

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

LÉKAŘSKÁ FAKULTA V PLZNI

Ústav histologie a embryologie



**Studium signálních drah modulujících mnohočetnou lékovou
rezistenci**

The study of signaling pathways that modulate multidrug resistance

Dizertační práce

RNDr. Pavel Dvořák

Školitel: doc. RNDr. Pavel Souček, CSc.

PLZEŇ 2017

Studijní program: Anatomie, histologie a embryologie (P5112)

Studijní obor: Anatomie, histologie a embryologie (5103V000)

Předmluva

Předkládaná dizertační práce byla zpracována formou komentovaného souboru pěti publikovaných vědeckých prací, na kterých se uchazeč podílel jako hlavní autor. Uchazeč si v žádném případě nechce přivlastňovat myšlenky a zásluhy ostatních spoluautorů publikovaných prací, kterým by chtěl touto formou velmi poděkovat za výbornou spolupráci. Dizertační práce řeší problematiku mnohočetné lékové rezistence u nádorových buněk dvěma hlavními přístupy. První přístup je založen na molekulárně genetickém stanovení hladiny exprese panelu všech lidských ABC genů, druhý přístup je založen na cytogenetické analýze morfologických změn chromosomů maligních a pre-maligních buněk.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem předkládanou dizertační práci vypracoval samostatně a řádně jsem citoval všechny použité prameny a literaturu. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu. Souhlasím s půjčováním dizertační práce a trvalým uložením elektronické verze v databázi UK LF v Plzni.

V Plzni, 1. března 2017

RNDr. Pavel Dvořák

Prohlášení o spoluautorství

Prohlašuji, že RNDr. Pavel Dvořák rozhodujícím způsobem přispěl ke vzniku všech pěti publikovaných vědeckých prací, které jsou součástí předkládané dizertační práce.

V Plzni, 1. března 2017

doc. RNDr. Pavel Souček, CSc.

Poděkování

Rád bych poděkoval svému školiteli doc. RNDr. Pavlu Součkovi, CSc. za možnost věnovat se velmi zajímavému tématu, výborné odborné vedení mojí výzkumné práce i za jeho vstřícný a osobní přístup.

Za cenné rady s organizací studia bych rád poděkoval vedoucí Ústavu histologie a embryologie paní prof. MUDr. Mileně Králíčkové, Ph.D.

Velmi rád bych také poděkoval svým rodičům a rodině za podporu a toleranci, která mi po celou dobu studia výrazně pomáhala.

Práce byla vypracována za finanční podpory Grantové agentury České republiky (GAČR, projekt č. P303/12/G163), Agentury zdravotnického výzkumu (AZV) Ministerstva zdravotnictví ČR (projekt č. 15-25618A) a Národního programu udržitelnosti I (NPU I) č. LO1503 poskytovaného Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy.

Abstrakt

V úvodu dizertační práce je na podkladě literární rešerše podán přehled problematiky rezistence nádorových buněk na podávanou chemoterapii, včetně mechanismů jejího vzniku a teorie nádorových kmenových buněk. Teoretická část se dále více zaměřila na dvě témata – úloha ATP-binding cassette (ABC) transportních proteinů a chromosomových abnormalit při vzniku nádorové rezistence. U obou hlavních témat je zdůrazněn jejich možný terapeutický potenciál při léčbě zhoubných nádorů. Výsledkovou část dizertační práce tvoří komentáře k pěti původním pracím, na kterých se uchazeč podílel v roli hlavního autora. První komentovaná práce přináší argumenty ve prospěch hypotézy o existenci genových expresních profilů ABC genů, které jsou společné pro více typů zhoubných nádorů (nádory prsu, kolorekta a pankreatu) a mají klinický význam. Tyto obecné expresní profily ABC genů by mohly vytvářet nový charakteristický rys kancerogeneze. Druhá práce přinesla hlubší poznání skupiny pacientů s akutní myeloidní leukemií, kteří po dvou pokusech o dosažení remise tohoto nádorového onemocnění nedosáhli kompletní cytogenetické remise. Na základě výsledků třetí práce je možné doporučit vyčlenění skupiny pacientů s primárními myelodysplastickými syndromy a translokací $t(2;11)(p21;q23)$ bez účasti *MLL* genu jako samostatnou entitu s předpokládanou dobrou prognózou. Čtvrtý příspěvek ve formě review přinesl komplexní pohled na problematiku kontrolovaného přerušení cílené léčby tyrozinkinázovými inhibitory u pacientů s chronickou myeloidní leukemií a diskuzi nad dosud otevřenými otázkami z pohledu laboratorní a klinické praxe. Zviditelnit specifický cytogenetický přístup k analýze genetických změn v nádorových buňkách a jeho výhody (komplexnost a zároveň citlivost na malé subklony) bylo cílem páté práce, která hodnotila soubor vzorků od dětských pacientů s akutní lymfoblastickou leukemií. Celkovou snahou práce bylo představit komplexnost problematiky rezistence na protinádorová léčiva z několika pohledů a přinést nové poznatky, které by mohly napomoci zlepšit léčbu onkologických pacientů.

Abstract

The theme of cancer cell resistance to anti-cancer drugs including the common mechanisms of resistance development and the theory of cancer stem cells was introduced in the Introduction to the doctoral thesis. The theoretical part was focused more deeply on the two topics – the role of ATP-binding cassette (ABC) transport proteins and chromosomal abnormalities in the development of cancer chemoresistance. The possible therapeutic potential for the treatment of cancer was stressed for both topics. The Results were composed of the commentaries on the five published works, which the author of the thesis conducted as the main author. The first work brought the evidence supporting the hypothesis of the existence of ABC gene expression profiles (signatures), which are common to multiple types of tumors and are associated with significant clinical consequences. These general ABC gene expression profiles could possibly form a new hallmark of cancer. The second work studied more closely a group of acute myeloid leukemia patients, who did not achieve complete cytogenetic remission after two attempts to maintain remission of the malignant disease. The new entity, consisting of patients with the translocation $t(2;11)(p21;q23)$ without the rearrangement of the *MLL* gene, within the myelodysplastic syndromes could be recognized on the basis of the information, which was described in the third work. The authors of the third work also suggested that a good prognosis may be associated with the new entity. A comprehensive review of the theme - controlled discontinuation of the tyrosine kinase inhibitor therapy in chronic myeloid leukemia patients - was presented in the fourth work. A discussion about the unsolved questions from the laboratory as well as clinical point of view was the most important contribution. The main goal of the fifth work was to highlight the specific complex view and the ability to visualize small subclones maintained during the cytogenetic analysis of the cancer cell karyotype. The concept was demonstrated on a collection of childhood acute lymphoblastic leukemia samples. The main purpose for writing the presented doctoral thesis was to show the complex issue of cancer cell chemoresistance from different laboratory as well as clinical directions and bring new information, which could help with the treatment of oncology patients.

Seznam použitých zkratk

ABC	ATP vázající doména
ADP	adenosin di-fosfát
ALDH	aldehyd dehydrogenázy
ALL	akutní lymfoblastická leukemie
AML	akutní myeloidní leukemie
ATP	adenosin tri-fosfát
CIN	chromosomová nestabilita
CML	chronická myeloidní leukemie
CRc	kompletní cytogenetická remise
CSCs	nádorové kmenové buňky
FISH	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
MDR	mnohočetná léková rezistence
MDS	myelodysplastické syndromy
NBD	nukleotid vázající doména
PDE-5	fosfodiesteráza 5
qRT-PCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase
TKI	tyrozinkinázové inhibitory
TMD	transmembránová doména

Obsah

1	Úvod	9
1.1	Rozšiřující se možnosti léčby nádorových onemocnění.....	9
1.2	Rezistence nádorových buněk na chemoterapii.....	10
1.2.1	Vznik nádorové rezistence.....	10
1.2.2	Nádorové kmenové buňky.....	11
2	ABC transportní proteiny a jejich role při vzniku MDR.....	13
2.1	Základní struktura ABC proteinů	13
2.2	ABC geny	14
2.3	Funkce ABC proteinů	15
2.4	Možné použití inhibitorů ABC transportérů v klinické praxi.....	16
3	Chromosomální abnormality a mnohočetná léková rezistence	18
3.1	Genomová a chromosomová nestabilita	18
3.2	Mechanismy podílející se na chromosomové nestabilitě.....	18
3.3	Klinický význam chromosomové nestability	19
3.4	Chromosomová nestabilita jako terapeutický cíl.....	19
4	Cíle práce.....	20
5	Materiál a použité metody	21
5.1	Analyzované vzorky	21
5.2	Kvantitativní PCR v reálném čase	21
5.3	Analýza karyotypu nádorových buněk a fluorescenční in situ hybridizace	22
5.4	Statistické a bioinformatické vyhodnocení získaných dat.....	22
6	Výsledky výzkumu	24
6.1	Příspěvek I	24
6.1.1	Komentář k příspěvku I.....	60
6.2	Příspěvek II.....	62

6.2.1	Komentář k příspěvku II.....	70
6.3	Příspěvek III.....	72
6.3.1	Komentář k příspěvku III	77
6.4	Příspěvek IV	79
6.4.1	Komentář k příspěvku IV	84
6.5	Příspěvek V.....	86
6.5.1	Komentář k příspěvku V	91
7	Hodnocení práce a závěr.....	93
7.1	Shrnutí dosažených výsledků.....	96
8	Seznam použitých literárních zdrojů	98
9	Seznam publikací uchazeče zahrnutých do výsledků dizertační práce	105
10	Seznam dalších publikovaných prací, na kterých se uchazeč podílel	106
11	Seznam nejvýznamnějších konferenčních příspěvků.....	108

1 Úvod

Nádorová onemocnění se postupně stávají **největším problémem pro zdravotnické systémy po celém světě** a z dosavadního vývoje této problematiky lze očekávat, že zhoubné nádory budou lidskou populaci stále více ohrožovat i ve třetím tisíciletí. S prodlužováním průměrného věku života lidí je především ve vyspělých státech stále zřetelněji pozorován i nárůst incidence nádorových onemocnění ve vyšším věku. Ve věkové skupině nad 70 let jsou ve většině evropských zemí nejčastěji se vyskytujícími nádory bronchogenní karcinom a karcinom prostaty u mužů a karcinom prsu a karcinom tlustého střeva a konečníku u žen (Marek et al., 2010). Zvyšující se hladina genotoxických látek v životním prostředí společně s hektičtějším životním stylem posouvá zvýšený výskyt nádorových onemocnění i mezi mladší generace.

1.1 Rozšiřující se možnosti léčby nádorových onemocnění

Chirurgická intervence byla první léčebnou metodou v onkologii, její možnosti se stále zdokonalují a zůstává léčbou první volby. Při postupném rozvoji **radioterapie, chemoterapie a imunoterapie** se v klinické praxi začalo stále častěji uplatňovat kombinování více léčebných metod (Klener a Klener, 2013; Marek et al., 2010). Pokroky molekulární biologie a genetiky vedou ke stále detailnějšímu poznání mechanismů podmiňujících kancerogenezi a patofyziologii nádorových onemocnění. Výsledkem tohoto poznání je rozšiřující se řada izolovaných či syntetizovaných chemických sloučenin, které cíleně blokují vnitrobuněčné pochody aberantně aktivované u nádorových buněk. Vznikla tzv. **cílená terapie** (cílená molekulární léčba), která se také stala významnou součástí komplexní protinádorové léčby (Klener a Klener, 2013). I přes vysokou lokální účinnost léčby se u téměř dvou třetin nemocných objevuje vzdálený rozsev onemocnění a při terapeutickém rozhodování je k některým solidním nádorům přistupováno jako k systémovému onemocnění. Do farmakologické léčby onkologických onemocnění dále spadá hormonální a biologická terapie a nověji látky ovlivňující nádorové mikroprostředí. Nedílnou součástí je také **léčba podpůrná a doplňková**, které významně omezují nežádoucí účinky protinádorových léčiv (Klener a Klener, 2013; Marek et al., 2010).

Diagnostika i léčba zhoubných nádorů se bouřlivě rozvíjí – od molekulární charakterizace nádorů přes cílenou terapii na molekulární úrovni. Onkologická léčba spěje též k individualizaci léčebných postupů a aplikaci **konceptu personalizované komplexní péče**, která vychází z filosofie o jedinečnosti každého pacienta nejen na úrovni daného onemocnění, ale i z pohledu rodinného a sociálního zázemí (Marek et al., 2010).

1.2 Rezistence nádorových buněk na chemoterapii

Rezistence nádoru k použité protinádorové chemoterapii výrazným způsobem snižuje účinnost léčby a může způsobit její úplné selhání. Na klinické úrovni se rezistence manifestuje stabilním či progresivním onemocněním a je v současnosti považována za **jeden z největších problémů onkologické léčby** (Gillet a Gottesman, 2012; Klener a Klener, 2010).

1.2.1 Vznik nádorové rezistence

Rezistence na protinádorová léčiva může být rozdělena na dvě základní kategorie: 1) **vrozená (primární) rezistence** spojená s genetickou charakteristikou nádorových buněk vytvářející ochranný mechanismus pro přežití v nepříznivých podmínkách a 2) **získaná (sekundární) rezistence** související s expozicí buněk protinádorovými léky v průběhu léčby (Kachalaki et al., 2016; Klener a Klener, 2010).

Výzkum zabývající se vznikem rezistence u nádorových buněk je jedním z hlavních polí biomedicínského výzkumu již po několik desetiletí. Byla odhalena řada mechanismů podmiňujících vznik rezistence na podkladě poruch či abnormálních modifikací fyziologických vnitrobuněčných procesů.

Mezi nejčastěji diskutované mechanismy vzniku rezistence patří:

- Snížení příjmu ve vodě rozpustných léčiv
- Zvýšené vyloučení hydrofobních léčiv z buňky zprostředkované ABC transportéry
- Změny v metabolismu léčiv
- Povzbuzení mechanismů opravujících poškozenou DNA
- Potlačení apoptózy (programové buněčné smrti)
- Kvalitativní či kvantitativní změny v cíli (cílovém enzymu), na který je léčivo mířeno
- Větší odolnost buněk v G0/G1 fázi buněčného cyklu
- Ochranná bariéra mikroprostředí nádoru
- Zvýšení či oslabení buněčné adheze k extracelulární matrix
- Přechodná změna buněčného fenotypu skrze epiteliální-mezenchymální přeměnu
- Protektivní vliv hypoxie v okolí nádoru
- Chemorezistence zprostředkovaná epigenetickými změnami
- Chromosomová nestabilita a vznik chromosomových aberací
(Holčáková et al., 2014; Kachalaki et al., 2016; Kufe et al., 2003; McGranahan et al., 2012)

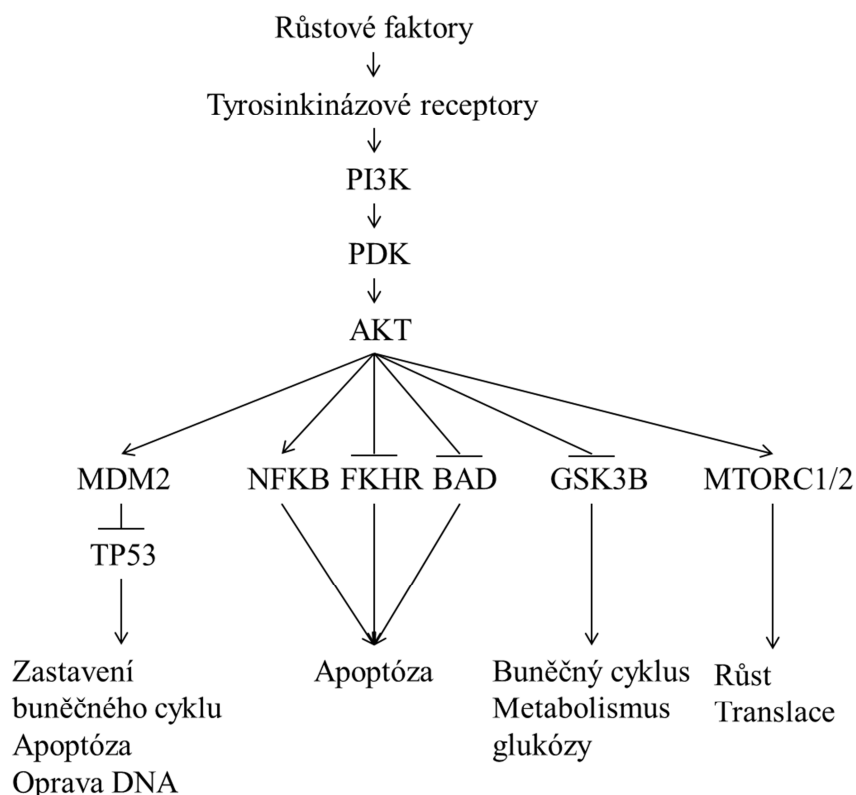
Zmíněné mechanismy však nepůsobí izolovaně a v případě chemorezistence jde většinou o **komplexní působení poruch ve více mechanismech současně**. Vznikne-li u nádorových buněk současně rezistence na více protinádorových léčiv, která nemají příbuznou strukturu nebo mechanismus jejich účinku, je tento stav označován jako **mnohočetná léková rezistence** (*multi-drug resistance*, **MDR**) (Wu et al., 2014).

1.2.2 Nádorové kmenové buňky

V posledních letech přinesla nový pohled na obecné mechanismy kancerogeneze teorie nádorových kmenových buněk (*cancer stem cells*, **CSCs**). Její možné klinické využití ji rychle přivedlo do středu zájmu mnoha výzkumných týmů. Nádory jsou dle této teorie řízeny subpopulací pluripotentních CSCs, které mají schopnost generovat různé populace

diferencovaných buněk vytvářejících vlastní nádorovou masu. Účinná protinádorová léčba by tedy měla zahrnovat i eradikaci CSCs (Holčáková et al., 2014; Klener a Klener, 2013).

CSCs byly dosud identifikovány a izolovány z celé řady nádorů původem z různých tkání. Jejich incidence v rámci různých nádorů je velmi variabilní, od přibližně 1 % u akutní myeloidní leukemie po 80 % u akutní lymfoblastické leukemie (Cojoc et al., 2015; Di a Zhao, 2014). CSCs mohou být identifikovány pomocí charakteristických povrchových proteinů (markerů), jako např. CD133, CD44, CD24 a $\alpha 2\beta 1$ integrin (Peitzsch et al., 2013). U CSCs z různých typů nádorů byly prokázány vysoké hladiny exprese ATP-binding cassette (ABC) transportních proteinů a s nimi asociované aktivování PI3K/AKT signální dráhy (obrázek 1) (Bleau et al., 2009). Mezi další mechanismy, které udržují silnou chemo- i radiorezistenci CSCs patří zejména vysoká aktivita aldehyd dehydrogenáz (ALDH) a mechanismů opravujících poškozenou DNA. Velkou roli budou hrát také stimulační faktory (růstové faktory, cytokiny) nádorového mikroprostředí (Cojoc et al., 2015; Di a Zhao, 2014).



Obrázek 1 – Schematické znázornění hlavních komponent a biologických funkcí signální dráhy PI3K/AKT (upraveno dle Danielsen et al., 2015 a Hennessy et al., 2005)

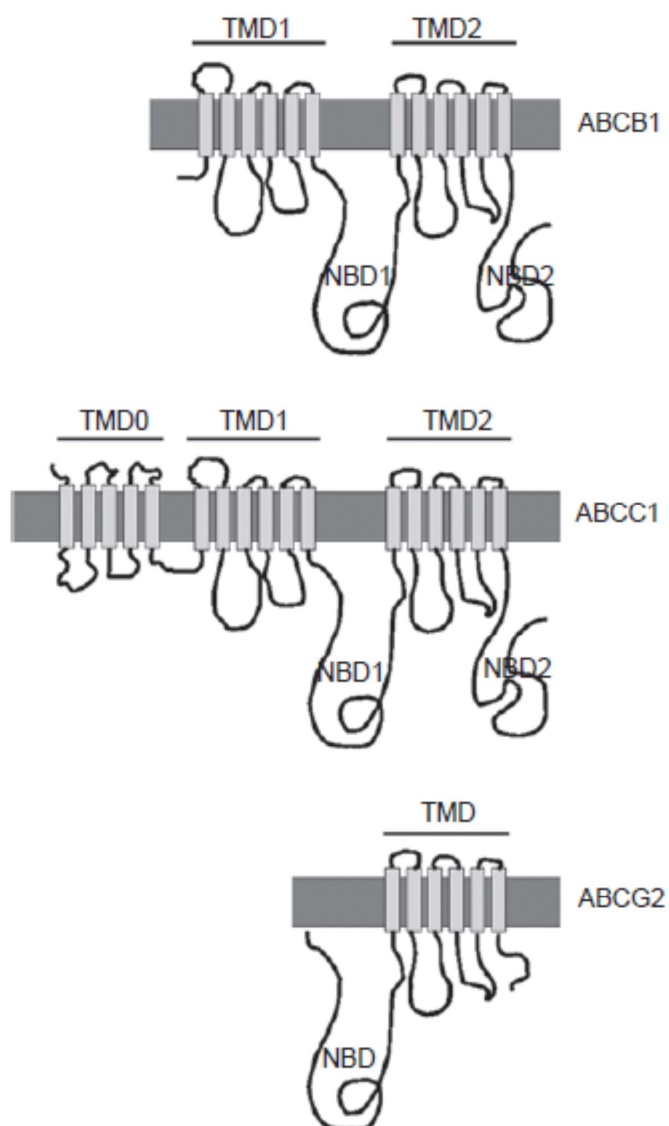
2 ABC transportní proteiny a jejich role při vzniku MDR

2.1 Základní struktura ABC proteinů

Proteiny obsahující ATP vázající doménu (*ATP-binding cassette*, **ABC**) tvoří velkou proteinovou rodinu a vyskytují se od buněk bakteriálních až po buňky eukaryotní. Nejčastěji jde o transmembránové proteiny, které využívají energii získanou hydrolyzou ATP na ADP k přenosu širokého spektra látek proti koncentračnímu gradientu. ABC proteiny jsou součástí cytoplasmatické membrány i membrán ohraničujících vnitrobuněčné organely, jako jsou endoplasmatické retikulum, peroxisomy či mitochondrie (Dean et al., 2001; Dean a Annilo, 2005). Typické ABC transportní proteiny obsahují dvě ATP vazebné domény (*nucleotide binding domains*, NBD) a dva sety transmembránových domén (*transmembrane domains*, TMD). NBD domény se skládají ze tří motivů – Walker A a Walker B, které mají totožnou strukturu u všech ABC proteinů, a specifického C motivu, který odlišuje jednotlivé ABC proteiny mezi sebou. TMD domény jsou tvořeny šesti až jedenácti membránou procházejícími alfa-helixy a jsou zodpovědné za vazbu specifického substrátu určeného k transportu (obrázek 2).

Přenos látek s využitím ABC pump je vždy jednosměrný. U bakteriálních buněk byly nalezeny jak tzv. ABC importéry, přenášející látky do nitra bakteriální buňky, tak tzv. ABC exportéry, které přenášejí látky mimo bakteriální buňku. U eukaryotních buněk byly popsány ABC transportéry pumpující přenášený substrát z cytosolu mimo eukaryotní buňku nebo z cytosolu do nitra buněčných organel (Dean et al., 2001; Falasca a Linton, 2012; Li et al., 2007).

Výjimku oproti typické struktuře tvoří tzv. poloviční transportéry (*half-transporters*), které obsahují jen jednu NBD a jednu TMD doménu a musejí tvořit homo- či heterodimery, aby mohly začít plnit svoji transportní funkci. Další výjimkou jsou ABC proteiny, které se skládají pouze ze dvou NBD domén a TMD domény jim zcela chybí. Tyto výjimečné proteiny mají jiné fyziologické funkce než je transport látek přes membrány (Barbet et al., 2012; Dean a Annilo, 2005).



Obrázek 2 – Struktura vybraných ABC transportních proteinů (obrázek byl převzat s laskavým svolením autora z publikace Zhang, Cell Research, 2007)

2.2 ABC geny

Dosud bylo u lidských buněk popsáno a izolováno 48 ABC genů a jeden pseudogen, které jsou klasifikovány do sedmi podrodin - ABCA (ABC1), ABCB (MDR/TAP), ABCC (CFTR/MRP), ABCD (ALD), ABCE (OABP), ABCF (GCN20) a ABCG (White) (Barbet et al., 2012; Kathavala et al., 2015).

Geny z podrodin ABCD, ABCG a některé geny z podrodiny ABCB kódují poloviční transportéry. Proteiny z podrodin ABCE a ABCF jsou výjimečné chyběním TMD domén a specifickými netransportními funkcemi, fylogeneticky však jejich TMD domény klastrují s TMD doménami ostatních ABC proteinů (Dean a Annilo, 2005).

ABC geny jsou široce rozprostřeny po eukaryotických genomech a jsou mezidruhově vysoce konzervovány, což naznačuje, že většina těchto genů existuje již od začátku evoluce eukaryotních buněk (Dean et al., 2001). Také funkce ABC proteinů zůstaly mezidruhově zachovány a organismy jako dánío pruhované (*Danio rerio*) nebo kuřata mohou být vhodným modelovým organismem pro studium savčích ABC proteinů (Dean a Annilo, 2005). Výjimkou v rozprostření ABC genů je pět genů z podrodiny ABCA, které vytvářejí klastr lokalizovaný na chromosomu 17 v pruhu q24 (Li et al., 2007).

2.3 Funkce ABC proteinů

Jako přenašeči velkého spektra látek od iontů a aminokyselin přes peptidy, lipidy, steroly a vitamíny až po malé proteiny tvoří ABC proteiny nedílnou součást mnoha fyziologických buněčných procesů. Jde zejména o odstraňování odpadních látek a detoxikaci, přenos buněčných signálů, výměnu lipidů či iontovou rovnováhu na membránách (Aye et al., 2009; Barbet et al., 2012; Theodoulou a Kerr, 2015). Jejich fyziologické tkáňové rozmístění a vyšší exprese v tkáních s hlavní funkcí bariéry včetně hematoencefalické bariéry či v trávicím traktu podtrhuje jejich protektivní funkci (Kachalaki et al., 2016). ABC proteiny bez TMD domén hrají důležitou úlohu při translaci mRNA (Barbet et al., 2012).

Historicky se výzkum v oblasti ABC transportérů zaměřoval především na jejich úlohu při transportu léčiv a s tím spojený vznik rezistence na daná léčiva u různých typů buněk. Mezi tři nejstudovanější regulátory mnohočetné lékové rezistence u nádorových buněk patří *P-glycoprotein* (P-gp, MDR1, ABCB1), *multidrug resistance-associated protein 1* (MRP1, ABCC1) a *breast cancer resistance protein* (BCRP, ABCG2) (Cojoc et al., 2015; Kunjachan et al., 2013). Zvýšená exprese těchto proteinů v nádorových buňkách vede k aktivnějšímu vylučování cytotoxických léčiv do extracelulárního prostoru a ke snížení koncentrace těchto léčiv uvnitř buněk pod toxickou hladinu. Mezi substráty jmenovaných

tří transportérů patří mnohá klasická protinádorová léčiva včetně taxanů, antracyklinů, antimetabolitů či inhibitorů topoizomerázy, ale také mnohá nová léčiva patřící do cílené léčby jako jsou inhibitory tyrozinkináz (*tyrosine kinase inhibitors*, TKI) sorafenib, imatinib, nilotinib, gefitinib či erlotinib (Cojoc et al., 2015; Deng et al., 2014; Kunjachan et al., 2013).

Důležitost fyziologických funkcí ABC proteinů je podtržena existencí lidských vrozených monogenních či komplexních chorob spojených s mutacemi v ABC genech. Jedná se např. o Dubin-Johnson syndrom (ABCC2), cystickou fibrózu (ABCC7), Tangierovu chorobu (ABCA1), pseudoxanthoma elasticum (ABCC6), X-vázanou adrenoleukodystrofii, Stargardtovu chorobu, s věkem spojenou makulární degeneraci, retinitis pigmentosa (ABCA4) nebo sitosterolémii (ABCG8) (Kachalaki et al., 2016; Falasca a Linton, 2012).

2.4 Možné použití inhibitorů ABC transportérů v klinické praxi

Již od prvních objevů spojujících nadměrnou expresi některých ABC transportérů se vznikem rezistence na protinádorová léčiva se objevily snahy vyvinout léky blokující či snižující aktivitu ABC transportérů, a tímto způsobem zvýšit koncentraci standardních protinádorových léků uvnitř nádorových buněk. V preklinických studiích již byly testovány **tři generace ABC inhibitorů** (především inhibitorů ABCB1) se slibnými výsledky na buněčných liniích, avšak pro použití v klinické praxi nebyl dosud schválen žádný. Důvody byly především **vysoká toxicita, neočekávané interakce s jinými léky nebo možný vliv na vznik jiných forem rezistence u nádorových buněk** (Chen et al., 2016; Kathavala et al., 2015). Významnou bariérou v tomto přístupu je také skutečnost, že v nádorových buňkách bývá zvýšena exprese současně více různých ABC transportérů, jejichž množiny substrátů se částečně překrývají. Inhibice jednoho typu ABC transportéru pak může být poměrně snadno nahrazena aktivitou transportéru jiného (Chen et al., 2016; Kathavala et al., 2015).

Výzkum se proto v posledních letech zaměřil na zkoušení efektu léčiv, která nebyla původně určena k léčbě nádorů s mnohočetnou lékovou rezistencí, jako jsou např. **tyrozinkinázové inhibitory** (TKI) a inhibitory PDE-5 (fosfodiesteráza 5). U mnoha TKI,

včetně již běžně klinicky využívaných imatinibu, erlotinibu a sorafenibu, výzkum v *in vitro* i *in vivo* podmínkách ukazuje, že blokují nebo působí proti aktivitě ABC transportérů (Deng et al., 2014; Chen et al., 2016; Kathavala et al., 2015). Vzhledem k tomu, že TKI působí proti více typům ABC transportérů současně a pravděpodobně nepřinášejí neočekávané nežádoucí účinky, jde o nadějný směr léčby MDR. Současně narůstá počet **přírodních látek** (především ze skupin flavonoidů, kumarinů, terpenoidů a alkaloidů), u kterých jsou popisovány účinky proti nádorovým buňkám s rozvinutou MDR (Chen et al., 2016; Kathavala et al., 2015).

3 Chromosomální abnormality a mnohočetná léková rezistence

3.1 Genomová a chromosomová nestabilita

Genomová nestabilita je výrazným znakem zhoubných nádorů a projevuje se genetickými změnami na různých úrovních uspořádání genomu (Hanahan a Weinberg, 2011; Negrini et al., 2010). Na úrovni genů se jedná o změny jednoho až řádově stovek nukleotidů, na úrovni chromosomů o početní či strukturní změny chromosomových segmentů a na úrovni celého genomu se projevuje ztrátami či zisky celých chromosomů. **Chromosomová nestabilita** (*chromosomal instability*, CIN) je forma genomové nestability, která byla popsána u většiny solidních nádorů a mnoha hematologických malignit. CIN představuje dynamický stav, při kterém buňky průběžně získávají či ztrácejí celé chromosomy či jejich části se zvýšenou četností než je obvyklé u normálních buněk. Je tedy základním zprostředkovatelem aneuploidie, stavu s abnormálním počtem chromosomů v buňce, a intra-tumorové heterogenity (McGranahan et al., 2012).

3.2 Mechanismy podílející se na chromosomové nestabilitě

Na CIN projevující se **početními chromosomovými změnami** se podílejí mechanismy, které vedou k chybám v mitóze a k nerovnoměrnému rozdělení chromosomů mezi dceřiné buňky. Jedná se např. o zeslabení mitotického kontrolního bodu, zmnožení centrosomů nebo nesprávné navázání chromosomů na dělicí vřetenko (Lee et al., 2011; McGranahan et al., 2012). Klíčový jev spojený s CIN projevující se **strukturními chromosomovými změnami** je tvorba tzv. reaktivních chromosomů vznikajících na podkladě chromosomových zlomů. Tři hlavní mechanismy bývají uváděny v souvislosti se vznikem chromosomových zlomů: chybná funkce telomer, fragilní místa a chybné DNA opravné mechanismy (Lee et al., 2011; McGranahan et al., 2012).

3.3 Klinický význam chromosomové nestability

Klinický význam CIN je podtržen jejím spojením se špatnými výsledky léčby popsány u mnoha typů nádorů, včetně nádorů plic, prsu a kolorekta (McGranahan et al., 2012). Toto spojení je pravděpodobně řízeno intra-tumorovou heterogenitou, která se podílí na přizpůsobování se nádoru jako celku nepříznivým podmínkám vnějšího prostředí ve smyslu Darwinovy evoluční teorie (Gerlinger a Swanton, 2010). Současné poznatky také naznačují, že CIN je spojena s **mnohočetnou lékovou rezistencí** (Lee et al., 2011). Cytogenetické metody založené na hodnocení jednotlivých buněk přinášejí při studiu mechanismů CIN výsledky zachycující, jak dynamiku celého procesu, tak intra-tumorovou heterogenitu. Tyto parametry nelze zachytit molekulárně genetickými metodami, jako například expresním profilováním, založenými na hodnocení populace buněk, které jsou však snadnější, co se týče náročnosti laboratorního procesu.

3.4 Chromosomová nestabilita jako terapeutický cíl

Vzhledem k zásadní roli kinetochorů při napojení mikrotubulů dělicího vřeténka na centromery chromosomů, mohou kinetochory představovat atraktivní terapeutický cíl pro ovlivnění špatného rozchodu chromosomů v nádorových buňkách. Zvýšená exprese kinetochorových proteinů vede k významnému snížení špatného rozchodu chromosomů a potlačení CIN v nádorových buňkách (Bakhoum a Compton, 2012). Tím by se měla v nádorových buňkách snižovat i schopnost získat rezistenci.

Opačným přístupem je podpora stability mikrotubulů, např. podáváním inhibitorů kináz Aurora A a B, které mikrotubuly destabilizují. Následkem je zvýšení množství chyb při rozchodu chromosomů a případný vznik polyploidních buněk. Takto cíleně destabilizované buňky potom mohou být citlivější na současně podávaná cytostatika. Informací o účinku inhibitorů kináz Aurora A a B neustále přibývá, včetně předběžných výsledků preklinických studií. Přes určité pozitivní výsledky při léčbě různých typů rezistentních nádorů je v současnosti velkým problémem toxicita (především závažné neutropenie) u této léčebné modalitě (Dittrich et al., 2015; Cheung et al., 2014).

4 Cíle práce

- I. Získat argumenty ve prospěch hypotézy o existenci genových expresních profilů ABC genů, které jsou společné více typům zhoubných nádorů a mají klinický význam.
- II. Přinést detailnější laboratorní i klinické informace o skupině pacientů s akutní myeloidní leukemií, kteří po dvou chemoterapeutických pokusech o dosažení remise onemocnění nedosáhli kompletní cytogenetické remise.
- III. Podpořit či nepodpořit vyčlenění skupiny pacientů s primárními myelodysplastickými syndromy a translokací $t(2;11)(p21;q23)$ bez účasti MLL genu jako samostatné entity a najít případnou prognózu této nové skupiny.
- IV. Zhodnotit potenciální rizika ve vztahu ke vzniku rezistence při kontrolovaném přerušení cílené léčby tyrozinkinázovými inhibitory u pacientů s chronickou myeloidní leukemií.
- V. Porovnat výhody a nevýhody cytogenetické analýzy změn v nádorových buňkách oproti současným molekulárně genetickým přístupům s využitím souboru vzorků dětské akutní lymfoblastické leukemie.

5 Materiál a použité metody

5.1 Analyzované vzorky

Vzorky tkáně primárních nádorů kolorektálního karcinomu a párové vzorky nenádorové tkáně byly odebrány vybraným onkologickým pacientům léčeným ve Fakultní nemocnici Plzeň od roku 2008 do roku 2013. Tkáňové vzorky primárních nádorů prsu a příslušné nenádorové kontrolní vzorky byly získány v rámci léčby prováděné v Onkocentru skupiny MEDICON a.s. v Praze v letech 2006 až 2010. V případě nádorů pankreatu se jednalo o vzorky nádorové a nenádorové tkáně od pacientů diagnostikovaných a léčených v Institutu klinické a experimentální medicíny v Praze a Fakultní nemocnici Brno v rozmezí let 2008 až 2012. Vzorky kostní dřeně či periferní krve za účelem analýzy karyotypu buněk hematologických neoplasií (chronická a akutní myeloidní leukemie, akutní lymfoblastická leukemie) byly odebírány pacientům léčeným ve Fakultní nemocnici Plzeň v letech 2004 až 2015.

5.2 Kvantitativní PCR v reálném čase

Naředěná amplifikovaná cDNA byla vstupním materiálem pro kvantitativní polymerázovou řetězovou reakci v reálném čase (qRT-PCR) s použitím TaqMan Gene Expression Assays (Life Technologies). Jako referenční geny byly v případě vzorků kolorektálního karcinomu použity geny *POLR2A*, *HPRT1*, *PSMC4*, *EIF2B1*, *MRPL19* a *PPIA*. Geny *EIF2B1*, *MRPL19*, *IPO8* a *UBB* byly vybrány jako nejstabilnější referenční geny pro normalizaci dat u vzorků nádoru prsu. U nádorů pankreatu byly referenčními geny *MRPL19*, *ELF1* a *POLR2A*. Analyzovanými geny (*genes of interest*, GOI) byl u všech studovaných typů nádorů set 49 popsaných lidských ABC genů (včetně pseudogenu *ABCC13*). Protokol pro qRT-PCR byl převzat dle doporučení výrobců použitých reagensů (New England Biolabs Inc, MBI Fermentas Inc, Top-Bio s.r.o., Life Technologies Corp) a byl v souladu se standardními doporučeními (MIQE Guidelines - Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments) (Bustin et al., 2009).

5.3 Analýza karyotypu nádorových buněk a fluorescenční *in situ* hybridizace

Chromosomová analýza byla provedena na buňkách kostní dřeně nebo periferní krve po krátkodobé kultivaci v růstovém médiu (24-72 hodin). Základní kultivace využívá spontánního dělení nádorových buněk v prostředí *in vitro* bez nutnosti buněčné dělení stimulovat mitogeny. Cytogenetické preparáty byly připraveny z fixovaných buněčných suspenzí kapáním na speciálně připravená podložní skla. Preparáty byly obarveny metodou G-pruhování, tj. barvení ve vypufrovaném roztoku Giemsova barviva po předchozím působení enzymu trypsinu (Michalová, 1999). Analýzy karyotypů byly provedeny s pomocí karyotypovacího systému Ikaros (MetaSystems) a vyhodnoceny dle mezinárodní cytogenetické nomenklatury (ISCN).

Metody hybridizace *in situ* využívají stejného principu jako analýza dle Southerna, to je schopnosti jednořetězcové DNA se vázat s komplementárními úseky denaturované cílové dvouřetězcové DNA. Částečné denaturace DNA vzorku bylo dosaženo působením vyšší teploty a přítomnosti labilizujících činidel (alkalie, formamid). Synteticky připravené DNA sondy, v případě fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) předem označené fluorescenční značkou, se pak za vhodných hybridizačních podmínek navázaly na cílovou DNA. Byly používány především komerčně dostupné FISH sondy od firem Abbott-Vysis, Cytocell a Kreatech. Signál navázané DNA sondy byl detekován pomocí fluorescenčního mikroskopu a analyzován v programu Isis (MetaSystems).

5.4 Statistické a bioinformatické vyhodnocení získaných dat

Pro účely relativní kvantifikace expresních dat byla použita normalizace vzhledem k panelu referenčních genů (viz 5.2 Kvantitativní PCR v reálném čase). Normalizační faktor (NF) byl spočítán jako geometrický průměr příslušných Ct hodnot všech referenčních genů. Násobek exprese daného analyzovaného genu u daného vzorku, vzhledem k normalizačnímu faktoru, byl vypočítán metodou $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Schmittgen a Livak, 2008). Pro účely hierarchického klastrování byla použita normalizace průměrnou hodnotou Ct pro daný analyzovaný gen, tj. Ct hodnoty daného analyzovaného genu u daného vzorku

byly poděleny průměrnou hodnotou Ct (aritmetický průměr) pro daný analyzovaný gen. Následovalo logaritmování takto získaných hodnot logaritmem při základu 2.

Pro zjištění korelací mezi expresními hodnotami byly spočítány korelační koeficienty pomocí Spearmanova testu, který je pro hodnocení genových expresních dat vhodnější než Pearsonův test. Hierarchické klastrování dat bylo založeno na euklidovských vzdálenostech a metodách UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method using arithmetic Averages*, nevážený průměr skupin dvojic) a Wardova metoda. Ke zjištění statisticky významných závislostí mezi genovými expresními daty pro daný analyzovaný gen či expresními profily a klinickými daty byly použity neparametrické statistické metody, především Mann-Whitneyův U test nebo Kruskal-Wallisův test. Křivky přežití byly odhadovány pomocí Kaplan-Meierovy metody a rozdíly mezi nimi testovány log-rank testem. Za statisticky významné byly považovány vztahy s p hodnotou menší než 0,05. Nalezené genové expresní profily byly vizualizovány formou tzv. heat map.

Pro normalizaci a statistické výpočty s expresními daty byly využity programy Microsoft Excel 2013, Netwalker software (<https://netwalkersuite.org/>), Statistica software (StatSoft, Česká republika) a PATH software (http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm). Genové sítě byly vytvářeny v programu Cytoscape (<http://www.cytoscape.org/>). Funkční *in silico* analýza byla provedena na základě informací získávaných z veřejně dostupných databází, zejména šlo o NCBI Gene, The Weizmann Institute of Science GeneCards, UniProtKB/Swiss-Prot, UCSC Genome Browser, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes a Reactome.

6 Výsledky výzkumu

6.1 Příspěvek I

Název příspěvku: ABC gene expression profiles have clinical importance and possibly create new hallmark of cancer

Autoři: Pavel Dvořák, Martin Pešta, Pavel Souček

Název časopisu a nakladatelství: Tumor Biology (SAGE Publishing)

Rok vydání a impakt faktor časopisu: 2017, IF₍₂₀₁₅₎ 2,926

Citace: DVORAK, Pavel, Martin PESTA a Pavel SOUCEK, 2017. ABC gene expression profiles have clinical importance and possibly create new hallmark of cancer. *Tumor Biology* [online]. SAGE Publishing [in press]. Dostupné z: <http://journals.sagepub.com/loi/tuba>

Tumor Biology

ABC gene expression profiles have clinical importance and possibly create new hallmark of cancer

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	TUBI-D-16-03780R1	
Full Title:	ABC gene expression profiles have clinical importance and possibly create new hallmark of cancer	
Short Title:	ABC profiles clinical importance hallmark cancer	
Article Type:	Original Article	
Corresponding Author:	Pavel Dvorak Charles University, Medical Faculty in Pilsen Plzen, CZECH REPUBLIC	
Corresponding Author Secondary Information:		
Corresponding Author's Institution:	Charles University, Medical Faculty in Pilsen	
Corresponding Author's Secondary Institution:		
First Author:	Pavel Dvorak	
First Author Secondary Information:		
Order of Authors:	Pavel Dvorak Martin Pesta Pavel Soucek	
Order of Authors Secondary Information:		
Funding Information:	Ministerstvo Zdravotnictví České Republiky (AZV 15-25618A)	Dr. Pavel Soucek
	Czech Science Foundation (P303/12/G163)	Dr. Pavel Soucek
	Ministry of Education Youth and Sports of the Czech Republic (LO1503)	Dr. Pavel Soucek
Abstract:	<p>ATP-binding cassette (ABC) proteins constitute a large family of active transporters through extracellular and intracellular membranes. Increased drug efflux based on ABC protein activity is related to the development of cancer cell chemoresistance. Several articles have focused on ABC gene expression profiles (signatures), based on the expression of all 49 human ABC genes, in individual tumor types and reported connections to established clinicopathological features. The aim of this study was to test our theory about the existence of ABC gene expression profiles common to multiple types of tumors, which may modify tumor progression and provide clinically relevant information. Such general ABC profiles could constitute a new attribute of carcinogenesis. Our combined cohort consisted of tissues from 151 cancer patients - breast, colorectal and pancreatic carcinomas. Standard protocols for RNA isolation and qRT-PCR were followed. Gene expression data from individual tumor types as well as a merged tumor dataset were analyzed by bioinformatics tools. Several general ABC profiles, with differences in gene functions, were established and shown to have significant relations to clinicopathological features such as tumor size, histological grade or clinical stage. Genes ABCC7, A3, A8, A12, and C8 prevailed among the most up- or downregulated ones. In conclusion, the results supported our theory about general ABC gene expression profiles and their importance for cancer on clinical as well as research levels. The presence of ABCC7 (official symbol CFTR) among the genes with key roles in the profiles supports the emerging evidence about its crucial role in various cancers.</p>	

Research article

ABC gene expression profiles have clinical importance and possibly create new hallmark of cancer

Pavel Dvorak^{1,*}, Martin Pesta¹, Pavel Soucek²

¹Department of Biology, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University, Alej Svobody 76, 323 00 Pilsen, Czech Republic

²Biomedical Center, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University, Alej Svobody 76, 323 00 Pilsen, Czech Republic

***Corresponding author:**

Pavel Dvorak, MSc.

Charles University

Faculty of Medicine in Pilsen

Department of Biology

Alej Svobody 76

323 00 Pilsen

Czech Republic

Tel.: +420 377 593 263

Email: Pavel.Dvorak@lfp.cuni.cz

Funding information

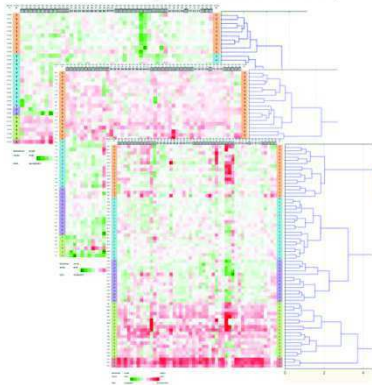
This work was supported by the Czech Ministry of Health [grant no. AZV 15-25618A]; the Czech Science Foundation [project no. P303/12/G163]; and the National Sustainability Program I (NPU I) provided by the Ministry of Education Youth and Sports of the Czech Republic [project no. LO1503].

Abstract

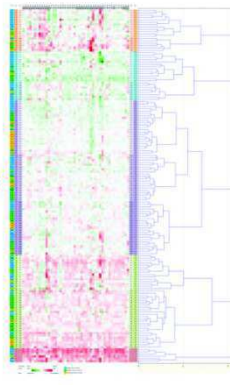
ATP-binding cassette (ABC) proteins constitute a large family of active transporters through extracellular and intracellular membranes. Increased drug efflux based on ABC protein activity is related to the development of cancer cell chemoresistance. Several articles have focused on ABC gene expression profiles (signatures), based on the expression of all 49 human ABC genes, in individual tumor types and reported connections to established clinicopathological features. The aim of this study was to test our theory about the existence of ABC gene expression profiles common to multiple types of tumors, which may modify tumor progression and provide clinically relevant information. Such general ABC profiles could constitute a new attribute of carcinogenesis. Our combined cohort consisted of tissues from 151 cancer patients - breast, colorectal and pancreatic carcinomas. Standard protocols for RNA isolation and qRT-PCR were followed. Gene expression data from individual tumor types as well as a merged tumor dataset were analyzed by bioinformatics tools. Several general ABC profiles, with differences in gene functions, were established and shown to have significant relations to clinicopathological features such as tumor size, histological grade or clinical stage. Genes *ABCC7*, *A3*, *A8*, *A12*, and *C8* prevailed among the most up- or downregulated ones. In conclusion, the results supported our theory about general ABC gene expression profiles and their importance for cancer on clinical as well as research levels. The presence of *ABCC7* (official symbol *CFTR*) among the genes with key roles in the profiles supports the emerging evidence about its crucial role in various cancers.

Graphical abstract

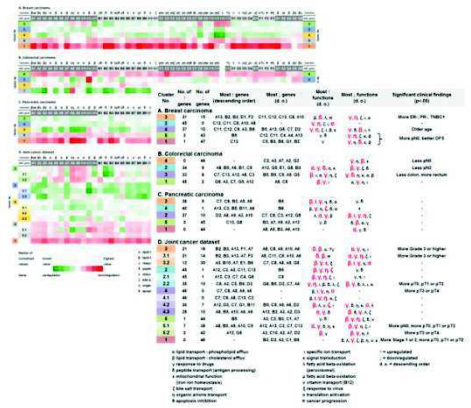
ABC gene expression profiles
in different tumor types (breast,
colorectal and pancreatic tumors)



ABC profiles
in merged tumor dataset



Comparison of ABC profiles
and clinical consequences



Keywords

ATP-binding cassette; ABC transporters; gene expression; profile; cancer; bioinformatics

Abbreviations

BC, breast carcinoma; CC, colorectal carcinoma; PC, pancreatic carcinoma.

ABC gene expression profiles have clinical importance and possibly create new hallmark of cancer

1. Introduction

Despite the wide range of modern options for treatment of specific cancer types, the main currently available therapies are generally based on surgery and the use of cytotoxic drugs and/or ionizing radiation, which have potent antitumor activity. Tumor chemoresistance, constitutional as well as acquired, limits the effect of administered chemotherapy or can even cause its failure. Resistance of cancer cells to several structurally and functionally distinct chemotherapeutics composes a phenomenon known as multidrug resistance (MDR), which is one of the main obstacles to tumor chemotherapy efficiency at present. This problem has first of all dramatic health impacts, but also high worldwide economic impacts [1-3].

Changes to any of several physiological processes ongoing in cells can initiate the development of chemoresistance. Processes mostly involved include blocking of important pathways leading to apoptosis, increased drug efflux or decreased uptake, accelerated catabolism of drugs, formation of a protective barrier of the tumor microenvironment, cell phenotype change via epithelial-mesenchymal transition, strengthened or weakened cell adhesion to the extracellular matrix, cell cycle phase switching, epigenetic changes or accelerated DNA repair [4, 5]. However, these processes do not stand alone, and in case of chemoresistance development, imbalances between several interconnected processes play a key role [1, 5]. Cancer stem cell (CSC) theory, which has been increasingly supported in recent years, can also provide an explanation for the origin of chemoresistance [3, 6].

Increased drug efflux based on high expression of ABC transport proteins (ATP-binding cassette family) is believed to be one of the major factors determining development of chemoresistance [1, 4, 7, 8]. ABC proteins constitute a large family of mostly active transporters located in extracellular and intracellular membranes in eukaryotic as well as bacterial cells. All 49 recognized ABC genes in

humans can be classified into seven subfamilies according to the similarities in structure and order of domains - ABCA (ABC1), ABCB (MDR/TAP), ABCC (CFTR/MRP), ABCD (ALD), ABCE (OABP), ABCF (GCN20) and ABCG (White) [8-10].

After ATP binding by nucleotide-binding domains these pumps use chemical energy for specific transportation of a wide spectrum of substrates, which are bound by transmembrane-binding domains. From ions and amino acids, through cholesterol and its derivatives, glycolipids, phospholipids, sugars, and vitamins, to whole proteins, all these molecules are among their transported physiological substrates. ABC proteins naturally constitute integral parts of the processes mediated by these substrates, e. g. membrane homeostasis, lipid trafficking, waste disposal and detoxification or cell signaling [8, 11, 12]. Toxic endogenous molecules and xenobiotics could also become substrates, as has been shown by many studies and which has raised considerable interest [8, 13]. Moreover, members of ABCE and ABCF subfamilies lack transmembrane-binding domains and are purported to play a role in protein translation [12, 13]. Importantly, Barbet et al. [12] also stressed the role of ABC transporters in maintenance of stem cells' pluripotency. However, the overlapping nature of ABC substrates could be one of the main obstacles to research on ABC gene function and also to developing promising ABC inhibitors [14].

This article follows three recently published works, which originated from our laboratories and explored the connection between the expression levels of ABC genes and clinicopathological features in three types of cancer individually. Expression of all human ABC genes in breast carcinoma (BC) was analyzed by Hlavac et al. [15], in colorectal carcinoma (CC) by Hlavata et al. [16], and in pancreatic carcinoma (PC) by Mohelnikova-Duchonova et al. [17]. In comparison to the corresponding non-neoplastic control samples, many significantly down-regulated or up-regulated ABC transporters were revealed for each tumor type. Moreover, some relationships between dysregulation of individual ABC genes and prognostic or predictive markers were statistically significant. Based on our previous results and influenced by the concept of hallmarks of cancer [18], we hypothesized the

existence of ABC gene expression profiles (signatures), which are common among multiple types of tumors. These profiles could have common characteristics on the expression as well as functional levels and bring some general information related to tumor pathogenesis. In clinical practice the development of new prognostic or predictive markers could be based on knowledge of these profiles. Moreover, general ABC expression profiles could constitute tumor attributes in a more general manner, which is getting closer to the concept of hallmarks of cancer in the context established in the work of Hanahan and Weinberg [18]. Bioinformatic analyses in this article are presented in support of this hypothesis.

2. Materials and methods

2.1. Dataset characteristics

Our bioinformatic analyses were performed on a merged dataset of 151 Czech cancer patients diagnosed in four Czech hospitals (Medicon, Prague; University Hospital Pilsen, Pilsen; Institute of Clinical and Experimental Medicine, Prague; and University Hospital Brno, Brno). ABC transporter expression data from 68 breast carcinoma (BC) patients, published separately in Hlavac et al. [15], were included as the first subset of our primary data. Data from both types of tissues - tumor as well as non-neoplastic control tissues - were available for 43 patients and for 25 patients only tumor samples were available. Gene expression of 49 human ABC genes (including the *ABCC13* pseudogene) was measured; all genes could be interpreted and entered further analyses.

The second subset of primary data was composed of 51 colorectal carcinoma (CC) samples; details of this subcohort were separately discussed in Hlavata et al. [16]. Data from 50 tumor and paired non-neoplastic tissue samples were available and only one patient was missing a control tissue sample. The expression of 49 ABC genes was measured for the CC samples. The data of all genes except

ABCC12, which was below the limit of method detection in all samples, were included in the following analyses.

The third subset of primary data was based on the cohort incorporated in the study conducted by Mohelnikova-Duchonova et al. [17] and contained 32 pancreatic adenocarcinoma (PC) tumor samples and 27 paired control non-neoplastic tissue samples. The expression data of 49 ABC genes with the exception of the ABCG4 and ABCG5 genes, which were also below the limit of method detection, were included in our present analyses.

The three above mentioned studies were our previous works performed in our laboratories. All clinical data available for our analyses have been continuously updated with the last update in April 2016. This study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals.

2.2. Gene expression profiling

Isolation of total RNA, cDNA preparation and quantitative real-time polymerase chain reactions (qRT-PCR) adhered to the Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments Guidelines [19] and were precisely described in our previous articles [15-17]. The same amount and quality of input RNA were applied for each sample within the studied tumor cohorts.

2.3. Statistics and bioinformatics

Preprocessing of our gene expression data was performed in Microsoft Excel 2013 and Netwalker software [20]. Raw gene expression data (Ct values) from individual tumor types were normalized by the average Ct value of each gene of interest (individual ABC genes) and then log₂-transformed (following the guidelines for data import and processing to the Netwalker software). Log₂-

transformed row-normalized gene expression data from BC, CC and PC datasets were collected into one MS Excel spreadsheet and transposed to a format with cases in rows and ABC genes in columns, with the aim of creating a merged tumor dataset. Because of the missing data about the expression of ABCC12 in the CC dataset and ABCG4 and ABCG5 in the PC dataset, all the data about the expression of these three genes were excluded from the merged dataset table. Afterwards, tree clustering was performed with the merged dataset with the same methodology as with the individual tumor datasets.

Statistical analyses (including survival analyses) were conducted with the help of Statistica (Statsoft, Czech Republic) and the freely available PAST statistical software package [21]. Two types of tree clustering – an unweighted pair-group method using arithmetic averages (UPGMA) and Ward's method - were performed. Determined clusters were visualized in a heat map manner. Heat maps with mean values for each cluster and each gene were calculated with the aim of showing comparable characteristics. Clinical data were sorted according to the relevant clusters, visualized in heat maps for an overall review and statistically tested using predominantly non-parametric statistics (the Mann-Whitney U and Kruskal-Wallis tests). Results with a two sided p value less than 0.05 were considered to be statistically significant. Disease-free survival (DFS) was defined as the time elapsed between surgery and disease recurrence or death. Overall survival (OS) was defined as the time elapsed between surgery and patient's death from any cause. Median survival was estimated using the Kaplan–Meier method and the difference was tested using the log-rank test. The characteristics based on the maximum of five most downregulated and five most upregulated ABC genes were proposed for each of the determined profiles. The comprehensive analysis of ABC gene functions was based on multiple searches in several publicly available databases – mainly NCBI Gene, The Weizmann Institute of Science GeneCards, UniProtKB/Swiss-Prot, UCSC Genome Browser, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, and Reactome.

3. Results

3.1. Breast cancer

Tree clustering with Ward's method divided the set of 68 BC samples into five main clusters (BC1-BC5), which consisted of 3, 19, 16, 13, and 17 cases. Heat map visualization of the clustering analysis is shown in [Fig. 1](#) (the clustering dendrogram is available in [Fig. S1](#) in the Supplementary Materials). Possible significant relationships between these established BC clusters and relevant clinical data (age, menopausal status, tumor size (pT), regional lymph node metastasis (pN), distant metastases (cM), clinical stage, histological type and grade, expression of ER, PR and HER2, expression of the Ki-67 protein, triple negative breast cancer (TNBC) status, neoadjuvant chemotherapy (NACT) regimen, outcome and survival) were further tested by statistical analyses.

The cluster BC3 (with 31 ABC genes upregulated and 15 downregulated) significantly prevailed in ER negative ($p=0.012$), PR negative ($p=0.009$), and TNBC ($p=0.022$) cases, i.e., in patients with a generally worse prognosis. Within the cluster BC3, *ABCA13*, *B2*, *B3*, *D1*, and *F2* showed the highest level of upregulation, and *ABCC11*, *C12*, *C13*, *C8*, and *A10* showed the highest level of downregulation. These deregulations also constitute the characteristic features of this cluster, defining it against the other clusters. Median values for each gene within the established clusters were calculated with the aim to show comparable characteristics between the clusters. In a similar heat map manner, these median values are presented in [Fig. 2](#). Significant and clinically important findings together with the characteristics of all BC clusters are summarized in [Fig. 3](#). The cluster BC4 was revealed to be connected with older patients; no patient younger than 40 years old (there were 15 patients younger than 40 in the BC cohort) was present in this cluster ($p=0.031$). A trend for a higher number of pN0 patients was seen in the cluster BC5 ($p=0.064$). Comparison of clusters with the vast majority of downregulated ABC genes (clusters BC1 and 5) against clusters with mostly upregulated genes (clusters BC2, 3 and 4) resulted in the significant finding that cases with pN0 status were prevalent in the clusters BC1 and 5 combined, compared with the rest of the clusters ($p=0.019$). Similarly, a trend

for longer DFS for the cluster BC5 patients was recognized (Log rank test χ^2 , $p=0.06$). Moreover, after combining the cluster BC1 and BC5 patients, the result – better DFS for patients in this combined cluster - fulfilled the criteria for statistical significance (Log rank test χ^2 , $p=0.034$).

3.2. Colorectal cancer

Tree clustering with Ward's method divided the set of 51 CC samples into four main clusters (CC1-CC4) composed of 6, 13, 13, and 19 members. A heat map presenting the results of the CC sample clustering is shown in Fig. 4 (for details see figure Fig. S2 in the Supplementary Materials). Gene median values for each CC cluster can be compared in Fig. 2. For statistical testing of CC samples, we considered these clinical data: gender, age, tumor size (pT), lymph node involvement (pN), distant metastases (cM), clinical stage, histological grade, primary tumor localization (colon C18, rectosigmoideum C19, and rectum C20), chemotherapy, grade 3 or 4 toxicity, post-operative radiotherapy, outcome and survival. Surprisingly, the cluster CC4 (representing cases with the vast majority of ABC genes downregulated) showed a significantly higher incidence of cases with pN1 or higher ($p=0.035$). Primary tumor localization in rectum compared with colon prevailed significantly among CC3 patients ($p=0.006$). Within the cluster CC3, *ABCC7*, *C13*, *A12*, *A8*, and *C3* were the most upregulated genes, and *ABCB5*, *B9*, *C9*, *A9*, and *G5* were the most downregulated – constituting the cluster characteristics. There was no case with pN2 status in the cluster CC2 ($p=0.036$). Similar to the BC set, in patients treated by adjuvant therapy after radical surgical resection R0, DFS was evaluated as a measure of short-term survival. Comparison of DFS and OS between samples with mostly downregulated ABC genes (cluster CC4) versus samples with most of the genes upregulated (clusters CC1, 2, and 3) was performed; however, no statistically significant association was observed. The other survival analyses of the individual clusters against the rest also did not show statistical significance. Fig. 3 summarizes the significant results and cluster characteristics for the CC set.

3.3. Pancreatic cancer

Five main clusters (PC1-PC5) were created in the set of 32 PC samples after the clustering analysis, which was performed in a similar way as in the previous two tumor sets. These clusters contained 1, 2, 10, 13, and 6 cases and can be examined in [Fig. 5](#) ([Fig. S3](#) in the Supplementary Materials provides the clustering dendrogram). In [Fig. 2](#), gene expression median values for each PC cluster can be studied and compared with the other tumor clusters. From available clinical information, we evaluated gender, age, histological grade, pTNM stage, angioinvasion (pA), perineural invasion (pP), margin status (R0 versus R1), *KRAS* mutations in codons 12 and 13 (wild type versus mutant), chemotherapy administration, and OS in the PC set. Similar types of statistical analyses were conducted as for the BC and CC sets; however, no statistically significant association of the ABC profiles with the clinicopathological features were found for our PC samples.

3.4. Merged cancer dataset

Which general ABC gene expression profiles can be distinguished across several different tumor types? To address this crucial question, we created a merged dataset composed of all available tumor samples (see Materials and Methods). Similar procedures as described above for the separate tumor cohorts were applied to the combined cohort afterwards. Tree clustering with Ward's method created five main clusters (JC1-JC5) within 151 tumor samples of the merged dataset. Importantly, each main cluster contained some samples from each of the analyzed tumor types, with the exception of the cluster JC1, which contained only BC and PC samples. The summary of the number of patients from individual tumor types within the established ABC expression profiles of the merged tumor dataset is available in [Table S1](#) in the Supplementary Materials. The overall number of the cases, which were assigned to the main clusters, was 6, 21, 18, 66, and 40 cases (from JC1 to JC5). After a comparative analysis of the characteristic expression profiles of these main clusters, further subdivision into nine subclusters was possible. The clustering results of the merged dataset can be

observed in Fig. 6 (Part 1 and Part 2); the clustering dendrogram is provided in the Supplementary Materials as Fig. S4. The characteristics of all the merged dataset clusters and subclusters in the form of expression median values of each ABC gene are shown in Fig. 2. The cluster JC1 had no subcluster and was characterized by a strong downregulation of all the 46 ABC genes, which were tested across all our tumor samples. The cluster JC2 had two subclusters (JC2.1 and JC2.2), and contrary to the cluster JC1, showed upregulation of 45 out of 46 ABC genes. In the JC2, the five most upregulated genes were *ABCA12*, *C3*, *A3*, *C11*, and *C13* (in descending order) and the only downregulated gene was *B5*. 21 upregulated genes (*ABCB2*, *B3*, *A13*, *F1*, *A7*, ...) and 18 downregulated genes (*ABCA8*, *C8*, *A9*, *A10*, *A6*, ...) were observed within the cluster JC3, which could be also further divided into two subclusters (JC3.1 and JC3.2). Milder upregulation of all 46 genes, compared with the JC2, constituted the characteristic feature of the JC4 having three subclusters (JC4.1-4.3); genes *ABCC7*, *C8*, *A8*, *A9*, and *A6* showed the highest level of upregulation. Importantly, upregulation of only one gene, *ABCB5*, and downregulation of 44 genes (*ABCA3*, *C3*, *B3*, *C1*, *A7*, ...) were discovered as the typical pattern of the JC5, which was further divided into two subclusters (JC5.1 and 5.2) in the detailed division. Thus, JC1 and JC2 were the most distinctive ones and interesting for further comparisons (Fig. 3).

In the further statistical analyses, only those clinicopathological features which were available for all of the samples in the merged dataset could be evaluated. These were: gender, age, histological grade, clinical stage, pN and pT status, and newly calculated relative risk. Relative risk was defined as the value 1 or 0 (achieved versus not achieved), according to one year OS in PC patients, three years DFS in BC patients and three years OS (all CC patients) or DFS (adjuvantly treated CC patients) in CC patients. The cluster JC3 contained significantly more Grade 3 or 4 patients ($p=0.010$). A trend for higher incidence of smaller size tumors (pT1 or pT2) was seen for the subcluster JC3.1 ($p=0.056$). Significantly higher incidence of such smaller size tumors was noted in the subcluster JC2.2 ($p=0.041$). On the contrary, a higher incidence of larger size tumors (pT3 or pT4) was recognized for the whole cluster JC4 ($p=0.017$). Moreover, this tendency was most prominent within the subcluster JC4.3,

though not fulfilling the cut-off for statistical significance ($p=0.059$). Within the cluster JC5, the subcluster JC5.1 had significantly higher incidence of pN0 patients ($p=0.048$) together with higher incidence of smaller size tumors ($p=0.013$). Surprisingly, the subcluster JC5.2 showed significantly higher incidence of patients with larger size tumors ($p=0.024$) and two times more patients with pN1 or higher than pN0. Higher incidence of stage I or II patients ($p=0.025$) and smaller size tumors ($p=0.038$) was observed for the cluster JC1. All statistically significant findings for the merged tumor dataset are also summarized in [Fig. 3](#). No significant association between JCs and relative risk was revealed.

4. Discussion

The evidence in support of a new approach in the field of ABC gene expression profiles (signatures) is presented in the current article. We believe that ABC gene expression profiles in cancer can be recognized on a more general level than the level of individual tumor types. This theory originated from our previous results, which were obtained from the analyses of the expression levels of all recognized human ABC genes separately in three tumor types, and also the results of several published studies, which explored ABC profiles in different tissues.

Scientific articles reporting the relationships between ABC gene expression profiles, based on the analyses of all described ABC genes in humans, and important biological or clinical consequences have been published since 2006. Two main directions can be distinguished in this research field, one focusing on the characterization of different stem cells and the other one on different tumor types.

The ABC transporter expression signature of hematopoietic stem cells (HSCs) was first determined by de Grouw et al. [22] and further explored by Tang et al. [23]. Unexpectedly, most transporters showed apparently higher expression in developed blood cell types (monocytes, granulocytes, CD71+ erythroid progenitors, T cells, and NK cells) compared to stem cells, challenging the concept that

individual transporters may function in maintaining stem cell integrity by protecting them against xenobiotics [23, 24]. Instead, a distinct expression profile for ABC transporters might be essential for stem cell function rather than overexpression of individual transporters. It is also tempting to speculate that the ABC expression profile could represent (and serve as a diagnostic tool for) the differentiation status or even “stemness” of stem cells including those with carcinogenic potential.

In the field of stem cell characterization, a comparison of human ABC gene expression profiles between pluripotent embryonic stem cells (hESCs) and early and late multipotent mesenchymal stem cells (hMSCs) was presented by Barbet et al. [12] and extended by Erdei et al. [25]. The most important differences were due to variations in ABC transporters with low but significant gene expression, suggesting their important roles in pluripotency. Similar to the current study, several of these highlighted transporters shared similar substrates but differed regarding gene regulation. In line with the previous studies, most of the ABC transporters were expressed at significantly higher levels in the differentiated cell types than in the pluripotent hESCs. The only ABC transporter that showed a decreased expression level in all differentiated cell types was *ABCG2*.

Using oligonucleotide microarrays, Park et al. [26] analyzed the ABC transporter gene expression profiles in breast cancer patients who underwent neoadjuvant chemotherapy. The expression profile of ABC transporters in melanoma (47 ABC genes were tested) was generated in the study performed by Heimerl et al. [27]. Marzac et al. [28] highlighted the putative role of less explored ABC transporters in primary chemoresistant acute myeloid leukemia, extending the research in the direction of tumor characterisation. They all emphasized the diversity of ABC transporters that cooperate to promote chemoresistance rather than overexpression of single transporters, and called for further research on ABC expression profiles in cancer. Recently published ABC gene expression profiles (based on the analysis of all human ABC genes) characteristic of specific tumors (in comparison with non-malignant control tissues) are summarized in the [Table 1](#) and profiles with clinical importance are stressed in the [Table 2](#).

Among the work originating from our laboratories, transcript levels of all human ABCs were explored in tumors and non-neoplastic control tissues from CC patients collected before the first line of treatment by a 5-fluorouracil (5-FU)-containing regimen (Hlavata et al. [16]). Several significant results with clinical consequences for CC patients were generated and *ABCC11* was proposed as a promising candidate marker for a validation study on 5-FU therapy outcome (Table 2). A major goal of our second ABC study (Hlavac et al. [15]) was to investigate associations between the expression of ABC genes and outcome of BC patients. Transcript levels of all human ABC genes were determined in post-treatment tumor and non-neoplastic tissue samples from patients treated by neoadjuvant chemotherapy. Six ABC genes were then evaluated in an independent series of pretreatment patients. *ABCA12*, *A13*, *C1*, *C8*, and *D2* were suggested as potential modifiers of progression and response to the chemotherapy of BC. Evaluation of human ABC gene transcript levels in one of the most drug-resistant cancers, the PC, was the aim of our third ABC study, conducted by Mohelnikova-Duchonova et al. [17]. The observed upregulation of *ABCB4*, *B11*, *C1*, *C3*, *C5*, *C10*, and *G2* in tumors may contribute to the generally poor treatment response of the disease. Furthermore, the upregulation of *ABCA1*, *A7*, and *G1* implicated a serious impairment of cellular cholesterol homeostasis. On the other hand, the observed downregulation of *ABCA3*, *C6*, *C7*, and *C8* suggested a possible role of stem cells in the development and progression of PC.

Dysregulation of cholesterol homeostasis and tumor progression in human prostate cancer through cancer-specific *ABCA1* hypermethylation and loss of protein expression was proposed by Lee et al. [29]. Their results were recently confirmed by Demidenko et al. [30], who reported that the ABC gene expression profile characterized by the downregulation of several genes was particularly prevalent in the *TMPRSS2-ERG*-negative prostate tumors. However, although the *TMPRSS2-ERG* gene fusion is the most prevalent genetic rearrangement, found in approximately 50 % of prostate cancers, studies examining its clinical implications have reported ambiguous results [31, 32].

Based on all the above-described research findings, our team raised the question about the existence of general ABC gene expression profiles, which could be common to different tumor types, and their possible clinical implications. This question was addressed for the first time in the current work. The clustering methodology, used in this article, was first applied to the expression data from individual tumor types – BC, CC, and PC. The variability in expression of ABC genes within each tumor type was shown and ABC gene profiles specific to individual tumor types were established. Similar clustering was then performed on a merged dataset, which was composed of all expression data from the three tumor types together. Altogether, data from 151 oncology patients were incorporated in the merged dataset. The ABC expression profiles common to these three types of tumors were revealed and it can be concluded that the existence of general ABC expression profiles was supported. It was shown that the spectrum of general ABC gene profiles, established by the clustering methodology, was similar to the spectrum of profiles seen in individual tumors. Characteristics of all the discovered profiles, from genetic as well as functional points of view, were established in the presented bioinformatics analyses and summarized in [Fig. 3](#). The characteristics based on the maximum of five most downregulated and five most upregulated ABC genes were proposed for each of the determined profiles. In the following statistical analyses, important connections to relevant clinical markers were revealed.

In the study, the BC cluster characterized by upregulation of *ABCA13*, *B2*, *B3*, *D1*, *F2* and downregulation of *ABCC11*, *C12*, *C13*, *C8*, *A10* was revealed to predominate in TNBC positive patients. Among dysregulated functions, peptide transport (antigen processing) was strongly upregulated and responsiveness to drugs and organic anion transport downregulated in this cluster. *ABCB3* and *ABCF2* were previously described as upregulated in the BC group with pathologic complete response by Park et al. [26]. Downregulation of *ABCC8* was found in relation to expression of hormone receptors, grade or TP53 protein level in BC patients by Hlavac et al. [15]. The same work connected downregulation of *ABCC8* and *ABCC11* with HER2 positivity. Older patients were found to have higher incidence in the BC cluster with mostly upregulated genes *ABCC11*, *C12*, *C8*, *A3*, *B8* and

downregulated genes *ABCB5*, *A13*, *G8*, *C7*, *D2* resulting in strong dysregulation of response to drugs, upregulation of organic anion transport and downregulation of lipid transport including cholesterol efflux. However, a possible more general link between ABC expression profiles and aging was not confirmed by the analysis of the merged tumor dataset. In Park et al. [26] upregulation of *ABCC11* was described in the BC group with residual disease. Importantly, better DFS and higher incidence of pN0 status were shown for BC patients belonging to two clusters with the vast majority of ABC genes downregulated in the present study. Surprisingly, the CC cluster with the vast majority of ABC genes downregulated showed lower incidence of patients with pN0 status, suggesting a greater importance of specific ABC genes than whole ABC gene profiles in this matter. The CC cluster having *ABCC7*, *C13*, *A12*, *A8*, *C3* genes mostly upregulated and *ABCB5*, *B9*, *C9*, *A9*, *G5* genes mostly downregulated prevailed among our rectal cancer patients. Lipid transport including cholesterol efflux was strongly upregulated and peptide transport (antigen processing) downregulated in this CC cluster along with a strong dysregulation of response to drugs in both directions. Expression of *ABCA12* and *ABCC7* was shown to increase in direction from colon to rectum in our previous work on the CC topic (Hlavata et al. [16]), where expression of *ABCB9* and *ABCG5* also decreased in the same direction.

Within the general ABC gene profiles established in this study, several of them were significantly connected with clinical markers. Prevalence of grade 3 or 4 tumors was revealed between samples attributed to the cluster characterized by high upregulation of *ABCB2*, *B3*, *A13*, *F1*, *A7* and downregulation of *ABCA8*, *C8*, *A9*, *A10*, and *A6*. Strong upregulation of peptide transport (antigen processing) together with lipid transport including cholesterol efflux, and on the other hand, downregulation of lipid transport without cholesterol efflux together with responsiveness to drugs characterize the general cluster from functional point of view. Mohelnikova-Duchonova et al. [17] showed a connection between upregulation of *ABCB2* and *B3* and Grade 3 or 4 and pT3 or pT4 respectively in PC patients. Downregulation of *ABCA6* was shown to be related to the presence of angiogenesis in the same work, as well as the downregulation of *ABCC8* in BC Grade 3 patients described above. A higher incidence of smaller sized tumors (pT1 or pT2) was found to be joined

together with three separate clusters, again pointing to the similar importance of different ABC gene combinations. Oppositely, two different clusters were shown to have a higher incidence of larger sized tumors (pT3 or pT4). A higher number of pN0 patients (together with higher number of smaller sized tumors) were shown to have the cluster with *ABCA8*, *B5*, *A9*, *A10*, and *C9* mostly upregulated and *ABCA12*, *A13*, *C3*, *C7*, and *C13* downregulated. These alterations are in line with a strong response to drug deregulation together with lipid transport without cholesterol efflux upregulation, but lipid transport including cholesterol efflux downregulation. In contrast, *ABCB5* was upregulated in the chemotherapy resistant group studied by Marzac et al. [28]. Prevalence of stage I or II (together with a higher number of smaller sized tumors as well) was noticed in the general cluster with all 46 measured ABC genes downregulated. In descending order, *ABCB3*, *D3*, *A3*, *C1*, and *B8* were the five most downregulated genes, underlining the strong downregulation of responsiveness to drugs within the cluster.

The frequency of the ABC genes among the five most up- or downregulated genes, within the revealed general ABC profiles, was also analyzed. Most interestingly, the *ABCC7* gene was found to be three times among the most upregulated and also three times among the most downregulated genes. *ABCC7*, official symbol *CFTR*, codes for chloride channels and also controls the regulation of other transport pathways. Defective *CFTR* is widely known to cause cystic fibrosis; however, there is accumulating evidence that suggests an unexpected role of *CFTR* in various cancers, especially in gastroenterological cancers, such as pancreatic and colon cancers [33-35]. From the above-mentioned previously published ABC studies, Park et al. [26] and Hlavata et al. [16] included *ABCC7* in the ABC expression profiles with clinical consequences. Furthermore, each of the *ABCA3*, *A8*, *A12*, and *C8* genes was present between the most deregulated ABC genes in five general ABC profiles. A tight connection between each of these four genes and different types of tumors has been also previously published.

The major limitation of the current pioneering study was the number of patients and tumor types that could be included. It is known that the expression and/or function of drug transporters may be influenced by genetic polymorphisms [36]. Therefore, the analyses of the most important genetic polymorphisms related to alterations in ABC gene functions should be performed and possible bias caused by the accumulation of specific variants determined, after the collection of more eligible samples.

In conclusion, the present study demonstrates the existence of general ABC gene expression profiles in cancer and their importance on the clinical as well as research levels. It points to several ABC genes (*ABCC7*, *A3*, *A8*, *A12*, and *C8*), which could play key roles and be interesting also from a pharmacological point of view. However, the number of patients and tumor types included was the major limitation. Further research in this field, taking into account more types of tumors and larger datasets, is therefore needed.

Statement of interest

The authors declare no competing financial interests.

Funding information

This work was supported by the Czech Ministry of Health [grant no. AZV 15-25618A]; the Czech Science Foundation [project no. P303/12/G163]; and the National Sustainability Program I (NPU I) provided by the Ministry of Education Youth and Sports of the Czech Republic [project no. LO1503].

Author contributions

PS and PD designed the study; PD performed the statistics and bioinformatics analyses; PS, PD and MP interpreted the results; PD and PS wrote the manuscript; PS and MP critically reviewed the manuscript.

References

1. Klener P, Klener P. Nová protinádorová léčiva a léčebné strategie v onkologii. Praha: Grada; 2010.
2. Kufe D, Holland J, Frei E. Cancer medicine 6. Hamilton, Ont.: BC Decker; 2003.
3. Hanahan D, Weinberg R. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. Cell. 2011;144(5):646-674.
4. Wu Q, Yang Z, Nie Y, Shi Y, Fan D. Multi-drug resistance in cancer chemotherapeutics: Mechanisms and lab approaches. Cancer Letters. 2014;347(2):159-166.
5. Gillet J, Gottesman M. Overcoming multidrug resistance in cancer: 35 years after the discovery of ABCB1. Drug Resistance Updates. 2012;15(1-2):2-4.
6. Di C, Zhao Y. Multiple drug resistance due to resistance to stem cells and stem cell treatment progress in cancer (Review). Experimental and Therapeutic Medicine. 2015;9(2):289-293.
7. Shukla S, Ohnuma S, V. Ambudkar S. Improving Cancer Chemotherapy with Modulators of ABC Drug Transporters. Current Drug Targets. 2011;12(5):621-630.
8. Kathawala R, Gupta P, Ashby C, Chen Z. The modulation of ABC transporter-mediated multidrug resistance in cancer: A review of the past decade. Drug Resistance Updates. 2015;18:1-17.
9. Dean M. The Human ATP-Binding Cassette (ABC) Transporter Superfamily. Genome Research. 2001;11(7):1156-1166.
10. Karatas O, Guzel E, Duz M, Ittmann M, Ozen M. The role of ATP-binding cassette transporter genes in the progression of prostate cancer. The Prostate. 2015;76(5):434-444.

11. Aye I, Singh A, Keelan J. Transport of lipids by ABC proteins: Interactions and implications for cellular toxicity, viability and function. *Chemico-Biological Interactions*. 2009;180(3):327-339.
12. Barbet R, Peiffer I, Hutchins J, Hatzfeld A, Garrido E, Hatzfeld J. Expression of the 49 human ATP binding cassette (ABC) genes in pluripotent embryonic stem cells and in early- and late-stage multipotent mesenchymal stem cells. *Cell Cycle*. 2012;11(8):1611-1620.
13. Alexander S, Benson H, Faccenda E, Pawson A, Sharman J, McGrath J et al. The Concise Guide to PHARMACOLOGY 2013/14: Overview. *British Journal of Pharmacology*. 2013;170(8):1449-1458.
14. Wu C, Ohnuma S, V. Ambudkar S. Discovering Natural Product Modulators to Overcome Multidrug Resistance in Cancer Chemotherapy. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 2011;12(4):609-620.
15. Hlaváč V, Brynychová V, Václavíková R, Ehrlichová M, Vrána D, Pecha V et al. The expression profile of ATP-binding cassette transporter genes in breast carcinoma. *Pharmacogenomics*. 2013;14(5):515-529.
16. Hlavata I, Mohelnikova-Duchonova B, Vaclavikova R, Liska V, Pitule P, Novak P et al. The role of ABC transporters in progression and clinical outcome of colorectal cancer. *Mutagenesis*. 2012;27(2):187-196.
17. Mohelnikova-Duchonova B, Brynychova V, Oliverius M, Honsova E, Kala Z, Muckova K et al. Differences in Transcript Levels of ABC Transporters Between Pancreatic Adenocarcinoma and Nonneoplastic Tissues. *Pancreas*. 2013;42(4):707-716.
18. Hanahan D, Weinberg R. The Hallmarks of Cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70.
19. Bustin S, Benes V, Garson J, Hellemans J, Huggett J, Kubista M et al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry*. 2009;55(4):611-622.
20. Komurov K, Dursun S, Erdin S, Ram P. NetWalker: a contextual network analysis tool for functional genomics. *BMC Genomics*. 2012;13(1):282.

21. Hammer Q, Harper D, Ryan P. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis [Internet]. *Palaeontologia Electronica*. 2001 [cited 26 October 2016]. Available from: http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm
22. de Grouw E, Raaijmakers M, Boezeman J, van der Reijden B, van de Locht L, de Witte T et al. Preferential expression of a high number of ATP binding cassette transporters in both normal and leukemic CD34+CD38- cells. *Leukemia*. 2006;20(4):750-754.
23. Tang L, Bergevoet S, Gilissen C, de Witte T, Jansen J, van der Reijden B et al. Hematopoietic stem cells exhibit a specific ABC transporter gene expression profile clearly distinct from other stem cells. *BMC Pharmacology*. 2010;10(1):12.
24. Misaghian N, Ligresti G, Steelman L, Bertrand F, Bäsecke J, Libra M et al. Targeting the leukemic stem cell: the Holy Grail of leukemia therapy. *Leukemia*. 2008;23(1):25-42.
25. Erdei Z, Lőrincz R, Szabó K, Péntek A, Varga N, Likó I et al. Expression pattern of the human ABC transporters in pluripotent embryonic stem cells and in their derivatives. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*. 2014;86(5):299-310.
26. Park S, Shimizu C, Shimoyama T, Takeda M, Ando M, Kohno T et al. Gene expression profiling of ATP-binding cassette (ABC) transporters as a predictor of the pathologic response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2006;99(1):9-17.
27. Heimerl S, Bosserhoff A, Langmann T, Ecker J, Schmitz G. Mapping ATP-binding cassette transporter gene expression profiles in melanocytes and melanoma cells. *Melanoma Research*. 2007;17(5):265-273.
28. Marzac C, Garrido E, Tang R, Fava F, Hirsch P, De Benedictis C et al. ATP Binding Cassette transporters associated with chemoresistance: transcriptional profiling in extreme cohorts and their prognostic impact in a cohort of 281 acute myeloid leukemia patients. *Haematologica*. 2011;96(9):1293-1301.

29. Lee B, Taylor M, Robinet P, Smith J, Schweitzer J, Sehayek E et al. Dysregulation of Cholesterol Homeostasis in Human Prostate Cancer through Loss of ABCA1. *Cancer Research*. 2012;73(3):1211-1218.
30. Demidenko R, Razanauskas D, Daniunaite K, Lazutka J, Jankevicius F, Jarmalaite S. Frequent down-regulation of ABC transporter genes in prostate cancer. *BMC Cancer*. 2015;15(1):683.
31. Font-Tello A, Juanpere N, de Muga S, Lorenzo M, Lorente J, Fumado L et al. Association of ERG and TMPRSS2-ERG with grade, stage, and prognosis of prostate cancer is dependent on their expression levels. *The Prostate*. 2015;75(11):1216-1226.
32. Kim S, Kim S, Joung J, Lee G, Hong E, Kang K et al. Overexpression of ERG and Wild-Type PTEN Are Associated with Favorable Clinical Prognosis and Low Biochemical Recurrence in Prostate Cancer. *PLOS ONE*. 2015;10(4):e0122498.
33. Hou Y, Guan X, Yang Z, Li C. Emerging role of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator - an epithelial chloride channel in gastrointestinal cancers. *World Journal of Gastrointestinal Oncology*. 2016;8(3):282.
34. Than B, Linnekamp J, Starr T, Largaespada D, Rod A, Zhang Y et al. CFTR is a tumor suppressor gene in murine and human intestinal cancer. *Oncogene*. 2016;35(32):4179-4187.
35. Xu J, Lin L, Yong M, Dong X, Yu T, Hu L. Adenovirus-mediated overexpression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator enhances invasiveness and motility of serous ovarian cancer cells. *Molecular Medicine Reports*. 2015;13(1):265-272.
36. Kimchi-Sarfaty C, Oh J, Kim I, Sauna Z, Calcagno A, Ambudkar S et al. A "Silent" Polymorphism in the MDR1 Gene Changes Substrate Specificity. *Science*. 2007;315(5811):525-528.

Table legends

Table 1: Summary of recently published ABC gene expression profiles (based on the analysis of all human ABC genes) associated with characteristics of individual tumor types

Table 2: Summary of recently published ABC gene expression profiles (based on the analysis of all human ABC genes) associated with clinical consequences in cancer

Table S1: Summary of the number of patients from individual tumor types included in the established ABC gene expression profiles of the merged tumor dataset

Figure legends

Fig. 1: Heat map visualization of the tree clustering (Ward's method, Euclidean distances) of the expression levels of 49 human ABC genes in breast carcinoma samples; Cl, cluster

Fig. 2: Heat map summary highlighting ABC gene profiles in individual tumors as well as the merged tumor dataset (based on gene expression median values for each ABC gene); Cl, cluster; Fc, function

Fig. 3: Summary of the most deregulated ABC genes, gene functions and significant clinically important findings in relation to the established ABC gene expression profiles in the individual tumors as well as merged tumor dataset (repeated functions were highlighted); No, number; d. o., descending order

Fig. 4: Heat map visualization of the tree clustering (Ward's method, Euclidean distances) of the expression levels of 48 human ABC genes in colorectal carcinoma samples; Cl, cluster

Fig. 5: Heat map visualization of the tree clustering (Ward's method, Euclidean distances) of the expression levels of 47 human ABC genes in pancreatic carcinoma samples; Cl, cluster

Fig. 6 (Part 1): Heat map visualization of the tree clustering (Ward's method, Euclidean distances) of the expression levels of 46 human ABC genes in the merged tumor dataset (breast, colorectal and pancreatic carcinoma samples); Cl, cluster; Scl, subcluster

[Fig. 6 \(Part 2\)](#): Heat map visualization of the tree clustering (Ward's method, Euclidean distances) of the expression levels of 46 human ABC genes in the merged tumor dataset (breast, colorectal and pancreatic carcinoma samples); Cl, cluster; Scl, subcluster

[Fig. S1](#): Dendrogram of the tree clustering (Ward's method, Euclidean distances) of the expression levels of 49 human ABC genes in breast carcinoma samples

[Fig. S2](#): Dendrogram of the tree clustering (Ward's method, Euclidean distances) of the expression levels of 48 human ABC genes in colorectal carcinoma samples

[Fig. S3](#): Dendrogram of the tree clustering (Ward's method, Euclidean distances) of the expression levels of 47 human ABC genes in pancreatic carcinoma samples

[Fig. S4](#): Dendrogram of the tree clustering (Ward's method, Euclidean distances) of the expression levels of 46 human ABC genes in the merged tumor dataset (breast, colorectal and pancreatic carcinoma samples)

Resource	Tumor type	Upregulated ABC genes (a. o.)	Downregulated ABC genes (a. o.)	Clinical consequences
Hlavac et al., 2013	Breast	A2, A3, A7, A12, B2, B3, B8, B9, B10, C1, C4, C5, C10, C11, C12, D1, D3, E1, F1, F2, F3, G1	A5, A6, A8, A9, A10, B1, B5, B11, C6, C9, D2, D4, G5, G8	All - tumor characteristics in relation to control tissues
Hlavata et al., 2012	Colorectal	A12, A13, B6, C1, C2, E1		
Mohelnikova-Duchonova et al., 2013	Pancreatic	B4, B11, C1, C3, C5, C10, G2		
Heimerl et al., 2007	Melanoma cell lines	B3, B6, C2, C4, E1, F2	A7, A12, B2, B4, B5, D1	
Demidenko et al., 2015	Prostate	C4, G1	A8, B1, C6, C9, C10, D2, G2, G4	

a. o.=alphabetical order

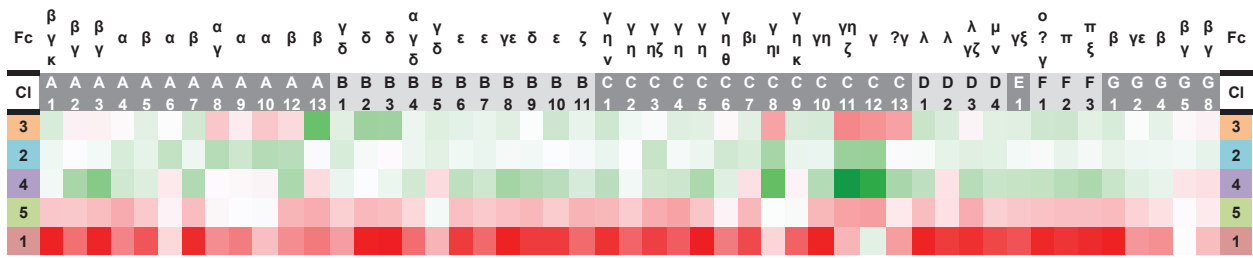
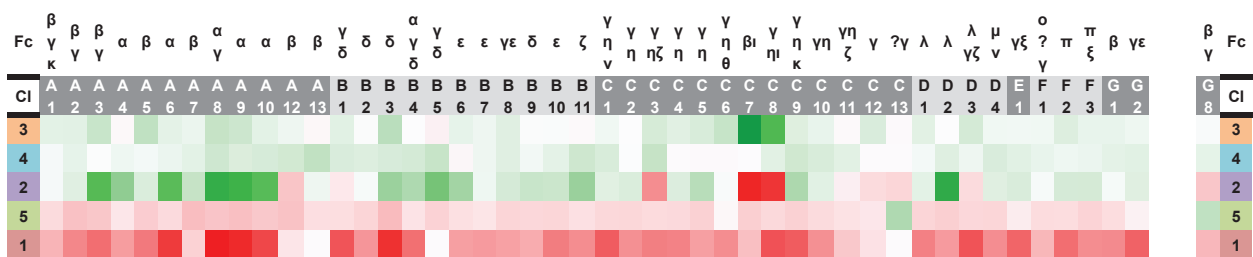
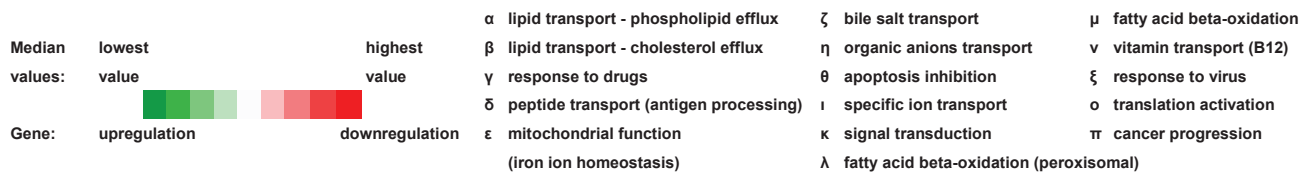
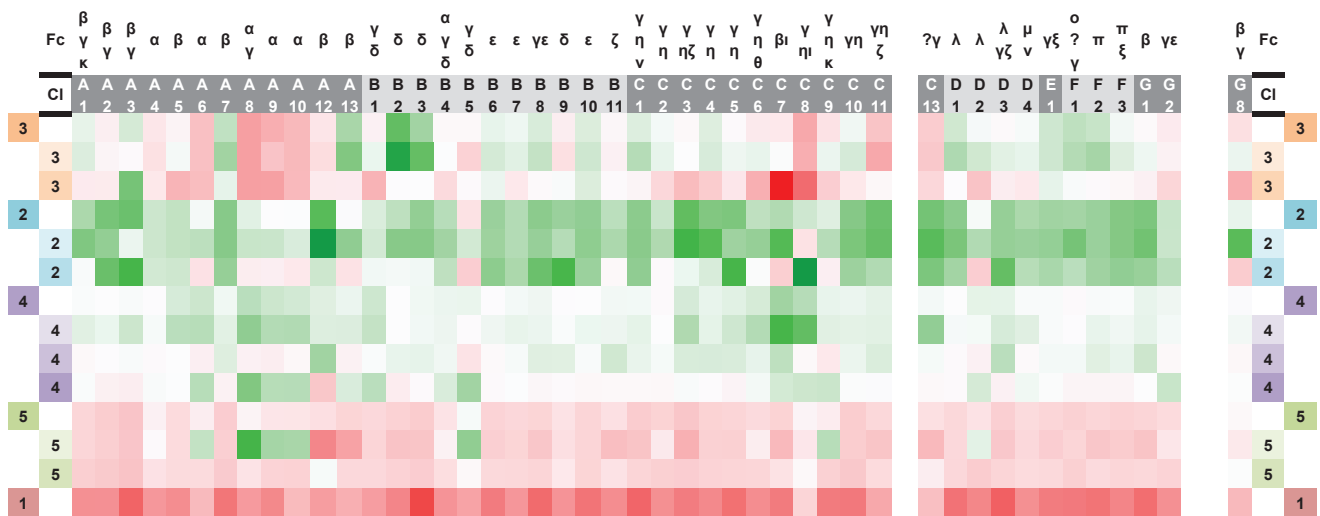
Resource	Tumor type	Upregulated ABC genes (a. o.)	Downregulated ABC genes (a. o.)	Clinical consequences
Park et al., 2006	Breast	B3, C7, F2		pathologic complete response
Park et al., 2006	Breast	A1, A12, B6, C5, C11, C13		residual disease
Hlavac et al., 2013	Breast	C1	C8	ER-, PR-/Grade 3/TP53+
Hlavac et al., 2013	Breast	A12	C8, C11	HER2+
Present study	Breast	A13, B2, B3, D1, F2	A10, C8, C11, C12, C13	More ER-, PR-, TNBC+
Present study	Breast	A3, B8, C8, C11, C12	A13, B5, C7, D2, G8	Older age
Present study	Breast	B5	A4, A13, C4, C11, C12	More pN0, better DFS
Present study	Breast	C12	B2, B3, B8, C5, G1	
Hlavata et al., 2012	Colorectal	A12, C7, C8	B9, B11, G5, G8	increase/decrease in direction from colon to rectum
Hlavata et al., 2012	Colorectal		C6, C11, F1, F2	non-responders to palliative chem.
Hlavata et al., 2012	Colorectal		A7, A13, B4, C11, D4	shorter DFS
Present study	Colorectal		A2, A3, A7, C2, G2	Less pN0
Present study	Colorectal	A6, A8, B1, B5, C9	A12, B3, E1, G5, G8	Less pN2
Present study	Colorectal	A8, A12, C3, C7, C13	A9, B5, B9, C9, G5	prevailed among rectal cancer
Mohelnikova-Duchonova et al., 2013	Pancreatic	A1, A4, B2		Grade 3 or 4
Mohelnikova-Duchonova et al., 2014	Pancreatic	A1, B3	G1, G2	pT3 or pT4
Mohelnikova-Duchonova et al., 2015	Pancreatic	B9, C4	E1	pN1 status
Mohelnikova-Duchonova et al., 2016	Pancreatic	A3, D1	A6, C10	with angioinvasion
Marzac et al., 2011	AML	A2, B1, B5, B6, C13, G1, G2		chem. resistant group
Present study	General	A7, A13, B2, B3, F1	A6, A8, A9, A10, C8	More Grade 3 or 4
Present study	General	A7, A13, B2, B3, F2	A6, A8, A10, C8, C11	More Grade 3 or 4
Present study	General	A3, B9, C5, C8, D3	A6, B5, C7, D2, G8	More pT1 or pT2
Present study	General	A6, A8, A9, C7, C8		More pT3 or pT4
Present study	General	A8, A9, A10, B5, C9	A12, A13, C3, C7, C13	More pN0, more pT1 or pT2
Present study	General	A12, G8	A2, A3, A7, C10, D2	More pT3 or pT4
Present study	General		A3, B3, B8, C1, D3	More Stage I or II, more pT1 or pT2

a. o.=alphabetical order; AML=acute myeloid leukemia; DFS=disease-free survival; ↑=increased; ↓=decreased; chem.=chemotherapy

Joint tumor dataset - number of patients in clusters

Cluster	Subcluster	No. of BC P.	No. of CC P.	No. of PC P.
1		5	0	1
2		14	5	2
	2.1	7	5	1
	2.2	7	0	1
3		10	4	4
	3.1	9	1	2
	3.2	1	3	2
4		24	24	18
	4.1	7	5	11
	4.2	8	9	3
	4.3	9	10	4
5		15	18	7
	5.1	10	3	2
	5.2	5	15	5
Σ		68	51	32

BC=breast carcinoma; CC=colorectal carcinoma;
 PC=pancreatic carcinoma; P.=patients; No.=number

A. Breast carcinoma**B. Colorectal carcinoma****C. Pancreatic carcinoma****D. Merged cancer dataset**

Cluster No.	No. of ↑ genes	No. of ↓ genes	Most ↑ genes (d. o.)	Most ↓ genes (d. o.)	Most ↑ functions (d. o.)	Most ↓ functions (d. o.)	Significant clinical findings (p<.05)
A. Breast carcinoma							
3	31	15	A13, B2, B3, D1, F2	C11, C12, C13, C8, A10	β, δ, λ, π	γ, η, ζ, ι, α	More ER-, PR-, TNBC+
2	45	0	C12, C11, C8, A10, A8	-	γ, η, ζ, ι, α	-	-
4	37	10	C11, C12, C8, A3, B8	B5, A13, G8, C7, D2	γ, η, ζ, ι, β, ε	γ, δ, β, ι, λ	Older age
5	3	43	B5	C12, C11, C4, A4, A13	γ, δ	γ, η, ζ, α, β	} More pN0, better DFS
1	1	47	C12	C5, B3, B8, G1, B2	γ	γ, η, δ, ε, β	
B. Colorectal carcinoma							
4	0	46	-	C2, A3, A7, A2, G2	-	γ, η, β, ε	Less pN0
2	34	9	A8, B5, A6, B1, C9	A12, G5, E1, G8, B3	α, γ, δ, η, κ	β, γ, ζ, δ	Less pN2
3	33	8	C7, C13, A12, A8, C3	B5, B9, C9, A9, G5	β, ι, α, γ, η, ζ	γ, δ, η, κ, α, β	prevail in rectal cancer
1	45	2	G8, A3, C7, G5, A12	A8, C8	β, γ, ι	α, γ, η, ι	-
C. Pancreatic carcinoma							
3	38	5	C7, C8, B3, A5, A8	B5	β, ι, γ, η, δ, α	γ, δ	-
4	40	1	A13, C3, B5, B11, A8	B6	β, γ, η, ζ, δ, α	ε	-
2	37	10	D2, A8, A9, A3, A10	C7, C8, C3, A12, G8	λ, α, γ, β	β, ι, γ, η, ζ	-
5	2	45	C13, G8	B3, A7, A9, A2, A12	γ, β	δ, β, α, γ	-
1	0	44	-	A8, A9, B3, A6, A10	-	α, γ, δ	-
D. Merged cancer dataset							
3	21	18	B2, B3, A13, F1, A7	A8, C8, A9, A10, A6	δ, β, ο, ?γ	α, γ, η, ι	More Grade 3 or 4
3.1	31	14	B2, B3, A13, A7, F2	A8, C11, C8, A10, A6	δ, β, π	α, γ, η, ζ, ι	More Grade 3 or 4
3.2	12	30	A3, B10, A7, E1, B6	C7, C8, A8, A9, G8	β, γ, ε, ξ	β, ι, γ, η, α	-
2	45	1	A12, C3, A3, C11, C13	B5	β, γ, η, ζ	γ, δ	-
2.1	45	1	A12, C3, C7, C4, G8	C8	β, γ, η, ζ, ι	γ, η, ι	-
2.2	35	10	C8, A3, C5, B9, D3	G8, B5, D2, C7, A6	γ, η, ι, β, δ, λ, ζ	β, γ, δ, λ, ι, α	More pT1 or pT2
4	46	0	C7, C8, A8, A9, A6	-	β, ι, γ, η, α	-	More pT3 or pT4
4.1	46	0	C7, C8, A8, C13, C3	-	β, ι, γ, η, α, ζ	-	-
4.2	30	7	A12, D3, C7, G1, B11	B5, C9, A9, A6, D2	β, λ, γ, ζ, ι	γ, δ, η, κ, α, λ	-
4.3	28	10	A8, B5, A10, A6, A9	A12, B2, A3, A2, D3	α, γ, δ	β, δ, γ, λ, ζ	-
5	1	44	B5	A3, C3, B3, C1, A7	γ, δ	β, γ, η, ζ, δ, ν	-
5.1	7	38	A8, B5, A9, A10, C9	A12, A13, C3, C7, C13	α, γ, δ, η, κ	β, γ, η, ζ, ι	More pN0, more pT1 or pT2
5.2	2	42	A12, G8	A3, C10, A2, A7, D2	β, γ	β, γ, η, λ	More pT3 or pT4
1	0	46	-	B3, D3, A3, C1, B8	-	δ, λ, γ, ζ, β, η, ν, ε	More Stage I or II, more pT1 or pT2

α lipid transport - phospholipid efflux
β lipid transport - cholesterol efflux
γ response to drugs
δ peptide transport (antigen processing)
ε mitochondrial function
(iron ion homeostasis)
ζ bile salt transport

η organic anions transport
θ apoptosis inhibition
ι specific ion transport
κ signal transduction
λ fatty acid beta-oxidation
(peroxisomal)
μ fatty acid beta-oxidation

ν vitamin transport (B12)
ξ response to virus
ο translation activation
π cancer progression
↑ upregulated
↓ downregulated
d. o. descending order

6.1.1 Komentář k příspěvku I

Ačkoliv se spektrum možností pro léčbu určitých typů zhoubných nádorů velmi rozšířilo o nové léčebné přístupy, obecně jsou současné léčebné režimy založeny na chirurgické léčbě a použití cytotoxických protinádorových léčiv nebo ionizujícího záření. Celosvětovým problémem při používání chemoterapie založené na cytotoxických léčivech je častý vznik rezistence a výrazné snížení léčebného účinku. Bylo popsáno výrazné spojení mezi ATP-binding cassette (ABC) proteiny, jejichž hlavní funkcí je transmembránový přenos velkého spektra látek, a vznikem nádorové rezistence.

Omezený počet prací se dosud zabýval genovým expresním profilem založeným na měření exprese všech 49 popsanych ABC genů (včetně pseudogenu *ABCC13*) u vybraných typů zhoubných nádorů. Vztah k etablovaným klinicko-patologickým znakům byl vyhodnocován především vzhledem ke změnám v expresi jednotlivých ABC genů. Hlavním cílem prezentovaného článku bylo ověřit naši hypotézu o existenci ABC expresních profilů společných více typům zhoubných nádorů. Tyto obecné ABC expresní profily by dle naší hypotézy mohly být novým atributem karcinogeneze a významně korelovat s některými ze známých prognostických či prediktivních faktorů.

Naše sjednocená nádorová databáze expresních genových dat byla založena na třech samostatných souborech pacientů se třemi různými typy nádorů – nádory prsu, kolorekta a pankreatu. Hodnoty genové exprese 49 ABC genů byly ze 151 tkáňových vzorků získány shodným způsobem ve všech případech. Předmětem dalšího studia bylo vyhodnocení a vizualizace výsledků bioinformatické analýzy expresních dat založené na hierarchickém klastrování Wardovou metodou.

Prezentovaná práce přinesla poprvé výsledky podporující hypotézu, že lze nalézt vzory exprese ABC genů (ABC expresní profily) společné pro různé typy zhoubných nádorů. Práce vycházela z předchozích vlastních výsledků sledování ABC expresních profilů u jednotlivých typů nádorů a také z publikovaných studií hodnotících ABC profily v různých tkáních včetně populací kmenových buněk. Na začátku diskuze k výsledkům příspěvku byl podán přehled publikovaných ABC expresních profilů (založených na hodnocení všech popsanych ABC genů) vytvářejících charakteristiku určitých typů nádorů

(v porovnání s expresními profily u příslušné nenádorové tkáně) nebo s prokazovaným klinickým významem.

Pro zachování informací specifických pro jednotlivé typy nádorů byl použitý postup klastrování dat aplikován nejprve na samostatné soubory jednotlivých typů nádorů a až poté na sjednocenou databázi. Byly odhaleny charakteristické ABC expresní profily obsahující vzorky od všech tří sledovaných typů nádorů (obecné profily) a tím podporující naši hypotézu. Dále byla sledována korelace takto vymezených obecných ABC profilů s klinicko-patologickými znaky dostupnými pro všechny analyzované vzorky. Jednalo se o údaje o pohlaví, věku, rozsahu postižení regionálních lymfatických uzlin (pN status), rozsahu nádoru (pT status), histologickém stupni diferenciaci, tzv. grade, a klinickém stadiu, tzv. stage. Nově byl spočítán tzv. faktor relativního rizika relapsu onemocnění. Následně byla provedena funkční *in silico* analýza popisovaných obecných ABC profilů.

U některých definovaných obecných ABC profilů byly nalezeny statisticky významné vztahy k rozsahu postižení regionálních lymfatických uzlin, rozsahu nádoru, histologickému stupni diferenciaci a klinickému stadiu. Co se týče funkční charakteristiky těchto obecných ABC profilů, množství silně pozmeněných funkcí v jednotlivých profilech bylo značné a vytyčení několika charakteristicky změněných funkcí nebylo možné. Bylo provedeno vyhodnocení četnosti ABC genů mezi nejvíce up- a down-regulovanými geny v rámci obecných profilů. Geny *ABCC7*, *ABCA3*, *ABCA8*, *ABCA12* a *ABCC8* se v této statistice vyskytovaly s nejvyšší četností a lze usuzovat, že na poli procesů ovlivňovaných ABC geny v nádorových buňkách hrají klíčovou roli. Velmi zajímavý je výskyt genu *ABCC7* na prvním místě. Gen *ABCC7*, s oficiálně doporučenou zkratkou *CFTR*, je transmembránový přenašeč spojený především s transportem chloridových iontů mimo buňku a je všeobecně známa jeho kauzální role při vzniku cystické fibrózy. Několik současných prací však již naznačilo i jeho klíčovou úlohu při patogenezi některých typů zhoubných nádorů, především gastrointestinálního traktu.

V práci bylo naznačeno, že tyto obecné expresní profily ABC genů by mohly vytvářet nový charakteristický rys kancerogeneze. Hlavní limitací předkládané práce byl menší počet hodnocených pacientů a typů nádorů, proto bude potřeba výsledky současné práce dále ověřit na větších a z pohledu typů nádorů různorodějších souborech.

6.2 Příspěvek II

Název příspěvku: Allogeneic stem cell transplantation can improve outcome of AML patients without complete cytogenetic response after induction and consolidation treatment

Autoři: Pavel Dvořák, Daniel Lysák, Samuel Vokurka, Michal Karas, Ivan Šubrt

Název časopisu a nakladatelství: Neoplasma (AEPRESS)

Rok vydání a impakt faktor časopisu: 2015, IF₍₂₀₁₅₎ 1,961

Citace: DVORAK, Pavel, Daniel LYSAK, Samuel VOKURKA, Michal KARAS a Ivan SUBRT, 2015. Allogeneic stem cell transplantation can improve outcome of AML patients without complete cytogenetic response after induction and consolidation treatment. *Neoplasma : journal of experimental and clinical oncology*. Bratislava: AEPRESS, **62**(1), 140-145. ISSN 00282685.

Allogeneic stem cell transplantation can improve outcome of AML patients without complete cytogenetic response after induction and consolidation treatment

P. DVORAK^{1,2,*}, D. LYSAK³, S. VOKURKA³, M. KARAS³, I. SUBRT¹

¹*Institute of Medical Genetics, University Hospital Pilsen, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University in Prague, Pilsen, Czech Republic;*

²*Institute of Biology, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University in Prague, Pilsen, Czech Republic;* ³*Department of Haematology and Oncology, University Hospital Pilsen, Pilsen, Czech Republic*

*Correspondence: Pavel.Dvorak@lfp.cuni.cz

Received April 2, 2014 / Accepted May 19, 2014

Our retrospective analysis was performed on 376 consecutive patients diagnosed with AML. A total of 256 (68%) were treated with standard “7+3” induction and high-dose cytarabine and mitoxantrone containing “4+3” consolidation/intensification regimens. Our study focused on patients with presumably very poor prognosis – patients, who did not achieve complete cytogenetic remission (CRc). Twenty-five AML patients without CRc were further analysed for clinical and laboratory parameters. Firstly, the subgroups with or without morphologic CR were compared. Similar cytogenetic abnormalities were observed in both with myelodysplasia related changes being the most common. Complex karyotype with deletion of 5q constituted approximately a third of all karyotypes in both subgroups. There were 1 patient with intermediate risk cytogenetics in the subgroup without morphologic CR and 5 patients in the subgroup with morphologic CR. Interestingly, in 4/25 patients subclones were diminished by the chemotherapy treatment, however cytogenetically less advanced clones proliferated. Secondly, transplanted or nontransplanted patients were analysed. Allogeneic stem cell transplantation (allo-SCT) was found to be the only curative treatment for patients without CRc after 7+3 and 4+3 regimens. In our cohort, 40% of the patients, who underwent allo-SCT, are alive. Importantly, 67% of the patients, who died after allo-SCT, died of causes unrelated to progression of AML. Nonrelapse mortality is therefore one of the fields where survival could be further improved.

Key words: acute myeloid leukaemia, complete cytogenetic remission, cytogenetic abnormalities, stem cell transplantation, nonrelapse mortality

The prognostic importance of some cytogenetic abnormalities identified at diagnosis of acute myeloid leukaemia (AML) has been proved in many extensive studies. Cytogenetic abnormalities were also largely reflected in the latest WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues [1]. Furthermore, the international working group led by Cheson recommended to use the achievement of complete cytogenetic remission (CRc) after chemotherapy as one of the most important criteria for assessment of treatment outcomes already in 2003 [2]. However, only a few studies focusing on this topic have been published. In fact, a detailed analysis of clinical data together with cytogenetic characteristic of AML patients, who failed to achieve CRc after induction and consolidation/intensification chemotherapy, has not been published

so far. This study adds to the limited amount of research in this important field.

Materials and methods

Our retrospective analysis was performed on a cohort of 376 consecutive patients, who were diagnosed with AML at University Hospital Pilsen between January 2000 and December 2012. A total of 256 (68%) of these patients were treated with the “7+3” induction and high-dose cytarabine and mitoxantrone containing “4+3” consolidation/intensification regimens (both regimens are described below), 71 (19%) were maintained with a different type of chemotherapy or got only 7+3 regimen and 49 (13%) were given

symptomatic therapy. Clinical and laboratory data from 256 patients treated with both regimens were further analysed. The study was approved by the Ethics Committee at our institution and conducted in accordance with the Declaration of Helsinki.

Chromosome G-banding analysis in combination with FISH analysis was performed in unstimulated 24-h cultures of bone marrow samples according to standard procedures. At least 20 metaphase cells were fully analysed to exclude any clonal abnormalities in accordance with ACC (Association of Clinical Cytogeneticists) and UK NEQAS (National External Quality Assessment Schemes) guidelines for clinical cytogenetics. The clonal abnormalities were described according to ISCN 2013 guidelines [3]. Complex karyotype (CK) was defined, in agreement with the WHO 2008 classification [1], as karyotype with 3 or more unrelated abnormalities. Molecular genetic techniques were performed according to standard protocols. The presence of these molecular genetic abnormalities was detected: MLL-PTD, FLT3-ITD, FLT3 Asp835, GSTM1 and GSTT1 polymorphisms, Cyclin D1 and BAALC overexpression, and NPM1 mutations.

Overall survival (OS) was measured from the date of initial treatment until the date of death and censored on the date of the last follow-up if alive. Progression free survival (PFS) was measured from the date of remission until the date of relapse or death and censored on the date of last follow-up if alive. Descriptive statistics were calculated. Kaplan-Meier curves were used to estimate unadjusted OS and PFS. Log-rank tests were used to compare each time-to-event variable between groups. The Cox proportional hazards regression model was used to evaluate the ability of the relevant variables to predict either OS or PFS. SAS 9.3 software (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) was used for statistical analyses.

Two chemotherapeutic attempts to achieve complete remission (CR) of AML (in line with Cheson et al. [3]) meant application of induction chemotherapy according to 7+3 regimen followed by consolidation/intensification chemotherapy according to 4+3 regimen (HiDAC +Mx). The 7+3 regimen consisted of: cytarabine 200mg/day i.v. continuously for 7 days, idarubicin 12mg/m²/day i.v. for 3 days. The 4+3 regimen consisted of: cytarabine 1500-3000 mg/m² (reduced doses for elderly patients) twice daily i.v. for 4 days, mitoxantrone 10-12mg/m²/day i.v. for 3 days.

In patients in complete or partial remission after the two chemotherapeutic attempts, the allogeneic stem cells transplantation (allo-SCT) was performed within the period of 2-8 weeks after the last chemotherapy regimen. Allo-SCT with reduced intensity conditioning regimen FLU/MEL was administered in elderly patients (the age 50-years and more) and consisted of fludarabine 30 mg/m² i.v. once daily for 4 days (total dose 120 mg/m²) and melphalan 140 mg/m² i.v. once daily one day prior to transplantation. In young patients, the conventional Bu/CY2 conditioning regimen was administered and consisted of busulphan 4 mg/kg p.o. or 3,2 mg/kg i.v. in divided doses for 4 days (total dose 16 mg/kg) and

cyclophosphamide 60 mg/kg once daily i.v. for 2 days (total dose 120 mg/kg).

Results

Normal karyotype at diagnosis was detected in 120 (47%) out of 256 AML patients treated with 7+3 and 4+3 regimens. Abnormal karyotype was found in remaining 136 (53%) patients. CRc was not achieved in 25 (18%) patients following two cycles of chemotherapy. Morphologic CR was not reached in 9 of these 25 patients (no CR/ no CRc; group A). The rest of these patients without CRc (16 patients) achieved morphologic CR (CR/ no CRc; group B).

A total of 9 patients (4 males and 5 females) were included in the group A. 6 patients were diagnosed with "AML with myelodysplasia related changes" (AML-MRC), 2 patients with "AML with inv(3)(q21q26)/t(3;3)(q21;q26)" and 1 patient with "treatment related AML" (t-AML). Clinical data of group A patients are summarized together with group B patients in the Table 1. Only 2 group A patients were found to be suitable for allo-SCT, the rest had disease resistant to all administered chemotherapy and sustained on symptomatic therapy. One of these 2 patients undergoing allo-SCT is alive 6 months after the diagnosis and the other died of pneumonia after 6 months. All of the 7 nontransplanted patients died due to the disease progression.

In the group A, 7 out of 9 patients (78%) had a complex karyotype. The assumed primary cytogenetic changes in CK were: abnormality of 5q in 3 patients, abnormality of 3q in 2 patients, abnormality 1p or 9q in 1 patient and abnormality of 11q in 1 patient (Table 2). Abnormalities of 7q were present in 4 patients and abnormality of 17p in 2 patients, presumably as secondary changes. Noncomplex karyotypes were present in 2 patients: 46,XY,inv(3)(q21q26)[6]/45,idem,-7[19] and 47,XY,+8[3]/46,XY[16] respectively. Interestingly, in 1 patient (patient No. 4) the karyotype 45,XX,der(1)t(1;6)(p33;?),der(6)t(1;6)(p33;q23)t(6;9)(p11;p13),-9[3]/46,idem,+10[16] was revealed at diagnosis, however the subclone with trisomy 10 (secondary change in this case) was diminished by the chemotherapy treatment and the main clone with no recurrent primary change expanded. Complete karyotypes including FISH results of the group A patients are shown in the Table S1 in the Supplemented Materials. The patient with trisomy 8 as a sole abnormality was positive for NPM1 mutation and overexpression of BAALC in molecular genetic analysis (Table 3).

Sixteen patients (8 males and 8 females) were included in the group B. Eleven patients were diagnosed with "AML with myelodysplasia related changes" (AML-MRC), 1 patient with "AML with inv(3)(q21q26)/t(3;3)(q21;q26)" and 4 patients with "AML not otherwise specified" (AML-NOS) (Table 1). Allo-SCT was performed in 13 patients. Five of these 13 patients are alive (6, 8, 64, 66 and 79 months from diagnosis) and 8 patients died. Only 3 of these 8 patients died on disease progression and conversely 5 patients died on reasons not di-

Table 1. Clinical data of 25 patients without CRc after 7+3 and 4+3 regimens

P. No.	Sex	Age	Previous Chemo-therapy	Previous Actino-therapy	Dg. (WHO 2008)	Disease Status after 7+3	CR after 7+3 and 4+3	Allo-SCT	Donor	GVHD	PFS (months)	Alive	OS (months)	Cause of death
1	F	61	No	No	AML-MRC	resistant	No	No	No	No	2.3	No	9.2	resistant disease
2	M	50	No	No	AML-MRC	PR	No	No	No	No	2.6	No	3.0	progresion
3	F	44	No	No	AML-MRC	resistant	No	No	No	No	1.4	No	4.3	progresion
4	F	63	No	No	AML-MRC	resistant	No	No	No	No	2.0	No	5.5	progresion
5	F	60	No	No	AML-MRC	resistant	No	No	No	No	1.9	No	3.2	progresion
6	M	25	No	No	AML with inv(3)	resistant	No	Yes	R	Yes	6.7	Yes	6.7	
7	M	62	No	No	AML with inv(3)	resistant	No	No	No	No	2.0	No	2.3	resistant disease
8	M	61	No	No	AML-MRC	resistant	No	No	No	No	2.0	No	2.0	pneumonia
9	F	62	Yes	Yes	t-AML	resistant	No	Yes	R	No	4.8	No	6.6	pneumonia
10	M	44	No	No	AML-MRC	resistant	Yes	Yes	R	No	2.9	No	13.9	progresion
11	F	52	No	No	AML-MRC	PR	Yes	Yes	U	Yes	23.2	No	24.4	pneumonia
12	M	62	No	No	AML-MRC	PR	Yes	No	No	No	2.8	No	3.5	progresion
13	M	56	No	No	AML-MRC	PR	Yes	No	No	No	5.7	No	8.8	progresion
14	F	63	No	No	AML-NOS	CR	Yes	Yes	U	Yes	5.4	No	5.4	GVHD
15	M	57	No	No	AML-MRC	PR	Yes	Yes	U	Yes	24.4	No	24.4	lung failure
16	F	50	No	No	AML-MRC	PR	Yes	Yes	R	No	79.3	Yes	79.3	
17	M	53	No	No	AML-MRC	CR	Yes	Yes	U	Yes	13.9	No	15.3	CNS infection
18	F	47	No	No	AML-MRC	PR	Yes	Yes	U	Yes	36.4	No	57.6	progresion
19	F	48	No	No	AML-MRC	PR	Yes	Yes	U	Yes	6.5	No	7.4	suicide
20	M	63	No	No	AML-MRC	CR	Yes	Yes	U	Yes	5.9	Yes	6.7	
21	F	56	No	No	AML-MRC	PR	Yes	Yes	U	Yes	8.3	Yes	8.3	
22	F	63	No	No	AML with t(3;3)	resistant	Yes	No	No	No	3.9	No	4.0	progresion
23	F	52	No	No	AML-NOS	PR	Yes	Yes	U	Yes	64.0	Yes	64.0	
24	F	54	No	No	AML-NOS	resistant	Yes	Yes	R	Yes	66.8	Yes	66.8	
25	M	66	No	No	AML-NOS	CR	Yes	Yes	U	Yes	32.4	No	38.9	progresion

Dg.=diagnosis; CR=complete remission; Allo-SCT=allogeneic stem cell transplantation; R=related; U=unrelated; GVHD=graft versus host disease; PFS=progression free survival; OS=overall survival;

rectly related to disease progression (pneumonia, graft versus host disease, lung failure, CNS infection, and suicide).

In the group B, CK was found in 7 patients (44%) and 9 patients had noncomplex karyotypes. The assumed primary

Table 2. Primary cytogenetic changes of 9 patients without hematological remission after 7+3 and 4+3 regimens

Abn.\P.No.	1	2	9	3	6	7	5	4	8
Complex karyotype	X	X	X	X		X		X	X
Abn. 5q/-5	X	X	X						
Abn. 3q				X	X	X			
Trisomy 8							X		
Abn. 1p								X	
Abn. 9q/-9								X	
Abn. 11q									X

Abn.=abnormality;

cytogenetic changes in CK were: abnormality of 5q in 6 patients and abnormality of 12p in 1 patient (Table 4). Abnormality of 7q was present in 3 patients and abnormality of 17p in 2 patients, presumably as secondary changes. Primary cytogenetic changes observed in the noncomplex karyotypes were: der(7)del(7)(p12)del(7)(q11.2); +8 (3 patients); t(2;3)(p13;q26); del(7)(q22q36); t(3;3)(q21;q26); t(9;11)(p22;p15); del(20)(q11.2). In 3 patients subclones were reduced by the chemotherapy treatment, however main clones or other subclones proliferated. After the chemotherapy, subclone with monosomy 7 was diminished in the patient No. 11, subclones unseen at the diagnosis were detected in the No. 17 and on the other hand main clone with the sole abnormality – deletion of 5q – unseen at diagnosis was present in the No. 21. Complete karyotypes including FISH results of the group B patients are shown in the Table S2 in the Supplemented Materials. One of the 5 patients with intermediate risk cytogenetics was positive for NPM1 mutation

and overexpression of BAALC and 2 patients were positive for overexpression of BAALC in molecular genetic analysis (Table 3).

All of the patients from the groups A and B were included in the statistical analysis. Median follow-up for the whole group (25 patients) was 7.4 months, median PFS was 0.5 years and median OS was 0.8 years. Statistically significant differences in survival parameters were found between two groups – transplanted and nontransplanted patients. PFS and OS were significantly higher than patients who underwent allo-SCT in comparison to nontransplanted group. PFS and OS in transplanted patients were 2.7 and 2 years, in nontransplanted patients 0.2 and 0.3 years respectively (Log-Rank test, $P=0.0001$, Figure 1 and Figure 2). Patients without transplantation had 22.8 times higher risk of disease progression and 12.5 times higher risk of death (Cox Regression Hazard Model).

Discussion

In 1997, Grimwade et al. [4] published the results of the 10th UK MRC AML trial. One of the trial's objectives was to determine the role of autologous bone marrow transplantation in AML patients lacking an HLA-matched sibling. Among 101 of 190 patients with AML characterised by abnormal karyotype at diagnosis, persistence of the disease-related clone in eight patients (8%), revealed by conventional cytogenetic assessment at bone marrow harvest whilst in morphologic CR, was found to predict a poor prognosis [4].

Fung et al. [5] reviewed the records of 68 patients who consecutively underwent transplantation at the City of Hope Cancer Center with allogeneic SCT for primary refractory AML between July 1978 and August 2000. Allogeneic SCT can cure approximately one third of patients with primary refractory AML. Cytogenetic characteristics before SCT correlate with transplantation outcome and posttransplantation relapse [5].

AML patients treated on Cancer and Leukemia Group B front-line studies were included in the work of Marcucci et

Table 3. Molecular genetic results of 25 patients without CRc after 7+3 and 4+3 regimens

P.No.	Positive molecular genetic results
1	NPM1
2	neg.
3	unk.
4	FLT3/ITD, BAALC
5	BAALC
6	BAALC
7	neg.
8	NPM1, BAALC
9	BAALC
10	unk.
11	neg.
12	neg.
13	neg.
14	FLT3/ITD, BAALC
15	BAALC
16	neg.
17	BAALC
18	unk.
19	FLT3/ITD, BAALC
20	neg.
21	BAALC
22	neg.
23	NPM1, BAALC
24	neg.
25	BAALC

neg.=negative;unk.=unknown;

al. [6] published in 2004. Cytogenetic samples were obtained at diagnosis and on the first day of documented morphologic CR following induction chemotherapy. Patients with abnormal cytogenetics at diagnosis, and normal cytogenetics at morphologic CR (NCR; $n=103$) were compared with those with abnormal cytogenetics both at diagnosis and at morphologic CR (ACR; $n=15$) for overall survival (OS), disease-free sur-

Table 4. Primary cytogenetic changes of 17 patients with hematologic but without cytogenetic complete remission

Abn.\P.No.	12	13	17	20	21	14	15	16	23	18	22	10	19	11	24	25
Complex karyotype	X	X	X	X	X	X										X
Abn. 5q/-5	X	X	X	X	X	X										
Trisomy 8							X	X	X							
Abn. 3q										X	X					
Abn. 7q/-7												X	X			
Abn. 12p																X
t(9;11)(p22;p15)																X
Abn. 20q																X

Abn.=abnormality;

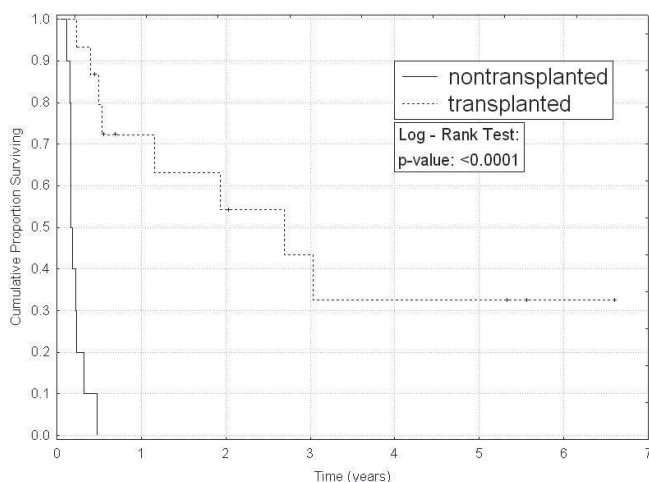


Figure 1. Comparison of progression free survival (Kaplan-Meier survival curves) between transplanted (n=15) and nontransplanted (n=10) patients from our cohort of 25 patients without CRc after 7+3 and 4+3 regimens (Log-Rank test, $P < 0.0001$), median progression free survival was 2.7 and 0.2 years respectively.

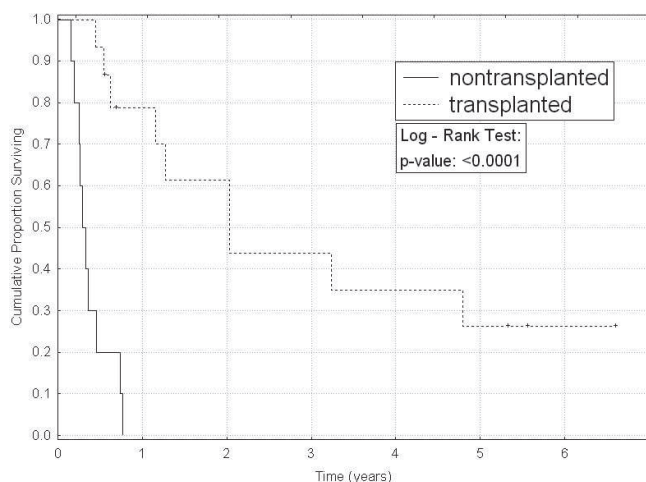


Figure 2. Comparison of overall survival (Kaplan-Meier survival curves) between transplanted (n=15) and nontransplanted (n=10) patients from our cohort of 25 patients without CRc after 7+3 and 4+3 regimens (Log-Rank test, $P < 0.0001$), median overall survival was 2.0 and 0.3 years respectively.

vival (DFS), and cumulative incidence of relapse (CIR). ACR patients had significantly shorter OS, DFS and higher CIR. The relative risk of relapse or death was 2.1 times higher for ACR patients than for NCR patients [6].

118 high-risk MDS or AML patients with an abnormal karyotype at diagnosis and a second cytogenetic analysis performed after induction chemotherapy were included in the retrospective study of German researchers in 2009 [7]. The authors confirmed that the persistence of minimal disease on a cytogenetic level in patients with de novo or secondary AML as well as high-risk MDS who achieved morphologic CR following conventional induction therapy was an independent prognostic parameter for the probability of shorter OS [7].

Data from 254 adult patients with AML (excluding acute promyelocytic leukaemia) who achieved CR after induction chemotherapy on various first-line protocols were examined by Chen et al. [8] in 2011. Persistent cytogenetically abnormal cells at CR predict a significantly shorter relapse-free survival and OS. SCT in CR1 may improve the clinical outcome of patients lacking cytogenetic remission after induction although this depends on patient selection [8].

Our study focused on AML patients with presumably very poor prognosis – patients, who did not achieve CRc after two chemotherapeutic attempts (7+3 and 4+3 regimens). The frequency of patients with this condition can be estimated to be as high as 18% between consecutive AML patients. Some of these patients have normal karyotype and CRc cannot be evaluated. In our study, 25 AML patients without CRc, who had an abnormal karyotype at diagnosis, were analysed for clinical and laboratory parameters. Approximately a third of these patients did not achieve even morphologic CR.

Firstly, we compared two subgroups – with or without morphologic CR. Similar cytogenetic abnormalities were observed in both subgroups with myelodysplasia related changes being the most common. CK with deletion of 5q, as suspected primary cytogenetic change, constituted approximately a third of all karyotypes in both subgroups. There were only two noncomplex karyotypes in the subgroup without morphologic CR. Interestingly, one of them had trisomy 8 as a sole abnormality. Molecular genetic analysis revealed NPM1 mutation and overexpression of BAALC in this patient. There were 5 patients with intermediate cytogenetics risk in the subgroup with morphologic CR. Three of them were positive for some of the negative prognostic markers tested in molecular genetic analyses. From cytogenetic point of view it is interesting that in 4/25 patients subclones were diminished by the chemotherapy treatment, however cytogenetically less advanced clones proliferated.

Secondly, we made statistical analyses on other two subgroups – transplanted or nontransplanted patients. Allogeneic stem cell transplantation was found to be the only curative treatment for patients without CRc after 7+3 and 4+3 regimens. In our cohort, 40% of the patients, who underwent allo-SCT, are alive. Importantly, 67% of the patients, who died after allo-SCT, died of causes unrelated to progression of AML. Nonrelapse mortality is therefore one of the fields where survival of patients without CRc could be further improved. However, there is still a lack of knowledge and further studies are needed to explore this very important topic.

Supplementary information is available in the online version of the paper.

Acknowledgements: The authors would like to thank Martina Hrubá and Anna Rykowska for their technical support in the cytogenetic laboratory (Institute of Medical Genetics, Pilsen). We also thank all the clinical staff of the Department of Haematology and Oncology (University Hospital Pilsen) for their perfect patient care and cooperation. The work was supported in part by the project ED2.1.00/03.0076 from the European Regional Development Fund and from the Ministry of Health, Czech Republic – EU project CZ1.07./2.3.00/20.0040.

References

- [1] SWERDLOW SH, CAPO E, HARRIS NL, JAFFE ES, PILERI SA, et al. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: IARC, 2008.
- [2] CHESON BD, BENNETT JM, KOPECKY KJ, BUCHNER T, WILLMAN CL, et al. Revised recommendations of the international working group for diagnosis, standardization of response criteria, treatment outcomes, and reporting standards for therapeutic trials in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2003; 21: 4642–4649. <http://dx.doi.org/10.1200/JCO.2003.04.036>
- [3] ISCN (2013): An International System for Human Cytogenetic Nomenclature, L.G.Shaffer, J.McGowan-Jordan, M.Schmid (eds); S. Karger, Basel 2013.
- [4] GRIMWADE D, WALKER H, OLIVER F, WHEATLEY K, CLACK R, et al. What happens subsequently in AML when cytogenetic abnormalities persist at bone marrow harvest? Results of the 10th UK MRC AML Trial. *Bone Marrow Transplant* 1997; 19: 1117–1123. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bmt.1700804>
- [5] FUNG HC, STEIN A, SLOVAK ML, O'DONNELL MR, SNYDER DS, et al. A long-term follow-up report on allogeneic stem cell transplantation for patients with primary refractory acute myelogenous leukemia: impact of cytogenetic characteristics on transplantation outcome. *Biol Blood Marrow Transplant* 2003; 9: 766–771. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbmt.2003.08.004>
- [6] MARCUCCI G, MROZEK K, RUPPERT AS, ARCHER KJ, PETTENATI MJ, et al. Abnormal cytogenetics at date of morphologic complete remission predicts short overall and disease-free survival, and higher relapse rate in adult acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B Study 8461. *J Clin Oncol* 2004; 22: 2410–2418. <http://dx.doi.org/10.1200/JCO.2004.03.023>
- [7] BALLEISEN S, KUENDGEN A, HILDEBRANDT B, HAAS R, GERMING U. Prognostic relevance of achieving cytogenetic remission in patients with acute myelogenous leukemia or high-risk myelodysplastic syndrome following induction chemotherapy. *Leuk Res* 2009; 33: 1189–1193. <http://dx.doi.org/10.1016/j.leukres.2009.03.004>
- [8] CHEN Y, CORTES J, ESTROV Z, FADERL S, QIAO W, et al. Persistence of cytogenetic abnormalities at complete remission after induction in patients with acute myeloid leukemia: prognostic significance and the potential role of allogeneic stem-cell transplantation. *J Clin Oncol* 2011; 29: 2507–2513. <http://dx.doi.org/10.1200/JCO.2010.34.2873>

Supplementary Information

Allogeneic stem cell transplantation can improve outcome of AML patients without complete cytogenetic response after induction and consolidation treatment

P. DVORAK^{1,2,*}, D. LYSAK³, S. VOKURKA³, M. KARAS³, I. SUBRT¹

¹Institute of Medical Genetics, University Hospital Pilsen, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University in Prague, Pilsen, Czech Republic;

²Institute of Biology, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University in Prague, Pilsen, Czech Republic; ³Department of Haematology and Oncology, University Hospital Pilsen, Pilsen, Czech Republic

*Correspondence: Pavel.Dvorak@lfp.cuni.cz

Supplementary Table

Table S1. G-banding and FISH results of 9 patients without hematologic complete remission

P. No.	At AML diagnosis	After 7+3 and 4+3 (HiDAC+Mx)
1	44,XX,del(4)(q27?),-5,der(5)t(4;5)(?q27;q21),der(7)t(5;7)(q13;q22),?der(8),der(9)t(5;9)(p13;q21),der(12)del(12)(p11)del(12)(q21),-16[12]/46,XX[6], FISH: 85% deletion EGR1(5q31),80% deletion D7S486(7q31),75% deletion CBFβ(16q22)	44,XX,del(4)(q27?),-5,der(5)t(4;5)(?q27;q21),der(7)t(5;7)(q13;q22),der(9)t(5;9)(p13;q21),der(12)del(12)(p11)del(12)(q21),-16[8] FISH: 90% deletion EGR1, 90% deletion D7S486
2	68-71<3n>,XXY,+Y,del(5)(?q12q35),+del(5)(?q12q35),+6,del(7)(q22q36),der(7)t(7;17)(p14;p12)x2,+del(7)(q22q36),+8,-9,-10,-11,-13,+14,-16,-17,-18,+19,+20,+der(?)t(17;?)(?q;?),+1-3mar[cp20] FISH: 6% deletion EGR1(5q31),92% deletion EGR1x2,10% deletion D7S486(7q31),87% deletion D7S486x2,95% tetrasomy 8	67-71<3n>,XXY,+Y,del(5)(?q12q35),+del(5)(?q12q35),+6,del(7)(q22q36),der(7)t(7;17)(p14;p12)x2,+del(7)(q22q36),+8,-9,-10,-11,-13,+14,-16,-17,-18,+19,+20,+der(?)t(17;?)(?q;?),+1-5mar[cp15] FISH: 90% deletion EGR1x2,80% trisomy 12 and disomy 13
3	45-46,X,der(X)t(X;?)(?),der(3)del(3)(?q)t(3;?6)(?q;q24),der(6)t(3;6)(?q;q23),der(7)del(7)(p12)del(7)(q21),-14,-15,+der(?)t(X;?)(?),+der(?)t(3;?)(?)cp20	Persistent massive infiltration by blasts of AML in bone marrow and peripheral blood by cytology, cytogenetic analysis not performed
4	45,XX,der(1)t(1;6)(p33;?),der(6)t(1;6)(p33;q23)t(6;9)(p11;p13),-9[3]/46,idem,+10[16], FISH: 90% deletion 9q21, 50% trisomy 10	45,XX,der(1)t(1;6)(p33;?),der(6)t(1;6)(p33;q23)t(6;9)(p11;p13),-9[13]/46,XX[1] FISH: 80% deletion 9q21, <1% trisomy 10
5	46,XX,+1,der(5)del(5)(q22q31)ins(5)(q31p15p1?1),i(8)(q10),-17,der(18)t(17;18)(q11.1;p11.1)[4]/47,sl,+i(8)(q10)[10]/48,sdl1,+i(8)(q10)[3]/48,sdl1,+mar1[1]/49,sdl1,+mar1,+mar2[1] FISH: 99% deletion EGR1(5q31),22% trisomy ETO(8q22),52% pentasomy ETO,12% septasomy ETO	46,XX,+1,der(5)del(5)(q22q31)ins(5)(q31p15p1?1),i(8)(q10),-17,der(18)t(17;18)(q11.1;p11.1)[2]/47,sl,+i(8)(q10)[9]/48,sdl1,+i(8)(q10)[3] FISH: 90% deletion EGR1,8% trisomy ETO,45% pentasomy ETO,25% septasomy ETO
6	46,XY,inv(3)(q21q26)[6]/45,idem,-7[19] FISH: 90% traslocation EVI1 (3q26), 90% monosomy 7	46,XY,inv(3)(q21q26)[4]/45,idem,-7[13]/46,XY[3] FISH: 77% traslocation EVI1, 84% monosomy 7
7	46,XY,inv(3)(q21q26),t(4;12)(q2?5;p13),der(11)del(11)(p11)del(11)(q13),der(13)t(11;13)(p11;p11)[4]/46,XY[1], FISH: 74% deletion MLL(11q23), 80% deletion TEL(ETV6,12p13), 70% translocation EVI1(3q26)	46,XY,inv(3)(q21q26),t(4;12)(q2?5;p13),der(11)del(11)(p11)del(11)(q13),der(13)t(11;13)(p11;p11)[5]/46,XY[1] FISH: 74% deletion MLL(11q23)
8	47,XY,+8[3]/46,XY[16], FISH: 45% trisomy 8	47,XY,+8[1]/46,XY[14], FISH: 3% trisomy 8
9	46,XX,del(5)(q12q33)[2]/45,idem,der(7)(17pter-17p?:7p13-7q11.2::17q21-17q25::20q11.2-20qter),-17,der(20)(20pter-20q11.2::17q-?17qter)[17] FISH: 85% deletion EGR1 (5q31), 85% deletion D7S486 (7q31)	G-banding unsuccessful FISH: 66% deletion EGR1

Table S2. G-banding and FISH results of 17 patients with hematologic but without cytogenetic complete remission

P. No.	At AML diagnosis	After 7+3 and 4+3 (HiDAC+Mx)
10	46,XY,der(7)del(7)(p12)del(7)(q11.2)[1]/46,XY[1], FISH: 75% deletion D7S486(7q31), 14% monosomy 7	G-banding unsuccessful FISH: 9% deletion D7S486, 4% monosomy 7
11	46,XX,der(2)ins(2;16)(q31;q22q?)t(2;12)(q33;q21-23),del(7)(p11), der(12)del(12)(p12)t(?;12)(q33;q21-23),del(16)(q11)[3]/45,idem,-del(7) (p11)[11]/46,XX[1], FISH: 93% deletion TEL(ETV6), 80% monosomy 7	46,XX,der(2)ins(2;16)(q31;q22q?)t(2;12)(q33;q21-23),del(7)(p11),der(12) del(12)(12)t(?;12)(q33;q21-23),del(16)(q11)[4]/46,XX[11], FISH: 20% deletion TEL(ETV6), <1% monosomy 7
12	42-45,XY,der(1)t(1;?)p13;?),i(1)(q10),-4,der(5)t(5;?)q14-21;?),del(7) (p11),-10,der(11)(?),-12,?der(12)(?),der(15)t(15;?)p11;?,-16,+der(18;21) (q10;q10),-19,+1-4mar[cp22] FISH: 78% deletion EGR1(5q31), 82% deletion TP53(17p13)	44,XY,del(1)(p13),-4,der(5)t(1;5)(p13;q13),del(7)(p10),-10,-11,-12,-15,- 16,-19,+5mar[1]/43,idem,-18[1]/46,XY[23] FISH: 12% deletion EGR1(5q31)
13	44-49,XY,-4,add(5)(q13),del(7)(q11.2),der(11)(q?),der(?14;15)(q10;q10),- 15,0-5mar[cp4]/43-49,idem,der(12)add(12)(p1?)del(12)(q?),+der(?) t(12;?)(q?;?)cp13]/46,XY[2] FISH: 91% deletion EGR1(5q31),92% deletion 7q31(D7S486),96% am- plification MLL(11q23),70% deletion TEL(ETV6, 12p13)	46,XY[15] FISH: 8% amplification MLL,7% deletion TEL
14	46,XX,der(5)t(5;11)(q32-34;q14-22),del(11)(q13),der(12)ins(12;11) (q24;q13q14-22)[2]/48,idem,+8,+13[13] FISH: 57% trisomy 8; deletion EGR1 (5q31) and MLL negative	48,XX,der(5)t(5;11)(q32-34;q14-22),+8,del(11)(q13),der(12)ins(12;11) (q24;q13q14-22),+13[7]/46,XX[8] FISH: 80% trisomy 8
15	47,XY,+8[8]/48,XY,+8,+21[12], FISH: 50% trisomy ETO(8q22)+trisomy AML1(21q22), 40% trisomy ETO(8q22)	47,XY,+8[9]/48,XY,+8,+21[6], FISH: 50% trisomy ETO(8q22)+trisomy AML1(21q22), 40% trisomy ETO(8q22)
16	47,XX,+8[13]/46,XX[3], FISH: 56% trisomy 8	46,XX[15], FISH: 10% trisomy 8
17	47,X,der(Y)t(Y;13)(p11.3;q22),-3,der(5)ins(5;3)(p1?4;?)del(5)(q12), +der(5)ins(5;3)(p1?4;?)del(5)(q12),+8,del(13)(q13),del(20)(q11.1) [19]/46,XY[1] FISH: 86% deletion EGR1(5q31), 87% trisomy 8, 88% deletion D20S108(20q12)	46,XY,der(3)t(3;5)(p21;p1?4),-5,+8[2]/48,XY,-3,der(5)ins(5;3)(p1?4;?) del(5)(q12), +der(5)ins(5;3)(p1?4;?)del(5)(q12),+8,+?del(20)(q11.1) [5]/46,XY[11] FISH: 63% deletion EGR1(5q31), 54% trisomy 8
18	46,XX,t(2;3)(p13;q26)[15], FISH: 95% translocation EVI1	46,XX,t(2;3)(p13;q26)[14]/46,XX[1], FISH: 90% translocation EVI1
19	46,XX,del(7)(q22q36)[4]/46,XX[16] FISH: 31% deletion D7S486 (7q31), 18% deletion 9q21	46,XX[20] FISH: 2% deletion D7S486
20	49-61,XY,+X,+1,+1,+3,+4,+5,del(5)(?q15q33),+6,+7,+7,del(7) (?q22q36),+8,+9,+11,der(11)del(11)(p11.2)del(11)(q12),der(11)t(11;?) (q21;?),+12,del(13)(?q12q14),+del(13)(?q12q14),der(13)t(13;?)(?;?),+15,+ 17,+18,+19,+20,+der(?t(11;?)(q21;?),+der(?t(13;?)(?;?),+1-2mar[cp20] FISH: 80% deletion EGR1(5q31), 79% deletion D7S486(7q31), 62% trisomy 17	51-56,XY,+5,del(5)(?q15q33) or t(5;?)(?;?),+6,+7,del(7) (?q22q36),+11,der(11)del(11)(p11.2)del(11)(q12),der(11)t(11;?) (q21;?),del(13)(?q12q14),+del(13)(?q12q14),der(13)t(13;?) (?;?),+15,der(17)t(17;?)(q?25;?),+der(17)t(17;?)(q?25;?),+19,+20,+1- 5mar[cp9]/46,XY[6] FISH: 18% deletion EGR1(5q31), 20% trisomy 17
21	41,XX,del(5)(q14-21q32-34),der(11)t(11;12)(p15;q13),-12,der(13;22) (q10;q10),der(14;15)(q10;q10),-17,der(?21)(21qter→21q21::22q11.2→22 q12::21p11.2→21q21::21q11.2→21qter),-22[11]/46,XX[9] FISH: 56% deletion EGR1(5q31), 61% monosomy 17	46,XX,del(5)(q14-21q32-34)[2]/46,XX[13] FISH: 6% deletion EGR1; monosomy 17 negative
22	45,XX,t(3;3)(q21;q26),-7[14]/46,XX[1], FISH: 91% monosomy 7	45,XX,t(3;3)(q21;q26),-7[1]/46,XX[9], FISH: 1,5% monosomy 7
23	47,XX,+8[9]/46,XX[8], FISH: 73% trisomy 8	46,XX[15], FISH: 1,5% trisomy 8
24	46,XX,t(9;11)(p22;p15)[20]	46,XX,t(9;11)(p22;p15)[1]/46,XX[19]
25	46,XY,del(20)(q11.2)[20], FISH: 97% deletion D20S108(20q12)	46,XY,del(20)(q11.2)[11]/46,XY[3], FISH: 80% deletion D20S108

6.2.1 Komentář k příspěvku II

Akutní myeloidní leukemie (AML) je onemocnění vzniklé v důsledku klonální expanze myeloidních blastů v periferní krvi, kostní dřeni nebo i jiné tkáni. Jedná se o onemocnění heterogenní na klinické, morfologické a genetické úrovni a může zahrnovat pouze jednu nebo všechny myeloidní buněčné linie. Celosvětově je roční incidence této choroby asi 3 případy na 100000 lidí s mírnou převahou mužů, průměrný věk při diagnóze je 65 let.

Komentovaný příspěvek předkládá retrospektivní analýzu 376 postupně diagnostikovaných pacientů s AML. Z tohoto celkového souboru bylo 256 (68 %) léčeno standardní indukční chemoterapií “7+3” následovanou konsolidačním/intenzifikačním režimem “4+3” s vysokými dávkami cytarabinu a mitoxantronu. Z 256 pacientů léčených režimy “7+3” i “4+3” byl při cytogenetickém vyšetření nádorových buněk z kostní dřene nalezen u 120 (47 %) pacientů normální karyotyp a u zbývajících 136 (53 %) pacientů byla nalezena alespoň jedna cytogenetická aberace. Naše studie se zaměřila na pacienty, kteří po uvedených dvou pokusech o dosažení remise onemocnění nedosáhli kompletní cytogenetické remise (CRc), tj. při kontrolním vyšetření po léčbě byly stále přítomné cytogenetické změny. Nedosažení CRc znamenalo pro tyto pacienty velmi špatnou prognózu vývoje onemocnění a předpoklad časně progresu. U pacientů s nedosaženou CRc lze také předpokládat různé stupně rezistence vůči podávaným protinádorovým léčivům.

Mezi pacienty léčenými oběma režimy a majícími alespoň jednu cytogenetickou aberaci v karyotypu bylo vyhledáno 25 (18 %) pacientů bez dosažení CRc a tyto pacienti byli dále analyzováni z pohledu laboratorních a klinických dat. Nejprve byly porovnány dvě podskupiny těchto pacientů – s a bez současného dosažení kompletní morfologické remise (16 versus 9 pacientů). V obou skupinách bylo pozorováno shodné zastoupení spektra cytogenetických aberací s nejvyšším výskytem tzv. aberací spojených s myelodysplastickými změnami. Mezi tyto změny patří především delece dlouhého raménka (q raménka) chromosomu 5 (delece 5q), ztráta celého chromosomu 5, delece q raménka chromosomu 7, ztráta celého chromosomu 7, aberace krátkého raménka (p raménka) chromosomu 17 a delece q raménka chromosomu 11. S myelodysplasií je také asociován tzv. komplexní karyotyp, definovaný jako karyotyp se třemi a více nesouvisejícími aberacemi. Komplexní karyotyp, jehož součástí byla delece 5q, tvořil

přibližně třetinu všech karyotypů v obou porovnávaných skupinách. U AML tvoří skupinu se střední prognózou pacienti s normálním karyotypem nebo s aberacemi nezahrnutými mezi aberace spojené s dobrou či naopak špatnou prognózou. V podskupině bez dosažené morfologické kompletní remise byl pouze jeden pacient (z 9 pacientů, 11 %) náležející při diagnóze do střední prognostické skupiny, v podskupině s dosaženou morfologickou kompletní remisí bylo takových pacientů pět (31 %).

Zajímavým pozorováním bylo, že u 4 z 25 pacientů byly chemoterapií eliminovány subklony vzniklé klonálním vývojem (tj. s vyšším počtem cytogenetických aberací), zatímco méně odvozené klony dále proliferovaly a vykazovaly vyšší stupeň rezistence. Toto pozorování by mohlo naznačovat, že rezistence by mohla být během vývoje nádoru v některých subpopulacích nádorových buněk i samovolně ztracena.

V rámci pacientů bez CRc byli dále porovnání pacienti, kteří podstoupili allogenní transplantaci kostní dřeně, s pacienty, kteří pro tento typ léčby indikováni nebyli. I pro pacienty s takto nepříznivou prognózou bylo demonstrováno, že allogenní transplantace kostní dřeně představuje kurativní léčbu. 40 % pacientů po transplantaci bylo dlouhodobě naživu. Doba přežití do progresu (PFS) a celkové přežití (OS) pro celou skupinu transplantovaných pacientů bylo 2,7 a 2 roky, zatímco pro skupinu netransplantovaných pacientů byla tato čísla 0,2 roku pro PFS a 0,3 roku pro OS. Důležitým faktem však bylo, že 67 % pacientů, kteří zemřeli po absolvované transplantaci, zemřelo na jiné příčiny než je progres AML. Jednou z možných cest k dalšímu zlepšení přežití velmi rizikových pacientů s AML by mohlo být zaměření se na zdravotní problémy nesouvisející přímo s progresí základního maligního onemocnění.

6.3 Příspěvek III

Název příspěvku: The translocation t(2;11)(p21;q23) without MLL gene rearrangement— a possible marker of good prognosis in myelodysplastic syndrome patients

Autoři: Pavel Dvořák, Daniel Lysák, Samuel Vokurka, Kyra Michalová, Iveta Šárová, Anna Jonášová, Martina Hrubá, Anna Rykovská, Ivan Šubrt

Název časopisu a nakladatelství: Hematological Oncology (Wiley)

Rok vydání a impakt faktor časopisu: 2014, IF₍₂₀₁₅₎ 3,494

Citace: DVORAK, Pavel, Daniel LYSAK, Samuel VOKURKA, Kyra MICHALOVA, Iveta SAROVA, Anna JONASOVA, Martina HRUBA, Anna RYKOVSKA a Ivan SUBRT, 2014. The translocation t(2;11)(p21;q23) without MLL gene rearrangement— a possible marker of good prognosis in myelodysplastic syndrome patients. *Hematological Oncology*. Wiley, **32**(2), 82-86. ISSN 1099-1069.

Original Research Article

The translocation t(2;11)(p21;q23) without MLL gene rearrangement—a possible marker of good prognosis in myelodysplastic syndrome patients

Pavel Dvorak^{1*}, Daniel Lysak², Samuel Vokurka², Kyra Michalova^{3,4}, Iveta Sarova^{3,4}, Anna Jonasova⁵, Martina Hrubá¹, Anna Rykowska¹ and Ivan Subrt^{1,6}

¹Institute of Medical Genetics, University Hospital Pilsen, Pilsen, Czech Republic

²Department of Haematology and Oncology, University Hospital Pilsen, Pilsen, Czech Republic

³Cytogenetic Department, Institute of Haematology and Blood Transfusion, Prague, Czech Republic

⁴Centre of Oncocytogenetics, Institute of Medical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, General Faculty Hospital and 1st Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic

⁵1st Department of Internal Medicine, General Faculty Hospital and 1st Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic

⁶Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University in Prague, Pilsen, Czech Republic

*Correspondence to:

Pavel Dvorak, MSc, Institute of Medical Genetics, University Hospital Pilsen, Dr Edvarda Benese 13, 30599 Pilsen, Czech Republic.
E-mail: dvorakp@fnplzen.cz

Abstract

The translocation t(2;11)(p21;q23) is associated with *de novo* myelodysplastic syndromes (MDS) and has an overall frequency of approximately 1%. The outcome of MDS patients with this translocation is not clear until now, because most of the clinical data addressing the t(2;11)(p21;q23) has been collected without investigating the status of the mixed lineage leukemia (MLL) gene. In this report, we present seven new patients with MDS diagnosis and the t(2;11)(p21;q23) in bone marrow cells; all of them without MLL gene rearrangement. They were found in two databases consisting of 1185 patients of two Czech institutions. These patients tended to be younger and showed a strong male predominance. A cytological and histological assessment of bone marrow at diagnosis revealed only mild MDS with marked dysplasia in megakaryopoiesis. Similar to other primary abnormalities in MDS (e.g. deletion of 11q), the t(2;11)(p21;q23) was frequently associated with deletion of 5q. Our results stress the common clinicopathological features of this entity and indicate that the t(2;11)(p21;q23) may be associated with a good prognosis for MDS patients (median survival 72 months). Copyright © 2013 John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: myelodysplastic syndromes; karyotype; t(2;11)(p21;q23); good prognosis

Received 18 February 2013

Revised 4 July 2013

Accepted 8 July 2013

Introduction

Myelodysplastic syndromes (MDS) constitute a heterogeneous group of myeloid neoplasms characterized by abnormal differentiation and maturation of myeloid cells, bone marrow (BM) failure and a genetic instability with enhanced risk of transformation to acute leukemia. These preleukemic conditions mainly affect adult patients of older age. Based on the disease etiology, MDS can be classified into three main categories: primary (*de novo*) MDS, MDS with a myeloproliferative syndrome and treatment-related MDS secondary to previous chemotherapy, radiotherapy or treatment with other toxic agents [1,2]. Each of these different biological entities has a characteristic cytogenetic profile.

Chromosomal abnormalities are detected in approximately 50% of patients with *de novo* MDS and are important in disease diagnosis, classification and prognostic stratification [1–4]. Approximately 30% of *de novo* MDS patients

have a pathologic karyotype with some of the recurrent chromosomal abnormalities that have a well-defined relationship with myelodysplasia and prognosis. However, non-random chromosomal changes found in approximately 10% of *de novo* MDS patients have no clearly defined prognostic value [3,5].

The translocation t(2;11)(p21;q23) (Figure 1) was first reported in 1982 in a patient 8 years after developing refractory sideroblastic anemia [6]. There are currently 45 cases with the translocation published in the literature [7]. The vast majority of the published cases involved patients who were diagnosed with MDS or acute myeloid leukemia (AML). At least half of the patients had a t(2;11)(p21;q23) as a primary chromosomal abnormality. The most frequently found abnormality associated with the t(2;11)(p21;q23) was deletion of the long arm of chromosome 5 (5q). This occurred in approximately half of the published cases [7]. According to the WHO 2008

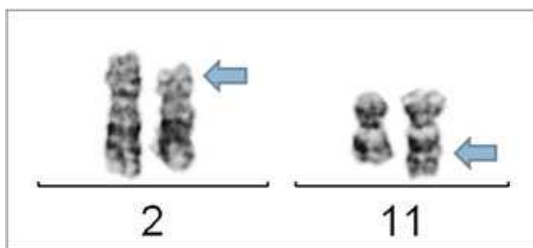


Figure 1. The t(2;11)(p21;q23) translocation by G-banding technique

classification, the t(2;11)(p21;q23) has an overall frequency of approximately 1% and belongs to the group of abnormalities that are characteristic for *de novo* MDS [1]. The clear prognostic significance of the translocation has not been assessed previously because most clinical studies addressing t(2;11)(p21;q23) did not determine the mixed lineage leukemia (*MLL*) gene (new HGNC official name *KMT2A*) involvement.

Materials and methods

The databases of the Institute of Medical Genetics at the University Hospital Pilsen (IMGP) and the Cytogenetic Department at the Institute of Haematology and Blood Transfusion and Centre of Oncocytogenetics of General Faculty Hospital in Prague from 1996 to the present were searched for patients with MDS with t(2;11)(p21;q23). The database of IMGP contained 335 consecutive MDS patients and the database of CDCOP contained 850 consecutive MDS patients. Clinical information was obtained by review of the electronic medical records for history of any antecedent neoplasm, chemotherapy, radiation therapy, cytopenia(s), treatment information and outcome. The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki.

Representative BM aspirate smears or trephine biopsy specimens were available for evaluation for all patients. BM samples were cultured for 24 h without stimulation. Chromosomal preparations were made by standard techniques using colcemide, hypotonic treatment, fixation in methanol/acetic acid and G-banding. Twenty metaphases were analyzed in all cases, if available, and the results reported using the International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN 2013) [8]. In some cases fewer than 20 metaphases were available, but in all cases the number of metaphases was adequate for conventional cytogenetic analysis. Fluorescence *in situ* hybridization analysis for *MLL* rearrangement was performed using a dual-colour break-apart probe (Vysis LSI *MLL* Break Apart Probe, Abbott Molecular Inc., Des Plaines, IL, USA)

on interphase nuclei and metaphase cells on freshly harvested BM cells according to the manufacturer's instructions.

Survival of the patients with MDS associated with t(2;11)(p21;q23) described in our study was compared to that with complex karyotype and trisomy 8 as a sole abnormality in our historical database consisting of 335 consecutive MDS patients from IMGP. Patient survival was estimated by the Kaplan–Meier method from the date of BM diagnosis until death from any cause or until the last patient follow-up. Survival curves were statistically compared using the log-rank test.

Results

A total of 1185 patients with diagnosis of MDS in two Czech institutions were examined for the presence of t(2;11)(p21;q23) in BM cells. Seven patients with the t(2;11)(p21;q23) were identified, all of them were without *MLL* rearrangement. All of the patients were males, with a median age of 52 years (range 37–71 years). At diagnosis, they presented heterogeneous clinical symptoms similar to MDS patients (symptoms connected to anemia, persistent raised body temperature and skin rash). The first cytological or histological assessment of BM showed mild MDS. A marked dysplasia in megakaryopoiesis was described in five patients. Conventional karyotyping (G-banding) revealed the t(2;11)(p21;q23) as the sole chromosomal abnormality in two patients at diagnosis. One patient had a subclone with deletion of 5q together with the translocation, and four patients had the t(2;11)(p21;q23) together with deletion of 5q in the main clone at diagnosis. The BM karyotypes at diagnosis and during follow-up are summarized in Table 1. All seven patients were tested by fluorescence *in situ* hybridization for *MLL* gene rearrangement and were negative. All patients were treated with symptomatic or cytoreductive therapy immediately after diagnosis. During the course of the disease treatment, one patient with deletion of 5q received lenalidomide, however, without permanent response to this therapy. Two patients underwent allogeneic peripheral blood stem cell transplantation, one had a stable disease but the other had transformed to acute leukemia. Two patients were alive at the time of writing the manuscript (130 and 144 months from MDS diagnosis), and five patients died (13, 22, 33, 72 and 127 months after MDS diagnosis). The median survival for all seven patients was 72 months. The detailed information on treatment and survival is also shown in Table 1. The median survival of MDS patients with t(2;11)(p21;q23) was significantly better than that of MDS patients with complex karyotype and MDS patients with trisomy 8 as a sole abnormality (72 months vs 7.5 and 57 months, Kaplan–Meier, log-rank test, $P = 0.0007$) (Figure 2).

Table 1. Clinical and cytogenetic data of seven *de novo* myelodysplastic syndrome patients with the t(2;11)(p21;q23) without MLL gene rearrangement

	Age/sex	Karyotype	Therapy	Outcome
1	59/M At dg. (3/2011) Progression of autoimmune CNS vasculitis (3/2012)	46,XY,t(2;11)(p21;q23)[8]/46,XY[12] 46,XY,t(2;11)(p21;q23)[3]/46,XY[17]	Symp.	Died 13 months from MDS dg. on autoimmune CNS vasculitis
2	71/M At dg. (8/2009)	46,XY,t(2;11)(p21;q23),del(5)(q12q33)[10]/46,XY[7]	Symp.	Died 33 months from dg. on subdural haemorrhage and heart failure
3	37/M At dg. (5/1999) Transformation to AML (6/2008) Relapse after allo-PBSCT (1/2009) Progression of AML (9/2009) Progression of AML (11/2009)	46,XY,t(2;11)(p21;q23)[20] 46,XY,t(2;11)(p21;q23)[15] 45,XY,t(2;11)(p21;q23),-7,der(11)t(2;11)(p21;q23)[13]/ 46,XY[2] 45,XY,t(2;11)(p21;q23),-7,der(11)t(2;11)(p21;q23)[13]/47,idem,+3,+21[2] 45,XY,t(2;11)(p21;q23),-7,der(11)t(2;11)(p21;q23)[9]/ 45,idem,t(3;17)(q26;q23-24)[9]/ 47,idem,+3,+21[1]/46,XY[1]	HU, IA, AP allo-PBSCT DLI	Died 127 months from dg. on progression of AML
4	50/M At dg. (11/2000)	46,XY,t(2;11)(p21;q23)[8]/46,idem,del(5)(q13q33)[7]	allo-PBSCT	Lives 130 months from dg. in remission
5	52/M At dg. (8/1998) Progression to MDS RAEB II (3/2000)	46,XY,t(2;11)(p21;q23),del(5)(q14q33)[34] complex karyotype	Symp. LD Ara-C, MTX, PU	Died 72 months from dg. on progression of MDS
6	54/M At dg. (9/2000) Without progression (11/2009) Without progression (6/2010)	46,XY,t(2;11)(p21;q23),del(5)(q13q33)[13]/ 46,XY[7] 46,XY,t(2;11)(p21;q23),del(5)(q13q33)[20]/ 46,XY[2] 46,XY,t(2;11)(p21;q23),del(5)(q13q33)[4]/ 46,XY[12]	Symp. LE, symp. Symp.	Lives 144 months from dg. without progression
7	47/M At dg. (10/1996) Without progression (6/1997) Progression to MDS RAEB (1/1998)	46,XY,t(2;11)(p21;q23),del(5)(q13q33)[20] 46,XY,t(2;11)(p21;q23),del(5)(q13q33)[39] 46,XY,t(2;11)(p21;q23),del(5)(q13q33)[40]	Symp. Symp. Symp.	Died 22 months from dg. on progression of MDS

m.,months;dg.,diagnosis;DLI, donor lymphocyte infusion;symp.,symptomatic;HU,hydroxyurea;IA,interferon alfa;AP,allopurinol;LD Ara-C,Low dose Ara-C;MTX,methotrexate;PU,purinethol;LE, lenalidomide;MDS, myelodysplastic syndrome; allo-PBSCT, allogeneic peripheral blood stem cell transplantation.

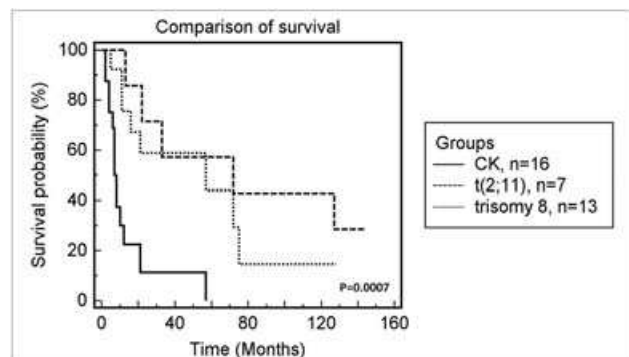


Figure 2. Comparison of survival (Kaplan-Meier survival curves) between our cohort of myelodysplastic syndrome patients with t(2;11)(p21;q23), $n=7$, median survival 72 months, *de novo* myelodysplastic syndrome patients with complex karyotype (≥ 3 abnormalities), $n=16$, median survival 7.5 months and *de novo* myelodysplastic syndrome patients with trisomy 8 as a sole abnormality, $n=13$, median survival 57 months, from our historical database consisting of 335 myelodysplastic syndrome patients from University Hospital Pilsen ($P=0.0007$)

Discussion

Patients with the t(2;11)(p21;q23) have been shown to share some common clinicopathological features, like younger age at diagnosis (mostly under 60 years) and a strong male predominance (3M:1F). Cytological or histological assessment of BM usually reveals only a mildly presented MDS with marked dysplasia in megakaryopoiesis. Because of the translocation breakpoint in 11q23, *MLL* gene involvement was presumed. However, only four of the 28 published cases tested for *MLL* rearrangement were positive for *MLL* gene translocation. These *MLL* positive cases were also clinically very different from the rest of the published cases [9,10]. Recently, Bousquet *et al.* [10] proved that t(2;11)(p21;q23) without *MLL* rearrangement results not in direct oncogene activation, but in up-regulation of miR-125b. Mir-125b is located near the translocation area in 11q23, distally to *MLL*. Moreover, miR-125b is also up-regulated in patients with B-cell acute lymphoblastic leukemia carrying the t(11;14)(q24;q32) translocation. The overexpression of miR-125b has been shown to target multiple signalling pathways. MiR-125b regulates expression of several genes important for hematopoietic development, such as *STAT3*, *BAK1*, *JUN* and *LIN28A* [11,12].

There are few data on survival of MDS patients with the t(2;11)(p21;q23) in the literature. Fleischman *et al.* [9] collected some data from 14 previously published cases with the t(2;11) for the first time in 1999. However, only three patients were tested for *MLL* rearrangement (two patients were positive and one was negative), and 11 patients were not tested for *MLL*. MDS lasted from 6 months–8 years without leukemic transformation in that heterogeneous group of patients [9]. In 2003, Gozzetti *et al.* [13] published another review of this topic and added one new case with the t(2;11)(p21;q23) without *MLL* rearrangement. In that case,

AML evolved from MDS 2 years after diagnosis. The patient was treated with Ara-C based chemotherapeutic regimens but died within 1 year [13]. The results of a large cohort of 968 patients with MDS were published in the work of Solé *et al.* [5] in 2005. A subgroup of six patients with t(2;11)(p21;q23) as a single abnormality (*MLL* was not studied) reached a median survival of 26.6 months. However, the subgroup had a higher incidence of evolution to acute leukemia than cases in the intermediate risk category [5]. Haase *et al.* [3] analyzed another large cohort of 2124 patients with MDS in 2007. Their subgroup consisted of six patients with t(2;11)(p21;q23), but the *MLL* status was not mentioned. These patients had a median survival of 20.0 months [3]. Both works placed patients with the t(2;11)(p21;q23) into an intermediate risk group [3,5]. Our study, which involved patients with the t(2;11)(p21;q23) without *MLL* gene rearrangement, indicates better clinical outcome and suggests a connection between this abnormality and good prognosis. In addition, based on our limited results, it seems that the favourable outcome of patients is not influenced by the presence of the abnormality deletion of 5q as a sole additional aberration.

In conclusion, the molecular mechanisms and clinical relevance of rare chromosomal abnormalities in MDS are the targets of current research in the field of cytogenetics. However, most of the clinical data addressing the t(2;11)(p21;q23) has been collected without investigating the status of the *MLL* gene. Contrary to other studies, this is the first report evaluating the clinical outcome of patients with the translocation but without *MLL* gene rearrangement. Despite the low number of cases in our study, our results indicate that the t(2;11)(p21;q23) could be associated with a good prognosis for MDS patients. However, a larger cohort of patients is necessary to confirm this finding.

Conflict of interest

None of the authors have any conflict of interest to report.

Acknowledgement

This work was supported in part by a grant from the Ministry of Health, Czech Republic (MH CZ DRO-VFN64165).

References

1. Swerdlow SH, Capovilla E, Harris NL, *et al.* WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. IARC: Lyon, 2008; p. 439.
2. Garcia-Manero G. Myelodysplastic syndromes: 2012 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol* 2012; **87**: 692–701.
3. Haase D, Germing U, Schanz J, *et al.* New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: evidence from a core dataset of 2124 patients. *Blood* 2007; **110**: 4385–4395.

4. Deeg HJ, Scott BL, Fang M, *et al.*. Five-group cytogenetic risk classification, monosomal karyotype, and outcome after hematopoietic cell transplantation for MDS or acute leukemia evolving from MDS. *Blood* 2012; **120**: 1398–1408.
5. Solé F, Luño E, Sanzo C, *et al.*. Identification of novel cytogenetic markers with prognostic significance in a series of 968 patients with primary myelodysplastic syndromes. *Haematologica* 2005; **90**: 1168–1178.
6. Kardon N, Shulman P, Deggan T, Budman DR, Davis J, Vinciguerra V. Cytogenetic findings in dysmyelopoietic syndrome. *Cancer* 1982; **50**: 2834–2838.
7. Mitelman F, Johansson B, Mertens F (eds). Mitelman database of chromosome aberrations and gene fusions in cancer, 2012. <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>
8. ISCN. An international system for human cytogenetic nomenclature. Shaffer LG, McGowan-Jordan J, Schmid M (eds). S. Karger: Basel; 2013.
9. Fleischman EW, Reshmi S, Frenkel MA, *et al.*. MLL is involved in a t(2;11)(p21;q23) in a patient with acute myeloblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 1999; **24**: 151–155.
10. Bousquet M, Quelen C, Rosati R, *et al.*. Myeloid cell differentiation arrest by miR-125b-1 in myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia with the t(2;11)(p21;q23) translocation. *J Exp Med* 2008; **205**: 2499–2506.
11. Surdziel E, Cabanski M, Dallmann I, *et al.*. Enforced expression of miR-125b affects myelopoiesis by targeting multiple signaling pathways. *Blood* 2011; **117**: 4338–4348.
12. Chaudhuri AA, So AY, Mehta A, *et al.*. Oncomir miR-125b regulates hematopoiesis by targeting the gene Lin28A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; **109**: 4233–4238.
13. Gozzetti A, Tozzuoli D, Crupi R, Raspadori D, Fabbri A, Lauria F. A case of acute myelogenous leukemia: myelodysplastic syndrome with t(2;11)(p21;q23) without MLL rearrangement. *Cancer Genet Cytogenet* 2003; **144**: 177–178.

6.3.1 Komentář k příspěvku III

Myelodysplastické syndromy (MDS) představují heterogenní skupinu myeloidních neoplasií charakterizovanou abnormální diferenciací a vyžíváním myeloidních buněk, selháváním funkce kostní dřeně a genetickou nestabilitou vyúsťující ve zvýšené riziko přechodu do akutní leukemie. Akutní leukemie na podkladě MDS vykazují obecně horší odpověď na standardně podávanou léčbu a vyšší stupeň rezistence v porovnání s akutními leukemiemi bez předchozí historie MDS (s výjimkou akutních leukemií spojených s předchozí protinádorovou léčbou). MDS lze označit za pre-leukemické stavy a jejich výskyt je nejvyšší mezi dospělými lidmi ve vyšším věku (věkový průměr 70 let) s převahou mužských pacientů. O primárních neboli *de novo* MDS hovoříme tehdy, není-li toto onemocnění spojeno s myeloproliferativním onemocněním nebo nevzniklo-li jako následek předchozí léčby jiného maligního onemocnění.

U přibližně 30 % pacientů s primárními MDS je při cytogenetickém vyšetření buněk kostní dřeně odhalen patologický karyotyp s některou z nejběžnějších aberací, u nichž je vztah k myelodysplasií a prognóze onemocnění již dobře popsán. V karyotypu 10 % pacientů s primárními MDS je však nalezena některá ze vzácných cytogenetických aberací, o jejichž vztahu k tomuto onemocnění a jeho prognóze je informací nedostatek a dosud čekají na upřesnění.

Translokace je cytogenetická změna, při které dojde k výměně chromosomových segmentů mezi dvěma či více různými chromosomy. Kromě přímého porušení primární struktury genů ležících v místě chromosomových zlomů, může v jejím důsledku dojít také ke změně regulačních mechanismů exprese genů, které samotnou translokací fyzicky porušené nebyly. Translokace mezi krátkým raménkem chromosomu 2 a dlouhým raménkem chromosomu 11, zapisovaná dle cytogenetické nomenklatury t(2;11)(p21;q23), je asociována s primárními MDS a její četnost se pohybuje okolo 1 %. Komentovaná práce si dala za cíl přinést hlubší informace o této translokaci jak z laboratorního, tak z klinického pohledu.

Většina z dosud publikovaných prací, zabývajících se translokací t(2;11)(p21;q23), neměla jednoznačně vyřešenu otázku, zda se translokační zlom nenachází přímo v místě genu *MLL*

(*mixed lineage leukemia gene*). Gen *MLL* je totiž do pruhu 11q23 lokalizován. Souvislost genu *MLL* (nový oficiální název je *KMT2A*) se vznikem některých typů leukemií je již delší dobu studována a je všeobecně známo spojení translokací se zlomem v místě tohoto genu a špatné prognózy. V naší práci byla u všech vzorků provedena analýza metodou FISH, zda se může jednat o translokaci se zlomem v místě genu *MLL*. Žádný z pacientů s MDS a t(2;11) v našem souboru neměl translokaci v místě genu *MLL*. V databázích dvou českých cytogenetických pracovišť, které jsme pro naši studii mohli využívat, bylo mezi 1185 pacienty s MDS nalezeno 7 pacientů s translokací t(2;11) bez zlomu v místě genu *MLL*.

Pacienti v námi vytipované sedmičlenné skupině se vyznačovali spíše mladším věkem (průměr 52 let), ve srovnání s průměrným věkem pacientů s MDS, a výraznou predominancí mužů. Při cytologickém a histologickém vyšetření kostní dřeně při záchytu onemocnění byly změny související s MDS naznačeny jen mírně, avšak s výraznou dysplasií v megakaryopoéze. V karyotypech byla t(2;11) často spojena s další změnou – delecí 5q, což bylo popsáno již u jiných primárních změn vyskytujících se u MDS (např. u delece 11q). Popisovaná práce přinesla argumenty ve prospěch vyčlenění t(2;11)(p21;q23) bez účasti *MLL* genu u primárních MDS jako samostatné entity. Práce dále naznačila, že by tato jednotka mohla souviset s dobrou prognózou u těchto typů pre-leukemických onemocnění.

Na základě literární rešerše bylo dále konstatováno, že možným onkogenním mechanismem t(2;11)(p21;q23) bez účasti *MLL* genu by mohla být up-regulace miR-125b, což by byl pro cytogenetickou abnormalitu méně častý mechanismus působení.

6.4 Příspěvek IV

Název příspěvku: Discontinuation of tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia patients – worldwide battlefield

Autoři: Pavel Dvořák, Daniel Lysák, Samuel Vokurka

Název časopisu a nakladatelství: Neoplasma (AEPRESS)

Rok vydání a impakt faktor časopisu: 2015, IF₍₂₀₁₅₎ 1,961

Citace: DVORAK, Pavel, Daniel LYSAK a Samuel VOKURKA, 2015. Discontinuation of tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia patients – worldwide battlefield. *Neoplasma : journal of experimental and clinical oncology*. Bratislava: AEPRESS, **62**(2), 167-171. ISSN 00282685.

Discontinuation of tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia patients – worldwide battlefield

Minireview

P. DVORAK^{1,2}, D. LYSAK³, S. VOKURKA³

¹Institute of Biology, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University in Prague, Karlovarska 48, 301 66 Pilsen, Czech Republic; ²Institute of Medical Genetics, University Hospital Pilsen, Dr. Edvarda Benese 13, 30599 Pilsen, Czech Republic; ³Department of Haematology and Oncology, University Hospital Pilsen, alej Svobody 80, 304 60 Pilsen, Czech Republic

*Correspondence: Pavel.Dvorak@lfp.cuni.cz

Received May 6, 2014 / Accepted July 14, 2014

Advances in understanding the pathogenesis of chronic myeloid leukemia (CML) and implementation of the therapy with tyrosine kinase inhibitors (TKI) could be considered as a prototype of successful fight against cancer. However, for an optimally responding patient it is recommended to follow the TKI therapy indefinitely. The question about the possibility of safe TKI treatment discontinuation in certain clinical situations was raised and is currently under close investigation worldwide. Currently, imatinib discontinuation trials have shown that about 60% of eligible patients experienced molecular recurrence within 6 months of treatment discontinuation, while the remaining 40% remained in defined deep molecular response throughout the duration of mostly two years follow-up. Interestingly, retreatment with the same TKI or another TKI was successful in the vast majority of patients demonstrating molecular recurrence of the disease. These findings support the concept of safe TKI treatment discontinuation and its usefulness for a specific subset of CML patients. However, recent data are not sufficient for TKI discontinuation attempts outside clinical trials yet. Because of the high risk of potentially problematic molecular recurrences of the pathological clones, the key question is to find the right predictive marker of TKI discontinuation success, however it stays unsolved yet. This minireview brings a concise summary of this hot topic with a realistic view from clinical routine.

Key words: tyrosine kinase inhibitors, imatinib, discontinuation, chronic myeloid leukemia

Chronic myeloid leukemia (CML) is a clonal hematopoietic stem cell disorder consequent to the origin of the *BCR-ABL1* fusion gene, which is predominantly generated by a t(9;22)(q34;q11) reciprocal translocation. The product of the oncogene, bcr-abl1 fusion protein, has a constitutive tyrosine kinase activity and is believed to play a crucial role in the development of CML. Biological therapy with tyrosine kinase inhibitors (TKIs) specifically disables this activity and effectively clears malignant clone in the vast majority of CML patients. Imatinib mesylate, first-generation TKI, has become the standard first-line treatment of chronic phase CML during the last decade. Second-generation TKIs (dasatinib, nilotinib) were shortly developed to overcome the resistance or intolerance to imatinib. Clinical trials with next generation TKIs (bosutinib, ponatinib) are in progress.

Several studies of imatinib as first-line therapy have published comparable long-term results. The estimated event-free survival at 6 years was 83%, and the estimated rate of freedom from progression to accelerated phase and blast crisis was 93% in the IRIS study [1]. Practice guidelines issued by the European LeukemiaNet (ELN) and the National Comprehensive Cancer Network (NCCN) both recommend that a patient who is responding optimally to TKI treatment continues indefinitely at the standard recommended dose [2, 3]. However, some situations in clinical routine raised the question about the possibility of safe TKI treatment discontinuation. These situations involve issues like chronic toxicity, patient compliance, pregnancy or patient's wish. Furthermore, financial issues of TKI treatment are being considered not only in economies with limited financial

sources (approximately 5,000 new cases are diagnosed with CML in Europe each year).

Rare cases with long-term stable minimal residual disease or complete molecular response after cessation of interferon alpha therapy had been reported and they laid the theoretical basis for the TKI discontinuation attempts [4]. Soon after 2000, when imatinib treatment came into clinical routine, case reports of patients who stopped the treatment were reported. Few years later, first clinical studies focusing on imatinib dose modification or discontinuation started to be published [5-7].

Response to TKI treatment. At present, the most important prognostic factor for CML patients is the response to TKI treatment. The response is measured based on cytogenetic (G-banding, FISH) and molecular genetic (qRT-PCR) methods. The definition of optimal response has evolved during the last few years. At present, an optimal response to any TKI as first-line treatment is defined by at least partial cytogenetic response (PCyR; 1-35% Ph+ metaphases) at 3 months, at least complete cytogenetic response (CCyR; No Ph+ metaphases) at 6 months and at least major molecular response (MMR; *BCR-ABL1:ABL1* $\leq 0.1\%$ on the International Scale) at 12 months [2]. Molecular response (MR) is mostly assessed according to the International Scale (IS) as the ratio of *BCR-ABL1* transcripts to *ABL1* transcripts and it is reported as *BCR-ABL1* % on a log scale, where 10%, 1%, 0.1%, 0.01%, 0.0032%, and 0.001% correspond to a decrease of 1, 2, 3, 4, 4.5, and 5 logs, respectively, below the standard baseline that was used in the IRIS study [2]. A *BCR-ABL1* expression of 0.1% (MR^{3.0}) corresponds to major molecular response (MMR). The proportion of patients who achieved MMR after 12 months of 400 mg imatinib daily (standard dose) ranged from 18% to 58% in the published studies [2, 3]. A high number of commercially available kits for molecular genetic analyses from different manufacturers for different platforms are available on the market. It is the responsibility of each laboratory to choose some of the kits to fit with the recommended criteria and obtain results, which are comparable with other laboratories.

Success rate for TKI discontinuation. The nonrandomized multicentre Stop Imatinib (STIM) study was one of the largest prospective studies of TKI treatment discontinuation organized to date [8]. Imatinib treatment was discontinued in patients who maintained MR^{5.0} (defined as undetectable *BCR-ABL1* with assay sensitivity of ≥ 5 log below IS-standardized baseline) for at least 2 years. Of 100 patients enrolled, 61 patients had molecular recurrence after a median of 30 months of follow-up (58 patients within 7 months) and 39 patients maintained MR^{5.0} after a median of 22 months of follow-up. The overall probability of maintaining MR^{5.0} at 12 months and 24 months was 43% and 39%, respectively [8, 9]. Molecular recurrence was defined as *BCR-ABL1* $\geq 0.001\%$ IS in the STIM study.

The results of another prospective study, TWISTER, were published in 2013 [10]. Imatinib treatment was stopped in 40 patients who maintained MR^{4.5} for at least 2 years. With

a median of 42 months of follow-up post-treatment cessation, 18 patients (45%) had not demonstrated molecular relapse (defined as loss of MMR or two consecutive occurrences of detectable *BCR-ABL1*), and the Kaplan–Meier estimate of rate of treatment-free remission at 2 years was 47.1% [9, 10]. Molecular relapse was defined as loss of MMR or two consecutive occurrences of detectable *BCR-ABL1* in TWISTER study.

In the HOVON 51 study, patients received escalating doses of imatinib in combination with escalating doses of cytarabine according to the study protocol. Thirty-three patients from the HOVON 51 study with an MR^{4.5} for at least 2 years who were still on imatinib treatment were randomized between continuation of imatinib (arm A, n = 18) or discontinuation of imatinib (arm B, n = 15) [11]. After a median follow up of 36 months since randomization, 3 patients (17%) in arm A and 10 patients (67%) in arm B had a molecular relapse. All 3 relapsing patients in arm A had also stopped imatinib after randomization. All but one relapsing patient relapsed within 7 months after discontinuation of imatinib. The molecular relapse rate at 12 and 24 months after randomization was 0% and 6% (arm A) and 53% and 67% (arm B) respectively [11].

Takahashi et al. [12] conducted a nationwide retrospective survey of the clinical outcomes of CML patients after discontinuation of imatinib in Japan. Among 3,242 imatinib-treated CML patients, they identified 50 (1.5%) who had discontinued imatinib for at least six months; of these they were able to analyze 43 in full. A complete molecular response (CMR) was defined as detection of no *BCR-ABL1* transcript in a real-time quantitative-polymerase chain reaction (RQ-PCR) assay (n=24), nested reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) assay (n=14), or a highly sensitive transcription-mediated amplification (TMA) method (n=5). These PCR methods could detect at least a 4-log reduction in the *BCR-ABL1* transcript (international scale $<0.01\%$). The reasons for which imatinib was discontinued were adverse events (n=18), patient's request due to cost (n=14), patient's desire to become pregnant (n=3), and long undetectable residual disease (n=8). The median duration of CMR before cessation was 27.4 months (range 0.9-79.6 months). The median period of cessation was 22.4 months (range 6.2-97.9 months). Molecular recurrence was detected in 19 patients (44%). The relapse free survival (RFS) rate at five years was estimated to be 47% while median RFS was determined to be 41 months using the Kaplan-Meier method [12].

The higher rates of deep molecular responses achievable with nilotinib and dasatinib suggest that use of second-generation TKIs might broaden the pool of candidates eligible for treatment discontinuation. To date, only very limited clinical data on discontinuation of nilotinib or dasatinib therapy are available.

Summary of qualification criteria for TKI discontinuation. Above mentioned prospective trails had differed in the qualification criteria for TKI discontinuation and there has not been published any consensus yet. Length of TKI treatment duration, level of response, and duration of response were the

main criteria used [8, 10, 11]. At least 3 years of TKI treatment duration was demanded in the STIM and TWISTER study. At least MR^{4.5} for at least 2 years were the minimal required level of response and its duration [8, 10, 11]. The ongoing EURO-SKI study (NCT01596114) has these main inclusion criteria: CML in chronic phase, duration of TKI treatment before enrolment at least 3 years, at least MR^{4.0} for at least one year (personal communication).

Predictive factors for TKI discontinuation success. Statistically significant predictive factors differed between published studies as well. A trend for a shorter time to *BCR-ABL1* negativity in nonrelapsing patients versus relapsing patients was found in the pilot study conducted by Rousselot et al. [6]. The absence of relapse was also not significantly associated with the length of interferon alpha (IFN- α) exposure prior to imatinib in this study [6]. Highest Sokal score group and female sex were predictive of worsened prognosis, whereas a long duration of imatinib was predictive of improved prognosis in the STIM study conducted by Mahon et al. [8]. Significant interaction with relapse risk was observed only for duration of IFN- α treatment and time to achieve undetectable minimal residual disease after switching from IFN- α to imatinib treatment in the TWISTER study performed by Ross et al. [10]. Three (75%) of 4 Sokal high-risk patients relapsed vs 45% of low-risk patients (log-rank $P > .05$) in this study [10]. The retrospective study of Takahashi et al. [12] found that based on multivariate regression analysis, imatinib dose intensity and prior IFN- α administration were independently predictive of molecular recurrence within 12 months. The depth of the molecular response should be a factor influencing long-term sustained complete molecular response after discontinuation of imatinib according to this study [12]. Interestingly, duration of prior IFN- α treatment was the most frequently found predictive factor.

Retreatment after relapse. Importantly, in patients who demonstrated molecular recurrence after TKI discontinuation, retreatment with the same TKI or another TKI resulted in high rates of response, mostly as deep as that observed during initial TKI treatment [6-12]. Loss of MMR was recently recommended as a practical and safe criterion for restarting therapy by Rousselot et al. [13]. It is too early to draw any conclusions about survival of continuing versus discontinuing patients.

Limitations of current data. Clinical data on TKI discontinuation obtained from published studies are difficult to compare. The cohorts varied among the clinical studies in many criteria such as how long they had been on TKI therapy, what level of response they had achieved, how long that response had been maintained before discontinuation, and how molecular recurrence was defined. Milder criteria for TKI discontinuation might expand the low pool of candidates, but their heterogeneity may lead to higher rates of relapse and hamper the ability to define the right candidate characteristics. Another limitation of the published studies is the duration of follow-ups, which could not be sufficient to draw relevant

conclusions [14]. Moreover, each of the published studies suggested different predictive factors of TKI discontinuation success. Current data about TKI discontinuation don't allow us to predict any long-term consequences of TKI discontinuation and retreatment on the clinical course of CML as well.

Models of operational cure of CML Several models for the achievement of a prolonged drug-free remission in CML are discussed in the literature [9, 14, 15]. The models are not mutually exclusive, and different pathways to drug-free remission might apply in different patients. In the Model of stem cell depletion, there is a rapid initial drop in the level of *BCR-ABL1*, which is thought to reflect the clearance of mature CML progeny that are sensitive to TKI. There follows a second phase with a shallow gradient, which is thought to reflect the gradual depletion of the less-sensitive CML stem cells. The slow but progressive depletion of CML progenitors during TKI treatment may be explained by the apoptosis that is dependent on cell cycling [14, 15]. In the Model of immunological control, a reduction in the level of minimal residual disease by TKI therapy is sufficient to overcome T-cell anergy and enables the emergence of an autologous immunological response that suppresses, but may not eradicate, the whole CML clone. The risk of relapse on TKI cessation is dependent on the functional immune response and the intrinsic immunogenicity of the CML cells [14, 15].

Future directions. Many of the above-mentioned limitations should be solved by numerous ongoing clinical trials conducted or planned worldwide. In Europe these are STIM 2 (imatinib), STOP 2GTKI (nilotinib, dasatinib), EURO-SKI (all TKI's), and German CML Study V (nilotinib), in the United States study organized by the University of Michigan Cancer Center (imatinib) and ENESTgoal (nilotinib), in Japan Dasatinib Stop Trail (dasatinib), in Korea study organized by the Seoul St. Mary's Hospital (imatinib). Other trials are organized by the pharmaceutical companies – Bristol-Myers Squibb (DASFREE, dasatinib), Novartis Pharmaceuticals (ENESTop and ENESTfreedom, both nilotinib). Furthermore, French investigators from around the STop IMatinib (STIM) trial have started to explore the feasibility of second attempt to discontinue imatinib in patients with second sustained CMR who experienced molecular recurrence after first attempt of imatinib discontinuation [16]. Their preliminary data suggest that such a second attempt could be possible and could be beneficial for a small subset of patients [16].

Leukemic stem cells are believed to play a crucial role in leukemic hematopoiesis. Strategies to eradicate both proliferating mature progeny and stem cells will continue to be a focus of much clinical research in the field of CML. Research efforts have focused mainly on combination approaches – TKIs plus other drugs.

Despite the remarkable success of TKIs against *bcr-abl1*, secondary resistance develops in a significant subset of patients, most often due to point mutations in the *BCR-ABL1* tyrosine kinase domain or insensitivity of leukemic stem cells to TKIs [17]. One of the current approaches to overcome this

resistance is launch of new non-TKI drugs with a different mechanism of action. One of them is the natural alkaloid omacetaxine mepesuccinate that inhibits protein synthesis and induces cell death independently from the presence of bcr-abl1 mutations [18].

Conclusions

In general, imatinib discontinuation trails have shown that about 60% of eligible patients experienced molecular recurrence within 6 months of treatment discontinuation, while the remaining 40% remained in defined deep MR throughout the duration of mostly two years follow-up. It seems certain that achievement of an MMR is not enough to decide on TKI treatment discontinuation and deeper MR is needed. Interestingly, retreatment with the same TKI or another TKI was successful in the vast majority of patients demonstrating molecular recurrence of the disease. These findings support the concept of safe TKI treatment discontinuation and its usefulness for a specific subset of CML patients. Regardless of economic issues, major benefits from TKI treatment discontinuation could have patients with adverse events and pregnant women. However, recent data are not sufficient for TKI discontinuation attempts outside clinical trials yet. Furthermore, the high risk of potentially problematic molecular relapse can be only hardly acceptable for many of the optimally responding patients, who don't experience any significant discomfort connected with the TKI therapy. The key issue is to find the right predictive marker of TKI discontinuation success and it waits for the results of the current research.

Acknowledgements: The authors would like to thank Martin Pesta (Institute of Biology, Faculty of Medicine in Plzen) and Pavel Soucek (Institute of Public Health in Praha) for their inspiring comments. This work was supported in part by the grants NT 14227 from the Ministry of Health of the Czech Republic and SVV-2014-SVV260 050 from the Faculty of Medicine in Plzen, Charles University in Praha (LF UK Plzen).

References

- [1] HOCHHAUS A, O'BRIEN SG, GUILHOT F, DRUKER BJ, BRANFORD S, et al.. Six-year follow-up of patients receiving imatinib for the first-line treatment of chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 2009; 23: 1054–1061. <http://dx.doi.org/10.1038/leu.2009.38>
- [2] BACCARANI M, DEININGER MW, ROSTIG, HOCHHAUS A, SOVERINI S, et al.. European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. *Blood* 2013; 122: 872–884. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2013-05-501569>
- [3] NATIONAL COMPREHENSIVE CANCER NETWORK. NCCN clinical practice guidelines in oncology: chronic myelogenous leukemia, v.4.2013.
- [4] KANTARJIAN HM, O'BRIEN S, CORTES JE, SHAN J, GILES FJ, et al.. Complete cytogenetic and molecular responses to interferon-alpha-based therapy for chronic myelogenous leukemia are associated with excellent long-term prognosis. *Cancer* 2003; 97: 1033–1041. <http://dx.doi.org/10.1002/cncr.11223>
- [5] ISHIKAWA I, KATO C, HARIGAE H, SUGAWARA T, TOMIYA Y, et al.. Dose modification of imatinib by monitoring the level of BCR-ABL transcript in chronic myelogenous leukemia. *Tohoku J Exp Med* 2006; 210: 355–363. <http://dx.doi.org/10.1620/tjem.210.355>
- [6] ROUSSELOT P, HUGUET F, REA D, LEGROS L, CAYUELA JM, et al.. Imatinib mesylate discontinuation in patients with chronic myelogenous leukemia in complete molecular remission for more than 2 years. *Blood* 2007; 109: 58–60. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2006-03-011239>
- [7] GOH HG, KIM YJ, KIM DW, KIM HJ, KIM SH, et al.. Previous best responses can be re-achieved by resumption after imatinib discontinuation in patients with chronic myeloid leukemia: implication for intermittent imatinib therapy. *Leuk Lymphoma* 2009; 50: 944–951. <http://dx.doi.org/10.1080/10428190902926973>
- [8] MAHON FX, RÉA D, GUILHOT J, GUILHOT F, HUGUET F, et al.. Discontinuation of imatinib in patients with chronic myeloid leukaemia who have maintained complete molecular remission for at least 2 years: the prospective, multicentre Stop Imatinib (STIM) trial. *Lancet Oncol* 2010; 11: 1029–1035. [http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045\(10\)70233-3](http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(10)70233-3)
- [9] MAURO MJ. Striving to achieve safe, permanent treatment discontinuation in chronic myeloid leukemia. *Leuk Res* 2013; 37: 1395–1403. <http://dx.doi.org/10.1016/j.leukres.2013.07.029>
- [10] ROSS DM, BRANFORD S, SEYMOUR JF, SCHWARER AP, ARTHUR C, et al.. Safety and efficacy of imatinib cessation for CML patients with stable undetectable minimal residual disease: results from the TWISTER Study. *Blood* 2013; 122: 515–522. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2013-02-483750>
- [11] THIELEN N, VAN DER HOLT B, CORNELISSEN JJ, VERHOEF GE, GUSSINKLO T, et al.. Imatinib discontinuation in chronic phase myeloid leukaemia patients in sustained complete molecular response: a randomised trial of the Dutch-Belgian Cooperative Trial for Haemato-Oncology (HOVON). *Eur J Cancer* 2013; 49: 3242–3246. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2013.06.018>
- [12] TAKAHASHI N, KYO T, MAEDA Y, SUGIHARA T, USUKI K, et al.. Discontinuation of imatinib in Japanese patients with chronic myeloid leukemia. *Haematologica* 2012; 97: 903–906. <http://dx.doi.org/10.3324/haematol.2011.056853>
- [13] ROUSSELOT P, CHARBONNIER A, CONY-MAKHOUL P, AGAPE P, NICOLINI FE, et al.. Loss of major molecular response as a trigger for restarting tyrosine kinase inhibitor therapy in patients with chronic-phase chronic myelogenous leukemia who have stopped imatinib after durable undetectable disease. *J Clin Oncol* 2014; 32: 424–430. <http://dx.doi.org/10.1200/JCO.2012.48.5797>
- [14] TANG M, FOO J, GÖNEN M, GUILHOT J, MAHON FX, MICHOR F. Selection pressure exerted by imatinib therapy leads to disparate outcomes of imatinib discontinuation

- trials. *Haematologica* 2012; 97: 1553–1561. <http://dx.doi.org/10.3324/haematol.2012.062844>
- [15] MELO JV, ROSS DM. Minimal residual disease and discontinuation of therapy in chronic myeloid leukemia: can we aim at a cure? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2011; 2011: 136–142.
- [16] LEGROS L, ROUSSELOT P, GIRAUDIER S, TULLIEZ M, HUGUET F, et al.. Second attempt to discontinue imatinib in CP-CML patients with a second sustained complete molecular response. *Blood* 2012; 120: 1959–1960. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2012-02-408229>
- [17] JABBOUR EJ, CORTES JE, KANTARJIAN HM. Resistance to tyrosine kinase inhibition therapy for chronic myelogenous leukemia: a clinical perspective and emerging treatment options. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2013; 13: 515–529. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clml.2013.03.018>
- [18] KANTARJIAN HM, O'BRIEN S, CORTES J. Homoharringtonine/omacetaxine mepesuccinate: the long and winding road to food and drug administration approval. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2013; 13: 530–533. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clml.2013.03.017>

6.4.1 Komentář k příspěvku IV

Chronická myeloidní leukemie (CML) patří mezi myeloproliferativní maligní onemocnění. Její celosvětová roční incidence je asi 2 případy na 100000 obyvatel, a ačkoliv se může objevit v každé věkové skupině, průměrný věk při diagnóze CML se nachází v páté a šesté dekádě lidského života.

Porozumění mechanismům patogeneze chronické myeloidní leukemie (CML) na molekulární i buněčné úrovni a zavedení cílené terapie s využitím inhibitorů tyrozinkináz (TKI) může být považováno za učebnicový prototyp boje proti nádorovému onemocnění. Z pohledu mechanismu vzniku je CML charakterizována klonální poruchou hematopoetické kmenové buňky, která je následkem vzniku abnormálního fúzního proteinu BCR-ABL1. Téměř ve 100 % případů je kauzálním mechanismem chromosomová translokace mezi dlouhým raménkem chromosomu 9 a dlouhým raménkem chromosomu 22, $t(9;22)(q34;q11)$, která vznikla chybnou opravou chromosomálních zlomů v daných segmentech. TKI první (imatinib), druhé (dasatinib, nilotinib) i třetí (bosutinib, ponatinib) generace účinně blokují konstitutivně aktivovaný fúzní protein a jeho onkogenní funkci.

Mezinárodní doporučení pro léčbu CML shodně doporučují, aby pacienti optimálně reagující na primární léčbu TKI byli, bez přestání, dále léčeni standardním dávkováním léčiva. Přesto v klinické praxi existují situace, kdy k přerušení léčby TKI dochází. Za prvé jde o případy vzniku rezistence na podávanou TKI léčbu nebo netolerovatelné toxicity, a zde je pak nutné hledat nové léčebné strategie. Za druhé se jedná vliv sociokulturních faktorů, jako jsou ochota nemocného spolupracovat při léčbě (compliance), těhotenství či subjektivní přání pacienta. Nemalý může být i ekonomický vliv spojený s neustále se zvyšujícími náklady na protinádorovou léčbu.

Klinické studie zabývající se kontrolovaným vysazením léčby s TKI u pacientů s definovanou hlubokou molekulární odpovědí již v posledních letech probíhají a jsou publikovány první výsledky. Publikované výsledky ukazují, že asi 40 % pacientů s vysazenou léčbou zůstalo v hluboké molekulární odpovědi během celých dvou let, po které studie většinou probíhaly. U valné většiny ze zbývajících 60 % pacientů, kteří

dosáženou odpověď ztratili většinou během prvních 6 měsíců vysazení, byla hluboká molekulární odpověď znovu nastolena po obnovení TKI léčby.

Otázkou stále zůstává, zda přerušeni tyrozinkinázové léčby nemůže zvýšit výskyt případů rezistence na tuto léčbu především tím, že umožní větší proliferaci nádorových buněk, a tím i vznik větší heterogenity mezi nimi. Vzhledem k tomu, že hlavním mechanismem vzniku sekundární rezistence na TKI jsou bodové mutace v BCR-ABL1 tyrozinkinázové doméně, je to teoreticky pravděpodobné. Zásadní je také nalezení prediktivního faktoru spojeného s rychlejší rekurencí onemocnění po kontrolovaném vysazení TKI léčby, který se zatím nalézt nepodařilo. Také ochota optimálně odpovídajících pacientů k účasti na studiích s vysazením léčby je menší a pochopitelná.

Příspěvek ve formě review přinesl komplexní pohled na problematiku kontrolovaného přerušeni léčby s TKI a diskuzi nad dosud otevřenými otázkami z pohledu laboratorní a klinické praxe.

6.5 Příspěvek V

Název příspěvku: Postavení cytogenetického vyšetření v současném managementu léčby dětské akutní lymfoblastické leukemie

Autoři: Pavel Dvořák, Petra Vohradská, Tomáš Votava, Lenka Doležalová, Zdeňka Černá, Ivan Šubrt

Název časopisu a nakladatelství: Onkologie (Solen)

Rok vydání a impakt faktor časopisu: 2015, časopis je evidován v Seznamu recenzovaných neimpaktovaných periodik vydávaných v ČR

Citace: DVOŘÁK, Pavel, Petra VOHRADSKÁ, Tomáš VOTAVA, Lenka DOLEŽALOVÁ, Zdeňka ČERNÁ a Ivan ŠUBRT, 2015. Postavení cytogenetického vyšetření v současném managementu léčby dětské akutní lymfoblastické leukemie. *Onkologie*. Solen, **9**(1), 38-42. ISSN 1802-4475.

Postavení cytogenetického vyšetření v současném managementu léčby dětské akutní lymfoblastické leukemie

Pavel Dvořák^{1,2}, Petra Vohradská¹, Tomáš Votava³, Lenka Doležalová³, Petr Smíšek⁴, Zdeňka Černá³, Ivan Šubrt¹

¹Ústav lékařské genetiky LF UK v Plzni a FN Plzeň

²Ústav biologie LF UK v Plzni

³Oddělení hemato-onkologické, Dětská klinika FN Plzeň

⁴Klinika dětské hematologie a onkologie FN Motol

Vznik dětské akutní lymfoblastické leukemie (ALL) je dle současných poznatků mnohastupňový proces počínající často již před narozením jedince. Na vývoj preleukemického klonu mají vliv vnější i vnitřní faktory, vrozené genetické dispozice i náhoda. Významným faktorem ovlivňujícím vznik dětské ALL mohou být infekční onemocnění. Více než konkrétní druh mikroorganismu však hraje roli abnormální odpověď imunitního systému na běžnou infekci, která může u vnímavých jedinců spustit další procesy. Výrazného pokroku bylo dosaženo v pochopení genetického profilu patologických buněk ALL. Na klinické úrovni je dnes známo mnoho korelací genetických změn s mírou agresivity chování daného subtypu leukemického onemocnění. S tím také souvisí úprava léčebných protokolů na základě stratifikace dle rizika (prognostické a/nebo prediktivní genetické faktory, sledování minimální zbytkové nemoci). Léčba dětské ALL dosahuje v porovnání s jinými maligními chorobami výborné výsledky (5leté přežití dosahuje 90%), s výjimkou leukemií v kojeneckém věku, které mají stále horší prognózu. Do laboratorní praxe se dostávají mnohé nové genetické techniky včele s metodami založenými na mikroarray technologii a sekvenování nové generace (next-generation sequencing). Silnou stránkou již plně etablovaného cytogenetického vyšetření zůstává možnost komplexního pohledu na karyotyp patologických buněk. Tento pohled nám umožňuje pochopit mechanismus vzniku přítomných aberací a také možnost zachytit diverzitu nádorových buněk ve formě vznikajících malých subklonů. Zviditelnit tento specifický cytogenetický přístup je cílem předkládaných kazuistik.

Klíčová slova: akutní lymfoblastická leukemie, prognostické faktory, cytogenetika.

Role of cytogenetic analysis in current management of childhood acute lymphoblastic leukemia treatment

Childhood acute lymphoblastic leukemia, like cancer in general, probably arises from interactions between exogenous or endogenous exposures, genetic susceptibility, and chance. This multistep process begins sometimes even during prenatal period of life. Abnormal response to a common infection remains the strongest candidate for causal exposure. More precise risk stratification and personalized chemotherapy based on the biological characteristics of leukemic cells and hosts (prognostic and/or predictive genetic markers, minimal residual disease monitoring) have pushed the cure rate of childhood acute lymphoblastic leukemia to near 90%. However with the exception of infant leukemia, which still bears a dismal prognosis. Many new genetic techniques are approaching to clinical praxis mostly based on microarray or next-generation sequencing techniques. The strong point of well-established cytogenetic analysis remains in the possibility of a complex view to the whole karyotype of pathological cells. This kind of view allows us to understand the origin of genetic abnormalities and diversity of cancer cells in the form of evolving new subclones. The main goal of the presented case reports is to bring attention to this specific advantage of cytogenetic analysis.

Key words: acute lymphoblastic leukemia, prognostic stratification, cytogenetics.

Onkologie 2015; 9(1): 38–42

Úvod

Vznik dětské akutní lymfoblastické leukemie (ALL) je dle současných poznatků mnohastupňový proces počínající obvykle již před narozením jedince. Na vývoj preleukemického klonu mají vliv vnější i vnitřní faktory, vrozené genetické dispozice i náhoda. Riziko vzniku ALL u populace dětí do 15 let je přibližně 1:2000 (1). V posledních letech bylo dosaženo velkých úspěchů v pochopení biologické podstaty a mechanismů tohoto procesu, přesto zůstává mnoho nedeřešených otázek. Další postup v po-

chopní podstaty procesu vzniku ALL je komplikován skutečností, že se velmi pravděpodobně jedná o více biologicky odlišných skupin, které nemusejí mít stejný mechanismus vzniku. Také identifikace významných vnějších i vnitřních vlivů a role vrozených genetických dispozic se ukazuje jako nesnadná.

Významné faktory vzniku dětských leukemií

Z vnějších faktorů byl prokázán vliv ionizujícího záření (např. záření vznikající při výbuchu

atomových bomb, rentgenové záření), jeho vliv na současnou populaci by však neměl být velký. Vliv neionizujícího záření (např. záření z běžných elektrických spotřebičů) je hodně diskutován, ale dosud se jej nepodařilo validně experimentálně dokázat (1). Významným faktorem pro vznik dětské ALL jsou infekční onemocnění. Více než konkrétní druh mikroorganismu však hraje roli abnormální odpověď imunitního systému na běžnou infekci u vnímavých jedinců. Vnímavost jedince v tomto smyslu může být dána vrozenými genetickými dispo-

Tabulka 1. Přehled genetických skupin dětské prekurzorové B-ALL, jejich četnost a rizikovitost (kompilace z literárních zdrojů použitých v článku)

Genetická skupina	Četnost (%)	Rizikovitost
Hyperdiploidní	25	nízká
ETV6-RUNX1	20	nízká
BCR/ABL1 like	9	vysoká
KMT2A (MLL)	6	vysoká
TCF3-PBX1	4	střední
CRLF2	4	vysoká
ERG	3	vysoká
BCR/ABL1	2	vysoká
dic(9;20)	2	vysoká
iAMP21	2	vysoká
Hypodiploidní	1	vysoká
TCF3-HLF	0,5	vysoká

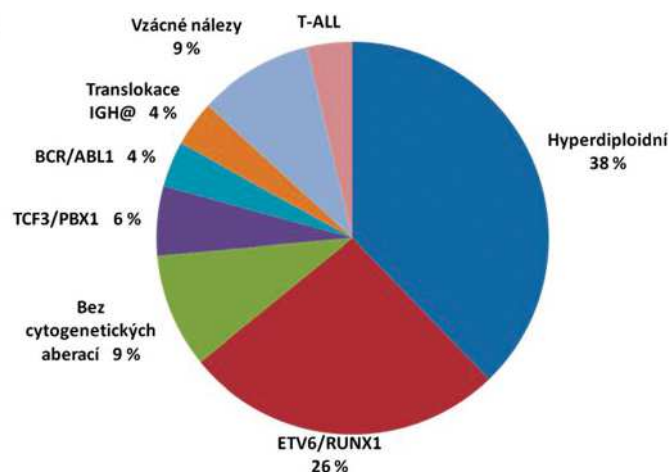
zicemi (v populaci běžnými variantami genů). Dlouhodobě je známo, že děti s Downovým syndromem mají asi 40násobné riziko vniku ALL než běžná populace. Analýzy na základě studia kandidátních genů nepřinesly statisticky významné výsledky. Celogenomové asociační studie (GWAS) na velkých souborech pacientů a zdravých kontrol prokázaly vliv běžných alelických variant u 4 genů – IKZF1, ARID5B, CEBPE a CDKN2A. Účinek těchto níže rizikových variant se sčítá až po 10násobné riziko pro nosiče variant ve všech 4 genech v homozygotní formě (1).

Biomarkery a genetický profil

Stanovení rizikovitosti onemocnění u konkrétního pacienta vychází z kombinace prognostických a prediktivních markerů získaných při zachytu onemocnění a během prvních týdnů léčby. Za významné markery se v současnosti považují především klinické údaje (věk, počáteční počet bílých krvinek, CNS status – míra eventuální infiltrace centrálního nervového systému leukemickými buňkami), odpověď na léčbu sledovaná pomocí hladiny minimální zbytkové nemoci/choroby (minimal residual disease, MRD) a biologická charakteristika patologického klonu (imunofenotypizace, cytogenetické vyšetření, molekulárně genetická vyšetření) (1, 2, 3). Na hodnocení MRD v přesně daných termínech se uplatňují především metody molekulárně genetické a imunofenotypizační, které dosahují výrazně vyšší citlivosti než vyšetření cytogenetické (4). Výrazného pokroku bylo dosaženo v pochopení genetického profilu patologických buněk ALL a jeho korelace s agresivností chování daného subtypu onemocnění na klinické úrovni. Stejně jako v ostatních oborech medicíny je v současné hematologii uplatňován koncept personalizované medicíny. S tím také souvisí

Obrázek 1. Cytogenetické výsledky FN Plzeň 2004–2014

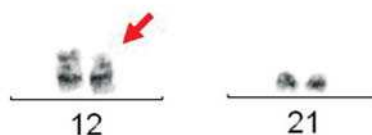
• 53 dětí s ALL
(B-ALL 51 dětí,
T-ALL 2 děti)



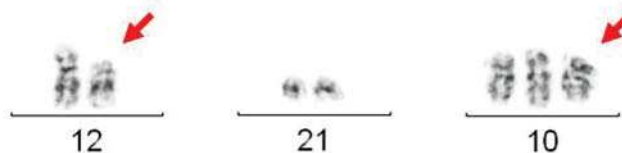
Obrázek 2. Cytogenetické vyšetření – kazuistika 1

G-pruhování:

1. hlavní klon **46,XY,der(12)del(12)(p11p12)t(12;21)(p13;q22)[5]**



2. subklon **47,idem,+10[2]**

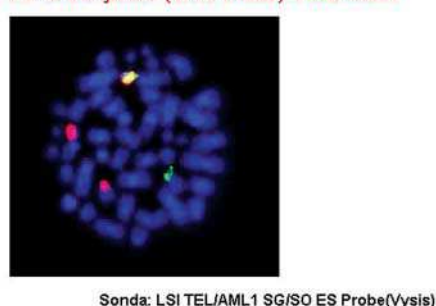


3. normální karyotyp **46,XY[13]**

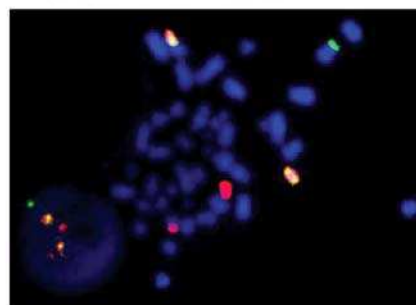
Obrázek 3. Cytogenetické vyšetření – kazuistika 1

FISH:

73 % int. jader (6/15 mitóz) TEL/AML1



18 % jader (3/15 mitóz) duplikace TEL/AML1 +der(21)t(12;21)(p13;q22)



13 % jader (2/16 mitóz) trizomie 10

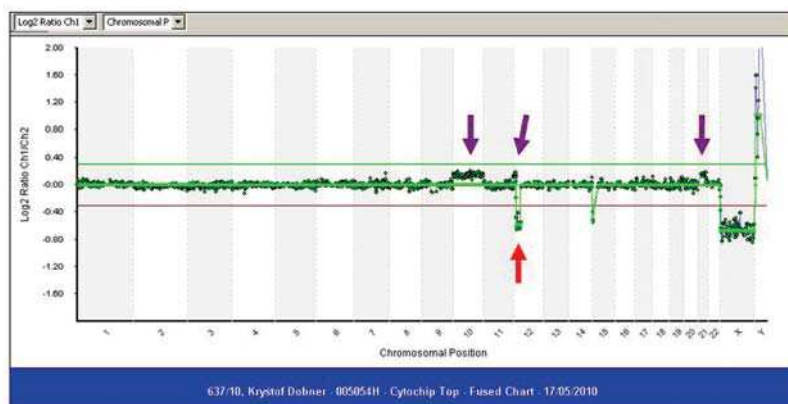


Obrázek 4. Cytogenetické vyšetření – kazuistika 1

arrayCGH (CytoChip Focus Haematology):

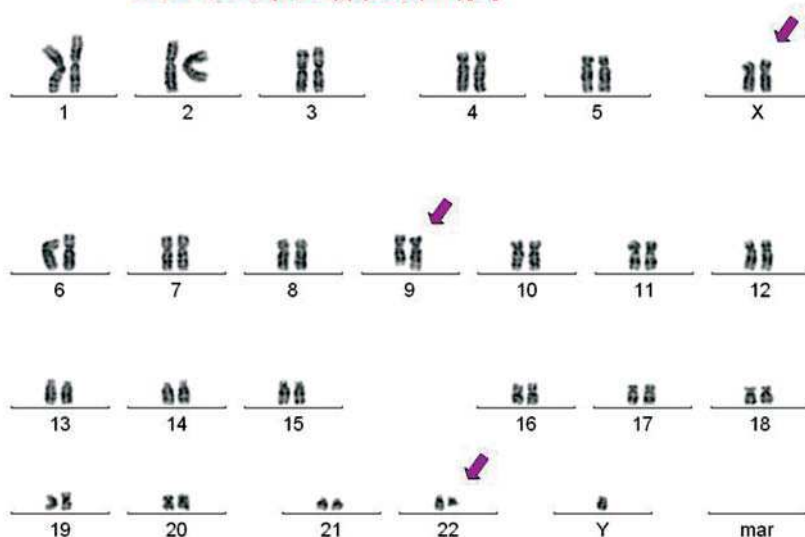
delece v oblasti 12p13.2→12p11.21 (20Mb oblast od 3' ETV6 (TEL) směrem k centromere) ↓

mírné zvýšení množství genetického materiálu v oblasti celého chromosomu 10, 12p13.33→12p13.2 a 21q11.2→21q22.12 ↓

**Obrázek 5.** Cytogenetické vyšetření – kazuistika 2

G-pruhování:

1. hlavní klon 47,XY,+X,t(9;22)(q34;q11)[5]



2. normální karyotyp 46,XY[10]

úprava léčebných protokolů a obecně výborné výsledky léčby dětské ALL v porovnání s jinými maligními chorobami (5leté přežití dosahuje 90%) (5). Výjimkou z této pozitivní situace jsou stále kojenecké akutní leukemie, které mají výsledky horší. Tabulka 1 přináší současný přehled genetických skupin dětské prekurzorové B-ALL, jejich četnost a rizikovitost. Dětská prekurzorová B-ALL tvoří přibližně 85% všech případů dětské ALL, u přibližně 10% je diagnostikována T-ALL a přibližně 2% tvoří zralá B-ALL.

Vývoj cytogenetického vyšetření

Výchozím materiálem pro cytogenetické vyšetření je u hematologických malignit kostní

dřeň, eventuálně periferní krev. Po krátkodobé kultivaci buněk (obvykle 24 hodin) je buněčné dělení zastaveno mitotickým blokátorem (kolchicin), ke vzorkům je přidán hypotonický roztok způsobující zvýšení objemu vnitřních buněčných struktur a dále fixace (metanol s kyselinou octovou), která mimo jiné způsobuje křehkost buněčných membrán. Za specifických podmínek (nízká teplota, vysoká vlhkost) je tato cytogenetická suspenze kapána na podložní sklo. U některých dělicích se buněk dojde k prasknutí cytoplazmatické i jaderné membrány a uvolnění mitotických chromozomů do okolí. Chromozomy jsou následně barveny různými barvicími technikami. Celosvětově nejrozšířenějším barvením je tzv.

G-pruhování (natrávení trypsinem a obarvení roztokem Giemsa-Romanowski). Na obarvených chromozomech lze pod optickým mikroskopem hodnotit početní a strukturální změny s rozlišením přibližně 5–10 megabází (MB). Ze strukturálních změn jde především o translokace, inverze, delece, amplifikace či inserce. Také do této oblasti zasáhl rychlý rozvoj informačních a komunikačních technologií a umožnil další vývoj cytogenetických technik. Šlo především o digitalizaci nasnímaných obrázků karyotypů a vývoj mnoha metod na pomezí cytogenetiky a molekulární genetiky (molekulární cytogenetické metody) v období kolem roku 2000. V rutinní praxi i výzkumu se dnes významně uplatňují metody založené na fluorescenční in situ hybridizaci (FISH) a celogenomové hybridizaci (CGH) umožňující rozlišení abnormalit o velikosti několika desítek kilobází (kb). Postupně bylo odhaleno mnoho primárních i sekundárních cytogenetických abnormalit a jejich vztah k rizikovitosti onemocnění a jeho prognóze.

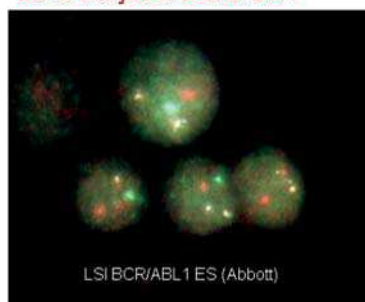
Významné primární cytogenetické abnormality

Mezi významné početní abnormality patologického klonu patří hyperdiploidie (hyperdiploidní karyotyp), která je charakterizována nenáhodným zmožením počtu chromozomů, ve formě trisomií bývají nejčastěji nalézány chromozomy X, 4, 6, 10, 14, 17, 18 a 21 (obvykle celkem více než 50 chromozomů). Tato skupina zahrnuje přibližně jednu čtvrtinu všech dětských pacientů s prekurzorovou B-ALL a koreluje s dobrou prognózou vývoje onemocnění. Vzácnou skupinou (asi 1%) je naopak hypodiploidie (hypodiploidní karyotyp, obvykle je definována jako méně než 44 chromozomů), která však koreluje s prognózou špatnou (zejména pak near-haploidní karyotyp s počtem méně než 30 chromozomů) (1, 6). Nejčastější (přibližně 20%) ze strukturálních abnormalit je translokace mezi p raménkem chromozomu 12 a q raménkem chromozomu 21 – zápis dle cytogenetické nomenklatury je t(12;21)(p13;q22). Jako důsledek této translokace vzniká nový fúzní gen ETV6/RUNX1, dříve označovaný jako TEL/AML1, který vykazuje onkogenní aktivitu. Vlastní translokace t(12;21) je kryptická (na hranici detekčních možností) pro klasickou karyotypovací techniku G-pruhování a byla objevena až s vývojem molekulárně cytogenetické metody FISH. Přítomnost této translokace u pacienta je spojována s dobrou prognózou. Po zavedení vyšetření ETV6/RUNX1 fúze pomocí metody FISH do rutinní praxe cytogenetických laboratoří a s přibývajícím daty

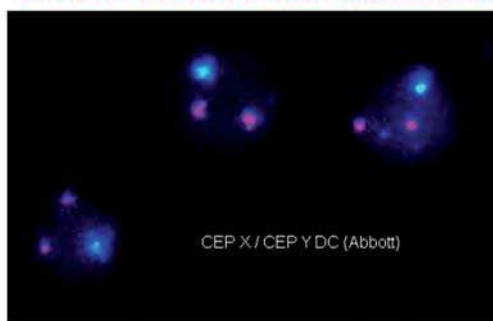
Obrázek 6. Cytogenetické vyšetření – kazuistika 2

FISH:

85 % int. jader BCR/ABL1



75 % jader s nadpočetným chromosomem X



byla identifikována další prognosticky důležitá podskupina – B-ALL s intrachromozomální amplifikací genu RUNX1 označovaná jako iAMP21. Tato vzácnější změna (2%) je naopak spojována se špatnou prognózou. Mezi další prognosticky významné translokace u dětské prekurzorové B-ALL (velmi často u kojenců) patří translokace oblasti q23 na q raménku chromozomu 11 s velkou paletou jiných chromozomů vedoucí k aktivaci onkogenu KMT2A (dříve MLL). Translokace KMT2A genu jsou většinou spojovány se špatnou prognózou. Obecně známá translokace mezi chromozomy 9 a 22 – t (9; 22) (q34; q11), při které vzniká tzv. filadelfský chromozom (Ph chromozom, jde o derivovaný chromozom 22) a s ním spojená nová genová fúze BCR/ABL1, patří mezi vzácnější nálezy u B-ALL (2%). Podstatou patofyziologického procesu u tohoto subtypu ALL je aktivace tyrozinkinázy ABL1. I přes začlenění cílené biologické léčby tyrozinkinázovými inhibitory (nejčastěji používaný je imatinib mesylát) do chemoterapeutických protokolů pro léčbu dětské B-ALL a slibné výsledky velkých studií, je však spojována s vysokou rizikovostí onemocnění. Novými genetickými metodami, mezi něž patří např. celogenomové sekvenování, byla v posledních letech objevena početně poměrně významná skupina označená jako BCR/ABL1-like, u které byl nalezen stejný profil exprese genů jako u klasické BCR/ABL1 pozitivní B-ALL (přes nepřítomnost BCR/ABL1 fúze). Také BCR/ABL1-like onemocnění má vysokou rizikovost (1, 6).

Výsledek ve FN Plzeň

V letech 2004 až 2014 bylo ve FN Plzeň diagnostikováno 53 dětí s ALL. Obrázek 1 představuje hlavní cytogenetické skupiny pro pacienty s B-ALL. Následující dvě vybrané kazuistiky demonstrují případy níže a vysoce rizikových pacientů.

Kazuistika 1

2,5letý chlapec s půl roku trvajícím recidivujícími respiračními infekty si občas stěžoval na bolest dolních končetin a měl zvýšenou tvorbu hematomů. Pro nápadnou bledost byl praktickým lékařem vyšetřen krevní obraz a nalezena anémie s hemoglobinem 65 g/l a trombocytopenie $54 \times 10^9/l$, počet leukocytů byl v normě. Pro podezření z akutní hemoblastozy byl chlapec v dubnu 2010 odeslán na Dětskou kliniku FN Plzeň. Po přijetí na dětskou hematologii v klinickém nálezu dominovala výrazná hepatosplenomegalie, laboratorně v diferenciálním rozpočtu bílých krvinek byly přítomny blasty.

Vyšetřením aspirátu kostní dřeně byla s využitím flowcytometrie a molekulárně genetických metod rychle potvrzena diagnóza akutní lymfoblastické leukemie – euploidní common ALL, ETV6/RUNX1 pozitivní. Cytogenetické vyšetření nám dále přineslo bližší pohled na genetické změny v nádorových buňkách. Na chromozomu 12 účastnicím se translokace t (12; 21) odhalilo metodou G-pruhování ještě současně přítomnou delecí na p raménku chromozomu 12 a subklon s trisomií chromozomu 10. Metodou FISH byl odhalen ještě druhý subklon s duplikací derivovaného chromozomu 21, resp. duplikací ETV6/RUNX1 fúze (obrázky 2, 3 a 4 ukazují výsledky tří různých metod používaných v cytogenetických laboratořích – G – pruhování, FISH a array CGH, z nichž každá si zachovává své výhody a nevýhody). Byla zahájena terapie dle protokolu Interim AIEOP BFM 2 000 prednisonovou předfází, která proběhla bez komplikací, bez projevů syndromu nádorového rozpadu (tumor lysis syndrom). V den +8 byla splněna kritéria pro dobrou léčebnou odpověď na prednison (prednison good respons). 1. část protokolu I. byla komplikována dvěma atakami febrilní neutropenie, kultivačně zjištěn Hemophilus influenzae. Antibiotickou

léčbou došlo rychle k úpravě stavu. Přechodně četnější stolice byly upraveny dietními opatřeními. Útlum parametrů krevního obrazu i koagulopatie doprovázející aplikaci L-asparaginázy (L-ASP) byly řešeny opakovanými substitucemi. V den +33 bylo dosaženo 1. kompletní remise. 2. část protokolu I. proběhla bez větších komplikací a protokol I. byl ukončen v červnu 2010. I další protokolární léčba probíhala bez větších problémů, ve 12. týdnu byl parametr minimální zbytková nemoc (MRD) negativní a léčba byla kompletně ukončena v dubnu 2012. V lednu 2015 je pacient bez klinických a laboratorních známek původního onemocnění ALL.

Kazuistika 2

5letý chlapec s febriliemi, krční lymfadenopatií, nechutenstvím a bolestí při polykání byl v září 2004 vyšetřen na Infekční klinice FN Plzeň. Zde byla zjištěna hepatosplenomegalie a v krevním obraze leukocytoza 127 tis., anémie s hemoglobinem 64 g/l, trombocytopenie $10 \times 10^9/l$. Chlapec byl přeložen na oddělení dětské hematologie FN Plzeň.

Vyšetřením kostní dřeně byla potvrzena euploidní common ALL, BCR/ABL1 pozitivní, na podkladě t (9; 22) (q34;q11), tj. přítomnosti Ph chromozomu. Cytogenetické vyšetření přineslo kromě potvrzení přítomnosti klasické translokace t (9; 22) další informaci o přítomnosti nadpočetného pohlavního chromozomu X v hlavním patologickém klonu (obrázky 5 a 6). Byla zahájena léčba dle protokolu ALL IC-BFM 2002, odpověď na léčbu však byla ve stanovených parametrech nepříznivá, v den +8 špatně léčebně zareagoval na prednison, v den +15 byla pozorována minimální regrese nálezu ve dřeni. Následně byl vzhledem k zjištěné BCR/ABL1 pozitivitě zařazen do studie EsPhALL s Glivecem (imatinib mesylát, inhibitor tyrozinkináz 1. generace) a k pokračování chemoterapie přeložen na Kliniku dětské hematologie a onkologie FN Motol. Chlapec byl dále indikován k nepřibuzenecké transplantaci kostní dřeně. Po ukončení indukčního bloku chlapec dosáhl cytologické remise. Léčba indukční i dalšími tzv. high riskovými bloky byla ale provázena četnými závažnými komplikacemi. Vyšetřením minimální residuální nemoci před alogenní transplantací kostní dřeně byla prokázána pozitivita BCR/ABL1 na hranici citlivosti použité molekulárně genetické metody RT-PCR (citlivost až 1 : 1 000 000), přestavby IGH@ genu zůstaly negativní. Potransplantační průběh byl komplikován infekcemi i rozvinutím reakce štěpu proti hostiteli, postupně došlo k

vývoji molekulárně genetického a poté v březnu 2006 i cytologického relapsu. Pokus o experimentální léčbu dasatinibem (tyrozinkinázový inhibitor 2. generace) byl neúspěšný, chlapec umírá na progresi základního onemocnění v červnu 2006.

Závěr

Cytogenetické vyšetření přináší klinickým lékařům hlavně informace s prognostickým či prediktivním významem. Tvoří důležitý kámen v mozaice managementu současné léčby dětské ALL směřující k cíli medicíny šité na míru konkrétnímu pacientovi. Silnou stránkou cytogenetického vyšetření zůstává kromě schopnosti detekce některých vzácnějších aberací

především možnost komplexního pohledu na karyotyp patologických buněk. Tento pohled nám umožňuje pochopit mechanismus vzniku přítomných aberací a také možnost zachytit diverzitu nádorových buněk ve formě nově vznikajících subklonů.

Vznik článku byl částečně podpořen z grantu č. NT 14227 od Ministerstva zdravotnictví České republiky.

Literatura

1. Inaba H, Greaves M, Mullighan CG. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*, 2013; 381(9881): 1943–1955. doi: 10.1016/S0140-6736(12)62187-4.
2. Pui CH, Mullighan CG, Evans WE, Relling MV. Pediatric acute lymphoblastic leukemia: where are we going and how do we get there? *Blood*, 2012; 120(6): 1165–1174. doi: 10.1182/blood-2012-05-378943.

3. Teachey DT, Hunger SP. Predicting relapse risk in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol.*, 2013; 162(5): 606–620. doi: 10.1111/bjh.12442.

4. Adam Z, Vorlíček J, Vaníček J, a kol. Diagnostické a léčebné postupy u maligních chorob. II. doplněné a aktualizované vydání. Praha: Grada Publishing, 2004: 692.5. WWW stránky České onkologické společnosti České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně: <http://www.linkos.cz/pro-odborniky/>.

6. WWW stránky – Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology: <http://atlasgeneticsoncology.org/index.html>.

Článek přijat redakcí: 18. 11. 2014

Článek přijat k publikaci: 4. 2. 2015

RNDr. Pavel Dvořák

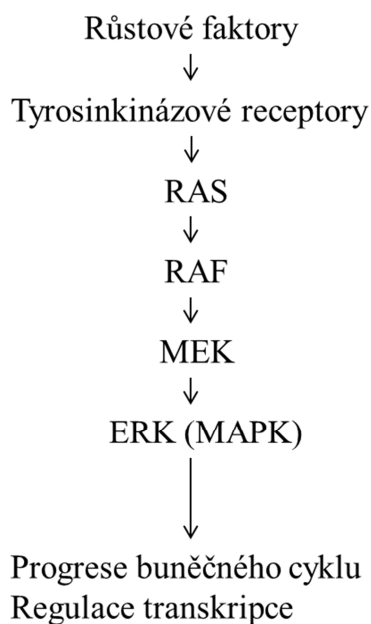
Ústav biologie LF UK v Plzni
Alej Svobody 76, 304 60 Plzeň
Pavel.Dvorak@lfp.cuni.cz

6.5.1 Komentář k příspěvku V

Vznik dětské akutní lymfoblastické leukemie (ALL), maligního onemocnění lymfoblastů, je dle současných poznatků mnohastupňový proces, který začíná obvykle již před narozením jedince. Na vývoj pre-leukemického klonu mají vliv vnější i vnitřní faktory, vrozené genetické dispozice i náhoda. Riziko vzniku ALL u populace dětí do 15 let je přibližně 1:2000. Významným faktorem ovlivňujícím vznik dětské ALL mohou být infekční onemocnění. Více než konkrétní druh mikroorganismu však hraje roli abnormální odpověď imunitního systému na běžnou infekci, která může u vnímavých jedinců spustit řetěz reakcí podporujících ve svém důsledku přežití defektních buněk.

Výrazného pokroku bylo dosaženo v pochopení genetického profilu patologických buněk ALL. Na klinické úrovni je dnes známo mnoho korelací konkrétních genetických změn s mírou agresivity daného subtypu leukemického onemocnění. S tím také souvisí úprava léčebných protokolů na základě stratifikace dle rizika (prognostické a/nebo prediktivní genetické faktory, sledování minimální zbytkové nemoci). Léčba dětské ALL dosahuje v porovnání s jinými maligními chorobami výborné výsledky a 5leté přežití dosahuje 90 %. Problematické však stále zůstávají především dvě skupiny pacientů, pacienti v kojeneckém věku a pacienti s relapsem základního onemocnění.

ALL v relapsu onemocnění je obecně více rezistentní na chemoterapeutickou léčbu než nově diagnostikovaná ALL, což se klinicky projevuje horší odpovědí i na intenzivnější léčebné režimy. Uplatňuje se zde jak primární, tak sekundární rezistence, ale i konstituční polymorfismy v genech, které se účastní při metabolismu léčiv. Na sekundární rezistenci se mohou podílet mutace získané během cytotoxické léčby nebo selekce původně malého subklonu nádorových buněk vykazujících větší rezistenci než hlavní populace přítomná při záchytu. Je známo několik signálních drah, které jsou při relapsu ALL deregulovány a napomáhají vzniku chemorezistence. Nejvíce diskutována je signální dráha RAS (MAPK), která řídí více biologických procesů včetně buněčné proliferace, přežití a migrace (obrázek 3). Mutace v genech *NRAS*, *KRAS*, *BRAF* či *FLT3*, ale i chromosomální translokace, jako např. t(9;22)(q34;q11) spojená se vznikem *BCR-ABL1* fúze, jsou mechanismy, které tuto dráhu u ALL často aktivují.



Obrázek 3 – Schematické znázornění hlavních komponent a biologických funkcí signální dráhy RAS (MAPK) (upraveno dle Knowles a Hurst, 2014, Papatsoris et al., 2007 a Pratilas a Solit, 2010)

Do laboratorní praxe se dostávají mnohé nové genetické techniky v čele s metodami založenými na mikročipech (microarrays) a sekvenování nové generace (next-generation sequencing). Silnou stránkou již plně etablovaného cytogenetického vyšetření zůstává možnost komplexního pohledu na karyotyp patologických buněk. Tento pohled nám umožňuje pochopit mechanismus vzniku přítomných aberací a také možnost zachytit diverzitu nádorových buněk ve formě vznikajících subklonů. V kontextu celé nádorové populace je velikost nově vznikajících subklonů často pod hranicí rozlišitelnosti molekulárně genetickými přístupy. Zviditelnit tento specifický cytogenetický přístup a jeho výhody bylo cílem komentované práce. V příspěvku je zaznamenán celkový přehled cytogenetických výsledků souboru 53 dětských ALL a prezentovány dvě kazuistiky z protichůdných rizikových pólů. Případ pacienta s nízkým rizikem a ETV6-RUNX1 genovou fúzí a případ pacienta s vysokým rizikem a BCR-ABL1 fúzí.

Množství nízkomolekulárních inhibitorů cílících na komponenty RAS (MAPK) dráhy, které se v současnosti testují v klinických studiích, slibuje posun v přežití vysoce-rizikových pacientů s ALL.

7 Hodnocení práce a závěr

V rámci předkládaného výzkumu se podařilo publikovat pět původních prací, na kterých se uchazeč podílel jako hlavní autor. Práce přináší sjednocení dvou metodických přístupů ke studiu vzniku rezistence nádorových buněk na protinádorovou léčbu. Jde za prvé o přístup molekulárně genetického profilování exprese lidských ABC genů u různých typů zhoubných nádorů a za druhé o sledování změn souvisejících s kancerogenezí na úrovni chromosomů za pomoci cytogenetických metod. Zatímco první přístup odhaluje poruchy v signálních drahách vedoucí ke vzniku rezistence na nejnižší biologické úrovni, druhý přístup se těmito pozměněnými mechanismy zabývá na úrovni o řád vyšší.

První prezentovaná práce přinesla poprvé výsledky podporující hypotézu, že lze nalézt vzory exprese ABC genů (ABC expresní profily) společné pro různé typy zhoubných nádorů. Podkladem tohoto výsledku byly bioinformatické analýzy dat ze společné databáze vzorků tří typů nádorů - nádorů prsu, kolorekta a pankreatu. U některých definovaných obecných ABC expresních profilů byly nalezeny statisticky významné vztahy k rozsahu postižení regionálních lymfatických uzlin, rozsahu nádoru, histologickému stupni diferenciaci a klinickému stadiu. Tyto výsledky by mohly souviset se známými, ale i dosud neznámými funkcemi ABC proteinů. V další části práce byla provedena analýza nejčastějších deregulovaných ABC genů. Geny *ABCC7*, *ABCA3*, *ABCA8*, *ABCA12* a *ABCC8* byly vyzdviženy jako geny pravděpodobně hrající klíčovou roli na poli procesů ovlivňovaných ABC geny v nádorových buňkách. Velmi zajímavý je výskyt genu *ABCC7* (*CFTR*) v tomto seznamu na prvním místě. V práci bylo naznačeno, že tyto obecné expresní profily ABC genů by mohly vytvářet nový charakteristický rys kancerogeneze.

Druhá prezentovaná práce ukázala detailnější cytogenetickou charakteristiku skupiny AML (akutní myeloidní leukemie) pacientů s velmi nepříznivou prognózou a předpokládanou rezistencí na podávanou chemoterapii. Jednalo se o pacienty, kteří ani po dvou chemoterapeutických pokusech o dosažení remise onemocnění nedosáhli kompletní cytogenetické remise. Zajímavé bylo pozorování, že u několika pacientů došlo po chemoterapeutické léčbě k vymizení klonální evolucí odvozenějších subklonů (s vyšším počtem cytogenetických změn), zatímco méně odvozené klony dále proliferovaly a vykazovaly vyšší stupeň rezistence. I pro pacienty s takto nepříznivou prognózou bylo

demonstrováno, že allogenní transplantace kostní dřeně představuje kurativní léčbu. Důležitým faktem však také bylo, že 67 % pacientů, kteří zemřeli po absolvované transplantaci kostní dřeně, zemřeli na jiné příčiny než je progresse AML. Jednou z možných cest k dalšímu zlepšení přežití vysoce rizikových pacientů s AML by mohlo být zaměření se na zdravotní problémy nesouvisející přímo s progresí základního maligního onemocnění.

Akutní leukemie na podkladě myelodysplastických syndromů (MDS) vykazují obecně horší odpověď na standardně podávanou léčbu a vyšší stupeň rezistence v porovnání s akutními leukemiemi bez předchozí historie MDS (s výjimkou akutních leukemií spojených s předchozí protinádorovou léčbou). **Třetí práce** se zaměřila na vzácnou cytogenetickou změnu vyskytující se rekurentně u primárních MDS a čekající dosud na bližší charakterizaci jak z laboratorního, tak z klinického pohledu. Pacienti s translokací $t(2;11)(p21;q23)$ bez účasti *MLL* genu se vyznačovali mladším věkem (průměr 52 let), výraznou predominancí mužů, markantní dysplasií v megakaryopoéze, častým spojením s další změnou – delecí 5q a dobrou prognózou. Práce přinesla zjištění vyznívající ve prospěch vyčlenění $t(2;11)(p21;q23)$ bez účasti *MLL* genu jako samostatné entity v rámci primárních MDS.

Porozumění mechanismům patogeneze chronické myeloidní leukemie (CML) na molekulární i buněčné úrovni a zavedení cílené terapie s využitím inhibitorů tyrozinkináz (TKI) může být považováno za učebnicový prototyp boje proti nádorovému onemocnění. TKI několika generací standardně používané v 1. linii léčby CML účinně blokují konstitutivně aktivovaný fúzní protein BCR-ABL1 a jeho onkogenní funkce. Mezinárodní doporučení pro léčbu CML shodně doporučují, aby pacienti optimálně reagující na primární léčbu TKI v léčbě bez přestání pokračovali se standardním dávkováním stále dál. Přesto v klinické praxi existují situace, kdy k přerušení léčby TKI dochází. Ať už se jedná o případy vzniku sekundární rezistence nebo netolerovatelné toxické vedlejší účinky TKI léčby, nebo o neochotu nemocného plně spolupracovat při léčbě (compliance), těhotenství či subjektivní přání pacienta.

Klinické studie zabývající se kontrolovaným vysazením léčby TKI u pacientů s definovanou hlubokou molekulární odpovědí již v posledních letech probíhají a jsou publikovány první spíše nadějně výsledky. Otázkou však stále zůstává, zda přerušení TKI

léčby nemůže zvýšit výskyt případů rezistence na tuto léčbu především tím, že umožní větší proliferaci nádorových buněk, a tím i vznik větší heterogenity mezi nimi. Vzhledem k tomu, že hlavním mechanismem vzniku sekundární rezistence na TKI jsou bodové mutace v BCR-ABL1 tyrozinkinázové doméně, je to teoreticky pravděpodobné. Zásadní je také nalezení prediktivního faktoru spojeného s rychlejší rekurencí onemocnění po kontrolovaném vysazení TKI léčby, který se zatím nalézt nepodařilo. Také ochota optimálně odpovídajících pacientů k účasti na studiích s vysazením léčby je menší a pochopitelná. **Čtvrtý příspěvek** ve formě review přinesl komplexní pohled na problematiku kontrolovaného přerušování léčby TKI a diskuzi nad dosud otevřenými otázkami z pohledu laboratorní a klinické praxe.

Akutní lymfoblastická leukemie (ALL) v relapsu onemocnění je obecně více rezistentní na chemoterapeutickou léčbu než nově diagnostikovaná ALL, což se klinicky projevuje horší odpovědí i na intenzivnější léčebné režimy. Uplatňuje se zde jak primární, tak sekundární rezistence, ale i konstituční polymorfismy v genech, které se účastní při metabolismu léčiv. Na sekundární rezistenci se mohou podílet mutace získané během cytotoxické léčby nebo selekce původně malého subklonu nádorových buněk vykazujících větší rezistenci než hlavní populace přítomná při záchytu. Je známo několik signálních drah, které jsou při relapsu ALL deregulovány a napomáhají vzniku chemorezistence. Nejvíce diskutována je signální dráha RAS (MAPK), která řídí více biologických procesů včetně buněčné proliferace, přežití a migrace. Mutace v genech *NRAS*, *KRAS*, *BRAF* či *FLT3*, ale i chromosomální translokace, jako např. t(9;22)(q34;q11) spojená se vznikem *BCR-ABL1* fúze, jsou mechanismy, které tuto dráhu u ALL často aktivují.

Do laboratorní praxe se dostávají mnohé nové genetické techniky včele s metodami založenými na mikročipech a sekvenování nové generace. Silnou stránkou již plně etablovaného cytogenetického vyšetření zůstává možnost komplexního pohledu na karyotyp patologických buněk. Tento pohled nám umožňuje pochopit mechanismus vzniku přítomných aberací a také možnost zachytit diverzitu nádorových buněk ve formě vznikajících subklonů. V kontextu celé nádorové populace je velikost nově vznikajících subklonů často pod hranicí rozlišitelnosti molekulárně genetickými přístupy. Zviditelnit tento specifický cytogenetický přístup a jeho výhody bylo cílem **páté komentované práce**. V příspěvku je zaznamenán celkový přehled cytogenetických výsledků souboru dětských ALL a prezentovány dvě kazuistiky z protichůdných rizikových pólů. Případ pacienta

s nízkým rizikem a ETV6-RUNX1 genovou fúzí a případ pacienta s vysokým rizikem a BCR-ABL1 fúzí.

Předkládaná dizertační práce se zaměřila na studium nefyziologické aktivace úzce spojených signálních drah PI3K/AKT a RAS (MAPK), která je patologickým mechanismem objevujícím se jak u solidních nádorů, tak u hematologických malignit. Množství nízkomolekulárních inhibitorů cílících na komponenty obou signálních drah, které se v současnosti testují v klinických studiích, slibuje posun v přežití vysoce rizikových pacientů.

7.1 Shrnutí dosažených výsledků

- I. Byly předloženy argumenty ve prospěch hypotézy o existenci genových expresních profilů ABC genů, které jsou společné více typům zhoubných nádorů. Výsledky předkládané práce naznačily, že tyto ABC expresní profily by mohly nejen představovat obecnější rys kancerogeneze, ale být spojeny i s prognostickým či prediktivním významem.
- II. Na úrovni cytogenetických abnormalit byla provedena charakterizace skupiny velice rizikových pacientů s akutní myeloidní leukemií, kteří po dvou chemoterapeutických pokusech o dosažení remise onemocnění nedosáhli kompletní cytogenetické remise. Byl potvrzen kurativní potenciál allogenní transplantace kostní dřeně i pro tyto vysoce rizikové pacienty a doporučeno cíleně se zaměřit na další zdravotní problémy pacientů, které nesouvisejí přímo se základním maligním onemocněním.
- III. S podporou předložených výsledků lze doporučit vyčlenění skupiny pacientů s primárními myelodysplastickými syndromy a translokací t(2;11)(p21;q23) bez účasti *MLL* genu jako samostatné entity spojené pravděpodobně s dobrou prognózou vývoje pre-maligního onemocnění.
- IV. Při kontrolovaném přerušení cílené léčby tyrozinkinázovými inhibitory u pacientů s chronickou myeloidní leukemií je potřeba považovat proliferaci maligního klonu

spojenou se vznikem geneticky heterogenních subklonů za potenciální riziko ve vztahu ke vzniku rezistence. Snížení tohoto rizika by přineslo nalezení specifického biomarkeru, který by předpovídal úspěšnost vysazení léčby.

- V. Bylo prezentováno shrnutí cytogenetických výsledků souboru dětských pacientů s akutní lymfoblastickou leukemií a vyzdvižen cytogenetický přístup umožňující pochopit mechanismus vzniku patologických změn v genomu nádorových buněk a současně zachytit heterogenitu subklonů nádorové populace.

Na závěr lze konstatovat, že předkládaná dizertační práce zkoumala genetické pozadí mechanismů souvisejících se vznikem rezistence nádorových buněk na chemoterapeutickou léčbu na dvou různých buněčných úrovních – úrovni nukleových kyselin a úrovni chromosomů. Celkovou snahou práce bylo představit komplexnost problematiky rezistence na protinádorová léčiva a přinést nové poznatky, které by především mohly napomoci zlepšit léčbu onkologických pacientů. Předkládané výsledky také ukazují nové směry, na které by se mohl zaměřit další výzkum.

8 Seznam použitých literárních zdrojů

AYE, Irving L.M.H., Ambika T. SINGH a Jeffrey A. KEELAN, 2009. Transport of lipids by ABC proteins: Interactions and implications for cellular toxicity, viability and function. *Chemico-Biological Interactions* [online]. **180**(3), 327-339 [cit. 2017-01-24]. DOI: 10.1016/j.cbi.2009.04.012. ISSN 00092797. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009279709001665>

BAKHOUM, Samuel F. a Duane A. COMPTON, 2012. Chromosomal instability and cancer: a complex relationship with therapeutic potential. *Journal of Clinical Investigation* [online]. **122**(4), 1138-1143 [cit. 2017-01-30]. DOI: 10.1172/JCI59954. ISSN 00219738. Dostupné z: <http://www.jci.org/articles/view/59954>

BARBET, Romain, Isabelle PEIFFER, James R.A. HUTCHINS, Antoinette HATZFELD, Edith GARRIDO a Jacques A. HATZFELD, 2012. Expression of the 49 human ATP binding cassette (ABC) genes in pluripotent embryonic stem cells and in early- and late-stage multipotent mesenchymal stem cells. *Cell Cycle* [online]. **11**(8), 1611-1620 [cit. 2017-01-19]. DOI: 10.4161/cc.20023. ISSN 15384101. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/cc.20023>

BLEAU, Anne-Marie, Dolores HAMBARDZUMYAN, Tatsuya OZAWA, Elena I. FOMCHENKO, Jason T. HUSE, Cameron W. BRENNAN a Eric C. HOLLAND, 2009. PTEN/PI3K/Akt Pathway Regulates the Side Population Phenotype and ABCG2 Activity in Glioma Tumor Stem-like Cells. *Cell Stem Cell* [online]. **4**(3), 226-235 [cit. 2017-02-08]. DOI: 10.1016/j.stem.2009.01.007. ISSN 19345909. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1934590909000101>

BUSTIN, S. A., V. BENES, J. A. GARSON et al., 2009. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry* [online]. **55**(4), 611-622 [cit. 2017-02-01]. DOI: 10.1373/clinchem.2008.112797. ISSN 00099147. Dostupné z: <http://www.clinchem.org/cgi/doi/10.1373/clinchem.2008.112797>

COJOC, Monica, Katrin MÄBERT, Michael H. MUDERS a Anna DUBROVSKA, 2015. A role for cancer stem cells in therapy resistance: Cellular and molecular mechanisms. *Seminars in Cancer Biology* [online]. **31**, 16-27 [cit. 2017-01-18]. DOI: 10.1016/j.semcancer.2014.06.004. ISSN 1044579x. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1044579X14000790>

DANIELSEN, Stine Aske, Peter Wold EIDE, Arild NESBAKKEN, Tormod GUREN, Edward LEITHE a Ragnhild A. LOTHE, 2015. Portrait of the PI3K/AKT pathway in colorectal cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* [online]. **1855**(1), 104-121 [cit. 2017-02-09]. DOI: 10.1016/j.bbcan.2014.09.008. ISSN 0304419x. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304419X14000961>

DEAN, M. et al., 2001. The Human ATP-Binding Cassette (ABC) Transporter Superfamily. *Genome Research* [online]. vol. 11, no. 7, pp. 1156-1166. DOI: 10.1101/gr-1649r

DEAN, Michael a Tarmo ANNILO, 2005. EVOLUTION OF THE ATP-BINDING CASSETTE (ABC) TRANSPORTER SUPERFAMILY IN VERTEBRATES. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* [online]. vol. 6, no. 1, pp. 123-142. DOI: 10.1146/annurev.genom.6.080604.162122

DENG, Jiexin, Jie SHAO, John S. MARKOWITZ a Guohua AN, 2014. ABC Transporters in Multi-Drug Resistance and ADME-Tox of Small Molecule Tyrosine Kinase Inhibitors. *Pharmaceutical Research* [online]. **31**(9), 2237-2255 [cit. 2017-01-25]. DOI: 10.1007/s11095-014-1389-0. ISSN 07248741. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11095-014-1389-0>

DI, Chong a Yaodong ZHAO, 2014. Multiple drug resistance due to resistance to stem cells and stem cell treatment progress in cancer (Review). *Experimental and Therapeutic Medicine* [online]. **9**: 289-293 [cit. 2015-09-05]. DOI: 10.3892/etm.2014.2141. ISSN 17920981. Dostupné z: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/etm.2014.2141>

DITTRICH, Christian, Michael A. FRIDRIK, Robert KOENIGSBERG, Chooi LEE, Rainer-Georg GOELDNER, James HILBERT a Richard GREIL, 2015. A phase 1 dose escalation study of BI 831266, an inhibitor of Aurora kinase B, in patients with advanced solid tumors. *Investigational New Drugs* [online]. **33**(2), 409-422 [cit. 2017-01-31]. DOI: 10.1007/s10637-014-0201-7. ISSN 01676997. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10637-014-0201-7>

FALASCA, Marco a Kenneth J. LINTON, 2012. Investigational ABC transporter inhibitors. *Expert Opinion on Investigational Drugs* [online]. **21**(5), 657-666 [cit. 2017-01-19]. DOI: 10.1517/13543784.2012.679339. ISSN 13543784. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/13543784.2012.679339>

GERLINGER, M a C SWANTON, 2010. How Darwinian models inform therapeutic failure initiated by clonal heterogeneity in cancer medicine. *British Journal of Cancer* [online]. vol. 103, no. 8, pp. 1139-1143 [accessed. 30 . January 2017]. doi:10.1038/sj.bjc.6605912

GILLET, Jean-Pierre a Michael M. GOTTESMAN, 2012. Overcoming multidrug resistance in cancer: 35 years after the discovery of ABCB1. *Drug Resistance Updates* [online]. **15**(1-2), 2-4 [cit. 2017-01-17]. DOI: 10.1016/j.drug.2012.03.001. ISSN 13687646. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1368764612000131>

HANAHAN, Douglas a Robert A. WEINBERG, 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* [online]. **144**(5), 646-674 [cit. 2017-01-30]. DOI: 10.1016/j.cell.2011.02.013. ISSN 00928674. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867411001279>

HENNESSY, Bryan T., Debra L. SMITH, Prahlad T. RAM, Yiling LU a Gordon B. MILLS, 2005. Exploiting the PI3K/AKT Pathway for Cancer Drug Discovery. *Nature Reviews Drug Discovery* [online]. vol. 4, no. 12, pp. 988-1004 [accessed. 9 . February 2017]. doi:10.1038/nrd1902

HOLČÁKOVÁ, J., M. NEKULOVÁ, P. ORZOL a B. VOJTĚŠEK, 2014. Mechanizmy lékové rezistence a nádorové kmenové buňky. *Klinická onkologie*. **27**(Suppl 1): S34-S41. ISSN 0862-495X.

CHEN, Zhaolin, Tianlu SHI, Lei ZHANG et al., 2016. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family in multidrug resistance: A review of the past decade. *Cancer Letters* [online]. **370**(1), 153-164 [cit. 2017-01-31]. DOI: 10.1016/j.canlet.2015.10.010. ISSN 03043835. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304383515006278>

CHEUNG, Chun Hei Antonio, Sailu SARVAGALLA, Jane Ying-Chieh LEE, Yi-Chun HUANG a Mohane Selvaraj COUMAR, 2014. Aurora kinase inhibitor patents and agents in clinical testing: an update (2011 – 2013). *Expert Opinion on Therapeutic Patents* [online]. **24**(9), 1021-1038 [cit. 2017-01-31]. DOI: 10.1517/13543776.2014.931374. ISSN 13543776. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/13543776.2014.931374>

KACHALAKI, Saeed, Mina EBRAHIMI, Leila MOHAMED KHOSROSHAHI, Sina MOHAMMADINEJAD a Behzad BARADARAN, 2016. Cancer chemoresistance; biochemical and molecular aspects: a brief overview. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. **89**, 20-30 [cit. 2017-01-17]. DOI: 10.1016/j.ejps.2016.03.025. ISSN 09280987. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928098716301014>

KATHAWALA, Rishil J., Pranav GUPTA, Charles R. ASHBY a Zhe-Sheng CHEN, 2015. The modulation of ABC transporter-mediated multidrug resistance in cancer: A review of the past decade. *Drug Resistance Updates* [online]. **18**, 1-17 [cit. 2017-01-19]. DOI: 10.1016/j.drug.2014.11.002. ISSN 13687646. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1368764614000788>

KLENER, Pavel a Pavel KLENER, jr., 2010. *Nová protinádorová léčiva a léčebné strategie v onkologii*. Praha: Grada. ISBN 9788024728087.

KLENER, Pavel, jr. a Pavel KLENER, 2013. *Principy systémové protinádorové léčby*. Praha: Grada. ISBN 9788024741710.

KNOWLES, Margaret A. a Carolyn D. HURST, 2014. Molecular biology of bladder cancer: new insights into pathogenesis and clinical diversity. *Nature Reviews Cancer* [online]. vol. 15, no. 1, pp. 25-41. doi:10.1038/nrc3817

KUFE, Donald W., James F. HOLLAND, Emil FREI et al., 2003. *Cancer medicine* 6. 6th ed. Lewiston, NY: BC Decker. ISBN 1550092138.

KUNJACHAN, Sijumon, Błażej RYCHLIK, Gert STORM, Fabian KIESSLING a Twan LAMMERS, 2013. Multidrug resistance: Physiological principles and nanomedical solutions. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. **65**(13-14), 1852-1865 [cit. 2017-01-25]. DOI: 10.1016/j.addr.2013.09.018. ISSN 0169409x. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X13002317>

LEE, A. J. X., D. ENDESFELDER, A. J. ROWAN et al., 2011. Chromosomal Instability Confers Intrinsic Multidrug Resistance. *Cancer Research* [online]. **71**(5), 1858-1870 [cit. 2017-01-30]. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-3604. ISSN 00085472. Dostupné z: <http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/0008-5472.CAN-10-3604>

LI, Guang, Peng SHI a Yiquan WANG, 2007. Evolutionary dynamics of the ABCA chromosome 17q24 cluster genes in vertebrates. *Genomics* [online]. **89**(3), 385-391 [cit. 2017-01-19]. DOI: 10.1016/j.ygeno.2006.07.015. ISSN 08887543. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0888754306002163>

MAREK, Josef et al., 2010. *Farmakoterapie vnitřních nemocí*. 4., zcela přeprac. a dopl. vyd. Praha: Grada. ISBN 9788024726397.

MCGRANAHAN, Nicholas, Rebecca A BURRELL, David ENDESFELDER, Marco R NOVELLI a Charles SWANTON, 2012. Cancer chromosomal instability: therapeutic and diagnostic challenges. *EMBO reports* [online]. **13**(6), 528-538 [cit. 2017-01-17]. DOI: 10.1038/embor.2012.61. ISSN 1469221x. Dostupné z: <http://embor.embopress.org/cgi/doi/10.1038/embor.2012.61>

MICHALOVÁ, Kyra, 1999. *Úvod do lidské cytogenetiky*. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví. ISBN 8070132817.

NEGRINI, Simona, Vassilis G. GORGOULIS a Thanos D. HALAZONETIS, 2010. Genomic instability — an evolving hallmark of cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* [online]. vol. 11, no. 3, pp. 220-228 [accessed. 30 . January 2017]. doi:10.1038/nrm2858

PAPATSORIS, A. G., M. V. KARAMOUZIS a A. G. PAPAVALASSILIOU, 2007. The power and promise of "rewiring" the mitogen-activated protein kinase network in prostate cancer therapeutics. *Molecular Cancer Therapeutics* [online]. **6**(3), 811-819 [cit. 2017-02-09]. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-06-0610. ISSN 15357163. Dostupné z: <http://mct.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1535-7163.MCT-06-0610>

PEITZSCH, Claudia, Ina KURTH, Leoni KUNZ-SCHUGHART, Michael BAUMANN a Anna DUBROVSKA, 2013. Discovery of the cancer stem cell related determinants of radioresistance. *Radiotherapy and Oncology* [online]. **108**(3), 378-387 [cit. 2017-02-08]. DOI: 10.1016/j.radonc.2013.06.003. ISSN 01678140. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167814013002788>

PRATILAS, C. A. a D. B. SOLIT, 2010. Targeting the Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway: Physiological Feedback and Drug Response. *Clinical Cancer Research* [online]. **16**(13), 3329-3334 [cit. 2017-02-09]. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-09-3064. ISSN 10780432. Dostupné z: <http://clincancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1078-0432.CCR-09-3064>

SCHMITTGEN, Thomas D a Kenneth J LIVAK, 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols* [online]. **3**(6), 1101-1108 [cit. 2017-02-02]. DOI: 10.1038/nprot.2008.73. ISSN 17542189. Dostupné z: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nprot.2008.73>

THEODOULOU, F. L. a I. D. KERR, 2015. ABC transporter research: going strong 40 years on. *Biochemical Society Transactions* [online]. **43**(5), 1033-1040 [cit. 2017-01-25]. DOI: 10.1042/BST20150139. ISSN 03005127. Dostupné z: <http://biochemsoctrans.org/cgi/doi/10.1042/BST20150139>

WU, Qiong, Zhiping YANG, Yongzhan NIE, Yongquan SHI a Daiming FAN, 2014. Multi-drug resistance in cancer chemotherapeutics: Mechanisms and lab approaches. *Cancer Letters* [online]. **347**(2), 159-166 [cit. 2017-01-18]. DOI: 10.1016/j.canlet.2014.03.013. ISSN 03043835. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030438351400158X>

ZHANG, Jian-Ting, 2007. Use of arrays to investigate the contribution of ATP-binding cassette transporters to drug resistance in cancer chemotherapy and prediction of chemosensitivity. *Cell Research* [online]. **17**(4), 311-323 [cit. 2017-01-24]. DOI: 10.1038/cr.2007.15. ISSN 10010602. Dostupné z: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/cr.2007.15>

9 Seznam publikací uchazeče zahrnutých do výsledků dizertační práce

Řazeno chronologicky.

DVORAK, Pavel, Martin PESTA a Pavel SOUCEK, 2017. ABC gene expression profiles have clinical importance and possibly create new hallmark of cancer. *Tumor Biology* [online]. SAGE Publishing [in press]. Dostupné z: <http://journals.sagepub.com/loi/tuba> [IF₍₂₀₁₅₎ 2,926]

DVORAK, Pavel, Daniel LYSAK a Samuel VOKURKA, 2015. Discontinuation of tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia patients – worldwide battlefield. *Neoplasma : journal of experimental and clinical oncology*. Bratislava: AEPRESS, **62**(2), 167-171. ISSN 00282685. [IF₍₂₀₁₅₎ 1,961]

DVORAK, Pavel, Daniel LYSAK, Samuel VOKURKA, Michal KARAS a Ivan SUBRT, 2015. Allogeneic stem cell transplantation can improve outcome of AML patients without complete cytogenetic response after induction and consolidation treatment. *Neoplasma : journal of experimental and clinical oncology*. Bratislava: AEPRESS, **62**(1), 140-145. ISSN 00282685. [IF₍₂₀₁₅₎ 1,961]

DVOŘÁK, Pavel, Petra VOHRADSKÁ, Tomáš VOTAVA, Lenka DOLEŽALOVÁ, Zdeňka ČERNÁ a Ivan ŠUBRT, 2015. Postavení cytogenetického vyšetření v současném managementu léčby dětské akutní lymfoblastické leukemie. *Onkologie*. Solen, **9**(1), 38-42. ISSN 1802-4475.

DVORAK, Pavel, Daniel LYSAK, Samuel VOKURKA, Kyra MICHALOVA, Iveta SAROVA, Anna JONASOVA, Martina HRUBA, Anna RYKOVSKA a Ivan SUBRT, 2014. The translocation t(2;11)(p21;q23) without MLL gene rearrangement—a possible marker of good prognosis in myelodysplastic syndrome patients. *Hematological Oncology*. Wiley, **32**(2), 82-86. ISSN 1099-1069. [IF₍₂₀₁₅₎ 3,494]

10 Seznam dalších publikovaných prací, na kterých se uchazeč podílel

Řazeno chronologicky.

MÜLLEROVÁ, D., M. PEŠTA, M. ČEDÍKOVÁ, J. DVOŘÁKOVÁ, V. KULDA, K. SRBECKÁ, L. MÜLLER, **P. DVOŘÁK**, M. KRIPNEROVÁ, M. KRÁLÍČKOVÁ, V. BABUŠKA, J. KUNCOVÁ, 2016. DDE downregulates PLIN2 expression during differentiation of mesenchymal stem cells into adipocytes in lipid-enriched medium. *Journal of Applied Biomedicine* [online]. **14**(2), 113-117 [cit. 2017-02-04]. DOI: 10.1016/j.jab.2016.01.002. ISSN 1214021x. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1214021X15300491> [IF₍₂₀₁₅₎ 1,509]

HATINA, J., M. KRIPNEROVÁ, J. TUKOVÁ, J. ŠRÁMEK, **P. DVOŘÁK**, M. PEŠTA, J. DOBRÁ, V. BABUŠKA, J. RACEK, M. SOBOL, A. PHILIMONENKO, P. HOZÁK, Z. CZUBA, W. A. SCHULZ, C. STRELL, S. GRIMM, S. JENNEK a K. H. FRIEDRICH, 2015. Tumor-Stroma-Interaktionen im Harnblasenkarzinom. *Der Urologe* [online]. **54**(4), 516-525 [cit. 2017-02-04]. DOI: 10.1007/s00120-014-3754-3. ISSN 03402592. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00120-014-3754-3> [IF₍₂₀₁₅₎ 0,331]

KRIPNEROVÁ, Michaela, **Pavel DVOŘÁK**, Martin PEŠTA, Jitka KUNCOVÁ, Tomáš VLAS, Martin LEBA, Luboš HOLUBEC a Jiří HATINA, 2015. Odvození a charakterizace buněčného modelu multilékové rezistence uroteliálního karcinomu. *Česká urologie*. Česká lékařská společnost J. E. Purkyně, **19**(4), 281–290. ISSN 2336-5692.

DVOŘÁK, Pavel, Daniel LYSÁK, Samuel VOKURKA a Věra VOZOBULOVÁ, 2014. Koncept přerušení biologické léčby tyrozinkinázovými inhibitory u chronické myeloidní leukemie. *Onkologie*. Solen, **8**(3), 129-130. ISSN 1802-4475.

NEUWIRTOVÁ, R., Z. ZEMANOVÁ, J. BŘEZINOVÁ, M. BELIČKOVÁ, **P. DVOŘÁK**, A. OLTOVÁ, A. JONÁŠOVÁ, J. ČERMÁK, D. ŠPONEROVÁ, J. ULLRICHOVÁ, Z. MAŠKOVÁ, L. ČERVÍNEK, Y. SMĚLÍKOVÁ, V. VOZOBULOVÁ, E. POLONYOVÁ, M. SVOBODA a K. MICHALOVÁ, 2014. Jsme oprávněni řadit nemocné s dvěma samostatnými buněčnými klony a to s delecí 5q a s trizomií 8 jako podskupinu myelodysplastického syndromu typu 5q- syndromu? *Transfúze a hematologie dnes*. Česká lékařská společnost J. E. Purkyně, **20**(1), 25-31. ISSN 1213-5763.

JUNGOVÁ, A., M. HOLUBOVÁ, S. VOKURKA, D. LYSÁK, P. JINDRA a **P. DVOŘÁK**, 2014. Hodnocení exprese antigenu CD45 u pacientů s mnohočetným myelomem a jeho vliv na dobu do první progresse nebo relapsu. *Transfúze a hematologie dnes*. Česká lékařská společnost J. E. Purkyně, **20**(2), 53-57. ISSN 1213-5763.

HRUBA, Martina, **Pavel DVORAK**, Lucie WEBEROVA a Ivan SUBRT, 2012. Independent coexistence of clones with 13q14 deletion at reciprocal translocation breakpoint and 13q14 interstitial deletion in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia & Lymphoma*. Informa Healthcare, 53, 2054-2062. ISSN 1042-8194. [IF₍₂₀₁₂₎ 2,3]

VOKURKA, S., V. KOZA, D. LYSÁK, M. KARAS, **P. DVORAK**, P. JINDRA, M. HRABETOVA a V. VOZOBULOVA, 2010. Successful peripheral blood stem cells collection in imatinib pretreated and nilotinib-treated chronic myeloid leukemia patient. *Journal of Oncology*. Hindawi Publishing Corporation, 2010, 1-3. ISSN 1687-8469.

DVORAK, Pavel, Martina HRUBA a Ivan SUBRT, 2009. Development of acute myeloid leukemia associated with Ph-negative clone with inv(3)(q21q26) during imatinib therapy for chronic myeloid leukemia. *Leukemia Research*. Elsevier, 33, 860-861. ISSN 0145-2126. [IF₍₂₀₀₉₎ 2,4]

11 Seznam nejvýznamnějších konferenčních příspěvků

Řazeno chronologicky.

Pavel Dvorak, Pavel Soucek. General network of ABC genes correlations. *6th Special Meeting, ATP-Binding Cassette (ABC) Proteins: From Multidrug Resistance to Genetic Diseases*, March 5-11, 2016, Innsbruck, Austria.

Pavel Soucek, **Pavel Dvorak**, Viktor Hlavac, Radka Vaclavikova, Beatrice Mohelnikova-Duchonova. Importance of transcriptomic profile of ABC transporters for prognosis of human cancer. *6th Special Meeting, ATP-Binding Cassette (ABC) Proteins: From Multidrug Resistance to Genetic Diseases*, March 5-11, 2016, Innsbruck, Austria.

Dana Müllerová, Martin Pešta, Jana Dvořáková, **Pavel Dvořák**, Miroslava Čedíková, Vlastimil Kulda, Michaela Kripnerová, Václav Babuška, Milena Králíčková. Effect of the Exposition of Persistent Organic Pollutants on in vitro Model of Adipocytes in Relation to a Higher Risk of Diabetes Mellitus type II. *22nd European Congress on Obesity (ECO 2015)*, May 6-9, 2015, Prague, Czech Republic.

Pavel Dvorak, Daniel Lysak, Samuel Vokurka, Kyra Michalova, Iveta Sarova, Anna Jonasova, Martina Hrubá, Anna Rykovska, Ivan Subrt. The t(2;11)(p21;q23) without MLL rearrangement - a possible marker of good prognosis in MDS patients. *European Human Genetics Conference 2013*, June 8-11, 2013, Paris, France.

Martina Hrubá, **Pavel Dvorak**, Anna Rykovska, Ivan Subrt. Multiclinality of 13q14 deletion in chronic lymphocytic leukemia. *9th European Cytogenetics Conference*, 29 June – 2 July, 2013, Dublin, Ireland.