az *MTRR* génvariánsok körében is, ahol a vizsgált SNP-k (rs2966952, rs1801394, rs326120, rs1532268, rs162036, rs3776455 és

rs10380) 0,65 valószínűséggel asszociálnak leukémiával (ALL), de csak az rs3776455 SNP-nek van nagyobb relevanciája a betegséghez. Így valószínűsíthető, hogy a prediktor változó-célváltozó közötti asszociációt ez utóbbi génvariáns befolyásolhatja elsősorban.

A B-ALL alcsoport elemzésekor az *MTHFD1* génben 3 polimorfizmus (rs1076991, rs2236225 és rs745686) asszociált a betegség hajlammal (*posterior* valószínűség= 0,57-0,67) az elsődlegesen domináns rs1076991 SNP-n keresztül. Az *SLCO1B1* (= *SLC21A6*) SNP-k (rs10841769, rs11045818, rs11045819, rs11045823, rs17328763, rs4149056, rs4363657) szintén asszociációt mutattak a teljes, illetve a B-sejtes ALL-lel is (*a posteriori* valószínűség: 0,51-0,55), azonban az erős relevancia valószínűségük csupán 0,25-nek adódott. Ez azt jelzi, hogy van ugyan asszociáció a változók és a kórkép között, de azt még nem tudjuk, hogy pontosan milyen a köztük lévő kapcsolati struktúra, függőségi viszony.

A *TYMS* gén SNP-i viszonylag magas valószínűséggel (0,64; 0,74) mutattak asszociációt T-sejtes ALL-lel, amelyek közül egyedül az rs2853533-nek és rs1004474-nek volt mérsékelten magas az erős relevancia *posterior* valószínűsége, ami utalhat arra, hogy a *TYMS* gén polimorfizmusai ez utóbbi kettőn keresztül hathatnak.

A hiperdiploid populáció modellezésekor a fentiekhez hasonlóan az rs1004474 variánson keresztül a *TYMS* gén (0,72-0,77), az rs1532268-en és rs3776455-en keresztül pedig az *MTRR* gén (0,79-0,82) többi SNP-je asszociált a betegséggel (HD-ALL).

A BN-BMLA elemzés során ebben az esetben is megvizsgáltuk az erősen releváns változók között fellépő interakciókat (strukturális és statisztikai) és redundanciákat.

A teljes-, B-, T-ALL-es populáció értékelésekor nem találtunk tiszta interakciós hatást egyik SNP-nél sem, ellenben a hiperdiploid csoporttal, ahol számos SNP-nél azonosítottunk tiszta interakciós hatást a strukturális interakciók vizsgálatakor. A **13. ábra** mutatja be a komplex interakciós térképet a HD-ALL hajlamra vonatkozóan. Látható, hogy az rs1532268 (*MTRR*), rs1222809 (*DHFR*), rs11545078 (*GGH*), és rs3780127 (*GGH*) tiszta interakcióban van a betegséggel. A számítások alapján azonban úgy tűnik, hogy ez a hatás csak az rs1004474 (*TYMS*) variánson keresztül

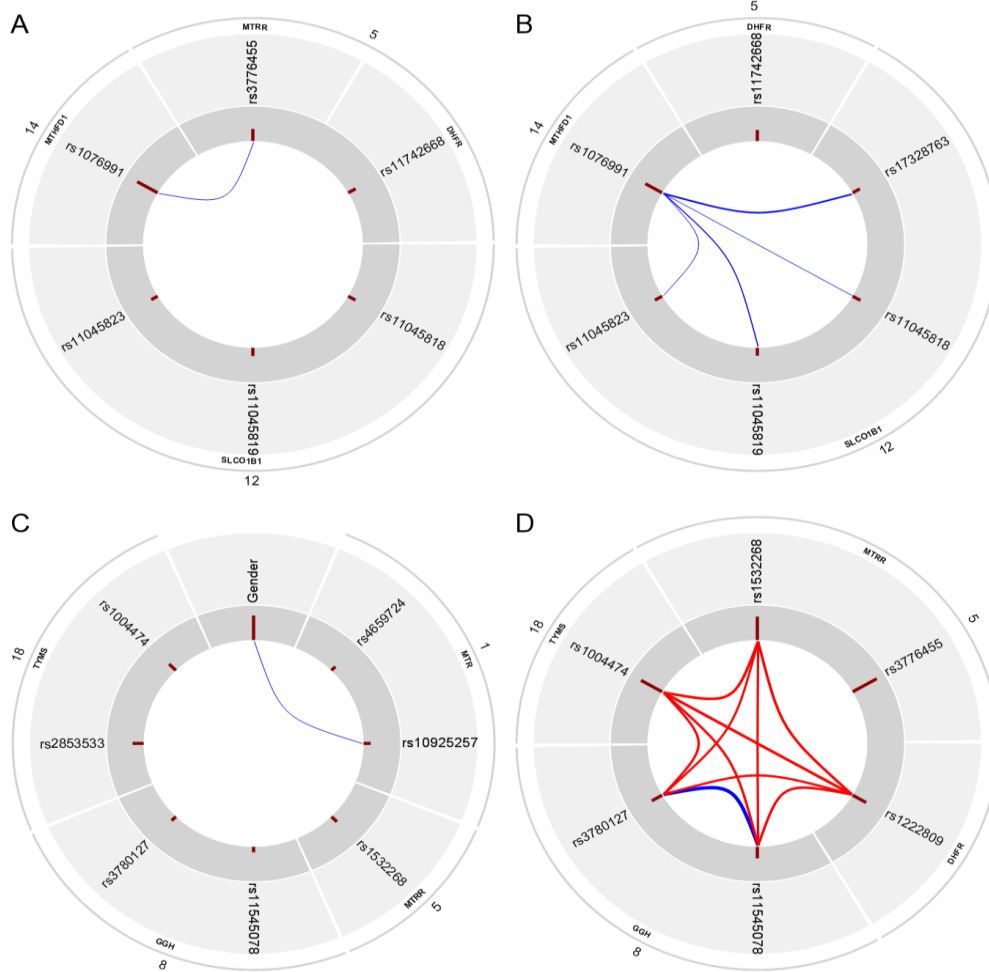


érvényesülhet, tehát a betegség szempontjából függő változóvá csak akkor válnak, ha a *TYMS* rs1004474 megjelenik.

A kapott eredmények pontos értékeléséhez azonban az is hozzátartozik, hogy a direkt élek a változók közötti valószínűségi kapcsolatot mutatják, nem jelentenek feltétlenül okozati összefüggést. Ez alapján az rs1532268 (*MTRR*) tulajdonképpen feltételesen független a betegségre való hajlamtól, azonban a *TYMS* gén rs1004474 polimorfizmusának ismeretében függő változóvá válik a kapcsolati struktúrában. Ily módon a két SNP (az rs1004474 és a „szülő” SNP-je az rs1532268) együttes hatása befolyásolja a gyermekkori akut limfoid leukémia hajlamot.

A statisztikai kölcsönhatások és redundanciák elemzése során (**14. ábra**) a teljes, a B-, és T -sejtes akut limfoid leukémiás populációkban csak néhány polimorfizmus esetében kaptunk nullától eltérő redundancia hányadost. A teljes populáció redundanciáinak grafikus megjelenítését a **14. ábra/A** (rs1076991-*MTHFD1* és rs3776455-*MTRR*; redundancy ratio; RR=0,12), a B-sejtes alcsoportét a **14. ábra/B** (rs1076991-*MTHFD1* és rs17328768, 11045819, rs11045818, 11045823 *SLCO1B1*; RR=0,11-0,24), és T-ALL esetében a **14. ábra/C** (nem és rs1092527 *MTR* közötti RR=0,11) panelje mutatja be.

A HD-ALL alcsoport (**14. ábra/D**) elemzése során az rs1004474-*TYMS*, rs1532268-*MTRR*, és rs1222809-*DHFR*, a *GGH* gén egyik, majd a másik SNP-jével alkottak egy interakciós csoportot (rs11545078: interaction ratio; IR=1,14 és rs3780127: IR=1,12). Továbbá a *GGH* génen belüli két SNP egymással redundánsnak bizonyult (RR=0,85).



**14. ábra:** A vizsgált polimorfizmusok közötti redundancia (kék görbe) és interakció (piros görbe) térkép a BN-BMLA módszer alapján. Az ábra a prediktor változók között fellépő kölcsönhatásokat (pirossal) és helyettesíthetőséget (késsel) mutatja be a teljes (A)-, B (B)-, T (C)-, HD (D)-ALL-re való hajlam esetén. A görbék vastagsága arányos a hatások erősségével. A sötétszürke belső körön látható bordó oszlopok magassága arányos a változók erős relevanciájának a *posteriori* valószínűségével. A vizsgált polimorfizmusok gén, ill. kromoszóma szerinti elhelyezkedése a külső, halványszürke gyűrűn látható.

A jelenlegi vizsgálatot kiegészítettük a bayes-i hatáserősség elemzés (Bayesian effect size analysis) eredményeivel is. Ennek lényege, hogy az ALL hajlam szempontjából releváns SNP-k esélyhányadosát (bayes-i OR) és a hozzájuk tartozó megbízhatósági tartományt (CR) is meg tudtuk adni a *posterior* valószínűségi értékek mellett.

A betegségre való hajlam és az rs1076991 (*MTHFD1*) SNP közötti szignifikáns asszociációt erősítette meg a bayes-i hatáserősség elemzés is. Az eredmények alapján mind az AG (CR=1,44-1,53), mind pedig a GG (CR=1,88-2,01) genotípusok

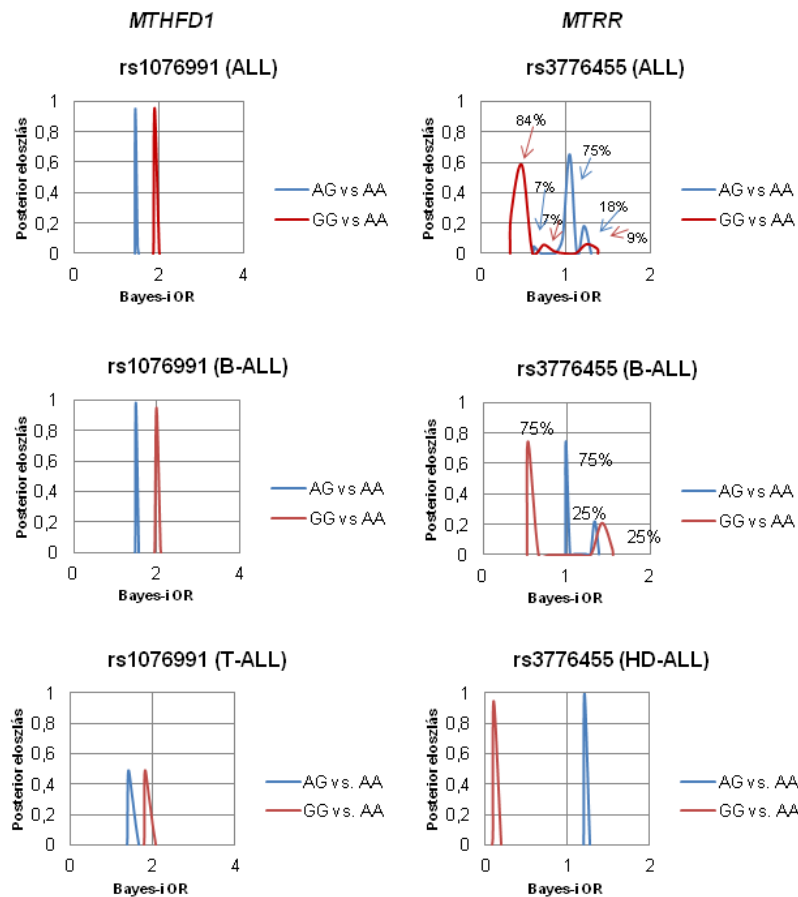
növelhetik az ALL-re való hajlamot (**18. táblázat**). Az esélyhányadosok *posterior* valószínűségi eloszlásának magas csúcsai („csúcsos görbék”; **15. ábra**) is a fenti SNP erős relevanciáját támasztják alá a teljes populációban. A B-ALL-es, illetve a T-ALL-es alpopulációban is hasonló eredményt kaptunk (B-ALL:  $CR_{AG}=1,48-1,56$ ;  $CR_{GG}=1,96-2,11$ ; T-ALL:  $CR_{AG}=1,38-1,68$ ;  $CR_{GG}=1,79-2,08$ ), bár T-ALL esetén az eredmény kevésbé volt erőteljes (**18. táblázat, 15. ábra**). A hiperdiploid alcsoportban nem tapasztaltunk releváns eredményt ebben az esetben.

**18. táblázat: Az MTHFD1 rs1076991 és MTRR rs3776455 polimorfizmusok esélyhányadosainak (OR) és 95%-os megbízhatósági tartományának (95% CR) értékei\***

Bayes-i OR: MTHFD1 (rs1076991)						
	ALL		B-ALL		T-ALL	
	95% CR	Valószínűség	95% CR	Valószínűség	95% CR	Valószínűség
AG vs AA	1,44-1,53	100%	1,48-1,56	100%	1,38-1,68	100%
GG vs AA	1,88-2,01	100%	1,96-2,11	100%	1,79-2,08	100%
Bayes-i OR: MTRR (rs3776455)						
	ALL		B-ALL		HD-ALL	
	95% CR	Valószínűség	95% CR	Valószínűség	95% CR	Valószínűség
AG vs AA	0,62-0,71	7%	0,99-1,04	75%	1,19-1,27	100%
	0,96-1,13	75%	1,33-1,39	25%		
	1,22-1,30	18%				
GG vs AA	0,34-0,60	84%	0,53-0,54	75%	0,09-0,20	100%
	0,73-0,99	7%	1,30-1,56	25%		
	1,25-1,39	9%				

\*CR: credibility region interval=credible interval, megbízhatósági tartomány, a konfidencia intervallum bayes-i megfelelője

Az rs3776455 (*MTRR*) polimorfizmus bayes-i hatáserősség elemzésekor (**18. táblázat, 15. ábra**) az SNP-hez tartozó esélyhányados (OR) *posterior* eloszlásának több lokális maximuma adódott, ami több, nem átfedő megbízhatósági intervallumot eredményezett mindkét genotípus esetén (AG vs. AA: 0,62-0,71; 0,96-1,13; 1,22-1,30 és GG vs. AA: 0,34-0,60; 0,73-0,99; 1,25-1,39). Ez azt mutatja, hogy a különböző függőségi modellek legalább három különböző csoportba sorolhatók, amely csoportok mindegyike különböző hatáserősségeket eredményez.

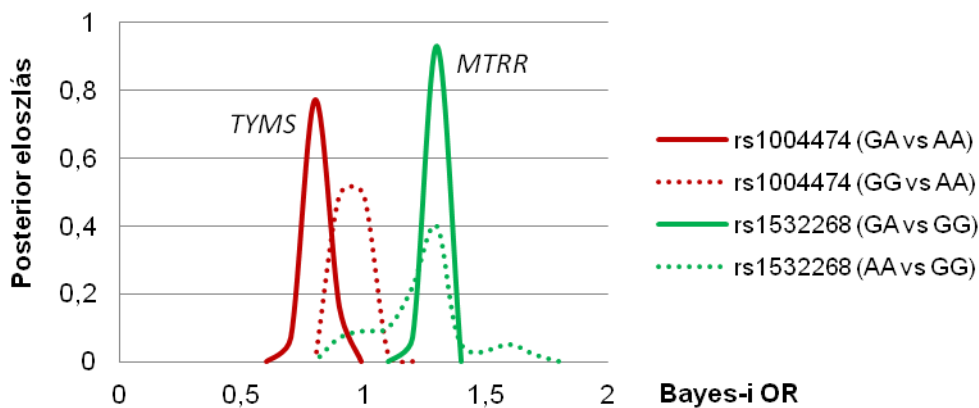


**15. ábra: Az rs1076991 (*MTHFD1*) és rs3776455 (*MTRR*) bayes-i OR-inak posterior eloszlási görbéi a teljes betegcsoportban, ill. az alpopulációkban.** Mindegyik görbe a 95%-os a megbízhatósági tartományon (CR) belüli lehetséges OR értékek vázlatos hisztogramját mutatja az AG és GG genotípusokra vonatkoztatva (az AA referenciaként szolgált). A bayes-i OR-k a vízszintes, a hozzá kapcsolódó valószínűségi értékek pedig a függőleges tengelyen láthatók.

Az AG genotípus esetén a modellek legnagyobb része (75%-a) semleges hatáserősséget eredményezett (CR=0,96-1,13), ami egy viszonylag nagy *a posteriori* valószínűségű nem releváns hatásra utalt. A GG genotípus csoport fő esélyhányadosa a megbízhatósági tartományával (CR<sub>GG</sub>=0,34-0,60) együtt relatíve nagy valószínűséggel annak védő hatását erősítette meg. Érdekesség, hogy ugyanennél a valószínűségi modellnél, annak igen kis százalékában (9%) hajlamosító hatást (CR<sub>GG</sub>=1,25-1,39) is megfigyelhettünk. Ez a jelenség azzal is magyarázható, hogy bizonyos körülmények (környezeti hatás) mellett egy komplexebb mechanizmus (más,

eddig nem ismert genetikai hatások) alapján az adott genotípus rizikó tényezőként is viselkedhet a betegség patogenezisében.

Ehhez hasonló bizonytalanságot figyeltünk meg B-ALL-es alcsoport eredményei esetében is, habár itt a bayes-i OR *posterior* eloszlásában csupán bimodális („kétcsúcsú”) eltérés mutatkozott. Az AG genotípus semleges hatása (CR=0,99-1,04) mérsékelten nagy valószínűséggel (0,75) fordult elő a B-ALL populációban, míg a GG esetén azonos valószínűséggel (0,75), de releváns védő hatást (CR=0,53-0,54) mutattunk ki. Az *MTHFD1* rs1076991 variánssal ellentétben az *MTRR* rs3776455-nél a HD-ALL elemzésekor releváns eredményeket kaptunk. Míg az AG genotípusú egyéneknél megnövekedett (1,19-1,27) ALL rizikót, addig a GG csoportban erős védő hatást (0,09-0,20) tapasztaltunk a betegséggel szemben.



**16. ábra:** Az rs1004474 (*TYMS*) és rs1532268 (*MTRR*) hatása a bayes-i esélyhányadosra (OR)

A korábbi eredményeknél (**13. ábra**), a hiperdiploid csoport elemzésekor már említett két SNP (*TYMS* rs1004474 és *MTRR* rs1532268) egyéni (**16. ábra**) és együttes (**19. táblázat**) hatását is vizsgáltuk a bayes-i hatáserősség módszerével. Az rs1004474 SNP-nek elhanyagolható hatását tapasztaltuk az ALL hajlamra a heterozigóta (CR<sub>GA</sub>=0,75-0,97) és vad homozigóta (CR<sub>AA</sub>=0,94-1,10) csoportoknál is. Az rs1532268 polimorfizmus heterozigóta (CR<sub>GA</sub>=1,28-1,40) és vad homozigóta (CR<sub>GG</sub>=0,97-1,72) variánsai azonban enyhén emelkedett rizikótényezőként jelentek meg a HD-ALL-t illetően. A két SNP együttes esélyhányadosát domináns modellt (gyakori vs. heterozigóta + ritka) alkalmazva számoltuk ki. Az rs1004474 AA és

rs1532268 GG két variánsának együttes hatása bizonyult a legnagyobb rizikójúnak (0,23) a HD-ALL hajlam vonatkozásában, amely érték meghaladta az *MTRR* rs1532268 A alléljának egyéni hajlamosító hatását (0,14). Ebből látható, hogy a bayes-i hatáserősség elemzés az egyváltozós modellnél sokkal komplexebb kapcsolati struktúrák, viszonyok leírására is alkalmas, hiszen míg az egyváltozós elemzés során kimutattuk az A alléllal rendelkezőknél (*MTRR* rs1532268) a nagyobb rizikóhajlamot, addig a többváltozós értékeléskor egy sokkal sokrétűbb eredményt kaptunk: nevezetesen az *MTRR* rs1532268 A allélja védő hatást mutatott a *TYMS* rs1004474 AA variánst hordozó egyéneknél (közös OR=0,32; félkövér kiemeléssel a **19. táblázat**-ban).

**19. táblázat: Az rs1004474 és rs1532268 polimorfizmusok bayes-i hatáserősség elemzése után kapott közös OR értéke (joint OR)\***

<i>TYMS</i> rs1004474 (A/G)*	<i>MTRR</i> rs1532268 (G/A)*	HD-ALL rizikó feltételes valószínűsége	Joint OR**
AA	GG	0,23	1,00
AA	AG+AA	0,09	<b>0,32</b>
GA+GG	GG	0,08	0,29
GA+GG	AG+AA	0,17	0,70

\*vadás/ritka allél; \*\*Joint OR – Joint odds ratio, mindkét SNP közös homozigóta eseteit alapul véve

#### 5.4 FARMAKOGENETIKAI VIZSGÁLAT–*ABCCI*

A dolgozat keretein belül az *ABCCI* gén 9 vizsgált polimorfizmusa közül csak a szignifikánsnak bizonyult rs3743527 SNP genotípus- és allélfrekvenciáit (**20. táblázat**), illetve statisztikai elemzésének eredményeit (**21. táblázat**) mutatom be a vizsgált akut limfoid leukémiás gyermekpopuláción. A farmakogenetikai tanulmányánál az antraciklinek szívkárosító hatása, mint a kemoterápia során kialakult mellékhatás és az *ABCCI*, mint a gyógyszer transzportban fontos transzportfehérjéjé kódoló gén közötti összefüggést vizsgáltuk.

**20. táblázat: Az *ABCCI* polimorfizmusának genotípus- és allélfrekvenciái**

Gén	SNP	Allél (1/2)	Genotípus	Genotípus	Genotípus	N (%) <sup>2</sup>	MAF (%) <sup>3</sup>
			N 11 (%) <sup>1</sup>	N 12 (%) <sup>1</sup>	N 22 (%) <sup>1</sup>		
<i>ABCCI</i>	rs3743527	C/T	140 (61)	75 (33)	13 (6)	228 (97)	22

<sup>1</sup>11: a vad allélra homozigóta, 12: heterozigóta; 22: a ritka allélra homozigóta; <sup>2</sup>N: sikeresen genotipizált betegek száma (%); <sup>3</sup>MAF: Minor allélfrekvencia (%)

Arra kerestük a választ, hogy az adott polimorfizmussal rendelkező leukémiás (ALL) gyermekekben hogyan változik a szívfunkciót jellemző bal kamrai lineáris ejekciós frakció (linEF) értéke az antraciklinekkel történő kezelés hatására. A szívfunkció változását a három időpontban (diagnóziskor, záróvizsgálatkor, utolsó *follow-up*) mért linEF érték segítségével követtük nyomon. A diagnóziskori szívultrahangos adatok alapján számolt linEF értékek nem tértek el számottevően a rs3743527 polimorfizmus egyik genotípuscsoportjában (CC, CT, TT) sem (**21. táblázat**). A kezdeti linEF érték mérésének jelentősége abban áll, hogy így tudjuk szűrni a polimorfizmus esetleges kezelés előtti hatását a vizsgált klinikai paraméterre. Az antraciklines kezelés után, a záróvizsgálatkor mért linEF értékek szignifikáns eltérést mutattak a genotípuscsoportok között. A TT típusú betegeknél jelentősen alacsonyabb (34%,  $p=0,001$ ) volt a linEF érték, mint a másik két genotípuscsoportnál (CC-39,5%, CT-39,3%; **21. táblázat**). Az utolsó szívultrahang mérés alapján számolt linEF értékeknek, a CC, CT és TT genotípusú betegeknél az előzőekhez hasonló tendenciát figyeltünk meg. Azaz az rs3743527 TT genotípusúak linEF értéke alacsonyabb (35,3%) volt a vad homozigóta (38,7%) és heterozigóta (38,9%) egyedekénél. Ez a különbség nem tért el szignifikánsan, amit az alacsonyabb esetszám is okozhatott.

**21. táblázat: A három időpontban mért lineáris ejekciós frakció értékek az rs3744527 polimorfizmus esetében**

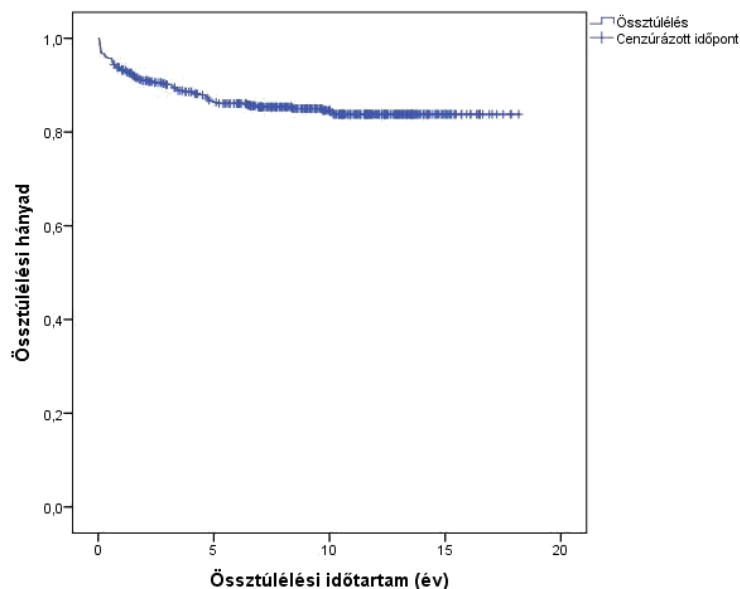
SNP	Mérés	N <sub>össz</sub>	linEF <sub>11</sub> *	SD	N <sub>11</sub> **	linEF <sub>12</sub> *	SD	N <sub>12</sub> **	linEF <sub>22</sub> *	SD	N <sub>22</sub> *	p
rs3743527 ( <i>ABCCI</i> )	linEF dg	131	39,7	5,6	79	40,1	7,1	43	38,5	4,5	9	0,5
	linEF za	168	<b>39,5</b>	5,8	103	<b>39,3</b>	6,4	54	<b>34,0</b>	4,4	11	<b>0,001</b>
	linEF ut	161	38,7	4,9	108	38,9	5,1	47	35,3	3,6	6	0,2

**21. táblázat rövidítéseinek folytatása:** a lineáris ejekciós frakció értékek átlaga az adott genotípusú betegeknél. 11: a gyakori allélra homozigóta, 12: heterozigóta; 22: a ritka allélra homozigóta. \*\*Esetszám az 11, 12, 22 genotípus csoportokban; A linEF érték a csoport átlagát jelöli (%). linEF: lineáris ejekciós frakció, linEF dg.: a diagnóziskor meghatározott linEF; linEF za.: a záróvizsgálatkor meghatározott linEF; linEF ut.: az utolsó szívultrahangos mérés alapján számolt linEF, N: mintaszám, SD: szórás

## 5.5 A KIVÁLASZTOTT POLIMORFIZMUSOK TÚLÉLÉSRE GYAKOROLT HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA A BETEGPOPULÁCIÓBAN

### 5.5.1 A FREKVENTISTA ELEMZÉS EREDMÉNYE

Az akut limfoid leukémiás populációban az alapvető statisztikai kérdések mellett az 5-éves össz (OS)-, és eseménymentes (EFS) túlélést, valamint az azt befolyásoló tényezőket - mint pl. SNP-k és klinikai paraméterek - is vizsgáltam. Az összes leukémiás beteg 95%-ától állt rendelkezésre megfelelő adat, így ezen a populáción (n=516) tudtam elvégezni az adatfeldolgozást. Az ösztülélés 85,5% volt, a teljes populációban (**17. ábra**).

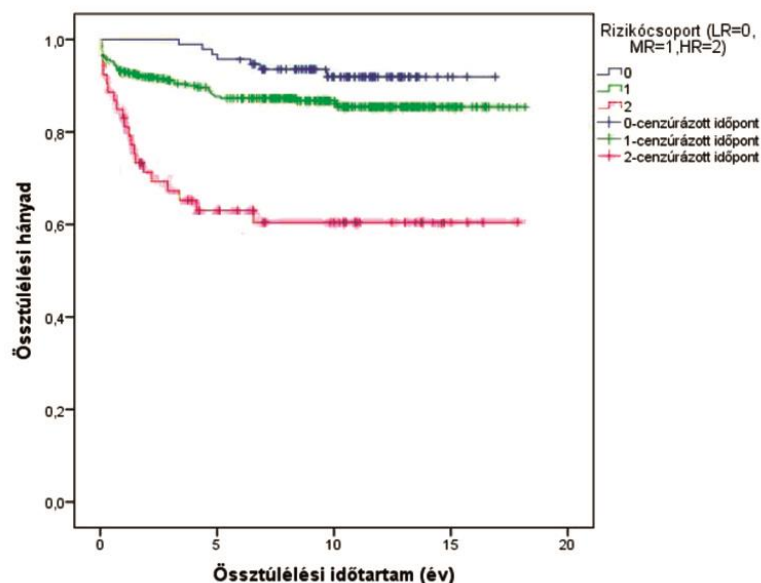


**17. ábra:** Az 5-éves ösztülélés a vizsgált ALL-es populációban. Cenzúrázott időpont, az utolsó nyomonkövetési időpont, ahol a vizsgált személynél még nem következett be esemény (OS-nél halál, EFS-nél halál, vagy recidiva).

Nem találtam szignifikáns eltérést sem a nem (fiú, lány), sem az alkalmazott protokoll (BFM 90/95, ALL IC 2002), sem pedig a különböző immunfenotípusú (B-, T-ALL)



csoporthoz. Az 5-éves túlélési hányad azonban szignifikánsan különbözött ( $p=1E-07$ ) a különböző rizikócsoporthoz besorolású betegek esetében (LR-92,6%, MR-87,0%, HR-62,3%; **18. ábra**).



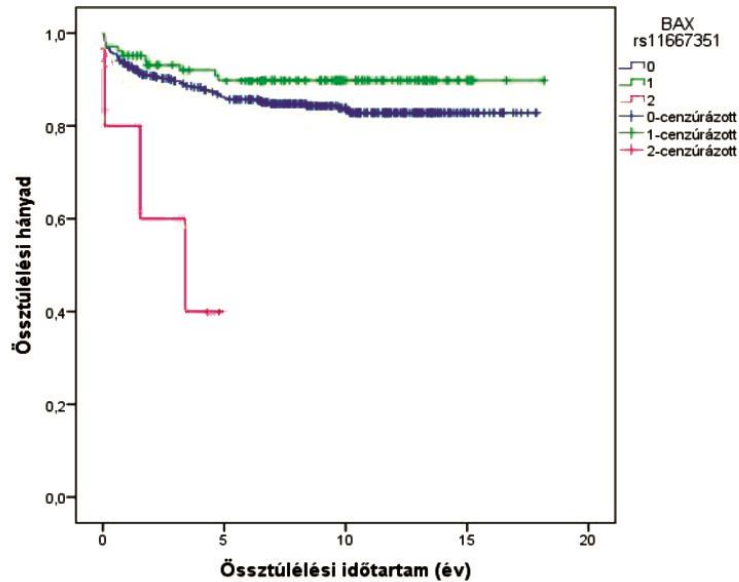
**18. ábra: A rizikócsoporthoz (LR-alacsony, MR-közepes, HR-magas rizikójú) hatása az 5-éves össz-túlélésre a vizsgált ALL-es populációban.** Cenzúrázott időpont, az utolsó nyomonkövetési időpont, ahol a vizsgált személynél még nem következett be esemény (OS-nél halál, EFS-nél halál, vagy recidiva).

Az eseménymentes túlélés vizsgálatakor a betegek jellemző átlagos túlélési hányada 81,0% volt. Itt sem találtam jelentős különbséget a betegek túlélési hányada és a vizsgált klinikai paraméterek között. Szignifikáns különbséget ( $p=1E-07$ ) - az össz-túléléshez hasonlóan - ebben az esetben is a különböző rizikócsoporthoz összehasonlító elemzésekor kaptam (LR-90,4%, MR-82,6%, HR-60,4).

A kétféle túlélési értékeket megvizsgálva látható, hogy az eseménymentes túlélés értékei alacsonyabbak, „rosszabbak” az össz-túléléshez viszonyítva. Ennek oka, hogy az eseménymentes túlélés számolása „szigorúbb” feltételekhez kötött, mivel itt a kérdés a diagnózistól számított utolsó nyomonkövetési (cenzúrázott) időpontban nem az, hogy él-e a beteg vagy sem (össz-túlélés), hanem hogy volt-e bármiféle esemény, azaz halálos kimenetel, vagy akár visszaesés (recidiva).

A vizsgált polimorfizmusok közül a túlélés szempontjából 4 gén 5 SNP-je (*CEBPA* rs10403561, rs874966, *STAT6* rs3024979, *BAX* rs11667351, *SHMT1* rs9909104)

bizonyult nominálisan szignifikánsnak. Ezek közül is a *BAX* gén rs11667351 SNP-je mutatta a legerősebb asszociációt ( $p=0,001$ ) a túléléssel. Az alábbi ábrán (**19. ábra**) látható, hogy a mutáns homozigóta (GG) forma nagyon alacsony (40%) túlélési aránnyal függ össze.



**19. ábra:** A *BAX* gén rs11667351 SNP-jének hatása a populáció 5-éves ösztúlélésére (0 vad-TT, 1 hordozó-TG, 2 mutáns-GG). Cenzúrázott időpont, az utolsó nyomkövetési időpont, ahol a vizsgált személynél még nem következett be esemény (OS-nél halál, EFS-nél halál, vagy recidiva).

Megfigyelhető volt továbbá az is, hogy a folát anyagcserében szerepet játszó *SHMT1* gén rs9909104 polimorfizmusa esetében a mutáns CC (83,9%) genotípusú egyének ösztúlélési esélye alacsonyabb volt a vad homozigóta TT (88,8%) genotípusúakhoz képest.

Az össz-, és eseménymentes túlélés nominálisan szignifikáns „p” értékeit tekintve nem volt számottevő különbség, így a dolgozatban csak az ösztúlélés adatait tüntettem fel (**22. táblázat**).

22. táblázat. A vizsgált SNP-k hatása a populáció 5-éves ösztülélésére

SNP	Allél* (v/m)	Kód**	Populáció jellemzői				Log Rank Teszt				$\chi^2$	p
			Össz. eset	Össz. esemény	Cenzúrázott		Átlagok					
					Eset	%	Becsült	Std. hiba	95% CI Alsó Felső határ határ			
<b>rs11667351 (BAX)</b>	T/G	0	405	62	343	84,7%	15,29	0,30	14,70	15,88	14,95	<b>0,001</b>
		1	103	10	93	90,3%	16,52	0,50	15,54	17,50		
		2	5	3	2	40,0%	2,92	0,83	1,30	4,54		
		Totál	513	75	438	85,4%	15,67	0,27	15,14	16,19		
<b>rs10403561 (CEBPA)</b>	A/G	0	169	35	134	79,3%	14,42	0,51	13,42	15,43	6,93	0,03
		1	234	26	208	88,9%	16,00	0,34	15,33	16,67		
		2	109	14	95	87,2%	15,86	0,58	14,73	16,99		
		Totál	512	75	437	85,4%	15,66	0,27	15,14	16,19		
<b>rs874966 (CEBPA)</b>	A/G	0	166	35	131	78,9%	14,36	0,52	13,34	15,38	9,09	0,01
		1	230	23	207	90,0%	16,19	0,33	15,54	16,84		
		2	111	16	95	85,6%	15,57	0,60	14,40	16,75		
		Totál	507	74	433	85,4%	15,67	0,27	15,14	16,20		
<b>rs3024979 (STAT6)</b>	T/A	0	402	54	348	86,6%	15,60	0,29	15,04	16,16	8,34	0,02
		1	103	17	86	83,5%	15,31	0,63	14,06	16,55		
		2	6	3	3	50,0%	8,20	2,75	2,81	13,58		
		Totál	511	74	437	85,5%	15,69	0,27	15,17	16,21		
<b>rs9909104 (SHMT1)</b>	T/C	0	303	34	269	88,8%	16,2	0,30	15,6	16,9	6,40	0,04
		1	177	35	142	80,2%	14,6	0,50	13,6	15,5		
		2	31	5	26	83,9%	11,7	0,80	10,2	13,2		
		Totál	511	74	437	85,5%	15,7	0,30	15,2	16,2		

\*Vad/gyakori \*\* (0), Heterozigóta (1), Mutáns/ritka (2)

### 5.5.2 A BAYES-I ELEMZÉS EREDMÉNYE

A Bayes – háló alapú bayes-i többszintű relevancia analízis módszerével is értékeltük a polimorfizmusok és a különböző kofaktorok hatását a túlélésre.

A **23. táblázat** foglalja össze a túlélés szempontjából legrelevánsabb változókat és azok *a posteriori* (vagy *posterior*) valószínűségét.

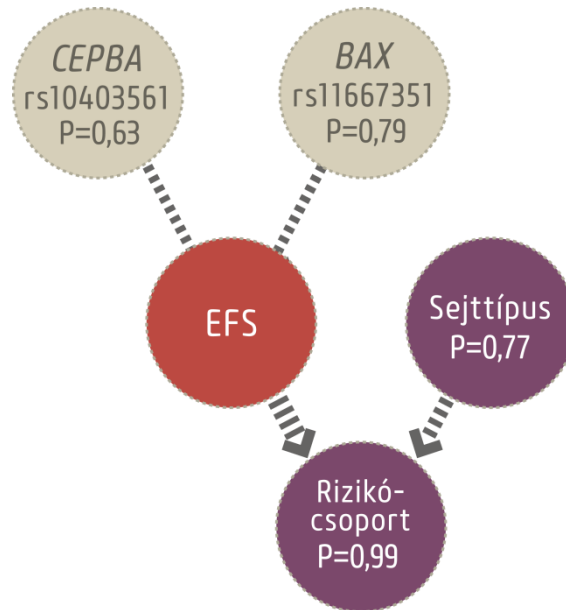
**23. táblázat: Az eseménymentes-, és ösztúlélés legrelevánsabb változóinak posterior valószínűségi értékei\***

Változók	EFS			OS		
	Erős relevancia	Direkt relevancia	Tiszta interakció	Erős relevancia	Direkt relevancia	Tiszta interakció
Sejttípus (B-,T-ALL)	<b>0,77</b>	0,09	<b>0,68</b>	<b>0,79</b>	0,12	<b>0,67</b>
Rizikócsoport	<b>0,99</b>	<b>0,99</b>	0,00	<b>1,00</b>	<b>1,00</b>	0,00
rs4509706 <i>ARID5B</i>	0,11	0,03	0,08	<b>0,54</b>	0,26	0,28
rs703817 <i>STAT6</i>	0,34	0,32	0,02	<b>0,67</b>	<b>0,65</b>	0,02
rs10403561 <i>CEBPA</i>	<b>0,63</b>	<b>0,63</b>	0,00	<b>0,62</b>	<b>0,62</b>	0,00
rs11667351 <i>BAX</i>	<b>0,79</b>	<b>0,78</b>	0,01	<b>0,87</b>	<b>0,87</b>	0,01

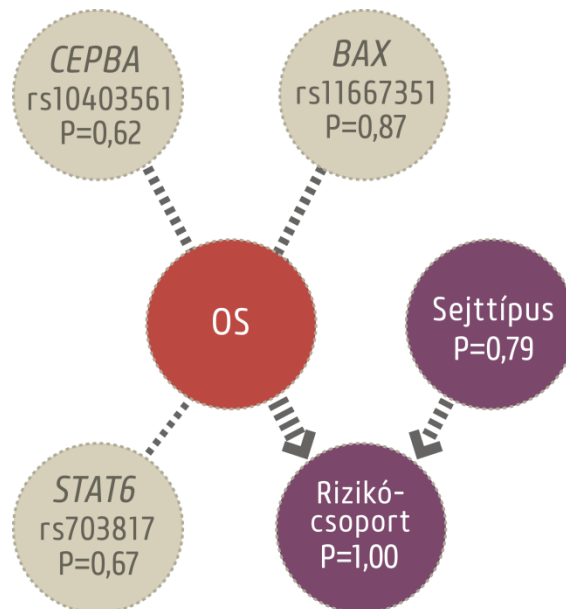
\*Releváns értékek félkövér kiemeléssel

Mindkét esetben (EFS és OS) a sejttípus ( $P \sim 0,8$ ) és a rizikócsoport ( $P \sim 1,0$ ) bizonyult erősen relevánsnak a túlélés szempontjából. Az erős relevancia kapcsolatát tovább elemezve, látható, hogy a sejttípus inkább tiszta interakcióban ( $P_{EFS}=0,68; P_{OS}=0,67$ ) van a túléléssel, mintsem direkt módon ( $P_{EFS}=0,09; P_{OS}=0,12$ ) hatna a célváltozóra.

Ez azt jelenti, hogy a sejttípus a rizikócsoporton „keresztül hathat”, azaz a sejttípus csak akkor válik befolyásoló tényezővé, ha a rizikócsoport besorolás - mint komplexebb faktor, amit több klinikai paraméter, többek között a sejttípus is meghatároz - ismert (**20. ábra, 21. ábra**).



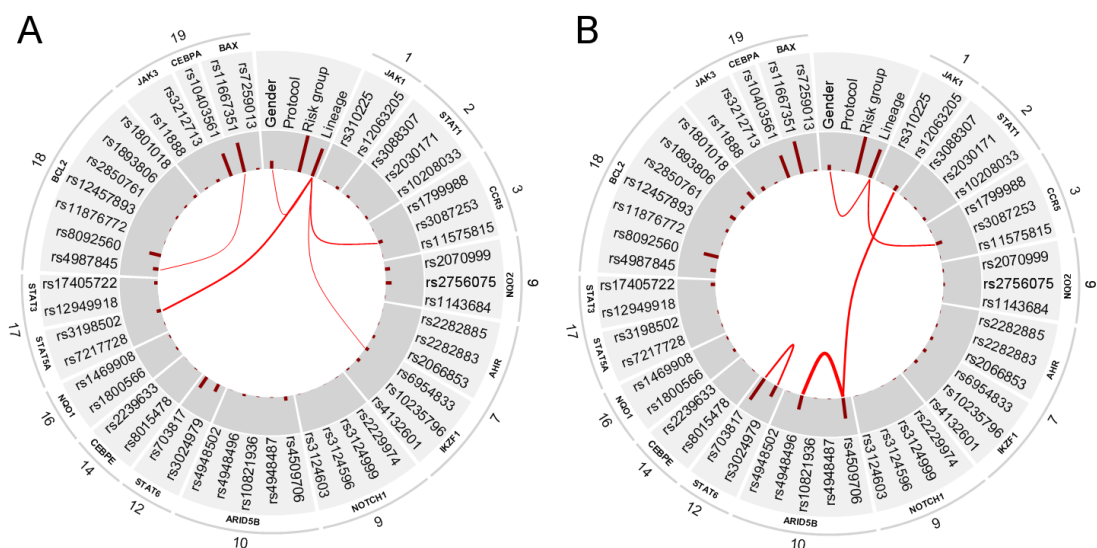
**20. ábra: Az erősen releváns változók algráfja az eseménymentes- (EFS) tekintetében.** Az élek vastagsága arányos az *a posteriori* valószínűségi értékekkel. Az élek iránya csak a valószínűségi kapcsolatokra utal, nem jelenti feltétlenül az ok okozati összefüggés irányát. Csak a  $P > 0,5$  értékű élek láthatóak. Piros színnel a célváltozókat, lilával a fenotípusos változókat, sárgával pedig a polimorfizmusokat jelöltük.



**21. ábra: Az erősen releváns változók algráfja az ösztülélés (OS) tekintetében.** Az élek vastagsága arányos az *a posteriori* valószínűségi értékekkel. Az élek iránya csak a valószínűségi kapcsolatokra utal, nem jelenti feltétlenül az ok okozati összefüggés irányát. Csak a  $P > 0,5$  értékű élek láthatóak. Piros színnel a célváltozókat, lilával a fenotípusos változókat, sárgával pedig a polimorfizmusokat jelöltük.

A vizsgált genetikai faktorok közül a *BAX* gén rs11667351 ( $P_{EFS}=0,79$ ;  $P_{OS}=0,87$ ) és a *CEBPA* gén rs10403561 ( $P_{EFS}=0,63$ ;  $P_{OS}=0,62$ ) polimorfizmusa bizonyult magas valószínűségi értékkel erősen relevánsnak az eseménymentes- és az ösztülélés szempontjából. A *STAT6* rs703817 SNP  $P=0,67$  valószínűséggel erősen releváns az ösztülélés tekintetében, azonban az eseménymentes túlélésre nem volt jelentős hatása ( $P_{EFS}=0,34$ ).

A BN-BMLA módszerrel modellezni tudtuk a túlélés függvényében a változók közötti interakciókat és redundanciákat, melyet a **22. ábra** mutat be. Redundancia egyik változó között sem lépett fel. Gyengébb kölcsönhatásokat azonban több faktor (pl. *BAX-BCL2* génpolimorfizmusok, Sejtípus-*STAT5A/CCR5/IKZF1*/nem között) esetében is megfigyelhettünk.



**22. ábra: A vizsgált változók és az eseménymentes- (EFS), valamint ösztülélés (OS) közötti interakciós térkép.** Az ábrák a változók és az EFS (A), illetve OS (B) között fellépő kölcsönhatásokat (piros színű görbék) mutatják be. A görbék vastagsága arányos a kölcsönhatások erősségével. A sötétszürke belső körön látható bordó oszlopok magassága arányos a változók erős relevanciájának a *posteriori* valószínűségével. A vizsgált polimorfizmusok gén, ill. kromoszóma szerinti elhelyezkedése a külső, halványszürke gyűrűn látható.

## 6 MEGBESZÉLÉS

Az első három vizsgálat célja a gyermekkori akut limfoid leukémiára való hajlam, és a kiválasztott gének és variánsaik közötti összefüggések vizsgálata volt. Az eredmények értékelése a II. és III. esetben a klasszikus statisztikai technikák mellett, Bayes-háló alapú bayes-i többszintű relevanciaanalízis módszerével is kiegészült. A további vizsgálatok kiterjedtek egy gén polimorfizmusainak farmakogenetikai szerepének elemzésére is a kemoterápia során alkalmazott antraciklinek okozta kardiotoxicitás, mint mellékhatás függvényében. Végül az utolsó vizsgálat során a genetikai faktorok és az adott ALL-es populáció túlélése közötti kapcsolatot is elemeztem.

### 6.1 JELÖLT GÉN ASSZOCIÁCIÓS VIZSGÁLAT I – *GSTT1*, *GSTM1*, *CCR5*

Munkám során a glutation-S-transzferáz gének (*GSTT1*, *GSTM1*) inaktív null variánsai, valamint a C-C kemokin receptor 5 (*CCR5*) delta32 polimorfizmusa, ill. genotípus kombinációik és a magyar gyermekpopuláció akut limfoid leukémiára (ALL) való hajlama közötti összefüggéseket vizsgáltam. A fenti gének funkcionális polimorfizmusai gyakoriak a humán (európai eredetű) populációban és befolyásolhatják az ALL-re való hajlamot, valamint a kemoterápiás kezelésre adott választ. A témával foglalkozó tanulmányok egyik része talált, míg mások nem, vagy csak gyengébb összefüggést azonosítottak az ALL-re való hajlam kialakulásában (69, 176-179). Az ellentmondásos eredmények felvetették a magyar populáció vizsgálatát is.

A glutation-S-transzferázok (GST) egy olyan, nagy szupercsaládba tartozó enzimek, melyeknek fontos szerepük van a karcinogének, egyes terápiás gyógyszerek és környezeti toxinok detoxifikálásában (180). A sejteket károsító oxidatív hatások ellen (pl. kemoterápiás kezelésben az antraciklinek) fontos védelmi rendszer a GST-k glutation redox ciklusa. A glutation az egyik legfontosabb sejten belüli (pl. szívműködésben) antioxidáns, az oxidatív stresszel szembeni védekezés lényeges eleme (177, 181).

Az általam is vizsgált *GSTM1* ( $\mu 1$ ) és *GSTT1* ( $\theta 1$ ) gének null polimorfizmusai – a gén deléciója következtében funkcionalitását veszti az enzim (182, 183)– megglehetősen gyakorinak mondhatók az európai eredetű populáció körében. A fent említett null polimorfizmusok valamelyikére a populáció kb. 30% (*GSTT1*) - 50% (*GSTM1*)-a homozigóta, szemben az ázsiai 14-22%, vagy az afrikai 37-25% gyakorisággal (184, 185).

A *GSTM1* és *GSTT1* molekulák fontos detoxifikáló szerepével állnak összhangban azok az eredmények, amelyek az enzimek funkcióvesztését okozó génvariánsok és az emelkedett gyógyszer toxicitás (pl. antraciklinek), valamint a rákos megbetegedések (pl. vastagbélrák, akut limfoid/mieloid leukémia, mellrák, tüdőrák, húgyúti daganatok), illetve a rosszabb túlélési arány között szignifikáns kapcsolatot találtak (179, 182, 186-194).

A *CCR5* delta32 polimorfizmus elemzése alapvetően két célt szolgált: az irodalomban fellelhető információk alapján, valamint technikai okok miatt a *GST* gének PCR reakciójához belső kontrollként is alkalmaztam.

A C-C kemokin receptor 5 (*CCR5*) membrán fehérje a béta kemokin receptor család egyik tagja. Jelentős szabályozó funkciójuk van a kemokineken keresztül történő apoptózisban, T-sejt differenciálódásban, hematopoézisben (leukocita forgalom irányítása) és a leukémiás sejtek szöveti infiltrációjában, a tumor patogenezisben. Számos rákos kórképben megfigyelték az extrém módon megnövekedett kemokinek és receptoraik jelenlétét (195, 196). Állatmodelleken végzett kísérletek azt mutatták, hogy a jelenlévő kemokinek közvetlenül a tumorsejtekre vagy a tumor-infiltrációban szereplő leukocitákra hatnak, azonban a rákos folyamatok által termelt kemokineknek más feladatuk is van: 1. a tumorba történő direkt leukocita infiltráció, 2. a tumorelles immunválasz, 3. a tumor angiogenezisének, fejlődésének, túlélésének, 4. rákos sejtek migrációjának szabályozása (197-201).

A *CCR5* delta32 génvariánssal kapcsolatos egyik legismertebb eredmény a HIV infekcióval szembeni rezisztencia felfedezése (202). Az irodalmi adatok alapján azonban szerepe lehet továbbá a koszorúér megbetegedéseknél - mint pl. miokardiális infarktus (203) -, továbbá hólyagrák kialakulásában (hajlamosít) (204), a Nyugat-nílusi vírus (WNV) (205) elleni rezisztenciában, vagy asztmában (véd). Az epehólyagrakos megbetegedéseinél különösen, ha az dohányzással párosult szintén



kimutatták a hajlamosító hatását (206). Bracci és munkatársai azonban a polimorfizmus védő funkcióját találták férfi Non-Hodgkin limfómás betegekben (207).

A vizsgálat során nem találtam szignifikáns asszociációt a *GSTM1* null, a *GSTT1* null vagy a *CCR5* delta32 génpolimorfizmusok, illetve genotípus kombinációik és az ALL kialakulásának kockázata között.

Mindemellett a vizsgált klinikai paraméterek (pl. nem, hiperdiploidia, immunfenotípus) sem befolyásolták szignifikánsan az vizsgált populáción a betegségre való hajlamot, habár a fiúk esetében gyenge kockázatemelkedést tapasztaltam, ami egy nem-által meghatározott folyamatra utalhat, így ennek tisztázása érdekében érdemes lehetne a jövőben egy kibővített ALL populáción is elvégezni az adatelemzést.

## **6.2 JELÖLT GÉN ASSZOCIÁCIÓS VIZSGÁLAT II – *ARID5B*, *IKZF1*, *STAT3***

A II. tanulmányban vizsgált 62 SNP-ből az *IKZF1* és *ARID5B* gének 3-3 SNP-jénél – amelyek kapcsoltsági egyenlőtlenségben voltak egymással – találtam szignifikáns asszociációt a gyermekkori ALL hajlammal. Mindkét esetben a B-sejtes alpopulációban, a ritka allél homozigóta formájánál kaptam erősebb szignifikanciát. Az *ARID5B* az embrionális fejlődésben, a sejt-specifikus génexpresszióban és a sejtnövekedés szabályozásában szerepet játszó fontos transzkripciós faktor. Korábbi genomszintű és kandidáns gén asszociációs tanulmányok (77, 79, 208, 209) is kimutatták már különböző variánsai és az ALL rizikó közötti kapcsolatot. Ezek közül néhány, különösen a B-sejtes, a hiperdiploid ALL-es és a férfi populációban talált erős összefüggést a gén polimorfizmusaival. A fenti eredmények is megerősítik az *ARID5B* variánsok megnövekedett B-ALL rizikóját, azonban a nemek, ill. a hiperdiploid és egészséges populációk között szignifikáns eltérést nem tapasztaltam. Az általunk vizsgált *ARID5B* gén releváns SNP-i intronban helyezkednek el, így jelenleg még nem tisztázott a pontos funkciójuk, hatásmechanizmusok, hogy hogyan befolyásolhatják a betegségre való hajlamot.

Az *IKZF1* gént egymástól független genomszintű asszociációs vizsgálatok azonosították európai eredetű (kaukázusi) gyermekpopulációban, amit azonban egyes tanulmányok nem tudtak megerősíteni (77, 79, 210). Az *IKZF1* gén egy fontos limfoid

transzkripciós faktort, az IKAROS fehérjét kódolja, ami az eddigi kutatások alapján a Philadelphia-kromoszóma pozitív aktív BCR-ABL1 tirozin kinázzal rendelkező ALL-es betegek 80%-ában deletálódik (93, 211). Mivel az IKZF1 egy kulcsfontosságú molekula a limfociták normális fejlődésében, ezért az azt kódoló jelölt gén fontos célpont lehet az akut limfoid leukémia etiológiájának tanulmányozásában, a betegség kialakulásának jobb megértésében. Az egyik ilyen vizsgálat során az *IKZF1* rs4132601 polimorfizmus mutáns allélja esetében alacsonyabb *in vitro* expressziós szintet, és így megnövekedett ALL kockázatot mutattak ki (77). A humán és egér vizsgálatok eredményei alapján az *IKZF1* csökkent expressziós szintje károsan befolyásolhatja a normál limfocitafejlődés menetét olyan körülményeket teremtve, ami az akut limfoid leukémia kialakulásának kedvez. Tehát az rs4132601 polimorfizmus mutáns formája, az *IKZF1* expressziós szintjét csökkentve, növelheti a betegségre való hajlamot.

A jelen tanulmány jelölt gén asszociációs vizsgálatait során a *STAT3* gén variánsai asszociáltak a HD-ALL hajlammal. A *STAT3* egy jelátviteli és transzkripciós aktivátor fehérje, amelynek fontos szerepe van az apoptózis szabályozásában is (212-214). A *STAT3* egyike a SYK tirozin kináz szubsztrátjainak. A SYK képes foszforilálni a *STAT3* molekulát az oxidatív stressznek kitett humán B-sejtes leukémia/limfóma sejtekben (215). Egy gyógyszerjelölt molekulával lehet blokkolni a SYK-et, amelynek következtében a *STAT3* nem indukálódik oxidatív stressz hatására, ezáltal a humán B-sejtes leukémia/limfóma sejtek apoptózissal szembeni rezisztenciája megszűnik.

A fenti eredmények alapján a *STAT3* gén két polimorfizmusa (rs12949918, rs3816769) alacsonyabb rizikót jelenthet a hiperdiploid ALL kialakulásával szemben. Ez a felfedezés korrelál egy másik kutatócsoportéval is (216), ahol szintén alacsonyabb rizikót mutattak ki az rs12949918 polimorfizmus jelenléte esetén a különböző eredetű malignitásokra - mint pl. vese karcinómára, vagy a B-sejtes non-Hodgkin limfómára - nézve. *In vitro* vizsgálatokban azt találták, hogy a polimorfizmus befolyásolja az mRNS szintet, azaz a mutáns allél esetében csökkent *STAT3* expressziót mértek (217). Jelenleg a *STAT3* variánsok pontos szerepe a HD-ALL kialakulásában még nem teljesen ismert.

Az adathalmazt ezután a munkacsoport által közösen fejlesztett Bayes-háló alapú bayes-i többszintű relevancianalízis (BN-BMLA) módszerével is elemeztük. Ennek

során egyrésztől megerősítésre kerültek a frekventista eredmények, hiszen az *ARID5B* és az *IKZF1* génvariánsok és a B-sejtes ALL közötti (erős relevancia) asszociációjára magas *posterior* valószínűségi értékek adódtak, másrésztől pedig új változók relevanciájára is sikerült rávilágítani.

A bayes-i módszer nagy előnye, hogy nemcsak az asszociáció jellegéről, hanem a változók közötti egyéb, akár gyengébb kölcsönhatásokról és redundanciákról is képes információt nyújtani. Így pl. az ALL hajlammal kapcsolatosan gyenge kölcsönhatás volt megfigyelhető az *ARID5B* rs10821936 és a *STAT3* rs17405722 polimorfizmusok, illetve a T-sejtes ALL tekintetében a nem és 3 SNP (*BCL2A* rs4987845; *STAT6* rs703817, *NQO2* rs1143684) között (**12. ábra/B**). Az irodalomból ismert, hogy a fiúgyermekes esetében gyakoribb az ALL megjelenése, mint a lányokban (2, 16-18), azonban az *NQO2* rs1143684 esetében fiúkban gyenge, de védő hatással bíró asszociációt sikerült kimutatni mind a BN-BMLA módszerrel, mind pedig a frekventista elemzés során.

Az *NQO2* egy quinon-reduktáz flavoprotein, amelynek elsődleges szerepe a xenobiotikumok detoxifikációjában van. Feltételezések szerint az *NQO2* bizonyos kemoterápiás szerek gyorsabb lebontását, kiürülését segíti, ami az antileukémiás terápia hatékonyságát ronthatja, illetve a kóros sejtek túlélésének kedvezhet. Ennek alapján, tehát a gén adott (mutáns) variánsának hordozása, ezáltal a gén csökkent aktivitása, bizonyos esetekben akár védő faktorként is szerepelhet. A jelenlegi leukémia protokollokban egyes leukémia típusok esetén – pl. Philadelphia-kromoszóma pozitív ALL, T-ALL, CML - az imatinib nevű terápiás készítmény jelentős javulást eredményezett. Az eddigi irodalmi adatok szerint, az imatinib az *NQO2* molekulához kapcsolódva annak aktivitását korlátozhatja, azonban a készítmény pontos *NQO2* gátló mechanizmusa még jelenleg sem teljesen ismert (218). A változók közötti redundanciák számolásakor egyedül az *ARID5B* két SNP-je (rs10821936, rs4509706) között detektáltunk mérsékelt redundanciát, ami annyit jelent, hogy az egyik SNP-re vonatkozó információk jellemzőek lehetnek a vele redundáns kapcsolatban lévő másik polimorfizmusra is. Egy munkacsoport másik fontos megállapítását (219) sikerült megerősítenünk, miszerint a vizsgálat két legmarkánsabb génjének (*IKZF1*, *ARID5B*) variánsai között nincs kölcsönhatás, sem

redundancia, ami azt bizonyítja, hogy a két különböző gén egymástól függetlenül vehet részt az ALL kialakulásában.

A hiperdiploid alcsoport bayes-i elemzésekor azonban számos erős interakciós hatást találtunk az egyes változók, mint pl. a *NOTCH1*, *STAT1*, *STAT3* és *BCL2* gének között (**12. ábra/C**). A *NOTCH1* egy transzmembrán fehérjét kódoló géncsalád egyik tagja, amely fontos szerepet játszik a sejtek közötti szignalizációban, az apoptózisban, valamint a limfociták normális működésében. Variánsai akár T-sejtes neoplázia kialakuláshoz is vezethetnek. Korábbi irodalmi adatok alapján ismert, hogy a *STAT3* aktivációja aktív Notch molekula jelenlétében zajlik, továbbá a Notch stabil intracelluláris formája megnövelte az IFN $\gamma$ -ra adott válaszként a *STAT1*-függő transzkripciót. Zebradánió állatmodellben a humán *NOTCH1* gén módosításával T-sejtes leukémiát idéztek elő. Megfigyelték, hogy a leukémia kialakulása drámaian felgyorsult, amikor a transzgenikus zebradániót egy másik, a saját *Bcl2* génjét túlexpresszáló sejtvonallal transzfektálták, így arra a következtetésre jutottak, hogy a *Bcl2*-mediálta antiapoptotikus és a Notch útvonalak szinergista módon fejtik ki hatásukat (220-222).

A fenti eredmények abba az irányba mutatnak, hogy ezen gének által érintett útvonalak átfedhetnek és ezáltal kölcsönhathatnak egymással, így együttes hatásuk révén befolyásolva akár pl. a gyermekkori akut limfoid leukémia kialakulását is.

Jelen tanulmányban a kétféle statisztikai kiértékelés összehasonlítása mellett, elsősorban az újonnan fejlesztett BN-BMLA módszer alkalmazhatóságát szerettem volna bemutatni jelölt gén asszociációs vizsgálatok esetében.

Az eredményekből is látható, hogy a bayes-i módszer előnye elsősorban nem abban állt, hogy több változót mutatott relevánsnak, hanem, hogy a célváltozó és az azt befolyásoló faktorok közötti kapcsolati struktúrát egyszerre tudta ábrázolni, illetve részletesen jellemezni tudta a kapcsolati típusokat, azok direkt és indirekt vonatkozásait. Továbbá a programba épített algoritmussal lehetővé vált az elsőfajú hiba megfelelő kezelése is (163). Az elemzéskor a BN-BMLA módszer teljes eszköztárának csak egy része került felhasználásra, mivel a tanulmány célja az volt, hogy a módszer hatékonyságának mérése teljes mértékben a vizsgált populáció hatásaiból, azaz csak a genotipizálási adatokból származzon. Tehát az értékelés során

csak uniform *priorok* alkalmazása történt külső adatforrások (pl. génexpresszió adatok) felhasználása nélkül. Ezen felül az alkalmazott célváltozó, a gyermekkori akut limfoid leukémia egy meglehetősen ritka betegség - magyarországi incidenciája 50-70 új eset/év -, ami megnehezítette a statisztikai szempontból megfelelő számú mintapopuláció gyűjtését. Az Intézet biobankjának bevonásával azonban sikerült egy jelentős és releváns számú (543-ALL, 529-kontroll) populáción elvégezni a vizsgálatokat. Ezért is volt szükséges egy más szemléletű statisztika, a BN-BMLA technika kiegészítő alkalmazása, amely lehetővé tette a frekventista eredmények megerősítését (*IKZF1*, *ARID5B*), valamint az eddig rejtve maradt kapcsolati típusok feltérképezését és jellemzését.

A munkacsoport korábbi eredményei alapján a bayes-i statisztika alkalmas az eddignél komplexebb rendszerek, változói hálók modellezésére és értelmezésére (*161-163*, *165*, *166*) is, ami a frekventista módszernél nem, vagy nehezkesebben kivitelezhető. A *posterior* valószínűség számításával, a bayes-i rendszer egy direkt állítást fogalmaz meg, ellenben a frekventistával, ahol indirekt módon, hipotézis vizsgálatok után vonhatjuk le a végső következtetéseket. Meg kell említeni azonban, hogy a bayes-i rendszer esetében a külső információk (*priorok*) alkalmazása nem teljesen triviális. Ez azt jelenti, hogy a modellezés során kellő körültekintés és hozzáértés szükséges a kívülről érkező háttértudás beépítéséhez, mert könnyen hamis irányba tolódhat az elemzés.

Mindezek tudatában elmondható, hogy egy adathalmaz, vagy halmazok színesebb, gazdagabb elemzését teszi lehetővé a két statisztikai módszer kiegészítő alkalmazása. A BN-BMLA módszer online is elérhető az alábbi honlap segítségével Genagrid Homepage: <http://redmine.genagrid.eu/projects/bayeseyedownload/wiki>

### **6.3 JELÖLT GÉN ASSZOCIÁCIÓS VIZSGÁLAT III – FOLÁT ANYAGCSERE GÉNEK**

A III. vizsgálat során arra kerestem a választ, hogy a vizsgált, folát metabolizmusban fontos szereppel bíró 15 gén 64 polimorfizmusa közül, melyek befolyásolhatják a gyermekkori akut limfoid leukémia kialakulását.

Az eredmények értékelése ebben az esetben is a már említett kétféle statisztikai módszerrel történt.

A frekventista elemzésben összesen 8 gén (*ABCBI*, *DHFR*, *FPGS*, *MTHFD1*, *MTR*, *SHMT1*, *TYMS*, *MTRR*) 9 SNP-je (rs2235013, rs12517451, rs1544105, rs1076991,

rs12759827, rs9909104, rs2853533, rs3776455, rs1532268) bizonyult nominálisan szignifikánsnak (**2. ábra**). Ezek közül csak kettő (*MTHFD1*-rs1076991, *MTRR*-rs3776455) maradt valóban szignifikáns a többszörös tesztelési korrekció után.

Az *MTHFD1* egy kulcsfontosságú szereplője a folát metabolizmusnak. Ez egy háromfunkciós enzim, ami a tetrahidrofolát átalakítását katalizálja, ezáltal fontos kofaktora a *de novo* purin, pirimidin, és metionin szintézisnek (60, 223, 224). A vizsgálatok során az rs1076991 (*MTHFD1*) variáns mutáns allélja (G), különösen homozigóta formában asszociált a B-sejtes ALL-re való hajlammal. Maga az SNP az *MTHFD1* gén promoter régiójában helyezkedik el. *Carroll* és munkatársai egy luciferáz reporter assay segítségével megállapították, hogy a polimorfizmus *in vitro* befolyásolja a gén promoter aktivitását (225). Az A allélt hordozók csak 38%-os promoter aktivitást mutattak a G allélhoz képest (az eredeti cikkben T és C allélok szerepelnek, de a dolgozatban az allélok megnevezése minden esetben a forward szárlól, a hivatalos dbSNP adatbázis alapján történik), ami a gén megnövekedett expresszióját jelentheti G allél esetében, *in vivo* környezetben is. A közleményben foglalt eredmény nem tér ki semmilyen transzkripciós kötőhely változására, ami magyarázhatná a fenti jelenséget, vagy az általunk tapasztalt megnövekedett rizikót B-ALL esetében, éppen ezért csak feltételezések alapján következtethetünk ennek okára. Lehetséges, hogy a megnövekedett *MTHFD1* szint a szubsztrátjának, az 5,10-metiléntetrahidrofolátnak csökkent mennyiségéhez vezet, ami negatívan hathat a deoxiuridin-monofoszfátból történő deoxitimidin-monofoszfát képződésre, így megnövelve a DNS-be épülő uracil mennyiségét, ami kromoszóma károsodáshoz vezethet. Továbbá a kromatin szerkezet megváltozása különböző epigenetikai faktorok hatására is bekövetkezhet, amely szintén hozzájárulhat az adott gén expressziójának módosulásához.

Az irodalom másik széles körben vizsgált és ebben a tanulmányban is szereplő variánsa (59, 60, 226-228), az *MTHFD1* gén rs2236225 (G1958A; Arg653Gln) missense SNP-je volt. A polimorfizmust önmagában vizsgálva nem tapasztaltam összefüggést az ALL hajlammal. A haplotípusokat (*MTHFD1* - rs1076991, rs1950902, rs2236225, rs745686) elemezve azonban két blokk (ACTA, GCCA) esetében is nominálisan szignifikáns eredményeket kaptam. A két haplotípus eltérő OR-ját valószínűleg az ALL hajlammal erős asszociációt mutató *MTHFD1* rs1076991

SNP-jének két allélja (A-védő, G-hajlamosító) adta, mintsem az rs2236225 variáns (**2. ábra**).

A másik erős szignifikanciát mutató génvariáns az *MTRR* rs3776455 volt, melynek GG genotípusa a csökkent B-ALL rizikóval asszociált. A gén a metionin szintáz reduktáz (*MTRR*) enzimet kódolja, az *MTHFD1*-hez hasonlóan a folát útvonal szintén jelentős molekulája. A homocisztein metilációját metioninná a B12 vitamin segítségével, a metionin szintáz (*MTR*) enzim katalizálja. Az *MTR* inaktivációja következhet be B12 vitamin oxidációjakor. A metionin szintáz reduktáz (*MTRR*) enzim képes katalizálni a B12 vitamin redukzív metilációját S-adenozil-metionin (*SAM*) – epigenetikai kulcsmolekula – metildonor segítségével, ezáltal biztosítva az *MTR* megfelelő működését.

Az rs3776455 SNP pontos funkciója jelenleg még nem tisztázott, mivel sem szekvencia-, sem pedig fenotípusbeli változást eddig nem azonosítottak vele kapcsolatban.

Az *MTRR* génen belül vizsgáltam még az aminosavcserét okozó (66A>G, Ile22Met) rs1801394 variánst is, ami az irodalom alapján az egyik leginkább tanulmányozott *MTRR* SNP. Egyes eredmények a mutáns allélnál mért alacsonyabb *MTR* affinitásról számoltak be (229), máshol a vad homozigóta AA genotípus megletekor emelkedett homocisztein szintet mértek, míg megint mások ennek ellentmondó tapasztalatokat írtak le (230-232). Egy metaanalízis szerint (76) sem áll fenn a rs1801394 variáns és az alacsonyabb ALL rizikó közötti összefüggés, amit a mi eredményeink is alátámasztanak. Érdeemes azonban még megemlíteni, hogy az rs1801394 polimorfizmus kapcsolatban van az rs3776455 SNP-vel, ami magyarázhatja az ellentmondásos eredményeket, amennyiben fennáll a két SNP között egy olyan kapcsolat, ahol az rs1801394 indirekt módon az rs3776455-en keresztül fejt ki hatását. Az rs3776455 SNP továbbá két másik olyan SNP-vel (rs162036, rs10380) is kapcsolatban állt, amelyeket korábban már összefüggésbe hoztak a nyitott gerinc rendellenesség háromszorosan emelkedett kockázatával (233).

A vizsgálat során szignifikáns összefüggést csak az rs3776455 SNP és a csökkent ALL rizikó között tudtam kimutatni. A pontos kapcsolati struktúra feltérképezéséhez további vizsgálatok szükségesek.

Az *MTHFR* gén, két leginkább vizsgált, aminosavcserét okozó (missense) polimorfizmusa az rs1801133 (677C>T, Ala222Val) és rs1801131 (1298A>C, Glu429Ala) semmilyen asszociációt nem mutatott az ALL hajlammal vagy a túléléssel. Ez összecsengett nagyobb populációs vizsgálatok (58, 234), illetve egy metaanalízis (235) eredményeivel is. Több publikáció is megjelent azonban az említett SNP-k hajlamot (44, 49, 236) és túlélést (237) igazoló szerepéről. Ennek oka lehet az MTRR polimorfizmusok epigenetikus változásokban betöltött funkciója.

A folát metabolizmust szabályozó géneknek - pl. az *SHMT1* - és polimorfizmusaiknak fontos szerepe lehet a kemoterápiás gyógyszerekre, közülük is egy fontos antifolátra, a metotrexátra (MTX) adott terápiás válaszban, vagy az esetlegesen kialakuló toxicitásban.

Eredményeink hasonló tendenciát mutattak azokkal a kutatásokkal (238-240), ahol a variánsok meglétekor az ALL rizikó csökkenése mellett, a metotrexát kezelésre adott gyengébb választ tapasztalták. Az *SHMT1* molekula az MTHFD1 és az MTHFR enzimekkel verseng az 5,10-metiléntetrahidrofolátért, mint közös szubsztrátért. Az *SHMT1* gén gyermekkori ALL vonatkozásában leginkább tanulmányozott rs1979277 (G/A) SNP-jét, összefüggésbe hozták a terápia során kialakult csökkent MTX érzékenységgel (133). A fenti variáns genotipizálása jelen tanulmány keretei között is megtörtént, ahol a kapcsoltsági viszonyokat elemezve kiderült, hogy az rs1979277 erős kapcsoltságban van az rs9909104 SNP-vel ( $D'=1$ ,  $r^2=0,13$ ). A kicsi  $r^2$  érték miatt azonban nem beszélhetünk teljes kapcsoltságról, ami felveti a viszony egyoldalúságát. Ez alapján feltételezhető, hogy a két SNP eltérő gyakorisága miatt, a ritkább rs9909104 C allélja mindig a gyakoribb rs1979277 A alléljával fordul elő, míg fordított esetben már nem élhet ez a kapcsolat. A vizsgált populációban a kapcsoltsági viszony egyirányúsága magyarázhatja az rs9909104 SNP relevanciáját és azt, hogy az rs1979277 esetében ilyen összefüggést nem találtunk. Ezt az elméletet támaszthatja alá *de Jonge* és társai munkája (133) is, ahol csak az rs1979277 SNP-t genotipizálták és az rs9909104 polimorfizmust nem, azonban a kapott „jel” valószínűleg mégiscsak ez utóbbtól származott az egyirányú kapcsoltság miatt.

A BN-BMLA technikának más kondicionális modellező rendszerekkel szembeni alkalmasságát már korábban bizonyítást nyert egy mesterséges, a bioinformatikus



kollégáim által generált eset-kontroll tanulmány elemzésével (165), majd később a rendelkezésünkre álló, saját adathalmazainkon (160, 161) történő alkalmazásával is.

A bayes-i elemzés megerősítette a frekventista statisztika fő eredményeit, tehát az *MTHFD1* rs1076991 és az *MTRR* rs3776455 SNP-k és az ALL hajlam közötti asszociációt. Az alpopulációkat tekintve az rs1076991 a B-sejtes ALL, míg az rs3776455 a HD-ALL csoportban mutatott erős relevanciát a betegséggel. A két polimorfizmus egymással szemben enyhén redundáns volt, ami utalhat a két SNP hasonló, de egymástól független hatására. A BN-BMLA módszer előnye, hogy a direkt asszociációkon túl, képes ún. indirekt, azaz két változó között egy harmadik változó által közvetített, vagy akár együttes interakciós hatások detektálására is (160-163).

A gén-gén interakciókat vizsgálva az *MTRR* (rs1532268 SNP-je) gén és a HD-ALL hajlam között alapvetően egy enyhén emelkedett rizikó, azonban a *TYMS* génnel (rs1004474) együtt vizsgálva azzal ellentétes (védő) hatás tapasztalható. Ez a „hatásváltozás” valószínűleg a folát útvonal rendkívül komplex és egyensúlyra érzékeny finomhangolásának köszönhető, ami a metabolizmusban szerepet játszó metabolitok hiányát vagy felhalmozódását is okozhatja. Ezek alapján talán jobban érthető az irodalomban fellelhető, a variánsok egyedi hatását vizsgáló számtalan ellentmondásos eredmény, amely egyben rávilágít a vizsgálatok rendszerbiológiai szemléletének fontosságára is.

A **14. ábra** az ALL alpopulációkban kapott eredmények sokszínűségét mutatja, ami alátámaszthatja azt az elgondolkodást, hogy az akut limfoid leukémia tulajdonképpen több különböző betegség összessége, melyek hasonló tünetegyüttessel és terápiás lehetőséggel bírnak, patogenezisük azonban eltér. A különböző ALL altípusok patogenezisének megfejtése nagymértékű előrelépést jelentene a személyre szabott terápia kialakításában.

Az eredmények értékelése után elmondható, hogy jelen tanulmányban összefoglalt vizsgálatoknak számos erőssége, de korlátja is van. Az egyik ereje, hogy az FDR és a BN-BMLA módszerek segítségével törekedtünk az asszociációs tanulmányokra gyakran jellemző álpozitív eredmények kiszűrésére. A BN-BMLA technika külön előnye a számolásba épített automatikus korrekciós lépés (163). Az eredményekből azonban az is látszik, hogy az SNP-k alacsonyabb hatáserőssége, illetve a statisztikai

tesztek relatíve alacsonyabb ereje miatt, szükséges lenne a számolások egy nagyobb, de homogén populáción történő ismételt elvégzésére. Erre megoldást nyújthatna egy metaanalízises vizsgálat vagy egy nemzetközi leukémia konzorcium létrehozása. A munkacsoportunk ugyan tagja volt a „The International Childhood Acute Lymphoblastic Leukaemia Genetics Consortium”-nak (241) és más nemzetközi együttműködésnek (78) is, de ezeknek a vizsgálatoknak a nagy esetszám és erős statisztikai ereje mellett volt hátulütője is: a heterogén genetikai háttér és az eltérő környezeti hatások (242, 243).

A tanulmány további erőssége, hogy más munkacsoportokkal (133) összehasonlítva a vizsgált ALL-es csoport a saját ország (itt: Magyarország) teljes népességéhez, illetve esetszámához viszonyítva az egyik relatíve legnagyobb európai (kaukázusi) eredetű populáció.

Ezzel magyarázhatóak azon eredményeink, amelyek más kutatásokkal ellentétben a többszörös tesztelési korrekció után is szignifikánsnak bizonyultak (47, 133, 234, 239). Az értékelés teljességéhez hozzátartozik, hogy jelen vizsgálatban csak a szignifikánsnak, vagy  $>0,5$  *posterior* valószínűségűnek adódott eredményeket tárgyaltam részletesen, azonban az egyes nominálisan szignifikáns értékek közül, más közlemények többet tényleges asszociációkként tárgyaltak. A mintabank tervezett bővítésével, a vizsgálatok ismételt elvégzésével így akár a névlegesen szignifikáns eredmények, vagy a gyengébb *posterior* valószínűséget mutató asszociációk, illetve az eltérő populációkban talált, de általunk nem megerősített összefüggések (rs1801133 - *MTHFR*, rs1801131 - *MTHFR*, rs2236225 - *MTHFD1*, rs1801394 - *MTRR*, rs1979277 - *SHMT1*) tényleges statisztikai relevanciája is tisztázódhatna.

#### **6.4 FARMAKOGENETIKAI VIZSGÁLAT–*ABCC1***

Az akut limfoid leukémiára való hajlam genetikai tényezőinek vizsgálata mellett szerettük volna a polimorfizmusok hatásának farmakogenetikai vonatkozásait is tanulmányozni. Erre a feladatra megfelelő vizsgálati célpontnak tűnt az I. vizsgálatban elemzett GST-k anyagcsere-útvonalához is köthető, a (kemoterápiás) gyógyszerek szállításában fontos szerepet játszó ABC transzporter család, azon belül is az *ABCC1* alcsoport. Az *ABCC1* (ATP-Binding Cassette, Sub-Family C (CFTR/MRP), Member 1), vagy másnéven *MRP1* (multidrug resistance-associated protein 1) gén által kódolt fehérje fontos transzmembrán molekula, különböző szerves anionok és gyógyszerek

kiszállítását végzi a citoplazmából. Részt vesz az ATP-függő glutationnak és származékainak, valamint a kemoterápiában használt metotrexátnak, antraciklineknek, továbbá egyéb xenobiotikumoknak a transzportjában is. Variánsai felelősek lehetnek a multi-drog/kemoterápiás szerek elleni rezisztencia kialakulásáért. Az *ABCC1* transzportereknek továbbá fontos sejtvédő funkciójuk is van, ami valószínűleg a többi ABC molekulától eltérően a sejtek bazolaterális membránjában történő elhelyezkedésüknek köszönhető (244). A doxorubicin (antraciklinek) sejtől történő kiszállítása éppen ezért fontos meghatározó lépés a kemoterápiás szerek, mint reakív oxigén gyökök okozta oxidatív stressz, illetve a toxicitás elkerülése érdekében (245, 246). A toxikus gyógyszerek mielőbbi kipumpálásához (pl. antraciklinek) viszont szükséges a megfelelő glutationszint, aminek fenntartásában szintén kulcsmolekula az *ABCC1*. Ezeket figyelembe véve az *ABCC1* variánsainak vizsgálata hasznos lehet az antraciklinek hatására kialakuló oxidatív stressz elleni hatékony válasz kialakításában (244, 245, 247, 248). Mindezzel az ismerettel összecseng a munkacsoport eredménye is, miszerint az *ABCC1* fontos a kardiomiociták védelmében.

Munkánkban a kemoterápia utáni késői kardiotoxicitás és az *ABCC1* gén egy pontos nukleotid polimorfizmusainak összefüggését vizsgáltuk. Az antraciklines kezelés utáni megváltozott szív bal-kamra-funkció asszociációt mutatott az *ABCC1* rs3743527 SNP mutáns homozigóta TT genotípusával. Az irodalomban ezidáig nem található számottevő adat az rs3743527 polimorfizmusról. Az SNP az *ABCC1* gén 3' nem átíródo régiójában (3' UTR) van. Wang és munkatársai (249) a tüdőrák kockázatát és az *ABCBI*, *ABCC1* gének, illetve variánsaik szerepét vizsgálták kínai populációban. Az rs3743527 SNP tekintetében nem kaptak releváns eredményt. Érdekes azonban megjegyezni, hogy az említett SNP-vel szomszédos, attól kb. 300 bp-nyira lévő rs212090 SNP viszont emelkedettebb rizikót mutatott tüdőrák tekintetében. A két SNP egymással kapcsoltságban van, így előfordulhat, hogy azok interakcióban, vagy a másikon keresztül indirekt módon fejtik ki hatásukat etnikumtól, vagy betegségtől függően. A másik lehetséges magyarázat a 3' UTR régió szabályozó szerepe, tehát pl. a fenti polimorfizmus a vele kapcsoltságban lévő másik SNP-n keresztül indirekt módon érvényesítheti hatását, ezáltal befolyásolva a szabályozó faktorok bekötődését, így az *ABCC1* működését (250). A miRDB mikroRNS adatbázis (<http://mirdb.org/miRDB/>; utolsó hozzáférés: 2013.08.28.) adatai alapján ugyanis az

rs3743527 SNP környékén kb. 500bp távolságon belül mikroRNS kötőhelyek találhatóak (hsa-miR-185, hsa-miR-548o, hsa-miR-1254).

Érdeemes lehetne ezért a későbbiekben egy bővített ALL populáción is vizsgálni ezen *ABCCI* polimorfizmusok szerepét a klasszikus frekventista statisztika mellett a bayesi módszer segítségével is. A munkacsoport jelenleg is dolgozik a BN-BMLA technika fejlesztésén, hogy mielőbb lehetőség legyen folytonos változókkal történő elemzésre is.

Az értékelés teljességéhez hozzátartozik még néhány információ. Az első, hogy a National Cancer Institute (USA) Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) v3.0 szerint (251) akkor beszélhetünk bal kamrai diszfunkcióról, ha a lineáris ejekciós frakció értéke 30% alatt van. Ez alapján az általunk mért *ABCCI* polimorfizmussal asszociálódó csökkent lineáris ejekciós frakció a normális tartományba esik. Azonban több tanulmány (252, 253) szerint is a még normális intervallumban lévő, de alacsonyabb, szubklinikus linEF csökkenés prognosztikus jelentőségű lehet a későbbi súlyosabb szívproblémák kialakulása szempontjából, így akár célszerű lehetne egy külön prognosztikai értéksáv meghatározása is.

A második, hogy a betegpopulációinkban alulreprezentáltak a mintagyűjtésünk előtt elhalálozott betegek. Ez azonban nem valószínű, hogy befolyásolta eredményeink hitelességét, hiszen egyrészt a szívkárosító mellékhatás jóval a kezelés után jelentkezik, másrészt pedig a halál nem szívproblémák, hanem főként fertőzések, vagy a hatástalan kezelés (Magyar Gyermekek Tumor Regiszter adatai alapján) miatt következett be.

Végül pedig fontos megemlítenünk azt is, hogy a kemoterápia részeként alkalmazott egyéb antileukémiás gyógyszerek (pl. vinca-alkaloidok, metotrexát) is okozhatnak kardiotoxicitást, melyek akár befolyásolhatták is eredményeinket. Ezt cáfolja azonban az az általánosan igazolt tény, hogy az antraciklinek kardiotoxikus hatása meghaladja az említett gyógyszerekét (254, 255).

## 6.5 A KIVÁLASZTOTT POLIMORFIZMUSOK TÚLÉLÉSRE GYAKOROLT HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA A BETEGPOPULÁCIÓBAN

A betegségre való hajlam és a terápiás kezelésre adott farmakogenetikai válasz mellett az SNP-k túlélésre gyakorolt hatását is vizsgáltam mindkét statisztikai módszer segítségével.

A frekventista elemzés során a *BAX* rs11667351 polimorfizmusának mutáns homozigóta formája mutatta a legerősebb asszociációt a túléléssel ( $p=1E-03$ ). A mutáns homozigóta egyedek 5-éves ösztúlélésre (OS=40%) és eseménymentes túlélésre (EFS=40%) is igen alacsony értékek adódtak, ami a polimorfizmus túlélésre gyakorolt releváns hatását mutatta.

A *BAX*-nak a gyermekkori ALL relapszusban betöltött szerepéről az irodalomban kevésbé konzisztens adat található (256, 257). Egyes adatok szerint a magas *BAX* fehérje szint emelkedett ALL relapszussal függött össze, míg a mi eredményeinkkel csengtek össze más tanulmányok felfedezései, miszerint az alacsonyabb *BAX* (illetve *BAX/BCL2*) arány rosszabb túléléssel párosult, valamint a csökkent arány a relapszusban lévő betegekben volt szignifikánsan megfigyelhető a diagnóziskori értékekhez képest (258). Ez utóbbi eredményt támaszthatja alá továbbá az a megfigyelés is, ahol ugyanezt a variánst vizsgálva szintén alacsonyabb *BAX* mRNS szintet mértek limfocitákban.

Másik, a túléléssel asszociáló változók a *CEBPA* génvariánsai (rs10403561- $p=0,03$ , rs874966- $p=0,01$ ) voltak. Ebben az esetben a vad homozigóta egyedek túlélése rosszabb volt, mint a mutáns allélt hordozóké. Ezzel korrelál az a tanulmány (259) is, ahol egy akut mieloid leukémiás populációt vizsgálva, a *CEBPA* mutációt hordozók a túlélés szempontjából jobb prognózist mutattak.

A statisztikai korrekció után a fenti eredményeinket csak nominálisan szignifikánsnak tekintettem, azonban azok feltételezett relevanciája miatt elvégeztük a bayes-i elemzést is.

A BN-BMLA értékelés eredményeként a túlélés függvényében vizsgált *BAX* és *CEBPA* génpolimorfizmusok erős relevancia asszociációja az rs11667351 esetében magas ( $>0,75$ ), míg az rs1040356-nél mérsékelt *posterior* valószínűségi értéket kaptunk. A **22. ábra** látható, hogy a *BAX* gén polimorfizmusa a *BCL2* gén variánsával interakcióban befolyásolhatja a betegek túlélését. A két gén kölcsönhatására és

szerepére már korábbi irodalmi eredmények is utaltak (256, 257, 260). A BCL2 egy mitokondriális membránfehérje, amely többek között a limfohematopoetikus sejtek apoptózisát gátolja. A BAX molekulával egy családba tartoznak, azonban a BAX fehérje a BCL2-vel ellentétben apoptózist aktiváló funkcióval bír. Stressz körülmények hatására a BCL2-vel heterodimert alkotva, konformációváltáson megy át, amely a membrán potenciál csökkenést, így citokróm-c felszabadulást és végül apoptózist indukál. A BAX gén expresszióját a tumor szupresszor P53 is szabályozza (261). Továbbá feltételezhető, hogy a BCL2 a BAX molekulához való kötődése révén megakadályozza a BAX/BAK oligomerizációját, ezáltal inaktíválva a BAX molekulát, ami a malignus sejtek túlélésének kedvezhet (257, 262).

A **22. ábra** további interakciókat mutat be a különböző sejtípus és génvariánsok, vagy a sejtípus és a nem, illetve egyéb prediktor SNP-k között.

A fenti eredményekhez hozzátartozik az a tény, hogy a magyarországi ALL-es populáció és az általunk vizsgált szűkebb csoport között az elhunyt betegek számában szignifikáns különbség adódott ( $p < 0,001$ ), így következtetéseink inkább tájékoztató jellegűnek, iránymutatónak tekinthetők.

A populáció túlélésének elemzése során a kétféle statisztikai módszer egyfelől megerősítette egymást, másrésztől azonban eltérő eredmények is születtek.

Erre egy példa a BAX génpolimorfizmus túlélésre gyakorolt hatása, ahol a frekventista módszerrel csak nominálisan szignifikáns értékeket kaptunk, melyeket a statisztikai korrekció után el kellett vetnünk. A bayes-i statisztika ellenben meggyőző *posterior* valószínűséggel, releváns változónak tekintette a BAX gént és variánsait. A két módszert összehasonlítva elmondható, hogy a frekventista alapú statisztika nem tudja megfelelően kezelni a többszörös tesztelésből (összehasonlításból) fakadó I. fajú hibát. Ezért annak elkerülésére célszerű korrekciót alkalmazni, ami azonban egy konzervatívabb megoldás, így a gyengébb hatások, vagy interakciók sokszor nem mutathatók ki. A BN-BMLA erőssége, hogy ezekre a gyengébben „látható” hatásokra is rávilágít. A két módszer kiegészítő, rutinszerű alkalmazásával egy pontosabb statisztikai értékelésre lenne lehetőség.

## 7 KÖVETKEZTETÉSEK

Jelen dolgozatban az általunk kiválasztott jelölt gének és variánsaik, valamint a gyermekkori akut limfoid leukémia (ALL) hajlam, illetve a terápiás kezelésre adott válasz farmakogenetikai vonatkozásai között fellépő kapcsolatot vizsgáltuk. A betegség hátterének jobb megértése érdekében több mint száz általunk kiválasztott génpolimorfizmust tanulmányoztunk a biobankban rendelkezésünkre álló több mint ezer egyén, leukémiás gyermek és egészséges kontroll DNS mintáján. A kiértékelés során az eredmények többszörös szűrőn mentek keresztül. Az egyik oldalról a klasszikus frekventista statisztikát, míg a másiktól, a napjainkban egyre nagyobb teret hódító inverz megközelítésű Bayes-háló alapú bayes-i többszintű relevanciaanalízis (BN-BMLA) technika eszközeit is felhasználtuk.

1. Kiemelkedően nagy, magyar, akut limfoid leukémiás populáción megmutattuk mindkét statisztikai technikával (frekventista, BN-BMLA) az *ARID5B* (rs10821936) és *IKZF1* (rs6964969) génvariánsok jelentőségét, azon belül is még kifejezettebb hatást kaptunk a B-ALL-re való hajlam tekintetében. A gének közötti interakciós hatásokat BN-BMLA-val elemezve azt tapasztaltuk, hogy az *IKZF1* és *ARID5B* gének egymástól függetlenül, míg az *ARID5B* és a *STAT3* gének együttesen vehetnek részt az ALL kialakulásában.

2. Az elemzések alapján kimutattuk a fiúgyermekek kétszer nagyobb rizikóját T-sejtes ALL kialakulására.

3. A hiperdiploid (HD) alpopulációt mindkét statisztikai módszerrel elemezve a *STAT3* gén rs12949918 polimorfizmusa bizonyult védő hatásúnak a betegség kialakulásával szemben. A bayes-i elemzéssel további génvariánsok, mint a *BCL2* (rs12457893), a *JAK1* (rs3212713), a *JAK3* (rs3212713) és a *CCR5* (rs3087253) relevanciáját is kimutattuk a HD-ALL-re való hajlam tekintetében. Ugyanezen alosztályon megfigyeltük az *AHR* (rs2282883) gén és a rizikócsoporthoz tartozó tiszta interakciót, ezáltal a polimorfizmus betegséghez köthető indirekt asszociációját is.

4. Megfigyeltük továbbá a nem és a *STAT6* (rs703817), a *BCL2* (rs4987845), illetve az *NQO2* (rs1143684) polimorfizmusok közötti interakciós kölcsönhatást is, amely az ALL rizikó függvényében egy szintén nem-által befolyásolt mechanizmust prediktálhat.
5. A haplotípus-elemzés során az *IKZF1* gén két haploblokkja közül a TGGGG haplotípus fokozott (1,5x), míg a TGATA blokk alacsonyabb (0,7x) rizikóval asszociált.
6. A folát anyagcsere egyik legfontosabb, általunk is vizsgált génjei közül az rs1076991 (*MTHFD1*) variáns allélja (G), különösen homozigóta formában fokozta a betegségre, azon belül is a B-sejtes-ALL-re való hajlamot. Az *MTRR* gén rs3776455 SNP-jének homozigóta mutáns (GG) genotípusa és a csökkent HD-ALL rizikó között találtunk szignifikáns asszociációt. Ezeket az eredményeket a BN-BMLA elemzéssel is megerősítettük. A két SNP együttes vizsgálatakor enyhe redundanciát tapasztaltunk.
7. Az *MTRR* többi variánsát is megvizsgálva az rs1532268 SNP esetében egy interakciós hatásra bekövetkező funkcióváltozást tapasztaltunk. Az rs1532268 SNP vad allélját (A) hordozók és a HD-ALL tekintetében hajlamosító hatást detektáltunk, amely SNP allélja a *TYMS* gén rs1004474 (AA) ritka variánsával együtt vizsgálva már védő hatást mutatott.
8. Az *ABCC1* génnek a kardiotoxicitás kialakulásában betöltött szerepét vizsgálva azt találtuk, hogy az *ABCC1* rs3743527 TT genotípusú betegek lineáris ejekciós frakciója a záróvizsgálatkor alacsonyabb volt. Eredményeink alapján az *ABCC1* megváltozott működése közrejátszhat az antraciklinek kardiotoxikus mellékhatásában, mivel az *ABCC1* genetikai variánsa összefüggött a csökkent szívfunkcióval.
9. A populáció 5-éves össz-(85,5%), és eseménymentes (81%) túlélésének vizsgálatakor nominálisan szignifikáns értékeket kaptunk, amelyek közül a *BAX* gén



rs11667351 SNP-jének mutáns homozigóta (GG) formája alacsonyabb ösztülélési eséllyel (40%) párosult. Azonos tendenciát figyeltünk meg az eseménymentes túlélés és a génvariánsok közötti összefüggések vizsgálatakor is.

10. Elsőként és sikerrel alkalmaztuk gyermekkori akut limfoid leukémiás populáción a munkacsoport által fejlesztett Bayes-háló alapú bayes-i többszintű relevanciaanalízis adatelemző technikáját a frekventista statisztika kiegészítő módszereként.

Ezen eredmények sokszínűsége alátámaszthatja azt az elgondolkodást, hogy az ALL tulajdonképpen több különböző betegség összessége, melyek hasonló tünetegyüttesrel és terápiás lehetőséggel bírnak, patogenezisük azonban eltér. A genetikai, farmakogenetikai vizsgálatok nagymértékű előrelépést jelentenének a különböző ALL altípusok genetikai hátterének megfejtésében és így a személyre szabott terápia kialakításában.

## 8 ÖSSZEFOGLALÁS

Vizsgálatainkban arra kerestük a választ, hogy az általunk kiválasztott összesen 37 gén 138 polimorfizmusa befolyásolja-e a gyermekkori akut limfoid leukémia (ALL) kialakulását, illetve a terápiás választ. Az eredmények megbízhatósága érdekében a tradicionális frekventista alapú statisztika mellett a bayes-i módszert is alkalmaztuk. A jelölt gén asszociációs vizsgálatokban több mint száz SNP hatását elemeztük egy nagy, magyarországi ALL-es populáción. Mindkét statisztikai technikával megerősítettük az *ARID5B* és *IKZF1* génvariánsok hajlamosító szerepét a gyermekkori ALL-ben, különös tekintettel a B-ALL-re. HD-ALL-nél a *STAT3* SNP-je mutatott védő szerepet a betegséggel szemben. Ugyanezen alpopulációban kimutattuk a *BCL2*, a *JAK1*, a *JAK3*, a *CCR5* és az *AHR* gének variánsainak relevanciáját is. Az elemzéseink során arra a következtetésre jutottunk, hogy nagy valószínűséggel az *IKZF1* és *ARID5B* gének egymástól függetlenül, míg az *ARID5B* és a *STAT3* gének együttesen befolyásolhatják a betegség kialakulását. A folát anyagcsere génjei közül az rs1076991 (*MTHFD1*) variáns allélja (G), homozigóta formában fokozta a betegségre, különösen a B-ALL-re való hajlamot. Az *MTRR* gén rs3776455 SNP-jének GG genotípusa és az alacsonyabb HD-ALL rizikó között azonosítottunk szignifikáns összefüggést. Megfigyeltük továbbá, hogy az *MTRR* rs1532268 (A) és a *TYMS* rs1004474 (AA) variánsa együttesen fejti ki védő hatását a HD-ALL-re való hajlam tekintetében. A *GSTT1*, *GSTM1* és a *CCR5* gének deléciós variánsait vizsgálva szignifikáns korrelációt nem találtunk a gyermekkori akut limfoid hajlam tekintetében. A vizsgált betegpopulációban az *ABCC1* rs3743527 egy pontos nukleotid polimorfizmusának TT homozigóta formája összefüggött a csökkent szívfunkcióval, ami az *ABCC1* genetikai variánsainak szerepét támaszthatja alá az antraciklinek kardiotoxikus mellékhatásának kialakulásában. Az 5-éves ösztülélést elemezve a *BAX* gén rs11667351 mutáns homozigóta (GG) variánsa rosszabb prognózissal és ösztülélési eséllyel párosult. Összességében elmondható, hogy a különböző anyagcsere útvonalak, detoxifikációs mechanizmusok kulcsmolekuláit kódoló gének és SNP-ik vizsgálatának jelentős szerepe lehet az ALL kialakulásának megértésében, a terápia személyre szabásában, ami nemcsak a túlélést javíthatja, hanem a későbbi mellékhatások csökkentésével, a gyermekkori rákos betegek jobb életminőségét eredményezheti a jövőben.

## 9 SUMMARY

We performed candidate gene association studies in pediatric ALL to identify possible genetic risk factors in a Hungarian population. The results were evaluated with traditional statistical methods and with our newly developed Bayesian technique. Altogether 138 SNPs in 37 candidate genes were selected and investigated whether the presence of these polymorphisms was associated with ALL in our population. It was found that the *IKZF1* and *ARID5B* tag polymorphisms associated with increased risk to B-cell ALL, and SNPs in the *STAT3* gene with decreased risk to hyperdiploid ALL. We confirmed the roles of genetic variations of *ARID5B* and *IKZF1* in the susceptibility to B-cell ALL and *STAT3*, *BCL2*, *JAK1*, *JAK3*, *CCR5*, and *AHR* in HD-ALL with Bayesian method, respectively. In the third model it was also demonstrated that patients carrying the rs1076991 (*MTHFD1*) GG genotype might have a significant risk for developing B-ALL. However in case of children with the variant rs3776455 (*MTRR*) GG genotype has lower risk to the disease. Besides these results, rs1532268 (A) and rs1004474 (AA) variant forms of *MTRR* and *TYMS* gene polymorphisms showed association with decreased HD-ALL risk. We also analysed the survival rate of ALL patients and found a slightly significant association with a lower overall survival rate and worst prognosis of *BAX* rs11667351 variant forms (GG). The possible roles of *GSTM1*, *GSTT1* and *CCR5* gene polymorphisms in the risk to ALL were analyzed, but no significant association was found. During the analysis of the role of *ABCC1* in the development of cardiotoxicity significant association was found between patients with *ABCC1* rs3743527TT genotype and the reduced left ventricular fractional shortening (LVFS) at the end of treatment. In this work it was also shown that as a useful supplementary tool of frequentist statistics, BN-BMLA offered a detailed representation of types of relevance, including direct and indirect aspects. Our results may contribute to the understanding of genetic basis of ALL development. Better elucidation of the mechanisms through which gene variants are involved in childhood ALL could be of great diagnostic value and help guide risk-directed therapy, ultimately improving disease management and outcome.

**10 IRODALOMJEGYZÉK**

1. Pui CH, Evans WE. (1998) Acute lymphoblastic leukemia. *N. Engl. J. Med.*, 339: 605-615.
2. Pui CH, Robison LL, Look AT. (2008) Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*, 371: 1030-43.
3. Magyarosy E. (2000) A gyermekkori akut limfoblasztos leukémia kezelésében elért hazai eredmények *Magyar Onkológia*, 44: 255-259.
4. Seibel NL. (2008) Treatment of acute lymphoblastic leukemia in children and adolescents: peaks and pitfalls. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*: 374-80.
5. Schrappe M. (2004) Evolution of BFM trials for childhood ALL. *Ann Hematol*, 83 Suppl 1: S121-3.
6. Hoffbrand A, Pettit J. *Color atlas of clinical hematology*. Mosby, 2000: 346.
7. Heerema NA, Sather HN, Ge J, Arthur DC, Hilden JM, Trigg ME, Reaman GH. (1999) Cytogenetic studies of infant acute lymphoblastic leukemia: poor prognosis of infants with t(4;11) - a report of the Children's Cancer Group. *Leukemia*, 13: 679-86.
8. Reaman GH, Sposto R, Sensel MG, Lange BJ, Feusner JH, Heerema NA, Leonard M, Holmes EJ, Sather HN, Pendergrass TW, Johnstone HS, O'Brien RT, Steinherz PG, Zeltzer PM, Gaynon PS, Trigg ME, Uckun FM. (1999) Treatment outcome and prognostic factors for infants with acute lymphoblastic leukemia treated on two consecutive trials of the Children's Cancer Group. *J Clin Oncol*, 17: 445-55.
9. Smith M, Arthur D, Camitta B, Carroll AJ, Crist W, Gaynon P, Gelber R, Heerema N, Korn EL, Link M, Murphy S, Pui CH, Pullen J, Reamon G, Sallan SE, Sather H, Shuster J, Simon R, Trigg M, Tubergen D, Uckun F, Ungerleider R. (1996) Uniform approach to risk classification and treatment assignment for children with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*, 14: 18-24.
10. Pui CH, Carroll AJ, Raimondi SC, Land VJ, Crist WM, Shuster JJ, Williams DL, Pullen DJ, Borowitz MJ, Behm FG, et al. (1990) Clinical presentation, karyotypic characterization, and treatment outcome of childhood acute

lymphoblastic leukemia with a near-haploid or hypodiploid less than 45 line. *Blood*, 75: 1170-7.

11. Frankel LS, Ochs J, Shuster JJ, Dubowy R, Bowman WP, Hockenberry-Eaton M, Borowitz M, Carroll AJ, Steuber CP, Pullen DJ. (1997) Therapeutic trial for infant acute lymphoblastic leukemia: the Pediatric Oncology Group experience (POG 8493). *J Pediatr Hematol Oncol*, 19: 35-42.
12. Hunger SP, Lu X, Devidas M, Camitta BM, Gaynon PS, Winick NJ, Reaman GH, Carroll WL. (2012) Improved survival for children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia between 1990 and 2005: a report from the children's oncology group. *J Clin Oncol*, 30: 1663-9.
13. Marco F, Bureo E, Ortega JJ, Badell I, Verdaguer A, Martinez A, Munoz A, Madero L, Olive T, Cubells J, Castel V, Sastre A, Maldonado MS, Diaz MA. (2000) High survival rate in infant acute leukemia treated with early high-dose chemotherapy and stem-cell support. *Grupo Espanol de Trasplante de Medula Osea en Ninos. J Clin Oncol*, 18: 3256-61.
14. Balduzzi A, Valsecchi MG, Uderzo C, De Lorenzo P, Klingebiel T, Peters C, Sary J, Felice MS, Magyarosy E, Conter V, Reiter A, Messina C, Gardner H, Schrappe M. (2005) Chemotherapy versus allogeneic transplantation for very-high-risk childhood acute lymphoblastic leukaemia in first complete remission: comparison by genetic randomisation in an international prospective study. *Lancet*, 366: 635-42.
15. Chessells JM, Bailey C, Richards SM. (1995) Intensification of treatment and survival in all children with lymphoblastic leukaemia: results of UK Medical Research Council trial UKALL X. *Medical Research Council Working Party on Childhood Leukaemia. Lancet*, 345: 143-8.
16. Pui CH, Boyett JM, Relling MV, Harrison PL, Rivera GK, Behm FG, Sandlund JT, Ribeiro RC, Rubnitz JE, Gajjar A, Evans WE. (1999) Sex differences in prognosis for children with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*, 17: 818-24.
17. Pollock BH, DeBaun MR, Camitta BM, Shuster JJ, Ravindranath Y, Pullen DJ, Land VJ, Mahoney DH, Jr., Lauer SJ, Murphy SB. (2000) Racial differences in

- the survival of childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia: a Pediatric Oncology Group Study. *J Clin Oncol*, 18: 813-23.
18. Bolufer P, Collado M, Barragan E, Cervera J, Calasanz MJ, Colomer D, Roman-Gomez J, Sanz MA. (2007) The potential effect of gender in combination with common genetic polymorphisms of drug-metabolizing enzymes on the risk of developing acute leukemia. *Haematologica*, 92: 308-14.
  19. Reiter A, Schrappe M, Ludwig WD, Tiemann M, Parwaresch R, Zimmermann M, Schirg E, Henze G, Schellong G, Gadner H, Riehm H. (2000) Intensive ALL-type therapy without local radiotherapy provides a 90% event-free survival for children with T-cell lymphoblastic lymphoma: a BFM group report. *Blood*, 95: 416-21.
  20. Uckun FM, Sensel MG, Sun L, Steinherz PG, Trigg ME, Heerema NA, Sather HN, Reaman GH, Gaynon PS. (1998) Biology and treatment of childhood T-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 91: 735-46.
  21. Pullen J, Shuster JJ, Link M, Borowitz M, Amylon M, Carroll AJ, Land V, Look AT, McIntyre B, Camitta B. (1999) Significance of commonly used prognostic factors differs for children with T cell acute lymphocytic leukemia (ALL), as compared to those with B-precursor ALL. A Pediatric Oncology Group (POG) study. *Leukemia*, 13: 1696-707.
  22. Ratei R, Sperling C, Karawajew L, Schott G, Schrappe M, Harbott J, Riehm H, Ludwig WD. (1998) Immunophenotype and clinical characteristics of CD45-negative and CD45-positive childhood acute lymphoblastic leukemia. *Ann Hematol*, 77: 107-14.
  23. Pui CH, Boyett JM, Hancock ML, Pratt CB, Meyer WH, Crist WM. (1995) Outcome of treatment for childhood cancer in black as compared with white children. The St Jude Children's Research Hospital experience, 1962 through 1992. *Jama*, 273: 633-7.
  24. Davies SM, Ross JA. (2003) Childhood cancer etiology: recent reports. *Med Pediatr Oncol*, 40: 35-8.
  25. Ross JA, Davies SM. (2001) Childhood cancer etiology: recent reports. *Med Pediatr Oncol*, 37: 55-8.

26. Greaves MF. (1997) Aetiology of acute leukaemia. *Lancet*, 349: 344-349.
27. Wiemels JL, Ford AM, Van Wering ER, Postma A, Greaves M. (1999) Protracted and variable latency of acute lymphoblastic leukemia after TEL-AML1 gene fusion in utero. *Blood*, 94: 1057-1062.
28. Ziegelberger G, Dehos A, Grosche B, Hornhardt S, Jung T, Weiss W. (2011) Childhood leukemia--risk factors and the need for an interdisciplinary research agenda. *Prog Biophys Mol Biol*, 107: 312-4.
29. Lightfoot TJ, Roman E. (2004) Causes of childhood leukaemia and lymphoma. *Toxicol Appl Pharmacol*, 199: 104-17.
30. Infante-Rivard C, Krajinovic M, Labuda D, Sinnett D. (2002) Childhood acute lymphoblastic leukemia associated with parental alcohol consumption and polymorphisms of carcinogen-metabolizing genes. *Epidemiology*, 13: 277-281.
31. Infante-Rivard C. (2003) Diagnostic x rays, DNA repair genes and childhood acute lymphoblastic leukemia. *Health Physics*, 85: 60-64.
32. Gale KB, Ford AM, Repp R, Borkhardt A, Keller C, Eden OB, Greaves MF. (1997) Backtracking leukemia to birth: identification of clonotypic gene fusion sequences in neonatal blood spots. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94: 13950-4.
33. Ford AM, Ridge SA, Cabrera ME, Mahmoud H, Steel CM, Chan LC, Greaves M. (1993) In utero rearrangements in the trithorax-related oncogene in infant leukaemias. *Nature*, 363: 358-60.
34. Ford AM, Pombo-de-Oliveira MS, McCarthy KP, MacLean JM, Carrico KC, Vincent RF, Greaves M. (1997) Monoclonal origin of concordant T-cell malignancy in identical twins. *Blood*, 89: 281-5.
35. Topinka J, Binkova B, Mrackova G, Stavkova Z, Benes I, Dejmek J, Lenicek J, Sram RJ. (1997) DNA adducts in human placenta as related to air pollution and to GSTM1 genotype. *Mutat Res*, 390: 59-68.
36. Infante-Rivard C, Labuda D, Krajinovic M, Sinnett D. (1999) Risk of childhood leukemia associated with exposure to pesticides and with gene polymorphisms. *Epidemiology*, 10: 481-487.
37. Infante-Rivard C, Mirea L, Bull SB. (2009) Combining case-control and case-trio data from the same population in genetic association analyses: Overview

- of approaches and illustration with a candidate gene study. *American Journal of Epidemiology*, 170: 657-664.
38. Whyatt RM, Bell DA, Jedrychowski W, Santella RM, Garte SJ, Cosma G, Manchester DK, Young TL, Cooper TB, Ottman R, Perera FP. (1998) Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in human placenta and modulation by CYP1A1 induction and genotype. *Carcinogenesis*, 19: 1389-92.
  39. Juchau MR. (1980) Drug biotransformation in the placenta. *Pharmacol Ther*, 8: 501-24.
  40. Hakkola J, Pelkonen O, Pasanen M, Raunio H. (1998) Xenobiotic-metabolizing cytochrome P450 enzymes in the human feto-placental unit: role in intrauterine toxicity. *Crit Rev Toxicol*, 28: 35-72.
  41. da Costa Ramos FJ, Cartaxo Muniz MT, Silva VC, Araujo M, Leite EP, Freitas EM, Zanrosso CW, Hatagima A, de Mello MP, Yunes JA, Marques-Salles Tde J, Santos N, Brandalise SR, Pombo-De-Oliveira MS. (2006) Association between the MTHFR A1298C polymorphism and increased risk of acute myeloid leukemia in Brazilian children. *Leuk Lymphoma*, 47: 2070-5.
  42. Gidron A, Plataniotis LC. (2006) MTHFR polymorphisms and the development of acute leukemia: does it really matter? *Leuk Lymphoma*, 47: 2002-3.
  43. Robien K, Ulrich CM. (2003) 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and leukemia risk: a HuGE minireview. *Am J Epidemiol*, 157: 571-82.
  44. Franco RF, Simoes BP, Tone LG, Gabellini SM, Zago MA, Falcao RP. (2001) The methylenetetrahydrofolate reductase C677T gene polymorphism decreases the risk of childhood acute lymphocytic leukaemia. *British Journal of Haematology*, 115: 616-618.
  45. Gemmati D, Ongaro A, Scapoli GL, Della Porta M, Tognazzo S, Serino ML, Di Bona E, Rodeghiero F, Gilli G, Reverberi R, Caruso A, Pasello M, Pellati A, De Mattei M. (2004) Common gene polymorphisms in the metabolic folate and methylation pathway and the risk of acute lymphoblastic leukemia and non-Hodgkin's lymphoma in adults. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 13: 787-94.



46. Chatzidakis K, Goulas A, Athanassiadou-Piperopoulou F, Fidani L, Kolioukas D, Mirtsou V. (2006) Methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism: Association with risk for childhood acute lymphoblastic leukemia and response during the initial phase of chemotherapy in Greek patients. *Pediatric Blood & Cancer*, 47: 147-151.
47. de Jonge R, Tissing WJE, Hooijberg JH, Jansen G, Kaspers GJL, Lindemans J, Peters GJ, Pieters R. (2009) Polymorphisms in folate-related genes and risk of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 113: 2284-2289.
48. Wiemels JL, Smith RN, Taylor GM, Eden OB, Alexander FE, Greaves MF. (2001) Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphisms and risk of molecularly defined subtypes of childhood acute leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98: 4004-4009.
49. Krajcinovic M, Lamothe S, Labuda D, Lemieux-Blanchard É, Théorêt Y, Moqhrabi A, Sinnett D. (2004) Role of MTHFR genetic polymorphisms in the susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 103: 252-257.
50. Sinnett D, Labuda D, Krajcinovic M. (2006) Challenges identifying genetic determinants of pediatric cancers - The childhood leukemia experience. *Familial Cancer*, 5: 35-47.
51. 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: 82-7.
52. Chiusolo P, Reddiconto G, Cimino G, Sica S, Fiorini A, Farina G, Vitale A, Sora F, Laurenti L, Bartolozzi F, Fazi P, Mandelli F, Leone G. (2004) Methylenetetrahydrofolate reductase genotypes do not play a role in acute lymphoblastic leukemia pathogenesis in the Italian population. *Haematologica*, 89: 139-44.
53. Thirumaran RK, Gast A, Flohr T, Burwinkel B, Bartram C, Hemminki K, Kumar R, MTHFR genetic polymorphisms and susceptibility to childhood

- acute lymphoblastic leukemia, in *Blood*. 2005: United States. p. 2590-1; author reply 2591-2.
54. Zanosso CW, Hatagima A, Emerenciano M, Ramos F, Figueiredo A, Felix TM, Segal SL, Giugliani R, Muniz MT, Pombo-de-Oliveira MS. (2006) The role of methylenetetrahydrofolate reductase in acute lymphoblastic leukemia in a Brazilian mixed population. *Leuk Res*, 30: 477-81.
  55. Oh D, Kim NK, Jang MJ, Kim HC, Lee JH, Lee JA, Ahn MJ, Kim CS, Kim HS, Park S, Chio HS, Min YH. (2007) Association of the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR C677T and A1298C) polymorphisms in Korean patients with adult acute lymphoblastic leukemia. *Anticancer Res*, 27: 3419-24.
  56. Nakai K, Itoh C, Habano W, Gurwitz D. (2001) Correlation between C677T MTHFR gene polymorphism, plasma homocysteine levels and the incidence of CAD. *Am J Cardiovasc Drugs*, 1: 353-61.
  57. Cortese C, Motti C. (2001) MTHFR gene polymorphism, homocysteine and cardiovascular disease. *Public Health Nutr*, 4: 493-7.
  58. Metayer C, Scélo G, Chokkalingam A, Barcellos L, Aldrich M, Chang J, Guha N, Urayama K, Hansen H, Block G, Kiley V, Wiencke J, Wiemels J, Buffler P. (2011) Genetic variants in the folate pathway and risk of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Causes & Control*, 22: 1243-1258.
  59. Krajinovic M. (2008) MTHFD1 gene: role in disease susceptibility and pharmacogenetics. *Pharmacogenomics*, 9: 829-832.
  60. Krajinovic M, Lemieux-Blanchard É, Chiasson S, Primeau M, Costea I, Moghrabi A. (2004) Role of polymorphism in MTHFR and MTHFD1 genes in the outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenomics Journal*, 4: 66-72.
  61. Cascorbi I, Brockmoller J, Roots I. (1996) A C4887A polymorphism in exon 7 of human CYP1A1: population frequency, mutation linkages, and impact on lung cancer susceptibility. *Cancer Res*, 56: 4965-9.
  62. Cosma G, Crofts F, Currie D, Wirgin I, Toniolo P, Garte SJ. (1993) Racial differences in restriction fragment length polymorphisms and messenger RNA

- inducibility of the human CYP1A1 gene. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2: 53-7.
63. Blumer JL, Dunn R, Esterhay MD, Yamashita TS, Gross S. (1981) Lymphocyte aromatic hydrocarbon responsiveness in acute leukemia of childhood. *Blood*, 58: 1081-8.
  64. Kawajiri K, Nakachi K, Imai K, Yoshii A, Shinoda N, Watanabe J. (1990) Identification of genetically high risk individuals to lung cancer by DNA polymorphisms of the cytochrome P450IA1 gene. *FEBS Lett*, 263: 131-3.
  65. Sesardic D, Pasanen M, Pelkonen O, Boobis AR. (1990) Differential expression and regulation of members of the cytochrome P450IA gene subfamily in human tissues. *Carcinogenesis*, 11: 1183-8.
  66. Manchester DK, Jacoby EH. (1981) Sensitivity of human placental monooxygenase activity to maternal smoking. *Clin Pharmacol Ther*, 30: 687-92.
  67. Whyatt RM, Garte SJ, Cosma G, Bell DA, Jedrychowski W, Wahrendorf J, Randall MC, Cooper TB, Ottman R, Tang D, et al. (1995) CYP1A1 messenger RNA levels in placental tissue as a biomarker of environmental exposure. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 4: 147-53.
  68. Sinnott D, Krajcinovic M, Labuda D. (2000) Genetic susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia and Lymphoma*, 38: 447-462.
  69. Rossini A, Rapozo DC, Amorim LM, Macedo JM, Medina R, Neto JF, Gallo CV, Pinto LF. (2002) Frequencies of GSTM1, GSTT1, and GSTP1 polymorphisms in a Brazilian population. *Genet Mol Res*, 1: 233-40.
  70. Pongstaporn W, Pakakasama S, Sanguansin S, Hongeng S, Petmitr S. (2009) Polymorphism of glutathione S-transferase Omega gene: association with risk of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 135: 673-678.
  71. Krajcinovic M, Labuda D, Sinnott D. (2001) Childhood acute lymphoblastic leukemia: Genetic determinants of susceptibility and disease outcome. *Reviews on Environmental Health*, 16: 263-279.

72. Alves S, Amorim A, Ferreira F, Norton L, Prata MJ. (2002) The GSTM1 and GSTT1 genetic polymorphisms and susceptibility to acute lymphoblastic leukemia in children from north Portugal [3]. *Leukemia*, 16: 1565-1567.
73. Krajcinovic M, Labuda D, Richer C, Karimi S, Sinnett D. (1999) Susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia: influence of CYP1A1, CYP2D6, GSTM1, and GSTT1 genetic polymorphisms. *Blood*, 93: 1496-1501.
74. Chen CL, Liu Q, Pui CH, Rivera GK, Sandlund JT, Ribeiro R, Evans WE, Relling MV. (1997) Higher frequency of glutathione S-transferase deletions in black children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 89: 1701-1707.
75. Lemos MC, Cabrita FJ, Silva HA, Vivan M, Placido F, Regateiro FJ. (1999) Genetic polymorphism of CYP2D6, GSTM1 and NAT2 and susceptibility to haematological neoplasias. *Carcinogenesis*, 20: 1225-9.
76. 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.
77. Papaemmanuil E, Hosking FJ, Vijayakrishnan J, Price A, Olver B, Sheridan E, Kinsey SE, Lightfoot T, Roman E, Irving JAE, 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. *Nature Genetics*, 41: 1006-1010.
78. 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. (2010) Variation in CDKN2A at 9p21.3 influences childhood acute lymphoblastic leukemia risk. *Nat Genet*, 42: 492-494.
79. Treviño 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.
80. Inaba H, Greaves M, Mullighan CG. (2013) Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*, 381: 1943-1955.
  81. Yang JJ, Cheng C, Yang W, Pei D, Cao X, Fan Y, Pounds SB, Neale G, Trevino LR, French D, Campana D, Downing JR, Evans WE, Pui CH, Devidas M, Bowman WP, Camitta BM, Willman CL, Davies SM, Borowitz MJ, Carroll WL, Hunger SP, Relling MV. (2009) Genome-wide interrogation of germline genetic variation associated with treatment response in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Jama*, 301: 393-403.
  82. Miller C, Mullighan C, Su Xea. (2008) Pax5 haploinsufficiency cooperates with BCR-ABL1 to induce acute lymphoblastic leukemia *Blood*, 112: 293.
  83. Virely C, Moulin S, Cobaleda C, Lasgi C, Alberdi A, Soulier J, Sigaux F, Chan S, Kastner P, Ghysdael J. (2010) Haploinsufficiency of the IKZF1 (IKAROS) tumor suppressor gene cooperates with BCR-ABL in a transgenic model of acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2010: 1200-1204.
  84. Coppede F, Colognato R, Bonelli A, Astrea G, Bargagna S, Siciliano G, Migliore L. (2007) Polymorphisms in folate and homocysteine metabolizing genes and chromosome damage in mothers of Down syndrome children. *Am J Med Genet A*, 143a: 2006-2015.
  85. Robison LL. (1992) Down syndrome and leukemia. *Leukemia*, 6 Suppl 1: 5-7.
  86. Armstrong SA, Look AT. (2005) Molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*, 23: 6306-6315.
  87. Seeger K, Adams HP, Buchwald D, Beyermann B, Kremens B, Niemeyer C, Ritter J, Schwabe D, Harms D, Schrappe M, Henze G. (1998) TEL-AML1 fusion transcript in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia. The Berlin-Frankfurt-Munster Study Group. *Blood*, 91: 1716-1722.
  88. Wiemels JL, Pagnamenta A, Taylor GM, Eden OB, Alexander FE, Greaves MF. (1999) A lack of a functional NAD(P)H:quinone oxidoreductase allele is selectively associated with pediatric leukemias that have MLL fusions. *Cancer Research*, 59: 4095-4099.

89. Harrison CJ. (2009) Cytogenetics of paediatric and adolescent acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*, 144: 147-56.
90. Schafer ES, Hunger SP. (2011) Optimal therapy for acute lymphoblastic leukemia in adolescents and young adults. *Nat Rev Clin Oncol*, 8: 417-24.
91. Russell LJ, Capasso M, Vater I, Akasaka T, Bernard OA, Calasanz MJ, Chandrasekaran T, Chapiro E, Gesk S, Griffiths M, Guttery DS, Haferlach C, Harder L, Heidenreich O, Irving J, Kearney L, Nguyen-Khac F, Machado L, Minto L, Majid A, Moorman AV, Morrison H, Rand V, Strefford JC, Schwab C, Tonnes H, Dyer MJ, Siebert R, Harrison CJ. (2009) Deregulated expression of cytokine receptor gene, CRLF2, is involved in lymphoid transformation in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 114: 2688-98.
92. Mullighan CG, Goorha S, Radtke I, Miller CB, Coustan-Smith E, Dalton JD, Girtman K, Mathew S, Ma J, Pounds SB, Su X, Pui CH, Relling MV, Evans WE, Shurtleff SA, Downing JR. (2007) Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature*, 446: 758-64.
93. Mullighan CG, Miller CB, Radtke I, Phillips LA, Dalton J, Ma J, White D, Hughes TP, Le Beau MM, Pui CH, Relling MV, Shurtleff SA, Downing JR. (2008) BCR-ABL1 lymphoblastic leukaemia is characterized by the deletion of Ikaros. *Nature*, 453: 110-4.
94. Mullighan CG, Collins-Underwood JR, Phillips LA, Loudin MG, Liu W, Zhang J, Ma J, Coustan-Smith E, Harvey RC, Willman CL, Mikhail FM, Meyer J, Carroll AJ, Williams RT, Cheng J, Heerema NA, Basso G, Pession A, Pui CH, Raimondi SC, Hunger SP, Downing JR, Carroll WL, Rabin KR. (2009) Rearrangement of CRLF2 in B-progenitor- and Down syndrome-associated acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet*, 41: 1243-6.
95. Mullighan CG, Zhang J, Kasper LH, Lerach S, Payne-Turner D, Phillips LA, Heatley SL, Holmfeldt L, Collins-Underwood JR, Ma J, Buetow KH, Pui CH, Baker SD, Brindle PK, Downing JR. (2011) CREBBP mutations in relapsed acute lymphoblastic leukaemia. *Nature*, 471: 235-9.
96. Mullighan CG, Zhang J, Harvey RC, Collins-Underwood JR, Schulman BA, Phillips LA, Tasian SK, Loh ML, Su X, Liu W, Devidas M, Atlas SR, Chen IM, Clifford RJ, Gerhard DS, Carroll WL, Reaman GH, Smith M, Downing

- JR, Hunger SP, Willman CL. (2009) JAK mutations in high-risk childhood acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106: 9414-8.
97. Kuiper RP, Schoenmakers EFPM, van Reijmersdal SV, Hehir-Kwa JY, van Kessel AG, van Leeuwen FN, Hoogerbrugge PM. (2007) High-resolution genomic profiling of childhood ALL reveals novel recurrent genetic lesions affecting pathways involved in lymphocyte differentiation and cell cycle progression. *Leukemia*, 21: 1258-1266.
98. Kawamata N, Ogawa S, Zimmermann M, Kato M, Sanada M, Hemminki K, Yamamoto G, Nannya Y, Koehler R, Flohr T, Miller CW, Harbott J, Ludwig WD, Stanulla M, Schrappe M, Bartram CR, Koeffler HP. (2008) Molecular allelokaryotyping of pediatric acute lymphoblastic leukemias by high-resolution single nucleotide polymorphism oligonucleotide genomic microarray. *Blood*, 111: 776-784.
99. Strefford JC, Worley H, Barber K, Wright S, Stewart AR, Robinson HM, Bettney G, van Delft FW, Atherton MG, Davies T, Griffiths M, Hing S, Ross FM, Talley P, Saha V, Moorman AV, Harrison CJ. (2007) Genome complexity in acute lymphoblastic leukemia is revealed by array-based comparative genomic hybridization. *Oncogene*, 26: 4306-18.
100. van Vlierberghe P, Meijerink JP, Lee C, Ferrando AA, Look AT, van Wering ER, Beverloo HB, Aster JC, Pieters R. (2006) A new recurrent 9q34 duplication in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 20: 1245-53.
101. Van Vlierberghe P, Homminga I, Zuurbier L, Gladdines-Buijs J, van Wering ER, Horstmann M, Beverloo HB, Pieters R, Meijerink JP. (2008) Cooperative genetic defects in TLX3 rearranged pediatric T-ALL. *Leukemia*, 22: 762-70.
102. Zhang J, Mullighan CG, Harvey RC, Wu G, Chen X, Edmonson M, Buetow KH, Carroll WL, Chen IM, Devidas M, Gerhard DS, Loh ML, Reaman GH, Relling MV, Camitta BM, Bowman WP, Smith MA, Willman CL, Downing JR, Hunger SP. (2011) Key pathways are frequently mutated in high-risk childhood acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children's Oncology Group. *Blood*, 118: 3080-7.
103. Zhang J, Ding L, Holmfeldt L, Wu G, Heatley SL, Payne-Turner D, Easton J, Chen X, Wang J, Rusch M, Lu C, Chen SC, Wei L, Collins-Underwood JR,

- Ma J, Roberts KG, Pounds SB, Ulyanov A, Becksfort J, Gupta P, Huether R, Kriwacki RW, Parker M, McGoldrick DJ, Zhao D, Alford D, Espy S, Bobba KC, Song G, Pei D, Cheng C, Roberts S, Barbato MI, Campana D, Coustan-Smith E, Shurtleff SA, Raimondi SC, Kleppe M, Cools J, Shimano KA, Hermiston ML, Doulatov S, Eppert K, Laurenti E, Notta F, Dick JE, Basso G, Hunger SP, Loh ML, Devidas M, Wood B, Winter S, Dunsmore KP, Fulton RS, Fulton LL, Hong X, Harris CC, Dooling DJ, Ochoa K, Johnson KJ, Obenauer JC, Evans WE, Pui CH, Naeve CW, Ley TJ, Mardis ER, Wilson RK, Downing JR, Mullighan CG. (2012) The genetic basis of early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Nature*, 481: 157-63.
104. Roman-Gomez J, Jimenez-Velasco A, Agirre X, Castillejo JA, Navarro G, Calasanz MJ, Garate L, San Jose-Eneriz E, Cordeu L, Prosper F, Heiniger A, Torres A. (2006) CpG island methylator phenotype redefines the prognostic effect of t(12;21) in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Clin Cancer Res*, 12: 4845-50.
105. Gutierrez MI, Siraj AK, Bhargava M, Ozbek U, Banavali S, Chaudhary MA, El Solh H, Bhatia K. (2003) Concurrent methylation of multiple genes in childhood ALL: Correlation with phenotype and molecular subgroup. *Leukemia*, 17: 1845-50.
106. Davidsson J, Lilljebjorn H, Andersson A, Veerla S, Heldrup J, Behrendtz M, Fioretos T, Johansson B. (2009) The DNA methylome of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Hum Mol Genet*, 18: 4054-65.
107. Yang Y, Takeuchi S, Hofmann WK, Ikezoe T, van Dongen JJ, Szczepanski T, Bartram CR, Yoshino N, Taguchi H, Koeffler HP. (2006) Aberrant methylation in promoter-associated CpG islands of multiple genes in acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res*, 30: 98-102.
108. Figueroa ME, Chen SC, Andersson AK, Phillips LA, Li Y, Sotzen J, Kundu M, Downing JR, Melnick A, Mullighan CG. (2013) Integrated genetic and epigenetic analysis of childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Invest*, 123: 3099-111.
109. Figueroa ME, Lugthart S, Li Y, Erpelinck-Verschueren C, Deng X, Christos PJ, Schifano E, Booth J, van Putten W, Skrabanek L, Campagne F, Mazumdar



- M, Grealley JM, Valk PJ, Lowenberg B, Delwel R, Melnick A. (2010) DNA methylation signatures identify biologically distinct subtypes in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell*, 17: 13-27.
110. Bullinger L, Ehrich M, Dohner K, Schlenk RF, Dohner H, Nelson MR, van den Boom D. (2010) Quantitative DNA methylation predicts survival in adult acute myeloid leukemia. *Blood*, 115: 636-42.
111. Broske AM, Vockentanz L, Kharazi S, Huska MR, Mancini E, Scheller M, Kuhl C, Enns A, Prinz M, Jaenisch R, Nerlov C, Leutz A, Andrade-Navarro MA, Jacobsen SE, Rosenbauer F. (2009) DNA methylation protects hematopoietic stem cell multipotency from myeloerythroid restriction. *Nat Genet*, 41: 1207-15.
112. Yoda A, Yoda Y, Chiaretti S, Bar-Natan M, Mani K, Rodig SJ, West N, Xiao Y, Brown JR, Mitsiades C, Sattler M, Kutok JL, DeAngelo DJ, Wadleigh M, Piciocchi A, Dal Cin P, Bradner JE, Griffin JD, Anderson KC, Stone RM, Ritz J, Foa R, Aster JC, Frank DA, Weinstock DM. (2010) Functional screening identifies CRLF2 in precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107: 252-7.
113. Hertzberg L, Vendramini E, Ganmore I, Cazzaniga G, Schmitz M, Chalker J, Shiloh R, Iacobucci I, Shochat C, Zeligson S, Cario G, Stanulla M, Strehl S, Russell LJ, Harrison CJ, Bornhauser B, Yoda A, Rechavi G, Bercovich D, Borkhardt A, Kempinski H, te Kronnie G, Bourquin JP, Domany E, Israeli S. (2010) Down syndrome acute lymphoblastic leukemia, a highly heterogeneous disease in which aberrant expression of CRLF2 is associated with mutated JAK2: a report from the International BFM Study Group. *Blood*, 115: 1006-17.
114. Harvey RC, Mullighan CG, Chen IM, Wharton W, Mikhail FM, Carroll AJ, Kang H, Liu W, Dobbin KK, Smith MA, Carroll WL, Devidas M, Bowman WP, Camitta BM, Reaman GH, Hunger SP, Downing JR, Willman CL. (2010) Rearrangement of CRLF2 is associated with mutation of JAK kinases, alteration of IKZF1, Hispanic/Latino ethnicity, and a poor outcome in pediatric B-progenitor acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 115: 5312-21.

115. Mullighan CG, Su X, Zhang J, Radtke I, Phillips LA, Miller CB, Ma J, Liu W, Cheng C, Schulman BA, Harvey RC, Chen IM, Clifford RJ, Carroll WL, Reaman G, Bowman WP, Devidas M, Gerhard DS, Yang W, Relling MV, Shurtleff SA, Campana D, Borowitz MJ, Pui CH, Smith M, Hunger SP, Willman CL, Downing JR. (2009) Deletion of IKZF1 and prognosis in acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*, 360: 470-80.
116. Den Boer ML, van Slegtenhorst M, De Menezes RX, Cheok MH, Buijs-Gladdines JG, Peters ST, Van Zutven LJ, Beverloo HB, Van der Spek PJ, Escherich G, Horstmann MA, Janka-Schaub GE, Kamps WA, Evans WE, Pieters R. (2009) A subtype of childhood acute lymphoblastic leukaemia with poor treatment outcome: a genome-wide classification study. *Lancet Oncol*, 10: 125-34.
117. Buitenkamp TD, Pieters R, Gallimore NE, van der Veer A, Meijerink JP, Beverloo HB, Zimmermann M, de Haas V, Richards SM, Vora AJ, Mitchell CD, Russell LJ, Schwab C, Harrison CJ, Moorman AV, van den Heuvel-Eibrink MM, den Boer ML, Zwaan CM. (2012) Outcome in children with Down's syndrome and acute lymphoblastic leukemia: role of IKZF1 deletions and CRLF2 aberrations. *Leukemia*, 26: 2204-11.
118. Roberts KG, Morin RD, Zhang J, Hirst M, Zhao Y, Su X, Chen SC, Payne-Turner D, Churchman ML, Harvey RC, Chen X, Kasap C, Yan C, Becksfort J, Finney RP, Teachey DT, Maude SL, Tse K, Moore R, Jones S, Mungall K, Birol I, Edmonson MN, Hu Y, Buetow KE, Chen IM, Carroll WL, Wei L, Ma J, Kleppe M, Levine RL, Garcia-Manero G, Larsen E, Shah NP, Devidas M, Reaman G, Smith M, Paugh SW, Evans WE, Grupp SA, Jeha S, Pui CH, Gerhard DS, Downing JR, Willman CL, Loh M, Hunger SP, Marra MA, Mullighan CG. (2012) Genetic alterations activating kinase and cytokine receptor signaling in high-risk acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell*, 22: 153-66.
119. Raimondi SC, Pui CH, Head DR, Rivera GK, Behm FG. (1993) Cytogenetically different leukemic clones at relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 82: 576-80.

120. 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.
121. Yang JJ, Bhojwani D, Yang W, Cai X, Stocco G, Crews K, Wang J, Morrison D, Devidas M, Hunger SP, Willman CL, Raetz EA, Pui CH, Evans WE, Relling MV, Carroll WL. (2008) Genome-wide copy number profiling reveals molecular evolution from diagnosis to relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 112: 4178-4183.
122. Kawamata N, Ogawa S, Seeger K, Kirschner-Schwabe R, Huynh T, Chen J, Megrabian N, Harbott J, Zimmermann M, Henze G, Schrappe M, Bartram CR, Koeffler PH. (2009) Molecular allelokaryotyping of relapsed pediatric acute lymphoblastic leukemia. *International Journal of Oncology*, 34: 1603-1612.
123. Hof J, Krentz S, van Schewick C, Korner G, Shalpour S, Rhein P, Karawajew L, Ludwig WD, Seeger K, Henze G, von Stackelberg A, Hagemeyer C, Eckert C, Kirschner-Schwabe R. (2011) Mutations and deletions of the TP53 gene predict nonresponse to treatment and poor outcome in first relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*, 29: 3185-93.
124. Inthal A, Zeitlhofer P, Zeginigg M, Morak M, Grausenburger R, Fronkova E, Fahrner B, Mann G, Haas OA, Panzer-Grumayer R. (2012) CREBBP HAT domain mutations prevail in relapse cases of high hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 26: 1797-803.
125. Tzoneva G, Perez-Garcia A, Carpenter Z, Khiabani H, Tosello V, Allegretta M, Paietta E, Racevskis J, Rowe JM, Tallman MS, Paganin M, Basso G, Hof J, Kirschner-Schwabe R, Palomero T, Rabadan R, Ferrando A. (2013) Activating mutations in the NT5C2 nucleotidase gene drive chemotherapy resistance in relapsed ALL. *Nat Med*, 19: 368-71.
126. Meyer JA, Wang J, Hogan LE, Yang JJ, Dandekar S, Patel JP, Tang Z, Zumbo P, Li S, Zavadil J, Levine RL, Cardozo T, Hunger SP, Raetz EA, Evans WE, Morrison DJ, Mason CE, Carroll WL. (2013) Relapse-specific mutations in NT5C2 in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet*, 45: 290-4.

127. Pritchard-Jones K, Pieters R, Reaman GH, Hjorth L, Downie P, Calaminus G, Naafs-Wilstra MC, Steliarova-Foucher E. (2013) Sustaining innovation and improvement in the treatment of childhood cancer: lessons from high-income countries. *Lancet Oncol*, 14: e95-e103.
128. Magrath I, Steliarova-Foucher E, Epelman S, Ribeiro RC, Harif M, Li CK, Kebudi R, Macfarlane SD, Howard SC. (2013) Paediatric cancer in low-income and middle-income countries. *Lancet Oncol*, 14: e104-16.
129. Sullivan R, Kowalczyk JR, Agarwal B, Ladenstein R, Fitzgerald E, Barr R, Steliarova-Foucher E, Magrath I, Howard SC, Kruger M, Valsecchi MG, Biondi A, Grundy P, Smith MA, Adamson P, Vassal G, Pritchard-Jones K. (2013) New policies to address the global burden of childhood cancers. *Lancet Oncol*, 14: e125-35.
130. Vassal G, Zwaan CM, Ashley D, Le Deley MC, Hargrave D, Blanc P, Adamson PC. (2013) New drugs for children and adolescents with cancer: the need for novel development pathways. *Lancet Oncol*, 14: e117-24.
131. Davidsen ML, Dalhoff K, Schmiegelow K. (2008) Pharmacogenetics influence treatment efficacy in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol*, 30: 831-49.
132. Weinshilboum R. (2003) Inheritance and drug response. *N Engl J Med*, 348: 529-37.
133. de Jonge R, Hooijberg JH, van Zelst BD, Jansen G, van Zantwijk CH, Kaspers GJL, Peters FGJ, Ravindranath Y, Pieters R, Lindemans J. (2005) Effect of polymorphisms in folate-related genes on in vitro methotrexate sensitivity in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 106: 717-720.
134. Costea I, Moghrabi A, Laverdiere C, Graziani A, Krajinovic M. (2006) Folate cycle gene variants and chemotherapy toxicity in pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*, 91: 1113-6.
135. Kishi S, Cheng C, French D, Pei D, Das S, Cook EH, Hijjiya N, Rizzari C, Rosner GL, Frudakis T, Pui CH, Evans WE, Relling MV. (2007) Ancestry and pharmacogenetics of antileukemic drug toxicity. *Blood*, 109: 4151-7.
136. Rocha JC, Cheng C, Liu W, Kishi S, Das S, Cook EH, Sandlund JT, Rubnitz J, Ribeiro R, Campana D, Pui CH, Evans WE, Relling MV. (2005)

- Pharmacogenetics of outcome in children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 105: 4752-8.
137. Chen ZS, Lee K, Walther S, Raftogianis RB, Kuwano M, Zeng H, Kruh GD. (2002) Analysis of methotrexate and folate transport by multidrug resistance protein 4 (ABCC4): MRP4 is a component of the methotrexate efflux system. *Cancer Res*, 62: 3144-50.
  138. Zeng H, Chen ZS, Belinsky MG, Rea PA, Kruh GD. (2001) Transport of methotrexate (MTX) and folates by multidrug resistance protein (MRP) 3 and MRP1: effect of polyglutamylation on MTX transport. *Cancer Res*, 61: 7225-32.
  139. McGuire JJ, Hsieh P, Coward JK, Bertino JR. (1980) Enzymatic synthesis of folylpolyglutamates. Characterization of the reaction and its products. *J Biol Chem*, 255: 5776-88.
  140. Whitehead VM, Rosenblatt DS, Vuchich MJ, Shuster JJ, Witte A, Beaulieu D. (1990) Accumulation of methotrexate and methotrexate polyglutamates in lymphoblasts at diagnosis of childhood acute lymphoblastic leukemia: a pilot prognostic factor analysis. *Blood*, 76: 44-9.
  141. Masson E, Relling MV, Synold TW, Liu Q, Schuetz JD, Sandlund JT, Pui CH, Evans WE. (1996) Accumulation of methotrexate polyglutamates in lymphoblasts is a determinant of antileukemic effects in vivo. A rationale for high-dose methotrexate. *J Clin Invest*, 97: 73-80.
  142. Kager L, Cheok M, Yang W, Zaza G, Cheng Q, Panetta JC, Pui CH, Downing JR, Relling MV, Evans WE. (2005) Folate pathway gene expression differs in subtypes of acute lymphoblastic leukemia and influences methotrexate pharmacodynamics. *J Clin Invest*, 115: 110-7.
  143. Sorich MJ, Pottier N, Pei D, Yang W, Kager L, Stocco G, Cheng C, Panetta JC, Pui CH, Relling MV, Cheok MH, Evans WE. (2008) In vivo response to methotrexate forecasts outcome of acute lymphoblastic leukemia and has a distinct gene expression profile. *PLoS Med*, 5: e83.
  144. Barredo JC, Synold TW, Laver J, Relling MV, Pui CH, Priest DG, Evans WE. (1994) Differences in constitutive and post-methotrexate folylpolyglutamate synthetase activity in B-lineage and T-lineage leukemia. *Blood*, 84: 564-9.

145. Chabner BA, Allegra CJ, Curt GA, Clendeninn NJ, Baram J, Koizumi S, Drake JC, Jolivet J. (1985) Polyglutamation of methotrexate. Is methotrexate a prodrug? *J Clin Invest*, 76: 907-12.
146. Cheng Q, Wu B, Kager L, Panetta JC, Zheng J, Pui CH, Relling MV, Evans WE. (2004) A substrate specific functional polymorphism of human gamma-glutamyl hydrolase alters catalytic activity and methotrexate polyglutamate accumulation in acute lymphoblastic leukaemia cells. *Pharmacogenetics*, 14: 557-67.
147. Mishra PJ, Humeniuk R, Longo-Sorbello GS, Banerjee D, Bertino JR. (2007) A miR-24 microRNA binding-site polymorphism in dihydrofolate reductase gene leads to methotrexate resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104: 13513-8.
148. Dulucq S, St-Onge G, Gagné V, Ansari M, Sinnott D, Labuda D, Moghrabi A, Krajcinovic M. (2008) DNA variants in the dihydrofolate reductase gene and outcome in childhood ALL. *Blood*, 111: 3692-3700.
149. Stanulla M, Schrappe M. (2009) Treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Semin Hematol*, 46: 52-63.
150. Cheek MH, Pottier N, Kager L, Evans WE. (2009) Pharmacogenetics in acute lymphoblastic leukemia. *Seminars in Hematology*, 46: 39-51.
151. Relling MV, Hancock ML, Boyett JM, Pui CH, Evans WE. (1999) Prognostic importance of 6-mercaptopurine dose intensity in acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 93: 2817-23.
152. Relling MV, Gardner EE, Sandborn WJ, Schmiegelow K, Pui CH, Yee SW, Stein CM, Carrillo M, Evans WE, Klein TE. (2011) Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium guidelines for thiopurine methyltransferase genotype and thiopurine dosing. *Clin Pharmacol Ther*, 89: 387-91.
153. Schmiegelow K, Forestier E, Kristinsson J, Söderhäll S, Vettenranta K, Weinshilboum R, Wesenberg F. (2009) Thiopurine methyltransferase activity is related to the risk of relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia: Results from the NOPHO ALL-92 study. *Leukemia*, 23: 557-564.
154. 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: 3754-62.
155. 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. (2012) Pharmacogenomic prediction of anthracycline-induced cardiotoxicity in children. *J Clin Oncol*, 30: 1422-8.
156. Bernt KM, Zhu N, Sinha AU, Vempati S, Faber J, Krivtsov AV, Feng Z, Punt N, Daigle A, Bullinger L, Pollock RM, Richon VM, Kung AL, Armstrong SA. (2011) MLL-rearranged leukemia is dependent on aberrant H3K79 methylation by DOT1L. *Cancer Cell*, 20: 66-78.
157. Stumpel DJ, Schneider P, van Roon EH, Boer JM, de Lorenzo P, Valsecchi MG, de Menezes RX, Pieters R, Stam RW. (2009) Specific promoter methylation identifies different subgroups of MLL-rearranged infant acute lymphoblastic leukemia, influences clinical outcome, and provides therapeutic options. *Blood*, 114: 5490-8.
158. Hoelzer D. (2011) Novel antibody-based therapies for acute lymphoblastic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2011: 243-9.
159. Millinghoffer A, Hullám G, Antal P. (2005) Statisztikai adat- és szövegelemzés Bayes-hálókkal: a valószínűségtől a függetlenségi és oksági viszonyokig *Híradástechnika*, LX: 40-49.
160. Lautner-Csorba O, Gezsi A, Semsei A, Antal P, Edelyi D, Schermann G, Kutszegi N, Csordas K, Hegyi M, Kovacs G, Falus A, Szalai C. (2012) Candidate gene association study in pediatric acute lymphoblastic leukemia evaluated by Bayesian network based Bayesian multilevel analysis of relevance. *BMC Medical Genomics*, 5: 42. doi:10.1186/1755-8794-5-42.
161. Ungvári I, Hullám G, Antal P, Kizsel P, Gézsi A, Hadadi É, Virág V, Hajós G, Millinghoffer A, Nagy A, et al. (2012) Evaluation of a partial genome screening of two asthma susceptibility regions using Bayesian network based Bayesian

- multilevel analysis of relevance. PLoS ONE, 7: e33573. doi:10.1371/journal.pone.0033573.
162. Antal P, Millinghoffer A, Hullam G, Szalai C, Falus A. (2008) A Bayesian view of challenges in feature selection: feature aggregation, multiple targets, redundancy and interaction, In JMLR Workshop and Conference Proceedings: New challenges for feature selection in data mining and knowledge discovery. 2008: 74-89.
  163. Antal P, Millinghoffer A, Hullám G, Hajós G, Szalai C, Falus A. A bioinformatic platform for a Bayesian, multiphased, multilevel analysis in immunogenomics, in Bioinformatics for Immunomics, Immunomics reviews. Springer-Verlag, New York, 2010: 157-185.
  164. Hullam G, Antal P. (2012) Estimation of effect size posterior using model averaging over Bayesian network structures and parameters. In Proceedings of the Sixth European Workshop on Probabilistic Graphical Models. 2012: 147-154.
  165. Hullám G, Antal P, Szalai C, Falus A. (2010) Evaluation of a Bayesian model-based approach in GA studies. Journal of Machine Learning in Systems Biology, Workshop and Conference Proceedings, 8: 30-43.
  166. Antal P, Hullam G, Gezsi A, Millinghoffer A. (2006) Learning complex bayesian network features for classification. Proceeding of third European Workshop on Probabilistic Graphical Models: 9-16.
  167. Lautner-Csorba O, Gezsi A, Erdelyi DJ, Hullam G, Antal P, Semsei AF, Kutszegi N, Kovacs G, Falus A, Szalai C. (2013) Roles of genetic polymorphisms in the folate pathway in childhood acute lymphoblastic leukemia evaluated by bayesian relevance and effect size analysis. PLoS One, 8: e69843.
  168. Cooper GF, Herskovits E. (1992) A Bayesian method for the induction of probabilistic networks from data. Mach. Learn., 9: 309-347.
  169. Altekar G, Dwarkadas S, Huelsenbeck JP, Ronquist F. (2004) Parallel Metropolis coupled Markov chain Monte Carlo for Bayesian phylogenetic inference. Bioinformatics, 20: 407-415.



170. Gelman A, Carlin JB, Stern HS, Rubin DB, Dunson DB. Bayesian Data Analysis. Chapman & Hall, London, 1995.
171. Gamerman D. Markov Chain Monte Carlo. Chapman and Hall, London, 1997.
172. Reich D, Cargil IM, Bolk S, Ireland J, Sabeti P, Richter D, Lavery T, Kouyoumjian R, Farhadian S, Ward R, Lander E. (2001) Linkage disequilibrium in the human genome. *Nature*, 411: 199-204.
173. Benjamini Y, Hochberg Y. (1995) Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*, 57: 289-300.
174. Storey JD. (2002) A direct approach to false discovery rates. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Statistical Methodology)*, 64: 479-498.
175. Purcell S, Cherny SS, Sham PC. (2003) Genetic Power Calculator: design of linkage and association genetic mapping studies of complex traits. *Bioinformatics*, 19: 149-150.
176. Franca R, Rebora P, Basso G, Biondi A, Cazzaniga G, Crovella S, Decorti G, Fagioli F, Giarin E, Locatelli F, Poggi V, Valsecchi MG, Rabusin M. (2012) Glutathione S-transferase homozygous deletions and relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia: a novel study design in a large Italian AIEOP cohort. *Pharmacogenomics*, 13: 1905-16.
177. Sobti RC, Al-Badran AI, Sharma S, Sharma SK, Krishan A, Mohan H. (2005) Genetic polymorphisms of CYP2D6, GSTM1, and GSTT1 genes and bladder cancer risk in North India. *Cancer Genet Cytogenet*, 156: 68-73.
178. He Y, Hoskins JM, McLeod HL. (2011) Copy number variants in pharmacogenetic genes. *Trends Mol Med*, 17: 244-51.
179. Dunna NR, Vure S, Sailaja K, Surekha D, Raghunadharao D, Rajappa S, Vishnupriya S. (2013) Deletion of GSTM1 and T1 genes as a risk factor for development of acute leukemia. *Asian Pac J Cancer Prev*, 14: 2221-4.
180. Okkels H, Sigsgaard T, Wolf H, Autrup H. (1996) Glutathione S-transferase mu as a risk factor in bladder tumours. *Pharmacogenetics*, 6: 251-6.
181. Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR. (2005) Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 45: 51-88.

182. Seidegard J, Vorachek WR, Pero RW, Pearson WR. (1988) Hereditary differences in the expression of the human glutathione transferase active on trans-stilbene oxide are due to a gene deletion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85: 7293-7.
183. Pemble S, Schroeder KR, Spencer SR, Meyer DJ, Hallier E, Bolt HM, Ketterer B, Taylor JB. (1994) Human glutathione S-transferase theta (GSTT1): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism. *Biochem J*, 300: 271-276.
184. Garte S, Gaspari L, Alexandrie AK, Ambrosone C, Autrup H, Autrup JL, Baranova H, Bathum L, Benhamou S, Boffetta P, Bouchardy C, Breskvar K, Brockmoller J, Cascorbi I, Clapper ML, Coutelle C, Daly A, Dell'Omo M, Dolzan V, Dresler CM, Fryer A, Haugen A, Hein DW, Hildesheim A, Hirvonen A, Hsieh LL, Ingelman-Sundberg M, Kalina I, Kang D, Kihara M, Kiyohara C, Kremers P, Lazarus P, Le Marchand L, Lechner MC, van Lieshout EM, London S, Manni JJ, Maugard CM, Morita S, Nazar-Stewart V, Noda K, Oda Y, Parl FF, Pastorelli R, Persson I, Peters WH, Rannug A, Rebbeck T, Risch A, Roelandt L, Romkes M, Ryberg D, Salagovic J, Schoket B, Seidegard J, Shields PG, Sim E, Sinnet D, Strange RC, Stucker I, Sugimura H, To-Figueras J, Vineis P, Yu MC, Taioli E. (2001) Metabolic gene polymorphism frequencies in control populations. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 10: 1239-48.
185. Piacentini S, Polimanti R, Porreca F, Martinez-Labarga C, De Stefano GF, Fuciarelli M. (2011) GSTT1 and GSTM1 gene polymorphisms in European and African populations. *Mol Biol Rep*, 38: 1225-30.
186. Economopoulos KP, Sergentanis TN. (2010) GSTM1, GSTT1, GSTP1, GSTA1 and colorectal cancer risk: a comprehensive meta-analysis. *Eur J Cancer*, 46: 1617-31.
187. Das P, Shaik AP, Bammidi VK. (2009) Meta-analysis study of glutathione-S-transferases (GSTM1, GSTP1, and GSTT1) gene polymorphisms and risk of acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma*, 50: 1345-51.
188. Bell DA, Taylor JA, Paulson DF, Robertson CN, Mohler JL, Lucier GW. (1993) Genetic risk and carcinogen exposure: a common inherited defect of the

- carcinogen-metabolism gene glutathione S-transferase M1 (GSTM1) that increases susceptibility to bladder cancer. *J Natl Cancer Inst*, 85: 1159-64.
189. Ambrosone CB, Freudenheim JL, Graham S, Marshall JR, Vena JE, Brasure JR, Laughlin R, Nemoto T, Michalek AM, Harrington A, et al. (1995) Cytochrome P4501A1 and glutathione S-transferase (M1) genetic polymorphisms and postmenopausal breast cancer risk. *Cancer Res*, 55: 3483-5.
  190. Kelsey KT, Hankinson SE, Colditz GA, Springer K, Garcia-Closas M, Spiegelman D, Manson JE, Garland M, Stampfer MJ, Willett WC, Speizer FE, Hunter DJ. (1997) Glutathione S-transferase class mu deletion polymorphism and breast cancer: results from prevalent versus incident cases. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 6: 511-5.
  191. Brockmoller J, Cascorbi I, Kerb R, Roots I. (1996) Combined analysis of inherited polymorphisms in arylamine N-acetyltransferase 2, glutathione S-transferases M1 and T1, microsomal epoxide hydrolase, and cytochrome P450 enzymes as modulators of bladder cancer risk. *Cancer Res*, 56: 3915-25.
  192. Brockmoller J, Kerb R, Drakoulis N, Staffeldt B, Roots I. (1994) Glutathione S-transferase M1 and its variants A and B as host factors of bladder cancer susceptibility: a case-control study. *Cancer Res*, 54: 4103-11.
  193. Anwar WA, Abdel-Rahman SZ, El-Zein RA, Mostafa HM, Au WW. (1996) Genetic polymorphism of GSTM1, CYP2E1 and CYP2D6 in Egyptian bladder cancer patients. *Carcinogenesis*, 17: 1923-9.
  194. Voso MT, D'Alo F, Putzulu R, Mele L, Scardocci A, Chiusolo P, Latagliata R, Lo-Coco F, Rutella S, Pagano L, Hohaus S, Leone G. (2002) Negative prognostic value of glutathione S-transferase (GSTM1 and GSTT1) deletions in adult acute myeloid leukemia. *Blood*, 100: 2703-7.
  195. Murphy PM. (2001) Chemokines and the molecular basis of cancer metastasis. *N Engl J Med*, 345: 833-5.
  196. Balkwill F, Mantovani A. (2001) Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*, 357: 539-45.
  197. Homey B, Muller A, Zlotnik A. (2002) Chemokines: agents for the immunotherapy of cancer? *Nat Rev Immunol*, 2: 175-84.

198. Mashino K, Sadanaga N, Yamaguchi H, Tanaka F, Ohta M, Shibuta K, Inoue H, Mori M. (2002) Expression of chemokine receptor CCR7 is associated with lymph node metastasis of gastric carcinoma. *Cancer Res*, 62: 2937-41.
199. Muller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, McClanahan T, Murphy E, Yuan W, Wagner SN, Barrera JL, Mohar A, Verastegui E, Zlotnik A. (2001) Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature*, 410: 50-6.
200. Taichman RS, Cooper C, Keller ET, Pienta KJ, Taichman NS, McCauley LK. (2002) Use of the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 pathway in prostate cancer metastasis to bone. *Cancer Res*, 62: 1832-7.
201. Manes S, Mira E, Colomer R, Montero S, Real LM, Gomez-Mouton C, Jimenez-Baranda S, Garzon A, Lacalle RA, Harshman K, Ruiz A, Martinez AC. (2003) CCR5 expression influences the progression of human breast cancer in a p53-dependent manner. *J Exp Med*, 198: 1381-9.
202. Samson M, Libert F, Doranz BJ, Rucker J, Liesnard C, Farber CM, Saragosti S, Lapoumeroulie C, Cognaux J, Forceille C, Muyldermans G, Verhofstede C, Burtonboy G, Georges M, Imai T, Rana S, Yi Y, Smyth RJ, Collman RG, Doms RW, Vassart G, Parmentier M. (1996) Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature*, 382: 722-5.
203. Karaali ZE, Sozen S, Yurdum M, Cacina C, Toptas B, Gok O, Agachan B. (2010) Effect of genetic variants of chemokine receptors on the development of myocardial infarction in Turkish population. *Mol Biol Rep*, 37: 3615-9.
204. Kucukgergin C, Isman FK, Dasedemir S, Cakmakoglu B, Sanli O, Gokkusu C, Seckin S. (2012) The role of chemokine and chemokine receptor gene variants on the susceptibility and clinicopathological characteristics of bladder cancer. *Gene*, 511: 7-11.
205. Glass WG, McDermott DH, Lim JK, Lekhong S, Yu SF, Frank WA, Pape J, Cheshier RC, Murphy PM. (2006) CCR5 deficiency increases risk of symptomatic West Nile virus infection. *J Exp Med*, 203: 35-40.

206. Srivastava A, Pandey SN, Choudhuri G, Mittal B. (2008) CCR5 Delta32 polymorphism: associated with gallbladder cancer susceptibility. *Scand J Immunol*, 67: 516-22.
207. Bracci PM, Skibola CF, Conde L, Halperin E, Lightfoot T, Smith A, Paynter RA, Skibola DR, Agana L, Roman E, Kane E, Wiencke JK. (2010) Chemokine polymorphisms and lymphoma: a pooled analysis. *Leuk Lymphoma*, 51: 497-506.
208. Healy J, Richer C, Bourgey M, Kritikou EA, Sinnott D. (2010) Replication analysis confirms the association of ARID5B with childhood B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*, 95: 1608-11.
209. Lahoud MH, Ristevski S, Venter DJ, Jermin LS, Bertonecello I, Zavarsek S, Hasthorpe S, Drago J, de Kretser D, Hertzog PJ, Kola I. (2001) Gene targeting of Desrt, a novel ARID class DNA-binding protein, causes growth retardation and abnormal development of reproductive organs. *Genome Res*, 11: 1327-34.
210. 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: 1271-4.
211. Molnár A, Wu P, Largespada DA, Vortkamp A, Scherer S, Copeland NG, Jenkins NA, Bruns G, Georgopoulos K. (1996) The Ikaros gene encodes a family of lymphocyte-restricted zinc finger DNA binding proteins, highly conserved in human and mouse. *J Immunol*, 156: 585-92.
212. Otero DC, Poli V, David M, Rickert RC. (2006) Cutting edge: inherent and acquired resistance to radiation-induced apoptosis in B cells: a pivotal role for STAT3. *J Immunol*, 177: 6593-7.
213. Haga S, Terui K, Zhang HQ, Enosawa S, Ogawa W, Inoue H, Okuyama T, Takeda K, Akira S, Ogino T, Irani K, Ozaki M. (2003) Stat3 protects against Fas-induced liver injury by redox-dependent and -independent mechanisms. *J Clin Invest*, 112: 989-98.
214. Grandis JR, Drenning SD, Zeng Q, Watkins SC, Melhem MF, Endo S, Johnson DE, Huang L, He Y, Kim JD. (2000) Constitutive activation of Stat3 signaling abrogates apoptosis in squamous cell carcinogenesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97: 4227-32.

215. Uckun FM, Qazi S, Ma H, Tuel-Ahlgren L, Ozer Z. (2010) STAT3 is a substrate of SYK tyrosine kinase in B-lineage leukemia/lymphoma cells exposed to oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107: 2902-7.
216. Butterbach K, Beckmann L, de Sanjose S, Benavente Y, Becker N, Foretova L, Maynadie M, Cocco P, Staines A, Boffetta P, Brennan P, Nieters A. (2011) Association of JAK-STAT pathway related genes with lymphoma risk: results of a European case-control study (EpiLymph). *Br J Haematol*, 153: 318-33.
217. Ito N, Eto M, Nakamura E, Takahashi A, Tsukamoto T, Toma H, Nakazawa H, Hirao Y, Uemura H, Kagawa S, Kanayama H, Nose Y, Kinukawa N, Nakamura T, Jinnai N, Seki T, Takamatsu M, Masui Y, Naito S, Ogawa O. (2007) STAT3 polymorphism predicts interferon-alfa response in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol*, 25: 2785-91.
218. Winger JA, Hantschel O, Superti-Furga G, Kuriyan J. (2009) The structure of the leukemia drug imatinib bound to human quinone reductase 2 (NQO2). *BMC Struct Biol*, 9: 7.
219. Prasad RB, Hosking FJ, Vijayakrishnan 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: 1765-7.
220. Gu F, Ma Y, Zhang Z, Zhao J, Kobayashi H, Zhang L, Fu L. (2010) Expression of Stat3 and Notch1 is associated with cisplatin resistance in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncol Rep*, 23: 671-6.
221. Kamakura S, Oishi K, Yoshimatsu T, Nakafuku M, Masuyama N, Gotoh Y. (2004) Hes binding to STAT3 mediates crosstalk between Notch and JAK-STAT signalling. *Nat Cell Biol*, 6: 547-54.
222. Chen J, Jette C, Kanki JP, Aster JC, Look AT, Griffin JD. (2007) NOTCH1-induced T-cell leukemia in transgenic zebrafish. *Leukemia*, 21: 462-71.
223. Shane B. (1989) Folylpolyglutamate synthesis and role in the regulation of one-carbon metabolism. *Vitam Horm*, 45: 263-335.

224. Assaraf Y. (2007) Molecular basis of antifolate resistance. *Cancer and Metastasis Reviews*, 26: 153-181.
225. Carroll N, Pangilinan F, Molloy A, Troendle J, Mills J, Kirke P, Brody L, Scott J, Parle-McDermott A. (2009) Analysis of the MTHFD1 promoter and risk of neural tube defects. *Human Genetics*, 125: 247-256.
226. Han D, Shen C, Meng X, Bai J, Chen F, Yu Y, Jin Y, Fu S. (2012) Methionine synthase reductase A66G polymorphism contributes to tumor susceptibility: evidence from 35 case-control studies. *Molecular Biology Reports*, 39: 805-816.
227. Yang L, Liu L, Wang J, Qiu L, Mi Y, Ma X, Xiao Z. (2011) Polymorphisms in folate-related genes: impact on risk of adult acute lymphoblastic leukemia rather than pediatric in Han Chinese. *Leukemia & Lymphoma*, 52: 1770-1776.
228. Chan JY-S, Ugrasena DG, Lum DW-K, Lu Y, Yeoh AE-J. (2011) Xenobiotic and folate pathway gene polymorphisms and risk of childhood acute lymphoblastic leukaemia in Javanese children. *Hematological Oncology*, 29: 116-123.
229. Olteanu H, Munson T, Banerjee R. (2002) Differences in the Efficiency of Reductive Activation of Methionine Synthase and Exogenous Electron Acceptors between the Common Polymorphic Variants of Human Methionine Synthase Reductase†. *Biochemistry*, 41: 13378-13385.
230. Gaughan DJ, Kluijtmans LAJ, Barboux S, McMaster D, Young IS, Yarnell JWG, Evans A, Whitehead AS. (2001) The methionine synthase reductase (MTRR) A66G polymorphism is a novel genetic determinant of plasma homocysteine concentrations. *Atherosclerosis*, 157: 451-456.
231. Geisel J, Zimbelmann I, Schorr H, Knapp J, Bodis M, Hubner U, Herrmann W. (2001) Genetic defects as important factors for moderate hyperhomocysteinemia. *Clin Chem Lab Med*, 39: 698-704.
232. O'Leary VB, Parle-McDermott A, Molloy AM, Kirke PN, Johnson Z, Conley M, Scott JM, Mills JL. (2002) MTRR and MTHFR polymorphism: Link to Down syndrome? *American Journal of Medical Genetics*, 107: 151-155.

233. Shaw G, Lu W, Zhu H, Yang W, Briggs F, Carmichael S, Barcellos L, Lammer E, Finnell R. (2009) 118 SNPs of folate-related genes and risks of spina bifida and conotruncal heart defects. *BMC Medical Genetics*, 10: 49.
234. 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.
235. Pereira TV, Rudnicki M, Pereira AC, Pombo-De-Oliveira MS, Franco RF. (2006) 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and acute lymphoblastic leukemia risk: A meta-analysis. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 15: 1956-1963.
236. Wiemels JL, Smith RN, Taylor GM, Eden OB, Alexander FE, Greaves MF, United Kingdom Childhood Cancer Study I. (2001) Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphisms and risk of molecularly defined subtypes of childhood acute leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98: 4004-4009.
237. de Deus DMV, de Lima ELS, Seabra Silva RM, Leite EP, Cartaxo Muniz MT. (2012) Influence of Methylenetetrahydrofolate Reductase C677T, A1298C, and G80A Polymorphisms on the Survival of Pediatric Patients with Acute Lymphoblastic Leukemia. *Leukemia Research and Treatment*, 2012: 6.
238. Semsei AF, Erdelyi DJ, Ungvari I, Kamory E, Csokay B, Andrikovics H, Tordai A, Csagoly E, Falus A, Kovacs GT, Szalai C. (2008) Association of some rare haplotypes and genotype combinations in the MDR1 gene with childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Leukemia Research*, 32: 1214-1220.
239. Ongaro A, De Mattei M, Della Porta MG, Rigolin G, Ambrosio C, Di Raimondo F, Pellati A, Masieri FF, Caruso A, Catozzi L, Gemmati D. (2009) Gene polymorphisms in folate metabolizing enzymes in adult acute lymphoblastic leukemia: effects on methotrexate-related toxicity and survival. *Haematologica*, 94: 1391-1398.
240. Erdélyi 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 Journal*, 8: 321-327.
241. 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, Ugarte EL, Leal VP, Espinoza JP, Kamel AM, Ebid GT, Radwan ER, Yalin S, Yalin E, Berkoz M, Simpson J, Roman E, Lightfoot T, Hosking FJ, Vijaykrishnan J, Greaves M, Houlston RS. (2011) Rationale for an international consortium to study inherited genetic susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*, 96: 1049-54.
  242. Zhang G, Candelaria P, Mäkelä JM, Khoo S-K, Hayden MC, von Hertzen L, Laatikainen T, Vartiainen E, Goldblatt J, Haahtela T, LeSouëf NP. (2011) Disparity of innate immunity-related gene effects on asthma and allergy on Karelia. *Pediatric Allergy and Immunology*, 22: 621-630.
  243. Semsei AF, Antal P, Szalai C. (2010) Strengths and weaknesses of gene association studies in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia Research*, 34: 269-271.
  244. Bakos E, Homolya L. (2007) Portrait of multifaceted transporter, the multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1/ABCC1). *Pflugers Arch*, 453: 621-41.
  245. Borst P, Evers R, Kool M, Wijnholds J. (2000) A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J Natl Cancer Inst*, 92: 1295-302.
  246. 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: 3409-16.
  247. Kruh GD, Belinsky MG. (2003) The MRP family of drug efflux pumps. *Oncogene*, 22: 7537-52.
  248. 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: 411-20.

249. 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.
250. 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, Vetrie 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, Korbel 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, Srinivasan 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, Eyraes 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.
251. Common Terminology Criteria for Adverse Events v3.0 C. (2006) [http://ctep.info.nih.gov/protocolDevelopment/electronic\\_applications/docs/ctcae3.pdf](http://ctep.info.nih.gov/protocolDevelopment/electronic_applications/docs/ctcae3.pdf).
252. 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: 819-29.
253. Lipshultz SE, Alvarez JA, Scully RE. (2008) Anthracycline associated cardiotoxicity in survivors of childhood cancer. *Heart*, 94: 525-33.

254. Simbre VC, Duffy SA, Dadlani GH, Miller TL, Lipshultz SE. (2005) Cardiotoxicity of cancer chemotherapy: implications for children. *Paediatr Drugs*, 7: 187-202.
255. Floyd JD, Nguyen DT, Lobins RL, Bashir Q, Doll DC, Perry MC. (2005) Cardiotoxicity of cancer therapy. *J Clin Oncol*, 23: 7685-96.
256. Hogarth LA, Hall AG. (1999) Increased BAX expression is associated with an increased risk of relapse in childhood acute lymphocytic leukemia. *Blood*, 93: 2671-8.
257. Prokop A, Wieder T, Sturm I, Essmann F, Seeger K, Wuchter C, Ludwig WD, Henze G, Dorken B, Daniel PT. (2000) Relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia is associated with a decrease of the Bax/Bcl-2 ratio and loss of spontaneous caspase-3 processing in vivo. *Leukemia*, 14: 1606-13.
258. Kaparou M, Choumerianou D, Perdikiogianni C, Martimianaki G, Kalmanti M, Stiakaki E. (2013) Enhanced levels of the apoptotic BAX/BCL-2 ratio in children with acute lymphoblastic leukemia and high-risk features. *Genet Mol Biol*, 36: 7-11.
259. Preudhomme C, Sagot C, Boissel N, Cayuela JM, Tigaud I, de Botton S, Thomas X, Raffoux E, Lamandin C, Castaigne S, Fenaux P, Dombret H, Group A. (2002) Favorable prognostic significance of CEBPA mutations in patients with de novo acute myeloid leukemia: a study from the Acute Leukemia French Association (ALFA). *Blood*, 100: 2717-23.
260. Tzifi F, Economopoulou C, Gourgiotis D, Ardavanis A, Papageorgiou S, Scorilas A. (2012) The role of BCL2 family of apoptosis regulator proteins in acute and chronic leukemias. *Adv Hematol*, 2012: 524308.
261. Findley HW, Gu L, Yeager AM, Zhou M. (1997) Expression and regulation of Bcl-2, Bcl-x1, and Bax correlate with p53 status and sensitivity to apoptosis in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 89: 2986-93.
262. Mikhailov V, Mikhailova M, Degenhardt K, Venkatachalam MA, White E, Saikumar P. (2003) Association of Bax and Bak homo-oligomers in mitochondria. Bax requirement for Bak reorganization and cytochrome c release. *J Biol Chem*, 278: 5367-76.

## 11 SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

### I. Az értekezésben összefoglalt eredeti közlemények:

**Lautner-Csorba O**, Gézsi A, Erdélyi DJ, Hullám G, Antal P, Semsei AF, Kutszegi N, Kovács GT, Szalai Cs. (2013) Roles of genetic polymorphisms in the folate pathway in childhood acute lymphoblastic leukemia evaluated by Bayesian relevance and effect size analysis. PLoS One, 8: e69843. IF: 3,730

**Lautner-Csorba O**, Gézsi A, Semsei Á, Antal P, Erdélyi DJ, Schermann G, Kutszegi N, Csordás K, Hegyi M, Kovács G, Falus A, Szalai C. (2012) Candidate gene association study in pediatric acute lymphoblastic leukemia evaluated by Bayesian network based Bayesian multilevel analysis of relevance. BMC Med Genomics, 5:42. IF: 3,466

Semsei AF, Erdelyi DJ, Ungvari I, Csagoly E, Hegyi MZ, Kiszél PS, **Lautner-Csorba O**, Szabolcs J, Masat P, Fekete G, Falus A, Szalai C, Kovacs GT. (2012) ABCC1 polymorphisms in anthracycline-induced cardiotoxicity in childhood acute lymphoblastic leukaemia. Cell Biol Int, 36: 79-86. IF: 1,640

Az értekezésben felhasznált közlemények kumulatív impakt faktora: 8,836

### II. Egyéb – az értekezésben fel nem használt – eredeti közlemények:

Rausz E, Szilagyi A, Nedoszytko B, Lange M, Nedoszytko M, **Lautner-Csorba O**, Falus A, Aladzsi I, Kokai M, Valent P, Marschalko M, Hidvegi B, Szakonyi J, Csomor J, Varkonyi J. (2013) Comparative analysis of IL6 and IL6 receptor gene polymorphisms in mastocytosis. Br J Haematol, 160: 216-219. IF: 4,942

Hegyi M, Gulácsi A, Csagoly E, Csordás K, Eipel OT, Erdélyi DJ, Müller J, Nemes K, **Lautner-Csorba O**, Kovács GT. (2012) Clinical relations of methotrexate pharmacokinetics in the treatment for pediatric osteosarcoma. J Cancer Res Clin Oncol, 138: 1697-1702. IF: 2,914

Semsei Á, **Lautner-Csorba O**, Kutszegi N, Schermann G, Eipel O, Falus A, Szalai C, Kovács GT, Erdélyi DJ. (2012) A gyermekkori akut limfoid leukémia farmakogenetikája egy gyógyszer mellékhatás példáján. *Magy Tud*, 173: 90-97.

Összes publikáció kumulatív impakt faktora: 16,692

## 12 KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Hálás vagyok Dr. Szalai Csaba témavezetőmnek, aki mindvégig segítette kutatásaimat az évek során, és biztosította a munkám előrehaladásához szükséges feltételeket.

Szeretnék köszönetet mondani Prof. Dr. Falus Andrásnak, aki lehetővé tette számomra, hogy elkezdhessem kutatói munkámat a Semmelweis Egyetem, Genetikai, Sejt-, és Immunbiológiai Intézetében, továbbá az Intézet jelenlegi vezetőjének Prof. Dr. Buzás Editnek, aki az elkezdett munkámban továbbra is támogatott.

Szeretném megköszönni munkatársamnak, Féléné Dr. Semsei Ágnesnek a szakmai segítségét és a baráti beszélgetéseket.

Tudományos munkám nem lehetett volna kerek egész, a Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, Méréstechnika és Információs Rendszerek Tanszékén dolgozó Dr. Antal Péter docens úr, valamint Gézsi András és Hullám Gábor, kutatómérnökök segítségével.

Vizsgálataim alapját az évek óta bővülő biobank adta, melynek alapítása és rendszerezése Dr. Erdélyi Dániel, a Semmelweis Egyetem II.sz. Gyermekgyógyászati Klinikáján dolgozó és kutató szakorvosának nevéhez fűződik. Köszönöm Dr. Kovács Gábornak, a Semmelweis Egyetem II.sz. Gyermekgyógyászati Klinika osztályvezető főorvosának, hogy biztosította a klinikai kooperáció és szakmaiság lehetőségét.

Köszönöm Sándorné Vángor Mónikának, Hadadi Évának és Schermann Géának a szakmai és emberi támogatását és hogy velük igazi kutatói csapatban dolgozhattam.

Köszönöm Dr. Hegyi Mártának, hogy hasonló kutatómunkát végző orvosként sok klinikai kérdésben a segítségemre volt.

Hálával tartozom továbbá az Intézet összes munkatársának, akik a kedves, baráti légkör biztosításával derűssé tették a mindennapokat. Külön is köszönöm Dr. Szentepásztói Máriának, Dr. Éder Katalinnak, Dr. Pál Zsuzsannának, Dr. Lajkó Eszternek és Pálóczi Krisztinának.

Tiszta szívből köszönöm Férjemnek, Gerinek, hogy egész idő alatt biztos támaszom, segítőtársam volt, és hogy értékes szakmai tanácsaival hozzájárult a kutatói munkám egészéhez.

Végül pedig szeretettel és nagy hálával mondok köszönetet Szüleimnek, Testvéremnek, Családtagjaimnak, hogy soha el nem lankadó hittel, a Gondviselő szeretetével támogattak munkámban és eddigi életemben.

Köszönöm a munka elvégzéséhez nyújtott támogatást az NKTH (Nemzeti Kutatási és Technológiai Hivatal) TECH\_08-A1/2-2008-0120 által támogatott Genagrid konzorciumnak és a Richter Gedeon Centenárium Alapítványnak.