

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Imunologie

Studijní obor: Imunologie



Mgr. Václava Polívková

Mechanismy rezistence k inhibitorům tyrozin kináz při léčbě pacientů
s chronickou myeloidní leukemií

Mechanisms of resistance to tyrosin kinase inhibitors in treatment of patients
with chronic myeloid leukemia

Typ závěrečné práce:

Disertační práce

Školitel: doc. Mgr. Kateřina Machová Poláková Ph.D.

Praha, 2020

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze 25. 6. 2020

Podpis

Poděkování:

Ráda bych poděkovala svojí školitelce doc. Mgr. Kateřině Machové Polákové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, trpělivost a přátelský přístup. Děkuji svému kolegovi RNDr. Nikolovi Čuříkovi, Ph.D. za spolupráci, rady a obohacující vědecké diskuze. Děkuji všem svým milým kolegům z Oddělení molekulární genetiky ÚHKT a svojí rodině.

Chtěla bych zde také poděkovat svojí kolegyni Mgr. Janě Karavdič, která bohužel v průběhu mého studia prohrála svůj boj s rakovinou. Děkuji za čas, který jsem s ní mohla strávit a za zprostředkování hlubšího smyslu výzkumu biologické podstaty všech nádorových onemocnění.

Mechanismy rezistence k inhibitorům tyrozin kináz při léčbě pacientů s chronickou myeloidní leukemií

Zavedení léčby inhibitory tyrozin kináz (TKI) znamenalo průlom v léčbě pacientů s chronickou myeloidní leukemií (CML). I přes velkou úspěšnost této terapie se u 20 až 30 % pacientů rozvíjí rezistence k této léčbě. Cílem této práce bylo za využití *in vitro* CML modelu sledovat mechanismy související s rozvojem mutací v kinázové doméně (KD) BCR-ABL1 a případně jiných genech, které jsou zodpovědné za rezistenci k TKI. Dále byl sledován vliv střídavé terapie interferonem alfa (IFN- α) a TKI na zastoupení klonů s multirezistentní mutací a role aktivace imunitního systému v dosažení léčebných odpovědí na tomto typu léčby. Jako poslední byla studována možnost využití měření exprese transportérů hOCT1 a ABCB1 v době určení diagnózy u pacientů s CML jako prediktivního markeru odpovědi na léčbu imatinibem.

Buňky CML buněčné linie KCL-22 jsou po vystavení účinku imatinibu schopny opakovaně vyvíjet mutace v KD BCR-ABL1. Na klonech odvozených od kultury KCL-22 jsme prokázali existenci *de novo* mutagenese. U čtyř klonů KCL-22, které byly schopny proliferovat v prostředí s 4 μ M imatinibem, došlo k vývoji mutací v KD BCR-ABL1, nebo KRAS. Vývoj mutací byl asociován se změnou exprese genů účastnících se odpovědi buněk na poškození DNA a jejich oprav. V klonech KCL-22 vyvíjejících mutace jsme v porovnání s kontrolními klony KCL-22 pozorovali zvýšení exprese genů alternativní dráhy nehomologního spojování konců (alt-NHEJ), která je spojována s vyšší chybovostí oproti kanonické NHEJ dráze. Konkrétně jsme pozorovali zvýšenou expresi DNA Ligázy I a genu *PARP*, naopak byla snížena exprese DNA Ligázy IV.

Multirezistentní mutace T315I v KD BCR-ABL1 nebo kompozitní mutace představují léčebný problém u pacientů v případech, kde není možné z důvodu komorbidit použít ponatinib nebo provést transplantaci kmenových hematopoetických buněk (HSCT). Využití střídavé nebo kombinované terapie TKI s IFN- α spolu se sledováním dynamiky mutovaných klonů pomocí vysoce citlivé metody sekvenování nové generace (NGS) nabízí efektivní alternativní léčebný přístup. Ve skupině takto léčených pacientů došlo k poklesu přítomnosti multirezistentní mutace na úrovni RNA do nedetekovatelnosti a dosažení hlubokých molekulárních odpovědí u 4/6 pacientů. Sledování imunitních profilů u těchto pacientů ukázalo zvýšené hladiny NK buněk,

naznačující imunitní aktivaci. Nejvíce patrná byla aktivace v případě, že byl jako předchozí TKI využit dasatinib známý svým imunoaktivačním efektem.

Intracelulární koncentrace imatinibu je ovlivňována funkcí membránových přenašečů. Jejich nedostatečná funkce má za následek subletální intracelulární koncentraci imatinibu, která nedostatečně inhibuje BCR-ABL1 protein. Snížení exprese/aktivity hOCT1 nebo zvýšení exprese/aktivity ABCB1 napomáhá snížení intracelulární koncentrace. Sledovali jsme expresi genů *hOCT1* a *ABCB1* u CML pacientů v době určení diagnózy v souvislosti se schopností dosažení optimálních odpovědí na léčbě imatinibem. Míra exprese *hOCT1* ani *ABCB1* v době diagnózy nepředpovídá schopnost dosažení odpovědí na terapii imatinibem v 6 a 12 měsících a neukázala se jako vhodný prognostický marker pro předpověď úspěšnosti terapie. Exprese *hOCT1* a *ABCB1* je ovlivněna přítomností nezralých buněčných forem myeloidní vývojové řady v analyzovaných vzorcích, které mají nižší expresi obou testovaných transportérů.

Mechanisms of resistance to tyrosin kinase inhibitors in treatment of patients with chronic myeloid leukemia

The introduction of tyrosine kinase inhibitor (TKI) therapy represented a breakthrough in the treatment of patients with chronic myeloid leukemia (CML). Despite a high success rate of the TKI therapy, 20-30 % of patients develop resistance to the treatment. The aim of this work was to study the mechanisms, related to the mutation development in BCR-ABL1 kinase domain (KD) or in the other genes responsible for TKI resistance, using the *in vitro* CML models. Furthermore, the effect of interferon alpha (IFN- α) and TKI sequential therapy on the presence of clones with multidrug-resistant mutations and a role of activation the immune response in achieving the treatment response were followed. Lastly, we studied the possibility of using the measurement of gene expression of hOCT1 and ABCB1 transporters at the time of diagnosis in CML patients as a predictive marker of the imatinib treatment response.

KCL-22 CML cell line cells exposed to imatinib were repeatedly able to develop BCR-ABL1 kinase domain mutations. We demonstrated the existence of *de novo* mutagenesis in clones derived from the KCL-22 cell line. In four clones, which can proliferate in 4 μ M imatinib, mutations in BCR-ABL1 KD or KRAS were developed. The development of mutations was associated with changes of expression of genes involved in DNA damage and DNA repair signaling pathways. We observed an increased expression of alternative NHEJ pathway genes in clones that were able to develop mutations compared to control clones. The alternative NHEJ repair pathway is more error prone compare to the canonical NHEJ pathway. We showed a higher expression of DNA Ligase I and *PARP* gene and lower expression of DNA Ligase IV in clones developing the mutations.

The multi-resistant mutation T315I and compound mutations are known therapy complication when is not possible to use ponatinib or alloHSCT due to comorbidities. Using sequential therapy TKI and IFN- α or its combination together with the next generation sequencing (NGS) monitoring of the presence of the mutated clone showed an effective possibility for management of these complicated cases. In four of 6 patients, this type of therapy resulted in the decrease of mutated BCR-ABL1 transcript to undetectable level and achievement of deep molecular response. Immuno-profiling of these patients

showed an increased levels of NK cells indicating the immunoactivation, which was the most visible in patients with dasatinib as the previous therapy before IFN- α .

An intracellular concentration of imatinib is affected by the activity of membrane transporters. Insufficient function of transporters led to a sublethal intracellular concentration of imatinib, which is not able effectively inhibit BCR-ABL1 protein. The decreased expression/activity of hOCT1 and increased expression/activity of ABCB1 helps to reduce the intracellular imatinib concentration. We measured the expression of *hOCT1* and *ABCB1* in samples of CML patients at the time of diagnosis in relation to the ability to achieve an optimal response to the imatinib therapy. Since expression levels of *hOCT1* and *ABCB1* at the time of diagnosis did not predict the achievement of optimal therapy response at 6 and 12 months on imatinib therapy, the expression level of *hOCT1* and *ABCB1* does not seem to be the appropriate predictive marker of the successful imatinib therapy. The total expression of both transporters is affected by the presence of immature myeloid cells in peripheral blood, in which is lower than in mature cells.

Obsah

OBSAH.....	9
1 LITERÁRNÍ ÚVOD.....	11
1.1 CHRONICKÁ MYELOIDNÍ LEUKEMIE.....	11
1.1.1 <i>BCR-ABL1 gen</i>	13
1.2 SIGNÁLNÍ DRÁHY OVLIVNĚNÉ BCR-ABL1	14
1.2.1 <i>JAK/STAT</i>	14
1.2.2 <i>PI3K/AKT</i>	14
1.2.3 <i>Ras/MAP</i>	15
1.2.4 <i>Src kinasy</i>	15
1.2.5 <i>Signální dráhy v kmenové leukemické buňce</i>	16
1.3 LÉČBA CML.....	17
1.4 IMUNOLOGIE CML.....	21
1.5 REZISTENCE K LÉČBĚ TKI.....	22
1.5.1 <i>Mutace v kinázové doméně BCR-ABL1</i>	24
1.5.2 <i>Mutageneze v leukemické buňce a epigenetické faktory ovlivňující rozvoj mutací</i>	28
1.5.3 <i>Genomová nestabilita CML buněk a vznik dalších chromozomálních abnormalit a mutací</i>	29
1.6 BUNĚČNÉ TRANSPORTÉRY Z RODIN ABC A SLC.....	31
1.6.1 <i>Transportéry rodiny SLC22 (hOCT)</i>	31
1.6.2 <i>Transportéry rodiny ABC</i>	33
2 CÍL PRÁCE:.....	35
2.1 SPECIFICKÉ CÍLE.....	35
3 MATERIÁL A METODY	36
3.1 BUNĚČNÉ LINIE	36
3.1.1 <i>BCR-ABL1 pozitivní buněčné linie</i>	36
3.1.2 <i>BCR-ABL1 negativní buněčné linie</i>	37
3.1.3 <i>Příprava klonů KCL-22</i>	37
3.2 VZORKY PACIENTŮ.....	37
3.3 METODY.....	38
3.3.1 <i>Izolace leukocytů z PK a příprava buněčných lysátů</i>	38
3.3.2 <i>Příprava buněčných lysátů a izolace NK z buněčných linií</i>	39
3.3.3 <i>Izolace RNA z trizolových lysátů a příprava cDNA</i>	39
3.3.4 <i>Analýzy genové exprese</i>	40
3.3.5 <i>Detekce mutací v kinázové doméně BCR-ABL1</i>	42

3.3.6	<i>Detekce mutací v genech nejčastěji mutovaných u myeloidních malignit</i>	45
3.3.7	<i>Průtoková cytometrie</i>	47
3.3.8	<i>Analýza proliferace a viability buněk</i>	48
3.3.9	<i>Cytogenetická analýza</i>	49
3.3.10	<i>Statistické metody</i>	49
4	VÝSLEDKY	50
4.1	CÍL 1	50
4.1.1	<i>Odvození CML buněčných linií rezistentních k léčbě imatinibem</i>	50
4.1.2	<i>Vývoj modelového systému pro studium rezistence vůči TKI:</i>	51
4.1.3	<i>Charakteristika linie KCL-22 pomocí mFISH analýzy</i>	52
4.1.4	<i>KCL-22 buněčná linie získává rezistenci k imatinibu rozvojem mutací v kinázové doméně BCR-ABL1 de novo</i>	52
4.2	CÍL 2	72
4.2.1	<i>Výsledky sledování dynamiky klonů s rezistentními mutacemi u pacientů v reakci na změnu léčby</i>	72
4.2.2	<i>Aktivace imunitního dohledu účinkem IFN-α a polevení selekčního tlaku TKI vedly k dosažení MMR a hlubokých MR u 4 z 6 sledovaných pacientů</i>	73
4.3	CÍL 3	78
4.3.1	<i>Zhodnocení možnosti využití sledování exprese buněčných transportérů hOCT1 a ABCB1 jako prognostických markerů rezistence k imatinibu</i>	78
4.3.2	<i>Exprese ABCB1 je ovlivněná působením imatinibu na Ph⁺ a Ph⁻ buňky</i>	83
4.3.3	<i>Schopnost dosažení optimální léčebné odpovědi v 6 a 12 měsících od zahájení léčby imatinibem nesouvisí s hladinou exprese ABCB1 a hOCT1 v době diagnózy</i>	86
5	DISKUZE	88
6	SHRNUTÍ	101
7	SEZNAM ZKRATEK	103
8	SEZNAM LITERATURY A ODKAZŮ	107
9	SEZNAM PŘÍLOH	124

1 Literární úvod

1.1 Chronická myeloidní leukemie

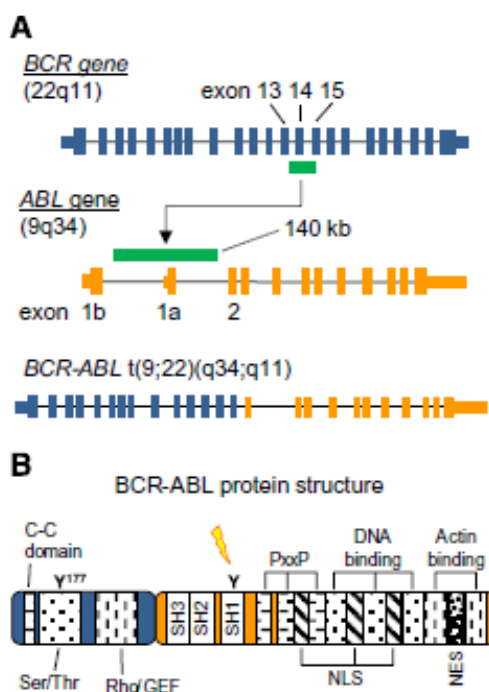
Chronická myeloidní leukemie (CML) je klonální myeloproliferativní onemocnění, které vzniká maligní transformací kmenové pluripotentní hematopoetické buňky. Molekulární podstata onemocnění, tzv. Filadelfský chromozom (Ph chromozom), pojmenovaný podle města objevu, byl popsán v roce 1960 Nowellem a Hungerfordem (Nowell P. C. a Hungerford D.A., 1960). J. D. Rowley v roce 1973 popsala vznik Ph chromozomu reciprokou translokací $t(9;22)(q34;q11)$ mezi dlouhými raménky obou chromozomů (Rowley J. D., 1973). Následně byl popsán fúzní gen *BCR-ABL1*, vznikající připojením velké části Abelson genu (*ABL1*), uložené na 9. chromozomu, do oblasti breakpoint cluster region (*BCR*) na chromozomu 22. Tyrozin kináza ABL1 ztrácí svoji přirozenou regulaci a je konstitutivně aktivní. Patologii napomáhá také změněná lokalizace chimérického proteinu v buňce. Na rozdíl od proteinů BCR a ABL1, které jsou převážně v jádře, se fúzní protein BCR-ABL1 vyskytuje převážně v cytoplazmě, kde může fosforylovat řadu substrátů. Patologická aktivace vede k deregulaci řady signálních drah. Dochází ke zvýšené proliferaci, snížené apoptóze, snížené adhezi myeloidních prekurzorových buněk ke stromálním buňkám kostní dřeně a nezávislosti na růstových faktorech (Goldman J. M. a Melo J.V., 2008). V pokročilejších stádiích nemoci dochází také k poruchám diferenciaci buněk. Všechny tyto patologické děje se u pacientů projevují nespecifickými příznaky, jako je zvýšená únava, dušnost, bolesti kloubů, kostí a zvýšená teplota. Z laboratorních nálezů je typická granulocytóza s posunem doleva. Incidence onemocnění celosvětově je 1,6 případů na 100 000 obyvatel (Cortes, J. E. 2016), v České republice 1,2 případů na 100 000 obyvatel. Pro onemocnění jsou typické tři fáze. Preneoplastická chronická fáze přechází bez léčby po 3-6 letech do akcelerované fáze. V akcelerované fázi je v krevním obraze výrazná leukocytóza a trombocytopenie. Blasty, nediferencované buňky, mohou tvořit 15-30 % buněk periferní krve. Terminální fáze onemocnění se nazývá blastický zvrát. V této fázi se CML podobá akutním leukemiím se špatnou prognózou a možnostmi léčby. Medián doby přežití blastického zvrátu bez účinné léčby jsou 2-4 měsíce. Blasty tvoří v této fázi více než 30 % buněk v periferní krvi. Myeloidní prekursorové mohou tvořit infiltráty také v lymfatických uzlinách, na kůži nebo v kostech. Podle převažujících prekurzorových buněk lze blastický zvrát rozdělit na myeloidní (60 %) a lymfoidní (30 %). Zbývajících 10 % tvoří vzácně se

vyskytující blastický zvrát do erytrocytární nebo megakaryocytární formy a zvraty smíšené (Kantarjian H. M., et al. 2002, Kantarjian H. M., et al. 2006). Většina případů onemocnění je odhalena v chronické fázi, záchyt až v akceleraci onemocnění a blastickém zvratu je v současné době ve vyspělých zemích spíše výjimečný. Avšak pacienti s primární či získanou rezistencí vůči TKI jsou ve vysokém riziku progresu onemocnění do blastického zvratu. Proto i v dnešní době zůstává preventivní přístup léčby jedinou možností předcházet blastickému zvratu, vůči kterému není zatím dostupná účinná léčba. Pochopení mechanismů rezistence vůči TKI a transformace CML z chronické fáze do blastického zvratu představuje zásadní téma výzkumu CML.

Zavedení léčby TKI, které cíleně blokuje aktivitu BCR-ABL1 kinázy, zásadně změnilo prognózu pacientů s CML a výrazně zvýšilo pravděpodobnost dosažení dlouhodobé optimální léčebné odpovědi. Stále se rozšiřující paleta TKI také umožňuje lépe překonávat nedostatečnou odpověď či intoleranci k užívanému typu TKI. Výsledky prvních studií sledujících úspěšnost léčby TKI ukázaly po šestiletém sledování 83 % případů bez progresu onemocnění s celkovým přežitím 88 % (Hochhaus A., et al. 2009). Po desetiletém sledování v Randomizované CML studii IV, zahrnující 956 pacientů, bylo pozorováno 82 % pacientů bez progresu onemocnění s celkovým přežitím 84 %. Osmdesát devět procent pacientů dosáhlo velké molekulární odpovědi (MMR), která je definována jako pokles hladiny transkriptu BCR-ABL1 $\leq 0,1$ % (IS) (Kalmanti L., et al. 2015). Dlouhodobá hluboká molekulární odpověď na TKI vedla u některých pacientů k vůbec prvnímu testování možnosti léčbu zcela vysadit (Mahon F., et al. 2010, Ross D. M., et al. 2013). S dalšími přibývajícími klinickými studii, včetně největší pan-evropské studie EURO-SKI (European Stop Tyrosine Kinase Inhibitor Study) se ukazuje, že ve 40-60 % případů dochází k molekulárnímu relapsu onemocnění, tj. ztrátě MMR (Mahon F., et al. 2010, Saussele S., et al. 2018). Spící CML kmenové buňky, které jsou rezistentní k TKI, jsou pravděpodobně zodpovědné za molekulární relapsy, pozorované u více než poloviny pacientů (Jørgensen H. G., et al. 2007, Copland M., et al. 2006, Holyoake T. L. and Vetrie D. 2017). Eliminace těchto buněk a optimalizace léčebných postupů s cílem předpovědět možnost molekulárního relapsu po vysazení TKI a případně mu předejít je významným trendem v současném výzkumu CML.

1.1.1 *BCR-ABL1* gen

Fúzní gen *BCR-ABL1* je tvořen na 5'konci *BCR* genem a na 3' *ABL1* genem. Místo zlomu je variabilní, nejčastěji dochází k spojení v tzv. major oblasti v intronu 13 a 14 *BCR* genu s 140 kb velkým regionem *ABL1* genu mezi exonem 1b a 2. Přepisem fúzního genu tedy nejčastěji vznikají transkripty e13a2 a e14a2. Oba tyto transkripty dávají vznik proteinu o velikosti 210 kDa. Minoritně dochází k přestavbě dávající vznik transkriptu e1a2 kódující protein o velikosti 190 kDa. Byla popsána i řada atypických raritních přestaveb např. e6a2, e19a2, b2a3, jejichž výskyt je spíše výjimečný (Obrázek 1A). Nejčastěji se vyskytující patologický protein p210 obsahuje více než 10 domén. Ser/Thr kináza, Rho/GEF a dimerizační (coiled-coil) doména z původního BCR proteinu se spojuje s doménami SH, prolin bohatými, DNA vazebnými a aktivačními doménami v *ABL1* proteinu. V *ABL1* části se také nachází jaderný lokalizační (NLS) a jaderný vstupní signál (NES). Nejvíce je v CML patogenezi studována SH1 doména *ABL1*, Tyr 177 a Ser/Thr kináza BCR, které jsou zásadní pro funkci *BCR-ABL1* (Chu S., et al. 2007, Hantschel O., 2012). V patologii *ABL1* kinázy v rámci fúzního proteinu je zásadní ztráta místa myristilace na N konci proteinu, neboť N koncová myristilace umožňuje autoinhibici SH1 domény (Obrázek 1B).



Obrázek 1 A. Struktura *BCR-ABL1* genu. Vznik translokace v oblasti major, mezi exony 13 a14 nebo 14 a 15 genu *BCR* a exony 1b a 2 genu *ABL1*. **B.** Struktura proteinu C-C – coiled-coil doména, Serin/threoninová doména, Rho/GEF doména, SH1-SH3 domény, PxxP- prolin bohatá doména, NLS- jaderný lokalizační signál, DNA vazebná doména, NES-jaderný exportní signál; obrázek převzatý z B.Chereda and J. V. Melo. 2015.

1.2 Signální dráhy ovlivněné BCR-ABL1

BCR-ABL1 protein zasahuje svou kinázovou aktivitou do řady signálních kaskád, které se podílejí na proliferaci, indukci apoptózy a dalších fyziologických buněčných dějích. Fúzní protein vytváří vazebné místo pro SH2 a fosfotyrozín-vazebné domény (PTB) adaptorových proteinů a vzniká tak multiproteinový komplex GRB2, GAB2, SOS a CRKL (Hantschel O., 2012). Tento proteinový komplex vede k aktivaci Ras/MEK/ERK, JAK/STAT a PI3K/AKT signálních drah (Chu S., et al. 2007, Sattler M., et al. 2002).

1.2.1 JAK/STAT

Tato signální dráha zahrnuje fyziologickou signalizaci přes cytokinový receptor (např. pro hematopoetin), jenž způsobí aktivaci JAK kinázy a následnou aktivaci STAT transkripčního faktoru, regulujícího buněčnou proliferaci, diferenciaci, migraci a apoptózu. Konstitutivní fosforylace STAT1 a STAT5 byla popsána na BCR-ABL1 pozitivních buněčných liniích a také na primárních CML buňkách (Chai S. K., et al. 1997). JAK2 může zesilovat BCR-ABL1 aktivitu fosforylací kritického tyrozínu 177 (Samanta, A. K., et al. 2009, Samanta, A.K., et al. 2011). Na myším modelu bylo prokázáno, že STAT5 je nezbytný pro rozvoj a udržení CML. STAT5 knockout myši nevyvinuly CML v přítomnosti BCR-ABL1 translokace. Delece JAK2 kinázy v myším modelu neovlivnila rozvoj myeloidní leukemie, avšak ukázala se být důležitá pro rozvoj lymfoidní leukemie. Zdá se tedy, že BCR-ABL1 je schopen aktivovat STAT5 a ovlivnit proliferaci bez účasti JAK2 (Samanta, A. K., et al. 2009). Horita et al. popsali stěžejní roli STAT5 v zábraně apoptózy transkripční aktivací BCL-xL (Horita M., et al. 2000). BCL-xL je protein rodiny BCL-2, který je transmembránovou molekulou v mitochondriích a brání aktivaci apoptózy uvolněním cytochromu c. Byla testována možnost zacílit tuto dráhu použitím kombinace TKI s ruxolitinem (inhibitorem JAK2), což vedlo ke zvýšení apoptózy progenitorových a kmenových buněk a snížení tvorby spících leukemických kmenových buněk (LSC) na myším modelu (Gallipoli P., et al. 2014).

1.2.2 PI3K/AKT

PI3K (Fosfatidylinositol-3-kináza) / AKT (Protein kináza B) signální dráha reguluje transkripční faktory, ovlivňující buněčný růst proliferaci a apoptózu. BCR-ABL1 tvoří multimerní komplex s PI3K a adaptorovými proteiny GRB2/GAB2,

CBL a CRKL, kde je kináza aktivována. Další molekulou v dráze aktivace je serin treoninová kináza Akt, která je součástí antiapoptotické kaskády. Akt je také stimulována interleukinem 3 (IL3), což vede k fosforylaci proapoptotického proteinu Bad. Fosforylovaná forma Bad je inaktivní, tudíž není schopna vázat proapoptotické proteiny jako BCL-xL a je likvidována pomocí cytoplazmatického proteinu 14-3-3. Zdá se tedy, že BCR-ABL1 protein je schopen napodobit fyziologickou signalizaci přes IL3 ovlivněním PI3K/Akt dráhy. BCR-ABL1 také ovlivňuje aktivitu SHIP a SHIP2 fosfatáz, které jsou aktivovány při odpovědi buňky na růstové faktory. Role aktivace této dráhy v transformaci hematopoetické buňky je tedy nesporná (Skorski T., et al. 1997). Inhibice mTOR (dalšího člena signální dráhy) vede k upregulaci sestrinu 3 (SESN3), což má inhibiční vliv na CML buňky včetně buněk s T315I mutací (Vakana E., et al. 2013). Blokáce mTOR je také asociována se vstupem buněk do G0/G1 fáze buněčného cyklu a poklesem exprese cyklinu D1 a BCL2 proteinu, což vede ke zvýšení apoptózy buněk (Li L., et al. 2012).

1.2.3 Ras/MAP

Ras protein přes RAF-1/MEK/ERK dráhu ovlivňuje buněčnou proliferaci a BCR-ABL1 je schopen Ras aktivovat (Goldman J. M. a Melo J.V., 2003). Obdobně jako u aktivace PI3K dráhy hraje zásadní úlohu v aktivaci MAP kinázové dráhy multimerní proteinový komplex. Autofosforylace na Tyr177 BCR-ABL1 vytváří vazebné místo pro adaptorový protein GRB2, který je ve vazbě na SOS protein schopen stabilizovat Ras v jeho aktivní GTP formě. Také další adaptorové proteiny jako SHC, aktivovaný vazbou k BCR-ABL1 přes SH2 doménu, a CRKL aktivovaný vazbou přes SH3 doménu, mohou aktivovat Ras (Goldman J. M. a Melo J. V., 2003). Ras přes RAF-1/MEK/ERK dráhu ovlivňuje buněčnou proliferaci. Modi et al. ukázali zásadní roli GRB2 exprese v stimulaci proliferace BCR-ABL1 pozitivních buněk (Modi H., et al. 2011).

1.2.4 Src kinázy

Na patologické buněčné signalizaci u CML se také mohou podílet kinázy z rodiny Src. Lyn a Hck kinázy, které se účastní regulace apoptózy a proliferace, mohou v případě deregulace vést k podpoře maligní transformace. V CML patogenezi mohou být Src kinázy aktivovány BCR-ABL1 proteinem, ale mohou se také aktivovat jiným, na BCR-ABL1 nezávislým mechanismem. Jejich aktivita je spojována s pokročilejšími

fázemi onemocnění a také se vznikem rezistence na TKI. Zvýšená aktivita Lyn kinázy byla popsána v asociaci s overexpresí antiapoptotického proteinu Bcl-2 (Dai Y., et al. 2004). Src kinázy se fosforylací Tyr694 podílejí na zadržování STAT5 v cytoplasmě v BCR-ABL1 pozitivních buňkách. Cytoplazmatická lokalizace pravděpodobně ovlivňuje cílovou funkci STAT5. Může docházet k stimulaci diferenciaci a senescence nebo naopak stimulaci přežívání a G1/S progresi (Chatain N., et al. 2013).

1.2.5 Signální dráhy v kmenové leukemické buňce

Leukemické kmenové buňky (LSC) představují malou populaci charakterizovanou Lin-, CD34+, CD38-, CD90+, CD45RA- (Wisniewski D., et al. 2011). Tyto buňky mohou vytvářet spící kmenové leukemické buňky, které jsou rezistentní k TKI (Copland M., et al. 2006, Bhatia R., et al. 2003, Jørgensen H. G., et al. 2007). LSC jsou charakterizované vyšší schopností osidlovat kostní dřeň imunokompromitovaných myší, na rozdíl od běžných hematopoetických kmenových buněk CD34+ (HSC) (Gerber J. M., et al. 2011). Mají také schopnost sebeobnovy a jsou rezistentní k indukci apoptózy (Graham S. M., et al. 2002, Copland M., et al. 2006). LSC jsou náchylné ke genové nestabilitě a mají porušené mechanismy opravy poškození DNA. BCR-ABL1 vede buňky ke zvýšené proliferaci a přežívání, je tedy poněkud paradoxní, že tyto BCR-ABL1 pozitivní LSC mají schopnost vytvářet spící LSC (Holyoake, T., et al. 1999, Holyoake T. L. a Vetrie D. 2017). TKI ve spících LSC neindukuje apoptózu (Graham S. M., et al. 2002, Jørgensen H. G., et al. 2007). Účinek TKI může napomoci k uvedení LSC do spícího stavu. Pod vlivem TKI je blokována BCR-ABL1 kináza a tím i aktivita PI3K/AKT dráhy, která fosforyluje transkripční faktor FOXO v cytoplasmě. Tato blokáce vede k tomu, že faktory FOXO1 a FOXO3 se vracejí do jádra, kde regulují expresi CCD1, ATM, CDKN1C a BCL6, což vede k zastavení buněčného cyklu v G1 fázi a vytváří se antiapoptotický fenotyp buněk G0 (Hurtz C., et al. 2011, Pellicano F., et al. 2014). Ukazuje se, že přežívání LSC není závislé na kinázové aktivitě, a proto tedy snaha o jejich eliminaci cestou užití TKI není úspěšná (Hamilton A., et al. 2012). LSC využívají pro přežívání aktivaci Hedgehog signální dráhy s klíčovým faktorem SMO. Dráha vede k inhibici apoptózy a zastavení buněčného cyklu díky aktivitě MDM2, která potlačuje p53. Delece nebo farmakologická inhibice SMO vede ke ztrátě vlastností kmenové buňky (Zhao C., et al. 2009, Dierks C., et al. 2008, Irvine D. A., et al. 2016). Transkripční faktor c-MYC a protein p53 jsou centrální molekuly v signální síti, charakterizující deregulaci fyziologických dějů v LSC (Abraham S. A., et al. 2016). β -catheninová signalizace je

důležitá pro vývoj a sebeobnovu HSC a LSC (Zhao C., et al. 2007). β -catenin je součástí Wnt signální dráhy. Wnt po vazbě na Frizzled receptor zabraňuje ubiquitinem mediované degradaci β -catenin, který může po translokaci do jádra regulovat expresi genů účastnících se udržení kmenovosti HSC a LSC (Moon R. T., et al. 2004, Cobas M., et al. 2004). Znalosti vlastností LSC mohou být využity při snaze o jejich eradikaci u pacientů. Holyoake a Vetrie shrnují molekuly vhodné k zacílení LSC např. PPAR γ , CD25, IL-1, RAP/IL1, PD-1/PD-L1 (Holyoake T. L. a Vetrie D. 2017). Aktivace receptoru PPAR γ pomocí agonistů (glitazony), běžně užívaných v léčbě diabetu mellitu, vede přes STAT5 ke snížení exprese HIF2 α a CITED2, což jsou hlavní regulační molekuly v udržení kmenovosti buňky (Prost S., et al. 2015). Povrchová exprese markeru CD25 (α -řetězec IL2R) je u CML LSC regulována transkripčním aktivátorem STAT5. Většina CML LSC je CD25+ CD26+ IL1-RAP+, tento fenotyp buněk by bylo možno využít jako terapeutický cíl (Sadovnik I., et al. 2017). Např. membránově asociovaná dipeptidáza DPP-4, která je vysoce exprimovaná v játrech a ledvinách, je známa také jako marker CD26, vyskytující se na povrchu CML LSC (Herrmann H., et al. 2014). CD26 je možno zacílit gliptiny, využívanými běžně v léčbě diabetu.

1.3 Léčba CML

Léčba CML je od roku 2001 založena převážně na tyrozinkinázových inhibitech. Prvním objeveným a nejčastěji používaným TKI je imatinib mesylát (dříve označovaný jako STI571). Jedná se o 2-phenylaminoantipyrimidinový derivát, navržený jako specifický inhibitor pro rodinu ABL1 proteinových tyrozinkináz (Druker B. J., et al. 1996). Imatinib je TKI první generace, který kompetitivně inhibuje vazebné místo pro ATP na molekule proteinkinázy. Zabraňuje fosforylační aktivitě BCR-ABL1 kinázy, která je udržována v neaktivní konformaci (Schindler T., et al. 2000). Imatinib také inhibuje receptor pro c-KIT a receptor pro destičkový růstový faktor α a β (PDGFR). Výsledky rozsáhlé klinické studie (IRIS-the international randomized study of interferon versus STI 571) ukázaly úspěšnost léčby imatinibem u nově diagnostikovaných pacientů s CML v chronické fázi. Kompletní cytogenetické odpovědi dosáhlo 82,8 % pacientů v mediánu sledování 10,9 let (Hochhaus A., et al. 2017). U pacientů v pokročilejších fázích onemocnění je úspěšnost léčby imatinibem nižší.

Následně byly vyvinuty a testovány TKI druhé generace. Nilotinib je strukturálním derivátem imatinibu, jehož inhibiční účinek je až 25x vyšší v *in vitro* podmínkách. Stejně jako imatinib se váže do BCR-ABL1 kinázy v inaktivní konformaci. Tento lék je účinný

na řadu mutací v kinázové doméně, jež způsobují rezistenci k imatinibu (Weisberg E., et al. 2005). Dasatinib je duální inhibitor, který je schopen mimo BCR-ABL1 inhibovat i dráhy Src kináz, které se účastní patogeneze CML a aktivují se i jako mechanismus rezistence k imatinibu. Chemicky se jedná o thiazolecarboxamid, *in vitro* byla popsána až 300x vyšší inhibiční aktivita než u imatinibu (Hochhaus A. 2006). Na rozdíl od imatinibu a nilotinibu se dasatinib váže do kinázové domény v aktivní i inaktivní konformaci, účinně blokuje také c-KIT receptor, PDGFR a ephrin A receptor. Dasatinib se využívá také k léčbě rakoviny prsu, žaludku a dlaždicobuněčného karcinomu plic (Kim E. M. H., et al. 2013, Pitini V., et al. 2013, Shi M., et al. 2013). Byl popsán i účinek dasatinibu v kombinaci s chemoterapií na eliminaci kmenových buněk akutní myeloidní leukemie (AML) aktivací p53 na myším modelu (Dos Santos C., et al. 2013). Dalším inhibitorem druhé generace je duální BCR-ABL1/SRC inhibitor bosutinib, účinný v nanomolárních koncentracích, který je schopen překonat rezistenci k většině mutací v kinázové doméně BCR-ABL1 s výjimkou V299L a T315I (Cortes J. E., et al. 2011, Redaelli S., et al. 2009).

Třetí generace TKI byla vyvinuta pro léčbu pacientů s rezistencí k imatinibu, jejichž využití se nabízí také u pacientů s intolerancí k ostatním TKI. Ponatinib byl vyvinut speciálně pro překonání rezistence způsobené multirezistentní mutací T315I, která není citlivá k žádnému jinému TKI (O'Hare T., et al. 2009, Cortes J. E., et al. 2012). Jedná se také o účinný inhibitor FLT3, což rozšiřuje jeho použití i u AML (Gozgit J. M., et al. 2011) a také inhibitor RET kinázy, která je asociována s karcinomem štítné žlázy (De Falco V., et al. 2013). Velmi efektivní se také zdá být využití ponatinibu u pacientů s akutní lymfoblastickou leukémií s přítomností Ph chromozomu (Ph⁺ ALL), kteří jsou rezistentní k TKI terapii I a II generace.

Vývoj nových inhibitorů stále pokračuje. V klinických studiích je například testován alosterický inhibitor asciminib, jehož mechanismus účinku je založen na vazbě k BCR-ABL1 mimo vazebné místo pro ATP. Váže se do myristilové kapsy kinázy a tím kinázu blokuje v inaktivní konformaci. Zdá se, že vzhledem k odlišnému mechanismu účinku je tento lék schopen překonat rezistenci, způsobenou veškerými mutacemi v kinázové doméně. Je tedy další terapeutickou možností pro CML pacienty s rezistentními mutacemi v KD BCR-ABL1 (Hughes T., et al. 2019).

Další terapeutickou možností je alogenní transplantace kmenových buněk (HSCT), což je přenos kmenových buněk od příbuzného nebo nepříbuzného HLA identického

dárce po předchozí eliminaci původní maligní krvetvorby. Vlastní zákrok i reakce štěpu proti hostiteli (GVHD), která po něm často následuje, jsou značně rizikové. Díky široké paletě TKI se použití této terapie v léčbě CML aplikuje již spíše výjimečně.

IFN- α byl v minulosti spolu s alogenní transplantací jedinou možností léčby CML. Zatímco využití transplantace v léčbě CML klesá, využití IFN- α v kombinaci s TKI zde nachází znovu své místo (Talpaž M., et al. 2015). IFN- α působí na leukemické buňky na řadě úrovní. Ovlivňuje expresi až 300 genů, podporuje diferenciaci a apoptózu, inhibuje buněčný růst a proliferaci (Der S. D., et al. 1998, Chawla-Sarkar M., et al. 2003). IFN- α obnovuje přirozenou regulaci mikroprostředí kostní dřeně, která ovlivňuje proliferaci progenitorů. U CML je regulace mikroprostředí defektní, dochází např. ke změně v produkci cytokinů (GM-SCF, IL1 β , IL1RA TGF- β) (Bhatia R. a Verfaillie C. M. 1998, Peschel C., et al. 1996). IFN- α také tlumí CML pomocí aktivace imunitních buněk pacienta, jako jsou lymfocyty B i T, NK buňky a antigen prezentující buňky (Molldrem J. J., et al. 2000). Paquette et al. popsali diferenciaci dendritických buněk z mononukleárních CML buněk působením IFN- α a to *in vitro* a také *in vivo* (Paquette R. L., et al. 2002). Burchert et al. popsali schopnost IFN- α indukovat tvorbu myeloblastinu a s ním spojené specifické T buněčné imunitní odpovědi u CML pacientů (Burchert A., et al. 2003). V éře TKI se jeví významný také účinek IFN- α na spící kmenové leukemické buňky, které nejsou zasažitelné pomocí TKI. Použití kombinace obou léků pak tento problém řeší díky schopnosti IFN- α indukovat u CML kmenových buněk opuštění G0 fáze a vstup do buněčného cyklu. Po aktivaci se stávají zasažitelné TKI (Copland M., et al. 2006, Vianello F., et al. 2010). Řada klinických studií také testuje využití IFN- α v kombinaci s TKI pro udržení dlouhodobé hluboké molekulární odpovědi po vysazení TKI léčby (Dimou M. a Panayiotidis P., 2014, Burchert A., et al. 2015).

Léčba CML a hodnocení odpovědi na terapii TKI se řídí dle doporučení evropské leukemické sítě (European LeukemiaNet – ELN), které vychází z výsledků řady rozsáhlých klinických studií, jež neustále probíhají (Baccarani M., et al. 2013, Hochhaus A., et al. 2020). Dokument definuje optimální odpověď v průběhu léčby TKI a řešení situace při jejím nedosažení (Tabulka 1 a 2). Díky širokému spektru TKI je možné optimalizovat léčebný postup s ohledem na věk a konkrétní situaci u pacienta. TKI vykazují kromě zásadního léčebného vlivu na CML také řadu různých nežádoucích vedlejších účinků, které je třeba při výběru vhodného preparátu zohledňovat. Pro hodnocení úspěšnosti léčby se mimo jiné využívá monitorování hladiny transkriptu

BCR-ABL1. Pod záštitou ELN v rámci projektu EUTOS for CML (European Treatment and Outcome Study) probíhá standardizace metodiky pro její hodnocení. Laboratoře provádějící toto vyšetření jsou napojeny na síť referenčních laboratoří s centrální EUTOS laboratoří v Salisbury (UK). Korekční faktor (CF), který jednotlivé laboratoře získávají, umožňuje sjednocené vyjádření v hodnotách mezinárodní stupnice IS (international scale) (Müller M. C., et al. 2009, Cross N. C. P., et al. 2012, Cross N. C. P., et al. 2015). Na základě hladin BCR-ABL1 v IS je pak možno hodnotit hloubku molekulární odpovědi na léčbu.

Tabulka 1. Definice léčebné odpovědi na základě hodnocení krevního obrazu včetně morfologie, cytogenetických a molekulárně genetických analýz (Baccarani M., et al. 2013, Cross N. C. P., et al. 2012, Hochhaus A., et al. 2020, Cross N. C. P., et al. 2015).

Typ odpovědi na léčbu	Stupeň odpovědi na léčbu	Definice
Hematologická odpověď	CHR	leukocyty méně než $10 \times 10^9/l$ krve, trombocyty méně než $450 \times 10^9/l$ krve, nepřítomnost nezralých buněk v periferní krvi, nepřítomnost splenomegalie
	pHR	jakékoliv zlepšení krevního obrazu
Cytogenetická odpověď	CCR	0 % Ph+ buněk v kostní dřeni
	pCR	1 – 34 % Ph+ buněk v kostní dřeni
	mCR	35 – 95 % Ph+buněk v kostní dřeni
	no CR	95 % Ph+buněk v kostní dřeni
Molekulární odpověď	MMR (MR ³)	$\leq 0,1$ % BCR-ABL1(IS)
	MR ⁴	$\leq 0,01$ % BCR-ABL1(IS) nebo nedetekovatelný transkript při počtu kopií kontrolního genu $GUSB \geq 24\ 000$, $ABL1 \geq 10\ 000$
	MR ^{4.5}	$\leq 0,0032$ % BCR-ABL1(IS) nebo nedetekovatelný transkript při počtu kopií kontrolního genu $GUSB \geq 77\ 000$ $ABL1 \geq 32\ 000$
	MR ⁵	$\leq 0,001$ % BCR-ABL1(IS) nebo nedetekovatelný transkript při počtu kopií kontrolního genu $GUSB \geq 240\ 000$, $ABL1 \geq 100\ 000$

Legenda: pHR-částečná hematologická odpověď, CHR-kompletní hematologická odpověď, CCR-kompletní cytogenetická odpověď, pCR-částečná cytogenetická odpověď, mCR-malá cytogenetická odpověď, no CR-žádná cytogenetická odpověď, MMR-velká molekulární odpověď, MR⁴ hluboká molekulární odpověď definovaná jako pokles o 4 řády od počáteční hladiny v době diagnózy stanovenou jako 100 % BCR-ABL1 (Hughes, Timothy, et al. 2006), MR^{4.5} hluboká molekulární odpověď definovaná jako pokles o 4,5 řády od 100 % BCR-ABL1, MR⁵ hluboká molekulární odpověď definovaná jako pokles o 5 řádů od 100 % BCR-ABL1, IS-hodnota BCR-ABL1 % přepočtena do jednotek IS. *GUSB*-glukoronidáza beta

Tabulka 2. Doporučená hodnocení odpovědi na léčbu TKI v 1. linii (Baccarani M, et al. 2013, Hochhaus, A., et al. 2020)

Měsíce od zahájení léčby TKI	Optimální odpověď	Varovná odpověď	Selhání léčby
3	BCR-ABL1 ≤10 %IS	BCR-ABL1 > 10 %	BCR-ABL1 > 10 % IS Pokud je potvrzeno v následujících 1-3 měsících
6	BCR-ABL1 < 1 %IS	BCR-ABL1 1-10 % IS	BCR-ABL1 > 10 % IS
12	BCR-ABL1 ≤ 0,1 % IS	BCR-ABL1 > 0,1-1 % IS	BCR-ABL1 > 1 % IS
Více než 12 měsíců	BCR-ABL1 ≤ 0,1 % IS	BCR-ABL1 > 0,1-1 % IS Ztráta MMR	BCR-ABL1 > 1 % IS mutace v KD BCR-ABL1 přítomnost vysoce rizikových přídatných chromozomálních abnormalit

Legenda: MMR–velká molekulární odpověď, IS- hodnota BCR-ABL1 % přepočtena do jednotek IS.

1.4 Imunologie CML

Stejně jako u ostatních maligních onemocnění, také u CML je imunitní reakce organismu ovlivňována leukemickými buňkami, čímž jsou přirozené imunitní mechanismy porušeny. U nově diagnostikovaných CML pacientů byly pozorovány snížené hladiny NK buněk se sníženou schopností degranulace. K upravení hladin NK buněk nedošlo ani po 10-34 měsících terapie imatinibem (Chen C. I., et al. 2012). Také invariantní NKT buňky jsou dysfunkční u pacientů v diagnóze, ale jejich funkce byla obnovena při léčbě IFN- α nebo TKI v případě dosažení kompletní cytogenetické odpovědi (Rossignol A., et al. 2012).

Bachy et al. popsali ovlivnění hladin regulačních T buněk (Treg), které jsou zodpovědné za navození tolerance k nádorovým antigenům. Hladiny Treg byly zvýšeny u pacientů se středním a vysokým rizikem dle Sokalova skóre oproti pacientům nízkorizikovým. Vysoká hladina arginázy-1, produkované myeloidními supresorovými buňkami, která je schopna inhibovat funkci T efektorových buněk, byla pozorována u pacientů s vysoce rizikovým Sokalovým skóre (Bachy E., et al. 2011).

CML buňky pacientů v diagnóze včetně CD34+ buněk exprimují na svém povrchu ligand pro apoptotický receptor PD-L1 (programmed death receptor ligand-1). Receptor pro tento ligand (PD-1), vyskytující se na povrchu T lymfocytů jako inhibiční receptor, způsobí po vazbě ligandu potlačení efektorových funkcí (Christiansson L., et al. 2013).

Posílení obnovy imunitního dohledu se jeví jako významné pro pacienty v případě plánování vysazení léčby TKI s cílem snížit molekulární relapsy onemocnění. Léčba

IFN- α posiluje expresi proteinasy 3 (PR3 - myeloblastin), která je schopna indukovat produkci PR3 specifických cytotoxických T lymfocytů, které se mohou podílet na udržení dlouhodobé hluboké molekulární odpovědi po vysazení TKI (Burchert A., et al. 2010). Imunoterapie s využitím monoklonálních protilátek by mohla napomoci k eradikaci LSC. Na povrchu LSC se vyskytuje IL1 receptor accesory protein (IL1-RAP), který není přítomen na normálních hematopoetických kmenových buňkách. Monoklonální protilátka proti IL1-RAP po své vazbě na antigen je pak schopna vyvolat antigenně dependentní buněčnou cytotoxickou reakci NK buněk, čímž by mohly být LCS specificky likvidovány (Järås M., et al. 2010).

Využití imunitních checkpoint inhibitorů známých z léčby některých solidních nádorů by mohlo najít své uplatnění také v léčbě CML (Ott P. A., et al. 2013). Inhibiční signalizaci spouštěnou vazbou molekuly PD-L1 na povrchu leukemických buněk s PD-1 receptorem na povrchu T lymfocytů, která vede k tlumení efektorových funkcí T lymfocytů a navození tolerance, je možné ovlivnit podáním protilátky proti PD-1 (novolumab). Snížená exprese inhibiční molekuly PD-1 byla pozorována u pacientů v MMR na TKI léčbě (Hughes A., et al. 2017).

Přítomnost vysoké exprese povrchové molekuly CD86 na povrchu plazmocytoidních dendritických buněk se jeví jako negativní prognostický faktor pro udržení dlouhodobé remise po vysazení léčby TKI (TFR). Ligand CD86 interaguje s inhibiční kostimulační molekulou CTLA-4 na povrchu CD4⁺ a CD8⁺ T lymfocytu a podporuje tak vývoj Treg. Chronická negativní kostimulace pak vede k postupnému vyčerpání efektorových T lymfocytů (Schütz C., et al. 2018). Utlumení této signalizace inhibiční protilátkou proti CTLA-4 (ipilimumab) by mohlo napomoci obnovení přirozeného imunitního dohledu a udržení TFR.

1.5 Rezistence k léčbě TKI

Jak již bylo zmiňováno v úvodu, léčba CML pomocí TKI zcela změnila prognózu pacientů s tímto onemocněním. Avšak přes velkou úspěšnost léčby vykazuje 20 – 30 % pacientů rezistenci a tedy selhání TKI terapie. Pacienti, kteří dle hodnocení popsaného v Tabulce 2 jsou v kategorii Varovná odpověď nebo Selhání léčby, mohou vykazovat rezistenci k léčbě. Pacienti mohou být rezistentní již vstupně (primární rezistence), tzn. na iniciační léčbu nereagují. Nebo pacienti na léčbu z počátku reagují, avšak odpověď po nějakém čase ztratí, jinými slovy rezistenci získávají (Baccarani M., et al. 2013, Hochhaus A., 2006).

Mechanismy rezistence k TKI lze rozdělit na BCR-ABL1 závislé a nezávislé. Mezi mechanismy závislé na aktivitě BCR-ABL1 kinázy lze zařadit somatické mutace v kinázové doméně BCR-ABL1, zvýšenou expresi nebo amplifikaci genu *BCR-ABL1* genu (Gorre M. E., et al. 2001). K mechanismům rezistence nezávislých na BCR-ABL1 aktivitě patří aktivace jiných signálních drah např. drah Src kináz (Goldman J. M. a Melo J. V., 2003), o kterých pojednává kapitola 2.2.4, nebo signalizace přes STAT3 (Eiring A. M., et al. 2014). Mutace v dalších genech, významných u jiných myeloproliferativních onemocnění (*ASXL1*, *DNMT3a*, *TET2* apod.), jsou spjaté s rezistencí vůči léčbě stejně tak jako přídavné chromozomální abnormality (trizomie chromozomu 8, přítomnost druhého Ph chromozomu, vznik izochromozomu 17 a další (Schmidt M., et al. 2014, Zaccaria A., et al. 2010, Schoch C., et al. 2003). Tyto faktory jsou výsledkem genové nestability a porušených opravných mechanismů DNA (Melo J. V. a Barnes J. D. 2007). Na rozvoji rezistence se rovněž podílejí změny v mikroprostředí kostní dřeně např. aktivací dráhy TGFβ/AKT/FOXO a β-catheninové dráhy (Feldhahn N., et al. 2012, Wagle M., et al. 2016, Eiring A. M., et al. 2015).

Neúčinnost léčby TKI, která vyúsťuje v klinickou manifestaci rezistence spjatou s klíčovými mechanismy popsanými výše a jejich kombinací, jednoznačně souvisí s nedostatečným množstvím TKI cílícím molekuly BCR-ABL1 proteinu syntetizovanými CML buňkami. Subletální intracelulární dávky TKI umožňují CML buňkám přežít a adaptovat se. Příčin nedostatečných terapeutických dávek TKI je hned několik:

1. Nízká adherence k léku

Analýzy sledující užívání TKI pacienty s CML ukazují, že pouze 45-50 % dodržuje pravidelnou konzumaci léků (Guilhot F., et al. 2010, Geissler J., et al. 2017). Americká studie ukazuje, že na včasné zahájení léčby má vliv také finanční situace pacientů. Winn et al. ukazuje, že až 40 % pacientů z USA ve věku 70 a více let začíná užívat TKI s cca 180denním zpožděním od doby určení diagnózy (Winn A. N., et al. 2016).

2. Snížená dávky TKI indikovaná lékařem z důvodu toxicity TKI

3. Snížené vstřebávání TKI

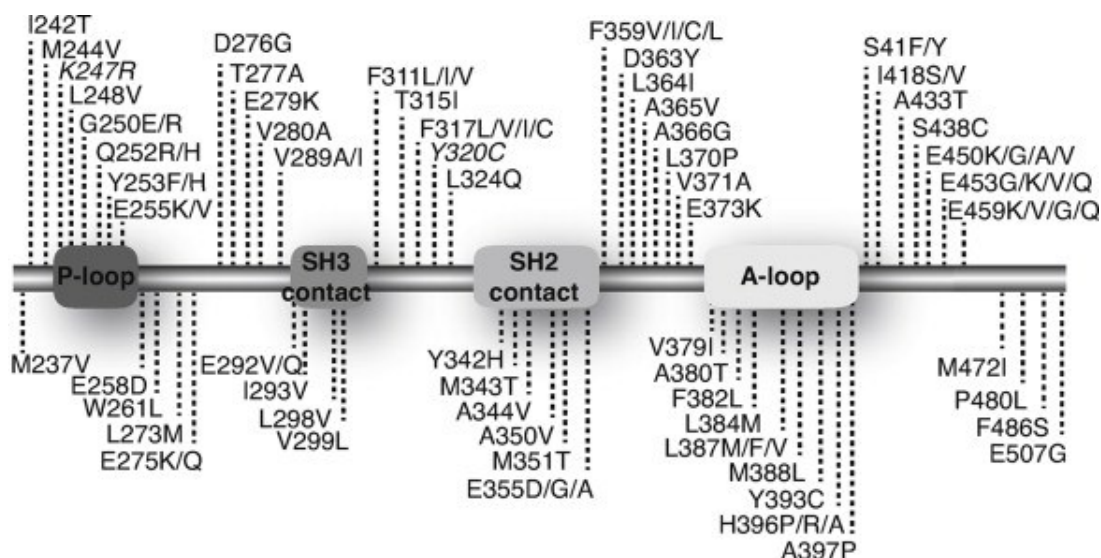
Tento fakt souvisí s funkcí cytochromu P450 3A4, také se souběžným užíváním léků snižujících pH v žaludku (Eley T., et al. 2009, Haouala A., et al. 2011), dále s vysokou hladinou bílkoviny akutní fáze alfa1 kyselého glykoproteinu v krevní

plazmě, který se s vysokou afinitou váže k imatinibu (Larghero J., et al. 2003, Gambacorti-Passerini C., et al. 2003).

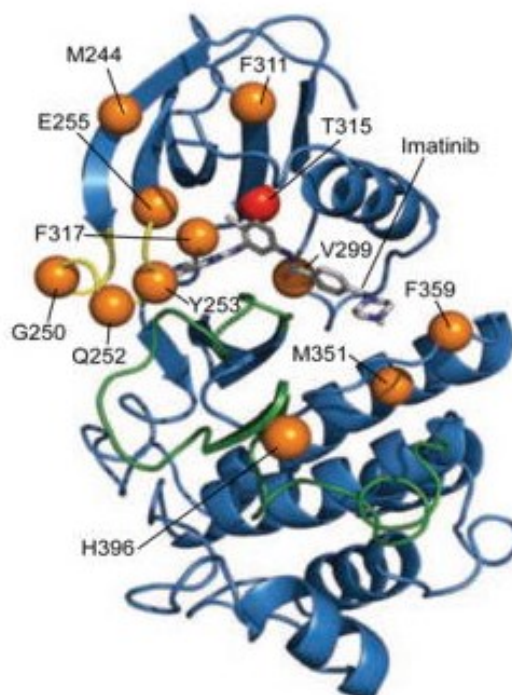
4. Míra exprese a aktivity lékových přenašečů přes plazmatickou membránu buněk; influxní přenašeče rodiny SLC (solute carrier membrane transport protein) a efluxní přenašeče ABC (ATP-binding cassette transporters) (Assouline S. a Lipton J.H. 2011, White D. L., et al. 2006).

1.5.1 Mutace v kinázové doméně BCR-ABL1

V klinické praxi léčby CML jsou u pacientů s neoptimální odpovědí na léčbu TKI vyšetřovány mutace v kinázové doméně (KD) BCR-ABL1. Jedná se o jednobodové nukleotidové záměny vedoucí ke změně v polypeptidovém řetězci. To vede ke změně ve struktuře proteinu a TKI se pak nemůže do vazebného místa účinně vázat a blokovat efektivně funkci kinázy. V závislosti na typu mutace dochází k narušení vazby buď ze sterických důvodů, nebo je ovlivněn vznik vodíkových můstků, případně jiných slabých vazebných interakcí, které jsou zásadní pro efektivní vazbu TKI (Gambacorti-Passerini C., et al. 2003). Dosud bylo publikováno více než 50 typů mutací v KD BCR-ABL1 (Obrázek 2) (Soverini S., et al. 2014, Soverini S., et al. 2015, O'Hare T., et al. 2012). Podle pozice mutace v proteinovém řetězci je rozdělujeme na mutace v P-smyčce, v kontaktním místě imatinibu, v aktivační smyčce nebo v katalytické doméně (Gambacorti-Passerini C., et al. 2003). Mutace v P-smyčce a kontaktním místě imatinibu jsou spojeny s horší prognózou (Hughes T. a Branford S., 2003). Nejčastější mutace při léčbě imatinibem jsou na reziduích M244, G250, Q252, Y253, E255, V299, F311, T315, F317, M351, F359 a H396 (Obrázek 3) (Zabriskie M. S., et al. 2014).



Obrázek 2. Kinázová doména BCR-ABL1 s mutacemi zachycenými u pacientů rezistentních k léčbě imatinibem. P-loop – místo vazby ATP, SH2 a SH3 vazebná doména, A-loop aktivační smyčka. K247R a Y320C jsou popsána SNP. Převzato z publikace (Soverini S, et al. 2014)



Obrázek 3. Krystalová struktura ABL1 kinázové domény v komplexu s imatinibem. Dvanáct hlavních pozic nejčastějších mutací zodpovědných za rezistenci k TKI (oranžově), multirezistentní mutace T315I (červeně), P-smyčka (žlutě), Aktivační smyčka (zeleně). Převzato z publikace (Zabriskie M. S., et al. 2014)

Mutace typu tranzicí (záměna purinové báze za purinovou nebo pyrimidinové za pyrimidinovou) jsou výrazně častější než mutace typu trasverzí (záměna purinové báze za pyrimidinovou a opačně) (Hughes T., et al. 2006). Výskyt mutací v KD BCR-ABL1 je signifikantně spjatý se ztrátou léčebné odpovědi s kratším mediánem přežívání do doby progresu onemocnění a s kratší celkovou dobou přežití pacientů s CML na léčbě

imatinibem v 1. linii (Soverini S., et al. 2014). Výskyt mutací je vyšší u pacientů v akcelerované fázi a blastickém zvratu v porovnání s chronickou fází onemocnění (Hughes T. a Branford S., 2003). Soverini et al. 2006 publikovali výsledky analýz mutací v rámci rozsáhlé italské studie GIMEMA working party. Analýza mutací byla provedena u 370 pacientů (CML a Ph+ALL) a ukázala přítomnost mutace u 43 % (127/297) pacientů, kteří vykazovali rezistenci k imatinibu. U pacientů v chronické fázi byly mutace zachyceny v 27 % případů (54/198), v akcelerované fázi v 52 % (11/21), v myeloidním blastickém zvratu v 75 % (24/32) a v lymfoidním blastickém zvratu v 83 % (38/46). Osm nejčastěji zachycených mutací na léčbě (M244V, G250E, Y253F/H, E255K/V, T315I, M351T, F359V) bylo detekováno v 85 % případech rezistence (Soverini S., et al. 2006). V naší práci Machova Polakova et al. ukazujeme záchyt mutací u pacientů v chronické fázi CML, kteří vykazují zastavení poklesu hladiny BCR-ABL1 na hranici MMR (0,1 % IS) po dobu minimálně 6-9 měsíců. Mutace byly detekovány v 9/32 případech a 5/9 záchytů mutace bylo následováno ztrátou CCR a nárůstem hladiny transkriptu BCR-ABL1. Analýza mutací v případě zastavení poklesu hladiny BCR-ABL1 na hladině MMR se jeví jako vhodný diagnostický nástroj pro včasnou změnu léčby (Machova Polakova K., et al. 2010). Dvě publikované práce popsaly zachycení přítomnosti mutace již v době diagnózy. Willis et al. 2005 detekovali mutace u pacientů v akcelerované fázi a blastické zvratu před zahájením terapie imatinibem. Zatímco u pacientů v chronické fázi mutace detekovány nebyly (Willis S. G., et al. 2005). Mutace, zachycené před zahájením terapie pomocí vysoce citlivé metody ASO PCR, pak v mnoha případech nebyly detekovány u pacientů při následném selhání léčby imatinibem. Přítomnost mutací výjimečně detekovaných v době diagnózy nemusí tedy znamenat, že tato mutace bude zodpovědná za případný rozvoj rezistence a progresi onemocnění. Roche-Lestienne et al. popsali záchyt mutace před zahájením terapie u 3 pacientů. Jeden pacient byl v chronické fázi nemoci a dva v akcelerované fázi. Zároveň ve své práci popisují detekci mutací až v době progresu onemocnění, kde analýzy těchto pacientů v době diagnózy za použití citlivých metod mutace nezachytily (Roche-Lestienne C., et al. 2002). Klinická relevance případného záchytu přítomnosti mutací v době diagnózy je z dostupných dat sporná. V práci naší skupiny jsme pomocí sekvenování nové generace přítomnost mutací v KD BCR-ABL1 v době diagnózy nepotvrdili. Jednalo se o pacienty diagnostikované v chronické fázi nemoci (Machova Polakova K., et al. 2015). Na základě dosavadních

výsledků konsorcium ELN doporučuje vyšetřovat BCR-ABL1 mutace vstupně pouze v případech akcelerované fáze a blastického zvratu (Soverini S., et al. 2011).

Stále nejrozšířenější metodou vyšetřování mutací v kinázové doméně je metoda Sangerova sekvenování (Alikian M., et al. 2012). Metodu je možno použít pro skřínink mutací, bez znalosti konkrétní mutace, nevýhodou je nižší citlivost detekce (20 %). Citlivější metody jako kapková digitální alelově specifická polymerázová řetězová reakce (ddASO-PCR), vysokorozlišovací analýza křivek tání (HRM) však vyžadují znalost sledované pozice. Průlomem v detekci mutací na hodnotách pod 20 % bylo zavedení NGS technologie. Využití této technologie umožňuje odhalení přítomnosti mutací na nízkých hladinách (> 1 %), což lépe charakterizuje mutační stav a umožňuje efektivněji volit TKI druhé případně třetí generace (Soverini S., et al. 2013).

Klinická relevance záchytu mutací na nízkých hladinách pomocí NGS v průběhu léčby je předmětem diskuzí a dalších studií (Soverini S., et al. 2013). Naše práce ukazují jednoznačný přínos technologie s vyšší citlivostí pro optimalizaci léčebných postupů. V 55 % testovaných vzorků (58/106) NGS technologie odhalila přítomnost mutací nedetekovatelných standardním sekvenováním. U poloviny nově zachycených mutací (51 %) se jednalo o mutace nedostatečně citlivé k terapii, která byla zvolena na základě jejich nezachycení pomocí standardního sekvenování. Byly však také zachyceny mutace na nízkých hladinách, které se v rezistenci k TKI nikdy neuplatnily (Machova Polakova K., et al. 2015, Soverini S., et al. 2013). NGS technologie umožňuje komplexně sledovat evoluci mutací jako dynamický proces zahrnující řadu dalších dějů. K odlišení přítomnosti klinicky relevantních mutací od chybového pozadí je nutné mít dobře propracované bioinformatické nástroje (Machova Polakova K., et al. 2015).

Parker et al. ukazuje využití další vysoce citlivé metody, multiplexní hmotnostní spektrometrie, pro detekci mutací u pacientů před změnou terapie na TKI druhé generace. Ve studii zahrnující 220 pacientů byla mutace zachycena přímou sekvenací v 127 případech, metoda hmotnostní spektrometrie zachytila nízké hladiny mutací u dalších 64 pacientů. V případě, že mutace na nízké hladině vykazovala rezistenci k TKI, který byl následně použit, klon s mutací expandoval a byl zodpovědný za následný relaps onemocnění v 85 % případů (Parker W. T., et al. 2011). Dosavadní data naznačují, že znalost přítomnosti mutace na nízké hladině je významná pro optimalizaci výběru TKI v další linii.

Rezistence k imatinibu způsobená mutací v KD BCR-ABL1 je řešitelná změnou léčby na TKI druhé a třetí generace. Nilotinib je účinný na všechny imatinib rezistentní mutace s výjimkou Y253F/H, E255K/V, T315I a F359V/I/C. Dasatinib nepřekoná mutace V299L, T315I/A, F317L/V/I/C. K bosutinibu jsou rezistentní mutace E255K, V299L a T315I. Mutaci T315I je schopen překonat pouze ponatinib. Informace o mutacích, které by byly rezistentní k bosutinibu a ponatinibu, jsou však vzhledem ke krátké době jejich používání omezené (Soverini S., et al. 2014). Aminokyselina na pozici 315 je esenciální pro vznik kritického vodíkového můstku pro vazbu s TKI. Mutace T315I znemožňuje vazbu většiny TKI (Tokarski J. S., et al. 2006, Weisberg E., et al. 2005). Ponatinib ve své vazbě nevyužívá tento vodíkový můstek, a proto je schopen inhibovat BCR-ABL1-T315I protein.

Některé mutace dávají BCR-ABL1 proteinu specifické vlastnosti. V *in vitro* testech byla popsána nejvyšší proliferační aktivita u buněk s mutací s Y253F a E255K. Přítomnost těchto mutací také zvyšovala transformační potenciál a enzymovou aktivitu kinázy (Griswold I. J., et al. 2006). Přítomnost gatekeeper mutace T315I přináší buňkám vyšší onkogenní potenciál, který je dán fosforylací odlišného adaptorového tyrozinového místa Tyr²⁵⁷ oproti nemutovanému BCR-ABL1, který využívá Tyr²⁵³ (Skaggs B. J., et al. 2006). Vysokou rezistenci k TKI také vykazují tzv. kompozitní mutace (přítomnost dvou a více různých mutací v jednom leukemickém klonu) a mutace polyklonální (přítomnost dvou a více různých mutací v různých klonech u pacienta ve stejném čase). Některé polymutované klony vykazují vyšší rezistenci než mutace T315I (Gibbons D. L., et al. 2014). Klony nesoucí kompozitní mutace, které obsahují mutaci T315I s další mutací, vykazují rezistenci k ponatinibu. Např. klon nesoucí kompozitní mutaci T315I/E255K vykazuje 22,7x vyšší rezistenci k ponatinibu než klon nesoucí samostatnou mutaci T315I. IC₅₀ pro tento polymutovaný klon je 6,5x vyšší, než je plazmatická koncentrace ponatinibu (101nM) u pacientů léčených běžnou dávkou 45mg/den (Zabriskie M. S., et al. 2014).

1.5.2 Mutageneze v leukemické buňce a epigenetické faktory ovlivňující rozvoj mutací

Mechanismus vzniku mutací v kinázové doméně BCR-ABL1 nebyl doposud zcela objasněn. Na rozvoji se pravděpodobně podílejí narušené mechanismy reparace DNA, popsané níže. Svou roli zde mohou sehrát i epigenetické faktory. Sirtuin 1 (SIRT1) patří do skupiny NAD závislých histon deacetyláz (deacetylázy skupiny III), které jsou známé

jako regulátory energetického metabolismu, tumorigeneze a odolnosti buněk ke stresu. SIRT1 se podílí na deacetylaci histonů H4K16 a H1K26 a také deacetylaci řady nehistonových proteinů, čímž reguluje řadu biologických procesů včetně buněčného růstu a apoptózy (Li L. a Bhatia R., 2015). Hraje roli také v regulaci fyziologické hematopoézy při hypoxii a leukemické hematopoézy regulací p53 aktivity. BCR-ABL1 aktivuje expresi SIRT1 v hematopoetických progenitorech, čímž podporuje proliferaci spojenou s deacetylací řady jeho substrátů jako je p53, FOXO1 a Ku70 (Yuan H., et al. 2012). Wang et al. popsali souvislost mezi aktivitou SIRT1 a schopností CML buněk vyvíjet mutace. CD38 je povrchová molekula a multifunkční ectoenzym, který katalyzuje syntézu a hydrolýzu cyklické ADP-ribosy z NAD⁺. Vysoká exprese povrchové molekuly CD38 snižuje intracelulární hladinu nikotinamid adenin dinukleotidu (NAD⁺), čímž je inhibována aktivita NAD⁺-dependentní deacetylázy SIRT1. Bylo popsáno, že inhibice SIRT1 v souvislosti se zvýšením povrchové exprese CD38 zamezila vzniku BCR-ABL1 mutací v buňkách vystavených účinku imatinibu (Wang Z., et al. 2014). SIRT1 aktivita v CML buňkách stimuluje chybové opravy DNA spojené s vývojem mutací (Wang Z., et al. 2013).

1.5.3 Genomová nestabilita CML buněk a vznik dalších chromozomálních abnormalit a mutací

Buněčný c-ABL1 protein se podílí na procesech oprav poškození DNA. ATM kináza se při poškození DNA váže na SH3 doménu c-ABL, čímž je aktivována. Následně pak aktivuje dráhu mismatch repair prostřednictvím proteinu MLH1. Opravnou dráhu homologní rekombinace (HR) ovlivňuje c-ABL přes protein RAD51. Opravná dráha nehomologního spojování konců (NHEJ) je tlumena fosforylací DNA proteinkinázy (DNA-PK). Fosforylace způsobí disociaci komplexu DNA-PK s proteinem Ku z vazby na DNA. Také fosforyluje WRN protein, čímž inhibuje jeho exonukleázovou a helikázovou aktivitu (Shaul Y. a Ben-Yehoyada M., 2005).

Protein BCR-ABL1 se svou aktivitou podílí na poruchách oprav DNA v leukemických buňkách. Jsou zde narušeny oba základní mechanismy oprav dvouřetězcových zlomů DNA, a to HR i NHEJ (Nowicki M. O., et al. 2004). V BCR-ABL1 pozitivních buňkách je snižena funkce katalytické podjednotky DNA dependentní proteinkinázy, která je esenciální pro účinný mechanismus NHEJ (Deutsch E., et al. 2003). NHEJ je v CML buňkách méně účinná se zvýšeným počtem chybných oprav (Gaymes T. J., et al. 2002, Brady N., et al. 2003).

Reparační mechanismus s využitím HR ovlivňuje BCR-ABL1 aktivaci a blokováním degradace proteinu RAD51 (Slupianek A., et al. 2001). Aktivace RAD51 je realizována fosforylací na T315 BCR-ABL1. BCR-ABL1 blokuje proteolytickou degradaci RAD51 aktivací kaspázy 3 (Nowicki M. O., et al. 2004).

Na destabilizaci genomu v CML buňkách se podílí také snížení exprese genu BRCA-1, který se účastní udržení integrity (Deutsch E., et al. 2003)

BCR-ABL1 ovlivňuje tzv. „DNA damage sensors“ (ATM a ATR kinázy) a narušuje jejich funkci. Takto ovlivněná ATM signalizace způsobuje trvalou fosforylací checkpoint kinázy 2 (CHK2). Inhibice ATR vede k zábraně fosforylace checkpoint kinázy 1 (CHK1), která je klíčová pro aktivaci kontrolního bodu v S fázi buněčného cyklu. Kontrolní body pro opravu poškození DNA jsou tedy u CML narušeny (Burke B. A. a Carroll M., 2010). Inhibice ATR funkce přispívá ke zvýšenému přesunu BCR-ABL1 do jádra (Dierov J., et al. 2004).

Na vzniku jednořetězcových a hlavně dvouřetězcových zlomů DNA se podílí také zvýšená hladina reaktivních kyslíkových radikálů (ROS) v BCR-ABL1 pozitivních buňkách (Nowicki M. O., et al. 2004, Koptyra M., et al. 2006). Tyr177 BCR-ABL1 byl popsán jako hlavní regulátor produkce ROS v CML buňkách. Nadprodukce ROS je způsobena buď zvýšeným glukózovým metabolismem, nebo zvýšenou aktivitou elektron transportního řetězce v mitochondriích (Kim, J. H., et al. 2005). Zvýšená produkce ROS je závislá na aktivitě PI3K/mTOR signální dráhy.

V akcelerované fázi onemocnění bývá pozorován vznik přídatných chromozomálních abnormalit, jejichž přítomnost se podílí na progresi onemocnění a rezistenci k TKI. Vyskytuje se trizomie 8 (33 %), přítomnost druhého Ph chromozomu (30 %), izochromozom 17 (20 %), trizomie 19 (12 %), ztráta chromozomu Y (8 %), trizomie 21 (7 %) a monozomie 7 (5 %) (Johansson B., et al. 2002). Výjimečně byla pozorována také translokace zahrnující X chromozom (Elder P. T., et al. 2010). Chromozomální abnormality zasahují geny, které jsou kritické v progresi onemocnění. Izochromozom 17 způsobuje ztrátu tumorsupresorového genu p53, trizomie 8 chromozomu pak overexpresi proto-onkogenu c-MYC (Becher R., et al. 1990, Collins S. a Groudine M., 1982). Nejnovější ELN doporučení pro terapii CML z roku 2020 některé tyto změny (trizomie chromozomu 8, přítomnost druhého Ph chromozomu, izochromozom 17, trizomie 19 a 7, monozomie 7 a komplexní změny karyotypu) nově

označuje jako vysoce rizikové, jejichž přítomnost je spojena s horší odpovědí na léčbu a vysoký rizikem progresu onemocnění (Hochhaus A., et al. 2020).

1.6 Buněčné transportéry z rodin ABC a SLC

Buněčné transportéry účastníci se transmembránového transportu léčiva mají vliv na vnitrobuněčnou terapeutickou koncentraci TKI. Nedostatečné množství TKI může být příčinou selhání léčby.

1.6.1 Transportéry rodiny SLC22 (hOCT)

Human organic cation transporter 1 (hOCT1) je členem rodiny SLC22 buněčných transportérů, u kterého byla prokázána funkce transportu imatinibu (Thomas J., et al. 2004). SLC transportéry se skládají z 12 transmembránových domén tvořených α -helixy, dlouhé extracelulární smyčky mezi doménou 1 a 2 a dlouhé intracelulární smyčky mezi doménou 6 a 7. Extracelulární smyčka je glykosylována a zprostředkovává homooligomerizaci (Brast S., et al. 2012), zatímco intracelulární smyčka je zapojena do potranskripčních regulací. Podskupina zahrnující hOCT1, hOCT2 a hOCT3 se podílí na transportu organických kationtů, organických bazí a některých neutrálních sloučenin. Transport je zajišťován na ATP nezávislým mechanismem. Pasivní difúzní systém je poháněn elektrochemickým gradientem transportované molekuly a posilovaný membránovým potenciálem (Koepsell H., et al. 2007). Thomas et al. 2004 popsali transport imatinibu do CML buňky jako aktivní, teplotně závislý proces zprostředkovaný hOCT1 transportérem. Byla sledována exprese hOCT1 na povrchu CML buněčných linií i buněk pacientů. Při použití inhibitoru tohoto transportéru byl pozorován snížený vstup imatinibu do buňky a snížená koncentrace uvnitř buněk. Účast hOCT2 a hOCT3 na transportu imatinibu byla vyloučena (Thomas J., et al. 2004). Na tuto práci navázali Crossman et al, kteří popsali sníženou expresi hOCT1 v mononukleárních buňkách kostní dřeně před zahájením léčby u pacientů, kteří nedosáhli optimální odpovědi na léčbu imatinibem oproti skupině dobře odpovídajících pacientů a zdravých dárců (Crossman L. C., et al. 2005).

White et al. 2006 potvrdili účast hOCT1 na transportu imatinibu měřením jeho aktivity. Měření prováděli na mononukleárních buňkách periferní krve od 25 *de novo* CML pacientů, kde sledovali IC₅₀, intracelulární koncentraci imatinibu a hodnotu IUR (intracellular uptake and retention). Hodnoty v době diagnózy a v čase 12 měsíců na léčbě imatinibem dobře reflektovaly odpověď pacientů na léčbu. Autoři v této práci nepotvrdili

transport nilotinibu přes hOCT1, hOCT2 a hOCT3 (White D. L., et al. 2006). V následné práci na 99 pacientech pozorovali signifikantně vyšší aktivitu hOCT1 u pacientů s nižším IC50. Pacienti s vyšší hOCT1 aktivitou dosáhli častěji MMR ve 24 měsících (85 %), oproti pacientům s nižší aktivitou hOCT1 (45 %). U 5 pacientů byla pozorována nulová aktivita hOCT1 v době diagnózy a všichni tito pacienti nedosáhli MMR (White D. L., et al. 2007). Na buněčné linii KCL-22 s overexpresí hOCT1 byla pozorována zvýšená intracelulární koncentrace imatinibu oproti kontrolním buňkám (Wang, L., et al. 2008). Tito autoři ve své práci tvrzení o vlivu exprese *hOCT1* podpořili nalezením signifikantní korelace vysoké exprese *hOCT1* před zahájením léčby s dobrou odpovědí na léčbu. Jiné práce však korelaci mezi vysokou hladinou exprese *hOCT1* a lepší odpovědí na léčbu nepotvrdily (White D. L., et al. 2010, Zhang, W. W., et al. 2009, Kim, Y., et al. 2014).

Přítomnost polymorfismů a jiných genetických změn v genu kódujícím *hOCT1* může ovlivnit účinný transport léčiva do buňky. Byla popsána řada genetických variant, avšak pouze 4 práce popisují signifikantní korelaci mezi jejich přítomností a sníženým transportem imatinibu. Například Giannoudis et al. sledovali vliv přítomnosti 23 SNP v hOCT1 na transport imatinibu do buňky a našli signifikantní pokles transportu pouze v přítomnosti M420del (rs35191146) (Giannoudis A., et al. 2013). Di Paolo et al. pozorovali roli SNP rs683369 c480C>G na farmakokinetiku imatinibu. Pacienti s genotypem GC a GG vykazovali signifikantně nižší clearance imatinibu a vyšší plazmatickou koncentraci. Nižší funkce transportéru v přítomnosti alespoň jedné G alely vede k nižší intracelulární koncentraci imatinibu a snižuje terapeutický efekt (Di Paolo A., et al. 2014).

Ve vztahu k transportu imatinibu je nejvíce prostudována role hOCT1 transportéru, tento transportér však není jediným, který do metabolismu léku zasahuje. V naší práci Jarušková et al. 2017 jsme se zaměřili na sledování role polymorfismů v promotorových oblastech 15 SLC a 4 ABCB transportérů ve vztahu s dosahováním optimálních léčebných odpovědí na terapii imatinibem. V rozsáhlé práci byla nalezena rozdílná frekvence SNP rs460089 a rs2631365 v regulačních oblastech exprese genů SLC22A4 a SLC22A5 ve skupinách pacientů optimálně a neoptimálně odpovídajících na terapii imatinibem v 1. linii. Pacienti nesoucí rs460089-GC genotyp měli signifikantně vyšší pravděpodobnost dosažení MMR, zatímco pacienti s rs 460089-GG byli ve vyšším riziku selhání léčby. Riziko selhání léčby bylo ještě vyšší u kombinace genotypů rs460089-GG a rs2631365-TC (Jaruskova M., et al. 2017).

1.6.2 Transportéry rodiny ABC

Efluxové přenašeče popsané v souvislosti s transportem TKI z buňky ven patří do rodiny přenašečů typu ATP binding cassette (ABC). Jedná se o rodinu velmi početnou a evolučně konzervovanou s výskytem od prokaryot až po člověka. Obvykle se skládají z několika podjednotek. Jedna až dvě podjednotky jsou transmembránové a 1-2 podjednotky tvoří s membránou asociované ATPázy. Tyto ATPázy poskytují energii získanou hydrolýzou ATP, která je využita k pohánění transportu substrátů přes membránu. U eukaryot se jedná výhradně o transport toxinů a léčiv ven z buněk. Někteří členové ABC rodiny (ABCB, ABCG, ABCA a ABCC) jsou známi v souvislosti s nádorovými onemocněními (Ross D. D. a Doyle L. A., 2004). ABCB1 protein, známý též jako P-glykoprotein nebo MDR1-multidrug resistance protein, popsal poprvé J. R. Juliano v roce 1976 v souvislosti s lékovou rezistencí (Juliano R. L. a Ling V., 1976).

ABC transportéry pravděpodobně hrají roli v rezistenci k TKI (Eechoute K., et al. 2011). Mahon et al. 2003 ve své práci popsali vliv zvýšení exprese ABCB1 na rezistenci k imatinibu s použitím buněčné linie K562. Experimenty na buňkách CML pacientů v blastickém zvratu v této práci ale zvýšenou expresi ABCB1 neukázaly. Za použití mononukleárních buněk z periferní krve 6 CML pacientů při inkubaci s imatinibem a s inhibitorem ABCB1 však demonstrovali účast ABCB1 na transportu imatinibu. Z jejich pozorování vyplývá, že CML blasty k odstraňování léčiva pravděpodobně využívají jinou pumpu (Mahon F., et al. 2003). Widmer et al. potvrdili účast ABCB1 na aktivním odstraňování imatinibu z buněk za pomoci měření koncentrace imatinibu v kultivačním médiu transfekované buněčné linie MDR+ a MDR-LLC-PK1, kterou vystavili různým koncentracím imatinibu (Widmer N., et al. 2003). Park et al. nepozorovali rozdíl v aktivitě ABCB1 u mononukleárních buněk z periferní krve CML pacientů a zdravých dárců. Pozorovali však signifikantně vyšší expresi ve skupině pacientů, u kterých léčba imatinibem selhávala (Park S. H., et al. 2015). Některé studie ukazují, že exprese ABCB1 se může v CML buňkách zvyšovat samovolně nebo může být indukována podáváním léčiva. Vasconcelos et al. pozorovali zvýšení ABCB1 exprese v souvislosti s progresí CML. Zároveň na *in vitro* experimentu ukázali indukci zvýšení ABCB1 na úrovni mRNA i proteinu na CML buněčných liniích vystavených imatinibu (Vasconcelos F. C., et al. 2011). Zdá se tedy, že imatinib ovlivňuje ABCB1 fenotyp CML buněk. Existují však i práce, které účast ABCB1 na rezistenci k imatinibu vyloučily

(Ferrao P. T., et al. 2003). Hamada et al. popsali, že imatinib může fungovat naopak jako inhibitor ABCB1 (Hamada A., et al. 2003).

Imatinib byl popsán jako substrát dalšího přenašeče z této rodiny breast cancer resistance glykoprotein (ABCG2) (Burger H., et al. 2004). Shukla et al. poposují imatinib jako substrát ABCB1 a ABCG2 v širokém rozmezí koncentrací. Ve vysokých koncentracích vzhledem k vysoké afinitě může fungovat výhradně jako inhibitor (Shukla S., et al. 2008). Tento fakt by mohl vysvětlovat rozporuplná data v literatuře.

2 Cíl práce:

Studium mutageneze kinázové domény BCR-ABL1 a role exprese buněčných lékových transportérů v rozvoji rezistence buněk chronické myeloidní leukemie k léčbě imatinibem.

2.1 Specifické cíle

1) Objasnování molekulárních mechanismů umožňujících mutagenezi kinázové domény BCR-ABL1 na vhodném *in vitro* modelovém systému CML buněčných linií vystavovaných účinku imatinibu.

2) Monitorování dynamiky BCR-ABL1 mutací pomocí NGS pro individualizovanou terapii pacientů ve vysokém riziku progresu onemocnění. Hodnocení úlohy imunitní odpovědi na individualizovanou léčbu v souvislosti s léčebnou odpovědí.

3) Studium možnosti využití měření hladiny exprese buněčných transportérů hOCT1 a ABCB1 jako prognostického markeru pro předpověď léčebné odpovědi na imatinib.

3 Materiál a metody

3.1 Buněčné linie

Veškeré buněčné linie použité v této práci byly získány z Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Německo (Tabulka 3). Pouze linie MOLM-7 byla získána od Dr. Minowadu (Tsuji-Takayama K., et al. 1994).

Tabulka 3. Seznam buněčných linií

Buněčné linie	DSMZ číslo
K562	ACC-10
KCL-22	ACC-519
CML-T1	ACC-7
MOLM-7	zdroj mimo DSMZ*
MOLM-13	ACC-547
SKM-1	ACC-554

* Linie MOLM-7 byla získána od Dr. Minowadu (Tsuji-Takayama K., et al. 1994)

3.1.1 BCR-ABL1 pozitivní buněčné linie

K562

Buněčná linie K562 je odvozena z buněk pleurálního výpotku 53leté pacientky s CML v blastickém zvratu (Lozzio C. B. a Lozzio B.B., 1975)

KCL-22

Buněčná linie KCL-22 je odvozena z buněk pleurálního výpotku 32leté pacientky v blastickém zvratu CML. Buňky nesou dva Ph chromozomy a mutaci v genu *TP53* (Kubonishi I. and I. Miyoshi. 1983).

CML-T1

Buněčná linie CML-T1 je odvozená z buněk periferní krve (PK) 30leté ženy s CML v blastickém zvratu. Buňky této linie nesou povrchové markery T lymfocytů a *BCR-ABL1* fúzní gen. V buňkách není přítomen Ph chromozom. Jedná se o kryptickou fúzi, kdy dochází k inserci genu *ABL1* do chromozomu 22 (Kuriyama K., et al. 1989).

MOLM-7

MOLM-7 je buněčná linie odvozená z buněk PK 44leté pacientky s CML v blastickém zvratu (Tsuji-Takayama K., et al. 1994).

3.1.2 BCR-ABL1 negativní buněčné linie

MOLM-13

MOLM-13 je linie odvozena z buněk PK pacienta s akutní myeloidní leukemií. Buňky pochází od 20letého muže s AML FAB M5a v relapsu po původní diagnóze MDS (myelodysplastický syndrom) RAEB – refrakterní anemie s přebytkem blastů (Matsuo Y., et al. 1997).

SKM-1

SKM-1 je buněčná linie odvozena z buněk PK 76letého muže s AML M5. AML se u tohoto pacienta vyvinula z původní diagnózy MDS (Nakagawa T. a Matozaki S., 1995).

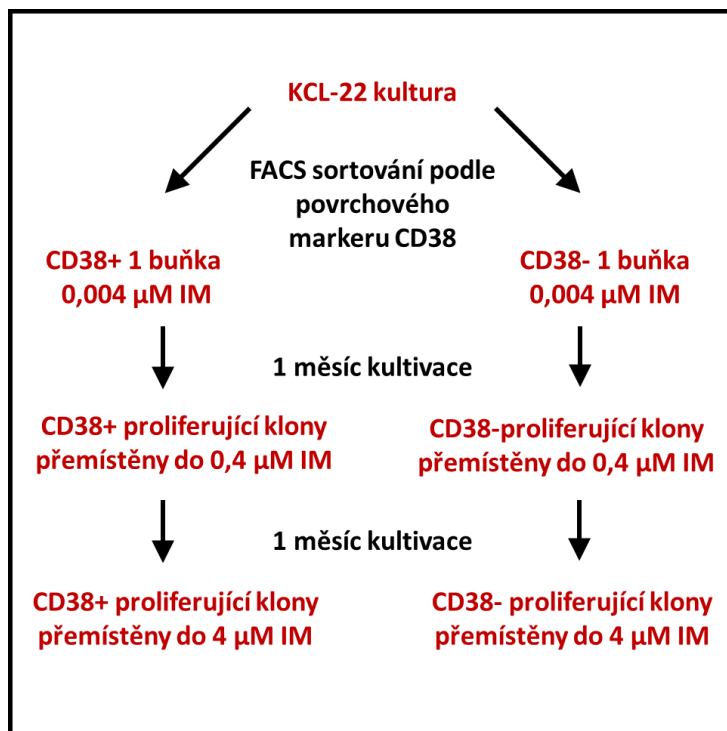
3.1.3 Příprava klonů KCL-22

Klony buněčné linie KCL-22 byly získány sortováním po jedné buňce dle přítomnosti povrchového markeru CD38. Příprava probíhala na pracovišti průtokové cytometrie laboratoří CLIP (Childhood Leukaemia Investigation Prague) FN Motol a 2. lékařské fakulty UK na přístroji BD FACS Aria III (Becton Dickinson, USA) s použitím BD FACS Diva Software verze 6.1.3. KCL-22 CD38+ a KCL-22 CD38- klony byly získány sortem za sterilních podmínek do kultivačního média s 0,004 μ M imatinibem, nebo v případě kontrolních klonů pouze do kultivačního média. Tyto klony byly dále kultivovány při 37 °C a byly z nich odebírány vzorky pro izolaci RNA a DNA. První odběr byl proveden po 21 dnech od sortu, kdy klony poprvé poskytly dostatek materiálu pro izolaci nukleových kyselin. Odběry materiálu byly následně prováděny v 14denních intervalech. Po 1 měsíci kultivace v 0,004 μ M imatinibu byly proliferující klony přemístěny do 0,4 μ M imatinibu a po dalším měsíci do 4 μ M imatinibu viz schéma (Obrázek 4). Vzorky pro izolaci nukleových kyselin z kontrolních klonů KCL-22 CD38+ a KCL-22 CD38- kultivovaných bez vystavení účinku imatinibu byly odebírány ve stejných časových intervalech.

3.2 Vzorky pacientů

Pacientům s chronickou myeloidní leukemií byla odebírána PK s využitím citrátu sodného jako protisrážlivého činidla. Stejným způsobem byly získány také vzorky zdravých dárců. CML pacienti, jejichž vzorky byly analyzovány v rámci této práce, byli léčeni v Ústavu hematologie a krevní transfúze v Praze (ÚHK), na III. interní klinice Fakultní nemocnice Královské Vinohrady Praha (FNKV), v Interní hematologické a onkologické klinice při FN Brno a v Hematoonkologické klinice při FN Olomouc. Tato

práce byla provedena v souladu se zásadami Helsinské deklarace a byla schválena etickými komisemi ÚHK, FNKV, FN Brno a FN Olomouc. Všichni pacienti, jejichž vzorky byly analyzovány v této práci, podepsali informovaný souhlas.



Obrázek 4. Schéma přípravy klonů izolovaných z buněčné linie KCL-22

3.3 Metody

3.3.1 Izolace leukocytů z PK a příprava buněčných lysátů

Celkové leukocyty byly izolovány metodou osmotické lýzy z odběru PK. Celkové leukocyty byly po odstranění erytrocytů a ostatních složek krve promyty ve fosfátovém pufru (PBS). Počet živých buněk v suspenzi PBS byl stanoven pomocí barvení v trypanové modři/Trypan Blue (Sigma-Aldrich, USA) na přístroji TC20 Automat Cell counter (Bio-Rad, USA). Získané leukocyty byly lyzovány v TRIzol™ Reagents (Invitrogen, USA) v koncentraci 10 milionů buněk na 1 ml roztoku.

Část odběru PK pacientů byla použita pro separaci mononukleárních a granulocytárních buněčných subpopulací. K oddělení frakcí byla použita metoda gradientové centrifugace přes Ficoll®-Paque (Sigma-Aldrich, USA). Oddělené frakce byly promyty v PBS, případně zbaveny erytrocytární frakce osmotickou lýzou a sloužily k přípravě buněčných lysátů výše popsáním způsobem.

3.3.2 Příprava buněčných lyzátů a izolace NK z buněčných linií

Z buněčných linií vystavovaných různým podmínkám byly připravovány buněčné lyzáty jako výchozí materiál pro další analýzy. Buňky byly po odstranění kultivačního média promyty PBS a spočítány. Lyzáty z celkových kultur byly zpracovávány v koncentraci 1-10 miliónů buněk/ml TRIzol™ Reagents. Lyzáty z klonů KCL-22 byly připravovány v koncentraci 0,5-2 miliony/ml TRIzol™ Reagents. V případě nedostatečného množství buněk při sběru materiálu v experimentu s klony KCL-22 byl připraven lyzát do lyzačního média RLT Plus (All Prep DNA/RNA-Micro Kit, Qiagen, Německo), který sloužil pro izolaci RNA i DNA z minimálního množství buněk. Přibližně 300 000 buněk bylo lyzováno v 300 µl roztoku. Postup izolace DNA a RNA probíhal dle doporučení výrobce.

V pozdějších časových sběrech, při dostatečném množství materiálu byl pro izolaci DNA využit izolační přístroj MagCore HF16 Plus (RBC Bioscience, USA) s použitím Genomic DNA Whole Blood Kitu. Výchozím materiálem byl 0,5-1 milion buněk v 400 µl PBS. Celkový výtěžek z izolace byl 3-6 µg DNA.

3.3.3 Izolace RNA z trizolových lyzátů a příprava cDNA

Buněčné lyzáty v TRIzol™ Reagents sloužily k izolaci celkové RNA. K 1ml buněčného lyzátu bylo přidáno 200 µl směsi chloroform + isoamylalkohol (49:1) a následovala centrifugace při 12 000g 15 min při 4 °C. Centrifugací byly odděleny organická a vodná fáze. Vodná fáze (400 µl) obsahující RNA byla přenesena do čistých zkumavek a RNA byla precipitována pomocí stejného objemu vychlazeného izopropanolu. Po vysrážení získané RNA z vodného roztoku při 40 min inkubaci v 20 °C byla směs opět centrifugována při 10000g 15 min při 4 °C. Získaná RNA byla promyta v 1 ml 75% ethanolu a centrifugována při 10 000g 8 min při 4 °C. Po odstranění ethanolu byla RNA rozpuštěna ve sterilní vodě určené pro molekulární biologii (DNAse/RNase free).

Celkový výtěžek RNA ve vzorcích pacientů a zdravých dárců byl 3-6 µg. U buněčných linií byl výtěžek 1,5-6 µg. Pro sledování genové exprese *BCR-ABL1*, *hOCT1* a *ABCBI* byla RNA přepsána do cDNA s použitím náhodných hexamerů a reversní transkriptázy M-MLV (Promega, USA) dle postupu doporučeného výrobcem. Pro detekci mutací v kinázové doméně *BCR-ABL1* metodou Sangerova sekvenování i NGS byla RNA přepsána do cDNA s použitím náhodných hexamerů a reversní

transkriptázy SuperScript II (Invitrogen, USA). Pro sledování genové exprese pomocí RT² Profiler PCR Arrays (Qiagen, Německo) byla cDNA připravena pomocí kitu RT² First Strand kitu (Qiagen) podle postupu doporučeného výrobcem.

3.3.4 Analýzy genové exprese

3.3.4.1 Onkogen *BCR-ABL1*

Expres *BCR-ABL1* byla měřena kvantitativní reversně transkriptázovou PCR (qRT-PCR) metodou standardizovanou v rámci projektu Evropské leukemické sítě The European Treatment Outcome Study (EUTOS for CML) (Müller M. C., et al. 2009). Výsledky jsou uváděny v mezinárodním měřítku (IS – International Scale). Postup pro měření exprese probíhal dle Standardního operačního postupu (SOP04 příloha 11) Oddělení molekulární genetiky ÚHKT a Národní referenční laboratoře pro DNA diagnostiku Praha (NRL DNA). Laboratoř využívá kontrolní gen *GUSB* (β -glucuronidáza), který byl vybrán na základě komplexní analýzy. V testování provedeném v naší laboratoři se ukázalo, že spolehlivě kvantifikuje i ve vysokých hladinách exprese *BCR-ABL1* genu na rozdíl od genu *ABL1*, u kterého byla prokázána linearita měření pouze v hladinách do 10 % *BCR-ABL1* (Rulcová J., et al. 2007, Moravcová J., et al. 2009).

Použité sekvence primerů a sond (Tabulka 4) byly validovány v rámci programu Europe Against Cancer (Gabert J., et al. 2003). Složení reakční směsi a amplifikační program je uveden v Tabulce 5 a 6).

Tabulka 4. Sekvence primerů a TaqMan sondy pro analýzu *BCR-ABL1*

Název	Sekvence
BCR-ABL1 Forward	5'- TCCGCTGACCATCAATAAGGA-3'
BCR-ABL1 Reverse	5'- CACTCAGACCCTGAGGCTCAA -3'
BCR-ABL sonda	5'- FAM-CCCTTCAGCGGCCAGTAGCATCTGA -BHQ1-3'
GUSB Forward	5'- GAAAATATGTGGTTGGAGAGCTCATT-3'
GUSB Reverse	5'- CCGAGTGAAGATCCCCTTTTTA-3'
GUSB sonda	5'-FAM- CCAGCACTCTCGTCGGTGA CTGTTCA -BHQ1-3'

Tabulka 5. Reakční směs pro qRT-PCR analýzu

Reagencie	Objem
RNA H ₂ O	11,7 μ l
Pufř	2,5 μ l
MgCl ₂ (25 mM)	4,0 μ l
dNTP (10 mM)	0,50 μ l
primer forward (20 μ M)	0,375 μ l
primer reverse (20 μ M)	0,375 μ l
TaqMan sonda (20 μ M)	0,31 μ l
FastStart Taq polymeráza (5U/ μ L)	0,25 μ l

Tabulka 6. Amplifikační program

Krok č.	teplota	čas	Počet cyklů
1	95 °C	10 min	
2	95 °C	15 s	
3	60 °C	1 min	45x krok 2-3

K určení počtu kopií onkogenu *BCR-ABL1* a kontrolního genu *GUSB* byla při každé RT-qPCR analýze analyzována řada plazmidových standardů se známým počtem kopií (*MBCR-ABL* a *GUSB* - Ipsogen, Qiagen, Německo, nebo ERM- AD623 pro oba geny - Join Research Centre, Belgie). Z hodnot Ct těchto standardů byla sestavena kalibrační křivka, která sloužila k určení počtu kopií genu *BCR-ABL1* (*GUSB*) ve vzorcích. Každý analyzovaný vzorek byl měřen v duplikátu. Výpočet hladiny transkriptu *BCR-ABL1* (IS) probíhal dle vzorce:

$$\text{hladina transkriptu } [\% \text{ IS}] = \frac{\sum \text{počet kopií } BCR - ABL1}{\sum \text{počet kopií } GUSB} \times 100 \times CF$$

Hodnotu CF (conversion factor) získává laboratoř na základě mezilaboratorních testů zkoušek jakosti, která je organizována v rámci EUTOS projektu referenční celoevropskou laboratoří (National Genetics Reference laboratory Wessex, Salisbury UK). CF umožňuje měřené hodnoty exprese *BCR-ABL1* uvádět v IS.

3.3.4.2 Expresse *hOCT1* a *ABCBI*

Genová exprese buněčných transportérů byla měřena pomocí TaqMan gene expression assay Hs00184491_m1 pro *ABCBI* a Hs00427552_m1 pro *hOCT1* (Thermo Fisher Scientific USA) s použitím TaqMan™ Gene Expression Master Mixu (Thermo Fisher Scientific USA). Jako kontrolní gen byl použit *GUSB* analyzovaný pomocí primerů a TaqMan proby, jak bylo uvedeno výše. Pro určení počtu kopií při analýzách exprese obou výše uvedených transportéru byly vytvořeny plazmidové standardy. Pro přípravu standardů byl použit TOPO TA Cloning kit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific USA) s postupem doporučeným výrobcem. Získané ověřené plazmidy byly izolovány pomocí Qiaprep Spin Miniprep kitu (Qiagen, Německo). Vložený inzert v plazmidu byl ověřen sekvenací a získaný plazmid byl linearizován pomocí restriktivního enzymu NSI I. Výpočet počtu kopií v získaném standardu proběhl dle vzorce:

$$\text{Váha } [Da(\frac{g}{mol})] = (\text{Velikost plazmidu} + \text{velikost inzertu})[bp] * 330[Da] * 2 [\text{nucleotide}/bp]$$

$$\text{počet kopií} = \frac{\text{Váha } [g/mol]}{\text{Avogadrovo číslo}}$$

Plazmidové standardy, s určeným počtem kopií, nařaděny desítkovou řadou do nosičové DNA (SalmonSperm DNA-100ng/ul-Invitrogen-Thermo Fisher Scientific USA), sloužily v analýzách k určení absolutního počtu kopií ve vzorcích. Pro výsledný výpočet byl použit vzorec:

$$\text{exprese } hOCT1(ABCB1)[\%] = \frac{\text{abs. počet kopií } hOCT1(ABCB1)}{\text{abs. počet kopií } GUSB} \times 100$$

3.3.4.3 Expresse genů pomocí RT² Profiler™ PCR Array Human DNA Damage Signaling Pathway a RT² Profiler™ PCR Array Human DNA Repair

Při měření exprese genů signálních drah účastnících se odpovědi na poškození DNA a oprav DNA byl dodržen postup doporučený výrobcem (Qiagen, Německo). RNA byla přepisována pomocí RT2 First Strand Kit (Qiagen, Německo). V analýzách bylo dodrženo doporučené množství RNA v rozsahu 25-500 ng. Každá analýza obsahovala kontrolu PCR reprodukovatelnosti a kontrolu nepřítomnosti kontaminace genomickou DNA. Výsledky měření exprese analyzovaných genů byly normalizovány na průměr 4 kontrolních genů obsažených v kitu (*B2M*, *GADPH*, *RPLP0*, *HPRT*). Kontrolní gen *ACTB* byl z hodnocení vyřazen, neboť změny jeho exprese v analýzách se výrazně odlišovaly od ostatních kontrolních genů. Hodnocení bylo prováděno metodou $\Delta\Delta CT$ (Bustin 2004). Hodnota $2^{-\Delta\Delta CT}$ byla stanovena pro jednotlivé geny. Jako signifikantní změna exprese byla považována změna o více než dvojnásobek; FC (fold change) vyšší než 2, nebo nižší než 0,5. Analýza DNA damage signaling i analýza DNA repair signaling obsahovala 84 genů. Součástí obou analýzy bylo 40 genů shodných, celkem tedy byla provedena analýza 128 různých genů (Příloha 1).

3.3.5 **Detekce mutací v kinázové doméně BCR-ABL1**

3.3.5.1 Sangerovo sekvenování v prostředí kapilární elektroforézy

Analýza mutací v kinázové doméně *BCR-ABL1* probíhala dle naší původní práce (Poláková K. M., et al. 2010) a standardního operačního postupu (SOP04 příloha 9) Oddělení molekulární genetiky ÚHKT a Národní referenční laboratoře pro DNA diagnostiku Praha (NRL DNA). Selektivní amplifikace úseku cDNA fúzního genu *BCR-ABL1* byla prováděna pomocí primerů forward 5'-TGA CCA ACT CGT GTG TGA AAC TC-3' a reverse 5'-TCC ACT TCG TCT GAG ATA CTG GAT T-3' s využitím AccuPrime™ SuperMix (Invitrogen, USA). Získané PCR produkty byly 100x ředěny ve vodě pro molekulární biologii. Ve druhém kroku PCR byl amplifikován úsek kinázové

domény z předchozího kroku amplifikace s použitím forward primeru 5'-TGG TTC ATC ATC ATT CAA CGG-3' a reverse primeru 5'-GAT ACT GGA TTC CTG GAA CA -3'. Získaný amplifikační produkt byl přečištěn pomocí QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Německo). Kvalita obou PCR produktů byla kontrolována pomocí elektroforézy v 2% agaróze. Přečištěné PCR produkty z druhé amplifikace sloužily jako templát pro sekvenační reakci prováděnou s použitím kitu Big-Dye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Qiagen, Německo) dle postupu doporučeného výrobcem. Sekvenační produkty byly přečištěny DyeEx™ 2.1 Spin Kitem (Qiagen, Německo), vysušeny v systému SpeedVac a rozpuštěny ve 25 µl formamidu. Rozpuštěné produkty byly denaturovány 3 min při 96 °C. Sekvenační analýza probíhala na přístroji ABI PRISM 3500 (Thermo Fisher Scientific, USA). Získané sekvence byly analyzovány s použitím softwaru Mutation Surveyor v 5.00 (Softgenetic, USA).

3.3.5.2 Sekvenování nové generace – NGS

Postup NGS analýzy kinázové domény *BCR-ABL1* popisuje detailně naše původní práce Machova Polakova et al. 2015. Selektivní amplifikace cDNA kinázové domény *BCR-ABL1* byla provedena ve dvou krocích. V prvním kroku došlo k preamplifikaci *BCR-ABL1* s použitím forward primeru, ležícím v exonu 13 *BCR* genu (5'TGACCAACTCGTGTGTGAAACTC3'), a reverse primeru položeném v exonu 11 *ABL1* (5'-ATCTCAGGCACGTCAGTGGT-3'). Druhá amplifikace byla prováděna s použitím primerových párů, které byly navrženy v rámci evropského konsorcia IRON II study (Interlaboratory RObustness of Next-Generation Sequencing) (Kohlmann A., et al. 2013), jehož byla naše laboratoř součástí. Amplifikace probíhala ve 4 PCR reakcích, poskytujících 4 částečně se překrývající amplikony o velikosti cca 350bp, které pokrývaly celou cDNA sekvenci, kódující kinázovou doménu *BCR-ABL1*. NGS analýza probíhala na přístroji GS Junior Roche (technologie 454; Roche Applied Sciences, Švýcarsko). Data byla analyzována za pomoci softwaru Amplicon Variant Analyzer (Roche, Švýcarsko). K filtrování chyb sekvenace byl použit algoritmus vycházející z dat měřených v kinázové doméně *ABL1* zdravých jedinců (Machova Polakova K., et al. 2015). Postup v tomto případě vycházel přímo z produktu amplifikace kinázové domény *ABL1* (bez preamplifikace *BCR-ABL1*). Z důvodu ukončení technické podpory NGS platformy společnosti Roche Applied Scientific ke konci roku 2016 bylo nutné převést technologii na platformu MiSeq Illumina (USA). NGS analýza na platformě MiSeq byla prováděna pomocí postupu Nextera XT. Selektivní amplifikace kódující oblasti kinázové

domény BCR-ABL1 byla provedena za použití forward primeru ležícím v exonu 13 *BCR* genu (5'GAAACTCCAGACTGTCCACA3') a reverse primeru ležícím v exonu 9/10 *ABL1* genu (5' CCTTTTCCACTTCGTCTGAG -3'). Amplikon byl přečištěn pomocí PCR Purification Kitu (Qiagen, Německo) a byla změřena koncentrace získaného produktu fluorimetricky pomocí PicoGreen (Invitrogen, USA). Naředěné PCR produkty (0,2 ng/μl) byly použity jako vstupní materiál do Nextera XT kitu (Illumina, USA) pro přípravu amplikonové knihovny, dle postupu doporučeného výrobcem. Ze získaných knihoven byl vytvořen pool o 2nM koncentraci, který byl ředěn a denaturován dle doporučení výrobce. Sekvenována byla 10pM knihovna pomocí Micro kitu V2 – 300 cyklů (Illumina USA) na sekvenační platformě MiSeq Illumina (USA). Analýza dat probíhala pomocí softwaru NextGene (Softgenetics, USA). Limit blanku (LoB), limit detekce (LoD) a limit kvantifikace (LoQ) byly stanoveny z NGS dat získaných po analýze cDNA kinázové domény *ABL1* 15 zdravých dárců v duplikovaných analýzách. Výpočet frekvence chyb byl proveden pomocí Poissonovy distribuce. Pro amplifikaci cDNA kinázové domény *ABL1* zdravých dárců byl použit odlišný forward primer (5'-GTAGCATCTGACTTTGAGCC-3'), který hybridizuje k exonu 2 genu *ABL1*.

3.3.5.3 Digitální ASO PCR pro detekci mutací v DNA

K detekci mutací v kinázové doméně *BCR-ABL1* na úrovni DNA pomocí alelově specifické kapkové digitální PCR (ASO-ddPCR) byly použity assaye pro detekci mutace T315I, E255K a Y253H od firmy Bio-Rad (USA). Reakční směs a podmínky reakce byly provedeny dle doporučení výrobce. Analýza byla prováděna ve dvou až čtyřech replikátech. Pro určení % mutace v *BCR-ABL1* byla provedena kvantifikace *BCR-ABL1* DNA. Pro tuto analýzu byla použita specifická assay navržená dle sekvence DNA zlomu u linie KCL-22. Ke stanovení množství DNA a tím i počtu analyzovaných buněk byl měřen počet kopií genu pro albumin. Použité primery jsou uvedeny v Tabulce 7.

Výpočet:

$$\% \text{ mutace} = \frac{\sum \text{kopíí mutace ve } 20\mu\text{l}}{\sum \text{kopíí BCR - ABL1 ve } 20\mu\text{l}} \times 100$$

Tabulka 7. Sekvence použitých primerů

Název	Sekvence
BCR-ABL1 Forward KCL-22	5'GATGCTCTGTGCCTTGGAT3'
BCR-ABL1 Reverse KCL-22	5'ACAAGGTATGCAAATGGATGTAAC3'
BCR-ABL1 Probe KCL-22	5'CCCACTCCCGTCCTCATTACAGAA3'
Albumin Forward	5'TGAAACATACGTTCCCAAAGAGTTT3'
Albumin Reverse	5'CTCTCCTTCTCAGAAAGTGTGCATAT3'
Albumin probe	5'TGCTGAAACATTCACCTTCCATGCAGAT3'

3.3.6 Detekce mutací v genech nejčastěji mutovaných u myeloidních malignit

3.3.6.1 Analýza mutací pomocí SeqCap EZ HyperCap Nimble gen (Roche)-NGS

Metodika umožňuje analýzu mutací ve vybraných 33 genech nejčastěji mutovaných u myeloidních malignit. Seznam analyzovaných genu shrnuje Tabulka 8.

Příprava knihovny probíhala podle SeqCap EZ HyperCap Workflow (Roche, Švýcarsko) s postupem double capture. Koncentrace získané knihovny byla určena pomocí KAPA Library Quantification Kit dle postupu výrobce (Roche, Švýcarsko). Sekvenována byla 15pM knihovna pomocí V2 Sequence kitu – 300 cyklů (Illumina, USA) na sekvenační platformě MiSeq Illumina (USA). Analýza dat probíhala pomocí software NextGene (Softgenetics, USA). Citlivost detekce mutací v této analýze je 5 % při požadovaném minimálním pokrytí 500 čtení na nukleotid.

Tabulka 8. Seznam sekvenovaných genů panelu SeqCap (Roche)

Zkratka	Název genu	Sekvenované exony
ABL1	Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1	4-10
ASXL1	Putative Polycomb group protein ASXL1	12
ATRX	ATP-dependent helicase ATRX, X-linked helicase II	8-10, 17-31
BCOR	BCL-6 Interacting Corepressor	všechny exony
BCORL1	BCL6 Corepressor Like 1	všechny exony
CBL	E3-ubiquitine protein ligase	8+9
CEBPA	CCAAT/enhancer-binding protein alpha	všechny exony
DNMT3A	DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3A	všechny exony
EZH2	Histone-lysine N-methyltransferase enzyme	všechny exony
FLT3	Receptor-type tyrosine-protein kinase FLT3	14+15+20
GATA1	Erythroid transcription factor-GATA-binding factor 1	2
GATA2	GATA-binding factor 2	2-6
IDH1	Isocitrate dehydrogenase 1 (NADP+)-soluble	4
IDH2	Isocitrate dehydrogenase 2 (NADP+)-mitochondrial	4
KIT	Mast/stem cell growth factor receptor (SCFR)	2 + 8-19
KRAS	K-ras protooncogene, GTPase	2+3
MLL (KMT2A)	Histone-lysine N-methyltransferase 2A	5-11
NPM1	Nucleophosmin (NPM)	11
NRAS	N-ras protooncogene	2+3
PHF6	PHD finger protein 6	všechny exony
PTEN	Phosphatase and tensin homolog	5+7
PTPN11	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 11	3+13
RUNX1	Runt-related transcription factor 1	všechny exony
SF3B1	Splicing factor 3B subunit 1	12-16
SMC3	Structural maintenance of chromosomes protein 3	10,13,19,23,25+28
SRSF2	Splicing factor, arginine/serine-rich 2	1
TET2	Tet methylcytosine dioxygenase 2	3-11
TP53	Tumor suppressor p53	2-11
U2AF1	Splicing factor U2AF 35 kDa subunit	2+6
WT1	Wilms tumor protein	4-9
ZRSR2	U2 small nuclear ribonucleoprotein auxiliary factor 35 kDa subunit-related protein 2	všechny exony
SIRT1	NAD-dependent deacetylase sirtuin-1	všechny exony
EZH1	Histone-lysine N-methyltransferase EZH1	všechny exony
PRPF8	Pre-mRNA-processing-splicing factor 8	všechny exony

3.3.6.2 Analýza mutací v genu *KRAS* pomocí sangerova sekvenování

Detekce mutací probíhala ve 212 bp dlouhém amplikonu ležícím mezi introny 1 a 2. Příprava amplikonu probíhala dle reakce popsané v Tabulka 9, 10 a 11.

Tabulka 9. Sekvence použitých primerů

Název	Sekvence
KRAS Forward	5' AAAGGTACTGGTGGAGTATTTGA 3'
KRAS Reverse	5' ACGAATATGATCCAACAATAGAGGT 3'

Tabulka 10. Složení reakční směs pro PCR reakci

Reagencie	Objem
RNA H ₂ O	8 µl
AccuPrime™ SuperMix I	10 µl
primer forward (10 µM)	0,5 µl
primer reverse (10 µM)	0,5 µl
DNA	1 µl

Tabulka 11. Amplifikační program

Krok č.	Teplota	Čas	Počet cyklů
1	94 °C	2 min	
2	94 °C	15 s	
3	60 °C	30 s	
4	68 °C	2 min	35x krok 2-4

Kvalita PCR produktů byla kontrolována pomocí elektroforézy v 2% agaróze. PCR produkty sloužily jako templát pro sekvenační reakci prováděnou s použitím kitu Big-Dye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Qiagen, Německo), reakční podmínky jsou uvedeny v Tabulka 12 a 13. Sekvenační produkty byly přečištěny DyeEx™ 2.1 Spin Kitem (Qiagen, Německo), vysušeny v systému SpeedVac a rozpuštěny ve 25 µl formamidu. Rozpuštěné produkty byly denaturovány 3 min při 96 °C. Sekvenační analýza pobíhala na přístroji ABI PRISM 3500 (Thermo Fisher Scientific, USA). Získané sekvence byly analyzovány s použitím softwaru Mutation Surveyor v 5.00 (Softgenetics, USA).

Tabulka 12. Složení reakční směsi pro sekvenaci forward a reverse řetězce.

Reagencie	Objem
RNA H ₂ O	5,5 µl
5x sequencing buffer	1 µl
Big-Dye v3.1 Sequencing Kit	1 µl
primer forward /reverse 10 µM	1 µl
Produkt PCR reakce	1,5 µl

Tabulka 13. Amplifikační program sekvenační reakce

Krok č.	teplota	čas	Počet cyklů
1	95 °C	10 s	
2	55 °C	10 s	
3	60 °C	4 min	25x (krok 1-3)

3.3.7 Průtoková cytometrie

3.3.7.1 Analýza imunoprofilů pacientů

Analýza buněčných subpopulací ve vzorcích pacientů byla realizována v rutinních laboratořích průtokové cytometrie ÚHKT Praha a FN Olomouc. Metodika umožňující

hodnocení zastoupení celkových T lymfocytů, subpopulací CD4⁺ a CD8⁺ T-lymfocytů a CD56⁺ a CD16⁺ NK buněk je podrobně popsána v článku – Příloha č. 2.

3.3.7.2 Analýza povrchové exprese CD38

Buněčné linie KCL-22 a klony KCL-22 byly analyzovány na přítomnost povrchové molekuly CD38 pomocí protilátky anti CD38 (Sony Biotechnologie USA). Exprese byla měřena na průtokovém cytometru BD FACS Canto II (Becton Dickinson, USA). Získané výstupy byly analyzovány s pomocí programu FACSDiva software v 6.1.

3.3.7.3 Měření apoptózy

Pro měření apoptózy buněk byl použit Annexin V, konjugovaný s fluorescenční barvou APC (Allofukokyanin, ExBio ČR). Buněčná suspenze obsahující $0,5 \times 10^6$ buněk byla v kyvetách dvakrát promyta Annexin vazebným pufrem (1x). Ke zbytkovému objemu bylo přidáno 0,8 μM Annexinu V – APC a kyveta inkubována 15 minut ve tmě a chladu. Buňky byly promyty v PBS. Vytvořená peleta buněk byla resuspendována v 1 ml PBS s albuminem a následně měřena na průtokovém cytometru BD FACS Canto II (Becton Dickinson, USA). Krátce před měřením byl do zkumavky přidán 1 μl interkalačního činidla propidium jodidu, který barví pozdně apoptotické a nekrotizující buňky. Získané výstupy byly analyzovány s pomocí programu FACSDiva software v 6.1.

3.3.8 **Analýza proliferace a viability buněk**

3.3.8.1 Měření proliferace

K analýze proliferace u buněčných kultur a klonů byla použita Quick cell proliferation colorimetric assay (Bio Vision, USA). Pro měření bylo nasazeno 100 000 buněk, analýza probíhala v časových bodech 72 hodin, 96 hodin a 120 hodin, v technických tetraplikátech. Z nasazených buněk bylo v době měření odebráno 90 μl suspenze a smícháno s 10 μl ECS roztoku. Takto připravená deska byla inkubována 2 hodiny při 37 °C. Absorbance byla následně měřena na přístroji Chameleon Multilabel Microplate Reader (BioScan, USA) při vlnové délce 450 nm.

3.3.8.2 Analýza IC 50 pomocí MTT assay

MTT test sloužil ke stanovení hodnot IC₅₀ pro imatinib u použitých buněčných linií. Použití kitu MTT (Thermofisher, USA) se řídilo doporučením výrobce. Reakce vycházela z 100 000 buněk, analýza byla prováděna po 72 h. Ze suspenze bylo odebráno

100 μ l a smícháno s 10 μ l roztoku s MTT a deska byla inkubována 4 hodiny při 37 °C. Následně byla přidána směs HCl a SDS a provedena inkubace 12 h při 37 °C. Absorbance byla měřena na Chameleon Multilabel Microplate Reader (BioScan, USA) při vlnové délce 570 nm.

3.3.9 Cytogenetická analýza

Cytogenetická charakterizace buněčné linie KCL-22 a klonů odvozených od této linie byla provedena akreditovanou metodou Analýza chromozomových odchylek metodou mFISH/mBAND (SOP-ÚLBLD-CNC-3) ve spolupráci s oddělením Cytogenetiky ÚHKT v Praze.

3.3.10 Statistické metody

K hodnocení rozdílu genové exprese 128 genů analyzovaných pomocí RT² Profiler™ PCR Array Human DNA Damage Signaling Pathway a RT² Profiler™ PCR Array Human DNA Repair ve skupině rezistentních klonů KCL-22 a kontrolních klonů KCL-22 byl použit nepárový Studentův t-test.

Klastrovací analýza profilů genové exprese byla provedena nehierarchickou shlukovou analýzou (K-mean clustering), založenou na analýze Pearsnova korelačního koeficientu. K vizualizaci profilů genové exprese (heatmap) byl použit software MeV4 (Multiple Experiment Viewer; <http://mev.tm4.org/>, Saeed AI et al., BioTechniques 2003).

Statistické hodnocení rozdílu v expresi *hOCT1* a *ABCBI* genu ve skupině zdravých dárců a skupinách pacientů s různou odpovědí na léčbu imatinibem bylo provedeno pomocí Kruskal Wallis testu. Následná analýza byla provedena Dunnovým vícenásobným porovnávacím testem. Korelační analýzy genové exprese *ABCBI* a *hOCT1* s množstvím nezralých buněk v analyzovaných vzorcích byly provedeny pomocí Spermanova korelačního testu. Statistická analýza a grafy byly vytvořeny pomocí software GraphPad Prism version 4.03 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

Fisherův exaktní test byl použit k analýze pravděpodobnosti dosažení optimální odpovědi dle ELN doporučení v 6 a 12 měsících na terapii imatinibem ve skupinách s nízkou a vysokou hladinou exprese *hOCT1* a *ABCBI* v době určení diagnózy CML.

4 Výsledky

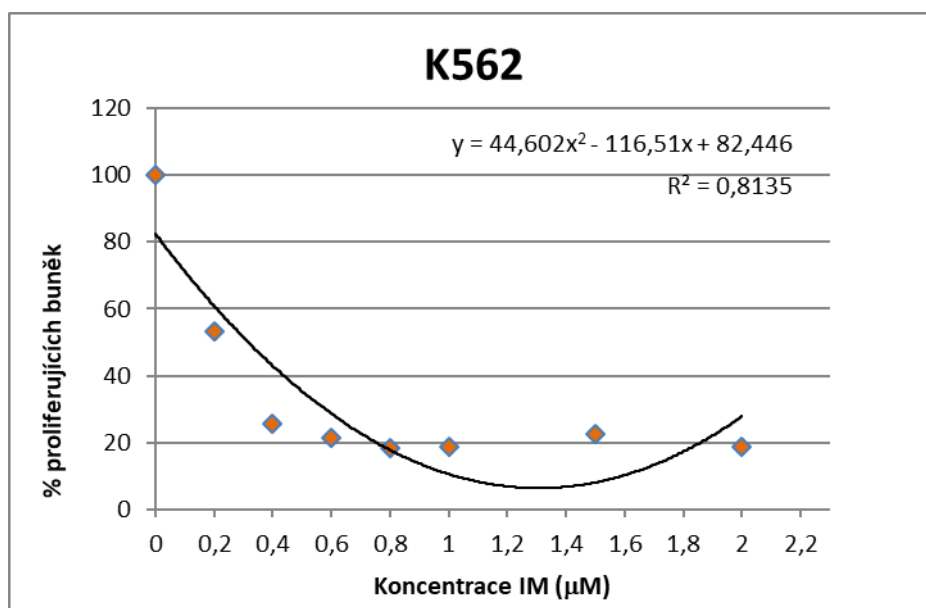
4.1 Cíl 1

4.1.1 Odvození CML buněčných linií rezistentních k léčbě imatinibem

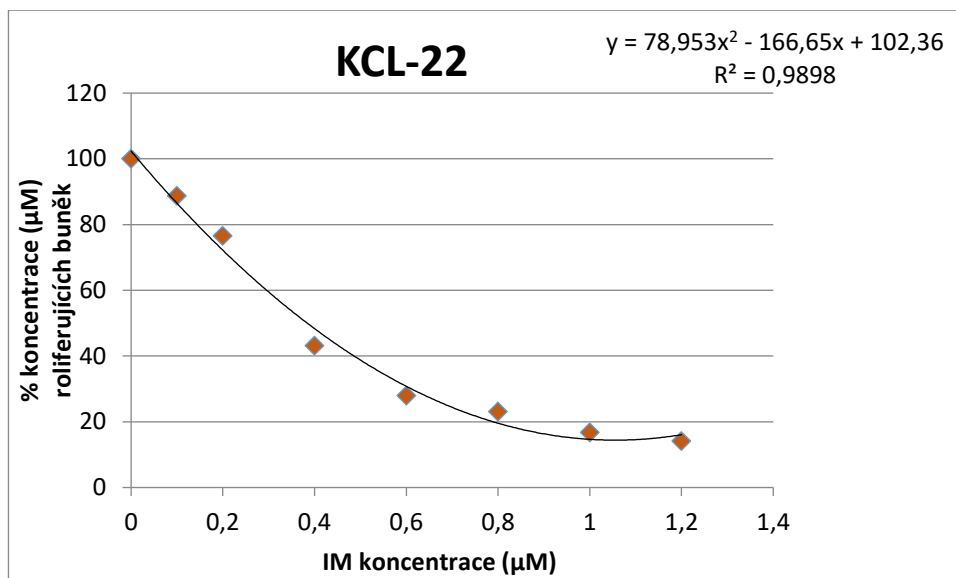
Při výběru vhodného modelového systému pro studium mechanismů souvisejících s vývojem mutací v kinázové doméně BCR-ABL1 byly provedeny testovací analýzy na liniích K562 a KCL-22. Pro obě zmíněné linie byla určena hodnota poloviny maximální inhibiční koncentrace (IC50) pro imatinib (Tabulka 14, Obrázek 5 a 6).

Tabulka 14. Hodnoty IC50 (μM) pro imatinib u buněčných linií KCL-22 a K562

Buněčná linie	IC50 lineárně (μM)	IC50 polynomicky (μM)
K562	0,20	0,31
KCL-22	0,52	0,38



Obrázek 5. Analýza hodnoty IC50 pro linii K562. Analýza hodnocena v lineárním vyjádření s hodnotou 0,20μM IM, při použití polynomického vyjádření hodnota IC50 0,31μM.



Obrázek 6. Analýza IC50 buněčné linie KCL-22. Analýza hodnocena v lineárním vyjádření s hodnotou $0,52\mu\text{M}$ IM, při použití polynomičného vyjádření hodnota IC50 $0,38\mu\text{M}$ IM.

4.1.2 Vývoj modelového systému pro studium rezistence vůči TKI:

4.1.2.1 Testování buněčné linie K562

Vývoj rezistentní linie K562R probíhal po dobu 10 měsíců. Buňky linie K562 byly postupně vystavovány účinku imatinibu o koncentraci od $0,1\mu\text{M}$ do $2\mu\text{M}$, použitá koncentrace byla zvyšována po $0,1\mu\text{M}$. Doba vystavení jedné koncentraci byla 15-30 dní. Ustálená rezistentní linie K562R roste v prostředí s imatinibem při koncentraci $2\mu\text{M}$. NGS analýza mutací v kinázové doméně BCR-ABL1 z buněk rostoucích v koncentracích $0,1\mu\text{M}$ - $2\mu\text{M}$ imatinibu nedetekovala přítomnost mutací v kinázové doméně BCR-ABL1. Linie K562 není vhodným modelovým systémem pro studium rezistence Ph+ leukemických buněk spojené s mutagenezí v KD BCR-ABL1, protože využívá jiný mechanismus rezistence.

4.1.2.2 Testování buněčné linie KCL-22

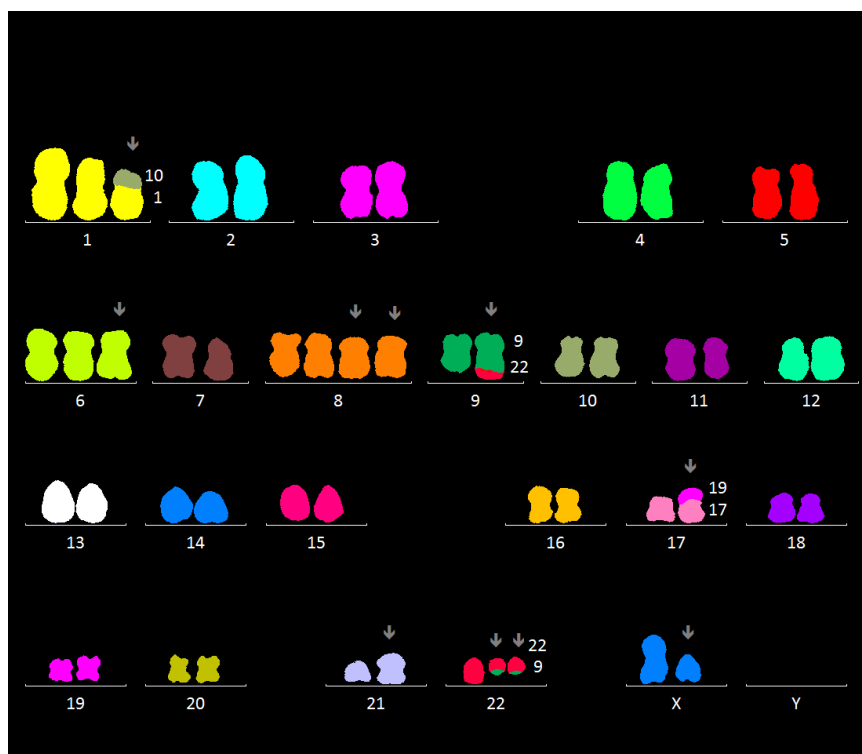
Vývoj rezistentní linie KCL-22R probíhal po dobu 3 měsíců. Buňky linie KCL-22 byly vystaveny účinku imatinibu o koncentraci $0,1$ - $4\mu\text{M}$. Zvyšování koncentrace probíhalo z $0,4\mu\text{M}$ (45 dní) do $1,2\mu\text{M}$ (15 dní) a následně pak do $4\mu\text{M}$ (30 dní). Koncentrace $4\mu\text{M}$ odpovídá hodnotě plazmatické koncentrace u pacientů léčených imatinibem v dávce 400-600 mg/den (Peng B., et al. 2005). Buněčná linie KCL-22 po vystavení účinku imatinibu rozvíjí rezistenci velmi rychle. V 5 nezávislých experimentech byly u rostoucí linie KCL-22R detekovány mutace v KD BCR-ABL1

vždy od koncentrace imatinibu 0,3 μ M výše. Pokud se buňky KCL-22 vystavily účinku 0,4 μ M imatinibu (tato koncentrace *in vitro* přibližně odpovídá hodnotě IC50), mutační analýzy v čase od 3 do 5 týdnů detekovaly mutace T315I a E255K.

Linie KCL-22 je vhodným modelovým systémem pro studium mechanismů rezistence souvisejících s mutagenézí KD BCR-ABL1.

4.1.3 Charakteristika linie KCL-22 pomocí mFISH analýzy

Pomocí mFISH metody byly charakterizovány chromozomální změny v buňkách KCL-22 (Obrázek 7). Buňky nesou 51 chromozomů. Je zde přítomen nadpočetný derivovaný chromozom 1 vzniklý translokací t(1;10), dále derivovaný chromozom 17 vzniklý translokací t(17;19), deletovaný chromozom X, trizomie chromozomu 6, tetrazomie chromozomu 8 a izochromozom 21. Buňky linie KCL-22 obsahují 2x Filadelfský chromozom, vzniklý translokací t(9;22).



Obrázek 7. Výsledek mFISH analýzy buněčné linie KCL-22:

(51,X,del(X)(p21),+der(1)t(1;10)(p11;?),+6,+8,+8,t(9;22)(q34;q11),der(17)t(17;19)(p11;?),i(21)(q10),+der(22)t(9;22)

4.1.4 KCL-22 buněčná linie získává rezistenci k imatinibu rozvojem mutací *de novo* v kinázové doméně BCR-ABL1

V rezistenci k imatinibu se u buněčné linie KCL-22 uplatňují mutace v kinázové doméně BCR-ABL1. Pro objasnění, zda se jedná o expanzi buněk nesoucích mutace

přítomných v kultuře již před vystavením účinku imatinibu nebo o *de novo* mutagenezi, byly provedeny následující experimenty:

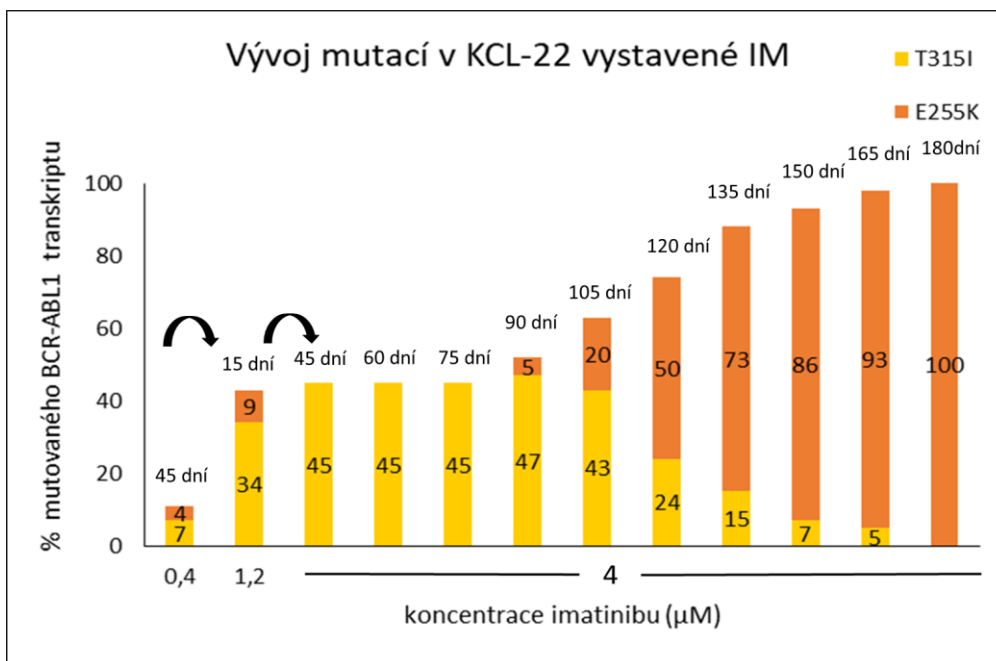
1. Analýza neovlivněné linie KCL-22 na přítomnost mutací v KD BCR-ABL1
2. Sledování vývoje mutací v KD BCR-ABL1 v čase při vystavení imatinibu v různých koncentracích
3. Analýza mutací v kloněch izolovaných z buněčné linie KCL-22
4. Sledování klonálního vývoje mutací v arteficiální kultuře připravené z izolovaných klonů KCL-22 při vystavení odlišným koncentracím imatinibu

4.1.4.1 Mutace v kinázové doméně BCR-ABL1 nebyly detekovány v linii KCL-22 neovlivněné imatinibem

NGS analýzy 8 biologických replikátů linie KCL-22 nezachytily mutace v kultuře bez ovlivnění imatinibem. Analýza byla provedena metodou vysoce citlivého amplikonového sekvenování technologií NGS s individuálním detekčním limitem pro každou pozici nukleotidů sekvenovaného úseku cDNA KD BCR-ABL1, medián 1,5 % (1-3,7 %). Přes vysokou citlivost metody však nelze zcela vyloučit přítomnost řádově desítek buněk, nesoucích mutace, které by po vystavení účinku imatinibu v kultuře expandovaly. Pro vyloučení přítomnosti těchto preexistujících buněk s mutacemi byly provedeny analýzy na úrovni izolovaných klonů KCL-22 (viz kapitola 4.1.4.4, strana 58).

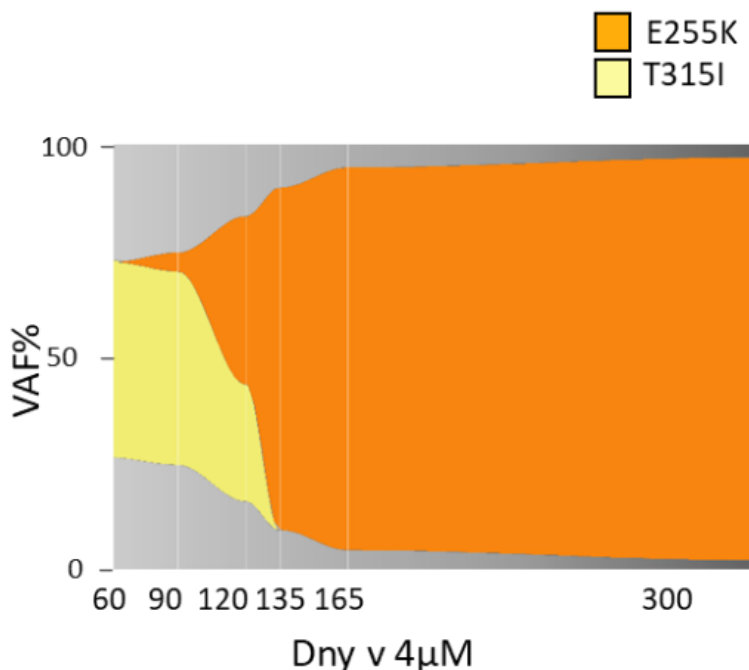
4.1.4.2 Při dlouhodobém vystavení účinku imatinibu na KCL-22 v kultuře expandují buňky s mutacemi na obou Ph chromozomech

Linie KCL-22R rezistentní k 4 μ M imatinibu byla připravena postupným zvyšováním koncentrace ve 3 krocích (0,4 μ M; 1,2 μ M a 4 μ M). V kultuře byly zachyceny mutace E255K a T315I (Obrázek 8). Selektivní tlak, způsobený zvýšením koncentrace imatinibu na 4 μ M, vedl k expanzi buněk nesoucích mutace T315I na jednom ze 2 Ph chromozomů. Při dlouhodobém vystavení účinku vysoké koncentraci imatinibu (4 μ M) došlo k expanzi buněk nesoucích mutaci E255K na obou Ph chromozomech (Obrázek 9). Výsledky NGS analýzy detekující přítomnost mutací na úrovni transkriptu byly potvrzeny DNA analýzou ddASO-PCR s možností přesné kvantifikace s využitím analýzy genomické fúze. Přítomnost mutace E255K na obou Ph chromozomech dala buňkám proliferační výhodu, díky níž v kultuře nakonec zcela převládly.



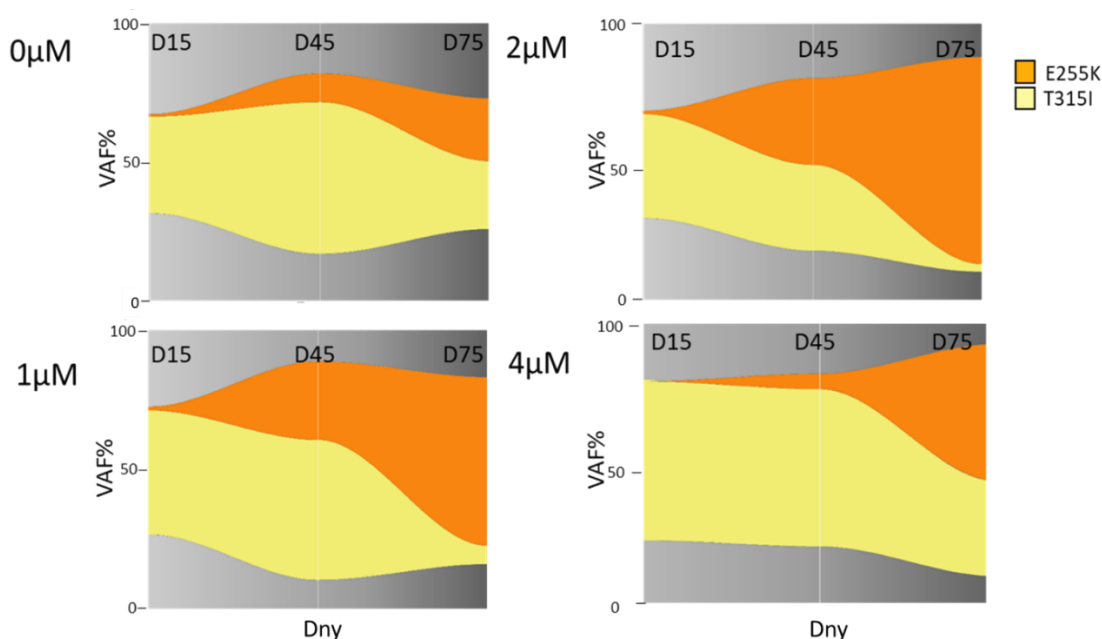
Obrázek 8. Analýza mutačního profilu v průběhu vývoje rezistentní linie KCL-22R k 4μM IM.

Osa X znázorňuje použitou koncentraci IM; osa Y znázorňuje % mutovaného transkriptu BCR-ABL1 analyzovaného pomocí NGS. Analýza mutací po 45 dnech vystavení 0,4μM IM ukazuje přítomnost mutace E255K i T315I. V 1,2μM IM po dalších 15 dnech je detekována opět přítomnost obou mutací s převahou mutace T315I (33,5 %). Po 45 dnech ve 4μM IM byla detekována mutace T315I v 45 % (mutovaný jeden ze dvou Ph chromozomů). Po 90 dnech se objevila přítomnost mutace E255K v 5 %. Její procentuální zastoupení postupně narůstalo a po 180 dnech ve 4μM byla detekována pouze mutace E255K (100 %). Buňky s mutací E255K nesly mutaci na obou Ph chromozomech.



Obrázek 9. Analýza změny mutačního profilu v kultuře KCL-22R ve 4μM IM na DNA úrovni pomocí ddASO PCR Fishplot graf znázorňuje vývoj mutačního profilu v kultuře. Osa X znázorňuje čas sledování 4μM IM; osa Y procentuální zastoupení mutace VAF %.

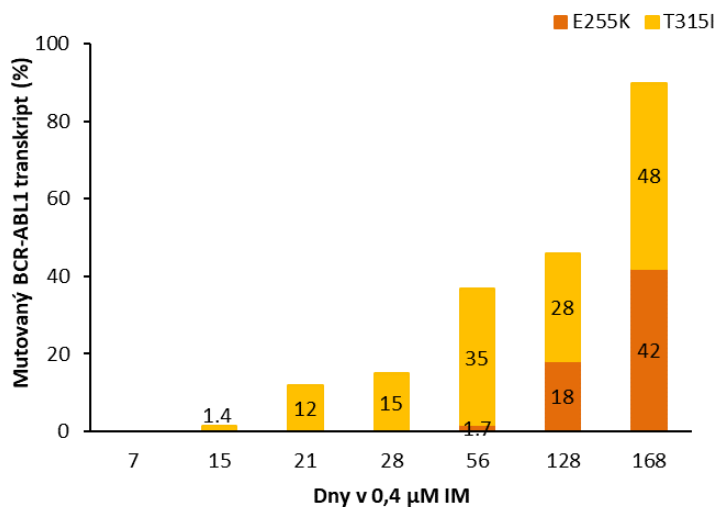
Pro sledování vlivu koncentrace na vývoj mutací byla kultura rezistentní k $4\mu\text{M}$ IM (KCL-22R/ $4\mu\text{M}$ -IM) s detekovanou mutací T315I ve 45 % po 45 dnech růstu (viz Obrázek 8) umístěna do prostředí bez IM a s IM v koncentracích $1\mu\text{M}$ a $2\mu\text{M}$. Klonální vývoj v kultuře ukazuje Obrázek 10. Změna koncentrace IM ovlivnila rychlost expanze buněk nesoucích mutaci E255K na obou Ph chromozomech. V prostředí $2\mu\text{M}$ IM došlo k expanzi subklonu E255K s mutací na obou Ph chromozomech nejrychleji. Rychlost expanze subklonu s mutací E255K v prostředí bez imatinibu byla stejná jako ve $4\mu\text{M}$ IM, odstranění selekčního tlaku imatinibu neovlivnilo rychlost expanze subklonu E255K. Zdá se, že růst buněk nesoucích E255K a buněk s mutací T315I v ustálené buněčné kultuře KCL-22R/ $4\mu\text{M}$ -IM je v čase koncentračně dependentní.



Obrázek 10. Klonální vývoj kultury KCL-22R/ $4\mu\text{M}$ -IM v nižších koncentracích imatinibu. Fish plot grafy znázorňují klonální vývoj kultur sledovaný 75 dní pomocí metody ddASO PCR. Do nižších koncentrací byla kultura KCL-22R/ $4\mu\text{M}$ -IM umístěna po 45 dnech růstu ve $4\mu\text{M}$ IM. Osa Y znázorňuje % zastoupení mutace a osa X délku vystavení příslušné koncentraci.

V kultuře KCL-22R rostoucí v $0,4\mu\text{M}$ IM (KCL-22R/ $0,4\mu\text{M}$ -IM) došlo také při dlouhodobém vystavení k expanzi buněk s mutacemi T315I a E255K (Obrázek 11). V analýze dosahuje přítomnost mutací v součtu 100 %. V případě buněčné linie nesoucí 2 Ph chromozomy tento nálezn znamená, že veškerý BCR-ABL1 transkript nese mutaci. S největší pravděpodobností se jedná o přítomnost dvou subklonů, jednoho s mutací T315I a druhého subklonu s mutací E255K. Pravděpodobnost, že by se jednalo o buňky

nesoucí obě mutace, jedna na jednom Ph chromozomu, druhá na druhém Ph chromozomu, je malá i s ohledem na další výsledky experimentů popsaných níže.



Obrázek 11. Sledování vývoje mutačního profilu KCL-22R/0,4μM-IM na úrovni transkriptu. V kultuře při této koncentraci byla mutace T315I poprvé zachycena po 15 dnech vystavení 0,4μM IM (1,4 %), dalších 15 dní byla detekována pouze mutace T315I v narůstajícím zastoupení (12 % den 21 a 15 % den 30). V následujících časových odběrech byly detekovány mutace T315I i E255K. Po 170 dnech byly detekovány mutace T315I 48 % a E255K 42 %.

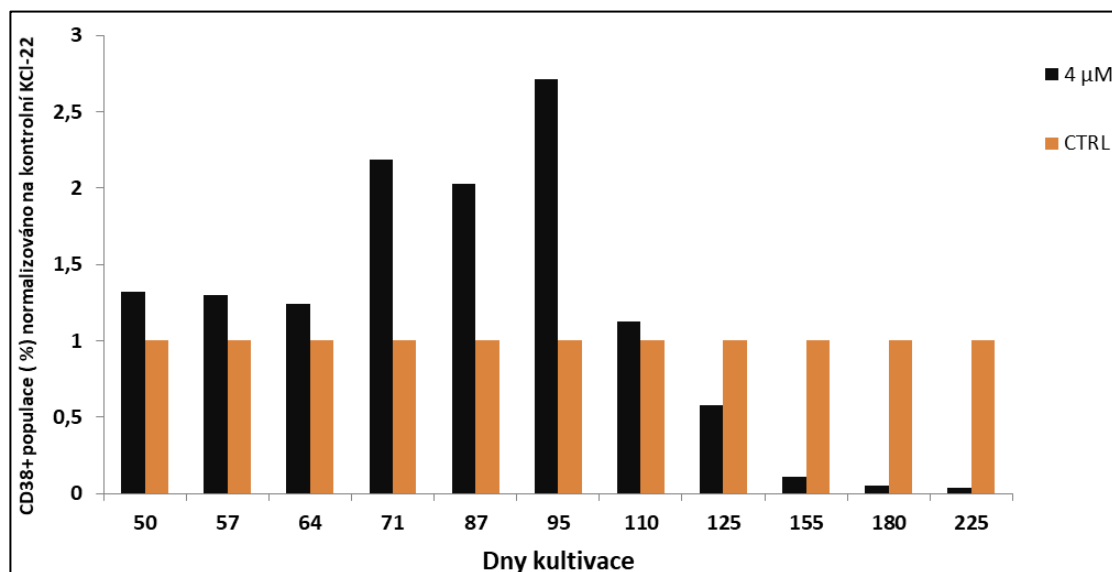
4.1.4.3 Expanze buněk KCL-22R/4μM-IM s mutací E255K na obou Ph chromozomech je doprovázena poklesem povrchové exprese molekuly CD38

Vysoká exprese povrchové molekuly CD38 snižuje intracelulární hladinu nikotinamid adenin dinukleotidu (NAD⁺) čímž je inhibována aktivita NAD⁺-dependentní deacetylázy SIRT1. Bylo popsáno, že inhibice SIRT1 zamezila vzniku BCR-ABL1 mutací v buňkách vystavených účinku IM (Wang Z., et al. 2014).

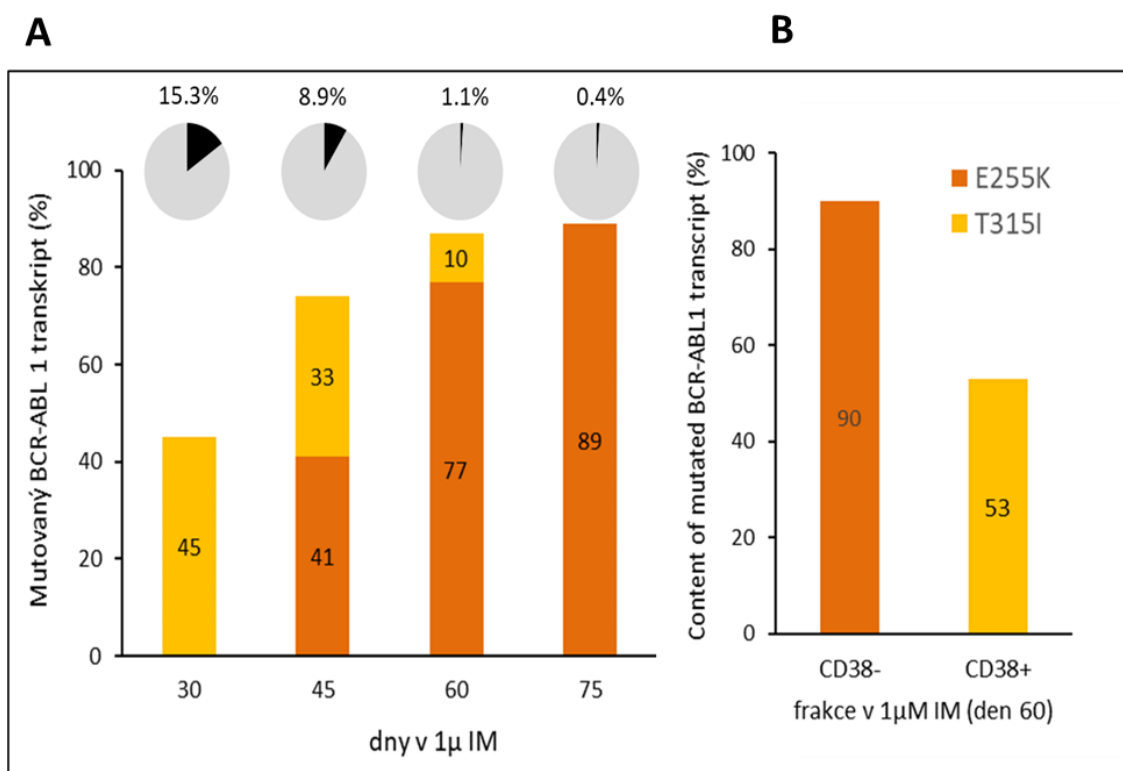
Expanze buněk KCL-22R/4μM-IM s mutací E255K rostoucí v prostředí s 4μM (1μM) IM byla doprovázena poklesem exprese povrchového markeru CD38 (Obrázek 12, 13A-koláčové grafy). Přibližně 1-10 % buněk kultury KCL-22 neovlivněné imatinibem na svém povrchu exprimovalo molekulu CD38.

Kultura KCL-22R/4μM-IM s mutačním profilem T315I (10 %) a E255K (77 %) byla sortována na subpopulace CD38⁺ a CD38⁻ buněk, v kterých byla provedena analýza mutací v BCR-ABL1. CD38⁺ buňky tvořily 1,1 % všech buněk a nesly výhradně mutaci T315I. Buňky CD38⁻ tvořily 98 % buněk z celkové kultury a nesly E255K na obou Ph chromozomech (Obrázek 13A a B). Kultura nesoucí pouze mutaci T315I na počátku (před expanzí subklonu E255K) měla povrchovou molekulu CD38 na 15 % buněk.

V době sortu byla CD38⁺ frakce tvořena pouze subklonem T315I, jehož exprese CD38 byla vyšší než u subklonu E255K.



Obrázek 12. Sledování povrchové exprese CD38 u buněk kultury KCL-22R/4μM-IM. CD38 byla exprimována u 0,5-10 % buněk v neovlivněné kultuře KCL-22. Měření exprese CD38 u kultury KCL-22R/4μM-IM vystavené 4μM IM bylo doplněno měřením exprese u kontrolní kultury KCL-22 a výsledné hodnoty byly na hodnotu exprese kontrolní kultury normalizovány. Po 125 dnech vystavení kultury 4μM IM povrchová exprese CD38 klesala a po 170 dnech zcela vymizela.

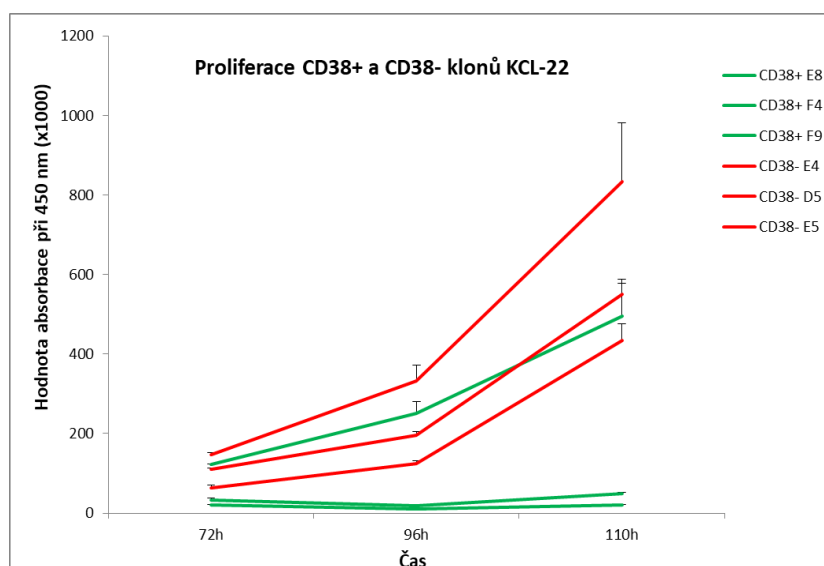


Obrázek 13. A KCL-22R/4μM kultura vystavená 4μM IM po dobu 45 dní byla umístěna do 1μM IM a následně sledována na přítomnost mutací v KD BCR-ABL1 a povrchovou expresi CD38. Koláčové grafy zobrazují procento CD34 pozitivních buněk (černě). **B.** Mutační profil v subpopulacích CD38⁺ a CD38⁻ buněk získaných sortem kultury. Sort byl proveden po 60 dnech v 1μM IM.

Buňky kultury KCL-22R/4 μ M nesoucí T315I a E255K se lišily v expresi CD38. Role přítomnosti povrchové exprese molekuly CD38 při vývoji různých typů mutací byla dále sledována v experimentu s odvozením klonů KCL-22, které byly připraveny sortem po jedné buňce na základě přítomnosti nebo nepřítomnosti povrchové molekuly CD38 (viz kapitola – 4.1.3, Strana 52). Sort byl proveden do média s IM. Experiment měl mimo jiné zodpovědět otázku, zda přítomnost povrchového markeru CD38 hraje úlohu ve vývoji mutací u buněk linie KCL-22 vystavené účinku IM.

4.1.4.4 Klony KCL-22 rezistentní k 4 μ M IM byly izolovány z CD38 negativních a také CD38 pozitivních buněk

V experimentu zaměřeném na přípravu rezistentních klonů, byly buňky linie KCL-22 sortovány po jedné buňce do média s 0,004 μ M IM podle přítomnosti povrchové molekuly CD38. Takto byly připraveny CD38+ a CD38- klony KCL-22. Klony pocházející z KCL-22 CD38- buněk vykazovaly vyšší proliferaci oproti klonům z CD38+ buněk (Obrázek 14). CD38+ buňky také poskytly nižší počty klonů, které rostly (Tabulka 15). V následném kontrolním experimentu při sortu CD38- a CD38+ KCL-22 buněk do média bez IM bylo opět získáno méně proliferujících klonů z CD38+ buněk (15/60), oproti počtu klonů z CD38- buněk (27/60). Přítomnost povrchové molekuly CD38 na povrchu KCL-22 buněk negativně ovlivňuje klonogenicitu v přítomnosti i nepřítomnosti IM.



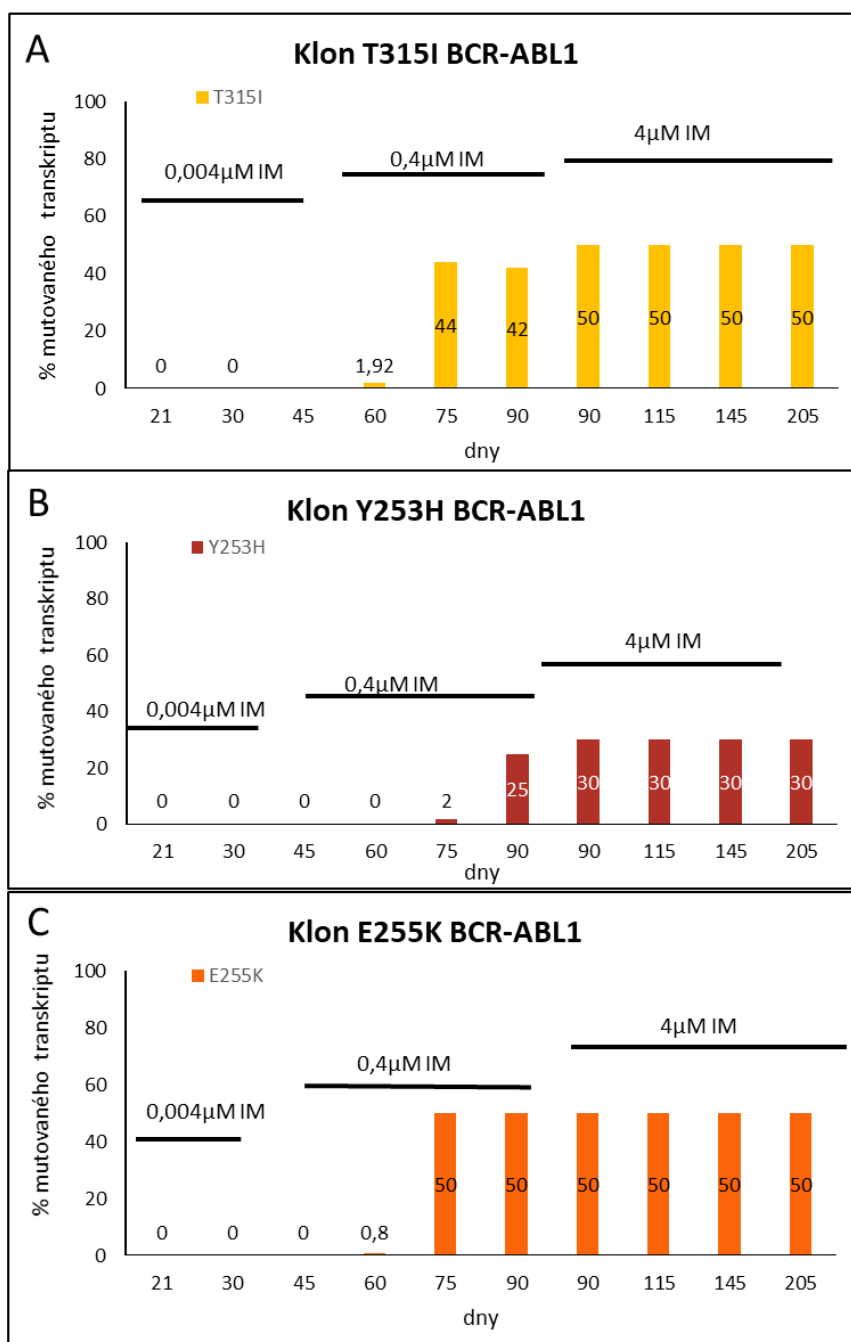
Obrázek 14. Proliferace 3 CD38+ a 3 CD38- klonů KCL-22. Proliferace měřená pomocí „Quick cell proliferation colorimetric assay“. Osa X znázorňuje čas a osa Y hodnotu absorbance měřené při 450 nm (x1000). Hodnota absorbance se zvyšuje s množstvím proliferujících buněk. Analýza byla provedena u 3 náhodně vybraných CD38+(zeleně) a CD38- (červeně) klonů. V grafu jsou uvedeny průměrné hodnoty 4 technických replikátů.

Tabulka 15. Počet klonů proliferujících v jednotlivých fázích vývoje izolovaných klonů rezistentních k imatinibu. Do 0,004 μ M IM bylo sortem po jedné buňce připraveno 60 CD38+ a 60 CD38- buněk. Z 60 buněk rostlo 6 CD38+ a 25 CD38- klonů. Po 30 dnech byly klony přemístěny do 0,4 μ M IM, kde proliferovaly 3 klony CD38+ a 17 klonů CD38-. Po 30 dnech ve 0,4 μ M IM byly klony přesunuty do 4 μ M IM, kde neproliferoval žádný klon z CD38+ buněk, ale rostly 4 klony z CD38- buněk.

Koncentrace IM (μ M)	Počet CD38+ klonů	Počet CD38- klonů
0,004	6	25
0,4	3	17
4	0	4

Ověření teorie *de novo* mutagenese bylo provedeno analýzou 24 klonů, které rostly po sortu do média s 0,004 μ M IM. Mutace nebyly detekovány v analýze vzorků klonů získaných 21. den po sortu u žádného z 24 klonů. NGS analýzy na přítomnost mutací v KD BCR-ABL1 byly provedeny z buněčných lyzátů získaných po 21 dnech v 0,004 μ M IM (čas od sortu poskytující dostatek materiálu k analýze) z 6 CD38+ klonů a 18 CD38- klonů. Materiál ze zbylých 7 CD38- klonů získaných sortem neposkytl kvalitní RNA. Tyto klony nebyly schopné dlouhodobého růstu.

Sortem do média s 0,004 μ M IM s postupným zvyšováním koncentrace IM jsme následně získali 4 klony rezistentní k 4 μ M IM. Tři tyto klony nesly mutace v kinázové doméně BCR-ABL1. Klony jsou dále označovány podle typu BCR-ABL1 mutace, kterou nesly (T315I, Y253H, E255K a klon BCR-ABL1 wt, tj. wild type-bez mutace). Vývoj mutací v klonech znázorňuje Obrázek 15. Mutace jsou v klonech detekovány v maximálním zastoupení 50 %, což v případě buněčné linie nesoucí 2 Ph chromozomy znamená, že mutace je přítomna na jednom Ph chromozomu, tedy mutované jsou všechny buňky. Každá buňka pak nese jeden *BCR-ABL1* gen s mutací a jeden *BCR-ABL1* wt gen, jak jsme ověřili pomocí ddASO PCR metody na úrovni DNA. Mutace se u klonů vyvinuly v koncentraci 0,4 μ M, první detekce byla po 60 až 75 dnech od sortu. Výsledky tohoto experimentu potvrzují teorii *de novo* vývoje mutací v buňkách KCL-22, vystavených účinku IM. Klony, které rozvinuly rezistenci k 4 μ M IM, byly odvozeny ve všech 4 případech z CD38- buněk. Toto zjištění by podporovalo dříve publikovanou teorii (Wang Z., et al. 2014), že nepřítomnost povrchové molekuly CD38 pozitivně ovlivňuje rozvoj mutací, avšak opakovaný experiment tuto teorii nepotvrdil.

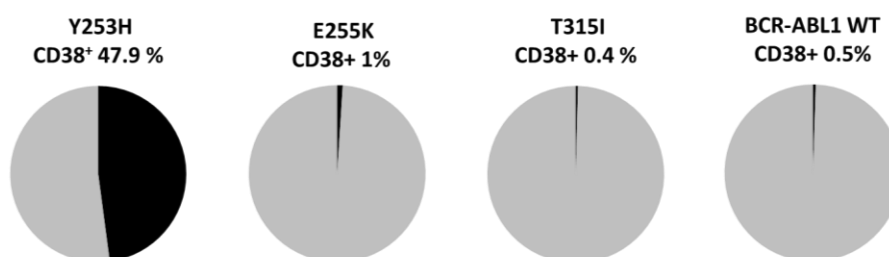


Obrázek 15. Vývoj BCR-ABL1 mutací v kloněch rezistentních k 4 μM IM. Osa X znázorňuje dny od sortu; osa Y % mutovaného transkriptu BCR-ABL1.

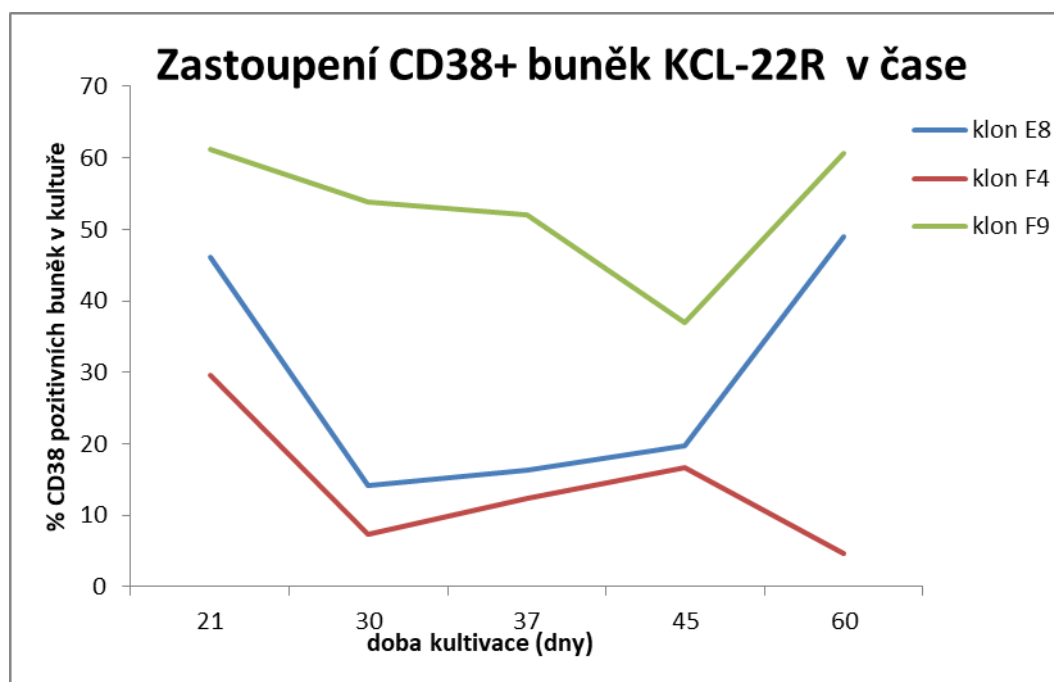
V opakovaném experimentu přípravy klonů při dodržení výše popsaného postupu bylo získáno v koncentraci 0,004 μM IM celkem 19 klonů KCL-22. Deset KCL-22 klonů pocházelo z CD38⁺ buněk a 9 z CD38⁻ buněk. V 0,4 μM IM proliferovalo 6 klonů z CD38⁺ buněk a 3 klony z CD38⁻ buněk. V tomto případě však dva klony odvozené z CD38⁺ buněk vyvinuly mutace v KD BCR-ABL1 (T315I, Y253H) v koncentraci 0,4 μM a proliferovaly i v koncentraci 4 μM IM. Ostatní klony získané v opakovaném

experimentu v koncentraci 4 μ M neproliferovaly. Druhý experiment ukázal schopnost vývoje mutace i v klonech, které pocházejí z CD38+ buňky.

Analýza povrchové exprese CD38 u klonů rezistentních k 4 μ M IM, které byly odvozeny z CD38- buněk, ukázala, že klon původně odvozený z CD38- buňky může expresi této molekuly vykazovat. Klon Y253H obsahoval po 165 dnech od sortu 47,9 % CD38+ buněk, přestože byl odvozen z CD38 negativní buňky, zbývající 3 klony přítomnost molekuly CD38 na povrchu nevykazovaly (Obrázek 16). Povrchová exprese CD38 molekuly se dynamicky mění v čase, jak ukazuje také analýza tří náhodně vybraných klonů v čase (Obrázek 17).



Obrázek 16. Procentuální zastoupení CD38+ a CD38- buněk u KCL-22R klonů. Koláčové grafy znázorňují procentuální zastoupení CD38+ (černá barva) a CD38- (šedá barva) buněk v klonech rezistentních k 4 μ M IM. Analýza byla provedena po 145 dnech od sortu. Klony pocházejí z CD38- buněk linie KCL-22.



Obrázek 17. Graf sledování CD38 exprese v čase u 3 náhodně vybraných CD38+ klonů KCL-22R. Osa X znázorňuje dny od sortu v 0,04 μ M IM, osa Y znázorňuje % CD38 pozitivních buněk. Náhodně vybrané CD38+ klony. Analyzované klony nevyvinuly mutace v KD BCR-ABL1 a nebyly schopny přežít v 4 μ M.

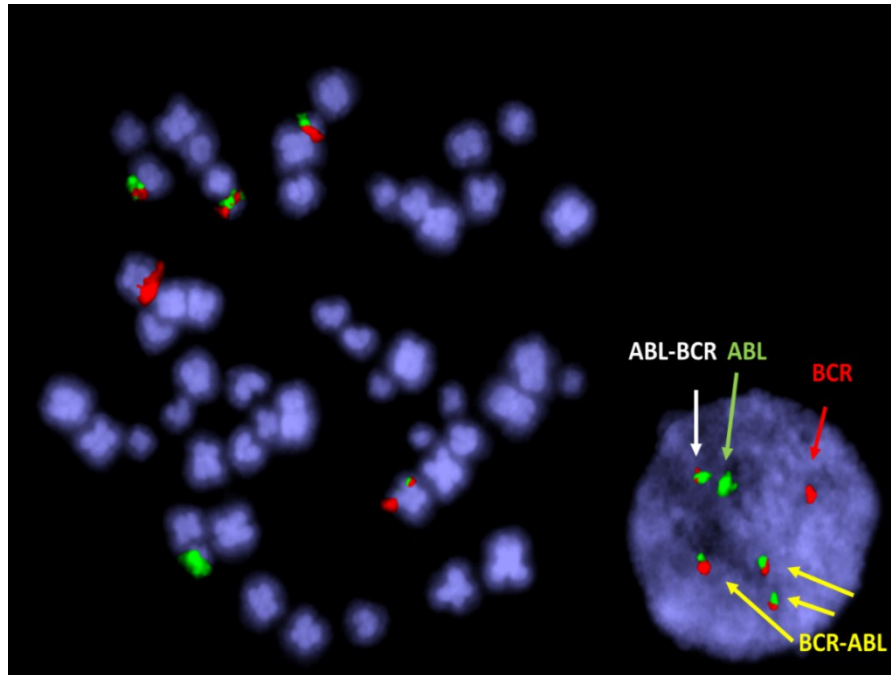
Ze získaných dat nevyplývá jednoznačný vztah mezi nepřítomností povrchové molekuly CD38 a vývojem mutací v kinázové doméně.

Mutace v kinázové doméně BCR-ABL1 byly zodpovědné za rezistenci k 4 μ M IM u 3 klonů. U klonů T315I a E255K byla mutace přítomna na jednom z 2 Ph chromozomů (max. 50 % na úrovni transkriptu), což bylo potvrzeno analýzou mutací na DNA pomocí ddPCR. Kvantifikace *BCR-ABL1* kopií pomocí ddPCR ukázala přítomnost 3 kopií *BCR-ABL1* fúze v buňkách klonu Y253H. Přítomnost dvou Ph chromozomů s třetí (kryptickou) *BCR-ABL1* fúzí byla ověřena pomocí cytogenetické analýzy (Obrázek 18). Mutace Y253H byla přítomna na jedné z 3 *BCR-ABL1* fúzí (max. 30 % na úrovni transkriptu).

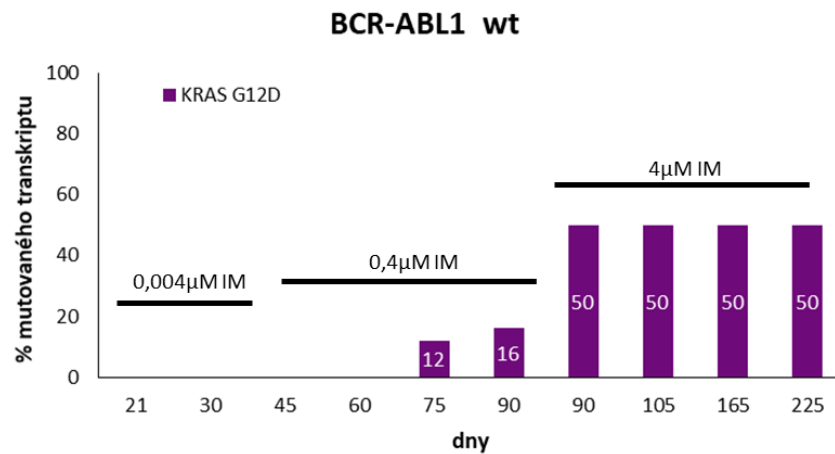
Pro objasnění mechanismu rezistence, který využívá pro přežití ve 4 μ M IM klon s nemutovaným BCR-ABL1 (BCR-ABL1-wt), byla provedena NGS analýza mutací v dalších 32 genech, nejčastěji mutovaných v myeloidních malignitách (Tabulka 8). Analýza byla provedena u všech 4 rezistentních klonů v párových analýzách v odběrech v prvním možném čase po sortu a v odběru s rozvinutou rezistencí k 4 μ M IM. Tabulka 16 zobrazuje geny, ve kterých byly detekovány záměny pouze v jednotlivých KCL-22R rezistentních klonech. Všechny 4 klony odvozené z kultury KCL-22 nesly 13 shodných nukleotidových záměn v genech *DNMT3A*, *TET2*, *PRPF8*, *TP53*, *CEBPA*, *BCOR* a *BCORL* (Tabulka 17). Tři detekované záměny jsou anotovaná SNP, 6 zjištěných záměn je u linie KCL-22 popsáno v databázi canSAR (Tym J. E., et al. 2016) a 4 detekované záměny nejsou v databázi canSAR evidovány.

BCR-ABL1-wt klon nesl tři somatické mutace, které nebyly detekovány u zbylých 3 klonů (Tabulka 16). Mutace G74R v genu *RUNX1* (30 %) a K1933Kfs v genu *ATRX* (40 %) byly v klonu přítomny již v prvním odběru po sortu, zatímco mutace G12D v genu *KRAS* vznikla 60-75 den po sortu (Obrázek 19). G12D *KRAS* mutace, která se vyvinula v klonu *de novo*, byla poprvé detekována v průběhu růstu v koncentraci 0,4 μ M IM a je pravděpodobně zodpovědná za schopnost tohoto klonu proliferovat v prostředí 4 μ M IM.

Klon E255K nesl již od počátku vývoje patogenní mutaci R306X v genu *TP53*.



Obrázek 18. Cytogenetická analýza klonu Y253H. Buňky klonu nesou 3 BCR-ABL1 fúze a jednu fúzi ABL1-BCR, jeden BCR nefúzovaný (červený) a jeden ABL1 nefúzovaný (zeleně).



Obrázek 19. Vývoj mutace G12D v genu *KRAS* v klonu KCL-22R BCR-ABL1-wt. Osa X znázorňuje dny od sortu; osa Y % mutace G12D. Mutace byla poprvé detekována po 75 dnech od sortu a to v prostředí v 0,4 μM IM.

Tabulka 16. Detekované mutace v onkogenech pomocí SeqCap EZ HyperCap Nimble gen (Roche)-NGS klonů KCL-22R. Den 21 představuje první odběr materiálu z klonů po sortu do 0,004 μ M IM, den 205 představuje odběr s rozvinutou rezistencí k 4 μ M IM (po 145 dnech v této koncentraci). Význam záměny byl určen z databáze VarSome (Kopanos C., et al. 2019).

Gen	Záměna aminokyselin	Záměna	Pozice GRCh37.p13	Chr.	COSMIC	dbSNP NCBI	MAF	význam záměny dle VarSome	BCR-ABL1							
									T315I		Y253H		WT		E255K	
									D21 wt	D205 45 %	D21 wt	D205 30 %	D21 wt	D205 wt	D21 wt	D205 45 %
KRAS	p.G12D	C>T	25398284	12	COSM521	rs121913529	T=0.000004 (1/249328)	patogenní						50		
RUNX1	p.G74R	C>G	36259271	21		rs1435268371	G=0.000004 (1/239782)	nejasného významu					34	35		
ATRX	p.K1933fs	delT	76855037	X	COSM6914754			patogenní					26	42		
TP53	p.R306X	G>A	7577022	17	COSM10663	rs121913344	NA	patogenní							100	100

MAF- minor allele frequency data z projektu GenomAD_exome, Chr-chromozom

Tabulka 17. Detekované nukleotidové záměny pomocí SeqCap EZ HyperCap Nimble gen (Roche)-NGS u všech klonů KCL 22R a mateřské linie KCL 22. Modré řádky označují detekované mutace u mateřské linie KCL-22, bílé řádky označují detekovaná SNP linie KCL-22, růžové řádky označují mutace známé u linie KCL-22 v databázi canSar <https://cansarblack.icr.ac.uk> (Tym J. E., et al. 2016). Význam záměny byl určen z databáze VarSome (Kopanos C., et al. 2019)

Gen	Záměna aminokyseliny	Záměna	Pozice GRCh37.p13	Chr.	COSMIC	SNP	MAF	význam záměny dle Varsome	%
TP53	p.P301Qfs	delG	7577036	17		rs876660726	NA	patogenní	100
TET2	p.F868L	T>G	106157703	4	COSM87107	rs147836249	G=0.002377 (596/250788, GnomAD_exome)	nepatogenní	50
CEBPA	p.H84Q	G>C	33793069	19		rs878854700	C=0.00003 (4/125568, TOPMED)	nejasného významu	35
CEBPA	p.P39L	G>A	33793205	19		rs1060502125	A=0.00002 (2/125568, TOPMED)	nepatogenní	35
TET2	p.P29R	C>G	106155185	4	COSM5020248	rs12498609	G=0.04120 (5174/125568, TOPMED)	SNP	50
TET2	p.I1762V	A>G	106196951	4	COSM3760322	rs2454206	G=0.25848 (32457/125568, TOPMED)	SNP	50
TP53	p.P72R	G>C	7579472	17	COSM250061	rs1042522	G=0.33184 (83136/250534, GnomAD_exome)	SNP	100
DNMT3A	p.E228K	C>T	25471079	2	COSM2911841*			nejasného významu	50
DNMT3A	p.V227L	C>A	25471082	2	COSM2911843*	rs1369743573	A=0.00000 (1/248550, GnomAD_exome)	nejasného významu	50
PRPF8	p.R1402C	G>A	1564699	17	COSM2738826*	rs563667441	A=0.00000 (1/251262, GnomAD_exome)	nejasného významu	100
CEBPA	p.H58Q	G>T	33793147	19				nepatogenní	30
CEBPA	p.C56W	G>C	33793153	19				nejasného významu	30
BCOR	p.V878A	A>G	39931966	X	COSM2964508*	rs759983308	G=0.00008 (15/183492, GnomAD_exome)	nepatogenní	100

MAF- minor allele frequency data z projektů TOPMED a GenomAD_exome; *COSMIC Cell lines Project

4.1.4.5 Klonální evoluci rezistentních leukemických buněk ovlivňuje typ mutace a další genetické události v interakci se selekčními podmínkami

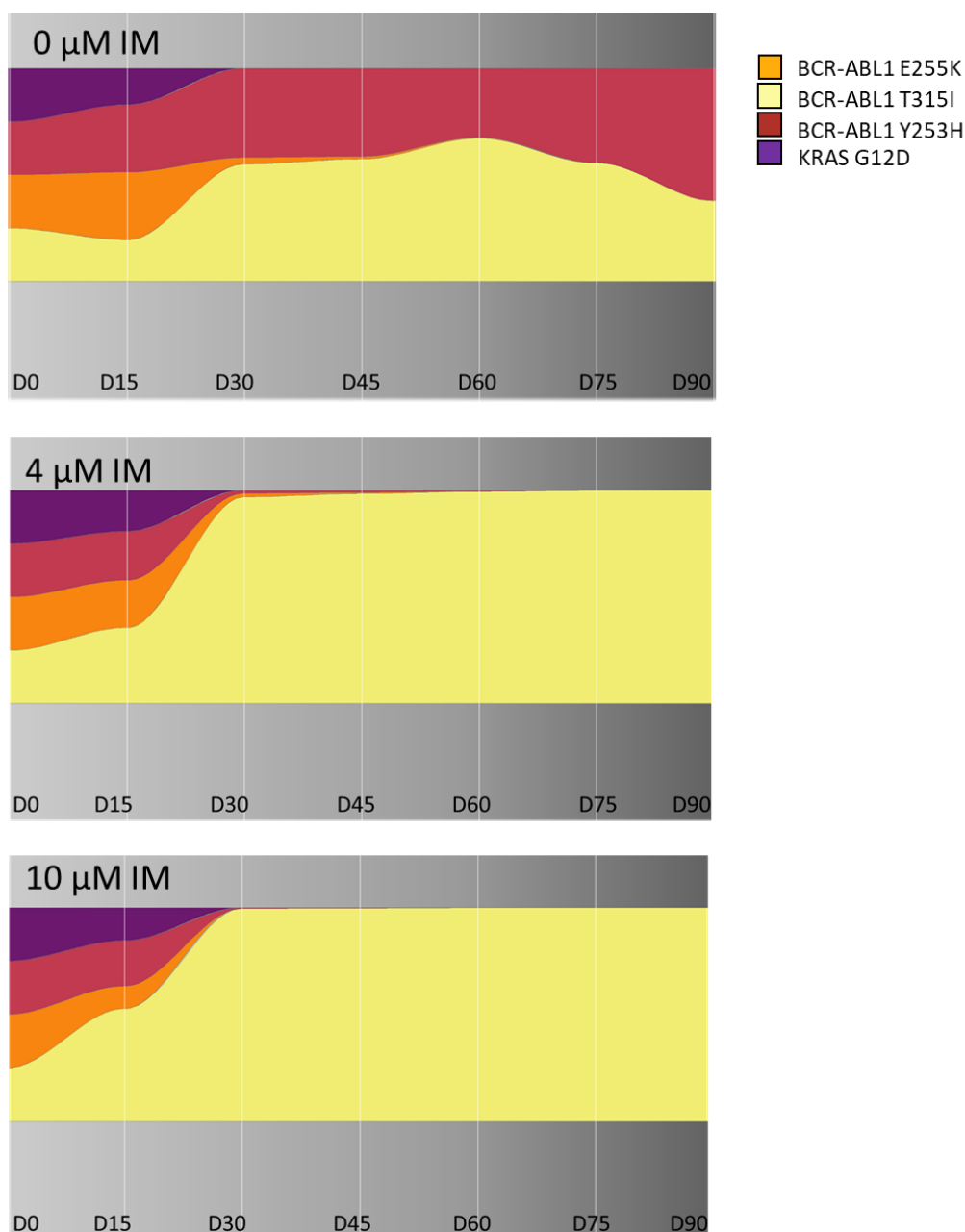
Získání 4 odlišných rezistentních klonů buněčné linie KCL-22 nám umožnilo také sledovat klonální vývoj mutovaných subklonů ve směsné buněčné kultuře za různých podmínek v čase a porovnat ho se situací pozorovanou na přirozené kultuře. Cílem bylo zjistit, jak typ mutace ovlivňuje proliferaci subklonů v odlišných koncentracích IM.

Směs klonů, která představovala model buněčné kultury, v níž jsou přítomny buňky nesoucí různé mutace, byla připravena smícháním milionu buněk jednotlivých klonů (nesoucí mutace *BCR-ABL1* T315I, E255K, Y253H a *KRAS* G12D). Klonální vývoj byl sledován v prostředí bez IM, 4μM IM a 10μM IM (Obrázek 20). V prostředí 4μM IM a 10μM IM v kultuře převládl klon T315I třicátý den. Klon s mutací E255K nezískal proliferační výhodu v prostředí 4μM IM a 10μM IM, ani v prostředí bez IM. Mutace E255K byla u klonu přítomna pouze na jednom Ph chromozomu. Toto sledování ukazuje, že vznik mutace na druhém Ph chromozomu byl pro buňky v přirozené kultuře KCL-22 zcela zásadní (Obrázek 9, strana 54). Jedině díky přítomnosti mutace E255K na obou Ph chromozomech byly buňky schopny převážit nad buňkami nesoucími mutaci T315I v prostředí s 4μM IM.

V prostředí bez IM byly po 60 dnech sledování detekovány pouze klony T315I a Y253H v rovnoměrném zastoupení. Následně zde získal proliferační výhodu klon nesoucí mutaci Y253H, který díky přítomnosti třetí *BCR-ABL1* fúze (Obrázek 18) proliferoval rychleji a v kultuře postupně převažoval.

Sledování přirozené a také směsné kultury KCL-22 v čase pod vlivem IM ukazuje, že typ mutace není jedinou vlastností ovlivňující chování buněk v kultuře. Proliferační výhoda buněk KCL-22 v přirozené kultuře v 4μM IM byla ovlivněna vznikem mutace na druhém Ph chromozomu u subklonu s *BCR-ABL1* mutací E255K. Buňky se dvěma mutacemi získaly výhodu i nad buňkami nesoucími multirezistentní mutaci T315I. Rychlost, s jakou buňky v kultuře převážily, byla ovlivněna koncentrací IM. Ve směsné kultuře, složené ze subklonů nesoucí mutaci na jednom Ph chromozomu při vystavení 4μM IM, převládl subklon T315I. V prostředí bez selekčního tlaku IM pak nejrychleji rostl subklon se 3 kopiemi *BCR-ABL1* fúze a mutací Y253H na jedné kopii *BCR-ABL1*.

Chování mutovaných subklonů u CML pacientů při použití různých terapeutických přístupů bylo sledováno také v rámci řešení specifického cíle 2.



Obrázek 20. Klonální vývoj ve směsné kultuře KCL-22R klonů v prostředí bez imatinibu, ve 4μM IM a 10μM IM. Fish plot grafy znázorňují klonální vývoj v příslušných koncentracích. Osa X znázorňuje dny sledování; osa Y znázorňuje % zastoupení jednotlivých subklonů. Arteficiální kultura byla připravena spojením milionu buněk od každého klonu (*BCR-ABL1* T315I, Y253H, E255K a *KRAS* G212D). Kultura byla sledována v odběrech po 15 dnech pomocí DNA analýzy s využitím ddASO-PCR pro *BCR-ABL1* mutace a pomocí Sangerova sekvenování pro *KRAS* mutaci.

4.1.4.6 Klony KCL-22R schopné vyvinout mutace v onkogenech *de novo* mají upregulované geny alternativní opravné dráhy NHEJ

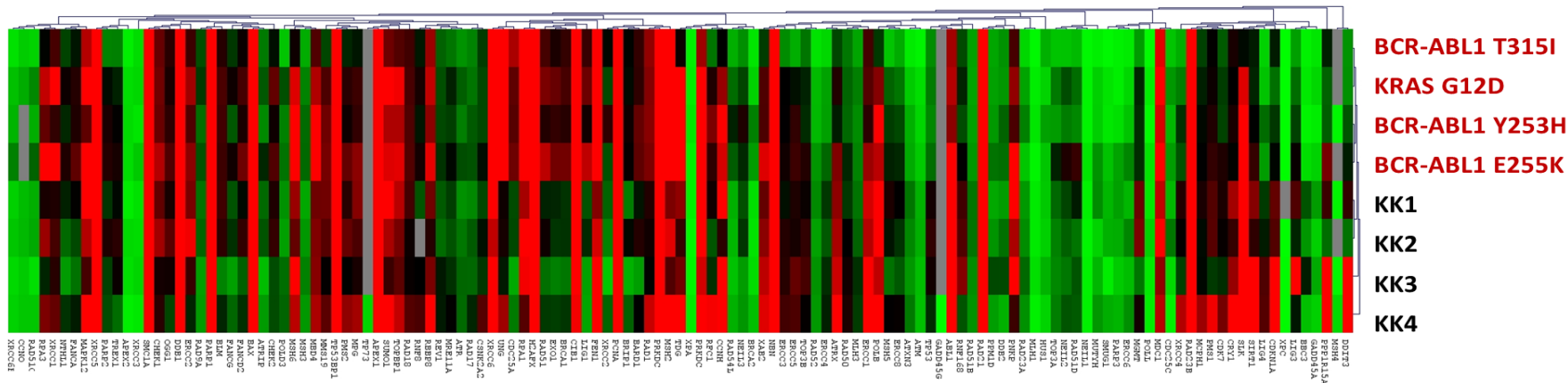
Buňky linie KCL-22 jsou schopny vyvíjet různé typy mutací *de novo* v kinázové doméně *BCR-ABL1*, případně v jiných onkogenech. Ke vzniku mutací dochází při vystavení buněk koncentraci 0,4μM IM a přítomnost mutací umožňuje buňkám klonu přežít v 4μM IM. *De novo* mutagenese může být způsobena chybnými buněčnými

mechanizmy, které reagují na poškození DNA a zajišťují opravy poškozené DNA. Expresi genů signální drah zahrnutých do těchto dějů byly na získaných klonech nesoucích mutace v genech *BCR-ABL1* a *KRAS* sledovány v porovnání s kontrolními klony KCL-22, sortovanými do média bez IM s cílem hledat společný profil, který by charakterizoval klony vyvíjející mutace zodpovědné za rezistenci k IM.

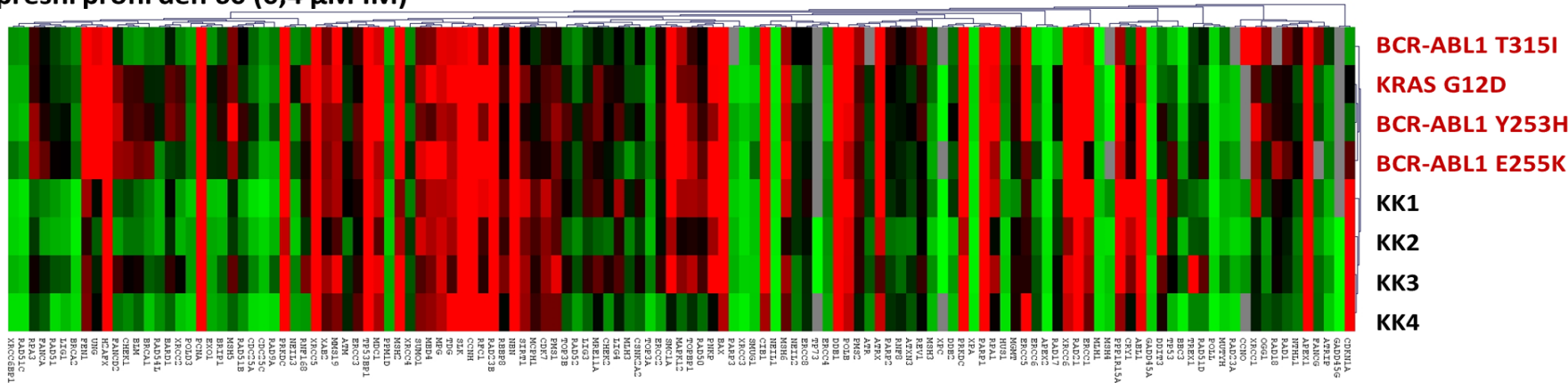
Analyzovány byly klony po sortu do 0,004 μ M IM (odběr 21. den – D21), v časném vývoji mutace (odběr 60/75 den od sortu D60/75) a s ustanovenou rezistencí (odběr 75/90 den od sortu – D75/90). Kontrolní klony byly analyzovány ve stejných časech (D21, D60, D90). Hodnocení bylo prováděno dynamickou a statickou analýzou. Při dynamické analýze byla hodnocena změna exprese v souvislosti s rozvojem mutací. Statická analýza hodnotila míru exprese v jednotlivých časových bodech (D21, D60/75 a D75/90) oproti expresi v kontrolních klonech ve stejném čase. Jako signifikantní změna bylo hodnoceno zvýšení exprese fold change FC > 2 a snížení exprese FC < 0,5.

MeV analýza ukázala statisticky významné oddělení profilu 4 rezistentních klonů, které vyvinuly mutace od kontrolních KCL-22 klonů (Obrázek 21). Tabulka 18 ukazuje signifikantně upregulované a downregulované geny v D21 a D60/75 a D75/90 v porovnání s kontrolními klony.

Expresní profil den 21 (0,004 µM IM)



Expresní profil den 60 (0,4 µM IM)



Obrázek 21. MeV souhrnná analýza genové exprese 128 genů v klonech KCL-22R analyzovaná metodou Pearson square.

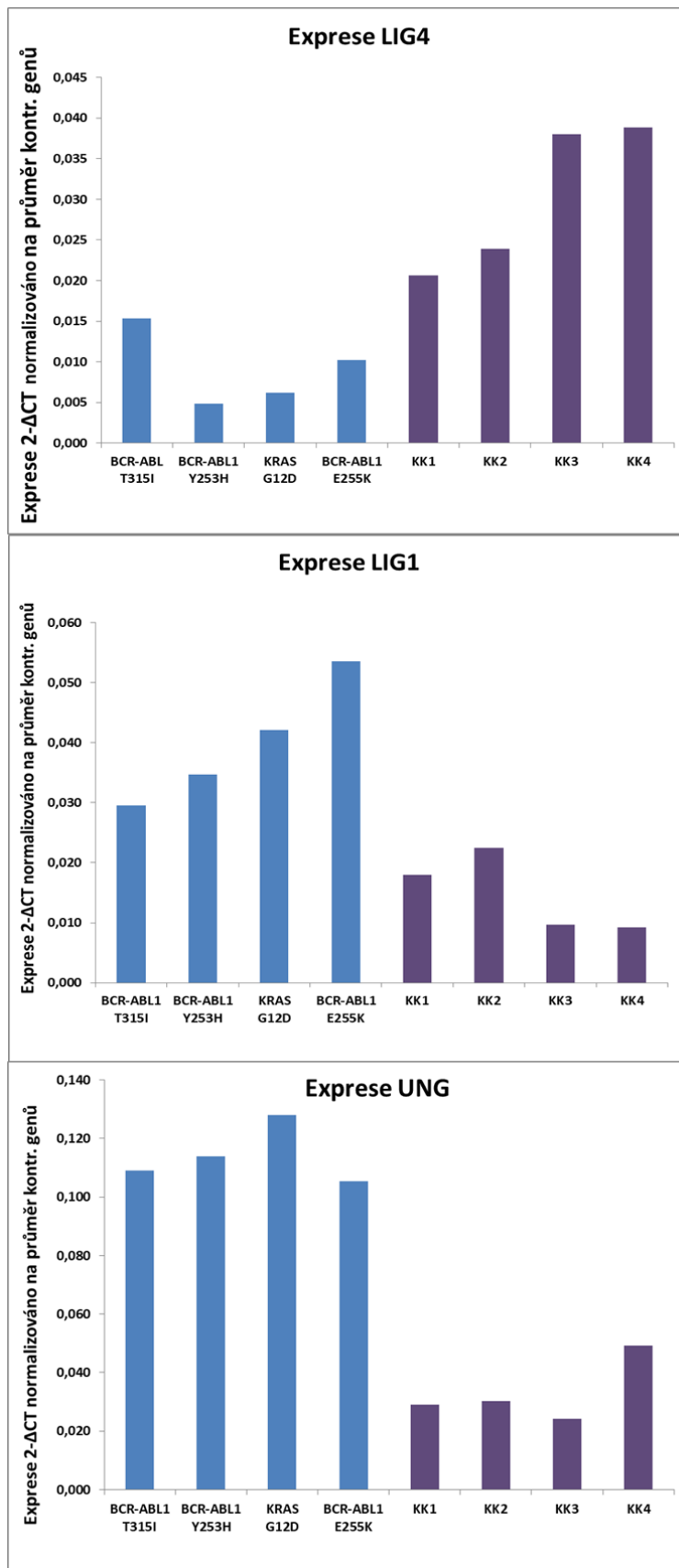
Vysvětlivky: KK1 – KK4 kontrolní klony KCL-22

Tabulka 18. Statická analýza genové exprese 128 genů klonů KCL-22R v porovnání s kontrolními klony KCL-22 rostoucími v médiu bez imatinibu. Signifikantně zvýšená (červeně) a snižená (modře) exprese genů u rezistentních klonů vzhledem k expresi u kontrolních klonů.

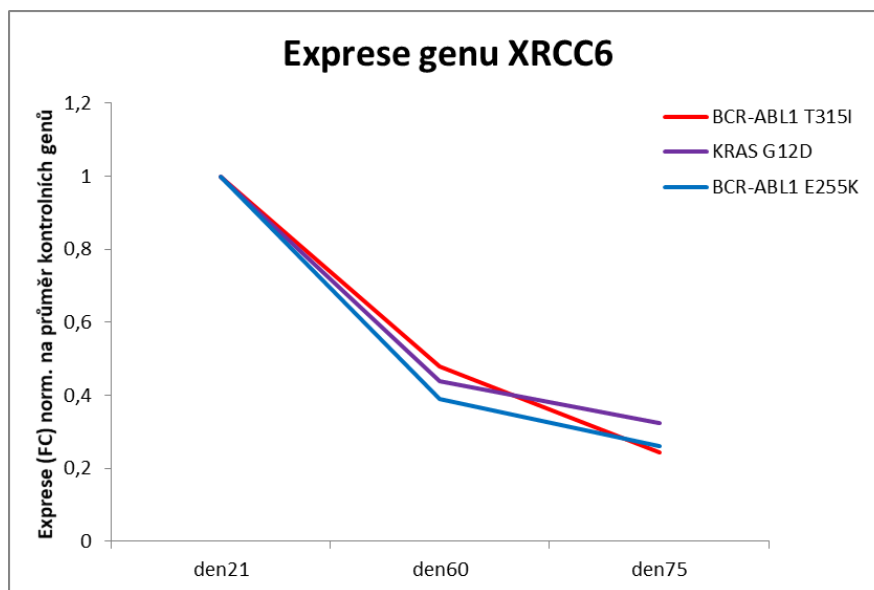
Den 21		Den 60-75		Den 75/90	
počátek vývoje klonů		časný vývoj mutace		ustanovená rezistence	
	p-value		p-value		p-value
XRCC6	0,00004	UNG	0,00016	BLM	0,01336
UNG	0,00004	BRCA2	0,00020		
CDC25A	0,00025	EXO1	0,00067		
LIG1	0,00927	H2AFX	0,00085		
LIG4	0,01294	PARP1	0,00534		
ABL1	0,01709	CDC25A	0,01075		
BBC3	0,04088	FEN1	0,01081		
		BIRP1	0,01088		
		MLH1	0,01150		
		RAD51	0,01975		
		CDKN1A	0,01425		

Změny v expresních profilech genů uvedených v tabulce 18 naznačují aktivaci alternativní dráhy nehomologního spojování konců (NHEJ) u klonů vyvíjejících mutace. Exprese *LIG IV* z klasické opravné dráhy NHEJ je v těchto klonech snížena oproti expresi v kontrolních klonech. Zvýšená je naopak exprese *LIG I*, která je součástí alternativní NHEJ dráhy (Obrázek 22). U klonů vyvíjejících mutace je exprese genu *XCCR6* (protein Ku 70) po sortu vysoká oproti odběrům v časném vývoji mutací a v ustanovené rezistenci (Obrázek 22 a 23). Protein Ku 70 je součástí iniciačního heterodiméru, spouštějícího klasickou cestu NHEJ. Jeho pokles v průběhu vývoje mutací tedy nasvědčuje přepnutí do alternativní cesty dráhy NHEJ. Stejně tak zvýšená exprese genu *PARP1* (Tabulka 18), který kóduje protein, jenž po vazbě na poškozenou DNA spouští opravu alternativní cestou NHEJ, v době časného vývoje mutací.

Zvýšení exprese genů *UNG* (Obrázek 22), *FEN1* a *LIG I* by mohlo také naznačovat aktivaci opravné dráhy BER (base excision repair), konkrétně její dlouhé cesty. Tato cesta se účastní oprav delších úseků a je zodpovědná za vznik inzercí a delecí. Případná aktivace BER dráhy pravděpodobně nebude přímo ovlivňovat vznik somatických mutací. Některé zdroje však uvádějí, že aktivita *UNG* je zásadní pro spuštění alternativní cesty NHEJ (Limpose K. L., et al. 2017)



Obrázek 22. Signifikantně odlišná expresse genů LIG IV, LIG I a UNG v D21 klonů KCL-22R. KK1-KK4 jsou označeny kontrolní klonů sortované do média bez IM. Osa Y znázorňuje hodnotu 2^{-ΔCt}.



Obrázek 23. Změna exprese genu *XRCC6* (Ku 70) v průběhu kultivace 3 KCL-22R klonů. Záznam poklesu exprese genu *XRCC6* ve dni 60 (odběr v iniciaci mutagenese) a odběr ve dni 75, ve kterém byla v kloněch *BCR-ABL1* T315I, *BCR-ABL1* E255K a *KRAS* G12D již ustanovena rezistence ke 0,4 μ M IM.

4.2 Cíl 2

4.2.1 Výsledky sledování dynamiky klonů s rezistentními mutacemi u pacientů v reakci na změnu léčby

Dynamika vysoce rezistentních mutací v KD *BCR-ABL1* byla sledována u 6 CML pacientů (Tabulka 19), u nichž byl aplikován individualizovaný léčebný postup založený na terapii IFN- α po zjištění přítomnosti mutace. Tito pacienti na léčbě TKI vyvinuli multirezistentní mutaci T315I nebo kompozitní mutace, což znamená přítomnost dvou typů mutace v jedné leukemické buňce. Využití jiného léčebného postupu, jako je transplantace periferních kmenových buněk a léčba ponatinibem, nebylo u těchto pacientů možné, buď z důvodu nedostupnosti vhodného dárce nebo přítomnosti dalších komorbidit a nedostupnosti ponatinibu v době detekce mutace.

Tabulka 19. Charakteristika pacientů.

Pacient č.	Diagnóza	Pohlaví	Věk	Sokalovo skóre	Délka sledování (měsíce)
1	CML-AP	M	44	HR	126
2	CML-AP	F	59	HR	68
3	CML-CP	M	39	HR	62
4	CML-CP	M	23	-	96
5	CMP-CP	M	80	IMR	44
6	CML-CP	M	65	HR	39

AP – Akcelerovaná fáze; CP – Chronická fáze; IMR – střední riziko; HR-vysoké riziko; MMR – velká molekulární odpověď (*BCR-ABL1* \leq 1 %); MR⁵ (hluboká molekulární odpověď – 5 log snížení hladiny *BCR-ABL1* transkriptu v IS);

4.2.2 Aktivace imunitního dohledu účinkem IFN- α a absence selekčního tlaku TKI vedly k dosažení MMR a hlubokých MR u 4 z 6 sledovaných pacientů

Využitý léčebný postup vycházel z předpokladu existence selekčního tlaku TKI, který udává výhodu leukemickým buňkám nesoucím mutaci rezistentní k užívanému TKI. Absence selekčního tlaku TKI v kombinaci s použitím terapie s odlišným mechanismem účinku by mohlo ovlivnit chování klonu s rezistentní mutací.

Sledovaní pacienti vyvinuli v 5/6 případech mutaci T315I a 1/6 případů kompozitní mutaci F317L/M351T (Obrázek 24 a Tabulka 20).

U pacienta č. 1 (Obrázek 24A) byla mutace T315I retrospektivně detekována v 100 % již během terapie imatinibem. Změna léčby na dasatinib, jenž je znám také svým imunomodulačním účinkem, vedla k poklesu hladiny celkového *BCR-ABL1* a dosažení MMR. MMR odpověď byla následně ztracena a vzhledem k přítomnosti mutace T315I byl pacient převeden na IFN- α . Na této terapii bylo možné pozorovat oscilaci hladiny *BCR-ABL1* transkriptu mezi negativitou a slabou pozitivitou (max 0,04 % IS). Současně byl tento stav doprovázen poklesem absolutního počtu CD3⁺ T lymfocytů a nárůstem absolutního počtu NK buněk (Tabulka 21). Je pravděpodobné, že léčba dasatinibem nastartovala aktivaci imunitního dohledu, který se spolupodílel na udržení hlubokých molekulárních odpovědí i přes přítomnost mutace T315I na terapii IFN- α .

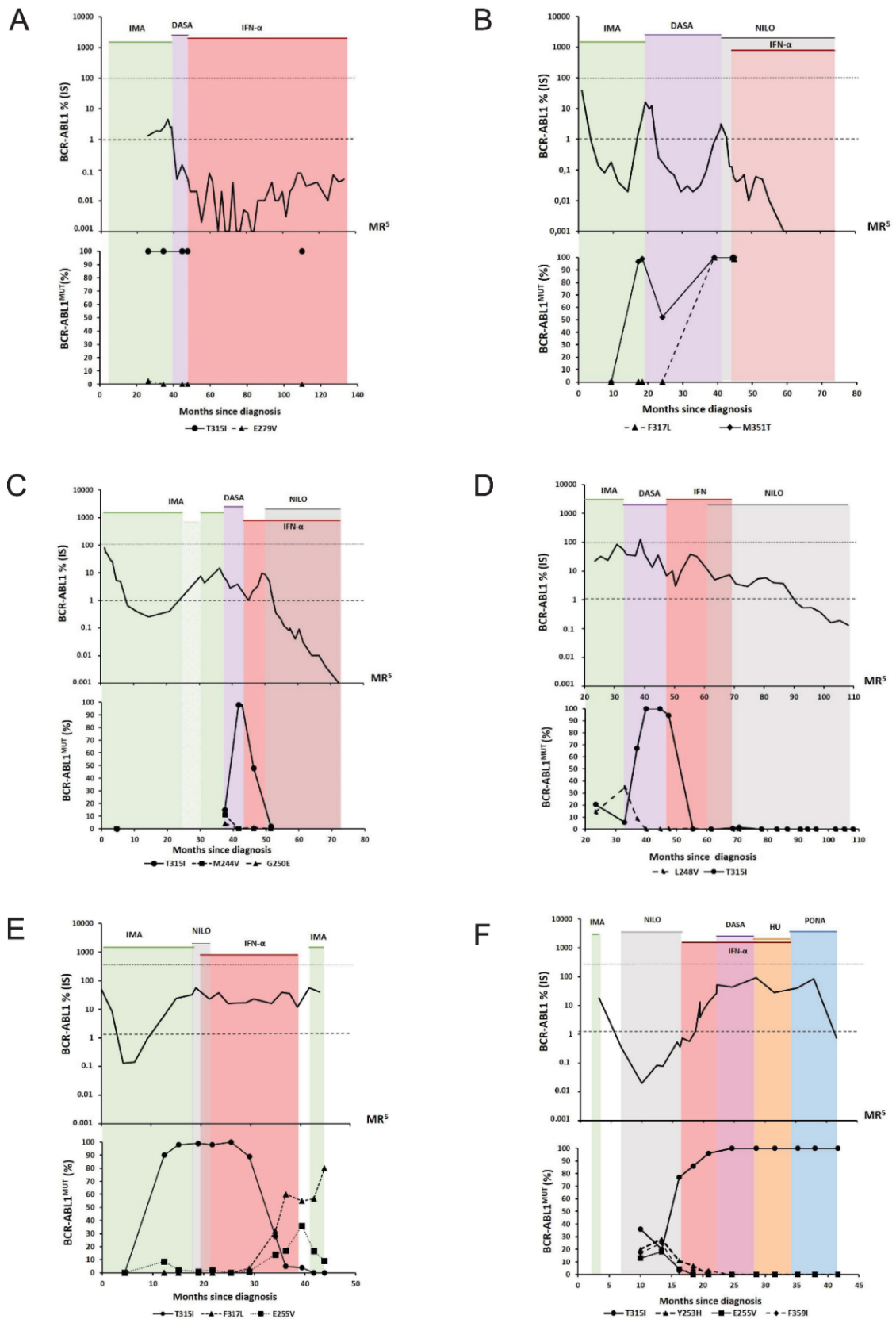
V případě pacienta č. 2 (Obrázek 24B) bylo po použití terapie dasatinibem jako TKI druhé linie využito kombinované terapie IFN- α s nilotinibem. Tento léčebný postup vedl k dosažení MR5 s nedetekovatelným *BCR-ABL1* transkriptem. Z měření hladin imunitních buněk bylo možno pozorovat zvýšení absolutního počtu NK buněk a CD8⁺ T buněk (Tabulka 21). Pravděpodobně tedy došlo k aktivaci imunitní odpovědi na terapii dasatinibem a následně byla aktivace udržena v další terapii IFN- α .

U pacienta č. 3 (Obrázek 24C) bylo po zjištění mutace T315I využito terapie IFN- α , což vedlo k poklesu přítomnosti mutace ze 100 % na 50 %, ale hladina celkového transkriptu *BCR-ABL1* začala stoupat, proto byla využita kombinace IFN- α s nilotinibem což vedlo k dosažení MR5. Při hodnocení zastoupení imunitních buněk bylo možno pozorovat pokles absolutního i relativního zastoupení CD3⁺ T buněk. Poměr CD4⁺/CD8⁺ byl trvale snížený, dále bylo možné pozorovat zvýšení absolutní počtu NK buněk během terapie dasatinibem.

V případě pacienta č. 4 (Obrázek 24D) bylo využito monoterapie IFN- α k redukci klonu s mutací T315I. Následně byla využita kombinovaná terapie s nilotinibem, která dále přešla v monoterapii nilotinibem. K převedení na terapii pouze nilotinibem došlo až v době, kdy byla mutace T315I nedetekovatelná již 46 měsíců. V průběhu léčby nilotinibem došlo i k pozvolnému poklesu hladiny *BCR-ABL1* transkriptu. V hodnocení imunoprofilu bylo pozorováno jen mírné zvýšení absolutního počtu NK buněk.

Pacient č. 5 (Obrázek 24E) na terapii IFN- α zareagoval redukcí klonu s mutací T315I ze 100 % na 4 %, avšak hladina celkového *BCR-ABL1* transkriptu byla dále vysoká (cca 10 %) a následně se u pacienta objevily další dvě mutace F317L a E255K. Tento 84letý pacient následně zemřel na jiné onemocnění než CML.

Pacient č. 6 (Obrázek 24F) z využitého terapeutického postupu neprofitoval. V tomto případě využití IFN- α , a to ani v případě monoterapie, ani v kombinaci s dasatinibem, nevedlo k redukci klonu s mutací T315I. Vysokou hladinu transkriptu *BCR-ABL1* se podařilo zredukovat do MMR až za použití ponatinibu. Ponatinib byl v naší zemi pro pacienty dostupný až v roce 2014, což bylo u tohoto pacienta 20 měsíců od záchytu mutace T315I.



Obrázek 24. Grafy znázorňují dynamiku mutovaného BCR-ABL1 transkriptu a hladiny celkového BCR-ABL1 transkriptu (použito z publikace Polivkova V. *et al.* 2017) A-pacient č.1; B-pacient č.2; C-pacient č.3; D-pacient č.4; E-pacient č.5; F-pacient č.6. Barevnými pruhy jsou označeny jednotlivé typy léčby. Zeleně: IMA-imatinib, šedě NILO-nilotinib, purpurově DASA-dasatinib, červeně IFN- α -interferon alpha, oranžově HU-hydroxyurea, a modře PONA-ponatinib.

Tabulka 20. Průběh léčby a detekce mutací v transkriptu BCR-ABL1 pomocí NGS.

Pacient číslo	Léčba první linie		Léčba druhé linie		Léčba třetí linie		Léčba čtvrté linie		Léčba páté linie	
	měsíce; odpověď na léčbu	mutace %	měsíce; odpověď na léčbu	mutace %	měsíce; odpověď na léčbu	mutace %	měsíce; odpověď na léčbu	mutace %	měsíce; odpověď na léčbu	mutace %
01	IM 13; CHR	T315I 100 E279V 2.5	DASA 9; CCgR	T315I 100	IFN 78; MMR	Nedet.				
02	IM 19; CCgR loss	M351T 99 S500F 3 I360V 7	DASA 22; CCgR loss	M351T 100 F317L 100	NILO 3; CCgR	M351T 100 F317L 100	NILO+ IFN 24; MMR	Nedet.		
03	IM 36; CCgR loss	M244V 11 G250E 4 T315I 15	DASA 6; CHR	T315I 98	IFN 7; CCgR	T315I 48 G250E 1	NILO+IFN 13; MMR	T315I 2		
04	IM 13; CHR	L248V 35 T315I 5.6	DASA 15; CHR	T315I 100	IFN 14; CHR	Nedet.	NILO+IFN 8; CHR	Nedet.	NILO 27; CCgR	Nedet.
05	IM18; CCgR loss	T315I 98 E255V 8.6 H246Y 4 S438F 3	NILO 1; CHR	T315I 99 E255V 1	NILO+IFN 2; CHR	T315I 98 E255V 2	IFN 18; CHR	T315I 4 E255V 17 F317L 60	IM 3; CHR	E255V 9.2 F317L 80
06	IM 1; CHR	NA	NILO 10; MMR loss	T315I 20 Y253H 28 E255V 18 F359I 25	IFN 6; CCgR ztráta	T315I 96 F359I 3	DASA+IFN 3; CHR	T315I 100		

Vysvětlivky: IM-imatinib, DASA-dasatinib, NILO-nilotinib, IFN-interferon- α , CHR-kompletní hematologická odpověď, CCgR-kompletní cytogenetická odpověď, MMR-velká molekulární odpověď, NA-nedostupný vzorek k analýze, Nedet.-nedetekovatelné.

Tabulka 21. Sledování imunoprofilů pacientů (výsledky cytometrických analýz).

Pacient číslo	Měsíce od diagnózy	Léčba	CD3+ T- lymfocyty 10 ⁹ /l	CD4+ T- pomocné buňky 10 ⁹ /l	CD8+ T- cytotoxické buňky 10 ⁹ /l	CD56+, CD16+ NK buňky 10 ⁹ /l
1	86	IFN	0,787	0,419	0,419	0,140
	119	IFN	0,783	0,537	0,290	0,131
	122	IFN	1,06	0,532	0,616	0,227
2	20	DASA	0,912	0,572	0,465	0,465
	26	DASA	1,164	0,543	0,718	0,66
	28	DASA	1,746	0,95	0,95	0,616
	32	DASA	1,246	0,659	0,712	0,338
	65	IFN+NILO	1,123	0,343	0,439	0,137
3	38	DASA	0,465	0,268	0,255	0,469
	39	DASA	0,808	0,413	0,430	0,705
	43	IFN	0,841	0,390	0,369	1,190
	57	IFN+NILO	0,632	0,303	0,320	0,142
4	93	NILO	1,06	0,52	0,48	0,16
	96	NILO	1,25	0,66	0,54	0,14
5	42	IMA	1,07	0,72	0,32	0,06

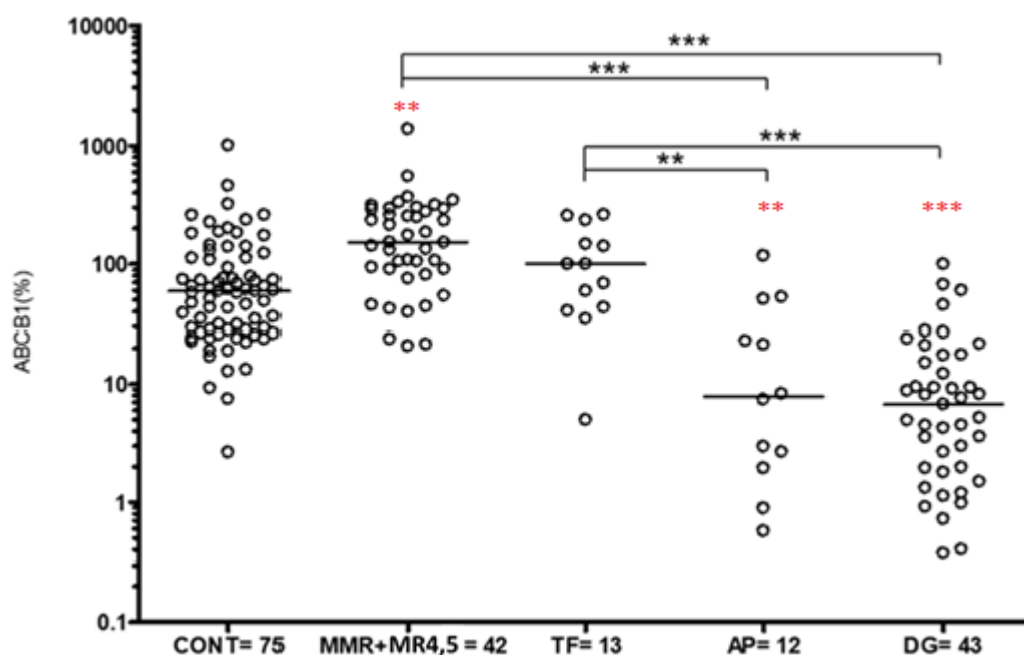
Vysvětlivky: IMA-imatinib, NILO-nilotinib, DASA-dasatinib, IFN -interferon alpha.

4.3 Cíl 3

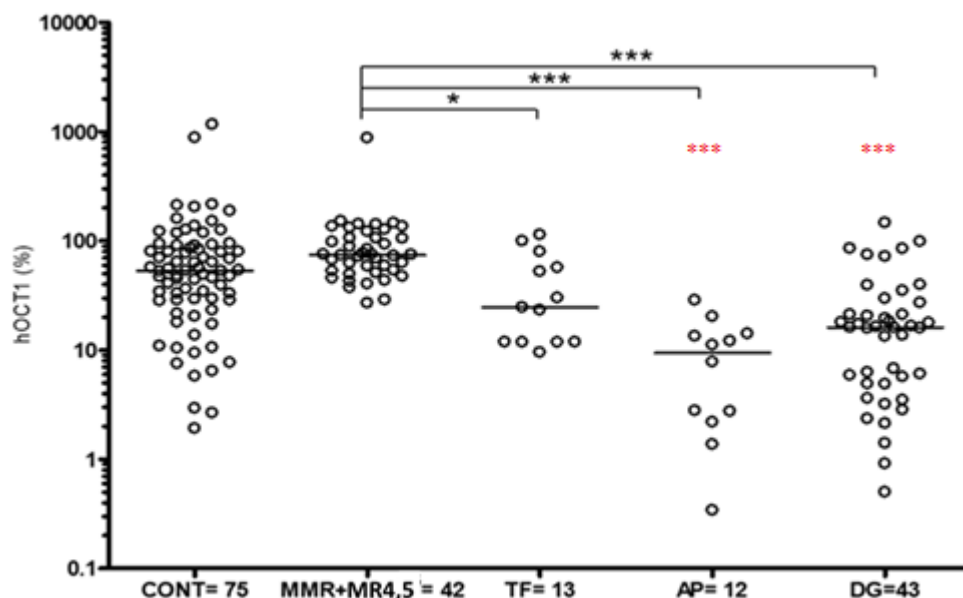
4.3.1 Zhodnocení možnosti využití sledování exprese buněčných transportérů hOCT1 a ABCB1 jako prognostických markerů rezistence k imatinibu

Intracelulární koncentrace imatinibu je ovlivňována funkcí buněčných transportérů, které se účastní vstupu látky do buňky a odstraňování z buňky. V souvislosti s rozvojem rezistence je nejvíce spojováno snížení exprese/aktivity hOCT1 transportéru a zvýšená exprese/aktivita ABCB1 transportéru (Thomas J., et al. 2004). Exprese genů kódujících oba zmíněné buněčné transportéry byla analyzována na souboru zahrnující 110 vzorků celkových leukocytů periferní krve pacientů s CML a 75 vzorků zdravých dárců (Tabulka 22).

Medián exprese obou sledovaných genů byl signifikantně snížený ($p < 0.001$) u skupiny pacientů v době určení diagnózy a v akcelerované fázi nemoci v porovnání s expresí u pacientů v době dosažení MMR a MR4,5 a expresí u zdravých dárců (Obrázek 25 a 26).



Obrázek 25. Hladiny exprese *ABCB1* ve skupinách pacientů v různé fázi onemocnění a odpovědi na léčbu. CONT-zdraví dárce, MMR-velká molekulární odpověď, MR^{4,5}-hluboká molekulární odpověď (pokles hladiny BCR-ABL1 o 4,5log), TF-selhání léčby, AP-akcelerovaná fáze, DG-doba určení diagnózy. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$. Statistická významnost porovnání jednotlivých skupin vůči skupině CONT-zdraví dárce je vyznačena červeně.



Obrázek 26. Hladiny exprese *hOCT1* ve skupinách pacientů v různé fázi onemocnění a odpovědi na léčbu. CONT-zdraví dárci, MMR-velká molekulární odpověď, MR^{4,5}-hluboká molekulární odpověď (pokles hladiny BCR-ABL1 o 4,5log), TF-selhání léčby, AP-akcelerovaná fáze, DG-doba určení diagnózy. *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$. Statistická významnost porovnání jednotlivých skupin vůči skupině CONT-zdraví dárci je vyznačena červeně.

Hladina exprese *ABCB1* v době dosažení MMR nebo MR^{4,5} je signifikantně vyšší v porovnání se zdravými dárci ($p < 0,01$), v porovnání s pacienty v akcelerované fázi nemoci ($p < 0,001$) a v době určení diagnózy ($p < 0,001$). Změna v expresi *hOCT1* oproti zdravým kontrolám nebyla pozorována u skupiny pacientů, kteří dosáhli MMR a MR^{4,5}. Signifikantně nižší exprese *hOCT1* byla pozorována u skupin pacientů v době diagnózy ($p < 0,001$), v akcelerované fázi ($p < 0,001$) a při selhání terapie imatinibem ($p < 0,05$) v porovnání se skupinou pacientů s dobrou odpovědí (MMR a MR^{4,5}) a zdravými dárci. Pozorovaný rozdíl v expresi obou genů detekovaný v celkových leukocytech mohl být ovlivněn odlišným složením buněk v periferní krvi u pacientů v době diagnózy a v akcelerované fázi onemocnění (Tabulka 22).

Tabulka 22. Charakteristika analyzovaných vzorků pacientů hodnocených na genovou expresi *hOCT1* a *ABCB1*

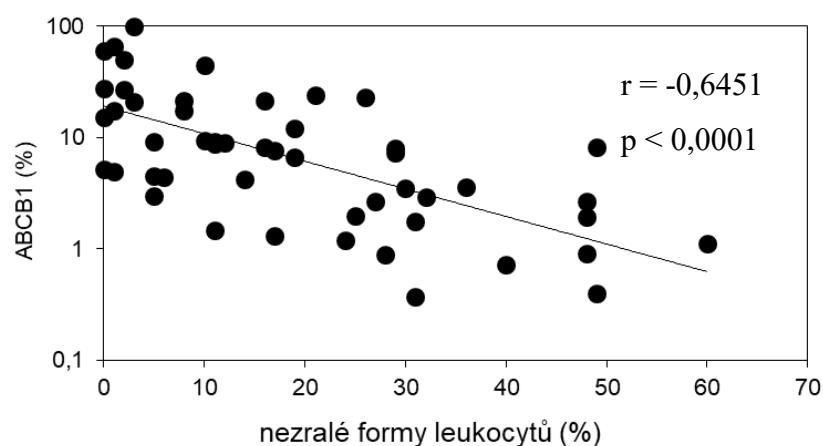
	MMR	MR^{4,5}	TF	AP	DG	Zdravé kontroly
počet pacientů	27	15	13	12	43	75
Počet leukocytů 10⁹/L	5,38	5,34	6,22	32	49	-
median (rozmezí)	(3,4-10,4)	(3,63-10,0)	(4,12-10,3)	(2,5-197)	(3-492)	
Trombo 10⁹/L	195	204	231,5	175	474	-
median (rozmezí)	(128-359)	(140-263)	(129-464)	(56-485)	(78-1792)	
Nezralé buňky (%)	-	-	-	21	13	-
median (rozmezí)				(2-41)	(0-60)	
Blasty (%)	-	-	-	21	0	-
median (rozmezí)				(2-41)	(0-14)	
neutrofilní granulocyty 10⁹/L	57	58	57	51	63	-
median (rozmezí)	(38-67)	(47-84)	(39-74)	(18-88)	(17-96)	
Ph+ buňky (%)	-	-	80	100	94	-
median (rozmezí)			(20-100)	(25-100)	(60-100)	
BCR-ABL1 (%)	0,02	0,0005	35	174	82	-
median (rozmezí)	(0,015-0,11)	(neg-0,001)	(10-153)	(32-827)	(34-312)	
BCR-ABL1 mutace	-	-	2	2	-	-
Počet (typ)			(M242V)	(E459K, Y253H, Q252H)		
hOCT1 (%)	74	84	25	9	16	67
median (rozmezí)	(27-151)	(40-872)	(10-114)	(0,3-29)	(0,5-146,7)	(5,7-1160)
ABCB1 (%)	182	152	100	8	8	76
median (rozmezí)	(21-396)	(24-1380)	(5-261)	(0,6-116)	(0,4-100)	(13-100)

Vysvětlivky: vzorky jsou rozděleny do skupin dle dosažené léčebné odpovědi: MMR- velká molekulární odpověď, MR^{4,5} – hluboká molekulární odpověď (pokles hladiny BCR-ABL1 o 4,5log), TF – selhání léčby, AP- akcelerovaná fáze, DG- pacienti v době určení diagnózy, zdravé kontroly – vzorky zdravých dárců, nezralé buňky- neutrofilní metamyelocyty, neutrofilní myelocyty, promyelocyty, promonocyty, hOCT1 (ABCB1) % jsou získána výpočtem: hOCT1 (ABCB1) absolutní počet kopií/ GUSB absolutní počet kopií *100.

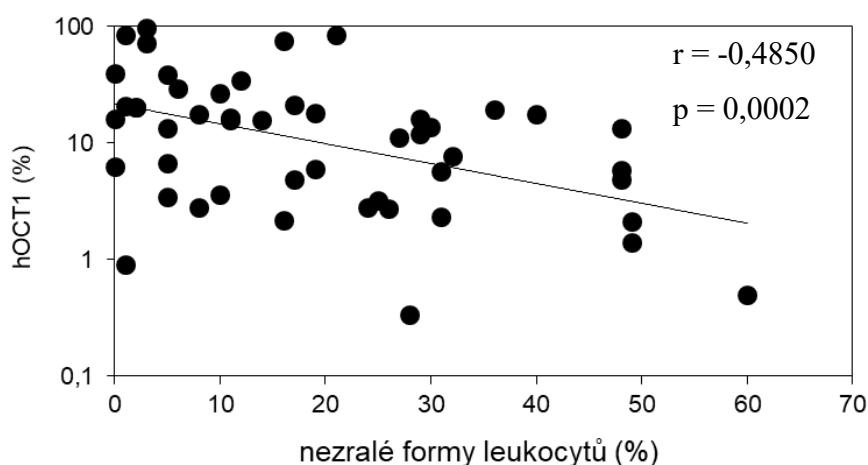
Pro sledování tohoto vlivu byl hodnocen vztah mezi expresí genů *ABCB1* a *hOCT1* a množstvím nezralých buněčných forem leukocytů v době diagnózy a akcelerované fázi CML.

Vztah hladiny exprese *ABCB1* a *hOCT1* k množství nezralých buněk přítomných ve vzorcích pacientů s nefyziologickým krevním obrazem, tedy v období určení diagnózy (DG) a v akcelerované fázi (AP) onemocnění, vykazuje signifikantně negativní korelaci (*ABCB1* $r = -0,6451$, $p < 0,0001$ a *hOCT1* $r = -0,485$, $p < 0,0002$) (Obrázek 27 a 28).

Pozorovaná signifikantně nižší exprese *ABCB1* a *hOCT1* v době diagnózy a akcelerované fázi CML je způsobena přítomností nezralých buněk v periferní krvi.



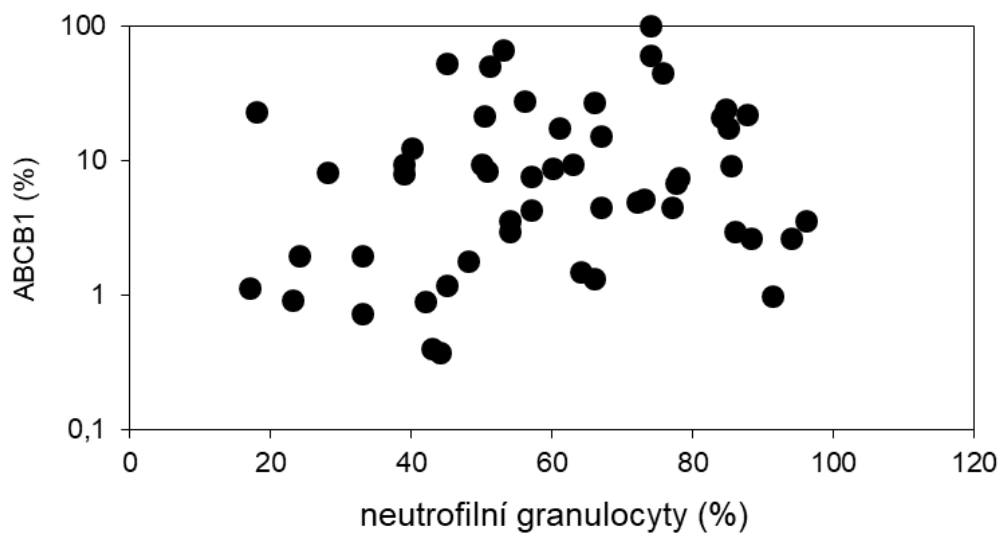
Obrázek 27. Korelace exprese genu *ABCB1* k zastoupení nezralých buněk. Nezralé formy leukocytů – neutrofilní metamyelocyty, neutrofilní myelocyty, pro myelocyty, pro monocyty. Osa X znázorňuje % nezralých forem leukocytů. Osa Y % exprese genu *ABCB1*. Analýza zahrnuje 53 pacientů v akcelerované fázi a době určení diagnózy. Přítomnost nezralých forem byla zjištěna u 47 z nich.



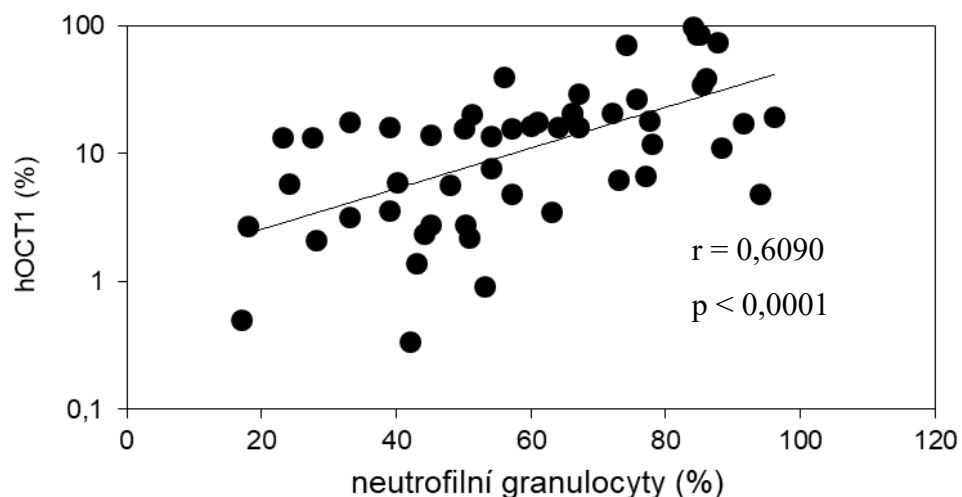
Obrázek 28. Korelace exprese *hOCT1* k zastoupení nezralých buněk. Nezralé formy leukocytů – neutrofilní metamyelocyty, neutrofilní myelocyty, promyelocyty, promonocyty. Osa X znázorňuje % nezralých forem leukocytů v analyzovaném vzorku. Osa Y % exprese genu *hOCT1*. Analýza zahrnuje 53 pacientů v akcelerované fázi a době určení diagnózy. Přítomnost nezralých forem byla zjištěna u 47 z nich.

Naopak při hodnocení vztahu hladiny exprese *ABCBI* se zastoupením zralých diferencovaných neutrofilních granulocytů ve vzorcích periferní krve pacientů s nefyziologickým krevním obrazem nebyla nalezena korelace (Obrázek 29). Pozitivní korelace mezi zastoupením zralých diferencovaných neutrofilních granulocytů byla zjištěna s expresí *hOCT1* ($r = 0,609$, $p < 0,0001$; Obrázek 30).

Výsledky ukazují, že hodnoty exprese genů *hOCT1* a *ABCBI* ve vzorcích celkových leukocytů periferní krve jsou výrazně ovlivněny složením vzorku, tedy především zastoupením nezralých buněčných forem. Z výsledků vyplývá, že nezralé vývojové formy a leukemické blasty se vyznačují sníženou expresí *hOCT1* a *ABCBI*.



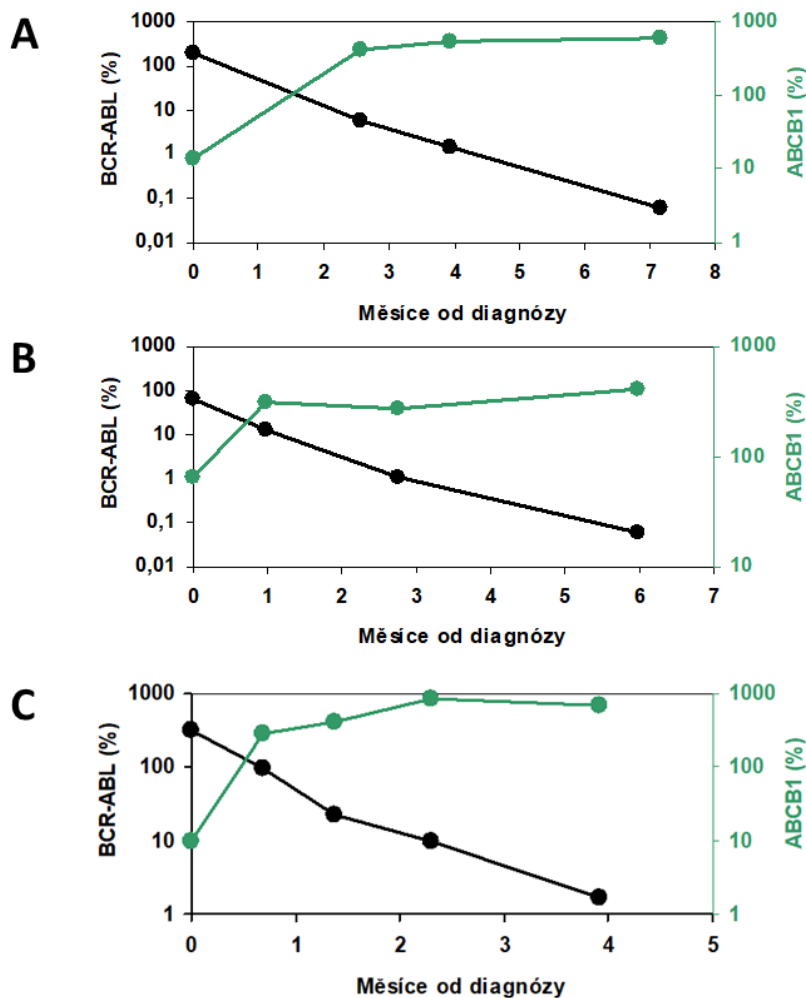
Obrázek 29. Korelace *ABCBI* exprese k zastoupení neutrofilních granulocytů. Osa X znázorňuje procentuální zastoupení neutrofilních granulocytů v analyzovaných vzorcích. Osa Y znázorňuje % *ABCBI* exprese.



Obrázek 30. Korelace exprese *hOCT1* k zastoupení neutrofilních granulocytů. Osa X znázorňuje procentuální zastoupení neutrofilních granulocytů v analyzovaných vzorcích. Osa Y znázorňuje % *hOCT1* exprese.

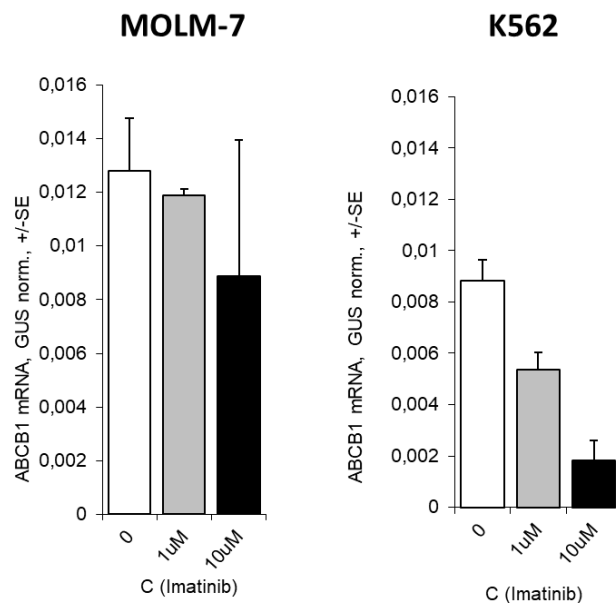
4.3.2 Exprese *ABCBI* je ovlivněná působením imatinibu na Ph pozitivní a Ph negativní buňky

Hladina exprese *ABCBI* v leukocytech periferní krve byla pozorována signifikantně vyšší u pacientů v hlubokých molekulárních odpovědích v porovnání se zdravými jedinci (Obrázek 25). Sledování dynamiky hladiny exprese *BCR-ABL1* a hladiny exprese *ABCBI* ukázalo, že pokles hladiny transkriptu *BCR-ABL1* po zahájení léčby imatinibem byl doprovázen nárůstem hladiny exprese *ABCBI* u pacientů odpovídajících na léčbu imatinibem optimálně (Obrázek 31). To znamená, že cílení imatinibu na aktivitu *BCR-ABL1* způsobuje pokles CML buněk v krvi. V období MMR a hlubokých molekulárních odpovědí převládají v periferní krvi leukocyty z normální, tedy Ph negativní krevetvoby. Testovali jsme vliv imatinibu na expresi *ABCBI* v Ph negativních buňkách, jelikož CML pacienti v období molekulární odpovědi stále užívají léčbu imatinibem, který vstupuje i do normálních Ph negativních leukocytů. Působení imatinibu jsme vystavili Ph pozitivní (MOLM-7 a K562) a Ph negativní buněčné linie (MOLM13 a SKM1).

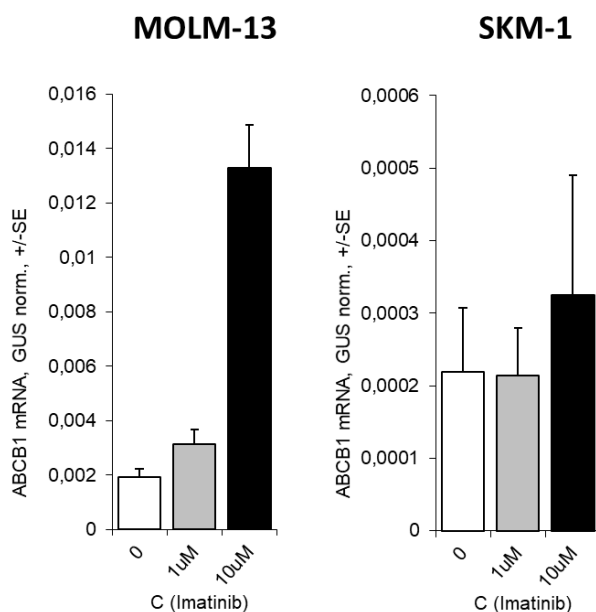


Obrázek 31. Sledování exprese *BCR-ABL1* a *ABCB1* v leukocytech periferní krve prvních 6 měsíců od zahájení terapie imatinibem u 3 pacientů (A-C) s optimální odpovědí na léčbu imatinibem; Hlavní osa Y - exprese *BCR-ABL1^{IS}*(%), vedlejší osa Y exprese *ABCB1*(%).

Vystavení Ph pozitivních buněčných linií K562 a MOLM-7 účinku imatinibu po dobu 24h vedlo k poklesu exprese genu *ABCB1*. Pokles byl výrazněji patrný při použití 10 μ M imatinibu než 1 μ M imatinibu (Obrázek 32). Naopak, u Ph negativních buněčných linií bylo po vystavení účinku imatinibem pozorováno zvýšení exprese *ABCB1*, především při použití koncentrace 10 μ M imatinibu (Obrázek 33).



Obrázek 32. Hladiny exprese *ABCB1* v Ph pozitivních buněčných liniích po působení imatinibu. Linie byly vystaveny účinku imatinibu po dobu 24 hodin. Analýza byla provedena z 2 biologických replikátů. Na ose X je znázorněna použitá koncentrace imatinibu, na ose Y je průměr hodnot (\pm SE) exprese *ABCB1* normalizované na expresi kontrolního genu *GUSB*.



Obrázek 33. Hladiny exprese *ABCB1* v Ph negativních liniích po působení imatinibu. Linie byly vystaveny účinku imatinibu po dobu 24 hodin. Analýza byla provedena ze 4 biologických replikátů u linie SKM-1 a 2 biologických replikátů u linie MOLM-13. Na ose X je znázorněna použitá koncentrace imatinibu, na ose Y je průměr hodnot exprese (\pm SE) *ABCB1* normalizované na expresi kontrolního genu *GUSB*.

4.3.3 Schopnost dosažení optimální léčebné odpovědi v 6 a 12 měsících od zahájení léčby imatinibem nesouvisí s hladinou exprese *ABCB1* a *hOCT1* v době diagnózy.

Vzorky periferní krve 30 pacientů s CML v době diagnózy byly použity pro izolaci celkových leukocytů, polymorfonukleárních buněk (PMNC) a mononukleárních buněk (MNC). U dvanácti pacientů byly analyzovány buňky kostní dřeně (BM). Po změření hladiny exprese obou genů byl stanoven medián exprese a pacienti byli rozděleni vždy do dvou skupin: „nízká exprese“ (s hladinou pod mediánem) a „vysoká exprese“ (s hladinou stejnou a vyšší, než je medián). V obou definovaných skupinách bylo hodnoceno procento případů, které dosáhlo optimální odpovědi, a které vykazovalo suboptimální odpověď (warning) či selhání léčby. Odpověď na léčbu imatinibem byla hodnocena dle doporučení ELN z roku 2009 (Baccarani M., et al. 2009). Analýza byla statisticky hodnocena za použití Fisherova exaktního testu. Výsledky testu ukazují, že nebyl nalezen statisticky signifikantní vztah mezi hladinou exprese *ABCB1* nebo *hOCT1* očekávaně v celkových leukocytech, ale ani v separovaných PMNC, MNC či buňkách kostní dřeně v době diagnózy a odpovědí na léčbu imatinibem hodnocenou v 6 a 12 měsíci od zahájení léčby (Tabulka 23).

Tabulka 23. Hodnocení exprese *hOCT1* a *ABCB1* v době určení diagnózy ve skupinách pacientů s optimální odpovědí a suboptimální odpovědí (warning) a selháním léčby).

Transportér	Analyzovaný materiál	exprese mRNA (median%)	skupina	odpověď v 6 měsících (dle ELN)		p-value	odpověď v 12 měsících (dle ELN)		p-value
				optimální (%)	suboptimální + selhání léčby(%)		optimální (%)	suboptimální + selhání léčby(%)	
h-OCT1	LEU	15,8	nízká exprese	12 (80,0)	3 (20,0)	0,589	11 (91,7)	1 (8,3)	0,598
			vysoká exprese	14 (93,3)	1 (6,7)		11 (78,6)	3 (21,4)	
	PMNC	78,59	nízká exprese	9 (81,8)	2 (18,2)	0,217	8 (80,0)	2 (20,0)	1,000
			vysoká exprese	12 (100,0)	0 (0,0)		9 (81,8)	2 (18,2)	
	MNC	0,93	nízká exprese	8 (88,9)	1 (11,1)	1,000	6 (85,7)	1 (14,3)	1,000
			vysoká exprese	11 (91,7)	1 (8,3)		9 (75,0)	3 (25,0)	
	BM	2,71	nízká exprese	5 (100,0)	0 (0,0)	1,000	5 (100,0)	0 (0,0)	1,000
			vysoká exprese	6 (100,0)	0 (0,0)		5 (83,3)	1 (16,7)	
ABCB1	LEU	5,18	nízká exprese	13 (81,3)	3 (18,7)	0,602	12 (85,7)	2 (14,3)	1,000
			vysoká exprese	13 (92,9)	1 (7,1)		10 (83,3)	2 (16,7)	
	PMNC	1,86	nízká exprese	7 (77,8)	2 (22,2)	0,156	6 (75,0)	2 (25,0)	1,000
			vysoká exprese	13 (100,0)	0 (0,0)		10 (83,3)	2 (16,7)	
	MNC	10,96	nízká exprese	9 (81,8)	2 (18,2)	0,476	7 (77,8)	2 (22,2)	1,000
			vysoká exprese	10 (100,0)	0 (0,0)		8 (80,0)	2 (20,0)	
	BM	2,99	nízká exprese	6 (100,0)	0 (0,0)	1,000	5 (83,3)	1 (16,7)	1,000
			vysoká exprese	5 (100,0)	0 (0,0)		5 (100,0)	0 (0,0)	

Vysvětlivky: LEU-celkové leukocyty, PMNC- polymorfonukleární frakce, MNC- monocyty, BM- buňky kostní dřeně. V každém analyzovaném typu materiálu byl určen medián exprese *hOCT1* a *ABCB1*. Následně byly výsledky exprese pacientů v skupinách (LEU, PMNC, MNC, BM) hodnoceny vzhledem k tomuto mediánu. Nízká exprese znamená hodnotu exprese *hOCT1/ABCB1* v době diagnózy nižší než medián, vysoká exprese znamená hodnotu exprese *hOCT1/ABCB1* v době diagnózy vyšší nebo rovnou mediánu. Hodnocení počtu (%) pacientů s optimální/neoptimální odpovědí v 6/12 měsících ukazuje, kolik pacientů s nízkou/vysokou expesí *hOCT1/ABCB1* v době určení diagnózy dosáhlo optimální/ neoptimální odpovědi v 6/12 měsících na terapii imatinibem.

5 Diskuze

K mechanismům rezistence buněk chronické myeloidní leukemie k léčbě inhibitory tyrozin kináz patří mutace v kinázové doméně BCR-ABL1, aktivace BCR-ABL1 nezávislých signálních drah, zvýšená exprese nebo amplifikace genu *BCR-ABL1* a nepříznivé farmakogenetické faktory, které ovlivňují metabolickou dráhu léku a transport přes plazmatickou membránu. Vliv farmakogenetických faktorů přispívá k nedosažení potřebné letální koncentrace léku v leukemických buňkách. Rozvoj rezistence je často spjat také s nedodržováním léčebných dávek pacienty. V této práci byly studovány molekulární mechanismy související s rozvojem mutací v KD BCR-ABL1 a geny kódující buněčné transportéry, ovlivňující intracelulární hladinu imatinibu.

Mutace v kinázové doméně jsou zodpovědné za zhruba třetinu případů sekundární rezistence CML v chronické fázi na léčbu TKI (Hochhaus A., et al. 2020). Stále však nebylo objasněno, jakým způsobem v CML buňkách vznikají. Dosud nebylo jednoznačně prokázáno, zda se mutace vyvíjí *de novo* nebo jsou v některých kmenových hematopoetických buňkách přítomny už v době diagnózy a expandují na léčbě TKI, kde jejich přítomnost uděluje buňkám selekční výhodu.

Několik prací popsalo přítomnost mutací v KD BCR-ABL1 u pacientů s CML v době diagnózy před zahájením terapie TKI (Roche-Lestienne C., et al. 2002, Shah N. P., et al. 2002, Willis S. G., et al. 2005). V převážné většině těchto případů se jednalo o pacienty v pokročilých fázích CML (akcelerovaná fáze/blastický zvrát) a pacienty léčené také hydroxyureou nebo busulfanem, u nichž byly prokázány mutagení účinky. Roche –Lestienne et al. popsali v jednom případě záchyt mutace v diagnóze v chronické fázi onemocnění. Přítomnost mutace byla zachycena pouze pomocí citlivé metody ASO-PCR a detekované množství přítomné mutace bylo pod detekčním limitem Sangerova sekvenování, což je 20 % (Roche-Lestienne C., et al. 2002). Novější studie detekující mutace pomocí citlivějších metod, založených na NGS a duplexovém sekvenování, přítomnost mutací v KD BCR-ABL1 u pacientů s CML v chronické fázi před nasazením TKI neprokázaly (Machova Polakova K., et al. 2015, Schmitt M. W., et al. 2018, Kim, T., et al. 2017). Tato dosud známá fakta naznačují, že pokud jsou mutace přítomny v CML buňkách bez vlivu TKI, je to častěji v pokročilých fázích onemocnění a záchyt mutací u pacientů v chronické fázi CML je výjimečný.

Cílem této práce bylo studium mechanismu mutagenese v kinázové doméně BCR-ABL1 na *in vitro* modelu CML. Chtěli jsme odpovědět na otázku, zda se v případě vývoje mutací v kinázové doméně BCR-ABL1 pod vlivem působení TKI jedná o mutagenesi *de novo* nebo expanzi buněk nesoucích mutaci. Pokud se jedná o *de novo* mutagenesi, dalším cílem bylo zjistit, jaké mechanismy se na tomto ději podílejí. Zaměřili jsme se na studium drah buněčné odpovědi na poškození DNA a opravných drah poškozené DNA, které jsou v CML buňkách deregulovány působením BCR-ABL1 proteinu (viz kapitola 1.5.2 a 1.5.3). Dále nás zajímalo, jak se chovají buňky s různým typem mutace ve směsi vystavené odlišným koncentracím imatinibu, což by pomohlo pochopit dynamiku přítomnosti mutovaných klonů u pacientů léčených TKI v různých dávkách, případně různými TKI. Zaměřili jsme se také na sledování dynamiky multirezistentních mutací u pacientů s refrakterní CML, u nichž byla využita personalizovaná sekvenční nebo kombinovaná terapie pomocí TKI a IFN- α . Mutační dynamika byla sledována pomocí NGS. U takto léčených pacientů nás zajímala také reakce imunitního systému na použití preparátů s imunomodulačním účinkem. Studovali jsme imunoprofilu těchto pacientů s cílem zjistit, jak reakce imunitního systému na tyto léky ovlivňuje celkovou léčebnou odpověď pacientů.

V poslední části práce jsme se zabývali studiem exprese buněčných transportérů *hOCT1* a *ABCBI*, které byly popsány v souvislosti s přenosem imatinibu přes cytoplazmatickou membránu, kdy změny v aktivitě těchto transportérů mohou mít za následek rozvoj rezistence (Thomas J., et al. 2004). Cílem bylo zjistit, zda měření exprese transportérů *hOCT1* a *ABCBI* v době určení diagnózy u CML pacientů může sloužit jako marker předpovídající dosažení, případně nedosažení optimálních léčebných odpovědí na imatinibu. Zajímalo nás, jak se liší exprese těchto transportérů v buněčných subpopulacích myeloidní vývojové řady a jak případné rozdíly ovlivňují expresi v celkových leukocytech v periferní krvi pacientů s CML.

Ke studiu mutagenese v KD BCR-ABL1 jsme využili buněčnou linii KCL-22, představující model blastického zvratu CML. Buňky KCL-22 jsou schopné spontánně relabovat a vyvinout mutace v KD BCR-ABL1 při vystavení různým koncentracím imatinibu (Yuan H., et al. 2010). V již publikovaných experimentech nebyla sledována dynamika vývoje mutací, avšak získaná data nasvědčovala existenci *de novo* mutagenese. V naší práci jsme pomocí NGS detekovali přítomnost mutací T315I a E255K v linii KCL-22 do 2-5 týdnů po vystavení účinku 0,4 μ M imatinibu. V linii KCL-22 neovlivněné

působením imatinibu nebyla přítomnost mutací v KD BCR-ABL1 opakovaně pomocí NGS detekována. Využití NGS pro detekci mutací zajišťuje vysokou citlivost detekce (Machova Polakova K., et al. 2015), avšak i v této analýze nelze vyloučit přítomnost malého množství buněk pod hladinou detekčního limitu, které následně v prostředí s TKI expandují. Pro potvrzení *de novo* mutageneze v buňkách KCL-22 vystavených působení imatinibu byla provedena mutační analýza klonů odvozených z jednotlivých buněk získaných sortem. Všechny získané klony KCL-22 byly v analýze z 21 dne od sortu negativní na přítomnost mutací v kinázové doméně BCR-ABL1. KCL-22 klony, které finálně získaly rezistenci na 4 μ M imatinib, vyvinuly ve 3 případech mutace v kinázové doméně BCR-ABL1 a v jednom případě v genu *KRAS* s první detekcí 60-75 dní po sortu na hladině 0,4 μ M imatinibu. Mutace vzniklé při této koncentraci pak umožnily buňkám KCL-22 přežít v nejvyšší použité koncentraci (4 μ M). Koncentrace 4 μ M byla zvolena na základě literatury, která uvádí, že této koncentrace dosahuje hladina imatinibu v plazmě pacientů léčených imatinibem v dávce 400-600 mg/den (Peng B., et al. 2005).

Ve schopnosti rozvinout mutace mohou hrát roli genetické i epigenetické faktory. Vysoká exprese povrchové molekuly CD38 s intracelulární enzymatickou doménou schopnou hydrolyzovat cADP-ribózu snižuje hladinu buněčného NAD⁺, který je využíván jako substrát pro deacetylázu SIRT1, a tím blokuje její aktivitu (Chini E. N. 2009, Chatterjee S., et al. 2018). BCR-ABL1 aktivuje expresi SIRT1, jehož hladiny jsou zvýšené jak v primárních buňkách pacientů s CML, tak v buňkách KCL-22 (Yuan H., et al. 2012). Inhibice deacetylázy SIRT1 farmakologickými inhibitory nebo shRNA v buňkách KCL-22 vystavených imatinibu vedla k potlačení schopnosti těchto buněk vyvíjet *de novo* mutace v KD BCR-ABL1 (Wang Z., et al. 2013). V práci této skupiny při porovnání expresního profilu buněk KCL-22 bez ovlivnění imatinibem a KCL-22 buněk nesoucích mutaci T315I pozorovali mimo jiné snížení exprese genů regulujících myeloidní diferenciaci např. genů *CSF1* a *STAP1*. Jelikož inhibice těchto genů byla popsána také v souvislosti s progresí onemocnění CML do pokročilých fází, kde je vyšší výskyt mutací v kinázové doméně (Radich J. P., et al. 2006), zaměřili se na posílení myeloidní diferenciaci buněk KCL-22 ve snaze zabránit vývoji mutací v KD BCR-ABL1 pod vlivem imatinibu (Wang Z., et al. 2014). Působení účinku kyseliny α -transretinové (ATRA), která zvyšuje expresi CD38, čímž inhibuje aktivitu SIRT1 a podporuje myeloidní diferenciaci, skutečně zabránilo rozvoji mutací v kinázové doméně BCR-ABL1 pod vlivem imatinibu u buněk CML (Wang Z., et al. 2014).

Naše data získaná na kultuře KCL-22, vystavené dlouhodobému působení 4 μ M imatinibu, ukázala, že pokles přítomnosti buněk s mutací T315I na jednom ze dvou Ph chromozomů a nárůst přítomnosti buněk KCL-22 s mutací E255K na obou Ph chromozomech byl doprovázen poklesem povrchové exprese molekuly CD38. Buňky KCL-22, nesoucí mutaci E255K na obou Ph chromozomech, nevykazovaly přítomnost povrchové molekuly CD38. Tato pozorování a data z literatury nás vedla ke studiu role povrchové molekuly CD38 v souvislosti s rozvojem BCR-ABL1 mutací. Klony KCL-22, určené ke studiu rozvoje *de novo* mutagenese, pocházely z jednotlivých CD38-pozitivních nebo CD38-negativních buněk KCL-22, což nám umožnilo sledovat rozdíl ve schopnosti vyvinout mutace v závislosti na expresi CD38. V prvním experimentu (Obrázek 15 a 19) KCL-22 klony, které vyvinuly mutace v KD BCR-ABL1 nebo genu *KRAS*, pocházely z CD38-negativních KCL-22 buněk, což naznačuje, že povrchová exprese CD38, která snižuje aktivitu SIRT1, může buňky chránit před vývojem mutace. Opakovaný experiment přípravy KCL-22 klonů však ukázal, že i buňky nesoucí povrchovou molekulu CD38 mohou vyvinout mutaci v KD BCR-ABL1. Získali jsme tak dva KCL-22 klony, které pocházely z CD38-pozitivní buňky, a přesto po vystavení imatinibu *de novo* vyvinuly mutace T315I a Y253H v KD BCR-ABL1. Sledování povrchové exprese CD38 u náhodně vybraných KCL-22 klonů v čase ukazuje, že se povrchová exprese CD38 mění v průběhu kultivace. U KCL-22 klonu odvozeného z CD38-negativní buňky, který vyvinul mutaci Y253H, došlo ke změně povrchové exprese CD38 v čase. Klon, který byl původně odvozen od CD38-negativní KCL-22 buňky, změnil v průběhu kultivace fenotyp a v čase s ustanovenou rezistencí vykazoval přítomnost povrchové molekuly CD38 na 48 % buněk klonu. Ostatní 3 KCL-22 klony, odvozené od CD38-negativní KCL-22 buňky, povrchovou expresí CD38 s ustanovenou rezistencí po 205 dnech od sortu nevykazovaly.

Naše pozorování neprokázala přímý vztah mezi přítomností povrchové molekuly CD38 a zábranou rozvoje mutací v kinázové doméně BCR-ABL1 nebo jiných genech po vystavení buněk KCL-22 účinku imatinibu. Gen *SIRT1* je v buňkách KCL-22 exprimován. V rámci analýzy genové exprese DNA Damage Signaling Pathway genů nicméně nebyl pozorován signifikantní rozdíl v míře exprese genu *SIRT1* v KCL-22 klonech vystavených účinku imatinibu a schopných vyvinout mutace a v kontrolních klonech KCL-22 bez vlivu imatinibu.

SIRT1 v BCR-ABL1 pozitivních buňkách ovlivňuje využití DNA reparačních drah NHEJ a HR (Wang, Z., et al. 2013). SIRT1 aktivuje expresi Ku70, čímž ovlivňuje NHEJ opravnou dráhu, konkrétně její kanonickou cestu. Wang et al. popsali blokaci vývoje mutací v KD BCR-ABL1 při inhibici Ku70, což by nasvědčovalo využití kanonické dráhy NHEJ pro opravu poškozené DNA ve spojení s rozvojem mutací (Wang, Z., et al. 2013). Hlavní tzv. kanonická dráha NHEJ je iniciována komplexem KU70/86 proteinů a dále využívá DNA protein kinázu C a Ligázu IV. Pokud buňka nemůže využít tuto dráhu, například kvůli nepřítomnosti iniciačních proteinů KU70/86, spouští se alternativní dráha NHEJ. Alternativní dráha, která je méně prostudovaná, je spouštěna PARP1 proteinem a MRE11 komplexem (Sallmyr A., et al. 2008). Alternativní NHEJ dráha je známa jako více chybová v porovnání s kanonickou cestou. BCR-ABL1 inhibuje klasickou NHEJ dráhu degradací DNA PKc (Deutsch, E., et al. 2001) a také aktivuje alternativní dráhu upregulací DNA Ligázy IIIa, PARP1 a Werner Syndrom proteinu (WSR) a downregulací proteinu Artemis a Ligázy IV (Sallmyr A., et al. 2008, Muvarak N., et al. 2015). Ligáza I může při nedostatku ligázy III zastoupit její funkci a být tak hlavním ligačním enzymem v alternativní NHEJ (Simsek D., et al. 2011).

Porovnání expresních profilů KCL-22 klonů vystavených imatinibu v době iniciace mutagenese a kontrolních klonů KCL-22 ukázalo změny v expresi genů jednotlivých drah, jenž svědčí pro aktivaci alternativní NHEJ dráhy při rozvoji mutací. Expresní data ukazují vysokou expresi Ku70 (XCCR6) na počátku vývoje KCL-22 klonů, která ovšem klesá v souvislosti s vývojem mutací. Dále jsme pozorovali snížení exprese Ku70 a zvýšení exprese *PARP1* v čase iniciace mutagenese, nízkou expresi DNA ligázy IV ve 21 dni po sortu a zvýšenou expresi DNA Ligázy I ve 21 dni po sortu i v době detekce mutagenese u klonů KCL-22, jenž vyvíjely mutace v BCR-ABL1 nebo genu *KRAS*. Snížení exprese Ku70 v souvislosti s vývojem mutací naznačuje spuštění alternativní dráhy NHEJ. Jedním z aktivačních faktorů této dráhy je právě nedostatek Ku70. PARP1 protein, který je součástí iniciačního komplexu pro alternativní dráhu, kompetuje ve vazbě k volným DNA koncům s Ku heterodimérem (Deriano L. a Roth D.B., 2013). Exprese *PARP1* je v čase iniciace mutagenese u klonů KCL-22 zvýšená.

Při hodnocení expresního profilu KCL-22 klonů rozvíjejících mutace jsme zaznamenali také zvýšenou expresi *UNG* a *FEN1* v odběru ve 21 dni po sortu v porovnání s expresí v kontrolních klonech KCL-22. Zvýšená exprese těchto genů by mohla

naznačovat aktivaci Base excision repair (BER) dráhy, konkrétně její dlouhé cesty, a její účast na vývoji mutací (Limpose K. L., et al. 2017).

Tato buněčná opravná dráha opravuje menší poškození DNA. N-glykosylázy UNG a NTHL1 spouštějí tuto opravnou dráhu při detekci chybějících basí. Molekuly jedné opravné dráhy mohou nepřímo ovlivňovat i využití jiných drah. BER proces je schopen při své aktivitě generovat dvouřetězcové zlomy při odstranění dvou bazí ležících na opačných řetězcích blízko sebe. Bylo popsáno, že pro odstranění těchto zlomů si buňka aktivuje již zmíněnou alt-NHEJ opravnou dráhu (Limpose K. L., et al. 2017). Zvýšená exprese *UNG* v kloních KCL-22, zjištěná v 21 dnu od sortu i v době mutageneze v kloních, které vyvinuly rezistenci, by mohla naznačovat účast molekuly UNG na spuštění alternativní NHEJ dráhy.

Naše analýzy KCL-22 klonů v prostředí s imatinibem potvrzují zapojení *de novo* mutageneze do vzniku rezistentního fenotypu v CML buňkách. V souvislosti s aktivací mutageneze jsme pozorovali sníženou expresi genů kanonické dráhy NHEJ a zvýšenou expresi genů alternativní NHEJ DNA opravné dráhy. O využití alternativní NHEJ dráhy při získávání mutací v CML buňkách se zmiňuje ve své práci také Muvarak et al., který popisuje roli c-MYC při spuštění této dráhy transkripční aktivací *PARP1* a *LIG3* (Muvarak N., et al. 2015). Tobin et al. také popisuje využití alternativní NHEJ dráhy k opravám DNA zlomů demonstrowané vysokou expresí *PARP1* a *LIG3* v imatinib rezistentních buněčných liniích a CML pacientů vyvíjejících mutace v KD BCR-ABL1 (Tobin L. A., et al. 2013). Wang et al. svoji hypotézu o roli kanonické NHEJ dráhy ve vývoji mutací v KD BCR-ABL demonstrují blokací vývoje mutací při inhibici Ku70 a popisují tak kritickou roli Ku70 v iniciaci mutageneze (Wang, Z., et al. 2013). Naše analýzy ukazují vysokou expresi Ku70 u klonů schopných vyvinout mutace ve 21 dni po sortu, která následně klesá v souvislosti s vývojem mutací. Možným vysvětlením spojující oba výsledky je role Ku70 při volbě reparační dráhy u poškozené DNA v CML buňce. Při volbě HR, která se spouští při nedostatku faktorů NHEJ (Howard S. M., et al. 2015), tedy i v případě blokace exprese Ku70, popsané Wang et al, k iniciaci mutageneze pravděpodobně nedochází. Při volbě NHEJ pro opravu DNA, pro kterou je nutný Ku70, může následně dojít k přepnutí do alternativní dráhy např. zvýšenou expresí *PARP1*, který s Ku70 kompetuje ve vazbě k poškozeným DNA koncům. Zvýšení exprese *PARP1* je pravděpodobně regulováno přes c-MYC, ovlivňovaný funkcí BCR-ABL1 (Muvarak N., et al. 2015). Vznik chybných oprav při procesu alternativní NHEJ pak přispívá k iniciaci

de novo mutagenese. Je také zjevné, že buňky KCL-22 potřebují pro vývoj mutací imatinib v subletální koncentraci (0,4 μ M).

Jako modelový systém pro sledování růstové kompetice buněk nesoucích různé typy mutace v odlišných prostředích jsme využili směs rezistentních klonů KCL-22 v různých koncentracích imatinibu. Ve vysokých koncentracích (4 a 10 μ M IM) získal selekční výhodu klon KCL-22R, nesoucí mutaci T315I. Přítomnost gate-keeper mutace T315I umožňuje fosforylaci Tyr²⁵⁷ oproti fosforylaci Tyr²⁵³ v BCR-ABL1 buňkách bez mutace, což udává buňkám vyšší onkogenní potenciál (Skaggs B. J., et al. 2006). Přítomnost isoleucinu na pozici 315 navíc posiluje hydrofobní interakce, udržující aktivní konformaci enzymu (Rajendran V., et al. 2018). Tyto změny pravděpodobně v prostředí buněčné kultury v přítomnosti imatinibu napomáhají buňkám nesoucí T315I získat proliferační výhodu.

V prostředí bez imatinibu se uplatnily klony nesoucí mutaci T315I a Y253H, které se ve směsi vyskytovaly po 45 dnech v přibližně stejném zastoupení. Při dlouhodobé kultivaci pak expandoval klon s mutací Y253H. Tento klon nesl 3 kopie BCR-ABL1, měl tedy více nemutovaného BCR-ABL1. V prostředí, kde není přítomen imatinib, je větší množství BCR-ABL1 proteinu bez mutace pro buňky výhodou. Griswold et al. popisuje nižší enzymatickou aktivitu BCR-ABL1 kinázy a nižší proliferační aktivitu buněk nesoucích mutaci T315I oproti buňkám s jiným typem mutace, např. Y253F, E255K, a BCR-ABL1 buňkám bez mutace (Griswold I. J., et al. 2006).

Podávání TKI svým selekčním tlakem ovlivňuje evoluci mutovaných klonů. Klon, jenž má selekční výhodu a převažuje na dané léčbě u pacienta, však nemusí mít tuto výhodu při vysazení léčby nebo za použití jiného TKI, jak jsme mohli pozorovat také na souboru šesti pacientů s individualizovaným léčebným postupem z reálné praxe. U pacientů, u kterých byla detekována multirezistentní mutace (5x T315I, 1x kompozitní mutace M351T/F317L), byla sledována dynamika mutovaného klonu pomocí NGS technologie. Vzhledem k nemožnosti transplantace z důvodu nedostupnosti vhodného dárce, přítomnosti dalších komorbidit a z důvodu nedostupnosti ponatinibu (TKI cíleného na rezistenci způsobenou mutací T315I) v době detekce mutace, bylo použito alternativního postupu. Léčba byla založena na střídavém podávání TKI s IFN- α nebo jejich podávání v kombinaci. Vycházelo se z předpokladu, že vysazením léčby TKI dojde k snížení selekčního tlaku, což povede k znevýhodnění klonu s mutací T315I.

Použitá terapie IFN- α využívá kromě polevení selekčního tlaku TKI, udávajícího výhodu buňkám nesoucím rezistentní mutaci, také imunomodulační efekt tohoto preparátu. IFN- α byl využíván v době před zavedením terapie TKI jako jediný lék CML pro pacienty, kteří nemohli podstoupit HSCT. Jeho účinek je široký přes stimulaci diferenciaci buněk, antiproliferační a proapoptotický efekt až k imunomodulačnímu vlivu.

U 4/6 pacientů došlo na základě střídání TKI s IFN- α nebo jejich kombinovanému podání k poklesu zastoupení klonu s mutací T315I, který se projevil poklesem hladiny mutovaného transkriptu BCR-ABL1 do nedetekovatelnosti NGS technologií. Tři z těchto čtyř pacientů dosáhli hluboké molekulární odpovědi. U jednoho pacienta bylo možno díky nedetekovatelnému mutovanému transkriptu přejít z kombinované terapie na monoterapii nilotinibem s ohledem na nežádoucí vedlejší účinky IFN- α . U tohoto pacienta ani následujících 46 měsíců sledování nedošlo k opětovnému záchytu mutace pomocí NGS technologie. Zbývající dva pacienti z použitého přístupu nezískali výsledný profit. Vysazení TKI sice mělo u jednoho z nich za následek pokles přítomnosti mutovaného transkriptu T315I do nedetekovatelnosti, byla však detekována přítomnost dalších dvou mutací (E255V a F317L). Tento 85letý pacient následně zemřel na jiné onemocnění než CML. Efekt léčebného účinku IFN- α je popisován mimo jiné v souvislosti s věkem, kdy jeho účinnost je lepší u pacientů mladších než 60 let. U starších pacientů, jak tomu bylo u našeho pacienta, je jeho schopnost stimulovat imunitní systém diskutabilní (Kujawski L. A. a Talpaz M., 2007). Záchyt dalších mutací na terapii IFN- α v tomto případě byl pravděpodobně také ovlivněn vysokým věkem pacienta, kdy je známa obecně vyšší incidence mutací.

Poslední sledovaný pacient na použití IFN- α nereagoval ani poklesem přítomnosti T315I mutovaného transkriptu. Pacient profitoval až z následně dostupné léčby ponatinibem, kde bylo možno sledovat pokles hladiny BCR-ABL1 se současným poklesem T315I mutovaného transkriptu.

Polevení selekčního tlaku TKI mělo za následek pokles přítomnosti klonu s multirezistentní mutací v 5/6 případech. Využitá terapie vedla k dosažení výborných léčebných odpovědí (MR4,5 nebo MMR) u 4/6 pacientů, u kterých bylo možno pozorovat také známky imunitní aktivace. U tří pacientů jsme sledovali vyšší hladiny NK buněk. Jednalo se o pacienty, kteří byli před IFN- α léčení dasatinibem. Stimulace produkce NK buněk byla pravděpodobně zahájena již v průběhu léčby dasatinibem

a následně byla posílena podáním IFN- α . IFN- α pak dopomohl v těchto případech k posílení imunitního dohledu, což pozitivně ovlivnilo dosažení výborných léčebných odpovědí těchto pacientů.

Z literatury je využití IFN- α v léčbě pacientů s mutací T315I známo pouze ze 3 kazuistik (Illander M., et al. 2014, Itonaga H., et al. 2012, Zhang, H., et al. 2018). Illander et al. popisují případ excelentní odpovědi na IFN- α u 75leté pacientky s mutací T315I. Odpověď byla asociována s přítomností nestandardního poměru NK buněk. V periferní krvi je cca 90 % maturovaných NK buněk s nízkou povrchovou expresí CD56 (CD56^{dim}) a pouze 10 % méně diferencovaných prekurzorů s vysokou expresí CD56 (CD56^{bright}), maturace NK buněk je spojena s rozvojem cytotoxické aktivity (Abel A. M., et al. 2018). NK buňky pacientky léčené IFN- α i přes nestandardně vysoký podíl CD56^{bright}, spojovaný s nižší cytotoxickou aktivitou, vykazovaly signifikantně vyšší cytotoxickou aktivitu proti leukemickým buňkám v porovnání s NK buňkami zdravých dárců. Nestandardní poměr CD56^{dim} a CD56^{bright} byl popsán také u pacientů s hepatitidou C léčených IFN- α . Oba zmíněné případy nasvědčují vlivu terapie IFN- α na zvýšeném vyplavování CD56^{bright} NK buněk ze sekundárních lymfoidních orgánů a stimulace jejich cytotoxické aktivity.

Na terapii IFN- α byla pozorována u zhruba 10-20 % pacientů schopnost dosažení kompletní CCR. Kreutzman et al. zkoumali imunitní profily těchto pacientů, kteří byli schopni si léčebnou odpověď udržet i po ukončení podávání IFN- α (Kreutzman A., et al. 2011). Popsali aktivaci NK buněk a zvýšení hladiny CD8⁺ T buněk. U 95 % analyzovaných pacientů byla přítomna subpopulace oligoklonálních T lymfo s $\gamma\delta$ TCR s V γ 9 přeskupením. Kanodia et al. sledovali schopnost IFN- α zvyšovat expresi proteinázy 3 (myeloblastin) a tím indukovat vývoj specifických cytotoxických T lymfocytů namířených proti antigenu PR-1, jejichž přítomnost pozitivně ovlivňuje schopnost udržení odpovědi (Kanodia S., et al. 2010). PR-1 Tc byly pozorovány také při léčbě kombinací IFN- α s TKI, kde jejich přítomnost zvyšuje pravděpodobnost TFR (Burchert A., et al. 2010).

Dasatinib použitý v terapii u 5/6 námi sledovaných pacientů vykazuje imunomodulační účinky (Hughes A., et al. 2017) a předpokládáme, že právě vzájemné potencování imunomodulačního efektu IFN- α a dasatinibu sehrálo ve stimulaci imunitního dohledu nad leukemickými klony u našich pacientů zásadní vliv. Léčba dasatinibem rychle mobilizuje NK buňky, NKT buňky, B lymfocyty a $\gamma\delta$ T lymfocyty

(Mustjoki S., et al. 2013). Přítomnost těchto buněk, nazývaných velké granulární lymfocyty (mono a oligo-klonální CD8⁺ T lymfocyty a NK buňky), bývá spojována s lepší prognózou a odpovědí na léčbu (Kim, D. H., et al. 2009, Nagata Y., et al. 2010). Na léčbě dasatinibem byla pozorována zvýšená cytotoxická aktivita NK buněk oproti stavu na léčbě imatinibem a nilotinibem (Hayashi Y., et al. 2012). Dasatinib redukuje T-regulační buňky v periferní krvi i kostní dřeni a tím napomáhá stimulaci imunitního systému (El Missiry M., et al. 2016).

I přes dnešní obecnou dostupnost léčby ponatinibem mohou nastat v léčebné praxi situace, kdy z důvodu dalších komorbidit (např. kardiovaskulárních onemocnění) není možné tento preparát podat. V takových případech může být možnost využití IFN- α v terapii CML s multirezistentní mutací velmi efektivní variantou. Zvláště pak v případě přítomnosti multirezistentní kompozitní mutace, zahrnující mutaci T315I, kde byla popsána rezistence k ponatinibu (Zabriskie M. S., et al. 2014), se tento léčebný postup ukazuje jako velmi účinná alternativa. Využití terapie IFN- α v návaznosti na léčbu dasatinibem dopomáhá k aktivaci NK buněk, které se podílejí na udržení léčebných odpovědí aktivací imunitního dohledu. Využití vysoce citlivé metody pro sledování zastoupení mutovaného klonu je pro použití takto individualizovaného léčebného přístupu velmi účinným nástrojem.

Posledním studovaným mechanismem rezistence buněk CML byla role buněčných transportérů hOCT1 a ABCB1 v léčebné odpovědi na terapii imatinibem. Sledovali jsme expresi genů kódujících transportéry *ABCB1* a *hOCT1* u CML pacientů v průběhu terapie imatinibem. Naší snahou bylo zjistit, zda míra exprese *ABCB1* a *hOCT1* může predikovat schopnost dosažení optimálních léčebných odpovědí.

Snížená exprese *hOCT1* transportéru, přenášejícího imatinib přes plazmatickou membránu do buňky, a zvýšená exprese efluxního *ABCB1* mohou způsobit nedostatečnou intracelulární koncentraci imatinibu. Nízká koncentrace léku v buňce má za následek nedostatečně efektivní inhibici BCR-ABL1 kinázy, což může vést až k selhání terapie (Thomas J., et al. 2004). Řada studií se zabývala vztahem mezi mírou aktivity nebo exprese transportérů před zahájením léčby a odpovědí na léčbu (Watkins D. B., et al. 2015). White et al. popsali korelaci mezi mírou exprese *hOCT1* a jeho aktivitou. Sledování exprese *hOCT1* by mohlo odrážet aktivitu transportéru v buňce, měření aktivity však lépe charakterizuje skutečný transport, nicméně jeho měření je náročné a nepoužitelné v běžné praxi (White D. L., et al. 2006). Aktivita hOCT1 je rozdílná

v různých buněčných subtypech. Engler et al. popsali, že aktivita *hOCT1* v mononukleárních buňkách nekoreluje s aktivitou v CD34+ buňkách CML pacientů. Zvýšená aktivita *hOCT1* v mononukleární frakci predikuje dosažení MMR, zatímco zvýšená aktivita v CD34+ buňkách není asociována s dobrou odpovědí na léčbu (Engler, J. R., et al. 2010). Studie hodnotící vztah mezi mírou exprese *hOCT1* a odpovědí na léčbu poskytují rozdílné závěry. Někteří autoři popsali signifikantně vyšší hladinu exprese *hOCT1* v době diagnózy ve vztahu k dosažení optimálních odpovědí na léčbě imatinibem (Crossman L. C., et al. 2005, Marin D., et al. 2010), jiné práce tento vztah nepotvrdily (Giannoudis A., et al. 2013, White D. L., et al. 2010). White et al. popsali sníženou aktivitu *hOCT1* ve vztahu s nedosažením optimálních léčebných odpovědí na imatinib (Engler, J. R., et al. 2010, White D. L., et al. 2010, White D. L., et al. 2007, Engler, J. R., et al. 2011).

V našich analýzách jsme zjistili, že značný vliv na míru exprese transportéru *hOCT1* má složení buněčných subpopulací ve vzorcích celkových leukocytů v periferní krvi. Nalezli jsme negativní korelaci mezi hladinou *hOCT1* s procentem nezralých buněčných forem (neutrofilní metamyelocyty, neutrofilní myelocyty, promyelocyty, promonocyty) ve vzorcích celkových leukocytů z periferní krve a pozitivní korelaci vyšší hladiny *hOCT1* s množstvím neutrofilních granulocytů. Toto zjištění naznačuje, že nezralé formy leukocytů přítomné ve vzorcích v době diagnózy nebo v akcelerované fázi onemocnění vykazují nižší expresi *hOCT1* a při použití celkových leukocytů k analýze exprese jejich přítomnost ovlivňuje celkovou expresi ve vzorku. Celkové leukocyty jsou pro hodnocení exprese z tohoto pohledu nevhodné. Pokud by se uvažovalo o využití míry exprese *hOCT1* v době diagnózy jako prediktivního markeru, je zásadní určit, v jaké buněčné subpopulaci bude měření prováděno. Složení vzorku v době diagnózy ovlivňuje hladinu celkové exprese transportéru a může vysvětlovat protichůdné závěry výše uvedených studií (Watkins D. B., et al. 2015).

Labussiere et al. ve své práci popsali korelaci mezi hladinou exprese *ABCBI* transportéru v době diagnózy a dosažení MMR ve 12 měsících. Tito autoři však ve své práci uvádějí, že míra exprese *ABCBI* není jednoznačným prognostickým markerem. Dle jejich závěrů ovlivňuje míra exprese genu *ABCBI* plazmatickou, a tedy i intracelulární koncentraci imatinibu, avšak není možné vztah mezi expresí *ABCBI* a účinností léčby takto zjednodušit. Jedná se o multifaktoriální děj ovlivněný řadou dalších událostí, jako je exprese jiných přenašečů, přítomností SNP atd. Na rozdíl od těchto autorů Crossman

et al. a Wang et al. žádný signifikantní vztah nepotvrdili (Crossman L. C., et al. 2005, Wang, L., et al. 2008).

Naše analýzy ukazují, že je možné pozorovat signifikantně vyšší *ABCB1* expresi v mononukleární subpopulaci buněk v porovnání s polymorfonukleární subpopulací ($p < 0,003$). Ve všech analyzovaných buněčných populacích byl popsán velký rozptyl v hladině exprese *ABCB1* (Racil Z., et al. 2011). Obdobný rozdíl v expresi u mononukleární a polymorfonukleární frakce byl pozorován také ve skupině zdravých dárců ($p < 0,001$), kde rozptyl v hladinách exprese byl ještě výraznější než u CML pacientů. Hodnoty exprese *ABCB1* u CML pacientů v době určení diagnózy byly ve všech sledovaných buněčných subpopulacích nižší než ve skupině zdravých dárců, což naznačuje změnu exprese transportéru *ABCB1* v BCR-ABL1 pozitivních buňkách. U CML pacientů v době určení diagnózy mononukleární frakce obsahuje kromě lymfocytů a monocytů také nezralé formy myeloidní vývojové řady, jako jsou metamyelocyty, promyelocyty a myelocyty a myeloblasty. Pozorovali jsme negativní korelaci exprese *ABCB1* s procentem nezralých buněčných subpopulací ve vzorku. Nezralé buňky myeloidní vývojové řady mají sníženou expresi *ABCB1* a jejich přítomnost snižuje celkovou expresi *ABCB1* v mononukleární frakci. V době určení diagnózy je exprese *ABCB1* v celkových leukocytech také ovlivněna přítomností nezralých vývojových forem ve vzorku a z hodnoty exprese *ABCB1* v celkových leukocytech ani z mononukleární frakce nelze odvozovat predispozici k rozvoji rezistence na základě účasti *ABCB1* na snížení intracelulární koncentrace imatinibu. Jak je diskutováno dále, role *ABCB1* na zvýšeném exportu imatinibu z CML buněk je sporná.

Vyšší míra exprese *ABCB1* u pacientů v hluboké molekulární odpovědi oproti skupině zdravých dárců nás přivedly k hypotéze, že imatinib v BCR-ABL1 negativních leukocytech ovlivňuje expresi efluxového transportéru *ABCB1*. Testování vlivu imatinibu na hladinu exprese *ABCB1* u BCR-ABL1 pozitivních a BCR-ABL1 negativních buněčných linií nám ukázalo snížení exprese *ABCB1* u BCR-ABL1 pozitivních linií, a naopak zvýšení exprese *ABCB1* u BCR-ABL1 negativních buněčných linií pod vlivem imatinibu. Výsledky *in vitro* analýz naznačují ovlivnění exprese *ABCB1* působením imatinibu. Sledovaný nárůst exprese *ABCB1* v čase po zaléčení pacientů imatinibem, doprovázený poklesem hladiny BCR-ABL1, je způsoben složením vzorku periferní krve v jednotlivých odběrech. Na počátku je v periferní krvi velké množství BCR-ABL1 pozitivních buněk, u kterých může pod vlivem imatinibu docházet ke snížení

exprese *ABCB1*, jak sledujeme v případě BCR-ABL1 pozitivních buněčných linií. Po zahájení terapie dochází s postupným ubýváním BCR-ABL1 pozitivních leukocytů a přibýváním BCR-ABL1 negativních leukocytů k nárůstu hladiny exprese *ABCB1*. Analýzy BCR-ABL1 negativních buněčných linií ukazují nárůst exprese *ABCB1* po působení imatinibu. BCR-ABL1 negativní leukocyty se zvýšením exprese efluxového transportéru pravděpodobně brání jeho účinku a stimulují si mechanismy, které jim napomáhají se imatinibu zbavit.

Pozorované snížení exprese *ABCB1* v BCR-ABL1 pozitivních buňkách je v souladu s pracemi dalších autorů. Ferrao et al. popisuje, že imatinib je ve fyziologických dávkách špatným substrátem pro přenos pomocí ABCB1 (Ferrao P. T., et al. 2003). Hamada et. al popsal, že imatinib může být za určitých okolností substrátem ABCB1, ale může být také jeho modulátorem s inhibičním efektem na ABCB1 (Hamada A., et al. 2003). Dohse et al. potvrdil toto zjištění (Dohse M., et al. 2010). Doplnil tento fakt o popis koncentrační závislosti, kdy v nízkých koncentracích imatinib může být substrátem ABCB1, avšak ve vysokých koncentracích funguje výhradně jako inhibitor. V této práci je diskutován pravděpodobný vliv lokalizace procesu působení imatinibu. V gastrointestinálním traktu, vzhledem k vysoké koncentraci imatinibu, převažuje pravděpodobně inhibiční efekt, zatímco v mikroprostředí kostní dřeně bude koncentrace pravděpodobně nízká a imatinib může být substrátem pro ABCB1 (Dohse M., et al. 2010).

Naše data nepotvrdila vztah mezi zvýšením exprese *ABCB1* a rozvojem rezistence k imatinibu nebo selháním léčby. Zdá se, že imatinib stimuluje expresi *ABCB1* v BCR-ABL1 negativních buňkách a může expresi inhibovat v BCR-ABL1 pozitivních buňkách.

Měření exprese genů kódujících buněčné transportéry ABCB1 a hOCT1 nepotvrdila možnost využití této metody jako prognostického markeru pro předpověď odpovědi pacientů s CML na léčbu imatinibem. Hladina exprese *hOCT1* stejně jako *ABCB1* v době diagnózy v žádné ze sledovaných buněčných frakcí (celkové leukocyty, mononukleární buňky, polymorfonukleáry) nepředpovídá schopnost dosažení optimální odpovědi v 6 a 12 měsících na terapii imatinibem. Jako slibný marker se ale ukazuje hodnocení přítomnosti SNP v promotorových oblastech transportéru SLC22A4 a SLC22A5. Přítomnost rs460089-GG_rs2631365-TC představuje rizikový faktor pro selhání terapie imatinibem (Jaruskova M., et al. 2017).

6 Shrnutí

V rámci řešení prvního cíle se s využitím *in vitro* modelového systému CML poprvé podařilo popsat důkazy existence *de novo* mutagenese v CML buňkách pod vlivem působení imatinibu. Technologie NGS a využití klonů odvozených od buněčné linie KCL-22 umožnily zachytit v reálném čase vývoj mutací u 4 odvozených KCL-22R klonů. Práce ukázala schopnost buněk KCL-22, vystavených subletální koncentraci imatinibu (0,4 μ M), vyvinout mutace v kinázové doméně BCR-ABL1, případně v KRAS. Rezistentní buňky nesoucí mutace ve směsné kultuře vystavené imatinibu získávají selekční výhodu a v kultuře převládají. Rozvoj mutací je v buňkách KCL-22 asociován se zvýšením exprese genů alternativní NHEJ opravné dráhy a snížením exprese genů kanonické NHEJ dráhy. Alternativní NHEJ dráha je známa vyšší chybovostí při opravách poškozené DNA, je tedy pravděpodobné, že využití této dráhy se na vzniku mutací *de novo* v buňkách KCL-22 podílí.

Při řešení druhého cíle byla u 6 pacientů s refrakterní CML efektivně využita metodika NGS, umožňující detailně a s vysokou citlivostí sledovat dynamiku mutovaných klonů v průběhu individualizované terapie IFN- α a TKI. Léčba IFN- α (střídavě s TKI, nebo v kombinaci) využívá kromě polevení selekčního tlaku TKI také imunomodulační efekt tohoto preparátu. U 4/6 sledovaných pacientů došlo k poklesu zastoupení klonu s mutací do nedetekovatelnosti a 3 z nich dosáhli hluboké molekulární odpovědi. U všech 4 úspěšně léčených pacientů bylo možno pozorovat známky aktivace imunitního systému. Zvýšení hladiny NK buněk bylo nejvíce patrné v případě, kdy léčba IFN- α následovala po předchozí léčbě dasatinibem, jenž je znám svými imunomodulačními účinky. Aktivace NK buněk, zahájená působením dasatinibu a posílená podáním IFN- α , se pravděpodobně podílela na dosažení výborných léčebných odpovědí u těchto terapeuticky komplikovaných CML pacientů.

Posledním cílem bylo hodnocení vztahu genové exprese buněčných transportérů *ABCBI* a *hOCT1* a schopnosti dosažení optimální léčebné odpovědi na léčbu imatinibem. Výsledky ukázaly výrazné ovlivnění celkové exprese obou transportérů buněčným složením analyzovaného vzorku. Celková exprese *hOCT1* a *ABCBI* je snížena přítomností nezralých buněčných forem myeloidní vývojové řady. Měření exprese obou genů nepotvrdilo možnost využití této metody jako prognostického markeru pro předpověď odpovědi pacientů s CML na léčbu imatinibem v žádné z analyzovaných buněčných frakcí (celkové leukocyty, mononukleární a polymorfonukleární buňky).

Zajímavým zjištěním bylo ovlivnění genové exprese transportéru ABCB1 působením imatinibu, a to odlišným způsobem v BCR-ABL1 pozitivních a BCR-ABL1 negativních buňkách. Zatímco v BCR-ABL1 pozitivních buňkách imatinib snižuje expresi *ABCB1*, v BCR-ABL1 negativních buňkách dochází pod vlivem imatinibu ke stimulaci jeho exprese, pravděpodobně ve snaze bránit se vlivu léčiva na buňky.

7 Seznam zkratek

ABC	ATP-binding cassette transporter
ABCG2	člen rodiny buněčných transportérů (ATP-binding cassette super-family G)
ABL1	Abelson gen 1
ADP	adenozindifosfát
AKT	proteinkináza B
AML	akutní myeloidní leukémie
AP	akcelerovaná fáze
ASO PCR	alelově specifická polymerázová řetězová reakce
ASXL1	transkripční regulátor
ATM	serin/treoninová kináza
ATP	adenozintrifosfát
ATR	serin/threoninová kináza (DNA damage sensor)
BCL-2	člen proteinové rodiny BCL
BCL-6	člen proteinové rodiny BCL
BCL-xL	člen proteinové rodiny BCL
BCOR	BCL6 corepressor
BCORL	BCL6 corepressor like protein 1
BCR	místo zlomu (break cluster region)
BER	Base excision repair
BM	kostní dřeň
CBL	E3 ubiquitin-protein ligáza
CCR	kompletní cytogenetická odpověď
CCD1	Carotenoid 9,10(9',10')-cleavage dioxygenaza 1
CDKN1C	cyklin dependentní kinázový inhibitor 1C
cDNA	komplementární DNA
CEBPA	CCAAT enhancer binding protein alpha
CF	korekční faktor
c-KIT	tyrozinkinázový receptor pro růstový faktor
CLIP	Childhood Leukaemia Investigation Prague
CML	chronická myeloidní leukemie
c-MYC	transkripční faktor
CRKL	CRK Like Proto-Oncogene, Adaptor Protein
CTLA-4	inhibiční receptor na povrchu T lymfocytů
DASA	dasatinib
ddASO PCR	digitální kapková alelově specifická PCR
DG	doba určení diagnózy
DNA PK	DNA proteinkináza
DNMT3a	DNA (cytosine-5)-methyltransferáza 3A

DPP-4	dipeptidyl peptidáza-4
ELN	European LeukemiaNet – evropská síť předních odborníků v diagnostice a léčbě leukemií
ERK	extracelulárními signály regulovaná kináza
ERM	Evropský referenční materiál
EURO-SKI	klinická studie European Stop Tyrosine Kinase Inhibitor Study
FAB	Francouzsko-Americko-Britská klasifikace leukemií
FACS	přítoková cytometrie (Fluorescent Activated Cell Sorting)
FC	fold change
FEN1	flap endonukleáza 1
FOXO	transkripční faktor
GAB2	protein asociovaný s GRB2 adaptorový protein
GADPH	glyceraldehyd 3-phosphat dehydrogenáza
GM-SCF	granulo-monocytový růstový faktor
GRB2	adaptorový protein vážící se k receptoru pro růstový faktor
GTP	guanozintrifosfát
GUSB	glukuronidáza beta
GVHD	reakce štěpu proti hostiteli
HIF2 α	hypoxií indukovatelný faktor 2 α
HLA	human leukocyte antigen
hOCT1,2,3	lidský organický kationt transporter
HPRT	hypoxanthin-guanin phosphoribosyltransferaza
HR	homologní rekombinace
HRM	vysoce rozlišující analýza křivek tání (high resolution melting analýza)
HSC	hematopoetické kmenové buňky
HSCT	transplantace hematopoetických kmenových buněk
CHK1/2	checkpoint kináza 1,2
CHR	kompletní hematologická odpověď
IC50	polovina maximální inhibiční koncentrace
IFN- α	interferon alfa
IL-1	interlekin 1
IL1RA	člen proteinové rodiny interleukinu 1
IL1 β	člen proteinové rodiny interleukinu 1
IL3	interlekin 3
IM	imatinib, dříve STI 571
IRIS	the international randomized interferon α versus STI 571
IS	mezinárodní stupnice (international scale)
IUR	intracelulární příjem a výdej látek (intracellular uptake and retention)
JAK	Janus kináza
KD BCR-ABL1	kinázová doména proteinu BCR-ABL1

KD	kostní dřeň
Ku70	protein kódovaný genem <i>XRCC6</i>
LIG1	ligáza 1
LoB	limit blanku
LoD	limit detekce
LoQ	limit kvantifikace
LSC	leukemická kmenová buňka
MAPK	mitogeny aktivovaná protein kináza
MBCR-ABL	major BCR-ABL1
mCR	malá cytogenetická odpověď
MDM2	ubiquitin ligáza
MDR1	P-glykoprotein
MEK	mitogeny aktivovaná protein kináza
mFISH	vícebarevná fluorescenční in situ hybridizace
MLH1	MutL homolog1 protein
MMR	velká molekulární odpověď
MNC	mononukleární buňky
NAD	nikotinamidadenindinukleotid
NES	jaderný exportní signál
NGS	sekvenování nové generace
NHEJ	nehomologní spojování konců
NILO	nilotinib
NK	nukleová kyselina (RNA, DNA)
NK buňka	přirozený zabíječ (natural killer)
NKT	subpopulace T lymfocytů nesoucí povrchové receptory T lymfocytů i NK buněk
NLS	jaderný lokalizační signál
noCR	bez cytogenetické odpovědi
NRL DNA	Národní referenční laboratoř pro DNA diagnostiku
PARP1	poly [ADP-ribose] polymeráza 1
PBS	fosfátový pufr (Phosphate Buffered Saline)
pCR	parciální cytogenetická odpověď
PCR	polymerázová řetězová reakce
PD-1	receptor programované buněčné smrti
PDGFR α / β	receptor pro destičkový růstový faktor
PD-L1	ligand programované buněčné smrti
Ph chromozom	Philadelfský chromozom
Ph+ ALL	akutní lymfatická leukemie a přítomností Ph chromozomu
pHR	parciální hematologická odpověď
PI3K	fosfatidylinozitol-3-kináza
PK	periferní krev

PMNC	polymorfonukleární buňky
PRPF8	pre-mRNA processing faktor 8
qRT-PCR	kvantitativní reversně transkriptázová polymerázová řetězová reakce
RAD51	gen kódující enzym účastnící se oprav DNA
RAEB	Refrakterní anémie s nadbytkem blastů
RAP	GTP vazebný protein
RET	tyrozinkináza
ROS	aktivní kyslíkové radikály (reactive oxygen species)
RPLP0	60S ribozomálníprotein P0
SIRT1 – NAD	dependentní deacetyláza sirtuin-1
SLC	rodina membránových transportérů (solute carrier)
SLC22A4	člen rodiny buněčných transportérů (Solute carrier family 22, member 4)
SNP	single nukleotid polymorfismus
SOP	standartní operační postup
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
TET2	tet methylcytozin dioxygenaza 2
TF	selhání léčby (therapy failure)
TFR	období po vysazení léčby do progresse onemocnění (treatment free remission)
TGF-β	tumor grow faktor beta
TKI	tyrozinkinázové inhibitory
TP53	tumorsupresorový gen
Treg	regulační T-lymfocyty
UHKT	Ústav hematologie a krevní transfuze
UNG	uracyl DNA glykosyláza
WT	bez záchyty mutace (wild type)
XCCR6	gen kódující protein Ku70

8 Seznam literatury a odkazů

Abel AM, Yang C, Thakar MS, Malarkannan S. Natural Killer Cells: Development, Maturation, and Clinical Utilization. *Front Immunol*. 2018;9:1869.

Abraham SA, Hopcroft LEM, Carrick E, et al. Dual targeting of p53 and c-MYC selectively eliminates leukaemic stem cells. *Nature*. 2016;534(7607):341-346.

Alikian M, Gerrard G, Subramanian PG, et al. BCR-ABL1 kinase domain mutations: methodology and clinical evaluation. *Am J Hematol*. 2012;87(3):298-304.

Assouline S, Lipton JH. Monitoring response and resistance to treatment in chronic myeloid leukemia. *Curr Oncol*. 2011;18(2):71.

Baccarani M, Deininger MW, Rosti G, et al. European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. *Blood*. 2013;122(6):872-884.

Baccarani M, Cortes JE, Pane F, et al Chronic Myeloid Leukemia: An Update of Concepts and Management Recommendations of European LeukemiaNet. *J Clin Oncol*. 2009;27(33):6041-6051

Bachy E, Bernaud J, Roy P, Rigal D, Nicolini FE. Quantitative and functional analyses of CD4(+) CD25(+) FoxP3(+) regulatory T cells in chronic phase chronic myeloid leukaemia patients at diagnosis and on imatinib mesylate. *Br J Haematol*. 2011;153(1):139-143.

Becher R, Carbonell F, Bartram CR. Isochromosome 17q in Ph1-negative leukemia: a clinical, cytogenetic, and molecular study. *Blood*. 1990;75(8):1679-1683.

Bhatia R, Verfaillie CM. The effect of interferon-alpha on beta-1 integrin mediated adhesion and growth regulation in chronic myelogenous leukemia. *Leuk Lymphoma*. 1998;28(3-4):241-254.

Bhatia R, Holtz M, Niu N, et al. Persistence of malignant hematopoietic progenitors in chronic myelogenous leukemia patients in complete cytogenetic remission following imatinib mesylate treatment. *Blood*. 2003;101(12):4701-4707.

Brady N, Gaymes TJ, Cheung M, Mufti GJ, Rassool FV. Increased error-prone NHEJ activity in myeloid leukemias is associated with DNA damage at sites that recruit key nonhomologous end-joining proteins. *Cancer Res*. 2003;63(8):1798-1805.

Brast S, Grabner A, Sucic S, et al. The cysteines of the extracellular loop are crucial for trafficking of human organic cation transporter 2 to the plasma membrane and are involved in oligomerization. *FASEB J*. 2012;26(3):976-986.

Burchert A, Saussele S, Eigendorff E, et al. Interferon alpha 2 maintenance therapy may enable high rates of treatment discontinuation in chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2015;29(6):1331-1335.

Burchert A, Müller MC, Kostrewa P, et al. Sustained molecular response with interferon alfa maintenance after induction therapy with imatinib plus interferon alfa in patients with chronic myeloid leukemia. *J Clin Oncol*. 2010;28(8):1429-1435.

Burchert A, Wöfl S, Schmidt M, et al. Interferon-alpha, but not the ABL-kinase inhibitor imatinib (STI571), induces expression of myeloblastin and a specific T-cell response in chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2003;101(1):259-264.

Burger H, van Tol H, Boersma AWM, et al. Imatinib mesylate (STI571) is a substrate for the breast cancer resistance protein (BCRP)/ABCG2 drug pump. *Blood*. 2004;104(9):2940-2942.

Burke BA, Carroll M. BCR-ABL: a multi-faceted promoter of DNA mutation in chronic myelogenous leukemia. *Leukemia*. 2010;24(6):1105-1112.

Bustin, Stephen A. A-Z of Quantitative PCR. La Jolla, Calif.: International University Line, 2004.

Chai SK, Nichols GL, Rothman P. Constitutive activation of JAKs and STATs in BCR-Abl-expressing cell lines and peripheral blood cells derived from leukemic patients. *J Immunol*. 1997;159(10):4720-4728.

Chatain N, Ziegler P, Fahrenkamp D, et al. Src family kinases mediate cytoplasmic retention of activated STAT5 in BCR-ABL-positive cells. *Oncogene*. 2013;32(31):3587-3597.

Chatterjee S, Daenthanasanmak A, Chakraborty P, et al. CD38-NAD⁺Axis Regulates Immunotherapeutic Anti-Tumor T Cell Response. *Cell Metab*. 2018;27(1):85-100.e8.

Chawla-Sarkar M, Lindner DJ, Liu Y-, et al. Apoptosis and interferons: role of interferon-stimulated genes as mediators of apoptosis. *Apoptosis*. 2003;8(3):237-249.

Chen CI-, Koschmieder S, Kerstiens L, et al. NK cells are dysfunctional in human chronic myelogenous leukemia before and on imatinib treatment and in BCR-ABL-positive mice. *Leukemia*. 2012;26(3):465-474.

Chereda B, Melo JV. Natural course and biology of CML. *Ann Hematol*. 2015;94 Suppl 2:107.

Chini EN. CD38 as a regulator of cellular NAD: a novel potential pharmacological target for metabolic conditions. *Curr Pharm Des*. 2009;15(1):57-63.

Christiansson L, Söderlund S, Svensson E, et al. Increased level of myeloid-derived suppressor cells, programmed death receptor ligand 1/programmed death receptor 1, and soluble CD25 in Sokal high risk chronic myeloid leukemia. *PLoS ONE*. 2013;8(1):e55818.

Chu S, Li L, Singh H, Bhatia R. BCR-tyrosine 177 plays an essential role in Ras and Akt activation and in human hematopoietic progenitor transformation in chronic myelogenous leukemia. *Cancer Res.* 2007;67(14):7045-7053.

Cobas M, Wilson A, Ernst B, et al. Beta-catenin is dispensable for hematopoiesis and lymphopoiesis. *J Exp Med.* 2004;199(2):221-229.

Collins S, Groudine M. Amplification of endogenous myc-related DNA sequences in a human myeloid leukaemia cell line. *Nature.* 1982;298(5875):679-681.

Copland M, Hamilton A, Elrick LJ, et al. Dasatinib (BMS-354825) targets an earlier progenitor population than imatinib in primary CML but does not eliminate the quiescent fraction. *Blood.* 2006;107(11):4532-4539.

Cortes JE, Kantarjian HM, Brümmendorf TH, et al. Safety and efficacy of bosutinib (SKI-606) in chronic phase Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia patients with resistance or intolerance to imatinib. *Blood.* 2011;118(17):4567-4576.

Cortes JE, Kantarjian H, Shah NP, et al. Ponatinib in refractory Philadelphia chromosome-positive leukemias. *N Engl J Med.* 2012;367(22):2075-2088.

Cross NCP, White HE, Colomer D, et al. Laboratory recommendations for scoring deep molecular responses following treatment for chronic myeloid leukemia. *Leukemia.* 2015;29(5):999-1003.

Cross NCP, White HE, Müller MC, Saglio G, Hochhaus A. Standardized definitions of molecular response in chronic myeloid leukemia. *Leukemia.* 2012;26(10):2172-2175.

Crossman LC, Druker BJ, Deininger MWN, Pirmohamed M, Wang L, Clark RE. hOCT 1 and resistance to imatinib. *Blood.* 2005;106(3):1133-1134; author reply 1134.

Dai Y, Rahmani M, Corey SJ, Dent P, Grant S. A Bcr/Abl-independent, Lyn-dependent form of imatinib mesylate (STI-571) resistance is associated with altered expression of Bcl-2. *J Biol Chem.* 2004;279(33):34227-34239.

De Falco V, Buonocore P, Muthu M, et al. Ponatinib (AP24534) is a novel potent inhibitor of oncogenic RET mutants associated with thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(5):811.

Der SD, Zhou A, Williams BR, Silverman RH. Identification of genes differentially regulated by interferon alpha, beta, or gamma using oligonucleotide arrays. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(26):15623-15628.

Deriano L, Roth DB. Modernizing the nonhomologous end-joining repertoire: alternative and classical NHEJ share the stage. *Annu Rev Genet.* 2013;47:433-455.

Deutsch E, Dugray A, AbdulKarim B, et al. BCR-ABL down-regulates the DNA repair protein DNA-PKcs. *Blood.* 2001;97(7):2084-2090.

- Deutsch E, Jarrousse S, Buet D, et al. Down-regulation of BRCA1 in BCR-ABL-expressing hematopoietic cells. *Blood*. 2003;101(11):4583-4588.
- Di Paolo A, Polillo M, Capecchi M, et al. The c.480C>G polymorphism of hOCT1 influences imatinib clearance in patients affected by chronic myeloid leukemia. *Pharmacogenomics J*. 2014;14(4):328-335.
- Dierks C, Beigi R, Guo G, et al. Expansion of Bcr-Abl-positive leukemic stem cells is dependent on Hedgehog pathway activation. *Cancer Cell*. 2008;14(3):238-249.
- Dierov J, Dierova R, Carroll M. BCR/ABL translocates to the nucleus and disrupts an ATR-dependent intra-S phase checkpoint. *Cancer Cell*. 2004;5(3):275-285.
- Dimou M, Panayiotidis P. Tyrosine kinase inhibitors and interferon. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2014;6(1):e2014006.
- Dohse M, Scharenberg C, Shukla S, et al. Comparison of ATP-binding cassette transporter interactions with the tyrosine kinase inhibitors imatinib, nilotinib, and dasatinib. *Drug Metab Dispos*. 2010;38(8):1371-1380.
- Dos Santos C, McDonald T, Ho YW, et al. The Src and c-Kit kinase inhibitor dasatinib enhances p53-mediated targeting of human acute myeloid leukemia stem cells by chemotherapeutic agents. *Blood*. 2013;122(11):1900-1913.
- Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, et al. Effects of a selective inhibitor of the ABL1 tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat Med*. 1996;2(5):561-566.
- Eechoute K, Sparreboom A, Burger H, et al. Drug transporters and imatinib treatment: implications for clinical practice. *Clin Cancer Res*. 2011;17(3):406-415.
- Eiring AM, Khorashad JS, Anderson DJ, et al. β -Catenin is required for intrinsic but not extrinsic BCR-ABL1 kinase-independent resistance to tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2015;29(12):2328-2337.
- Eiring AM, Kraft IL, Page BD, O'Hare T, Gunning PT, Deininger MW. STAT3 as a mediator of BCR-ABL1-independent resistance in chronic myeloid leukemia. *Leuk Suppl*. 2014;3(Suppl 1):5.
- El Missiry M, Adnan Awad S, Rajala HL, et al. Assessment of bone marrow lymphocytic status during tyrosine kinase inhibitor therapy and its relation to therapy response in chronic myeloid leukaemia. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2016;142(5):1041-1050.
- Elder PT, McMullin MF, Humphreys MW, Hamilton J, McGrattan P. The finding of a reciprocal whole-arm translocation t(X;12)(p10;p10) in association with atypical chronic myeloid leukaemia. *Med Oncol*. 2010;27(3):760-762.
- Eley T, Luo FR, Agrawal S, et al. Phase I study of the effect of gastric acid pH modulators on the bioavailability of oral dasatinib in healthy subjects. *J Clin Pharmacol*. 2009;49(6):700-709.

Engler JR, Frede A, Saunders VA, Zannettino ACW, Hughes TP, White DL. Chronic myeloid leukemia CD34+ cells have reduced uptake of imatinib due to low OCT-1 activity. *Leukemia*. 2010;24(4):765-770.

Engler JR, Zannettino ACW, Bailey CG, Rasko JEJ, Hughes TP, White DL. OCT-1 function varies with cell lineage but is not influenced by BCR-ABL. *Haematologica*. 2011;96(2):213-220.

Feldhahn N, Arutyunyan A, Stoddart S, et al. Environment-mediated drug resistance in Bcr/Abl-positive acute lymphoblastic leukemia. *Oncoimmunology*. 2012;1(5):618-629.

Ferrao PT, Frost MJ, Siah S, Ashman LK. Overexpression of P-glycoprotein in K562 cells does not confer resistance to the growth inhibitory effects of imatinib (STI571) in vitro. *Blood*. 2003;102(13):4499-4503.

Gabert J, Beillard E, van der Velden, V. H. J., et al. Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia - a Europe Against Cancer program. *Leukemia*. 2003;17(12):2318-2357.

Gallipoli P, Cook A, Rhodes S, et al. JAK2/STAT5 inhibition by nilotinib with ruxolitinib contributes to the elimination of CML CD34+ cells in vitro and in vivo. *Blood*. 2014;124(9):1492-1501.

Gambacorti-Passerini C, Zucchetti M, Russo D, et al. Alpha1 acid glycoprotein binds to imatinib (STI571) and substantially alters its pharmacokinetics in chronic myeloid leukemia patients. *Clin Cancer Res*. 2003;9(2):625-632.

Gaymes TJ, Mufti GJ, Rassool FV. Myeloid leukemias have increased activity of the nonhomologous end-joining pathway and concomitant DNA misrepair that is dependent on the Ku70/86 heterodimer. *Cancer Res*. 2002;62(10):2791-2797.

Geissler J, Sharf G, Bombaci F, et al. Factors influencing adherence in CML and ways to improvement: Results of a patient-driven survey of 2546 patients in 63 countries. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2017;143(7):1167-1176.

Gerber JM, Qin L, Kowalski J, et al. Characterization of chronic myeloid leukemia stem cells. *Am J Hematol*. 2011;86(1):31-37.

Giannoudis A, Wang L, Jorgensen AL, et al. The hOCT1 SNPs M420del and M408V alter imatinib uptake and M420del modifies clinical outcome in imatinib-treated chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2013;121(4):628-637.

Gibbons DL, Pricl S, Posocco P, et al. Molecular dynamics reveal BCR-ABL1 polymutants as a unique mechanism of resistance to PAN-BCR-ABL1 kinase inhibitor therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(9):3550-3555.

Goldman JM, Melo JV. BCR-ABL in chronic myelogenous leukemia--how does it work? *Acta Haematol*. 2008;119(4):212-217.

Goldman JM, Melo JV. Chronic myeloid leukemia--advances in biology and new approaches to treatment. *N Engl J Med*. 2003;349(15):1451-1464.

Gorre ME, Mohammed M, Ellwood K, et al. Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science*. 2001;293(5531):876-880.

Gozgit JM, Wong MJ, Wardwell S, et al. Potent activity of ponatinib (AP24534) in models of FLT3-driven acute myeloid leukemia and other hematologic malignancies. *Mol Cancer Ther*. 2011;10(6):1028-1035.

Graham SM, Jørgensen HG, Allan E, et al. Primitive, quiescent, Philadelphia-positive stem cells from patients with chronic myeloid leukemia are insensitive to STI571 in vitro. *Blood*. 2002;99(1):319-325.

Griswold IJ, MacPartlin M, Bumm T, et al. Kinase domain mutants of Bcr-Abl exhibit altered transformation potency, kinase activity, and substrate utilization, irrespective of sensitivity to imatinib. *Mol Cell Biol*. 2006;26(16):6082-6093.

Guilhot F, Coombs J, Zernovak O, Szczudlo T, Rosti G. A Global Retrospective and Physician-Based Analysis of Adherence to Tyrosine Kinase Inhibitor (TKI) Therapies for Chronic Myeloid Leukemia (CML). *Blood*. 2010;116(21):1514-1514.

Hamada A, Miyano H, Watanabe H, Saito H. Interaction of imatinib mesilate with human P-glycoprotein. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003;307(2):824-828.

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.

Hantschel O. Structure, regulation, signaling, and targeting of ABL1 kinases in cancer. *Genes Cancer*. 2012;3(5-6):436-446.

Haouala A, Widmer N, Duchosal MA, Montemurro M, Buclin T, Decosterd LA. Drug interactions with the tyrosine kinase inhibitors imatinib, dasatinib, and nilotinib. *Blood*. 2011;117(8):75.

Hayashi Y, Nakamae H, Katayama T, et al. Different immunoprofiles in patients with chronic myeloid leukemia treated with imatinib, nilotinib or dasatinib. *Leuk Lymphoma*. 2012;53(6):1084-1089.

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):3951-3962.

Hochhaus A. Chronic myelogenous leukemia (CML): resistance to tyrosine kinase inhibitors. *Ann Oncol*. 2006;17 Suppl 10:274.

Hochhaus A, Baccarani M, Silver RT, et al. European LeukemiaNet 2020 recommendations for treating chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2020;34(4):966-984.

- 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(6):1054-1061.
- 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.
- Holyoake T, Jiang X, Eaves C, Eaves A. Isolation of a highly quiescent subpopulation of primitive leukemic cells in chronic myeloid leukemia. *Blood*. 1999;94(6):2056-2064.
- Holyoake TL, Vetrie D. The chronic myeloid leukemia stem cell: stemming the tide of persistence. *Blood*. 2017;129(12):1595-1606.
- Horita M, Andreu EJ, Benito A, et al. Blockade of the Bcr-Abl kinase activity induces apoptosis of chronic myelogenous leukemia cells by suppressing signal transducer and activator of transcription 5-dependent expression of Bcl-xL. *J Exp Med*. 2000;191(6):977-984.
- Howard SM, Yanez DA, Stark JM. DNA damage response factors from diverse pathways, including DNA crosslink repair, mediate alternative end joining. *PLoS Genet*. 2015;11(1):e1004943.
- Hughes A, Clarson J, Tang C, et al. CML patients with deep molecular responses to TKI have restored immune effectors and decreased PD-1 and immune suppressors. *Blood*. 2017;129(9):1166-1176.
- Hughes T, Branford S. Molecular monitoring of chronic myeloid leukemia. *Seminars in Hematology*. 2003;40:62-68.
- Hughes TP, Mauro MJ, Cortes JE, et al. Asciminib in Chronic Myeloid Leukemia after ABL1 Kinase Inhibitor Failure. *N Engl J Med*. 2019;381(24):2315-2326.
- Hughes T, Deininger M, Hochhaus A, et al. Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors: review and recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts and kinase domain mutations and for expressing results. *Blood*. 2006;108(1):28-37.
- Hurtz C, Hatzi K, Cerchietti L, et al. BCL6-mediated repression of p53 is critical for leukemia stem cell survival in chronic myeloid leukemia. *J Exp Med*. 2011;208(11):2163-2174.
- Ilander M, Koskenvesa P, Hernesniemi S, Lion T, Porkka K, Mustjoki S. Induction of sustained deep molecular response in a patient with chronic-phase T315I-mutated chronic myeloid leukemia with interferon- α monotherapy. *Leuk Lymphoma*. 2014;55(4):934-937.
- Irvine DA, Zhang B, Kinstrie R, et al. Deregulated hedgehog pathway signaling is inhibited by the smoothed antagonist LDE225 (Sonidegib) in chronic phase chronic myeloid leukaemia. *Sci Rep*. 2016;6:25476.

Itonaga H, Tsushima H, Hata T, et al. Successful treatment of a chronic-phase T-315I-mutated chronic myelogenous leukemia patient with a combination of imatinib and interferon-alfa. *Int J Hematol.* 2012;95(2):209-213.

Järås M, Johnels P, Hansen N, et al. Isolation and killing of candidate chronic myeloid leukemia stem cells by antibody targeting of IL-1 receptor accessory protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(37):16280-16285.

Jaruskova M, Curik N, Hercog R, et al. 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.

Johansson B, Fioretos T, Mitelman F. Cytogenetic and molecular genetic evolution of chronic myeloid leukemia. *Acta Haematol.* 2002;107(2):76-94.

Jørgensen HG, Allan EK, Jordanides NE, Mountford JC, Holyoake TL. Nilotinib exerts equipotent antiproliferative effects to imatinib and does not induce apoptosis in CD34+ CML cells. *Blood.* 2007;109(9):4016-4019.

Juliano RL, Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta.* 1976;455(1):152-162.

Kalmanti L, Saussele S, Lauseker M, et al. Safety and efficacy of imatinib in CML over a period of 10 years: data from the randomized CML-study IV. *Leukemia.* 2015;29(5):1123-1132.

Kanodia S, Wieder E, Lu S, et al. PR1-specific T cells are associated with unmaintained cytogenetic remission of chronic myelogenous leukemia after interferon withdrawal. *PLoS ONE.* 2010;5(7):e11770.

Kantarjian HM, Talpaz M, Giles F, O'Brien S, Cortes J. New insights into the pathophysiology of chronic myeloid leukemia and imatinib resistance. *Ann Intern Med.* 2006;145(12):913-923.

Kantarjian H, Sawyers C, Hochhaus A, et al. Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia. *N Engl J Med.* 2002;346(9):645-652.

Kim DH, Kamel-Reid S, Chang H, et al. Natural killer or natural killer/T cell lineage large granular lymphocytosis associated with dasatinib therapy for Philadelphia chromosome positive leukemia. *Haematologica.* 2009;94(1):135-139.

Kim EMH, Mueller K, Gartner E, Boerner J. Dasatinib is synergistic with cetuximab and cisplatin in triple-negative breast cancer cells. *J Surg Res.* 2013;185(1):231-239.

Kim JH, Chu SC, Gramlich JL, et al. Activation of the PI3K/mTOR pathway by BCR-ABL contributes to increased production of reactive oxygen species. *Blood.* 2005;105(4):1717-1723.

- Kim T, Tyndel MS, Kim HJ, et al. Spectrum of somatic mutation dynamics in chronic myeloid leukemia following tyrosine kinase inhibitor therapy. *Blood*. 2017;129(1):38-47.
- Kim Y, Lee S, Jeong S, et al. OCT-1, ABCB1, and ABCG2 Expression in Imatinib-Resistant Chronic Myeloid Leukemia Treated with Dasatinib or Nilotinib. *Chonnam Med J*. 2014;50(3):102-111.
- Koepsell H, Lips K, Volk C. Polyspecific organic cation transporters: structure, function, physiological roles, and biopharmaceutical implications. *Pharm Res*. 2007;24(7):1227-1251.
- Kohlmann A, Grossmann V, Nadarajah N, Haferlach T. Next-generation sequencing - feasibility and practicality in haematology. *Br J Haematol*. 2013;160(6):736-753.
- Kopanos C, Tsiolkas V, Kouris A, et al. VarSome: the human genomic variant search engine. *Bioinformatics*. 2019;35(11):1978-1980.
- Koptyra M, Falinski R, Nowicki MO, et al. BCR/ABL kinase induces self-mutagenesis via reactive oxygen species to encode imatinib resistance. *Blood*. 2006;108(1):319-327.
- Kreutzman A, Rohon P, Faber E, et al. Chronic myeloid leukemia patients in prolonged remission following interferon- α monotherapy have distinct cytokine and oligoclonal lymphocyte profile. *PLoS ONE*. 2011;6(8):e23022.
- Kubonishi I, Miyoshi I. Establishment of a Ph1 chromosome-positive cell line from chronic myelogenous leukemia in blast crisis. *Int J Cell Cloning*. 1983;1(2):105-117.
- Kujawski LA, Talpaz M. The role of interferon-alpha in the treatment of chronic myeloid leukemia. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2007;18(5-6):459-471.
- Kuriyama K, Gale RP, Tomonaga M, et al. CML-T1: a cell line derived from T-lymphocyte acute phase of chronic myelogenous leukemia. *Blood*. 1989;74(4):1381-1387.
- Larghero J, Leguay T, Mourah S, et al. Relationship between elevated levels of the alpha 1 acid glycoprotein in chronic myelogenous leukemia in blast crisis and pharmacological resistance to imatinib (Gleevec) in vitro and in vivo. *Biochem Pharmacol*. 2003;66(10):1907-1913.
- Li L, Bhatia R. Role of SIRT1 in the growth and regulation of normal hematopoietic and leukemia stem cells. *Curr Opin Hematol*. 2015;22(4):324-329.
- Li L, Wang L, Li L, et al. Activation of p53 by SIRT1 inhibition enhances elimination of CML leukemia stem cells in combination with imatinib. *Cancer Cell*. 2012;21(2):266-281.
- Limpose KL, Corbett AH, Doetsch PW. BERing the burden of damage: Pathway crosstalk and posttranslational modification of base excision repair proteins regulate DNA damage management. *DNA Repair (Amst)*. 2017;56:51-64.

Lozzio CB, Lozzio BB. Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood*. 1975;45(3):321-334.

Machova Polakova K, Kulvait V, Benesova A, et al. 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):887-899.

Mahon F, Belloc F, Lagarde V, et al. MDR1 gene overexpression confers resistance to imatinib mesylate in leukemia cell line models. *Blood*. 2003;101(6):2368-2373.

Mahon F, Réa D, Guilhot J, et al. Discontinuation of imatinib in patients with chronic myeloid leukaemia who have maintained complete molecular remission for at least 2 years: the prospective, multicentre Stop Imatinib (STIM) trial. *Lancet Oncol*. 2010;11(11):1029-1035.

Marin D, Bazeos A, Mahon F, et al. Adherence is the critical factor for achieving molecular responses in patients with chronic myeloid leukemia who achieve complete cytogenetic responses on imatinib. *J Clin Oncol*. 2010;28(14):2381-2388.

Matsuo Y, MacLeod RA, Uphoff CC, et al. Two acute monocytic leukemia (AML-M5a) cell lines (MOLM-13 and MOLM-14) with interclonal phenotypic heterogeneity showing MLL-AF9 fusion resulting from an occult chromosome insertion, ins(11;9)(q23;p22p23). *Leukemia*. 1997;11(9):1469-1477.

Melo JV, Barnes DJ. Chronic myeloid leukaemia as a model of disease evolution in human cancer. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(6):441-453.

Modi H, Li L, Chu S, Rossi J, Yee J-, Bhatia R. Inhibition of Grb2 expression demonstrates an important role in BCR-ABL-mediated MAPK activation and transformation of primary human hematopoietic cells. *Leukemia*. 2011;25(2):305-312.

Molldrem JJ, Lee PP, Wang C, et al. Evidence that specific T lymphocytes may participate in the elimination of chronic myelogenous leukemia. *Nat Med*. 2000;6(9):1018-1023.

Moon RT, Kohn AD, De Ferrari GV, Kaykas A. WNT and beta-catenin signalling: diseases and therapies. *Nat Rev Genet*. 2004;5(9):691-701.

Moravcová J, Rulcová J, Poláková KM, Klamová H. Control genes in international standardization of real-time RT-PCR for BCR-ABL. *Leuk Res*. 2009;33(4):582-584.

Müller MC, Cross NCP, Erben P, et al. Harmonization of molecular monitoring of CML therapy in Europe. *Leukemia*. 2009;23(11):1957-1963.

Mustjoki S, Auvinen K, Kreutzman A, et al. Rapid mobilization of cytotoxic lymphocytes induced by dasatinib therapy. *Leukemia*. 2013;27(4):914-924.

Muvarak N, Kelley S, Robert C, et al. c-MYC Generates Repair Errors via Increased Transcription of Alternative-NHEJ Factors, LIG3 and PARP1, in Tyrosine Kinase-Activated Leukemias. *Mol Cancer Res.* 2015a;13(4):699-712.

Nagata Y, Ohashi K, Fukuda S, Kamata N, Akiyama H, Sakamaki H. Clinical features of dasatinib-induced large granular lymphocytosis and pleural effusion. *Int J Hematol.* 2010;91(5):799-807.

Nakagawa T, Matozaki S. The SKM-1 leukemic cell line established from a patient with progression to myelomonocytic leukemia in myelodysplastic syndrome (MDS)-contribution to better understanding of MDS. *Leuk Lymphoma.* 1995;17(3-4):335-339.

Nowell PC, Hungerford DA. Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. *J Natl Cancer Inst.* 1960;25:85-109.

Nowicki MO, Falinski R, Koptyra M, et al. BCR/ABL oncogenic kinase promotes unfaithful repair of the reactive oxygen species-dependent DNA double-strand breaks. *Blood.* 2004;104(12):3746-3753.

O'Hare T, Shakespeare WC, Zhu X, et al. AP24534, a pan-BCR-ABL inhibitor for chronic myeloid leukemia, potently inhibits the T315I mutant and overcomes mutation-based resistance. *Cancer Cell.* 2009;16(5):401-412.

O'Hare T, Zabriskie MS, Eiring AM, Deininger MW. Pushing the limits of targeted therapy in chronic myeloid leukaemia. *Nat Rev Cancer.* 2012;12(8):513-526.

Ott PA, Hodi FS, Robert C. CTLA-4 and PD-1/PD-L1 blockade: new immunotherapeutic modalities with durable clinical benefit in melanoma patients. *Clin Cancer Res.* 2013;19(19):5300-5309.

Paquette RL, Hsu N, Said J, et al. Interferon-alpha induces dendritic cell differentiation of CML mononuclear cells in vitro and in vivo. *Leukemia.* 2002;16(8):1484-1489.

Park SH, Park C, Kim D, et al. MRP1 and P-glycoprotein expression assays would be useful in the additional detection of treatment non-responders in CML patients without ABL1 mutation. *Leuk Res.* 2015;39(10):1109-1116.

Parker WT, Lawrence RM, Ho M, et al. Sensitive detection of BCR-ABL1 mutations in patients with chronic myeloid leukemia after imatinib resistance is predictive of outcome during subsequent therapy. *J Clin Oncol.* 2011;29(32):4250-4259.

Pellicano F, Scott MT, Helgason GV, et al. The antiproliferative activity of kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia cells is mediated by FOXO transcription factors. *Stem Cells.* 2014;32(9):2324-2337.

Peng B, Lloyd P, Schran H. Clinical pharmacokinetics of imatinib. *Clin Pharmacokinet.* 2005;44(9):879-894.

Peschel C, Aulitzky WE, Huber C. Influence of interferon-alpha on cytokine expression by the bone marrow microenvironment--impact on treatment of myeloproliferative disorders. *Leuk Lymphoma*. 1996;22 Suppl 1:129-134.

Pitini V, Arrigo C, Di Mirto C, Mondello P, Altavilla G. Response to dasatinib in a patient with SQCC of the lung harboring a discoid-receptor-2 and synchronous chronic myelogenous leukemia. *Lung Cancer*. 2013;82(1):171-172.

Poláková KM, Polívková V, Rulcová J, et al. 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):20-26.

Prost S, Relouzat F, Spentchian M, et al. Erosion of the chronic myeloid leukaemia stem cell pool by PPAR γ agonists. *Nature*. 2015;525(7569):380-383.

Racil Z, Razga F, Polakova KM, et al. Assessment of adenosine triphosphate-binding cassette subfamily B member 1 (ABCB1) mRNA expression in patients with de novo chronic myelogenous leukemia: the role of different cell types. *Leuk Lymphoma*. 2011;52(2):331-334.

Radich JP, Dai H, Mao M, et al. Gene expression changes associated with progression and response in chronic myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(8):2794-2799.

Rajendran V, Gopalakrishnan C, Sethumadhavan R. Pathological role of a point mutation (T315I) in BCR-ABL1 protein-A computational insight. *J Cell Biochem*. 2018;119(1):918-925.

Redaelli S, Piazza R, Rostagno R, et al. Activity of bosutinib, dasatinib, and nilotinib against 18 imatinib-resistant BCR/ABL mutants. *J Clin Oncol*. 2009;27(3):469-471.

Roche-Lestienne C, Soenen-Cornu V, Grardel-Duflos N, et al. Several types of mutations of the ABL1 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(3):1014-1018.

Ross DM, Branford S, Seymour JF, et al. Safety and efficacy of imatinib cessation for CML patients with stable undetectable minimal residual disease: results from the TWISTER study. *Blood*. 2013;122(4):515-522.

Ross DD, Doyle LA. Mining our ABCs: pharmacogenomic approach for evaluating transporter function in cancer drug resistance. *Cancer Cell*. 2004;6(2):105-107.

Rosignol A, Levescot A, Jacomet F, et al. Evidence for BCR-ABL-dependent dysfunctions of iNKT cells from chronic myeloid leukemia patients. *Eur J Immunol*. 2012;42(7):1870-1875.

Rowley JD. Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature*. 1973;243(5405):290-293.

Rulcová J, Zmeková V, Zemanová Z, Klamová H, Moravcová J. The effect of total-ABL, GUS and B2M control genes on BCR-ABL monitoring by real-time RT-PCR. *Leuk Res.* 2007;31(4):483-491.

Sadovnik I, Herrmann H, Eisenwort G, et al. Expression of CD25 on leukemic stem cells in BCR-ABL1+ CML: Potential diagnostic value and functional implications. *Exp Hematol.* 2017;51:17-24.

Sallmyr A, Tomkinson AE, Rassool FV. Up-regulation of WRN and DNA ligase IIIalpha in chronic myeloid leukemia: consequences for the repair of DNA double-strand breaks. *Blood.* 2008;112(4):1413-1423.

Samanta AK, Chakraborty SN, Wang Y, et al. Jak2 inhibition deactivates Lyn kinase through the SET-PP2A-SHP1 pathway, causing apoptosis in drug-resistant cells from chronic myelogenous leukemia patients. *Oncogene.* 2009;28(14):1669-1681.

Samanta A, Perazzona B, Chakraborty S, et al. Janus kinase 2 regulates Bcr-Abl signaling in chronic myeloid leukemia. *Leukemia.* 2011;25(3):463-472.

Sattler M, Mohi MG, Pride YB, et al. Critical role for Gab2 in transformation by BCR/ABL. *Cancer Cell.* 2002;1(5):479-492.

Saussele S, Richter J, Guilhot J, et al. Discontinuation of tyrosine kinase inhibitor therapy in chronic myeloid leukaemia (EURO-SKI): a prespecified interim analysis of a prospective, multicentre, non-randomised, trial. *Lancet Oncol.* 2018;19(6):747-757.

Schindler T, Bornmann W, Pellicena P, Miller WT, Clarkson B, Kuriyan J. Structural mechanism for STI-571 inhibition of abelson tyrosine kinase. *Science.* 2000;289(5486):1938-1942.

Schmidt M, Rinke J, Schäfer V, et al. Molecular-defined clonal evolution in patients with chronic myeloid leukemia independent of the BCR-ABL status. *Leukemia.* 2014;28(12):2292-2299.

Schmitt MW, Pritchard JR, Leighow SM, et al. Single-Molecule Sequencing Reveals Patterns of Preexisting Drug Resistance That Suggest Treatment Strategies in Philadelphia-Positive Leukemias. *Clin Cancer Res.* 2018;24(21):5321-5334.

Schoch C, Haferlach T, Kern W, et al. Occurrence of additional chromosome aberrations in chronic myeloid leukemia patients treated with imatinib mesylate. *Leukemia.* 2003;17(2):461-463.

Schütz C, Inselmann S, Saussele S, et al. Expression of the CTLA-4 ligand CD86 on plasmacytoid dendritic cells (pDC) predicts risk of disease recurrence after treatment discontinuation in CML. *Leukemia.* 2018;32(4):1054.

Shah NP, Nicoll JM, Nagar B, et al. Multiple BCR-ABL kinase domain mutations confer polyclonal resistance to the tyrosine kinase inhibitor imatinib (STI571) in chronic phase and blast crisis chronic myeloid leukemia. *Cancer Cell.* 2002;2(2):117-125.

Shaul Y, Ben-Yehoyada M. Role of c-Abl in the DNA damage stress response. *Cell Res.* 2005;15(1):33-35.

Shi M, Lou B, Ji J, et al. Synergistic antitumor effects of dasatinib and oxaliplatin in gastric cancer cells. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2013;72(1):35-44.

Shukla S, Sauna ZE, Ambudkar SV. Evidence for the interaction of imatinib at the transport-substrate site(s) of the multidrug-resistance-linked ABC drug transporters ABCB1 (P-glycoprotein) and ABCG2. *Leukemia.* 2008;22(2):445-447.

Simsek D, Brunet E, Wong SY, et al. DNA ligase III promotes alternative nonhomologous end-joining during chromosomal translocation formation. *PLoS Genet.* 2011;7(6):e1002080.

Skaggs BJ, Gorre ME, Ryzkin A, et al. Phosphorylation of the ATP-binding loop directs oncogenicity of drug-resistant BCR-ABL mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(51):19466-19471.

Skorski T, Bellacosa A, Nieborowska-Skorska M, et al. Transformation of hematopoietic cells by BCR/ABL requires activation of a PI-3k/Akt-dependent pathway. *EMBO J.* 1997;16(20):6151-6161.

Slupianek A, Schmutte C, Tomblin G, et al. BCR/ABL regulates mammalian RecA homologs, resulting in drug resistance. *Mol Cell.* 2001;8(4):795-806.

Soverini S, Branford S, Nicolini FE, et al. Implications of BCR-ABL1 kinase domain-mediated resistance in chronic myeloid leukemia. *Leuk Res.* 2014;38(1):10-20.

Soverini S, Colarossi S, Gnani A, et al. Contribution of ABL1 kinase domain mutations to imatinib resistance in different subsets of Philadelphia-positive patients: by the GIMEMA Working Party on Chronic Myeloid Leukemia. *Clin Cancer Res.* 2006;12(24):7374-7379.

Soverini S, De Benedittis C, Machova Polakova K, et al. Unraveling the complexity of tyrosine kinase inhibitor-resistant populations by ultra-deep sequencing of the BCR-ABL kinase domain. *Blood.* 2013;122(9):1634-1648.

Soverini S, de Benedittis C, Mancini M, Martinelli G. Mutations in the BCR-ABL1 Kinase Domain and Elsewhere in Chronic Myeloid Leukemia. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* 2015;15 Suppl:120.

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(5):1208-1215.

Talpaz M, Mercer J, Hehlmann R. The interferon-alpha revival in CML. *Ann Hematol.* 2015;94 Suppl 2:195.

Thomas J, Wang L, Clark RE, Pirmohamed M. Active transport of imatinib into and out of cells: implications for drug resistance. *Blood*. 2004;104(12):3739-3745.

Tobin LA, Robert C, Rapoport AP, et al. Targeting abnormal DNA double strand break repair in tyrosine kinase inhibitor-resistant chronic myeloid leukemias. *Oncogene*. 2013;32(14):1784-1793.

Tokarski JS, Newitt JA, Chang CYJ, et al. The structure of Dasatinib (BMS-354825) bound to activated ABL1 kinase domain elucidates its inhibitory activity against imatinib-resistant ABL1 mutants. *Cancer Res*. 2006;66(11):5790-5797.

Tsuji-Takayama K, Kamiya T, Nakamura S, et al. Establishment of multiple leukemia cell lines with diverse myeloid and/or megakaryoblastoid characteristics from a single Ph1 positive chronic myelogenous leukemia blood sample. *Hum Cell*. 1994;7(3):167-171.

Tym JE, Mitsopoulos C, Coker EA, et al. canSAR: an updated cancer research and drug discovery knowledgebase. *Nucleic Acids Res*. 2016;44(D1):D938-D943.

Vakana E, Arslan AD, Szilard A, Altman JK, Platanias LC. Regulatory effects of sestrin 3 (SESN3) in BCR-ABL expressing cells. *PLoS ONE*. 2013;8(11):e78780.

Vasconcelos FC, Silva KL, Souza PSd, et al. Variation of MDR proteins expression and activity levels according to clinical status and evolution of CML patients. *Cytometry B Clin Cytom*. 2011;80(3):158-166.

Vianello F, Villanova F, Tisato V, et al. Bone marrow mesenchymal stromal cells non-selectively protect chronic myeloid leukemia cells from imatinib-induced apoptosis via the CXCR4/CXCL12 axis. *Haematologica*. 2010;95(7):1081-1089.

Wagle M, Eiring AM, Wongchenko M, et al. A role for FOXO1 in BCR-ABL1-independent tyrosine kinase inhibitor resistance in chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2016;30(7):1493-1501.

Wang L, Giannoudis A, Lane S, Williamson P, Pirmohamed M, Clark RE. Expression of the uptake drug transporter hOCT1 is an important clinical determinant of the response to imatinib in chronic myeloid leukemia. *Clin Pharmacol Ther*. 2008;83(2):258-264.

Wang Z, Yuan H, Roth M, Stark JM, Bhatia R, Chen WY. SIRT1 deacetylase promotes acquisition of genetic mutations for drug resistance in CML cells. *Oncogene*. 2013;32(5):589-598.

Wang Z, Liu Z, Wu X, et al. ATRA-induced cellular differentiation and CD38 expression inhibits acquisition of BCR-ABL mutations for CML acquired resistance. *PLoS Genet*. 2014;10(6):e1004414.

Watkins DB, Hughes TP, White DL. OCT1 and imatinib transport in CML: is it clinically relevant? *Leukemia*. 2015;29(10):1960-1969.

Weisberg E, Manley PW, Breitenstein W, et al. Characterization of AMN107, a selective inhibitor of native and mutant Bcr-Abl. *Cancer Cell*. 2005;7(2):129-141.

White DL, Dang P, Engler J, et al. Functional activity of the OCT-1 protein is predictive of long-term outcome in patients with chronic-phase chronic myeloid leukemia treated with imatinib. *J Clin Oncol*. 2010;28(16):2761-2767.

White DL, Saunders VA, Dang P, et al. Most CML patients who have a suboptimal response to imatinib have low OCT-1 activity: higher doses of imatinib may overcome the negative impact of low OCT-1 activity. *Blood*. 2007;110(12):4064-4072.

White DL, Saunders VA, Dang P, et al. OCT-1-mediated influx is a key determinant of the intracellular uptake of imatinib but not nilotinib (AMN107): reduced OCT-1 activity is the cause of low in vitro sensitivity to imatinib. *Blood*. 2006;108(2):697-704.

Widmer N, Colombo S, Buclin T, Decosterd LA. Functional consequence of MDR1 expression on imatinib intracellular concentrations. *Blood*. 2003;102(3):1142.

Willis SG, Lange T, Demehri S, et al. High-sensitivity detection of BCR-ABL kinase domain mutations in imatinib-naive patients: correlation with clonal cytogenetic evolution but not response to therapy. *Blood*. 2005;106(6):2128-2137.

Winn AN, Keating NL, Dusetzina SB. Factors Associated With Tyrosine Kinase Inhibitor Initiation and Adherence Among Medicare Beneficiaries With Chronic Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol*. 2016;34(36):4323-4328.

Wisniewski D, Affer M, Willshire J, Clarkson B. Further phenotypic characterization of the primitive lineage- CD34+CD38-CD90+CD45RA- hematopoietic stem cell/progenitor cell sub-population isolated from cord blood, mobilized peripheral blood and patients with chronic myelogenous leukemia. *Blood Cancer J*. 2011;1(9):e36.

Yuan H, Wang Z, Gao C, et al. BCR-ABL gene expression is required for its mutations in a novel KCL-22 cell culture model for acquired resistance of chronic myelogenous leukemia. *J Biol Chem*. 2010;285(7):5085-5096.

Yuan H, Wang Z, Li L, et al. Activation of stress response gene SIRT1 by BCR-ABL promotes leukemogenesis. *Blood*. 2012;119(8):1904-1914.

Zabriskie MS, Eide CA, Tantravahi SK, et al. BCR-ABL1 compound mutations combining key kinase domain positions confer clinical resistance to ponatinib in Ph chromosome-positive leukemia. *Cancer Cell*. 2014;26(3):428-442.

Zaccaria A, Testoni N, Valenti AM, et al. Chromosome abnormalities additional to the Philadelphia chromosome at the diagnosis of chronic myelogenous leukemia: pathogenetic and prognostic implications. *Cancer Genet Cytogenet*. 2010;199(2):76-80.

Zhang H, Liang Z, Hu Y, Wang X, Wang B, Huang H. The effectiveness of interferon- γ combined with imatinib in patient with chronic myeloid leukemia harboring T315I BCR-ABL1 mutation. *Leuk Lymphoma*. 2018;59(12):3018-3019.

Zhang WW, Cortes JE, Yao H, et al. Predictors of primary imatinib resistance in chronic myelogenous leukemia are distinct from those in secondary imatinib resistance. *J Clin Oncol*. 2009;27(22):3642-3649.

Zhao C, Blum J, Chen A, et al. Loss of beta-catenin impairs the renewal of normal and CML stem cells in vivo. *Cancer Cell*. 2007;12(6):528-541.

Zhao C, Chen A, Jamieson CH, et al. Hedgehog signalling is essential for maintenance of cancer stem cells in myeloid leukaemia. *Nature*. 2009;458(7239):776-779.

9 Seznam příloh

Příloha 1

Seznam 128 genů analyzovaných pomocí RT² Profiler™ PCR Array Human DNA Damage Signaling Pathway a RT² Profiler™ PCR Array Human DNA Repair

Příloha 2

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.

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.

PLoS One. 2016 May 23;11(5):e0155959. IF- 2,8

Příloha 3

The predictive value of human organic cation transporter 1 and ABCB1 expression levels in different cell populations of patients with de novo chronic myelogenous leukemia.

Razga F, Racil Z, Machova Polakova K, Buresova L, Klamova H, Zackova D, Dvorakova D, Polivkova V, Cetkovsky P, Mayer J.

Int J Hematol. 2011 Sep;94(3):303-6. IF- 2,3

Příloha 4

Assessment of adenosine triphosphate-binding cassette subfamily B member 1 (ABCB1) mRNA expression in patients with de novo chronic myelogenous leukemia: the role of different cell types.

Racil Z, Razga F, Polakova KM, Buresova L, Polivkova V, Dvorakova D, Zackova D, Klamova H, Cetkovsky P, Mayer J.

Leuk Lymphoma. 2010 Feb;52(2):331-4. IF – 2,7

Příloha 5

Prohlášení o podílech na výsledcích dizertační práce a publikacích