

Génpolimorfizmusok szerepének vizsgálata gyógyszermellékhatások kialakulásában akut limfoblasztos leukémiában

Doktori értekezés

Borszékiné dr. Kutszegi Nóra Zsófia

Semmelweis Egyetem
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



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

Hivatalos bírálók: Dr. Rónai Zsolt, Ph.D., egyetemi docens
Dr. Bácsi Attila, Ph.D., egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Szökő Éva, az MTA doktora, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Sasvári Mária, az MTA doktora,
nyugalmazott egyetemi tanár
Dr. Budai Barna Lajos, Ph.D.,
vegyészmérnök

Budapest
2017

Tartalomjegyzék

1	Bevezetés	6
1.1	A gyermekkori akut limfoblasztos leukémia előfordulása és kezelése	7
1.2	Az aszparagináz farmakológiája – gyermekkori vonatkozások.....	14
1.3	Aszparagináz hiperszenzitivitás.....	24
1.4	Az aszparagináz hiperszenzitivitás genetikai háttere.....	26
1.5	A HLA II. osztályának szerepe az antigénbemutatásban.....	27
1.6	Exogén peptidek által kiváltott hiperszenzitivitási reakciók	28
1.7	A <i>CYP3A4</i> polimorfizmusok szerepe a gyermekkori akut limfoblasztos leukémiás betegek túlélésében	31
2	Célkitűzések	34
3	Módszerek	35
3.1	Betegek	35
3.2	Genotipizálás	37
3.2.1	<i>GRIA1</i> és <i>GALNT10</i> polimorfizmusok meghatározása KASPar genotipizálási módszerrel	37
3.2.2	HLA-tipizálás új generációs szekvenálással.....	43
3.2.3	A <i>CYP3A4</i> rs2246709 polimorfizmusának meghatározási módszerei.....	43
3.3	Internetes adatbázisok és eszközök.....	45
3.4	Statisztika.....	46
3.4.1	A <i>GRIA1</i> és <i>GALNT10</i> polimorfizmusok vizsgálata.....	46
3.4.2	A HLA allélok és haplotípusok vizsgálata	47
3.4.3	Túléléselemzés.....	48
4	Eredmények.....	49
4.1	<i>GRIA1</i> és <i>GALNT10</i> génpolimorfizmusok szerepe az aszparagináz hiperszenzitivitásban	49
4.2	HLA allélok és haplotípusok szerepe az aszparagináz hiperszenzitivitásban .	60
4.2.1	<i>HLA-DRB1</i> és <i>HLA-DQB1</i> allélok asszociációja az aszparagináz hiperszenzitivitással.....	60
4.2.2	Haplotípus-rekonstrukció és következtetés a <i>HLA-DQA1</i> allélokra	69
4.2.3	Polimorf aminosavak meghatározása a HLA II. osztály peptidkötő zsebeiben	75

4.3	Az aszparagináz hiperszenzitivitás és a <i>CYP3A4</i> rs2246709 polimorfizmus hatása a betegek túlélésére.....	79
5	Megbeszélés.....	83
6	Következtetések.....	92
7	Összefoglalás	93
8	Summary.....	94
9	Irodalomjegyzék	95
10	Saját publikációk jegyzéke	110
11	Köszönetnyilvánítás	112

Rövidítések jegyzéke

ABC	Accelerated Blood Clearance
AEP	aszparaginil-endopeptidáz
ALL	akut limfoblasztos leukémia
AMPA	α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-izoxazol-propionát
APC	antigén-prezentáló sejt
AS	aminosav
ASNS	Asparagine Synthetase (glutamine-hydrolyzing); aszparagin-szintetáz
BCR	B-Cell Receptor; B-sejt receptor
BFM	Berlin–Frankfurt–Münster munkacsoport
BGI	Beijing Genomics Institute; Pekingi Genomikai Intézet
CD	Cluster of Differentiation; differenciálódási marker
CI 95%	95%-os konfidencia-intervallum
CTCAE	National Cancer Institute Common Toxicity Criteria for Adverse Events
CYP3A4	Cytochrome P450 Family 3 Subfamily A Member 4
CYP3A5	Cytochrome P450 Family 3 Subfamily A Member 5
dbMHC	Database of Major Histocompatibility Complex
E. coli	Escherichia coli
ETT TUKEB	Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága
FAM	6-karboxi-fluoreszcein
FC	Flow Cytometry; áramlási citometria
Fc ϵ RI	type I high affinity IgE receptor
FDR	False Discovery Rate; hamis felfedezési hibaarány
FRET	fluoreszcencia rezonancia energia transzfer
GALNT10	Polypeptide N-Acetylgalactosaminyltransferase 10
GRIA1	Glutamate Ionotropic Receptor AMPA Type Subunit 1; ionotróp AMPA glutamát-receptor alegység-1
GWAS	Genome-Wide Association Study; teljesgenom-asszociációs vizsgálat
HEX	hexakloro-6-karboxi-fluoreszcein
HLA	Human Leukocyte Antigen
HR	High Risk; magas kockázatú

HR	Hazard Ratio; hazárd ráta
HWE	Hardy-Weinberg Equilibrium; Hardy-Weinberg egyensúly
IC	Intercontinental
IR	Intermediate Risk; közepes kockázatú
i.v.	intravénás
KOD	KASP on Demand
LD	Linkage Disequilibrium; kapcsoltsági egyensúlytalanság
MHC	Major Histocompatibility Complex
MRD	Minimal Residual Disease
NFATC2	Nuclear Factor Of Activated T-Cells 2
OR	Odds Ratio; esélyhányados
PCR	Polymerase Chain Reaction
p.i.	per infusionem, intravénás infúzióban kapott
PEG	polietilén-glikol
PEG-ASP	pegilált aszparagináz
ROX	5-karboxi-X-rodamin-N-szukcinimidil-észter
SNP	Single Nucleotide Polymorphism; egy pontos nukleotid-polimorfizmus
SR	Standard Risk; alacsony kockázatú
TCR	T-Cell Receptor; T-sejt receptor
ULN	Upper Limit of Normal; a normál szint felső határa

1 Bevezetés

Napjainkban a molekuláris genetika folyamatosan bővülő eszköztára egyre szélesebb körben válik elérhetővé. Mind a laboratóriumi módszerek, mind az online elérhető adatbázisok és szoftverek hozzájárulnak ahhoz, hogy minél több betegség vagy állapot háttérében azonosíthatóvá váljanak az azokra hajlamosító genetikai tényezők, amely végső soron személyre szabott orvoslás lehetőségét teremti meg.

A gyermekkori akut limfoblasztos leukémia (ALL) terápiájának meghatározó komponense az aszparagin keringésből való elbontásáért felelős aszparagináz. Jelentős kihívást jelentenek azonban a bakteriális eredetű enzim ellen kialakuló immunológiai reakciók. Ezek akár szisztémás anafilaxia formájában is jelentkezhetnek, ami közvetlen életveszélyt jelent a beteg számára, de a kialakuló aszparagináz ellenes antitestek a gyógyszer inaktivációját is előidézhetik, ami a leukémiás sejtek gyógyszer-expozíciójának csökkentésén keresztül szuboptimális terápiás választ is előidézhet. Egyelőre nem áll rendelkezésünkre olyan eszköz, amelynek segítségével előre meg lehetne jósolni, hogy kinél alakul ki hiperszenzitivitási reakció.

PhD munkám során a gyermekkori ALL-es betegek körében a jelen kezelési protokoll szerint első vonalban adott natív *Escherichia coli* eredetű aszparagináz által kiváltott hiperszenzitivitás genetikai háttérét vizsgáltam. Célom a túlérzékenységre fokozott kockázattal rendelkező betegek azonosítása volt. Az ő esetükben megfontolandó lehet más immunogenitással vagy más antigenitással rendelkező aszparagináz készítmény alkalmazása első vonalbeli gyógyszerként. Eredményeim továbbá hozzájárulhatnak más nagymolekulás gyógyszerek által kiváltott hiperszenzitivitási reakciók mechanizmusának pontosabb megértéséhez is.

1.1 A gyermekkori akut limfoblasztos leukémia előfordulása és kezelése

Hazánkban évi 60-70 gyermeknél diagnosztizálnak leukémiát, amelynek leggyakoribb típusa az akut limfoblasztos leukémia (ALL). A mai nemzetközi protokollokon alapuló, folyamatos fejlesztés alatt álló kezelési módszereknek köszönhetően a betegek több mint 85%-a tartós túlélő. Ennek ellenére a leukémia az egyéb rosszindulatú daganatos megbetegedésekkel együtt az 1-14 éves korosztály vezető halálokai között található meg [1].

A leukémia a limfo-hematopoetikus rendszer rosszindulatú klonális megbetegedése [2]. A beteg leukémiasejtjei egyetlen, genetikai károsodások sorozata nyomán kialakuló, transzformált progenitor sejtből származnak. Az elváltozott sejteket immunfenotípusukat tekintve többé-kevésbé annak a sejtfeleségnek a differenciálódási markerei (CD) jellemzik, amelynek szintjén a transzformáció bekövetkezett (pre-B-sejtes, T-sejtes, mieloblasztos stb.) [2]. A betegség kialakulásához genetikai és környezeti faktorok egyaránt hozzájárulhatnak.

Az ALL változatos tünetekkel jelentkezhet. Nem specifikus panasz az egy-két hete tartó lázas állapot, amely kezelésre sem rendeződik. Fáradékonyság, bőrvérzések jelentkezhetnek, jellemző a végtagfájdalom és a nyirokcsomók megnagyobbodása. Az észlelt tünetek a normális vérképzés visszaszorulásával, a tumoros sejtproliferáció okozta térfoglalással és a daganat okozta általános toxikus tünetekkel függnek össze [2, 3].

A vérképzés zavara anémiához vezethet, amelyet a sápadt bőr és nyálkahártya, szédülés, szapora szív működés jelez. A visszatérő fertőzések, a láz és a torokgyulladás a fehérvérsejt-funkció kiesésének következményei. A vérlemezkeszám csökkenése okozhatja a bőr- és nyálkahártyavérzéseket [3].

A malignus sejtproliferáció okozta térfoglalás következménye a csontvelő-infiltráció, melyet a csontok fájdalma jelez. A limfoid rendszer inváziója a nyirokcsomók megnagyobbodásához, hepato- és splenomegaliához vezethet. A központi idegrendszer érintettsége diffúz és fokális neurológiai tünetekkel járhat, gyakori az agyi nyomásfokozódás. Infiltrálódhatnak a herék, ritkábban a petefészek, a bőr és a szem képletei, a csontok, az ízületek és a vesék. A thymus megnagyobbodása T-sejtes ALL esetén légzési panaszokat is okozhat [2, 3].

Manapság egyre több terápiás jelentőségű genetikai elváltozást azonosítanak a kóros sejtekben. A prognosztikai besorolásnál azonban döntően még mindig olyan klinikai és laboratóriumi adatok a meghatározók, mint a kezdeti fehérvérsejtszám, a diagnóziskori életkor vagy a korai terápiás válasz [4]. A betegek csontvelői érintettsége három kategóriába sorolható:

M1: a blasztok aránya a csontvelőben $<5\%$

M2: a blasztok aránya a csontvelőben $\geq 5 < 25\%$

M3: a blasztok aránya a csontvelőben $\geq 25\%$

A túlélési mutatók jelentős javulásához nagyban hozzájárult a kezelésnek a korai terápiás válaszműtatók alapján történő stratifikációja, a minimális reziduális betegség (minimal residual disease, MRD) követése. A Magyarországon is alkalmazott, az európai Berlin–Frankfurt–Münster (BFM) munkacsoport által kidolgozott BFM IC-ALL 2009 protokoll szerint az MRD monitorozás áramlási citometriával (flow cytometry, FC) történik [5].

A kezelési protokoll a betegeket alacsony (standard risk, SR), közepes (intermediate risk, IR) és magas (high risk, HR) kockázatú terápiás csoportokba sorolja:

Rizikócsoport-besorolás az ALL IC-BFM 2009 protokollban

Alacsony kockázatú (SR) csoport

1 éves \leq életkor \leq 6 éves

és kezdeti fehérvérsejt-szám $< 20,000/\mu\text{l}$

és perifériás blasztok száma $< 1,000$ blaszt/ μl az indukció 8. napján

és FC-MRD $< 0,1\%$ a 15. napon

és nem M2/3 csontvelő a 33. napon

Minden egyes kritériumnak meg kell felelni.

Magas kockázatú (HR) csoport

vagy FC-MRD $>10\%$ a csontvelőben a 15. napon

vagy perifériás blaszt-szám a 8. napon $\geq 1,000$ blaszt/ μl

vagy M2 vagy M3 csontvelő a 33. napon

vagy t(9;22) [BCR/ABL] vagy t(4;11) [MLL/AF4] genetikai eltérés

vagy hipodiploid ALL ≤ 44 kromoszóma

Legalább egy kritériumnak teljesülnie kell.

Közepes kockázatú (IR) csoport

Minden beteg, aki se SR, se HR csoportba nem besorolható.

A 2-3 éves kezelés célja az elváltozott sejtek teljes eradikációja, amely elvileg és gyakorlatilag egyaránt lehetséges. Azonban mind az alapbetegség, mind a kezelés a normál csontvelőműködés elnyomását idézi elő, ezért a betegek szoros megfigyelést igényelnek az esetlegesen kialakuló infekciók és komplikációk azonnali ellátása érdekében.

Világszerte számos különböző, de alapfelépítésében hasonló kezelési protokoll használata terjedt el. Hazánkban jelenleg egy klinikai tanulmány, az ALL IC-BFM 2009 nemzetközi study keretében kezelik a gyermekeket. Ez a kezelési protokoll az alábbi részekre osztható fel: indukció, korai intenzifikáció, konszolidáció, reindukció, késői reintenzifikáció és fenntartó kezelés [5].

Az ún. indukciós terápia célja a kezdeti nagy daganatos sejtömeg elpusztítása, 95%-os remissziós ráta (blasztszám a csontvelőben 5% vagy az alatti) elérése, vagyis a betegség visszafejlődésének indukálása; az első hónap végére pedig a normális csontvelőműködés helyreállítása. Az első, bevezető hét folyamatosan emelkedő dózisú kortikoszteroid-kezeléssel (prednizolonnal) kezdődik a limfoblasztok számának kíméletes csökkentése céljából, ezzel csökkentve a tumorlízis-szindróma kialakulásának kockázatát. A kezelés első szakasza alatt a terápiás válasz megállapítása a betegek kockázati csoportokba sorolása szempontjából elengedhetetlen. A lehetséges maximális számú citosztatikumot – vinkrisztint, prednizolont, daunorubicint, aszparaginázt és metotrexátot – a lehetséges maximális dózisban alkalmazzák 4 héten át az optimális tumorelles hatása elérése és a gyógyszer-rezisztencia kialakulásának megelőzése érdekében. Ennek megfelelően ebben a ciklusban teljes csontvelő-elégtelenség alakul ki, és itt fordul elő a legtöbb életet veszélyeztető komplikáció. Ezt a kezelést egészíti ki a korai intenzifikáció: citozin-arabinozid, ciklofoszfamid, 6-merkaptopurin és metotrexát adagolásával újabb 4 héten át.

A kezelés harmadik része az ún. konszolidációs kezeléssel áll. Ez az indukciós és intenzifikációs fázist túlélő blasztok elpusztítására és a központi idegrendszeri érintettség megelőzésére irányul. Nagydózisú, grammos nagyságrendű metotrexát (4 alkalommal), 6-merkaptopurin és intratekális metotrexát 8 hetes alkalmazását jelenti. A nagy adagban

alkalmazott, a vér-agy gáton is átjutó gyógyszerek a központi idegrendszer területén lévő leukémiás sejtek elpusztítására is képesek.

A reindukció és a késői reintenzifikáció célja a reziduális, maradvány kóros sejtek kiirtása. Ez a kezdeti indukciós kezelésben alkalmazott gyógyszerek újbóli alkalmazását jelenti 6 héten át. Ennek a szakasznak alapvető jelentősége van a betegség kiújulásának megelőzésében.

A fenntartó kezelés szakaszában a késői csontvelői relapszusok kockázatának csökkentése a cél. Ez a kezelés kezdetétől számítva 2 évig tartó szájon át szedhető metotrexát és 6-merkaptopurin alkalmazását jelenti, esetenkénti intratekális metotrexát beadással. A hosszan tartó, kisdózisú gyógyszeradagolással a csontvelőben esetlegesen megbúvó limfoblasztok kiirtása érhető el. Az egyes kezelési szakaszok között alkalmazott szünetek a szervezet regenerálódását biztosítják.

A magas kockázatú csoportba tartozó betegek intenzifikációs kezelésüket követően nagyon intenzív terápiás ciklusban, 5–6 napos ún. blokk-kezelés formájában 4–5 citosztatikus gyógyszer kombinációját kapják 6 alkalommal (szteroid, vinka alkaloidok, alkilezőszerek, antraciklinek, nagy dózisú citozin-arabinozid, etopozid, aszparagináz). Ez a kezelés lényegesen több szövődménnyel, mellékhatással jár, ezért ebben a csoportban a szupportív terápiának is intenzívebbnek kell lennie.

A magas malignitású betegek egy csoportjában, a kezdetben központi idegrendszeri érintettségben szenvedők és a T-sejtes betegek esetében profilaktikus céllal a teljes agykoponya besugárzása szükséges.

Kiújulás esetén különös jelentősége van a recidíva idejének (korai vagy késői) és helyének. A nagy rizikójú, korai csontvelő-recidívák esetén az allogén csontvelő-transzplantáció a választandó terápia. Izolált központi idegrendszeri relapszus esetén szisztémás kemoterápiát, gyakori intratekális gyógyszeradagolást (metotrexát, citozin-arabinozid, prednizolon, tiotepa) és teljes cranialis/craniospinalis besugárzást (18 Gy) kell alkalmazni. A viszonylag jobb prognózisú izolált here-recidíva esetén szintén szisztémás kemoterápia és irradiáció javasolt. Az intermedier rizikócsoportba tartozó betegek kezelése kemoterápia vagy kemoterápia és allogén csontvelő transzplantáció a beteg korai terápiás választától függően.

Az e tanulmányban vizsgált betegeket négy egymásra épülő (ALL BFM 90 és 95, ALL IC-BFM 2002 és ALL IC-BFM 2009) protokoll valamelyike szerint kezelték. Az 1.

Táblázatban ezek közül a jelenleg is érvényben lévő ALL IC-BFM 2009 kemoterápiás protokoll egyes szakaszainak gyógyszerdózisait mutatom be – eltekintve a kísérleti ág ismertetésétől [5]:

1. Táblázat. Az ALL IC-BFM 2009 kezelési protokoll gyógyszerdózisai

<p>Indukció – SR, IR, HR</p> <p>Prednizolon: 60 mg/m² p.o. 36 napon át (fokozatosan fel- és leépítve)</p> <p>Vinkrisztin: 4× 1,5 mg/m² i.v. bólus</p> <p>Daunorubicin: 2–4× 30 mg/m² 1 órás i.v. infúzióban^a</p> <p>L-aszparagináz: 8× 5000 U/m² 1 órás i.v. infúzióban</p> <p>Metotrexát: 3–5× 6–12 mg i.th. (életkorfüggő dozírozás)^b</p>
<p>Korai intenzifikáció– SR, IR, HR</p> <p>Ciklofoszfamid: 2× 1 g/m² 1 órás i.v. infúzióban</p> <p>Citozin-arabinozid: 16× 75 mg/m² i.v. bólus</p> <p>6-Merkaptopurin: 60 mg/m² p.o. 28 napon át</p> <p>Metotrexát: 2× 6–12 mg i.th. (életkorfüggő dozírozás)</p>

Konszolidáció – SR, IR	Konszolidáció – HR^c
<p>Metotrexát: 4× 5 g/m² vagy 2 g/m² 24 órás i.v. infúzióban</p> <p>6-Merkaptopurin: 25 mg/m² p.o. 56 napon át</p> <p>Metotrexát: 4× 6–12 mg i.th. (életkorfüggő dozírozás)</p>	<p>HR-1 blokk:</p> <p>Dexametazon: 20 mg/m² p.o. 5 napon át</p> <p>Vinkrisztin: 2× 1,5 mg/m² i.v.</p> <p>Citozin-arabinozid: 2× 2 g/m² 3 órás i.v. infúzióban</p> <p>Metotrexát: 1× 5 g/m² 24 órás i.v. infúzióban</p> <p>Ciklofoszfamid: 5× 200 mg/m² 1 órás i.v. infúzióban</p> <p>L-aszparagináz: 1×25 000 E/m² 2 órás i.v. infúzióban</p> <p>Metotrexát/Citozin-arabinozid/Prednizolon: 1× 6-12/16-30/4-10 mg i.th. (életkorfüggően)</p> <p>HR-2 blokk:</p> <p>Dexametazon: 20 mg/m² p.o. 5 napon át</p> <p>Vindezin: 2× 3 mg/m² i.v.</p> <p>Daunorubicin: 1× 30 g/m² 24 órás i.v. infúzióban</p> <p>Metotrexát: 1× 5 g/m² 24 órás i.v. infúzióban</p> <p>Ifoszfamid: 5× 800 mg/m² 1 órás i.v. infúzióban</p> <p>L-aszparagináz: 1×25 000 E/m² 2 órás i.v. infúzióban</p> <p>Metotrexát/Citozin-arabinozid/Prednizolon: 1× 6-12/16-30/4-10 mg i.th. (életkorfüggően)</p> <p>HR-3 blokk:</p> <p>Dexametazon: 20 mg/m² p.o. 5 napon át</p> <p>Citozin-arabinozid: 4× 2000 mg/m² 3 órás i.v. infúzióban</p> <p>Etopozid: 5× 100 g/m² 1 órás i.v. infúzióban</p> <p>L-aszparagináz: 1×25 000 E/m² 2 órás i.v. infúzióban</p> <p>Metotrexát/Citozin-arabinozid/Prednizolon: 1× 6-12/16-30/4-10 mg i.th. (életkorfüggően)</p>

<p>Reindukció – SR, IR, HR</p> <p>Dexametazon: 10 mg/m² p.o. 30 napon át (fokozatosan leépítve)</p> <p>Vinkrisztin: 4× 1,5 mg/m² i.v. bólus</p> <p>Doxorubicin: 4× 30 mg/m² 1 órás i.v. infúzióban</p> <p>L-aszparagináz: 4× 10000 U/m² 1 órás i.v. infúzióban</p> <p>Metotrexát: 0–2× 6–12 mg i.th. (életkorfüggő dozírozás)^b</p>
<p>Késői reinterifikáció – SR, IR, HR</p> <p>Ciklofoszfamid: 1× 1 g/m² 1 órás i.v. infúzióban</p> <p>Citozin-arabinozid: 8× 75 mg/m² i.v. bólus</p> <p>6-Tioguanin: 60 mg/m² p.o. 14 napon át</p> <p>Metotrexát: 2× 6–12 mg i.th. (életkorfüggő dozírozás)</p>
<p>Fenntartó – SR, IR, HR</p> <p>6-Merkaptopurin 1x 50 mg/m²/nap p.o. a 2. év végéig</p> <p>Metotrexát 1x 20 mg/m²/hét p.o. a 2. év végéig</p> <p>Metotrexát 0-6x 6-12 mg i.th. (életkorfüggő dozírozás)</p>

^aA közepes kockázatú rizikócsoporthoz 4, az alacsony kockázatú rizikócsoporthoz 2 daunorubicin dózist írt elő a protokoll.

^bAz intratekális dózisok száma eltért központi idegrendszeri érintettség esetén vagy annak hiányában.

^cA HR-1-2-3 blokkot 2-szer kapják a betegek.

1.2 Az aszparagináz farmakológiája – gyermekkori vonatkozások

Az aszparagináz 130 kDa tömegű enzim, amely a vérben keringő aszparagin hidrolízisével a sejtek fehérjeszintézisének csökkenését váltja ki, és végül a blasztsejtek apoptózisához vezet. Míg a normál sejtek szintézis útján képesek pótolni a hiányzó aszparagint, addig a limfoblasztok és egyes tumorsejtek elveszítik ezt a képességüket, és túlélésük függővé válik az exogén aszparagin-forrástól.

Ami az aszparagináz felfedezését illeti, a tengerimalac szérum limfómaellenes hatásáról – melyet később aszparagináz-tartalmának tulajdonítottak – először Kidd és munkatársai számoltak be 1953-ban, majd Broome alkalmazta először rákellenes gyógyszerként [6, 7]. Jelenleg a bakteriális, *Escherichia coli* és *Erwinia chrysanthemii* eredetű 2-es típusú aszparaginázok vannak klinikai használatban. Mindkettő enzim nagy affinitást mutat az aszparagin, és sokkal kisebb mértékűt a glutamin iránt. Az *Erwinia chrysanthemii* eredetű enzim glutamináz aktivitása nagyobb az *E. coli* eredetű enziméhez képest [8-10].

Sokáig az *E. coli* és az *Erwinia* aszparagináz natív formáit használták az ALL és a non-Hodgkin limfóma kezelésére. A natív *E. coli* aszparagináz kémiaileg módosított, pegilált formája 1993-ban vált elérhetővé [8]. Az Egyesült Államokban 2013-ban beszüntették a natív *E. coli* aszparagináz forgalmazását, Magyarországon azonban még mindig ez az elsőként választandó – és ezáltal a legelterjedtebben használt – aszparagináz készítmény. 2016-ban egy új, rekombináns *E. coli* aszparagináz is megjelent az európai piacon [11].

A natív és pegilált *E. coli*, valamint az *Erwinia* aszparagináz intravénásan és intramuszkulárisan egyaránt alkalmazható. Magyarországon a BFM protokollok ajánlása szerint tesztdózist követően (100 E, utána 10 perc szünet) az aszparaginázt intravénásan kapják a betegek 1 órás infúzió formájában.

A három készítményt igen eltérő farmakokinetikai paraméterek jellemzik, amelyet figyelembe kell venni adagolásukkor. Leghosszabb felezési idővel a pegilált forma rendelkezik, legrövidebbel az *Erwinia* aszparagináz, ennek megfelelően előbbit kevesebbszer és kisebb dózisban, utóbbit többször és nagyobb dózisban szükséges adagolni összehasonlítva a natív *E. coli* aszparagináz készítménnyel [12, 13].

Számos tanulmány összefüggést mutatott ki az ASNS (aszparagin-szintetáz; asparagine synthetase (glutamine-hydrolyzing)) expressziója és az aszparagináz rezisztencia között,

azonban az *ASNS* alacsony expressziós szintje, mint az aszparagináz-érzékenység biomarkere kérdéses. A szuboptimális terápiás válasz másik forrása lehet az aszparagináz ún. csendes inaktivációja, amelynek során a termelődött antitestek az enzimaktivitás csökkenését okozhatják egyéb tünetek nélkül.

Az ALL-es betegek túlélésének jelentős javulása részben az intenzív és hosszan tartó aszparagináz terápiának köszönhető, sajnos azonban toxikus hatásai korlátozzák a használatát. Az életveszélyes toxicitások kialakulása miatt nem teljesített aszparagináz kezelés összefügg a betegség rossz kimenetelével [14-20].

Az aszparaginázhoz kapcsolódó toxikus hatásokat, azok gyakoriságát és az ajánlott terápiás eljárásokat foglalja össze a 2. Táblázat.

2. Táblázat. Az aszparagináz-kezelés toxikus hatásai a gyermekkori ALL terápiájában

Toxicitás	Gyak.	Terápiás beavatkozás	Ref.
Klinikai aszparagináz hiperszenzitivitás	≤45%	váltás másik aszparagináz készítményre	[21, 22]
Szubklinikai aszparagináz hiperszenzitivitás	8-29%	váltás másik aszparagináz készítményre	[23]
Hyperglycaemia	4-20%	inzulin-kezelés melletti normál vércukorszint esetén a terápia folytatása	[24]
Pancreatitis	2-18%	az aszparagináz terápia leállítása $\geq 3 \times \text{ULN}^\ddagger$ amiláz/lipáz szint és/vagy klinikai tünetek vagy képalkotói eljárással látható jelek esetén	[25]
		enyhe pancreatitis esetén aszparagináz újraadása megkísérelhető, ha 48 órán belül a betegnek nem voltak tünetei, amiláz/lipáz szintje $< 3 \times \text{ULN}^\ddagger$, nincs pseudocysta vagy necrosis a hasnyálmirigyében	[26]
Thrombosis	2-7%	klínikailag jelentős thrombosis esetén az aszparagináz megvonása	[27]
		a tünetek elmúltával antikoaguláns terápia mellett újra adható	[28, 29]
Encephalopathia	N.A.	enkephalopathia tüneti kezelése, szérum ammónia szint emelkedése esetén annak normalizálása	[30]
		ha a tünetek nem életveszélyesek, az aszparagináz terápia folytatható	
Myelosuppressio	N.A.	az aszparagináz terápia folytatása	[31]
		a többi mieloszuppresszív szer dózisának csökkentése (indukció alatt nem ajánlott)	
Hypertrigliceridaemia	≤67%*	az aszparagináz terápia folytatása, a beteg szoros monitorozása pancreatitis irányában	[32, 33]
Hepatotoxicitás	N.A.	AST/ALT szint $< 10 \times \text{ULN}^\ddagger$, bilirubin szint $< 3 \times \text{ULN}^\ddagger$ és a sárgaság hiánya az előfeltétele az aszparagináz beadásának (DCOG ALL-11); nem egyértelműek az ajánlások	[34]

‡ a normál érték felső határa (upper limit of normal; ULN); *kortikoszteroiddal együtt adva

Az aszparagináz okozta toxicitásokat az aszparagin-depléciónak fehérjeszintézis-csökkentő hatása mellett összefüggésbe hozták az enzim glutamináz aktivitásával is. Ezáltal az új készítmények egyik fejlesztési iránya a glutamináz aktivitás eltüntetésére, illetve csökkentése lett [10]. Azonban megjelentek olyan tanulmányok is, amelyekben a glutamináz aktivitás bizonyos esetekben hozzájárult az aszparagináz leukémiaellenes hatásához is [8, 35].

Az aszparagináz interakcióba léphet más gyógyszerekkel. Csökkenti a metotrexát tumorellenes és toxikus hatását, ezért 24 óra különbséggel adják őket a betegeknek. Feltételezhetően hepatotoxikus hatása következtében csökkenti a vinkrisztin clearance-ét, ezért 24 (de minimum 12) órával előtte adandó. Glükokortikoidokkal (prednizolon, dexametazon) együtt adva megnő a hyperglycaemia, a hypertriglyceridaemia és a trombotikus események kockázata, valamint kimutatták, hogy az aszparagináz a szérumban albumin szint csökkentésén keresztül befolyásolja a dexametazon clearance-ét [36]. Később pedig azt találták, hogy az aszparagináz-ellenes antitestek magas szintje összefüggést mutat az osteonecrosis alacsonyabb kockázatával [37]. A kortikoszteroidok maszkírozhatják az aszparaginázra adott hiperszenzitív reakciók tüneteit [8, 38].

A véráramból az aszparagináz makrofágok általi fagocitózis útján ürül ki, melynek során proteolízist szenved el [39]. Meer és mtsai in vivo imaging technikával indium-111 izotóppal jelzett *E. coli* aszparagináz útját követték egerekben. Azt találták, hogy az aszparagináz a májban, lépben és csontvelőben található rezidens makrofágszerű fagocitasejtek tüntetik el gyorsan a véráramból. A fagocitózist követő emésztés sebességmeghatározó lépése a katepszin B lizoszomális enzim általi hasítás volt *in vitro* és *in vivo* egyaránt. Egy esettanulmány is született egy a katepszin B gén inaktiváló mutációját hordozó betegről, aki többszöri *Erwinia* aszparagináz beadást követően nagyon magas szérumban aszparagináz szintje következtében súlyos hyperammonaemiával kísért encephalopathiát szenvedett el [8, 40].

Patel és mtsai azt találták, hogy az endo/lizoszóma közegében az aszparaginil-endopeptidáz (AEP) az *E. coli* aszparaginázra igen, az *Erwinia* aszparaginázra azonban nem képes hasítani. Az AEP magas expressziója jellemző a nagy kockázatú ALL egy csoportjára. Az antigén-feldolgozásban betöltött szerepe mellett az aszparagináz-rezisztenciához való hozzájárulását is valószínűsítik [41].

Az új készítmények fejlesztései elsősorban a klinikumban elérhető aszparaginázok immunogenitásának csökkentésére irányultak, irányulnak. A hosszabb felezési idejű, az immunrendszer számára kevésbé hozzáférhető pegilált *E. coli* aszparaginázt már sikeresen alkalmazzák a gyakorlatban. Farmakokinetikai paramétereinek további javítását célozva fejlesztették ki a PEG (polietilén-glikol) oldalláncokat az enzimhez kötő molekuláris kapcsoló (linker) stabilabb változatát [42].

A vörösvértetekbe zárt natív *E. coli* aszparaginázt felnőtt- és gyermekkori ALL-es betegek körében is vizsgálták. A vörösvértetek membránja megvédi az enzimet a proteázoktól és a makrofágoktól, így megnő a felezési ideje és csökken az immunogenitása [43].

A más *E. coli* és *Erwinia* szubtypusokból kinyert aszparaginázok mellett rekombináns *E. coli* és *Erwinia* aszparaginázokat, valamint más baktériumfajokból származó aszparaginázokat is továbbfejlesztettek. A glutamináz-aktivitás toxicitások kialakulásában feltételezett szerepét alapul véve, más baktériumból származó, glutamináz-aktivitással nem rendelkező aszparaginázokat is vizsgáltak, valamint rekombináns technológiával is előállítottak ilyeneket [44, 45].

A limfoblasztokban jelen lévő lizoszomális cisztein proteázok hasításának ellenálló aszparaginázokat is kifejlesztettek. A hasítással szembeni rezisztencia csökkentheti az immunogenitást, és javíthatja az enzim farmakokinetikai paramétereit, valamint a gyógyszer-rezisztencia kialakulását is csökkentheti [41, 46].

A *Wolinella succinogenes* eredetű aszparagináz V23Q és K24T aminosavcseréivel Sannikova és mtsai tripszinolízisnek ellenálló aszparaginázt hoztak létre. Ezenkívül a rekombináns enzim N-terminálisához egy heparin-kötő peptidet kapcsoltak, melynek segítségével az aszparaginázt a sejtek felszínén, illetve az extracelluláris mátrixban jelenlévő heparán-szulfát-tartalmú proteoglikánokhoz irányították [8, 47].

A PhD munkám során vizsgált betegek natív *E. coli* aszparaginázt (KidrolaseTM-t vagy Asparaginase medacTM-ot) kaptak első vonalbeli kezelésként. Az ALL-BFM 90, 95, ALL IC-BFM 2002 és 2009 protokollok aszparagináz kezelés ütemezését és dózisait a különböző rizikócsoportokban a 3. Táblázatban mutatom be. A későbbiekben az *E. coli* készítményekhez kapcsolódó hiperszenzitivitást fogom részletezni.

3. Táblázat. Az ALL BFM 90, 95, BFM IC-ALL 2002 és 2009 protokollok aszparagináz dózisa az A) SR, B) IR és C) HR kezelési ágakon.

A	ALL-BFM 90	ALL-BFM 95	ALL IC-BFM 2002	
	SR	SR	SR standard	SR experimentális
Indukció	Protokol IA (33 nap)			
<i>E. coli</i> aszparagináz dózis (E/m ² /nap)	10 000 p.i.* (1 h) × 8; 3 naponta		5000 p.i.* (1 h) × 8; 3 naponta	
Intenzifikáció	Protokol IB (28 nap)			
Konzolidáció	Protokol M (56 nap)			
Reindukció	Protocol II/1. rész (28 nap)		Protocol III/1. rész (14 nap)	
<i>E. coli</i> aszparagináz dózis (E/m ² /nap)	10 000 p.i.* (1 h) × 4 a 8., 11., 15. és 18. napon		10 000 p.i.* (1 h) × 4 az 1., 4., 8. és 11. napon	
Reintenzifikáció	Protokol II/2. rész (14 nap)		Protokoll III/2. rész (14 nap)	
Fenntartó	A diagnózistól számított 2. év végéig		Köztes fenntartó (10 hét)	
Késői reindukció	-		Protocol III/1. rész (14 nap)	
<i>E. coli</i> aszparagináz dózis (E/m ² /nap)			10 000 p.i.* (1 h) × 4 az 1., 4., 8. és 11. napon	
Késői reintenzifikáció			Protokoll III/2. rész (14 nap)	
Fenntartó			A diagnózistól számított 2. év végéig	

B	ALL-BFM 90	ALL-BFM 95	ALL IC-BFM 2009	ALL IC-BFM 2002	
	IR standard	IR	IR standard	IR standard	IR experimentális
Indukció	Protokol IA (33 nap)				
<i>E. coli</i> aszparagináz dózis (E/m ² /nap)	10 000 p.i.* (1 h) × 8; 3 naponta		5000 p.i.* (1 h) × 8; 3 naponta		
Intenzifikáció	Protokol IB (28 nap)				
Konszolidáció	Protokol M (56 nap)				
Reindukció	Protokoll II/1. rész (28 nap)			Protokoll III/1. rész (14 nap)	
<i>E. coli</i> aszparagináz dózis (E/m ² /nap)	10 000 p.i.* (1 h) × 4 a 8., 11., 15. és 18. napon			10 000 p.i.* (1 h) × 4 az 1., 4., 8. és 11. napon	
Reintenzifikáció	Protokoll II/2. rész (14 nap)			Protokoll III/2. rész (14 nap)	
Fenntartó	A diagnózistól számított 2. év végéig			Köztes fenntartó (10 hét)	
Késői reindukció	-			Protokoll III/1. rész (14 nap)	
<i>E. coli</i> aszparagináz dózis (E/m ² /nap)				10 000 p.i.* (1 h) × 4 az 1., 4., 8. és 11. napon	
Késői reintenzifikáció				Protokoll III/2. rész (14 nap)	
Fenntartó				Köztes fenntartó (10 hét)	
Késői reindukció				Protokoll III/1. rész (14 nap)	

	ALL-BFM 90	ALL-BFM 95	ALL IC-BFM 2009	ALL IC-BFM 2002	
	IR standard	IR	IR standard	IR standard	IR experimentális
<i>E. coli</i> aszparagináz dózis (E/m ² /nap)	-			10 000 p.i.* (1 h) × 4 az 1., 4., 8. és 11. napon	
Késői reinterzifikáció				Protokoll III/2. rész (14 nap)	
Fenntartó				A diagnózistól számított 2. év végéig	

C	ALL-BFM 90	ALL-BFM 95	ALL IC-BFM 2009	ALL IC-BFM 2002	
	HR standard	HR	HR standard	HR standard	HR experimentális
Indukció	Protokol IA (33 nap)				
<i>E. coli</i> aszparagináz dózis (E/m ² /nap)	10 000 p.i.* (1 h) × 8; 3 naponta		5000 p.i.* (1 h) × 8; 3 naponta		
Intenzifikáció	(HR'-1/HR'-2/HR'-3)×3		Protokol IB (28 nap)		
Konzolidáció	(6×3×3 nap) [‡]	(HR'-1/HR'-2/HR'-3)×2 (6×3×2 nap) [‡]	(HR'-1/HR'-2/HR'-3)×2 (6×3×2 nap) [‡]	(HR'-1/HR'-2/HR'-3)×1 (6×2 nap) [‡]	
<i>E. coli</i> aszparagináz dózis (E/m ² /nap)	25 000 p.i.* (6 h) minden egyes blokk 6. napján			25 000 p.i.* (6 h) minden egyes blokk 6. és 11. napján	
Reindukció		Protokoll II/1. rész (28 nap)		Protokoll III/1. rész (14 nap)	
<i>E. coli</i> aszparagináz dózis (E/m ² /nap)	-	10 000 p.i.* (1 h) × 4 a 8., 11., 15. és 18. napon		10 000 p.i.* (1 h) × 4 az 1., 4., 8. és 11. napon	
Reintenzifikáció	Protokoll II/2. rész (14 nap)			Protokoll III/2. rész (14 nap)	
Fenntartó	A diagnózistól számított 2. év végéig			Köztes fenntartó (28 nap)	
Késői reindukció				Protokoll III/1. rész (14 nap)	
<i>E. coli</i> aszparagináz dózis (E/m ² /nap)	-			10 000 p.i.* (1 h) × 4 az 1., 4., 8. és 11. napon	
Késői reintenzifikáció				Protokoll III/2. rész (14 nap)	
Fenntartó				Köztes fenntartó (28 nap)	

	ALL-BFM 90	ALL-BFM 95	ALL IC-BFM 2009	ALL IC-BFM 2002	
	HR standard	HR	HR standard	HR standard	HR experimentális
Késői reintenzifikáció	-			Protokoll III/1. rész (14 nap)	
<i>E. coli</i> aszparagináz dózis (E/m ² /nap)				10 000 p.i.* (1 h) × 4 az 1., 4., 8. és 11. napon	
Fenntartó				A diagnózistól számított 2. év végéig	

**per infusionem*=intravénás infúzióban kapott

‡a kezelési szüneteket nem számítva

1.3 Aszparagináz hiperszenzitivitás

Az aszparagináz szubklinikai és klinikai hiperszenzitivitást egyaránt okozhat. A klinikai hiperszenzitivitás leggyakrabban urticaria formájában jelenik meg, de a tünetek súlyossága az infúzió körüli lokális fájdalmas kipirosodástól és ödémától a súlyos szisztémás reakciókig – úgy mint gégeödéma, bronchospasmus, hypotensio és esetenként súlyos anafilaxiás sokk – változhat [48, 49]. A korábbi BFM protokollok és a jelenlegi IC-BFM protokoll első vonalbeli szerként az *E. coli* aszparaginázt ajánlják. Az erre a szerre kialakuló klinikai hiperszenzitivitás előfordulási aránya a gyermekkori ALL-es betegek körében akár 45% is lehet. Túlérzékenységi tünetek esetén az *E. coli* aszparaginázzal való kezelést fel kell függeszteni, és a későbbiekben egy másik, pegilált *E. coli* vagy *Erwinia* aszparagináz készítményre váltani [20, 22, 50]. A kezelés felfüggesztésének oka leggyakrabban a hiperszenzitivitás.

A klinikai hiperszenzitivitási reakció ritkábban, 3-24%-ban alakul ki pegilált *E. coli* aszparaginázzal szemben [15, 19, 51, 52]. A korábban *E. coli* aszparaginázzal kezelt betegek esetében a közös bakteriális eredet miatt gyakrabban alakul ki túlérzékenységi reakció a pegilált formával szemben is [53]. A más baktériumtörzsből származó *Erwinia* aszparagináz esetében 3-37%-os hiperszenzitivitási rátáról számoltak be [13, 19, 21, 52, 54-60]

Az aszparagináz túlérzékenység számos rizikófaktorát leírták már, köztük a különböző készítmények használatát, a dozírozást, a beadás módját, a szünet utáni újraadását, illetve az egy időben alkalmazott kemoterápiát. Azonban a hiperszenzitivitás máig megijósolhatatlan, és nagy egyéni különbségeket mutat [22].

A klinikai túlérzékenység az aszparaginázt inaktiváló, ún. neutralizáló antitestek kialakulásával mutat összefüggést [61]. Jelenlétük nem feltétlenül jár együtt tünetek kialakulásával, ilyen esetekben csendes inaktivációról beszélünk. Ez az állapot az aszparagináz beadását követő nagyon alacsony vagy hiányzó aszparagináz aktivitással jellemezhető [61]. Habár a klinikai tünetek hiányából kifolyólag a szubklinikai hiperszenzitivitás diagnózisának felállítása nehéz, a natív *E. coli* aszparagináz terápiában részesülő betegek körében a szubklinikai hiperszenzitivitás előfordulása 8-29%-ra tehető [23, 62, 63]. A szubklinikai túlérzékenység, ha nem fedezik fel, és nem foglalkoznak vele időben, erősen asszociál a rossz klinikai kimenetellel. [23, 63]. Egy klinikai tanulmányban a klinikai kimenetel szignifikáns javulásával járt együtt a

szubklinikai hiperszenzitivitást mutató betegek prospektív azonosítása, és a váltás másik aszparagináz készítményre [23].

Intravénás beadást követően megfigyeltek lokális, nem antitest-mediált ún. infúziós reakciót néhány beteg esetében [64]. A klinikai hiperszenzitivitástól eltérően az infúziós reakció során nem képződnek aszparagináz-ellenes antitestek és nem mutatnak összefüggést az aszparagináz-aktivitás csökkenésével sem. Egy lezajlott infúziós reakciót követően a beadás újra megkísérrelhető hosszabb infúziós idővel és megfelelő premedikáció kíséretében. A gyakorlatban nehézségeket okozhat a klinikai és szubklinikai hiperszenzitivitás, illetve az infúziós reakció közötti különbségtétel, azonban az aszparagináz aktivitás mérése segítséget nyújthat a fent említett állapotok elkülönítésében [14].

A klinikai túlérzékenységi és infúziós reakciókon, valamint a csendes inaktiváción kívül atípusos allergiás reakciókról, ún. allergiaszerű reakciókról is beszámoltak pegilált *E. coli*, illetve *Erwinia* aszparagináz beadását követően. Az allergiaszerű tünetek (1-2-es fokozatú viszketés, csalánkiütés, egyéb kiütések, láz, hányás, ödéma, gasztrointesztinális és pulmonáris tünetek) nem voltak elkülöníthetőek az allergiás reakcióktól. A tünetek megjelenéséig azonban jelentősen rövidebb idő telt el egy valódi allergiás reakció esetében. Néhány allergiaszerű tüneteket mutató beteg esetében kimutathatóak voltak antitestek is, azonban azok nem bizonyultak neutralizáló hatásúaknak [65]. Nem inaktiváló antitesteket ki lehetett mutatni olyan betegekben is, akiknek nem volt klinikai allergiás vagy allergiaszerű reakciójuk, se csendes inaktivációjuk [37, 59, 62].

Az *E. coli* és az *Erwinia* aszparagináz között nincsen keresztreaktivitás, ezért akár allergiás reakció, akár csendes inaktiváció esetén is helyettesíthetők egymással [66, 67]. A nagy kiterjedésű PEG láncok úgy csökkentik az enzim immunogenitását, hogy sztérikusan védik meg azt az immunrendszertől [51]. Ezért a pegilált *E. coli* aszparagináz is használható a natív forma ellen kialakult allergiát követően [68, 69]. Az összes kezelési protokollban élnek azzal a lehetőséggel, hogy egy allergiás reakció esetén aszparagináz készítményt cserélnek. A korábbi ALL BFM protokollokban natív *E. coli* hiperszenzitivitás esetén a pegilált készítményre váltottak, ha a pegilált *E. coli* aszparaginázra is allergia alakult ki, akkor pedig *Erwinia* aszparaginázra. Azoknak a betegeknek, akikben a natív *E. coli* aszparagináz ellen neutralizáló antitestek alakultak

ki, nagyobb kockázatuk volt a pegilált forma elleni hiperszenzitivitás kialakulására is [68]. Különösen a natív *E. coli* aszparagináz ellen kialakuló magas antitestszinteknél figyeltek meg neutralizáló hatást a pegilált készítményekkel szemben is. Ilyen esetekben egy magas antitestszinttel rendelkező betegnek nagyobb haszna származna a korai *Erwinia* aszparaginázra történő váltásból [8, 69].

A pegilált aszparagináz esetében nem kizárólag a bakteriális enzim ellen alakulhat ki allergiás reakció. A hozzákapcsolt PEG molekulák maguk is indukálhatnak hiperszenzitiv reakciót komplementaktiváció kiváltásán keresztül. Ilyen pszeudoallergiás reakció akár a pegilált gyógyszer első beadásánál is jelentkezhet [70]. A PEG hapténként is képes viselkedni, és anti-PEG-antitestek kialakulását indukálni. Vélhetően a PEG környezetünkben történő gyakori előfordulásával magyarázható, hogy IgM és IgG típusú PEG-ellenes antitestek az egészséges donorok 25%-ában kimutathatók [71]. Armstrong és mtsai voltak az elsők, akik a pegilált aszparagináz beadását követő anti-PEG-antitestek kialakulásáról beszámoltak [72]. A PEG-ellenes antitestek szoros összefüggést mutatnak a PEG-aszparagináz gyorsabb eliminációjával. A csak a PEG-re korlátozódó allergiás reakcióval magyarázható annak a két betegnek a sikeres kezelése natív *E. coli* aszparaginázzal, akik korábban allergiás reakciót mutattak a pegilált formára [8, 73]. Továbbá a vérből történő felgyorsult clearance (accelerated blood clearance, ABC) jelenségét is leírták pegilált gyógyszerek adását követően. Az ABC jelenség mechanizmusa még nem teljesen ismert. Egyesek az immunrendszer közreműködését feltételezik, és IgM típusú anti-PEG-antitestek kialakulását tartják felelősnek. Mások ezt megkérdőjelezzik, és más mechanizmusok szerepét valószínűsítik [8, 74, 75].

1.4 Az aszparagináz hiperszenzitivitás genetikai háttere

2010-ben teljesgenom-asszociációs vizsgálatot (GWAS) végeztek az egyesült államokbeli gyermekkori ALL-es betegek körében az aszparagináz hiperszenzitivitásban szerepet játszó genetikai variánsok azonosítására [76]. A vizsgálatban a *GRIAI* (Glutamate Ionotropic Receptor AMPA Type Subunit 1; ionotróp AMPA glutamát-receptor alegység-1) gén polimorfizmusaival találtak összefüggéseket mind a felfedező, mind a validáló betegcsoportokban. Ugyanebben a tanulmányban a felfedező populációban a *GALNT10* (polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 10)

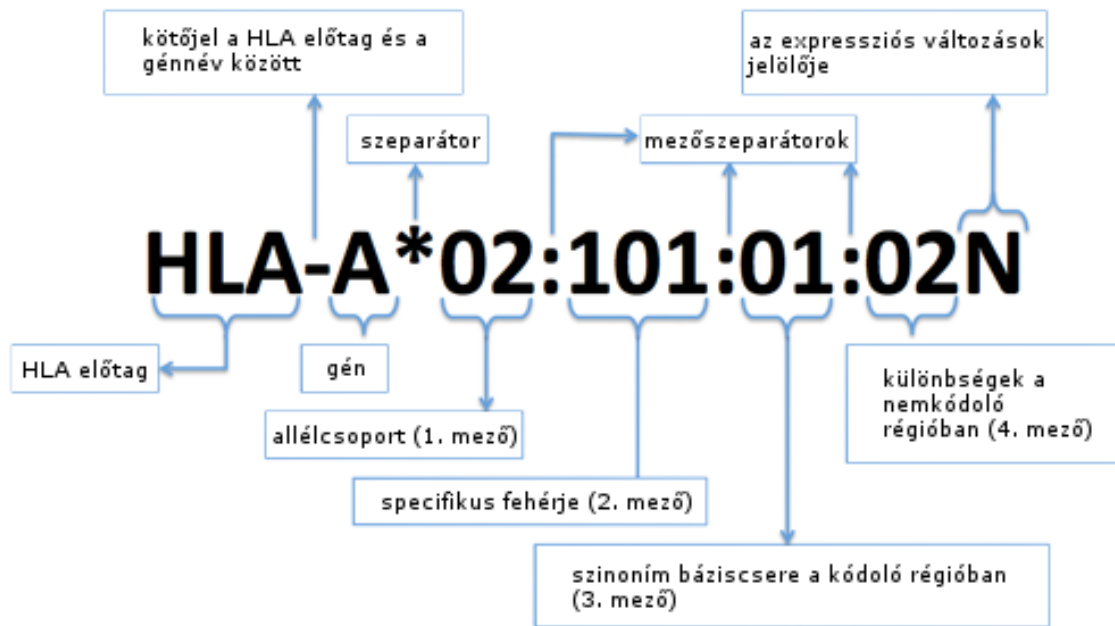
gén több polimorfizmusa is asszociált az aszparagináz hiperszenzitivitással. A genom-asszociációs analízisek gyakori inkonkluzív eredményei miatt egy gén vagy egy génavariáns hatását a vizsgált betegségre vagy állapotra akkor tekintik igazoltnak, ha azt független vizsgálatok is alátámasztják. Chen és mtsai *GRIA1* polimorfizmusokra vonatkozó eredményét később egy kisebb, szlovén populáción végzett vizsgálat is megerősítette [77].

2014-ben Fernandez és mtsai 1870 európai ősókkal rendelkező ALL-es gyermek vizsgálata alapján a *HLA-DRB1*07:01* allél aszparagináz hiperszenzitivitással való asszociációjáról számoltak be [78]. Ugyanez a csoport egy későbbi, kevert etnikumú betegekkel végzett GWAS vizsgálattal megerősítette ezt az összefüggést [79]. E későbbi tanulmány egy másik gén, az *NFATC2* (nuclear factor of activated T-cells 2) rs6021191 polimorfizmusának szerepére is fényt derített. Az rs6021191 ritka alléljának gyakorisága 0,001 alatt van az európai származásúak körében, így ez az eredmény a nem kaukázusi betegekre nézve bírhat klinikai jelentőséggel.

1.5 A HLA II. osztályának szerepe az antigénbemutatásban

A humán leukocita antigén (Human Leukocyte Antigen, HLA) II. osztályához tartozó molekulák az extracelluláris eredetű fehérjék meghatározott tulajdonságú peptid-részleteinek bemutatásában vesznek részt. Ezt a bemutatást az antigén-prezentáló sejtek végzik a Th-sejtek számára, melynek központi jelentősége van az adaptív immunválasz elindításában. A HLA II. osztály génei a fő hisztokompatibilitási komplex (Major Histocompatibility Complex, MHC) régiójában helyezkednek el, a 6-os kromoszómán. Ez a régió nagyon polimorf, és jelentős kapcsoltsági egyensúlytalanságot (linkage disequilibrium, LD) mutat.

A régi nevezéktan szerológiai vizsgálatok eredményein alapult. A HLA tag után álló betű vagy betűk az adott lókuszt jelölték (pl.: *HLA-B*), az azt követő számok, pedig az adott allélt (pl.: *HLA-B27*). A jelenleg használt nevezéktan két évente megújul, és genetikai módszerekre épülve precízebb megjelölést tesz lehetővé. A lókuszt megjelölése a régi nomenklatúrával megegyezik, majd *-gal elválasztva 4 számjegy határozza meg az adott allélt az alábbi módon (<http://hla.alleles.org/nomenclature/naming.html>; 1. ábra):



1. ábra. A HLA allélok nevezéktana.

1.6 Exogén peptidek által kiváltott hiperszenzitivitási reakciók

Káros gyógyszerreakciónak nevezünk a reakció patomechanizmusától függetlenül minden olyan nem kívánt hatást, amelyet az adott gyógyszer váltott ki. A sokféle klasszifikáció közül jelenleg a Rawlins és Thompson által kidolgozott a legelterjedtebb, amely a káros gyógyszerreakciók két nagy altípusát különíti el [80, 81]:

1. „A” típusú reakció: a gyógyszer farmakológiai sajátágaiból fakadóan jön létre; a legtöbb gyógyszernek kitett egyénben kialakul.
2. „B” típusú reakció: nehezen megjósolható; csak az arra hajlamos egyéneknél alakul ki (ilyen pl.: a gyógyszer okozta hiperszenzitivitási reakció).

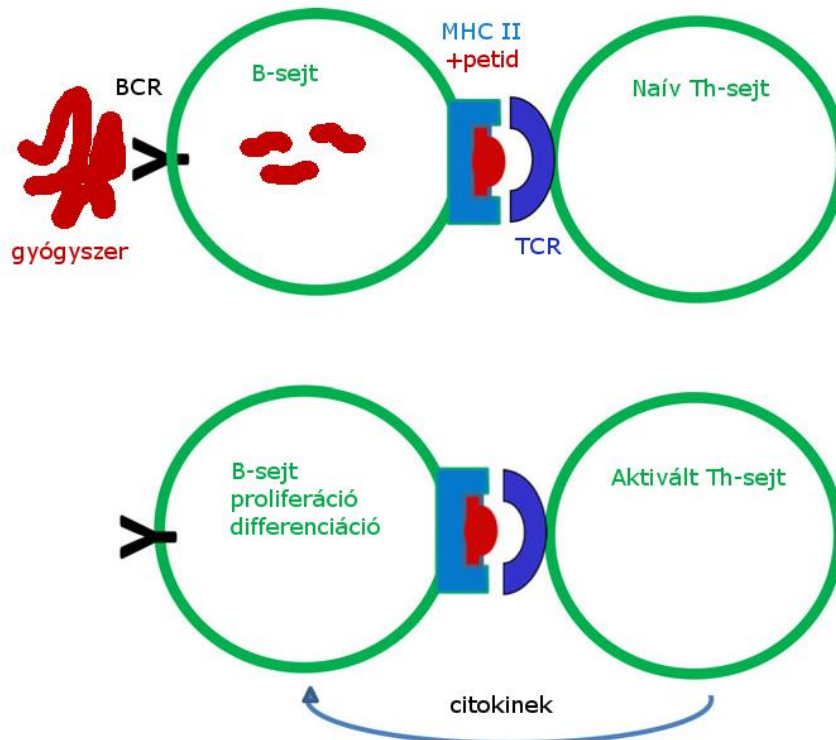
Az allergia nevezéktana vita tárgya. Egyes immunológusok úgy vélik, hogy vagy csak az IgE-mediált, vagy csak az IgE és a T-sejt által közvetített immunológiai reakciók tekinthetők valódi allergiás reakcióknak, mert ezek a leggyakoribb gyógyszerreakciók, és a mechanizmusuk is jól dokumentált. Az Európai Allergológiai és Klinikai Immunológiai Akadémia és az allergiás megbetegedések világszervezete (World Allergy Organization) állásfoglalása szerint azonban a túlérzékenységi reakciók Coombs és Gell által leírt négy típusának mindegyike allergiás reakciónak tekinthető [82]. Eszerint a terminológia szerint gyógyszerallergia az a gyógyszer okozta

túlérzékenységi reakció, ami specifikus immunválasz formájában jön létre. Ez minden specifikus antitest vagy T-sejt által közvetített reakciót magában foglal; a nem specifikus immunreakciók – mint pl. a nem IgE-függő hízósejt degranuláció – viszont nem tartoznak ide. A specifikus immunválasz jellemzője a specifikus B- és/vagy T-sejtek klonális expanziója és szomatikus hipermutációja következtében kialakuló immunológiai memória. Ezért jellemző az allergiás reakciókra – a többi hiperszenzitív reakcióval összevetve – a reakciók mértékének drámai növekedése ismételt expozíciók követően. Ezért még rettegettebbek a többi gyógyszer-túlérzékenységi reakcióhoz képest, és helyes felismerésük klinikailag ezért jelentős [82].

A nagymolekulás, fehérje típusú gyógyszerekre adott tipikus immunválasz az antitestek T-sejt-függő kialakulása. Még egy rekombináns humán terápiás fehérje is képes specifikus antitest-termelődést kiváltani többszöri adagolást követően, mert szinte minden ilyen gyógyszer esetében is található eltérés a molekula háromdimenziós szerkezetében a beteg saját fehérjééhez képest [81].

Az ún. szenzitizációs fázisban a B-sejtek és a CD4+ T-sejtek szoros közreműködésére van szükség. Az extracelluláris térbe kerülő biológiai gyógyszerek specifikus felismerésre kerülnek a B-sejtek sejtfelszíni receptorai (BCR) által. A B-sejt a gyógyszermolekula megkötését követően felszínén CD80 (B7.1) vagy CD86 (B7.2) molekulát expresszál. Ez a folyamat önmagában nem elegendő ahhoz, hogy B-sejt-proliferációt és differenciációt indukáljon. Ahhoz, hogy ez bekövetkezzen, szükség van a T-sejtek közreműködésére, köztük a CD40-CD40L kölcsönhatás létrejöttére [81].

A T-sejt-aktivációhoz szükséges, hogy a professzionális antigén-prezentáló sejtek (APC) MHC II komplexeikben a gyógyszer egy peptid-fragmensét bemutassák az azt specifikusan felismerő receptorral (TCR) rendelkező T-sejtek számára. Ez a naív T-sejtek aktiválódásához vezet. A terápiás fehérjék leghatékonyabb APC sejtjei a limfoid folliculusokban található, megfelelő BCR receptorral rendelkező folliculáris B-sejtek. Ezek képesek specifikusan megkötni, internalizálni és feldolgozni az oldott gyógyszermolekulát, és az abból származó antigén tulajdonságú peptid-darabkát (epitóp) MHC II komplexeik segítségével bemutatni. Aktivációjukat követően a folliculáris B-sejtek a T-sejt-zónába migrálnak, ahol a naív helper T-sejtekkel találkozva azoknak a Th2 irányba történő differenciációjához szükséges kostimulációs jeleket (mint pl.: a B7 molekula) szolgáltatnak (2. ábra; [81]).



2. ábra. A gyógyszer-szenzitizáció mechanizmusának sematikus vázlata nagymolekulás gyógyszerek (fehérjék) esetében. A gyógyszer felismerésre és endocitózisa kerül a megfelelő receptorral (BCR) rendelkező B-sejt által. Ez a B-sejt aktivációját váltja ki, ami az antigén processzálásához, majd az így létrejött peptid-részlet MHC II komplex segítségével történő bemutatásához vezet. A megfelelően illeszkedő receptorral rendelkező naív helper T-sejt (Th-sejt) aktiválódik az MHC II-peptid-komplex által, és citokinszekréció útján proliferációra és differenciációra serkenti a B-sejtet.

A peptidet bemutató B-sejt és a megfelelő TCR-rel rendelkező Th-sejt szoros kontaktusára van szükség ahhoz, hogy a CD40 és a CD40 ligand közötti kötés létrejöjjön, aminek következtében transzkripciós faktorok aktiválódnak, beindul a B-sejt-proliferáció, szomatikus mutáció, majd a gyógyszer-specifikus antitestek termelése. A szenzitizációs fázis gyakran nem okoz klinikai tüneteket. Ha később a szervezet ismételt találkozik ugyanazzal az allergénnel, a szenzitizáció típusától függ, hogy milyen immunválasz alakul ki rá. A fehérjékkel szemben kialakuló allergiás reakciók többnyire antitest-mediáltak. Az IgE-mediált (I. típusú túlérzékenység Coombs és Gell besorolása alapján) reakciók a legjobban tanulmányozottak, de IgG-mediált (III. típusú) immunkomplex-képződést is megfigyeltek már [81].

Az effektor fázis során az I. típusú túlérzékenységi reakció esetében a cirkuláló gyógyszer-specifikus IgE molekulák Fc végükkel bekötődnek a zömmel a hízósejtek és bazofil granulociták felszínén található IgE-specifikus receptoraikhoz (type I high

affinity IgE receptor; FcεRI). A jelenlegi paradigma szerint az antigén keresztkötésére (cross-linking) van szükség ahhoz, hogy a hízósejtek aktivációja bekövetkezzen, és a különböző mediátorok mint pl.: a hisztamin, leukotriének, prosztaglandinok és citokinek felszabaduljanak. Ezek vazodilatációt, az érpermeabilitás növekedését, fokozott nyáktermelést és bronchoconstrictiót okoznak, ami olyan klinikai tünetek formájában nyilvánulhat meg mint a csalánkiütés vagy az anafilaxis [81].

A III. típusú túlérzékenység effektor fázisában a gyógyszer és a gyógyszer-specifikus antitestek immunkomplexet alkotnak, ami egy gyakori jelenség, és nem feltétlenül okoz patológiás elváltozásokat. Bizonyos esetekben viszont aktiválhatják az endotélsejteket, FcγR-függő komplement-aktivációt idézhetnek elő, vagy lerakódhatnak a kisebb erekben. Nyitott kérdés, hogy milyen körülménytől függ, hogy az immunkomplexek előidézik-e betegséget vagy sem. Klinikai tünetei megnyilvánulhatnak szérumbetegség, gyógyszer okozta szisztémás lupus erythematosus és/vagy vasculitis formájában [81].

1.7 A *CYP3A4* polimorfizmusok szerepe a gyermekkori akut limfoblasztos leukémiás betegek túlélésében

A *CYP3A4* a P450-es citokróm enzim-rendszernek a májban és bélben legnagyobb mennyiségben előforduló tagja. Az emberben a legjelentősebb gyógyszermetabolizáló enzimnek tekinthető. Az ALL terápiájában használt számos gyógyszer – mint például a vinkrisztin, ciklofoszfamid, dexametazon vagy a doxorubicin – metabolizmusában részt vesz. Egy egészséges önkéntesek bevonásával végzett tanulmányban 90%-ra becsülték a *CYP3A4* enzim aktivitásában megfigyelhető nagy egyéni különbségek örökölhetőségét (heritabilitását), ami felveti a *CYP3A4* gén, illetve annak kifejeződését szabályozó genomi régiók polimorfizmusainak meghatározó szerepét [83]. Gyakorlatilag nem születtek ez idáig közlemények a *CYP3A4* polimorfizmusok az ALL farmakogenetikájában betöltött szerepéről. Ennek egyik valószínűsíthető oka a funkcionális polimorfizmusok viszonylag alacsony gyakorisága (megközelítőleg 4-5%), ami túl alacsony ahhoz, hogy esetleges hatásuk az általában kis betegszámú vizsgálatokban szignifikánsan kimutatható legyen [84].

Munkacsoportunk korábban a *CYP3A4* gén polimorfizmusainak hatását vizsgálta a gyermekkori ALL-es betegek túlélési mutatóira. A gyakori (a kaukázusi populációkban

10% feletti ritka allél gyakorisággal előforduló) polimorfizmusok mellett a *CYP3A4* és az átfedő szubsztrát-specificitással rendelkező *CYP3A5* egyes gyógyszerek farmakokinetikai paramétereit befolyásoló, ritkább polimorfizmusait is vizsgáltuk [84-87]. Ebben a tanulmányban azt találtuk, hogy a *CYP3A4* gén gyakori rs2246709 polimorfizmusa szignifikánsan befolyásolja az ALL-es betegek túlélését. Ez a hatás a két nem esetében jelentősen eltérő volt [84, 87]. Halálokok szerinti vizsgálva, abban az esetben, ha a betegség progressziója vezetett a beteg halálához, az rs2246709 és további két polimorfizmus (rs2404955 és rs12333983) is szignifikáns összefüggést mutattak a túléléssel (4. Táblázat).

4. Táblázat. A különböző halálokokat vizsgáló log-rank tesztek eredményei.

Halálok	Infekció N = 28		A betegség progressiója N = 34		Toxicitás N = 7		Egyéb N = 6	
	P-érték	Statisztikai erő	P-érték	Statisztikai erő	P-érték	Statisztikai erő	P-érték	Statisztikai erő
rs15524 = AA	0,066	0,571	0,033	0,789	0,368	0,343	0,169	0,463
rs15524 = AG								
rs15524 = GG								
rs776746 = GG	0,741	0,045	0,078	0,611	0,347	0,351	0,142	0,486
rs776746 = GA								
rs776746 = AA								
rs2404955 = GG	0,734	0,093	0,002	0,809	0,408	0,295	0,58	0,206
rs2404955 = GA								
rs2404955 = AA								
rs12333983 = TT	0,717	0,102	0,003	0,802	0,386	0,309	0,547	0,223
rs12333983 = TA								
rs12333983 = AA								
rs2242480 = CC	0,817	0,092	0,44	0,195	0,129	0,51	0,422	0,288
rs2242480 = CT								
rs2242480 = TT								
rs4646437 = GG	0,839	0,068	0,637	0,319	0,17	0,462	0,917	0,068
rs4646437 = GA								
rs4646437 = AA								
rs2246709 = AA	0,242	0,512	0,003	0,916	0,264	0,384	0,05	0,635
rs2246709 = AG								
rs2246709 = GG								
rs35599367 = GG	0,797	0,135	0,889	0,019	0,717	0,000	0,913	0,109
rs35599367 = GA								
rs35599367 = AA								

A $p \leq 0,05$ és a 0,8 feletti statisztikai erővel rendelkező eredmények félkövérrel jelöltek.

2 Célkitűzések

Célkitűzéseim a következők voltak:

1. Egy korábbi aszparagináz hiperszenzitivitást vizsgáló GWAS alapján kiválasztott *GRIA1* és a *GALNT10* gének meghatározott polimorfizmusainak vizsgálata magyarországi gyermekkori ALL-es populáción kompetitív allélspecifikus PCR segítségével.
2. A *HLA-DRB1* és *HLA-DQB1* allélok nagyfelbontású szekvencia alapú tipizálása; az allélok és haplotípusok szerepének vizsgálata az aszparagináz hiperszenzitivitás kialakulásában.
3. Az aszparagináz hiperszenzitivitás hatásának vizsgálata a gyermekkori ALL-es betegek túlélési mutatóira.
4. Ugyanezen a populáción a *CYP3A4* rs2246709 polimorfizmus ALL-es betegek túlélésére gyakorolt hatásának vizsgálata hosszabb követési idővel.

3 Módszerek

3.1 Betegek

A jelöltgén-asszociációs vizsgálatokhoz 576 gyermekkori akut limfoblasztos leukémiás betegről gyűjtöttünk mintát és klinikai adatot. Ezeket a betegeket 1990 és 2012 között kezelték a kutatásba bevont 9 magyarországi gyermekhematológiai központ valamelyikében:

Semmelweis Egyetem I. sz. Gyermekgyógyászati Klinika

Semmelweis Egyetem II. sz. Gyermekgyógyászati Klinika

Heim Pál Gyermekkórház

Madarász utcai Gyermekkórház

Bethesda Gyermekkórház

Debreceni Egyetem, Orvos- és Egészségtudományi Centrum, Gyermekklinika, Hemato-Onkológiai Osztály

Borsod-Abaúj-Zemplén Megyei Kórház Gyermekegészségügyi Központ, Gyermekhaematológiai és Csontvelőtranszplantációs Osztály

Szegedi Tudományegyetem, Gyermekgyógyászati Klinika

Pécsi Tudományegyetem, Gyermekgyógyászati Klinika, Onkohematológiai Osztály

Vas megyei Önkormányzat Kórháza, Gyermekosztály

Kezelésüket a nemzetközi BFM munkacsoport egymásra épülő protokolljai (ALL-BFM 90, 95, ALL IC-BFM 2002 és 2009) szerint kapták. Magyarországon ebben az időszakban az *Escherichia coli* baktériumból származó KidrolaseTM (Jazz Pharmaceuticals, Inc.), illetve Asparaginase medacTM (Kyowa-Hakko) márkanevű L-aszparagináz készítményeket használták első vonalbeli kezelésként.

Az adatgyűjtést retrospektív módon, a betegek egészségügyi dokumentációjának felhasználásával végeztük. A vizsgálatból az alábbi okok miatt zártunk ki 61 beteget: klinikai dokumentáció hiánya (n=15), az aszparagináz-kezelés felfüggesztése nem túlérzékenységi reakció miatt (n=1), másik aszparagináz készítményre történő váltás nem túlérzékenységi reakció miatt (n=1), a betegminta 50% alatti genotipizálhatósága (n=28), szignifikáns eltérés a kezelési protokolltól (n=6), valamint más kezelési protokoll használata (n=10). Az így megmaradt betegpopuláción belül a kontrollok (az

aszparagináz kezelésre hiperszenzitivitást nem mutató betegek) beválasztási kritériuma legalább 2 aszparagináz tartalmú kezelési blokk teljesítése volt aszparagináz-túlérzékenységi reakció nélkül. Ebből kifolyólag további 10 beteget zártunk ki, és végül a *GRIA1* és *GALNT10* polimorfizmusok vizsgálatát 505 fős betegpopuláción végeztük el (5. Táblázat). A *HLA* régió szekvenálásához szükséges minőségi kritériumoknak megfelelő DNS minta 359 beteg esetében állt rendelkezésünkre (5. Táblázat).

5. Táblázat. A betegek jellemzői

	N=505	N=359
Nem (%)		
Fiú	280 (55,4)	200 (55,7)
Leány	225 (44,6)	159 (44,3)
Diagnóziskori életkor (év)		
Mean (\pm szórás)	6,2 (\pm 4,1)	6,3 (\pm 4,2)
Median (intervallum)	4,9 (1-18)	4,8 (1-18)
Rizikócsoport (%)		
Alacsony, SR	147 (29,1)	102 (28,4)
Közepes, IR	305 (60,4)	213 (59,3)
Magas, HR	53 (10,5)	44 (12,3)
Immunfenotípus (%)		
pre-B-ALL	402 (79,6)	287 (79,9)
T-ALL	69 (13,7)	46 (12,8)
Egyéb	34 (6,7)	26 (7,2)

Az aszparagináz hiperszenzitivitás kategorizálását a nem kívánt eseményekre vonatkozó általános toxicitási kritériumrendszer, a National Cancer Institute Common Toxicity Criteria for Adverse Events (CTCAE v3.0) alapján végeztük el.

Az esetek közé soroltunk azokat a betegeket, akiknél a CTCAE szerinti 1-es vagy azt meghaladó fokú allergiás vagy anafilaktikus reakció volt megfigyelhető az infúzió beadása során vagy az azt követő 4 órán belül, valamint ha kezelést végző szakemberek úgy döntöttek, hogy az adott készítmény alkalmazását leállítják, illetve a továbbiakban más típusú aszparagináz készítményre váltanak. A hiperszenzitivitási reakciók lefolyásának részletes leírása visszakereshető volt a dokumentáció dekurzus részéből.

A beteg gyermekek és szüleik, illetve gondviselőjük írásos és szóbeli tájékoztatásban részesültek, és beleegyezésüket adták gyógyszergenetikai kutatásban való részvételükhöz. A betegtájékoztatókat és beleegyező nyilatkozatokat az Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága (ETT TUKEB; 12988-52/2003-1018-EKU 602/KO/03 és 8-374/2009-1018EKU 914/PI/08 engedélyek) hagyta jóvá.

A Genetikai, Sejt- és Immunbiológiai Intézetben rendelkezésemre állt egy gyermekkori ALL-es betegektől származó mintagyűjtemény és adatbank. A gyűjtés megszervezése és lebonyolítása főleg dr. Erdélyi Dániel nevéhez, későbbi továbbfejlesztése, fenntartása és bővítése pedig Félné dr. Semsei Ágnes nevéhez fűződik [88, 89]. Ezt az adat- és mintabankot bővítettem én is PhD munkám során adat- és mintagyűjtéssel egyaránt.

3.2 Genotipizálás

3.2.1 *GRIA1* és *GALNT10* polimorfizmusok meghatározása KASPar genotipizálási módszerrel

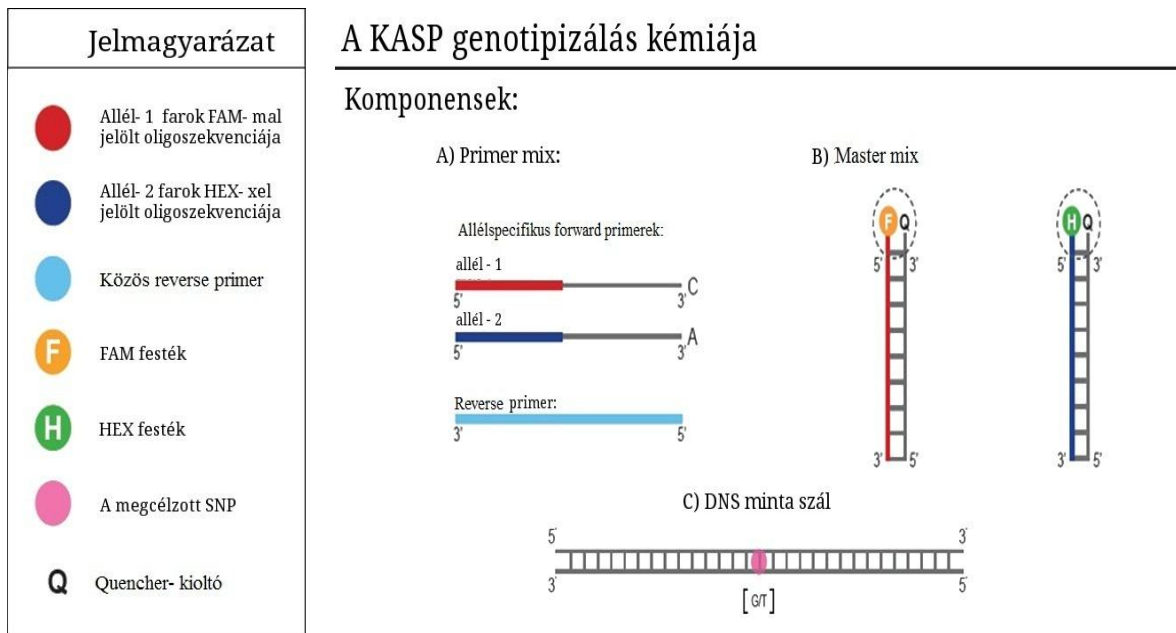
A legtöbb esetben a betegektől remissziós fázisban vett perifériás vér állt a rendelkezésemre. Néhány beteg esetben azonban (n=69) csak diagnóziskori perifériás vérminta vagy csontvelői sejtszuspenzió volt elérhető.

A mintákból *QIAamp DNA Blood Midi Kit* (Qiagen, Valencia, CA, USA) segítségével izoláltam DNS-t a gyártói instrukcióknak megfelelően. Egyes, gyenge minőségű, kis mennyiségű, illetve alacsony DNS-koncentrációjú minta esetében (n=87) *REPLI-g Mini Kit* (Qiagen, Valencia, CA, USA) felhasználásával, az előírásnak megfelelően teljesgenom-amplifikálást végeztem.

A *GRIA1* és *GALNT10* gének összesen 20 polimorfizmusát az előzetesen validált *KASPar-on-Demand* (LGC Genomics, Berlin, Németország) módszerrel, *7900HT Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) készülék segítségével határoztam meg.

A módszer leírása a következő. Az adott SNP-re (single nucleotide polymorphism; egy pontos nukleotid-polimorfizmus) specifikus reakcióelegy tartalmazza a két allél-specifikus forward primert és egy közös reverz primert (Assay mix). Mindkét forward primer az 5' végén tartalmaz egy további farki szekvenciát, amely komplementer a Mastermix-ben található kétféle univerzális ún. FRET (fluoreszcencia rezonancia

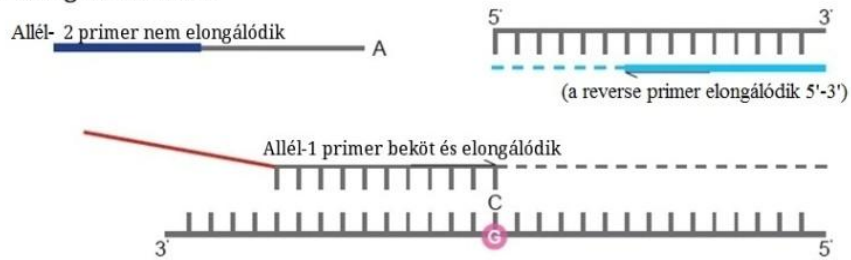
energia transzfer) kazetta (6-karboxi-fluoreszcein, FAM és hexakloro-6-karboxi-fluoreszcein, HEX jelöléssel) valamelyikével. Az univerzális elegy további komponensei a reakcióba nem lépő 5-karboxi-X-rodamin-N-szukcinimidil-észter (ROX) passzív referencia festék, a Taq-polimeráz, a szabad nukleotidok és $MgCl_2$ megfelelő pufferoldatban. Ehhez adjuk hozzá a genotipizálni kívánt DNS-mintát (<http://www.lgcgenomics.com/genotyping/kasp-genotyping-reagents/>; 3. ábra) [90].



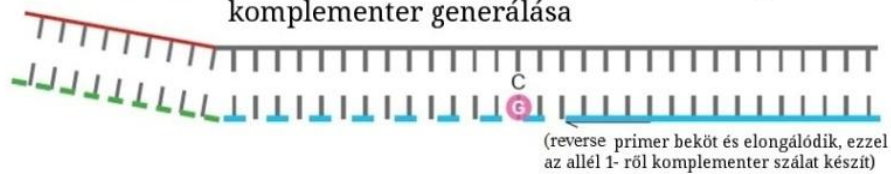
3. ábra. A KASPar mastermix összetétele. Az ábrát Csányiné dr. Sági Judit diplomamunkájából használtam fel a szerző engedélyével.

A forward primerek 3' végükön csak a vizsgált SNP-ben térnek el egymástól. A bekötődésért versengő két forward primer közül a templát DNS-szálhoz teljesen illeszkedő primer bekötődése esetében tud csak megindulni a Taq-polimeráz által végzett lánchosszabbítás. A forward és a reverz primerek bekötődését követően a bázis-extendíció végbemegy, és a PCR (polymerase chain reaction) ciklus végére létrejön(nek) az első 5' farki szekvenciát is tartalmazó PCR-termék(ek) (<http://www.lgcgenomics.com/genotyping/kasp-genotyping-reagents/>; 4. ábra) [90].

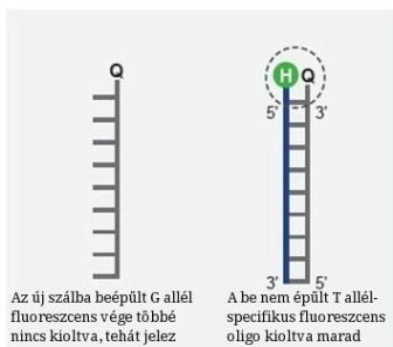
1)PCR 1. ciklus: A denaturált DNS és az új szálak szintéziséhez szükséges elemek:



2)PCR 2. ciklus: Allél- specifikus oligoszekvenciának megfelelő komplementer generálása



3) PCR 3. ciklus: - Jelgenerálás:



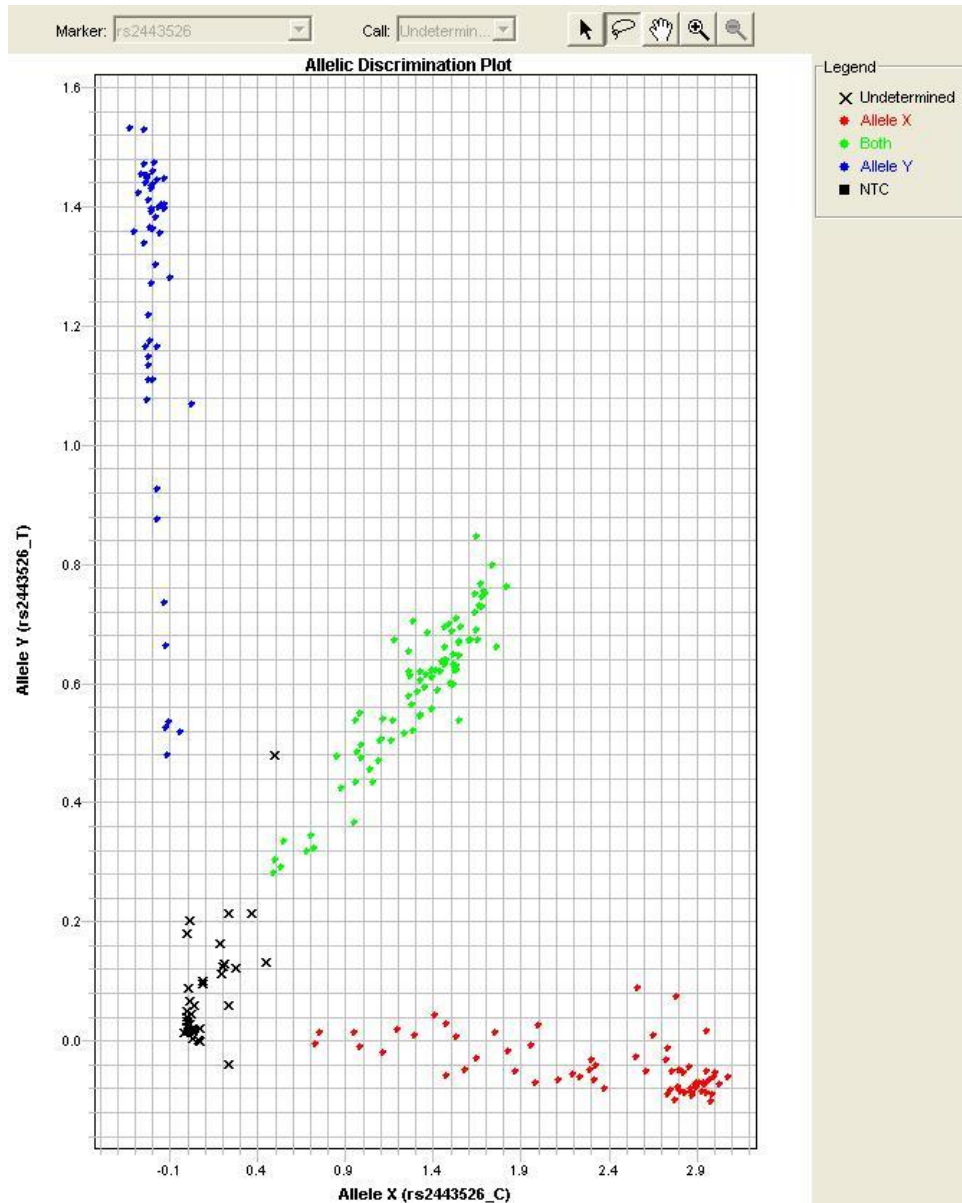
4. ábra. A KASPar-reakció lépései. Az ábrát Csányiné dr. Sági Judit diplomamunkájából használtam fel a szerző engedélyével.

A második PCR-ciklus során, a denaturációt és a primerek bekötődését követően, az 5' farki szekvenciával komplementer szekvencia is megszintetizálódik.

A harmadik PCR-ciklusban a FRET kazetta fluorofórral kapcsolt oligonukleotidja disszociációval felszabadul a kioltás alól, és bekötődik az egyes alléloknak megfelelő komplementer szekvenciához. A ciklus végére létrejön(nek) az első fluoreszcensen jelölt allél-specifikus PCR-termék(ek).

A további PCR-ciklusokban az allél-specifikus fluoreszcensen jelölt PCR-termékek száma exponenciálisan növekszik. A vizsgált minta genotípusától függően a végponton az alábbi termékeket tudjuk detektálni: csak FAM-mal (egyik allélra homozigóta), 50-50%-ban FAM-mal, illetve HEX-szel (heterozigóta), valamint csak HEX-szel (másik allélra homozigóta) jelölteket.

Az eredmények kiértékelését SDS v2.3 program segítségével végeztem el. A szoftver a párhuzamos mérésekből származó, kétféle fluoreszcens festékhez tartozó fluoreszcencia-intenzitás jeleket egymáshoz viszonyítva ábrázolja, az ún. genotipizálási klaszter plotot jeleníti meg. Az egyes minták genotípusait az ebben a koordináta-rendszerben elfoglalt helyük, illetve a pozitív és negatív kontrollok értékei alapján határoztam meg (5. ábra).



5. ábra. Az SDS v2.3 program segítségével készült reprezentatív genotipizálási klaszter plot

A vizsgált polimorfizmusok meghatározásához használt anyagokat és PCR körülményeket az 6-8. Táblázatok mutatják be:

6. Táblázat. A *GRIAI* és *GALNT10* gének vizsgált polimorfizmusai és a hozzájuk tartozó PCR körülmények

<i>GRIAI</i>	PCR körülmény	<i>GALNT10</i>	PCR körülmény
rs4958351	TD61-55C	rs888979	TD61-55C
rs11167640	TD61-55C	rs7710430	2Step57C
rs548294	TD61-55C	rs3172941	TD61-55C
rs2926833	TD61-55C	rs10796	TD61-55C
rs707176	TD68-62C	rs2277937	TD68-62C
rs1994862	TD61-55C	rs7244	2Step57C
rs1461224	TD61-55C	rs6580076	TD61-55C
rs2055083	TD61-55C	rs17552639	TD61-55C
rs970078	TD61-55C	rs11167667	TD61-55C
rs11749754	TD61-55C	rs2443526	TD61-55C

7. Táblázat. A gyártó által előírt PCR ciklusok jellemzői

TD61-55C		
hőmérséklet	idő	ciklusszám
94°C	15 min	1x
94°C	20 sec	10x
61°C (-0,6°C ciklusonként)	60 sec	
94°C	10 sec	26x
55°C	60 sec	
TD68-62C		
94°C	15 min	1x
94°C	20 sec	12x
68°C (-0,5 °C ciklusonként)	60 sec	
94°C	20 sec	26x
62 °C	60 sec	
2Step57C		
94°C	15 min	1x
94°C	20 sec	35x
57°C	60 sec	

8. Táblázat. A reakcióelegy összetétele 96-lyukú és 384-lyukú plate-ekhez

1 reakcióhoz, 384-lyukú plate-n:	Térfogat (ul)
KASPar 2x Mastermix	3
Assay mix	0,0825
DNS minta	2
	Σ: 5
1 reakcióhoz, 96-lyukú plate-n:	Térfogat (ul)
KASPar 2x Mastermix	4
Assay mix	0,11
Desztillált víz	2
DNS minta	2
	Σ: 8

Felhasznált reagensek:

KASP V4.0 2X Mastermix 96/384, High ROX (LGC Genomics)

KASP on Demand (KOD) Primer Mix (Assay mix, LGC Genomics)

UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water (Thermofisher)

DNS-minta vizes oldata

3.2.2 HLA-tipizálás új generációs szekvenálással

A szekvenáláshoz az ALL-es betegek perifériás véréből, illetve csontvelő aspirátumából származó DNS-mintákat használtuk fel. Az új generációs szekvenálási metodika minőségi kritériumainak eleget tevő DNS-minta 359 ALL-es betegből állt rendelkezésünkre. A *HLA-DRB1* és *HLA-DQB1* lokuszok nagyfelbontású (4 számjegyű) tipizálására a Pekingi Genomikai Intézet (Beijing Genomics Institute; BGI) hongkongi laboratóriumában került sor. A tipizálást a BGI által korábban közölt laboratóriumi és bioinformatikai folyamatnak megfelelően, Illumina MiSeq platformon végezték el [91]. Ennek során a *HLA-DRB1* gén 2-es exonját, a *HLA-DQB1* gén 2-es és 3-as exonját szekvenálták meg.

3.2.3 A CYP3A4 rs2246709 polimorfizmusának meghatározási módszerei

Az *CYP3A4* rs2246709 polimorfizmusra vonatkozó adatok kétféle genotipizálási módszer eredményéből álltak rendelkezésemre. A 494 megfelelő aszparagináz hiperszenzitivitásra vonatkozó klinikai adattal rendelkező beteg közül 431 betegnek a

mintáját korábban Sequenom iPLEX Gold MassARRAY technikával a kanadai McGill Egyetem és Génome Québec Innovációs Központban [84, 92], 430 betegét pedig TaqMan® OpenArray® technikával a Semmelweis Egyetem, Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Pathobiokémiai Intézetében genotipizálták. A betegminták jelentős részét (n=367) mindkét módszerrel meghatározták. Azokat a mintákat, amelyeknél eltérő eredmények születtek (n=18; 4.9%), kizártam a további elemzésekből.

3.3 Internetes adatbázisok és eszközök

A *HLA-DRB1–HLA-DQA1–HLA-DQB1* haplotípusok rekonstruálásához az Allele Frequency Net adatbázist, azon belül pedig a HLA Haplotype Frequency Search alkalmazást (<http://www.allelefrequencys.net/hla6003a.asp>) használtuk. Ehhez a *HLA-DRB1* és *HLA-DQB1* lókuszok genotípusadatai álltak rendelkezésünkre [93]. Az adatbázis kaukázusi etnikai eredetre vonatkozó adatait referencia panelként használva következtettünk a *HLA-DQA1* allélokra. Automatizált hozzáférést használva teszteltük a két lókusz genotípusainak lehetséges kombinációit. A keresést úgy állítottuk be, hogy *HLA-DQA1* allélokra vonatkozó adatokat is kapjunk. Csak abban az esetben fogadtuk el a haplotípus-becslést, ha a lehetséges négyféle kombinációból pontosan kettő, nem átfedő haplotípus-találatot kaptunk a keresés során. Például ha egy betegnek a következő genotípus adatai voltak: *HLA-DRB1*01:01/HLA-DRB1*07:01* és *HLA-DQB1*05:01/DQB1*02:02*, akkor az ő esetében ezek voltak a lehetséges kombinációk: *HLA-DRB1*01:01–HLA-DQA1*(xx:xx)–HLA-DQB1*05:01*, *HLA-DRB1*07:01–HLA-DQA1*(xx:xx)–HLA-DQB1*05:01*, *HLA-DRB1*01:01–HLA-DQA1*(xx:xx)–HLA-DQB1*02:02* és *HLA-DRB1*07:01–HLA-DQA1*(xx:xx)–HLA-DQB1*02:02*. Ezek közül a specifikált keresésünk során az adatbázisban csak a *HLA-DRB1*01:01–HLA-DQA1*01:01–HLA-DQB1*05:01* és a *HLA-DRB1*07:01–HLA-DQA1*02:01–HLA-DQB1*02:02* haplotípusokra kaptunk találatot; így ezeket elfogadtuk eredményként.

A *HLA-DRB1*, *HLA-DQA1* és *HLA-DQB1* gének 2-es exonja által kódolt aminosavak szerepét is vizsgáltuk az aszparagináz hiperszenzitivitás kialakulásában. A *HLA-DRB1* és *HLA-DQB1* allélok négy számjegyű felbontásban szekvencia alapú tipizálás eredményeként álltak rendelkezésünkre. A szintén négy számjegyű *HLA-DQA1* alléladatokra haplotípusadatok felhasználásával következtettünk. Ezek alapján a Database of Major Histocompatibility Complex (dbMHC) adatbázis Alignment Viewer alkalmazása segítségével határoztuk meg a polimorf aminosav pozíciókat, és vontuk be a vizsgált betegeinkben azonosított allélok által meghatározott aminosavakat az elemzéseinkbe

(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gv/mhc/align.fcgi?cmd=aligndisplay&user_id=0&probe_id=0&source_id=0&locus_id=0&locus_group=1&proto_id=0&kit_id=0&banner=1).

3.4 Statisztika

3.4.1 A *GRIA1* és *GALNT10* polimorfizmusok vizsgálata

Többváltozós logisztikus regresszióval vizsgáltam az *E.coli* aszparagináz hiperszenzitivitás lehetséges prediktorait IBM SPSS v20.0 statisztikai szoftver segítségével. A nem, a diagnóziskori életkor, az ALL immunfenotípusa, a rizikócsoporthoz, az indukciós fázis során kapott aszparagináz-dózis, a kezelési protokoll és a vizsgált SNP-k szerepeltek a modellben kategorikus változókként. A genotípusok csoportosítását additív (11/12/22), domináns (11/12+22) és recesszív (11+12/22) modell szerint is elvégeztem (ahol az 1-es a major, a 2-es a minor allélokot jelöli). A modell segítségével az aszparagináz hiperszenzitivitás kialakulásának kockázatát jellemző esélyhányadost (OR) és 95%-os konfidencia intervallumot számítottam ki.

Az elemzéseket a teljes betegpopuláción, valamint a nemek, az ALL immunfenotípus (T-sejtes/pre-B-sejtes), a diagnóziskori életkor (≥ 10 év/ < 10 év) és a rizikócsoporthoz (alacsony/közepes/magas) szerinti alcsoportokon is elvégeztem.

A többszörös tesztelés miatt az elsőfajú hiba elkövetésének a valószínűsége megnő, ezért a hamis felfedezési hibaarányt (false discovery rate, FDR) a Benjamini-Hochberg-féle eljárással kontrolláltam [94, 95]. A kapott p-értékeket növekvő sorba rendeztem, és egy folyamatosan növekvő küszöbértékhez viszonyítottam. A szignifikancia határt $\alpha \leq 0,05$ értéknél húztam meg, az így a még szignifikánsnak elfogadott legnagyobb p-érték $p = 6,76 \times 10^{-3}$ lett.

A statisztikai próbák erejét ($1 - \beta$) bootstrap replikátumok segítségével becsültük meg R program (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria; version 3.0.3) használatával az alábbi módon. A szimulációs eljárás során a valódi adathalmazunkból kiindulva 1000 adathalmaz másolatot hoztunk létre egyszerű, visszatevéses mintavételezéssel. Az ilyen módon generált adathalmazok mindegyikén elvégeztük a logisztikus regressziót, majd a statisztikai erőt azon esetek százalékos arányával becsültük, ahol a nullhipotézis elvetésre került.

Szintén R programban diszkrét idejű túlélés-analízissel vizsgáltuk az egyes genotípuscsoportokban a betegek kockázatának arányát az aszparagináz hiperszenzitivitás kialakulására a dózisszám függvényében. Logisztikus regresszióval modelleztük az i -edik beteg kockázatát (h_i) a túlérzékenységi reakció bekövetkezésére:

$$\text{logit } h_i = \alpha D_i + \beta X_i$$

ahol D jelöli a minimum dózisszámot, ahol az aszparagináz hiperszenzitivitás bekövetkezett (még formálisabban, az i -edik beteg esetében $D_{ij}=1$ értéket vesz fel, ha j jelöli a dózisszámot, amelynél a túlérzékenység jelentkezett, és $D_{ik}=0$ értéket vesz fel minden k dózisszám esetében, ahol $k \neq j$), X_i jelöli a kovariáns értékét (SNP), ami megjósolhatja a kockázatbeli különbségeket, valamint α és β jelölik a megfelelő regressziós koefficienseket. A magyarázó változók relatív kockázatát a hazard arány (hazard ratio, HR) és a 95%-os konfidencia intervallum megadásával jellemeztük.

A Hardy-Weinberg egyensúlytól való eltérést Pearson-féle χ^2 -tesztel vizsgáltuk egy online alkalmazás segítségével (<http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>).

3.4.2 A HLA allélok és haplotípusok vizsgálata

Többváltozós logisztikus regresszióval teszteltük a *HLA-DRB1*, *HLA-DQA1* és *HLA-DQB1* gének, a *HLA-DRB1*–*HLA-DQA1*–*HLA-DQB1* haplotípusok és ezek polimorf aminosav pozícióinak összefüggéseit az *E. coli* aszparagináz hiperszenzitivitással. A nemet, az ALL immunfenotípusát (pre-B-sejtes vagy T-sejtes), a diagnóziskori életkort (≤ 10 vagy > 10 életkor), a rizikócsoportot (alacsony, közepes vagy magas) és a kezelési protokollt vettük bele a modellbe kategorikus kofaktorokként. Additív genetikai modell használatával az esélyhányados (OR) és a hozzá tartozó 95%-os konfidencia intervallum-érték kiszámításával becsültük az aszparagináz hiperszenzitivitás kockázatát minden egyes változó esetében. A többszörös tesztelés miatt Bonferroni korrekciót használtunk (66 HLA II. osztályú alléllal, 38 haplotípussal és 84 polimorf aminosav pozícióval való összehasonlítást alapján $p \leq 2.66 \times 10^{-4}$ szignifikancia határt állapítottunk meg). A számításainkhoz R (3.1.2) és IBM SPSS Statistics (v20) statisztikai szoftvereket használtunk.

A genetikai asszociációs vizsgálataink kiterjesztéseként Bayes-háló alapú relevanciaelemzést is alkalmaztunk az erős relevancia *a posteriori* valószínűségének (P) becslésére [96-99]. E megközelítés részletes leírása dr. Gézsi András doktori értekezésében, valamint korábbi tanulmányainkban is megtalálható [87, 100-102]. Röviden a módszer változóhalmazok egy adott célváltozóval (pl.: egy dichotóm, igen/nem típusú változóval, amely az aszparagináz hiperszenzitivitás státuszát írja le a betegnek) való erős relevanciájának *a posteriori* valószínűségét számítja ki Bayes-háló

struktúramodellek segítségével. Az erősen releváns változóknak közvetlen hatásuk van a célváltozóra. Az *a posteriori* valószínűség értéke 0 és 1 közé eshet, ahol $P=1$ azt jelenti, hogy 100% a valószínűsége annak, hogy a célváltozó függ egy prediktortól (pl.: egy HLA alléltól), $P=0$ pedig azt jelenti, hogy ennek a valószínűsége 0%. Az erős relevanciának két fajtája van: a közvetlen relevancia (pl.: egy kóroki genetikai variáns) vagy tiszta interakció (p.: az episztázis jelensége). Az elemzéseknél prediktorként a *HLA-DRB1*, *HLA-DQB1* és *HLA-DQA1* allélokot, a *HLA-DRB1–HLA-DQA1–HLA-DQB1* haplotípusokat, a nemet, az ALL immunfenotípusát, a diagnóziskori életkort, a rizikócsoportot és a kezelési protokollt vettük bele a modellbe.

A *HLA-DRB1–HLA-DQB1* haplotípusok becslését az ALL-es betegek négy számjegyű *HLA-DRB1* és *HLA-DQB1* alléljai alapján végeztük el a PHASE szoftver (v2.1.1) használatával [103, 104].

3.4.3 Túléléselemzés

A betegek túlélésének és relapszusának aszparagináz hiperszenzitivitási reakciók kialakulásával való összefüggését az 505 fős betegpopuláción vizsgáltam. Ebből a populációból 476 főnek volt értékelhető *CYP3A4* rs2246709 polimorfizmusra vonatkozó genotípusadata, amelyet fel tudtam használni a túléléselemzéshez. A betegek eseménymentes és össztúlélési függvényét Kaplan-Meier eljárással becsültem. Az aszparagináz hiperszenzitivitás és *CYP3A4* rs2246709 genotípusok szerinti túlélési görbéket Mantel-Cox teszttel hasonlítottam össze. Cox-regressziós modellel az aszparagináz hiperszenzitivitás, a *CYP3A4* rs2246709 polimorfizmus, a nem, az immunfenotípus, az életkor és a rizikócsoport relatív kockázatát becsültem. Az elemzéseket az IBM SPSS Statistics v20 program segítségével végeztem el.

4 Eredmények

4.1 *GRIA1* és *GALNT10* génpolimorfizmusok szerepe az aszparagináz hiperszenzitivitásban

A *GRIA1* és a *GALNT10* génpolimorfizmusok az *E. coli* aszparagináz okozta hiperszenzitivitással való összefüggéseit vizsgáltuk gyermekkori ALL-es betegek körében.

A két gén összesen 20 kiválasztott SNP-je közül 18-cal végeztünk statisztikai elemzéseket. Két SNP-t kizártunk, mert a meghatározott genotípusok eloszlása szignifikáns eltérést mutatott a Hardy-Weinberg egyensúlytól (HWE) a kontrollként vizsgált ALL-esek körében (9. Táblázat).

9. Táblázat. A vizsgált gének és polimorfizmusaik

SNP ID	Allélok (1/2) ^a	Pozíció ^b	Funkció ^c	MAF ^d	Genotípus Frekvencia			HWE ^e (p érték)	Genotipizált minták aránya (%)
					1/1	1/2	2/2		
GRIA1 gén									
rs548294	C/T	chr5:153488877	5' génközeli régió	0,36	41,7	44,4	13,8	0,42	96
rs2055083	G/A	chr5:153577458	intron	0,10	80,2	19,0	0,8	0,54	98
rs1994862	C/G	chr5:153609350	intron	0,32	46,2	43,8	10,0	0,87	85
rs707176	T/C	chr5:153650400	szinoním	0,33	45,3	43,2	11,4	0,62	95
rs970078	G/T	chr5:153657654	intron	0,48	27,5	48,1	24,4	0,40	98
rs11167640	T/C	chr5:153752746	intron	0,21	64,1	30,6	5,2	0,17	98
rs11749754	G/A	chr5:153767331	intron	0,18	68,2	28,3	3,6	0,53	89
rs4958351	G/A	chr5:153790814	intron	0,34	42,1	47,2	10,7	0,31	92
rs1461224	T/G	chr5:153806677	intron	0,48	29,6	43,9	26,5	0,01	84
rs2926833	G/A	chr5:153814103	3' génközeli régió	0,17	69,5	27,6	2,8	0,95	92
GALNT10 gén									
rs17552639	A/G	chr5:154271899	intron	0,19	65,3	31,8	2,9	0,33	97
rs11167667	C/T	chr5:154274385	intron	0,42	34,9	47,1	18,0	0,52	97
rs2443526	T/C	chr5:154276970	intron	0,45	33,6	43,4	23,0	0,007	97
rs6580076	C/T	chr5:154404193	szinoním	0,16	70,5	27,9	1,7	0,20	95

SNP ID	Allélok (1/2) ^a	Pozíció ^b	Funkció ^c	MAF ^d	Genotípus Frekvencia			HWE ^e (p érték)	Genotipizált minták aránya (%)
					1/1	1/2	2/2		
rs888979	A/G	chr5:154417315	3'-UTR	0,31	48,5	40,4	11,0	0,19	95
rs7710430	C/T	chr5:154417717	3'-UTR	0,31	48,6	40,7	10,6	0,29	95
rs3172941	C/T	chr5:154418320	3'-UTR	0,30	50,2	39,2	10,6	0,15	84
rs10796	G/C	chr5:154418808	3'-UTR	0,20	64,9	30,1	5,0	0,17	95
rs2277937	T/C	chr5:154419605	3'-UTR	0,29	50,5	40,4	9,1	0,58	98
rs7244	G/A	chr5:154420953	3'-UTR	0,18	68,8	27,4	3,8	0,26	93

A félkövérrel jelzett p értékek az $\alpha=0,05$ statisztikai szignifikancia határon belül vannak

^aAllélok a forward szálon; 1: ritka allél, 2: gyakori allél.

^bPozíció a GRCh38 Annotation Release 106 szerint.

^cA dbSNP 142 szerinti becsült funkció.

^dMinor (ritka) allél frekvencia.

^eHardy-Weinberg egyensúly

Az aszparagináz hiperszenzitivitás vizsgálatára többváltozós logisztikus regressziót végeztünk a teljes populáción, illetve annak meghatározott alcsoportjain. A többszörös tesztelés miatt statisztikai korrekciót alkalmaztunk. Az 5%-ot nem meghaladó hamis felfedezési hibaarányt megengedve, $p=6,76 \times 10^{-3}$ értéknél húztuk meg a szignifikancia határt. Így a *GRIA1* gén 3 SNP-je mutatott szignifikáns összefüggést különböző alcsoportokban.

A teljes populáción végzett elemzéseink eredménye nem erősítette meg a korábbi összefüggést az rs4958351 polimorfizmus és az *E. coli* aszparagináz hiperszenzitivitás között. A hiperszenzitiv reakciót mutató (eset) és nem mutató betegek (kontroll) csoportjaiban kapott genotípus- és allélfrekvenciákat a 10. Táblázat mutatja be.

10. Táblázat. Allél- és genotípus-eloszlások az érintettek és a kontrollok esetében

SNP	Genotípus	N	Csoport	N	MAF ^a
rs548294	CC	124	kontroll	309	0,37
	CT	143			
	TT	42			
	CC	78	eset	175	0,35
	CT	72			
	TT	25			
rs2055083	GG	245	kontroll	313	0,11
	AG	65			
	AA	3			
	GG	151	eset	181	0,09
	AG	29			
	AA	1			
rs1994862	CC	127	kontroll	280	0,32
	CG	126			
	GG	27			
	CC	71	eset	149	0,32
	CG	62			
	GG	16			
rs707176	TT	141	kontroll	304	0,32
	CT	134			
	CC	29			
	TT	77	eset	177	0,36
	CT	74			
	CC	26			

SNP	Genotípus	N	Csoport	N	MAF ^a
rs970078	GG	85	kontroll	312	0,48
	GT	152			
	TT	75			
	GG	51	eset	183	0,49
	GT	86			
	TT	46			
rs11167640	TT	208	kontroll	315	0,20
	CT	89			
	CC	18			
	TT	110	eset	181	0,22
	CT	63			
	CC	8			
rs11749754	GG	197	kontroll	291	0,18
	AG	86			
	AA	8			
	GG	109	eset	158	0,18
	AG	41			
	AA	8			
rs4958351	GG	124	kontroll	300	0,35
	AG	144			
	AA	32			
	GG	72	eset	166	0,34
	AG	76			
	AA	18			
rs1461224	TT	84	kontroll	276	0,49
	GT	115			
	GG	77			
	TT	42	eset	150	0,48
	GT	72			
	GG	36			
rs2926833	GG	211	kontroll	298	0,16
	AG	77			
	AA	10			
	GG	111	eset	165	0,17
	AG	51			
	AA	3			
rs17552639	AA	201	kontroll	310	0,19
	AG	100			
	GG	9			
	AA	119	eset	180	0,18
	AG	56			
	GG	5			

SNP	Genotípus	N	Csoport	N	MAF ^a
rs11167667	CC	115	kontroll	309	0,40
	CT	141			
	TT	53			
	CC	56	eset	181	0,44
	CT	90			
	TT	35			
rs2443526	TT	110	kontroll	310	0,44
	CT	130			
	CC	70			
	TT	54	eset	178	0,47
	CT	82			
	CC	42			
rs6580076	CC	215	kontroll	304	0,16
	CT	83			
	TT	6			
	CC	124	eset	177	0,16
	CT	51			
	TT	2			
rs888979	AA	146	kontroll	306	0,32
	AG	125			
	GG	35			
	AA	87	eset	174	0,30
	AG	69			
	GG	18			
rs7710430	CC	146	kontroll	307	0,32
	CT	125			
	TT	36			
	CC	87	eset	172	0,29
	CT	70			
	TT	15			
rs3172941	CC	139	kontroll	277	0,30
	CT	108			
	TT	30			
	CC	75	eset	149	0,30
	CT	59			
	TT	15			
rs10796	GG	202	kontroll	309	0,19
	CG	94			
	CC	13			
	GG	109	eset	170	0,21
	CG	50			
	CC	11			

SNP	Genotípus	N	Csoport	N	MAF ^a
rs2277937	TT	161	kontroll	314	0,29
	CT	125			
	CC	28			
	TT	89	eset	181	0,30
	CT	75			
	CC	17			
rs7244	GG	207	kontroll	298	0,17
	AG	80			
	AA	11			
	GG	117	eset	173	0,18
	AG	49			
	AA	7			

^aMinor (ritka) allél frekvenciája

Azonban amikor a pre-B-, illetve a T-sejtes csoportokon belül is elvégeztük az analízist, jelentős különbségeket találtunk. Domináns modellel vizsgálva az A allélt hordozó T-ALL-es betegeknek szignifikánsan alacsonyabb volt a kockázatuk az aszparagináz túlérzékenység kialakulására a GG genotípusú betegekkel összevetve (OR=0,05 (0,01–0,26); $p=4,7 \times 10^{-4}$; $1-\beta=0,78$; 11. Táblázat). A T-ALL-es alcsoport többségét jelentő, IR ágon kezelt alcsoportjában szintén megtalálható volt ez az összefüggés (N = 50; OR = 0,05 (0,01–0,29); $p=8,43 \times 10^{-4}$).

11. Táblázat. Az rs4958351 polimorfizmus asszociációja az aszparagináz hiperszenzitivitással a teljes populáción és a T-ALL-es betegalcsoportban

Alcsoport		rs4958351		
		GG vs. AG/AA		
		N	p-érték	OR (95% CI)
Teljes populáció		464	0,500	0,87 (0,58-1,31)
Immunfenotípus	pre-B-ALL	364	0,522	1,16 (0,73-1,85)
	T-ALL	66	$4,7 \times 10^{-4}$	0,05 (0,01-0,26)

A korrigált szignifikancia határon belüli p-értékek ($FDR(\alpha)=5\%$; $p \leq 6,76 \times 10^{-3}$) félkövérrel jelöltek.

Az *E. coli* aszparagináz hiperszenzitivitás összaránya 37% volt (37%, 30% és 77% az SR, IR és HR rizikócsoportokban). Két polimorfizmus (rs2055083 és rs707176) mutatott összefüggést az aszparagináz hiperszenzitivitással a közepes rizikójú betegek

alcsoportjában. Domináns modell szerint vizsgálva az rs2055083 AA/AG genotípusú betegeknek szignifikánsan alacsonyabb volt a rizikójuk az aszparagináz hiperszenzitivitásra összehasonlítva a GG genotípusú betegekkel (OR = 0,21 (0,09–0,53); $p = 8,48 \times 10^{-4}$; $1-\beta=0,97$; 12. Táblázat).

12. Táblázat. Az rs2055083 polimorfizmus asszociációja az aszparagináz hiperszenzitivitással a teljes populáción és a rizikócsoport szerinti betegalcsoportokban

Alcsoport		rs2055083		
		GG vs. AG/AA		
		N	p-érték	OR (95% CI)
Teljes populáció		490	0,104	0,66 (0,39-1,09)
Rizikócsoport	SR	141	0,090	2,08 (0,89-4,84)
	MR	298	$8,48 \times 10^{-4}$	0,21 (0,09-0,53)
	HR	51	0,245	4,73 (0,34-64,90)

A korrigált szignifikancia határon belüli p-értékek ($FDR(\alpha)=5\%$; $p \leq 6,76 \times 10^{-3}$) félkövérrel jelöltek.

Az rs707176 CC genotípusú betegek esetében recesszív modellel számolva háromszoros volt annak az esélye, hogy a reindukciós kezelés végéig hiperszenzitiv reakció alakuljon ki az aszparaginázra a T allélt hordozó betegekkel összehasonlítva (OR=3,02 (1,36–6,73); $p=6,76 \times 10^{-3}$; $1-\beta=0,73$; 13. Táblázat). Ez az összefüggés a CC genotípusú lányok esetében volt megfigyelhető (OR=4,03 (1,48–10,94), $p=6,28 \times 10^{-3}$; $1-\beta=0,78$), és a közepes rizikójú ágon kezelt lányok körében volt a legkifejezettebb (OR=11,56 (2,56–52,27); $p=1,48 \times 10^{-3}$); a fiúkat külön elemezve nem találtunk ilyen összefüggést.

13. Táblázat. Az rs707176 polimorfizmus asszociációja az aszparagináz hiperszenzitivitással a teljes populáción, a nemek szerinti és a rizikócsoport szerinti betegalcsoportokban

Alcsoport		rs707176 ^a		
		CT/TT vs. CC		
		N	p-érték	OR (95% CI)
Teljes populáció		477	0,041	1,90 (1,02-3,48)
Nem	Fiú	263	0,770	1,14 (0,48-2,66)
	Lány	214	6,28×10⁻³	4,03 (1,48-10,94)
Rizikócsoport	SR	136	0,689	1,25 (0,42-3,68)
	MR	292	6,76×10⁻³	3,02 (1,36-6,73)
	HR	49	0,385	0,36 (0,03-3,66)

A korrigált szignifikancia határon belüli p-értékek (FDR(α)=5%; $p \leq 6,76 \times 10^{-3}$) félkövérrel jelöltek.

^aAz indukció alatti aszparagináz-dózist nem vettük bele az elemzésbe kofaktorként.

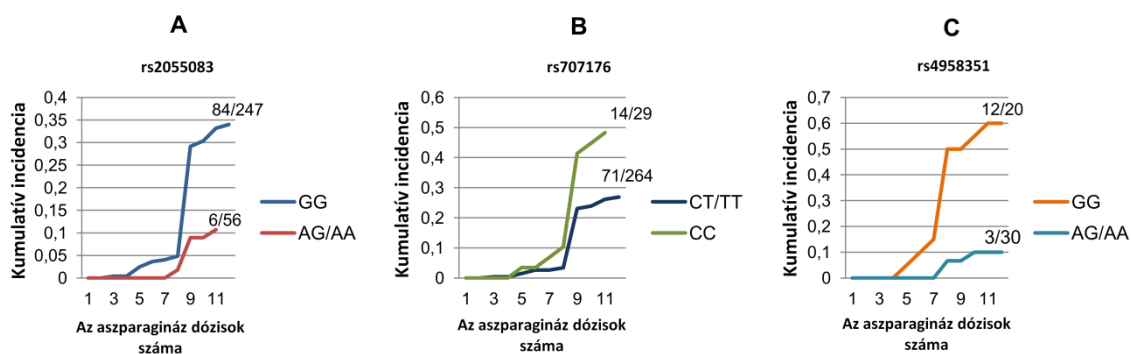
A IR betegek aszparagináz hiperszenzitivitás incidenciája a reindukció első dózisének (9. dózis) volt a legmagasabb (az esetek megközelítőleg 70% ekkor alakult ki). A betegek a kezelési protokollnak megfelelően ekkor 3 hónapos szünet után kaptak újra aszparagináz készítményt.

A teljes aszparagináz kezelés végére a rs2055083 GG genotípusú betegek 34%-a (244 betegből 84) vált túlérzékennyé, ezzel szemben az A allélt hordozó betegek esetében 11%-os volt a hiperszenzitivitás kumulatív incidenciája ($p=1,3 \times 10^{-3}$; 6. ábra).

Az rs707176 polimorfizmus esetében ugyanez az érték 48% (29 betegből 14) volt a CC genotípusú és 27% (264 betegből 71) volt a CT/TT genotípusú betegek körében ($p=3,1 \times 10^{-2}$; 6. ábra)

A T-ALL-es IR ágon kezelt betegeket a rs4958351 polimorfizmusra vizsgálva azt találtuk, hogy a GG genotípusú betegek kumulatív aszparagináz hiperszenzitivitás incidenciája 60% (20 betegből 12) volt, míg ugyanez az érték az AA/AG genotípusúak körében csak 10% (30 betegből 3) volt ($p=5,0 \times 10^{-4}$, 6. ábra).

Az IR ágon a reindukciós kezelés befejezéséig a betegek összesen 12-szer kaptak aszparaginázt. Azoknál a betegeknél, akik túlérzékenységi reakció kialakulása nélkül teljesítették eddig a pontig a kezelésüket, az esetleges későbbi aszparagináz dózisok egy esetben sem váltottak ki hiperszenzitivitást.



6. ábra. Az *E. coli* aszparagináz hiperszenzitivitás kumulatív incidenciája az aszparagináz dózisok függvényében az A) rs2055083, B) rs707176 és C) rs4958351 polimorfizmusok esetében.

Az IR betegeken további elemzéseket is végeztünk. Diszkrét-idő túlélés-elemzéssel vizsgáltuk a génpolimorfizmusok hatását a minimum dózisszámra, amelynél az aszparagináz hiperszenzitivitás kialakult. Erős hatást találtunk az rs2055083, az rs707176 és az rs4958351 polimorfizmus esetében. Az rs2055083 ritka A allélját hordozó betegeknél az aszparagináz hiperszenzitivitás bekövetkezésének 75%-kal kisebb volt a kockázata összehasonlítva a GG genotípusú betegekével (HR=0,25 (0,11–0,60); N = 299; $p=1,8 \times 10^{-3}$). Ezzel szemben az rs707176 ritka C allélja erős rizikófaktornak bizonyult (HR=2,38 (1,23–4,62); N=293; $p=0,011$). Az rs4958351 polimorfizmus ritka alléljának hordozása erős védő hatásúnak mutatkozott az IR ágon kezelt T-ALL-esek körében. Az aszparagináz túlérzékenység kialakulásának kockázata 91%-kal alacsonyabb volt az A allélt hordozóknál, mint a GG genotípusú betegeknél (HR=0,09 (0,02–0,36); N=50; $p=6,1 \times 10^{-4}$).

Egyváltozós és többváltozós logisztikus regresszióval vizsgáltuk az aszparagináz hiperszenzitivitás előfordulásának különbségét a rizikófaktorok szerinti alcsoportokban. A HR kezelési ágon lévő betegeknél jelentősen nagyobb volt az esélyük az aszparagináz túlérzékenységi reakciókra az SR, illetve IR ágakon kezeltékhez képest (OR=5,88 (2,85–12,15); $p=2,00 \times 10^{-6}$, illetve OR=10,50 (2,82–39,02); $p=4,49 \times 10^{-4}$). Más alcsoportokat vizsgálva nem találtunk szignifikáns eltérést az aszparagináz hiperszenzitivitás kialakulásának kockázatában (14. Táblázat).

14. Táblázat. Az aszparagináz hiperszenzitivitás kockázata az egyes alcsoportok szerint (n=505)

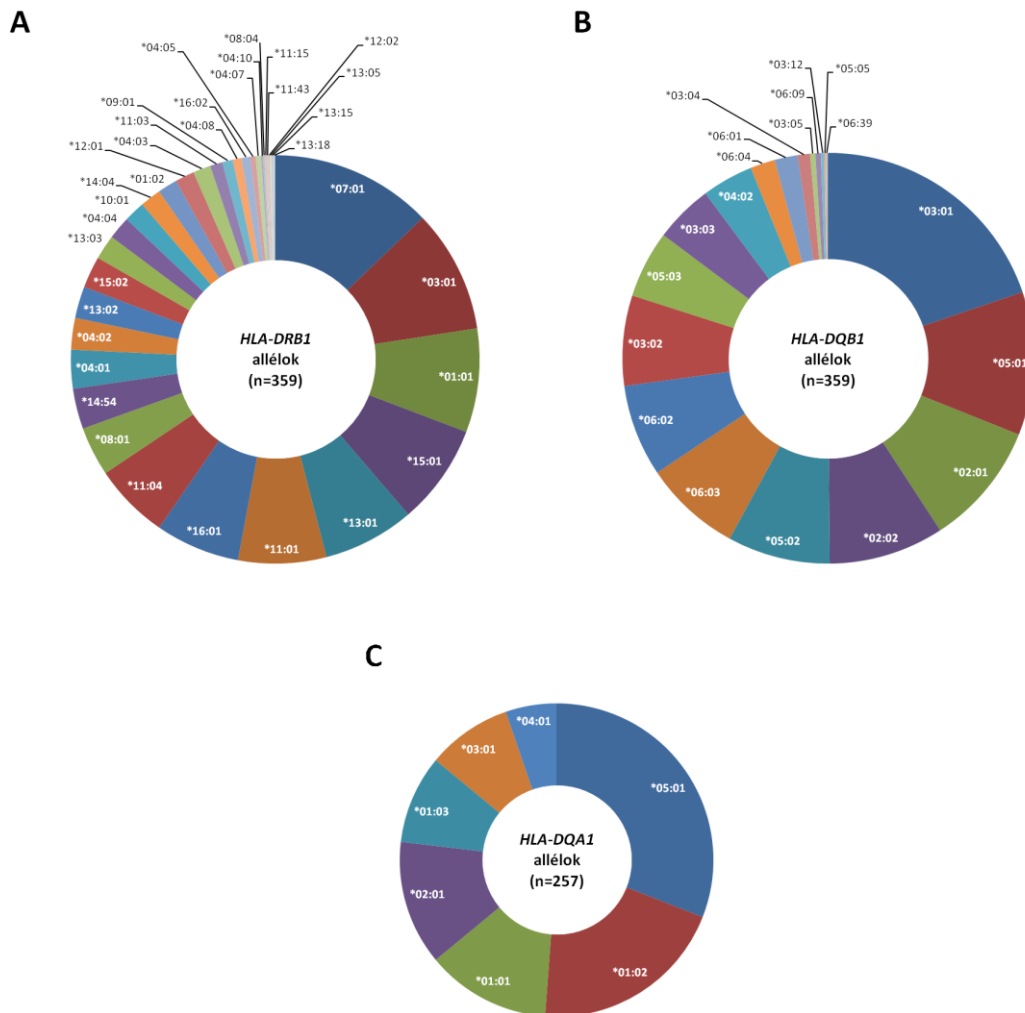
Alcsoport		N eset/N teljes (%)	Egyváltozós p-érték	OR (95% CI)	Többváltozós p-érték	OR (95% CI)
Nem	Fiú	99/280 (35,4)	0,444	1,15 (0,80-1,66)	0,225	1,27 (0,86-1,87)
	Leány	87/225 (38,7)				
Immunfenotípus	pre-B-ALL	152/402 (37,8)	0,984	0,99 (0,59-1,68)	0,854	0,99 (0,47-1,56)
	T-ALL	26/69 (37,7)				
Diagnóziskori életkor	<10 év	151/413 (36,6)	0,790	1,07 (0,67-1,70)	0,921	1,03 (0,60-1,75)
	≥10 év	35/92 (38,0)				
Rizikócsoport	Alacsony	54/147 (36,7)	0,142	0,73 (0,48-1,11)	0,512	0,86 (0,54-1,37)
	Közepes	91/305 (29,8)				
	Magas	41/53 (77,4)	2,00×10⁻⁶	5,88 (2,85-12,15)	4,49×10⁻⁴	10,50 (2,82-39,02)
Indukcióban kapott aszparagináz dózis*	5000 E/m ² /d	53/138 (38,4)	0,059	0,67 (0,44-1,02)	0,398	1,93 (0,42-8,78)
	10000 E/m ² /d	91/310 (29,4)				

*csak az alacsony és közepes kockázatú betegek esetében

4.2 HLA allélok és haplotípusok szerepe az aszparagináz hiperszenzitivitásban

4.2.1 *HLA-DRB1* és *HLA-DQB1* allélok asszociációja az aszparagináz hiperszenzitivitással

A *HLA-DRB1* és *HLA-DQB1* allélok és haplotípusok összefüggését vizsgáltuk *E. coli* aszparagináz hiperszenzitivitással gyermekkori ALL-es gyermekek körében. A 359 fős betegpopuláció nagyfelbontású szekvencia-alapú tipizálása 35 különböző *HLA-DRB1* és 19 különböző *HLA-DQB1* allélt azonosított eredményezte (7. ábra).



7. ábra. A *HLA-DRB1*, *HLA-DQB1* és *HLA-DQA1* allélok gyakorisága gyermekkori ALL-es betegekben. A nagyfelbontású szekvencia-alapú HLA-tipizálás A) 35-féle *HLA-DRB1* allélt, B) 19-féle *HLA-DQB1* allélt és C) 7-féle *HLA-DQA1* allélt eredményezett.

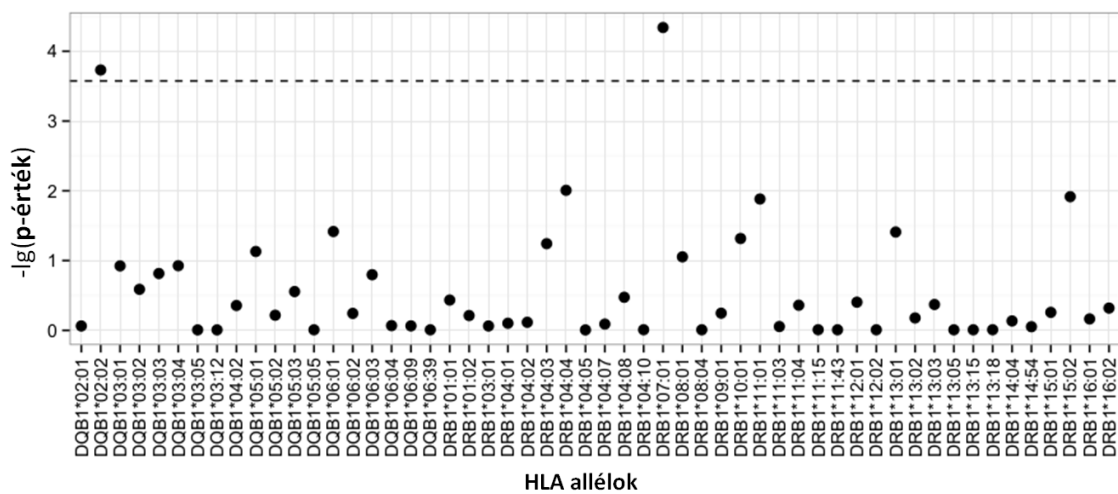
Egyváltozós és többváltozós logisztikus regresszióval teszteltük az aszparagináz hiperszenzitivitás potenciális rizikófaktorait (15. Táblázat). A túlérzékenységi reakció előfordulása szignifikánsan különbözött az egyes rizikócsoportok és kezelési protokollok betegek körében ($p=5,7 \times 10^{-5}$ és $p=3,36 \times 10^{-3}$). Míg az IR betegeknél 31%-os, a HR betegeknél 77%-os volt a megjelenési arány. A kezelési protokoll esetében ugyanez az érték 26% volt az ALL-BFM 90 és 60% az ALL IC-BFM 2002 experimentális ága szerint kezelték körében (15. Táblázat). A rizikócsoport és a kezelési protokoll a többváltozós elemzésnél is szignifikáns asszociációt mutatott az aszparagináz hiperszenzitivitással. A genetikai adatokkal történő elemzésnél kategorikus kovariánsként minden rizikófaktort belevettünk a modellbe.

15. Táblázat. Az aszparagináz hiperszenzitivitás és a vizsgált kovariánsok összefüggései (n=359)

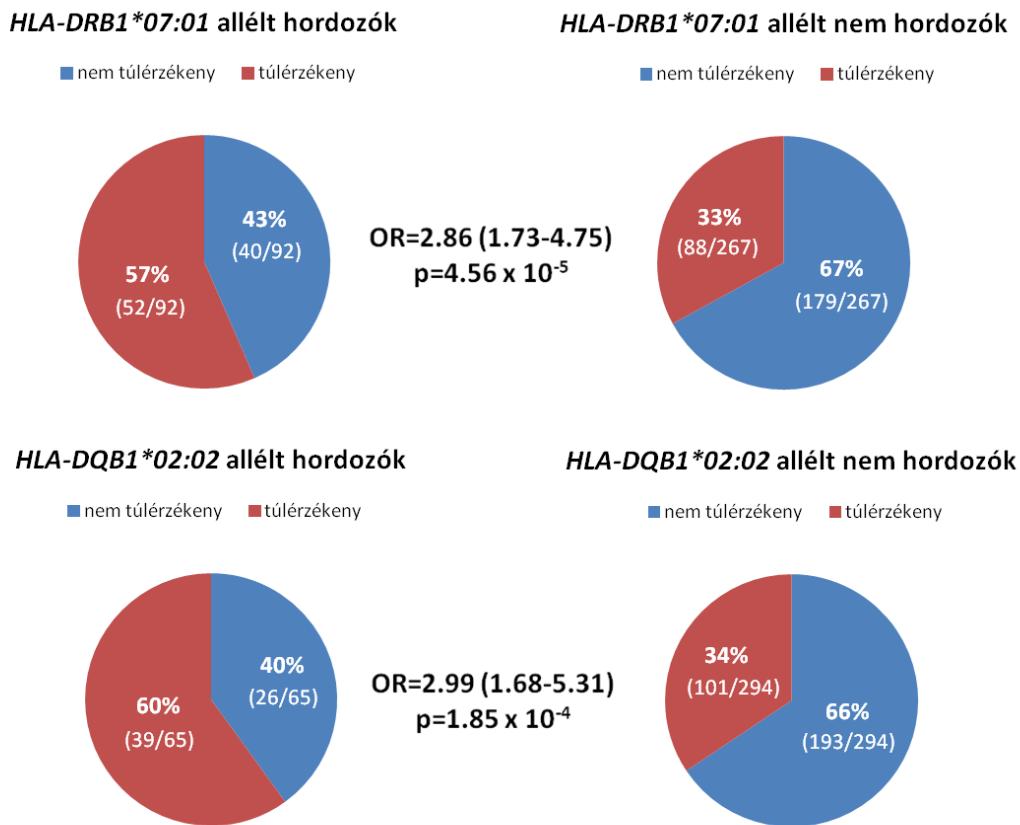
Kovariáns	Csoport	Aszparagináz hiperszenzitivitás	Egyváltozós p-érték	OR (95% CI)	Többváltozós p-érték	OR (95% CI)
Nem	Fiú	38%	0,514	1,15 (0,75-1,76)	0,219	1,34 (0,84-2,14)
	Lány	41%				
Immunfenotípus	pre-B-ALL	40%	0,874	1,05 (0,56-1,98)	0,823	0,92 (0,45-1,90)
	T-ALL	41%				
Diagnóziskori életkor	<10 év	37%	0,136	1,46 (0,86-2,48)	0,277	1,41 (0,76-2,60)
	≥10 év	46%				
Rizikócsoport	Alacsony	39%	5,7x10⁻⁵	5,88 (2,85-12,15)	1,15x10⁻⁴	5,37 (2,29-12,63)
	Közepes	31%				
	Magas	77%				
Kezelési protokoll	ALL-BFM 90	26%	3,36x10⁻³	4,18 (1,61-10,89)	0,032	3,14 (1,10-8,97)
	ALL-BFM 95	39%				
	ALL IC-BFM 2002 standard	44%				
	ALL IC-BFM 2002 experimental	60%				
	ALL IC-BFM 2009	40%				

A félkövérrel jelzett p értékek az $\alpha=0,05$ statisztikai szignifikancia határon belül vannak.

Bonferroni korrekciót követően ($p \leq 2,66 \times 10^{-4}$) a *HLA-DRB1*07:01* és *HLA-DQB1*02:02* allél mutatott szignifikáns összefüggést az aszparagináz hiperszenzitivitással (8. ábra). Egy beteg sem volt homozigóta egyetlen allélra nézve sem. A *HLA-DRB1*07:01* allélt hordozó betegek kockázata szignifikánsan nagyobb volt az aszparagináz túlérzékenység kialakulására, mint a nem hordozóknak ($p=4,56 \times 10^{-5}$; OR=2,86 (1,73-4,75); 9. ábra). Hasonlóképpen a *HLA-DQB1*02:02* allélt hordozók nagyobb eséllyel lettek túlérzékenyek, mint a nem hordozók ($p=1,85 \times 10^{-4}$; OR=2,99 (1,68-5,31); 9. ábra).



8. ábra. A vizsgált HLA allélok összefüggései az aszparagináz hiperszenzitivitással. Többváltozós logisztikus regressziót használtunk az *E. coli* aszparagináz hiperszenzitivitás a HLA II allélok közötti asszociáció vizsgálatára. A nemet, a kort, a kezelési protokollt, a rizikócsoportot és az ALL immunfenotípust kategorikus kovariánsként vettük bele a modellbe. A szaggatott vonal a Bonferroni-korrekcióval kapott statisztikai szignifikancia határt ábrázolja. A *HLA-DRB1*07:01* és a *HLA-DQB1*02:02* allélok mutattak szignifikáns összefüggést az aszparagináz hiperszenzitivitással.



9. ábra. A *HLA-DRB1*07:01* és *HLA-DQB1*02:02* allélt hordozó betegek szignifikáns asszociációt mutattak az aszparagináz hiperszenzitivitással. A túlérzékenységi reakciók előfordulási aránya 57%-os volt a *HLA-DRB1*07:01* allélt hordozó betegek körében (92 betegből 52 betegnél), míg 33%-os volt azoknál a betegeknél, akik nem hordozták az allélt (267 betegből 179 betegnél volt megfigyelhető). A *HLA-DQB1*02:02* allélt hordozó beteg 60%-ánál (65 betegből 39-nél), míg az allélt nem hordozó beteg esetében 34%-nál (294 betegből 101-nél) alakult ki aszparagináz hiperszenzitivitás.

A többváltozós logisztikus regressziós elemzések eredményét és az aszparagináz hiperszenzitivitás allélhordozástól függő előfordulási arányát mutatja be a 16. Táblázat. Szignifikáns különbség volt a *HLA-DQB1*02:02* allélt hordozók arányában a pre-B-sejtes és T-sejtes betegcsoportok között (19,2% és 6,5%; p=0,047). Hasonló különbség nem volt megfigyelhető a *HLA-DRB1*07:01* allélt hordozók megoszlásában.

16. Táblázat. Az aszparagináz hiperszenzitivitás összefüggései a HLA II allélokkal (n=359).

Gén	Allél	Allél-frekvencia	Hiperszenzitivitás (%) hordozók ¹	Hiperszenzitivitás (%) nem hordozók ²	OR ³	95% CI ⁴	p-érték ³
<i>HLA-DRB1</i>	*01:01	0,082	35,6	39,7	0,76	0,41-1,39	0,368
	*01:02	0,015	45,5	38,8	1,39	0,39-4,94	0,613
	*03:01	0,097	40,0	38,8	1,05	0,60-1,82	0,865
	*04:01	0,031	36,4	39,2	0,88	0,35-2,21	0,791
	*04:02	0,025	38,9	39,0	0,86	0,31-2,35	0,766
	*04:03	0,014	80,0	37,8	4,79	0,95-24,10	0,057
	*04:04	0,018	69,2	37,9	5,08	1,48-17,44	0,01
	*04:05	0,004	0,0	39,3	NA ⁵	NA ⁵	0,985
	*04:07	0,004	33,3	39,0	1,35	0,12-15,78	0,812
	*04:08	0,007	60,0	38,7	2,47	0,39-15,55	0,336
	*04:10	0,001	100,0	38,8	NA ⁵	NA ⁵	0,979
	*07:01	0,128	56,5	33,0	2,86	1,73-4,75	4,56x10⁻⁵
	*08:01	0,039	21,4	40,5	0,44	0,17-1,13	0,088
	*08:04	0,001	100,0	38,8	NA ⁵	NA ⁵	0,98
	*09:01	0,008	50,0	38,8	1,63	0,31-8,64	0,567
	*10:01	0,017	8,3	40,1	0,12	0,02-0,98	0,048
	*11:01	0,07	22,0	41,7	0,4	0,19-0,82	0,013
	*11:03	0,01	42,9	38,9	1,13	0,24-5,32	0,881
	*11:04	0,06	44,2	38,3	1,3	0,67-2,54	0,436
	*11:15	0,001	100,0	38,8	NA ⁵	NA ⁵	0,979
*11:43	0,001	0,0	39,1	NA ⁵	NA ⁵	0,981	
*12:01	0,015	45,5	38,8	1,71	0,50-5,93	0,394	

Gén	Allél	Allél-frekvencia	Hiperszenzitivitás (%) hordozók ¹	Hiperszenzitivitás (%) nem hordozók ¹	OR ³	95% CI ⁴	p-érték ³
<i>HLA-DRB1</i>	*12:02	0,001	0,0	39,1	NA ⁵	NA ⁵	0,981
	*13:01	0,072	26,9	41,0	0,49	0,25-0,96	0,039
	*13:02	0,025	33,3	39,3	0,79	0,28-2,26	0,664
	*13:03	0,019	28,6	39,4	0,61	0,18-2,06	0,426
	*13:05	0,001	0,0	39,1	NA ⁵	NA ⁵	0,981
	*13:15	0,001	100,0	38,8	NA ⁵	NA ⁵	0,98
	*13:18	0,001	100,0	38,8	NA ⁵	NA ⁵	0,979
	*14:04	0,017	41,7	38,9	1,23	0,38-4,01	0,733
	*14:54	0,032	34,8	39,3	0,94	0,38-2,32	0,887
	*15:01	0,079	43,9	38,1	1,2	0,66-2,17	0,552
	*15:02	0,025	11,1	40,5	0,14	0,03-0,65	0,012
	*16:01	0,067	41,7	38,6	1,14	0,60-2,15	0,686
*16:02	0,007	20,0	39,3	0,45	0,05-4,10	0,479	
<i>HLA-DQB1</i>	*02:01	0,097	40,0	38,8	1,05	0,60-1,82	0,865
	*02:02	0,091	60,0	34,4	2,99	1,68-5,31	1,85x10⁻⁴
	*03:01	0,198	33,1	42,9	0,7	0,44-1,10	0,119
	*03:02	0,071	47,1	37,7	1,43	0,77-2,65	0,258
	*03:03	0,046	48,5	38,0	1,72	0,82-3,61	0,153
	*03:04	0,01	71,4	38,4	3,85	0,71-20,89	0,118
	*03:05	0,004	100,0	38,5	NA ⁵	NA ⁵	0,984
	*03:12	0,003	0,0	39,2	NA ⁵	NA ⁵	0,983
	*04:02	0,04	31,0	39,7	0,72	0,31-1,67	0,44
	*05:01	0,113	32,1	41,0	0,6	0,35-1,05	0,074

Gén	Allél	Allél-frekvencia	Hiperszenzitivitás (%) hordozók ¹	Hiperszenzitivitás (%) nem hordozók ¹	OR ³	95% CI ⁴	p-érték ³
<i>HLA-DQB1</i>	*05:02	0,081	41,1	38,5	1,17	0,65-2,10	0,607
	*05:03	0,053	28,9	40,2	0,66	0,31-1,40	0,278
	*05:05	0,001	0,0	39,1	NA ⁵	NA ⁵	0,981
	*06:01	0,018	15,4	39,9	0,19	0,04-0,91	0,038
	*06:02	0,072	44,2	38,1	1,2	0,64-2,22	0,571
	*06:03	0,077	30,9	40,5	0,63	0,34-1,20	0,159
	*06:04	0,019	35,7	39,1	0,9	0,28-2,90	0,855
	*06:09	0,004	33,3	39,0	0,81	0,07-9,13	0,862
	*06:39	0,001	0,0	39,1	NA ⁵	NA ⁵	0,981

A korrigált szignifikancia határon belüli p-értékek (Bonferroni; $p \leq 2,66 \times 10^{-4}$) félkövérrel jelöltek.

¹Az aszparagináz hiperszenzitivitás aránya az 1. és 2. oszlopban definiált allélt hordozó betegek körében.

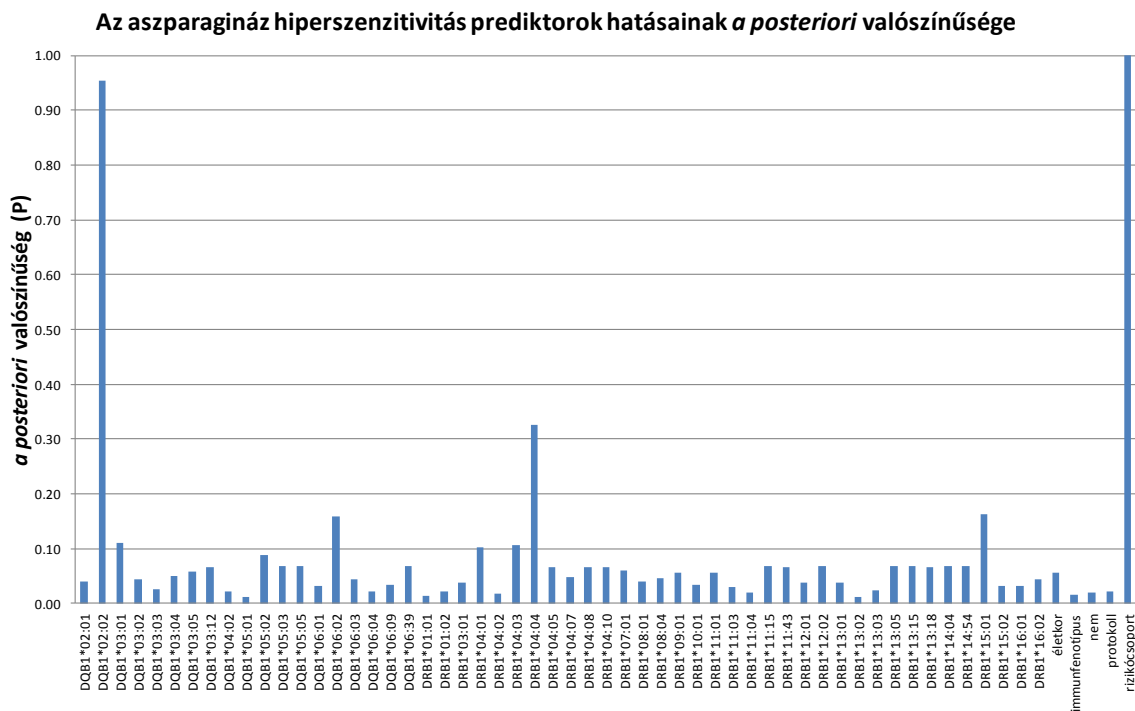
²Az aszparagináz hiperszenzitivitás aránya az 1. és 2. oszlopban definiált allélt nem hordozók körében.

³A többváltozós logisztikus regresszióval tesztelt összefüggés az aszparagináz hiperszenzitivitással.

⁴95%-os konfidencia-intervallum.

⁵Nincs adat; alacsony elemszám miatt az esélyhányados és a konfidencia-intervallum becslését nem végeztük el.

Bayesi statisztikai megközelítést használtunk a feltételezett rizikófaktork és az aszparagináz hiperszenzitivitás között fennálló kapcsolati struktúra vizsgálatára. Ha a modellbe mindkét lókuszt alléladatait belevettük, akkor a genetikai prediktorok közül csak a *HLA-DQB1*02:02* allél mutatott közvetlen relevanciát az aszparagináz hiperszenzitivitásra ($P=0,95$) a rizikócsoporthoz direkt hatása mellett ($P=1,00$; 10. ábra). Interakciót, illetve redundanciát nem találtunk a prediktorok között.



10. ábra. Az aszparagináz hiperszenzitivitással összefüggésben vizsgált prediktorok hatásainak *a posteriori* valószínűsége. Bayes-háló alapú relevanciaanalízist használtunk a HLA allélok, a diagnóziskori életkor, az immunfenotípus, a nem, a protokoll, a rizikócsoporthoz és az aszparagináz hiperszenzitivitás között fennálló kapcsolati struktúra vizsgálatára. A *HLA-DQB1*02:02* allél és a rizikócsoporthoz esetében valószínűsíthető, hogy közvetlen hatásuk van az aszparagináz hiperszenzitivitás kialakulására.

4.2.2 Haplotípus-rekonstrukció és következtetés a *HLA-DQA1* allélokra

Ahhoz, hogy továbbvizsgáljuk az aszparagináz hiperszenzitivitással asszociáló *HLA-DRB1*07:01* és *HLA-DQB1*02:02* allélok közötti kapcsolatot, haplotípus-becslést végeztünk a PHASE szoftver (v2.1.1) segítségével. Ezzel a módszerrel 56 különböző haplotípust rekonstruáltunk (17. Táblázat).

Az általunk vizsgált betegekben a *HLA-DRB1*07:01* allél kétféle haplotípusban volt megtalálható: a *HLA-DRB1*07:01–HLA-DQB1*02:02* és *HLA-DRB1*07:01–HLA-DQB1*03:03* haplotípusban. A kettő közül csak a *HLA-DRB1*07:01–HLA-DQB1*02:02* mutatott szignifikáns pozitív asszociációt az aszparagináz hiperszenzitivitással ($p=1,85 \times 10^{-4}$; OR=2,99 (1,68-5,31), 17. Táblázat). Tehát a *HLA-DRB1*07:01* allél csak a *HLA-DQB1*02:02* alléllal alkotott haplotípusában hajlamosított a túlérzékenységre. Ez összhangban van a Bayes-háló alapú relevanciaelemzés eredményével abban az értelemben, hogy az aszparagináz hiperszenzitivitás szempontjából a *HLA-DQB1*02:02* allél jelenléte tűnik meghatározónak.

Az előzőektől független módon az Allele Frequency Net Database használatával rekonstruáltuk a *HLA-DRB1-HLA-DQA1-HLA-DQB1* haplotípusokat, és egyidejűleg a betegek 72%-ában a *HLA-DQA1* allélokra is tudtunk következtetni ($n=257$; 18. Táblázat).

17. Táblázat. A becsült *HLA-DRB1-HLA-DQB1* haplotípusok asszociációja az aszparagináz hiperszenzitivitással (n=359).

Haplotípus	Gyakoriság	OR ¹	95% CI ²	p-érték ¹
<i>DRB1*01:01-DQB1*05:01</i>	0,081	0,71	0,38-1,31	0,27
<i>DRB1*01:01-DQB1*06:03</i>	0,001	NA ³	NA ³	0,98
<i>DRB1*01:02-DQB1*05:01</i>	0,015	1,39	0,39-4,94	0,61
<i>DRB1*03:01-DQB1*02:01</i>	0,097	1,05	0,60-1,82	0,87
<i>DRB1*04:01-DQB1*03:01</i>	0,014	0,37	0,08-1,80	0,22
<i>DRB1*04:01-DQB1*03:02</i>	0,015	1,30	0,38-4,47	0,68
<i>DRB1*04:01-DQB1*03:05</i>	0,001	NA ³	NA ³	0,98
<i>DRB1*04:02-DQB1*03:02</i>	0,025	0,86	0,31-2,35	0,77
<i>DRB1*04:03-DQB1*03:02</i>	0,008	2,25	0,37-13,73	0,38
<i>DRB1*04:03-DQB1*03:04</i>	0,003	NA ³	NA ³	0,98
<i>DRB1*04:03-DQB1*03:05</i>	0,003	NA ³	NA ³	0,98
<i>DRB1*04:04-DQB1*03:02</i>	0,017	4,74	1,35-16,61	0,02
<i>DRB1*04:04-DQB1*04:02</i>	0,001	NA ³	NA ³	0,98
<i>DRB1*04:05-DQB1*03:02</i>	0,004	NA ³	NA ³	0,99
<i>DRB1*04:07-DQB1*03:01</i>	0,004	1,35	0,12-15,78	0,81
<i>DRB1*04:08-DQB1*03:04</i>	0,007	2,47	0,39-15,55	0,34
<i>DRB1*04:10-DQB1*04:02</i>	0,001	NA ³	NA ³	0,98
<i>DRB1*07:01-DQB1*02:02</i>	0,091	2,99	1,68-5,31	1,85 x 10⁻⁴
<i>DRB1*07:01-DQB1*03:03</i>	0,038	1,71	0,76-3,84	0,20
<i>DRB1*08:01-DQB1*03:01</i>	0,001	NA ³	NA ³	0,98
<i>DRB1*08:01-DQB1*03:02</i>	0,001	NA ³	NA ³	0,98
<i>DRB1*08:01-DQB1*04:02</i>	0,036	0,48	0,18-1,26	0,13
<i>DRB1*08:04-DQB1*04:02</i>	0,001	NA ³	NA ³	0,98
<i>DRB1*09:01-DQB1*03:03</i>	0,008	1,63	0,31-8,64	0,57
<i>DRB1*10:01-DQB1*05:01</i>	0,017	0,12	0,02-0,98	0,05
<i>DRB1*11:01-DQB1*03:01</i>	0,070	0,40	0,19-0,82	0,01
<i>DRB1*11:03-DQB1*03:01</i>	0,010	1,13	0,24-5,32	0,88
<i>DRB1*11:04-DQB1*03:01</i>	0,060	1,30	0,67-2,54	0,44
<i>DRB1*11:15-DQB1*03:01</i>	0,001	NA ³	NA ³	0,98
<i>DRB1*11:43-DQB1*03:01</i>	0,001	NA ³	NA ³	0,98
<i>DRB1*12:01-DQB1*03:01</i>	0,013	2,34	0,60-9,12	0,22

Haplotípus	Gyakoriság	OR ¹	95% CI ²	p-érték ¹
<i>DRB1*12:01-DQB1*03:12</i>	0,003	NA ³	NA ³	0,98
<i>DRB1*12:02-DQB1*03:01</i>	0,001	NA ³	NA ³	0,98
<i>DRB1*13:01-DQB1*06:02</i>	0,001	NA ³	NA ³	0,98
<i>DRB1*13:01-DQB1*06:03</i>	0,071	0,51	0,26-1,00	0,05
<i>DRB1*13:02-DQB1*06:03</i>	0,001	NA ³	NA ³	0,98
<i>DRB1*13:02-DQB1*06:04</i>	0,019	0,90	0,28-2,90	0,85
<i>DRB1*13:02-DQB1*06:09</i>	0,004	0,81	0,07-9,13	0,86
<i>DRB1*13:03-DQB1*03:01</i>	0,019	0,61	0,18-2,06	0,43
<i>DRB1*13:05-DQB1*03:01</i>	0,001	NA ³	NA ³	0,98
<i>DRB1*13:15-DQB1*03:01</i>	0,001	NA ³	NA ³	0,98
<i>DRB1*13:18-DQB1*06:03</i>	0,001	NA ³	NA ³	0,98
<i>DRB1*14:04-DQB1*05:03</i>	0,017	1,23	0,38-4,01	0,73
<i>DRB1*14:54-DQB1*05:02</i>	0,004	1,23	0,37-48,73	0,25
<i>DRB1*14:54-DQB1*05:03</i>	0,028	0,72	0,26-1,97	0,52
<i>DRB1*15:01-DQB1*05:02</i>	0,006	0,49	0,05-5,17	0,55
<i>DRB1*15:01-DQB1*06:01</i>	0,001	NA ³	NA ³	0,98
<i>DRB1*15:01-DQB1*06:02</i>	0,070	1,32	0,70-2,47	0,39
<i>DRB1*15:01-DQB1*06:03</i>	0,001	NA ³	NA ³	0,98
<i>DRB1*15:01-DQB1*06:39</i>	0,001	NA ³	NA ³	0,98
<i>DRB1*15:02-DQB1*05:03</i>	0,008	NA ³	NA ³	0,98
<i>DRB1*15:02-DQB1*06:01</i>	0,017	0,22	0,05-1,06	0,06
<i>DRB1*16:01-DQB1*05:02</i>	0,064	1,25	0,66-2,38	0,50
<i>DRB1*16:01-DQB1*05:05</i>	0,001	NA ³	NA ³	0,98
<i>DRB1*16:01-DQB1*06:02</i>	0,001	NA ³	NA ³	0,98
<i>DRB1*16:02-DQB1*05:02</i>	0,007	0,45	0,05-4,10	0,48

A korigált szignifikancia határon belüli p-értékek (Bonferroni; $p \leq 2,66 \times 10^{-4}$) félkövérrel jelöltek.

¹A többváltozós logisztikus regresszióval tesztelt összefüggés az aszparagináz hiperszenzitivitással.

²95%-os konfidencia-intervallum.

³Nincs adat; alacsony elemszám miatt az esélyhányados és a konfidencia-intervallum becslését nem végeztük el.

18. Táblázat. A becült kiterjesztett haplotípusok és a *HLA-DQAI* allélok asszociációja az aszparagináz hiperszenzitivitással (n=257).

Gén/Haplotípus	Allél	Allélfrekvencia	Hiperszenzitivitás (%) hordozók ¹	Hiperszenzitivitás (%) nem hordozók ¹	OR ³	95% CI ⁴	p-érték ³
<i>HLA-DRB1</i> ⁶	*07:01	0,128	60,6	31,9	3,69	1,99-6,84	3,45x10⁻⁵
<i>HLA-DQB1</i> ⁶	*02:02	0,088	68,1	32,9	5,00	2,43-10,29	1,22x10⁻⁵
<i>HLA-DQAI</i>	*01:01	0,128	33,3	41,4	0,64	0,34-1,20	0,163
	*01:02	0,202	46,0	35,5	1,49	0,89-2,51	0,128
	*01:03	0,091	23,4	42,9	0,33	0,15-0,71	0,004
	*02:01	0,128	60,6	31,9	3,69	1,99-6,84	3,45x10⁻⁵
	*03:01	0,088	46,7	37,7	1,41	0,71-2,81	0,330
	*04:01	0,053	25,9	40,9	0,52	0,20-1,34	0,178
	*05:01	0,309	32,8	45,8	0,75	0,49-1,15	0,185
<i>HLA-DRB1*01:01–HLA-DQAI*01:01–HLA-DQB1*05:01</i>	NA	0,088	37,8	39,6	0,84	0,42-1,69	0,624
<i>HLA-DRB1*01:02–HLA-DQAI*01:01–HLA-DQB1*05:01</i>	NA	0,019	40,0	39,3	1,15	0,29-4,47	0,843
<i>HLA-DRB1*03:01–HLA-DQAI*05:01–HLA-DQB1*02:01</i>	NA	0,115	40,7	38,9	1,08	0,58-2,02	0,800
<i>HLA-DRB1*04:01–HLA-DQAI*03:01–HLA-DQB1*03:01</i>	NA	0,016	25,0	39,8	0,46	0,09-2,42	0,358
<i>HLA-DRB1*04:01–HLA-DQAI*03:01–HLA-DQB1*03:02</i>	NA	0,006	0,0	39,8	NA ⁵	NA ⁵	0,985
<i>HLA-DRB1*04:02–HLA-DQAI*03:01–HLA-DQB1*03:02</i>	NA	0,021	27,3	39,8	0,46	0,11-1,91	0,285
<i>HLA-DRB1*04:03–HLA-DQAI*03:01–HLA-DQB1*03:02</i>	NA	0,006	100,0	38,6	NA ⁵	NA ⁵	0,985
<i>HLA-DRB1*04:03–HLA-DQAI*03:01–HLA-DQB1*03:04</i>	NA	0,002	100,0	39,1	NA ⁵	NA ⁵	0,987
<i>HLA-DRB1*04:03–HLA-DQAI*03:01–HLA-DQB1*03:05</i>	NA	0,004	100,0	38,8	NA ⁵	NA ⁵	0,987
<i>HLA-DRB1*04:04–HLA-DQAI*03:01–HLA-DQB1*03:02</i>	NA	0,019	60,0	38,5	3,76	0,97-14,65	0,056

Gén/Haplotípus	Allél	Allélfrekvencia	Hiperszenzitivitás (%) hordozók ¹	Hiperszenzitivitás (%) nem hordozók ¹	OR ³	95% CI ⁴	p-érték ³
<i>HLA-DRB1*04:05–HLA-DQA1*03:01–HLA-DQB1*03:02</i>	NA	0,002	0,0	39,5	NA ⁵	NA ⁵	0,986
<i>HLA-DRB1*04:07–HLA-DQA1*03:01–HLA-DQB1*03:01</i>	NA	0,004	50,0	39,2	3,80	0,21-68,33	0,366
<i>HLA-DRB1*07:01–HLA-DQA1*02:01–HLA-DQB1*02:02</i>	NA	0,091	68,1	32,9	5,00	2,43-10,29	1,22x10⁻⁵
<i>HLA-DRB1*07:01–HLA-DQA1*02:01–HLA-DQB1*03:03</i>	NA	0,037	42,1	39,1	1,19	0,44-3,19	0,736
<i>HLA-DRB1*08:01–HLA-DQA1*04:01–HLA-DQB1*04:02</i>	NA	0,051	23,1	41,1	0,46	0,17-1,25	0,128
<i>HLA-DRB1*08:04–HLA-DQA1*04:01–HLA-DQB1*04:02</i>	NA	0,002	100,0	39,1	NA ⁵	NA ⁵	0,987
<i>HLA-DRB1*09:01–HLA-DQA1*03:01–HLA-DQB1*03:03</i>	NA	0,008	75,0	38,7	5,61	0,53-58,84	0,150
<i>HLA-DRB1*10:01–HLA-DQA1*01:01–HLA-DQB1*05:01</i>	NA	0,043	9,1	40,7	0,17	0,02-1,39	0,098
<i>HLA-DRB1*11:01–HLA-DQA1*05:01–HLA-DQB1*03:01</i>	NA	0,089	21,7	43,1	0,37	0,17-0,81	0,013
<i>HLA-DRB1*11:03–HLA-DQA1*05:01–HLA-DQB1*03:01</i>	NA	0,012	33,3	39,4	0,67	0,11-3,94	0,661
<i>HLA-DRB1*11:04–HLA-DQA1*05:01–HLA-DQB1*03:01</i>	NA	0,054	46,4	38,4	1,40	0,61-3,19	0,429
<i>HLA-DRB1*12:01–HLA-DQA1*05:01–HLA-DQB1*03:01</i>	NA	0,016	50,0	39,0	1,91	0,44-8,24	0,384
<i>HLA-DRB1*13:01–HLA-DQA1*01:03–HLA-DQB1*06:03</i>	NA	0,070	25,0	41,6	0,42	0,19-0,97	0,041
<i>HLA-DRB1*13:02–HLA-DQA1*01:02–HLA-DQB1*06:04</i>	NA	0,027	35,7	39,5	0,90	0,27-3,02	0,870
<i>HLA-DRB1*13:02–HLA-DQA1*01:02–HLA-DQB1*06:09</i>	NA	0,006	33,3	39,4	0,74	0,06-8,48	0,810
<i>HLA-DRB1*13:03–HLA-DQA1*05:01–HLA-DQB1*03:01</i>	NA	0,043	18,2	40,2	0,36	0,07-1,84	0,219
<i>HLA-DRB1*13:05–HLA-DQA1*05:01–HLA-DQB1*03:01</i>	NA	0,002	0,0	39,5	NA ⁵	NA ⁵	0,988
<i>HLA-DRB1*15:01–HLA-DQA1*01:02–HLA-DQB1*05:02</i>	NA	0,008	25,0	39,5	0,42	0,04-4,71	0,479
<i>HLA-DRB1*15:01–HLA-DQA1*01:02–HLA-DQB1*06:02</i>	NA	0,076	53,8	36,7	2,15	1,04-4,46	0,039
<i>HLA-DRB1*15:01–HLA-DQA1*01:02–HLA-DQB1*06:03</i>	NA	0,002	100,0	39,1	NA ⁵	NA ⁵	0,986

Gén/Haplotípus	Allél	Allélfrekvencia	Hiperszenzitivitás (%) hordozók ¹	Hiperszenzitivitás (%) nem hordozók ¹	OR ³	95% CI ⁴	p-érték ³
<i>HLA-DRB1*15:02–HLA-DQA1*01:03–HLA-DQB1*06:01</i>	NA	0,021	18,2	40,2	0,21	0,04-1,06	0,058
<i>HLA-DRB1*16:01–HLA-DQA1*01:02–HLA-DQB1*05:02</i>	NA	0,074	42,1	38,8	1,21	0,58-2,51	0,609
<i>HLA-DRB1*16:02–HLA-DQA1*01:02–HLA-DQB1*05:02</i>	NA	0,010	20,0	39,7	0,47	0,05-4,32	0,503

A korrigált szignifikancia határon belüli p-értékek (Bonferroni; $p \leq 2,66 \times 10^{-4}$) félkövérrel jelöltek.

¹Az aszparagináz hiperszenzitivitás aránya az 1. és 2. oszlopban definiált allélt hordozó betegek körében.

²Az aszparagináz hiperszenzitivitás aránya az 1. és 2. oszlopban definiált allélt nem hordozók körében.

³A többváltozós logisztikus regresszióval tesztelt összefüggés az aszparagináz hiperszenzitivitással.

⁴95%-os konfidencia-intervallum.

⁵Nincs adat; alacsony elemszám miatt az esélyhányados és a konfidencia-intervallum becslését nem végeztük el.

⁶A könnyebb összevethetőség kedvéért a 257 fős populáción számolt *HLA-DRB1*07:01* és *HLA-DQB1*02:02* allélokra vonatkozó logisztikus regresszió eredményeit is feltüntettük.

Összehasonlítottuk a PHASE szoftverrel és az Allele Frequency Net adatbázis segítségével becsült haplotípusokat, és azok 100%-ban megegyeztek. A 257 beteg esetében 7 *HLA-DQA1* allélt tudtunk azonosítani (5. ábra).

A 257 fős betegpopulációt továbbvizsgálva a *HLA-DQA1*02:01* allél és a *HLA-DRB1*07:01–HLA-DQA1*02:01–HLA-DQB1*02:02* haplotípus szignifikáns pozitív asszociációját azonosítottuk ($p=3,45 \times 10^{-5}$; OR=3,69 (1,99-6,84) and $p=1,22 \times 10^{-5}$; OR=5,00 (2,43-10,29); 18. Táblázat). Ezek az eredmények számszerűen megegyeztek a *HLA-DRB1*07:01* és *HLA-DQB1*02:02* allélok asszociációival. Ennek oka az volt, hogy a *HLA-DQA1*02:01* allél kizárólag a *HLA-DRB1*07:01* alléllal együtt fordult elő, és a *HLA-DRB1*07:01* allél sem fordult elő más *HLA-DQA1* alléllal, illetve a *HLA-DQB1*02:02* sem volt megtalálható más *HLA-DRB1* alléllal egy haplotípuson (18. Táblázat).

4.2.3 Polimorf aminosavak meghatározása a HLA II. osztály peptidkötő zsebeiben

A dbMHC segítségével összesen 84 polimorf aminosav pozíciót azonosítottam a *HLA-DRB1*, *HLA-DQB1* és *HLA-DQA1* gének 2-es exonjaiban. Többváltozós logisztikus regressziót végeztünk ahhoz, hogy megállapítsuk, hogy melyik szekvencia-szakasz hordozza a megnövekedett kockázatot az aszparagináz hiperszenzitivitásra. A betegeinkben összesen 27 polimorf aminosav pozíció mutatott szignifikáns összefüggést az aszparagináz túlérzékenységgel (19. Táblázat).

A *HLA-DRB1* lánc 78-as pozíciójában lévő valin mutatta a legerősebb asszociációt az aszparagináz hiperszenzitivitással ($p=8,16 \times 10^{-6}$; OR=4,01 (2,18-7,37); 19. Táblázat). A 27 hajlamosító aminosav közül 7-et a *HLA-DRB1*07:01* és 3-at a *HLA-DQA1*02:01* allél kódolt egyedi módon ($p=3,45 \times 10^{-5}$; OR=3,69 (1,99-6,84); 19. Táblázat). A *HLA-DQB1* láncban található hajlamosító aminosavak mindegyikét legalább kétféle allél kódolta, és kisebb mértékben asszociáltak az aszparagináz hiperszenzitivitással ($p=1,69 \times 10^{-4}$; OR=2,87 (1,66-4,97); 19. Táblázat).

19. Táblázat. Az aszparagináz hiperszenzitivitással asszociáló polimorf aminosav pozíciók (n=275)

HLA lókuszt	AS pozíció ¹	Rizikó AS ²	OR ³	95% CI ⁴	p-érték ³	Más lehetséges AS ⁵	A rizikó AS-at kódoló HLA allélok
<i>HLA-DRB1</i>	10	Q	2,22	1,45-3,40	$2,30 \times 10^{-5}$	E,Y	*01:01, *01:02, *04:01, *04:02, *04:03, *04:04, *04:05, *04:07, *07:01, *09:01, *15:01, *15:02, *16:01, *16:02
	11	G	3,69	1,99-6,84	$3,45 \times 10^{-5}$	D,L,P,S,V	*07:01
	13	Y	3,69	1,99-6,84	$3,45 \times 10^{-5}$	F,G,H,R,S	*07:01
	14	K	3,69	1,99-6,84	$3,45 \times 10^{-5}$	E	*07:01
	25	Q	3,69	1,99-6,84	$3,45 \times 10^{-5}$	R	*07:01
	30	L	3,69	1,99-6,84	$3,45 \times 10^{-5}$	C,G,H,R,Y	*07:01
	37	F	3,69	1,99-6,84	$3,45 \times 10^{-5}$	L,N,S,Y	*07:01
	57	V	3,52	2,00-6,19	$1,31 \times 10^{-5}$	D,S	*07:01, *09:01, *12:01
	60	S	3,52	2,00-6,19	$1,31 \times 10^{-5}$	Y	*07:01, *09:01, *12:01
	73	G	2,96	1,71-5,12	$1,10 \times 10^{-4}$	A	*07:01, *03:01
	74	Q	3,69	1,99-6,84	$3,45 \times 10^{-5}$	A,E,L,R	*07:01
	78	V	4,01	2,18-7,37	$8,16 \times 10^{-6}$	Y	*07:01, *09:01
<i>HLA-DQA1</i>	47	K	3,69	1,99-6,84	$3,45 \times 10^{-5}$	C,Q,R	*02:01
	50	L	3,03	1,78-5,14	$4,09 \times 10^{-5}$	E,V	*02:01, *03:01
	52	H	3,69	1,99-6,84	$3,45 \times 10^{-5}$	R,S	*02:01
	53	R	3,03	1,78-5,14	$4,09 \times 10^{-5}$	K,Q	*02:01, *03:01

HLA lókuszt	AS pozíció ¹	Rizikó AS ²	OR ³	95% CI ⁴	p-érték ³	Más lehetséges AS ⁵	A rizikó AS-at kódoló HLA allélok
<i>HLA-DQA1</i>	54	L	3,69	1,99-6,84	$3,45 \times 10^{-5}$	F	*02:01
<i>HLA-DQB1</i>	28	S	2,87	1,66-4,97	$1,69 \times 10^{-4}$	T	*02:01, *02:02
	30	S	2,87	1,66-4,97	$1,69 \times 10^{-4}$	H,Y	*02:01, *02:02
	37	I	2,87	1,66-4,97	$1,69 \times 10^{-4}$	D,Y	*02:01, *02:02
	46	E	2,87	1,66-4,97	$1,69 \times 10^{-4}$	V	*02:01, *02:02
	47	F	2,87	1,66-4,97	$1,69 \times 10^{-4}$	Y	*02:01, *02:02
	52	L	2,87	1,66-4,97	$1,69 \times 10^{-4}$	P	*02:01, *02:02
	55	L	2,87	1,66-4,97	$1,69 \times 10^{-4}$	P,R	*02:01, *02:02
	57	A	2,60	1,58-4,26	$1,61 \times 10^{-4}$	D,S,V	*02:01, *02:02 , *03:02, *03:04, *03:05
	71	K	2,87	1,66-4,97	$1,69 \times 10^{-4}$	A,D,T	*02:01, *02:02
	74	A	2,87	1,66-4,97	$1,69 \times 10^{-4}$	E,S	*02:01, *02:02

A korrigált szignifikancia határon belüli p-értékek (Bonferroni; $p \leq 2,66 \times 10^{-4}$) félkövérrel jelöltek.

¹Az aminosav pozíciója a HLA II fehérje szekvenciájában az irányító szignálszekvencia nélkül.

²Az aszparagináz hiperszenzitivitással pozitívan asszociáló aminosav.

³A többváltozós logisztikus regresszióval tesztelt összefüggés az aszparagináz hiperszenzitivitással.

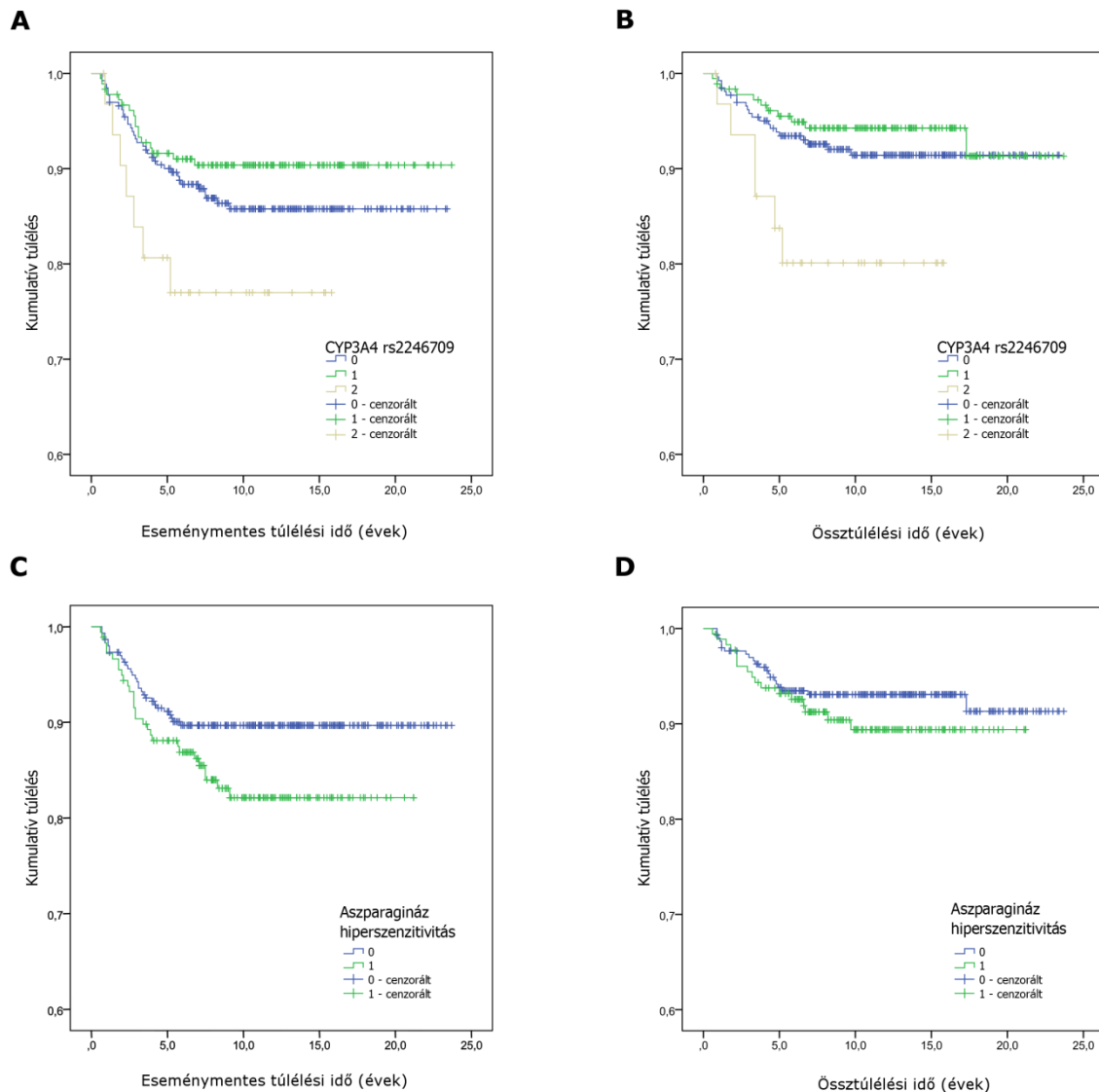
⁴95%-os konfidencia-intervallum.

⁵A vizsgált populációban előforduló más aminosavak.

Érdekes módon az aszparagináz túlérzékenységgel szignifikánsan pozitívan asszociáló aminosavak közül mindegyiket kódolja a *HLA-DQB1*02:02* allél, míg a másik *HLA-DRB1*07:01* alléllal kapcsoltságot mutató *HLA-DQB1* allél, a *HLA-DQB1*03:03* egyik hajlamosító aminosavat sem. Ezek az eredmények alátámasztják a *HLA-DRB1*07:01–HLA-DQA1*02:01–HLA-DQB1*02:02* haplotípus meghatározó szerepét az aszparagináz hiperszezeitivitás kialakulásának fokozott kockázatában.

4.3 Az aszparagináz hiperszenzitivitás és a *CYP3A4* rs2246709 polimorfizmus hatása a betegek túlélésére

Korábban összefüggést találtunk a *CYP3A4* rs2246709 polimorfizmus és a gyermekkori ALL-es betegek eseménymentes és össztúlélése között [84]. Jelen munkámban a túléléselemzéshez a korábbival részben átfedő, de újabb betegekkel kiegészített populációt és frissített túlélési adatokat használtam. Kaplan-Meier módszer segítségével vizsgáltam az aszparagináz hiperszenzitivitás és a *CYP3A4* rs2246709 polimorfizmus hatását a betegek eseménymentes és össztúlélésére. A túlélési görbéket Mantel-Cox teszttel hasonlítottam össze. A *CYP3A4* rs2246709 polimorfizmus és a betegek össztúlélése között szignifikáns összefüggést találtam ($p=0,024$), az eseménymentes túlélésükben azonban nem volt különbség ($p=0,074$; 11. ábra). Ezzel ellentétben az aszparagináz túlérzékenységi reakciók kialakulását vizsgálva a betegek eseménymentes túlélésében tudtam szignifikáns eltérést igazolni ($p=0,047$). A betegek össztúlélési idejében nem találtam szignifikáns különbséget ($p=0,296$; 11. ábra).



11. ábra. A *CYP3A4* rs2246709 polimorfizmus és az aszparagináz hiperszenzitivitás hatása a gyermekkori ALL-es betegek túlélési mutatóira.

Ezt követően Cox-regresszió alkalmazásával az aszparagináz hiperszenzitivitás és rizikófaktorai, valamint a *CYP3A4* rs2246709 polimorfizmus túlélésre vonatkozó relatív kockázatát határoztam meg. A *CYP3A4* polimorfizmus hatását az ösztúlélésre ez az elemzés is megerősítette. A legkedvezőtlenebb genotípus a GG homozigóta volt, amely csoportban a betegek elhalálzásának kockázata háromszoros volt az AA homozigótákéhoz képest (HR=3,10 (1,22-7,88); $p=0,018$; 20. Táblázat). Az eseménymentes túlélésben nem találtam szignifikáns eltérést. Cox-regresszióval vizsgálva az aszparagináz hiperszenzitivitásnak nem volt hatása sem az eseménymentes, sem az ösztúlélésre.

20. Táblázat. Az ALL-es betegek össz túlélésének egy- és többváltozós vizsgálata.

Változó		Egyváltozós			Többváltozós		
		HR	95% CI	p-érték	HR	95% CI	p-érték
Aszparagináz hiperszenzitivitás	nincs	(1,00)			(1,00)		
	van	1,41	(0,74-2,67)	0,298	1,16	(0,58-2,33)	0,679
Nem	fiú	(1,00)			(1,00)		
	lány	0,65	(0,33-1,26)	0,201	0,72	(0,36-1,43)	0,344
Rizikócsoport	SR	(1,00)			(1,00)		
	MR	1,28	(0,57-2,88)	0,549	1,23	(0,53-2,89)	0,633
	HR	2,98	(1,12-7,94)	0,029	2,84	(0,99-8,13)	0,052
Immunfenotípus	pre-B	(1,00)			(1,00)		
	T	0,96	(0,37-2,46)	0,924	0,66	(0,25-1,77)	0,409
	egyéb	0,70	(0,17-2,96)	0,631	0,72	(0,17-3,05)	0,652
Életkor	≤10 év	(1,00)			(1,00)		
	>10 év	1,42	(0,67-3,01)	0,354	1,33	(0,60-2,92)	0,481
CYP3A4 rs2246709	AA	(1,00)			(1,00)		
	AG	0,75	(0,36-1,55)	0,430	0,79	(0,38-1,65)	0,531
	GG	2,73	(1,10-6,77)	0,031	2,97	(1,18-7,51)	0,021

A $p \leq 0,05$ szignifikancia határ alatti eredmények félkövérrel jelöltek. HR (=hazard arány); 95% CI (=95%-os konfidencia intervallum).

A többváltozós elemzést nemek szerint külön elvégezve a *CYP3A4* rs2246709 polimorfizmus GG genotípusának hatása csak a fiúk esetében volt szignifikáns (HR=3,07 (1,09-8,65); p=0,034), míg a lányok esetében megfigyelhető kockázatnövekedés nem érte el a szignifikancia határt (HR=2,37 (0,27-20,83); p=0,436).

5 Megbeszélés

Első tanulmányunk célja a *GRIAI* és *GALNT10* gének aszparagináz hiperszenzitivitásban betöltött szerepének vizsgálata volt egy nagy 576 fős magyarországi gyermekkori ALL-es betegpopuláción.

A *GRIAI* polimorfizmusai közül 1 szinoním és 2 intronikus SNP mutatott összefüggést az ALL-es betegek bizonyos alcsoportjain belül. A *GALNT10* gén polimorfizmusaival nem találtunk asszociációt.

Korábban Chen és mtsai több mint 500 000 SNP-t vizsgáltak 485 gyermekkori ALL-es beteg mintáján. Betegeiket egy 322 fős „felfedező” és egy 163 fős „validáló” populációra osztották fel. Összefüggést találtak az 5q33 régióban elhelyezkedő *GRIAI* gén rs4958351 és további 4 intronikus polimorfizmusa és az aszparagináz hiperszenzitivitás között mindkét vizsgálati betegpopuláción [76]. Ezt az eredményt később megerősítették egy viszonylag kicsi, 146 fős szlovén populáción is [77]. Chen és mtsai a az ugyanabban a kromoszómarégióban elhelyezkedő *GALNT10* gén variánsaival is talált összefüggést a kezdeti felfedező populáción, azonban ezt a validáló populáción nem tudták megerősíteni [76].

A *GRIAI* gén az ionotróp α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-izoxazol-propionát (AMPA) receptor glutamát-receptor 1 (GluR1) alegységét kódolja. E receptorcsalád tagjai a GluR1-4 alegységekből épülnek fel, és homomer vagy heteromer komplexeket alkotnak. A komplexek ligandfüggő ioncsatornákat képeznek, melyek a központi idegrendszer glutamáterg neurotranszmissziójában játszanak szerepet (www.genecards.org) [105, 106].

Friss tanulmányok a glutamát immunmodulátor szerepét is felvetik [76, 77, 107]. Első alkalommal Lombardi és mtsai írták le az ionotróp glutamát receptorok jelenlétét humán T-limfociták felszínén. Ugyanez a tanulmány igazolta T-sejt aktivációban az AMPA receptorok Ca^{2+} beáramlást potencírozó szerepét [108]. Későbbi vizsgálatokban naív/nyugvó T-sejteken a glutamát AMPA receptorok közvetítette, adhéziót és migrációt elősegítő hatását igazolták [109-111]. Ezen felül számos glutamát receptor és transzporter expresszióját írták le immunsejtekben, köztük dendritikus sejtekben is. A nyirokcsomókban a T-limfocitákkal kölcsönhatásba lépő dendritikus sejtek glutamátot bocsátanak ki magukból. Pancheco és mtsai kimutatták, hogy ebben az interakcióban a

glutamát nagyon hatásos szabályozója a T-sejt-mediált immunválasz elindításának [111].

Mindezek mellett, azon túl, hogy malignus állapotokban eleve jellemző az emelkedett plazma glutamát szint, az aszparagináz glutamináz-aktivitása következtében a hasítási termék, a glutamát szintje jelentősen megemelkedik, melynek mértéke nagy egyéni különbségeket mutat [112].

A fentiek alapján feltételezhető, hogy a glutamát-jelátviteli útvonalak génpolimorfizmusai befolyásolhatják az aszparagináz hiperszenzitivitás kialakulásának kockázatát.

A teljes ALL-es betegpopulációnkat vizsgálva nem találtunk összefüggést az rs4958351 és az aszparagináz túlérzékenység között. A betegcsoportok vizsgálatánál azonban a ritka A allél hatása jelentős különbségeket mutatott. Míg igen jelentős mértékben csökkentette (OR=0,05) az aszparagináz hiperszenzitivitás kialakulásának esélyét a T-sejtes betegekben, addig szignifikáns összefüggést nem tudtunk kimutatni a pre-B-sejtes, jelentősen nagyobb betegcsoport esetében.

Ezzel szemben Chen és mtsai, majd később Rajić és mtsai az rs4958351 ritka A allélját rizikófaktorként azonosították. A látszólagos ellentmondás egy lehetséges feloldása az lehet, hogy ezekben a korábbi vizsgálatokban a T-ALL-es betegek alacsony száma miatt nem végeztek immunfenotípus szerinti alcsoportokra bontást, és így a pre-B-sejtes betegekben megfigyelhető ellentétes irányú összefüggés maszkírozhatta az A allél kisszámú T-sejtes betegekben kifejtett védő hatását. Tudomásunk szerint mi írtuk le elsőként az rs4958351 fordított asszociációját az aszparagináz hiperszenzitivitással T-ALL-es betegekben.

Vizsgálatunkban az intronban elhelyezkedő rs2055083 polimorfizmus ritka allélja erős védő faktornak bizonyult az aszparagináz hiperszenzitivitással szemben a közepes kockázatú ALL-es betegek alcsoportjában. Eddig más közlemény nem jelent meg erről a polimorfizmusról.

A neurológia területén egy olasz eset-kontroll tanulmányban az rs707176 allél-eloszlásában jelentős különbséget találtak skizofrén betegekben a kontroll populációhoz képest [113]; valamint egy másik munkacsoport összefüggésbe hozta gyermekkori obszesszív-kompulzív zavarok kialakulásával is [114]. Immunmoduláló szerepét vizsgálva mi azt találtuk, hogy ez, a *GRIA1* gén 3-as exonjában található,

aminosavcserét nem okozó C/T tranzíció az *E. coli* aszparagináz hiperszenzitivitás kialakulásának fokozott kockázatával asszociál IR ALL-es betegekben ($p=6.76 \times 10^{-3}$). A homozigóta CC genotípusú lányoknak jelentősen megnőtt az esélye a túlérzékenységi reakcióra (OR=4,03 (1,48–10,94)), míg a fiúk esetében nem tudtunk kimutatni ilyen összefüggést. Eredményünk felveti az aszparagináz hiperszenzitivitás genetikai hátterének nemek szerinti különbözőségét.

A *GRIAI* gén összes általunk vizsgált polimorfizmusa aminosavcserét nem okozó vagy intronban elhelyezkedő polimorfizmus. Ezeknek az ún. „csendes” polimorfizmusoknak a funkcionális szerepe máig nem teljesen tisztázott. A szinoním SNP-k esetében több mechanizmust is feltártak már, amelyen keresztül hatással lehetnek a fehérjék konformációjára és funkciójára: a prekursor mRNS-ek splicing-helyeinek elrontásával, transzkripciós faktorok, illetve mikroRNS-ek kötőhelyeinek megváltoztatásával vagy az mRNS-ek másodlagos struktúrájának módosításával [115]. Az általunk azonosított SNP-k patomechanizmusban betöltött szerepük tisztázására további funkcionális vizsgálatok szükségesek.

Egyváltozós és többváltozós logisztikus regresszióval vizsgáltuk a nemek, kor, rizikócsoport, az ALL immunfenotípusa és az SR és IR betegek indukció alatt kapott aszparagináz dózisa szerinti alcsoportok hatását az *E. coli* aszparagináz hiperszenzitivitás kialakulásának a kockázatára.

A HR csoportba tartozó betegeknek megközelítőleg hatszor nagyobb volt az esélyük az aszparagináz hiperszenzitivitásra az SR csoportba tartozókéhoz képest (OR=5,88 (2,85–12,15), $p=2,00 \times 10^{-6}$). A túlérzékenységi reakciók előfordulása szignifikánsan nem különbözött az IR és SR csoportok között. Ennek a magyarázata az lehet, hogy a HR ágon a kezelés jelentősen eltér az IR és SR ágakéhoz képest; a betegek az aszparaginázt több alkalommal és nagyobb dózisokban kapják.

Az aszparagináz hiperszenzitivitás előfordulása IR ágon a konszolidációs kezelést követően a reindukció első dóziséknél volt a legmagasabb – az összes aszparagináz túlérzékenységi reakció megközelítőleg 70%-a ekkor következett be. A konszolidációs kezelés alatt a beteg nem kapnak aszparagináz készítményt. Ez egybevág azzal a korábban megfigyelt jelenséggel, amely szerint a kezelésben tartott szünetet követően újra alkalmazott aszparagináz növeli a hiperszenzitivitás kialakulásának esélyét [22,

50]. Ennek háttérben az indukciós fázisbeli szenzitizációt követő konszolidációs fázis alatti immunkompetens B-sejt-proliferáció és antitesttermelés állhat [77, 79].

DNS mintáink egy kisebb része diagnosztikus mintákból származott. Feltételezésünk szerint a leukemogenesis során az általunk vizsgált génpolimorfizmusok megváltozásának a valószínűsége extrém módon alacsony. Ahhoz, hogy ezt igazoljuk, az elemzéseinket e minták kizárásával is elvégeztük, és kiszámoltuk az allélfrekvenciákat a remissziós és a diagnosztikus minták adatain külön-külön. Az általunk azonosított összefüggések a kisebb populáción is szignifikánsak voltak, az allélfrekvenciákban pedig nem találtunk jelentős eltérést.

Második munkánk célja a MHC II. régió *E. coli* aszparagináz hiperszenzitivitásban betöltött szerepének vizsgálata volt. A 359 fős gyermekkori ALL-es betegpopulációnk adatait elemezve azt találtuk, hogy a *HLA-DRB1*07:01* és *HLA-DQB1*02:02* allél az aszparagináz hiperszenzitivitás kialakulásának fokozott kockázatával asszociál. Haplotípus-rekonstrukciót követően azt találtuk, hogy a *HLA-DRB1*07:01* allél a *HLA-DQB1*02:02* alléllal alkotott haplotípusában szignifikáns összefüggést mutat. Mindezek mellett a *HLA-DQA1* allélok következtetve bevonását követően a *HLA-DQA1*02:01* allél és a kiterjesztett haplotípus pozitív asszociációját is azonosítottuk.

Korábban, egy 2014-es tanulmányban Fernandez és mtsai 1870 európai felmenőkkel rendelkező ALL-es gyermeket vizsgálva összefüggést írtak le a *HLA-DRB1*07:01* allél és az aszparagináz hiperszenzitivitás között [78]. Később ugyanez a munkacsoport egy etnikailag eltérő populáción is megerősítette ezt a felfedezést. A mi magyar populációnkat vizsgálva munkacsoportunk is azonosította ezt az összefüggést. A haplotípusok rekonstrukcióját követően ezen felül viszont a *HLA-DRB1*07:01* allél *HLA-DQB1*02:02* alléllal alkotott haplotípusának asszociációját mutattuk ki az aszparagináz hiperszenzitivitással; a másik, *HLA-DRB1*07:01*–*HLA-DQB1*03:03* haplotípust vizsgálva viszont nem találtunk ilyen összefüggést.

A *HLA-DQB1*02:02* allél fontosságát az aszparagináz hiperszenzitivitás kialakulásában bayesi megközelítéssel is meg tudtuk erősíteni. Abban az esetben, ha a *HLA-DRB1* és *HLA-DQB1* allélokat is belevettük a modellépítésbe, akkor csak a *HLA-DQB1*02:02* allél mutatott erős közvetlen relevanciát magas *a posteriori* valószínűségi értékkel ($P=0,95$). Ennek háttérben az állhat, hogy míg a *HLA-DQB1*02:02* allél csak a *HLA-DRB1*07:01* alléllal egy haplotípuson van jelen a vizsgált populációban, addig a *HLA-*

*DRB1*07:01* allél kétféle haplotípuson is megtalálható, de összefüggést csak a *HLA-DQB1*02:02* alléllal együtt alkotott haplotípusával tudtunk kimutatni. A *HLA-DQA1*02:01* allél teljes kapcsoltsági egyensúlytalanságot mutatnak egymással. Ezek alapján feltételezhető, hogy a *HLA-DQ* lókuszt is jelentős szerepet játszhat az aszparagináz hiperszenzitivitás kialakulásában.

Amikor azonban a peptidkötő zsebekben elhelyezkedő aminosavakat vizsgáltuk, ennek kissé ellentmondó eredményekre jutottunk. Ahogyan az jól ismert, a HLA-D gének (az MHC II. osztályának génjei) által kódolt fehérjéknek kritikus szerepük van az extracelluláris antigénekkal szembeni immunválasz kialakulásában. Az antigénprezentáló sejtek MHC II komplexhez kötötten processzált antigének vagy epitópok bemutatására képesek a helper T-sejtek számára, ami a T-sejtek citokin szekrécióját eredményezi, ami többek között a B-sejtek antitesteket szekretálni képes plazmasejtté történő differenciációjához vezet. Ezen elmélet alapján az MHC II komplex minél erősebben köti a peptidkötő zsebében az epitópot, annál valószínűbb, hogy immunválaszt képest kiváltani. A kötés erősségét az MHC II komplex negyedleges szerkezete határozza meg, ami függ a komplexet alkotó fehérjék aminosavösszetételétől.

A 19. Táblázat az aszparagináz hiperszenzitivitással asszociáló aminosavakat, valamint a hajlamosító aminosavakat kódoló HLA allélokat mutatja be. Az *E. coli* aszparagináz epitópokat illetően Fernandez és mtsai bioinformatikai eszközök segítségével a *HLA-DRB1*07:01* allélt az erősen kötő allélnak határozták meg, és ezt az aszparagináz hiperszenzitivitással való asszociációjának lehetséges okaként interpretálták. Mi a *HLA-DQB1* fehérje számos aminosavával is találtunk összefüggést, amelyek közül az összes megtalálható volt a *HLA-DQB1*02:02* allél termékében. Ugyanakkor, míg a *HLA-DQB1*02:01* allél által kódolt fehérje is tartalmazta ugyanezeket az aminosavakat, az allél nem mutatott összefüggést az aszparagináz túlérzékenységgel. A polimorf aminosav pozíciók vizsgálata alapján tehát nem lehet egyértelműen következtetni arra, hogy miért asszociáltak a *HLA-DQB1*02:02* allél aminosavai az aszparagináz hiperszenzitivitással. Ezek alapján arra következtethetünk, hogy bár a *HLA-DQB1*02:02* allél jelenléte döntő lehet az aszparagináz túlérzékenység kialakulásában, de a *HLA-DRB1*07:01* és/vagy *HLA-DQA1*02:01* allélok szintén szükségesek a

kockázatfokozódás kialakulásához, amely felveti a lehetőséget, hogy a kiterjesztett haplotípus szerepe fontosabb ebben a kérdésben, mint az egyedi alléloké.

Tanulmányunknak egy másik érdekes felfedezése is volt. A T-ALL-es betegek körében jelentősen alacsonyabb volt a *HLA-DQB1*02:02* allélt hordozók aránya, mint a pre-B-sejtes betegek esetében (6,5% a T-sejtes és 19,2% a pre-B-sejtes betegek esetében). Ennek kétféle magyarázata is lehet. Az allél egyaránt fokozhatja a pre-B-sejtes leukémia kialakulását, vagy védő szerepe is lehet a T-sejtes betegség kialakulásával szemben. Korábban összefüggést találtak a *HLA-DQB1*02:02* allél és a coeliakia kialakulásának fokozott kockázata között, ami az allél autoimmun és hiperszenzitivitási potenciálját jelzi [116]. Habár egészséges kontroll populáción nem határoztuk meg a gyakoriságát ennek az allélnak, az Allele Frequency Net adatbázisban a kaukázusi populációra vonatkozó érték a mi pre-B-sejtes betegeink értékéhez volt hasonló. Így a coeliakiában mutatott hajlamosító szerepével szemben a *HLA-DQB1*02:02* allél csökkentheti a T-sejtes ALL kialakulásának a kockázatát. Továbbá, mivel ez az allél kizárólag a *HLA-DRB1*07:01–HLA-DQA1*02:01–HLA-DQB1*02:02* haplotípusban fordult elő, ez felveti a lehetőségét annak, hogy a haplotípusnak is van védő szerepe a T-ALL kialakulásával szemben, a pre-B-sejtesével szemben azonban nincs. Természetesen ugyanebből a populációból más alanyok bevonása is szükséges lenne ahhoz, hogy igazolni tudjuk ezt a feltevést.

Néhány esetben a *HLA-DQA1* allélokra nem lehetett egyértelműen következtetni, az Allele Frequency Net adatbázisban elérhető adatok bizonytalanságából fakadóan. Ezekben az esetekben a további analízisekhez a bizonytalan allélokat az egyik lehetséges kategóriába soroltuk (21. Táblázat).

21. Táblázat. A bizonytalan *HLA-DQA1* allélok kategorizálása.

Haplotípus		<i>DQA1</i> allél
<i>HLA-DRB1*04:01–HLA-DQA1*03:01/*03:02–HLA-DQB1*03:01</i>	→	*03:01 ^a
<i>HLA-DRB1*04:01–HLA-DQA1*03:01/*03:02–HLA-DQB1*03:02</i>		
<i>HLA-DRB1*04:03–HLA-DQA1*03:01/*03:02–HLA-DQB1*03:02</i>		
<i>HLA-DRB1*04:05–HLA-DQA1*03:01/*03:02–HLA-DQB1*03:02</i>		
<i>HLA-DRB1*04:07–HLA-DQA1*03:01/*03:02–HLA-DQB1*03:01</i>		
<i>HLA-DRB1*09:01–HLA-DQA1*03:01/*03:02–HLA-DQB1*03:03</i>		
<i>HLA-DRB1*10:01–HLA-DQA1*01:01/*01:04–HLA-DQB1*05:01</i>	→	*01:01 ^a
<i>HLA-DRB1*13:01–HLA-DQA1*01:02/*01:03–HLA-DQB1*06:03</i>	→	*01:03 ^b
<i>HLA-DRB1*13:03–HLA-DQA1*05:01/*05:05–HLA-DQB1*03:01</i>	→	*05:01 ^a

A legtöbb esetben a lehetséges allélok 2-es exonjai megegyeztek transzlációs szinten, valamint a két allél közül csak az egyikre lehetett olyan populációs adatot találni az adatbázisban, ahol a *HLA-DQA1* allél egyértelmű meghatározásra került.

A *HLA-DRB1*13:01–HLA-DQA1*01:02/*01:03–HLA-DQB1*06:03* haplotípus esetében a *HLA-DQA1* lókuszra vonatkozóan nem egyértelmű eseteket a *HLA-DQA1*01:03* allélok közé soroltuk, mert a kaukázusi populációkra vonatkozó haplotípus-gyakorisági adatok alapján ez tűnt valószínűbbnek. Az adatbázis alapú kiterjesztett haplotípus-rekonstrukció megbízhatóságának növelése érdekében alkalmazott szigorú algoritmus a gyakori haplotípusok felülreprezentáltságához vezetett. A tanulmánynak azonban számos erőssége is van. A vizsgált ALL-es betegpopulációnk viszonylag nagyinak és etnikai eredetét tekintve homogénnek (európai) tekinthető. Ezen kívül újgenerációs szekvenálást alkalmaztunk a *HLA-DRB1* és *HLA-DQB1* allélok meghatározásához, ami megbízhatóbb eredményt ad a többi tanulmányban alkalmazott SNP-alapú imputációs módszerekhez képest. Emellett a szekvencia alapú HLA tipizálás – a költséges és nehézkes *in vitro* HLA tipizálással szemben – lehetőséget adott a HLA allélok polimorf aminosav pozícióinak vizsgálatára is. Végezetül pedig a mi tanulmányunk vizsgálta elsőként a HLA haplotípusok szerepét az aszparagináz hiperszenzitivitásban, és eredményeink arra engednek következtetni, hogy az egyetlen allél alapú kockázatbecslésnél a HLA haplotípus alapú pontosabban jelezheti előre az aszparagináz hiperszenzitivitás kialakulását.

A Kaplan-Meier módszerrel végzett túléléselemzés az aszparagináz hiperszenzitivitás szignifikáns hatását igazolta a betegek eseménymentes túlélésére ($p=0,047$). Ezt az összefüggést Cox-regresszióval azonban nem tudtuk megerősíteni.

Az életveszélyes toxicitások kialakulása miatt nem teljesített aszparagináz kezelés összefüggést mutat a betegség rossz kimenetelével [14-20]. Hiperszenzitivitási reakció esetén ezért kritikus jelentőségű, hogy különböző antigenitású aszparagináz készítmények lehessenek elérhetőek a beteg számára. Az aszparagináz expozíciót csökkentő túlérzékenységi reakció kialakulása esetén egy másik aszparagináz készítményre történő váltás lehetővé teszi az előírt aszparagináz kezelés maradéktalan teljesítését. Előfordulhat, hogy a natív *E. coli* készítményre kialakuló hiperszenzitivitás miatt a pegilált készítményre történő váltás esetén a korábban létrejött *E. coli* aszparagináz ellenes antitestek a pegilált enzimet is képesek neutralizálni. Ez nem minden esetben manifesztálódik újabb túlérzékenységi reakcióként, a gyógyszer csendes inaktivációja formájában is bekövetkezhet [52, 63]. Ez az enzim aktivitásának monitorozásával tetten érhető lenne. Vizsgálatunk során ilyen adatok nem álltak a rendelkezésünkre. Elképzelhető, hogy a Kaplan-Meier módszer segítségével kimutatott kedvezőtlenebb eseménymentes túlélés (ahol eseményként definiáltuk a beteg elhalálását vagy a betegség kiújulását) néhány beteg esetében ennek a jelenségnek tudható be. Ez felveti az aszparagináz aktivitás követésének szükségességét a terápia során.

A Kaplan-Meier módszerrel végzett túléléselemzés a korábbi vizsgálatainkkal összhangban a *CYP3A4* rs2246709 polimorfizmus szignifikáns hatását igazolta a betegek össztúlélésére ($p=0,024$). Ezt az összefüggést az egy- és többváltozós Cox-regressziós vizsgálat is megerősítette. A homozigóta GG genotípusú betegeknek szignifikánsan kedvezőtlenebb életkilátásai voltak (HR=3,10 (1,22-7,88); $p=0,018$), a nemek szerinti bontásban azonban ez a hatás csak a fiúk esetében érte el a szignifikancia határt (HR=3,10 (1,10-8,74); $p=0,033$). Korábban azt találtuk, hogy az AG heterozigóták, és azon belül is a fiúk rendelkeznek szignifikánsan kedvezőbb a túlélési aránnyal [84]. Érdekes módon azonban úgy tűnik, hogy hosszabb követési időt vizsgálva az AG genotípusúak korábban megfigyelt kedvező hatásával szemben a GG genotípusak kedvezőtlen hatása kerül előtérbe (9. ábra).

Számos tanulmány számolt be a nemek között szignifikánsan eltérő *CYP3A4* expresszióról [117-119]. A lányok esetében hiányzó összefüggés háttérében állhat ez a különbözőség, de a vizsgálatba bevont lányok kicsivel alacsonyabb száma is lehet az okozója. A *CYP3A4* polimorfizmus szerepét a gyermekkori ALL-ben Gézsi András doktori értekezésében tárgyalja részletesen [87].

Meg kell jegyezni, hogy tanulmányainknak vannak korlátjai. Először is azok a betegek, aki a kemoterápia során meghaltak terápia-rezisztens betegségük progressziója vagy infekció következtében alulreprezentáltak a vizsgált ALL-es populációnkban. Továbbá az *E. coli* aszparagináz hiperszenzitivitásra vonatkozó adatokat retrospektíven gyűjtöttük a betegek egészségügyi dokumentációjából. Ez a módszer nem teszi lehetővé minden beteg esetében, hogy a hiperszenzitív reakció lefolyásának és kezelésének részletes leírásához jussunk, és a reakció fokát pontosan meghatározzuk.

6 Következtetések

Munkám során az alábbi következtetéseket vontuk le:

1. A vizsgált gyermekkori ALL-es betegek körében a *GRIAI* és *GALNT10* gének közül a *GRIAI* polimorfizmusai mutattak szignifikáns összefüggést az *E. coli* aszparagináz hiperszenzitivitással. A korábban azonosított rs4958351 polimorfizmus A alléljának ellentétes hatását mutattuk ki a T-ALL-es betegalcsoporthoz. Más alcsoportokon belül további két polimorfizmus, az rs2055083 és rs707176 asszociált az aszparagináz túlérzékenységgel. Az azonosított *GRIAI* polimorfizmusok befolyásolhatják az aszparagináz hiperszenzitivitás kialakulását, hatásuk azonban jelentősen eltérhet az egyes alcsoportokon belül.
2. A *HLA-DRB1*07:01* és *HLA-DQB1*02:02* allélt jelenléte a betegekben szignifikánsan asszociált az aszparagináz túlérzékenység kialakulásával. Haplotípus-rekonstrukciót és a *HLA-DQA1* alléladatok bevonását követően a *HLA-DRB1*07:01–HLA-DQA1*02:01–HLA-DQB1*02:02* haplotípus hordozása szignifikánsan fokozta az aszparagináz hiperszenzitivitás előfordulásának kockázatát az ALL-es betegekben. A kiterjesztett haplotípust hordozó betegek esetében megfontolandó lehet más antigenitású aszparagináz készítmény alkalmazása első vonalbeli kezelésként.
3. Az aszparagináz hiperszenzitivitás szignifikánsan befolyásolta a BFM protokollokkal kezelt gyermekkori ALL-es betegek eseménymentes túlélését. Ez alátámasztja az aszparagináz kezelés kulcsfontosságát az ALL terápiájában, és felveti a az aszparagináz-szintek monitorozásának szükségességét az optimális terápiás hatás elérése érdekében.
4. A *CYP3A4* rs2246709 homozigóta GG genotípusú betegek ösztülélése szignifikánsan rosszabbnak bizonyult az AA genotípusú beteghez képest. Nemek szerinti bontásban ez az összefüggés a fiúk esetében volt szignifikáns. További vizsgálatok szükségesek a *CYP3A4* rs2246709 polimorfizmus funkciójának tisztázására.

7 Összefoglalás

A hiperszenzitivitás a gyermekkori akut limfoblasztos leukémiás (ALL-es) betegek körében használt natív *E. coli* aszparagináz leggyakoribb dóziskorlátozó mellékhatása. Célunk magyarországi betegek bevonásával az aszparagináz hiperszenzitivitás genetikai hátterének, továbbá az aszparagináz hiperszenzitivitás és a *CYP3A4* rs2246709 polimorfizmus túlélési mutatókra gyakorolt hatásának vizsgálata volt.

A *GRIA1* és *GALNT10* gén összesen 20 egy pontos nukleotid-polimorfizmusának (SNP) összefüggéseit az aszparagináz hiperszenzitivitással 505 betegen vizsgáltuk. A T-ALL-es betegcsoportban a *GRIA1* rs4958351 AA/AG genotípusú betegeknek szignifikánsan alacsonyabb kockázatuk volt az aszparagináz hiperszenzitivitás kialakulására összehasonlítva a GG genotípusú betegekkel. A pre-B sejtes alcsoporton nem találtunk összefüggést. További két *GRIA1* polimorfizmus, a rs2055083 és rs707176 mutatott szignifikáns összefüggést az aszparagináz hiperszenzitivitással bizonyos alcsoportokon belül. Eredményeink alapján a *GRIA1* polimorfizmusok befolyással lehetnek az aszparagináz hiperszenzitivitás kialakulására; hatásuk azonban jelentősen eltérhet a különböző betegcsoportokban.

A HLA II. régió *HLA-DRB1* és *HLADQB1* alléljainak és haplotípusainak aszparagináz túlérzékenységében betöltött szerepét 359 gyermekkori ALL-es beteg bevonásával vizsgáltuk. A *HLA-DRB1* és *HLADQB1* allélokat új generációs szekvenálással azonosítottuk. A *HLA-DRB1**07:01 és *HLA-DQB1**02:02 allélt hordozó betegeknek szignifikánsan nagyobb volt a kockázatuk az aszparagináz túlérzékenység kialakulására. Haplotípus-rekonstrukciót követően a *HLA-DRB1**07:01–*HLA-DQA1**02:01–*HLA-DQB1**02:02 haplotípust hordozó betegek fokozott kockázatát azonosítottuk. A kiterjesztett haplotípust hordozó betegek esetében megfontolandó lehet más antigenitású aszparagináz készítmény alkalmazása első vonalbeli szerként.

A gyerekkori ALL-esek túlélési mutatóit 476 fős populáción vizsgáltuk. Az aszparagináz hiperszenzitivitás kialakulása rosszabb eseménymentes túléléssel asszociált. Ez felveti az aszparagináz-szint monitorozásának a szükségességét. A *CYP3A4* rs2246709 homozigóta GG genotípusú betegek kedvezőtlenebb ösztülését igazoltuk. Az SNP funkciójának tisztázásához további vizsgálatok szükségesek.

Eredményeink hozzájárulhatnak a kevesebb gyógyszer mellékhatást és kedvezőbb túlélést célzó személyre szabott orvoslás fejlődéséhez.

8 Summary

Hypersensitivity reactions are the most frequent dose-limiting adverse reactions to *Escherichia coli*-derived asparaginase in pediatric acute lymphoblastic leukemia (ALL) patients. Our aims were to investigate genetic variants that might influence the risk to asparaginase hypersensitivity as well as the impact of asparaginase hypersensitivity and *CYP3A4* rs2246709 on the survival rate of patients.

The sample and clinical data collection was carried out from 576 paediatric ALL patients who were treated between 1990 and 2012 according to the protocols from the Berlin–Frankfurt–Münster Study Group.

A total of 20 single nucleotide polymorphisms (SNPs) in *GRIA1* and *GALNT10* genes were tested for associations in 505 patients. Patients with *GRIA1* rs4958351 AA/AG genotypes showed significantly reduced risk to ASP hypersensitivity compared to patients with GG genotype in the T-cell ALL subgroup, while no such association was found in pre-B-cell ALL. Two additional SNPs in *GRIA1* (rs2055083 and rs707176) were associated with asparaginase hypersensitivity in certain subgroups of patients. Genetic variants of *GRIA1* might influence the risk to asparaginase hypersensitivity, but subgroups of patients can differ significantly in this respect.

The role of alleles and haplotypes in the HLA II region was investigated in 359 patients. The *HLA-DRB1* and *HLA-DQB1* alleles were determined using next-generation sequencing. Patients with *HLA-DRB1**07:01 and *HLA-DQB1**02:02 alleles had significantly higher risk to develop asparaginase hypersensitivity. After haplotype reconstruction the *HLA-DRB1**07:01–*HLA-DQA1**02:01–*HLA-DQB1**02:02 haplotype was associated with an increased risk. In case of patients with the extended haplotype, it can be suggested to use another asparaginase preparation with different antigenic properties as first-line treatment.

The survival rates of 476 pediatric ALL patients were also investigated. The asparaginase hypersensitivity was associated with poorer event-free survival. Based on this, the monitoring of asparaginase level in patients is suggested. Patients with *CYP3A4* rs2246709 GG genotype had significantly poorer survival. Further investigations are needed to clarify the function of this SNP.

Our results may contribute to the development of personalized medicine aiming less frequent drug-induced adverse reactions and more favorable survival rates of patients.

9 Irodalomjegyzék

1. A haláloki struktúra változása Magyarországon, 2000-2012. Központi Statisztikai Hivatal, Budapest, 2014.
2. Oláh, É. 7.2. XXVII/2. fejezet – A vérképzőrendszer rosszindulatú betegségei, in Gyermekgyógyászati kézikönyv II., E. Magyarosi, P. Masát, and É. Oláh, Editors., Medicina, Budapest, 2008: 322-324.
3. Kutszegi, N. Antraciklinek kardiotoxikus hatásának farmakogenetikai vizsgálata gyermekkori akut limfoblasztos leukémia esetén. Diplomamunka, in Genetikai, Sejt- és Immunbiológiai Intézet, Semmelweis Egyetem, Budapest, 2012.
4. Pui, C.H. (2010) Recent research advances in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Formos Med Assoc*, 109(11): 777-87.
5. Castillo, L., D. Janic, S. Belgrad, A.P.D.J. Jazbec, E. Kaiserova, J. Konja, G. Kovacs, J. Kowalczyk, and L.Y. Soycan. ALL IC-BFM 2009.
6. Kidd, J.G. (1953) Regression of transplanted lymphomas induced in vivo by means of normal guinea pig serum. I. Course of transplanted cancers of various kinds in mice and rats given guinea pig serum, horse serum, or rabbit serum. *J Exp Med*, 98(6): 565-82.
7. Broome, J.D. (1963) Evidence that the L-asparaginase of guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effects. I. Properties of the L-asparaginase of guinea pig serum in relation to those of the antilymphoma substance. *J Exp Med*, 118: 99-120.
8. Lanvers-Kaminsky, C. (2017) Asparaginase pharmacology: challenges still to be faced. *Cancer Chemother Pharmacol*, 79(3): 439-450.
9. Krishnapura, P.R., P.D. Belur, and S. Subramanya. (2016) A critical review on properties and applications of microbial l-asparaginases. *Crit Rev Microbiol*, 42(5): 720-37.
10. Roth, G., J.E.S. Nunes, L.A. Rosado, C.V. Bizarro, G. Volpato, C.P. Nunes, G. Renard, L.A. Basso, D.S. Santos, and J.M. Chies. (2013) Recombinant *Erwinia carotovora* l-asparaginase II production in *Escherichia coli* fed-batch cultures. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 30: 245-256.
11. CHMP. Summary of product characteristics - Spectrila in European Medicines Agency, 2016.

12. Avramis, V.I. and E.H. Panosyan. (2005) Pharmacokinetic/pharmacodynamic relationships of asparaginase formulations: the past, the present and recommendations for the future. *Clin Pharmacokinet*, 44(4): 367-93.
13. Pieters, R., S.P. Hunger, J. Boos, C. Rizzari, L. Silverman, A. Baruchel, N. Goekbuget, M. Schrappe, and C.H. Pui. (2011) L-asparaginase treatment in acute lymphoblastic leukemia: a focus on Erwinia asparaginase. *Cancer*, 117(2): 238-49.
14. Hijiya, N. and I.M. van der Sluis. (2016) Asparaginase-associated toxicity in children with acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma*, 57(4): 748-57.
15. Silverman, L.B., R.D. Gelber, V.K. Dalton, B.L. Asselin, R.D. Barr, L.A. Clavell, C.A. Hurwitz, A. Moghrabi, Y. Samson, M.A. Schorin, S. Arkin, L. Declerck, H.J. Cohen, and S.E. Sallan. (2001) Improved outcome for children with acute lymphoblastic leukemia: results of Dana-Farber Consortium Protocol 91-01. *Blood*, 97(5): 1211-8.
16. Pession, A., M.G. Valsecchi, G. Maserà, W.A. Kamps, E. Magyarosy, C. Rizzari, E.R. van Wering, L. Lo Nigro, A. van der Does, F. Locatelli, G. Basso, and M. Arico. (2005) Long-term results of a randomized trial on extended use of high dose L-asparaginase for standard risk childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*, 23(28): 7161-7.
17. Amylon, M.D., J. Shuster, J. Pullen, C. Berard, M.P. Link, M. Wharam, J. Katz, A. Yu, J. Laver, Y. Ravindranath, J. Kurtzberg, S. Desai, B. Camitta, and S.B. Murphy. (1999) Intensive high-dose asparaginase consolidation improves survival for pediatric patients with T cell acute lymphoblastic leukemia and advanced stage lymphoblastic lymphoma: a Pediatric Oncology Group study. *Leukemia*, 13(3): 335-42.
18. Stock, W. (2010) Adolescents and young adults with acute lymphoblastic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2010: 21-9.
19. Raetz, E.A. and W.L. Salzer. (2010) Tolerability and efficacy of L-asparaginase therapy in pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol*, 32(7): 554-63.
20. Muller, H.J. and J. Boos. (1998) Use of L-asparaginase in childhood ALL. *Crit Rev Oncol Hematol*, 28(2): 97-113.

21. Salzer, W.L., B. Asselin, J.G. Supko, M. Devidas, N.A. Kaiser, P. Plourde, N.J. Winick, G.H. Reaman, E. Raetz, W.L. Carroll, and S.P. Hunger. (2013) Erwinia asparaginase achieves therapeutic activity after pegaspargase allergy: a report from the Children's Oncology Group. *Blood*, 122(4): 507-14.
22. Woo, M.H., L.J. Hak, M.C. Storm, J.T. Sandlund, R.C. Ribeiro, G.K. Rivera, J.E. Rubnitz, P.L. Harrison, B. Wang, W.E. Evans, C.H. Pui, and M.V. Relling. (2000) Hypersensitivity or development of antibodies to asparaginase does not impact treatment outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Journal of Clinical Oncology*, 18(7): 1525-1532.
23. Vrooman, L.M., K.E. Stevenson, J.G. Supko, J. O'Brien, S.E. Dahlberg, B.L. Asselin, U.H. Athale, L.A. Clavell, K.M. Kelly, J.L. Kutok, C. Laverdiere, S.E. Lipshultz, B. Michon, M. Schorin, M.V. Relling, H.J. Cohen, D.S. Neuberg, S.E. Sallan, and L.B. Silverman. (2013) Postinduction dexamethasone and individualized dosing of Escherichia Coli L-asparaginase each improve outcome of children and adolescents with newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia: results from a randomized study--Dana-Farber Cancer Institute ALL Consortium Protocol 00-01. *J Clin Oncol*, 31(9): 1202-10.
24. Howard, S.C. and C.H. Pui. (2002) Endocrine complications in pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia. *Blood Rev*, 16(4): 225-43.
25. Raja, R.A., K. Schmiegelow, B.K. Albertsen, K. Prunsild, B. Zeller, G. Vaitkeviciene, J. Abrahamsson, M. Heyman, M. Taskinen, A. Harila-Saari, J. Kanerva, and T.L. Frandsen. (2014) Asparaginase-associated pancreatitis in children with acute lymphoblastic leukaemia in the NOPHO ALL2008 protocol. *Br J Haematol*, 165(1): 126-33.
26. Stock, W., D. Douer, D.J. DeAngelo, M. Arellano, A. Advani, L. Damon, T. Kovacsovics, M. Litzow, M. Rytting, G. Borthakur, and A. Bleyer. (2011) Prevention and management of asparaginase/pegaspargase-associated toxicities in adults and older adolescents: recommendations of an expert panel. *Leuk Lymphoma*, 52(12): 2237-53.
27. Payne, J.H. and A.J. Vora. (2007) Thrombosis and acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*, 138(4): 430-45.

28. Truelove, E., A.K. Fielding, and B.J. Hunt. (2013) The coagulopathy and thrombotic risk associated with L-asparaginase treatment in adults with acute lymphoblastic leukaemia. *Leukemia*, 27(3): 553-9.
29. Grace, R.F., S.E. Dahlberg, D. Neuberg, S.E. Sallan, J.M. Connors, E.J. Neufeld, D.J. Deangelo, and L.B. Silverman. (2011) The frequency and management of asparaginase-related thrombosis in paediatric and adult patients with acute lymphoblastic leukaemia treated on Dana-Farber Cancer Institute consortium protocols. *Br J Haematol*, 152(4): 452-9.
30. Panis, B., A.M. Vlaar, G.T. van Well, B. Granzen, J.W. Weber, A.A. Postma, and S. Klinkenberg. (2010) Posterior reversible encephalopathy syndrome in paediatric leukaemia. *Eur J Paediatr Neurol*, 14(6): 539-45.
31. Merryman, R., K.E. Stevenson, W.J. Gostic, 2nd, D. Neuberg, J. O'Brien, S.E. Sallan, and L.B. Silverman. (2012) Asparaginase-associated myelosuppression and effects on dosing of other chemotherapeutic agents in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer*, 59(5): 925-7.
32. Tong, W.H., R. Pieters, H.A. de Groot-Kruseman, W.C. Hop, J. Boos, W.J. Tissing, and I.M. van der Sluis. (2014) The toxicity of very prolonged courses of PEGasparaginase or Erwinia asparaginase in relation to asparaginase activity, with a special focus on dyslipidemia. *Haematologica*, 99(11): 1716-21.
33. Bhojwani, D., R. Darbandi, D. Pei, L.B. Ramsey, W. Chemaitilly, J.T. Sandlund, C. Cheng, C.H. Pui, M.V. Relling, S. Jeha, and M.L. Metzger. (2014) Severe hypertriglyceridaemia during therapy for childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Eur J Cancer*, 50(15): 2685-94.
34. PROTOKOL ALL-11 Treatment study protocol of the Dutch Childhood Oncology Group for children and adolescents (1–19 year) with newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia, 2013.
35. Parmentier, J.H., M. Maggi, E. Tarasco, C. Scotti, V.I. Avramis, and S.D. Mittelman. (2015) Glutaminase Activity Determines Cytotoxicity of L-Asparaginases on Most Leukemia Cell Lines. *Leuk Res*, 39(7): 757-62.
36. Yang, L., J.C. Panetta, X. Cai, W. Yang, D. Pei, C. Cheng, N. Kornegay, C.H. Pui, and M.V. Relling. (2008) Asparaginase may influence dexamethasone

- pharmacokinetics in acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*, 26(12): 1932-9.
37. Liu, C., J.D. Kawedia, C. Cheng, D. Pei, C.A. Fernandez, X. Cai, K.R. Crews, S.C. Kaste, J.C. Panetta, W.P. Bowman, S. Jeha, J.T. Sandlund, W.E. Evans, C.H. Pui, and M.V. Relling. (2012) Clinical utility and implications of asparaginase antibodies in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 26(11): 2303-9.
 38. Avramis, V.I. and P.N. Tiwari. (2006) Asparaginase (native ASNase or pegylated ASNase) in the treatment of acute lymphoblastic leukemia. *Int J Nanomedicine*, 1(3): 241-54.
 39. van der Meer, L.T., S.Y. Terry, D.S. van Ingen Schenau, K.C. Andree, G.M. Franssen, D.M. Roeleveld, J.M. Metselaar, T. Reinheckel, P.M. Hoogerbrugge, O.C. Boerman, and F.N. van Leeuwen. (2017) In Vivo Imaging of Antileukemic Drug Asparaginase Reveals a Rapid Macrophage-Mediated Clearance from the Bone Marrow. *J Nucl Med*, 58(2): 214-220.
 40. van der Meer, L.T., E. Waanders, M. Levers, H. Venselaar, D. Roeleveld, J. Boos, C. Lanvers, R.J. Bruggemann, R.P. Kuiper, P.M. Hoogerbrugge, F.N. van Leeuwen, and D.M. te Loo. (2014) A germ line mutation in cathepsin B points toward a role in asparaginase pharmacokinetics. *Blood*, 124(19): 3027-9.
 41. Patel, N., S. Krishnan, M.N. Offman, M. Krol, C.X. Moss, C. Leighton, F.W. van Delft, M. Holland, J. Liu, S. Alexander, C. Dempsey, H. Ariffin, M. Essink, T.O. Eden, C. Watts, P.A. Bates, and V. Saha. (2009) A dyad of lymphoblastic lysosomal cysteine proteases degrades the antileukemic drug L-asparaginase. *J Clin Invest*, 119(7): 1964-73.
 42. Angiolillo, A.L., R.J. Schore, M. Devidas, M.J. Borowitz, A.J. Carroll, J.M. Gastier-Foster, N.A. Heerema, T. Keilani, A.R. Lane, M.L. Loh, G.H. Reaman, P.C. Adamson, B. Wood, C. Wood, H.W. Zheng, E.A. Raetz, N.J. Winick, W.L. Carroll, and S.P. Hunger. (2014) Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of calaspargase pegol *Escherichia coli* L-asparaginase in the treatment of patients with acute lymphoblastic leukemia: results from Children's Oncology Group Study AALL07P4. *J Clin Oncol*, 32(34): 3874-82.

43. Domenech, C., X. Thomas, S. Chabaud, A. Baruchel, F. Gueyffier, F. Mazingue, A. Auvrignon, S. Corm, H. Dombret, P. Chevallier, C. Galambrun, F. Huguet, F. Legrand, F. Mechinaud, N. Vey, I. Philip, D. Liens, Y. Godfrin, D. Rigal, and Y. Bertrand. (2011) l-asparaginase loaded red blood cells in refractory or relapsing acute lymphoblastic leukaemia in children and adults: results of the GRASPALL 2005-01 randomized trial. *Br J Haematol*, 153(1): 58-65.
44. Husain, I., A. Sharma, S. Kumar, and F. Malik. (2016) Purification and characterization of glutaminase free asparaginase from *Pseudomonas otitidis*: Induce apoptosis in human leukemia MOLT-4 cells. *Biochimie*, 121: 38-51.
45. Meena, B., L. Anburajan, N.V. Vinithkumar, D. Shridhar, R.V. Raghavan, G. Dharani, and R. Kirubakaran. (2016) Molecular expression of l-asparaginase gene from *Nocardiosis alba* NIOT-VKMA08 in *Escherichia coli*: A prospective recombinant enzyme for leukaemia chemotherapy. *Gene*, 590(2): 220-6.
46. Offman, M.N., M. Krol, N. Patel, S. Krishnan, J. Liu, V. Saha, and P.A. Bates. (2011) Rational engineering of L-asparaginase reveals importance of dual activity for cancer cell toxicity. *Blood*, 117(5): 1614-21.
47. Sannikova, E.P., N.V. Bulushova, S.E. Cheperegin, Gubaydullin, II, G.G. Chestukhina, V.V. Ryabichenko, I.A. Zalunin, E.K. Kotlova, G.E. Konstantinova, T.S. Kubasova, A.A. Shtil, V.S. Pokrovsky, S.V. Yarotsky, B.D. Efremov, and D.G. Kozlov. (2016) The Modified Heparin-Binding L-Asparaginase of *Wolinella succinogenes*. *Mol Biotechnol*, 58(8-9): 528-39.
48. Narta, U.K., S.S. Kanwar, and W. Azmi. (2007) Pharmacological and clinical evaluation of L-asparaginase in the treatment of leukemia. *Crit Rev Oncol Hematol*, 61(3): 208-21.
49. Shinnick, S.E., M.L. Browning, and S.E. Koontz. (2013) Managing hypersensitivity to asparaginase in pediatrics, adolescents, and young adults. *J Pediatr Oncol Nurs*, 30(2): 63-77.
50. Rizzari, C., V. Conter, J. Sary, A. Colombini, A. Moericke, and M. Schrappe. (2013) Optimizing asparaginase therapy for acute lymphoblastic leukemia. *Curr Opin Oncol*, 25 Suppl 1: S1-9.
51. Avramis, V.I., S. Sencer, A.P. Periclou, H. Sather, B.C. Bostrom, L.J. Cohen, A.G. Ettinger, L.J. Ettinger, J. Franklin, P.S. Gaynon, J.M. Hilden, B. Lange, F.

- Majlessipour, P. Mathew, M. Needle, J. Neglia, G. Reaman, J.S. Holcenberg, and L. Stork. (2002) A randomized comparison of native *Escherichia coli* asparaginase and polyethylene glycol conjugated asparaginase for treatment of children with newly diagnosed standard-risk acute lymphoblastic leukemia: a Children's Cancer Group study. *Blood*, 99(6): 1986-94.
52. Vrooman, L.M., J.G. Supko, D.S. Neuberg, B.L. Asselin, U.H. Athale, L. Clavell, K.M. Kelly, C. Laverdiere, B. Michon, M. Schorin, H.J. Cohen, S.E. Sallan, and L.B. Silverman. (2010) Erwinia asparaginase after allergy to *E. coli* asparaginase in children with acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer*, 54(2): 199-205.
53. Seibel, N.L., P.G. Steinherz, H.N. Sather, J.B. Nachman, C. Delaat, L.J. Ettinger, D.R. Freyer, L.A. Mattano, Jr., C.A. Hastings, C.M. Rubin, K. Bertolone, J.L. Franklin, N.A. Heerema, T.L. Mitchell, A.F. Pyesmany, M.K. La, C. Edens, and P.S. Gaynon. (2008) Early postinduction intensification therapy improves survival for children and adolescents with high-risk acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children's Oncology Group. *Blood*, 111(5): 2548-55.
54. Keating, G.M. (2013) Asparaginase *Erwinia chrysanthemi* (Erwinaze(R)): a guide to its use in acute lymphoblastic leukemia in the USA. *BioDrugs*, 27(4): 413-8.
55. Billett, A.L., A. Carls, R.D. Gelber, and S.E. Sallan. (1992) Allergic reactions to *Erwinia* asparaginase in children with acute lymphoblastic leukemia who had previous allergic reactions to *Escherichia coli* asparaginase. *Cancer*, 70(1): 201-6.
56. Moghrabi, A., D.E. Levy, B. Asselin, R. Barr, L. Clavell, C. Hurwitz, Y. Samson, M. Schorin, V.K. Dalton, S.E. Lipshultz, D.S. Neuberg, R.D. Gelber, H.J. Cohen, S.E. Sallan, and L.B. Silverman. (2007) Results of the Dana-Farber Cancer Institute ALL Consortium Protocol 95-01 for children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 109(3): 896-904.
57. Albertsen, B.K., H. Schroder, P. Jakobsen, V.I. Avramis, H.J. Muller, K. Schmiegelow, and N.T. Carlsen. (2002) Antibody formation during intravenous

- and intramuscular therapy with Erwinia asparaginase. *Med Pediatr Oncol*, 38(5): 310-6.
58. Albertsen, B.K., H. Schroder, P. Jakobsen, H.J. Muller, N.T. Carlsen, and K. Schmiegelow. (2001) Monitoring of Erwinia asparaginase therapy in childhood ALL in the Nordic countries. *Br J Clin Pharmacol*, 52(4): 433-7.
 59. Tong, W.H., R. Pieters, G.J. Kaspers, D.M. te Loo, M.B. Bierings, C. van den Bos, W.J. Kollen, W.C. Hop, C. Lanvers-Kaminsky, M.V. Relling, W.J. Tissing, and I.M. van der Sluis. (2014) A prospective study on drug monitoring of PEGasparaginase and Erwinia asparaginase and asparaginase antibodies in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 123(13): 2026-33.
 60. Plourde, P.V., S. Jeha, N. Hijiya, F.G. Keller, L.B. Silverman, S.R. Rheingold, Z.E. Dreyer, G.V. Dahl, T. Mercedes, C. Lai, and T. Corn. (2014) Safety profile of asparaginase Erwinia chrysanthemi in a large compassionate-use trial. *Pediatr Blood Cancer*, 61(7): 1232-8.
 61. van der Sluis, I.M., L.M. Vrooman, R. Pieters, A. Baruchel, G. Escherich, N. Goulden, V. Mondelaers, J. Sanchez de Toledo, C. Rizzari, L.B. Silverman, and J.A. Whitlock. (2016) Consensus expert recommendations for identification and management of asparaginase hypersensitivity and silent inactivation. *Haematologica*, 101(3): 279-85.
 62. Tong, W.H., R. Pieters, W.J. Tissing, and I.M. van der Sluis. (2014) Desensitization protocol should not be used in acute lymphoblastic leukemia patients with silent inactivation of PEGasparaginase. *Haematologica*, 99(7): e102-4.
 63. Panosyan, E.H., N.L. Seibel, S. Martin-Aragon, P.S. Gaynon, I.A. Avramis, H. Sather, J. Franklin, J. Nachman, L.J. Ettinger, M. La, P. Steinherz, L.J. Cohen, S.E. Siegel, and V.I. Avramis. (2004) Asparaginase antibody and asparaginase activity in children with higher-risk acute lymphoblastic leukemia: Children's Cancer Group Study CCG-1961. *J Pediatr Hematol Oncol*, 26(4): 217-26.
 64. Lenz, H.J. (2007) Management and preparedness for infusion and hypersensitivity reactions. *Oncologist*, 12(5): 601-9.

65. Kloos, R.Q., R. Pieters, G. Escherich, and I.M. van der Sluis. (2016) Allergic-like reactions to asparaginase: Atypical allergies without asparaginase inactivation. *Pediatr Blood Cancer*, 63(11): 1928-34.
66. Wang, B., M.V. Relling, M.C. Storm, M.H. Woo, R. Ribeiro, C.H. Pui, and L.J. Hak. (2003) Evaluation of immunologic crossreaction of anti-asparaginase antibodies in acute lymphoblastic leukemia (ALL) and lymphoma patients. *Leukemia*, 17(8): 1583-8.
67. Zalewska-Szewczyk, B., A. Gach, K. Wyka, J. Bodalski, and W. Mlynarski. (2009) The cross-reactivity of anti-asparaginase antibodies against different L-asparaginase preparations. *Clin Exp Med*, 9(2): 113-6.
68. Schrey, D., S. Borghorst, C. Lanvers-Kaminsky, G. Hempel, J. Gerss, A. Moricke, M. Schrappe, and J. Boos. (2010) Therapeutic drug monitoring of asparaginase in the ALL-BFM 2000 protocol between 2000 and 2007. *Pediatr Blood Cancer*, 54(7): 952-8.
69. Willer, A., J. Gerss, T. Konig, D. Franke, H.J. Kuhnel, G. Henze, A. von Stackelberg, A. Moricke, M. Schrappe, J. Boos, and C. Lanvers-Kaminsky. (2011) Anti-*Escherichia coli* asparaginase antibody levels determine the activity of second-line treatment with pegylated *E coli* asparaginase: a retrospective analysis within the ALL-BFM trials. *Blood*, 118(22): 5774-82.
70. Szebeni, J. (2005) Complement activation-related pseudoallergy: a new class of drug-induced acute immune toxicity. *Toxicology*, 216(2-3): 106-21.
71. Garay, R.P., R. El-Gewely, J.K. Armstrong, G. Garratty, and P. Richette. (2012) Antibodies against polyethylene glycol in healthy subjects and in patients treated with PEG-conjugated agents. *Expert Opin Drug Deliv*, 9(11): 1319-23.
72. Armstrong, J.K., G. Hempel, S. Koling, L.S. Chan, T. Fisher, H.J. Meiselman, and G. Garratty. (2007) Antibody against poly(ethylene glycol) adversely affects PEG-asparaginase therapy in acute lymphoblastic leukemia patients. *Cancer*, 110(1): 103-11.
73. Fernandez, C.A., E. Stewart, J.C. Panetta, M.R. Wilkinson, A.R. Morrison, F.D. Finkelman, J.T. Sandlund, C.H. Pui, S. Jeha, M.V. Relling, and P.K. Campbell. (2014) Successful challenges using native *E. coli* asparaginase after

- hypersensitivity reactions to PEGylated *E. coli* asparaginase. *Cancer Chemother Pharmacol*, 73(6): 1307-13.
74. Abu Lila, A.S., H. Kiwada, and T. Ishida. (2013) The accelerated blood clearance (ABC) phenomenon: clinical challenge and approaches to manage. *J Control Release*, 172(1): 38-47.
 75. Poppenborg, S.M., J. Wittmann, W. Walther, G. Brandenburg, R. Krahmer, J. Baumgart, and F. Leenders. (2016) Impact of anti-PEG IgM antibodies on the pharmacokinetics of pegylated asparaginase preparations in mice. *Eur J Pharm Sci*, 91: 122-30.
 76. Chen, S.H., D. Pei, W. Yang, C. Cheng, S. Jeha, N.J. Cox, W.E. Evans, C.H. Pui, and M.V. Relling. (2010) Genetic variations in GRIA1 on chromosome 5q33 related to asparaginase hypersensitivity. *Clin Pharmacol Ther*, 88(2): 191-6.
 77. Rajic, V., M. Debeljak, K. Goricar, and J. Jazbec. (2015) Polymorphisms in GRIA1 gene are a risk factor for asparaginase hypersensitivity during the treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma*: 1-6.
 78. Fernandez, C.A., C. Smith, W. Yang, M. Date, D. Bashford, E. Larsen, W.P. Bowman, C. Liu, L.B. Ramsey, T. Chang, V. Turner, M.L. Loh, E.A. Raetz, N.J. Winick, S.P. Hunger, W.L. Carroll, S. Onengut-Gumuscu, W.M. Chen, P. Concannon, S.S. Rich, P. Scheet, S. Jeha, C.H. Pui, W.E. Evans, M. Devidas, and M.V. Relling. (2014) HLA-DRB1*07:01 is associated with a higher risk of asparaginase allergies. *Blood*, 124(8): 1266-76.
 79. Fernandez, C.A., C. Smith, W. Yang, C.G. Mullighan, C. Qu, E. Larsen, W.P. Bowman, C. Liu, L.B. Ramsey, T. Chang, S.E. Karol, M.L. Loh, E.A. Raetz, N.J. Winick, S.P. Hunger, W.L. Carroll, S. Jeha, C.H. Pui, W.E. Evans, M. Devidas, and M.V. Relling. (2015) Genome-wide analysis links NFATC2 with asparaginase hypersensitivity. *Blood*, 126(1): 69-75.
 80. Rawlins, M.D. and J.W. Thompson. Pathogenesis of adverse drug reactions. *Textbook of adverse drug reactions*, ed. D.M. Davies. Vol. 10. 1977, Oxford: Oxford University Press.
 81. Schnyder, B. and K. Brockow. (2015) Pathogenesis of drug allergy--current concepts and recent insights. *Clin Exp Allergy*, 45(9): 1376-83.

82. Johansson, S.G., T. Bieber, R. Dahl, P.S. Friedmann, B.Q. Lanier, R.F. Lockey, C. Motala, J.A. Ortega Martell, T.A. Platts-Mills, J. Ring, F. Thien, P. Van Cauwenberge, and H.C. Williams. (2004) Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003. *J Allergy Clin Immunol*, 113(5): 832-6.
83. Ozdemir, V., W. Kalow, B.K. Tang, A.D. Paterson, S.E. Walker, L. Endrenyi, and A.D. Kashuba. (2000) Evaluation of the genetic component of variability in CYP3A4 activity: a repeated drug administration method. *Pharmacogenetics*, 10(5): 373-88.
84. Gezsi, A., O. Lautner-Csorba, D.J. Erdelyi, G. Hullam, P. Antal, A.F. Semsei, N. Kutszegi, M. Hegyi, K. Csordas, G. Kovacs, and C. Szalai. (2015) In interaction with gender a common CYP3A4 polymorphism may influence the survival rate of chemotherapy for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenomics J*, 15(3): 241-7.
85. Elens, L., R. Bouamar, D.A. Hesselink, V. Haufroid, I.P. van der Heiden, T. van Gelder, and R.H. van Schaik. (2011) A new functional CYP3A4 intron 6 polymorphism significantly affects tacrolimus pharmacokinetics in kidney transplant recipients. *Clin Chem*, 57(11): 1574-83.
86. Wang, D., Y. Guo, S.A. Wrighton, G.E. Cooke, and W. Sadee. (2011) Intronic polymorphism in CYP3A4 affects hepatic expression and response to statin drugs. *Pharmacogenomics J*, 11(4): 274-86.
87. Gézsi, A. Genetikai variáns kivonatoló munkafolyamatok automatikus fúziója és a bayesi relevanciaelemzés alkalmazása jelölt gén asszociációs vizsgálatokban. PhD értekezés, in *Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola*, Semmelweis Egyetem, Budapest, 2016.
88. Erdélyi, D.J. ABC-transzporter génpolimorfizmusok jelentősége gyermekkori akut limfoid leukémiában. PhD értekezés, in *Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola*, Semmelweis Egyetem, Budapest, 2009.
89. Semsei, Á.F. Transzportfehérjék genetikai polimorfizmusainak szerepe akut limfoid leukémiában; farmakogenetikai vizsgálatok. PhD értekezés, in *Molekuláris Orvostudományi Doktori Iskola*, Semmelweis Egyetem, Budapest, 2011.

90. Sági, J. A gyermekkori akut limfoid leukémia és az aszparagináz-allergia molekuláris genetikai háttere. Diplomamunka, in Genetikai, Sejt- és Immunbiológiai Intézet, Semmelweis Egyetem, Budapest, 2015.
91. Cao, H., Y. Wang, W. Zhang, X. Chai, X. Zhang, S. Chen, F. Yang, C. Zhang, Y. Guo, Y. Liu, Z. Tang, C. Chen, Y. Xue, H. Zhen, Y. Xu, B. Rao, T. Liu, M. Zhao, W. Zhang, Y. Li, X. Zhang, L.C. Tellier, A. Krogh, K. Kristiansen, J. Wang, and J. Li. (2013) A short-read multiplex sequencing method for reliable, cost-effective and high-throughput genotyping in large-scale studies. *Hum Mutat*, 34(12): 1715-20.
92. Lautner-Csorba, O. A gyermekkori akut limfoid leukémiára való hajlam genetikai, valamint a kezelésre adott válasz farmakogenetikai vizsgálata. PhD értekezés, in Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola, Semmelweis Egyetem Budapest, 2013.
93. Gonzalez-Galarza, F.F., L.Y. Takeshita, E.J. Santos, F. Kempson, M.H. Maia, A.L. da Silva, A.L. Teles e Silva, G.S. Ghattaoraya, A. Alfirevic, A.R. Jones, and D. Middleton. (2015) Allele frequency net 2015 update: new features for HLA epitopes, KIR and disease and HLA adverse drug reaction associations. *Nucleic Acids Res*, 43(Database issue): D784-8.
94. Benjamini, Y. and Y. Hochberg. (1995) Controlling the False Discovery Rate - a Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society Series B-Methodological*, 57(1): 289-300.
95. Storey, J.D. (2002) A direct approach to false discovery rates. *Journal of the Royal Statistical Society Series B-Statistical Methodology*, 64: 479-498.
96. Antal, P., A. Millinghoffer, G. Hullám, G. Hajós, P. Sárközy, A. Gézsi, C. Szalai, and A. Falus. Bayesian, systems-based, multilevel analysis of associations for complex phenotypes: from interpretation to decisions, in *Probabilistic Graphical Models for Genetics, Genomics and Postgenomics*, C. Sinoquet and R. Mourad, Editors., Oxford University Press, Oxford, 2014: 318-352.
97. Hullám, G., P. Antal, C. Szalai, and A. Falus. Evaluation of a Bayesian model-based approach in GA studies. in *Proceedings of the third International Workshop on Machine Learning in Systems Biology*. D. Sašo, G. Pierre, and R.

- Juho, Editors.,2009. PMLR: Proceedings of Machine Learning Research. p. 30-43.
98. Antal, P., A. Millinghoffer, G. Hullám, C. Szalai, and A. Falus. A Bayesian View of Challenges in Feature Selection: Feature Aggregation, Multiple Targets, Redundancy and Interaction. in Proceedings of the Workshop on New Challenges for Feature Selection in Data Mining and Knowledge Discovery at ECML/PKDD 2008. S. Yvan, et al., Editors.,2008. PMLR: Proceedings of Machine Learning Research. p. 74-89.
99. Antal, P., G. Hullam, A. Gézsi, and A. Millinghoffer. Learning complex bayesian network features for classification. in Proceedings of the Third European Workshop on Probabilistic Graphical Models. M. Studený and J. Vomlel, Editors.,2006. Action M Agency: Prague: Czech Republic. p. 9–16.
100. Lautner-Csorba, O., A. Gezsi, D.J. Erdelyi, G. Hullam, P. Antal, A.F. Semsei, N. Kutszegi, G. Kovacs, A. Falus, and C. Szalai. (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(8): e69843.
101. Ungvari, I., G. Hullam, P. Antal, P.S. Kiszal, A. Gezsi, E. Hadadi, V. Virag, G. Hajos, A. Millinghoffer, A. Nagy, A. Kiss, A.F. Semsei, G. Temesi, B. Melegh, P. Kiszfali, M. Szell, A. Bikov, G. Galffy, L. Tamasi, A. Falus, and C. Szalai. (2012) Evaluation of a partial genome screening of two asthma susceptibility regions using bayesian network based bayesian multilevel analysis of relevance. PLoS One, 7(3): e33573.
102. Lautner-Csorba, O., A. Gezsi, A.F. Semsei, P. Antal, D.J. Erdelyi, G. Schermann, N. Kutszegi, K. Csordas, M. Hegyi, G. Kovacs, A. Falus, and C. Szalai. (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.
103. Stephens, M., N.J. Smith, and P. Donnelly. (2001) A New Statistical Method for Haplotype Reconstruction from Population Data. American Journal of Human Genetics, 68(4): 978-989.

104. Stephens, M. and P. Scheet. (2005) Accounting for Decay of Linkage Disequilibrium in Haplotype Inference and Missing-Data Imputation. *American Journal of Human Genetics*, 76(3): 449-462.
105. Rebhan, M., V. Chalifa-Caspi, J. Prilusky, and D. Lancet. (1997) GeneCards: integrating information about genes, proteins and diseases. *Trends Genet*, 13(4): 163.
106. Maglott, D., J. Ostell, K.D. Pruitt, and T. Tatusova. (2005) Entrez Gene: gene-centered information at NCBI. *Nucleic Acids Res*, 33(Database issue): D54-8.
107. Ma, Q. and A.Y. Lu. (2011) Pharmacogenetics, pharmacogenomics, and individualized medicine. *Pharmacol Rev*, 63(2): 437-59.
108. Lombardi, G., C. Dianzani, G. Miglio, P.L. Canonico, and R. Fantozzi. (2001) Characterization of ionotropic glutamate receptors in human lymphocytes. *Br J Pharmacol*, 133(6): 936-44.
109. Ganor, Y., M. Besser, N. Ben-Zakay, T. Unger, and M. Levite. (2003) Human T cells express a functional ionotropic glutamate receptor GluR3, and glutamate by itself triggers integrin-mediated adhesion to laminin and fibronectin and chemotactic migration. *J Immunol*, 170(8): 4362-72.
110. Ganor, Y. and M. Levite. (2014) The neurotransmitter glutamate and human T cells: glutamate receptors and glutamate-induced direct and potent effects on normal human T cells, cancerous human leukemia and lymphoma T cells, and autoimmune human T cells. *J Neural Transm*, 121(8): 983-1006.
111. Pacheco, R., H. Oliva, J.M. Martinez-Navio, N. Climent, F. Ciruela, J.M. Gatell, T. Gallart, J. Mallol, C. Lluís, and R. Franco. (2006) Glutamate released by dendritic cells as a novel modulator of T cell activation. *J Immunol*, 177(10): 6695-704.
112. Pieters, R., I. Appel, H.J. Kuehnel, I. Tetzlaff-Fohr, U. Pichlmeier, I. van der Vaart, E. Visser, and R. Stigter. (2008) Pharmacokinetics, pharmacodynamics, efficacy, and safety of a new recombinant asparaginase preparation in children with previously untreated acute lymphoblastic leukemia: a randomized phase 2 clinical trial. *Blood*, 112(13): 4832-8.
113. Magri, C., R. Gardella, S.D. Barlati, D. Podavini, P. Iatropoulos, S. Bonomi, P. Valsecchi, E. Sacchetti, and S. Barlati. (2006) Glutamate AMPA receptor

- subunit 1 gene (GRIA1) and DSM-IV-TR schizophrenia: a pilot case-control association study in an Italian sample. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 141B(3): 287-93.
114. Ortiz, A.E., P. Gasso, S. Mas, C. Falcon, N. Bargallo, A. Lafuente, and L. Lazaro. (2016) Association between genetic variants of serotonergic and glutamatergic pathways and the concentration of neurometabolites of the anterior cingulate cortex in paediatric patients with obsessive-compulsive disorder. *World J Biol Psychiatry*, 17(5): 394-404.
 115. McCarthy, C., A. Carrea, and L. Diambra. (2017) Bicondon bias can determine the role of synonymous SNPs in human diseases. *BMC Genomics*, 18(1): 227.
 116. Dieli-Crimi, R., M.C. Cenit, and C. Nunez. (2015) The genetics of celiac disease: A comprehensive review of clinical implications. *J Autoimmun*, 64: 26-41.
 117. Thangavel, C., E. Boopathi, and B.H. Shapiro. (2011) Intrinsic Sexually Dimorphic Expression of the Principal Human CYP3A4 Correlated with Suboptimal Activation of GH/Glucocorticoid-Dependent Transcriptional Pathways in Men. *Endocrinology*, 152(12): 4813-24.
 118. Waxman, D.J. and M.G. Holloway. (2009) Sex Differences in the Expression of Hepatic Drug Metabolizing Enzymes. *Mol Pharmacol*, 76(2): 215-28.
 119. Yang, L., E.T. Price, C.W. Chang, Y. Li, Y. Huang, L.W. Guo, Y. Guo, J. Kaput, L. Shi, and B. Ning. (2013) Gene Expression Variability in Human Hepatic Drug Metabolizing Enzymes and Transporters. *PLoS One*, 8(4).

10 Saját publikációk jegyzéke

Az értekezésben felhasznált közlemények:

Nóra Kutszegi*, Xiaoqin Yang*, András Gézsi, Géza Schermann, Dániel J Erdélyi, Ágnes F Semsei, Krisztina M Gábor, Judit C Sági, Gábor T Kovács, András Falus, Hongyun Zhang, Csaba Szalai. (2017) *HLA-DRB1*07:01-HLA-DQA1*02:01-HLA-DQB1*02:02* haplotype is associated with a high risk of asparaginase hypersensitivity in acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* [Epub ahead of print]

IF:6,671

*megosztott első szerzők

Gezsi A, Lautner-Csorba O, Erdelyi DJ, Hullam G, Antal P, Semsei AF, **Kutszegi N**, Hegyi M, Csordas K, Kovacs G, Szalai C. (2015) In interaction with gender a common *CYP3A4* polymorphism may influence the survival rate of chemotherapy for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenomics J*, 15:(3) pp. 241-247.

IF:3,784

Kutszegi N, Semsei AF, Gezsi A, Sagi JC, Nagy V, Csordas K, Jakab Z, Lautner-Csorba O, Gabor KM, Kovacs GT, Erdelyi DJ, Szalai C. (2015) Subgroups of Paediatric Acute Lymphoblastic Leukaemia Might Differ Significantly in Genetic Predisposition to Asparaginase Hypersensitivity. *PLoS One*, 10:(10) Paper e0140136. 12 p.

IF:3,057

Egyéb eredeti közlemények:

Hegyi M, Arany A, Semsei AF, Csordas K, Eipel O, Gezsi A, **Kutszegi N**, Csoka M, Muller J, Erdelyi DJ, Antal P, Szalai C, Kovacs GT. (2017) Pharmacogenetic analysis of high-dose methotrexate treatment in children with osteosarcoma. *Oncotarget*, 8:(6) pp. 9388-9398.

IF:5.008

Rzepiel Andrea, **Kutszegi Nóra**, Cs Sági Judit, Kelemen Andrea, Pálóczi Krisztina, F Semsei Ágnes, Buzás Edit, Erdélyi Dániel János. (2016) Extracelluláris vezikulák és hematológiai malignitásokban játszott szerepük. Orvosi Hetilap, 157:(35) pp. 1379-1384.

Sagi JC*, **Kutszegi N***, Kelemen A, Fodor LE, Gezsi A, Kovacs GT, Erdelyi DJ, Szalai C, Semsei AF. (2016) Pharmacogenetics of anthracyclines. Pharmacogenomics, 17:(9) pp. 1075-1087.

*megosztott első szerzők

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:(8) Paper e69843. 13 p.

IF: 3,534

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: Paper 42. 15 p.

IF: 3,466

Semsei Ágnes, Lautner-Csorba Orsolya, **Kutszegi Nóra**, Schermann Géza, Eipel Olivér, Falus András, Szalai Csaba, Kovács T Gábor, Erdélyi Dániel. (2012) A gyermekkori akut limfoid leukémia farmakogenetikája egy gyógyszer mellékhatás példáján. Magyar Tudomány, 173:(1 különszám) pp. 90-97.

11 Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni **Prof. Dr. Falus Andrásnak**, hogy még gyógyszerészhallgatóként a SE Genetikai, Sejt- és Immunbiológiai Intézetébe befogadott, és az általa szervezett tudományos együttműködésekkel lehetővé tette, példamutatással, tanácsokkal és biztatással segítette kutatási munkámat. Köszönöm **Prof. Dr. Buzás Editnek**, hogy későbbi intézetvezetése alatt PhD hallgatóként folytathattam megkezdett munkámat.

Köszönettel tartozom **Prof. Dr. Szalai Csabának**, témavezetőmnek a szakmai irányításáért és támogatásáért, és nem hivatalos témavezetőimnek is, **Félné dr. Semsei Ágnesnek** és **Dr. Erdélyi Dánielnek** a rengeteg segítségért, tanításért, szervezésért és bátorításért, amiket az évek során kaptam tőlük. Köszönöm, hogy nyertes pályázataikkal keretet biztosítottak munkámhoz.

Köszönöm a SE II. sz. Gyermekgyógyászati Klinika igazgatójának, **Prof. Dr. Szabó Andrásnak**, hogy tudományos segédmunkatársként befogadott, és így biztosította PhD munkám befejezését. Nagyon köszönöm **Dr. Kovács Gábor** kedvességét és segítségét, valamint a Magyar Gyermekhematológusok és Gyermekonkológusok Társaságának támogatását, melyek lehetővé tették számomra az országos szintű adat- és mintagyűjtést.

Hálával tartozom **Dr. Gézi Andrásnak** a statisztikai kiértékelésekben és az informatikai megközelítésekben nyújtott sok segítségért, ötleteiért, magyarázataiért és megbízható munkájáért.

Nagyon köszönöm **Sándorné Vángor Mónikának** a laboratóriumban nyújtott segítségét, tanítását és a helyes laboratóriumi gyakorlatra való nevelését.

Köszönöm **Csányiné dr. Sági Juditnak** a részvételét a betegek genotipizálásában, hálás vagyok a szakmai, szervezési és csapatépítő feladatokba fektetett rengeteg energiájáért.

Köszönöm a TDK hallgatók: **Nagy Viktória**, **Kelemen Andrea**, **Sipos Máté** jó kérdéseit, észrevételeit és segítségét.

Köszönöm **Dr. Molnár-Érsek Barbara** és **Készné Fodor Lili** barátságát, bátorítását, témámmal kapcsolatos gondolataikat.

Házi védésem opponense, **Dr. Pós Zoltán** számos hasznos tanáccsal és korrekciós javaslattal segítette a dolgozat végső formájának kialakítását. Köszönöm kutatói és oktatói példamutatását, és hogy mindig fordulhattam hozzá kérdéseimmel.

Hálás vagyok a magyarországi gyermekhematológiai központok munkatársainak barátságos fogadtatásukért és segítségükért az adat- és mintagyűjtésben. Külön köszönöm **Dr. Gábor Krisztina Mítának** (Szegedi Tudományegyetem, Gyermekgyógyászati Klinika), **Dr. Ottóffy Gábornak** és **Dr. Vojcek Ágnesnek** (Pécsi Tudományegyetem, Gyermekgyógyászati Klinika, Onkohematológiai Osztály), **Prof. Dr. Kiss Csongornak** és **Dr. Szegedi Istvánnak** (Debreceni Egyetem, Orvos- és Egészségtudományi Centrum, Gyermekklinika, Hemato-Onkológiai Osztály), **Dr. Puskás Noéminak** (Borsod-Abaúj-Zemplén Megyei Kórház Gyermekkegészségügyi Központ, Gyermekhaematológiai és Csontvelőtranszplantációs Osztály) és **Dr. Péter Györgynek** (Heim Pál Gyermekkorház) a hozzájárulásukat és segítségüket.

Köszönettel tartozom a Pekingi Genomikai Intézetben **Hongyun Zhang**-nak, **Xiaoqing Yang**-nak és **Maocai Wu**-nak a szekvencia-alapú HLA tipizálás elvégzéséért.

Köszönöm a SE Genetikai, Sejt- és Immunbiológiai Intézet minden dolgozójának a segítséget, kedvességet és tanítást, valamint annak a légkörnek a megteremtését, amelyben öröm volt dolgozni.

Köszönöm **Dr. Vimpláti Gábornak**, hogy részmunkaidőben dolgozhattam az Óbuda Patikában, amivel támogatott PhD hallgatói éveim alatt. Köszönöm a lehetőséget, hogy gyógyszerész szakmai tudásomat elmélyíthettem és gyakorlati tapasztalatot nyerhettem, illetve azt szinten tarthattam. A gyógyszertár összes dolgozójának köszönöm a kedvességét és a tanítását.

Végül köszönöm a családomnak, szüleimnek, testvéremnek és férjemnek a támogatást, segítséget, bátorítást, tanácsaikat és szeretetüket, amely az alapját biztosította annak, hogy ez a munka megszülethessen.