

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Vladimir V. Gašić

**FARMAKOGENOMSKI I
FARMAKOTRANSKRIPTOMSKI MARKERI
ODGOVORA NA TERAPIJU
GLUKOKORTIKOIDNIM LEKOVIMA KOD DECE
SA AKUTNOM LIMFOBLASTNOM LEUKEMIJOM:
MOLEKULARNI MEHANIZAM DELOVANJA,
KLINIČKI I POPULACIONI ASPEKTI**

Doktorska disertacija

Beograd, 2019

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Vladimir V. Gašić

**PHARMACOGENOMIC AND
PHARMACOTRANSCRIPTOMIC MARKERS IN
GLUCOCORTICOID TREATMENT OF PEDIATRIC
ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA:
MOLECULAR MECHANISM OF ACTION,
CLINICAL AND POPULATION ASPECTS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2019

MENTORI:

dr Nikola Kotur, naučni saradnik, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu

Prof. dr Gordana Matić, redovni profesor, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

ČLANOVI KOMISIJE:

dr Nikola Kotur, naučni saradnik, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu

Prof. dr Gordana Matić, redovni profesor, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

Prof. dr Svetlana Radović, redovni profesor, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Branka Zukić, viši naučni saradnik, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu

Prof. dr Lidija Krivokapić Dokmanović, vanredni profesor, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane: _____2019. godine

Ova doktorska disertacija je stvarana u Laboratoriji za molekularnu biomedicinu na Institutu za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo u Beogradu.

Prvo bih želeo da se u najvećoj mogućoj meri zahvalim svojoj supruzi i ljubavi svog života, Milici, koja je bila moja velika podrška i uteha u napornim trenucima, kao i sjajan donosač pica i partner za gledanje serija i maskiranje u likove iz istih. Bez nje neki trenuci, situacije, pa čak i periodi, ne bi mogli da se prežive. Posle ovog razdoblja znam da je ona jedan veliki i trajni blagoslov za mene.

Posebnu zahvalnost dugujem šefu laboratorije, Sonji Pavlović, na smernicama, pomoći i strpljenju prilikom prepravljavanja nedostataka ove doktorske disertacije. Posebnu zahvalnost takođe gajim prema Branki Zukić koja je uvek imala odgovor za svako moje pitanje vezano za savlađivanje materije. I na kraju zahvaljujem se svom mentoru Nikoli Koturu za sav trud i mentalni napor koji je uložio u realizaciju ovog doktorata.

Zahvaljujem se i komentorki profesorki Gordani Matić na sugestijama koje su poboljšale ovu disertaciju, kao i profesorki Svetlani Radović i profesorki Lidiji Krivokapić Dokmanović.

Želim da se zahvalim svojoj porodici, kako članovima uže, tako i članovima šire porodice. Upućujem zahvalnost svom ocu Vojislavu, majci Sonji, bratu Andreju, baki Branki, ujacima Saši, Siniši, sa svojim porodicama, kao i mnogim prijateljima na podršci.

Hvala i mojim ostalim kolegama iz laba Nataši, Biljani, Tanji, Miši, Marini, Kris i ostalim članovima Laba 01 na svim odgovorima na moja pitanja. Takođe se zahvaljujem i čuvarima, posebno Vladi, na gašenju aparata kada god sam zatražio.

Zahvaljujem se i celokupnom osoblju hematoonkološkog odeljenja Univerzitetske dečje klinike u Tiršovoj, bez kojih ovaj rad ne bi bio moguć.

Na kraju svega, želeo bih da se zahvalim samom sebi što sam pisao, radio i učio koliko god je bilo potrebno bez obzira na doba dana i noći, bez obzira na umor, povremenu zablokiranost, pogubljenost ili nedostatak sna i što sam došao do ove tačke bez odustajanja.

Farmakogenomski i farmakotranskriptomski markeri odgovora na terapiju glukokortikoidnim lekovima kod dece sa akutnom limfoblastnom leukemijom: molekularni mehanizam delovanja, klinički i populacioni aspekti

SAŽETAK

Uvod. Personalizovana medicina, medicina XXI veka, nastoji da individualizuje terapiju za svakog pacijenta, kako bi lečenje bilo što efikasnije i sa što manje rizika od toksičnosti. Personalizovana medicina se danas najviše oslanja na farmakogenomiku i farmakotranskriptomiku, koje su već dale svoj doprinos unapređenju lečenja mnogih bolesti, a posebno maligniteta.

Akutna limfoblastna leukemija (ALL) predstavlja najčešći hematološki malignitet pedijatrijskog uzrasta. Mada stopa izlečenja dostiže 80-90%, ALL je i dalje glavni uzrok mortaliteta u ovih pacijenata. Terapija izaziva neželjene efekte u 75% pacijenata. Pored toga, u 1-3% pedijatrijskih pacijenata sa ALL smrtni ishod nije posledica bolesti, već je uzrokovan terapijom. Lečenje pedijatrijske ALL nije napredovalo uvođenjem novih lekova, već nastojanjem da se smanje neželjena dejstva onih lekova koji su već sastavni delovi postojećih terapijskih protokola, zbog čega su farmakogenomika i farmakotranskriptomika dobile ključno mesto u ovoj oblasti.

Glukokortikoidni lekovi (GK) se koriste u početnoj fazi lečenja ALL u dece, u fazi indukcije remisije. Od početka lečenja do 8. dana se primenjuju isključivo GK. Ipak, farmakogenomske i farmakotranskriptomске studije za glukokortikoidne lekove još uvek nisu dovele do algoritma koji bi mogao biti primenjen u lečenju dečje ALL. Stoga je izuzetno značajno nastaviti sa istraživanjima farmakogenomskih i farmakotranskriptomskih markera relevantnih za uspešnost GK terapije u dece sa ALL. Razumevanje molekularnog mehanizma dejstva GK vodi ka otkrivanju novih markera koji mogu biti iskorišćeni za optimizaciju GK terapije. Nove tehnologije, kao što je sekvenciranje nove generacije (eng, next generation sequencing, NGS) su omogućile dizajniranje panela za farmakogenomske i farmakotranskriptomске markere za različite

lekove. Korišćenje ovih panela u populaciono- farmakogenomskim studijama dovodi do saznanja koja širom otvaraju vrata prediktivnom farmakogenomskom testiranju u jednoj zemlji.

Ciljevi. Istraživanja u ovoj tezi su imala za cilj da daju doprinos farmakogenomici i farmakotranskriptomici u pedijatrijskoj ALL, kao i populacionoj-farmakogenomici, koje se odnose na terapiju GK. Specifični ciljevi su obuhvatili studiju kako potencijalni farmakogenomski markeri, varijante rs33388, rs33389, rs6198 u genu *NR3C1*, varijante rs2032582, rs1128503, rs1045642 u genu *ABCB1*, varijante rs1695, rs1138272 u genu *GSTP1* i delecije gena *GSTM1* i *GSTT1* utiču na odgovor na GK u indukcionoj fazi terapije u grupi pacijenata dečjeg uzrasta sa ALL. Pored toga, po prvi put je izučavana ekspresija duge nekodirajuće RNK *GAS5* kod ovih pacijenata i njena korelacija sa odgovorom na terapiju GK, sa ciljem da se utvrdi da li je *GAS5* novi farmakotranskripcioni marker. Treći cilj je bio izučavanje molekularnog mehanizma dejstva GK *in vitro*, sa osvrtom na ulogu *GAS5* i vezivanje transkripcionog faktora NF- κ B za DNK. Naš cilj je bio i da dizajniramo farmakogenomski panel za GK baziran na metodi NGS i sprovedemo populacionu- farmakogenomsku studiju koja će utvrditi učestalost prediktivnih markera efikasnosti GK terapije u populaciji Srbije.

Materijal i metode: 122 uzoraka periferne krvi neselektovanih pacijenata dečjeg uzrasta sa dijagnozom ALL je analizirano u farmakogenetičkoj studiju. Uzorci su sakupljeni na Univerzitetškoj dečjoj klinici u Beogradu na dan postavljanja dijagnoze. Za potrebe ispitivanja poveznosti ekspresije *GAS5* i odgovora na GK, uzeti su uzorci krvi 29 pacijenata sa dijagnozom pedijatrijske ALL iz Univerzitetske dečje klinike na dan dijagnoze (0. dan), 15. dana i 33. dana od početka faze indukcije remisije terapije. Pacijenti sa dečjom ALL su dijagnostikovani, stratifikovani u grupe rizika i tretirani prema Berlin-Frankfurt-Munster (BFM) protokolima: BFM ALL IC-2002 i BFM ALL IC-2009. Pacijenti su kao GK terapiju primali prednizon u indukcionoj fazi terapije. Svim pacijentima je na 8. dan od početka terapije meren broj limfoblasta u mikrolitru (μ L) periferne krvi, i pacijenti su podeljeni na one sa dobrim odgovorom na prednizon (DOP), ako je broj limfoblasta po μ L manji od 1000, i na one sa lošim odgovorom na prednizon (LOP), ako je broj limfoblasta po μ L veći od 1000. Od broja limfoblasta u perifernoj krvi 8. dana terapije najviše zavise prognoza bolesti i preživljavanje.

Detekcija homozigotnih delecija gena *GSTM1* i *GSTT1* je vršena multiplom lančanom reakcijom polimeraze (multiplex PCR). Varijanta rs2032582 gena *ABCB1* je genotipizirana metodom amplifikaciono-refraktornog mutacionog sistema lančane reakcije polimeraze (ARMS-PCR). Varijante rs1045642 i rs1128503 gena *ABCB1* su genotipizirane uz pomoć metode kompetitivni alel specifični PCR (KASP). Varijante rs1695 i rs1138272 gena *GSTP1* su detektovane istom KASP metodom. Varijante rs33389, rs33388 i rs6198 gena *NR3C1* su genotipizirane korišćenjem TaqMan SNP eseja.

Nivo ekspresije *GAS5* je određivan metodom Real-Time PCR (qRT-PCR), a rezultati su procenjavani u odnosu na *GAPDH* ekspresiju metodom $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Analiza DNK-proteinskih interakcija je vršena metodom usporene elektroforetske pokretljivosti (eng. electrophoretic mobility shift assay, EMSA) u HeLa ćelijama koje su transfektovane ekspresionim vektorom u koji je ukloniran *GAS5* gen.

U populaciono-farmakogenomskoj studiji je korišćena metoda NGS i TruSightOne platforma (Illumina). Panelom za farmakgenomske markere za odgovor na GK terapiju, dizajniranim u ovom istraživanju, analizirano je 100 zdravih ispitanika iz Srbije.

Rezultati: U farmakogenetičkoj studiji je pokazano da su broj leukocita na dan dijagnoze i broj limfoblasta 8. dana u pozitivnoj korelaciji (rs = 0,44, p = 0,000001). Takođe, pacijenti koji su bolovali od T-ćelijske leukemije su imali veći rizik od lošeg odgovora na terapiju GK (≥ 1000 blasta/ μL 8. dana) (Fišerov test, p = 0,043) u odnosu na pacijente sa B-ćelijskom leukemijom. Retki GG genotip varijante rs6198 u genu *NR3C1* je asociran sa LOP (Fišerov test, p = 0,030). Haplotip CAA (rs33389-rs33388-rs6198) u genu *NR3C1* je asociran sa DOP (Fišerov test, p = 0,030). Obe povezanosti su ostale statističke značajne ili granično statistički značajne kada su normalizovane za pol, uzrast i broj leukocita (logistička regresija, p = 0,036 i p = 0,052, redom). Haplotip GC (rs1695-rs1138272) gena *GSTP1* je asociran sa DOP (hi kvadrat test, p = 0,036).

Kada je u pitanju studija asocijacije između nivoa ekspresije *GAS5* i odgovora na GK u fazi indukcije remisije terapije pedijatrijske ALL, pokazano je da je nivo ekspresije *GAS5* 15. dana bio viši u odnosu na nivo ekspresije na dan dijagnoze (Wilcoxon-ov test sume rangova, p < 0.0005). Nivo ekspresije *GAS5* 33. dana se smanjio u odnosu na nivo ekspresije 15. dana (Wilcoxon-ov test sume rangova, p < 0.0005), ali je i dalje bio viši

nego na dan dijagnoze (Wilcoxon-ov test sume rangova, $p = 0.001$). Ovi rezultati ukazuju na to da nivo ekspresije *GAS5* zavisi od intenziteta terapije GK lekovima.

Pokazano je još da je viši nivo ekspresije *GAS5* na dan dijagnoze asociran sa manjim brojem blasta (< 100 blasta po μL) 8. dana (Mann-Whitney test, $p = 0.016$), ukazujući na pozitivan efekat *GAS5* na odgovor na terapiju GK u inicijalnoj fazi terapije ALL. Analiziran je i odnos između nivoa ekspresije *GAS5* 15. dana i na dan dijagnoze. Što je ekspresija *GAS5* bila viša 15. dana u odnosu na nivo ekspresije na dan dijagnoze, veći je bio broj blasta 8. dana terapijskog protokola (Mann-Whitney test, $p = 0.009$), ukazujući na asocijaciju između lošeg terapijskog odgovora i porasta *GAS5* ekspresije tokom terapijske faze indukcije remisije.

U *in vitro* analizi mehanizma dejstva GK na molekularnom nivou, pokazano je da se nivo ekspresije *GAS5* u HeLa ćelijama menja zavisno od doze GK kojom su ćelije tretirane. Tokom analize DNK-protein interakcija EMSA metodom, pokazano je da, sa povećanjem ekspresije *GAS5*, raste afinitet vezivanja proteinskog kompleksa u kome učestvuje NF- κ B, za regulatorni element za koji se vezuje NF- κ B. Ovo znači da *GAS5* učestvuje u signalnom putu kojim GK deluju na transkripcioni kompleks koji se vezuje za regulatorni element za koji se vezuje NF- κ B. Rezultati su takođe pokazali da se DNK-vezujuća aktivnost proteinskog kompleksa koji se vezuje za regulatorni element, za koji se vezuje NF- κ B, menja u prisustvu GK.

U okviru ove studije dizajniran je panel baziran na NGS tehnologiji koji omogućava sveobuhvatnu analizu egzoma na farmakogene i farmakogenomske markere značajne za odgovor na terapiju GK. Naš farmakogenomski panel za GK je obuhvatio 22 farmakogena u kojima je detektovano 19 farmakogenomskih varijanti za koje je pokazano da utiču na odgovor na GK. U ovim genima je detektovano i 12 novih potencijalnih farmakogenomskih markera za GK čiji je značaj pokazan korišćenjem predikcionog algoritma Polyphen. Među detektovanim varijantama, posebnu pažnju zaslužuje njih 6: 3 varijante po predikciji imaju najveći impakt na funkcionalnost enzima koji kodiraju (*ABCB1* c.947A>G, *NCOA3* rs138733364 i *TBX21* rs14059812), 2 varijante su zanimljive kao potencijalni farmakogenomski markeri zbog svoje visoke učestalosti (*FCER2* rs28364072 – 34% i *NCOA3* rs2230782 – 12.5%), i varijanta koja je učestalija u populaciji Srbije nego u Evropi, *NCOA3* rs6094752.

Zaključak: Naši rezultati su pokazali da su varijanta rs6198 u genu *NR3C1* i haplotip rs1695-rs1138272 u genu *GSTP1* potencijalni novi farmakogenetički markeri odgovora na terapiju GK kod dece obolele od ALL. Pored toga, u našoj pionirskoj studiji duge nekodirajuće RNK *GAS5* kao potencijalnog farmakotranskripcionog markera, pokazano je da bi nivo ekspresije *GAS5* mogao da bude marker terapijskog odgovora na GK u fazi lečenja indukcija remisije kod dece obolele od ALL. Za *GAS5* je utvrđeno da učestvuje u signalnom putu u kojem GK deluju na transkripcioni kompleks koji se vezuje za NF-κB regulatorni element. Prva populaciono-farmakogenomska studija za GK u Srbiji u kojoj je korišćen farmakogenomski panel za GK, dizajniran u ovoj studiji, je ukazala na postojanje 12 novih potencijalnih farmakogenetičkih markera za odgovor na GK terapiju. Dalje proučavanje farmakogenomskih i farmakotranskriptomskih markera, razumevanje molekularnog mehanizma lekova, kao i korišćenje metoda sveobuhvatnih analiza genoma i transkriptoma baziranih na NGS, bi mogli da doprinesu stvaranju prediktivnih farmakogenomskih i farmakotranskriptomskih testova odgovora na GK, što bi doprinelo individualizaciji terapije i boljem ishodu lečenja pacijenata koji boluju od pedijatrijske ALL.

Ključne reči: farmakogenetika, farmakotranskriptomika, populaciona farmakogenomika, pedijatrijska akutna limfoblastna leukemija, glukokortikoidni lekovi, *GAS5*, NF-κB, sekvenciranje nove generacije

Naučna oblast: Molekularna biologija eukariota

Uža naučna oblast: Molekularna genetika

UDK: [[575.22 + 575.117] : [615.262 + 615.27]] : [616.155.392 + 616-053.2](043.3)

Pharmacogenomic and Pharmacotranscriptomic Markers in Glucocorticoid Treatment of Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia: Molecular Mechanism of Action, Clinical and Population Aspects

ABSTRACT

Introduction. Personalized medicine, the medicine of the XXI century, aims to individualize therapy for each patient, in order for the treatment to be as efficient and safe as possible. Today, personalized medicine is the most reliant on pharmacogenomics and pharmacotranscriptomics, which have already given their contribution to enhancing treatment of many diseases, especially malignancies.

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most common hematological malignancy of childhood. Even though the percentage of cured patients reaches 80-90%, ALL is still the main cause of mortality in this group of patients. Therapy causes side effects in 75% of patients. Aside from that, 1-3% of pediatric ALL patients die because of therapy side effects rather than the disease itself. Treatment of pediatric ALL wasn't improved by the introduction of new drugs, but by decreasing the side effects of the drugs which are already included in existing protocols. Due to this fact, pharmacogenomics and pharmacotranscriptomics have gained key positions in this field.

Glucocorticoid drugs (GC) are used in the initial phase of childhood ALL treatment, in the phase of remission induction therapy. From the beginning of the treatment until day 8, GCs are exclusively applied. Pharmacogenomic and pharmacotranscriptomic studies for GC drugs have yet to produce an algorithm that could be applied in childhood ALL treatment. Therefore, it is of extreme importance to continue researching pharmacogenomic and pharmacotranscriptomic markers relevant to the success of the GC therapy of children with ALL. Understanding the molecular mechanism of action of GC can lead to discovery of new markers that could be used for the optimization of GC therapy. New technologies, such as next generation sequencing (NGS) have created a possibility for designing panels for pharmacogenomic and pharmacotranscriptomic markers of response to different drugs. Utilization of these panels in population pharmacogenomic studies can lead to new knowledge that could open wide the doors to predictive pharmacogenomic testing.

Goals. The goal of the research conducted in this thesis aims to contribute to pharmacogenomics and pharmacotranscriptomics in pediatric ALL, as well as population pharmacogenomics, relevant to GC therapy. The thesis includes a study of potential pharmacogenomics markers, variants rs33388, rs33389, rs6198 in the *NR3C1* gene, variants rs2032582, rs1128503, rs1045642 in the *ABCB1* gene, variants rs1695, rs1138272 in the *GSTP1* gene and the deletions of *GSTM1* and *GSTT1* gene and their influence on GC response in the induction therapy phase of the childhood ALL. Aside from that, for the first time, correlation between GC response and expression level of the long noncoding RNA *GAS5* in patients with childhood ALL was conducted. The aim was to determine whether *GAS5* is a new pharmacotranscriptomic marker. The third goal was to study the molecular mechanism of GC effect *in vitro*, with an emphasis on studying the role of *GAS5* in binding of the transcription factor NF- κ B to DNA. Our last goal was also to design a pharmacogenomic panel for GC based on the NGS methodology and to conduct a population pharmacogenomics study which will determine the frequency of predictive markers of GC therapy efficacy in the population of Serbia.

Materials and Methods: 122 samples of peripheral blood were taken from unselected childhood patients with ALL and analyzed in the pharmacogenetics study. The samples were collected at the University children's hospital in Belgrade on the day of diagnosis. For the purpose of the investigating the association between *GAS5* expression and GC response, blood samples were taken from 29 patients with pediatric ALL from the University children's hospital on the day of diagnosis (day 0), day 15 and day 33 since the beginning of the remission induction phase of therapy. Patients with childhood ALL were diagnosed, stratified into risk categories and treated according to the Berlin-Frankfurt-Munster (BFM) protocols: BFM ALL IC-2002 and BFM ALL IC-2009. Patients received GC therapy in the form of prednisone during the induction phase of therapy. On day 8 since the beginning of treatment, the number of lymphoblasts in microliter (μ l) of peripheral blood was measured. According to this measurement, the patients were divided into prednisone good responders (PGR), if the number of lymphoblasts per μ l was less than 1000, and prednisone poor responders (PPR), if the number of lymphoblasts per μ l was greater than 1000. The prognosis and survival depends the most on the number of lymphoblasts in the peripheral blood on day 8 of treatment.

The detection of homozygous deletions of *GSTM1* and *GSTT1* genes was performed using the multiple polymerase chain reaction (multiplex PCR). The variants rs2032582 of the *ABCB1* gene is genotyped using the amplification-refractory mutation system method of polymerase chain reaction (ARMS-PCR). The variants rs1045642 and rs1128503 of the *ABCB1* gene were genotyped using kompetitive allele specific PCR (KASP). The variants rs1695 and rs1138272 of the *GSTP1* gene were also detected using the KASP method. The variants rs33389, rs33388 and rs6198 of the *NR3C1* gene were genotyped using the TaqMan SNP assay.

The level of expression of *GAS5* was determined using the Real-Time PCR (qRT-PCR) method and the results were evaluated in comparison to *GAPDH* expression using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method.

The analysis of DNA-protein interactions was performed using the electrophoretic mobility shift assay (EMSA) in HeLa cells transfected with the expression vector into which the *GAS5* gene was cloned.

NGS methodology and the TruSightOne platform (Illumina) were used for the population pharmacogenomic study. Using the panel for analyzing pharmacogenomic markers of GC therapy response designed in this study, 100 healthy subjects from Serbia were examined.

Results: The results of pharmacogenetic study showed that the number of leucocytes on the day of diagnosis and the number of lymphoblasts on day 8 were in positive correlation ($r_s = 0,44$, $p = 0,000001$). Patients suffering from T-cell leukemia had a greater risk of being PPR (≥ 1000 blasts/ μ l on day 8) (Fisher's test, $p = 0,043$) when compared to the patients with B-cell leukemia. The rare GG genotype of the variant rs6198 in the *NR3C1* gene was associated with PPR (Fisher's test, $p = 0,030$). The CAA haplotype (rs33389-rs33388-rs6198) of the *NR3C1* gene was associated with PGR (Fisher's test, $p = 0,030$). Both associations remained statistically significant or borderline statistically significant when normalized for gender, age and the number of leucocytes (logistic regression, $p = 0,036$ and $p = 0,052$, respectively). The haplotype GC (rs1695-rs1138272) of the *GSTP1* gene was associated with PGR (chi-square test, $p = 0,036$).

The results of the study of association between the level of expression of *GAS5* and GC response in the remission induction therapy phase of pediatric ALL showed that the level of expression of *GAS5* on day 15 was higher compared to the level of expression on the day of diagnosis (Wilcoxon sign rank test, $p < 0,0005$). The level of expression of *GAS5*

on day 33 was lower compared to the expression level on day 15 (Wilcoxon sign rank test, $p < 0,0005$), but it was still higher than on the day of diagnosis (Wilcoxon sign rank test, $p = 0,001$). These results imply that *GAS5* expression level depends on GC therapy dose.

It was shown that a higher level of expression of *GAS5* on the day of diagnosis was associated with a lower number of blasts (< 100 blasts per μl) on day 8 (Mann Whitney test, $p = 0,016$), showing a positive effect of *GAS5* on GC therapy response in the initial phase of ALL treatment. The ratio between *GAS5* expression levels on day 15 and on the day of diagnosis was also analyzed. The higher the expression level of *GAS5* on day 15, compared to the expression level on the day of diagnosis, the higher the number of blasts was on day 8 of the therapy protocol (Mann-Whitney test, $p = 0,009$), showing an association between poor therapy response and an elevation of *GAS5* expression levels during the remission induction therapy phase.

In the *in vitro* analysis of the mechanism of action of GC on the molecular level, it was shown that the level of expression of *GAS5* in HeLa cells changes depending on the GC dose. EMSA analysis of DNA-protein interactions showed that *GAS5* overexpression increased the binding affinity of the protein complex, in which NF- κ B participates, to the NF- κ B regulatory element. This means that *GAS5* participates in the signaling pathway in which GCs act on the transcription complex which binds to the NF- κ B regulatory element. The results have also shown that the DNA-binding activity of the protein complex that binds to the NF- κ B regulatory element changed in the presence of GC.

For the purposes of this research, a panel, based on NGS technology, which enables a whole-exome analysis of pharmacogenes and pharmacogenomic markers important for GC therapy response was designed. Our pharmacogenomic panel for GC included 22 pharmacogenes in which 19 pharmacogenomic variants were detected. These 19 pharmacogenomic variants have been previously shown to influence GC response. In the 22 studied pharmacogenes, 12 new potential pharmacogenomic markers of GC response were detected, whose significance was shown using Polyphen predictive algorithm. Amongst the detected variants, special attention should be given to 6 of them: 3 variants, according to the predictions, have the greatest impact on the functionality of the enzymes which they encode (*ABCB1* c.947A>G, *NCOA3* rs138733364 and *TBX21* rs14059812), 2 variants were interesting as potential pharmacogenomic markers due to their high

frequency (*FCER2* rs28364072 – 34% and *NCOA3* rs2230782 – 12,5%) and a variant which has a higher frequency in the population of Serbia compared to Europe, *NCOA3* rs6094752.

Conclusion: Our results have shown that the variant rs6198 in the *NR3C1* gene and the haplotype rs1695-rs1138272 in the *GSTP1* gene are potential new pharmacogenetic markers of GC therapy response in childhood ALL patients. Aside from that, in our pioneer pharmacotranscription study of the long noncoding RNA *GAS5*, it has been shown that the level of *GAS5* expression could be a marker of GC therapy response in the remission induction treatment phase of childhood ALL. It was determined that *GAS5* participates in the signaling pathway in which GC influences the transcription complex which binds to the NF-κB regulatory element. The first population pharmacogenomic study of GC in Serbia, in which pharmacogenomic panel for GC was used, has discovered 12 new potential pharmacogenetic markers of GC therapy response.

Further study of pharmacogenomic and pharmacotranscriptomic markers, understanding the molecular mechanisms of drugs, as well as using methods of whole-genome and whole-transcriptome analysis based on NGS could contribute to formation of predictive pharmacogenomic and pharmacotranscriptomic tests of GC response, which could contribute to therapy individualization and a better treatment outcome of patients suffering from pediatric ALL.

Key words: pharmacogenetics, pharmacotranscriptomics, population pharmacogenomics, pediatric acute lymphoblastic leukemia, glucocorticoid drugs, *GAS5*, NF-κB, next generation sequencing

Scientific field: Molecular biology of eukaryotes

Scientific subfield: Molecular genetics

UDK: [[575.22 + 575.117] : [615.262 + 615.27]] : [616.155.392 + 616-053.2](043.3)

LISTA SKRAĆENICA

- 6-MP – 6-merkaptopurin
- ALL – akutna limfoblastna leukemija
- AP-1 – aktivacioni protein 1 (eng. activating protein 1)
- ARMS-PCR – amplifikaciono-refraktorni mutacioni sistem polimerazne lančane reakcije (eng. amplification-refractory mutation system of polymerase chain reaction)
- ATP – adenzin trifosfat
- BFM – Berlin Frankfurt Munster
- DEX – deksametazon
- CASP1 – kaspaza 1
- cDNK – komplementarna dezoksiribonukleinska kiselina
- CNS – centralni nervni sistem
- CREBBP – CREB vezujući protein (eng. CREB binding protein)
- DNK – dezoksiribonukleinska kiselina
- dnkRNK – duga nekodirajuća ribonukleinska kiselina
- DOP – dobar odgovor na prednizon
- DVD – DNK vezujući domen
- EMP1 – epitelni membranski protein 1
- FDA – administracija za hranu i lekove (eng. Food and Drug Administration)
- FRPE – fluorescentni rezonantni prenos energije
- GAS5 – faktor zaustavljanja rasta 5 (eng. growth arrest specific 5)
- GK – glukokortikoid
- G6PD – glukozo-6-fosfat dehidrogenaza
- GR – glukokortikoidni receptor
- GRE – element odgovora na glukokortikoide (eng. glucocorticoid response element)
- GWAS – studija asocijacija na nivou celog genoma (eng. genome wide association study)
- IBC – inflamatorna bolest creva
- IR – intermedijerni rizik
- iRNK – informaciona ribonukleinska kiselina
- ITPA – inozin trifosfataza

JNV – jednonukleotidna varijanta
κBRE – element odgovora na NF-κB (eng. NF-κB response element)
KASP – kompetitivni alel specifični PCR
LOP – loš odgovor na prednizon
MĆPK – mononuklearne ćelije periferne krvi
miRNK – mikro ribonukleinska kiselina
MRB – minimalna rezidualna bolest
NF-κB – nuklearni faktor kappa-pojačivač-lakih-lanaca aktiviranih B ćelija (eng. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)
nGRE – negative element odgovora na glukokortikoide
NGS – sekvenciranje naredne generacije (eng. next generation sequencing)
nkRNK – nekodirajuća ribonukleinska kiselina
PCR – polimerazna lančana reakcija (eng. polymerase chain reaction)
RE – relativna ekspresija
RHR – region rel homologije (eng. rel homology region)
RNK – ribonukleinska kiselina
SR – standardni rizik
TPMT – tiopurin S-metil transferaza
VCF – format pozivanja varijante (eng. variant call format)
VIP – veoma važan farmakogen (eng. very important pharmacogene)
VNTR – varijabilni broj ponovaka (eng. variable number of tandem repeats)

SADRŽAJ

1.	UVOD.....	1
1.1.	Omike i personalizovana medicina.....	2
1.2.	Farmakogenetika i farmakogenomika	3
1.3.	Farmakotranskriptomika.....	4
1.4.	Populaciona farmakogenomika	5
1.5.	Akutna limfoblastna leukemija (ALL) kod dece.....	5
1.6.	Lečenje dečje ALL	9
1.6.1.	Berlin Frankfurt Munster (BFM) protokol	9
1.6.2.	Faza indukcije remisije	10
1.6.3.	Faza rane intenzifikacije	10
1.6.4.	Faza konsolidacije	10
1.6.5.	Faza reindukcije.....	11
1.6.6.	Terapija održavanja	11
1.7.	Farmakogenomika i farmakotranskriptomika u pedijatrijskoj ALL.....	11
1.8.	Glukokortikoidi i njihov mehanizam dejstva	15
1.9.	NF- κ B	16
1.10.	Farmakogenomika glukokortikoidnih lekova.....	19
1.11.	<i>GAS5</i>	22
2.	CILJEVI.....	24
3.	MATERIJAL I METODE	27
3.1.	Pacijenti	28
3.2.	Genotipizacija	28
3.2.1.	DNK izolacija	28
3.2.2.	Detekcija delecije gena <i>GSTM1</i> i <i>GSTT1</i>	28
3.2.3.	Genotipizacija <i>ABCB1</i> varijanti.....	29
3.2.4.	Genotipizacija <i>NR3C1</i> varijanti.....	31
3.2.5.	Genotipizacija <i>GSTP1</i> varijanti	32
3.2.6.	Statisitčka analiza rezultata genotipizacije	32
3.3.	Merenje nivoa ekspresije <i>GAS5</i>	33
3.3.1.	RNK izolacija.....	33
3.3.2.	Reverzna transkripcija	33

3.3.3. Provera kvaliteta cDNK.....	33
3.3.4. Relativna kvantifikacija nivoa ekspresije <i>GAS5</i> i njeno izražavanje u odnosu na kalibrator.....	34
3.3.5. Statistička analiza merenja ekspresije <i>GAS5</i>	34
3.4. Kloniranje <i>GAS5</i> gena metodom ligacije uz pomoć restrikcionih enzima (130).....	35
3.4.1. Kloniranje <i>GAS5</i> u ekspresioni vektor.....	35
3.4.2. Uzgajanje <i>E. Coli DH5α</i>	35
3.4.3. Pripremanje kompetentnih <i>E. Coli DH5α</i>	36
3.4.4. Transformacija kompetentnih ćelija	36
3.4.5. Detekcija željenog konstrukta.....	36
3.5. Uzgajanje HeLa ćelija, izolacija jedarne frakcije proteina HeLa ćelija i analiza protein-DNK interakcija.....	37
3.5.1. Uzgajanje HeLa	37
3.5.2. Transfekcija HeLa ćelija i tretmani deksametazonom.....	37
3.5.3. Izolacija jedarnih proteina HeLa.....	39
3.5.4. Određivanje koncentracije proteina.....	39
3.5.5. Analiza interakcije protein-DNK.....	39
3.6. Populaciona farmakogenomska analiza (pilot studija).....	40
3.6.1. Odabir gena varijanti za pilot populacionu farmakogenomsku studiju	40
3.6.2. Metoda NGS sekvenciranja	41
3.6.3. Analiza podataka dobijenih NGS sekvenciranjem	42
3.6.4. Statistička obrada rezultata dobijenih NGS sekvenciranjem.....	42
4. REZULTATI	43
4.1. Farmakogenetički markeri značajni za odgovor na GK terapiju u inicijalnoj fazi lečenja dece sa ALL	44
4.1.1. Demografske i kliničke karakteristike dečjih ALL pacijenata	44
4.1.2. Odgovor na GK terapiju 8. dana.....	44
4.1.3. Asocijacija između farmakogenetičkih varijanti i odgovora na GK terapiju prema BFM protokolu	45
4.1.4. Dodatne analize asocijacije farmakogenetičkih markera i odgovora na GK terapiju 8. dana u dece sa ALL.....	45
4.2. Duga nekodirajuća RNK <i>GAS5</i> kao novi farmakotranskripcioni marker u inicijalnoj fazi lečenja dece sa ALL	52
4.2.1. Demografske i kliničke karakteristike dečjih ALL pacijenata na dijagnozi.....	52
4.2.2. Ekspresija <i>GAS5</i> na dijagnozi, 15. dana i 33. dana terapijske faze indukcije remisije.....	52
4.2.3. Korelacija ekspresije <i>GAS5</i> sa kliničkim karakteristikama pacijenata pre terapije.....	54
4.2.4. Korelacija između nivoa ekspresije <i>GAS5</i> na dijagnozi, 15. i 33. dana terapijske faze indukcije remisije i odgovora na terapiju	54

4.3. Analiza molekularnog mehanizma dejstva duge nekodirajuće RNK <i>GAS5</i>	57
4.3.1. Uticaj GK na ekspresiju <i>GAS5</i>	57
4.3.2. Uticaj dnkRNK <i>GAS5</i> na DNK-vezujuću aktivnost NF-κB.....	58
4.4. Studija farmakogenomskih markera za GK u populaciji Srbije	63
4.4.1. Odabir farmakogena i farmakogenomskih markera značajnih za terapiju GK.....	63
4.4.2. Rezultati analize pilot populacione farmakogenomske studije za terapiju GK u Srbiji.....	65
4.4.3. Novi potencijalni farmakogenomski markeri za GK.....	68
5. DISKUSIJA	71
5.1. Farmakogenetički markeri značajni za odgovor na GK terapiju u inicijalnoj fazi lečenja dece sa ALL	72
5.2. Duga nekodirajuća RNK <i>GAS5</i> kao novi farmakotranskripcioni marker u inicijalnoj fazi lečenja u dece sa ALL	76
5.3. Analiza molekularnog mehanizma dejstva duge nekodirajuće RNK <i>GAS5</i>	78
5.4. Studija farmakogenomskih markera za GK u populaciji Srbije	80
6. ZAKLJUČCI	86
7. BIBLIOGRAFIJA	89

1. UVOD

1.1. Omike i personalizovana medicina

U XXI veku ponovo postaje aktuelan koncept personalizovane medicine, koji postoji od samih početaka medicine. Zna se da je Hipokrat, začetnik medicine, još u IV veku p.n.e. zaključio: „Važnije je razumeti osobenost bolesnog čoveka, nego osobenost bolesti tog čoveka“.

Krajem XX veka personalizovana medicina je tretirana kao „umetnost lečenja“ i od tada je aktuelan koncept medicine zasnovane na dokazima (eng.evidence-based medicine), koji zastupa stav da lečenje treba da se oslanja na rezultate mnogobrojnih višegodišnjih kliničkih studija (1). Međutim, nove tehnologije koje omogućavaju sveobuhvatnu analizu individualnih genoma, epigenoma, transkriptoma, proteoma, metaboloma i mikrobioma, takozvanih „omika“, donele su veliki napredak u oblasti biomedicinskih nauka i otvorile širom vrata personalizovanoj medicini (2). Štaviše, mnogi genomski, epigenomski, transkriptomski i proteomski markeri su već uključeni u rutinske dijagnostičke, prognostičke i terapijske protokole za veliki broj bolesti (3, 4). Takođe, ovi markeri su izuzetno značajni za dizajniranje novih terapija, kao što su molekularna i genska terapija.

Personalizovano ili stratifikovano zdravstvo je važan cilj medicine u XXI veku. Ono će rezultovati efikasnijim tretmanom pacijenata, i doprineti velikim uštedama zdravstvenim sistemima (5).

Personalizovana medicina, koju danas nazivaju „preciznom“ medicinom (eng. precision medicine) nastoji da individualizuje lečenje svakog pacijenta, odnosno da svakom pacijentu bude obezbeđeno najefikasnije lečenje, koje podrazumeva „pravi lek, u odgovarajućoj dozi, dat u odgovarajućem momentu“ (eng. “the right patient with the right drug at the right dose at the right time”) (6).

Iz ovoga je proizašlo da medicina XXI veka u svoje središte stavlja discipline koje doprinose individualizaciji terapije, kao što su farmakogenetika, farmakogenomika i farmakotranskriptomika.

1.2. Farmakogenetika i farmakogenomika

Farmakogenetika i farmakogenomika su jedni od stožera personalizovane medicine, koje istražuju kako je interindividualna genetička varijabilnost povezana sa efikasnošću/toksičnošću leka. Farmakogenomika ima sveobuhvatniji pristup od farmakogenetike i predstavlja farmakogenetiku primenjenu na ceo genom.

Varijante u genima koji kodiraju proteine uključene u metabolizam lekova su najčešći farmakogenomski markeri primenjeni u kliničkoj praksi. Pokazano je da se aktivnost pojedinih enzima koji metabolišu lekove razlikuje među pojedincima i više od 1000 puta, što prvenstveno usmerava pažnju na genetičku varijabilnost kao osnov za ove medicinski relevantne različitosti.

Pored identifikacije specifičnih gena i alelskih varijanti gena koji mogu uticati na odgovor pacijenta na lekove koji se već koriste u medicini, farmakogenetika i farmakogenomika nastoje da identifikuju genetičke markere koji su u korelaciji sa različitim bolestima, a mogu biti meta za nove terapeutike (molekularni terapeutici). Cilj farmakogenomike je da stvori delotvornu terapijsku strategiju skrojenu za svakog pacijenta, a koja minimalizuje toksičnost i stara se o efikasnosti terapije uzimajući u obzir genomski profil pacijenta i interindividualne genetičke razlike.

Farmakogenomika je potpuno promenila stari princip lečenja, „ista doza odgovara svim pacijentima“, i princip da se doza leka određuje metodom „pokušaja, promašaja i podešavanja“ ka novom, individualizovanom principu „podešavanje izbora leka i doze prema specifičnom genomskom zapisu pacijenta.“

U poslednje dve decenije se dogodila velika akumulacija farmakogenomskih podataka, sa više od 20,000 novih citata u PubMed -u povezanih sa farmakogenomikom, sa više od 3500 potvrđenih asocijacija između lekova i farmakogena i farmakogenomskih varijanti, kao i sa 200 lekova koji u svom uputstvu sadrže preporuku ili zahtev za farmakogenomskim testiranjem pre upotrebe (7).

1.3. Farmakotranskriptomika

Farmakotranskriptomika je potpuno nova oblast koja povezuje varijacije u transkriptomu sa farmakokinetikom i farmakodinamikom lekova sa ciljem da se ustanove interindividualne razlike među pacijentima, kako bi se postiglo efikasnije doziranje leka. Cilj farmakotranskriptomike je da se stvori adekvatna terapija za pojedince zasnovajući se na transkriptomskim, RNK varijantama. RNK markeri su varijabilni, jer su rezultat različite ekspresije gena, ne samo gena koji kodiraju proteine, nego i gena koji kodiraju regulatorne RNK.

Iako se >85% ljudskog genoma transkribuje, manje od 2% se transkribuje u proteine. Više hiljada nekodirajućih RNK (nkRNK) se transkribuju i prepoznaju kao funkcionalne RNK koje karakterišu različite veličine, strukture i biološke funkcije. Kroz njihove interakcije sa DNK, RNK i proteinima, nkRNK utiču na sve nivoe genske regulacije, uključujući remodeliranje hromatina, transkripciju, translaciju i proteinsku stabilnost (8).

Na osnovu veličine, nkRNK se mogu generalno podeliti na dve podgrupe: kratke nkRNK (do 200 nukleotida, uključujući mikroRNK ili miRNK) i duge nkRNK (dnkRNK, više od 200 nukleotida). Za obe podgrupe je pokazano da su relevantne kod patoloških stanja, kao na primer, da mogu da regulišu zapaljenski odgovor (9).

RNK profil čini nivo ekspresije različitih iRNK, kao i nekodirajućih RNK (miRNK i dnkRNK). Potrebno je istaći da je podatak o ekspresionom profilu za individualizaciju terapije izuzetno značajan, posebno kad se radi o doziranju leka i pravom momentu za aplikaciju leka („right dose at the right time“).

Brojne studije su pokazale promenu u novou ekspresije nkRNK u dijabetesu (10), kanceru (11, 12) i drugim bolestima. Takođe je primećena promena nivoa ekspresije nkRNK kod pacijenata koji boluju od leukemija (13, 14, 15).

Pokazano je da postoje značajne interindividualne razlike u ekspresiji nkRNK i da su neke od njih uključene u odgovore na lekove (16).

1.4. Populaciona farmakogenomika

Što se više istraživalo na polju farmakogenomike, sve su više dolazile do izražaja razlike između različitih etničkih grupa kada su odgovori na lekove bili u pitanju. Shodno tome, više nisu mogli da se koriste podaci iz jedne populacije kako bi se primenili na drugu populaciju (17). Dobar primer za varijabilnost između populacija koja ima farmakogenomski značaj je deficijencija enzima glukozo 6-fosfat dehidrogenaze (G6PD) koja je odgovorna za neželjeni, toksični efekat leka primakvin. Postoji značajno više G6PD-deficijentnih nosilaca u populaciji crnaca iz Afrike u odnosu na populaciju belaca iz Amerike. Zastupljenost ovog genetičkog markera u Africi je rezultat selektivnog pritiska, jer nosioci ne obolevaju od malarije, čestog uzroka smrti na ovom kontinentu (18).

Individualizacija terapije se, kao praktična primena znanja iz farmakogenomike, bazirala na studijama sprovedenim na populacijama belaca. Kada su i druge etničke grupe uključene u klinička ispitivanja, došlo se do saznanja da pripadnost određenoj etničkoj zajednici može uticati na odgovor osobe na različite terapeutike. Pošto je metabolizam lekova populaciono-specifičan, podaci dobijeni u studijama jedne populacije ne mogu se ekstrapolirati na ostale. Poznavanje farmakogenetičkih razlika između populacija može biti od velikog značaja za farmaceutsku industriju i za ostvarivanje ušteda u zdravstvenom sistemu svake zemlje (19).

Populaciono farmakogenomske studije omogućavaju integraciju farmakogenomike u zdravstvene sisteme širom sveta i pružaju snažnu podršku prediktivnom farmakogenomskom testiranju (20).

1.5. Akutna limfoblastna leukemija (ALL) kod dece

Akutna limfoblastna leukemija (ALL) je hematološki malignitet koji nastaje klonskom proliferacijom ćelije prethodnika limfocita, oligopotentne matične ćelije limfopoeze. Proces diferencijacije od matične ćelije limfopoeze do zrelih limfocita prolazi kroz mnoge korake, a genetički defekti koji mogu dovesti do narušavanja tog procesa nalaze se u osnovi više maligniteta limfoidne loze, među kojima je i ALL (21). Ova bolest predstavlja jedan od najčešćih maligniteta pedijatrijskog uzrasta, čineći 30%

svih maligniteta dece, a 80% svih akutnih leukemija dečjeg uzrasta (22, 23, 24). Pritom, stopa oboljevanja dece je 40 na 10^6 dece na godišnjem nivou, a samo u SAD 3000 dece oboli od godišnje od ALL (25). U Srbiji godišnje oboli od ALL 60 dece (26).

Lečenje je danas uspešno te stepen izlečenja (petogodišnji period bez znakova bolesti) iznosi 85-90% (27). Međutim, relaps bolesti, koji se događa kod 15-20% dece obolele od ALL, može dovesti i do letalnog ishoda (28). Najviše dece oboleva između 2. i 5. godine života. Muška deca češće oboljevaju od ove vrste leukemije, osim u prvoj godini života.

Etiologija i patogenetički mehanizmi pedijatrijske ALL nisu dovoljno razjašnjeni. S obzirom da je kod neke novorođene dece utvrđeno postojanje leukemijskog klona, jasno je da događaji u fetalnom/neonatalnom periodu mogu da igraju značajnu ulogu. Neke nasledne bolesti (Downov sindrom, Turnerov sindrom, neurofibromatoza, von Recklinhausenova bolest, ataksija teleangiektazija, Brutonova agamaglobulinemija, Klinefelterov sindrom, Fankonijeva anemija, Wiskott Aldrichov sindrom) su često asocirane sa ALL. Takođe se i virusne infekcije (virusni onkogeni) povezuju sa nastankom ALL kod dece. Ipak, najčešći genetički poremećaji koji dovode do ALL su stečeni, čime se naglašava uticaj spoljašnje sredine. Izlaganje X-zracima *in utero* povećava rizik od akutne leukemije.

Prema biološkim i imunofenotipskim karakteristikama limfoblasta ALL se deli na B linijsku i T linijsku ALL.

Prezentacija ALL kod dece je najčešće u vidu nespecifičnih simptoma: umor, gubitak telesne mase i povišena telesna temperatura bez jasnog uzroka. Trećina bolesnika ima bol u kostima. Često se javljaju bledilo i krvarenja u koži i sluznicama. Česta je hepatosplemomegalija i limfadenopatija. Kod nekih pacijenata se javljaju i znakovi letargije, mučnine i ostalih CNS manifestacija (29).

Krvna slika najčešće može da ukaže na ALL. Oko polovina obolele dece ima broj leukocita veći od $10\ 000/\mu\text{L}$. Normohromna i normocitna anemija je prisutna kod 90% dece. Kod 80% dece je prisutna trombocitopenija.

Dijagnoza se postavlja na osnovu morfološkog pregleda razmaza periferne krvi i razmaza punktata koštane srži, citohemijskom bojenjem, imunofenotipizacijom, citogenetičkim i molekularnim analizama.

Citohemijska dijagnostika se vrši bojenjem na mijeloperoksidazu, kako bi se utvrdilo da nije u pitanju mijeloidna leukemija. Potom se vrši bojenje na PAS (eng. Periodic acid Schiff base; sr. Periodična kisela-Šifova baza), kako bi se utvrdilo da je u pitanju limfoblastna leukemija i, po potrebi, na kiselu fosfatazu, kako bi se utvrdilo postojanje T-limfoblasta. Najveći broj ALL kod dece poreklom su od prekursora B-limfocita (65-70%), dok su ostali poreklom od T-limfocita (15%). Imunofenotipizacija protočnom citometrijom i imunohistohemija jasno razlikuju B i T ALL kao i njihove podtipove.

Citogenetičke aberacije imaju veći značaj kao prognozni nego kao dijagnostički markeri. Tako „high“ hiperdiploidija (51 - 65 hromozoma) ima dobru prognozu; 43% dece ima ovu anomaliju. Tetraploidija (82- 94 hromozoma) ima lošu prognozu. Pseudodiploidija (46 hromozoma uz strukturne abnormalnosti), takođe ima lošu prognozu kao i hipodiploidija (manje od 46 hromozoma).

Strukturne hromozomske aberacije, translokacije, su relativno česti markeri kod dečje ALL. Detektuju se metodama molekularne genetike i uključeni su u stratifikaciju pacijenata u grupe rizika, na osnovu čega se primenjuju odgovarajući protokoli lečenja. Najčešće translokacije detektovane kod dečje ALL su: t(9;22)(q34;q11) - *BCR/ABL*, t(4;11)(q21;q23) - *MLL/AF4*, t(12;21)(p13;q22) - *TEL/AML1* and t(1;19)(q23;p13) - *E2A/PBX1* (30, 31).

Incidencija *BCR/ABL* fuzionog transkripta je 3-5% i on je veoma loš prognozni marker (32). *MLL/AF4* translokacija je prisutna u 2-6% dece sa ALL, i povezan je sa agresivnom kliničkom slikom. Ova genetička aberacija je izrazito učestala kod dece mlađe od jedne godine (33). *TEL/AML1* fuzioni transkript, poznat i kao *ETV6-RUNX1*, ima incidencu od 20-25% i ima dobar impakt na preživljavanje dece sa ALL (34, 35). *E2A/PBX1* translokacija je prisutna u 4-8% slučajeva dečje ALL i njen klinički značaj nije jasan, mada su mnoge studije ukazale da je to marker nepovoljne prognoze (36).

Kod dece obolele od ALL pored prisustva hromozomskih aberacija, strukturnih i numeričkih (aneuploidije), prisutne su i delecije, amplifikacije i veliki broj različitih „tačkastih“ mutacija (37). Većina stečenih mutacija u ALL pogađaju Ras i JAK/STAT signalne puteve, transkripcionu regulaciju uključenu u limfoidnu diferencijaciju, nukleozidni metabolizam, epigenetičke modifikacije i regulatore ćelijskog ciklusa (38).

Genomske analize, kao što su sekvenciranje egzoma, sekvenciranje genoma, transkriptomske i proteomske analize su doprinele boljoj klasifikaciji ALL u dece i pomogle da se identifikuju novi podtipovi ove bolesti (39).

Imajući u vidu sve prognozne markere, vrši se stratifikacija dece sa ALL po riziku na pacijente sa standardnim, intermedijarnim i visokim rizikom i na osnovu toga se bira odgovarajući terapijski tretman (Tabela 1).

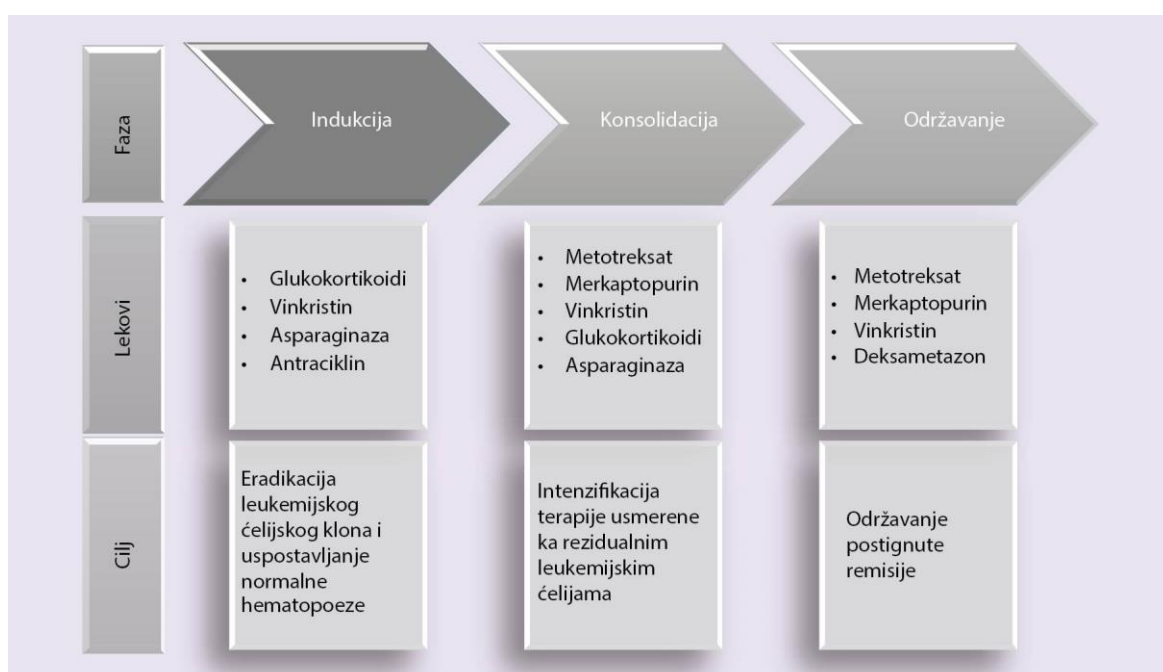
Tabela 1. Kriterijumi za stratifikaciju pacijenata sa dečjom ALL u grupe rizika. (Adaptirano iz „Pedijatrija“, 2. tom, ur. Radlović N., Bogdanović R.; „Akutna limfoblastna leukemija“, Janić D. 2016) (29)

Standardni rizik
Apsolutni broj blasta u perifernoj krvi 8. dan <1000/ μ l
I Uzrast \geq 1 god <6 god
I Inicijalni broj leukocita < 20 000/ μ l
I 15. dan koštana srž MRB<1% ili M1/M2
I 33. dan koštana srž M1
Svi uslovi moraju biti ispunjeni.
Intermedijerni rizik
1. Apsolutni broj blasta u perifernoj krvi 8. dan <1000/ μ l
I Uzrast < 1 god ili \geq 6 god i/ili broj leukocita \geq 20 000/ μ l
I 15. dan koštana srž MRB <10% ili M1/M2
I 33. dan koštana srž M1
ili
2. Kriterijumi za standardni rizik
15. dan koštana srž MRB >0,1% ili M3
I 33. dan koštana srž M1
Visoki rizik
1. IR i 15. dan koštana srž MRB >10% ili M3
2. SR i 15. dan koštana srž MRB >10%
3. Apsolutni broj blasta u perifernoj krvi 8. dan > 1000/ μ l
4. 33. dan koštana srž M2 ili M3
5. Translokacija (9, 22) [BCR/ABL] ili t(4, 11) [MLL/AF4]
Mora da bude ispunjen najmanje jedan uslov

Legenda. SR – standardni rizik; IR – intermedijerni rizik; MRB – minimalna rezidualna bolest

1.6. Lečenje dečje ALL

Postoji više odobrenih protokola lečenja dece obolele od ALL, koji su slični i razlikuju se u doziranju istih lekova, a retko i po uključivanju različitih lekova, pogotovo kod pacijenata visokog rizika. Bez obzira na specifičnosti protokola, svi se sastoje od 3 glavne faze, koje ukupno traju 2-2,5 godine: Faza indukcije, faza konsolidacije i faza održavanja (27) (Slika 1).



Slika 1. Ilustracija faza lečenja dece sa ALL i lekovi koji se koriste u većinin protokola (modifikovano iz Al-Mahayri ZN et al, 2017) (40)

1.6.1. Berlin Frankfurt Munster (BFM) protokol

Lečenje ALL-a kod dece u Srbiji se vrši po standardizovanom protokolu, Berlin-Frankfurt-Munster (BFM) protokolu. Ovaj protokol je imao više verzija (na primer, BFM ALL IC-2002 i BFM ALL IC-2009), kroz koje se nastojalo da se obezbedi bolji ishod lečenja. Međutim, osnova protokola se nije mnogo menjala.

1.6.2. Faza indukcije remisije

Prvi deo BFM protokola je faza indukcije remisije. Ova faza traje 39 dana i njen cilj je da se smanji broj limfoblasta u koštanoj srži i perifernoj krvi. Tokom prvih 8 dana ove faze se u lečenju primenjuje samo prednizon, sintetički glukokortikoidni lek. U terapiji indukcije remisije se daju prednizon, vinkristin, daunorubicin, L-asparaginaza i, u slučaju zahvaćenosti CNS-a, metotreksat.

Postoje tri vremenske tačke tokom ove faze u kojima analizira krv i kosna srž radi stratifikacije pacijenata po riziku: 8. dan, 15. dan i 33. dan.

Osmog dana lečenja, određuje se broj blasta u perifernoj krvi i pacijent se svrstava u grupu rizika shodno broju blasta. Broj blasta u perifernoj krvi je jedan od najvažnijih kriterijuma za određivanje terapijskog režima i za predikciju preživljavanja (41). Ako razmatramo ovaj kriterijum kao pokazatelj odgovora na terapiju, pacijenti kod kojih je 8. dana od početka terapije broj blasta po μL krvi veći od 1000, se tretiraju kao pacijenti sa lošim odgovorom na prednizon (LOP) i asocirani su sa lošom prognozom. Nasuprot njima su pacijenti sa dobrim odgovorom na prednizon (DOP), kod kojih je 8. dana od početka terapije broj blasta po μL krvi manji od 1000.

Procenat blasta u koštanoj srži 15. i 33. dana se koristi kao mera minimalne rezidualne bolesti (MRB) i koristi se za stratifikaciju pacijenta u rizične grupe.

1.6.3. Faza rane intenzifikacije

Sledeća faza terapije po BFM protokolu je faza rane intenzifikacije. Počinje 36. dana terapije i traje narednih 38 dana. Tokom ove faze počinje primena citostatika, kao što su ciklofosamid, citarabin, 6-merkaptopurin i intratekalni metotreksat. Metotreksat treba da spreči zahvatanje CNS-a tokom lečenja. Ako je pacijent u višoj grupi rizika, primenjuju se još i L-asparaginaza i vinkristin.

1.6.4. Faza konsolidacije

Tokom faze konsolidacije primenjuju se sistemski citostatici kako bi se sprečio relaps. Počinje 2 nedelje po završetku rane intenzifikacije i traje 56 dana. Primenjuju se 6-merkaptopurin i metotreksat. U slučaju da je CNS i dalje zahvaćen, primenjuje se radioterapija sa više ciklusa polihemioterapije. Da bi se prevenirali neželjeni efekti metotreksata ili da bi se oni umanjili, primenjuje se leukovorin.

1.6.5. Faza reindukcije

Reindukciona faza terapije ima za cilj da poveća stopu preživljavanja pacijenata posle remisije. Počinje 2 nedelje posle faze konsolidacije i traje 49 dana. U ovoj fazi postoje dve vremenske tačke u kojima se terapija usklađuje sa tokom bolesti: 1. dan i 36. dan. Prvo se primenjuju deksametazon, vinkristin, doksorubicin i L-asparaginaza. U slučaju neuropatije, prekida se terapija vinkristinom. U slučaju neadekvatne granulopoeze, može se odložiti primena doksorubicina i vinkristina. Zatim, od 36. dana, primenjuju se ciklofosamid, 6-tioguanin, citarabin i intratekalni metotreksat.

1.6.6. Terapija održavanja

Na kraju BFM protokola se sprovodi terapija održavanja. Ona traje do dve godine nakon početka indukcije remisije i podrazumeva dnevnu oralnu primenu 6-merkaptopurina i primenu metotreksata oralno, jednom nedeljno. Nužne su česte kontrole krvne slike, kako bi se postigla željena leukopenija u opsegu između 2000 i 3000/mm³, prilagođavanjem doze lekova.

U kasnijem toku lečenja se primenjuju citostatici i zračenje, zavisno od toga koliko je zahvaćen CNS.

1.7. Farmakogenomika i farmakotranskriptomika u pedijatrijskoj ALL

ALL kod dece je jedan od maligniteta sa najvećom stopom izlečenja, dostižući više od 80-90% (42, 43). Međutim, ALL je i dalje glavni uzrok mortaliteta kod ovih pacijanata. Efikasna terapija izaziva neželjene efekte u 75% pacijenata (44). Pored toga, hemioterapija dovodi do odloženih neželjenih efekata, pa i permanentnih sekvela (37, 45). Smatra se da u 1-2% pedijatrijskih pacijenata sa ALL smrtni ishod nije posledica bolesti, već je posledica neželjenih efekata lekova (42). U nekim studijama je pokazano da je smrtni ishod uzrokovan terapijom u 3.2% dece obolele od ALL (46).

Uzimajući u obzir da se sve veća uspešnost u lečenju pedijatrijske ALL nije postizala uvođenjem novih lekova, već nastojanjem da se smanje neželjena dejstva onih koji su već sastavni delovi postojećih terapijskih protokola, jasno je zašto je farmakogenomika dobila ključno mesto u ovoj oblasti.

Treba istaći da pacijent oboleo od maligne bolesti ima dva genoma: konstitucionalni genom karakterističan za sve ćelije osim ćelija tumorskog klon, koje sadrže stečene genetičke varijante, i čine tumorski genom, koji se menja tokom evolucije klonova tumora. Varijante u konstitucionalnom genomu, germinativne varijante utiču na transport i metabolizam lekova, i tako su odgovorne za efikasnost dejstva leka i za neželjene efekte, a stečene mutacije su odgovorne za rezistenciju tumora na lekove (47).

Neželjeni efekti terapije kod pedijatrijske ALL su posledica nedovoljne specifičnosti lekova, malog terapijskog indeksa lekova, visokih doza i dugotrajne aplikacije lekova. Najčešće komplikacije su hipersenzitivne reakcije, neuro-, kardio- i hepatotoksičnost, kao i toksičnost koja oštećuje gastrointestinalni trakt i bubrege, mijelosupresija i osteonekroza (44).

Mnoge studije su pokazale da se značajni deo varijabilnosti u odgovoru na terapiju kod dece obolele od ALL može dovesti u vezu sa varijantama u genomu koje utiču na farmakokinetiku i farmakodinamiku primenjenih lekova.

Lekovi koji se koriste u lečenju pedijatrijske ALL po BFM protokolu, a za čije uobičajene neželjene efekte su identifikovani farmakogeni i farmakogenomske varijante su: tiopurinski lekovi, metotreksat, vinkristin, asparaginaza i glukokortikoidni lekovi.

Tiopurini su purinski analozi koji se inkorporiraju u novosintetisanu DNK, diprinoseći neefektivnoj replikaciji DNK i citotoksičnom dejstvu ovih lekova. Jedan od prvih klinički značajnih farmakogena je tiopurin S-metiltransferaza (*TPMT*). Testiranje prisustva određenih varijanti u genu *TPMT* se preporučuje pre upotrebe tiopurinskih lekova (48, 49). Doze tiopurinskih lekova se rutinski usklađuju sa genotipom pacijenata obolelih od dečje ALL, jer prisustvo određenih varijanti u genu *TPMT* dovode do mijelotoksičnosti (50, 51). Pored toga, u promotoru gena *TPMT* postoji region koji sadrži varijabilni broj ponovaka (eng, variable number of tandem repeats, VNTR), koji je potencijalni farmakogenomski marker (49). Testiranje broja i tipa ponovaka može dovesti do tačnije predikcije toksičnog efekta tiopurinskog leka 6-merkaptopurina (6-MP) u dečjoj ALL (48, 52). Pored *TPMT*, značajni farmakogeni za 6-MP su i gen inozin trifosfat pirofosfataza (*ITPA*), kao i geni *ABCC4* i *ABCB1* koji kodiraju ATP transportere odgovorne za efluks lekova iz ćelije (53). Najnovije otkrivene varijante asocirane sa toksičnošću izazvanom primenom leka 6-MP su u *NUDT15* genu, i one su izrazito učestale u populacijama iz istočne Azije (54).

Ključni lek u fazi konsolidacije i fazi održavanja u BFM protokolu lečenja dečje ALL je antifolatni hemioterapeutski agens, metotreksat. Toksičnost izazvana ovim lekom izaziva oštećenje gastrointestinalnog trakta, bubrega, jetre i neuropatije i mijelosupresiju. Citotoksično, terapijsko dejstvo metotreksata je povezano sa ekspresijom mnogih enzima uključenih u folatni put koji je odgovoran za sintezu purina, timidilata i reakcije metilacije.

Pokazano je da u osnovi oko 68–75% interindividualnih razlika u kinetici metotreksata leži u genomskim razlikama (55). Zbog toga su varijante u genima *SLCO1B1* i *ABCB1*, koji kodiraju ćelijske transportere, potencijalni farmakogenetički markeri u dečjoj ALL (56).

Vinkristin je alkaloid izolovan iz biljaka, koji svoj citotoksični efekat ostvaruje kroz sprečavanje formiranja mikrotubula značajnih za deobu ćelije i kroz interkalaciju u molekule DNK (57). U studiji u kojoj je analizirano prisustvo JNV-ova (jednonukleotidnih varijanti) u celom genomu 300 pacijenata obolelih od ALL tretiranih vinkristinom, 22% pacijenata je ispoljilo neurotoksičnost izazvanu vinkristinom. U istoj studiji je otkrivena asocijacija varijanti u genima *CEP72* (centrozomalni protein 72) sa neurotoksičnošću povezanu sa vinkristinom, a dodatna istraživanja su u slične potencijalne farmakogene uključile i gene *CYP3A5* (*3) i *VDR* (vitamin D receptor) (45, 58).

Bakterijska (najčešće poreklom iz *E.coli*) L-asparaginaza vrši hidrolizu L-asparagina i tako doprinosi da tumorskim ćelijama nedostaje ova esencijalna aminokiselina, što rezultuje smrću maligne ćelije. Međutim, ovaj enzim može izazvati stvaranje antitela koja indukuju hipersenzitivnu reakciju u 45% dece sa ALL, a ponekad dolazi i do pojave anafilaktičkog šoka (59).

U pojedinim studijama je pokazana korelacija između hipersenzitivnosti na asparinazu izolovanu iz *E. coli* i varijanti u genima *GRIA1* i nekih varijanti u HLA genima klase II (60, 61).

Glukokortikoidi, prednizon i deksametazon, predstavljaju osnovu hemioterapije kod dečjih ALL. Citotoksični efekat glukokortikoidnih lekova je povezan sa njihovim antiproliferativnim dejstvom koje ostvaruju u specifičnim ćelijama preko glukokortikoidnog receptora (62).

Smatra se da u limfoblastima glukokortikoidni lekovi aktiviraju Bim protein koji indukuje apoptozu a deaktiviraju NF- κ B i Ap1, i tako negativno modulišu preživljavanje ćelije (63).

Najznačajniji neželjeni efekti glukokortikoidnih lekova su osteonekroza, sepsa, dijabetes, miopatija, hipertenzija i poremećaj ponašanja (64).

Varijante u genskom lokusu *ACPI-SH3YLI* i genu *GRIN3A* su potencijalni farmakogenetički markeri za osteonekrozu izazvanu glukokortikoidnim lekovima kod pedijatrijske ALL (65, 66).

Podaci o farmakogenomici za glukokortikoidne lekove kod dečje ALL su kontradiktorni i oskudni i mali je broj studija u kojima se sprovelo farmakogenomsko testiranje u pedijatrijskoj ALL koje je povezano sa glukokortikoidnom terapijom (67).

Većina farmakogenomskih markera je otkrivena u kodirajućim regionima gena ili, ređe, u njihovim promotorima. Međutim, istraživanja su se proširila na gene za nekodirajuće RNK. Tako je pokazano da su varijante u genu *DROSHA*, za koji se zna da kodira enzim RNase III, uključen u formiranje miRNA, povezane sa toksičnošću izazvanom terapijom metotreksatima u pedijatrijskoj ALL (68). Još jedna farmakogenomska studija koja je analizirala sve JNV u genima za miRNA, pokazala je asocijaciju nekoliko varijanti sa transportom metotreksata i njegovim nivoom u krvi kod dece obolele od ALL (69).

Ukupno šest studija je izučavalo asocijaciju između JNV-ova povezanih sa miRNK i toksičnosti uzrokovane terapijom kod pedijatrijske ALL. Rezultat koji najviše obećava je da je rs2114358 u miRNK-1206 marker za pojavu mukozitisa (70).

Farmakotranskriptomске studije u pedijatrijskoj ALL su malobrojne. Uglavnom se odnose na ekspresiju miRNA i njihovu asocijaciju sa rezistencijom na terapiju kod dečje ALL. Tako je pokazano da su povećana ekspresija miRNK-125b, kao i povećana ekspresija miRNK-99a i/ili miRNK-100 povezane sa rezistencijom na vinkristin (71).

Farmakotranskriptomске studije na dnkRNK u pedijatrijskoj ALL nisu rađene.

1.8. Glukokortikoidi i njihov mehanizam dejstva

Glukokortikoidi (GK) su steroidni hormoni koji se proizvode u nadbubrežnoj žlezdi i izlučuju iz nje pod uticajem hipotalamo-pituitarno-nadbubrežne ose (72). Deluju preko glukokortikoidnog receptra (GR). Utiču na veliki broj vrsta ćelija i regulišu homeostazu glukoze, metabolizam proteina, lipida i ugljenih hidrata, kao i razvoj ćelije i programiranu ćelijsku smrt. Što se tiče njihove kliničke upotrebe, treba istaći imunosupresivnu, anti-inflamatornu i anti-alergijsku aktivnost glukokortikoida.

Sintetički glukokortikoidi spadaju među najviše upotrebljavane lekove u lečenju imunih ili zapaljenskih bolesti, kao što su zapaljenska bolest creva, astma, alergijski rinitis i druge. Sposobnost GK da indukuju apoptozu u timocitima, monocitima i perifernim T ćelijama ih čini centralnom komponentom u hemioterapijskim protokolima u lečenju leukemija, limfoma i mijeloma.

Biološka aktivnost GK može da se podeli na genomske efekte, posredovane citosolnim GR i negenomske efekte (73, 74, 75, 76). Negenomski efekti se dalje mogu podeliti na tri podkategorije: negenomski efekti posredovani citosolnim GR; nespecifični negenomski efekti; efekti posredovani GR vezanim za plazma membranu (75, 77).

Većina efekata GK je posredovana GR. Ovaj receptor pripada nuklearnoj superfamiliji receptora u koju spadaju i receptori za mineralokortikoide, estrogene, progesterone, androgene, tiroidne hormone, retinoičnu kiselinu, vitamin D i brojni receptori „siročići“ (78). Gen za GR se nalazi na dugom kraku hromozoma 5q31-32 i sastoji se od devet egzona, od kojih se prvi ne translira. Identifikovana su tri promotora za humani GR gen (79).

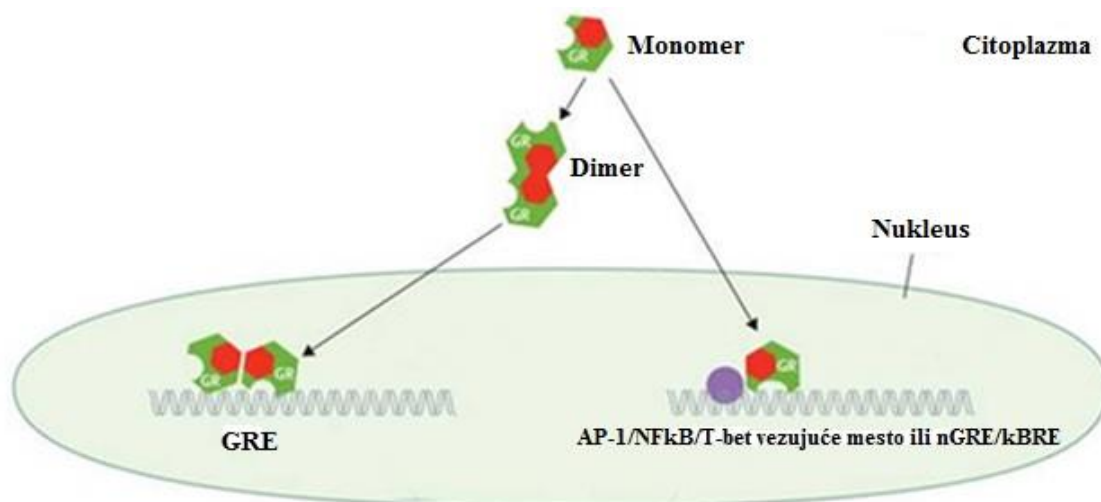
Dve najznačajnije izoforme humanog GR su GR α i GR β . Klasični glukokortikoidni receptor, GR α , se eksprimira u svim tipovima ćelija i sastoji se od 777 amino kiselina. GR β izoforma se razlikuje od GR α na C terminusu (80). Nastaje alternativnom obradom pre-iRNK pri kojoj se iskraja poslednji egzon, tako da kao produkt nastaje protein GR β od 742 amino kiselina. GR protein se sastoji od tri glavna domena: varijabilni N-terminalni transaktivacioni domen, očuvani DNK-vezujući domen (DVD) i C-terminalni ligand-vezujući domen.

U slučaju proinflammatoryh ćelija, brojni molekuli, kao što su citokini, hemokini, faktori rasta, adhezioni molekuli i zapaljenski enzimi igraju ulogu u ćelijskom

metabolizmu. Ovi molekuli posreduju zapaljenskom odgovoru u raznim vrstama ćelija kao što su makrofagi, eozinofili, mastociti, T limfociti, dendritske ćelije, endotelne ćelije, epitelne ćelije i neutrofilni. GK ometaju proinflammatory signalni proces genomskim i negenomskim mehanizmima zavisno od vrste ćelije. GK mogu da povećaju ekspresiju antiinflammatory proteina, inhibiraju MAP kinaze od suštinske važnosti za aktivaciju proinflammatory gena i da indukuju programiranu ćelijsku smrt. Mnogi od ovih antiinflammatory efekata glukokortikoida su indukovani direktnom inhibicijom transkripcione aktivnosti faktora AP-1 i NF- κ B, koji su centralni medijatori ekspresije zapaljenskih gena (81).

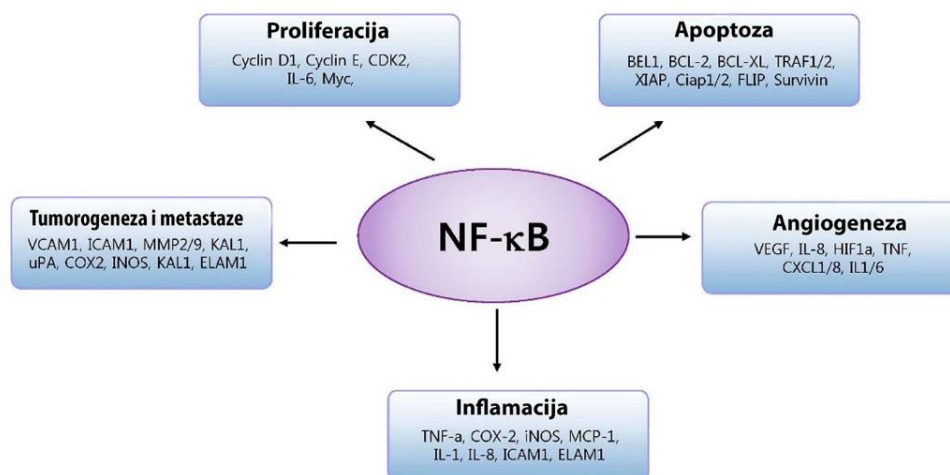
1.9. NF- κ B

Efekat GK, posredovan njihovim vezivanjem za GR, može da rezultuje i aktivacijom i utišavanjem gena koji su ključni za regulaciju produkcije citokina, ekspresiju onkogeni, regulaciju ćelijskog ciklusa i apoptoze (62, 82). Posle interakcije GK-GR u citoplazmi, smatralo se da glukokortikoidni receptori mogu da regulišu ekspresiju mnogih gena na dva načina: kao aktivatori transkripcije, formiranjem homodimera koji se translociraju u nukleus i interaguju sa regulatornim elementima GRE (eng. glucocorticoid response elements), ili kao transkripcioni represori, u vidu monomera koji interaguju sa transkripcionim faktorima, kao što su AP-1 (eng, activating protein-1) i NF- κ B (eng. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) i T-bet (83, 84). Pokazano je, takođe, da GR mogu da izazovu utišavanje određenih gena direktnom interakcijom sa DNK. Naime, otkriveni su invertovani ponovljeni negativni GRE (nGREs), za koje je pokazano da posreduju u utišavanju više stotina gena pod dejstvom glukokortikoida (85, 86). Najnovija istraživanja pokazuju da se GR vezuje direktno za DNK i preko regulatornih elemenata za koje se vezuje NF- κ B transkripcioni faktor, κ BREs (eng. NF- κ B response elements) (87) (Slika 2).



Slika 2. Regulacija ekspresija gena poredovana interakcijom GR sa DNK regulatornim elementima (modifikovano iz Inaba et al, 2013) (27)

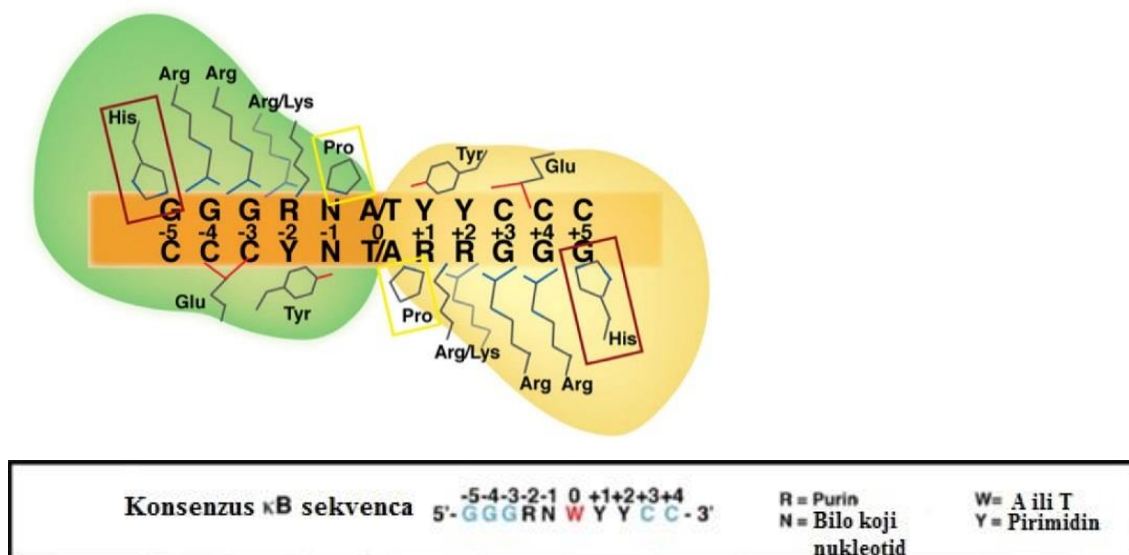
NF- κ B je transkripcioni faktor koji ima značajnu ulogu u više bioloških procesa, kao što su imunološki odgovor, inflamacija, proliferacija i apoptoza (88). Različiti inflamatorni stimuli, kao što su faktori rasta ili mikroorganizmi aktiviraju NF- κ B, koji zatim aktivira ili utišava više stotina gena koji su uključeni u regulaciju imunskog odgovora, rasta i proliferacije ćelija, apoptozu, odgovor na stres i embriogenezu (89, 90) (Slika 3). Aberantna aktivacija NF- κ B može da uzrokuje različite autoimune, inflamatorne i maligne bolesti, kao što su reumatoidni artritis, ateroskleroza, inflamatorne bolesti creva, multipla skleroza i maligni tumori (91, 92). NF- κ B familiju transkripcionih faktora čini pet proteina, p65 (RelA), RelB, c-Rel, p105/p50 (NF- κ B1) i p100/p52 (NF- κ B2), koji stupaju u međusobne interakcije i formiraju različite transkripciono aktivne homo- i heterodimerne komplekse (93, 94). Različite kombinacije Rel proteinske familije daju oko 15 različitih dimera. Među njima, heterodimer p50/p65 je najčešći i nalazi se u svim tipovima ćelija (95). Pored toga, opisani su i dimerni kompleksi p65/p65, p65/c-Rel, p65/p52, c-Rel/c-Rel, p52/c-Rel, p50/c-Rel, p50/p50, RelB/p50, i RelB/p52 (96).



Slika 3. Geni koji su regulisani transkripcionim faktorom NF-κB (Park et al, 2016) (96)

NF-κB reguliše ekspresiju gena tako što se vezuje za specifične DNK elemente, koji nose zajedničko ime κBREs, ili κB vezivna mesta/regulatorni elementi, koja se nalaze u promotorima i drugim regulatornim regionima ciljnih gena. DNK-vezujući domen NF-κB subjedinica se naziva RHR (eng. rel homology region), sastoji se od oko 300 aminokiselina, lociranih blizu N terminusa. Sveobuhvatne genomske analize su identifikovale veliki broj različitih κB regulatornih elemenata. In vitro eksperimenti su doveli do klasifikacije κB regulatornih elemenata prema njihovoj specifičnosti da vezuju različite NF-κB dimere. Karakterizacija više κB regulatornih elemenata utvrdila je da je kosenzusna sekvenca za vezivanje NF-κB dimera pseudo -simetrična i glasi: 5'-GGGRNYYCC-3' (R = purin, N = bilo koji nukleotid, W =A ili T, and Y = pirimidin) (97) (Slika 4).

NF-κB dimeri se vezuju za različite κB sekvence sa različitim afinitetom za vezivanje i sa različitim efektom na transkripciju ciljnih gena. Utvrđeno je da centralni bazni par κB regulatornog elementa najizraženije utiče na tip i nivo aktivnosti NF-κB dimera kao transkripcionog faktora, dok su okolne GC sekvence najodgovornije za afinitet vezivanja i selekciju κB elementa. Tako, kroz detektovanje razlika u κB vezivnim mestima, NF-κB dimeri modulišu biološke programe kroz aktivaciju, represiju ili promenu ekspresije efektorskih gena (97).



Slika 4. Konsenzusna DNK sekvenca za vezivanje NFκB transkripcionog faktora (Wang et al, 2012) (97)

1.10. Farmakogenomika glukokortikoidnih lekova

Farmakogenomske studije za glukokortikoidne lekove nisu dovele do algoritma koji bi mogao biti primenjen u kliničkoj praksi. Postoji nekoliko studija koje su ukazale na postojanje farmakogena i farmakogenomskih varijanti za koje ima dokaza da utiču na farmakodinamiku i farmakokinetiku GK (83, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104).

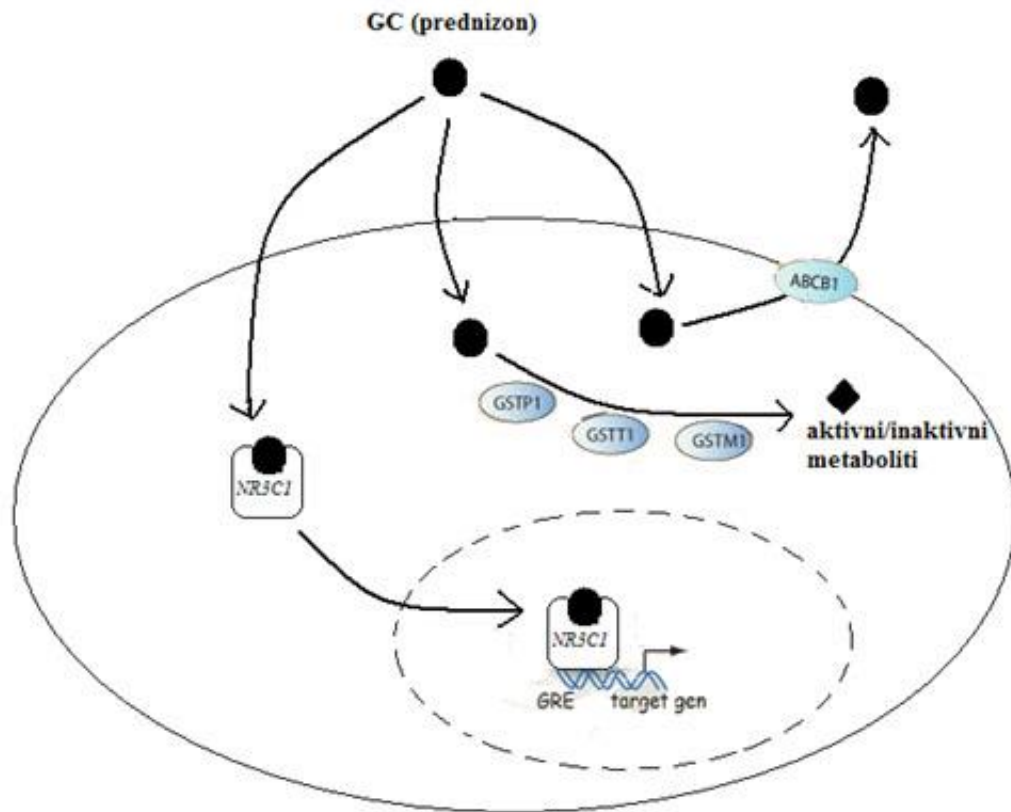
U dosadašnjim farmakogenomskim studijama GK izdvojilo se pet gena: *NR3C1*, *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1*, *ABCB1* (Slika 5). Određene varijante unutar ovih gena su se takođe pokazale kao najbolji kandidati za farmakogenetičke markere GK.

NR3C1 kodira glukokortikoidni receptor koji je od suštinske važnosti za manifestovanje efekata glukokortikoida. Shodno tome, *NR3C1* se svrstava u činioca farmakodinamike. Za tri varijante u navedenom genu je pokazana asocijacija sa odgovorom na terapiju GK: rs33389 (c.1185-6766C>T), rs33388 (c.1185-3562A>T) i rs6198 (c.*3833A>G). Prve dve varijante se nalaze u intronu 2, gde menjaju konsenzusna mesta splajsovanja (105). Ako su minorni rs33389 T alel i majorni rs33388 A alel prisutni, odigrava se alternativni splajsing i u većoj meri se eksprimira izoforma GR sa manjim

afinitetom za GK (106). U pedijatrijskom nefrotskom sindromu, odgovor na steroide je bio promenjen usled prisustva ova dva alela u intronu 2 (107). Varijanta rs6198 se nalazi u 3' UTR regionu egzona 9 β , u „ATTTA“ motivu izoforme GR sa drastičnom manjim afinitetom za GK (108). Ako je minorni rs6198 G alel prisutan, informaciona RNK (iRNK) postaje stabilnija, što dovodi do pojačane sinteze izoforme GR sa manjim afinitetom za GK (109).

GSTM1, *GSTT1*, *GSTP1* su geni koji kodiraju tri različita proteina iz porodice glutation-S-metiltransferaza. Oni su ključni u eliminaciji GK tako što katalizuju konjugaciju redukovano glutationa sa ksenobioticima, što u slučaju GK predstavlja prvi korak u njihovoj eliminaciji (110, 111). Navedena karakteristika ih čini ključnim za farmakokinetiku GK. Delecije gena *GSTM1* i *GSTT1* dovode do odsustva aktivnosti ova dva enzima. Takođe, prijavljeno je da varijante rs1695 (c.313A>G, p.Ile105Val) i rs1138272 (c.341C>T, p.Ala114Val) u genu *GSTP1* utiču na aktivnost i strukturu *GSTP1*, tako što menjaju efikasnost GK konjugacije ako su minorni aleli prisutni (112). Asocijacija između rs1695 varijante i odgovora na GK je pokazana kod ALL (113).

ABCB1 je gen koji kodira membranski transporter P-glikoprotein (P-gp), koji vrši efleks hemioterapijskih agenasa u leukemijskoj terapiji (114). GK je supstrat P-glikoproteina, što znači da je P-glikoprotein značajan za farmakokinetiku. Povećana ekspresija P-gp može da pospeši GK rezistenciju (115). Kada se razmatra *ABCB1*, tri varijante su često analizirane kao farmakogenetički markeri odgovora na GK (rs1128503 (c.1236C>T, p.Gly412=), rs2032582 (c.2677G>A/T, p.Ser893Ala) i rs1045642 (c.3435C>T, p.Ile1145=). Varijanta rs2032582 je nesinonimna mutacija, dok je rs1045642 sinonimna mutacija koja dovodi do smanjene ekspresije gena *ABCB1* na ćelijskim membranama digestivnog trakta (116). Takođe je pronađeno da kod dece sa nefrotskim sindromom postoji razlika u odgovoru na steroide zavisno od razlika u ekspresiji *ABCB1* gena (117).



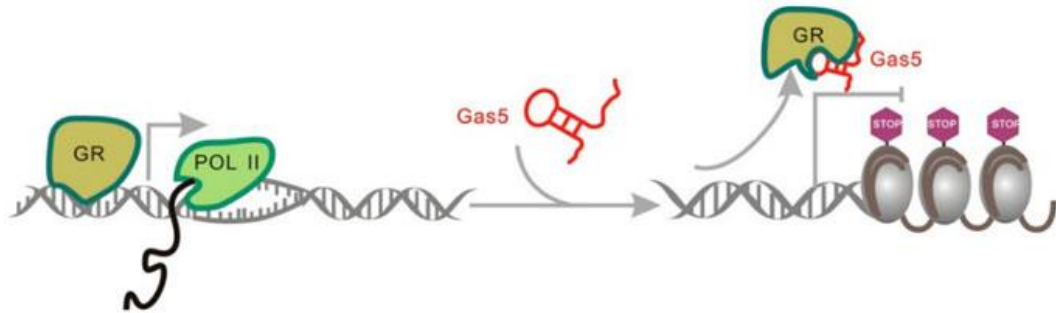
Slika 5. Shematski prikaz funkcija izabranih farmakogena u metabolizmu GK. Gen *NR3C1* kodira GR, preko koga se ispoljava većina efekata GK; geni *GST* kodiraju familiju proteina koja učestvuje u konjugaciji GK, prvog koraka u eliminaciji GK; gen *ABCB1* kodira P-glikoprotein, membranski transporter. (Sa ljubaznošću dobijeno od dr Vite Dolžan, MD).

1.11. *GAS5*

Growth arrest specific 5 (*GAS5*) je dnkRNK koja aktivira apoptozu i zaustavlja ćelijski ciklus u T limfocitima (118). Pored funkcionalne uloge kao faktora zaustavljanja rasta, *GAS5* takođe imitira DNK regulatorni element odgovora na GR (GRE), DNK sekvencu koju prepoznaje DNK vezujući domen (DVD) GR. *GAS5* se ponaša kao mamac za GR, i tako dovodi do inhibicije delovanja GR (119, 120) (Slika 6).

Skorašnje studije su pokazale efekat *GAS5* u modulaciji anti-proliferativne aktivnosti GK u mononuklearnim ćelijama periferne krvi (MČPK) zdravih individua, donatora krvi za transfuziju: osobe koje su imale loš odgovor na GK su imale viši nivo *GAS5* u poređenju sa osobama koje su imale dobar odgovor, dokazujući da GK efektivnost može da zavisi od nivoa dnkRNK. Rezultati jednog rada sugerišu da *GAS5* može da bude regulisan imunskom aktivnošću i pokazano je da nivo ekspresije *GAS5* može da utiče na efikasnost GK (121).

Prethodno, *GAS5* je izučavan kod kancera dojke (12), gde je pokazano da nizak nivo ekspresije gena *GAS5* doprinosi rastu tumora i lošem preživljavanju pacijenata. Takođe je pronađeno da je *GAS5* deregulisan kod kancera prostate i ćelije kancera su u ovom slučaju pokazale viši nivo ekspresije *GAS5*, kao i rezistenciju na androgeni tretman (122). Kod kancera pankreasa, nivo ekspresije *GAS5* je snižen (123). Kada je u pitanju farmakotranskriptomski uloga *GAS5* u GK tretmanu, *GAS5* je samo proučavan kod pedijatrijskih pacijenata sa inflamatornom bolešću creva (IBC) (124). U ovoj studiji, *GAS5* je preporučan za razmatranje kao farmakotranskriptomski marker u tretmanu pedijatrijskih IBC. Farmakotranskriptomski potencijal *GAS5* nije do sada proučavan u kontekstu pedijatrijske leukemije.



Slika 6. Modulacija ekspresije gena posredovana GR u prisustvu dnkRNK GAS5. GAS5 se ponaša kao mamac za GR, i tako dovodi do inhibicije delovanja GR. (Modifikovano prema Li et al, 2016). (120)

2. CILJEVI

Akutna limfoblastna leukemija (ALL) predstavlja najčešći hematološki malignitet pedijatrijskog uzrasta. Mada stopa izlječenja dostiže 80-90%, ALL je i dalje glavni uzrok mortaliteta kod ovih pacijenata. Terapija izaziva neželjene efekte u 75% pacijenata. Pored toga, u 1-3% pedijatrijskih pacijenata sa ALL smrtni ishod nije posledica bolesti, već je uzrokovan terapijom. Lečenje pedijatrijske ALL nije napredovalo uvođenjem novih lekova, već nastojanjem da se smanje neželjena dejstva onih koji su već sastavni delovi postojećih terapijskih protokola, zbog čega su farmakogenomika i farmakotranskriptomika dobile ključno mesto u ovoj oblasti.

GK se koriste u početnoj fazi lečenja ALL u dece, u fazi indukcije remisije. Farmakogenomske i farmakotranskriptomске studije za glukokortikoidne lekove nisu dovele do algoritma koji bi mogao biti primenjen u lečenju dečje ALL. Stoga su ciljevi ove teze bili izučavanje farmakogenomskih i farmakotranskriptomskih markera relevantnih za uspešnost GK terapije u dece sa ALL. Pored toga, cilj ove teze je bio i rasvetljavanje molekularnog mehanizma dejstva GK kroz signalni put koji uključuje farmakotranskripcioni marker, dugu nekodirajuću RNK *GAS5*, i transkripcioni faktor NF- κ B.

Sekvenciranje nove generacije (eng, next generation sequencing, NGS) je omogućilo analizu velikog broja farmakogenomskih markera. Bilo bi korisno dizajnirati panele za farmakogenomske i farmakotranskriptomске markere za različite lekove. Korišćenje ovih panela bi omogućilo populaciono- farmakogenomske studije koje pružaju snažnu podršku prediktivnom farmakogenomskom testiranju u jednoj zemlji.

Specifični ciljevi istraživanja su bili:

1. Izučiti kako potencijalni farmakogenomski markeri, varijante rs33388, rs33389, rs6198 u genu *NR3C1*, varijante rs2032582, rs1128503, rs1045642 u genu *ABCB1*, varijante rs1695, rs1138272 u genu *GSTP1* i delecije gena *GSTM1* i *GSTT1* utiču na odgovor na GK u indukcionoj fazi terapije u grupi pacijenata dečjeg uzrasta sa ALL

2. Korelisati ekspresiju duge nekodirajuće RNK *GAS5*, potencijalnog novog farmakotranskripcionog markera, sa odgovorom na indukcionu GK terapiju u grupi pacijenata dečjeg uzrasta sa ALL

3. Izučiti molekularni mehanizam dejstva GK *in vitro*, sa posebnim osvrtom na ulogu duge nekodirajuće RNK *GAS5* i vezivanje transkripcionog faktora NF- κ B za DNK

4. Dizajnirati farmakogenomski panel za GK baziran na metodi NGS i sprovesti populacionu farmakogenomsku studiju koja će utvrditi učestalost prediktivnih markera efikasnosti GK u populaciji Srbije

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Pacijenti

Za potrebe farmakogenomske analize, uzorci periferne krvi ($n = 122$) su uzeti od neselektovanih pacijenata sa dijagnozom dečje ALL iz Univerzitetske dečje klinike u Beogradu na dan dijagnoze. U svrhu ispitivanja ekspresije *GAS5*, uzorci periferne krvi ($n=29$) su uzeti od pedijatrijskih ALL pacijenata iz Univerzitetske dečje klinike u Beogradu na dan dijagnoze (0. dan), 15. dana i 33. dana terapije indukcije remisije.

Pacijenti sa dečjom ALL su dijagnostifikovani, stratifikovani u grupe rizika i tretirani prema Berlin-Frankfurt-Münster protokolima: BFM ALL IC-2002 i BFM ALL IC-2009. Svi pacijenti su primali prednizon u indukcionoj fazi terapije. Ovu studiju je odobrio Etički odbor Univerzitetske dečje klinike, Univerziteta u Beogradu. Studija je sprovedena po principima Helsinške deklaracije.

Kontrolnu grupu je činilo 100 osoba iz populacije Srbije analiziranih sekvenciranjem nove generacije (NGS) na Illumina TruSightOne panelu. Osobe iz kontrolne grupe su analizirane na gene prediktore za bolesti koje ne utiču na dejstvo glukokortikoidnih lekova. Ovo istraživanje je odobreno od strane Etičkog odbora Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo Univerziteta u Beogradu.

3.2. Genotipizacija

3.2.1. DNK izolacija

Genomska DNK je ekstrahovana iz uzoraka periferne krvi učesnika koristeći QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) i čuvana na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do analize.

3.2.2. Detekcija delecije gena *GSTM1* i *GSTT1*

Detekcija *GSTM1* i *GSTT1* homozigotnih delecija je izvedena koristeći multiplu polimeraznu lančanu reakciju (PCR) u skladu sa prethodno opisanim postupkom (125). U ovoj metodi su umnožavani geni *GSTM1* i *GSTT1*. Umnožavan je i gen β -globina kao pozitivna kontrola PCR reakcije. Analiza je vršena na 2% agaroznom gelu.

Prajmeri za ovu metodu su dati u tabeli 2.

Tabela 2: Sekvence prajmeri za detekciju homozigotne delecije gena *GSTM1* i *GSTT1*

Naziv prajmera	Sekvenca prajmera
β -globin_F	5'-CAACTTCATCCACGTTCCACC-3'
β -globin_R	5'-GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-3'
GSTM1_F	5'-CTGGATTGTAGCAGATCATGC-3'
GSTM1_R	5'-CTCCTGATTATGACAGAAGCC-3'
GSTT1_F	5'-TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC-3'
GSTT1_R	5'-TCACCGGATCATGGCCAGCA-3'

3.2.3. Genotipizacija *ABCB1* varijanti

Varijanta rs2032582 u genu *ABCB1* je genotipizirana koristeći amplifikaciono-refraktorni mutacioni sistem polimerazne lančane reakcije (ARMS-PCR). Ushodni prajmer je dizajniran za svaki alel specifično kako bi se odredio tačni genotip. Protokol je adaptiran po Kurzavaskom i njegovim saradnicima (126). Za svaki uzorak su pripremljene tri PCR smeše od kojih je svaka sadržala različit alel-specifični prajmer, dok su sve ostale komponente bile identične. Konačna reakciona smeša je imala zapreminu od 15 μ l i sadržala je 1x pufer, 3mM MgCl₂, 0,67mM dNTP-ova, 0,3M ushodnog i nishodnog prajmera, 1U *Taq* polimeraze (Hot Start polymerase, Qiagen, Hilden, Germany) i 60ng DNK. PCR program je počeo denaturacijom od 95 °C u trajanju od 15min, posle koje je usledilo 10 ciklusa 95 °C (30sek) / 60 °C (30sek) / 72 °C (40sek), potom je usledilo 30 ciklusa 95 °C (30sek) / 56 °C (30sek) / 72 °C (40sek) i završio se elongacijom od 72 °C u trajanju od 5min.

Prajmeri za ARMS PCR varijante rs2032582 su dati u tabeli 4. Kontrolni produkt je umnožen pomoću *ABCB1_2677_K_F* i *ABCB1_2677_R* prajmera, dok je alel specifični produkt umnožen vezivanjem odgovarajućeg alel specifičnog (*ABCB1_2677_G_F*, *ABCB1_2677_T_F* ili *ABCB1_2677_A_F*) i *ABCB1_2677_R* prajmera (Tabela 3).

Tabela 3: Sekvence prajmera za alel-specifičnu genotipizaciju varijante rs2032582 u genu *ABCB1*

Naziv prajmera	Sekvenca prajmera
ABCB1_2677_A_F	5'-TGAAAGATAAGAAAGAAGGTA-3'
ABCB1_2677_G_F	5'-TGAAAGATAAGAAAGAAGGTG-3'
ABCB1_2677_T_F	5'-TGAAAGATAAGAAAGAAGGTT-3'
ABCB1_2677_K_F	5'-AGCAAATCTTGGGACAGGAA-3'
ABCB1_2677_R	5'-AGTCCAAGAAGGCTTTGC-3'

Varijante rs1045642 i rs1128503 u genu *ABCB1* su genotipizirane koristeći kompetitivni alel-specifični PCR genotipizirajući sistem (KASP) (LGC, Tedington, Middlesex, UK) prema upustvima proizvođača.

KASP (kompetitivni alel-specifični PCR) je metoda genotipizacije zasnovana na fluorescentnom rezonantnom prenosu energije (FRPE). U ovom slučaju, donorska hromofora je fluorofora ili nosilac fluorescencije, dok je akceptorska hromofora kvenčer, koja onemogućava emitovanje svetlosti van tačno određenih uslova do kojih KASP metoda i treba da dovede. Za potrebe sprovođenja KASP metode, potrebne su tri komponente:

1. DNK uzorak (5-10 ng)
2. KASP Assay mix (2 alel-specifična, ushodna prajmera i 1 zajednički nishodni prajmer)
3. KASP Master mix (2 dvolančana oligonukleoida obeležena različitim fluoroforama; KASP Taq, dNTP-ovi, soli, pufer)

Alel-specifični ushodni prajmeri sadrže alel komplementaran jednom od alela JNV-a na svom 3' kraju. Na svom 5' kraju sadrže specifičnu oligonukleotidnu sekvencu koja ne hibridizuje sa DNK, nazvanu rep. Fluorofore, FAM ili HEX, su vezane za jedan lanac oligonukleotida, dok je za komplementarni lanac istog oligonukleotida vezan kvenčer. Nishodni region fluorescentno obeleženog oligonukleotida je komplementaran repovima alel-specifičnih ushodnih prajmera.

Prvi korak u sprovođenju KASP metode jeste HotStart na 95 °C stepeni, koji služi kako bi se izvršila denaturacija i aktivirao enzim KASP Taq. Posle toga, počinje prva faza PCR-a. Denaturiše se DNK lanac. Potom se izvrši aniling jednog od ushodnih prajmera, zavisno od toga koji se u kompeticiji jače vezao shodno komplementarnosti sa JNV (otud i naziv metode) i vrši se elongacija.

U drugoj fazi PCR-a, vrši se denaturacija preostalog materijala koji se sastoji od originalnog DNK i od PCR produkta nastalog u prvoj fazi. Vrši se aniling i elongacija. Tokom ove faze, formira se komplementaran niz sa elongiranim ushodnim prajmerom, kao i komplementarna sekvenca repa samog prajmera.

Tokom treće faze PCR-a, opet se vrši denaturacija PCR produkata iz prethodne faze. Međutim, tokom anilinga u ovoj fazi, lanac oligonukleotida sa fluoroforom hibridizuje sa komplementom repa odgovarajućeg prajmera. Potom se vrši elongacija. U toku amplifikacije oligonukleotid sa fluoroforom se elongira i fluorofora ostaje odvojena od kvenčera.

Na kraju se smanji temperatura ispod 40 °C, kako bi se višak fluorofora kvenčovao i meri se signal koji emituju fluorescirajući produkti amplifikacije. Genotip ispitanika se očitava u zavisnosti od toga da li se detektuje fluoerescencija poreklom od FAM, VIC ili obe fluorofore.

3.2.4. Genotipizacija *NR3C1* varijanti

Varijante rs33389, rs33388 i rs6198 u genu *NR3C1* su genotipizirane koristeći TaqMan SNP genotipizirajuće eseje (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) prema instrukcijama proizvođača. Fluorofora VIC je korišćena da bi se detektovao majorni alel, dok je FAM fluorofora korišćena za detekciju minornog alela. Za genotipizaciju varijanti rs33389, rs33388 i rs6198, korišćeni su C__1032036_10, C__1046426_10 i C__8951023_10 eseji.

Taqman je metoda kvantitativnog PCR-a (qPCR) zasniva se na FRPE.

Za ovu metodu su potrebne sledeće komponente:

1. DNK uzorak

2. Taqman gene expression assay (oligonukleotidne probe sa fluoroforom (5' kraj) i kvenčerom (3' kraj); jedan par prajmera (jedan ushodni i jedan nishodni))
3. Taqman MasterMix (AmpliTaq Gold DNK polimeraza; dNTP-ovi; pasivna referenca (ROX); pufer; uracil-DNK glikozilaza)

Prvo se vrši denaturacija, kada se razdvajaju dvolančane DNK.

U fazi anilinga, oligonukleotidne probe hibridizuju sa mestom ispitivanog JNV-a, kao i par prajmera koji služe da bi se umnožio segment u okviru kojeg se nalazi JNV koji treba da se genotipizira.

AmpliGold Taq polimeraza vrši elongaciju. Ova polimeraza poseduje 5'-3' egzonukleaznu aktivnost. Kada polimeraza dođe do mesta početka hibridizovane probe, proba se degraduje i oslobađa se fluorofora od kvenčera. Fluorofora emituje svetlost, što se detektuje kao signal prisustva PCR umnoška za alel za koji je proba sa fluoroforom bila specifična. Na osnovu nivoa fluorescencije poreklom od VIC i FAM fluorofore očitava se genotip ispitanika.

3.2.5. Genotipizacija *GSTPI* varijanti

Varijante rs1695 i rs1138272 u genu *GSTPI* su detektovane koristeći KASP genotipizirajući sistem prema gore opisanoj proceduri.

3.2.6. Statistička analiza rezultata genotipizacije

Hardi-Vajnberg ravnoteža je ispitivana koristeći hi-kvadrat test. Haplotipske faze i učestalosti su procenjivane koristeći Alrequin softver (127). Asocijacije između nosilaca specifičnog genotipa ili haplotipa i broja blasta 8. dana su analizirane koristeći hi-kvadrat ili Fišerov test, kada je bilo primereno. I dominantni i recesivni genetički modeli su primenjivani kada su razmatrane pojedinačne varijante. Prijavljene su jače asocijacije sa odgovorom na GK. Nosioци specifičnog haplotipa su upoređivani sa svim ostalim pacijentima koji su nosili neki drugi haplotip. Ovo je rađeno za svaki haplotip. Količnik verovatnoće od 95% je korišćen za utvrđivanje uticaja kliničkih ili genetičkih varijabli odgovora na GK lekove. Vrednost $p = 0,05$ je izabrana kao granična vrednost statističke značajnosti, dok je vrednost $p = 0,07$ izabrana kao vrednost granične značajnosti.

Kontrolisanje za demografske i kliničke razlike je vršeno multivarijantnom logističkom regresijom. Korelacija između kontinuiranih promjenljivih je procjenjivama koristeći Spirmanov koeficijent korelacije (ρ). SPSS softverski paket (IBM SPSS Statistics v.21) je korišćen za statističke analize.

3.3. Merenje nivoa ekspresije *GAS5*

3.3.1. RNK izolacija

Mononuklearne ćelije su izolovane iz uzoraka periferne krvi dečjih ALL pacijenata koristeći Ficoll-Paque Plus rastvor (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) i skladištene su u TRI reagens rastvoru (Ambion, TX, USA) na -80°C . Totalna RNK je potom izolovana prema uputstvima proizvođača i skladištena na -80°C .

3.3.2. Reverzna transkripcija

Totalna RNK u količini od 600 ng je korišćena u sintezi cDNK metodom reverzne transkripcije prema uputstvu proizvođača kita (RevertAid Reverse Transcriptase, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Uzorci cDNK su skladišteni na -20°C .

3.3.3. Provera kvaliteta cDNK

Uspešnost reverzne transkripcije je proverena PCR metodom gde je kao matrica korišćena sintetisana cDNK. Za ovu proveru je umnožavan konstitutivno eksprimiran gen *Abl1* (128). Prajmeri korišćeni za umnožavanje gena *Abl1* su prikazani u tabeli 4.

Tabela 4: Sekvence prajmera za umnožavanje gena *Abl1*

Naziv prajmera	Sekvenca prajmera
Ia	5'-ATCTGCCTGAAGCTGGTGGGCT-3'
D	5'-TGTGATTATAGCCTAAGACCCGGAG-3'

3.3.4. Relativna kvantifikacija nivoa ekspresije *GAS5* i njeno izražavanje u odnosu na kalibrator

Nivo ekspresije *GAS5* je procenjivan u odnosu na *GAPDH* ekspresiju koristeći $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu (129).

$$X_n = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_U - \Delta Ct_K =$$

$$(Ct_{UT} - Ct_{UE}) - (Ct_{KT} - Ct_{KE})$$

Gde je X_n relativni nivo ekspresije ciljnog gena za ispitivani uzorak; Ct_{UT} je ciklus u kojem fluorescentni signal prelazi zadati prag intenziteta za ciljni gen u ispitivanom uzorku; Ct_{UE} je ciklus u kojem fluorescentni signal prelazi zadati prag intenziteta za endogenu kontrolu ispitivanog uzorka; Ct_{KT} i Ct_{KE} su ciklusi u kojima fluorescentni signal prelazi zadati prag intenziteta za ciljni gen i endogenu kontrolu za uzorak koji je izabran kao kalibrator.

Normalizovana medijana nivoa ekspresije pre terapije je korišćena kao kalibrator i u odnosu na ovu vrednost su preračunati nivoi ekspresije drugih uzoraka. Za merenje *GAS5* ekspresije u odnosu na *GAPDH* ekspresiju, korišćeni su Hs03464472_m1 i Hs99999905_m1 Taqman eseji za gensku ekspresiju (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) kao i KAPA Probe Fast qPCR Master Mix (Kapa Biosystems, MA, USA) na 7900HT Fast Real-Time PCR mašini.

3.3.5. Statistička analiza merenja ekspresije *GAS5*

Korelacija između kontinuiranih varijabli je ispitivana određivanjem Spirmanovog koeficijenta korelacije (ρ). Za merenje razlika u *GAS5* ekspresiji između različitih vremenskih tačaka korišćen je Wilcoxon-ov test sume rangova. Asocijacija kliničkih parametara ALL pacijenata i nivoa ekspresije *GAS5* je merena Mann Whitney U testom. Vrednost $p = 0,05$ je izabrana kao granična vrednost za statističku značajnost. Softver SPSS (IBM SPSS Statistics v.21) je korišćen za statističke analize.

3.4. Kloniranje GAS5 gena metodom ligacije uz pomoć restrikcionih enzima (130)

3.4.1. Kloniranje GAS5 u ekspresioni vektor

GAS5 je kloniran u ekspresioni vektor pcDNA3 (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) i dobijeni konstrukt je kasnije korišćen za prolaznu transfekciju. pcDNA3 u svom polilinkerskom regionu sadrži restrikciona mesta za enzime *HindIII* i *XbaI* koji su korišćeni prilikom kloniranja.

Sekvenca gena GAS5 bez introna je umnožena PCR reakcijom iz cDNK koja je sintetisana iz totalne RNK. Prajmeri na svom 5' kraju sadrže sekvence koje nisu komplementarne sa GAS5 sekvencom, ali sadrže restrikciona mesta za enzime *HindIII* i *XbaI*. Prajmeri koji su korišćeni za umnožavanje gena GAS5 su u tabeli 5.

Tabela 5: Sekvence prajmera za umnožavanje gena GAS5

Naziv prajmera	Sekvenca prajmera
GAS5_F_HindIII	5'-CCCA <u>AAGCTT</u> GGGTTTCGAGGTAGGAGTCGACT-3'
GAS5_R_XbaI	5'-GCTCTAGAGCGGAGACACTGTTTTAATCT-3'

Podvučeni nukleotidi predstavljaju mesta koja prepoznaju restrikcioni enzimi.

Smeše za digeriranje fragmenta GAS5 i plazmida pcDNA3 su inkubirane na 37°C 16h. Rezultati digestija su proveravani na 1% agaroznom gelu za plazmid i na 2% agaroznom gelu za PCR umnožak GAS5.

Za ligaciju je korišćena T4 DNK ligaza (Biolabs, Ipswich, Massachusetts, USA). U ligacionoj smeši molarni odnos između digeriranog ekspresionog vektora i digeriranog PCR produkta ispitivanog gena je bio 1:5. Ligaciona smeša je inkubirana 16 h na 16 °C. Produkt ligacije je ispitivan na 1% agaroznom gelu.

3.4.2. Uzgajanje E. Coli DH5α

E. Coli DH5α soj se uzgaja na LB podlozi koja se pravi prema ustaljenom receptu (130). Bakterije se zasejavaju na čvrstu ili tečnu LB podlogu uz aeraciju i inkubiraju na 37°C.

3.4.3. Pripremanje kompetentnih *E. Coli DH5α*

Ova metoda se izvodi sa ciljem povećanja propustljivosti bakterija za stranu DNK. Protokol je opisan ranije (130). Bakterijski soj *E. Coli DH5α*, posle inkubacije na čvrstoj podlozi na 37 °C, se inokulira u tečni medijum i inkubira se na 37°C uz aeraciju. Kada bakterije stupe u fazu eksponencijalnog rasta, one se centrifugiraju i nataložene bakterije se inkubiraju na ledu u 10 ml 0,1M CaCl₂. Posle inkubacije u rastvoru CaCl₂, resuspenduju se u 15% glicerolu i 0,1M CaCl₂ i čuvaju se na –80 °C.

3.4.4. Transformacija kompetentnih ćelija

Transformacija bakterija podrazumeva unos strane DNK u bakterijske ćelije. Transformacija kompetentnih *E. Coli* konstruktom pcDNA3-GAS5 je izvedena izlaganjem bakterija temperaturnom šoku u prisustvu konstrukta (131). Ukratko, period inkubacije na ledu u trajanju od 10 minuta prethodi izlaganju temperaturi od 42 °C u trajanju od 2 minuta zajedno sa konstruktom. Potom sledi oporavak na 37 °C u trajanju od 30 do 60 minuta.

Proces transformacije se završava razmazivanjem potencijalno transformisanih bakterija na LB podlozi i njihovo kultivisanje u prisustvu ampicilina. Plazmid sadrži gen koji kodira β-laktamazu, enzim koji razgrađuje ampicilin, stoga jedino transformisane bakterije mogu da izrastu na zasejanim podlogama u prisustvu antibiotika.

3.4.5. Detekcija željenog konstrukta

Inkubacijom na čvrstoj podlozi, na koju je dodat ampicilin, izrastao je veliki broj transformisanih bakterija. Međutim, čak iako izrasle bakterije sadrže plazmid, to ne znači da i sam plazmid sadrži željenu sekvencu.

Prvo je vršena brza liza (132) koja služi za izolaciju plazmida iz bakterijske kolonije. Potom je na 1% agaroznom gelu proveravana veličina plazmida kako bi se selektovale bakterijske kolonije koje sadrže proučavanu sekvencu.

Potvrdom o postojanju plazmida ligiranog sa sekvencom iste ili slične dužine kao ispitivana sekvencu u jednoj od kolonija se prelazi na sledeći korak - tzv. Mini Prep. Svrha ove metode je bila da se dobiju male količine plazmida zadovoljavajuće čistoće i kvaliteta

koji je bio podvrgnut dvostrukoj digestiji restrikcijom enzimima *HindIII* i *XbaI*. Proverom na 2% agaroznom gelu je utvrđivano postojanje fragmenta koji je bio ligiran u ekspresioni vektor. Time se potvrdilo postojanje pcDNA3-GAS5 konstrukta. Izvršeno je i sekvenciranje po Sangeru (133) kako bi se potvrdilo da nije došlo do greške u replikaciji ukloniranog fragmenta. Mini Prep je vršen Qiagen-ovim QIAprep Spin Miniprep kitom (Qiagen, Hilden, Germany) prema uputstvu proizvođača.

Na kraju je rađen Maxi Prep. Svrha ove metode je bila da se izdvoji plazmid sa kloniranom sekvencom u velikoj količini, koji je potom bio korišćen za transfekciju. Maxi Prep je vršen QIAGEN EndoFree Plasmid Purification MAXI Kit-om (Qiagen, Hilden, Germany) prema uputstvu proizvođača.

3.5. Uzgajanje HeLa ćelija, izolacija jedarne frakcije proteina HeLa ćelija i analiza protein-DNK interakcija

3.5.1. Uzgajanje HeLa

HeLa ćelije (ATCC br. CCL-2, DSMZ br. ACC 57) su uzgajane kako bi se dobila jedarna frakcija proteina za proučavanje efekta povećane ekspresije *GAS5* i tretmana deksametazonom na DNK-vezujuću aktivnost NF- κ B.

Za uzgajanje HeLa ćelija korišćen je DMEM medijum sa malom koncentracijom glukoze (1g/l) (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco, Paisley, UK). Medijum je kompletiran dodavanjem 10% fetalnog telećeg seruma (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Dublin, Ireland) i mešavine antibiotika penicilin-streptomycin (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) u finalnoj koncentraciji od 1%. Ćelije su inkubirane na 37 °C uz prisustvo 5% CO₂.

Za ispiranje je korišćen 1xPBS.

Pasažiranje je vršeno pri vrednostima od 80% konfluentnosti.

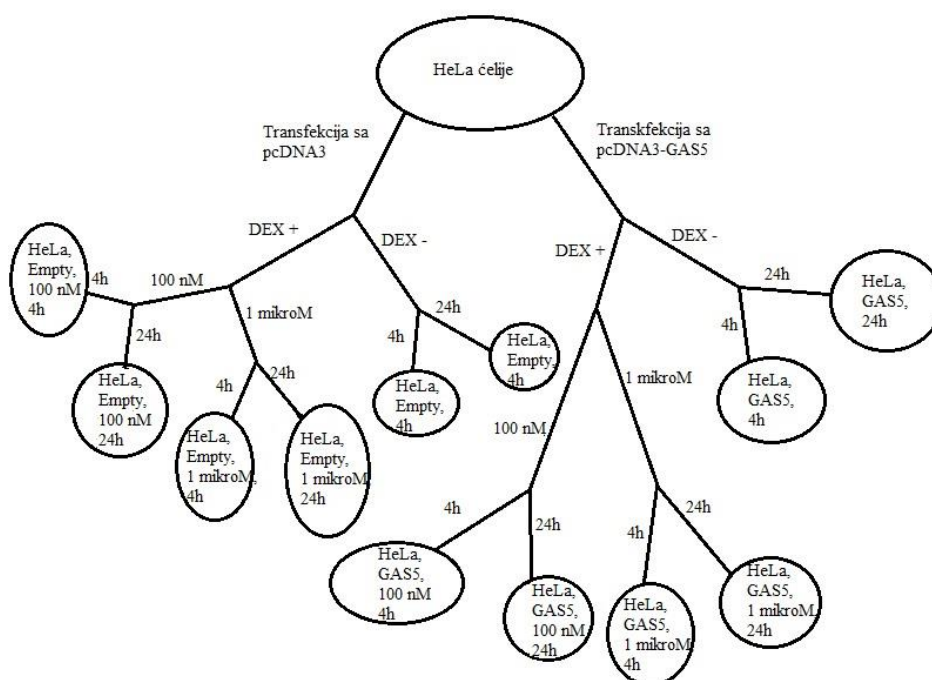
Brojanje je vršeno pomoću *Burker-Turk* pločice dodavanjem boje tripan-plavo (0,1%) koja je služila za razlikovanje živih i mrtvih ćelija.

3.5.2. Transfekcija HeLa ćelija i tretmani deksametazonom

Prolazna transfekcija HeLa ćelija plazmidnom je vršena pomoću lipofektamina (Lipofectamine 2000 Transfection Reagent, Invitrogen, Carlsbad, California, USA)

prema prethodno opisanom protokolu (134). Plazmidna DNK je rastvarana u Opti-MEM medijumu (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Dublin, Ireland) u koji je dodat 10% fetalni teleći serum. Plazmidna DNK u Opti-MEM medijumu je bila pomešana sa lipofektaminskim agensom i inkubirana je 25 minuta na sobnoj temperaturi. Potom je rastvor plazmidne DNK pomešan sa rastvorom medijuma koji je sadržao HeLa ćelije i lipofektaminski agens. Novostvoreni rastvor je bio inkubiran na 37 °C sa 5% CO₂ u trajanju od 5h. Potom su skupljane ćelije i rastvarane u kompletiranom DMEM medijumu i ostavljane su da bi se oporavljale preko noći. Sledećeg dana, dodat je deksametazon u unapred određene populacije HeLa ćelija, te su ostavljene da budu inkubirane sa deksametazonom 4h ili 24h.

HeLa ćelije su transfektovane, tretirane deksametazonom i inkubirane. Na osnovu ova tri postupka, uzgojeno je 12 grupa HeLa ćelija, čiji odnos i grupisanje na osnovu ova tri postupka je grafički prikazan na slici 7. Transfektovane su pcDNA3 plazmidom i pcDNA3-GAS5 konstruktom. Posle transfekcije, ćelije su tretirane deksametazonom. Finalne koncentracije u rastvorima transfekovanih HeLa ćelija su bile 100 nM i 1 µM. Ćelije su sakupljane 20 h i 40 h posle transfekcije.



Slika 7. Populacije HeLa ćelija razvrstane po grupama. DEX + označava prisustvo deksametazona u finalnoj smeši, dok DEX – označava odsustvo deksametazona u finalnoj

smeši. Oznake „100 nM“ i „1 mikroM“ označavaju koncentraciju deksametazona u finalnim smešama. Oznake „4h“ i „24h“ označavaju dužinu trajanja tretmana deksametazonom. „Empty“ označava transfekciju plazmidom bez fragmenta *GAS5*, dok „*GAS5*“ označava transfekciju plazmidom sa fragmentom *GAS5*.

3.5.3. Izolacija jedarnih proteina HeLa

Izolacija proteina jedarne frakcije uzgajanih ćelija je vršena iz 1×10^6 ćelija. Metoda je po kojoj je vršena izolacija je prethodno opisana (135). Jedarni ekstrakt je čuvan u alikvotima na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.5.4. Određivanje koncentracije proteina

Koncentracija jedarne frakcije proteina transfektovanih i netransfektovanih HeLa ćelija je određivana Bradfordovom metodom (136). Apsorbancija je merena spektrofotometrijski na 595nm talasne dužine.

3.5.5. Analiza interakcije protein-DNK

Metodom usporene elektroforetske pokretljivosti (eng. Electrophoretic mobility shift assay) je proučavana interakcija između proteina i proteinskih kompleksa jedarne frakcije i oligonukleotidne DNK probe sa konsenzus sekvencom specifičnom za protein koji se ispituje. Metoda je adaptirana po prethodno opisanom protokolu (137).

EMSA obuhvata nekoliko koraka:

1. Priprema probe
2. Inkubacija probe sa nuklearnim proteinima
3. Gel elektroforeza
4. Detekcija signala

DNK proba u količini od 10 pmolova/ μl , koja sadrži konsenzus sekvencu za vezivanje proteinskog kompleksa u kojem učestvuje NF- κ B, se radioaktivno obeležava na svom 5' kraju T4 polinukleotidnom kinazom (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Pošto se izvrši radioaktivno obeležavanje, moraju da se uklone nevezani radioaktivni nuleotidi propuštanjem kroz G-50 kolonu (Sephadex, Merck

KGaA, Darmstadt, Germany). Radioaktivno obeležena DNK proba se hibridizuje sa svojom antisense sekvencom u odnosu 1:5, odnosno 10 pmolova:50 pmolova. Na scintilacionom brojaču (LKB) se meri radioaktivnost, koja odgovara količini obeležene probe.

Da bi se ispitalo vezivanje nuklearnih proteina za ovu radioaktivnu probu, proba je najpre inkubirana 30 min na 37 °C sa poly dI-dC da bi se obezbedila bolja specifičnost. Nakon toga se dodaje 3 µg nuklearnih proteina i inkubira 30 min na 37°C. Dodatna provera specifičnosti je vršena dodavanjem anti-p65 antitela. Ova smeša se razdvaja elektroforetski na 4% poliakrilamidnom gelu u trajanju od 75 min pri uslovima od 250 V i 55 mA na temperaturi od 16°C.

Poliakrilamidni gel je sušen i potom je analiziran na aparatu *Storage Phosphor System* (Cyclone, Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA) ili autoradiografijom. Posle ekspozicije rendgen filmovi su podvrgnuti skeniranju. U *ImageJ* softveru je vršena semikvantitativna denzitometrijska analiza. Ovim programom su izmereni intenziteti traka koje odgovaraju kompleksima protein-DNK.

Sekvenca oligonukleotida od kojih je formirana DNK proba je data u tabeli 6.

Tabela 6: Sekvence sense i antisense oligonukleotida DNK probe za koju se vezuje NF-κB

Naziv	Sekvenca
NF-κB_sense	5'-AGTTGAGGGGACTTTC ^u CCAGG-3'
NF-κB_antisense	5'-CCTGGGAAAGTCCCCTCAACT-3'

Podvučeni nukleotidi predstavljaju konsenzus sekvencu za NF-κB.

3.6. Populaciona farmakogenomska analiza (pilot studija)

3.6.1. Odabir gena varijanti za pilot populacionu farmakogenomsku studiju

Varijante koje utiču na farmakogenomiku GK-a u terapiji dečjeg ALL-a i koje mogu potencijalno da se uključe u farmakogenomski test za GK rezistenciju u populaciji Srbije su odabrane korišćenjem farmakogenomske baze podataka „PharmGKB“ i literature. Izdvojene su egzonske varijante koje obuhvata TruSightOne panel.

Referentni genom za TruSightOne je Hg19.

3.6.2. Metoda NGS sekvenciranja

Illumina platforme za NGS sekvenciranje omogućavaju masivno paralelno sekvenciranje koje se zasniva na konceptima sekvenciranja po sintezi (eng. *sequencing by synthesis*) koristeći hemiju koja omogućuje reverzibilno prekidanje sinteze DNK (eng. *reversible terminated chemistry*). Suštinski, očitavanje sekvence se vrši tokom elongacije DNK lanca nakon ugrađivanja fluorescentno obeleženog nukleotida koji istovremeno služi da reverzibilno prekine sintezu DNK.

Metod obuhvata izolaciju i kvantifikaciju DNK koja se koristi za pripremu biblioteke. DNK biblioteka obuhvata specifične DNK od interesa okružene oligonukleotidnim adapterima koji omogućavaju identifikaciju, umnožavanje i sekvenciranje DNK fragmenata.

Pripremanje biblioteke se vrši u nekoliko koraka:

1. Tagmentisanje genomske DNK podrazumeva fragmentaciju ispitivane DNK i dodavanje specifičnih adaptera.
2. Prva amplifikacija uz prečišćavanje produkata i procenu koncentracije uzorka korišćenjem fluorimetrijskih metoda
3. Obogaćivanje uzorka probama specifičnim za egzone 4813 gena
4. Druga amplifikacija uz prečišćavanje produkata i procenu koncentracije uzorka korišćenjem fluorometrijskih metoda

Pripremljena biblioteka se analizira na MiSeq platformi (Illumina, San Diego, California, USA). Analiza obuhvata nekoliko koraka:

1. Klonalna amplifikacija koja se vrši zahvaljujući kratkim oligonukleotidnim sekvencama gusto raspoređenim na staklenom čipu.
2. Sekvenciranje po sintezi koje podrazumeva dodavanje fluorescentno obeleženih nukleotida na DNK lanac nakon čega sledi detekcija signala. Fluorescentna boja reverzibilno prekida elongaciju DNK lanca što omogućava čitanje jednog po jednog nukleotida.

3.6.3. Analiza podataka dobijenih NGS sekvenciranjem

Panel kliničkog egzoma obuhvata analizu 12 megabaza u okviru kojih se nalazi 62 000 egzona koji su delovi 4813 gena. Po završetku reakcije sekvenciranja, dobijaju se variant call format (VCF) fajlovi koji se analiziraju VariantStudio softverom, verzija 3 (Illumina, San Diego, California, USA). Ovaj softver vrši anotaciju, klasifikaciju na osnovu biološkog značaja, procenu potencijalnog uticaja na proteinski produkt i učestalost varijante kod analizirane grupe individua.

3.6.4. Statistička obrada rezultata dobijenih NGS sekvenciranjem

Koristeći podatke za učestalost varijanti u evropskoj populaciji iz „1000 genome project“, Fišerovim egzaktnim testom je proverena sličnost između evropske i srpske populacije. Hardy-Vajnbegova ravnoteža je proveravana Fišerovim egzaktnim testom. Granični nivo za statističku značajnost je postavljen na $p = 0,05$.

4. REZULTATI

4.1. Farmakogenetički markeri značajni za odgovor na GK terapiju u inicijalnoj fazi lečenja dece sa ALL

Inicijalna faza lečenja dečje ALL je indukcija remisije. U prvih 8 dana se koristi monoterapija koju čine GK (prednizon), te je efekat farmakogenetičkih markera za GK u ovoj fazi lečenja lakše pratiti. Surogat marker za praćenje odgovora na terapiju je bio broj blasta u μL periferne krvi 8. dana. Pri tome, nismo koristili samo vrednost od 1000 blasta (koja se koristi u BFM protokolu), već smo kao marker za procenu efikasnosti terapije koristili i vrednosti od 100 ili 0 blasta u μL periferne krvi pacijenata. Ovi surogat markeri su korišćeni za podelu pacijenata sa dobrim odgovorom na prednizon (DOP) i lošim odgovorom na prednizon (LOP).

4.1.1. Demografske i kliničke karakteristike dečjih ALL pacijenata

Od 122 dečjih ALL pacijenata, 66 su bili dečaci (54,1%) i medijana uzrasta je bila 5,2 (interkvartilni opseg 3,3-10,2) godina. B-ćelijska leukemija je bila zastupljena kod 108 (88,5%) pacijenata, dok su ostali imali T-ćelijsku leukemiju. Oko 47% pacijenata je inicijalno imalo preko 20 000 leukocita (Le) po μL periferne krvi, što se smatra za nepovoljni prognostički faktor prema BFM ALL IC-2002 i BFM ALL IC-2009 protokolima.

4.1.2. Odgovor na GK terapiju 8. dana

U našoj studiji, broj blasta po μL krvi 8. dana je korišćen kao surogat marker odgovora na GK. Bilo je 13 pacijenata (11%) sa više od 1000 blasta/ μL 8. dana GK terapije u našoj grupi pacijenata. Analizirana je korelacija sa kliničkim i demografskim karakteristikama pacijenata sa odgovorom na prednizon. Naime, broj leukocita u momentu postavljanja dijagnoze je pokazao pozitivnu korelaciju sa apsolutnim brojem blasta 8. dana ($r_s = 0,44$, $p = 0,000001$). Pacijenti koji boluju od T-ćelijske leukemije su imali veći rizik da loše odgovore na inicijacioni GK tretman (≥ 1000 blasta/ μL 8. dana) (Fišerov test, $p = 0,043$) u odnosu na pacijente sa B-ćelijskom leukemijom. Uzrast i pol

dečjih ALL pacijenata su pokazali asocijaciju sa odgovorom na prednizon sa graničnom statističkom značajnošću.

4.1.3. Asocijacija između farmakogenetičkih varijanti i odgovora na GK terapiju prema BFM protokolu

Homozigotne delecije gena *GSTM1* i *GSTP1* su proučavane, kao i 8 JNV u genima *NR3C1* (rs33389, rs33388 i rs6198), *GSTP1* (rs1695 i rs1138272) i *ABCB1* (rs1128503, rs2032582 i rs1045642). Genotipske učestalosti svih analiziranih JNV su bile u skladu sa HW ravnotežom za datu grupu ALL pacijenata.

Kada su urađene analize u kojima je 1000 blasta/ μ L bila granica između DOP i LOP, pronađene su pozitivne korelacije farmakogenetičkih markera sa odgovorom na GK. Što se tiče gena *NR3C1*, rezultati ovog rada su pokazali da su *NR3C1* varijante asociirane sa odgovorom na GK terapiju 8. dana od početka lečenja. Naime, retki *NR3C1* rs6198 GG genotip je asociiran sa LOP (Fišerov test, $p = 0,030$). Kada su razmatrani analizirani JNV kao haplotipovi u genu *NR3C1*, pokazano je da je haplotip CAA (rs33389-rs33388-rs6198) asociiran sa DOP (< 1000 blasta/ μ L) (Fišerov test, $p = 0,030$). Obe asocijacije su ostale statistički značajne ili granično značajne kada su korigovane za uzrast, pol i inicijalni broj leukocita (logistička regresija, $p = 0,036$ i $p = 0,052$, redom).

Kada su varijante u genima *ABCB1* i *GST* razmatrane u odnosu na odgovor na GK, nije pronađena statistički značajna asocijacija. Međutim, kada su razmatrani analizirani JNV kao haplotipovi, haplotip GC (rs1695-rs1138272) u genu *GSTP1* je bio asociiran sa DOP (hi kvadrat test, $p = 0,036$). (Tabele 8 i 9)

4.1.4. Dodatne analize asocijacije farmakogenetičkih markera i odgovora na GK terapiju 8. dana u dece sa ALL

Pored granične vrednosti od 1000 blasta/ μ L 8. dana, koja je korišćena da razgraniči pacijente sa DOP i LOP prema BFM protokolu, mi smo koristili i druge granične vrednosti broja blasta 8. dana kao markere odgovora na GK. Kako bi se potvrdio značaj analiziranih farmakogenetičkih varijanti sa odgovorom na GK terapiju, izvršene su dodatne analize sa graničnim vrednostima od 0 (blast- negativni pacijenti) ili 100 blasta

u perifernoj krvi. U našoj grupi dečjih ALL pacijenata, 40 (32,8%) je bilo blast-negativno, dok je 38 (31,1%) pacijenata imalo između 1 i 99 blasta/ μ L posle 8 dana GK tretmana. Inicijalni broj leukocita je korelisan sa blast-pozitivnim statusom (barem 1 blast/ μ L) i većim brojem blasta (≥ 100 blasta/ μ L).

Što se tiče gena *NR3C1*, rezultati su pokazali da su nosioci minornog T alela varijante rs33389 uglavnom imali veći broj blasta (≥ 100 blasta/ μ L) (hi kvadrat test, $p = 0,095$), dok su nosioci minornog T alela varijante rs33388 imali manji broj blasta (< 100 blasta/ μ L) (hi kvadrat test, $p = 0,098$), ali rezultati nisu dostigli statističku značajnost. Kada su razmatrani analizirani JNV kao haplotipovi, identične asocijacije su dobijene, pošto alel rs33389 T definiše relativno retki haplotip TAA (rs33389-rs33388-rs6198), dok alel rs33388 T definiše najučestaliji haplotip CTA.

Dodatne analize koje se tiču gena *GSTP1* su pokazale da su nosioci minornog T alela varijante rs1138272 u genu *GSTP1* imali 5 puta veću verovatnoću da budu blast-pozitivni 8. dana u poređenju sa nosiocima genotipa CC (hi kvadrat test, $p = 0,024$). Potom je analiziran haplotip u genu *GSTP1* koji se sastoji od rs1695 i rs1138272 varijanti. Pronađeno je da je haplotip GC u genu *GSTP1* asociran sa DOP i sa manjim brojem blasta 8. dana. Naime, ovaj haplotip je bio asociran sa brojem blasta ispod 100 (< 100 blasta/ μ L, hi kvadrat test, $p = 0,028$) kao i sa blast-negativnim statusom sa graničnom statističkom značajnošću (hi kvadrat test, $p = 0,054$). Takođe, pokazano je da je haplotip GT u genu *GSTP1* asociran sa većim brojem blasta sa graničnom statističkom značajnošću (≥ 100 blasta/ μ L, hi kvadrat test, $p = 0,062$) i statistički značajno asociran sa blast-pozitivnim statusom (hi kvadrat test, $p = 0,034$). Većina ovih asocijacija je ostala značajno ili granično asocirana kada su korigovane za uzrast, pol i inicijalni broj leukocita, posle statističke analize logističkom regresijom. Svi rezultati koji se tiču *GSTP1* varijanti, ukazuju na to da nosioci haplotipa GC imaju bolji odgovor na tretman prednizonom, dok nosioci haplotipa GT imaju lošiji odgovor na tretman prednizonom.

Što se tiče gena *GSTT1*, rezultati su pokazali da nosioci delecije imaju veću verovatnoću da imaju broj blasta preko 100 (≥ 100 blasta/ μ L) (hi kvadrat test, $p = 0,063$) u poređenju sa nosiocima makar jednog funkcionalnog alela *GSTT1*. Kada se ova asocijacija koriguje za uzrast, pol i inicijalni broj leukocita, ona postaje statistički značajna (logistička regresija, $p = 0,044$).

Kada su u pitanju *ABCB1* farmakogenetičke varijante, nije pokazana asocijacija između njih i broja blasta. Međutim, kada su razmatrani haplotipovi, pokazano je da su nosioci relativno retkog haplotipa CGT (rs1128503-rs2032582-rs1045642) imali 5 puta veću verovatnoću da će biti blast-pozitivni (hi kvadrat test, $p = 0,018$), nego nosioci ostalih haplotipova. Ova asocijacija je ostala značajna kada je korigovana za uzrast, pol i inicijalni broj leukocita korišćenjem logističke regresije (Tabele 7 i 8).

Naši rezultati pokazali da su varijanta rs6198 u genu *NR3C1* i haplotip rs1695-rs1138272 u genu *GSTP1* potencijalni novi farmakogenetički markeri odgovora na terapiju GK kod dece obolele od ALL.

Tabela 7. Učestalost genotipova i njihova povezanost sa odgovorom na prednizon – glukokortikoidnu terapiju (GK). Odgovor GK je procenjen na osnovu apsolutnog broja blasta u μL krvi 8. dana od početka terapije. Za univarijantnu statističku analizu korišćen je hi kvadrat test, osim ako nije drugačije navedeno. Statistički značajne asocijacije ($p < 0.05$) su obeležene podebljanim slovima (bold).

Genotip	≥ 1000 blasta	$100 \leq$ blasta < 1000	$1 \leq$ blasta < 100	blast- negativni pacijenti	Odgovor na GK (cutoff=1000 blasta) ⁰	Odgovor na GK (cutoff=1000 blasta) ^{0, ADI}	Odgovor na GK (cutoff=100 blasta) ¹	Odgovor na GK (cutoff=100 blasta) ^{1, ADI}	Odgovor na GK (cutoff=0 blasta) ²	Odgovor na GK (cutoff=0 blasta) ^{2- ADI}
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	OR[95%CI] P vrednost	OR[95%CI] P vrednost	OR[95%CI] P vrednost	OR[95%CI] P vrednost	OR[95%CI] P vrednost	OR[95%CI] P vrednost
NR3C1 rs33389										
CC	10 (76.9)	21 (67.7)	33 (86.8)	32 (80.0)	referentna vrednost	referentna vrednost	referentna vrednost	referentna vrednost	referentna vrednost	referentna vrednost
CT	3 (23.1)	9 (29.0)	4 (10.5)	6 (15.0)	1.12[0.29-4.41]	1.10[0.21-5.92]	2.1[0.87-5.05]	1.85[0.73-4.71]	1.12[0.44-2.86]	0.89[0.32-2.44]
TT	0 (0.0)	1 (3.2)	1 (2.6)	2 (5.0)	1 ^e	0.910	0.095	0.195	0.805	0.826
NR3C1 rs33388										
AA	4 (30.8)	11 (35.5)	7 (18.4)	9 (22.5)	referentna vrednost	referentna vrednost	referentna vrednost	referentna vrednost	referentna vrednost	referentna vrednost
AT	4 (30.8)	15 (48.4)	19 (50.0)	19 (47.5)	0.74[0.21-2.60]	0.71[0.16-3.13]	0.5[0.22-1.15]	0.53[0.28-1.26]	0.79[0.32-1.92]	0.83[0.32-2.11]
TT	5 (38.5)	5 (16.1)	12 (31.6)	12 (30.0)	0.737 ^f	0.658	0.098	0.148	0.606	0.699
NR3C1 6198										
AA	7 (53.8)	21 (67.7)	28 (73.7)	30 (75.0)	referentna vrednost	referentna vrednost	referentna vrednost	referentna vrednost	referentna vrednost	referentna vrednost
AG	4 (30.8)	10 (32.3)	9 (23.7)	10 (25.0)	referentna vrednost	referentna vrednost	referentna vrednost	referentna vrednost	referentna vrednost	referentna vrednost
GG	2 (15.4)	0 (0.0)	1 (2.6)	0 (0.0)	19.64[1.65-234.32] 0.030 ^{g,h}	16.76[1.20-234.27] 0.036 ^g	1.66[0.75-3.68] 0.222 ^h	4.01[0.34-47.4] 0.27 ^h	1.04[0.99-1.08] 0.22 ^h	- 1 ^h
GSTP1 rs1695										
AA	7 (53.8)	15 (48.4)	16 (42.1)	16 (40.0)	referentna vrednost	referentna vrednost	referentna vrednost	referentna vrednost	referentna vrednost	referentna vrednost
AG	5 (38.5)	13 (41.9)	18 (47.4)	19 (47.5)	0.65[0.21-2.06]	0.91[0.26-3.25]	0.70[0.33-1.46]	0.73[0.34-1.58]	0.77[0.36-1.66]	0.84[0.37-1.9]
GG	1 (7.7)	3 (9.7)	4 (10.5)	5 (12.5)	0.46	0.885	0.338	0.423	0.508	0.682
GSTP1 rs1138272										
CC	9 (69.2)	25 (80.6)	31 (81.6)	38 (95.0)	referentna vrednost	referentna vrednost	referentna vrednost	referentna vrednost	referentna vrednost	referentna vrednost
CT	3 (23.1)	6 (19.4)	7 (18.4)	2 (5.0)	2.79[0.76-10.20]	3.17[0.76-13.28]	2.26[0.84-6.07]	2.23[0.81-6.15]	4.97[1.09-22.69]	4.44[0.9-21.08]
TT	1 (7.7)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0.119 ^f	0.115	0.122	0.121	0.024	0.060
GSTM1 homozigotna delecija										
WT	6 (46.2)	13 (41.9)	18 (47.4)	19 (47.5)	referentna vrednost	referentna vrednost	referentna vrednost	referentna vrednost	referentna vrednost	referentna vrednost

DEL	7 (53.8)	18 (58.1)	20 (52.6)	21 (52.5)	0.99[0.31-3.13] 0.99	0.96[0.25-3.70] 0.953	1.19[0.56-2.50] 0.707	1.03[0.47-2.27] 0.941	1.0[0.51-2.38] 0.805	0.96[0.43-2.18] 0.935
GSTT1 homozigotna delecija										
WT	8 (61.5)	23 (74.2)	31 (81.6)	35 (87.5)	referentna vrednost	referentna vrednost	referentna vrednost	referentna vrednost	referentna vrednost	referentna vrednost
DEL	5 (38.5)	8 (25.8)	7 (18.4)	5 (12.5)	2.78[0.82-9.09] 0.138 ^g	3.70[0.95-14.08] 0.058	2.33[0.94-5.56] 0.063	2.39[1.03-6.25] 0.044	2.27[0.78-6.67] 0.127	2.06[0.67-6.29] 0.202
ABCB1 rs1128503										
CC	5 (38.5)	10 (32.3)	13 (34.2)	13 (32.5)	referentna vrednost	referentna vrednost	referentna vrednost	referentna vrednost	referentna vrednost	referentna vrednost
CT	6 (46.2)	16 (51.6)	21 (55.3)	17 (42.5)	0.79[0.24-2.59]	0.74[0.20-2.76]	0.97[0.44-2.11]	0.89[0.40-1.99]	0.92[0.41-2.07]	0.84[0.36-1.97]
TT	2 (15.4)	5 (16.1)	4 (10.5)	10 (25.0)	0.759 ^g	0.651	0.932	0.773	0.857	0.691
ABCB1 rs2032582										
GG	5 (31.3)	9 (24.3)	15 (30.6)	14 (27.5)	referentna vrednost	referentna vrednost	referentna vrednost	referentna vrednost	referentna vrednost	referentna vrednost
GT	4 (25.0)	16 (43.2)	17 (34.7)	16 (31.4)	0.86[0.26-2.80] 0.769 ^g	1.08[0.29-4.05] 0.908	1.27[0.58-2.78] 0.693	1.27[0.56-2.88] 0.57	0.98[0.44-2.17] 0.968	0.9[0.39-2.1] 0.813
TT	3 (18.8)	5 (13.5)	6 (12.2)	9 (17.6)						
GA	1 (6.3)	1 (2.7)	0 (0.0)	1 (2.0)						
ABCB1 rs1045642										
CC	3 (23.1)	6 (19.4)	11 (28.9)	11 (27.5)	referentna vrednost	referentna vrednost	referentna vrednost	referentna vrednost	referentna vrednost	referentna vrednost
CT	7 (53.8)	16 (51.6)	19 (50.0)	18 (45.0)	1.15[0.30-4.49]	1.47[0.31-6.35]	1.53[0.63-3.70]	1.92[0.74-4.98]	1.17[0.5-2.77]	1.31[0.52-3.28]
TT	3 (23.1)	9 (29.0)	8 (21.1)	11 (27.5)	1 ^h	0.657	0.393	0.18	0.711	0.559

^g Asocijacija sa odgovorom na GK 8. dana od početka terapije prema parametrima BFM protokola: LOP grupa (≥ 1000 blasta) u odnosu na DOP grupu (< 1000 blasta)

^h Asocijacija sa odgovorom na GK 8. dana od početka terapije sa cut-off (graničnom) vrednošću od 100 blasta u mikrol: veći (≥ 100 blasta) u odnosu na manji (< 100 blasta) broj blasta

^g Asocijacija sa blastnim statusom 8. dana od početka terapije: blast- pozitivni u odnosu na blast-negativne (0 blasta u μ l) pacijente

^h Fisherov egzaktni test

^h Recessivni model

^{AD} Korigovano za uzrast, pol i inicijalni broj leukocita korišćenjem logističke regresije

OR = količnik verovatnoće (Odds ratio) između grupa pacijenata sa većom brojem blasta u poređenju sa grupom sa manjim brojem blasta. Grupa pacijenata sa manjim brojem blasta je referentna grupa.

CI = Interval poverenja (confidence interval)

Tabela 8. Učestalost haplotipova i njihova povezanost sa odgovorom na prednizon – glukokortikoidnu terapiju (GK). Odgovor GK je procenjen na osnovu apsolutnog broja blasta u μL krvi 8. dana od početka terapije. Za univarijantnu statističku analizu korišćen je hi kvadrat test, osim ako nije drugačije navedeno. Statistički značajne asocijacije ($p < 0.05$) su obeležene podebljanim slovima (bold).

Haplotip učestalost	Status nosioca *	≥ 1000 blasta	$100 \leq$ blasta < 1000	$1 \leq$ blasta < 100	blast-negativni pacijenti	Odgovor na GK (cutoff=1000 blasta) ²	Odgovor na GK (cutoff=1000 blasta) ^{2, ADI}	Odgovor na GK (cutoff=100 blasta) ¹	Odgovor na GK (cutoff=100 blasta) ^{1, ADI}	Odgovor na GK (cutoff=0 blasta) ⁰	Odgovor na GK (cutoff=0 blasta) ^{0, ADI}
		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	OR [95%CI] p vrednost	OR [95%CI] p vrednost	OR [95%CI] p vrednost	OR [95%CI] p vrednost	OR [95%CI] p vrednost	OR [95%CI] p vrednost
NR3C1 (rs33389-rs33388-rs6198) haplotipovi											
CTA (51.2%)	-	4 (30.8)	11 (35.5)	7 (18.4)	9 (22.5)	referentna vrednost	referentna vrednost	referentna vrednost	referentna vrednost	referentna vrednost	referentna vrednost
	+	9 (69.2)	20 (64.5)	31 (81.6)	31 (77.5)	0.71[0.21-2.60] 0.737 ^f	0.72[0.16-3.13] 0.658	0.50[0.22-1.15] 0.098	0.53[0.22-1.26] 0.148	0.79[0.32-1.92] 0.606	0.83[0.32-2.11] 0.699
CAA (20.5%)	-	12 (92.3)	15 (48.4)	25 (65.8)	25 (62.5)	referentna vrednost	referentna vrednost	referentna vrednost	referentna vrednost	referentna vrednost	referentna vrednost
	+	1 (7.7)	16 (51.6)	13 (34.2)	15 (37.5)	0.12[0.015-0.98] 0.030 ^f	0.12[0.013-1.02] 0.052	1.12[0.52-2.41] 0.763	1.27[0.57-2.80] 0.561	0.96[0.44-2.1] 0.922	1.22[0.53-2.80] 0.643
CAG (16.0%)	-	7 (53.8)	20 (64.5)	28 (73.7)	29 (72.5)	referentna vrednost	referentna vrednost	referentna vrednost	referentna vrednost	referentna vrednost	referentna vrednost
	+	6 (46.2)	11 (35.5)	10 (26.3)	11 (27.5)	2.06[0.64-6.62] 0.222 ^f	1.82[0.49-6.74] 0.372	1.71[0.78-3.75] 0.18	1.60[0.70-3.65] 0.262	1.29[0.56-2.97] 0.543	1.28[0.53-3.1] 0.576
TAA (12.3%)	-	10 (76.9)	21 (67.7)	33 (86.8)	32 (80.0)	referentna vrednost	referentna vrednost	referentna vrednost	referentna vrednost	referentna vrednost	referentna vrednost
	+t	3 (23.1)	10 (32.3)	5 (13.2)	8 (20.0)	1.12[0.29-4.41] 1.000 ^f	1.10[0.21-5.92] 0.91	2.10[0.87-5.05] 0.095	1.85[0.73-4.71] 0.195	1.12[0.44-2.86] 0.805	0.89[0.32-2.44] 0.826
GSTP1 (rs1695-rs1138272) haplotipovi											
AC (66.4%)	-	1 (7.7)	3 (9.7)	4 (10.5)	5 (12.5)	referentna vrednost	referentna vrednost	referentna vrednost	referentna vrednost	referentna vrednost	referentna vrednost
	+	12 (92.3)	28 (90.3)	34 (89.5)	35 (87.5)	1.49[0.18-12.45] 1.000 ^f	0.99[0.11-9.21] 0.993	1.30[0.38-4.51] 0.768 ^f	1.18[0.33-4.19] 0.797	1.32[0.4-4.33] 0.756	1.15[0.33-3.93] 0.825
GC (25.4%)	-	11 (84.6)	20 (64.5)	21 (55.3)	18 (45.0)	referentna vrednost	referentna vrednost	referentna vrednost	referentna vrednost	referentna vrednost	referentna vrednost
	+	2 (15.4)	11 (35.5)	17 (44.7)	22 (55.0)	0.22[0.045-1.01] 0.036	0.27[0.054-1.38] 0.117	0.42[0.19-0.96] 0.028	0.42[0.19-0.96] 0.041	0.47[0.22-1.02] 0.054	0.55[0.24-1.23] 0.149
GT (7.8%)	-	9 (69.2)	25 (80.6)	32 (84.2)	38 (95.0)	referentna vrednost	referentna vrednost	referentna vrednost	referentna vrednost	referentna vrednost	referentna vrednost
	+	4 (30.8)	6 (19.4)	6 (15.8)	2 (5.0)	3.02[0.82-11.12] 0.101 ^f	3.41[0.81-14.34] 0.094	2.57[0.93-7.11] 0.062	2.61[0.93-7.37] 0.069	4.6[1.00-21.12] 0.034	4.33[0.91-20.62] 0.065
ABCB1 (rs1128503-rs2032582-rs1045642) haplotipovi											

CGC (45.9%)	-	4 (30.8)	10 (32.3)	8 (21.1)	12 (30.0)	referentna vrednost	referentna vrednost	referentna vrednost	referentna vrednost	referentna vrednost	referentna vrednost
	+	9 (69.2)	21 (67.7)	30 (78.9)	28 (70.0)	0.85[0.25-2.98] 0.754 ^f	0.74[0.19-2.81] 0.654	0.74[0.33-1.67] 0.465	0.73[0.32-1.69] 0.461	1.17[0.5-2.7] 0.714	1.43[0.58-3.53] 0.432
TTT (36.9%)	-	6 (46.2)	12 (38.7)	17 (44.7)	16 (40.0)	referentna vrednost	referentna vrednost	referentna vrednost	referentna vrednost	referentna vrednost	referentna vrednost
	+	7 (53.8)	19 (61.3)	21 (55.3)	24 (60.0)	0.82[0.26-2.60] 0.772	0.85[0.24-3.08] 0.805	1.06[0.50-2.24] 0.88	1.13[0.52-2.47] 0.76	0.89[0.41-1.93] 0.778	0.91[0.4-2.05] 0.821
CGT (8.6%)	-	10 (76.9)	24 (77.4)	30 (78.9)	38 (95.0)	referentna vrednost	referentna vrednost	referentna vrednost	referentna vrednost	referentna vrednost	referentna vrednost
	+	3 (23.1)	7 (22.6)	8 (21.1)	2 (5.0)	1.62[0.40-6.52] 0.446 ^f	2.29[0.50-10.59] 0.289	2.00[0.76-5.27] 0.156	2.34[0.86-6.33] 0.095	5.34[1.17-24.31] 0.018	7.56[1.6-35.82] 0.011

*Status nosioca: nije prisutan haplotip kod pacijenta (-), prisutan je haplotip kod pacijenta (+)

⁰ Asocijacija sa odgovorom na GK 8. dana od početka terapije prema parametrima BFM protokola: LOP grupa (≥ 1000 blasta) u odnosu na DOP grupu (< 1000 blasta)

¹ Asocijacija sa odgovorom na GK 8. dana od početka terapije sa cut-off (graničnom) vrednošću od 100 blasta u mikroL: voći (≥ 100 blasta) u odnosu na manji (< 100 blasta) broj blasta

² Asocijacija sa blastnim statusom 8. dana od početka terapije: blast- pozitivni u odnosu na blast-negativne (0 blasta u μ L) pacijente

^f Fisherov egzaktni test

^{ADJ} Korigovano za uzrast, pol i inicijalni broj leukocita korišćenjem logističke regresije

OR = količnik verovatnoće (Odds ratio) između grupa pacijenata sa većom brojem blasta u poređenju sa grupom sa manjim brojem blasta. Grupa pacijenata sa manjim brojem blasta je referentna grupa.

CI = Interval poverenja (confidence interval)

4.2. Duga nekodirajuća RNK *GAS5* kao novi farmakotranskripcioni marker u inicijalnoj fazi lečenja dece sa ALL

Cilj ove studije je bila analiza korelacije između nivoa ekspresije duge nekodirajuće RNK *GAS5* i odgovora na terapiju dece obolele od ALL u fazi lečenja indukcije remisije. Ovo je prva studija u kojoj je izučavan farmakotranskripcioni potencijal *GAS5* kod dečjih leukemija. Ekspresija *GAS5* je određivana u tri kontrolne tačke u BFM protokolu (na dijagnozi, 15. i 33. dana od početka terapije), a zatim je korelisana sa parametrima odgovora na terapiju koji se koriste u BFM protokolu. Naše istraživanje je uključilo i dodatni parametar odgovora na terapiju, gde je uspešnost terapije procenjivana u odnosu na graničnu vrednost od 100 blasta u μL periferne krvi 8. dana od početka terapijskog protokola.

4.2.1. Demografske i kliničke karakteristike dečjih ALL pacijenata na dijagnozi

Uzorak u ovoj studiji se sastojao od 29 dečjih ALL pacijenata. Bilo je 14 muških pacijenata (48,3%). Medijana uzrasta je bila 6,0 (interkvartilni opseg: 3,0-12,4) godina. B-ćelijska leukemija je bila zastupljena kod 26 pacijenata (89,65%), dok je kod ostalih bila dijagnostikovana T-ćelijska leukemija.

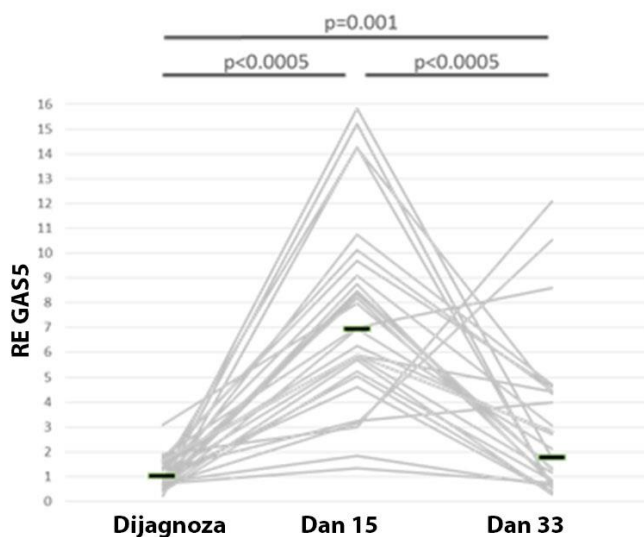
4.2.2. Ekspresija *GAS5* na dijagnozi, 15. dana i 33. dana terapijske faze indukcije remisije

Prvo smo razmatrali nivo *GAS5* ekspresije na dijagnozi, 15. dana i 33. dana nezavisno od kliničkih karakteristika ALL pacijenata. Utvrđene su značajne interindividualne razlike u nivou ekspresije *GAS5* među pacijentima. Naime, na dijagnozi, medijana nivoa ekspresije *GAS5* je bila 1,00 (interkvartilni opseg 0,66-1,56). Na dan 15 od početka terapije, medijana nivoa ekspresije *GAS5* je bila 6,94 (interkvartilni poseg 4,91-9,40). Na dan 33 od početka terapije, medijana nivoa ekspresije *GAS5* je bila 1,75 (interkvartilni poseg 0,74-4,37).

Rezultati su pokazali da je kod svakog ALL pacijenta *GAS5* ekspresija bila viša 15. dana u poređenju sa njegovim nivoom na dijagnozi (Wilcoxon test sume rangova, $p < 0.0005$). Na dan 33 od početka terapije, nivo ekspresije *GAS5* se smanjio kod svih sem kod 4 pacijenta (Wilcoxon-ov test sume rangova, $p < 0.0005$). Nivo ekspresije *GAS5* 33. dana je bio viši nego na dijagnozi kod većine pacijenata (Wilcoxon-ov test sume rangova, $p = 0.001$) (Slika 8).

Kao što je ranije rečeno, nivo ekspresije *GAS5* se povećao između 15. i 33. dana terapije kod 4 pacijenta. Ovi pacijenti su dalje analizirani po pitanju kliničkih i demografskih karakteristika u odnosu na ostale ALL pacijente. Sva 4 pacijenta su bili dečaci, imali su B-ćelijsku leukemiju i bili su stratifikovani u visoku kategoriju rizika. U ovoj podgrupi od 4 pacijenta, pronađen je viši procenat blasta u koštanoj srži 15. dana u odnosu na ostale ALL pacijente (Mann Whitney test, $p = 0.051$).

Nije pronađena korelacija između uzrasta i pola i nivoa ekspresije *GAS5* ni u jednoj vremenskoj tački terapije.



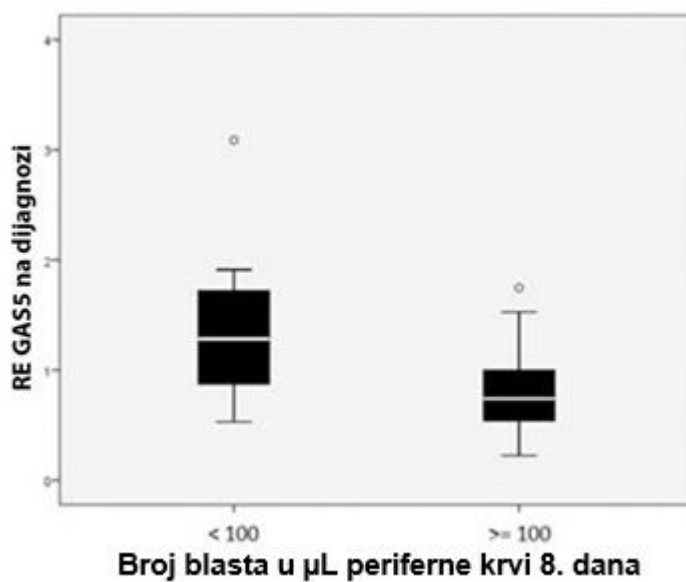
Slika 8. Relativna ekspresija (RE) *GAS5* određena na dijagnozi (dan 0), 15. dana i 33. dana od dana početka terapije kod 29 ALL pacijenata. Svaka siva linija povezuje vrednosti relativne ekspresije *GAS5* određene kod jednog ALL pacijenta. Tamne horizontalne linije označavaju medijanu relativne ekspresije *GAS5* u svakoj vremenskoj tački.

4.2.3. Korelacija ekspresije *GAS5* sa kliničkim karakteristikama pacijenata pre terapije

Analizirana je korelacija ekspresije *GAS5* i kliničkih parametara pacijenata pre terapije. Broj leukocita po μL periferne krvi na dan dijagnoze je važan za prognozu i za utvrđivanje daljeg toka terapije. Rezultati su pokazali statistički trend ka negativnoj korelaciji između nivoa ekspresije *GAS5* na dijagnozi i broja leukocita po μL periferne krvi na dijagnozi. (Spirmanova korelacija, $p = 0.069$, $r_s = -0.342$).

4.2.4. Korelacija između nivoa ekspresije *GAS5* na dijagnozi, 15. i 33. dana terapijske faze indukcije remisije i odgovora na terapiju

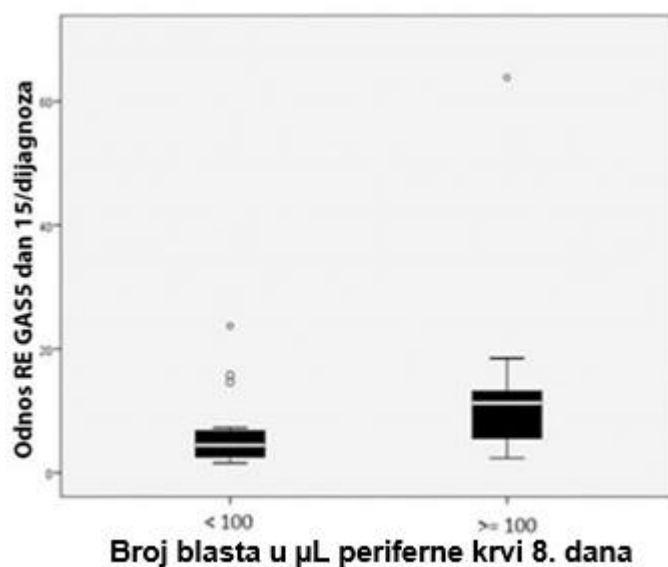
Analiziran je nivo ekspresije *GAS5* na dijagnozi u korelaciji sa kliničkim parametrima koji bi ukazali na terapijski odgovor. Manji broj blasta (ispod 100 po μL periferne krvi) 8. dana terapije je asociran sa višim nivoima ekspresije *GAS5* na dijagnozi (Mann Whitney test, $p = 0.016$) (Slika 9).



Slika 9. Boks dijagram prikazuje vrednosti relativne ekspresije (RE) *GAS5* na dan dijagnoze kod pacijenata koji imaju apsolutni broj blasta u μ L periferne krvi 8. dana od početka terapije ispod 100 (Mann Whitney test, $p = 0.016$)

Takođe je analiziran odnos između nivoa ekspresije *GAS5* 15. dana i na dijagnozi. ALL pacijenti su imali značajno viši odnos kada je broj blasta 8. dana terapije iznad 100 (Mann-Whitney test, $p = 0.009$) (Slika 10).

Ekspresija *GAS5*, određivana u bilo kojoj vremenskoj tački terapije indukcije remisije, nije asocirana sa pojavom minimalne rezidualne bolesti 15. i 33. dana.



Slika 10. Boks dijagram prikazuje odnos ekspresije (RE) *GAS5* merene na dan 15 od početka terapije i na dan dijagnoze kod pacijenata koji imaju apsolutni broj blasta u μL periferne krvi ispod 100 na dan 8 od početka terapije (Mann Whitney test, $p = 0.009$)

Naši rezultati ukazuju da bi nivo ekspresije *GAS5* mogao da bude marker terapijskog odgovora u fazi lečenja indukcija remisije kod dece obolele od ALL. Studije validacije na drugim grupama pacijenata bi potvrdile ili opovrgle našu hipotezu.

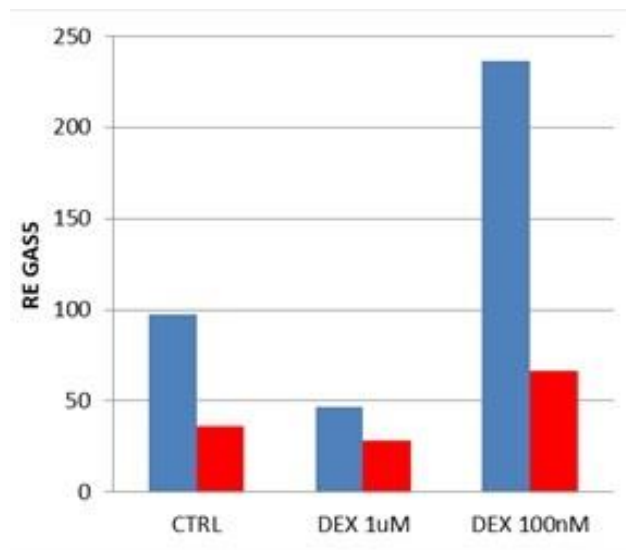
4.3. Analiza molekularnog mehanizma dejstva duge nekodirajuće RNK *GAS5*

4.3.1. Uticaj GK na ekspresiju *GAS5*

Molekularni mehanizam dejstva dnkRNK *GAS5* nije rasvetljen. Da bi se potvrdio farmakotranskripcioni potencijal *GAS5* koji se odnosi na GK terapiju, sprovedena je analiza u *in vitro* model sistemu (humana permanentna ćelijska linija HeLa), u kome je testiran uticaj aplikacije GK na nivo ekspresije *GAS5*. HeLa ćelijska linija je transfektovana ekspresionim vektorom pcDNA3 u koji je ukloniran gen *GAS5* (HeLa pcDNA3-*GAS5*/ HeLa *GAS5*). Kao kontrola je korišćena HeLa ćelijska linija transfektovana plazmidom bez kloniranog gena (HeLa pcDNA3/ HeLa EMPTY). Nivo ekspresije *GAS5* je određivan metodom qRT-PCR.

Pokazano je da je nivo ekspresije *GAS5* u ćelijama transfektovanim plazmidom pcDNA3-*GAS5* veći i do 100 puta u odnosu na ćelije transfektovane sa pcDNA3 (Slika 11 CTRL), što je potvrdilo funkcionalnost plazmida pcDNA3-*GAS5*.

Zatim su u ćelijsku kulturu dodavani GK (deksametazon, DEX), i to u koncentraciji 1 μ M i 100nM. Rezultati ukazuju da GK utiču na ekspresiju *GAS5*. Naime, detektovana je povišena ekspresija *GAS5* pri tretmanu sa 100nM DEX, a smanjena pri tretmanu sa 1 μ M DEX u odnosu na netretirane ćelije (Slika 11).



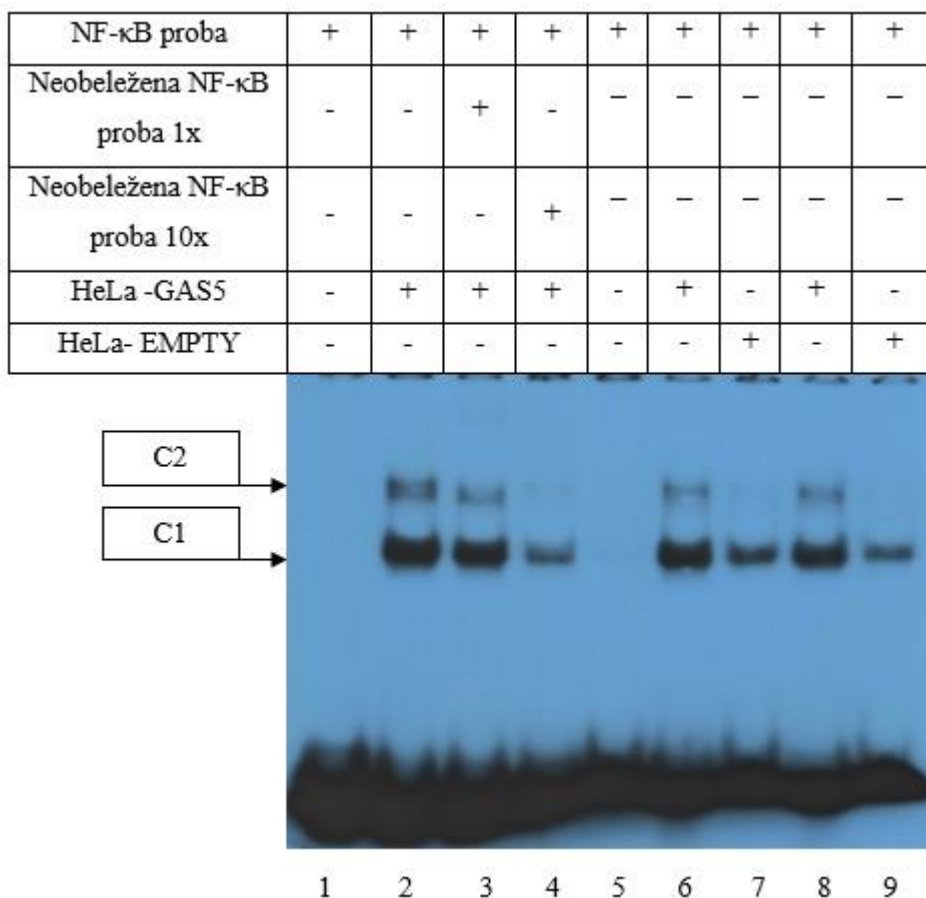
Slika 11. Relativna ekspresija *GAS5* u HeLa ćelijama transfektovanim plazmidom pcDNA3 i pcDNA3-*GAS5* bez (CTRL) i sa GK (dexametazonskim) tretmanom. Stubići predstavljaju odnos nivoa ekspresije *GAS5* u HeLa ćelijama transfektovanim sa pcDNA3-*GAS5* i sa pcDNA3 (HeLa *GAS5* / HeLa EMPTY): plavi stubići - HeLa ćelije koje su 4h inkubirane u prisustvu deksametazona; crveni stubići - HeLa ćelije koje su 24h inkubirane u prisustvu deksametazona. CTRL – ćelije koje nisu tretirane glukokortikoidima; DEX – ćelije koje su tretirane glukokortikoidima (prikazane su koncentracije deksametazona).

4.3.2. Uticaj dnkRNK *GAS5* na DNK-vezujuću aktivnost NF- κ B

Nuklerani proteini izolovani iz HeLa ćelija transfektovanih sa pcDNA3 i pcDNA3-*GAS5* su korišćeni u esejima izmenjene elektroforetske pokretljivosti (eng. electromobility shift assay, EMSA) u cilju određivanja njihove interakcije sa regulatornim elementom za koji se vezuje NF- κ B. Ovaj regulatorni element sa nuklearnim proteinima izolovanim iz HeLa ćelija formira dominantne (C1) i minorne komplekse (C2). Afinitet vezivanja proteinskog kompleksa za regulatorni element za koji se vezuje NF- κ B je veći u ćelijama u kojima je ekspresija *GAS5* povećana (slika 12, kolone 6-9). Denzitometrijska merenja iz tri nezavisna eksperimenta su potvrdila dobijeni rezultat. U svakom nezavisnom eksperimentu smo dobili

povećanje afiniteta vezivanja proteinskog kompleksa za regulatorni element pri povećanoj ekspresiji *GAS5*.

EMSA eseji u kojima je vršena kompeticija sa neobeleženom DNK probom koja predstavlja regulatorni element za koji se vezuje NF- κ B (self-kompeticija), takozvano „hlađenje“, su pokazali specifičnu interakciju između probe regulatornog elementa i proteinskog kompleksa koji interaguje sa njom (Slika 12, kolone 1-4).

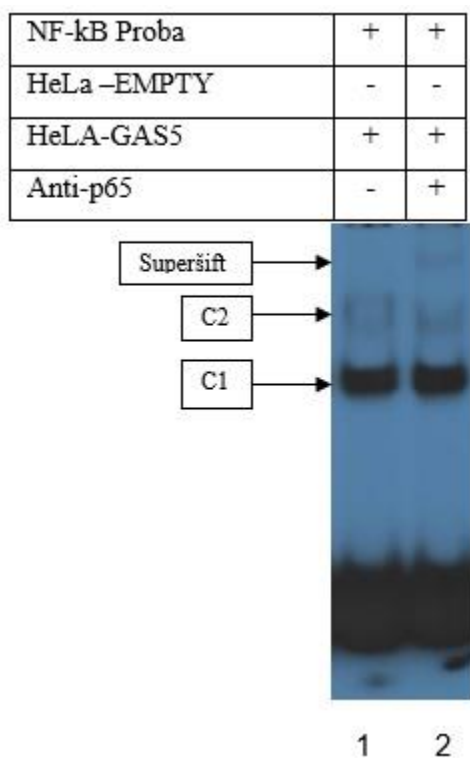


Slika 12. EMSA eseji sa probom koja predstavlja regulatorni element za koji se vezuje NF- κ B 1. slobodna proba; 2. vezivanje nuklearnih proteina iz HeLa ćelija transfektovanih sa pcDNA3-*GAS5*; 3. self-kompeticija sa neobeleženom probom (molarni odnos obeležene i neobeležene probe 1:1); 4. self-kompeticija sa neobeleženom probom (molarni odnos obeležene i neobeležene probe 1:10); 5. slobodna proba; 6. vezivanje nuklearnih proteina iz HeLa ćelija transfektovanih sa pcDNA3-*GAS5*; 7. vezivanje nuklearnih proteina iz HeLa

ćelija transfektovanih sa pcDNA3; 8. vezivanje nuklearnih proteina iz HeLa ćelija transfektovanih sa pcDNA3-GAS5; 9. vezivanje nuklearnih proteina iz HeLa ćelija transfektovanih sa pcDNA3;

Supershift esejom, u kojem je korišćeno antitelo za p65 subjedinicu NF-κB (anti-p65), pokazano je da je NF-κB transkripcioni faktor uključen u proteinski kompleks koji se vezuje za obeleženu probu regulatornog elementa za koji se vezuje NF-κB (slika 13). Takođe, antitelo nije ostvarilo efikasnu interakciju sa p65 komponentom NF-κB transkripcionog faktora, što se može objasniti učešćem drugih regulatornih proteina u ovom proteinskom kompleksu koji ometaju vezivanje antitela za p65.

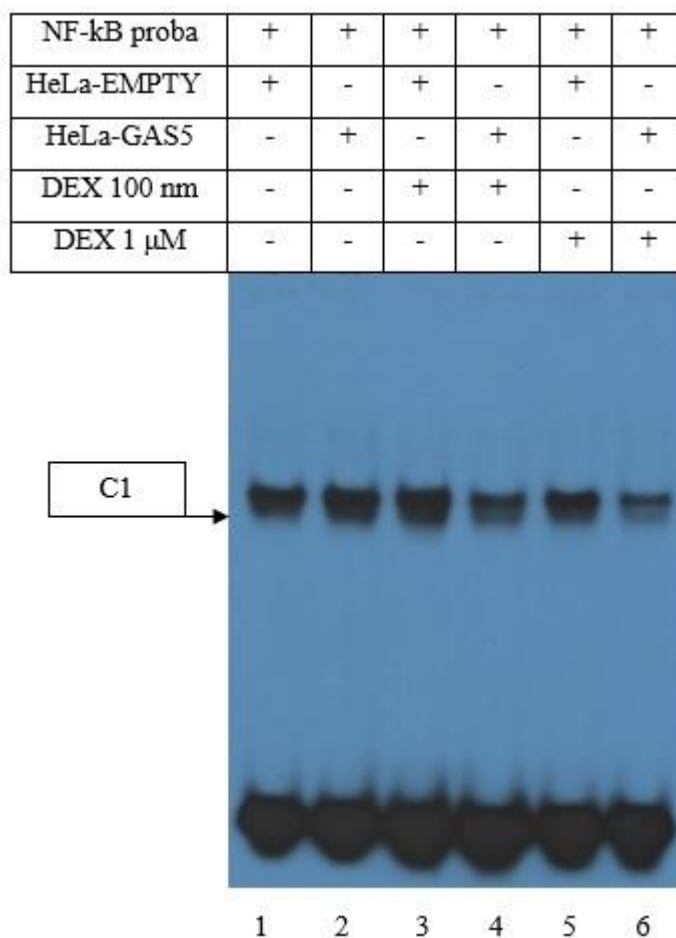
Ovim je pokazano da je DNK-vezujuća aktivnost NF-κB transkripcionog faktora zavisna od nivoa ekspresije *GAS5*.



Slika 13. EMSA eseji sa probom koja sadrži regulatorni element za koji se vezuje NF-κB 1. vezivanje nuklearnih proteina iz HeLa ćelija transfektovanih sa pcDNA3-GAS5; 2. supershift esej u kojem je korišćeno antitelo za p65 subjedinicu NF-κB (anti-p65)

GAS5 je uključen u signalni put kojim GK deluju na transkripcioni kompleks koji se vezuje za regulatorni element za koji se vezuje NF- κ B.

Sledeći eksperimenti imali su za cilj da utvrde povezanost ekspresije *GAS5* i DNK-vezujuće aktivnosti proteinskog kompleksa u kojem učestvuje NF- κ B, ovog puta posle tretmana HeLa ćelija GK (deksametazonom). Tretman GK je uticao na promenu transkripcionog kompleksa u kojem učestvuje NF- κ B (C1) (Slika 14). Posle tretmana HeLa-*GAS5* i HeLa-EMPTY ćelija različitim dozama GK (100 nM i 1 μ M), DNK-vezujuću aktivnost proteinskog kompleksa u kojem učestvuje NF- κ B pokazuje značajne razlike (slika 14, kolone 3-6). Uviđa se da se DNK-vezujuća aktivnost proteinskog kompleksa posle tretmana ćelija deksametazonom smanjuje ukoliko je ekspresija *GAS5* veća. (Slika 14, kolone 3-6).



Slika 14. EMSA eseji sa probom koja predstavlja regulatorni element za koji se vezuje NF-κB
 1. vezivanje nuklearnih proteina iz HeLa ćelija transfektovanih sa pcDNA3; 2. vezivanje nuklearnih proteina iz HeLa ćelija transfektovanih sa pcDNA3-GAS5; 3. vezivanje nuklearnih proteina iz HeLa ćelija transfektovanih sa pcDNA3, tretiranih 24 h GK (100 nM DEX); 4. vezivanje nuklearnih proteina iz HeLa ćelija transfektovanih sa pcDNA3-GAS, tretiranih 24 h GK (100 nM DEX); 5. vezivanje nuklearnih proteina iz HeLa ćelija transfektovanih sa pcDNA3, tretiranih 24 h GK (1 μM DEX); 6. vezivanje nuklearnih proteina iz HeLa ćelija transfektovanih sa pcDNA3-GAS5, tretiranih 24 h GK (1 μM DEX)

Rezultati ukazuju da je *GAS5* uključen u signalni put kojim GK deluju na transkripcioni kompleks koji se vezuje za regulatorni element za koji se vezuje NF-κB. Takođe, izgleda da se pod dejstvom glukokortikoida menja DNK-vezujuća aktivnost

proteinskog kompleksa u kome učestvuje NF- κ B, kao i sastav kompleksa, što ukazuje na uključivanje specifičnih transkripcionih faktora u taj kompleks u prisustvu GK.

4.4. Studija farmakogenomskih markera za GK u populaciji Srbije

4.4.1. Odabir farmakogena i farmakogenomskih markera značajnih za terapiju GK

Koristeći se bazom podataka PharmGKB i pretragom literature, izdvojeno je 22 gena za koje postoje dokazi o njihovom uticaju na dejstvo glukokortikoidnih lekova. Svi geni se nalaze na TruSightOne panelu (Illumina) za NGS sekvenciranje. Izabrani farmakogeni su prikazani u tabeli 9.

Tabela 9. Farmakogeni koji utiču na dejstvo glukokortikoidnih lekova

<i>ABCB1</i>	<i>FCER2</i>	<i>HSPA4</i>
<i>ADRB2</i>	<i>FKBP5</i>	<i>NCOA3</i>
<i>CREBBP</i>	<i>GSTM1</i>	<i>NR3C1</i>
<i>CRHR1</i>	<i>GSTP1</i>	<i>SERPINA6</i>
<i>CYP3A4</i>	<i>GSTT1</i>	<i>ST13</i>
<i>CYP3A5</i>	<i>HSD11B2</i>	<i>STIP1</i>
<i>CYP3A7</i>	<i>HSP90AA1</i>	<i>TBP</i>
		<i>TBX21</i>

Daljim pretraživanjem baze podataka i literature izdvojene su varijante za koje je prijavljen uticaj na dejstvo glukokortikoidnih lekova. Birane su varijante koje su pokriveno analizom TruSightOne panela. Izabrane varijante su prikazane u tabeli 10.

Tabela 10: Varijante obuhvaćene TruSightOne panelom za koje postoje dokazi o uticaju na odgovor na GK

rs broj	Gen	Varijanta
rs2229109	<i>ABCB1</i>	c.1199G>A (p.Ser400Asn)
rs1128503	<i>ABCB1</i>	c.1236T>C (p.Gly412=)
rs2032582	<i>ABCB1</i>	c.2677G>T/A (p.Ser893Ala/Thr)
rs1045642	<i>ABCB1</i>	c.3435T>C/A (p.Ile1145=)
rs1042713	<i>ADRB2</i>	c.46G>A (p.Gly16Arg)
rs28364072	<i>FCER2</i>	c.621+7T>C
rs1695	<i>GSTP1</i>	c.313A>G (p.Ile105Val)
rs1138272	<i>GSTP1</i>	c.341C>T (p.Ala114Val)
rs10873531	<i>HSP90AA1</i>	c.282C>T(p.Thr94=)
rs6195	<i>NR3C1</i>	c.1088A>G (p.As363Ser)
rs104893913	<i>NR3C1</i>	c.1433G>A (p.Arg478His)
rs6194	<i>NR3C1</i>	c.1767C>T (p.His589=)
rs138896520	<i>NR3C1</i>	c.1899G>A (p.Gln633=)
rs72558023	<i>NR3C1</i>	c.198A>G (p.Pro66=)
rs6196	<i>NR3C1</i>	c.2301T>C (p.Asn767=)
rs6189	<i>NR3C1</i>	c.66G>A (p.Glu22=)
rs72542742	<i>NR3C1</i>	c.685G>A (p.Ala229Thr)
rs6190	<i>NR3C1</i>	c.68G>A (p.Arg23Lys)
rs2240017	<i>TBX21</i>	c.99C>G (p.His33Gln)

Pored toga, u studiju su uključene sve varijante u farmakogenima koje potencijalno utiču na funkcionalnost proteina koji kodiraju.

4.4.2. Rezultati analize pilot populacione farmakogenomske studije za terapiju GK u Srbiji

Cilj populaciono farmakogenomske studije je da se utvrdi učestalost već poznatih farmakogenomskih markera u određenoj populaciji, i da se, ukoliko je za nekog od njih učestalost izrazito visoka, sprovedu validacione studije, među koje spadaju i kliničke asocijativne studije, kako bi se potvrdio farmakogenomski potencijal date varijante u toj populaciji. Ovakve studije dovode do otkrića farmakogenomskih markera koji se mogu preporučiti za prediktivno genetičko testiranje što može dovesti do individualizacije terapije, kao i do ušteda u zdravstvenom sistemu jedne zemlje.

Pored toga, ove studije mogu dovesti do otkrića novih varijanti u farmakogenima, čiji potencijal treba validirati u kliničkim asocijativnim studijama.

U našoj studiji, po završetku NGS sekvenciranja, dobijeni VCF fajlovi su analizirani uz pomoć bioinformatičkog paketa VariantStudio v. 3.0. Uzorci su anotirani. Filter je bio podešen tako da se prikažu varijante i u homozigotnom i u heterozigotom stanju, bez obzira na tip promene (JNV-ovi, insercije, delecije) i na poziciju na hromozomima. Takođe su izdvojene sve nesinonimne varijante koje su po predikcionom algoritmu Polyphen potencijalno patogene („possibly damaging“ ili „probably damaging“). Pored nesinonimnih, uključene su i varijante koje menjaju okvir čitanja, koje kreiraju ili ukidaju stop kodon, koje kreiraju start kodon, koje menjaju start kodon, insercije, delecije, promene koje se nalaze na mestima iskrajanja (splajsing varijante).

Kada su u pitanju izabrane egzonske varijante, čiji je farmakogenomski potencijal za GK bio već potvrđen u ranijim studijama, od 19 varijanti, u našoj populaciji je detektovano 17. Sve varijante su bile u Hardi Vajnberg ravnoteži. U poređenju distribucije varijantnih alela u Srbiji i Evropi, dobijeno je da je ona za većinu alela slična. Izuzetak je manja učestalost minornog alela varijante rs1695 u genu *GSTP1* u populaciji Srbije u odnosu na populaciju Evrope ($p = 0.03$). Rezultati distribucije egzonskih varijanti su prikazane u tabelama 11 i 12.

Tabela 11. Učestalost genotipova i alela izabranih egzonskih varijanti u farmakogenima za GK. P-vrednosti su mera razlika alelske učestalosti između populacija Srbije i Evrope

rs broj	Gen	Varijanta	Maj/Maj	Maj/Min	Min/Min	Učestalost Min alela	Učestalost Min alela EUR	p- vrednost
rs1045642	ABCB1	c.3435T>C/A (p.Ile1145=)	26	49	25	49.50%	48.20%	0.79
rs1128503	ABCB1	c.1236T>C (p.Gly412=)	17	46	37	60.00%	58.40%	0.74
rs2229109	ABCB1	c.1199G>A (p.Ser400Asn)	90	10	0	0.00%	3.30%	0.23
rs1042713*	ADRB2	c.46G>A (p.Gly16Arg)	40	47	10	35.00%	38.60%	0.29
rs1695*	GSTP1	c.313A>G (p.Ile105Val)	57	36	6	25.00%	33.10%	0.017
rs1138272	GSTP1	c.341C>T (p.Ala114Val)	92	8	0	4.00%	7.10%	0.15
rs6195	NR3C1	c.1088A>G (p.Asn363Ser)	100	0	0	0.00%	1.80%	X
rs6189	NR3C1	c.66G>A (p.Glu22=)	96	4	0	2.00%	3.00%	0.59
rs6190	NR3C1	c.68G>A (p.Arg23Lys)	96	4	0	2.00%	3.00%	0.59
rs72542742	NR3C1	c.685G>A (p.Ala229Thr)	99	1	0	0.50%	1.00%	X

rs6194	NR3C1	c.1767C>T (p.His589=)	100	0	0	0.00%	0.20%	X
rs6196*	NR3C1	c.2301T>C (p.Asn767=)	75	23	1	13.50%	14.90%	0.4
rs104893913	NR3C1	c.1433G>A (p.Arg478His)	100	0	0	0.00%	0.00%	X
rs72558023	NR3C1	c.198A>G (p.Pro66=)	100	0	0	0.00%	0.00%	X
rs138896520	NR3C1	c.1899G>A (p.Gln633=)	100	0	0	0.00%	0.00%	X
rs2240017*	TBX21	c.99C>G (p.His33Gln)	98	0	0	1.50%	0.00%	X

*Genotipizacija nije izvršena sa dovoljnom sigurnošću kod svih uzoraka; Maj – majorni, učestaliji alel; Min – minorni, manje učestao alel; EUR – evropska populacija.

Tabela 12. Učestalost genotipova i alela za varijantu rs2032582 u genu *ABCB1*. Ova varijanta je izdvojena jer je detektovano 3 različita alela.

rs broj	Gen	Varijanta	GG	AG	GT	AT	AA	A alel	A alel EUR	T alel	T alel EUR	p-vrednost
rs2032582	ABCB1	c.2677G>T/A (p.Ser893Ala/Thr)	35	46	2	0	17	40.00%	41.00%	1.00%	1.70%	0.68

Pošto je učestalost većine ispitivanih varijanti u Srbiji slična onoj u evropskim populacijama, i kako do sada ni za jednu od navedenih varijanti ne postoji potvrda da ima dovoljan farmakogenomski potencijal da bi bila uključena u protokole lečenja u kojima se koriste GK, nema osnova da se bilo koja od ovih varijanti uvede u kliničku praksu u Srbiji. Izuzetak je varijanta rs1695 u genu *GSTP1*, za koju postoje dokazi da je farmakogenetički marker odgovora na GK, ali je njena učestalost u populaciji Srbije manja nego u evropskim populacijama.

4.4.3. Novi potencijalni farmakogenomski markeri za GK

Kada su analizirane sve varijante u farmakogenima za GK, koje potencijalno narušavaju funkcionalnost proteina, među onima koje do sada nisu izučavane kao farmakogenomski markeri, detektovano je 12 novih potencijalnih farmakogenomskih markera za GK. Nove varijante su detektovane u 5 farmakogena za GK (*ABCB1*, *FCER2*, *NCOA3*, *NR3C1* i *TBX21*). Sve predstavljaju varijante tipa zamene jednog nukleotida, 11 od njih su egzonske nesinonimne, a jedna zahvata region iskrajanja. Detektovane su i 3 varijante koje nisu evidentirane u bazi dbSNP. Varijante sa identifikacionim brojevima (JNV evidentirane u dbSNP) su sve u Hardi Vajnberg ravnoteži. Rezultati su prikazani u tabeli 13.

Budući da je koristeći Polyphen algoritam procenjen štetni efekt ovih varijanti na funkciju proteina koje kodiraju, potrebno je razmotriti njihov farmakogenomski potencijal u budućim studjama. Kao najbolji kandidati izdvajaju se varijanta *NCOA3* rs6094752 zbog veće učestalosti minornog alela u populaciji Srbije u odnosu na evropsku populaciju. Od ostalih varijanti bi mogle da se razmotre varijanta rs2230782 u genu *NCOA3* i varijanta rs28364072 u genu *FCER2*, s obzirom na to da je u ispitavnom uzorku učestalost njihovih minornih alela bila visoka.

Tabela 13. Učestalost genotipova i alela novootkrivenih varijanti u farmakogenima za GK sa potencijalno štetnim efektima na funkciju proteina.

Gen	HGVSc	rs broj	Tip varijante	Efekat	Maj/Maj	Maj/Min	Min/Min	Učestalost Min alela	Učestalost Min alela EUR	p-vrednost
ABCB1	c.2438C>G (p.Ala813Gly)	rs201744003	Nesinonimna	Moguće štetno dejstvo	99	1	X	0.50%	0.02%	X
ABCB1	c.3698G>A (p.Arg1233His)	rs201578293	Nesinonimna	Moguće štetno dejstvo	99	1	X	0.5%	0.01%	X
ABCB1	c.947A>G (p.Tyr316Cys)	X	Nesinonimna	Verovatno štetno dejstvo	99	1	X	0.50%	X	X
FCER2	c.621+7T>C	rs28364072	Varijanta u regionu iskrajanja, intronska varijanta	X	46	40	14	34%	28.40%	0.13
NCOA3	c.1758G>C (p.Gln586His)	rs2230782	Nesinonimna	Moguće štetno dejstvo	77	21	2	12.50%	11.50%	0.79
NCOA3	c.3844C>T (p.Pro128Ser)	rs138733364	Nesinonimna	Verovatno štetno dejstvo	98	2	X	1%	0.30%	X
NCOA3	c.4028C>T (p.Ser1343Phe)	rs369893954	Nesinonimna	Verovatno štetno dejstvo	98	2	X	1%	0.02%	X
NCOA3	c.4073A>G (p.Gln1358Arg)	X	Nesinonimna	Moguće štetno dejstvo	99	1	X	0.50%	X	X
NCOA3	c.652C>T (p.Arg218Cys)	rs6094752	Nesinonimna	Moguće štetno dejstvo	87	13	X	6.50%	2.80%	0.014
NR3C1	c.697G>T (p.Asp233Tyr)	X	Nesinonimna	Moguće štetno dejstvo	99	1	X	0.50%	X	X

REZULTATI

TBX21	c.1184A>G (p.Tyr395Cys)	rs140598127	Nesinonimna	Verovatno štetno dejstvo	99	1	X	0.50%	0.001%	X
TBX21	c.653G>A (p.Arg218His)	rs202150196	Nesinonimna	Moguće štetno dejstvo	99	1	X	0.50%	0.04%	X

Maj – majorni, učestaliji alel; Min – minorni, manje učestao alel; EUR – evropska populacija.

5. DISKUSIJA

5.1. Farmakogenetički markeri značajni za odgovor na GK terapiju u inicijalnoj fazi lečenja dece sa ALL

Farmakogenomika je nauka koja nastoji da objasni činjenicu da efikasnost leka zavisi od individualne sposobnosti pacijenta da apsorbuje i metabolizuje lek, što, posledično, utiče na efikasnost tretmana. Farmakogenomika povezuje interindividualne razlike u odgovoru na terapiju sa varijabilnošću genoma svakog pacijenta. Kao i sposobnost apsorpcije i metabolizma leka, toksičnost leka zavisi od pacijentovog genoma. Farmakogenomsko testiranje je već uključeno kao sredstvo za podešavanje doza u fazi održavanja terapije kod dečje ALL, kako bi se minimalizovale incidence ozbiljnih toksičnih događaja tokom tretmana 6-MP (43).

Glukokortikoidni lekovi (GK) su esencijalna komponenta faze indukcije remisije u terapiji dečje ALL. Loš odgovor na standardni inicijalni tretman GK i održavanje broja blasta preko 1000 po mikrolitru 8. dana terapije, svrstava pacijente u višu grupu rizika sa lošom prognozom. Kasnije faze tretmana su zavisne od stratifikacije pacijenata na osnovu nivoa rizika. Međutim, mnoga deca dožive ozbiljne toksične efekte asociirane sa tretmanom, dok se kod nekih od njih i ne postigne izlečenje (67). Stoga, moglo bi se tvrditi da ova grupisanja pacijenata nisu još uvek dovoljno dobra (138). Što se tiče faze indukcije remisije ALL tretmana, od suštinske je važnosti da se pronađe što više potencijalnih markera GK rezistencije. Cilj naše studije je bio da se analiziraju asocijacije između pojedinih farmakogenetičkih varijanti i GK rezistencije, odnosno dobrog odgovora na GK, kako bi se približili individualizaciji GK tretmana, tako da budući pacijenti mogu da se tretiraju shodno njihovom individualnom genetičkom profilu.

Mali broj studija se bavio varijantama u genima *NR3C1*, *GST* i *ABCB1* i njihovom asocijacijom sa toksičnošću GK ili preživljavanjem, odnosno izlečenjem u dečjim pacijentima sa ALL. Međutim, i rezultati tih studija su često bili neusaglašeni (139, 140, 141, 142, 143). Toksične reakcije i praćenje parametara remisije su najvažniji indikatori ishoda inicijalne terapije, ali oni ne mogu da se povežu sa odgovorom na pojedinačne lekove. Međutim, odgovor na GK 8. dana tretmana, procenjenog na osnovu broja blasta u krvi, je verovatno najbolje merilo GK efikasnosti u dečjem ALL, pošto se pre terapije GK nijedan hemoterapeutik ne daje sistematski. Niski broj blasta (< 100 blasta/ μ L) ili

blast-negativan status takođe može biti značajan u otkrivanju pacijenata sa dobrim odgovorom na GK terapiju.

Ova studija se fokusirala na varijante u nekodirajućem regionu gena *NR3C1*, nasuprot često proučavanim varijantama u kodirajućim regionima gena *NR3C1* koje su ranije analizirane, u odnosu na odgovor na GK 8. dana u tretmanu dečje ALL. Jedna od ovih studija je pokazala da je samo varijant *BclI* asocirana sa odgovorom na GK, i to u relativno maloj kineskoj kohorti ALL pacijenata (144). Međutim, druge studije nisu pronašle značajnu asocijaciju varijanti u genu *NR3C1* sa odgovorom na GK 8. dana (140, 145).

Što se tiče varijante rs6198 u genu *NR3C1*, u ovoj studiji je pronađen povećan rizik za loš odgovor na pronizon (LOP) (≥ 1000 blasta/ μ L) u inicijalnoj fazi lečenja kod nosilaca retkog GG genotipa. Ova varijanta je važna za stabilizaciju iRNK za GR β . Štaviše, GG genotip dovodi do veće ekspresije GR β izoforme (109). Povećan nivo GR β izoforme dovodi do dominantno negativne inhibicije GR α izoforme (146). GR β izoforma povećava rezistenciju prema biološkim i farmakološkim efektima GK (106, 108, 147, 148). Pokazano je da nivo GR β izoforme utiče na odgovor na GK u dece sa ALL. Naime, pokazano je da je glukokortikoidna senzitivnost negativno korelisana sa GR β /GR α odnosom u leukemijskim blast ćelijama (149). Ovo je prva studija koja je izučavala asocijaciju između varijante rs6198 i odgovora na GK tretman 8. dana u dečjoj ALL. Asocijacija ove varijante sa odgovorom na GK je pokazana kod pacijenata koji boluju od drugih bolesti. Kod pedijatrijskog nefrotskog sindroma, pokazano je da nosioci GG genotipa imaju lošiji terapijski ishod (150), što je u saglasnosti sa nalazima ove studije. Kod kliničke depresije, haplotip (rs10482605-rs6198) koji sadrži G alel rs6198 varijante je asociran sa stabilnošću iRNK za GR β . Ovaj haplotip doprinosi hiperaktivnosti hipotalamo-pituitarno-adrenalne ose (151).

Rezultati ove studije su pokazali da nosioci minornog T alela varijante rs33389 u genu *NR3C1* teže ka većem broju blasta (≥ 100 blasta/ μ L), dok su nosioci T alela varijante rs33388 u genu *NR3C1* težili manjem broju blasta (< 100 blasta/ μ L) 8. dana GK tretmana. Pokazano je da određeni aleli varijanti rs33389 (alel T) i rs33388 (alel A), koje se nalaze u intronu 2 gena *NR3C1* u regionu gde se odigrava alternativno iskrajanje, dovode do povećane ekspresije GR γ izoforme (106). GR γ ima afinitet za ligand, koji je sličan standardnoj izoformi GR α , ali mu nedostaje stabilnost vezivanja za GRE koju ima GR α

(152). Sa druge strane, rs33389 C alel i rs33388 T alel su delovi haplotipa ACT (rs41423247-rs33389-rs33388) koji je značajno povezan sa glukokortikoidnom senzitivnošću (153). Između ostalog, u pedijatrijskom nefrotskom sindromu, značajna povezanost je pokazana između ovog haplotipa i dobrog odgovora na terapiju GK (107). Štaviše, haplotip CTA (rs33389-rs33388-rs6198), koji se sastoji od alela za koje je pokazano da su povezani sa dobrim GK odgovorom 8. dana u našoj studiji, je povezan sa dužim periodom preživljavanja kod pacijenata sa akutnom leukemijom koji su lečeni transplantacijom hematopoetskih matičnih ćelija (154). Međutim, u našoj studiji, haplotip CAA je bio asociran sa dobrim odgovorom na prednizon (DOP). Ovaj rezultat dodatno ukazuje na značajnu asocijaciju između rs33389 C i rs6198 A alela sa nižim brojem blasta.

Nosioci haplotipa GC (rs1695-rs1138272) u genu *GSTP1* su imali manji rizik od LOP-a, veću verovatnoću da imaju niži broj blasta (< 100 blasta/ μ L) i veću verovatnoću da budu blast-negativni 8. dana GK terapije. Dok se ispitivala aktivnost i struktura proteina *GSTP1*, pokazano je da ovaj haplotip kodira region za vezivanje supstrata, H mesto *GSTP1* proteina, i da taj haplotip dovodi do sinteze proteina sa mnogo manjom Mihaelisovom konstantom, što dovodi do manje efikasne konjugacije različitih agenasa (155). Posledično, glukokortikoidni agensi mogu da deluju duži vremenski period. Rezultati ove studije su takođe pokazali povezanost između nosilaca *GSTP1* rs1138272 T alela i *GSTP1* haplotipa GT sa pozitivnim blast-statusom. Dve studije su se bavile varijantama u genu *GSTP1* i GK odgovorom 8. dana u terapiji ALL-a, ali one nisu pronašle nikakvu značajnu asocijaciju, s tim što je u ovim studijama bio uključen relativno mali broj pacijenata (113, 156).

Nosioci delecije *GSTT1* su imali veći broj blasta 8. dana u grupi dece sa ALL u ovoj studiji. Nasuprot našim rezultatima, jedna studija nije pronašla statističku značajnu asocijaciju (113), dok su druge studije ukazale na statistički trend prema DOP kod dečje ALL. *Meissner* i saradnici su pronašli da podgrupa pacijenata sa dečjom ALL, koja generalno ima viši rizik za LOP, ispoljava smanjeni rizik za LOP ako je deletiran *GSTT1* (157). Kada su u pitanju rizik od relapsa i ishod bolesti povezani sa delecijom *GSTT1*, prijavljeni su neusaglašeni rezultati dveju studije koje su uključile veliki broj dečjih ALL pacijenata (141, 143).

Kada je u pitanju gen *ABCB1*, u ovoj studiji je primećeno da nosioci retkog haplotipa CGT (rs1128503-rs2032582-rs1045642) imaju veću verovatnoću da budu blast-pozitivni. Veća ekspresija *ABCB1* je pokazala asocijaciju sa steroidnom rezistencijom (117, 158). Pokazano je da prisustvo major alela na pozicijama rs1128503, rs2032582 i rs1045642 dovodi do veće ekspresije *ABCB1* ili više *ABCB1* aktivnosti (159), što povećava verovatnoću da su ti aleli asocirani sa lošim odgovorom na GK (160). Ova studija je prva koja je izučavala odgovor na GK terapiju kod dece sa ALL 8. dana lečenja uzimajući u obzir haplotipove gena *ABCB1*. U jednoj velikoj grupi pacijenata sa idiopatskom trombocitopenijskom purpurom, različiti haplotipovi povezani sa varijantama koje su analizirane u ovoj studiji su asocirani sa odgovorom na GK (160). Međutim, nije utvrđena asocijacija sa haplotipom CGT, detektovana u ovoj studiji.

Uprkos obećavajućim rezultatima, ograničenja ove studije moraju biti istaknuta. Ispitivani uzorak je mali, pošto je ovo studija koja uključuje pacijente koji pate od retke bolesti. Određeni aleli proučavanih genetskih varijanti nisu česti, što znači da je u nekim slučajevima bilo samo nekoliko nosilaca određenih genotipova. Posledično, zaključci koji su dobijeni analizom ovako male grupe pacijenata, treba da budu uzeti sa oprezom. Zbog navedenih nedostataka, bilo bi od velike koristi da se potvrde rezultati dobijeni u ovoj studiji na većem uzorku koristeći prospektivni pristup.

Asocijacione studije vezane za farmakogenomske profile pacijenata i za podatke o toksičnosti lekova su istraživanja koja najviše obećavaju na putu ka personalizovanoj medicini. Krajnji cilj tekućih multicentričnih kliničkih ispitivanja jeste da se optimizuje korišćenje poznatih antileukemijskih lekova u kontekstu individualnog farmakogenomskog profila svakog pacijenta i u kontekstu molekularnih markera leukemijskih ćelija, kako bi se modulirao tretman i time dovelo do manje toksičnosti i neželjenih reakcije, kao i do većih stopa preživljavanja (42). Pristup personalizovane medicine u modulaciji tretmana prema individualnim karakteristikama svakog pacijenta je imao velike uspehe u nekoliko bolesti. Ti uspešni primeri ukazuju na to da će implementacija personalizovnog pristupa kod dečje ALL biti komplikovana, jer se radi o heterogenoj bolesti koja stalno evoluira, kakav je slučaj sa svim malignitetima.

Ova studija je ukazala na asocijaciju između nekoliko varijanti u genu *NR3C1*, *GSTP1*, *GSTT1*, *GSTM1* i *ABCB1* i terapijskog odgovora GK u inicijalnoj fazi terapije indukcije remisije kod pedijatrijskih ALL pacijenata. Pokazano je u ovoj studiji da su

NR3C1 varijanta rs6198 i *GSTP1* haplotip rs1695-rs1138272 farmakogenetički markeri GK odgovora kod ALL pacijenata koji najviše obećavaju. Međutim, potrebne su studije koje uključuju više pacijenata, kao i temeljnije analize ličnih „farmakomičkih“ profila, kako bi se otkrili novi potencijalni markeri ciljane terapije (161) i kako bi se dizajnirale modulacije već postojećih protokola lečenja, što dovodi do individualizovanije i uspešnije terapije kod dece sa ALL.

5.2. Duga nekodirajuća RNK *GAS5* kao novi farmakotranskripcioni marker u inicijalnoj fazi lečenja u dece sa ALL

Među transkriptomskim markerima hematoloških maligniteta, dnkRNK *GAS5* je počela da dobija posebnu pažnju među istraživačima i lekarima.

Postoje sporadični podaci o ekspresiji *GAS5* u hematološkim malignitetima. Pronađeno je da je *GAS5* imao povećanu ekspresiju u pedijatrijskoj akutnoj limfoblastnoj leukemiji prekursora B-ćelija, tačnije, u slučajevima sa hiperdiploidijom (VHD) i t(1;19)(q23;p13)-pozitivnim slučajevima (162). Međutim, važno je naglasiti da se gen *GAS5* nalazi na hromozomu 1q i da njegova povećana ekspresija može biti posledica dozirajućeg efekta gena u podtipovima dečje ALL koje karakteriše dodat 1q nastao duplikacijom ili nebalansiranom translokacijom.

U drugoj studiji, demonstriran je uticaj *GAS5* varijante rs55829688 (T>C) na ekspresiju *GAS5* u mononuklearnim ćelijama periferne krvi (MČPK) akutne mijeloidne leukemije. Genotip CC varijante rs55829688 *GAS5* je doveo do povećane ekspresiju *GAS5* (163).

Ovo je prva studija koja je analizirala korelaciju između *GAS5* ekspresije i terapijskog odgovora kod dečje ALL. Primećeno je da su nivoi ekspresije *GAS5* zavisni od tretmana GK lekovima. Tačnije, detektovan je povećani nivo ekspresije *GAS5* 15. dana (kontinuirana primena GK) u poređenju sa danom pre nego što je započeta GK terapija. Takođe je primećeno da je nivo ekspresije *GAS5* značajno smanjen 33. dana (GK doza je značajno smanjena). Promene u nivou ekspresije *GAS5* u odnosu na doziranje GK su primećene u HeLa i LoVo ćelijama (124). Iako su i netretirane HeLa (humani cervikalni karcinom) i LoVo (kolorektalni karcinom) ćelijske linije imale sličan nivo ekspresije

GAS5, ushodna regulacija *GAS5* je primećena kod LoVo ćelijske linije posle GK tretmana, dok je kod HeLa ćelija primećena nishodna regulacija (124). Očigledno je da ekspresija *GAS5* nije ista u različitim tkivima ili bolestima (164). Pošto je u ovoj studiji *GAS5* ekspresija proučavana u PKMĆ, nastojali smo da uporedimo rezultate ove studije sa sličnim rezultatima iz drugih studija. Ima mali broj radova o *GAS5* ekspresiji u PKMĆ tretiranih GK. Jedna od njih je bila *in vitro* studija *GAS5* ekspresije u PKMĆ zdravih donora krvi tretiranih GK, u kojoj su prijavljene interindividualne razlike (165).

Treba naglasiti da su rezultati ove studije pokazali da se *GAS5* ekspresija povećava posle primene GK kod dečjih ALL pacijenata. Poznato je da GK indukuju apoptozu u limfoidnim ćelijama (166) kroz signalni put koji uključuje ćelijski inhibitor apoptoze 2 (*cIAP2*) (167, 168, 169). Povećana ekspresija *cIAP2* dovodi do inhibicije apoptoze. Promotor gena *cIAP2* sadrži GRE za koje se vezuje GR i aktivira transkripciju ovog gena (167, 168). Pokazano je da *GAS5* sprečava vezivanje GR za GRE *cIAP2*, što sprečava transkripciju *cIAP2* (100). Zaključak ove studije je bio da je povećani nivo *GAS5* asociran sa indukcijom apoptoze. Naša studija ukazuje na to da je povećani nivo ekspresije *GAS5* u inicijalnoj fazi terapije, detektovan kod svih pacijenata u ovoj studiji, odraz terapijskog efekta GK na leukemijske ćelije kroz indukciju apoptoze. Nizvodni signalni put od *GAS5* do proteaza ćelijske smrti, kaspaza 3, 7 i 9, je ispitan i relativno rasvetljen (100, 169, 170). Međutim, put od GK vezivanja za domen GR (eng. ligand binding domain, LBD) do *GAS5*, što je uzvodni deo signalnog puta, još uvek nije proučavan. Dakle, molekularni mehanizam transkripcije *GAS5* koja je indukovana GK u leukemijskim ćelijama, detektovan u ovoj studiji, treba da bude razjašnjen u budućnosti.

Pored pokušaja ove studije da elaborira mehanizam učestovanja *GAS5* u GK terapijskom efektu, ova studije je takođe ukazala na potencijalnu ulogu *GAS5* ekspresije kao farmakotranskripcionog markera terapijske faze indukcije remisije kod dečje ALL.

Primećeno je da je nivo ekspresije *GAS5* na dijagnozi u korelaciji sa brojem leukocita po μL periferne krvi. Što je bio viši nivo ekspresije *GAS5*, broj leukocita je bio niži. Pored toga, pacijenti sa višim nivoom ekspresije *GAS5* na dijagnozi su imali manji broj blasta u perifernoj krvi 8. dana terapije. Ovi nalazi ukazuju na doprinos *GAS5* apoptozi u leukemiji. Moguće je da će se nivo ekspresije *GAS5* uključiti u farmakotranskriptomski algoritam inicijalne faze indukciono remisione terapije dečjih ALL pacijenata, pošto nivo ekspresije *GAS5* predviđa odgovor na GK 8. dana.

Nasuprot tome, primećena je korelacija između odnosa nivoa ekspresije *GAS5* 15dan/dan dijagnoze i broja blasta u perifernoj krvi 8. dana. Što je ekspresija *GAS5* bila viša u odnosu na nivo ekspresije na dan dijagnoze, veći je bio broj blasta 8. dana terapijskog protokola, ukazujući na asocijaciju između lošeg terapijskog odgovora i porasta *GAS5* ekspresije u kasnijim fazama terapije. Mogući mehanizam ovih kliničkih manifestacija, ako uzimamo u obzir ulogu *GAS5*, jeste da *GAS5*, imitirajući GRE, funkcioniše kao mamac za GR, vezuje ga i sprečava njegovo delovanje (119).

Teško je predvideti ulogu *GAS5* u leukemiji zbog njegove uloge i u apoptozi i u zaustavljanju ćelijskog ciklusa (118). Nadalje, dvostruka uloga *GAS5* u suprotstavljenim ćelijskim procesima je još više naglašena po primeni GK. Dakle, ovi rezultati sugerišu da tokom terapije indukcije remisije dečje ALL, antiapoptotski efekat *GAS5*, posredovan GR vezivanjem postaje dominantan. Međutim, nužno je naglasiti da se u kasnijem toku terapije indukcije remisije, ne primenjuju samo GK, već se primenjuju i drugi lekovi. *GAS5* ekspresija takođe može da bude pod uticajem tih lekova.

Ovo je prva studija farmakotranskripcionog potencijala *GAS5* u dečjoj ALL. U ovoj studiji nisu bili dostupni podaci o nivou ekspresije *GAS5* 8. dana, mada je to važna vremenska tačka BFM protokola. Dalje studije na velikoj kohorti dečjih ALL pacijenata su potrebne kako bi se potvrdili naši rezultati.

5.3. Analiza molekularnog mehanizma dejstva duge nekodirajuće RNK *GAS5*

Poznato je da GK inhibiraju dejstvo NF- κ B kao transkripcionog faktora (171). Jedan od mogućih načina inhibicije dejstva NF- κ B jeste indukcija sinteze I κ B kompleksom GK-GR. I κ B je protein koji vezuje NF- κ B u citosolu i sprečava njegovu translokaciju u nukleus (172, 173). Pored navedenog mehanizma, postoje i drugi modeli inhibicije dejstva NF- κ B kompleksom GK-GR, kao što su jednostavni model i kompozitni model (171). Po jednostavnom modelu, GK-GR kompleks se vezuje direktno za NF- κ B, što onemogućava vezivanje NF- κ B za svoju konsenzus sekvencu (174, 175, 176). Po kompozitnom modelu, GK-GR kompleks se vezuje za NF- κ B, koji se već vezao za svoju konsenzus sekvencu, ali na taj način bude inhibirano dejstvo NF- κ B (174).

Cilj istraživanja u okviru ove teze je bio rasvetljavanje molekularnog mehanizma kojim bi se ispitala uloga dnkRNK *GAS5* u signalnom putu kojim GK ostvaruju svoje dejstvo na aktivnost NF- κ B kao transkripcionog faktora.

Na osnovu rezultata ove doktorske teze i na osnovu ranijih istraživanja (165), pokazano je da se nivo ekspresije *GAS5 in vitro* menja zavisno od doze GK kojom su ćelije tretirane, iako je mehanizam uticaja GK-GR kompleksa na ekspresiju *GAS5* nepoznat. Naši *in vitro* rezultati su pokazali povećanje *GAS5* ekspresije kada je primenjen tretman HeLa ćelija DEX u 100 nM koncentraciji, a smanjenje *GAS5* ekspresije prilikom primene DEX u 1 μ M koncentraciji. Ako uzmemo u obzir da 100 nM koncentracija DEX više odgovara terapijskim koncentracijama izmerenim u plazmi pacijenata pod terapijom DEX (177), rezultati naše *in vitro* studije su u saglasnosti sa zaključkom iz naše studije koja uključuje ALL pacijente. Naime, u oba slučaja rezultati ukazuju na pojačanu ekspresiju *GAS5* prilikom primene GK. Međutim, ovaj rezultat treba uzeti kao preliminaran, i potrebno ga je potvrditi u ponovljenim studijama.

Međutim, poznato je od ranije da *GAS5* menja efikasnost GK (100). Pretpostavljeno je da je ovo posledica toga što *GAS5* imitira GRE sekvencu, ponašajući se kao „mamac“ za GK-GR kompleks (119).

Sledeći cilj naše studije je bio da ispitamo da li ova funkcija *GAS5* uključuje transkripcioni kompleks NF- κ B.

Rezultati ovog doktorskog rada su pokazali da je afinitet vezivanja proteinskog kompleksa za NF- κ B konsenzusnu sekvencu veći u ćelijama u kojima je ekspresija *GAS5* povećana. Takođe je pokazano da ekspresija *GAS5*, pri primeni GK, moduliše vezivanje NF- κ B za DNK u odnosu na interakciju NF- κ B sa DNK kada ćelije nisu tretirane GK.

Ovo su prvi, a uz to i preliminarni rezultati koji rasvetljavaju signalni put koji povezuje GK, *GAS5* i interakciju NF- κ B sa DNK. Potrebna su dalja istraživanja kako bi se utvrdio tačan mehanizam interakcija između ovih komponenti. Naši eksperimenti su pokazali da je u transkripcionom kompleksu koji smo detektovali prisutna p65 subjedinica NF- κ B. Poznato je da transkripcioni kompleks koji se vezuje za regulatorni element za koji se vezuje NF- κ B može biti sastavljen od različitih transkripcionih faktora. Sledeći koraci istraživanja bi bili usmereni na utvrđivanju komponenti transkripcionog kompleksa koji se vezuje za konsenzusnu DNK sekvencu za NF- κ B u uslovima povišene

ekspresije *GAS5* i u uslovima u kojima su ćelije tretirane GK. Naša pretpostavka je da se sastav transkripcionog kompleksa menja u zavisnosti od ekspresije *GAS5* i tretmana GK.

Uprkos tome što su GK terapijski standard za fazu indukcije remisije ALL, tretman prednizonom može da dovede do mnogih neželjenih efekata kao što su steroidna psihoza, proksimalna miopatija i infekcije (62). Deksametazon, kao alternativa prednizonu u slučaju tretiranja visoko rizične leukemije (178) ili GK rezistencije, je povezan sa još težim neželjenim efektima, kao što je osteonekroza, pa čak i smrtni ishod u ranoj fazi indukcije remisije ALL (179). Neželjeni efekti tretmana deksametazonom imaju još teže manifestacije nego što je slučaj sa prednizonom (180). Pored toga, pokazano je da od koncentracije GK u plazmi zavisi i klinički odgovor (177).

Od suštinske je važnosti za poboljšanje preživljavanja pacijenata u pedijatrijskoj ALL da se ispitaju svi faktori koji bi doveli do povoljnijeg ili neadekvatnog odgovora na terapiju u fazi indukcije remisije. Dalje ispitivanje uloge *GAS5* na odgovore na GK terapiju je put koji vodi ka utvrđivanju farmakotranskriptomskih markera, koji potencijalno mogu da utiču na odgovor pacijenata na GK u fazi lečenja indukcije remisije kod dece obolele od ALL.

5.4. Studija farmakogenomskih markera za GK u populaciji Srbije

U okviru ove doktorske teze je dizajniran panel baziran na NGS tehnologiji koja omogućava sveobuhvatnu analizu genoma na farmakogene i farmakogenomske markere značajne za odgovor na terapiju GK. U našem istraživanju smo koristili saznanja dobijena u farmakogenomskim studijama i podatke iz baze PharmGKB, kako bismo dizajnirali panel i sprovedi populaciono-farmakogenomsko istraživanje koje bi nam ukazalo na učestalost pojedinih markera relevantnih za odgovor na GK terapiju u populaciji Srbije.

Farmakogenomske studije vezane za odgovor na GK terapiju kod dece sa ALL nisu brojne.

Studija gena kandidata je oblik farmakogenomske studije u okviru koje se ispituju asocijacije između bolesti i genetičkih varijanti u genima, koji potencijalno doprinose

fenotipu bolesti. Uprkos ponekad zbunjujućim mehanizmima odgovora na GK u dečjoj ALL, poznato je da izvesni geni doprinose uticaju na odgovore na GK kod ove bolesti.

Za razliku od pristupa proučavanja gena kandidata, korišćenje sveobuhvatnih metoda za analizu genoma (eng. high-throughput) za utvrđivanje uloge farmakogenomskih markera u odgovoru na GK, kao što su GWAS (eng. genome-wide association study; srp. studija asocijacija na nivou celog genoma) i NGS, bi moglo da istakne relevantne varijante ili skupine varijanti koje su potencijalno odgovorne za različit odgovor na GK među pacijentima sa dečjom ALL. NGS analiza je omogućila da se detektuju važni mutirani geni u ćelijskom putu od važnosti za metabolizam i transport GK. Nove mutacije u pedijatrijskoj ALL koje su detektovane ovom metodom mogu da budu od suštinske važnosti kao prognostički i/ili prediktivni biomarkeri, koji bi bili korišćeni za biranje najboljeg terapijskog pristupa i za biranje najboljeg leka za tretiranje ovog maligniteta (181).

U jednoj GWAS studiji (182), 440 044 JNV (jednonukleotidna varijanta), koje su doprinele riziku od relapsa, su proučavane kod 2535 dečjih ALL pacijenata posle usklađivanja analizirane grupe ispitanika prema porodičnom genetičkom miljeu i prema primenjenom terapijskom režimu. Od 134 detektovanih novih JNV asociраних sa rizikom od relapsa, četiri JNV (rs6007758, rs41488548, rs10264856, rs4728709) su pokazale asocijaciju sa većim uklanjanjem deksametazona iz plazme. Dva od navedenih JNV (rs10264856, rs4728709) se nalaze u genu *ABCB1*, za koji je prethodno pokazano da je važan farmakogen za GK.

U drugoj GWAS studiji (183) pronađeno je da jedan region na hromozomu 14, koji sadrži gen *SERPINA6/SERPINA1*, objašnjava oko 1% varijanse nivoa kortizola u plazmi. Koristeći Illumina Exome čip i GWAS metaanalizu, pokazano je da jedna JNV, rs12589136, utiče na vezujuću aktivnost reaktivne centralne petlje kortikosteroid-vezujućeg globulina. Ovo dovodi do povišenja nivoa kortizola u plazmi, kao i do veće vezujuće aktivnosti globulina koji vezuje kortizol. Dakle, pokazano je da varijanta rs12589136 utiče na nivo kortizola u plazmi, što bi značilo da ova varijanta može da bude potencijalna buduća meta istraživanja kada je u pitanju ishod GK terapije kod dečjih ALL pacijenata.

Toksičnost GK terapije je generalno poznati problem kada je u pitanju faza indukcije remisije u lečenju dečje ALL. Osteonekroza, usled primene deskametazona kod

lečenja visoko rizičnih ALL pacijenata, je jedna od najopasnijih posledica toksičnosti GK terapije u dečjoj ALL. Jedna GWAS studija (65) je pronašla asocijaciju između minornog alela JNV rs10989692 i osteonekroze. Ova JNV se nalazi blizu gena za glutamatski receptor, *GRIN3A*. Ova asocijacija je potvrđena i u dve ponovljene, validacione studije. U još jednoj GWAS studiji, pokazano je da je veći broj JNV u genu *ACPI* (en. acid phosphatase 1; sr. kisela fosfataza 1) asociran sa povećanim rizikom od osteonekroze tokom tretmana pedijatrijske ALL deksametazonom (184). Gen *ACPI* je važan za regulisanje nivoa holesterola i triglicerida (185), što znači da je nivo lipida verovatno značajan za patofiziologiju osteonekroze u pedijatrijskoj ALL.

Farmakotranskriptomski markeri odgovora na GK u dečjoj ALL su i dalje nedovoljno istraženi. Međutim, postoje sporadični rezultati. Jedna studija, koja je koristila pristup kompjuterske obrade postojećih rezultata u proučavanju asocijacije između mikroRNK i GK rezistencije, je pronašla da su dve mikroRNK, hsa-miR-142-3p i hsa-miR-17-5p, povezane sa GK rezistencijom u pedijatrijskoj ALL (186). Takođe je pokazano da je dnkRNK *GAS5* asocirana sa nepovoljnim odgovorom na GK u dečjoj ALL tokom faze indukcije remisije (187).

Analize genske ekspresije korišćenjem genskih čipova su pokazale da modifikovane ekspresije RNK, koje su osnova za sintezu različitih proteina i transkripcionih faktora, mogu da budu asocirane sa GK rezistencijom u terapiji dečje ALL. Ekspresija epitelnog membranskog proteina (*EMP1*) je povećana kod pacijenata sa nepovoljnim odgovorom na prednizon, u odnosu na pacijente sa dobrim odgovorom na prednizon (188). *EMP1* je protein koji utiče na fosforilaciju Src i FAK proteina (189). Src kinazna familija proteina je od suštinske važnosti za funkcionisanje receptora kod limfocita (190, 191). U drugoj studiji korišćenjem mikroareja, u slučaju nižeg nivoa metilacije promotora kaspaze 1 (*CASP1*) i promotora njegovog aktivatora *NLRP3*, detektovana je njihova povišena ekspresija. Povišena ekspresije *CASP1* utiče na pojačanu digestiju GR, a time se povećava GK rezistencija (192).

Geni uključeni u remodelovanje hromatina su još jedna grupa koja potencijalno doprinosi ishodu GK odgovora kod pedijatrijske ALL. Jedna studija, u kojoj je korišćen genski čip, je pokazala da je snižena ekspresija tri subjedinice *SWI/SNF* kompleksa (*SMARCA4*, *ARID1A* i *SMARCB1*) asocirana sa GK rezistencijom (193). Pored toga, kada je gen *CREBBP*, koji kodira transkripcioni koaktivator i histon-acetiltransferazu, CREB-

vezujući protein, analiziran sekvenciranjem, a potom i njegova ekspresija korišćenjem genskog čipa, otkrivene su nove mutacije koje su doprinosile GK rezistenciji (194).

Pored pretraživanja literature, koristili smo i bazu podataka PharmGKB, da bismo dizajnirali panel za analizu farmakogena značajnih za odgovor na terapiju glukokortikoidnim lekovima.

Kada su u pitanju detalji vezani za same farmakogenomske markere, postoji baza podataka koja sadrži informacije o varijantnim alelima, o nivou pouzdanosti dokaza vezanih za povezanost između farmakogenomskih markera i odgovora na lekove, kao i o mestu farmakogenomskih markera u okviru „puta“ leka i, najvažnije od svega, ova baza podataka nudi preporuke i vodiče za primenu lekova na čiju efikasnost ili toksičnost utiče farmakogenomski marker. Baza podataka koja sadrži objedinjeno ove podatke se zove PharmGKB.

PharmGKB je, ukratko, enciklopedija podataka iz farmakogenomike (195). Aktuelnost ove baze podataka se ogleda u nizu aktivnosti koje se vrše u okviru samog sajta. Kuratori PharmGKB-a redovno vrše pregled literature i sumiranje informacija kako bi informacije bile prisutne na samoj web stranici. Pored bazičnih informacija o samim farmakogenomskim markerima, postoje na samom sajtu i podaci o oznakama za lekove koje sadrže farmakogenomske informacije, a koje je odobrila FDA (eng. Food and Drug Administration). Na kraju, PharmGKB omogućava postizanje konsenzusa o relevantnim farmakogenomskim markerima i relevantnim farmakogenima (VIP), na osnovu studija koje daju podatke o asocijacijama između farmakogenomskih markera, VIP-ova i odgovora na lekove. Sve ovo vodi ka stvaranju i izdavanju vodiča za doziranje lekova zavisno od farmakogenomske varijante. Informacije u bazi podataka PharmGKB su poredane hijerarhijski, od podataka o detekciji farmakogenomskog markera, do kliničke primene nekih od njih.

Podaci u bazi PharmGKB nisu nedvosmisleni po pravilu, iz razloga što se podaci u okviru ove baze podataka zasnivaju na studijama u okviru kojih su proučavane farmakogenomske varijante. Preciznije, broj i kvalitet studija vezanih za različite farmakogenomske varijante se često razlikuje, a pored toga često se susreće neusaglašenost rezultata kada su u pitanju dokazi o kliničkom efektu farmakogenomske varijante koja se razmatra. Shodno tome, postoji više nivoa pouzdanosti dokaza.

Nivoi pouzdanosti dokaza se dele na:

1. Nivo 1A: Postoji anotacija (informacija) o klinički relevantnoj asocijaciji između varijante i leka koju je prihvatio konzorcijum za izradu vodiča PharmGKB-a ili je navedena asocijacija zapisana u vodiču.
2. Nivo 1B: Anotacija za koju postoji velika količina dokaza u prilog povezanosti između varijante i leka, sa tim što ovu asocijaciju treba potvrditi u više od jedne kohorte pacijenata.
3. Nivo 2A: Anotacija koja može da bude nivoa 2B, ali se varijanta nalazi u okviru farmakogena svrstanog u VIP.
4. Nivo 2B: Anotacija sa dokazima koji nisu od apsolutne značajnosti, ali koji imaju dovoljno visok nivo značajnosti da postoji osnovan razlog da se ponovi studija razmatranog farmakogenomskog markera kako bi se asocijacija potvrdila u još jednoj ili više studija.
5. Nivo 3: Anotacija zasnovana na jednoj bitnoj studiji ili na više studija u okviru kojih je proučavana farmakogenomska varijanta u pitanju, ali u ovim studijama nisu pronađene dovoljno značajne asocijacije.
6. Nivo 4: Anotacija formulisana na osnovu studija slučajeva, *in vitro* analiza, funkcionalnih ili molekularnih eseja.

Svrha PhramGKB baze podataka jeste da se dovede do potpune implementacije farmako-genomike na osnovu podataka, studija i vodiča dostupnih u okviru ove baze podataka.

Naš farmakogenomski panel za GK je obuhvatio 22 farmakogena i dodatnih 19 farmakogenomskih varijanti. Pojedine farmakogenomske studije su otkrile razlike između populacija kada su u pitanju farmakogenomski markeri koji menjaju efikasnost ili toksičnost leka, čak i u prostorno bliskim populacijama, kao što su različite evropske populacije (196). Međutim, učestalost većine ispitivanih varijanti u Srbiji je bila slična onoj u evropskim populacijama. Stoga smo zaključili da nema osnova da se bilo koja od ovih varijanti uvede u prediktivne genetičke testove pre primene GK u lečenju pacijenata u Srbiji. Izuzetak je varijanta rs1695 u genu *GSTP1*, koja je validan farmakogenetički marker odgovora na GK, ali čija je učestalost u populaciji Srbije manja nego u evropskim populacijama.

Naš farmakogenomski panel je ukazao na 12 novih potencijalnih farmakogenomskih markera za GK. Među detektovanim alelima, posebnu pažnju zaslužuje njih 6: 3 varijante po predikciji imaju najveći impakt na funkcionalnost enzima koji kodiraju (*ABCB1* c.947A>G, *NCOA3* rs138733364 i *TBX21* rs14059812), 2 varijante su izuzetno zanimljive kao potencijalni farmakogenomski markeri zbog svoje visoke učestalosti (*FCER2* rs28364072 – 34% i *NCOA3* rs2230782 – 12.5%), i varijanta koja je učestalija u populaciji Srbije nego u Evropi, *NCOA3* rs6094752. Ukoliko bi se pokazalo da su ove varijante farmakogenomski markeri za GK (funkcionalni *in vitro* esej, kliničke asocijativne studije), one bi bile uključene u postojeće farmakogenomske baze podataka.

Jedna od najpoznatijih baza podataka koja sadrži informaciju o farmakogenomskim markerima u različitim populacijama je FINDbase (20). To je detaljna baza podataka koja sadrži informacije o učestalosti kliničkih relevantnih varijanti i u različitim populacijama, uključujući i farmakogenomske markere. U FINDbase se već nalaze podaci o zastupljenosti pojedinih klinički relevantnih varijanti u populaciji Srbije. Naša dalja istraživanja bi mogla da dovedu do proširenja ove, i drugih farmakogenomskih baza podataka.

Ogromna količina podataka (eng. big data) u oblasti farmakogenomike u dečjoj ALL, nastala kao rezultat analize genomskog profila pacijenata korišćenjem metoda za sveobuhvatnu analizu genoma, posebno NGS metode, zahteva da se od “skupljanja podataka” pređe na sledeći nivo, analizu podataka. Naime, neophodno je razviti algoritme, koji će biti osnova za farmakogenomske prediktivne testove i koji će se validirati u retrospektivnim i prospektivnim kliničkim studijama. Za to je neophodno unaprediti bioinformatičke alate i implementirati veštačku inteligenciju. Jedino tako će biti postignuta translacija od istraživanja do primene farmakogenomike i drugih omika u kliničkoj praksi.

Ako govorimo o dečjoj ALL, biomedicinske nauke su na dobrom putu ka unapređenju lečenja dece sa ALL kroz individualizaciju terapije za svakog pacijenta. Armija istraživača nastoji da uvede personalizovanu medicinu u kliničku praksu kad je u pitanju dečja ALL. I ova doktorska teza predstavlja doprinos naporima da se to dogodi što pre.

6. ZAKLJUČCI

1. Uzorak pacijenata u našoj asocijativnoj farmakogenetičkoj studiji odgovora na glukokortikoidne lekove (GK), obuhvatio je 122 pacijenta dečjeg uzrasta obolelih od ALL. Svi su lečeni po BFM protokolu, a rezultati se odnose na inicijalnu fazu lečenja, indukciju remisije. Studija je pokazala da je retki GG genotip varijante rs6198 u genu *NR3C1* asociran sa lošim odgovorom na GK. Pored toga, haplotip CAA (rs33389-rs33388-rs6198) u genu *NR3C1* je asociran sa dobrim odgovorom na GK.
2. U istoj asocijativnoj farmakogenetičkoj studiji je pokazano da je haplotip GC (rs1693-rs1138272) u genu *GSTP1* asociran sa dobrim odgovorom na GK.
3. Uzorak pacijenata u našoj asocijativnoj farmakotranskriptomskoj studiji odgovora na glukokortikoidne lekove, obuhvatio je 29 pacijenata dečjeg uzrasta obolelih od ALL. Svi su lečeni po BFM protokolu, a rezultati se odnose na inicijalnu fazu lečenja, indukciju remisije. Pokazano je da je nivo ekspresije novog potencijalnog farmakotranskripcionog markera, duge nekodirajuće RNK *GAS5*, 15. dana terapije bio viši u odnosu na nivo ekspresije na dan dijagnoze. Nivo ekspresije *GAS5* 33. dana se smanjio u odnosu na nivo ekspresije 15. dana. Takođe je pokazano da je nivo ekspresije *GAS5* bio viši 33. dana nego na dan dijagnoze. S obzirom na to da se ovaj nivo ekspresije poklapa sa promenama u doziranju GK, može se pretpostaviti da GK utiču na ekspresije *GAS5*.
4. U istoj farmakotranskriptomskoj studiji je pokazano je da viši nivo ekspresije *GAS5* na dan dijagnoze asociran sa manjim brojem blasta 8. dana terapije, odnosno boljim odgovorom na GK terapiju.
5. U istoj studiji, kada je analiziran odnos između nivoa ekspresije *GAS5* detektovanih 15. dana terapije i na dan dijagnoze, pokazano je da je kod pacijenata kod kojih je ovaj odnos veći, veći i broj blasta 8. dana terapije, odnosno da ovaj odnos može biti marker odgovora na GK terapiju.
6. Naša studija je ukazala na to da se *GAS5* može tretirati kao novi potencijalni farmakotranskripcioni marker odgovora na GK u terapiji dečje ALL.
7. Studija u *in vitro* sistemu, u kojoj je u HeLa ćelijama izučavan mehanizam dejstva GK na ekspresiju *GAS5* i i vezivanje transkripcionog faktora NF- κ B za DNK, je pokazala da *GAS5* učestvuje u signalnom putu kojim GK deluju

na transkripcioni kompleks koji se vezuje za NF- κ B konsenzusnu DNK sekvencu.

8. U okviru ove doktorske teze je dizajniran panel baziran na tehnologiji sekvenciranja nove generacije (NGS) koji omogućava sveobuhvatnu analizu genoma na farmakogene i farmakogenomske markere značajne za odgovor na terapiju GK. Panel omogućava analizu 22 farmakogena i dodatnih 19 farmakogenomskih varijanti.
9. Naša populaciono-farmakogenomska studija je obuhvatila 100 ispitanika iz populacije Srbije. Pošto je studija pokazala da je učestalost većine ispitivanih farmakogenomskih varijanti u Srbiji slična onoj u evropskim populacijama, i kako do sada ni za jednu od navedenih varijanti ne postoji potvrda da ima dovoljan farmakogenomski potencijal da bi bila uključena u protokole lečenja u kojima se koriste GK, zaključeno je da nema osnova da se bilo koja od ovih varijanti uvede u prediktivne genetičke testove pre primene GK u lečenju pacijenata u Srbiji.
10. Populaciono- farmakogenomska studija u kojoj je korišćen naš farmakogenomski panel je ukazala na 12 novih potencijalnih farmakogenomskih markera za GK. Među detektovanim alelima, posebnu pažnju zaslužuje njih 6. Ukoliko bi se pokazalo da su ove varijanta farmakogenomski markeri za GK (funkcionalni *in vitro* esaji, kliničke asocijativne studije), one bi bile uključene u postojeće farmakogenomske baze podataka.
11. Novodetektovane varijante koje po predikciji imaju najveći impakt na funkcionalnost enzima koji kodiraju, *ABCB1* c.947A>G, *NCOA3* rs138733364 i *TBX21* rs14059812, su potencijalni farmakogenomski markeri za GK.
12. Novodetektovane varijante, izuzetno zanimljive kao potencijalnih farmakogenomski markeri zbog svoje visoke učestalosti u evropskim populacijama, su *FCER2* rs28364072 – 34% i *NCOA3* rs2230782 – 12.5% .
13. Novodetektovana varijanta koja je učestalija u populaciji Srbije nego u Evropi, *NCOA3* rs6094752, je kandidat za prediktivno genetičko testiranje pre primene GK u lečenju pacijenata u Srbiji.

7. BIBLIOGRAFIJA

1. Sackett D L, Rosenberg W M, Gray J A, Haynes R B, Richardson W S. Evidence based medicine: What it is and what it isn't. *BMJ (Clinical research ed.)* 1996; 312: 71-72
2. Geraghty J C. 'Omics' and 'omes' – the future of personalised medicine. *Journal* 2015; 2019:
3. Georgitsi M, Zukic B, Pavlovic S, Patrinos G P. Transcriptional regulation and pharmacogenomics. *Pharmacogenomics* 2011; 12: 655-73
4. Stojiljkovic M, P. Patrinos G, Pavlovic S. Clinical applicability of sequence variations in genes related to drug metabolism. *Current Drug Metabolism* 2011; 12: 445-54
5. Everett J R, Loo R L, Pullen F S. Pharmacometabonomics and personalized medicine. *Annals of Clinical Biochemistry* 2013; 50: 523-45
6. Offit K. Personalized medicine: New genomics, old lessons. *Human genetics* 2011; 130: 3-14
7. Table of pharmacogenomic biomarkers in drug labeling. *Journal*
8. Yoon J-H, Abdelmohsen K, Gorospe M. Posttranscriptional gene regulation by long noncoding rna. *Journal of molecular biology* 2013; 425: 3723-30
9. Marques-Rocha J L, Milagro F I, Mansego M L, Zulet M A, Bressan J, Martínez J A. Expression of inflammation-related mirnas in white blood cells from subjects with metabolic syndrome after 8 wk of following a mediterranean diet-based weight loss program. *Nutrition* 2016; 32: 48-55
10. Carter G, Miladinovic B, Patel A A, Deland L, Mastorides S, Patel N A. Circulating long noncoding rna gas5 levels are correlated to prevalence of type 2 diabetes mellitus. *BBA clinical* 2015; 4: 102-7
11. Li W, Huang K, Wen F, Cui G, Guo H, Zhao S. Genetic variation of lncrna gas5 contributes to the development of lung cancer. *Oncotarget* 2017; 8: 91025-29
12. Mourtada-Maarabouni M, Pickard M R, Hedge V L, Farzaneh F, Williams G T. Gas5, a non-protein-coding rna, controls apoptosis and is downregulated in breast cancer. *Oncogene* 2009; 28: 195-208
13. Calin G A, Liu C G, Ferracin M, Hyslop T, Spizzo R, Sevignani C, et al. Ultraconserved regions encoding ncrnas are altered in human leukemias and carcinomas. *Cancer Cell* 2007; 12: 215-29
14. Lammens T, Durinck K, Wallaert A, Speleman F, Vlierberghe P. Long non-coding rnas in leukemia: Biology and clinical impact. *Journal* 2017; 24: 1
15. Wang X, Zhu B, Huang Z, Chen L, He Z, Zhang H. Micrnas as biomarkers in leukemia. *Stem Cell Investigation* 2014; 1:
16. Chen Q N, Wei C C, Wang Z X, Sun M. Long non-coding rnas in anti-cancer drug resistance. *Oncotarget* 2017; 8: 1925-36
17. Engen R M, Marsh S, Booven D J V, McLeod H L. Ethnic differences in pharmacogenetically relevant genes. *Current Drug Targets* 2006; 7: 1641-48
18. Carson P E, Flanagan C L, Ickes C E, Alving A S. Enzymatic deficiency in primaquine-sensitive erythrocytes. *Science* 1956; 124: 484
19. Mette L, Mitropoulos K, Vozikis A, Patrinos G P. Pharmacogenomics and public health: Implementing 'populationalized' medicine. *Pharmacogenomics* 2012; 13: 803-13
20. Viennas E, Komianou A, Mizzi C, Stojiljkovic M, Mitropoulou C, Muilu J, et al. Expanded national database collection and data coverage in the findbase worldwide database for clinically relevant genomic variation allele frequencies. *Nucleic Acids Res.* 2017; 45: D846-D53

21. Zuckerman T, Rowe J M. Pathogenesis and prognostication in acute lymphoblastic leukemia. *F1000prime reports* 2014; 6: 59-59
22. Pui C H, Robison L L, Look A T. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 2008; 371: 1030-43
23. Schrappe M, Reiter A, Zimmermann M, Harbott J, Ludwig W D, Henze G, et al. Long-term results of four consecutive trials in childhood all performed by the all-bfm study group from 1981 to 1995. *Leukemia* 2000; 14: 2205-22
24. Stary J, Zimmermann M, Campbell M, Castillo L, Dibar E, Donska S, et al. Intensive chemotherapy for childhood acute lymphoblastic leukemia: Results of the randomized intercontinental trial all ic-bfm 2002. *J. Clin. Oncol.* 2014; 32: 174-84
25. Tasian S K, Loh M L, Hunger S P. Childhood acute lymphoblastic leukemia: Integrating genomics into therapy. *Cancer* 2015; 121: 3577-90
26. Janic D, Dokmanovic L, Krstovski N, Skoric D, Lazic J. Treatment results of children with acute lymphoblastic leukemia according to modified bfm protocol. *Journal* 2004; 132 Suppl 1: 17-22
27. Inaba H, Greaves M, Mullighan C G. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* (London, England) 2013; 381: 1943-55
28. Ko R H, Ji L, Barnette P, Bostrom B, Hutchinson R, Raetz E, et al. Outcome of patients treated for relapsed or refractory acute lymphoblastic leukemia: A therapeutic advances in childhood leukemia consortium study. *J. Clin. Oncol.* 2010; 28: 648-54
29. Janic D. Akutna limfoblastna leukemija. *Journal* 2016; 2: 1068-74
30. Carroll W L, Bhojwani D, Min D-J, Moskowitz N, Raetz E A. Childhood acute lymphoblastic leukemia in the age of genomics. *Pediatric blood & cancer* 2006; 46: 570-78
31. van Dongen J J M, Macintyre E A, Gabert J A, Delabesse E, Rossi V, Saglio G, et al. Standardized rt-pcr analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. *Leukemia* 1999; 13: 1901
32. Jones L K, Saha V. Philadelphia positive acute lymphoblastic leukaemia of childhood. *British journal of haematology* 2005; 130: 489-500
33. Pui C H, Campana D. Age-related differences in leukemia biology and prognosis: The paradigm of mll-af4-positive acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2007; 21: 593
34. Shurtleff S, Buijs A, G Behm F, Rubnitz J, C Raimondi S, L Hancock M, et al. Tel/am11 fusion resulting from a cryptic t(12;21) is the most common genetic lesion in pediatric all and defines a subgroup of patients with an excellent prognosis. *Journal* 1996; 9: 1985-9
35. Zelent A, Greaves M, Enver T. Role of the tel-am11 fusion gene in the molecular pathogenesis of childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Oncogene* 2004; 23: 4275
36. Uckun F M, Herman-Hatten K, Crotty M-L, Sensel M G, Sather H N, Tuel-Ahlgren L, et al. Clinical significance of $mll-af4$ fusion transcript expression in the absence of a cytogenetically detectable t(4;11)(q21;q23) chromosomal translocation. *Blood* 1998; 92: 810
37. Mullighan C G. The molecular genetic makeup of acute lymphoblastic leukemia. *ASH Education Program Book* 2012; 2012: 389-96
38. Ma X, Edmonson M, Yergeau D, Muzny D M, Hampton O A, Rusch M, et al. Rise and fall of subclones from diagnosis to relapse in pediatric b-acute lymphoblastic leukaemia. *Nature communications* 2015; 6: 6604-04
39. Wu C, Li W. Genomics and pharmacogenomics of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Critical reviews in oncology/hematology* 2018; 126: 100-11

40. Al-Mahayri Z N, Patrinos G P, Ali B R. Pharmacogenomics in pediatric acute lymphoblastic leukemia: Promises and limitations. *Pharmacogenomics* 2017; 18: 687-99
41. Myriam Campbell e a. All ic-bfm 2009 a randomized trial of the i-bfm-sg for the management of childhood non-b acute lymphoblastic leukemia. 2009; 178
42. Hunger S P, Mullighan C G. Acute lymphoblastic leukemia in children. *N. Engl. J. Med.* 2015; 373: 1541-52
43. Rudin S, Marable M, Huang R S. The promise of pharmacogenomics in reducing toxicity during acute lymphoblastic leukemia maintenance treatment. *Genomics, proteomics & bioinformatics* 2017; 15: 82-93
44. Gervasini G, Vagace J M. Impact of genetic polymorphisms on chemotherapy toxicity in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Frontiers in genetics* 2012; 3: 249
45. Ross C, Visscher H, Rassekh S, Castro-Pastrana L, Shereck E, Carleton B, et al. Pharmacogenomics of serious adverse drug reactions in pediatric oncology. *Journal* 2011; 18: e134-51
46. Thomas A. How can we improve on the already impressive results in pediatric all? *ASH Education Program Book* 2015; 2015: 414-19
47. Mlakar V, Huezio-Diaz Curtis P, Satyanarayana Uppugunduri C R, Krajinovic M, Ansari M. Pharmacogenomics in pediatric oncology: Review of gene-drug associations for clinical use. *International journal of molecular sciences* 2016; 17: 1502
48. Kotur N, Stankovic B, Kassela K, Georgitsi M, Vicha A, Leontari I, et al. 6-mercaptopurine influences tpmt gene transcription in a tpmt gene promoter variable number of tandem repeats-dependent manner. *Journal* 2012; 13: 283-95
49. Zukic B, Radmilovic M, Stojiljkovic M, Tomic N, Pourfarzad F, Dokmanovic L, et al. Functional analysis of the role of the tpmt gene promoter vntr polymorphism in tpmt gene transcription. *Pharmacogenomics* 2010; 11: 547-57
50. Dokmanovic L, Janic D, Krstovski N, Zukic B, Toisc N, Pavlovic S. Importance of genotyping of thiopurine s-methyltransferase in children with acute lymphoblastic leukaemia during maintenance therapy. *Journal* 2008; 136:
51. Dokmanovic L, Urosevic J, Janic D, Jovanovic N, Petrucev B, Tomic N, et al. Analysis of thiopurine s-methyltransferase polymorphism in the population of serbia and montenegro and mercaptopurine therapy tolerance in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Ther. Drug Monit.* 2006; 28: 800-6
52. Kotur N, Dokmanovic L, Janic D, Stankovic B, Krstovski N, Tomic N, et al. Tpmt gene expression is increased during maintenance therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia patients in a tpmt gene promoter variable number of tandem repeat-dependent manner. *Pharmacogenomics* 2015; 16: 1701-12
53. Milosevic G, Kotur N, Krstovski N, Lazic J, Zukic B, Stankovic B, et al. Variants in tpmt, itpa, abcc4 and abcb1 genes as predictors of 6-mercaptopurine induced toxicity in children with acute lymphoblastic leukemia. *Journal of medical biochemistry* 2018; 37: 320-27
54. Tanaka Y, Manabe A, Fukushima H, Suzuki R, Nakadate H, Kondoh K, et al. Multidrug resistance protein 4 (mrp4) polymorphisms impact the 6-mercaptopurine dose tolerance during maintenance therapy in japanese childhood acute lymphoblastic leukemia. *The pharmacogenomics journal* 2015; 15: 380-4
55. Radtke S, Zolk O, Renner B, Paulides M, Zimmermann M, Moricke A, et al. Germline genetic variations in methotrexate candidate genes are associated with pharmacokinetics, toxicity, and outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2013; 121: 5145-53

56. Liu S G, Gao C, Zhang R D, Zhao X X, Cui L, Li W J, et al. Polymorphisms in methotrexate transporters and their relationship to plasma methotrexate levels, toxicity of high-dose methotrexate, and outcome of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Oncotarget* 2017; 8: 37761-72
57. Berg S L, Parsons D W. The pharmacogenomics of vincristine-induced neuropathy: On pins and needles. *JAMA oncology* 2015; 1: 975-6
58. Diouf B, Crews K R, Lew G, Pei D, Cheng C, Bao J, et al. Association of an inherited genetic variant with vincristine-related peripheral neuropathy in children with acute lymphoblastic leukemia. *Jama* 2015; 313: 815-23
59. Kutszegi N, Semsei A F, Gezsi A, Sagi J C, Nagy V, Csordas K, et al. Subgroups of paediatric acute lymphoblastic leukaemia might differ significantly in genetic predisposition to asparaginase hypersensitivity. *PloS one* 2015; 10: e0140136
60. Fernandez C A, Smith C, Yang W, Date M, Bashford D, Larsen E, et al. Hla-drb1*07:01 is associated with a higher risk of asparaginase allergies. *Blood* 2014; 124: 1266-76
61. Rajic V, Debeljak M, Goricar K, Jazbec J. Polymorphisms in gral1 gene are a risk factor for asparaginase hypersensitivity during the treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia & lymphoma* 2015; 56: 3103-8
62. Inaba H, Pui C H. Glucocorticoid use in acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet Oncol.* 2010; 11: 1096-106
63. Lin K T, Wang L H. New dimension of glucocorticoids in cancer treatment. *Steroids* 2016; 111: 84-88
64. Mei L, Ontiveros E P, Griffiths E A, Thompson J E, Wang E S, Wetzler M. Pharmacogenetics predictive of response and toxicity in acute lymphoblastic leukemia therapy. *Blood reviews* 2015; 29: 243-9
65. Karol S E, Yang W, Van Driest S L, Chang T Y, Kaste S, Bowton E, et al. Genetics of glucocorticoid-associated osteonecrosis in children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2015; 126: 1770-6
66. Kawedia J, C Kaste S, Pei D, C Panetta J, Cai X, Cheng C, et al. Pharmacokinetic, pharmacodynamic, and pharmacogenetic determinants of osteonecrosis in children with acute lymphoblastic leukemia. *Journal* 2010; 117: 2340-7; quiz 556
67. Jackson R K, Irving J A, Veal G J. Personalization of dexamethasone therapy in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br. J. Haematol.* 2016; 173: 13-24
68. Lopez-Lopez E, Gutierrez-Camino A, Pinan M A, Sanchez-Toledo J, Uriz J J, Ballesteros J, et al. Pharmacogenetics of micrnas and micrnas biogenesis machinery in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *PloS one* 2014; 9: e91261
69. Iparraguirre L, Umerez M, Gutierrez-Camino A, Martín-Guerrero I, García de Andoin N, Sastre A, et al. Micrna snps as novel markers of methotrexate toxicity in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Journal* 2016; 61: S141-S42
70. Umerez M, Garcia-Obregon S, Martin-Guerrero I, Astigarraga I, Gutierrez-Camino A, Garcia-Orad A. Role of mirnas in treatment response and toxicity of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenomics* 2018; 19: 361-73
71. Schotte D, Menezes R, Akbari Moqadam F, Mohammadi Khankahdani L, Lange-Turenhout E, Chen C, et al. Micrna characterize genetic diversity and drug resistance in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Journal* 2011; 96: 703-11
72. Smith S M, Vale W W. The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress. *Dialogues in clinical neuroscience* 2006; 8: 383-95

73. Adcock I M. Glucocorticoids: New mechanisms and future agents. *Current Allergy and Asthma Reports* 2003; 3: 249-57
74. Almawi W Y, Melemedjian O K. Molecular mechanisms of glucocorticoid antiproliferative effects: Antagonism of transcription factor activity by glucocorticoid receptor. *Journal of Leukocyte Biology* 2002; 71: 9-15
75. Buttgereit F, Scheffold A. Rapid glucocorticoid effects on immune cells. *Steroids* 2002; 67: 529-34
76. Buttgereit F, Straub R H, Wehling M, Burmester G-R. Glucocorticoids in the treatment of rheumatic diseases: An update on the mechanisms of action. *Arthritis & Rheumatism* 2004; 50: 3408-17
77. Spies C M, Schaumann D H S, Berki T, Mayer K, Jakstadt M, Huscher D, et al. Membrane glucocorticoid receptors are down regulated by glucocorticoids in patients with systemic lupus erythematosus and use a caveolin-1-independent expression pathway. *Annals of the rheumatic diseases* 2006; 65: 1139-46
78. Evans R M. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science (New York, N.Y.)* 1988; 240: 889-95
79. Geng C-D, Breslin M B, Vedeckis W V. Multiple promoters exist in the human gr gene, one of which is activated by glucocorticoids. *Molecular Endocrinology* 2001; 15: 1381-95
80. Giguère V, Hollenberg S M, Rosenfeld M G, Evans R M. Functional domains of the human glucocorticoid receptor. *Cell* 1986; 46: 645-52
81. Necela B, A Cidlowski J. Necela bm, cidlowski ja.. Mechanisms of glucocorticoid receptor action in noninflammatory and inflammatory cells. *Proc am thorac soc* 1: 239-246. *Journal* 2004; 1: 239-46
82. Reddy T E, Pauli F, Sprouse R O, Neff N F, Newberry K M, Garabedian M J, et al. Genomic determination of the glucocorticoid response reveals unexpected mechanisms of gene regulation. *Genome research* 2009; 19: 2163-71
83. Liberman A C, Refojo D, Druker J, Toscano M, Rein T, Holsboer F, et al. The activated glucocorticoid receptor inhibits the transcription factor t-bet by direct protein-protein interaction. *The FASEB Journal* 2007; 21: 1177-88
84. Tissing W J E, Meijerink J P P, den Boer M L, Pieters R. Molecular determinants of glucocorticoid sensitivity and resistance in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2003; 17: 17
85. Surjit M, Ganti Krishna P, Mukherji A, Ye T, Hua G, Metzger D, et al. Widespread negative response elements mediate direct repression by agonist- liganded glucocorticoid receptor. *Cell* 2011; 145: 224-41
86. Weikum E R, Knuesel M T, Ortlund E A, Yamamoto K R. Glucocorticoid receptor control of transcription: Precision and plasticity via allostery. *Nature reviews. Molecular cell biology* 2017; 18: 159-74
87. Hudson W H, Pickard M R, de Vera I M, Kuiper E G, Mourtada-Maarabouni M, Conn G L, et al. Conserved sequence-specific lincrna-steroid receptor interactions drive transcriptional repression and direct cell fate. *Nat Commun* 2014; 5: 5395
88. Karin M, Lin A. Nf-kb at the crossroads of life and death. *Nature Immunology* 2002; 3: 221
89. Baeuerle P, Henkel T. Function and activation of nf-kappa b in the immune system. *Journal* 1994; 12: 141-79
90. Tak P P, Firestein G S. Nf-kappab: A key role in inflammatory diseases. *The Journal of clinical investigation* 2001; 107: 7-11

91. Tilstra J S, Clauson C L, Niedernhofer L J, Robbins P D. Nf- κ b in aging and disease. *Aging and disease* 2011; 2: 449-65
92. Westbrook A M, Szakmary A, Schiestl R H. Mechanisms of intestinal inflammation and development of associated cancers: Lessons learned from mouse models. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 2010; 705: 40-59
93. D Perkins N. Integrating cell-signalling pathways with nf-b and ikk function. *Journal* 2007; 8: 49-62
94. Sun S-C, Ley S C. New insights into nf-kappab regulation and function. *Trends in immunology* 2008; 29: 469-78
95. Hayden M S, Ghosh S. Signaling to nf- κ b. *Genes & Development* 2004; 18: 2195-224
96. Park M H, Hong J T. Roles of nf- κ b in cancer and inflammatory diseases and their therapeutic approaches. *Cells* 2016; 5: 15
97. Ghosh G, Wang V Y-F, Huang D-B, Fusco A. Nf- κ b regulation: Lessons from structures. *Immunological reviews* 2012; 246: 36-58
98. Kirschke E, Goswami D, Southworth D, Griffin P R, Agard D A. Glucocorticoid receptor function regulated by coordinated action of the hsp90 and hsp70 chaperone cycles. *Cell* 2014; 157: 1685-97
99. Song Q-q, Tang Y-j, Liu J. Pharmacogenomics genetic variation in the glucocorticoid. 2017; 18: 293-316
100. Kino T, Hurt D E, Ichijo T, Nader N, Chrousos G P. Noncoding rna gas5 is a growth arrest- and starvation-associated repressor of the glucocorticoid receptor. *Science signaling* 2010; 3: ra8
101. Rollins D A, Coppo M, Rogatsky I. Minireview: Nuclear receptor coregulators of the p160 family: Insights into inflammation and metabolism. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* 2015; 29: 502-17
102. Miller A L, Copik A J, Webb M S, Kumar R, Wang Y, Thompson E B. Activation function 1 of glucocorticoid receptor binds tata-binding protein in vitro and in vivo. *Molecular Endocrinology* 2006; 20: 1218-30
103. Gardill B R, Vogl M R, Lin H-Y, Hammond G L, Muller Y A. Corticosteroid-binding globulin: Structure-function implications from species differences. *PloS one* 2012; 7: e52759
104. Zou Y-F, Xu J-H, Gu Y-Y, Pan F-M, Tao J-H, Wang D-G, et al. Single nucleotide polymorphisms of hsp90aa1 gene influence response of sle patients to glucocorticoids treatment. *Journal* 2016; 5:
105. Cartegni L, Chew S L, Krainer A R. Listening to silence and understanding nonsense: Exonic mutations that affect splicing. *Nature Reviews Genetics* 2002; 3: 285-98
106. Gross K L, Lu N Z, Cidlowski J A. Molecular mechanisms regulating glucocorticoid sensitivity and resistance. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2009; 300: 7-16
107. Zalewski G, Wasilewska A, Zoch-Zwierz W, Chyczewski L. Response to prednisone in relation to nr3c1 intron b polymorphisms in childhood nephrotic syndrome. *Pediatr. Nephrol.* 2008; 23: 1073-8
108. Schaaf M J M, Cidlowski J A. Molecular mechanisms of glucocorticoid action and resistance. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2002; 83: 37-48
109. Derijk R H, Schaaf M J, Turner G, Datson N a, Vreugdenhil E, Cidlowski J, et al. A human glucocorticoid receptor gene variant that increases the stability of the

- glucocorticoid receptor beta-isoform mRNA is associated with rheumatoid arthritis. *The Journal of rheumatology* 2001; 28: 2383-8
110. Homma H, Listowsky I. Identification of γ -glutathione-S-transferase as a major rat liver protein labeled with dexamethasone 21-methanesulfonate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1985; 82: 7165-69
111. Vega L. 3. Role of glutathione S-transferase enzymes in toxicology, pharmacology and human disease. *Pharmacological and Toxicological Aspects* 2010; 661: 45-66
112. Johansson A S, Stenberg G, Widersten M, Mannervik B. Structure-activity relationships and thermal stability of human glutathione transferase p1-1 governed by the h-site residue 105. *J. Mol. Biol.* 1998; 278: 687-98
113. Zubowska M, Zielinska E, Zmyslowska A, Bodalski J. [increased frequency of a-g transition at exon 5 of *gstp1* as a genetic risk factor for acute childhood leukaemia]. *Med Wieku Rozwoj* 2004; 8: 245-57
114. Farrell R J, Menconi M J, Keates A C, Kelly C P. P-glycoprotein-170 inhibition significantly reduces cortisol and ciclosporin efflux from human intestinal epithelial cells and t lymphocytes. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2002; 16: 1021-31
115. Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, Arnold H P, Brockmüller J, Johne A, et al. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: Multiple sequence variations and correlation of one allele with p-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2000; 97: 3473-8
116. Ambudkar S V, Dey S, Hrycyna C A, Ramachandra M, Pastan I, Gottesman M M. Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1999; 39: 361-98
117. Wasilewska A, Zoch-Zwierz W, Pietruczuk M, Zalewski G. Expression of p-glycoprotein in lymphocytes from children with nephrotic syndrome, depending on their steroid response. *Pediatr. Nephrol.* 2006; 21: 1274-80
118. Mourtada-Maarabouni M, Hedge V L, Kirkham L, Farzaneh F, Williams G T. Growth arrest in human t-cells is controlled by the non-coding rna growth-arrest-specific transcript 5 (*gas5*). *J. Cell Sci.* 2008; 121: 939-46
119. Garabedian M J, Logan S K. Glucocorticoid receptor DNA binding decoy is a *gas5*. *Science signaling* 2010; 3: pe5
120. Li R, Zhu H, Luo Y. Understanding the functions of long non-coding RNAs through their higher-order structures. *International journal of molecular sciences* 2016; 17: 702
121. Lucafò M, De Iudicibus S, Di Silvestre A, Pelin M, Luigi C, Stefano M, et al. Long noncoding rna *gas5*: A novel marker involved in glucocorticoid response. *Journal* 2014;
122. Pickard M R, Mourtada-Maarabouni M, Williams G T. Long non-coding rna *gas5* regulates apoptosis in prostate cancer cell lines. *Biochim. Biophys. Acta* 2013; 1832: 1613-23
123. Lu X, Fang Y, Wang Z, Xie J, Zhan Q, Deng X, et al. Downregulation of *gas5* increases pancreatic cancer cell proliferation by regulating *cdk6*. *Cell Tissue Res.* 2013; 354: 891-6
124. Lucafo M, Di Silvestre A, Romano M, Avian A, Antonelli R, Martelossi S, et al. Role of the long non-coding rna growth arrest-specific 5 in glucocorticoid response in children with inflammatory bowel disease. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 2018; 122: 87-93
125. Chen C L, Liu Q, Relling M V. Simultaneous characterization of glutathione S-transferase m1 and t1 polymorphisms by polymerase chain reaction in American whites and blacks. *Journal* 1996; 6: 187-91

126. Kurzawski M, Pawlik A, Górnik W, Drożdżik M. Frequency of common *mdr1* gene variants in a polish population. *Pharmacol. Rep.* 2006; 58: 35-40
127. Excoffier L, Lischer H E. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under linux and windows. *Mol. Ecol. Resour.* 2010; 10: 564-7
128. Kotur N. Pharmacogenetics of 6-mercaptopurine and methotrexate in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Journal* 2015; PhD:
129. Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative pcr and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. *Methods* 2001; 25: 402-8
130. Zukic B. Components of human thiopurine s-methyltransferase gene expression regulation system as pharmacogenetic markers. *Journal* 2009; PhD:
131. Cohen S N, Chang A C, Hsu L. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of *escherichia coli* by r-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1972; 69: 2110-4
132. Barnes W. Plasmid detection and sizing in single colony lysates. *Journal* 1977; 195: 393-4
133. Sanger F, Nicklen S, Coulson A R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1977; 74: 5463-7
134. Lipofectamine 2000 transfection reagent protocol. *Journal*
135. Schreiber E, Harshman K, Kemler I, Malipiero U, Schaffner W, Fontana A. Astrocytes and glioblastoma cells express novel octamer-DNA binding proteins distinct from the ubiquitous oct-1 and b cell type oct-2 proteins. *Nucleic Acids Res.* 1990; 18: 5495-503
136. Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976; 72: 248-54
137. Stankovic B. Molecular markers of chronic inflammation and apoptosis in inflammatory bowel diseases. *Journal* 2015; PhD:
138. Asselin B L. The right dose for the right patient. *Blood* 2012; 119: 1617-8
139. Labuda M, Gahier A, Gagne V, Moghrabi A, Sinnott D, Krajcinovic M. Polymorphisms in glucocorticoid receptor gene and the outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia (all). *Leuk. Res.* 2010; 34: 492-7
140. Eipel O T, Nemeth K, Torok D, Csordas K, Hegyi M, Ponyi A, et al. The glucocorticoid receptor gene polymorphism n363s predisposes to more severe toxic side effects during pediatric acute lymphoblastic leukemia (all) therapy. *Int. J. Hematol.* 2013; 97: 216-22
141. Franca R, Rebora P, Basso G, Biondi A, Cazzaniga G, Crovella S, et al. Glutathione s-transferase homozygous deletions and relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia: A novel study design in a large italian aieop cohort. *Pharmacogenomics* 2012; 13: 1905-16
142. Stanulla M, Schäffeler E, Arens S, Rathmann A, Schrauder A, Welte K, et al. *Gstp1* and *mdr1* genotypes and central nervous system relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Journal* 2005; 81: 39-44
143. Stanulla M, Schrappe M, Brechlin A M, Zimmermann M, Welte K. Polymorphisms within glutathione s-transferase genes (*gstm1*, *gstt1*,

- gstp1) and risk of relapse in childhood b-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: A case-control study. *Blood* 2000; 95: 1222-28
144. Xue L, Li C, Wang Y, Sun W, Ma C, He Y, et al. Single nucleotide polymorphisms in non-coding region of the glucocorticoid receptor gene and prednisone response in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk. Lymphoma* 2015; 56: 1704-09
145. Tissing W J E. Genetic variations in the glucocorticoid receptor gene are not related to glucocorticoid resistance in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Clin. Cancer Res.* 2005; 11: 6050-56
146. Longui C A, Vottero A, Adamson P C, Cole D E, Kino T, Monte O, et al. Low glucocorticoid receptor alpha/beta ratio in t-cell lymphoblastic leukemia. *Horm. Metab. Res.* 2000; 32: 401-6
147. Turner J D, Schote A B, Macedo J A, Pelascini L P L, Muller C P. Tissue specific glucocorticoid receptor expression, a role for alternative first exon usage? *Biochem. Pharmacol.* 2006; 72: 1529-37
148. Bamberger C M, Bamberger A M, De Castro M, Chrousos G P. Glucocorticoid receptor b, a potential endogenous inhibitor of glucocorticoid action in humans. *J. Clin. Invest.* 1995; 95: 2435-41
149. Koga Y, Matsuzaki A, Suminoe A, Hattori H, Kanemitsu S, Hara T. Differential mrna expression of glucocorticoid receptor alpha and beta is associated with glucocorticoid sensitivity of acute lymphoblastic leukemia in children. *Pediatr. Blood Cancer* 2005; 45: 121-7
150. Teeninga N, Kist-Van Holthe J E, Van Den Akker E L T, Kersten M C, Boersma E, Krabbe H G, et al. Genetic and in vivo determinants of glucocorticoid sensitivity in relation to clinical outcome of childhood nephrotic syndrome. *Kidney Int.* 2014; 85: 1444-53
151. Kumsta R, Moser D, Streit F, Koper J W, Meyer J, Wust S. Characterization of a glucocorticoid receptor gene (gr, nr3c1) promoter polymorphism reveals functionality and extends a haplotype with putative clinical relevance. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 2009; 150B: 476-82
152. Beger C, Gerdes K, Lauten M, Tissing W J, Fernandez-Munoz I, Schrappe M, et al. Expression and structural analysis of glucocorticoid receptor isoform gamma in human leukaemia cells using an isoform-specific real-time polymerase chain reaction approach. *Br. J. Haematol.* 2003; 122: 245-52
153. Stevens A, Ray D W, Zeggini E, John S, Richards H L, Griffiths C E, et al. Glucocorticoid sensitivity is determined by a specific glucocorticoid receptor haplotype. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2004; 89: 892-7
154. Pearce K F, Balavarca Y, Norden J, Jackson G, Holler E, Dressel R, et al. Impact of genomic risk factors on survival after haematopoietic stem cell transplantation for patients with acute leukaemia. *Int. J. Immunogenet.* 2016; 43: 404-12
155. Johansson A S, Mannervik B. Human glutathione transferase a3-3, a highly efficient catalyst of double-bond isomerization in the biosynthetic pathway of steroid hormones. *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 33061-5
156. Anderer G, Schrappe M, Brechlin A M, Lauten M, Muti P, Welte K, et al. Polymorphisms within glutathione s-transferase genes and initial response to glucocorticoids in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Pharmacogenetics* 2000; 10: 715-26

157. Meissner B, Stanulla M, Ludwig W D, Harbott J, Moricke A, Welte K, et al. The *gstt1* deletion polymorphism is associated with initial response to glucocorticoids in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2004; 18: 1920-3
158. Jafar T, Prasad N, Agarwal V, Mahdi A, Gupta A, Sharma R K, et al. *Mdr-1* gene polymorphisms in steroid-responsive versus steroid-resistant nephrotic syndrome in children. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2011; 26: 3968-74
159. Wang D, Johnson A D, Papp A C, Kroetz D L, Sadee W. Multidrug resistance polypeptide 1 (*mdr1*, *abcb1*) variant 3435c>t affects mrna stability. *Pharmacogenet. Genomics* 2005; 15: 693-704
160. Xuan M, Li H, Fu R, Yang Y, Zhang D, Zhang X, et al. Association of *abcb1* gene polymorphisms and haplotypes with therapeutic efficacy of glucocorticoids in chinese patients with immune thrombocytopenia. *Hum. Immunol.* 2014; 75: 317-21
161. Dokmanovic L, Milosevic G, Peric J, Tosic N, Krstovski N, Janic D, et al. Next generation sequencing as a tool for pharmacogenomic profiling: Nine novel potential genetic markers for targeted therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Srp. Arh. Celok. Lek.* 2018; 146: 407-11
162. Gunnarsson R, Dilorenzo S, Lundin-Strom K B, Olsson L, Biloglav A, Lilljebjorn H, et al. Mutation, methylation, and gene expression profiles in *dup(1q)*-positive pediatric b-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2018; 32: 2117-25
163. Yan H, Zhang D Y, Li X, Yuan X Q, Yang Y L, Zhu K W, et al. Long non-coding rna *gas5* polymorphism predicts a poor prognosis of acute myeloid leukemia in chinese patients via affecting hematopoietic reconstitution. *Leuk. Lymphoma* 2017; 58: 1948-57
164. Yu X, Li Z. Long non-coding rna growth arrest-specific transcript 5 in tumor biology. *Oncol. Lett.* 2015; 10: 1953-58
165. Lucafo M, De Iudicibus S, Di Silvestre A, Pelin M, Candussio L, Martelossi S, et al. Long noncoding rna *gas5*: A novel marker involved in glucocorticoid response. *Curr. Mol. Med.* 2015; 15: 94-9
166. Frankfurt O, Rosen S T. Mechanisms of glucocorticoid-induced apoptosis in hematologic malignancies: Updates. *Curr. Opin. Oncol.* 2004; 16: 553-63
167. Hong S-Y, Yoon W-H, Park J-H, Kang S-G, Ahn J-H, Lee T H. Involvement of two *nf-kb* binding elements in tumor necrosis factor α -, *cd40*-, and epstein-barr virus latent membrane protein 1-mediated induction of the cellular inhibitor of apoptosis protein 2 gene. *J. Biol. Chem.* 2000; 275: 18022-28
168. Webster J C, Huber R M, Hanson R L, Collier P M, Haws T F, Mills J K, et al. Dexamethasone and tumor necrosis factor- α act together to induce the cellular inhibitor of apoptosis-2 gene and prevent apoptosis in a variety of cell types. *Endocrinology* 2002; 143: 3866-74
169. Wen L-P, Madani K, Fahrni J, R. Duncan S, Rosen G. Dexamethasone inhibits lung epithelial cell apoptosis induced by *ifn- γ* And *fas*. *Journal* 1997; 273: L921-9
170. Deveraux Q L, Reed J C. *Iap* family proteins—suppressors of apoptosis. *Genes Dev.* 1999; 13: 239-52
171. Almawi W Y, Melemedjian O K. Molecular mechanisms of glucocorticoid antiproliferative effects: Antagonism of transcription factor activity by glucocorticoid receptor. *J. Leukoc. Biol.* 2002; 71: 9-15
172. Auphan N, DiDonato J A, Rosette C, Helmsberg A, Karin M. Immunosuppression by glucocorticoids: Inhibition of *nf-kappab* activity through induction of *ikappab* synthesis. *Science* 1995; 270: 286-90

173. Scheinman R I, Cogswell P C, Lofquist A K, Baldwin A S. Role of transcriptional activation of ikappabalpha in mediation of immunosuppression by glucocorticoids. *Science* 1995; 270: 283-86
174. De Bosscher K, Schmitz M L, Vanden Berghe W, Plaisance S, Fiers W, Haegeman G. Glucocorticoid-mediated repression of nuclear factor-kappaB-dependent transcription involves direct interference with transactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1997; 94: 13504-9
175. Adcock I M, Lane S J, Brown C R, Peters M J, Lee T H, Barnes P J. Differences in binding of glucocorticoid receptor to DNA in steroid-resistant asthma. *J. Immunol.* 1995; 154: 3500-5
176. Kleinert H, Euchenhofer C, Ihrig-Biedert I, Forstermann U. Glucocorticoids inhibit the induction of nitric oxide synthase ii by down-regulating cytokine-induced activity of transcription factor nuclear factor-kappa B. *Journal* 1996; 49: 15-21
177. Wenting-Van Wijk M J, Blankenstein M A, Lafeber F P, Bijlsma J W. Relation of plasma dexamethasone to clinical response. *Clin. Exp. Rheumatol.* 1999; 17: 305-12
178. Vrooman L M, Neuberg D S, Stevenson K E, Supko J G, Sallan S E, Silverman L B. Dexamethasone and individualized asparaginase dosing are each associated with superior event-free survival in childhood acute lymphoblastic leukemia: Results from dfci-all consortium protocol 00-01. *Blood* 2009; 114: 136-36
179. Schrappe M, Zimmermann M, Moricke A, Mann G, Valsecchi M G, Bartram C R, et al. Dexamethasone in induction can eliminate one third of all relapses in childhood acute lymphoblastic leukemia (all): Results of an international randomized trial in 3655 patients (trial aieop-bfm all 2000). *Blood* 2008; 112: 9-9
180. Mitchell C D, Richards S M, Kinsey S E, Lilleyman J, Vora A, Eden T O, et al. Benefit of dexamethasone compared with prednisolone for childhood acute lymphoblastic leukaemia: Results of the uk medical research council all97 randomized trial. *Br. J. Haematol.* 2005; 129: 734-45
181. Montano A, Forero-Castro M, Marchena-Mendoza D, Benito R, Hernandez-Rivas J M. New challenges in targeting signaling pathways in acute lymphoblastic leukemia by ngs approaches: An update. *Cancers (Basel)* 2018; 10: 110
182. Yang J J, Cheng C, Devidas M, Cao X, Campana D, Yang W, et al. Genome-wide association study identifies germline polymorphisms associated with relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2012; 120: 4197-204
183. Bolton J L, Hayward C, Direk N, Lewis J G, Hammond G L, Hill L A, et al. Genome wide association identifies common variants at the *serpina6/serpina1* locus influencing plasma cortisol and corticosteroid binding globulin. *PLoS Genet* 2014; 10: e1004474
184. Kawedia J D, Kaste S C, Pei D, Panetta J C, Cai X, Cheng C, et al. Pharmacokinetic, pharmacodynamic, and pharmacogenetic determinants of osteonecrosis in children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2011; 117: 2340-7; quiz 556
185. Bottini N, MacMurray J, Peters W, Rostamkhani M, Comings D E. Association of the acid phosphatase (*acp1*) gene with triglyceride levels in obese women. *Mol. Genet. Metab.* 2002; 77: 226-9
186. Chen H, Zhang D, Zhang G, Li X, Liang Y, Kasukurthi M V, et al. A semantics-oriented computational approach to investigate microRNA regulation on glucocorticoid resistance in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Journal* 2018; 18:
187. Gasic V, Stankovic B, Zukic B, Janic D, Dokmanovic L, Krstovski N, et al. Expression pattern of long non-coding rna growth arrest-specific 5 in the remission induction therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Journal* 2018;

188. Ariës I, Jerchel I, E S R van den Dungen R, C J van den Berk L, Boer J, Horstmann M, et al. Emp1, a novel poor prognostic factor in pediatric leukemia regulates prednisolone resistance, cell proliferation, migration and adhesion. *Journal* 2014; 28:
189. A Morales S, Mareninov S, Wadehra M, Zhang L, Goodglick L, Braun J, et al. Fak activation and the role of epithelial membrane protein 2 (emp2) in collagen gel contraction. *Journal* 2008; 50: 462-9
190. Gauld S B, Cambier J C. Src-family kinases in b-cell development and signaling. *Oncogene* 2004; 23: 8001-6
191. Palacios E H, Weiss A. Function of the src-family kinases, lck and fyn, in t-cell development and activation. *Oncogene* 2004; 23: 7990-8000
192. Paugh S W, Bonten E J, Savic D, Ramsey L B, Thierfelder W E, Gurung P, et al. Nalp3 inflammasome upregulation and casp1 cleavage of the glucocorticoid receptor cause glucocorticoid resistance in leukemia cells. *Nat. Genet.* 2015; 47: 607-14
193. Pottier N, Yang W, Assem M, Panetta J C, Pei D, Paugh S W, et al. The swi/snf chromatin-remodeling complex and glucocorticoid resistance in acute lymphoblastic leukemia. *J. Natl. Cancer Inst.* 2008; 100: 1792-803
194. Mullighan C G, Zhang J, Kasper L H, Lerach S, Payne-Turner D, Phillips L A, et al. Crebbp mutations in relapsed acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* 2011; 471: 235-9
195. Pharmgkb. <https://www.pharmgkb.org/>
196. Mizzi C, Dalabira E, Kumuthini J, Dzimir N, Balogh I, Basak N, et al. A european spectrum of pharmacogenomic biomarkers: Implications for clinical pharmacogenomics. *PLoS One* 2016; 11: e0162866

Biografija

Vladimir Gašić je rođen 17.08.1990. godine u Beogradu. Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu, modul integrisane akademske studije, je upisao 2009/2010. godine i diplomirao je u oktobru 2015. odbranivši diplomski rad naslovljen „Značaj profilakse u terapiji teške hemofilije u dece“. Doktorske studije je upisao školske 2015/2016 godine na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, studijski program Molekularna biologija, modul Molekularna biologija eukariota. Od decembra 2015. do juna 2016. godine zaposlen je kao istraživač pripravnik u Laboratoriji za molekularnu biomedicinu, Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo Univerziteta u Beogradu, kao učesnik međunarodnog projekta: „Strengthening the Research Potential of IMGGE through Reinforcement of Biomedical Science of Rare Diseases in Serbia – en route for innovation“ (EU-FP7-REGPOT-316088, 2013-2016. godine). Od juna 2016. godine učesnik je na nacionalnom projektu „Retke bolesti: molekularna patofiziologija, dijagnostički i terapijski modaliteti i socijalni, etički i pravni aspekti“ (Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, ev. br. III41004, 2011-2018. godine). U septembru 2018. godine je stekao zvanje istraživača saradnika. Vladimir Gašić je do sada objavio 7 radova u časopisima od međunarodnog značaja, 1 poglavlje u udžbeniku od međunarodnog značaja i imao je 1 saopštenje na skupu od nacionalnog značaja i 1 saopštenje na skupu od međunarodnog značaja.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а _____ Владимир Гашић _____

број индекса _____ М3020/2015 _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Фармакогеномски и фармакотранскриптомски маркери одговора на терапију

глюкокортикоидним лековима код деце са акутном лимфобластном леукемијом:

молекуларни механизам деловања, клинички и популациони аспекти

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

Потпис докторанда

У Београду, 22.03.2019.

Владимир Гашић

Прилог 2.

**Изјава о истоветности штампане и електронске
верзије докторског рада**

Име и презиме аутора Владимир Гашић

Број индекса M3020/2015

Студијски програм Молекуларна биологија, модул: молекуларна биологија
еукариота

Наслов рада Фармакогеномски и фармакотранскриптомски маркери одговора на
терапију глукокортикоидним лековима код деце са акутном лимфобластном
леукемијом: молекуларни механизам деловања, клинички и популациони
аспекти

Ментор др Никола Котур, др Гордана Матић

Потписани/а Владимир Гашић

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 22.03.2019.

Владимир Гашић

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Фармакогеномски и фармакотранскриптомски маркери одговора на терапију
глюкокортикоидним лековима код деце са акутном лимфобластном леукемијом:

молекуларни механизам деловања, клинички и популациони аспекти

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, _____ 22.03.2019.

Владимир Башкић

1. Ауторство - Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.