

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

LÉKAŘSKÁ FAKULTA V PLZNI



Autoreferát dizertační práce

**Studium signálních drah modulujících mnohočetnou lékovou  
rezistenci**

The study of signaling pathways that modulate multidrug resistance

**RNDr. Pavel Dvořák**

PLZEŇ 2017

Dizertační práce byla vypracována v rámci prezenčního doktorského studijního programu **Anatomie, histologie a embryologie (P5112)** na **Ústavu histologie a embryologie LF UK v Plzni**.

- Uchazeč:** RNDr. Pavel Dvořák, Ústav biologie LF UK v Plzni
- Předseda oborové rady:** prof. MUDr. Milena Králíčková, Ph.D., Ústav histologie a embryologie LF UK v Plzni
- Školitel:** doc. RNDr. Pavel Souček, CSc., Státní zdravotní ústav v Praze, Biomedicínské centrum LF UK v Plzni
- Konzultantka:** prof. MUDr. Milena Králíčková, Ph.D., Ústav histologie a embryologie LF UK v Plzni
- Oponenti:** RNDr. Veronika Benson, Ph.D., Mikrobiologický ústav AV ČR  
doc. MUDr. Ondřej Daum, Ph.D., Šiklův ústav patologie LF UK a FN Plzeň

Autoreferát byl rozeslán dne:

Obhajoba dizertační práce před komisí pro obhajobu dizertačních prací studijního programu Anatomie, histologie a embryologie (P5112) se koná:

Dne \_\_\_\_\_ v \_\_\_\_\_ hodin

Místo obhajoby:

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.

S dizertační prací je možno se seznámit na děkanátě Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Plzni, Husova 3, Plzeň.

## Obsah

1	Abstrakt .....	5
2	Summary.....	6
3	Úvod .....	7
3.1	Rozšiřující se možnosti léčby nádorových onemocnění.....	7
3.2	Rezistence nádorových buněk na chemoterapii.....	7
3.2.1	Vznik nádorové rezistence.....	7
3.2.2	Nádorové kmenové buňky.....	8
4	ABC transportní proteiny a jejich role při vzniku MDR.....	10
4.1	Základní struktura ABC proteinů .....	10
4.2	ABC geny .....	10
4.3	Funkce ABC proteinů .....	10
4.4	Možné použití inhibitorů ABC transportérů v klinické praxi.....	11
5	Chromosomální abnormality a mnohočetná léková rezistence .....	12
5.1	Genomová a chromosomová nestabilita .....	12
5.2	Mechanismy podléjící se na chromosomové nestabilitě.....	12
5.3	Chromosomová nestabilita jako terapeutický cíl.....	12
6	Cíle práce.....	14
7	Materiál a použité metody .....	15
7.1	Analyzované vzorky .....	15
7.2	Kvantitativní PCR v reálném čase .....	15
7.3	Analýza karyotypu nádorových buněk a fluorescenční in situ hybridizace .....	15
7.4	Statistické a bioinformatické vyhodnocení získaných dat.....	16
8	Výsledky výzkumu .....	17
8.1	Příspěvek I .....	17
8.1.1	Komentář k příspěvku I.....	17

8.2	Příspěvek II .....	18
8.2.1	Komentář k příspěvku II.....	19
8.3	Příspěvek III.....	20
8.3.1	Komentář k příspěvku III .....	20
8.4	Příspěvek IV .....	21
8.4.1	Komentář k příspěvku IV .....	22
8.5	Příspěvek V.....	23
8.5.1	Komentář k příspěvku V .....	23
9	Hodnocení práce a závěr.....	25
9.1	Shrnutí dosažených výsledků.....	27
10	Seznam použitých literárních zdrojů .....	29
11	Přehled publikační činnosti autora .....	33
11.1	Původní články .....	33
11.2	Přehledové články .....	34
11.3	Nejvýznamnější konferenční příspěvky .....	35

# 1 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.

## 2 Summary

### **The study of signaling pathways that modulate multidrug resistance**

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.

## 3 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.

### 3.1 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 blokuji 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).

### 3.2 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).

#### 3.2.1 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).

**Mezi nejčastěji diskutované mechanismy vzniku rezistence patří** zvýšené vyloučení hydrofobních léčiv z buňky zprostředkované ABC transportéry, změny v metabolismu léčiv, povzbuzení mechanismů opravujících poškozenou DNA, potlačení apoptózy, kvalitativní či kvantitativní změny v cíli (cílovém enzymu), ochranná bariéra mikroprostředí nádoru či chromosomová nestabilita a vznik chromosomových aberací (Holčáková et al., 2014; Kachalaki et al., 2016; Kufe et al., 2003; McGranahan et al., 2012)

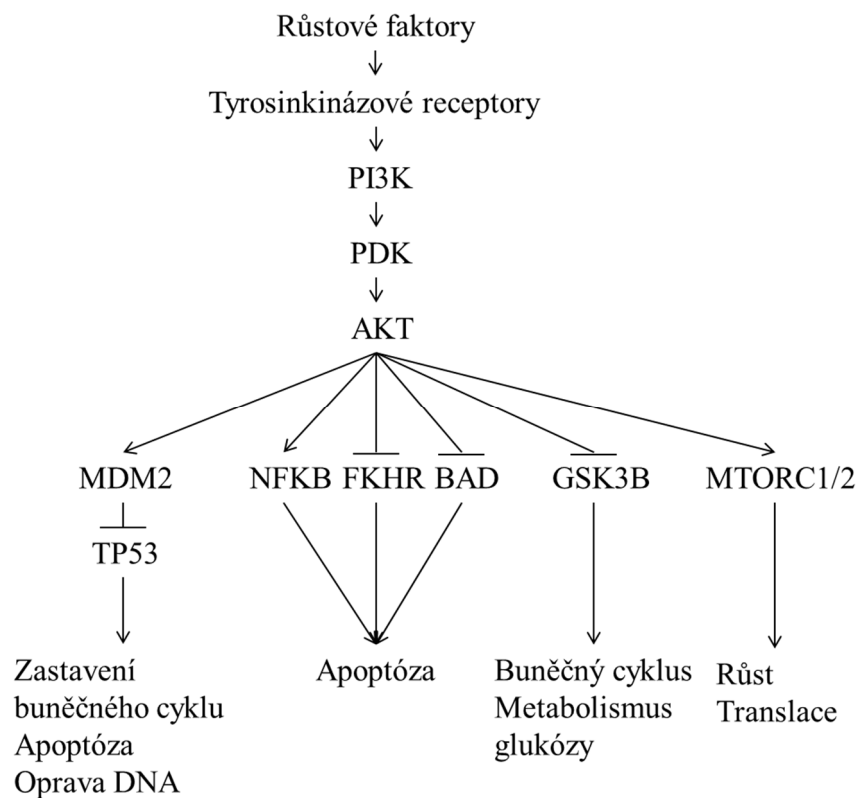
Zmíněné mechanismy však nepůsobí izolovaně a v případě chemorezistence jde většinou o **komplexní působení poruch ve více mechanismech současně**. Vznikne-li u nádorových buněk současně rezistence na více protinádorových léčiv, která nemají příbuznou strukturu nebo mechanismus jejich účinku, je tento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

### 3.2.2 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).

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)

## 4 ABC transportní proteiny a jejich role při vzniku MDR

### 4.1 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 hydrolýzou ATP na ADP k přenosu širokého spektra látek proti koncentračnímu gradientu. ABC proteiny jsou součástí cytoplasmatické membrány i membrán ohraničujících vnitrobuněčné orgány, 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 sady 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.

### 4.2 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).

### 4.3 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).

#### **4.4 Možné použití inhibitorů ABC transportérů v klinické praxi**

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).

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).

## 5 Chromosomální abnormality a mnohočetná léková rezistence

### 5.1 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).

### 5.2 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 vřeténko (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).

### 5.3 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 (Bakhoun 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 modality (Dittrich et al., 2015; Cheung et al., 2014).

## 6 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.

## **7 Materiál a použité metody**

### **7.1 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.

### **7.2 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). Analyzovanými geny (*genes of interest*, GOI) byl u všech studovaných typů nádorů set 49 popsanych 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).

### **7.3 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).

## 7.4 Statistické a bioinformatické vyhodnocení získaných dat

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](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.



## 8 Výsledky výzkumu

### 8.1 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<sub>(2015)</sub> 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>

#### 8.1.1 Komentář k příspěvku I

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 popsaných ABC genů) vytvářejících charakteristiku určitých typů nádorů (v porovnání s expresními profily u příslušné nenádorové tkáně) nebo s prokazovaným klinickým významem.

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.

## 8.2 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<sub>(2015)</sub> 1,961

**Citace:** DVORAK, Pavel, DANIEL LYSÁK, SAMUEL VOKURKA, MICHAL KARAS a IVAN ŠUBRT, 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.

## 8.2.1 Komentář k příspěvku II

Komentovaný příspěvek předkládá retrospektivní analýzu 376 postupně diagnostikovaných pacientů s akutní myeloidní leukémií (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 dřeně 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 tito 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 porovnáni 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 progresu 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.

### 8.3 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<sub>(2015)</sub> 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.

#### 8.3.1 Komentář k příspěvku III

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).

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 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 delecce 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 preleukemických 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.

## 8.4 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<sub>(2015)</sub> 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.

#### **8.4.1 Komentář k příspěvku IV**

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

Otázkou stále zůstává, zda přerušování 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 přerušení léčby s TKI a diskuzi nad dosud otevřenými otázkami z pohledu laboratorní a klinické praxe.

## 8.5 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

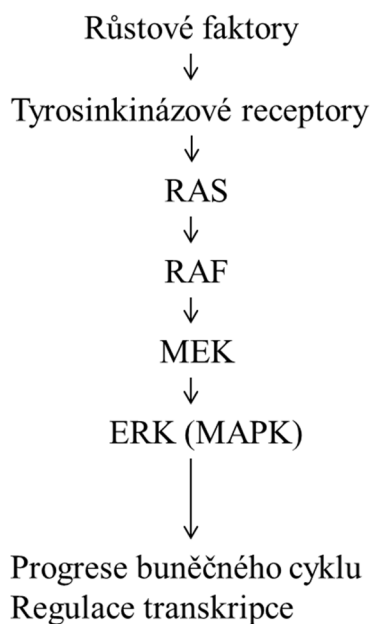
**Název časopisu a nakladatelství:** Onkologie (Solen)

**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.

### 8.5.1 Komentář k příspěvku V

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 2). 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 2 – 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.



## 9 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 vyzdvíženy 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 přerušení 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 včetně 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.**

## 9.1 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 nesouvisí 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.

## 10 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**(Supl 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. GORGOLIS 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/doi/10.1038/cr.2007.15>



# 11 Přehled publikační činnosti autora

## 11.1 Původní články

**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<sub>(2015)</sub> 2,926]

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<sub>(2015)</sub> 1,509]

**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<sub>(2015)</sub> 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.

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.

**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<sub>(2015)</sub> 3,494]

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? *Transfuze 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. *Transfuze 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<sub>(2012)</sub> **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<sub>(2009)</sub> **2,4**]

## 11.2 Přehledové články

**DVORAK, Pavel**, Daniel LYSÁK 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<sub>(2015)</sub> **1,961**]

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<sub>(2015)</sub> **0,331**]

**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.

### **11.3 Nejvýznamnější konferenční příspěvky**

**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. Multiclونality of 13q14 deletion in chronic lymphocytic leukemia. *9th European Cytogenetics Conference*, 29 June – 2 July, 2013, Dublin, Ireland.