

Poděkování

Především bych chtěla poděkovat mé rodině. Mé dceři Aničce, která již od miminka byla ke mně nesmírně tolerantní a umožnila mi věnovat se mé práci – mému koníčku – i v době mateřské a rodičovské dovolené. Manželovi Honzovi, který je mým velkým fanouškem a oporou, a který mi umožňuje skloubit mou nejnáročnější úlohu maminky s prací. Obrovské poděkování patří mým rodičům Zdeňce a Bedřichovi, kteří mě celý život podporují a díky jejichž vzoru a výchově mám v sobě onen vnitřní hnací motor, přirozenou zvědavost a kreativitu. Zde musím vzpomenout i na mou babičku Štěpánku a dědečka Rudolfa, kteří mě obohacovali a formovali svou životní zkušeností.

Moc děkuji mým nejbližším kamarádkám, Petře a Petře, které se mnou prožívají mé úspěchy i těžké chvíle.

Veliké poděkování patří mým kolegyním, kolegům, studentům a přátelům z Ústavu hematologie a krevní transfuze v Praze, především celému kolektivu oddělení molekulární genetiky, bez jejichž zásadního podílu by tato práce nevznikla – Václava Polívková, Jana Karavdič (†), Karla Zemanová, Hana Žižková, Kateřina Vlčanová, Nikola Čuřík, Jitka Koblihová, Jana Linhartová, Adéla Benešová, Monika Krutská (roz. Jarušková), Klára Šrůtová, Pavel Burda, Eliška Motlová, Jan Zach, Štěpánka Venclíková a Martina Hanková. Velkou dávkou poděkování věnuji Haně Klamové, přednostce klinického úseku ÚHKT, bez jejíž práce s pacienty a velmi úzké spolupráce s našim oddělením, bychom nemohli provádět výzkum chronické myeloidní leukémie.

V mé profesi mě nesmírně ovlivnili, radili, pomáhali mě směřovat a také mi věřili a podporovali Jan Trka, Marek Trněný, Tomáš Stopka, Edgar Faber a Daniela Žáčková. Nemohu opomenout mé blízké kolegy a přátele ze zahraničí, Simonu Soverini, Johna Goldmana (†), Nicka Crosse a Danila Perrottiho, kteří mi velice pomohli a pomáhají naši práci prosadit v zahraničí a je radost s nimi spolupracovat.

Děkuji prof. Petrovi Cetkovskému, řediteli ÚHKT a přednostovi Ústavu klinické a experimentální hematologie 1.LF UK, prof. Janu E. Dyrovi, přednostovi výzkumného úseku ÚHKT, za jejich maximální podporu a vytváření podmínek pro mou výzkumnou a pedagogickou práci.

Poděkování patří též paní Janě Pelouchové, předsedkyni spolku Diagnóza leukemie, se kterou spolupracuji již 10 let. Díky ní mám možnost vnímat potřeby a pocity našich pacientů a pomáhat jim porozumět jejich onemocnění.

Miroslav Veverka ve své knize Evoluce svým vlastním tvůrcem -
„*Omne vivum ex DNA*“

Obsah

1.	Abstrakt	5
2.	Úvod	6
3.	Chronická myeloidní leukémie	7
4.	Léčba	8
	4.1. Inhibitory tyrozinových kináz	10
5.	Molekulární podstata rezistence vůči léčbě TKI	12
	5.1. Jednobodové mutace v kinázové doméně BCR-ABL1	13
	5.2. Farmakogenetické faktory rezistence	20
6.	Kmenová CML buňka – terapeutické cílení	22
	6.1. Signální dráhy CML křevetvorné buňky	23
	6.2. mikroRNA specifické pro CML	26
7.	Molekulárně genetické monitorování	31
	7.1. Standardizace monitorování MMR.....	33
	7.2. Pokles hladiny BCR-ABL1 časně po zahájení léčby TKI předpovídá průběh onemocnění.....	37
	7.3. Definice a standardizace hluboké molekulární odpovědi	39
	7.4. Výhled na vyšší citlivost a přesnost měření MR.....	42
8.	Závěr	44
9.	Literatura	45
10.	Přílohy	52

1. Abstrakt

Tato práce souhrnně pojednává o přispění molekulárně genetického výzkumu mechanismů rezistence buněk chronické myeloidní leukémie (CML) vůči léčbě inhibitory tyrozinových kináz (TKI) a molekulárně genetického vyšetřování genu BCR-ABL1 ke sledování průběhu nemoci a optimalizaci léčby pacientů s CML. Těmto tématům se v naší laboratoři ve spolupráci s lékaři ÚHKT a dalších hematologických center v ČR a zahraničí věnujeme již přes 10 let.

Zjistili jsme slibné farmakogenetické markery, které mají potenciál již v době diagnózy určit, s jakou pravděpodobností bude u pacientů léčba imatinibem (nejrozšířenější preparát v 1. linii léčby) účinná či selže. Individuální dispozice leukemických buněk přijímat imatinib souvisí s rozvojem rezistence v případě subletálních vnitrobuněčných koncentrací. Nebezpečným mechanismem rezistence CML buněk vůči TKI jsou mutace v kinázové (KD) doméně BCR-ABL1. Vyšetřování mutačního stavu KD BCR-ABL1, který zapříčiňuje rezistenci vůči TKI u zhruba poloviny pacientů se znaky neúčinnosti léčby, přispělo k časné změně léčby aplikováním účinných TKI druhé případně třetí generace, a to i díky znalosti typu mutace. Ukázali jsme, že díky revoluční technologii sekvenování nové generace máme nakročeno ještě k časnějšímu odhalování rozvoje mutací v průběhu léčby a sledování vývoje mutovaných klonů, které umožní zpřesnit a zefektivnit následující léčbu.

Velkou překážku k úplnému vyléčení CML představují samotné leukemické kmenové buňky, především spící formy. Cílení CML kmenových buněk je v současnosti v popředí světového výzkumu. V naší laboratoři se věnujeme studiu konkrétní signální dráhy, kterou v leukemických kmenových buňkách tvoří nefyziologicky funkčně propojené transkripční faktory a microRNA zprostředkované aktivitou BCR-ABL1. CML kmenové buňky jsou vůči léčbě TKI rezistentní a způsobují relaps onemocnění po vynechání léčby i u pacientů, kteří se dlouhodobě nacházejí v hlubokých molekulárních odpovědích i s nedetekovatelnými molekulami transkriptu BCR-ABL1.

V lékařské praxi CML se významně uplatnilo pravidelné vyšetřování hladin transkriptu BCR-ABL1 v periferní krvi. U tohoto prakticky využívaného molekulárně genetického vyšetřování je však neustále co zlepšovat. V rámci ČR a celé Evropy

bylo zásadní harmonizovat a standardizovat kvantitativní stanovení onkogenu BCR-ABL1 mezi laboratořemi pro vydávání výsledků v mezinárodním měřítku. Díky standardizaci a optimalizaci tohoto typu vyšetření jsme mohli společně s dalšími evropskými referenčními laboratořemi definovat měření a hodnocení hluboké molekulární odpovědi, tedy minimální zbytkovou nemoc u CML, což zásadním způsobem přispělo k uskutečnění evropské klinické studie vysazující léčbu TKI u pacientů, kteří se léčili minimálně 3 roky a setrvali v hluboké molekulární odpovědi alespoň 1 rok.

2. Úvod

Molekulární genetice jako nástroji pro výzkum a diagnostiku chronické myeloidní leukémie (CML) se věnuji od října roku 2006, tedy od začátku svého působení v Ústavu hematologie a krevní transfuze v Praze. Mým prvním úkolem bylo studovat mechanismus resistance CML buňky vůči imatinibu zprostředkovaný mutacemi v kinázové doméně onkogenu BCR-ABL1. Bylo tomu totiž 5 let od zavedení cílené biologické léčby namířené vůči aktivitě chimérického proteinu Bcr-Abl. V naší laboratoři se podařilo zavést vyšetřování mutací v BCR-ABL1 ve standardizované formě do lékařské praxe na konci roku 2008. V úzké spolupráci se zahraničními centry v rámci právě probíhajícího řešení projektu EUTOS 2016 (The European Treatment Outcome Study for CML) hledáme racionální způsob uplatnění vysoce citlivého a komplexního vyšetřování BCR-ABL1 mutací pomocí sekvenování nové generace (NGS – Next Generation Sequencing). Tématu pochopení rozvoje mutací v BCR-ABL1 se v naší laboratoři stále intenzivně věnujeme a snažíme se zjistit, zda je možné u pacientů předpovědět jejich náchylnost k rozvoji rezistence již v době diagnózy či časně po zahájení léčby. Zabývali jsme se studiem farmakogenetických faktorů, které jsou důvodem nedostatečných vnitrobuněčných terapeutických dávek inhibitorů tyrozinových kináz (TKI), což umožňuje buňkám přežít a stát se zcela rezistentními vůči léčbě.

Rovněž se podílíme na mezinárodní standardizaci kvantifikace hladin BCR-ABL1 transkriptů, měření a definování hluboké molekulární odpovědi, což jsou klíčová vyšetření v lékařské praxi CML, na jejichž základě lékař hodnotí léčebnou odpověď. Naše laboratoř byla zapojena do mezinárodní klinické studie EURO-SKI

(EUROpean Stop TKI), v rámci které se pacientům, kteří se po několika letech léčby TKI nacházeli v dlouhodobých a stabilních hlubokých molekulárních odpovědích, vynechávala léčba TKI. Centrálně jsme monitorovali zbytkovou nemoc u všech pacientů zařazených do studie v rámci ČR. Dle dosažených výsledků studie se ukazuje, že někteří pacienti s vynechanou léčbou nevykazují známky molekulárního relapsu nemoci.

Zatím se však zdá, že u většiny pacientů, kteří jsou léčeni TKI, přežívají CML kmenové buňky v podobě zbytkové nemoci a jsou vůči léčbě netečné. V některých případech hrozí návrat nemoci s klinickou manifestací rezistence vůči léčbě, což v ojedinělých případech končí fatálním blastickým zvratem neboli blastickou krizí (BC – blast crisis). Věnujeme se charakterizaci genetických a epigenetických faktorů a molekul, které jsou mezi sebou nefyziologicky funkčně propojeny, a charakterizujeme toto propojení, kvůli němuž dochází ke klonálnímu vývoji CML hematopoézy.

Cílem této práce je přehledně pojednat o všech výše zmiňovaných aspektech, na kterých jsem se podílela v posledních 10 letech za obrovské práce a úsilí kvalitního týmu, který se mi podařilo v laboratoři vybudovat.

3. Chronická myeloidní leukémie

CML je příkladem maligního onemocnění, u kterého výzkum v oblasti molekulární biologie, potažmo molekulární genetiky, vedl zásadním způsobem k uplatnění cílené biologické léčby, která zvrátila nepříznivý osud pacientů trpících tímto typem rakoviny. Peter Nowell a David Hungerford v roce 1960 pozorovali u pacientů s CML nepřírozený výskyt krátkého chromosomu, který dle místa objevu získal název Filadelfský chromosom a který se celosvětově označuje jako Ph chromosom (Nowell PC, Hungerford DA Science 1960). Ph chromosom byl následně v roce 1973 charakterizován Janet Rowley, která popsala, že se jedná o chromosom 22, jehož velká část byla recipročně translokována s částí chromosomu 9 (Rowley JD Nature 1973). K prohloubení znalostí o této reciproké translokaci cytogeneticky zapisované jako $t(9;22)(q34.1;q11.2)$ došlo v 80. a 90. letech minulého století, kdy bylo zjištěno, že místa zlomů se tvoří v genech breakpoint cluster region (BCR) lokalizovaném na chromosomu 22 (Groffen J, et al. Cell 1984) a Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1 (ABL1) nacházejícím se na chromosomu 9 (Heisterkamp N;

Nature 1982). Oba geny fúzíjí za vzniku onkogenu BCR-ABL1, který dává vznik chimérickému proteinu s alterovanou aktivitou tyrozin kinázy Abl (Konopka JB, et al. Cell 1984). Netlumená aktivita Bcr-Abl proteinu způsobuje nekontrolovatelnou aktivaci řady cílových kináz, která vede k nepřiměřené proliferaci krvetvorných buněk myeloidní řady, inhibici jejich apoptózy a poškození adheze ke stromatu kostní dřeně. Průběh neléčené CML má 3 fáze; chronická fáze (CP – chronic phase), akcelerovaná fáze (AP – accelerated phase) a blastická krize (BC). Jednotlivé fáze se liší podle procentuálního zastoupení akumulovaných forem nezralých krevních buněk, blastů (unipotentní, jen částečně diferencované buňky krevní řady), v kostní dřeni, odkud jsou vyplavovány do periferní krve a shromažďují se ve slezině. U dvou třetin případů přecházela CP do AP, která následně progredovala až do BC. U třetiny pacientů transformovala CP rovnou do BC. Jen malá část pacientů mohla žít v chronické fázi CML po dobu až 10 let, zatímco u některých pacientů proběhla transformace do AP či BC během několika měsíců. Medián trvání chronické fáze u neléčených pacientů byl 3-5 let, u fáze akcelerované byl medián trvání 3-9 měsíců (Todd RF, et al. Guideline and Case Reviews in Oncology 2015). V blastickém zvratu je kostní dřeň silně infiltrována blasty podobně jako u akutní myeloidní leukémie (AML). Častěji se vyskytuje myeloblastický zvrát CML (70 % ze všech BC), zbytek blastických zvrátů tvoří B-lymfoblasty.

Chronická myeloidní leukémie je poměrně vzácné onemocnění, které tvoří 15-20 % všech případů leukémií. Výskyt onemocnění narůstá s věkem lidí, raritně postihuje děti. Věkový medián diagnózy se udává kolem 65 let (Hehlmann R, et al. Lancet 2007). Podle českého národního onkologického registru byla incidence v České republice dlouhodobě stabilizována na hodnotách 1,1-1,5 osoby na 100 000 obyvatel v poměru mužů a žen 1,06 : 1 (Faber E, Indrák K; kniha Chronická myeloidní leukémie; 1. edice 2010).

4. Léčba

Na přelomu 19. a 20. století se hledal způsob léčby, který by pomohl prodloužit život pacientů s CML. Využívání radioterapie ulevilo pacientům od klinických projevů onemocnění, ale život neprodloužilo. Od začátku 60. let radioterapii postupně nahrazovala cytostatika, konkrétně busulfan (Witts J, et al. BMC 1968). Léčba

busulfanem vylepšovala krevní obraz, ale v kostní dřeni nedocházelo k redukci buněk s Ph chromosomem. Později byl busulfan s nežádoucími účinky, zahrnujícími především nepředvídatelné útlumy krvetvorby a neplodnost, nahrazen hydroxyureou (Hehlmann R, et al. Blood 1994). K významnému oddálení progresu onemocnění a prodloužení života pacientů s CML docházelo od roku 1970 s aplikací interferonu alfa (IFN- α) (Bonifazi F, et al. Leukemia 2001). Ze souhrnů klinických studií je zřejmé, že ve srovnání s aplikováním cytostatik přežívali pacienti léčení IFN- α o 29 měsíců déle (CML Trialists' Collaborative Group, J Natl Cancer Inst 1997). Klinická randomizovaná studie italské skupiny prokázala dvounásobnou pravděpodobnost přežití 10 let (Italian Cooperative Study Group on Chronic Myeloid Leukemia, Blood 1998). IFN- α vedl k dosažení kompletní hematologické odpovědi u 50 až 80 % nemocných, 10 až 40 % pacientů reagovalo velkou cytogenetickou odpovědí, charakterizovanou 1 až 34 % Ph-pozitivních mitóz v kostní dřeni, a 5 až 25 % pacientů dosáhlo kompletní cytogenetickou odpověď (0 % Ph-pozitivních mitóz). Řada prací ukazovala, že IFN- α snižuje expresi cytokinů a zvyšuje expresi adhezivních molekul a histokompatibilních komplexů I. a II. třídy. Interferon alfa obnovuje regulaci apoptózy, napomáhá normalizaci buněčného cyklu, navozuje diferenciaci a proliferaci buněk (de Veer MJ, et al. J of Leuk Biol 2001). Jeho významným a zásadním účinkem je imunomodulace, kterou IFN- α pravděpodobně navozuje prostřednictvím indukce syntézy antagonisty receptoru pro interleukin 1, prostřednictvím fagocytární aktivity makrofágů, stimulací NK-buněk a cytotoxicity lymfocytů sensitivních na účinek IFN- α . V současné době IFN- α zaznamenává renesanci, jelikož se ukazuje, že v kombinaci s léčbou TKI napomáhá dosahování trvalých hlubokých molekulárních odpovědí, a to i po vysazení léčby TKI.

Před érou TKI (tj. před rokem 2001) se v léčbě CML postupovalo tak, že se u nemocných po stanovení diagnózy zahájilo podávání hydroxyurey a současně se vyhledávali vhodní dárci kostní dřeně z řad rodinných příslušníků či jiní nepříbuzní dárci evidovaní v registru dárců kostní dřeně. Pokud dárců nebyl nalezen, byla zahájena léčba IFN- α mnohdy v kombinaci s cytarabinem (Guilhot F, et al. 1997; Kantarjian HM, et al. J Clin Oncol 1999).

Zmiňovaná transplantace krvetvorných buněk (alogenní i autologní) byla před érou TKI léčbou, která umožňovala úplné vyléčení. Alogenní transplantace krvetvorných kmenových buněk (HSCT) je v klinické praxi používána od 70. let 20. století (Goldman JM, Melo JV. N Engl J Med 2001). V současné době, tedy v éře TKI

jako léčby první volby, se transplantace HSCT indikuje zřídka, a to v případech závažné intolerance k TKI preparátům či selhání léčby, kdy je pacient ve vysokém riziku rychlé progresse onemocnění.

4.1. Inhibitory tyrozinových kináz

V současnosti je léčbou první volby podání TKI, které cíleně inhibují aktivitu proteinu Bcr-Abl. V praxi se lékaři drží doporučení NCCN (National Comprehensive Cancer Network, Clinical Practice Guidelines in Oncology), ELN (European LeukemiaNet), ESMO (Evropská společnost klinické onkologie) a ČHS (Česká hematologická společnost). Doporučení vycházejí z výstupů řady mezinárodních klinických studií a publikovaných dat z hematologických center zahrnující podávání TKI první generace imatinibu (Baccarani M, et al. JCO 2009; Baccarani M, et al. Blood 2013; Hochhaus A, et al. Ann Oncol 2008; Hochhaus A, et al. Leukemia, 2009; Druker BJ, et al. N Eng J Med 2006; Zackova D, et al. Am J Hematol 2011) a druhé generace nilotinibu (Kantarjian H, et al. Blood, 2007; Kantarjian H, et al. Lancet Oncol 2011) a dasatinibu (Kantarjian H, et al. N Engl J Med 2010; Hochhaus A, et al. Blood 2007; Cortes J, et al. Blood, 2007). Léčba chronické fáze CML je zpravidla zahájena krátkodobou aplikací hydroxyurey pro dosažení cytoredukce. V případě symptomatické leukocytózy či trombocytózy se aplikuje leukocytaferéza, případně trombocytaferéza, či inhibitor trombopoézy anagrelid. Nejčastěji používaným TKI podávaným v 1. linii je imatinib. Šestnáctiletá klinická praxe ukázala, že podávaná dávka imatinibu 400 mg denně je poměrně dobře tolerovaná. Multicentrická klinická studie IRIS (International Randomized Study of Interferon vs. STI571) zjistila, že odhadované desetileté celkové přežití dosahuje 82,8 % pacientů (Hochhaus A, et al. N Engl J Med 2017). V první linii je možné aplikovat nilotinib 300 mg dvakrát denně nebo dasatinib 100 mg denně. Těmto preparátům je přičítaná indukce rychlejší a hlubší molekulární odpovědi, nicméně jednoznačný důkaz o lepším celkovém výsledku léčby ve srovnání s imatinibem chybí (Baccarani M, et al. Ann Hematol 2015). V praxi se TKI 2. generace v první linii podávají u pacientů s vyšším rizikem, v pokročilých fázích CML nebo u mladších pacientů, kteří mají zpravidla agresivnější průběh onemocnění. Po zahájení léčby TKI je pacient pravidelně monitorován (viz. kapitola 7) a v definovaných časových bodech se dle ELN kritérií hodnotí jeho léčebná odpověď

(Baccarani M, et al. Blood 2013). Při dosahování optimální léčebné odpovědi na nejčastěji podávaný preparát imatinib se pokračuje v podávání ve standardních dávkách. Pokud je odpověď vyhodnocena jako varovná, nebo léčba selhává, je doporučeno denní dávku zvýšit (i když dle nejnovějších poznatků se od tohoto doporučení v současné době opouští), nebo změnit léčbu na TKI 2. generace. Před plánovaným převodem na jiný preparát je nutné provést mutační analýzu kinázové domény (KD) BCR-ABL1 pro podezření na rozvoj rezistence v souvislosti s mutacemi (více viz kapitola 5.1.). Velmi účinnou látkou překonávající klinicky vysoce rezistentní mutaci T315I, vůči které selhává léčba všemi dalšími dostupnými TKI, je ponatinib. Ponatinib je multipotentní TK inhibitor třetí generace, který, jak ukazují první výsledky klinické studie PACE fáze 2, je vysoce účinný u pacientů v chronické fázi, u kterých selhala předchozí léčba imatinibem a následně dasatinibem nebo/a nilotinibem (Cortes JE, et al. N Engl J Med. 2013). Většina pacientů nesla rezistentní mutaci vůči TKI, převážně T315I. U 50 % pacientů v blastickém zvratu ponatinib navodil kompletní hematologickou či velkou cytogenetickou odpověď.

Dalším, novějším preparátem 2. generace je bosutinib, který je možné podávat ve 2. linii z důvodu rezistence vůči léčbě imatinibem, nebo jeho intolerance. Výsledky přežití pacientů léčených bosutinibem ve druhé linii ukazují na celkové přežití po dvou letech u 92 % pacientů a přežití bez progresu u 79 % (Cortes JE, et al. Blood 2011).

Transplantace HSCT se aplikuje i v éře TKI, a to nejčastěji v pokročilých fázích CML, tedy v AP a BC. Podává se TKI často v kombinaci s chemoterapií s cílem dosažení chronické fáze. Následuje transplantace hematopoetických kmenových a progenitorových buněk (HSPC), pokud je proveditelná. Alogenní transplantace je indikována také v případě selhání léčby všech v klinické praxi dostupných TKI.

Důležitým parametrem vedoucím ke změně léčby jsou nežádoucí účinky TKI, které jsou hodnoceny podle CTCAE v.4.0 (National Cancer Institute Common Terminology Criteria for Adverse Events) (<http://ctep.cancer.gov>). Závažné stupně jsou 3-4, na které lékař reaguje snížením dávky TKI nebo dočasným případně i definitivním ukončením léčby konkrétním TKI. Nejčastěji uváděnými nežádoucími účinky při léčbě imatinibem jsou nauzea, zvracení, křeče, myalgie, průjmy, retence tekutin, otoky, neutropenie a anemie. V průběhu léčby nilotinibem si pacienti často stěžují na bolesti hlavy, únavu, nauzeu, kožní vyrážky. Biochemické analýzy mohou zaznamenat zvýšení glykémie, bilirubinu, transamináz, amylázy a trombocytopenie.

Nilotinib může představovat riziko u pacientů s anamnesou pankreatitidy, nutné je také sledovat charakter EKG křivky pro riziko prodloužení QT intervalu (Jabbour E, et al. Leukemia 2011). Nejčastějšími projevy netolerance léčby dasatinibem jsou dušnost, infekce, retence tekutin včetně pleurálních výpotků, únava, bolesti svalů, trombocytopenie a neutropenie (Jabbour E, et al. Leukemia 2011).

5. Molekulární podstata rezistence vůči léčbě TKI

Přes vysokou účinnost léčby CML pomocí TKI existuje skupina pacientů (20-30%), kteří na léčbu neodpoví primárně, anebo rozvinou rezistenci v průběhu léčby. Nejvíce poznatků je shromážděno v souvislosti s rezistencí vůči léčbě imatinibem, preparátem aplikovaným v lékařské praxi jako lék první volby již více jak 10 let. Pacienti, u kterých dojde k rozvoji rezistence v průběhu léčby TKI, jsou ve vysokém riziku rozvoje onemocnění z chronické fáze až do blastického zvratu. Jsou případy, kdy rozvoj blastického zvratu může být velmi rychlý. Důležitým faktorem rezistence vůči léčbě TKI je samotný fakt, že CML kmenové buňky, především spící CML kmenové buňky, na léčbu nereagují. Bylo ukázáno, že imatinib inhibuje růst CML kmenových buněk, ale jen částečně indukuje jejich apoptózu (Holtz MS, et al. Blood 2002). U pacientů dlouhodobě léčených imatinibem, kteří se nacházejí ve velké molekulární odpovědi (MMR) a hlubších molekulárních odpovědích (MR), viz. kapitola 7, bylo zjištěno přetrvávání BCR-ABL1 pozitivních kmenových buněk (Chu S, et al. Blood 2011).

Ke snížení účinnosti až k úplné neúčinnosti léčby TKI může přispívat mnoho faktorů, které můžeme rozčlenit do 5 kategorií dle putování a vstřebávání léku po jeho perorálním užití (Apperley J, et al. Lancet Oncol. 2007):

1. Užívání TKI pacientem

Největší mezinárodní studie testující adherenci 2546 pacientů z 63 zemí poukázala na správné užívání léků dle indikace pouze u 32,7 % pacientů (Geissler J, et al. JCO 2017).

2. Vstřebávání TKI v gastrointestinálním traktu (GIT), interakce s jinou medikací a stravou

Na vstřebávání TKI se podílí míra transportu léčebné látky přes plazmatickou membránu buněk gastrointestinálního traktu. Transport je zpravidla zprostředkován přenašeči z rodiny SLC a ABC (viz. kapitola 5.3.). Účinek léku mohou snižovat jiné preparáty či látky obsažené například v grapefruitové šťávě.

3. *Metabolismus TKI v játrech*

Metabolismus TKI v játrech může být ovlivněn polymorfismy v genech cytochromů s dopadem na jejich funkci.

4. *Koncentrace TKI v plazmě*

Koncentrace TKI v plazmě může být snižena nepříznivým přispěním všech tří výše vyjmenovaných faktorů. Vedle toho se mohou molekuly TKI vázat na řadu proteinů v plazmě, nejvíce na kyselý α 1-glykoprotein.

5. *Leukemické buňky*

Místem účinku TKI jsou CML buňky kostní dřeně. Ke sníženému účinku TKI v leukemických buňkách může přispět hned několik faktorů:

- a) míra přenosu TKI přes plazmatickou membránu buněk směrem dovnitř i ven (SLC a ABC transportéry),
- b) další chromosomální aberace v Ph pozitivních i negativních buňkách,
- c) amplifikace genu BCR-ABL1 způsobující overexpresi genu a nadměrnou produkci Bcr-Abl proteinu,
- d) mutace v kinázové doméně Bcr-Abl, které snižují či znemožňují vazbu TKI k proteinu,
- e) na BCR-ABL1 nezávislé signální transdukce,
- f) spící CML kmenové buňky.

5.1. Jednobodové mutace v kinázové doméně BCR-ABL1

Nejvíce probádaným mechanismem rezistence vůči léčbě TKI jsou jednobodové mutace v KD proteinu Bcr-Abl, kterým se intenzivně věnuje i naše laboratoř. Mutace v KD Bcr-Abl jsou zodpovědné za 30-40 % případů získané rezistence vůči léčbě imatinibem (Jabbour E, et al. *Leukeima* 2006; Quintas-Cardama A, et al. *Cancer control* 2009). V závislosti na tom, která aminokyselinová residua jsou postižena, mohou mutace zapříčinit rezistenci k imatinibu zamezením přístupu preparátu ke kinázové doméně kvůli sterickým překážkám a/nebo eliminací kritických vodíkových

vazeb změnou konformace proteinu, anebo stabilizací aktivní formy kinázy, která není přístupná pro imatinib (La Rosee P, Deininger MW Seminars in hematology 2010). Dosud bylo v souvislosti s rezistencí k imatinibu popsáno okolo 100 typů mutací v KD Bcr-Abl, přičemž v 70 % případů je zaznamenáno 8 nejfrekventovanějších aminokyselinových záměn (Deininger M, et al. Blood 2005). Díky vývoji TKI 2. a 3. generace je možné rezistenci spjatou s mutacemi v KD Bcr-Abl překonávat. Z publikovaných dat z klinických studií či reálné praxe je známé, vůči kterým typům mutací rezistentních k imatinibu jsou účinné preparáty 2. generace dasatinib, nilotinib a bosutinib. Ponatinib je lék 3. generace a jediný účinný TKI vůči panrezistentní mutaci T315I. Odborná konsorcia ELN (Soverini S, et al. Blood 2011) a NCCN (NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology 2013) vydala doporučení o volbě léčby v případě zjištění konkrétního typu mutace.

Vyšetřování přítomnosti a charakterizace typu mutací v KD Bcr-Abl je důležité pro lékařskou praxi s cílem časného převedení léčby na účinný preparát. V lékařské praxi je doporučováno mutace vyšetřovat při podezření na rozvoj rezistence. Jedná se o případy, kdy pacient na léčbu TKI neodpovídá v definovaných časových intervalech optimálně, což je charakterizováno varovnými ukazateli a ztrátou odpovědi v průběhu léčby TKI dle definic ELN (Baccarani M, et al. 2013; Soverini S, et al. Blood 2011). Otázkou zůstává časnost a citlivost vyšetření, přičemž oba faktory spolu přímo souvisí. Z biologického hlediska pracujeme s hypotézou, že časný záchyt mutací, a tedy rozvoje mutovaného klonu, vede k časně změně léčby, účinné eradikaci mutovaného klonu a odvrácení progresu onemocnění.

V naší práci jsme se zabývali studiem raných ukazatelů rozvoje rezistence, které by mohly indikovat vyšetření mutací a jejich časný záchyt (Příloha 1). Zaměřili jsme se na skupinu pacientů (32/140), kteří po léčbě imatinibem dosáhli kompletní cytogenetickou odpověď, ale vykazovali konstantní hladiny BCR-ABL1 transkriptu, které fluktovaly kolem hodnoty 0,1 % BCR-ABL1 po dobu minimálně 6-9 měsíců. Definovali jsme tento stav jako BCR-ABL1 plató, odrážející hodnoty BCR-ABL1, které se lišily v po sobě jdoucích časových odběrech v rámci stanovené variability metody pro kvantifikaci BCR-ABL1 pomocí RT-qPCR (více o monitorování BCR-ABL1 v kapitole 7). Mutace jsme v průběhu BCR-ABL1 plató detekovali a potvrdili v po sobě následujících odběrech u 28 % pacientů (9/32), přičemž 5 z nich později ztratilo cytogenetickou odpověď. Zjistili jsme, že pacienti, kteří vykazovali BCR-ABL1 plató

na hladinách kolem 0,1 %, nedosáhli stabilní MMR a byli ve vysokém riziku ztráty odpovědi spjaté s pomalu rozvíjející se rezistencí vůči léčbě.

Některé práce ukázaly, že 2–5násobný nárůst hladiny BCR-ABL1 byl spjatý s vyšším zachytem mutací, a uvažuje se, že by tento nárůst mohl vést k provedení mutační analýzy (Branford S, et al. Blood 2004; Press RD, et al. Blood 2006). Návrh naráží na fakt, že variabilita metody kvantifikace BCR-ABL1 se liší mezi laboratořemi až o půl řádu (Kantarjian H, et al. Blood 2008). Proto by uvažovaný návrh nemohl být široce uplatněn. Na základě naší práce se domníváme, že BCR-ABL1 plató, tedy fluktuace hladin v rámci variability metody, v minimálně třech po sobě jdoucích časových odběrech by mohl být racionálním indikátorem pro časnou detekci mutací a v případě potvrzené detekce mutace v následujících odběrech k časně změně léčby.

Zlatým standardem pro vyšetřování mutací v KD BCR-ABL1 je klasické Sangerovo sekvenování, které umožňuje analyzovat celou kódující oblast KD ABL1 (~1 kbp). Aby byla sekvenována kódující oblast KD pocházející pouze z fúzního genu BCR-ABL1, je nutné provést PCR ve dvou krocích. V průběhu 1. PCR dochází k namnožení úseku BCR a současně ABL1 nesoucího KD (~1500 bp). V 2. PCR již dochází k amplifikování úseku KD ABL1 z předchozí PCR. Tím dochází k zamezení souběžného amplifikování úseku KD z nefúzovaného ABL1 přítomného v analyzovaných buňkách krve. V opačném případě bychom výrazně snížili citlivost detekce, protože KD nefúzovaného ABL1 není mutovaná. Vedle nejrozšířenější metody Sangerova sekvenování některá pracoviště využívá i jiné technologie zahrnující například denaturační a vysokokapacitní kapalnou chromatografii (DHPLC) (Deininger MW, et al. Leukemia 2004), pyrosekvenování (Khorashad JS, et al. Leukemia 2006), elektroforézu ve dvojitým denaturačním gradientovém gelu (DG-DGGE) (Sorel N, et al. Clin Chem 2005), fluorescenční PCR a tzv. PNA clamping PCR (PNA- Protein Nucleic Acid) (Kreuzer KA, et al. Ann Hematol 2003), alelově specifickou PCR (ASO-PCR) (Roche-Lestienne C, et al. Blood 2002; Willis S, et al. Blood 2005) a hmotnostní spektrofotometrii - technologii SEQUENOM (Vivante A, et al. Leukemia 2007). Uvedené metody vynikají oproti Sangerovu sekvenování rychlostí a ekonomickým provedením skrínungu a/nebo vyšší citlivostí detekce. Nevýhodami těchto technologií je buďto možnost pouhého detekování přítomnosti mutace bez určení typu (př. DHPLC, DG-DGGE) anebo možnost analýzy jen konkrétní mutace nebo úzkého souboru mutací (př. pyrosekvenování, ASO-PCR, Sequenom). My jsme pro účely rychlého skrínungu mutací v KD BCR-ABL1 vyvinuli

postup využívající analýzu křivek teploty tání ve vysokém rozlišení (HRM – high resolution melt curve) (Příloha 2). HRM se používá k charakterizaci PCR amplifikovaných úseků DNA dle teploty tání T_m potřebné k disociaci dvouvláknové DNA do jednovláknové DNA. Pokud je v porovnání s kontrolním vzorkem nesoucím divokou alelu v homozygotní sestavě posun v teplotě tání oproti T_m úseku DNA analyzovaného vzorku, vzorek nese pozměněnou sekvenci ve smyslu výskytu mutace nebo inserce/delece v homozygotní sestavě. Pokud je průběh tvaru křivky T_m odlišný od kontrolního vzorku, analyzovaný vzorek nese pozměněnou sekvenci v heterozygotní sestavě (Herrmann MG, et al. Clin Chem 2006). Ukázali jsme, že HRM umožňuje detekovat mutaci v KD BCR-ABL1 již na hladině 5 % mutovaného BCR-ABL1 transkriptu z celkového množství mRNA BCR-ABL1. V článku jsme popsali uplatnění HRM v reálné praxi. HRM je rychlá a ekonomická skriningová metoda pro odhalení mutací BCR-ABL1 v analyzovaných vzorcích. Pouze pozitivní vzorky následně postupují k detailnější analýze a charakterizaci mutací Sangerovým sekvenováním. Po analýze HRM může být PCR produkt dále zpracován pro sekvenování, jelikož jsme zjistili, že HRM interkalační činidlo v průběhu sekvenování neinterferuje.

Sangerovo sekvenování, nejrozšířenější technologie pro detekci mutací v KD BCR-ABL1, nedokáže identifikovat mutovaný transkript na hladinách nižších než 10-15 %, neumožňuje přesnou kvantifikaci mutace a neodlišuje polyklonální mutace od kompozitních. Další, výše uvedené metody sice citlivější detekci mutací umožňují, ale jejich limitace spočívá především v tom, že nelze charakterizovat jakoukoliv záměnu v celém kódujícím úseku kinázové domény čítající bezmála 1000 nukleotidů. Velký zvrat však přišel s objevením nanotechnologie sekvenování nové generace (NGS-Next Generation Sequencing). NGS sestává z několika desítek tisíc až milionů sekvenančních reakcí v pikolitrových objemech, které současně produkují několik desítek tisíc až milionů čtení či sekvencí, přičemž každá z nich odpovídá jedné, klonálně amplifikované molekule DNA. Tento přístup umožňuje sekvenovat jednu nukleotidovou pozici mnohonásobně, což vede k vysoké citlivosti postupu, který označujeme jako hluboké sekvenování. V úzké spolupráci s Univerzitou Bologna jsme pracovali na projektu zaměřeném na charakterizování spektra minoritních mutovaných variant u pacientů, jejichž léčba v průběhu sledování selhala. Využívali jsme v té době komerčně dostupnou technologii Roche/454 Life Sciences, která byla vhodná pro projekty zaměřené na cílené amplikonové resekvenování. Technologie

umožňovala plně charakterizovat spektrum minoritních variant v analyzované sekvenci, sledovat dynamiku rozvoje rezistentních mutací v čase a rekonstruovat klonální architekturu mutovaných populací v případech mnohočetných mutací vyskytujících se v rámci jednoho amplikonu. Citlivost a reprodukovatelnost hlubokého amplikonového sekvenování s technologií 454 byla dříve ukázána konsorciem IRON (Interlaboratory Robustness of Next-generation sequencing) (Kohlmann A, et al. Leukemia 2011). Naše laboratoř se stala součástí tohoto konsorcia a spolupracovala na zavedení a testování technologie 454 pro detekci a kvantifikaci mutací v KD BCR-ABL1. Využívali jsme páry primerů, které byly navrženy a dodávány IRON konsorciem. Ve spolupráci s Univerzitou v Bologni jsme publikovali práci, ve které jsme pomocí technologie 454 analyzovali 106 vzorků 33 pacientů s CML a Ph+ ALL, kteří v průběhu sekvenční léčby pomocí TKI vykazovali po sobě jdoucí relapsy doprovázené selekcí jedné nebo více mutací rezistentních k aplikovaným TKI (Příloha 3). Jednalo se o vůbec první publikovanou práci popisující aplikování NGS pro detekci mutací v KD BCR-ABL1. Zjistili jsme, že Sangerovo sekvenování chybně klasifikovalo či podhodnocovalo BCR-ABL1 mutační status v 55 % vyšetřených vzorků, u kterých byly detekovány mutace na hladinách 1-15 %. NGS nám navíc umožnilo zjistit poměrně komplexní texturu mutovaných klonů pomocí klonální analýzy vzorků nesoucích mnohočetné mutace. Obraz těchto mutovaných klonů byl v časové ose léčby TKI dosti dynamický. Vysoký stupeň komplexity mutací odhalený NGS poukazuje na to, že konvenční Sangerovo sekvenování může být nedostatečným nástrojem pro analýzu mutací v KD BCR-ABL1, která je součástí terapeutického algoritmu u CML. V naší další společné práci jsme se mimo jiné zaměřili na bioinformatické vyhodnocování sekvencí získaných po hlubokém sekvenování pomocí NGS 454 technologie (Roche Applied Science) (Příloha 4). Pomocí zavedeného hlubokého sekvenování technologií 454 jsme analyzovali kinázovou doménu ABL1 ve vzorcích celkových leukocytů zdravých jedinců. Předpokládali jsme, že jakékoliv jednobodové nukleotidové záměny detekované na velmi nízkých hladinách jsou způsobené chybným zařazováním nukleotidů enzymy používanými v procesu přípravy vzorků pro sekvenování, který zahrnuje reverzní transkripci a dvoukolovou PCR. Zjištěná míra chyb byla mnohem vyšší v případě nukleotidových tranzic (výměna purinové báze za purinovou bázi, pyrimidinové za pyrimidinovou) než v případě nukleotidových transverzí (výměna purinové báze za pyrimidinovou a opačně). Stejně zkušenosti ukázaly i jiné práce (Campbell PF, et al.

PNAS 2008; Grossmann V, et al. J Mol Diagn 2013). Navíc jsme zjistili, že frekvence chyb je v průměru dvojnásobně vyšší po provedení dvoukolové PCR v porovnání s provedením jedné PCR. Také jsme přišli na to, že frekvence chyb je ovlivněná délkou sekvenovaného PCR produktu. Na základě těchto experimentálních zjištění jsme odvodili a optimalizovali bioinformatický algoritmus umožňující korigovat variabilitu a chybovost laboratorního postupu analýzy a odlišit skutečné varianty vyskytující se v analyzovaném vzorku v nízkých hladinách od pozadí chyb. Mnoho prací aplikuje hladinu mutací 1 % jako hranici pro spolehlivé vyjádření výsledku mutační analýzy pomocí hlubokého NGS. Ukázali jsme, že tato hranice nemusí být pro veškeré analýzy mutací v různých cílových sekvencích genů obecně spolehlivá a aplikovatelná. V průběhu několikastupňové přípravy vzorků pro samotné sekvenování na přístroji NGS může docházet s různou frekvencí k tvorbě chyb, což může být ovlivněno neznámými faktory, které náhodně vyvstanou v průběhu analýzy. Proto je vhodné bioinformatický algoritmus aplikovat pro hodnocení sekvencí po hluboké NGS analýze. Bioinformatický algoritmus, který v naší práci detailně popisujeme, jsme aplikovali pro hodnocení dat NGS analýzy 135 vzorků 15 pacientů s CML v chronické fázi, kteří v průběhu léčby TKI vyvinuli mutace. Potvrdili jsme, že NGS umožňuje detekovat mutace v KD BCR-ABL1 časněji, konkrétně o 2-11 měsíců dříve než klasické Sangerovo sekvenování. V návaznosti na naši předchozí práci (Příloha 1) jsme zjistili, že v případech pacientů, u nichž selhala léčba imatinibem, byly mutace přítomny již v době velké molekulární odpovědi. Identifikovali jsme komplexní spektrum pozvolně expandujících mutací v průběhu fluktuace hladiny BCR-ABL1 kolem hranice 0,1 %, což jsme označili jako BCR-ABL1 plató či nestabilní MMR. NGS rovněž umožnilo odhalit mutace, které expandovaly v průběhu léčby TKI ve druhé linii, již před změnou léčby první linie. Zjistili jsme, že kompozitní mutace se vyskytují v chronické fázi CML velmi vzácně a pouze v minoritním zastoupení. U žádného z pacientů, kteří v průběhu léčby TKI vyvinuli klinicky rezistentní BCR-ABL1 mutace, nebyly mutace v době diagnózy pomocí hlubokého sekvenování detekovány.

Příkladem úspěšné aplikace NGS pro vyšetření mutací v KD BCR-ABL1 v reálné praxi představuje práce na souboru 6 pacientů, kteří byli léčeni individuálním přístupem (Příloha 5). Jednalo se o pacienty, u nichž selhala léčba na aplikovaných TKI v první a druhé linii kvůli vysoce rezistentní mutaci T315I a dalším vícečetným rezistentním mutacím. V takových případech je doporučováno pacienty

transplantovat, nebo je indikována léčba ponatinibem. Těchto 6 pacientů nebylo možné transplantovat z různých důvodů (např. multilékově rezistentní tuberkulóza) a v daném období nebyl ponatinib k dispozici. U těchto pacientů se přistoupilo k alternativní individualizované strategii léčby s IFN- α , který byl aplikován po selhání léčby TKI sólo, sekvenčně, nebo současně s TKI. Vycházeli jsme z předpokladu, že IFN- α terapeuticky působí zcela odlišně a může vést k potlačení mutovaného klonu. V průběhu této individualizované terapie bylo pro detekci mutací aplikováno NGS, což umožnilo měnit léčbu dle aktuálního mutačního statusu. Zjistili jsme, že aplikovaný individualizovaný léčebný přístup s uplatněním IFN- α vedl k potlačení mutovaného klonu T315I a kompozitních mutací, které byly identifikovány NGS, na nedetekovatelné hladiny, což bylo doprovázeno dosažením molekulárních odpovědí u 4 z 6 pacientů. Svou úlohu sehrála vlastní imunitní odpověď pacientů vyvolaná léčbou dasatinibem, která byla následně ještě umocněna IFN- α , což jsme vyzorovali díky imunoprofilování.

Nejen v těchto specifických případech individualizované léčby u vysoce rizikových pacientů s rezistentními klony vůči TKI a dalšími komorbiditami má velmi citlivé vyšetřování mutací v KD BCR-ABL1 své opodstatnění. NGS má velký potenciál poskytovat cenné informace o klonálním vývoji onemocnění v průběhu léčby TKI a lékař může včas intervenovat změnou léčebného protokolu a efektivně předejít případné progresi. Zcela určitě se jedná o sekvenační technologii budoucnosti, protože s vývojem a zlepšováním NGS bude Sangerovo sekvenování brzy v ústraní zájmu.

NGS může být aplikováno pro vyšetřování mutací v KD BCR-ABL1 dle indikace pro mutační analýzy, tak jak je doporučováno ELN (Soverini S, et al. Blood 2011). Chybí však komplexní studie či prospektivní sledování, které by jednoznačně zjistily prospěšnost a racionální aplikaci vysoce citlivé detekce mutací v KD BCR-ABL1 v určitých případech. Otázkou zůstává, zda by lékař měl reagovat změnou léčby již při záchytu mutace na nízkých hladinách, např. 1 %, zda je relevantní vyšetřovat NGS mutace v době nestabilní MMR, tedy BCR-ABL1 plató, atp. Na tyto otázky by měl odpovědět mezinárodní projekt EUTOS 2016, který v současnosti řeší konsorcium 11 evropských center včetně naší laboratoře.

5.2. Farmakogenetické faktory rezistence

Polymorfismy v kódujících oblastech genů transmembránových proteinů mohou modifikovat jejich funkci nebo pozměnit jejich strukturu s dopadem na jejich aktivitu. Naproti tomu je míra tvorby transportérů dána expresí příslušných genů, která může být významně ovlivněna polymorfismy v regulačních nekódujících oblastech genů, především v promotorech. Takové polymorfismy mohou mít dopad na distribuci léků, jejich hladinu v cílových buňkách a v konečném důsledku na výslednou odpověď na léčbu. Promotory ABC a SLC genů jsou vysoce polymorfní. Ve 107 promotorech těchto genů bylo u zdravých jedinců různých etnik identifikováno více jak 500 polymorfismů (Hesselson SE, et al PlosONE 2009).

Naše práce se vůbec jako první věnovala studiu jednonukleotidových polymorfismů (SNP – Single Nucleotide Polymorphism) v promotorech genů transmembránových proteinů v souvislosti s lékovou rezistencí (Příloha 6). Pomocí NGS jsme na souboru 83 pacientů vyšetřili promotory 19 SLC a ABC genů kódujících transportéry s anotovanou funkcí lékových přenašečů s cílem vysledovat SNP, která by mohla ovlivňovat odpověď na léčbu imatinibem. Pacienti museli splňovat kritéria zahrnující 1) léčbu imatinibem v první linii, 2) dobrou adherenci a 3) standardizovaná a validovaná molekulární a klinická data. Důraz byl kladen na to, aby byly sledované skupiny pacientů s optimální a neoptimální odpovědí na léčbu srovnatelně velké pro statistické hodnocení. Odpověď na léčbu imatinibem byla klasifikována dle ELN doporučení (Baccarani M, et al. Blood 2013) a hodnocena ve 12. měsíci léčby jako optimální při dosažení MMR a hladin nižších než 0,1 % BCR-ABL1 IS (40 pacientů) a neoptimální, pokud hladiny BCR-ABL1 byly vyšší jak 0,1 % IS nebo při jakémkoliv nenulovém počtu Ph+ metafází v kostní dřeni (43 pacientů).

Celkově bylo detekováno 95 SNP a díky Fisherově testu pravděpodobnosti jsme identifikovali SNP významně související s odpovědí na léčbu imatinibem. Jednalo se o 2 SNP, která jsou vzájemně ve vysoké vazebné nerovnováze (linkage disequilibrium – LD) v promotoru SLC22A4 (rs460089 G/C a rs460271 G/C; dále již jen SNP rs460089 díky identickým výsledkům s rs460271). Frekvence genotypů GG obou SNP byla signifikantně vyšší u pacientů s neoptimální odpovědí ve 12. měsíci léčby imatinibem, zatímco heterozygotní sestavy alel GC se vyskytovaly častěji u pacientů s optimální odpovědí. Stejně rozložení frekvencí těchto genotypů bylo pozorováno i u dalších 46 pacientů (optimální odpověď – 32; neoptimální odpověď –

14), kteří mohli být dle stejných kritérií uvedených výše zařazeni v průběhu řešení projektu ve spolupráci s FN Hradec Králové. Na celkovém souboru 129 pacientů jsme zjistili, že rs460089-GC genotyp je významně spjatý s kratším halving time počítaným v 6. měsíci od zahájení léčby imatinibem na rozdíl od rs460089-GG genotypu ($P < 0,0001$) a také s vyšším kumulativním dosažením stabilní MMR ($P = 0,0013$) a přežitím bez události (EFS; $P = 0,0002$). Halving time je definovaný jako míra změny hladiny BCR-ABL1 od diagnózy v 1., 2. a 3. měsíci od zahájení léčby imatinibem, která se odhadovala jako počet dní potřebných na to, aby došlo k redukci BCR-ABL1 o polovinu (Branford S, et al. Blood 2014). Multivariátní analýzy poskytly informaci, že rs460089 představuje nezávislý parametr, který významně předpovídá průběh onemocnění, respektive odpověď v průběhu léčby imatinibem.

Pomocí statistických analýz jsme navíc zjistili, že u pacientů nesoucích genotyp SNP rs2631365-TC (SLC22A5), kterých bylo 56/129, byl zjištěn významný rozdíl ve frekvencích zastoupení rs460089-GC a rs460089-GG genotypů, což bylo spojeno v prvním případě s jejich optimální a v druhém případě neoptimální odpovědí na imatinib po 12 měsících léčby. Rozdíl v kumulativním dosažení MMR ($P < 0,0001$) a pravděpodobnosti EFS ($P < 0,0001$) byl ještě výraznější u pacientů s kombinací genotypů rs460089-GC_rs2631365-TC v porovnání s pacienty nesoucích rs460089-GG_rs2631365-TC.

Díky genetickým a bioinformatickým analýzám jsme zjistili, že lokusy rs460089 a rs2631365 jsou ve významné vazebné nerovnováze s 12 regulačními SNP, nacházejícími se v intronech obou genů (SLC22A4 a SLC22A5), které ovlivňují expresi obou transportérů s popsanou funkcí přenosu imatinibu. Pro testování hypotézy, že genotypy mají vliv na expresi obou transportérů, nebylo možné jednoduše změřit genovou expresi obou transportérů u pacientů s různým genotypem. Z dostupných informací z databáze Regulome DB totiž víme, že regulační oblasti ovlivňují expresi obou genů v závislosti na typu krevních buněk. U studovaných pacientů jsme měli k dispozici pouze celkové leukocyty a výsledky by byly v podstatě nějakou průměrnou změřenou hodnotou mixu různých typů zralých buněk. Proto jsme pracovali s 8 různými buněčnými liniemi, u kterých jsme analyzovali SNP rs460089 a rs2631365 a rovněž genovou expresi SLC22A4 a SLC22A5. U všech buněčných linií jsme zjistili expresi SLC22A4 významně nižší než SLC22A5 ($P = 0,02$). Čtyři testované linie, které nesly genotyp rs460089-GG, a b. linie CML-T1 a MAVER-1 s genotypem rs460089-GC vykazovaly hladinu mRNA

SLC22A5 nižší v porovnání s liniemi JURKAT a RAMOS nesoucími rs460089-GC. CML b. linie KCL-22 a SUP-B15, které nesly kombinaci genotypů rs460089-GG_rs2631365-TC, exprimovaly SLC22A5 markantně méně než linie RAMOS, JURKAT a MAVER-1 s kombinací genotypů rs460089-GC_rs2631365-TC. Tyto výsledky jsou nástinem potenciálního dopadu genotypů studovaných SNP na expresi transportérů a intracelulární koncentraci imatinibu, což bude nutné potvrdit technicky náročnými experimenty *in vitro*.

Domníváme se, že SNP rs460089 a rs2631365 představují genetické markery, které mohou predikovat odpověď na léčbu imatinibem u pacientů s CML v době diagnózy (Příloha 6). Tyto velmi slibné genetické markery a jejich možné uplatnění v lékařské praxi pro předpověď pravděpodobnosti odpovědi na léčbu imatinibem v 1. linii jsou nyní ověřovány v rámci mezinárodní spolupráce s pracovišti Skandinávských zemí, Velké Británie, Německa a Francie. Dle prvních výsledků analyzovaných 99 pacientů ze studie EURO-SKI, u kterých mohla být vysazena léčba díky optimální odpovědi po léčbě imatinibem a dosažení hlubokých molekulárních odpovědí, frekvence 34,4 % kombinace genotypů rs460089-GC_rs2631365-TC odpovídala frekvenci 37,5 % u pacientů optimálně odpovídajících v původní práci (Příloha 6). Nepříznivý genotyp pro dosažení optimální odpovědi rs460089-GG_rs2631365-TC se u EURO-SKI pacientů vyskytoval minoritně s frekvencí 10,1 %, obdobně jako u pacientů optimálně odpovídajících na léčbu imatinibem v úvodní práci s frekvencí 8,3 %.

6. Kmenová CML buňka – terapeutické cílení

Dosud nebylo objasněno, zda je reciproká transformace chromosomů 9 a 22 počáteční poruchou krvetvorné kmenové buňky, nebo zda této aberaci předcházejí jiná genetická a epigenetická poškození způsobující nestabilitu genomu, která dosud nebyla odhalena. Přes jednotící faktor BCR-ABL1 a vysoce účinnou léčbu je CML heterogenní onemocnění. U některých pacientů se vyvíjejí mutace před nebo po formaci BCR-ABL1, mohou se objevovat poruchy specifikace liniového vývoje buněk, klonální hematopoéza, poškození DNA, aktivace zánětlivých odpovědí a epigenetické změny, tedy změny v hematopoéze, které nastávají v průběhu procesu stárnutí (Holyoake TL, Vetrie D Blood 2017). U CML pacientů bývají v Ph negativních buňkách přítomné jiné cytogenetické abnormality. Také u pacientů po úspěšné léčbě

CML a redukcí až nedetekovatelnosti BCR-ABL1 pozitivních buněk byly identifikovány klonální změny v Ph negativních populacích (+8, monosomie 7, -Y, apod.). To naznačuje jakousi předcházející náchylnost ke genomické nestabilitě v populaci buněk bez Ph chromosomu. Dle výpočtů a hypotézy Fialkova (Blood 1981) je populace Ph pozitivních buněk klonální. Zatím žádné výsledky tuto hypotézu nevyvrátily. Přestože je CML již několik desetiletí považováno za onemocnění hematopoetických kmenových a progenitorových buněk (HSPC), které dávají vznik liniím myeloidních a lymfoidních buněk, je charakteristika CML HSPC (dále označeno jako LSC – Leukemic Stem Cells) neúplná a je obtížné nalézt správný cíl léčebné strategie, který by společně s TKI umožnil LSC zcela eradikovat, a to bezpečně bez poškození normálních HSPC. Jak již bylo zmíněno výše, CML kmenové buňky, především spící LSC, ale i časné progenitorové buňky přežívají v přítomnosti TKI, tedy i po zablokování aktivity BCR-ABL1. Využívají k tomu, podobně jako normální kmenové buňky, molekulární mechanismy, které zajišťují přežití a sebeobnovu, a také ochranu mikroprostředím kostní dřeně, avšak regulace, a tedy i kontrola těchto mechanismů je u LSC poškozená (Jamieson CH, et al. N Eng J Med 2004).

V typické kohortě 100 pacientů v chronické fázi CML, kteří užívají TKI více jak 5 let, budou u jedné třetiny z nich přetrvávat LSC. K tomuto fenotypu pravděpodobně přispívá i uplatnění protirůstového efektu TKI na CML CD34+ buňky a LSC, který indukuje klidový stav buněk, a také změny v signálních drahách, které zajišťují jejich přežití (Holyoake TL, Vetrie D Blood 2017). Přežití LSC je pravděpodobně nezávislé na aktivitě Bcr-Abl kinázy a uvažuje se, že Bcr-Abl může mít i nekinázovou funkci, která zprostředkuje modifikaci signálních drah zajišťujících přežití LSC (Hamilton A, et al. Blood 2012).

6.1. Signální dráhy CML krvetvorné buňky

Je známo několik mechanismů a signálních drah, které charakterizují fenotyp CML LSC s potenciálem pro terapeutické cílení (shrnutí v Holyoake TL, Vetrie D Blood 2017). BCR-ABL1 zvyšuje aktivitu **signální dráhy fosfatidylinositol 3-kinázy (PI3K/AKT)** a fosforylaci transkripčních faktorů FOXO, kterou zprostředkovává AKT. Fosforylované FOXO jsou z jadra re-lokalizovány do cytoplazmy, kde se stávají neaktivními. TKI inaktivují Bcr-Abl s dopadem na downregulaci PI3K/AKT signální

dráhy v LSC, což vede k re-lokalizaci FOXO1 a FOXO3a z cytoplazmy do jádra, kde ovlivňují expresi CCND1, ATM, CDKN1C a BCL6 způsobující zastavení buněčného cyklu v G1 fázi, což má v konečném důsledku proti apoptotický projev v LSC. Několik prací poukazuje na to, že **Hedgehog signální dráha** zajišťuje proces sebeobnovy a růstu LSC, kde je klíčovým zprostředkovatelem interakcí SMO (Smoothed – G protein-coupled receptor). Samotná léčba prostřednictvím TKI neblokuje tuto dráhu. Zdá se, že Hedgehog dráha je nezávislá na aktivitě kináz. Avšak delece SMO nebo inhibice proteinu v myším modelu CML blokovala Hedgehog signální dráhu s dopadem na eliminaci LSC.

Beta-catenin je centrálním mediátorem **kanonické a nekanonické signální dráhy Wnt**. Jaderný beta-catenin je potřebný pro sebeobnovu a přežití normálních HSPC, a tedy i LSC. Ztráta beta-cateninu v myším modelu CML narušuje vývoj onemocnění kvůli inhibici procesu sebeobnovy. Genetická a farmakologická inhibice aktivity beta-cateninu synergisticky s TKI navozují apoptózu LSC. U LSC se v zásadě uplatňuje několik alternativních signálních drah regulovaných Wnt. TKI způsobuje translokaci beta-cateninu do jádra a aktivaci cílových genů Wnt zahrnujících NOTCH a c-MYC. TKI indukují i ne-kanonickou signální dráhu Wnt prostřednictvím NFAT signalizace, což v konečném důsledku snižuje produkci cytokinu interleukinu 4 (IL-4), který je důležitý pro přežití buněk. V práci našich kolegů (Toman O, et al. Oncol Rep 2016), na které jsme participovali, bylo zjištěno, že k imatinibu rezistentní buněčná linie CML-T1/IR nesoucí BCR-ABL1 mutaci Y253H, neexprimuje NFAT, a to na rozdíl od mateřské CML-T1, b. linie myeloidního blastického zvratu CML, ze které byla CML-T1/IR odvozena. Kolegové poukázali na to, že CaMKII/Ca²⁺/NFAT Wnt signální dráha je u CML-T1/IR potlačena. Otázkou zůstává, zda by mohlo díky potlačení NFAT docházet v CML-T1/IR kultuře k vyplavování IL-4, který by buňkám zajišťoval přežívání.

Rodina kináz Janus je důležitá pro signální transdukcí zprostředkovanou cytokiny přes **JAK/STAT signální dráhu**. Primární buňky CML i CML buněčné linie mají aktivovanou STAT5 kinázu, která je translokována do jádra, kde reguluje transkripci. Izoforma STAT5a nesoucí jednobodovou mutaci spojenou s úplnou ztrátou funkce proteinu snižuje rozvoj onemocnění podobného CML v myším modelu, zatímco úplné vyřazení genu STAT5 znemožňuje formování kolonií z buněk CML pacientů. Snížení aktivity JAK2 v lidských a myších buněčných liniích potlačuje Bcr-Abl a STAT5 signalizaci a inhibice JAK2 ruxolitinihem vede ke ztrátě LSC *in vitro* i *in*

vivo. To naznačuje, že JAK2 je upstreamový prostředník JAK/STAT signální kaskády v CML LSC, avšak není klíčový pro rozvoj CML onemocnění, jelikož BCR-ABL1 je přímým aktivátorem STAT5.

Přestože byly tyto výše uvedené molekulární dráhy studovány údajně jako primárně vnitrobuněčné či buněčně autonomní, je pravděpodobné, že některé, ne-li všechny, jsou regulovány prostřednictvím interakcí mezi CML LSC a mikroprostředím kostní dřeně. Řada z těchto interakcí byla identifikována a některé způsobují rezistenci k TKI (souhrnně podává tabulka v Holyoake TL, Vetrie D Blood 2017).

S největší pravděpodobností se CML kmenové buňky nacházejí v populaci buněk kostní dřeně exprimující buněčný povrchový marker CD34 za současného negativního signálu CD38 a liniově specifických markerů zralých buněk Lin (označované CD34+CD38-Lin-). V předešlých několika letech se výzkum dosti věnoval charakterizaci buněčných povrchových markerů, které by ve frakci CD34+CD38 – HSPC buněk identifikovaly jen ty, které nesou BCR-ABL1 onkogen. CML LSC buňky na svém povrchu exprimují markery CD25 (IL-2RA), CD26 (DDPIV), CD33 (Siglec-3), CD44 (Pgp-1), CD47 (IAP), CD52 (Campath-1), CD90 (Thy-1), CD114 (G-CSFR), CD117 (KIT/SCFR), CD133 (AC133), CD184 (CXCR4) a IL-1RAP (shrnuto ve Valent P, et al. Eur J Clin Invest 2014). Z těchto markerů je pouze CD26 výhradně exprimován u BCR-ABL1 pozitivních LSC (Herrmann H, et al. Blood 2014). Ostatní z výše uvedených markerů se vyskytují na povrchu AML LSC nebo/a normálních HSPC. CD26 je enzym, který reguluje metabolismus cytokinů v niche hematopoetických kmenových buněk. Proteolyticky degraduje různé ligandy cytokinů zahrnující interleukin-3 (IL-3), faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů (GM-CSF) a SDF-1 (Christopherson KW, et al. Exp Hematol 2006; Campbell TB, et al. Stem Cells Dev 2007; Broxmeyer HE, et al. Nat Med 2012). CD26 je velice nadějným markerem, jehož míra exprese v LSC v době diagnózy CML by mohla mít prediktivní dopad na průběh nemoci, a to v kombinaci s markery CD25 a IL-1RAP (Herrmann H, et al. Blood 2014). CD26 je rovněž zajímavým terapeutickým cílem gliptinů (inhibitorů DDPIV), které se podávají při léčbě cukrovky typu 2. Čerstvá data ukazují, že gliptiny potlačují aktivitu CD26 v primárních CML LSC. Kombinovaná léčba TKI a gliptinů je v současné době studována v rámci klinických studií.

6.2. mikroRNA specifické pro CML

Epigenetické faktory zapojené v CML LSC zahrnují regulační mechanismy genové exprese, tedy DNA methylace a kovalentní post-translační modifikace histonů, které vedou ke změnám v prostupnosti chromatinu pro regulaci mRNA transkripce (shrnuto v Machova Polakova K, et al. *Curr Hematol Malig Rep* 2013). Mechanismy zprostředkované krátkými nekódujícími RNA (microRNA - miRs; siRNA) specifickými pro tlumení mRNA na post-transkripční úrovni jsou rovněž považovány za velmi účinné faktory ovlivňující expresní profily a fenotypové projevy CML. MikroRNA kontrolují tisíce mRNA genů a tím pádem rovněž široké spektrum fyziologických a patofyziologických událostí v normální a rakovinové buňce.

Ve studiu úlohy miRNA u chronické myeloidní leukémie se snažíme zodpovědět důležité otázky: 1) jaký je miRNA profil specifický pro CML, 2) které miRNA mohou cílit BCR-ABL1, 3) existují miRNA, které jsou deregulovány prostřednictvím Bcr-Abl, 4) lze CML specifické miRNA terapeuticky cílit? Naše práce (Příloha 7), a práce dalších (př. Agirre X, et al. *Mol Cancer Res* 2008; Flamant S, et al. *Haematologica* 2010) názorně ukázaly expresi maturovaných mikroRNA typických pro CML buňky. Přestože byly použity různé buněčné populace krevních buněk, jiné přístrojové platformy a postupy pro měření expresních profilů miRNA, zjištěné hladiny miRNA vždy jednoznačně odlišovaly jak CML od zdravých kontrol, tak různé definované fáze CML mezi sebou a pacienty s optimální odpovědí na TKI od pacientů se selháním léčby. Expresní profily založené na hladinách zralých miRNA rovněž odrážejí transformaci z chronické do akcelerované fáze či blastického zvratu CML. Přes to, že se práce mezi sebou odlišují v analýzách ať již v použití typu buněk, metod nebo přístrojů, existují shodné profily specifických mikroRNA, které mohou být pro CML klíčové a stojí za pozornost je blíže studovat.

V naší práci (Příloha 7) jsme aplikovali miRNA array pro charakterizaci mikroRNA s odlišnou hladinou v celkových leukocytech periferní krve pacientů s CML v různých fázích onemocnění, zahrnujících diagnózu, velkou molekulární odpověď, selhání léčby, hematologický relaps a blastický zvrát, v porovnání s přirozenou hladinou v leukocytech zdravých jedinců. Hierarchické klastrování na základě expresních profilů 49 detekovaných miRNA jednoznačně separovalo období diagnózy, hematologického relapsu a blastického zvratu, u kterých v periferní krvi převládají CML leukocyty, od pacientů s optimální odpovědí a pacientů se selháním

léčby, u kterých převládají v periferní krvi normální leukocyty (optimální odpověď) nebo se jedná o větší či menší mix normálních a CML leukocytů (selhání léčby). MikroRNA s největším rozdílem v hladinách mezi CML a zdravou kontrolou (n=17) byly vybrány pro validaci exprese pomocí miRNA specifické real-time qPCR. MikroRNA miR-19a, miR-19b, miR-17, miR-20a, miR-92a, miR-221, miR-222, miR-126, miR-146a, miR-181a, miR-181b, let7c a miR-155 byly v blastickém zvratu silně upregulované zatímco miR-103, miR-150, miR-451 a miR-144 byly silně downregulované. Pro tyto mikroRNA asociované s CML jsme pomocí bioinformatického nástroje DAVID zjišťovali biologické funkce předpovězených cílových genů těchto mikroRNA splňující kritérium vysoce konzervovaných oblastí a vysokou hodnotu P_{CT} (P_{CT} hodnoty vyjadřují, s jakou pravděpodobností jsou předpovězené sekvence cílových genů konzervované pro vazbu konkrétní miRNA). Proteiny kódované geny, které jsou s největší pravděpodobností cíli těchto mikroRNA, plní funkci především v regulaci transkripce, fosforylaci aminokyselin, regulaci RNA metabolických procesů, v regulaci apoptózy i profilerace buněk a v transportu proteinů. Několik proteinů se účastní krve tvorby nebo tvorby lymfoidních orgánů. Pomocí databáze KEGG (Kanehisa M, et al. Nucleic Acids Res 2010) jsme analyzovali signální dráhy, v kterých jsou signifikantně ($P < 0,0001$) zapojeny cílové proteiny, jejichž exprese je na úrovni genů regulována zjištěnými miRNA. Jednalo se o signální dráhy endocytózy, mTOR, Hedgehog, fokální adheze a Wnt. Rovněž jsme zjistili predikované cíle, které jsou zahrnuty v signálních drahách CML. Většina z nich je součástí MAPK, p53 a cyklin dependentních drah (cyklin D1 a CDK6).

Největší rozdíl jsme pozorovali v případě miR-150, jejíž signifikantně nízké hladiny byly zjištěny v blastickém zvratu, diagnóze a hematologickém relapsu. Proto jsme hladiny miR-150 validovali na kohortě čítající 70 pacientů. Potvrdili jsme signifikantně nízké hladiny u pacientů v diagnóze a progredovaných fázích onemocnění. Navíc hladiny miR-150 negativně korelovaly s expresí BCR-ABL1 a transkripčního faktoru MYB na hladině významnosti. MYB je předpokládaný a funkčně validovaný cíl miR-150. Testovali jsme, zda BCR-ABL1 může regulovat expresi miR-150, a inkubovali jsme buněčnou kulturu CML linie MOLM-7 s imatinibem. Pozorovali jsme, že po snížení aktivity BCR-ABL1 došlo k výraznému zvýšení hladiny miR-150. Naše data naznačují, že prostřednictvím aktivity BCR-ABL1 je potlačena exprese miR-150 s dopadem na overexpresi MYB, která není miR-150 dostatečně tlumená.

Také další autoři ve svých pracích zjistili zcela shodně, že miR-150 je významně snižená v CML buňkách, ať jsou to celkové leukocyty periferní krve, izolované mononukleární buňky či CD34+ buňky v době diagnózy a progredovaných fázích onemocnění (Agirre X, et al. *Mol Cancer Res* 2008; Flamant S, et al. *Haematologica* 2010). Můžeme tedy říci, že jedním z typických znaků CML jsou nefyziologické nízké hladiny miR-150. Proto jsme se rozhodli dále zkoumat mechanismus downregulace exprese miR-150 a jeho funkční dopad v hematopoéze CML.

V práci, která je nyní v revizním řízení v odborném časopise (Příloha 8) jsme se zaměřili na prostudování mechanismu potlačení tvorby miR-150 a dopadu na formaci maligní sítě molekulárních interakcí v CML buňce. Inverzní hladiny miR-150 a MYB u CML, které jsme zjistili v předchozí práci (Příloha 7), a předpokládané řízení potlačení exprese miR-150 prostřednictvím BCR-ABL1 mohou být znakem patogeneze CML buňky a také souviset s progresí do blastického zvratu. Blastický zvrát v CML reprezentuje transformaci nemoci se znaky akutní leukémie. Bylo popsáno, že MYB je upstream faktorem agresivity AML, který pozitivně reguluje miR-155. MiR-155 inhibuje tumor supresorový a pro-diferenciační faktor PU.1 (Lidonnici MR, et al. *Blood* 2008). MYB přímo aktivuje onkogenní transkripční faktor MYC ve virem indukovaných myších myeloidních leukemických buňkách (Vigorito E, et al. *Immunity* 2007). MYC a jeho vazebný partner MAX přímo váží BCR promotor a zvyšují regulaci exprese BCR-ABL1 (Wolff L, et al. *Blood cells, molecules & diseases* 2001). Pracovali jsme s hypotézou, že u CML existuje funkční propojení mezi miR-150, MYC a BCR-ABL1 a mechanismem zprostředkovaným molekulární drahou MYB/miR-155/PU.1, která je uplatněná v patogenezi AML. Předpokládali jsme, že toto funkční propojení může v CML buňkách umožnit rozvoj rezistence vůči TKI a transformaci do blastického zvratu.

Nejdříve jsme se zaměřili na stanovení hladin exprese studovaných molekul v sortovaných (dle exprese povrchových markerů CD34 a CD38) subpopulacích buněk kostní dřeně pacientů s CML v chronické fázi v porovnání s mononukleárními buňkami (izolovanými dle exprese povrchového markeru CD34) z dostupného materiálu periferní krve zdravých jedinců (PBMNC). Potvrdili jsme očekávané, významně snížené hladiny miR-150 v CML LSC v porovnání se zdravými kontrolami. Hladiny miR-150 významně inverzně korelovaly s hladinami MYB, MYC a BCR-ABL1, přičemž hladina MYC byla v CML LSC v porovnání s buňkami zdravých jedinců signifikantně zvýšena. Zjistili jsme signifikantně zvýšené hladiny miR-155 u

CD34+ LSC, zatímco hladiny diferenciačního transkripčního faktoru PU.1, který je předpokládaným cílem miR-155, byly významně sniženy v porovnání s CD34+ buňkami zdravých jedinců.

Zaměřili jsme se na testování hypotézy, že miR-150 je downregulována prostřednictvím Bcr-Abl, což má dopad na nedostatečné potlačení exprese MYB v průběhu krvetvorby vycházející z CML LSC. *In vitro* jsme v CML buněčných liniích K562 a KCL-22 zvyšovali hladinu miR-150 a inhibovali aktivitu a/nebo expresi BCR-ABL1 a MYB. Naše data poukazují na to, že exprese MYB je u CML modifikována aktivitou Bcr-Abl a sníženou hladinou miR-150 v pozitivním kombinačním efektu, zatímco samotná exprese miR-150 je potlačena pouze prostřednictvím Bcr-Abl. Naopak, potlačení exprese MYB nevedlo k jednoznačnému snížení Bcr-Abl aktivity.

Dle výsledků měření exprese a na základě publikované práce, která popsala represi exprese miR-150 prostřednictvím MYC na buněčném modelu lidských B buněk (Chang TC, et al. Nat Genet. 2008), jsme se zaměřili na identifikaci vazebného místa MYC proteinu v regulační oblasti genu MIR150 u CML. Provedli jsme *in silico* analýzu veřejně dostupných dat ChIP-Seq (UCSC Genome Browser) provedených na CML buněčné linii K562 a vytypovali jsme potenciální vazebné oblasti MYC proteinu v regulační oblasti genu MIR150. Experimentálně jsme testovali hned několik vytypovaných lokusů a identifikovali jsme lokus nacházející se -11,7 kb upstream od transkripčního začátku MIR150, který je v K562 a KCL-22 buňkách obsazen MYC. Toto místo, ani žádný další z testovaných lokusů, není obsazen MYC u BCR-ABL1 negativní AML buněčné linie HL-60. Inhibice aktivity BCR-ABL1 prostřednictvím imatinibu snížila expresi MYC a také došlo k depleci MYC proteinu z tohoto specifického lokusu regulační oblasti MIR150 v K562 a KCL-22. Zajímavé je, že obsazení MYC v lokusu -11,7 kb MIR150 bylo jen částečně sníženo v buňkách KCL-22 na rozdíl od K562. S tímto pozorováním souviselo i to, že hladina miR-150 se následně zvýšila u K562, nikoli však u KCL-22. Naopak zřetelný pokles exprese MYC na 20% původní exprese bez ovlivnění exprese BCR-ABL1 po působení BET inhibitoru JQ1 (Delmore JE, et al. Cell 2011) vedl k významnému zvýšení hladiny miR-150 v KCL-22 nikoliv však v buňkách K562. Tyto na první pohled nekonzistentní výsledky můžeme vysvětlit tak, že mechanismus rekrutování MYC pro represi MIR150 exprese je v jednom případě závislý spíše na míře aktivity Bcr-Abl a v druhém spíše na množství molekul MYC dostupných v buňkách, čímž se oba typy CML buněčných linií od sebe odlišují. S těmito odlišnostmi může mít souvislost také

rozdílná citlivost těchto buněčných linií k imatinibu. Zatímco 50 % buněk K562 podleho po 96 h od vystavení imatinibu apoptóze, v kultuře KCL-22 jsme pozorovali pouze minoritu (5%) apoptotických buněk. Z našich pozorování a měření víme, že KCL-22 buňky mají schopnost nepřetržitě růst v přítomnosti 1 μ M imatinibu a brzy relabovat díky rozvoji mutace v BCR-ABL1 na rozdíl od K562, které tuto schopnost nemají a dceřinou buněčnou linií K562R rezistentní vůči 1 μ M imatinibu jsme odvodili a získali až po 9 měsících kontinuálního a pozvolného zvyšování množství imatinibu v růstovém médiu kultury.

Naše data ukazují, že Bcr-Abl inhibuje v CML buňkách expresi MIR150 prostřednictvím přítomnosti MYC v lokusu vzdáleném -11,7 kb od transkripčního začátku genu MIR150, kde MYC působí jako přímý represor transkripce. Na rozdíl od modelů AML s přestavbami zahrnujícími gen MLL, jsme u CML nepozorovali, že by se uplatňoval mechanismus post-transkripční inhibice maturace miR-150 prostřednictvím Lin28 řízeným MYC.

MiR-155 byla již dříve identifikována jako onkogenní miRNA s výrazně zvýšenou hladinou v B buněčných lymfomech, chronické lymfocytární leukémii, AML a u různých solidních nádorů. Vysoké hladiny miR-155 signalizovaly špatnou prognózu nebo selhání léčby u těchto onemocnění (Kluiver J, et al. *The Journal of pathology*. 2005; Calin GA, et al. *Blood* 2009; Volinia S, et al. *PNAS* 2006; O'Connell RM, et al. *J of Exp Med* 2008). V CML LCS pacientů v chronické fázi v době diagnózy i v době rezistence vůči TKI jsme našli hladiny miR-155 zvýšené v porovnání se zdravými CD34+ PBMNC. Nicméně inhibice Bcr-Abl aktivity imatinibem vedla dále ke zvýšení hladiny miR-155 u K562 a KCL-22, což souvisí se zjištěním, že miR-155 je upregulovaná v leukocytech CML pacientů léčených imatinibem (Rokah OH, et al. *PloS one* 2012). Avšak odvozené rezistentní buněčné linie k imatinibu K562R a KCL-22R vykazují významně snížené hladiny miR-155 v porovnání s parentálními buněčnými liniemi. Různé hladiny miR-155 mají v buňkách různý funkční dopad (inhibují jiné soubory genů), což bylo nedávno popsáno u AML (Narayan N, et al. *Leukemia* 2017). Podobně můžeme uvažovat i u CML, jelikož je zajímavé, že korelace hladiny miR-155 s expresí MYC je signifikantně negativní ve zdravých CD34+ buňkách, ale signifikantně pozitivní v CML LSC, což naznačuje možné reprogramování exprese miR-155 prostřednictvím Bcr-Abl. S tímto předpokladem souvisí i zjištění, že PU.1 je downregulována po působení imatinibu na K562, zatímco u KCL-22 vystavené imatinibu naopak pozorujeme signifikantní

zvýšení hladiny PU.1. Pracujeme s hypotézou, že inhibice aktivity Bcr-Abl by měla vést k odblokování potlačené diferenciaci buněk prostřednictvím PU.1 v závislosti na buněčném kontextu, kdy pro terminální diferenciaci K562 (erytroidní vývojová linie) jsou zapotřebí nízké hladiny PU.1 a pro terminální diferenciaci KCL-22 (myeloidní vývojová linie) jsou zapotřebí vysoké hladiny PU.1. Tuto hypotézu jsme podpořili zjištěním, že rezistentní buněčné linie K562R a KCL-22R, které kontinuálně rostou v přítomnosti vysokých koncentrací imatinibu, vykazují opačné trendy exprese PU.1. Jinými slovy, že signifikantně zvýšené hladiny PU.1 v K562R buněčné linii v porovnání s citlivými buňkami K562 perzistentně blokují erytroidní diferenciaci, zatímco významně snížené hladiny PU.1 u KCL-22R v porovnání s citlivými buňkami KCL-22 perzistentně blokují myeloidní diferenciaci.

Naše práce souhrnně přináší zjištění, že BCR-ABL1/MYC/miR-150/MYB/miR-155/PU.1 signální síť je u CML aktivována a individuální molekuly pravděpodobně operují v souhře s BCR-ABL1 nebo semi-autonomně v závislosti na jejich množstvích, které mají různý dopad na CML leukemogenezi v průběhu klonální hematopoézy. Upregulace BCR-ABL1 a MYC v LSC (CD34+CD38-) dereguluje expresi miR-150 a následně MYB v diferencovanějších populacích. Tato data jsou zajímavá v kontextu nedávno publikované práce našich kolegů z University v Glasgow (Abraham S, et al. Nature 2017). Abraham et al. provedli globální proteomickou a transkriptomovou analýzu primárních vzorků pacientů CD34+ buněk a CML LSC a zjistili závislost CML buněk na signální síti regulované p53 a MYC. Toto zjištění dalo základ pro testování kombinační léčby s aplikací MDM2 a BET inhibitorů s cílem synergisticky cílit a potlačit LSC prostřednictvím upregulace apoptotické dráhy p53 a downregulace MYC.

7. Molekulárně genetické monitorování

Pravidelné molekulárně genetické monitorování je v současné době klíčové pro hodnocení odpovědi pacientů na léčbu TKI, sledování minimální zbytkové nemoci a pro rozhodování lékaře o dalším postupu v léčbě. Pro vyřčení diagnózy se vychází z komplexního vyšetření pacienta zahrnujícím například hematologické hodnocení (př. krevní obraz, morfologie aspirátu kostní dřeně), cytogenetické vyšetření (zjištění přítomnosti a počtu Ph pozitivních metafází, případně jiných chromosomálních

abnormalit) a molekulárně genetické vyšetření pro průkaz přítomnosti transkriptu BCR-ABL1 a charakterizaci přestavby. Na úrovni DNA dochází ke zlomům v intronech genů BCR a ABL1 pravděpodobně nahodile a zatím nebyli zjištěni pacienti, kteří by nesli na úrovni DNA stejný typ fúze, tj. stejné pozice zlomů v intronech obou genů (Příloha 9; Krumbholz M Genes Chromosomes Cancer. 2012). Pro představu, intron 1 genu ABL1, ve kterém dochází ke zlomům takřka u všech pacientů s CML, je dlouhý 174 kbp. U 99 % pacientů s CML je přítomen transkript BCR-ABL1 s přestavbou Major (b2a2, b3a2). Pacient-specifické DNA zlomy se nacházejí v intronu 13 genu BCR a intronu 1 ABL1 (e13a2, resp. b2a2) nebo v intronu 14 BCR a intronu 1 ABL1 (e14a2, resp. b3a2). Zbývající procento pacientů nese raritní typy přestaveb BCR-ABL1 transkriptu (př. minor – e1a2; mikro – e19a2). Je zřejmé, že molekulárně genetické vyšetření je snazší, rychlejší a levnější na úrovni transkriptů, protože stejný test je aplikovatelný na 99 % pacientů s CML. Znalost typu přestavby na úrovni transkriptu je důležitá pro následující kvantifikaci hladiny transkriptů BCR-ABL1 a zamezení falešně negativním výsledkům. Metoda multiplex reverzně transkriptázová PCR (RT-PCR) umožňuje detekovat transkripci BCR-ABL1 s různými typy přestaveb (Cross NC, et al. Leukemia 1994). Tento typ vyšetření je v laboratořích rozšířený, avšak existují ojedinělé případy pacientů s raritními přestavbami BCR-ABL1 transkriptu, jejichž správné určení může být problematické. Například v případě ampliconu o délce cca 1000 bp v cDNA vzorku pacienta získaného po průběhu multiplex RT-PCR je nutné rozlišit, zda se jedná o přestavbu e6a2 (926 bp) či e19a2 (1123 bp). Po klasické elektroforetické separaci PCR produktu je určení délky málo přesné, proto je nutné provést singleplex PCR se specifickými primery, umožňujícími amplifikaci úseku cDNA nesoucího konkrétní typ přestavby.

Po potvrzení diagnózy CML je zahájena léčba TKI doprovázená pravidelným monitorováním hladin BCR-ABL1 transkriptů v celkových leukocytech periferní krve. V roce 2013 byla publikována nová verze doporučení pro hodnocení léčebné odpovědi na léčbu TKI (Baccarani M, et al. Blood 2013). Je doporučeno provádět monitorování hladiny BCR-ABL1 transkriptů (dále jen hladina BCR-ABL1) každé 3 měsíce od zahájení léčby. Pokud není možné v doporučených časových intervalech od zahájení léčby provést cytogenetické vyšetření (nemožnost odběru aspirátu kostní dřeně, nedostatek metafází pro hodnocení), opírá se lékař o zjištěnou hladinu BCR-ABL1 transkriptů v periferní krvi. Je známo, že hladina BCR-ABL1 odráží množství

Ph pozitivních buněk vyplavovaných do periferní krve. Monitorování hladiny BCR-ABL1 bylo u CML poprvé uplatněno v 90. letech minulého století pro sledování minimální zbytkové nemoci u pacientů po transplantaci kostní dřeně (Lion T, et al. Leukemia 1992). Pro kvantifikaci hladiny BCR-ABL1 byla používána metoda kompetitivní PCR (Moravcová J, et al. Leukemia 1998). Dnes je zlatým standardem pro kvantifikaci hladin BCR-ABL1 metoda reverzně transkriptázová real-time kvantitativní PCR (RT-qPCR) s doporučeným a nejvíce rozšířeným metodickým postupem dle EAC (European Against Cancer; Beillard E, et al. Leukemia 2003).

Studie IRIS prokázala, že redukce BCR-ABL1 transkriptů (BCR-ABL1/kontrolní gen, tj. normalizovaný počet kopií BCR-ABL1) o minimálně 3 řády v porovnání se standardizovanou hladinou 100 %, která byla vypočtena jako medián hladin transkriptů BCR-ABL1 s přestavbou Major u vzorků pacientů v době diagnózy, významně předpovídá pravděpodobnost přežití bez progresu. Tato 3-řádová redukce byla převedena do numerického mezinárodního měřítka (IS = international scale) a odpovídá hladině 0,1 % BCR-ABL IS, jenž je označována jako velká molekulární odpověď (MMR). O ukotvení hladin BCR-ABL1 v mezinárodní škále na dvou hodnotách ustanovených v rámci studie IRIS: standardizovaná vstupní hladina BCR-ABL1 (100 % IS) a standardizovaná hodnota MMR (0,1 % IS) se dohodlo konsorcium expertů na mezinárodní sjezdu konaném na půdě National Institutes of Health (NIH) v Bethesda v roce 2005 (Hughes T, et al. Blood 2006). Doporučená citlivost metodik byla stanovena na hladinu minimálně 0,01 % BCR-ABL1 (IS) odpovídající 4-řádovému poklesu hladiny od standardizované vstupní hladiny. Logickým vyústěním dosavadních poznatků bylo rozhodnutí harmonizovat lokální metodiky BCR-ABL1 laboratoří v rámci mezilaboratorní standardizace, čehož mělo být dosaženo výměnou referenčních materiálů s hodnotami změřenými v centrální referenční laboratoři. Na základě těchto kroků bylo doporučeno vytvořit dostatečné množství referenčních materiálů pro kontroly kvality standardizovaných protokolů monitorování BCR-ABL1.

7.1. Standardizace monitorování MMR

Velká molekulární odpověď je významným molekulárně genetickým parametrem odrážejícím úspěšnost léčby CML prostřednictvím TKI a umožňujícím predikci

celkového přežití a přežití bez události. Bylo nezbytné, aby laboratoře poskytující vyšetření kvantifikace BCR-ABL1 transkriptu metodou RT-qPCR harmonizovaly své metodiky a jednotně vydávaly výsledky v mezinárodním měřítku. Pod záštitou ELN byl v roce 2007 zahájen projekt EUTOS for CML (The European Treatment Outcome Study for CML), který mezi své hlavní úkoly zařadil vytvoření standardizované metodiky (Branford S, et al. Leukemia 2006). V roce 2007 proběhlo mezinárodní testování variability měření hladin transkriptů BCR-ABL1 v 39 laboratořích ze 14 evropských zemí. Testování poskytlo základ pro další harmonizaci postupů, které používají rozdílné protokoly pro pre-analytickou a analytickou fázi a pro vytvoření mezinárodního referenčního standardu nezbytného pro standardizační proces (Müller M, et al. Leukemia 2008). Následně bylo v roce 2008 zahájeno testování za účasti 57 evropských laboratoří, v němž byla ve dvou krocích ověřena funkčnost metodik a vypočten nejprve preliminární a později také validovaný konverzní faktor (CF) pro vyjadřování výsledků v IS. Na základě testování bylo vybráno 24 laboratoří, které měly ve svých zemích plnit funkci národních referenčních laboratoří a pokračovat ve validaci CF pro ostatní lokální laboratoře (Müller M, et al. Leukemia 2009). První publikované výsledky potvrdily, že pomocí CF lze sjednotit výsledky rozdílných analytických postupů (Branford S, et al. Blood 2008). Na základě mezilaboratorní výměny vzorků bylo testováno, zda metodiky 38 laboratoří z 15 zemí celého světa podávají konzistentní výsledky s referenční laboratoří a zda je lze konvertovat do IS pomocí vypočtených CF. Současně s reportováním výsledků v IS byl vyzdvihnut význam externích i interních kontrol kvality, určení přesnosti a reprodukovatelnosti metod a nutnost odlišení analytické variability měření od klinicky relevantních změn.

Procedura validace a re-validace CF vychází z analýzy 25-30 vzorků CML pacientů, které měří referenční a testovaná laboratoř. Celý proces je finančně i časově náročný a dostupný jen pro omezený počet laboratoří, jelikož pro mnoho laboratoří je problematické získat potřebné množství vhodných primárních vzorků pacientů pro testování. Obecně je doporučováno přepočtové koeficienty re-validovat každý rok a také vždy, když se mění metodický postup, chemikálie, přístroje, apod. Pokud se zjistí nestabilita CF je doporučeno provést následnou validaci do půl roku. Je důležité zdůraznit, že k procesu validace přepočtového koeficientu mohou přistoupit laboratoře, jejichž RT-qPCR metodika splňuje stanovené parametry analýzy zahrnující linearitu měření a dostatečný počet kopií kontrolního genu, který rovněž určuje požadovanou citlivost. Jedním z faktorů přispívajících k variabilitě

metodik mezi laboratořemi je používání různých plasmidových kalibrátorů, které umožňují stanovit množství analyzovaných cílových molekul onkogenu BCR-ABL1 a kontrolního genu. Plasmidové kalibrátory se odlišují dle výrobců, mnohdy si laboratoře vyvíjejí kalibrátory vlastní. Cílem rozsáhlé práce vybraných EUTOS referenčních laboratoří bylo vyvinout a validovat mezinárodní certifikovaný referenční plasmidový standard pro výraznou pomoc a usnadnění procesu standardizace. Výstupem práce je existence referenčního materiálu ERM-AD623a-f, který je v současné době komerčně dostupný (Příloha 10). Jedná se o sadu plasmidových standardů nesoucích současně sekvence pro gen BCR-ABL1 (přestavba Major) a kontrolní geny ABL1, BCR a GUSB a může být používán přímo pro diagnostické analýzy vzorků cDNA nebo nepřímo pro kalibraci lokálního plasmidového standardu. Je nutné zdůraznit, že samotné používání ERM-AD623 standardu nevede k vydávání výsledků v IS, jelikož nepostihuje variabilitu celé metodiky zahrnující izolaci celkové RNA a reverzní transkripci do cDNA, která do měření mezi laboratořemi vnáší největší variabilitu. Významně však napomáhá zvýšit přesnost samotného měření RT-qPCR ve smyslu určení počtů kopií měřeného BCR-ABL1 a kontrolního genu. Tento certifikovaný plasmidový kalibrátor je vhodný pro optimalizaci a kontrolu účinnosti RT-qPCR pro BCR-ABL1 a kontrolní gen. Pro správnou laboratorní praxi by obě RT-qPCR reakce, tedy pro BCR-ABL1 a kontrolní gen, měly být stejně účinné. To znamená, že při analýze BCR-ABL1 s přestavbou major a kontrolního genu v certifikovaném plasmidu, by hodnoty Ct měly být identické, jelikož jsou geny v plasmidu přítomny v poměru 1/1.

Pro zajištění toho, aby laboratoře mohly vydávat výsledky v IS bez nutnosti výměny vzorků pacientů s referenční laboratoří pro obdržení přepočtového koeficientu, bylo zapotřebí vyvinout sekundární referenční materiál postihující celou metodiku počínaje zpracováním primárního vzorku periferní krve. V rámci mezinárodní studie zahrnující vybrané EUTOS referenční laboratoře byl vyvinut a validován první buněčný BCR-ABL1 sekundární referenční panel. Jedná se o lyofilizované mixy buněk buněčných linií K562 (BCR-ABL1 pozitivní b. linie odvozená od blastického zvratu pacientky s CML) a HL-60 (BCR-ABL1 negativní b. linie odvozená z blastů akutní myeloidní leukémie) v definovaných poměrech (Příloha 11). Sekundární referenční panel byl kalibrován na první mezinárodní genetický referenční panel pro kvantifikaci mRNA BCR-ABL1 světové zdravotnické organizace WHO (World Health Organization) (White D, et al. Blood 2010). Byl to vůbec první

BCR-ABL1 panel, sloužící jako primární standard pro kalibraci BCR-ABL1 metod a vydávání výsledků v IS, který byl akreditován WHO. WHO BCR-ABL1 referenční panel je jen omezeně dostupný, a to pro výrobce BCR-ABL1 testů, kitů a sekundárních standardů (Cross NC, et al. Ann. Hematol 2015).

V rámci EUTOS studie (Příloha 11) bylo připraveno 12000 kusů sekundárního referenčního panelu lyofilizovaných buněk s využitím stejných buněk jako v případě WHO panelu. Kvůli potřebě monitorování hluboké molekulární odpovědi byl zahrnut standard s hladinou MR^{4.5} (MR – hluboká molekulární odpověď; více v kapitole 7.3.). Hodnocení kvality kontroly ukázalo, že sekundární panel vykazoval homogenitu, minimální zbytkovou vlhkost a dvouapůlroční stabilitu v reálném čase.

Referenční panel byl úspěšně zpracován a testován všemi 44 zúčastněnými laboratořemi, což naznačuje, že je kompatibilní s mnoha různými konfiguracemi metody pro kvantifikaci BCR-ABL1 pomocí RT-qPCR. Prostřednictvím analýzy standardní křivky ukazující míru linearity kvantifikace jsme zjistili, že téměř polovina testů vykazuje známky nedostatečné optimalizace projevující se především nelinearitou měření a nižší účinností průběhu PCR. Zajímavé je, že když laboratoře použily optimální množství vstupního vzorku RNA, což bylo v rámci studie pro každou metodiku testováno, dosáhlo 60 % laboratoří průměrných hodnot BCR-ABL1 do dvojnásobku určených hodnot referenčního panelu, 84 % laboratoří měřilo s dobrou přesností ($\leq 2,5$ řádu směrodatné odchylky) v rozsahu od 0,1 % - 0,01 % BCR-ABL1 a 76 % laboratoří ukázalo 100 % detekční schopnost hladiny MR^{4.5}, tj. 0,0032 %. K těmto vynikajícím výsledkům nejspíše přispěly 3 faktory; použití ověřeného optimalizovaného množství vstupního vzorku specifického pro daný test, skutečnost, že 78 % testů využívá návrh EAC primerů (Beillard E, et al. Leukemia 2003) a to, že 71 % testů je kalibrováno na IS prostřednictvím výměny vzorků s jedním ze dvou hlavních mezinárodních referenčních center. Výsledky ukazují, že používání publikovaných testů a harmonizovaný postup kalibrace testu na IS mohou vést k úspěšné standardizaci BCR-ABL1 analýzy. Pro tyto účely je zřejmá potřeba jednoduchého a široce dostupného kalibračního mechanismu, jako je tento sekundární panel, pro zajištění měření v IS v laboratořích v průběhu času.

Validování použití tohoto sekundárního referenčního panelu pro BCR-ABL1 kvantifikaci a kalibraci testů na IS v současné době probíhá v rámci mezinárodního projektu EUTOS 2016, přičemž doporučený postup pro aplikování v praxi by měl být publikován v roce 2018.

7.2. Pokles hladiny BCR-ABL1 časně po zahájení léčby TKI předpovídá průběh onemocnění

Prognostické skórovací parametry, jako jsou Sokalovo a Hasfordovo (Euro) skóre, byly zavedeny do lékařské praxe pro odhad rizika průběhu onemocnění v době, kdy byli pacienti léčeni IFN- α nebo busulfanem (Sokal JE, et al. Blood 1984; Hasford J, et al. J Natl Cancer Inst 1998). Oba parametry jsou nadále užitečnými nástroji v době léčby TKI (Baccarani M, et al. Blood 2013). Navíc k nim přibyl i třetí, značně zjednodušený skórovací systém EUTOS, který do kalkulace zahrnuje velikost sleziny a počet basofilů v době diagnózy (Hasford J, et al. Blood 2011). Ukázalo se, že EUTOS skóre předpovídá pravděpodobnost dosažení kompletní cytogenetické odpovědi (CCgR) a přežití bez progresu u pacientů léčených imatinibem. Rovněž se ukázalo, že odhad odpovědi na léčbu TKI je účinný na základě hodnocení časově závislých proměnných zahrnujících hematologická, cytogenetická a molekulární kritéria, která definují optimální odpověď, varovné signály a selhání léčby ve 3., 6. a 12. měsíci a v následujících časových obdobích od zahájení léčby TKI (Baccarani M, et al. Blood 2013). Práce německé skupiny The German CML study group na souboru 1303 nově diagnostikovaných pacientů léčených imatinibem v první linii ukázala, že 28 % pacientů, u kterých nedošlo k redukci hladiny BCR-ABL1 pod 10 % IS ve 3. měsíci, mělo pětileté celkové přežití pouze 87 % (Hanfnstein B, et al. Leukemia 2012). Významně lepší míra přežití byla zjištěna u pacientů s hladinou BCR-ABL1 1-10 % IS a ≤ 1 % IS, avšak obě tyto skupiny se nelišily mezi sebou. Z toho důvodu byla hranice 10 % BCR-ABL1 IS zvolena jako relevantní mezní hladina definující vysoce rizikovou skupinu pacientů. Práce německé a rovněž britské skupiny usuzují, že pokles hladiny BCR-ABL1 ve 3. měsíci od zahájení léčby imatinibem může představovat důležitý prognostický marker následujícího průběhu léčby a může být ukazatelem pro časný převod rizikové skupiny pacientů na léčbu TKI 2. generace (Hanfnstein B, et al. Leukemia 2012; Marin D, et al. JCO 2012). Naše práce, která zpracovala molekulární data pacientů léčených v 1. linii v reálné praxi tří českých center, která v té době již měla standardizovanou metodiku pro kvantifikaci BCR-ABL1 transkriptů a měřila porovnatelně, ukázala, že kumulativní incidence dosažení kompletní cytogenetické odpovědi (CCgR; 0 metafází kostní dřeně s Ph chromosomem) a MMR ve 12. a 18. měsíci od zahájení léčby imatinibem

je významně spjata s hladinou BCR-ABL1 $\leq 10\%$ IS dosaženou po 3 měsících léčby (Příloha 12). Nicméně jsme nepotvrdili, že by hladiny BCR-ABL1 ve 3. měsíci odrážely přežití bez progresu (definováno jako přežití bez evidence AP nebo BC, ztráty kompletní hematologické odpovědi, velké cytogenetické odpovědi, nárůst počtu bílých krvinek nebo úmrtí v průběhu léčby imatinibem) a události (definováno jako progresu, ztráta CCgR, selhání dosažení kompletní hematologické odpovědi v 6. měsíci, velké cytogenetické odpovědi ve 12. měsíci, CCgR v 18. měsíci, netolerance k imatinibu – důvodu k převodu na jinou léčbu). Zatím neexistují data, která by jednoznačně prokázala, že pozvolnější odpověď na léčbu by měla prokazatelný negativní dopad na celkové přežití. Rovněž je otázkou, zda časně převedení na léčbu TKI 2. generace vyvolá rychlejší odpověď. Odlišné biologické charakteristiky pozvolně odpovídajících pacientů mohou být dosti heterogenní a inhibitory druhé generace mohou být jen částečně účinné. Navíc, z praxe víme, že pozvolně odpovídající pacienti, kteří dle ELN kritérií odpovídají neoptimálně, mnohdy dosahují MMR za delší čas a jejich outcome je srovnatelný s optimálně odpovídajícími pacienty. Naproti tomu by ze změny terapie na TKI 2. generace již po 3 měsících mohla profitovat vysoce riziková skupina pacientů s hladinami BCR-ABL1 $\geq 10\%$ IS, protože by mohlo dojít k časně a efektivní eliminaci BCR-ABL1 pozitivních klonů a snížení rizika rozvoje rezistence.

V praxi se hranice 10% BCR-ABL1 IS zatím neuplatnila jako kritérium pro změnu léčby. K tomuto přispívá i fakt, že kvantifikace BCR-ABL1 v analyzovaném vzorku je ovlivněna variabilitou samotného měření, která odpovídá mnohastupňovému procesu od zpracování primárního vzorku až po konečný výpočet výsledku. Variabilita, která určuje míru nejistoty měření, stoupá s klesající hladinou BCR-ABL1 ve vzorku. Nejistoty měření jsou vypočteny na základě testování reprodukovatelnosti, přičemž toto testování by mělo být v rámci validace metody provedeno každou laboratoří. Určitému rozmezí hodnot hladiny transkriptů BCR-ABL1 pak odpovídá příslušný interval, v němž je daný výsledek považován za správný. V případě, že si lékař není jistý, jak posoudit např. hraniční aktuální výsledek pacienta v daném období, je vhodné měření hladiny transkriptů BCR-ABL1 zopakovat mimo interval běžného monitorování. Zdá se, že mnohem přesnějším prediktorem rizikové skupiny pacientů, která by mohla profitovat z časně změny léčby, je individuální kinetika poklesu hladiny BCR-ABL1. Hanfstein B et al. (Leukemia 2014) ukázali, že jako nejvíce prediktivní veličina byla identifikována půl

řádová redukce hladiny BCR-ABL1 ve 3. měsíci od vstupní hladiny měřené v době diagnózy, kdy byl použitý kontrolní GUSB. Dle autorů by pacienti v riziku progresivního onemocnění mohli být přesně identifikováni nedosažením půl řádového poklesu hladiny BCR-ABL1 ve 3. měsíci od zahájení léčby TKI. S ještě přesnějším odhadem rizikovitosti progresivního onemocnění na zvoleném prvoliniovém TKI časně po zahájení léčby přišla australská skupina (Branford S, et al. Blood 2014). Mezi skupinou pacientů s hladinou nad 10 % BCR-ABL1 jsou pacienti, kteří v průběhu léčby prospívají. Autoři práce si vzali za cíl identifikovat v této skupině pacienty se skutečným rizikem progresivního onemocnění. Pacienti s BCR-ABL1 halving time dosaženým za méně než 76 dní měli významně lepší průběh onemocnění v porovnání s pacienty s delším časem. Multivariantní analýzy ukázaly, že halving time je významným parametrem předpovědi průběhu onemocnění u rizikové skupiny pacientů s hladinou BCR-ABL1 vyšší než 10 % IS ve 3. měsíci od zahájení léčby.

Obdobně jako 10 % mezní hladina BCR-ABL1 ve 3. měsíci tak i půl řádová redukce BCR-ABL1 či halving time se v lékařské praxi dosud neuplatnily jako parametry, které by vedly k časně (ve 3. měsíci) změně léčby u rizikových pacientů. Důvodem je chybějící randomizovaná klinická studie, která by ukázala příznivý dopad časně změny léčby u takto definovaných rizikových skupin pacientů na další průběh onemocnění. Pravidelné monitorování hladiny BCR-ABL1 každé 3 měsíce od zahájení léčby zůstává klíčové pro sledování a hodnocení průběhu odpovědi na léčbu v čase. Lékaři zpravidla reagují se změnou léčby teprve při potvrzení nedostatečné odpovědi na léčbu v následujících obdobích sledování a na základě detekce mutací v kinázové domény BCR-ABL1, které představují jeden z mechanismů rezistence vůči léčbě TKI (viz. kapitola 5.1.).

7.3. Definice a standardizace hluboké molekulární odpovědi

S delší dobou sledování léčby CML pacientů imatinibem se ukazuje, že pacienti vykazují nižší hladiny BCR-ABL1, než je MMR a v některých případech není BCR-ABL1 pomocí RT-qPCR detekován. Pacienti léčení dasatinibem (Kantarjian H, et al. J Engl J Med 2010) nebo nilotinibem (Saglio G, et al. J Engl J Med 2010) v první linii dosahují častěji a rychleji hlubších odpovědí, tj. hladin pod 0,1 % BCR-ABL IS v porovnání s léčbou imatinibem. Pacienti, kteří po léčbě TKI dosahují dlouhodobých

hlubokých molekulárních odpovědí, mají výhled pro vysazení léčby, jak ukazují klinické studie zabývající se vysazením léčby u této skupiny pacientů (STIM, EURO-SKI, TWISTER, ENESTfreedom, Dasfree, aj.). Proto bylo zapotřebí seriózně se zabývat otázkou definice a standardizace hlubokých molekulárních odpovědí na základě měření množství BCR-ABL1 transkriptu s přestavbou major (varianty e13a2, e14a2; 99 % CML pacientů), pro které existuje externí plasmidový kalibrátor pro určení počtu kopií. Panelem odborníků ELN bylo navrženo označení pro hlubokou molekulární odpověď jako MR („deep“ Molecular Response) (Baccarani M, et al. Blood 2013). Společně s dalšími EUTOS laboratořemi jsme se zabývali technickými detaily a způsobem interpretace, které laboratořím umožní kategorizovat pacienty ve standardizované formě. Vyvinuli jsme laboratorní postup definující MR reprodukovatelným způsobem (Příloha 13). Doporučení vzešla na základě konsensu mnoha pracovních mýtinků a použitou terminologii jsme opřeli o doporučení MIQE – the Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments guidelines (Bustin SA, et al. Clin Chem 2009). Jelikož většina laboratoří používá kontrolní gen ABL1, menšina GUSB, a BCR se používá pouze v některých australských či amerických laboratořích, doporučení se týkají metodik využívajících kontrolní geny ABL1 a GUSB. Na základě paralelního měření obou kontrolních genů u 1567 vzorků s hladinami <10 % BCR-ABL1 IS a počty kopií kontrolního genu ABL1 >10 000, byl vypočítán medián poměru GUSB/ABL1, který činil 2,4. Proto jsme pro potřebu definování hlubokých MR uvažovali, že 10000 kopií transkriptu ABL1 odpovídá ve stejném objemu cDNA 24000 kopiím GUSB. Úroveň hluboké molekulární odpovědi jsme definovali dle počtu řádů poklesu hladin transkriptů BCR-ABL1 od IRIS standardizované hranice 100 % IS v případě detekovatelnosti a tedy kvantifikovatelnosti BCR-ABL1. V případě nedetekovatelnosti kopií BCR-ABL1 transkriptů se hloubka molekulární odpovědi řídí dle měřeného počtu kopií kontrolního genu, který současně odráží míru citlivosti analýzy konkrétního vzorku. BCR-ABL1 laboratoře dle našich doporučení vyhodnocují MR následovně:

- **MR⁴**: pokles o ≥ 4 řády od IRIS standardizované hranice, tj. buď detekovatelná choroba na hladině $\leq 0,01$ % IS BCR-ABL1 nebo nedetekovatelná choroba (0 kopií BCR-ABL1) při detekci $\geq 10\ 000$ kopií ABL1 resp. $\geq 24\ 000$ kopií GUSB v každé z testovaných paralel;

- **MR^{4.5}**: pokles o $\geq 4,5$ řádů od IRIS standardizované hranice, tj. buď detekovatelná choroba na hladině $\leq 0,0032$ % IS BCR-ABL1 nebo nedetekovatelná choroba (0 kopií BCR-ABL1) při detekci součtu $\geq 32\ 000$ kopií ABL1 resp. $\geq 77\ 000$ kopií GUSB;
- **MR⁵**: pokles o $\geq 5,0$ řádů od IRIS standardizované hranice, tj. buď detekovatelná choroba na hladině $\leq 0,001$ % IS BCR-ABL1 nebo nedetekovatelná choroba (0 kopií BCR-ABL1) při detekci součtu $\geq 100\ 000$ kopií ABL1 resp. $\geq 240\ 000$ kopií GUSB.

Práce také definuje kritéria hraničních hodnot pozitivitu vzorku, pravidla pro negativní kontroly a NTC (No Template Control), hranice pro počty kopií referenčního genu. Při nesplnění jednotlivých kritérií či pravidel není výsledek validní.

Schopnost laboratoří dosahovat použitím lokálních metodik úroveň MR⁴, MR^{4.5}, případně MR⁵ byla testována v rámci projektu EUTOS for CML v součinnosti s klinickou studií ENEST1st (Hochhaus A, et al. Leukemia 2016) a vybranými EUTOS laboratořemi včetně naší. V roce 2014 proběhlo třetí testování v rámci „EUTOS MR^{4.5} trial Evaluation Performance“ a certifikát o tom, že laboratoř je schopna detekovat MR^{4.5} u vysokého podílu vzorků, obdrželo téměř 80 % zúčastněných laboratoří. Testování schopnosti detekovat MR^{4.5} pokračuje dále v rámci nového projektu EUTOS 2016.

Uplatnění standardizovaného měření a hodnocení MR na sebe nenechalo dlouho čekat a realizovalo se v rámci akademické evropské klinické studie EURO-SKI (EUROpean Stop TKI). Certifikované EUTOS^{4.5} laboratoře vyšetřovaly hladiny BCR-ABL1 s přestavbou major ve vzorcích periferní krve pacientů centralizovaně pro jednotlivé zúčastněné země (pro ČR to byla naše laboratoř oddělení molekulární genetiky a NRL ÚHKT). Pro definitivní zařazení pacientů do studie a tedy zahájení vysazení léčby TKI musela příslušná EUTOS^{4.5} laboratoř potvrdit, že se pacient po minimálně 3 letech léčby TKI a 1 roku trvajícím hluboké molekulární odpovědi skutečně nachází v odpovědi MR⁴ a nižší. U pacientů definitivně zařazených do studie bylo monitorování a hodnocení MR prováděno EUTOS^{4.5} laboratořemi v prvním půlroce každé 4 týdny. Dalšího půl roku byli pacienti monitorováni každých 6 týdnů a následující 3 roky byli sledováni každé 3 měsíce. Kdykoliv při zjištění ztráty MMR byli pacienti okamžitě převedeni zpět na léčbu TKI, a i nadále byli monitorováni. Hlavním výstupem EURO-SKI studie je zjistit délku trvání MMR či hlubší MR po zastavení léčby TKI. Mezi dalším druhotnými cíli a výstupy studie je z hlediska monitorování

MR vhodné zmínit například výpočet pravděpodobnosti přežití bez molekulárního relapsu po vysazení léčby TKI, dopad míry MR a délky trvání MR před vstupem do studie na pravděpodobnost přežití bez ztráty MMR. Výsledky EURO-SKI studie ukazují, že 60 % pacientů si drží MMR 6 měsíců po vysazení léčby a 49 % pacientů po 24 měsících (Saussele S, et al. Blood 2017). Ukazuje se, že délka léčby TKI a trvání MR mají významný dopad na udržení si odpovědi po vysazení léčby. Výsledky EURO-SKI studie budou v nejbližší době publikovány a budou tvořit základ pro uplatnění v klinické praxi. Pro mnoho pacientů to bude znamenat zvýšení kvality života úbytkem nežádoucích účinků z dlouhodobé léčby TKI. Pro zdravotnictví přinese takový léčebný protokol nemalé finanční úspory.

Pro zavedení léčebného protokolu zahrnujícího vysazení léčby TKI je nutné, aby pacienti s CML měli co nejlepší dostupnost vyšetření hluboké molekulární odpovědi v laboratoři se standardizovanou metodikou. V současné době probíhá plnění evropského projektu EUREKA (EUropean survey on the assessment of deep molecular REsponse in CP CML patients after at least 2 years of therapy with tyrosine KinAse inhibitors), který shromažďuje informace o míře MR u pacientů, kteří po 2 letech léčby TKI v běžné lékařské praxi evropských hematologických zdravotnických zařízení dosahují MMR a MR. Jedním z výstupů je ověření dostupnosti standardizovaného měření MR v evropských zemích.

7.4. Výhled na vyšší citlivost a přesnost měření MR

V rámci projektu EUTOS 2016 se několik evropských laboratoří včetně naší zabývá otázkou zvýšení citlivosti a přesnosti měření hlubokých molekulárních odpovědí pomocí detekce a kvantifikace zbytkového množství BCR-ABL1 prostřednictvím nejnovějších nanotechnologií, jako je digitální PCR (dPCR) (Vogelstein B, Kinzler KW Proc Natl Acad Sci 1999). Předností dPCR je absolutní kvantifikace bez nutnosti použití plazmidových standardů pro tvorbu kalibrační křivky a určení počtu kopií sledovaných genů a vysoká citlivost umožňující přesně kvantifikovat zbytkové množství sledovaného genu či transkriptu. Podstatou dPCR je rozdělení reakční směsi na stovky až miliony dílčích vzorků o nano – až pikolitrových objemech. Z analýz lze vypočítat absolutní počet kopií cílového genu na 1 μ l objemu. První data ukazují na vyšší přesnost a spolehlivost detekce zbytkového množství BCR-ABL1

v porovnání s RT-qPCR na stejné úrovni citlivosti. dPCR umožňuje vyšší citlivost detekce, která je určena množstvím dílčích vzorků, ale důležitou otázkou zůstává, jak vysoká citlivost je vlastně vhodná a potřebná pro relevantní interpretaci dat pro lékařskou praxi, a to i s ohledem na cenu provedení analýzy. To je jeden z cílů stanovených v rámci EUTOS 2016.

Další oblastí studia je použití pacient specifické genomické přestavby BCR-ABL1 pro kvantifikaci zbytkové nemoci na úrovni DNA. Jak již bylo zmíněno v úvodu této práce, každý CML pacient nese specifickou fúzi genů BCR a ABL1 na DNA úrovni (Příloha 9; Krumbholz M Genes Chromosomes Cancer. 2012). DNA je stabilnější molekulou než RNA a je známo, že kvantifikace genu, respektive úseku DNA konkrétního genu, věrohodně odráží počet analyzovaných buněk. V případě BCR-ABL1 je to množství CML buněk. Odpadá i nutnost reverzní transkripce RNA do cDNA, která je nutná pro provedení PCR a která nejvíce ovlivňuje variabilitu měření. První data ukazují, že BCR-ABL1 DNA detekce zbytkové nemoci pomocí pacient-specifických testů by mohla být v případech hlubokých molekulárních odpovědí a nedetekovatelnosti BCR-ABL1 transkriptu citlivější a poskytovat reálnější obraz o zbytkovém onemocnění (Ross DM et al. 2010 Leukemia; Alikian M et al. 2016 J Mol Diagn). Uplatnění DNA detekce BCR-ABL1 v lékařské praxi CML je předmětem výzkumného projektu 3 hematologických center podporovaného zdravotnickou agenturou AZV (AZV 15-31540A; 2015-2018) „Molekulární detekce chronické myeloidní leukémie pomocí pacient-specifické fúze genu BCR-ABL1: dopad na efektivitu léčby“; hl. řešitel K. Machová Poláková (ÚHKT), spoluřešitelé J. Zuna (2. LF UK) a T. Jurček (FN Brno)). V rámci projektu provádíme vyšetření prospektivně u nově diagnostikovaných pacientů, u pacientů, kteří se v průběhu léčby TKI nacházejí v hlubokých molekulárních odpovědích a také u pacientů, u kterých je vysazena léčba TKI v rámci EURO-SKI. Porovnáváme mezi sebou úrovně hladin mRNA a DNA BCR-ABL1, ale také data zjištěná pomocí qPCR a dPCR. Z průběžných výsledků je zřejmé, že kvantifikovatelná množství mRNA a DNA měřená v celkových leukocytech periferní krve spolu signifikantně korelují, což potvrzuje, že míra exprese BCR-ABL1 odráží počet leukemických buněk v periferní krvi. To není překvapivé zjištění, když si uvědomíme, že monitorování hladiny BCR-ABL1 transkriptů se uplatňuje v lékařské praxi více než 10 let a prokazatelně odráží míru účinku TKI na redukci leukemických buněk. Odlišnosti nacházíme u vzorků, u kterých nebyl transkript BCR-ABL1 detekován. K tomu, abychom jednoznačně mohli mluvit o vyšší citlivosti měření

zbytkové nemoci na úrovni DNA, si musíme počkat, až v rámci projektu budeme mít analyzován kompletní soubor čítající přes 100 pacientů.

8. Závěr

V současné době je chronická myeloidní leukémie díky cílené inhibici onkoproteinu Bcr-Abl prostřednictvím inhibitorů tyrozinových kináz léčebně velmi dobře zvladatelné nádorové onemocnění. Vysoce citlivé komplexní vyšetřování mutačního statutu BCR-ABL1 a farmakogenetická charakterizace reprezentují důležité molekulárně genetické faktory pro zkvalitnění léčby pacientů s CML. Standardizace kvantifikace transkriptů onkogenu BCR-ABL1 umožňující vydávání výsledků v mezinárodním měřítku, stejně tak jako měření hluboké molekulární odpovědi se snahou racionálně implementovat nové technologie umožňující spolehlivěji a přesněji kvantifikovat zbytkové molekuly BCR-ABL1, jsou nezbytnou součástí léčebných protokolů CML. Většina pacientů dosahuje MMR a MR a někteří pacienti (cca 10 % z celkového počtu CML pacientů), kteří setrvávají v hluboké molekulární odpovědi po několika letech léčby, dokonce mají výhled na vynechání TKI bez návratu onemocnění. Avšak zatím se zdá, že u většiny pacientů přežívají LSC a sólová léčba TKI neumožňuje LSC cílit. Ze všech dostupných dat je zřejmé, že klonální vývoj LSC buněk rezistentních vůči TKI bude mezi pacienty poměrně heterogenní. Můžeme očekávat, že u některých pacientů se v tomto procesu bude více uplatňovat určitá signální dráha, u dalších pacientů pak zase jiná. Dosud popsané signální dráhy uplatněné u CML LSC lze terapeuticky cílit. Některé preparáty jsou ve fázi testování v rámci klinických studií. Jsem však přesvědčená, že pro výhled na vyléčení CML budeme muset být schopni identifikovat přetrvávající LSC a jejich způsob rezistence vůči TKI u každého konkrétního pacienta a aplikovat specifickou léčbu, která umožní LSC zcela eliminovat.

Věřím, že tato práce dokumentuje, že se v České republice podařilo pro pacienty s CML zajistit dostupná standardizovaná vyšetření BCR-ABL1 a že se aktivně v mezinárodním kontextu podílíme na jejich neustálém zlepšování, což přispívá k výborným výsledkům léčebné praxe CML. Rovněž věřím, že díky spolupráci mezi domácími a zahraničními pracovišti můžeme vytvářet výzkumné týmy, které přispívají k poznatkům o CML LSC, které umožní v budoucnu reziduální nemoc terapeuticky překonávat.

9. Literatura

- Abraham SA, Hopcroft LE, Carrick E, et al. Dual targeting of p53 and c-MYC selectively eliminates leukaemic stem cells. *Nature*. 2016, 534:341.
- Agirre X, Jiménez-Velasco A, José-Enériz ES, et al. Downregulation of hsa-miR-10a in chronic myeloid leukemia CD34+ cells increases USF2-mediated cell growth. *Mol Cancer Res*. 2008;6:1830–40.
- Apperley J. Part I: Mechanisms of resistance to imatinib in chronic myeloid leukaemia *Lancet Oncol*. 2007;8:1018–29.
- Alikian M, Ellery P, Forbes M, et al. Next-Generation Sequencing-Assisted DNA-Based Digital PCR for a Personalized Approach to the Detection and Quantification of Residual Disease in Chronic Myeloid Leukemia Patients. *J Mol Diagn*. 2016;18(2):176-89.
- Baccarani M, Cortes J, Pane F, et al. Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet. *J Clin Oncol*. 2009;27:6041-6051.
- Baccarani M, Deininger MW, Rosti G, et al. European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. *Blood*. 2013;122(6):872-84.
- Baccarani M, Castagnetti F, Gugliotta G, et al. A review of the European LeukemiaNet recommendations for the management of CML. *Ann Hematol*. 2015;94:S141-7.
- Beillard E, Pallisgaard N, van der Velden VH et al. Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) - a Europe against cancer program. *Leukemia*. 2003;17(12):2474-2486.
- Bonifazi F, de Vivo A, Rosti G, et al. European Study Group on Interferon in Chronic Myeloid Leukemia: Chronic myeloid leukemia and interferon-alpha: a study of complete cytogenetic responders. *Blood*. 2001;98:3074-3081.
- Branford S, Cross NCP, Hochhaus A, et al. Rationale for the recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts in patients with chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2006;20:1925-1930.
- Branford S, Fletcher L, Cross CP, et al. Desirable performance characteristics for BCR-ABL measurement on an international reporting scale to allow consistent interpretation of individual patient response and comparison of response rates between clinical trials. *Blood*. 2008;112:3330-3338.
- Branford S, Rudzki Z, Parkinson I, et al. Real-time quantitative PCR analysis can be used as a primary screen to identify patients with CML treated with imatinib who have BCR-ABL kinase domain mutations. *Blood*. 2004;104:2926-2932.
- Branford S, Yeung DT, Parker WT, et al. Prognosis for patients with CML and >10% BCR-ABL1 after 3 months of imatinib depends on the rate of BCR-ABL1 decline. *Blood*. 2014;124(4):511-8.
- Broxmeyer HE, Hoggatt J, O'Leary HA, et al. Dipeptidylpeptidase 4 negatively regulates colonystimulating factor activity and stress hematopoiesis. *Nat Med*. 2012;18:1786–96.
- Bustin SA, Benes V, Garson JA, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*. 2009;55(4):611-22.
- Calin GA, Croce CM. Chronic lymphocytic leukemia: interplay between noncoding RNAs and protein-coding genes. *Blood*. 2009;114(23):4761-4770.

- Campbell PJ, Pleasance ED, Stephens PJ, et al. Subclonal phylogenetic structures in cancer revealed by ultra-deep sequencing. *PNAS*. 2008;105:13081–13086
- Campbell TB, Hangoc G, Liu Y, et al. Inhibition of CD26 in human cord blood CD34+ cells enhances their engraftment of nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency mice. *Stem Cells Dev*. 2007;16:347–54.
- Chang TC, Yu D, Lee YS, et al. Widespread microRNA repression by Myc contributes to tumorigenesis. *Nat Genet*. 2008;40:43.
- CML Trialists' Collaborative Group. Interferon versus chemotherapy for chronic myeloid leukaemia: an overview of the randomised trials. *J Natl Cancer Inst*. 1997;89:1616-1620.
- Cortes J, Rousselot P, Kim DW, et al. Dasatinib induces complete hematologic and cytogenetic responses in patients with imatinib-resistant or -intolerant chronic myeloid leukemia in blast crisis. *Blood*. 2007;109:3207-3213.
- Cortes JE, Kantarjian HM, Brummendorf TH, et al. Safety and efficacy of bosutinib (SKI-606) in chronic phase chronic Ph+ CML patients with resistance or intolerance to imatinib. *Blood*. 2011;118:4567-4576.
- Cortes JE, Kim DW, Pinilla-Ibarz J, et al. A phase 2 trial of ponatinib in Philadelphia chromosome-positive leukemias. *N Engl J Med*. 2013;369(19):1783-96.
- Cross NC, Hochhaus A, Muller MC. Molecular monitoring of chronic myeloid leukemia: principles and interlaboratory standardization. *Ann Hematol*. 2015; 94(2): S219–S225.
- Cross NC, Melo JV, Feng L, et al. An optimized multiplex polymerase chain reaction (PCR) for detection of BCR-ABL fusion mRNAs in haematological disorders. *Leukemia*. 1994;8(1):186-189.
- de Veer MJ, Holko M, Frevel M, et al. Functional classification of interferon-stimulated genes identified using microarrays. *Journal of Leukocyte Biology*. 2001;69, 912-920.
- Deininger M, Buchdunger E, Druker BJ. The development of imatinib as a therapeutic agent for chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2005;105:2640-2653.
- Deininger MW, McGreevey L, Willis S, et al. Detection of ABL kinase domain mutations with denaturing high-performance liquid chromatography. *Leukemia*. 2004;18:864–71.
- Delmore JE, Issa GC, Lemieux M, et al. BET bromodomain inhibition as a therapeutic strategy to target c-Myc. *Cell*. 2011;146(6):904-917.
- Druker BJ, Guilhot F, O'Brien SG, et al. Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *N Eng J Med*. 2006;355:2308-2417.
- Faber E, Indrák K: *Chronická myeloidní leukémie*. 2010; 1st ed., Galén, Praha, 234. ISBN 978-80-7262-680-9.
- Fialkow PJ, Martin PJ, Najfeld V, et al. Evidence for a multistep pathogenesis of chronic myelogenous leukemia. *Blood*. 1981;58:158-163.
- Flamant S, Ritchie W, Guilhot J, et al. Micro-RNA response to imatinib mesylate in patients with chronic myeloid leukemia. *Haematologica*. 2010;95:1325–33.
- Geissler J, Sharf G, Bombaci F, et al. Factors influencing adherence in CML and ways to J Cancer Res Clin Oncol. 2017;143(7):1167-1176.
- Goldman JM, Melo JV. Targeting the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2001;344:1084-1086.
- Groffen, Stephenson JR, Heisterkamp N, et al. Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. *Cell*, 1984;36:93-99.

- Grossmann V, Roller A, Klein HU, Weissmann S, et al. Robustness of amplicon deep sequencing underlines its utility in clinical applications. 2013. *J Mol Diagn* 15:473–484.
- Guilhot F, Chastang C, Michallet M, et al. Interferon alfa-2b combined with cytarabine versus interferon alone in chronic myelogenous leukemia. *N Engl J Med*. 1997;337:223-229.
- Hamilton A, Helgason GV, Schemionek M, et al. Chronic myeloid leukemia stem cells are not dependent on Bcr-Abl kinase activity for their survival. *Blood*. 2012;119(6):1501-1510.
- Hanfstein B, Mueller MC, Hehlmann R, et al. Early molecular and cytogenetic response is predictive for long-term progression-free and overall survival in chronic myeloid leukemia (CML). *Leukemia*. 2012;26:2096–2102.
- Hanfstein B, Shlyakhto V, Lauseker M, et al. Velocity of early BCR-ABL transcript elimination as an optimized predictor of outcome in chronic myeloid leukemia (CML) patients in chronic phase on treatment with imatinib. *Leukemia*. 2014;28:1988–1992.
- Hasford J, Baccarani M, Hoffmann V, et al. Predicting complete cytogenetic response and subsequent progression-free survival in 2060 patients with CML on imatinib treatment: the EUTOS score. *Blood*. 2011;118(3):686-692.
- Hasford J, Pfirrmann M, Hehlmann R, et al. A new prognostic score for survival of patients with chronic myeloid leukemia treated with interferon alfa. Writing Committee for the Collaborative CML Prognostic Factors Project Group. *J Natl Cancer Inst*. 1998;90:850–858.
- Hehlmann R, Heimpel H, Hasford J., et al. Randomized comparison of interferon-alpha with busulfan and hydroxyurea in chronic myelogenous leukemia. The German CML Study Group. *Blood*. 1994;84:4064-4077.
- Hehlmann R, Hochhaus A, Baccarani M, European LeukemiaNet: Chronic myeloid leukaemia. *Lancet*. 2007;370:342-350.
- Heisterkamp N, Stephenson JR, Groffen J, et al. Localization of the c-abl oncogene adjacent to a translocation breakpoint in chronic myelocytic leukaemia. *Nature*. 1983;306:239-242.
- Herrmann H, Sadovnik I, Cerny-Reiterer S, et al. Dipeptidylpeptidase IV (CD26) defines leukemic stem cells (LSC) in chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2014;123(25):3951-62
- Herrmann MG, Durtschi JD, Bromley LK, et al. Amplicon DNA melting analysis for mutation scanning and genotyping: cross-platform comparison of instruments and dyes. *Clin Chem*. 2006;52:494–503.
- Hesselson SE, Matsson P, Shima JE, et al. Genetic variation in the proximal promoter of ABC and SLC superfamilies: liver and kidney specific expression and promoter activity predict variation. *PLoS ONE*. 2009;4:e6942.
- Hochhaus A, Dreyling M. Chronic myelogenous leukemia: ESMO Clinical Recommendations for the diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2008;19:63-64.
- Hochhaus A, Kantarjian HM, Baccarani M, et al. Dasatinib induces notable hematologic and cytogenetic responses in chronic-phase chronic myeloid leukemia after failure of imatinib therapy. *Blood*. 2007;109(6):2303-9.
- Hochhaus A, Larson RA, Guilhot F, et al. Long-Term Outcomes of Imatinib Treatment for Chronic Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 2017;376(10):917-927.

- Hochhaus A, O'Brien SG, Guilhot F, et al. Six-year follow-up of patients receiving imatinib for the first-line treatment of chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2009;23:1054-1061.
- Hochhaus A, Rosti G, Cross NC, et al. Frontline nilotinib in patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase: results from the European ENEST1st study. *Leukemia*. 2016;30(1):57-64.
- Holtz MS, Slovak ML, Zhang F, et al. Imatinib mesylate (STI571) inhibits growth of primitive malignant progenitors in chronic myelogenous leukemia through reversal of abnormally increased proliferation. *Blood*. 2002; 99(10):3792-800.
- Holyoake TL, Vetrie D. The chronic myeloid leukemia stem cell: stemming the tide of persistence. *Blood*. 2017;129(12):1595-1606.
- Hughes T, Deininger M, Hochhaus A, et al. Monitoring CML patients responding to treatment with TKIs. *Blood*. 2006;108:28-37.
- Christopherson KW, Uralil SE, Porecha NK, et al. G-CSF- and GM-CSF-induced upregulation of CD26 peptidase downregulates the functional chemotactic response of CD34+CD38- human cord blood hematopoietic cells. *Exp Hematol*. 2006;34:1060-8.
- Chu S, McDonald T, Lin A, et al. Persistence of leukemia stem cells in chronic myelogenous leukemia patients in prolonged remission with imatinib treatment. *Blood*. 2011;118:5565-5572.
- Italian Cooperative Study Group on Chronic Myeloid Leukemia. Long-term follow-up of the Italian trial of interferon- α versus conventional chemotherapy in chronic myeloid leukemia. *Blood*. 1998;92:1541-1548.
- Jabbour E, Deininger M, Hochhaus A. Management of adverse events associated with tyrosine kinase inhibitors in the treatment of chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2011;25(2):201-210.
- Jabbour E, Kantarjian H, Jones D, et al. Frequency and clinical significance of BCR-ABL mutations in patients with chronic myeloid leukemia treated with imatinib mesylate. *Leukemia*. 2006;20(10):1767-73.
- Jamieson CH, Ailles LE, Dylla SJ, et al. Granulocyte-macrophage progenitors as candidate leukemic stem cells in blast-crisis CML. *N Engl J Med*. 2004;351(7):657-67.
- Kanehisa M, Goto S, Furumichi M, et al. KEGG for representation and analysis of molecular networks involving diseases and drugs. *Nucleic Acids Res* 2010.38:D355-D360.
- Kantarjian H, Shah NP, Hochhaus A, et al. Dasatinib versus imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *J Engl J Med*. 2010;362:2260-2270.
- Kantarjian H, Schiffer C, Jones D, et al. Monitoring the response and course of chronic myeloid leukemia in the modern era of BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors: practical advice on the use and interpretation of monitoring methods. *Blood*. 2008;111:1774-1780.
- Kantarjian HM, Giles F, Gattermann N, et al. Nilotinib (formerly AMN107), a highly selective BCR-ABL tyrosine kinase inhibitor, is effective in patients with Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia in chronic phase following imatinib resistance and intolerance. *Blood*. 2007;110:3540-3546.
- Kantarjian HM, Hochhaus A, Saglio G, et al. Nilotinib versus imatinib for the treatment of patients with newly diagnose chronic phase chronic myeloid leukemia ENEST trial. *Lancet Oncol*, 2011,12,841-851.

- Kantarjian HM, O'Brien S, Smith TL, et al. Treatment of Philadelphia chromosome-positive early chronic phase chronic myelogenous leukemia with daily doses of interferon alpha and low-dose cytarabine. *J Clin Oncol*. 1999;17:284-292.
- Khorashad JS, Anand M, Marin D, et al. The presence of a BCR-ABL mutant allele in CML does not always explain clinical resistance to imatinib. *Leukemia*. 2006;20:658–63.
- Kluiver J, Poppema S, de Jong D, et al. BIC and miR-155 are highly expressed in Hodgkin, primary mediastinal and diffuse large B cell lymphomas. *The Journal of pathology*. 2005;207(2):243-249.
- Kohlmann A, Klein HU, Weissmann S, et al. The Interlaboratory RObustness of Nextgeneration sequencing (IRON) study: a deep sequencing investigation of TET2, CBL and KRAS mutations by an international consortium involving 10 laboratories. *Leukemia*. 2011;25(12):1840-1848.
- Konopka JB, Watanabe SM, Witte ON. An alteration of the human c-abl protein in K562 leukemia cells unmasks associated tyrosine kinase activity. *Cell*. 1984; 37:1035-1042.
- Kreuzer KA, le Coutre P, Landt O, et al. Preexistence and evolution of imatinib mesylate-resistant clones in chronic myelogenous leukemia detected by a PNA-based PCR clamping technique. *Ann Hematol*. 2003;82:284–96.
- Krumbholz M, Karl M, Tauer JT et al. Genomic BCR-ABL1 breakpoints in pediatric chronic myeloid leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*. 2012;51:1045–53.
- La Rosee P, Deininger MW. Resistance to imatinib: mutations and beyond. *Seminars in hematology*. 2010;47:335-343.
- Lidonnici MR, Corradini F, Waldron T, et al. Requirement of c-Myb for p210(BCR/ABL)-dependent transformation of hematopoietic progenitors and leukemogenesis. *Blood*. 2008;111(9):4771-4779.
- Lion T, Izraeli S, Henn T, et al. Monitoring of residual disease in chronic myelogenous leukemia by quantitative polymerase chain reaction. *Leukemia*. 1992;6:495–499.
- Machova Polakova K, Koblihova J, Stopka T. Role of epigenetics in chronic myeloid leukemia. *Curr Hematol Malig Rep*. 2013;8(1):28-36.
- Marin D, Ibrahim AR, Lucas C, et al. Assessment of BCR-ABL1 transcript levels at 3 months is the only requirement for predicting outcome for patients with chronic myeloid leukemia treated with tyrosine kinase inhibitors. *J Clin Oncol*. 2012;30(3):232-8.
- Moravcová J, Lukášová M, Starý J, et al. Simple competitive two-step RT-PCR assay to monitor minimal residual disease in CML patients after bone marrow transplantation. *Leukemia*. 1998;12(8):1303-12.
- Müller MC, Cross NCP, Erben P, et al. Harmonization of molecular monitoring of CML therapy in Europe. *Leukemia*. 2009;23:1957-1963.
- Müller MC, Erben P, Saglio G, et al. Harmonization of BCR-ABL mRNA quantification using a uniform multifunctional control plasmid in 37 international laboratories. *Leukemia* 2008;22:96-102.
- Narayan N, Morenos L, Phipson B, et al. Functionally distinct roles for different miR-155 expression levels through contrasting effects on gene expression, in acute myeloid leukaemia. *Leukemia*. 2017;31(4):808-820.
- NCCN. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. NCCN Chronic Myelogenous Leukemia Guidelines Vers 4. NCCN; 2013.
- Nowel PC, Hungerford DA. A minute chromosome in human granulocytic leukemia. *Science*. 1960;132:1497.

- O'Connell RM, Rao DS, Chaudhuri AA, et al. Sustained expression of microRNA-155 in hematopoietic stem cells causes a myeloproliferative disorder. *The Journal of experimental medicine*. 2008;205(3):585-594.
- Press RD, Love Z, Tronnes AA, et al. BCR-ABL mRNA levels at and after the time of a complete cytogenetic response (CCR) predict the duration of CCR in imatinib mesylate treated patients with CML. *Blood*. 2006;107:4250-4256.
- Quintas-Cardama A, Kantarjian HM, Cortes JE. Mechanisms of primary and secondary resistance to imatinib in chronic myeloid leukemia. *Cancer Control*. 2009;16(2):122-31.
- Roche-Lestienne C, Soenen-Cornu V, Gardel-Duflos N, et al. Several types of mutations of the ABL gene can be found in chronic myeloid leukemia patients resistant to STI571, and they can pre-exist to the onset of treatment. *Blood*. 2002;100:1014-8.
- Rokah OH, Granot G, Ovcharenko A, et al. Downregulation of miR-31, miR-155, and miR-564 in chronic myeloid leukemia cells. *PloS one*. 2012;7(4):e35501.
- Ross DM, Branford S, Seymour JF, et al. Patients with chronic myeloid leukemia who maintain a complete molecular response after stopping imatinib treatment have evidence of persistent leukemia by DNA PCR. *Leukemia*. 2010;24:1719-1724.
- Rowley JD. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature*. 1973;243:290-293.
- Saglio G, Kim DW, Issaragrisil S, et al. Nilotinib versus imatinib for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *J Engl J Med*. 2010;362:2251-2259.
- Saussele S, Richter J, Guilhot J, et al. "Duration of Deep Molecular Response" Has Most Impact on the Success of Cessation of Tyrosine Kinase Inhibitor Treatment in Chronic Myeloid Leukemia - Results from the EURO-SKI Trial. *Blood*. 2017;130:313.
- Sokal JE, Cox EB, Baccarani M, et al. Prognostic discrimination in 'good-risk' chronic granulocytic leukemia. *Blood*. 1984;63:789-799.
- Sorel N, Chazelas F, Brizard A, et al. Double-gradientdenaturing-gel electrophoresis for mutation screening of the BCR-ABL tyrosine kinase domain in chronic myeloid leukemia patient. *Clin Chem*. 2005;51:1263-6.
- Soverini S, Hochhaus A, Nicolini FE, et al. BCR-ABL kinase domain mutation analysis in chronic myeloid leukemia patients treated with tyrosine kinase inhibitors: recommendations from an expert panel on behalf of European LeukemiaNet. *Blood*. 2011;118:1208-15.
- Todd RF, Cooney KA, Hayes TG, et al. *Tumor Board Review, Second Edition: Guideline and Case Reviews in Oncology*. 2015; 2nd ed., Demos Medical Publishing, New York, 372.
- Toman O, Kabickova T, Vit O, et al. Proteomic analysis of imatinib-resistant CML-T1 cells reveals calcium homeostasis as a potential therapeutic target. *Oncol Rep*. 2016;36(3):1258-68.
- Valent P, Sadovnik I, Ráčil Z, et al. DPPIV (CD26) as a novel stem cell marker in Ph+ chronic myeloid leukaemia. *Eur J Clin Invest*. 2014;44(12):1239-45.
- Vigorito E, Perks KL, Abreu-Goodger C, et al. microRNA-155 regulates the generation of immunoglobulin class-switched plasma cells. *Immunity*. 2007;27(6):847-859.

- Vivante A, Amariglio N, Koren-Michowitz M, et al. High-throughput, sensitive and quantitative assay for the detection of BCR-ABL kinase domain mutations. *Leukemia*. 2007;21:1318–21.
- Vogelstein B, Kinzler KW. Digital PCR. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(16):9236–41.
- Volinia S, Calin GA, Liu CG, et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *PNAS*. 2006;103(7):2257–2261.
- White HE, Matejtschuk P, Rigsby P, et al. Establishment of the first World Health Organization International Genetic Reference Panel for quantitation of BCR-ABL mRNA. *Blood*. 2010;116:e111–e117.
- Willis S, Lange T, Demehri S, et al. High sensitivity detection of BCR-ABL kinase domain mutation in imatinib-naive patient: correlation with clonal cytogenetic evolution but not response therapy. *Blood*. 2005;106:2128–37.
- Witts LJ. Chronic granulocytic leukaemia: comparison of radiotherapy and busulphan therapy. Report of the Medical Research Council's working party for therapeutic trials in leukaemia. *British Medical Journal*. 1968;1:201–208.
- Wolff L, Schmidt M, Koller R, et al. Three genes with different functions in transformation are regulated by c-Myb in myeloid cells. *Blood cells, molecules & diseases*. 2001;27(2):483–488.
- Zackova D, Klamova H, Dusek L, et al. Imatinib as the first-line treatment of patients with chronic myeloid leukemia diagnosed in the chronic phase: Can we compare real life data to the results from clinical trials? *Am J Hematol*. 2011; 86:318–321.

Pro tuto práci jsem rovněž čerpala a vycházela ze souhrnů, které jsem spolu s kolegy publikovala (1-3) a rovněž ze souhrnu kolegyně Dr. Klamové (4):

- 1) **Machová Poláková K**, Zemanová K, Soucková M, et al. *Molekulární genetika v diagnostice a léčbě chronické myeloidní leukemie*. 2012, *Vnitřní lék*, 58, p2S27–2S37.
- 2) Zemanová K, Žižková H, Jurček T, Dvořáková D, Zach J., Polívková V, Vlčanová K, Divoká M, Křupková L, Hrochová K, Karas M, **Machová Poláková K**. Chronická myeloidní leukemie – standardizace molekulárního monitorování hladiny transkriptů BCR-ABL1 v České republice. *Transfuzie Hematol. Dnes*, 22, 2016, No. 1, p. 56–64
- 3) Jarošová M, Moravcová J, **Machová Poláková K** Cytogenetika a molekulární genetika. V knize Faber E, Indrák K. *Chronická myeloidní leukémie*. Praha: Galén, c2010, s. 29–50. ISBN 978-80-7262-680-9.

- 4) Klamová H. Chronická myeloidní leukémie – zásadní změna prognózy nemocných po zavedení léčby inhibitory tyrozinových kináz. 2012, Vnitřní lék, 58, p2S27-2S37.

10. Přílohy

Příloha 1. Poláková KM, Polívková V, Rulcová J, Klamová H, Jurcek T, Dvoráková D, Zácková D, Pospíšil Z, Mayer J, Moravcová J. Constant BCR-ABL transcript level $\geq 0.1\%$ (IS) in patients with CML responding to imatinib with complete cytogenetic remission may indicate mutation analysis. *Exp Hematol.* 2010;38(1):20-6.

Příloha 2. Poláková KM, Lopotová T, Klamová H, Moravcová J. High-resolution melt curve analysis: initial screening for mutations in BCR-ABL kinase domain. *Leuk Res.* 2008;32(8):1236-43.

Příloha 3. Soverini S, De Benedittis C, **Machova Polakova K**, Brouckova A, Horner D, Iacono M, Castagnetti F, Gugliotta G, Palandri F, Papayannidis C, Iacobucci I, Venturi C, Bochicchio MT, Klamova H, Cattina F, Russo D, Bresciani P, Binotto G, Giannini B, Kohlmann A, Haferlach T, Roller A, Rosti G, Cavo M, Baccarani M, Martinelli G. Unraveling the complexity of tyrosine kinase inhibitor-resistant populations by ultra-deep sequencing of the BCR-ABL kinase domain. *Blood.* 2013;122(9):1634-48.

Příloha 4. Machova Polakova K, Kulvait V, Benesova A, Linhartova J, Klamova H, Jaruskova M, de Benedittis C, Haferlach T, Baccarani M, Martinelli G, Stopka T, Ernst T, Hochhaus A, Kohlmann A, Soverini S. Next-generation deep sequencing improves detection of BCR-ABL1 kinase domain mutations emerging under tyrosine kinase inhibitor treatment of chronic myeloid leukemia patients in chronic phase. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2015;141(5):887-99.

Příloha 5. Polivkova V, Rohon P, Klamova H, Cerna O, Divoka M, Curik N, Zach J, Novak M, Marinov I, Soverini S, Faber E, **Machova Polakova K**. Interferon- α Revisited: Individualized Treatment Management Eased the Selective Pressure of Tyrosine Kinase Inhibitors on BCR-ABL1 Mutations Resulting in a Molecular Response in High-Risk CML Patients. *PLoS One.* 2016;23:11(5):e0155959.

Příloha 6. Jaruskova M, Curik N, Hercog R, Polivkova V, Motlova E, Benes V, Klamova H, Pecherkova P, Belohlavkova P, Vrbacky F, **Machova Polakova K.** Genotypes of SLC22A4 and SLC22A5 regulatory loci are predictive of the response of chronic myeloid leukemia patients to imatinib treatment. *J Exp Clin Cancer Res.* 2017;36(1):55.

Příloha 7. Kateřina Machová Poláková, Tereza Lopotová, Hana Klamová, Pavel Burda, Marek Trněný, Tomáš Stopka, Jana Moravcová. Expression pattern of microRNAs associated with CML phases and disease related targets. *Molecular Cancer.* 2011;10:41.

Příloha 8. Srutova K, Curik N, Burda P, Savvulidi F, Silvestri G, Trotta R, Klamova H, Pecherkova P, Sovova Z, Koblihova J, Stopka T, Perrotti D, **Machova Polakova K.** BCR-ABL1 mediated miR-150 downregulation through MYC contributed to myeloid differentiation block and drug resistance in chronic myeloid leukemia. Submitted to *Haematologica*

Příloha 9. - Linhartova J, Hovorkova L, Soverini S, Benesova A, Jaruskova M, Klamova H, Zuna J, **Machova Polakova K.** Characterization of 46 patient-specific BCR-ABL1 fusions and detection of SNPs upstream and downstream the breakpoints in chronic myeloid leukemia using next generation sequencing. *Mol Cancer.* 2015; Apr 18;14:89.

Příloha 10. White H, Deprez L, Corbisier P, Hall V, Lin F, Mazoua S, Trapmann S, Aggerholm A, Andrikovics H, Akiki S, Barbany G, Boeckx N, Bench A, Catherwood M, Cayuela JM, Chudleigh S, Clench T, Colomer D, Daraio F, Dulucq S, Farrugia J, Fletcher L, Foroni L, Ganderton R, Gerrard G, Gineikienė E, Hayette S, El Housni H, Izzo B, Jansson M, Johnels P, Jurcek T, Kairisto V, Kizilors A, Kim DW, Lange T, Lion T, **Polakova KM,** et al. A certified plasmid reference material for the standardisation of BCR-ABL1 mRNA quantification by real-time quantitative PCR. *Leukemia.* 2015;29(2):369-76.

Příloha 11. Cross NC, White HE, Ernst T, Welden L, Dietz C, Saglio G, Mahon FX, Wong CC, Zheng D, Wong S, Wang SS, Akiki S, Albano F, Andrikovics H, Anwar J, Balatzenko G, Bendit I, Beveridge J, Boeckx N, Cerveira N, Cheng SM, Colomer D, Czurda S, Daraio F, Dulucq S, Eggen L, El Housni H, Gerrard G, Gniot M, Izzo B, Jacquin D, Janssen JJ, Jeromin S, Jurcek T, Kim DW, **Machova-Polakova K,** et al.

Development and evaluation of a secondary reference panel for BCR-ABL1 quantification on the International Scale. *Leukemia*. 2016;30(9):1844-52.

Příloha 12. Klamová H, **Poláková KM**, Mužík J, et al. Evaluation of 5-year imatinib treatment of 458 patients with CP-CML in routine clinical practice and prognostic impact of different BCR-ABL cutoff levels. *Cancer Med*. 2013;2(2):216-25.

Příloha 13. Cross NC, White HE, Colomer D, Ehrencrona H, Foroni L, Gottardi E, Lange T, Lion T, **Machova Polakova K**, et al. Laboratory recommendations for scoring deep molecular responses following treatment for chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2015;29(5):999-1003.