

**Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra fyziologie**



Diplomová práce

Molekulární charakteristika nových variant BCR/ABL kinázové domény u pacientů s chronickou myeloidní leukémií

Bc. Lucie Dvořáková

Praha, 2011

Vedoucí diplomové práce : MUDr. Soňa Peková, PhD
(Laboratoř molekulární diagnostiky, CHAMBON)

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně, jen s použitím citované literatury a pod vedením příslušného vedoucího diplomové práce

4.5. 2011

Bc. Lucie Dvořáková

Poděkování

Ráda bych poděkovala svojí školitelce, MUDr. Soně Pekové, PhD za vedení při psaní této diplomové práce.

Poděkování patří též RNDr. Radku Čmejlovi, Ph.D, za mnoho cenných rad a odborných připomínek, bez kterých by tato práce nemohla vzniknout, RNDr. Renatě Haugvicové, CSc a Mgr. Oldřichu Mazalovi za pomoc při vypracování experimentální části diplomové práce.

Zároveň bych chtěla poděkovat celému kolektivu Laboratoře molekulární diagnostiky za podporu při vypracování této práce.

Abstrakt

BCR/ABL je konstitutivně aktivní tyrozin kináza, jež je příčinou vzniku chronické myeloidní leukemie (CML), a přibližně 30% akutních lymfoblastických leukemií. S nedávným uvedením tyrozin kinázových inhibitorů (TKI), představovaných Imatinibem, Nilotinibem, Dasatinibem, Bosutinibem, se pacienti s Ph+ CML a ALL stali kandidáty pro tento typ terapie. Z dostupných TKI představuje Imatinib první linii léčby pro CML pacienty v chronické fázi, zatímco u Ph+ ALL pacientů jsou za účinnější volbu považovány TKI druhé generace (Nilotinib, Dasatinib, Bosutinib)

Jelikož je léčba TKI prakticky celoživotní, může se u značné části pacientů objevit rezistence, jež je zapříčiněna různým typem mutací v BCR/ABL kinázové doméně. K dnešnímu dni je identifikováno přes devadesát mutací kinázové domény, ovlivňujících přes 50 AMK. Opakovaně se vyskytující mutace byly také testovány *in vitro* pro stanovení svých *in vivo* vlastností.

Naším cílem je vyvinout *in vitro* metodiku, která by umožňovala testování sensitivity nových BCR/ABL mutací, identifikovaných již na nízké hladině MRN, k nyní terapeuticky využívaným TKI. Pro tento záměr jsme využili technik místně cílené mutagenese, abychom *in vitro* vytvořili nové BCR/ABL varianty. Příprava a selekce stabilních klonů Ba/F3 buněk byla provedena transdukcí retrovirovými konstrukty, nesoucími transgen s jednotlivými variantami BCR/ABL. Tyto buněčné linie byly následně testovány na svou citlivost vůči TKI.

Včasná informace o charakteru mutace BCR/ABL kinázové domény a jejím biologickém významu může být pro kliniku nesmírně důležitou při rozhodování o úpravě či změně léčby. Doufáme, že úspěch našeho testování by mohl být dalším krokem, vedoucím k personalizované, pacientům přizpůsobené medicíně.

Klíčová slova: Chronická myeloidní leukémie, Ph chromozom, BCR/ABL, Tyrozin kinázové inhibitory

Abstract

BCR/ABL is a constitutively active tyrosine kinase that has been shown to be at the heart of the development of chronic myeloid leukemia (CML) and about 30% of acute lymphoblastic leukemia (ALL). With the recent advent of tyrosine kinase inhibitors (TKIs), exemplified by Imatinib, Nilotinib, Dasatinib and Bosutinib, patients with Ph+ CML or ALL are candidates for the therapy with these agents. From the available TKIs, Imatinib is considered as front-line therapy for CML patients in chronic phase, while for Ph+ ALL patients, 2nd generation TKIs (nilotinib, dasatinib, bosutinib) might be considered as more effective therapeutic option. Since the treatment with TKIs is a long-term affair, a substantial proportion of patients acquire some sort of mutation in kinase domain of BCR-ABL, which could be a reason of treatment failure.

To date, over ninety BCR/ABL kinase domain mutations have been identified, affecting over 50 amino acids. Recurrent BCR/ABL kinase domain mutations have already been in vitro tested to approximate for their in vivo behavior.

Our goal is to invent in vitro technique that would allow testing TKI sensitivity of novel BCR/ABL kinase domain mutations, identified at very low MRD levels. The technique makes use of site-directed mutagenesis to create the novel BCR/ABL kinase domain variants in vitro, preparation and selection of stable clones of Ba/F3 cells transduced with retroviral constructs harboring the transgene and tests of their in vitro response to a panel of TKIs.

Timely information on the BCR/ABL kinase domain mutational status and its biological relevance might prove valuable for the clinical hematologist in their clinical decision making in respect to the treatment modulation and adjustment. Thus, we believe that this approach is just another step on the way to personalized, patient-tailored medicine, which in the future should be the ultimate goal for the molecular medicine.

Keywords: Chronic myeloid leukemia, Ph chromosome, BCR/ABL, Tyrosine kinase inhibitors

Obsah

1. Úvod.....	8
2. Literární přehled	9
2.1 Leukémie	9
2.1.1 Myeloproliferativní nemoci	10
2.2 Chronická myeloidní leukemie (CML).....	11
2.2.1 Fáze CML a klinický obraz	11
2.2.2 Diagnostika	12
2.2.2.1 Laboratorní vyšetření	12
2.2.2.2 Diferenciální diagnostika	12
2.2.2.3 Cytologická vyšetření kostní dřeně.....	13
2.2.2.4 Cytogenetika a molekulární genetika	13
2.2.2.4.1 Klasické cytogenetické vyšetření.....	14
2.2.2.4.2 Cytogenetické nálezy u CML	14
2.2.2.4.3 Molekulární genetika	15
2.2.3 BCR/ABL onkogen.....	16
2.2.3.1 Varianty chimérického genu BCR/ABL.....	18
2.2.4 Modely pro studium CML	19
2.2.4.1 Myší model	19
2.2.4.2 Buněčné linie	20
2.2.5 BCR/ABL zprostředkovaná maligní transformace.....	20
2.2.6 Terapie CML.....	23
2.2.6.1 Transplantace	23
2.2.6.2 Cytostatická chemoterapeutika	24
2.2.6.3 Léčba interferonem IFN- α	25
2.2.6.4 Tyrozin kinázové inhibitory.....	26
2.2.6.4.1 Imatinib.....	26
2.2.6.4.2 Nilotinib	29
2.2.6.4.3 Dasatinib	30
2.2.6.4.4 Bosutinib.....	31
2.2.6.4.5 Inhibitory Aurora kinázy	32
2.2.7 Mutace v BCR/ABL	33
2.2.7.1 Mutace v oblasti P-smyčky.....	35
2.2.7.2 Mutace v místě kontaktu BCR/ABL s Imatinibem.....	35
2.2.7.3 Mutace katalytické domény a A-smyčky.....	36
2.2.8 In vitro testování mutací	36
2.2.9 Detekce Mutací v BCR/ABL kinázové doméně.....	37
3. Cíle práce	39
4. Materiál a Metody.....	40
4.1 Místně cílená mutageneza.....	41
4.2 Transformace pMig hBCR/mABL-EGFP do kompetentních buněk.....	44
4.3 Příprava stabilních klonů	46
4.4 Měření proliferace Ba/F3-pMIG hBCR/mABL- EGFP s TKI.....	46
5. Výsledky	49
5.1 Senzitivita buněčných linií k TKI	52
6. Diskuze	54
8. Závěr	57
9. Seznam citované literatury.....	58

Seznam zkratk

CML	Chronická myeloidní leukémie
ALL	Akutní lymfoblastická leukémie
AML	Akutní myeloidní leukémie
ET	Esenciální trombocytémie
PV	Polycytemia vera
IM	Idiopatická myelofibróza
Ph chromozom	Philadelphský chromozom
CP	Chronická fáze
AP	Akutní fáze
BC	Blastická krize
TKI	Tyrozín kinázové inhibitory
KD	Kinázová doména
MRN (MRD)	Minimální residuální nemoc
AMK	Aminokyseliny
Wt	Wild type
WHO	World hematology organization

1. Úvod

Chronická myeloidní leukémie (CML) je jednou z nejčastěji se vyskytujících leukémií u dospělých pacientů, u nichž představuje přibližně 20% všech hematologických onemocnění. Jedná se o klonální myeloproliferativní onemocnění, vycházející z abnormální pluripotentní kmenové buňky. Z této kmenové leukemické buňky jsou odvozena zralejší stadia granulocytů, se zachovanou schopností diferenciací.

V 90% případů výskytu onemocnění je v buňkách přítomen tzv. Philadelphský (Ph) chromozom, jenž je výsledkem reciproké translokace chromozomů 9 a 22. Touto translokací vzniká chimérický gen BCR/ABL, jeho formy se mohou lišit v závislosti na umístění zlomu. Kromě dominantního výskytu u CML je Ph chromozom nalézán v menší míře i u akutní lymfoblastické a akutní myeloidní leukémie.

Produktem chimérického genu je fúzní protein, jenž si zachovává kinázovou aktivitu původní kinázy Abl, která však nyní není pod vlivem regulace a kontinuálně stimuluje buněčnou proliferaci, potlačuje apoptózu a mění adhezi buněk vůči stromatu. Zároveň blokuje buněčnou diferenciaci a tím i přirozené odstraňování buněk z oběhu.

Historicky hrála primární léčebnou úlohu alogenní transplantace kostní dřeně v kombinaci s chemoterapií, zejména se zastoupením hydroxyurey a interferonu α . Tyto postupy byly však již nahrazeny cílenými léčivými – inhibitory tyrozinových kináz (TKI). Do klinické praxe na počátku 21. století vstoupil jako první Imatinib a o několik let později i tzv. inhibitory druhé generace. Jejich vývoj byl vynucen nárůstem rezistence vůči Imatinibu v důsledku selekce mutantních variant chimérického proteinu. U většiny případů je tato rezistence způsobena mutacemi v kinázové doméně BCR/ABL. Navzdory možnosti vzniku rezistence je Imatinib nadále první linií léčby pacientů s CML. Důvodem je jednak jeho stále dosti vysoká účinnost a za druhé vyšší míra nežádoucích účinků u alternativních inhibitorů.

V současnosti je již popsáno několik desítek mutací, jež mohou významně ovlivnit odpověď pacienta na léčbu. Některé z nich způsobují rezistenci dokonce vůči všem dostupným lékům. Stále jsou však objevovány nové mutace, jejichž klinická relevance je neznámá. Z tohoto důvodu je důležité nalézt rychlou a spolehlivou metodiku, s jejíž pomocí bychom byli schopni stanovit *in vitro* citlivost nových mutantů vůči TKI.

Vypracování této metodiky je cílem této práce. V případě úspěchu bychom získali nástroj, jenž umožní zvolit pro pacienta s mutací v kinázové doméně BCR/ABL adekvátní léčbu v přijatelném časovém horizontu.

2. Literární přehled

2.1 Leukémie

Pojem leukémie zahrnuje celou řadu maligních onemocnění postihující hematopoetický systém.

Dochází k transformaci obvykle na úrovni kmenové hematopoetické buňky. Výsledkem transformace je nekontrolovaná proliferace patologických buněk. Typickými vlastnostmi nádorové kmenové buňky jsou: schopnost sebeobnovy, abnormální proliferace, aberantní diferenciaci a léková rezistence. Ke vzniku leukémie může dojít v zásadě na úrovni jakéhokoliv buněčného typu, včetně jaderných prekurzorů erytrocytů.

Leukémie lze rozdělit na základě průběhu onemocnění, a to na leukémie akutní a chronické.

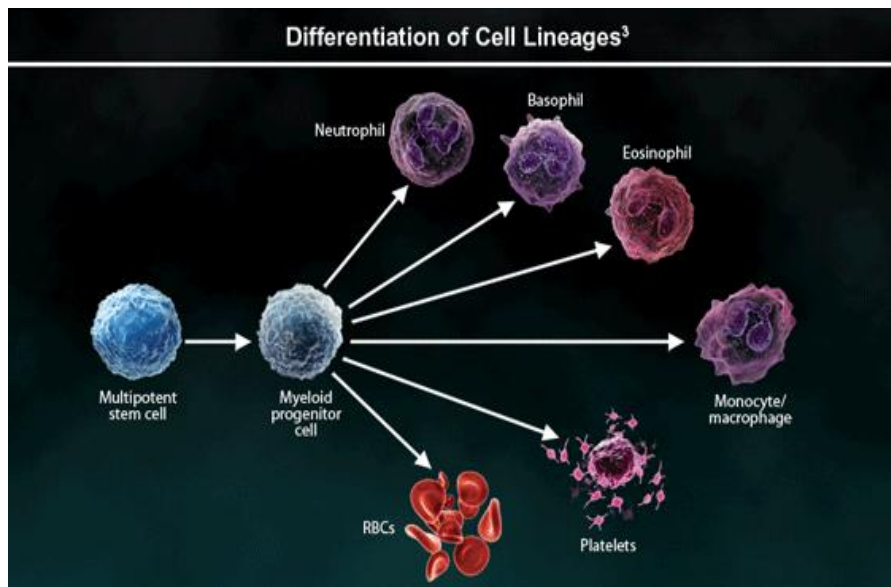
Akutní leukémie se vyznačují prudkým nástupem onemocnění. Při nedostatečné léčbě je medián přežití přibližně 2-3 měsíce. Dochází ke zmožení buněk mladší vývojové řady – tzv. blastů, u nichž je omezena schopnost diferenciaci ve zralou buňku (Mayer et al., 2002).

Chronické formy se vyznačují pomalým a postupným průběhem nemoci, jež je vyvolána spíše zralejšími buňkami se zachovalou schopností diferenciaci, postrádají ale normální funkci a přirozeně neodumírají. Pacient může žít i řadu let bez léčby, diagnóza bývá obvykle náhodná při jiném vyšetření. I u chronických leukémií však může v průběhu času dojít k blastickému zvratu, při němž dochází k rychlé progresi onemocnění, jež bez intenzivní léčby končí fatálně. (Mayer et al., 2002)

Rozdělení leukémií je možné dále provádět na základě buněčného typu.

Kmenové buňky se za fyziologických podmínek ve dřeni udržují v malém počtu po celý život. Jejich charakteristickým znakem je adhezivní molekula CD34. Z kmenových buněk vznikají dvě základní linie - myeloidní a lymfoidní. Z myeloidní linie vznikají monocyty, megakaryocyty (z jejichž membrán se odštěpují trombocyty), erytrocyty a tři druhy granulocytů (neutrofilů, eozinofilů a bazofilů), které jsou profesionálními fagocyty, základní buňky nespecifické imunity, významné v antiinfekční obraně, zejména proti extracelulárním bakteriím (Obr.1). Z lymfoidní linie se diferencují NK buňky, lymfocyty B a T (Mayer et al., 2002).

Transformací (pluripotentních) kmenových hematopoetických buněk vznikají patologické klony, jejichž proliferace a akumulace je zvýšena. Podle typu krvetvorných buněk, ve kterých došlo k nádorovému zvratu, rozlišujeme leukémie lymocytární a leukémie myeloidní. (Mayer et al., 2002)



Obr.1: Diferenciace hematopoetické myeloidní buněčné linie.

(<http://www.mpnconnect.org/jak-pathway/jak-pathway-mutations/index.aspx>)

2.1.1 Myeloproliferativní nemoci

CML se řadí dle FAB klasifikace do skupiny myeloproliferativních nemocí. Do této skupiny se řadí např. i Polycytemia vera (PV), esenciální trombocytémie (ET) a idiopatická myelofibróza (IM). U myeloproliferativních chorob maligní buňky proliferují a diferencují v jednu dominující hematopoetickou řadu (granulocytární, megakaryocytární nebo erytroidní) Pro všechny myeloproliferativní choroby je typická reaktivace extramedulární krvetvorby ve slezině a játrech (vedoucí k hepatosplenomegalii). Genetická nestabilita a vznik dalších změn způsobují stupňování agresivity nemoci a mohou vést k přechodu v akutní leukemii. Rychlostí přechodu do fáze akutní leukémie se jednotlivé myeloproliferativní choroby liší. (Adam et al, 2001)

2.2 Chronická myeloidní leukemie (CML)

V periferním krevním obraze CML se vyskytuje vysoký počet neutrofilů a jejich zralejších prekurzorů, ale také bývá zvýšen počet trombocytů, bazofilních segmentů a někdy i erytrocytů. (Adam et al, 2001)

2.2.1 Fáze CML a klinický obraz

Příznaky v počátečních stádiích bývají mírné, nespecifické, způsobené anémií a splenomegálií (Faber et al., 2010). Chronická fáze (CP) trvá průměrně 3-4 roky a choroba je u významné proporce pacientů (30%) zjištěna náhodně při vyšetření krevního obrazu (Sureda a Hernández-Bronchud, 1997). U některých nemocných se může projevit váhový úbytek, noční pocení, únava a nevykonnost, nechutenství popřípadě tlak v levém podžebří. S postupem času může nemoc progredovat do akcelerované fáze (AP), kdy se intenzita potíží stupňuje.

Pacienti trpí větším úbytkem hmotnosti, nevykonností, dušností a ve variabilním poměru i závratěmi, progresí trombocytopenie, anémie a progresivně se začne zvětšovat slezina. Výrazná splenomegalie způsobuje útlakem okolních orgánů silné bolesti břicha. Vzácně se vyskytuje i Sweetův syndrom (akutní febrilní neutrofilní dermatóza).

Terminálním stadiem CML je přechod nemoci v tzv. blastickou krizi (BC) s klinickými symptomy shodnými s akutní leukémií, kdy již choroba nedostatečně reaguje na cytostatika. Blasty jsou v kostní dřeni zastoupeny z více než 50% všech krevních elementů. Zhoršený stav je doprovázen neinfekčními teplotami, bolestmi kostí, krvácivostí, zvětšením mízních uzlin, trombocytopenií, anémií a nedostatkem funkčních granulocytů, z čehož vyplývá snížení protibakteriální imunity. Zvrat může být myeloblastický (60%), lymfoblastický (30%), nebo myelo-lymfoblastický (10%) (Adam et al, 2001)(Sureda a Hernández-Bronchud, 1997)(Cang a D. Liu, 2008).

2.2.2 Diagnostika

2.2.2.1 Laboratorní vyšetření

Krevní obraz patří k základnímu vyšetření v diagnostice CML. Zvýšený počet leukocytů dosahuje hodnot v rozmezí $20 \times 10^9/l$ až $500 \times 10^9/l$. Granulocyty vyžívají do stádia segmentů a morfologicky se neliší od granulocytů zdravých osob. Převažují neutrofilní granulocyty, vyskytují se ale i nezralé formy neutrofilních granulocytů. Blasty v chronické fázi nepřesahují většinou 10-15% buněk v diferenciálním rozpočtu periferní krve. Zvýšený absolutní počet eozinofilů a bazofilů v periferní krvi bývá také pravidelným nálezem. U většiny nemocných je při diagnóze přítomna anémie. Počet destiček je normální nebo zvýšený. Nižší hodnoty trombocytů mohou znamenat blížící se akceleraci či blastický zvrát onemocnění. Významným diagnostickým kritériem v dřívějších dobách bylo stanovení alkalické fosfatázy. Hodnoty leukocytární alkalické fosfatázy u CML bývají nízké až nulové. Z biochemických nálezů je u pacientů většinou zaznamenána zvýšená hladina kyseliny močové a laktátdehydrogenázy, jejíž hladina koreluje s aktivitou choroby. Hladina vitamínu B₁₂ v séru může být až 10x vyšší, což je dáno zvýšenou afinitou proteinů neutrofilů k vitamínu A (Faber et al., 2010)

2.2.2.2 Diferenciální diagnostika

Vysoké počty leukocytů (leukocytóza) se může vyskytnout také u zánětlivých infekčních onemocnění (sepse), u myelodisplastického syndromu a dalších myeloproliferativních chorob. Obecně je leukocytóza, zvýšený počet trombocytů, fibróza kostní dřeně a splenomegalie příznakem myelodisplastických syndromů a dalších myeloproliferativních chorob (podle WHO klasifikace) - jako je PV, IM, ET, chronická neutrofilní či eozinofilní leukémie. Jednoznačnou odlišností CML je především pozitivita Ph chromozomu, či fúzního genu BCR/ABL. Diferenciální diagnóza PV, IM a ET je určována podle kritérií WHO. Průkazem Ph negativních myeloproliferací může být také přítomnost mutace V617F v genu JAK2.

O něco složitější může být však rozlišení Ph⁺ CML diagnostikované v blastické fázi a Ph pozitivní akutní lymfoblastická leukémie. V případech ALL se většinou vyskytuje fúzní gen BCR/ABL typu minor a chybí údaje o CML v předchorobí (Mayer et al., 2002).

2.2.2.3 Cytologická vyšetření kostní dřeně

Významnou úlohu při stanovení diagnózy a především odlišení jednotlivých fází CML má cytologické vyšetření kostní dřeně. Neutrofilní, eozinofilní a bazofilní granulocyty jsou zastoupeny ve zvýšené míře včetně jejich prekurzorů. Častější je i přítomnost makrofágů. Podíl erythropoézy klesá (pod 5%). Barvitelné železo v kostní dřeni je sníženo nebo chybí, přestože je hladina sérového ferritinu normální.

Během akcelerované fáze dochází k infiltraci kostní dřeně bazofily a blasty (neutrofilního, eozinofilního, bazofilního, monocytárního, eryteroidního nebo megakaryocytárního původu). V případě přechodu do blastického zvratu je normální hematopoéza touto infiltrací potlačena.

K určení původu blastů je třeba nálezy porovnat s vícebarevnou průtokovou cytometrií, cytochemií, imunohistochemií a cytogenetickými nálezy. Např. imunofenotypizací lze rozlišit myeloidní blasty (CD34⁺ HLA⁻ DR⁺ CD33⁻ CD38⁺) exprimující myeloperoxidázu. Pro megakaryocytární řadu je typická pozitivita CD61, CD41 a pro eryteroidní řadu pozitivita glykoforinu. A (Faber et al., 2010)

2.2.2.4 Cytogenetika a molekulární genetik

Velkou roli v rozvoji cytogetické a molekulární diagnostiky sehrál objev Philadelphia chromozomu. Pomocí techniky G pruhování bylo zjištěno, že Ph chromozom je výsledkem reciproké translokace mezi chromozomy 9 a 22. Iniciační událostí je pravděpodobně vznik zlomů DNA na obou chromozomech a následná nesprávná reparace a spojení nesprávných konců chromozomů. Zlomy vznikají autonomně, nebo jsou výsledkem působení exogenního agens poškozující DNA, např. oxidativním stresem, radiací, genotoxickými chemikáliemi nebo chybami v průběhu replikace. Pro detekci BCR/ABL se používá široká škála metod, od úrovně chromozomu, genu, transkriptu až po protein (Schoch et al., 2002).

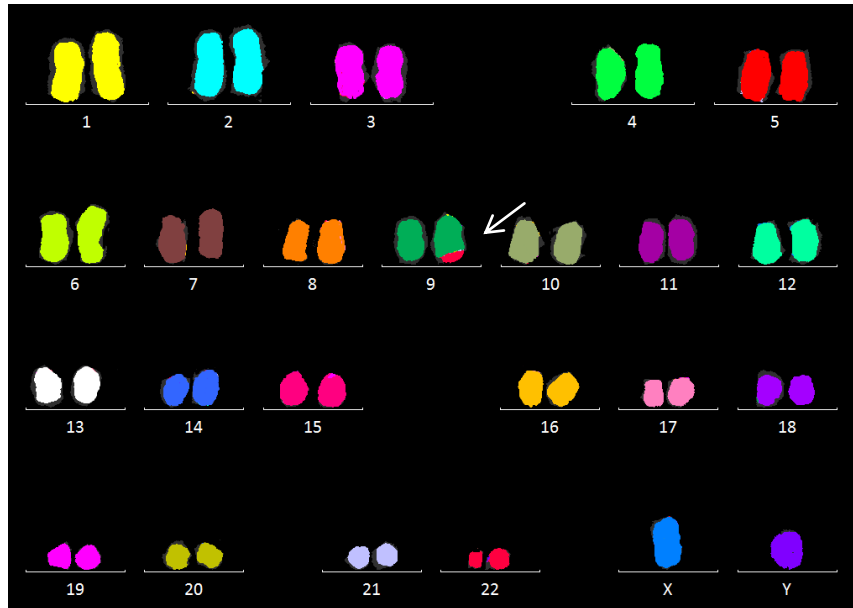
2.2.2.4.1 Klasické cytogenetické vyšetření

Cytogeneticky zpracované preparáty lze hodnotit speciálním pruhovacím barvením, např. G-pruhováním (Giemsa). V důsledku rozdílného rozložení hetero- a euchromatinu dochází na chromozomech ke vzniku specifického vzorce světlých a tmavých pruhů, jež dovolují jejich přesnou identifikaci. Na základě tohoto charakteristického barvení je možné sestavit kompletní karyotyp pacienta.

FISH (fluorescenční in situ hybridizace) je molekulárně cytogenetická metoda, pomocí níž jsme u CML schopni detekovat fúzi genů BCR/ABL jak na chromozomech tak v interfázních jádrech. Používají se fluorescenčně značené DNA sondy, které hybridizují k cílové DNA u denaturovaných chromozomů (Schoch et al., 2002).

2.2.2.4.2 Cytogenetické nálezy u CML

Ph chromozom lze prokázat asi u 90% pacientů. Asi u 5-10% Ph negativních pacientů s CML mohou být chromozomové změny submikroskopické. Jedná se o kryptické translokace známé jako tzv. „maskovaný Ph chromozom“. 5-10% procent pacientů má v době diagnózy tzv. variantní translokaci, kdy se k translokaci 9/22 přidává ještě třetí fúzní partner, nejčastěji se jedná o chromozomy 3, 11, 12, 14 a 17. V době diagnózy a především pak v blastické fázi se mohou vyskytovat tzv. přídatné chromozomové změny. Nejčastějším takovým nálezem bývá trisomie chromozomu 8, duplikace Ph chromozomu, trisomie chromozomu 19, 21, ale i monosomie 7. (Faber et al., 2010) (Kurzrock et al., 2003)



Obr.2.: Cytogenetický nález translokace: karyotyp 46,XY,t(9;22)
(pořízeno v laboratoři molekulární diagnostiky Chambon, 2010)

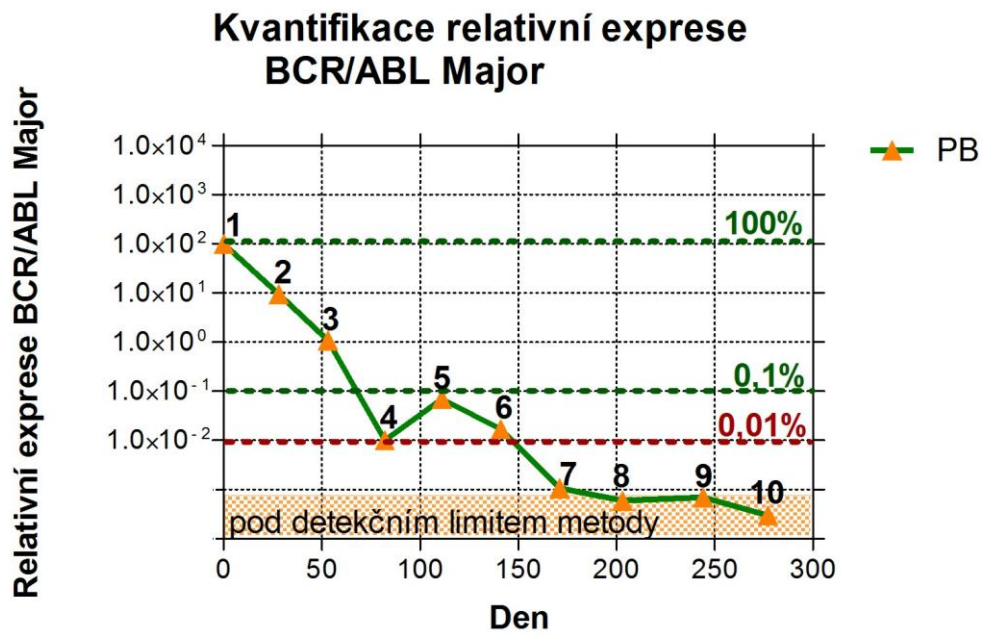
2.2.2.4.3 Molekulární genetika

Na molekulární úrovni dává translokace vzniknout fúznímu genu BCR/ABL, jenž je přítomný u 100% pacientů s CML, proto je považován za významný znak této nemoci a zároveň příčinu jejího vzniku. BCR/ABL hybridní gen můžeme však nalézt také ve spojitosti s akutní lymfoblastickou leukémií, méně často také i u dalších akutních a chronických hemopoetických tumorů. Vyšetřování hladiny transkriptu BCR/ABL mají značný prognostický význam v hodnocení odpovědi pacienta na léčbu. (Emig et al., 1999)

Pro molekulární detekci BCR/ABL je v současné době nejvíce využívána metoda RT-PCR, jež dosahuje v porovnání s alternativami nejvyšší citlivosti. Transkript je možné stanovovat kvalitativně i kvantitativně. Kvalitativní technika se využívá především pro diferenciální diagnostiku a popř. přesné stanovení místa zlomu. Dvoukolová RT-PCR a kvantitativní real-time RT-PCR jsou využívány pro sledování průběhu onemocnění a odpovědi na léčbu sledováním kinetiky hladiny transkriptu BCR/ABL. K detekci a kvantifikaci jsou využívány BCR/ABL – specifické fluorescenčně značené hybridizační TaqMan sondy. (Emig et al., 1999)(Schoch et al., 2002)

Real-time PCR a dvoukolová PCR dosahují senzitivity 10^{-5} - tj. dokáží detekovat 1 leukemickou buňku v 10^5 leukocytů. Tato hladina senzitivity je dostatečná pro použití

metody PCR k monitorování minimální zbytkové nemoci (obr.3). Minimální reziduální nemoc (MRN) je definována jako množství zbytkových maligních buněk v těle pacienta po léčbě. (Adam et al, 2001)(Schoch et al., 2002) Cílem léčebné strategie je dosáhnout u pacientů kompletní molekulární remise, jež je definována jako negativita vyšetření na hladině 10^{-4} .



Obr.3: Monitorování minimální reziduální nemoci u pacienta.
(pořizeno v laboratoři molekulární diagnostiky Chambon, 2010)

2.2.3 BCR/ABL onkogen

Ph chromozom je považován za prvotní změnu vedoucí k rozvoji CML. Předpokládá se, že k jeho vzniku dochází v průběhu dělení buňky následkem translokace mezi dlouhými raménky chromozomů 9 a 22. Ke zlomu dochází v pruhu q34 a q11 ($t(9;22)(q34;q11)$).

Role protoonkogeny ABL, lokalizované na chr. 9, byla poprvé popsána v roce 1983. Jedná se o lidský homolog virového onkogeny Abelsonovy myši leukémie. Samotný onkoprotein má molekulovou hmotnost 145 kDa, funguje jako nереceptorová tyrosin kináza převážně lokalizovaná v jádře, vázaná na chromatin. V menší míře zároveň působí i v cytoplasmě, kde je asociovaná s cytoskeletálními aktinovými vlákny. (Deininger et al., 2000)(Sureda a Hernández-Bronchud, 1997)

Obsahuje SH1 tyrozin kinázovou doménu, SH2 doménu (vázající fosfotyrosin) a SH3 doménu, která hraje důležitou roli v inhibici c-ABL aktivity. SH2 a SH3 domény jsou zároveň důležité pro interakce s dalšími proteiny. Na karboxylovém konci se nachází signál pro jadernou lokalizaci a sekvence pro kinázovou, aktivační a DNA vazebnou doménu. (Pear et al., 1998)

Abl se za fyziologických podmínek účastní regulace buněčného cyklu, buněčné odpovědi na genotoxický stres a v přenosu informací signálními drahami (Deininger et al., 2000)(Kurzrock et al., 2003). Zasahuje jednak do signální kaskády regulující vývoj B lymfocytů a granulocytů, jednak drah zodpovědných za odpověď na poškození DNA (DDR= DNA damage response). V případě DDR Abl fosforyluje DNA-dependentní protein kinázu DNA-PK důležitou pro opravu dvouřetězcových zlomů DNA. Interakcí s p53 a pRB proteiny může indukovat zastavení buněčného cyklu v G1-fázi. Případně se prostřednictvím fosforylace proteinu I κ B β účastní regulace apoptózy. (Faber et al., 2010)

Fúzní partner BCR (Breakpoint cluster region) je lokalizován na dlouhém rameni q11 chromozomu 22. Jedná se o fragilní oblast, v níž dochází k častým chromozomovým zlomům. BCR gen poskytuje ABL kináze na N-konci dvojitě svinutou oligomerní doménu, která umožňuje dimerizaci, autofosforylaci a tím rovněž konstitutivní aktivaci BCR/ABL kinázy. BCR/ABL onkoprotein je lokalizován v cytoplazmě Ph pozitivních buněk, kde se váže k aktinovému cytoskeletu. Deregulace kinázové aktivity ABL prostřednictvím fúze s BCR je považována za jednoznačnou kauzální příčinu vzniku maligního onemocnění. (Deininger et al., 2000)

BCR gen obsahuje také několik funkčních motivů. V centrální části se nachází PH doména (Pleckstrin homology) a oblast homologní dbl (DH), fungující jako GEF (guanosin exchange factor) pro protein Rho. C-konec molekuly pak vykazuje GTPázovou aktivitu pro Rac (malá GTPáza rodiny Ras, regulující polymerizaci aktinu). (Kurzrock et al., 2003)(Laurent et al., 2000)

Pro aktivaci BCR/ABL transformačního potenciálu jsou nezbytné sekvence kódované prvním exonem BCR. Jedná se o aminokyseliny (AMK) 1-63, označována jako tzv. doména 1, a doménu 2 sahající od AMK 176 až 242. Doména 1 je zásadní pro aktivaci tyrosin kinázy a F-aktin vázající funkci Abl. Analýzou sekvencí Bcr domény 1 bylo zjištěno, že vytváří alfa-helikální coiled-coil konformaci. Tato coiled-coil doména zprostředkovává oligomerizaci fúzních proteinů a jejich vzájemnou fosforylaci. (McWhirter et al., 1993)

AMK pozice Y177 exonu 1 Bcr tvoří autofosforylační místo zásadní pro vazbu Grb-2, což je důležitý adaptorový protein zprostředkovávající propojení signalizace ABL s Ras dráhou. *In vitro* studiemi bylo také prokázáno, že Bcr doména 2 je schopna se vázat k Abl SH2 doméně a pravděpodobně je zodpovědná za její aktivaci prostřednictvím interference s inhibiční doménou SH3. (McWhirter et al., 1993)

2.2.3.1 Varianty chimérického genu BCR/ABL

Zlomy na chromozomech 9 a 22 mohou vznikat v různých oblastech a vedou tak k tvorbě různých forem BCR/ABL proteinu (obr.4). Na chromozomu 9 jsou zlomy lokalizovány v úseku prvního exonu genu ABL a to ve dvou variantách 1a nebo 1b (Kurzrock et al., 2003). Ke zlomům v oblasti BCR pak dochází na třech definovaných místech. V závislosti na umístění zlomů dochází k tvorbě fúzních genů, jež dávají vznik proteinům o velikostech 190, 210, respektive 230 kDa.

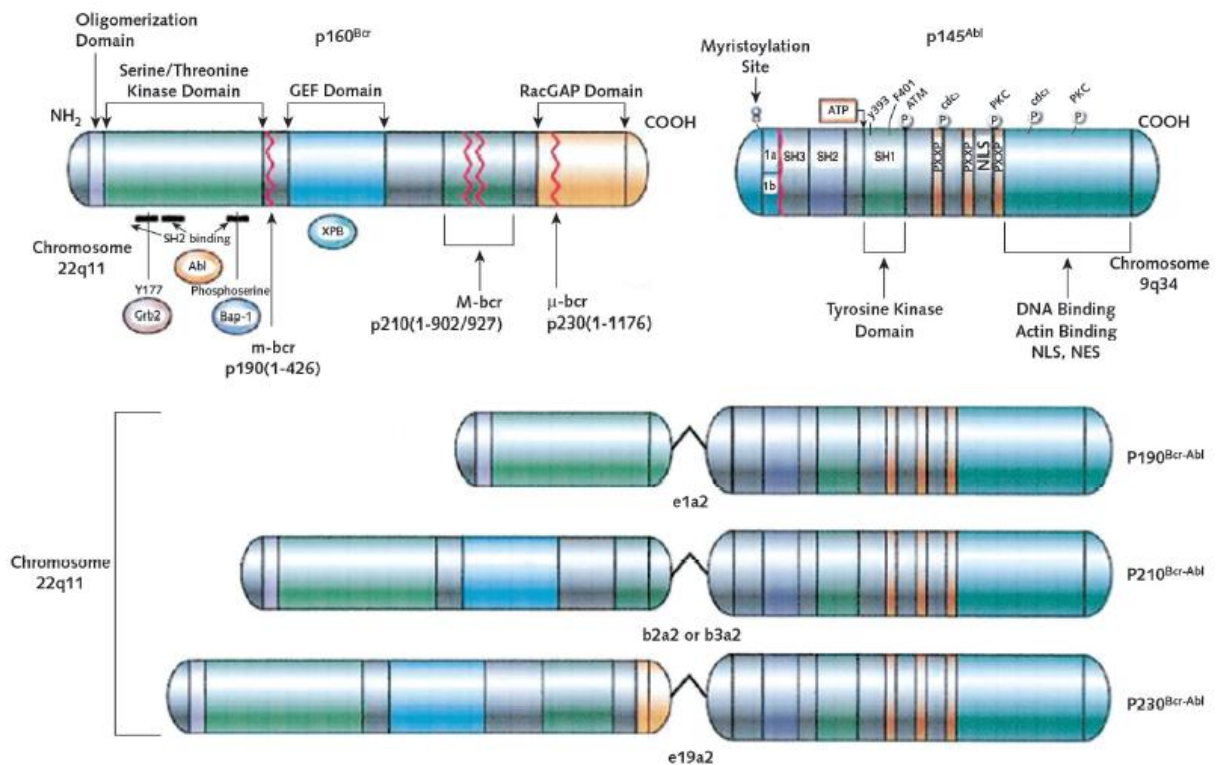
U většiny pacientů s CML (92%) a přibližně u 1/3 pacientů s Ph pozitivní ALL nastává zlom v BCR oblasti mezi exony 12-16 (nazvané b1 a b5) a je definovaný jako „Major breakpoint cluster region“ (M-BCR). Vyskytují se pak dvě různé varianty b2a2 a b3a2. Z takto vzniklé mRNA je odvozený chimerní protein o velikosti 210 kD. (Kurzrock et al., 2003)

Minor BCR zlomy (m-BCR) se nacházejí v oblasti prvního a druhého exonu (e1 a e2) a výsledný protein p185 nebo častěji p190 kDa je detekován asi v 50% případů Ph pozitivních ALL pacientů. U pacientů s CML byl detekován pouze asi ve 3%. 190-kD BCR/ABL fúzní protein postrádá oproti p210 PH doménu a doménu homologní Dbl. (Pear et al., 1998)(Melo, 1996) Zjištěné poznatky napovídají, že právě DH doména v major BCR/ABL proteinu hraje roli při posunu k tvorbě myeloidních klonů namísto lymfoidních. (Martinelli et al., 2002)

Vzácně se vyskytují u specifických podtypů CML také alternativní zlomy, např. varianta proteinu p230, jedná se o tzv. mikro BCR zlomy (μ -BCR) mezi exony 19 a 20. (Melo, 1996)

P210 forma Bcr/Abl se vyskytuje nejčastěji v hematopoetických buňkách pacientů s CML ve stabilní fázi, ale byly nalezeny také v případě ALL a AML, ačkoli je třeba vzít v úvahu možnost, že někteří pacienti s p210 AML jsou spíše případy CML diagnostikované v blastické krizi po nerozpoznané chronické fázi. P190 formy BCR/ABL

se obvykle nacházejí u Ph pozitivních akutních B lymfoidních leukémií a případně u AML. Tyto formy nemoci jsou výrazně agresivnější než CML. (Pear et al., 1998)



Obr.4: Struktura Bcr a Abl proteinu a varianty BCR/ABL fúzních proteinů. (Kurzrock et al., 2003)

2.2.4 Modely pro studium CML

2.2.4.1 Myší model

V roce 1990 byl vyvinut myší model pro studium CML. Bylo zjištěno, že podáním BCR/ABL pozitivních lidských hematopoetických buněk experimentálním zvířatům je možné vyvolat myeloproliferativní onemocnění shodné co do průběhu s lidskou CML (Faber et al., 2010). Myší CML je bifázické onemocnění s počáteční myeloproliferativní a následnou blastickou transformací. V obou těchto fázích je detekovatelný chimérický protein. Z původní nezralé hematopoetické kmenové buňky vzniká heterogenní potomstvo, zahrnující jak myeloidní, tak lymfoidní linii. Myší model byl neocenitelnou pomůckou pro studium rozvoje a nástupu blastické krize u této choroby. (Kelliher et al., 1990)(Zhang a Ren, 1998)

2.2.4.2 Buněčné linie

K *in vitro* studiu transformačního potenciálu BCR/ABL onkogenu jsou často využívány především myší IL-3 dependentní 32D (myeloidní) a Ba/F3 (lymfoidní) buněčné linie. (Daley a Baltimore, 1988)

Bylo prokázáno, že transdukcí všemi variantami BCR/ABL (P190, P210 a P230) lze u obou linií vyvolat nezávislost na IL-3. (Klucher et al., 1998) Obě myší linie jsou odvozeny od normálních nemaligních hematopoetických buněk, nelze však přesto vyloučit vývoj přídatných mutací, které by mohly změnit odpověď buněk na introdukovaný BCR/ABL. (Deininger et al., 2000)

2.2.5 BCR/ABL zprostředkovaná maligní transformace

Onkogenní účinek BCR/ABL je výsledkem abnormální regulace celé řady signálních drah, jejichž aktivace vede k nádorové transformaci buňky.

Signální dráhy ovlivněné konstitutivní aktivací BCR/ABL kinázy v důsledku ovlivňují:

- indukci neoplastické transformace a buněčné proliferace
- inhibici apoptózy leukemických buněk
- inhibici adheze myeloidních progenitorů v kostní dřeni (Faber et al., 2010).

Kromě stimulace proliferace a inhibice apoptózy indukuje též změny v adhezi ke stromatu kostní dřene, a to prostřednictvím signalizačních kaskád zahrnujících např. Ras, mitogen – aktivující protein kinázu (MAPK) a její „downstream“ efektory MEK a Erk, Phosphatidylinositol-3 kinázu (PI3K) (Skorski et al., 1995) a i její efektor Akt(obr.5). Společným rysem BCR/ABL a zmíněných proteinů je, že jsou tyrozin kinázami. (Martinelli et al., 2005)

BCR/ABL vytváří multimerní proteinové komplexy s celou řadou adaptorových proteinů, např. GRB-2 (adaptorový protein pro receptor růstového faktoru), SHC, CrkL (Nichols et al., 1994) Tyto adaptorové proteiny zprostředkovávají spojení s dalšími články signální kaskády (např. Ras) a tím moduluji signální transdukcí.

Protein CrkL se váže na C-terminální oblast BCR/ABL (SH3 doménu). Fosforylovaný CrkL pak aktivuje kinázu PI3 (fosfatidylinozitol-3'-kináza) a následně jejím prostřednictvím pak dochází k aktivaci Akt-dependentní signální dráhy, která poskytuje transformované buňce jisté výhody k přežití. Mezi známé cíle Akt signálních drah patří proteiny FoxO a mTOR, jež jsou v BCR/ABL pozitivních progenitorech inaktivní a nespouštějí transkripci důležitých proapoptických genů. Serin-threoninová kináza Akt hraje roli dále v antiapoptické signalizaci tím, že se váže na proapoptický protein Bad a fosforylací ho následně inaktivuje.

mTOR (=savčí cílová molekula rapamycinu) se nachází v centru několika různých signalizačních drah, zahrnující signály od receptorů pro růstové faktory, signalizaci poškození DNA, nutriční stav buňky atd. Na základě výsledné kombinace těchto signálů ovlivňuje mTOR konečný osud buňky, a to jak směrem k další proliferaci, tak k útlumu buněčného cyklu, popř. až k apoptóze. Je schopen eliminovat klasickou cestu iniciace translace, fosforylací příslušných iniciačních faktorů, zejména eIF4E. (Faber et al., 2010)

Autofosforylace BCR/ABL proteinu v místě Tyr177 umožní navázání jiného adaptorového proteinu/molekuly Grb-2. Ten následně asociuje a konstitutivně aktivuje Ras, a to prostřednictvím komplexu s proteinem SOS, jenž stabilizuje konformaci Ras-GTP. Aktivace Ras vede ke stimulaci dalších drah zapojených do procesu transformace. Některé PI3K a Ras aktivované dráhy jsou navíc zodpovědné za vznik reaktivních kyslíkových radikálů (ROS), které mohou mít také významnou negativní roli v procesu transformace (Cortez et al., 1995).

Další drahou ovlivňovanou BCR/ABL je MAP kinázová dráha (MAPK=proteinové kinázy aktivované mitogeny). Ras aktivuje serin-threoninovou kinázu Raf, která iniciuje signální kaskádu vedenou přes kinázy Mek1/ Mek2 a Erk, a která finálně vede k aktivaci genové transkripce a ve výsledku může výrazně zasahovat do antiapoptických buněčných mechanismů (M. W. Deininger et al., 2000).

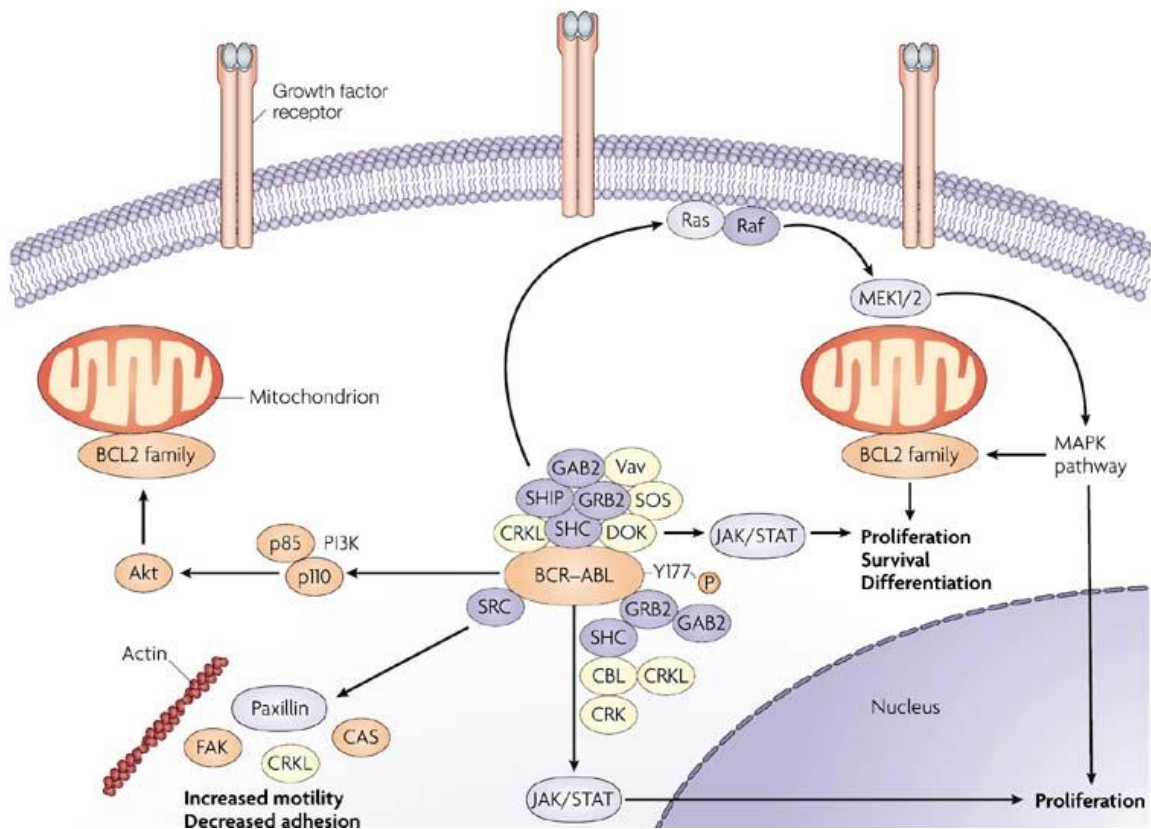
Působením P210 a P190 Bcr/Abl může docházet také k deregulaci dráhy JAK/STAT. Přímá aktivace STAT5 transkripčních faktorů, pravděpodobně za účasti proteinu Hck (člen rodiny Src), může vést ve výsledku ke zvýšené proliferaci a přežití. Tento proces může probíhat zcela bez účasti proteinu JAK. (Ilaria a Van Etten, 1996)(Danhauser-Riedl et al., 1996)

Konstitutivně jsou onkoproteinem aktivovány i NF- κ B transkripční faktory, které jsou zásadní pro řadu buněčných procesů (buněčný cyklus, přežití, apoptóza), a mimo to

mohou být ovlivňovány např. adhezní proteiny, jako je paxilin, což vede k alteraci adhezních vlastností CML buněk.(Faber et al., 2010)

Kromě prokázané zvýšené proliferační a antiapoptotické aktivity může BCR/ABL výrazně inhibovat regulátory buněčného cyklu, jako je protein p53 nebo tumor supresorový gen PP2A (Protein fosfatáza 2A). (Faber et al., 2010)(Danhauser-Riedl et al., 1996)

Sekundárně je zvýšená exprese onkoproteinu spojována s genomickou nestabilitou, která souvisí s vývojem přídatných cytogenetických aberací v Ph⁺ buňkách a akumulací mutací. To může ve výsledku přispívat k chemorezistenci CML u pacientů v blastickém zvratu.



Obr.5: Signální dráhy aktivované BCR/ABL proteinem

(Nature Reviews Cancer 7, 345-356, May 2007)

2.2.6 Terapie CML

V průběhu předešlých deseti let dosáhla léčba CML, stejně tak i dalších nádorových onemocnění, významných výsledků.

Se zlepšujícími se znalostmi o molekulární patogenezi hematoonkologických onemocnění došlo ke zkvalitnění terapeutických technik. Způsob léčby a léčebná odpověď mají zásadní význam pro prognózu CML. Výběr léčebných postupů se posuzuje na základě mnoha faktorů, jako je např. věk a celkový stav pacienta, případně další doprovodné nemoci (Faber et al., 2010).

2.2.6.1 Transplantace

Transplantace krvetvorných buněk (HSCT) je i dnes jediným léčebným postupem dosahujícím úplného vyléčení CML. V posledních letech však docházelo k mírnému poklesu transplantačních indikací v důsledku zavedení moderních cílených léků (Faber et al., 2010).

Transplantace lze rozdělit na základě typu dárce poskytujícího transplantovaný štěp. Štěpy od dárců geneticky identických s příjemci jsou syngenní (např. jednovaječná dvojčata), od geneticky neidentického, ale stejného živočišného druhu jsou alogenní, přenosy tkání či buněk v rámci jedince jsou transplantace autologní. Za xenogenní se označuje transplantace od jiného živočišného druhu.

U hematoonkologických pacientů se využívají alogenní případně autologní transplantace, při kterých jsou pacientovi injikovány hematopoetické kmenové buňky. Nejčastěji se využívá štěp z kostní dřeně, moderní techniky ale umožňují také získat kmenové buňky z pupečnickové krve nebo z periferní krve dárce po jejich vyplavení do periferie po stimulaci růstovými faktory. (Hořejší a Bartůňková, 2005)

Vhodné provedení alogenní transplantace kostní dřeně je v časně chronické fázi CML, kdy dosáhne 50-60% případů pětiletého přežití bez příznaků nemoci. Ve fázi akcelerace se úspěšnost transplantace zmenšuje přibližně na 19 až 37% (Adam et al, 2001). Novější data dokonce uvádějí zlepšení transplantačních výsledků a celkové přežití 5 let ve skupině s nízkým transplantačním rizikem u více než 85%. Pomocí allogenní transplantace je možné dosáhnout eradikace onemocnění po dobu delší než 20 let, což je výsledek léčbou

chemoterapeutiky nedosažitelný, proto je alogenní transplantace kostní dřeně obecně přijímána za jedinou metodu vedoucí k úplnému vyléčení (Faber et al., 2010).

Pacienti musí splňovat přísná kritéria, např. věkovou hranici (obvykle do 55 let), také musí být nalezen vhodný dárce krvetvorných buněk, a to na základě rozhodnutí dle kritérií NMDP (The National Marrow Donor Program). Cílem NMDP je identifikovat potenciální (nepříbuzné) dárce, jejichž štěp by bylo možné využít pro příjemce. (McGlave et al., 1993)

Bez ohledu na úspěšnost transplantační léčby její využití pro pacienta vždy znamená podstupovat další rizika i pokud dojde k přihojení štěpu. Tkáň od dárce je pro recipienta rozeznávána imunitním systémem (IS) jako cizorodá, pacientům se podávají imunopresiva a jsou tudíž vystaveni zvýšenému riziku infekcí. Druhou podobou problému je nežádoucí (a někdy i fatální) reakce transplantátu proti hostiteli - GVHD. Z toho důvodu se v dnešní době tato metoda léčby CML ocitá pod tlakem moderních cílených léků a pouze výjimečně je používána v první linii léčby. HSCT bývá indikována v případech rezistence na chemoterapii, popřípadě u dětí a adolescentů, u nichž je vhodný příbuzný dárce (Faber et al., 2010).

2.2.6.2 Cytostatická chemoterapeutika

Busulfan je jedním z prvních cytostatik, který je v klinickém použití od roku 1953.

Po podání se v trávicím ústrojí vstřebává téměř úplně, nicméně s výraznou interindividuální variabilitou, která má významné klinické důsledky, zejména při vysokodávkových přípravných režimech před transplantací krvetvorných buněk. Proto se průběžně monitoruje jeho plazmatická hladina a podle dosažených výsledků se upravuje dávkování.

Busulfan je gonadotoxický, mutagenní, teratogenní a pravděpodobně i karcinogenní. (Faber et al., 2010).

O něco později začala být využívána hydroxyurea, která je do jisté míry používána dodnes. Lék je k dispozici pro klinické užití v několika formách více než 30 let. Hydroxyurea způsobuje selektivní inhibici buněčného cyklu v S-fázi zabráněním konverze ribonukleotidů na deoxyribonukleotidy, čímž dochází k zastavení syntézy DNA. Její nežádoucí účinky nejsou tak závažné jako u busulfanu. Během aplikace však často dochází u pacientů k rozvoji anémie, kožním vyrážkám, časté mohou být také stomatitida, alopecie

či různé formy gastrointestinálních potíží, někdy se vyskytují (15%) i neuropsychiatrické symptomy.

Celková doba přežití pacientů s CML léčených cytostatickými chemoterapeutiky byla značně neuspokojivá, v průměru dosahovala 45 až 58 měsíců. (Fausel, 2007)

2.2.6.3 Léčba interferonem IFN- α

Interferonový systém byl vyvinut organismy jako součást nespecifické imunity k obraně proti virovým infekcím. Navázáním interferonu na specifický buněčný receptor dojde k aktivaci JAK/STAT signální dráhy, jež ovlivňuje expresi celé řady genů, jejichž proteiny mají antivirové, antibakteriální, imunomodulační a antiproliferační účinky. Modulují expresi některých onkogenů a cytokinů, ovlivňují expresi např. transkripčního faktoru E2F, cyklin-dependentních kináz a p53, čímž se podílejí na regulaci apoptózy, buněčného cyklu, diferenciaci a proliferaci. Zejména byl prokázán antiproliferační účinek interferonu α , jenž má schopnost inhibovat patologicky zvýšenou sebeobnovu CML progenitorů. (O'Brien et al., 2003) U CML se k léčbě využívá interferon α 2a získaný rekombinantní technologií z bakterie *Escherichia coli* a dále IFN- α modifikovaný (peglylovaný). Nejúčinnější je při zahájení léčby v chronické fázi brzy po stanovení diagnózy. (Bonifazi et al., 2001)

Dle randomizovaných studií dosáhlo velké cytogenetické odpovědi od 11 do 30% a kompletní cytogenetické odpovědi okolo 10% pacientů. (O'Brien et al., 2003) Na léčbu je však přesto asi 20-30% nemocných rezistentní, často nedosáhnou ani hematologické odpovědi.

Mezi nejčastější nežádoucí účinky lze uvést zvýšené teploty až horečky, flu-like syndrom, únava, bolesti hlavy, svalů, kloubů, především při zahájení léčby. Dále se může vyskytovat nevolnost, nechutenství, nervozita, neurologické či psychiatrické komplikace, trombopenie méně častá je pak i anémie. Před objevením cílené léčby TKI byl interferon α základem konzervativní terapie CML oddalující progresi onemocnění. Medián přežití se pohyboval od 60 do 89 měsíců. (Fausel, 2007) Interferon není ani mutagenní ani teratogenní, přesto jeho užití v těhotenství musí být pečlivě zváženo.

Některé studie prokázaly vysokou účinnost kombinované terapie Imatinibem a peglylovaným interferonem (s dosažením velké molekulární odpovědi). Vzhledem k tomu, že tato strategie se opírá o rozdílný mechanismus účinku, neztratí interferon α svůj význam ani v éře cílené léčby TKI (Faber et al., 2010).

Je třeba vzít do úvahy, že interferon hraje silnou imunomodulační úlohu a tudíž jeho dlouhodobé podávání může mít pro pacienta těžko předvídatelné důsledky.

2.2.6.4 Tyrozin kinázové inhibitory

Pokroky v molekulární biologii a biochemii vedly ke studiu látek zacílených na blokaci určitých proteinových katalytických funkcí. V roce 1988 byly objeveny malé molekuly, schopné selektivně inhibovat přímo aktivitu tyrozin kináz a mající antiproliferační účinky.

2.2.6.4.1 Imatinib

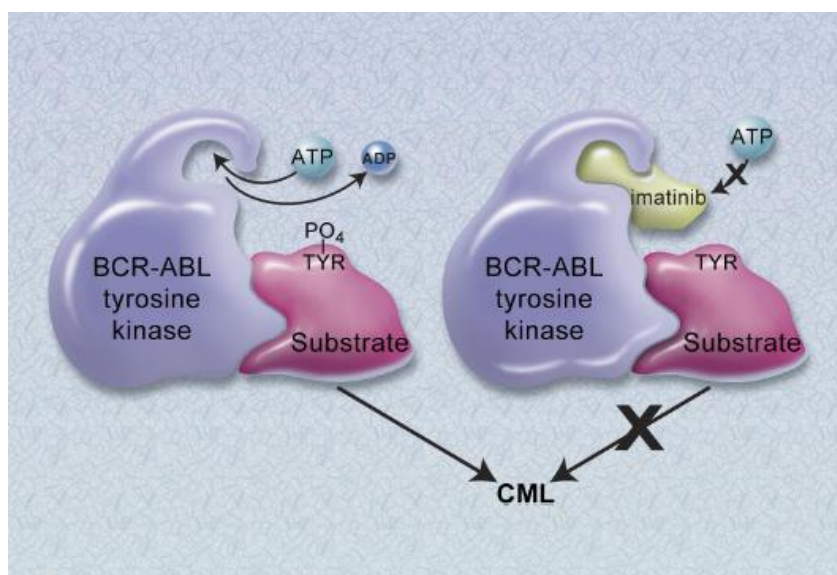
Pokroky v molekulární biologii, přímé *in vitro* studie (Liu et al., 2002) a studie na zvířecích modelech potvrdily, že BCR/ABL onkoprotein je molekulární příčina vzniku CML.

Následující roky se výzkum zaměřil na možnosti selektivní inhibice BCR/ABL tyrozin kinázy. V roce 1998 byly zahájeny klinické zkoušky prvního inhibitoru, tehdy známého jako STI571 (=signal transduction inhibitor), později jako Imatinib, který revolučním způsobem změnil léčbu a prognózu pacientů s CML. Chemicky je Imatinib mesylát derivátem fenylaminopyrimidinu, produkováný farmaceutickou firmou Novartis (dříve CIBA).

Účinkuje jako selektivní kompetitivní inhibitor BCR/ABL, PDGFR(platelet-derived growth factor receptor), ARG nebo i c-KIT tyrozinových kináz (O'Brien et al., 2003).

Imatinib se přímo váže do nukleotidového vazebného místa na BCR/ABL, čímž zabraňuje vazbě ATP a tím stabilizuje enzym v inaktivní konformaci (obr.6). Nedochází tak k fosforylaci tyrozinových zbytků substrátů a inhibuje se tak kontinuální aktivace signálních kaskád podílejících se na vzniku leukemického fenotypu buňky. Brání tak realizaci účinku BCR/ABL leukemického genu na proteinové úrovni. Podle současných poznatků nepůsobí na leukemické progenitorové buňky a nedokáže tedy pravděpodobně CML zcela vyléčit, podílí se ale účinně na inhibici proliferace patologického klonu a apoptóze leukemických buněk.

Vzhledem k farmakologickému profilu je Imatinib indikován při léčbě např. ALL, systémové mastocytózy nebo gastrointestinálních stromálních tumorů. (Martinelli et al., 2005)(Druker et al., 2001)



Obr.6: Mechanismus působení Imatinibu na BCR/ABL tyrosin kinázy
(Druker et al., 2001)

Od roku 2003 (Fausel, 2007) je Imatinib pacientům podáván v první linii léčby CML. Lék je užíván pod názvem Gleevec a je podáván u dospělých pacientů jednou denně ve 400 až 600 mg dávce, při nedostatečné odpovědi je možné dávky zvýšit až na 800 mg. Přestože většina pacientů na Imatinibu dosáhlo kompletní cytogenetické odpovědi, převážná část z nich zrelabuje při přerušení terapie Imatinibem.

Od doby prvních klinických testování až po současnost proběhlo mnoho studií, které prokázaly pozoruhodnou účinnost Imatinibu. Významnou retrospektivní studií je IRIS, zahájená v červnu 2000 (international Randomized Study of Interferon and STI571). Výrazné procento pacientů rezistentních k interferonu α dosáhlo vysoké hodnoty odpovědi na Imatinib. 95% pacientů dosáhlo CHR (kompletní hematologické odpovědi). Po 19 měsících léčby Imatinibem nově diagnostikovaných pacientů s CML bylo dosaženo 97% kompletních hematologických odpovědí a 76% kompletních cytogenetických odpovědí. (O'Brien et al., 2003) O něco pozdější studií bylo zjištěno 5 leté celkové přežití u více než 89% nemocných léčených Imatinibem v první linii v chronické fázi CML. Bez progresu pokračuje v léčbě Imatinibem 83% nemocných (Druker et al., 2001).

Po 6-12 měsících léčby Ima dosahuje většina nemocných kompletní cytogenetické odpovědi a řada z nich i velké molekulární odpovědi. Kompletní molekulárně–genetická odpověď na léčbu Imatinibem je vzácná, z tohoto důvodu je nutné pravidelně pacienty

s CML molekulárně monitorovat (Rosti et al., 2004). Tato technika je již součástí standardní laboratorní péče o pacienty s CML.(Paschka et al., 2003)(Branford et al., 1999)

Jako optimální léčebnou odpověď hodnotíme dosažení kompletní hematologické remise a nejméně malé cytogenetické odpovědi ($Ph^+ < 35\%$) po 3 měsících léčby, kompletní cytogenetické odpovědi (nejsou detekovatelné Ph^+ buňky) po 12 měsících a velké molekulární odpovědi po 18 měsících. I při dosažení stabilní molekulární negativity BCR/ABL získané vyšetřením RT-PCR je doporučeno trvalé užívání Imatinibu (Baccarani et al., 2006)

Suboptimální léčebná odpověď bývá v podstatě přechodným jevem. Jedná se o stav, kdy se nedosáhlo u pacienta po 3 měsících redukce Ph^+ klonu, či po 6 měsících velké cytogenetické odpovědi ($Ph^+ > 35\%$), nedosažení či ztráta velké molekulární odpovědi po 18 měs. Případně vznik mutací v kinázové doméně u klonů původně citlivých k Imatinibu. U většiny takovýchto případů se pokračuje v léčbě Imatinibem, případně se zvyšuje dávkování, pacienti jsou pečlivěji sledováni a bývají kandidáty na alternativní léčbu. (Baccarani et al., 2009)

S progresí onemocnění do akutní a blastické fáze efektivita Imatinibu samozřejmě klesá. I přes nepříznivé faktory v pokročilejších fázích choroby dosáhlo dle studií(e) v akutní fázi 30-40% pacientů kompletní hematologické remise. Hlavní cytogenetické odpovědi bylo dosaženo zhruba u 20-30% nemocných.

V blastickém zvratu je účinek Imatinibu krátkodobý a efekt pouze u malé části pacientů, je indikován prakticky výhradně k optimalizaci přípravy k allogenní transplantaci.

Ve většině případů terapie přechází v léčbu odpovídající akutní leukémii. Jedním příkladem je např. chemoterapeutický režim VAC (etoposid, cytarabin a carboplatina). Takováto chemoterapie může u určitého procenta pacientů indukovat i tzv. sekundární chronickou fázi (Fausel, 2007).

Vzhledem k účinnosti Imatinibu v rámci hematologických a cytogenetických odpovědí na léčbu, snášenlivosti léku a nižší pravděpodobnosti progresu choroby do AP nebo BC byl Imatinib předřazen Interferonu α a uveden do první linie léčby u nově diagnostikovaných CML pacientů v chronické fázi.(O'Brien et al., 2003) Toxicita Imatinibu je podstatně nižší a negativní účinky se primárně projevují během prvních dvou let terapie. Nejčastěji se vyskytují nežádoucí účinky jsou např. nevolnost, bolesti svalů, kloubů, kostí, alergické reakci, otoky. Nejzákladnější klinické účinky jsou hematologické, např. neutropenie, trombocytopenie. Kvalitu života nemocných v období kompletní

hematologické odpovědi na léčbu nelimituje samotná choroba, ale právě tolerance léčby (Fausel, 2007) (Faber et al., 2010).

Nejzávažnějším problémem spojeným s léčbou Imatinibem u CML je rozvoj rezistence, a to jednak primární, kdy pacient od počátku na léčbu neodpovídá, nebo sekundární, tedy získané v průběhu terapie, jež je ve většině případů příčinou relapsu chronické fáze CML.

Sekundární rezistenci lze dále rozdělit na BCR/ABL závislé a nezávislé. Mezi BCR/ABL závislé mechanismy rezistence patří mutace v onkogenu ovlivňující vazbu Imatinibu (přes 60% případů rezistence) či jeho zvýšená exprese v důsledku genové amplifikace.

Za BCR/ABL nezávislé mechanismy rezistence jsou pak považovány např. snížení intracelulární koncentrace Imatinibu, zvýšená signalizace přes kinázy Src (při blokaci signalizace přes BCR/ABL). Příčinou mohou být také přídavné chromozomální aberace. (Martinelli et al., 2005)(Gambacorti-Passerini et al., 2003)

Imatinib zcela zásadně změnil terapii CML. Princip cílené terapie CML se ukázal velmi účinný a pokračující výzkum přinesl další nové léky podobného mechanismu účinku. Na základě studií (např IRIS a další) zaměřených na TKI a volbu léčby CML byla formulována a později aktualizována nová léčebná doporučení ELN (European LeukemiaNet) (Baccarani et al., 2006)(Baccarani et al., 2009).

Momentálně nejvýznamnější alternativou při selhání léčby Imatinibem jsou tzv. tyrozin kinázové inhibitory druhé generace (Mathisen et al., 2011)(Jabbour et al., 2009).

2.2.6.4.2 Nilotinib

Nilotinib je analogem Imatinibu. Byl vyvinut na základě studií krystalické struktury komplexu Imatinib+Abl. Stejně jako Imatinib je Nilotinib aminopyrimidinový selektivní kompetitivní inhibitor tyrozinových kináz (BCR/ABL, PDGFR, Kit a i dalších receptorových kináz (EphA4).

Má přibližně 30x vyšší afinitu k BCR/ABL než Imatinib, což je pravděpodobně dáno jeho lepší schopností vázat se k inaktivované Abl doméně(Obr.7) (Golemovic et al., 2005)(Weisberg et al., 2005). Nilotinib prokázal také vyšší účinnost u některých případů rezistentních na Imatinib způsobených mutací v BCR/ABL (Saglio et al., 2010)(Hughes et al., 2009).

Dle studií a klinických testů bylo prokázáno, že více než 70% CML pacientů v pokročilé fázi onemocnění a přes 90% v chronické fázi odpovídalo na Nilotinib použitý v druhé linii léčby. (Weisberg et al., 2006)

Dvě pilotní studie zaměřené na Nilotinib v první linii u nově diagnostikovaných pacientů s CML prokázaly, že v chronické fázi CML bylo dosaženo během 6 až 12 měsíců 96% kompletních cytogenetických (Saglio et al., 2010).

Pozitivem je také doposud vykazovaná velmi dobrá tolerance k Nilotinibu. Nežádoucí účinky se vyskytují většinou v mírnější formě, a to v podobě kožních alergických reakcí, celkové slabosti, nevolnosti či bolestech hlavy, a především Nilotinib doposud nevykazoval zkříženou intoleranci s dalšími TKI. Nedoporučuje se však podávání Nilotinibu současně s např. klaritromyciny (inh.CYP3A4), či jinými inhibitory, neboť tyto interakce mohou ve výsledku vést ke zvyšování hladin Nilotinibu a tedy zvýšenému riziku toxicity (Faber et al., 2010).

2.2.6.4.3 Dasatinib

Dasatinib (dříve označovaný BMS-354825) je dalším selektivním kompetitivním inhibitorem syntetizovaným Bristol-Meyers Squibb (známý jako lék Sprycel). Účinkuje stejně jako jeho předchůdce Imatinibu jako inhibitor Tyrozin kináz (Abl, BCR/ABL, c kit, PDGFR) a mimo to je inhibitorem kináz rodiny Src (kam patří např. Src, Lck, Hck) a také kinázy ephrinového receptoru (EPH) (O'Hare et al., 2005).

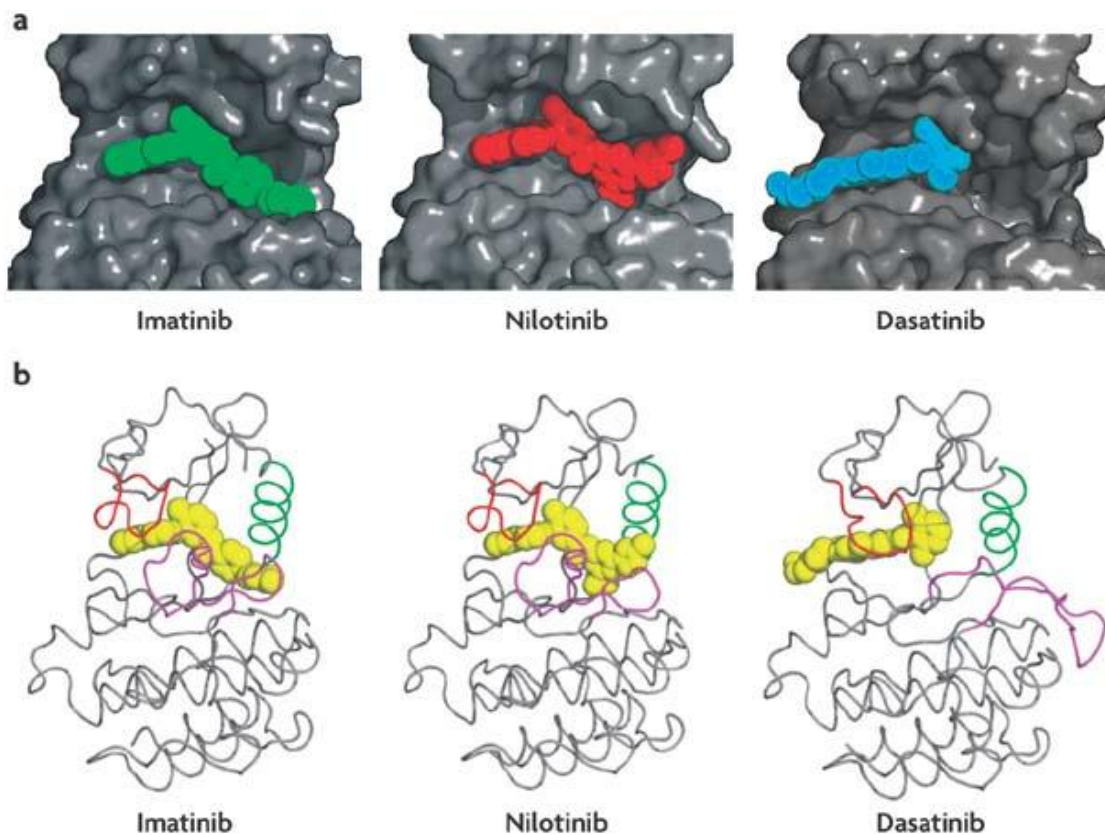
Strukturní požadavky BCR/ABL pro vazbu Dasatinibu jsou méně striktní než například u Imatinibu, je schopen se vázat k vazebnému místu pro ATP jak v inaktivní tak i v aktivní konformaci enzymu. (Obr.7) Díky tomu je jeho účinnost až 325krát vyšší než u Imatinibu (a přibližně 16x vyšší než Nilotinibu) (Tokarski et al., 2006) (Shah et al., 2004).

Ze studií postupně vyplynulo, že Dasatinib je navíc schopen inhibovat mutace zodpovědné za rezistenci k Imatinibu. Konkrétně z 16 klinicky významných mutací, představujících 90% případů rezistencí, je Dasatinib účinný u 15. Výjimkou je pouze mutace T315I. (Tokarski et al., 2006).

Z *in vitro* experimentů i klinických zkušeností je přesto evidentní, že Dasatinib může být méně účinný u některých jiných mutací v BCR/ABL kinázové doméně, než alternativní TKI, a to včetně Imatinibu (Shah et al., 2004).

Stejně jako v případě Nilotinibu dosavadní studie prokázaly nízkou toxicitu s obdobnými nežádoucími účinky. Poměrně často byly popisovány různé typy retence tekutin, zejména periferní otoky, elevace jaterních testů, hypokalcémie, hypofosfatémie, což bylo většinou upraveno dávkováním nebo substitucí minerálů

Závěrem lze říci, že tyto analýzy ukazují, že dasatinib by mohl představovat účinnou terapii pro většinu pacientů v CP-CML s Imatinib-rezistentními mutacemi a tato odpověď je dlouhodobá. (Müller et al., 2009) V současné době se intenzivně studuje jeho eventuelní význam jako léku první linie. (Kantarjian et al., 2010)



Obr.7: Porovnání vazeb různých TKI (Imatinib, Nilotinib, Dasatinib) k BCR/ABL tyrozin kináze (Nature Reviews Cancer 7, 345-356 (May 2007)).

2.2.6.4.4 Bosutinib

Dalším potenciálním duálním Src/Abl inhibitorem 2. generace je Bosutinib. Tato novinka je v současné době ve 3. fázi klinického testování a dosavadní studie zatím prokazují dobrou aktivitu u pacientů rezistentních k Imatinibu (100x vyšší účinnost) nebo dalším TKI, opět s výjimkou mutace T315I (Golas et al., 2003) (Mathisen et al., 2011).

2.2.6.4.5 Inhibitory Aurora kinázy

MK-0457 (Merk) inhibitor Aurora kinázy v současné době je ve fázi II klinického testování a je představitelem TKI 3. generace. Má schopnost inhibovat ABL a mnoho jeho mutantních variant (např. středně rezistentní Q252H, rezistentní Y253F) a na rozdíl od předešlých TKI i variantu T315I. Je možné, že neinhibuje rezistentní mutantu přímo, neboť koncentrace vyvolávající odpověď byla nižší než IC_{50} nemutované kinázy BCR/ABL. V testování je dále např. SGX70393.

Případný úspěch by otevřel cestu k léčbě kombinací různých inhibitorů, ačkoliv by zde vyvstalo riziko selekce mnohočetných mutant. Je ovšem otázkou, zdali by si takováto mutanta ještě podržela aktivitu schopnou maligně transformovat buňku (O'Hare et al., 2007).

Nové preparáty TKI jsou pro řadu pacientů další nadějí na opětovné dosažení remise v případě relapsu nebo refrakterního onemocnění. TKI druhé generace jsou dobrou alternativou pro nemocné s většinou mutací BCR/ABL (Faber et al., 2010). Úspěšnost Dasatinibu a Nilotinibu u pacientů s rezistencí na Imatinib je 90% CP. V AP a BC je 20% a 40% pacientů refrakterních k dasatinibu a 30% až 60% je refrakterních k nilotinibu (O'Hare et al., 2007). V naprosté většině případů nevykazují zkříženou intoleranci, léčebného účinku dosahují rychle a díky nízké toxicitě bývají léky dobře tolerovány. Stejně jako během léčby Imatinibem je nezbytné pacienty pečlivě sledovat z hlediska adekvátní léčebné odpovědi. Pro hodnocení účinnosti léčby TKI 2. generace se využívá nových doporučení ELN (Baccarani et al., 2009).

2.2.7 Mutace v BCR/ABL

Sekundární rezistence na léčbu Imatinibem je přibližně z více než dvou třetin zapříčiněna mutacemi v BCR/ABL kinázové doméně (dle některých studií až 90%) (Deininger et al., 2005). Většina těchto mutací má za následek konformační změnu fúzního proteinu, jež neumožňuje optimální vazbu TKI.

Zřejmě se tvoří nezávisle na terapii, je jich více v AP a BC než v CP, což koreluje s délkou onemocnění. Zdá se, že význam mají pouze mutace, které vznikly v nádorových „kmenových“ buňkách, mutace vzniklé ve zralějších progernitorech mají tendenci postupně vymizet. Z toho důvodu není účelné dělat mutační screen před zahájením terapie. Jiná situace nastává pokud klon v průběhu léčby převládne, pak je pravděpodobné, že mutace je zodpovědná za rezistenci na Imatinib.

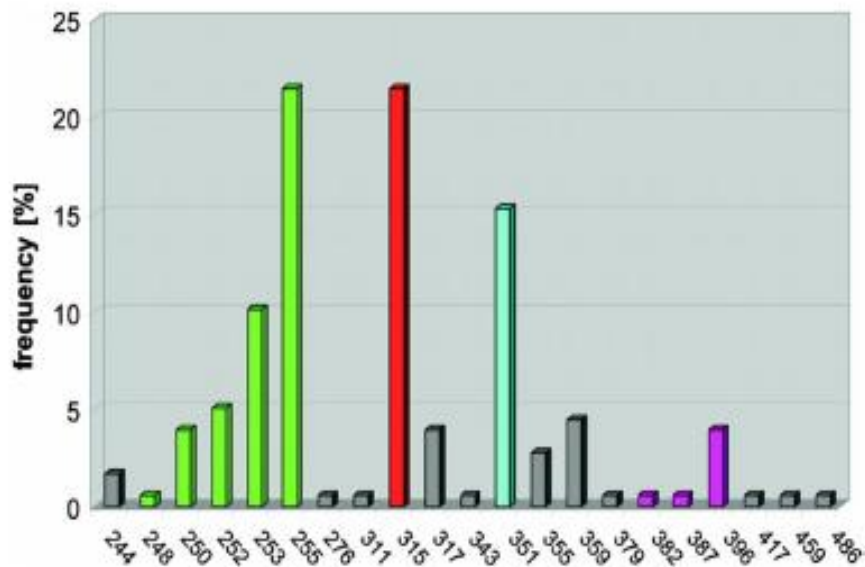
Aktivita BCR/ABL může negativně ovlivnit stabilitu genomu, např. produkcí ROS, čím déle nemoc trvá, tím vyšší riziko vzniku mutace. Léčba Imatinibem by měla mutační rychlost snížit, neboť se snižuje množství rizikových buněk i aktivita BCR/ABL. (O'Hare et al., 2007)

V současnosti je známo více než 50 pozic, kde dochází k substituci aminokyselin (AMK) vedoucích ke vzniku více než 100 typů mutací (Mathisen et al., 2011), jež se liší mírou rezistence k jednotlivým inhibitorům. Dle analýz jsou převládajícími nukleotidovými záměnami spíše transice (76,4%), než transverze (23,6%).

Ne všechny mutace v BCR/ABL však musí znamenat zásadní ovlivnění prognózy pacienta. Některé jednobodové záměny nukleotidů známé jako jednobodový polymorfismus (SNP) - např. K247R - nemusí mít vliv na signalizační funkci BCR/ABL a na vazbu TKI. (Khorashad et al., 2006)

Mimoto je zde u některých případů zaznamenána jistá heterogenita v léčebné odpovědi na stejný typ mutace u různých pacientů. Např. ve studii *JS Khorashad et al.*, (2006) pacient s mutací M244V selhával s Imatinibem, jiný pacient se stejnou mutací na léčbu Imatinibem odpovídal.

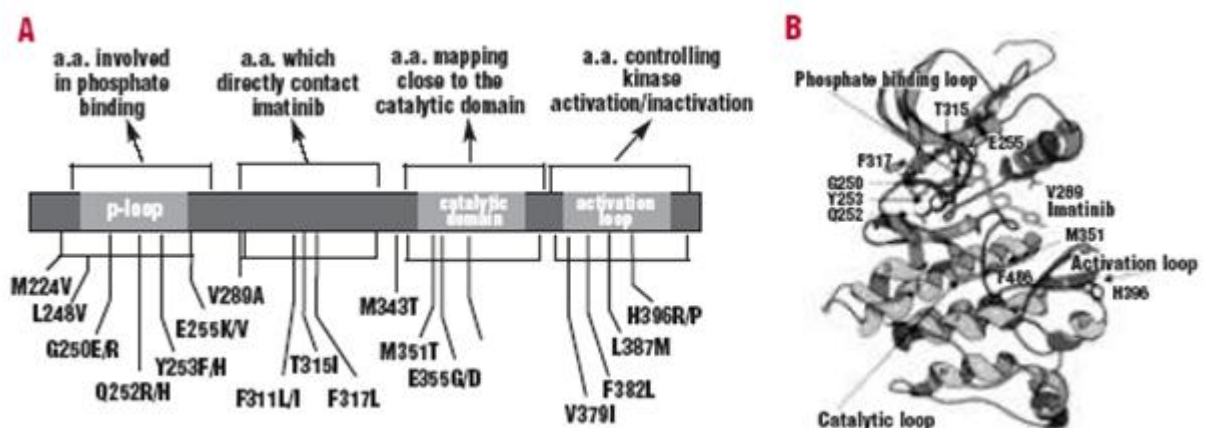
V průběhu léčby Imatinibem se nejčastěji vyskytuje 16 až 20 (Ernst et al., 2008)(Branford et al., 2009) klinicky významných mutací (nejčastěji Y253, E255, T315, M351, F359), vedoucí k alteraci P smyčky, aktivační smyčky nebo vazebného místa pro Imatinib. (Obr.8) (Deininger et al., 2005)(Redaelli et al., 2009)



Obr.8: Schéma nejčastěji se vyskytujících bodových mutací v různých oblastech BCR/ABL kinázové domény. Oblast P-smyčky(zelená), mutace T315I (červená), katalytická doména(M351T)(modře), aktivační smyčka(fialově) (Deininger et al., 2005).

Mutace se obvykle vyskytují ve 4 oblastech kinázové domény:

Nejčastěji mutovanou oblastí je tzv. P-smyčka (P-loop oblast), což je ATP vazebná oblast, dále místo přímé vazby Imatinibu, oblast katalytické domény a aktivační smyčka (A-loop). (Branford et al., 2002) (Scappini et al., 2004)



Obr.9: Distribuce nejfrekventovanějších mutací v kinázové doméně BCR/ABL (Martinelli et al., 2005)

2.2.7.1 Mutace v oblasti P-smyčky

Tato struktura je bohatá na glycin a poměrně flexibilní, zasahující od AMK 244 po 255. Představuje oblast zahrnující asi 36-48% mutací rezistentních k Imatinibu a je tedy považována za nejfrekventovanější mutovanou část BCR/ABL. V porovnání s nemutovanou BCR/ABL mají tyto mutanty vyšší transformační potenciál a vykazují na základě *in vitro* testů až 100x nižší senzitivitu k Imatinibu. Byla prokázána výrazně zvýšená transformační aktivita mutací v pořadí: Y253F > E255K > nemutovaný BCR/ABL \geq T315I > H396P > M351T. (Cang a Liu, 2008) (Branford et al., 2002)

Mutace P-smyčky jsou obecně asociovány se špatnou prognózou a vyšším rizikem progresu.

Dasatinib a Nilotinib prokázaly odlišnou aktivitu proti mnoha mutacím, a to včetně těch, jež jsou lokalizovány právě v této oblasti. Odpověď především na Dasatinib nebývá snížena, a proto je v těchto případech zřejmě lékem volby - konkrétně zejména u pacientů s mutací např. Y253H a F359C/V rezistentních na Imatinib i Nilotinib. Oproti tomu u mutací rezistentních k Dasatinibu, jako je F317L/V, V299L a T315A je vhodné zvolit pro léčbu právě Nilotinib či Imatinib. (Branford et al., 2003) (Jabbour et al., 2009)

2.2.7.2 Mutace v místě kontaktu BCR/ABL s Imatinibem

Významný klinický problém představují mutace lokalizované v místě přímé vazby Imatinibu s BCR/ABL. T315I je vůbec nejfrekventovanější mutací (14%), jež je navíc vysoce rezistentní ke všem doposud komerčně dostupným TKI. Záměna threoninu za hydrofobnější isoleucin odstraní z BCR/ABL důležitý vodíkový můstek a tím je znemožněna vazba TKI a jejich interakce s ATP vazebným místem.

Mutace T315I je spojena s vysoce agresivním průběhem choroby a se špatnou prognózou pacientů, která je dále odvislá od aktuálního stádia choroby. Při zjištění mutace T315I je v současné době vhodné urychleně hledat dárce a připravovat nemocného na alogenní transplantaci krvetvorných buněk. (Deininger et al., 2005)

Další potenciální možností by v budoucnu mohly být již zmiňované inhibitory aurora kinázy, jež jsou ale zatím pouze ve stadiu klinického testování.

Všechny inhibitory potřebují k vazbě také M318, avšak mutace v tomto místě zatím nebyla nalezena. Mutace v T315 mají sice sníženou aktivitu samotné kinázy, ale poskytují

vysokou ochranu. Nicméně spektrum mutací rezistentních ke všem TKI bude pravděpodobně velice malé. (O'Hare et al., 2007)

2.2.7.3 Mutace katalytické domény a A-smyčky

Velmi často (asi 10%) se také vyskytuje mutace M351T lokalizovaná v SH2 ABL katalytické doméně, vykazuje však poměrně nízkou rezistenci. Zvažovanou léčebnou možností u těchto typů mutací (dle doporučení ELN) je zvýšení dávky Imatinibu na 600-800mg denně.

Čtvrtou skupinou, zahrnující AMK 379-398, jsou mutace A-smyčky. Tato doména reguluje svým konformačním stavem aktivaci kinázové funkce BCR/ABL. Mutace H396P/R, která je zodpovědná za stabilizaci A smyčky v aktivní konformaci, znemožňuje tak vazbu Imatinibu. (Deininger et al., 2005)

2.2.8 In vitro testování mutací

Vznik mutací může vést k opětovné iniciaci BCR/ABL kinázové aktivity a tím k progresi onemocnění. Metodami přímého sekvenování kompletní BCR/ABL kinázové domény jsme dnes schopni detekovat jednotlivé nebo vícenásobné mutace u relabujících pacientů a případně změnit léčbu.

Na základě několika studií, která analyzovaly mutační spektra u pacientů s rezistencí na Imatinib, bylo zjištěno, že je možné do jisté míry predikovat jejich účinnost *in vitro* (O'Hare et al., 2007). Citlivost mutací k TKI lze pak rozlišit na základě hodnot koncentrace IC_{50} , což je koncentrace léku, která inhibuje růst buněčné linie z 50%. (Obr.10) Tato zjištění umožňují, aby pacient s individuální mutací dostal takovou terapii, jež mu poskytne největší pravděpodobnost úspěšné léčby (jde o tzv. terapii šitou na míru).

	Ba/F3 cellular proliferation IC ₅₀ values		
	imatinib (nM)	nilotinib (nM)	dasatinib (nM)
Native Bcr-Abl	260	13	0.8
244M>V	2000	38	1.3
250G>E	1350	48	1.8
252Q>H	1325	70	3.4
253Y>F	3475	125	1.4
253Y>H	>6400	450	1.3
255E>K	5200	200	5.6
255E>V	>6400	430	11
299V>L	540 ^r	nd	18 ^r
311F>L	480	23	1.3
315T>A	971	61	125 ^r
315T>I	>6400	>2000	>200
317F>L	1050	50	7.4
317F>V	350 ^r	nd	53 ^r
315M>T	880	15	1.1
355E>G	2300 ^r	nd	1.8 ^r
359F>V	1825	175	2.2
379V>I	1630	51	0.8
387L>M	1000	49	2
396H>P	850	41	0.6
396H>R	1750	41	1.3

■ Sensitive
■ Intermediate sensitivity
■ Insensitive

Obr.10: Senzitivita klinicky nejvýznamnějších mutací BCR/ABL k tyrozin kinázovým inhibitorům. (Deininger et al., 2005)

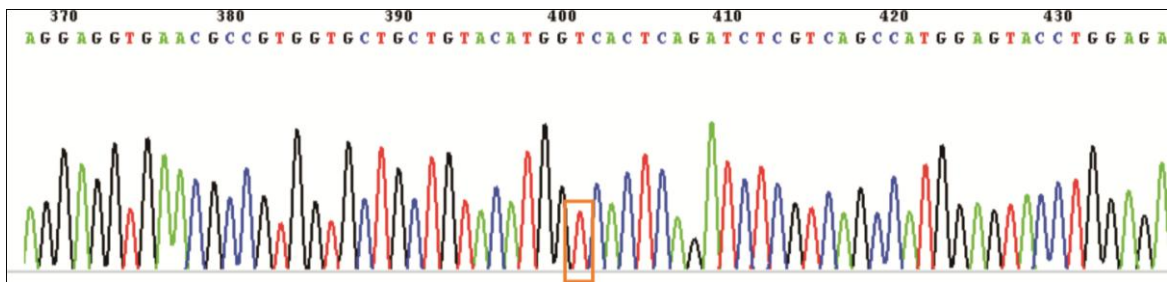
2.2.9 Detekce Mutací v BCR/ABL kinázové doméně

U pacientů s CML léčených TKI je sledována nejen přítomnost, ale také i hladina BCR/ABL transkriptů. K průběžnému sledování a kvantifikaci MRN je využívána technika kvantitativní PCR v reálném čase s použitím fluorescenčně značených hybridizačních TaqMan sond.

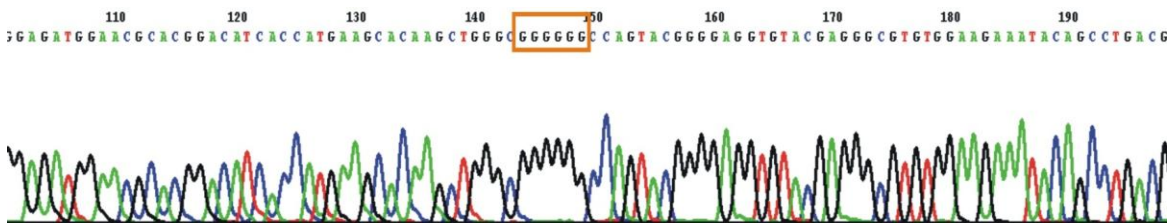
Díky vysoce senzitivním metodám real time RT-PCR a přímému sekvenování, jsme schopni detekovat mutace již na velmi nízké hladině MRN.

K detekci mutací v ABL kinázové doméně se využívá techniky dvoukolové nested PCR. Výsledný PCR produkt je přímo sekvenován na kapilárním sekvenátoru ABI3130. Získaná sekvence je srovnávána s referenční sekvencí genu ABL.

V naší Laboratoři molekulární diagnostiky - Chambon byly detekovány u dvou pacientů zcela nové a doposud nepopsané mutace, jejichž biologické vlastnosti jsou dosud neznámé, a to mutace A344V a inserce guaninu(G) za nukleotidovou pozicí 752.



Obr.11: Mutace **A344V** – doposud nepopsaná mutace, neznámá citlivost na TKI
 Aminokyselinová záměna A344V, mění smysl původního kodonu pro alanin (GCC) za valin (GTC). (pořízeno v laboratoři molekulární diagnostiky Chambon, 2010)



Obr.12: **Q252fs (Inserce G za nukleotidovou pozicí 752)** doposud nepopsaná mutace, neznámá citlivost na TKIs. Tato inserce vede k posunu čtecího rámce po 252 AMK. Zkrácenému BCR/ABL produktu zcela chybí místo pro kontakt s Imatinibem, rovněž mu chybí celá katalytická doména a aktivační smyčka. (pořízeno v laboratoři molekulární diagnostiky Chambon, 2010)

3. Cíle práce

Cílem této práce je vyvinout funkční metodiku pro in vitro testování biologických vlastností a farmakologické odpovědi nově detekovaných mutací v kinázové doméně BCR-ABL a stanovit hladinu jejich rezistence k současně používaným TKI.

Postup práce:

- Vyklonovat nové BCR/ABL varianty
- Následná exprese konstruktů v Ba/F3 IL-3 dependentní linii
- Test senzitivity transgenních linií na TKI (Nilotinib, Dasatinib)

4. Materiál a Metody

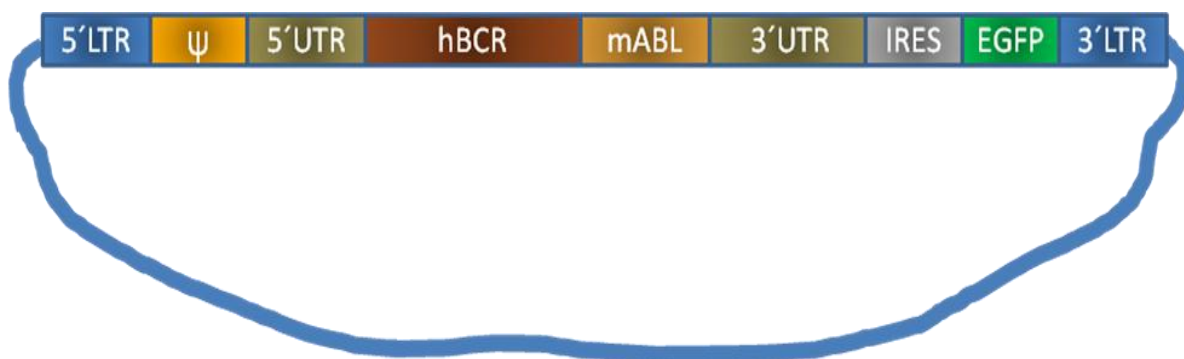
In vitro byly testovány dvě nové mutace **A344V** a **Q252fs** diagnostikované v naší Laboratoři molekulární diagnostiky-Chambon. Převzaty byly další 2 doposud nepopsané mutace L364I a M496I z publikace Blood, z roku 2010 (Jones et al., 2010). Jako kontroly byly do testování zavzaty nemutovaná (wild type; wt) BCR/ABL a další již známé mutace BCR/ABL jako je např. T315I, Q252H a M351T.

Mutované varianty Abl:

wild type BCR/ABL		senzitivní
c.1052T>C	p.Met351Thr	senzitivní
c.756G>T	p.Gln252His	středně senzitivní
c.944C>T	p.Thr315Ile	rezistentní
c.752dupG	p.Gln252fs	
c.1031C>T	p.Ala344Val	
c.1090C>A	p.Leu364Ile	
c.1488G>A	p.Met496Ile	

pMIG hBCR/mABL wt– EGFP konstrukt, použitý pro místně cílenou mutagenzu nám poskytl Dr. Nikolas Von Bubnoff a Justus Duyster (Mnichov, DE). Inset hBCR/mABL (4812-bp) obsahuje chimérický gen, složený z lidského BCR a myšího ABL, jehož produkt je co do aminokyselinového složení prakticky identický s lidským, s výjimkou záměny v jedné AMK, jež však dle dosavadních studií nemá pravděpodobně zásadní efekt na funkci ABL či BCR/ABL. Výsledkem je Bcr/Abl wild type protein o velikosti 185kDa. (von Bubnoff et al., 2006)(von Bubnoff et al., 2005)

Úplný konstrukt pMIG hBCR/mABL wt - EGFP obsahuje přibližně 11 500bp. (Obr.13)



Obr.13: pMIG hBCR/mABL wt – EGFP konstrukt (11 500 bp)

4.1 Místně cílená mutageneza

Pro mutagenezu byl hBCR/mABL překlonován přes EcoRI restrikční místa do menšího vektoru- pCR2.1 o velikosti 3929bp (Invitrogen).

K získání mutantních variant pMIG hBCR/mABL- EGFP konstruktů pomocí techniky místně cílené mutageneze byl využit komerční QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit (Promega) a Phusion Flash PCR Master Mix (FINNZYMES) dle manuálu výrobce s využitím Thermal cycleru C1000 (BIO-RAD)..

Tato PCR metoda umožňuje cílenou modifikaci DNA a je využívána k vytváření specifických bodových mutací, vedoucích ve výsledku k záměnám AMK, delecím či insercím AMK. Pracuje se s dvouvláknovou vektorovou DNA obsahující gen, který má být mutován. V našem případě se jednalo o pMig BCR/ABL wt- EGFP konstrukt.

Pro reakci byly navrženy specifické mutační primery v programu Vector NTI Advance 11.

Technikou PCR rolling cycle (obr.14) jsou dle manuálu tyto syntetické primery prodlužovány pomocí DNA polymerasy PfuTurbo® DNA polymerase, pro potřeby této práce byl však tento postup modifikován. Pro vlastní PCR reakci jsme využili Phusion Flash PCR Master Mix (FINNZYMES) obsahující velmi přesnou a vysoce procesivní Phusion Flash DNA Polymerázu. Chybovost této polymerázy je přibližně 3x nižší v porovnání s PfuTurbo polymerázou.

Reakční schéma PCR:

- Templát (pMig BCR/ABL wt-EGFP) 8 μ l
 - Flash PCR Master Mix 10 μ l
 - Mutační Primer - Forward 1 μ l
 - Mutační Primer - Reverse 1 μ l
- ⇒ Konečný objem reakce: **20 μ l**

Počet cyklů	Jednotlivé kroky	Teplota	Čas
1	Iniciační denaturace	95°C	1 min
25	Denaturace	95°C	1 min
	Nasednutí primerů	58°C	0,5 min
	Elongace	72°C	3 min
1	Poslední krok/ Závěr	72°C / 4°C	1 min/ inkubace

(čas/doba elongace polymerázy – 1 min. na 4-kb DNA, při 72°C)

K PCR produktu byl přidán 1 μ l Dpn I restriktázy, jež je specifická pro methylovanou a hemimethylovanou DNA a v našem postupu sloužila ke štěpení nemutované templátové DNA. Tímto mechanismem byly získány nově nasynthetizované mutované DNA, které byly následně vneseny chemickou transformací do kompetentních buněk *E.coli*.

Následně byl hBCR/mABL inzert sekvenačně ověřen a zaligován pomocí T4 DNA ligázy (Fermentas) zpět do původní pMIG-EGFP kostry.

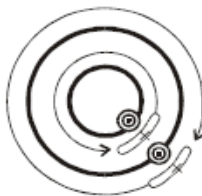
1. templátový plasmid
nesoucí gen, který má být
mutován



2. mutační komplementární
primery s nukleotidovou
substitucí v příslušném místě



3. PCR- rolling cycle



4. štěpení DpnI restriktázou



5. nově nasyntetizovaný
plasmid nesoucí mutovaný
gen



Obr.14: Místně cílená mutageneza technikou PCR „rolling cycle“
(QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit)

4.2 Transformace pMig hBCR/mABL-EGFP do kompetentních buněk

K transformaci byly použity komerční One Shot TOP10 kompetentní *E.coli* buňky (Invitrogen). Kompetentní *E.coli* buňky v alikvotech 50 μ l byly skladovány v -80°C . Transformace byla provedena dle návodu výrobce takto:

Zkumavky s *E.coli* byly umístěny na led. Po rozmražení (přibližně 2 až 4 minuty) byly k buňkám přidány 4 μ l PCR produktu a dále byly inkubovány na ledu po dobu 30 minut. Poté byly umístěny na 40 vteřin do 42°C vodní lázně („Heat shock“) a opět na 2 minuty na led. Následně se ke směsi připipetovalo 250 μ l S.O.C. Media (součást KITu). Zkumavky byly upevněny ve vyhřívané třepačce (IKA KS 4000i, Schoeller) a inkubovány při 37°C , 225 rpm přibližně 60 minut. Mezitím byly misky s připraveným LB agarem vytemperovány v inkubátoru (Sanyo, Schoeller) na teplotu 37°C . Po jedné hodině bylo napipetováno na misky 40 μ l Carbenicilinu (100 mg/ml) a přidána ligační směs. Misky s transformovanými *E.coli* byly inkubovány při 37°C přes noc.

Narostlé kolonie buněk byly druhý den zaočkovány do LB média s přidáním Carbenicilinem (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) a inkubovány při 37°C a 250 rpm ve vyhřívané třepačce přes noc.

Třetí den byly narostlé buněčné kultury izolovány a purifikovány pomocí QIAprep Miniprep KITu (Qiagen) dle manuálu výrobce. Pro ověření úspěšnosti správného zpětného překlonovalí byly vypurifikované plazmidy restriktivně ověřeny pomocí XbaI restriktázy. Správně zaklonované vektory byly do vysokých koncentrací replikovány v bakteriální kultuře a po kultivaci byly izolovány pomocí QIAGEN Plasmid Midi/Maxi KIT.

Úspěšný proces mutagenese, transformace a ligace mutovaného hBCR-mABL insertu zpět do původního pMIG-EGFP konstruktů byl ověřen sekvenováním výsledného maxipreparátu v koncentraci $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ s použitím dostupných primerů:

- Abl_G1852A-F
- Abl_C1454A-F
- MIG mAbl- F01
- MIG mAbl - F02
- MIG mAbl- R
- MIG mAbl- F03

- MIG mAbl- F04
- MIG hBCR- R01
- MIG hBCR- F
- MIG hBCR- R02
- MIG hBCR- R03
- LXI 587

K sekvenaci byl využit Big Dye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing KIT (Applied Biosystems). PCR reakce probíhala v Thermal cycleru C1000 (BIO-RAD) podle reakčního schématu:

- Vypurifikovaný konstrukt(0,1µg/µl)	5 µl
- Big Dye Premix	4 µl
- Primer	1 µl
⇒ celkový objem rce	10 µl

Počet cyklů	Jednotlivé kroky	Teplota	Čas
1	Iničiační denaturace	95°C	5 min
35	Denaturace	95°C	0,5 min
	Nasednutí primerů	53°C	0,5 min
	Elongace	60°C	4 min
1	Poslední krok/ Závěr	15°C	Inkubace

Výsledný produkt byl následně analyzován na ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (AB, Hitachi) a získané sekvence byly porovnány s původním plazmidem.

Připravené mutované pMIG hBCR/mABL – EGFP konstrukty byly použity pro transfekci do Ba/F3 buněčné linie.

4.3 Příprava stabilních klonů

Retrovirové konstrukty nesoucí klonované varianty BCR/ABL kinázové domény byly transientně transfekovány do „pakážovací“ buněčné linie EcoPack (Clontech, USA).

Buněčná linie EcoPack byla kultivována v DMEM (Sigma, DE) s přidavkem 10% fetálního bovinního séra (PAA, AT), glutaminu a směsi penicilinu a streptomycinu (Sigma, DE) do 70% konfluence. Transientní transfekce retrovirových konstruktů byla provedena pomocí Lipofectamine 2000 (Invitrogen, UK), podle návodu výrobce. Druhý den po transfekci byly sklizeny supernatanty obsahující retrovirové partikule nesoucí transgen a naneseny na recipientní buňky Ba/F3 (DSMZ, Braunschweig, DE, ACC 300). Supernatanty byly sklizeny v dalších dvou dnech, čímž byla provedena opakovaná retrovirová transdukce. Přítomnost transgenu v recipientních Ba/F3 buňkách byla detekována pomocí zelené fluorescence EGFP exprimovaného z konstruktů, umístěného za sekvenci IRES (Internal Ribosome Binding Site). Exprese divokého typu BCR/ABL a nebo jeho aktivačních variant měla za následek ztrátu vitální závislosti buněk Ba/F3 na IL-3, čehož bylo využito jako selekčního tlaku při kultivování polyklonálních populací Ba/F3 exprimujících funkční transgen BCR/ABL a jeho varianty.

4.4 Měření proliferace Ba/F3-pMIG hBCR/mABL- EGFP s TKI

Všechny experimenty Ba/F3-pMIG hBCR/mABL-EGFP byly prováděny v kvadruplikátech. Buňky byly kultivovány ve 100 μ l v 96 jamkových mikrotitračních destičkách (40 000 buněk na jamku) při 37°C a při 5% CO₂ v inkubátoru Sanyo (Schoeller). V přítomnosti různých koncentrací TKI (Nilotinib, Dasatinib) byly buňky inkubovány 72 hodin. Tyrosin kinázové inhibitory byly rozpuštěny v DMSO (dimethyl sulfoxid), připraveny jako 10 mM zásobní roztoky a skladovány v -20°C.

Tyrosin kinázové inhibitory:

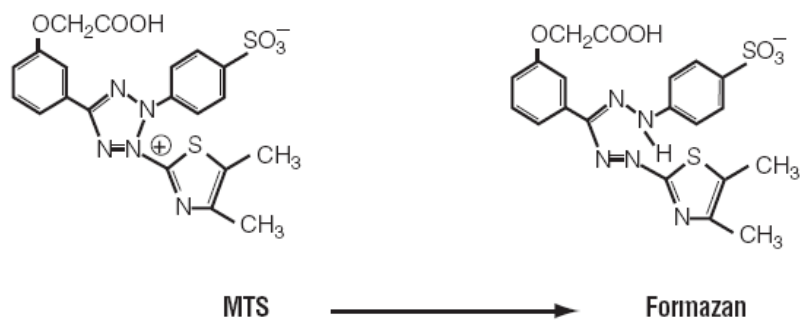
- Nilotinib (AMN107)- (Tasigna; Novartis Pharmaceuticals, Basel, Switzerland)
- Dasatinib (BMS-354825)- (Sprycel; Bristol Myers Squibb, New York)

Použité koncentrace TKI:

- Nilotinib - 50, 150, 450, 600 nM

- Dasatinib -1, 10, 50, 100 nM

Pro *in vitro* měření efektu tyrozin kinázových inhibitorů na proliferaci transfekovaných Ba/F3 buněk byla použita CellTiter 96 AQueous One solution Cell Proliferation Assay (Promega). Jedná se o kolorimetrickou metodu stanovení koncentrace viabilních buněk v médiu. Koncentrace buněk je měřena na základě monitorace aktivity mitochondriálních dehydrogenas, jež metabolizují MTS (methyltetrazoliová sůl, součást KITu) a redukují ji na modrofialový formazan, jenž se uvolňuje do média. Konverze MTS je dána přítomností NADPH nebo NADH produkované dehydrogenázami v metabolicky aktivních buňkách.

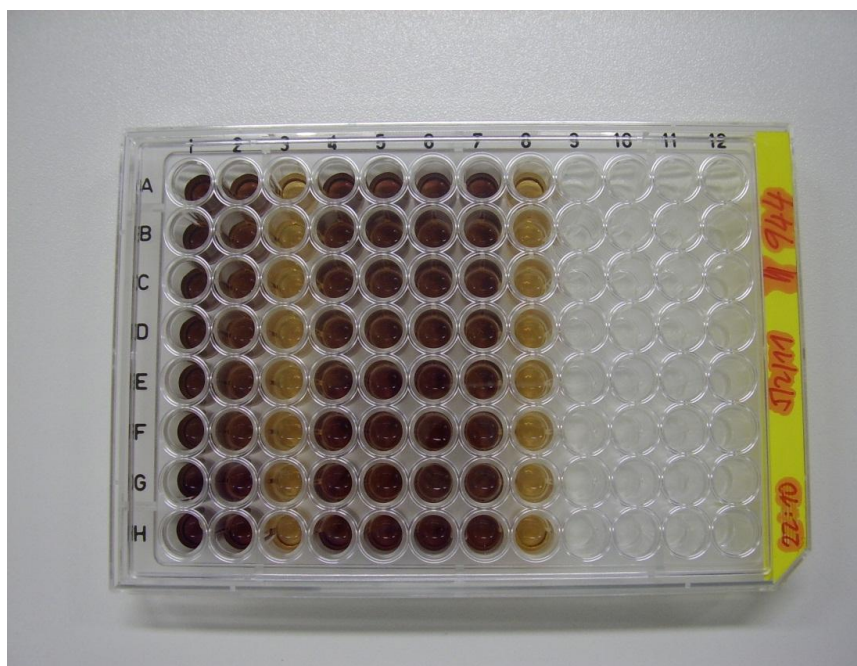


Obr.15: MTS tetrazolium redukováný na Formazan.

(CellTiter 96 AQueous One solution Cell Proliferation Assay)

Měření bylo provedeno dle doporučení výrobce. Po 72 hodinách inkubace s inhibitory bylo k buňkám s TKI připipetováno 20 μ l vytemperovaného CellTiter 96 AQueous One solution činidla a následovala inkubace při 37°C po dobu 1-4 hodin.

Obrázek 16 ukazuje Ba/F3- pMIG hBCR/mABL T315I -EGFP kultivované s inhibitory, dvě hodiny po přidání MTS. Živé buňky jsou zabarveny do modrofialova.



Obr.16: Měřená Destička: Ba/F3- pMIG hBCR/mABL T315I -EGFP s TKI
(pořízeno v laboratoři molekulární diagnostiky Chambon,2011)

Spektrofotometrické hodnocení bylo provedeno na iMark- microplate Reader (BIO-RAD), zaznamenávajícím absorbanci při 490nm. Pro stanovení pozadí měření byly připraveny kontrolní vzorky, které obsahovaly pouze médium bez TKI, a dále byly připraveny jamky obsahující transfekované Ba/F3 bez přítomnosti TKI jako kontrola buněčného růstu.

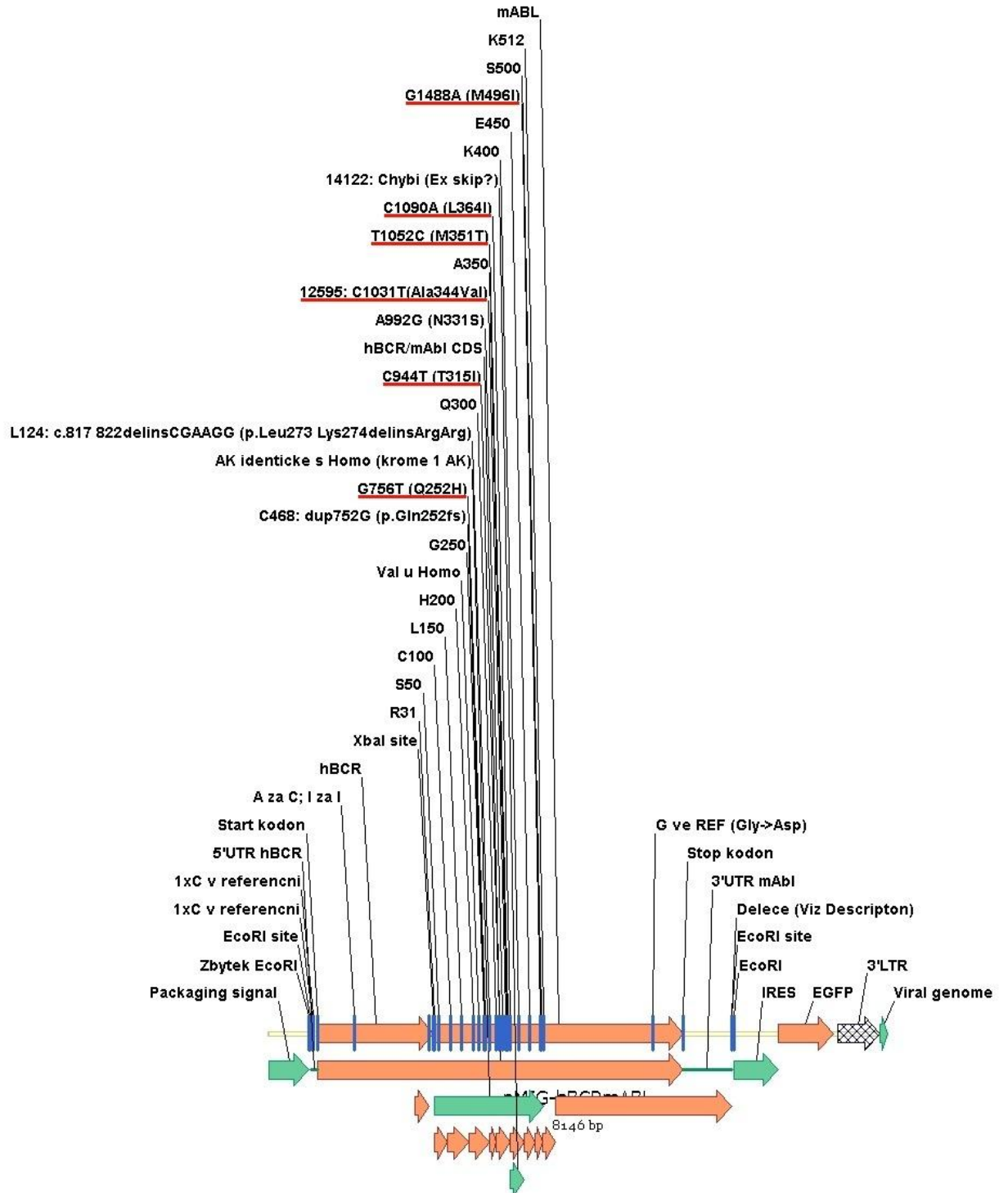
Pro zpracování naměřených hodnot byl použit Microplate Manager 6 Software (BIO-RAD).

Buněčná linie Ba/F3 byla pro testování zvolena na základě předešlých publikovaných *in vitro* studií TKI. (von Bubnoff et al., 2006)(von Bubnoff et al., 2005)(O'Hare et al., 2005)

Zaměřili jsme se především na TKI druhé generace (Nilotinib, Dasatinib) vzhledem k faktu, že pacientům je téměř vždy podáván v první linii léčby právě Imatinib, vůči němuž u námi testovaných pacientů vznikla rezistence.

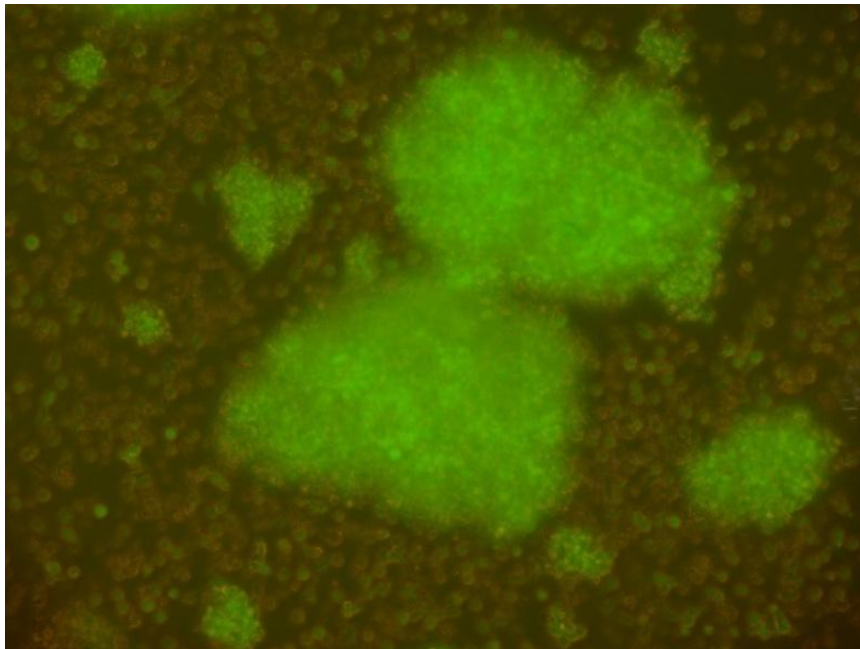
5. Výsledky

Schéma zaklonovaných mutací v kinázové doméně hBCR/mABL.

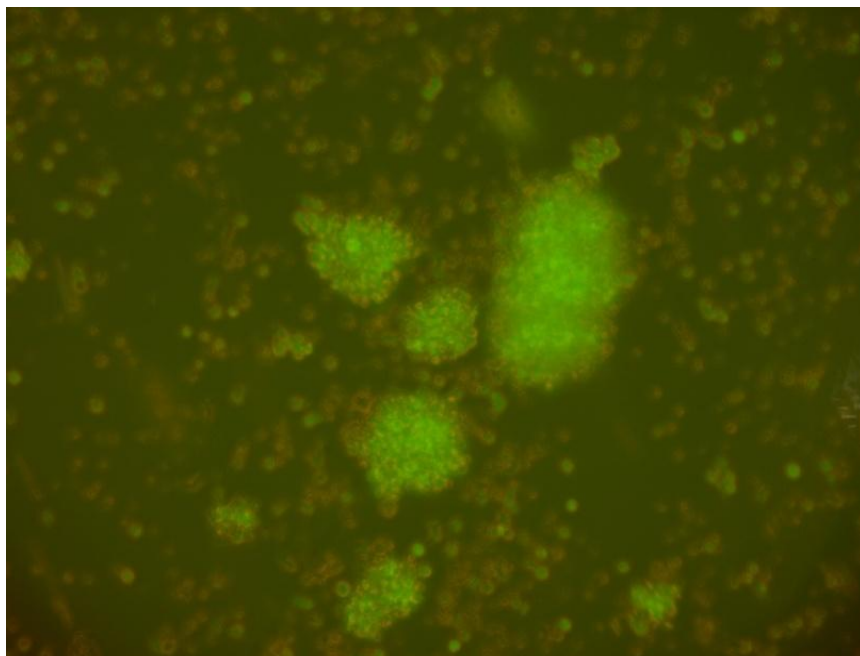


Obr.17: pMIG hBCR/mABL wt – EGFP konstrukt s definovanými místy mutací
(Vytvořeno v programu Vector NTI Advance 11, 2010)

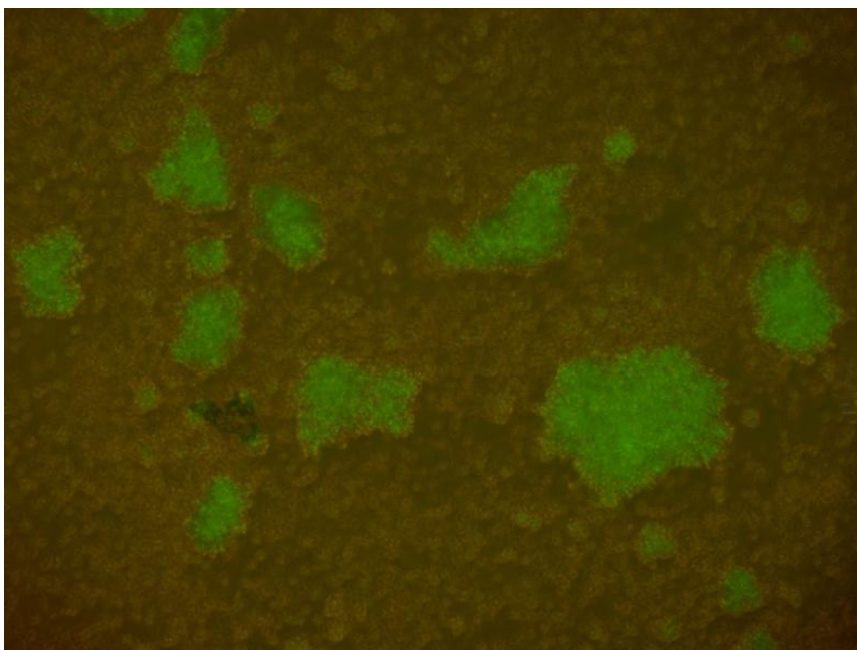
Vizuální kontrola účinnosti transfekce pMIG hBCR/mAbl-EGFP konstruktů do Ba/F3 lymfoidní buněčné linie byla provedena detekcí EGFP pomocí fluorescenčního mikroskopu (Olympus CKX41).



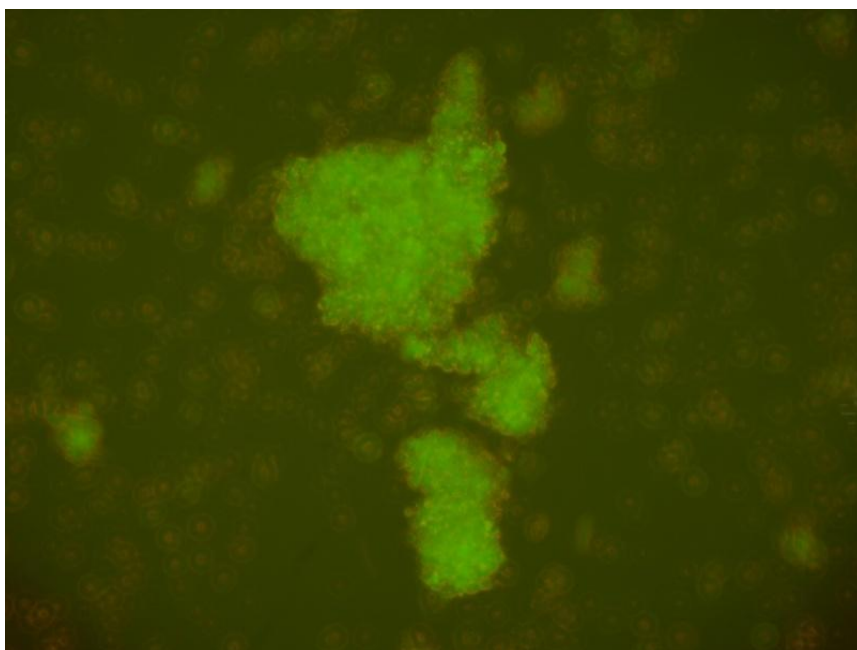
Obr.18: Stabilní polyklon **Ba/F3 - pMIG hBCR/mABL wt- EGFP**
(pořízeno v laboratoři molekulární diagnostiky Chambon,2010)



Obr.19: Stabilní polyklon **Ba/F3 - pMIG hBCR/mABL T315I- EGFP**
(pořízeno v laboratoři molekulární diagnostiky Chambon,2010)



Obr.20: Stabilní polyklon **Ba/F3 - pMIG hBCR/mABL A344V-EGFP**
(pořízeno v laboratoři molekulární diagnostiky Chambon,2010)



Obr.21: Stabilní polyklon **Ba/F3 - MIG hBCR/mABL Q252fs –EGFP**
Fotka pořízena v stadiu kdy buňky rostly stále ještě v přítomnosti IL-3
(pořízeno v laboratoři molekulární diagnostiky Chambon,2010)

Úspěšná transfekce byla ověřena selekcí - Ba/F3 buňky exprimující daný konstrukt rostly i bez přítomnosti IL-3. Výjimkou byla linie Ba/F3-pMIG hBCR/mABL **Q252fs –EGFP**. Buňky bez přítomnosti IL-3 dále nerostly a postupně odumíraly.

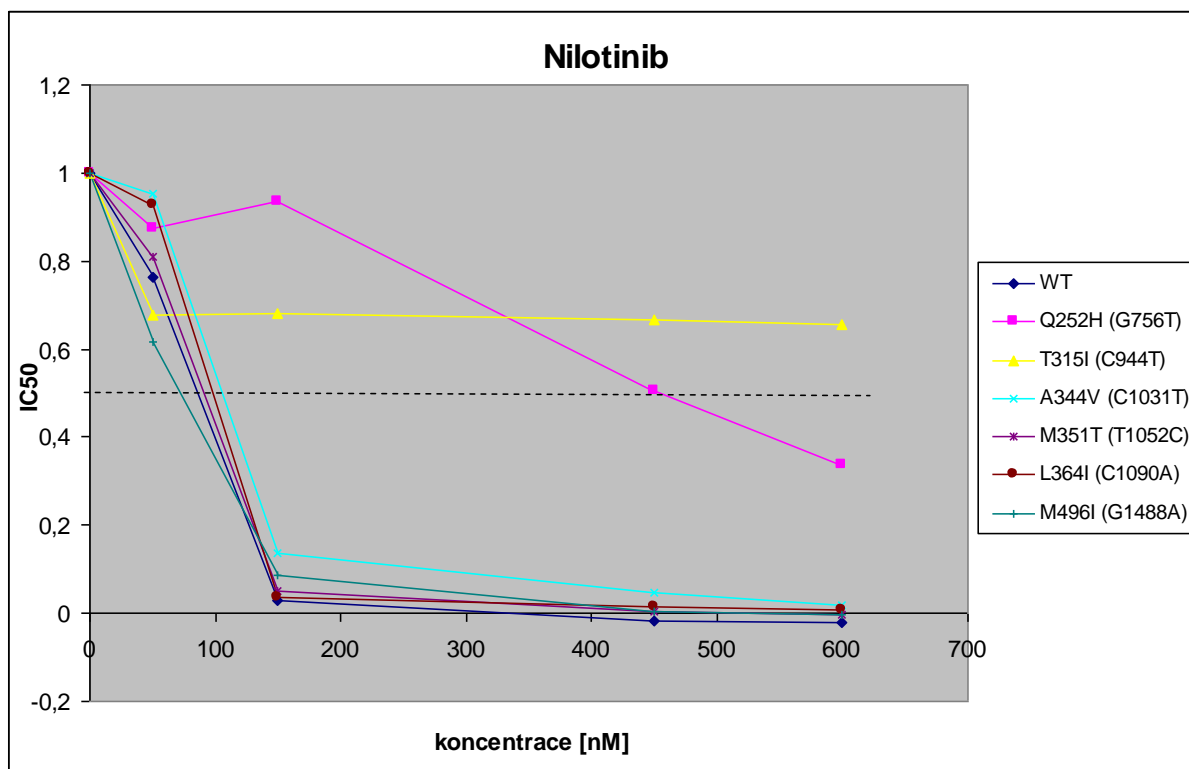
5.1 Senzitivita buněčných linií k TKI

Muster	1	2	3	4	5	6
A	Ba/F3 bez TKI	Nilo 50	Nilo 450	Dasa 1	Dasa 50	RPMI bez buněk
B	Ba/F3 bez TKI	Nilo 50	Nilo 450	Dasa 1	Dasa 50	RPMI bez buněk
C	Ba/F3 bez TKI	Nilo 50	Nilo 450	Dasa 1	Dasa 50	RPMI bez buněk
D	Ba/F3 bez TKI	Nilo 50	Nilo 450	Dasa 1	Dasa 50	RPMI bez buněk
E	Ba/F3 bez TKI	Nilo 150	Nilo 600	Dasa 10	Dasa 100	RPMI bez buněk
F	Ba/F3 bez TKI	Nilo 150	Nilo 600	Dasa 10	Dasa 100	RPMI bez buněk
G	Ba/F3 bez TKI	Nilo 150	Nilo 600	Dasa 10	Dasa 100	RPMI bez buněk
H	Ba/F3 bez TKI	Nilo 150	Nilo 600	Dasa 10	Dasa 100	RPMI bez buněk

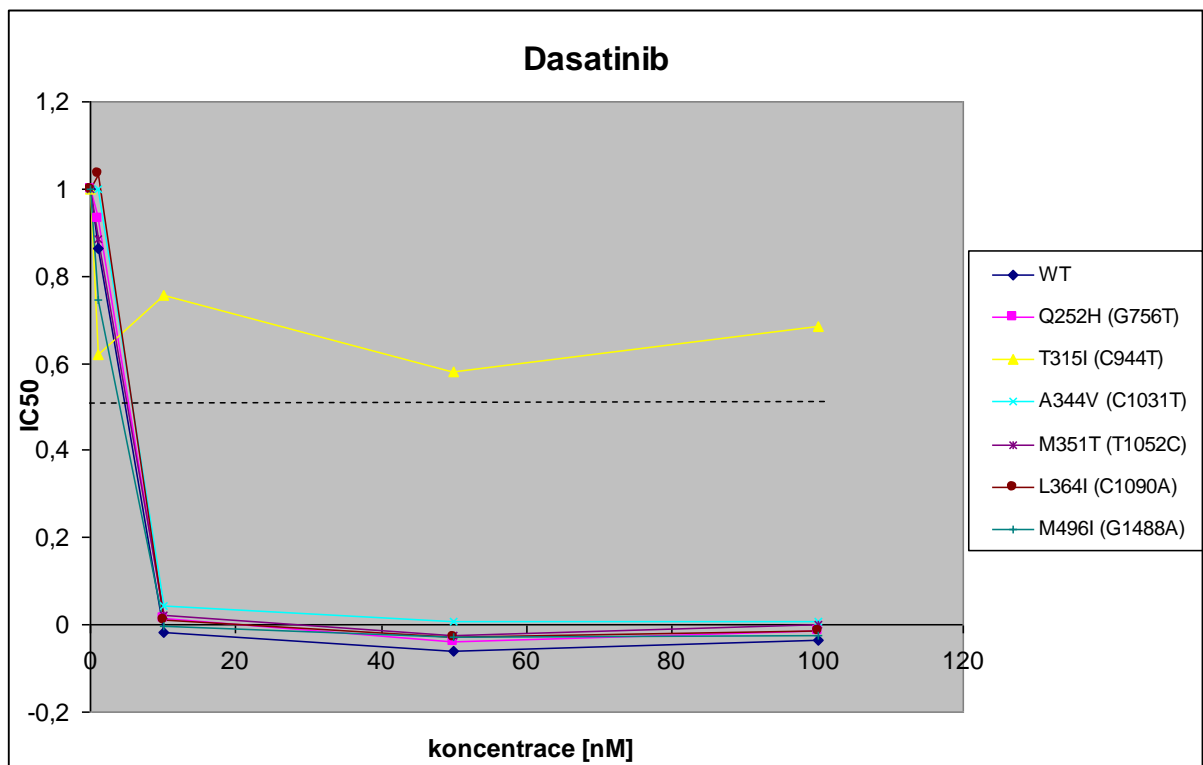
Tabulka 1: Schéma koncentrací TKI (v nM) přidávaných k buňkám v 96 jamkové destičce.

Hrubá data naměřená Microplate Manager 6 Softwarem (BIO-RAD) byla následně vyhodnocena. Naměřené hodnoty samotného média bez buněk byly brány jako pozadí a odečteny od ostatních skupin. Z vyhodnocených dat byly připraveny grafy.

Hodnoty testovaných skupin byly vztaženy ke skupině buněk, které rostly bez inhibitorů. Hodnota 1 představuje 100%, což odpovídá buněčnému růstu bez přítomnosti inhibitorů. Koncentrace IC_{50} je koncentrace TKI, která inhibuje růst buněčné linie z 50%



Graf.1: Viabilita Ba/F3 buněk exprimujících různé mutované varianty hBCR/mABL v přítomnosti Nilotinibu.



Graf.2: Viabilita Ba/F3 buněk exprimujících různé mutované varianty hBCR/mABL v přítomnosti Dasatinibu.

Vyhodnocení senzitivity mutací k Nilotinibu a Dasatinibu na základě hodnoty IC₅₀.

Mutace	Nilotinib	Dasatinib
T315I (C944T)	>600	>100
Q252H (G756T)	458	5,5
M351T (T1052C)	92	5,1
WT	87	4,8
A344V (C1031T)	105	6
L364I (C1090A)	98	5,9
M496I (G1488A)	71	3,9
Q252fs (752dupG)	neaktivní	

Tabulka 2: Mutace senzitivní (zelená), středně senzitivní (žlutá), rezistentní (červená).

Nově testované mutace vyznačeny modře.

6. Diskuze

V současné době je u relabujících pacientů s CML prováděno testování senzitivity tyrosin kinázových inhibitorů na kultivovaných hematopoetických buňkách pacienta.

Ve většině případů se progrese onemocnění dostavuje ve spojitosti se vznikem mutací v BCR/ABL kinázové doméně. V současnosti je známo přibližně 100 různých typů mutací, tento počet se však neustále zvyšuje. (Mathisen et al., 2011)(Branford et al., 2009)

Většina těchto mutací způsobuje rezistenci zejména proti Imatinibu, protože Imatinib je první linií léčby CML a tudíž terapie selektuje mutanty primárně vůči němu. TKI druhé generace (Nilotinib a Dasatinib) vykazují v klinických studiích vysokou účinnost proti většině mutant rezistentních vůči Imatinibu. Výjimku tvoří zejména mutace T315I, jež vykazuje výraznou rezistenci ke všem dosud užívaným TKI.

K detekci mutací přistupujeme především v okamžiku, kdy sledovaná MRN začíná ukazovat na relaps onemocnění, případně u pacientů dlouhodobě refrakterních na léčbu. Za této situace přistupujeme k sekvenčnímu vyšetřování stavu kinázové domény.

V uplynulých letech bylo provedeno několik různých studií, které se zabývaly testováním senzitivity TKI in vitro technikami, cílem bylo zejména porovnání jejich účinnosti vůči různým mutacím v BCR/ABL. (O'Hare et al., 2005)

Hodnocení senzitivity TKI je možné na několika úrovních. V naší studii jsme se zaměřili na testování účinku sekundárních inhibitorů Nilotinibu a Dasatinibu ke zcela novým nepopsaným BCR/ABL mutacím, které byly detekovány u pacientů rezistentních k Imatinibu.

Zkoumány byly dvě mutace A344V a Q252fs diagnostikované naší laboratoří a dvě mutace L364I a M496I z publikace Blood z roku 2010. (Dan Jones et al., 2010) Pro ověření funkčnosti našeho testování jsme použili jako kontrolu BCR/ABL wild type a několik dalších známých mutací T315I, Q252H a M351T s definovanou senzitivitou k TKI

Využitím techniky místně cílené mutagenese byly zaklonovány konkrétní mutace v arteficiálně připraveném hBCR/mABL. Tento fúzní chimérický gen byl připraven specificky pro in vitro testování a je složen z lidského BCR genu a myšičího ABL. (von Bubnoff et al., 2006)(von Bubnoff et al., 2005) Častou volbou pro transfekci konstruktem s hBCR/mABL bývají z tohoto důvodu myšičí hematopoetické buněčné linie.

V našem případě byl pMIG hBCR/mABLwt – EGFP konstrukt a jeho další mutované varianty zatransfekovány do Ba/F3 hematopoetických lymfoidních myších buněk.

Tyto buňky za běžných podmínek vyžadují ke svému růstu médium doplněné o interleukin-3. Bez přítomnosti IL-3 rapidně odumírají. Funkční onkoprotein Bcr-Abl svou aktivitou ruší závislost buněk na tomto faktoru, inhibice onkoproteinu pak závislost na IL-3 obnovuje. Pokračující růst Ba/F3 buněk i po odebrání IL-3 je tedy zjevným markerem exprese BCR/ABL. (Cortez et al., 1995)(Daley a Baltimore, 1988)(Klucher et al., 1998)

Signální sekvence EGFP, jež je součástí našeho pMIG hBCR/mABL- EGFP konstruktů nám umožnila vizualizovat úspěšně transfekované a proliferující Ba/F3 buňky. Transfekce proběhla úspěšně u všech konstruktů.

Téměř ve všech případech buňky exprimující daný konstrukt rostly nadále i bez přítomnosti IL-3. Výjimku tvořila pouze linie Ba/F3-pMIG hBCR/mABL G252fs-EGFP. Tyto buňky po odebrání IL-3 postupně odumíraly. Na základě těchto poznatků lze usuzovat, že tato mutace byla zodpovědná za inaktivaci BCR/ABL kinázy a nelze ji tedy považovat za kauzální příčinu relapsu.

Senzitivita TKI byla pak hodnocena na bázi měření proliferace transfekovaných Ba/F3 v přítomnosti Nilotinibu a Dasatinibu s využitím MTS eseje.

Míra citlivosti je popisována na základě stanovení koncentrace IC_{50} . Vzhledem k tomu, že škály, na jejichž základě jsou mutantní varianty BCR/ABL klasifikovány do jednotlivých kategorií (senzitivní, středně senzitivní a rezistentní (O'Hare et al., 2007)), se v různých publikacích liší, rozhodli jsme se vytvořit vlastní stupnici. Jako základ nám posloužily hodnoty naměřené pro wild type BCR-ABL, jež je citlivá ke všem testovaným TKI, dále jsme porovnávali hodnoty u již dříve testovaných mutací s vlastními výsledky.

Obecně lze konstatovat, že ačkoliv byly absolutní hodnoty IC_{50} u našich měření zvýšeny oproti hodnotám publikovaným v dřívějších studiích, síla rezistence jednotlivých mutací zůstává odstupňovaná. Mutace M351T vykazovala téměř shodnou citlivost jako BCR-ABL wild type, zatímco mutace hBCR/mABL-Q252H již vykazuje středně zvýšenou rezistenci k oběma TKI, stejně jako v předešlých studiích. Mutace T315I byla v našem testu vysoce rezistentní ke všem TKI, což je zcela ve shodě s očekávanými výsledky.

Na základě těchto zjištění je možné konstatovat, že v důsledku odlišné použité metodiky (např. metoda transfekce, rozdílných klonovacích konstrukcí) se testované varianty jeví „rezistentnější“, než by odpovídalo srovnatelným datům z literatury. Odstupňování rezistence jednotlivých variant nicméně zůstává nezměněno, takže vhodnou úpravou

kritérií, podle nichž klasifikujeme mutace do jednotlivých kategorií, je možné dosáhnout korekce tohoto zkreslení.

Nově testované mutace A344V, L364I a M496I se prokázaly jako středně rezistentní jak na Nilotinib tak i Dasatinib, i podle klasifikačního profilu z publikace *O'Hare et al, 2007*. Přičemž nejvyšší rezistenci k Nilotinibu vykazovala A344V, k Dasatinibu pak L364I. Největší senzitivita k oběma inhibitorům byla zjištěna u M496I, jejíž naměřené hodnoty IC_{50} se pohybovaly na rozhraní střední rezistence a senzitivity. Vzhledem k výše zmíněnému faktu, že v naší studii jsou celkově hodnoty IC_{50} do jisté míry nadhodnoceny, můžeme mutaci M496T při porovnání s BCR/ABL wt považovat spíše za senzitivní.

Interpretace těchto výsledků nemusí být dosud jednoznačná. Také mezi jednotlivými studii je možné vyzorovat diskrepance ve stanovení hodnot IC_{50} u některých mutací. Naše vlastní pozorování jsou také v některých případech odlišná od publikovaných výsledků. Tyto diskrepance mohou být výsledkem použitím různých technik, odlišných buněčných linií a způsobu vyhodnocování. Můžeme však konstatovat, že námi navržená technika je plně funkční a jsme s její pomocí schopni jednoznačně rozlišit rozdíly v rezistenci vůči TKI jak již dříve testovaných, tak zcela nově objevených mutací. Pro zavedení techniky do rutinního použití bude třeba důkladněji stanovit hranice mezi jednotlivými kategoriemi rezistence, což si vyžádá testování na větším vzorku mutací.

Mimo to je z dosavadních výzkumů zřejmé, že použité koncentrace léků inhibující transfekované a tedy IL-3 nezávislé Ba/F3 nejsou vždy shodné s koncentracemi TKI, užívaných pro inhibici CML progernitorů in vivo. Proto ačkoliv in vitro test může sloužit jako rychlý ukazatel rezistence de novo vzniklých mutant, vyžaduje tento výsledek ověření klinickou praxí. (Branford et al., 2009)

8. Závěr

Léčba Imatinibem a TKI druhé generace u Imatinib rezistentních pacientů výrazně zlepšila dlouhodobou prognózu nemocných s CML. Největším problémem v této léčbě je vznik mutací, způsobujících často sekundární rezistenci. V této práci jsme se zaměřili na vývoj in vitro testování nových mutací, jejichž senzitivita k TKI je neznámá, detekovaných u pacientů s CML. Díky detekovatelnosti mutací kinázové domény BCR/ABL již v nízkých hladinách MRN, jsme schopni časné přípravy stabilních linií pro in vitro testy senzitivity k TKI. Metodika se doposud prokázala funkční a pravděpodobně univerzální i v budoucnu pro TKI 3. generace.

Touto metodou je možné získat prvotní farmakologický profil nových mutací BCR/ABL kinázy, a to v časovém úseku přibližně tří až čtyř týdnů. Včasná informace o biologických vlastnostech mutace u konkrétního pacienta je pro klinika nesmírně důležitá. Umožňují individualizovat terapeutický přístup a zejména usnadňují rozhodování o úpravě léčby CML s cílem zabránit výrazné hematologické progresi. Tento postup by se měl stávat obecným standardem při plánování léčebné strategie u nemocných s maligními onemocněními.

9. Seznam citované literatury

Adam, Z., Vorlíček, J., a kolektiv. (2001). Hematologie II- Přehled maligních hematologických nemocí. 1.vyd., Nakladatelství Grada, Praha

Baccarani, Michele, Cortes, J., Pane, F., Niederwieser, D., Saglio, Giuseppe, Apperley, J., Cervantes, F., Deininger, M., Gratwohl, A., Guilhot, François, et al. (2009). Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet. *J. Clin. Oncol*, **27**, 6041-6051.

Baccarani, Michele, Saglio, Giuseppe, Goldman, J., Hochhaus, Andreas, Simonsson, Bengt, Appelbaum, F., Apperley, J., Cervantes, F., Cortes, J., Deininger, M., et al. (2006). Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*, **108**, 1809-1820.

Bonifazi, F, de Vivo, A., Rosti, G, Guilhot, F, Guilhot, J., Trabacchi, E, Hehlmann, R, Hochhaus, A, Shepherd, P. C., Steegmann, J. L., et al. (2001). Chronic myeloid leukemia and interferon-alpha: a study of complete cytogenetic responders. *Blood*, **98**, 3074-3081.

Branford, S, Hughes, T P, a Rudzki, Z (1999c). Monitoring chronic myeloid leukaemia therapy by real-time quantitative PCR in blood is a reliable alternative to bone marrow cytogenetics. *Br. J. Haematol*, **107**, 587-599.

Branford, Susan, Melo, Junia V, a Hughes, Timothy P (2009). Selecting optimal second-line tyrosine kinase inhibitor therapy for chronic myeloid leukemia patients after imatinib failure: does the BCR-ABL mutation status really matter? *Blood*, **114**, 5426-5435.

Branford, Susan, Rudzki, Zbigniew, Walsh, S., Grigg, A., Arthur, C., Taylor, K., Herrmann, R., Lynch, K. P., a Hughes, Timothy P (2002d). High frequency of point mutations clustered within the adenosine triphosphate-binding region of BCR/ABL in patients with chronic myeloid leukemia or Ph-positive acute lymphoblastic leukemia who

develop imatinib (STI571) resistance. *Blood*, **99**, 3472-3475.

Branford, Susan, Rudzki, Zbigniew, Walsh, S., Parkinson, I., Grigg, A., Szer, J., Taylor, K., Herrmann, R., Seymour, J. F., Arthur, C., et al. (2003). Detection of BCR-ABL mutations in patients with CML treated with imatinib is virtually always accompanied by clinical resistance, and mutations in the ATP phosphate-binding loop (P-loop) are associated with a poor prognosis. *Blood*, **102**, 276-283.

von Bubnoff, N., Manley, P. W., Mestan, Jurgen, Sanger, J., Peschel, C., a Duyster, J. (2006). Bcr-Abl resistance screening predicts a limited spectrum of point mutations to be associated with clinical resistance to the Abl kinase inhibitor nilotinib (AMN107). *Blood*, **108**, 1328-1333.

von Bubnoff, N., Veach, D. R., van der Kuip, H., Aulitzky, W. E., Sänger, J., Seipel, P., Bornmann, W. G., Peschel, C., Clarkson, B., a Duyster, J. (2005). A cell-based screen for resistance of Bcr-Abl-positive leukemia identifies the mutation pattern for PD166326, an alternative Abl kinase inhibitor. *Blood*, **105**, 1652-1659.

Cang, S. a Liu, D. (2008). P-loop mutations and novel therapeutic approaches for imatinib failures in chronic myeloid leukemia. *J Hematol Oncol*, **1**, 15.

Cortez, D., Kadlec, L., a Pendergast, A. M. (1995). Structural and signaling requirements for BCR-ABL-mediated transformation and inhibition of apoptosis. *Mol. Cell. Biol*, **15**, 5531-5541.

Daley, G Q a Baltimore, D. (1988). Transformation of an interleukin 3-dependent hematopoietic cell line by the chronic myelogenous leukemia-specific P210bcr/abl protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **85**, 9312-9316.

Danhauser-Riedl, S., Warmuth, M., Druker, B J, Emmerich, B., a Hallek, M. (1996a). Activation of Src kinases p53/56lyn and p59hck by p210bcr/abl in myeloid cells. *Cancer Res*, **56**, 3589-3596.

Deininger, M. W., Goldman, J M, a Melo, J V (2000b). The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood*, **96**, 3343-3356.

Deininger, M., Buchdunger, Elisabeth, a Druker, Brian J (2005). The development of imatinib as a therapeutic agent for chronic myeloid leukemia. *Blood*, **105**, 2640-2653.

Druker, B J, Talpaz, M, Resta, D. J., Peng, B., Buchdunger, E, Ford, J. M., Lydon, N. B., Kantarjian, H, Capdeville, R, Ohno-Jones, S., et al. (2001e). Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med*, **344**, 1031-1037.

Emig, M., Saussele, S., Wittor, H., Weisser, A., Reiter, A., Willer, A., Berger, U., Hehlmann, R, Cross, N. C., a Hochhaus, A (1999). Accurate and rapid analysis of residual disease in patients with CML using specific fluorescent hybridization probes for real time quantitative RT-PCR. *Leukemia*, **13**, 1825-1832.

Ernst, T., Erben, P., Müller, Martin C, Paschka, Peter, Schenk, T., Hoffmann, J., Kreil, Sebastian, La Rosée, P., Hehlmann, Rüdiger, a Hochhaus, Andreas (2008). Dynamics of BCR-ABL mutated clones prior to hematologic or cytogenetic resistance to imatinib. *Haematologica*, **93**, 186-192.

Faber, E., Indrák, K., a kolektiv. (2010). Chronická myeloidní leukémie. 1.vyd., Nakladatelství Galén, Praha

Fausel, C. (2007). Targeted chronic myeloid leukemia therapy: Seeking a cure. *Am J Health Syst Pharm*, **64**, S9-15.

Gambacorti-Passerini, C. B., Gunby, R. H., Piazza, R., Galiotta, A., Rostagno, R., a Scapozza, L. (2003). Molecular mechanisms of resistance to imatinib in Philadelphia-chromosome-positive leukaemias. *Lancet Oncol*, **4**, 75-85.

Golas, J. M., Arndt, K., Etienne, C., Lucas, J., Nardin, D., Gibbons, J., Frost, P., Ye, F., Boschelli, D. H., a Boschelli, F. (2003). SKI-606, a 4-anilino-3-quinolinecarbonitrile dual inhibitor of Src and Abl kinases, is a potent antiproliferative agent against chronic

myelogenous leukemia cells in culture and causes regression of K562 xenografts in nude mice. *Cancer Res*, **63**, 375-381.

Golemovic, M., Verstovsek, S., Giles, F., Cortes, J., Manshouri, T., Manley, P. W., Mestan, Jürgen, Dugan, M., Alland, L., Griffin, James D, et al. (2005). AMN107, a novel aminopyrimidine inhibitor of Bcr-Abl, has in vitro activity against imatinib-resistant chronic myeloid leukemia. *Clin. Cancer Res*, **11**, 4941-4947.

Hořejší, V., Bartůňková, J. (2005). *Základy imunologie*. 3.vyd., Nakladatelství Triton, Praha

Hughes, Timothy, Saglio, Giuseppe, Branford, Susan, Soverini, S., Kim, D.-W., Müller, Martin C, Martinelli, Giovanni, Cortes, J., Beppu, L., Gottardi, E., et al. (2009). Impact of baseline BCR-ABL mutations on response to nilotinib in patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase. *J. Clin. Oncol*, **27**, 4204-4210.

Ilaria, R. L., Jr a Van Etten, R. A. (1996). P210 and P190(BCR/ABL) induce the tyrosine phosphorylation and DNA binding activity of multiple specific STAT family members. *J. Biol. Chem*, **271**, 31704-31710.

Jabbour, E., Jones, Daniel, Kantarjian, H. M., O'Brien, S., Tam, C., Koller, C., Burger, J. A., Borthakur, G., Wierda, W. G., a Cortes, J. (2009). Long-term outcome of patients with chronic myeloid leukemia treated with second-generation tyrosine kinase inhibitors after imatinib failure is predicted by the in vitro sensitivity of BCR-ABL kinase domain mutations. *Blood*, **114**, 2037-2043.

Jones, Dan, Chen, S. S., Jabbour, E., Rios, M. B., Kantarjian, Hagop, a Cortes, J. (2010). Uncommon BCR-ABL kinase domain mutations in kinase inhibitor-resistant chronic myelogenous leukemia and Ph+ acute lymphoblastic leukemia show high rates of regression, suggesting weak selective effects. *Blood*, **115**, 5428-5429.

Kantarjian, Hagop, Shah, N. P., Hochhaus, Andreas, Cortes, J., Shah, S., Ayala, M., Moiraghi, B., Shen, Z., Mayer, J., Pasquini, R., et al. (2010). Dasatinib versus imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med*, **362**, 2260-

2270.

Kelliher, M. A., McLaughlin, J., Witte, O. N., a Rosenberg, N. (1990). Induction of a chronic myelogenous leukemia-like syndrome in mice with v-abl and BCR/ABL. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, **87**, 6649-6653.

Khorashad, J. S., Anand, M., Marin, D., Saunders, S., Al-Jabary, T., Iqbal, A., Margerison, S., Melo, J V, Goldman, J M, Apperley, J. F., et al. (2006g). The presence of a BCR-ABL mutant allele in CML does not always explain clinical resistance to imatinib. *Leukemia*, **20**, 658-663.

Klucher, K. M., Lopez, D. V., a Daley, G Q (1998c). Secondary mutation maintains the transformed state in BaF3 cells with inducible BCR/ABL expression. *Blood*, **91**, 3927-3934.

Kurzrock, Razelle, Kantarjian, H. M., Druker, Brian J, a Talpaz, Moshe (2003d). Philadelphia chromosome-positive leukemias: from basic mechanisms to molecular therapeutics. *Ann. Intern. Med*, **138**, 819-830.

Laurent, E., Talpaz, M, Wetzler, M., a Kurzrock, R (2000b). Cytoplasmic and nuclear localization of the 130 and 160 kDa Bcr proteins. *Leukemia*, **14**, 1892-1897.

Liu, W. M., Stimson, L. A., a Joel, S. P. (2002). The in vitro activity of the tyrosine kinase inhibitor STI571 in BCR-ABL positive chronic myeloid leukaemia cells: synergistic interactions with anti-leukaemic agents. *Br. J. Cancer*, **86**, 1472-1478.

Martinelli, Giovanni, Amabile, M., Giannini, B., Terragna, C., Ottaviani, E., Soverini, S., Saglio, Giuseppe, Rosti, Gianantonio, a Baccarani, Michele (2002c). Novel types of bcr-abl transcript with breakpoints in BCR exon 8 found in Philadelphia positive patients with typical chronic myeloid leukemia retain the sequence encoding for the DBL- and CDC24 homology domains but not the pleckstrin homology one. *Haematologica*, **87**, 688-694; discussion 694.

Martinelli, Giovanni, Soverini, S., Rosti, Gianantonio, Cilloni, D., a Baccarani, Michele (2005d). New tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia. *Haematologica*, **90**, 534-541.

Mathisen, M. S., Kantarjian, H. M., Cortes, J., a Jabbour, E. (2011a). Mutant BCR-ABL clones in chronic myeloid leukemia. *Haematologica*, **96**, 347-349.

Mayer, J., Starý, J., a kolektiv. (2002). Leukémie. 1.vyd., Nakladatelství Grada, Praha

McGlave, P., Bartsch, G., Anasetti, C., Ash, R., Beatty, P., Gajewski, J., a Kernan, N. A. (1993). Unrelated donor marrow transplantation therapy for chronic myelogenous leukemia: initial experience of the National Marrow Donor Program. *Blood*, **81**, 543-550.

McWhirter, J. R., Galasso, D. L., a Wang, J. Y. (1993). A coiled-coil oligomerization domain of Bcr is essential for the transforming function of Bcr-Abl oncoproteins. *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 7587-7595.

Melo, J V (1996h). The diversity of BCR-ABL fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype. *Blood*, **88**, 2375-2384.

Müller, Martin C, Cortes, J. E., Kim, D.-W., Druker, Brian J, Erben, P., Pasquini, R., Branford, Susan, Hughes, Timothy P, Radich, J. P., Ploughman, L., et al. (2009). Dasatinib treatment of chronic-phase chronic myeloid leukemia: analysis of responses according to preexisting BCR-ABL mutations. *Blood*, **114**, 4944-4953.

Nichols, G. L., Raines, M. A., Vera, J. C., Lacomis, L., Tempst, P., a Golde, D. W. (1994). Identification of CRKL as the constitutively phosphorylated 39-kD tyrosine phosphoprotein in chronic myelogenous leukemia cells. *Blood*, **84**, 2912-2918.

O'Brien, S. G., Guilhot, François, Larson, R. A., Gathmann, I., Baccarani, Michele, Cervantes, F., Cornelissen, J. J., Fischer, T., Hochhaus, Andreas, Hughes, Timothy, et al. (2003). Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.*, **348**, 994-1004.

O'Hare, T., Eide, C. A., a Deininger, M. W. N. (2007). Bcr-Abl kinase domain mutations, drug resistance, and the road to a cure for chronic myeloid leukemia. *Blood*, **110**, 2242-2249.

O'Hare, T., Walters, D. K., Stoffregen, E. P., Jia, T., Manley, P. W., Mestan, Jürgen, Cowan-Jacob, S. W., Lee, F. Y., Heinrich, M. C., Deininger, M. W. N., et al. (2005). In vitro activity of Bcr-Abl inhibitors AMN107 and BMS-354825 against clinically relevant imatinib-resistant Abl kinase domain mutants. *Cancer Res*, **65**, 4500-4505.

Paschka, P, Müller, M C, Merx, K., Kreil, S, Schoch, C., Lahaye, T., Weisser, A., Petzold, A., König, H., Berger, U., et al. (2003). Molecular monitoring of response to imatinib (Glivec) in CML patients pretreated with interferon alpha. Low levels of residual disease are associated with continuous remission. *Leukemia*, **17**, 1687-1694.

Pear, W. S., Miller, J. P., Xu, L., Pui, J. C., Soffer, B., Quackenbush, R. C., Pendergast, A. M., Bronson, R., Aster, J. C., Scott, M. L., et al. (1998). Efficient and rapid induction of a chronic myelogenous leukemia-like myeloproliferative disease in mice receiving P210 bcr/abl-transduced bone marrow. *Blood*, **92**, 3780-3792.

Redaelli, S., Piazza, R., Rostagno, R., Magistrini, V., Perini, P., Marega, M., Gambacorti-Passerini, C., a Boschelli, F. (2009). Activity of bosutinib, dasatinib, and nilotinib against 18 imatinib-resistant BCR/ABL mutants. *J. Clin. Oncol*, **27**, 469-471.

Rosti, Gianantonio, Martinelli, Giovanni, Bassi, S., Amabile, M., Trabacchi, Elena, Giannini, B., Cilloni, D., Izzo, B., De Vivo, A., Testoni, Nicoletta, et al. (2004). Molecular response to imatinib in late chronic-phase chronic myeloid leukemia. *Blood*, **103**, 2284-2290.

Saglio, Giuseppe, Kim, D.-W., Issaragrisil, S., le Coutre, P., Etienne, G., Lobo, C., Pasquini, R., Clark, R. E., Hochhaus, Andreas, Hughes, Timothy P, et al. (2010). Nilotinib versus imatinib for newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med*, **362**, 2251-2259.

Scappini, B., Gatto, S., Onida, F., Ricci, C., Divoky, V., Wierda, W. G., Andreeff, M., Dong, L., Hayes, K., Verstovsek, S., et al. (2004). Changes associated with the development of resistance to imatinib (STI571) in two leukemia cell lines expressing p210 Bcr/Abl protein. *Cancer*, **100**, 1459-1471.

Shah, N. P., Tran, C., Lee, F. Y., Chen, P., Norris, D., a Sawyers, Charles L (2004b). Overriding imatinib resistance with a novel ABL kinase inhibitor. *Science*, **305**, 399-401.

Schoch, C., Schnittger, S., Bursch, S., Gerstner, D., Hochhaus, A, Berger, U., Hehlmann, R, Hiddemann, W., a Haferlach, T. (2002). Comparison of chromosome banding analysis, interphase- and hypermetaphase-FISH, qualitative and quantitative PCR for diagnosis and for follow-up in chronic myeloid leukemia: a study on 350 cases. *Leukemia*, **16**, 53-59.

Skorski, T., Kanakaraj, P., Nieborowska-Skorska, M., Ratajczak, M. Z., Wen, S. C., Zon, G., Gewirtz, A. M., Perussia, B., a Calabretta, B. (1995). Phosphatidylinositol-3 kinase activity is regulated by BCR/ABL and is required for the growth of Philadelphia chromosome-positive cells. *Blood*, **86**, 726-736.

Sureda, A. a Hernández-Bronchud, M. (1997). The management of chronic myeloid leukaemia--a case history. *Ann. Oncol*, **8**, 91-96.

Tokarski, J. S., Newitt, J. A., Chang, C. Y. J., Cheng, J. D., Wittekind, M., Kiefer, S. E., Kish, K., Lee, F. Y. F., Borzillerri, R., Lombardo, L. J., et al. (2006). The structure of Dasatinib (BMS-354825) bound to activated ABL kinase domain elucidates its inhibitory activity against imatinib-resistant ABL mutants. *Cancer Res*, **66**, 5790-5797.

Weisberg, E, Manley, P., Mestan, J, Cowan-Jacob, S., Ray, A, a Griffin, J D (2006). AMN107 (nilotinib): a novel and selective inhibitor of BCR-ABL. *Br. J. Cancer*, **94**, 1765-1769.

Weisberg, Ellen, Manley, P. W., Breitenstein, W., Brügger, J., Cowan-Jacob, S. W., Ray, Arghya, Huntly, B., Fabbro, D., Fendrich, G., Hall-Meyers, E., et al. (2005e). Characterization of AMN107, a selective inhibitor of native and mutant Bcr-Abl. *Cancer Cell*, **7**, 129-141.

Zhang, X. a Ren, R. (1998). Bcr-Abl efficiently induces a myeloproliferative disease and production of excess interleukin-3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in mice: a novel model for chronic myelogenous leukemia. *Blood*, **92**, 3829-3840.