

Univerzita Karlova
1. lékařská fakulta
Autoreferát disertační práce



UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta

Experimentální terapie B-nehodgkinských lymfomů
Experimental therapy of B-cell Non-Hodgkin's lymphomas

MUDr. Magdalena Klánová

2017

Doktorské studijní programy v biomedicině
Univerzita Karlova a Akademie věd České republiky

Obor: Fyziologie a patofyziologie člověka

Předseda oborové rady: Prof. MUDr. Jaroslav Pokorný, DrSc.

Školící pracoviště: Ústav patologické fyziologie, 1. Lékařská fakulta, Univerzita Karlova

Školitel: Doc. MUDr. Pavel Klener, Ph.D.

Disertační práce bude nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněna k nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky Děkanátu 1. lékařské fakulty.

Obsah

1	Abstrakt.....	4
2	Abstract.....	6
3	Úvod.....	8
4	Hypotézy a cíle	9
5	Metody	10
6	Výsledky	11
7	Diskuse.....	12
7.1	Publikace číslo 1:.....	12
7.2	Publikace číslo 2:.....	14
7.3	Publikace číslo 3:.....	15
7.4	Publikace číslo 4:.....	18
8	Závěry	22
9	Použitá literatura	23
10	Seznam publikací doktoranda	25

1 Abstrakt

Agresivní ne Hodgkinovy lymfomy vycházející z B-lymfocytů (B-NHL) představují heterogenní skupinu vzácných hematologických malignit vznikajících nádorovou transformací tzv. periferních lymfocytů v průběhu jejich diferenciaci v sekundárních lymfatických orgánech. Difúzní velkobuněčný B-lymfom (DLBCL, difuse large B-cell lymphoma) a lymfom z pláštěvých buněk (MCL, mantle cell lymphoma) jsou agresivní typy B-NHL. V jejich patogenezi se uplatňuje zejména narušení mechanismů programované buněčné smrti, buněčného cyklu či oprav poškozené DNA. Identifikovány byly také abnormálně aktivované signální dráhy, které vedou ke zvýšení proliferace nádorových buněk či inhibici apoptózy. Poznání těchto mechanismů umožňuje vyvíjet a experimentálně testovat nová protinádorová léčiva, která cíleně blokují onkogenní kaskády rekurentně nalézané u jednotlivých typů B-NHL.

MCL je agresivní typ B-NHL s nepříznivou prognózou. *In vivo* modely lidského MCL pro experimentální terapii tohoto onemocnění však dosud chyběly. Zavedli a charakterizovali jsme několik modelů lidského MCL pomocí xenotransplantace primárních buněk a ustálených linií MCL do imunodeficitních myší. Prokázali jsme, že buňky přiložené a proliferující v myších tkáních jsou biologicky odlišné a mají komplexní změny genové exprese, fenotypu a senzitivity k cytotoxickým látkám ve srovnání s *in vitro* rostoucími MCL buněčnými liniemi (práce č.1). Tyto závěry mohou být významným přínosem pro preklinický výzkum.

Randomizovaná klinická studie Evropské skupiny pro MCL prokázala, že alternace režimu R-CHOP (rituximab, cyklofosfamid, doxorubicin, vinkristin, prednison) s režimem R-DHAP (rituximab, dexamethazon, cisplatina, HDAC) signifikantně zlepšuje celkové přežití pacientů s MCL ve srovnání s chemoterapií R-CHOP. Dosud však nebylo jasné, která komponenta režimu DHAP (cisplatina, cytarabin, či jejich kombinace) vede ke zlepšení přežívání pacientů s MCL. Nedávno publikované výsledky Nordické lymfomové skupiny ukázaly, že monoterapie HDAC (v kombinaci s rituximabem) není u mladších pacientů s agresivními formami MCL dostatečně efektivní (studie byla předčasně ukončena). S využitím námi odvozených myších modelů lidského MCL jsme experimentálně ukázali, že cisplatina v monoterapii či kombinaci cisplatin s cytarabinem je účinnější ve srovnání s cytarabinem podávaným v monoterapii (práce č.2). Naše závěry tak potvrzují závěry klinické studie Nordické lymfomové skupiny, a to že HDAC podávaný v monoterapii není dostatečně účinnou léčbou u agresivních forem MCL.

U části DLBCL nacházíme zvýšenou expresi antiapoptotického proteinu BCL2 (B-cell lymphoma 2), jež je asociována s nepříznivou prognózou. Expresní profil a prognostický

význam dalších antiapoptotických proteinů rodiny BCL2 jako je MCL1 (myeloid-cell leukemia sequence 1) a BCL-XL (B-cell lymphoma-extra large) pro přežívání buněk DLBCL nebyl dosud systematicky zkoumán. Cílenou inhibicí jednotlivých antiapoptotických proteinů jsme zjistili, že DLBCL může být rozdělen na biologicky odlišné podskupiny podle závislosti na antiapoptotickém proteinu BCL2 a/nebo MCL1 (viz práce č.1). Role proteinu BCL-XL se zdá být minoritní. Podskupina BCL2 pozitivních DLBCL obsahuje jak BCL2-, tak MCL1-dependentní případy, které mohou být farmakologicky inhibovány pomocí cíleného nízkomolekulárního inhibitoru BCL2 proteinu s názvem venetoclax (ABT-199 / GDC0199), rostlinného alkaloidu homoharingtoninu (HHT, snižuje expresi MCL1), či jejich kombinace (s významným synergickým efektem), podskupina BCL2-negativních DLBCL se zdá být převážně závislá na proteinu MCL1. Tyto výsledky mohou mít přímý dopad na nové koncepty experimentální terapie DLBCL cílené na inhibici proteinů BCL2 a/nebo MCL1.

Vysokodávkovaný cytarabin (HDAC, high-dose cytarabine) se stal standardní součástí léčby mladších pacientů s MCL. Přesto pacienti prodělávají návrat (relaps) choroby i po léčbě založené na HDAC. Molekulární mechanismy rezistence na cytarabin nebyly u lymfomů (na rozdíl od akutních leukémií) systematicky zkoumány. Za účelem studia mechanismů rezistence na cytarabin jsme odvodili několik klonů ustálených MCL linií rezistentních na cytarabin (viz práce č.3). Zjistili jsme, že hlavním mechanismem získané rezistence k cytarabinu je snížení exprese deoxycytidinkinázy (DCK), enzymu, který je nezbytný pro fosforylaci, a tedy aktivaci nukleosidových analogů po jejich vstupu do buňky. Snížení exprese DCK vedle rezistence k cytarabinu způsobuje rezistenci k ostatním nukleosidovým analogům používaným v léčbě MCL (např. fludarabin, cladribin, gemcitabin), což jsme prokázali také *in vivo* na námi odvozených myších modelech lidského MCL. Výsledky naší práce naznačují, že pacienti, kteří progredují či relabují po režimu založeném na HDAC, by neměli být léčeni nukleosidovými analogy, konkrétně fludarabinem, gemcitabinem a cladribinem.

2 Abstract

B-cell non-Hodgkin lymphomas (B-NHL) represent the most common mature lymphoproliferative diseases. B-NHL arise at different stages of B-cell development and represent their malignant counterpart. Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) and mantle cell lymphoma (MCL) are aggressive types of B-NHLs. Deregulation of cell cycle control, inhibition of apoptosis or abnormal DNA damage response play a key role in the pathogenesis of DLBCL and MCL. Aberrant activation of several signaling pathways that further promote survival, cell proliferation or affect the tumor microenvironment have been recently recognized. Increased understanding of the oncogenic mechanisms implicated in pathogenesis of B-NHL lead to development of novel agents that target the oncogenic drivers of distinct lymphoma subtypes.

MCL is an aggressive subtype of B-NHL associated with poor prognosis. *In vivo* models of human MCL for experimental therapy are however scarce. We established and characterized several mouse models of human MCL by xenotransplantation of either primary cells or established cell lines into immunodeficient mice (publication no 1). We demonstrated that engrafted MCL cells displayed complex changes of gene expression profile, phenotype and sensitivity to cytotoxic agents compared to the original *in vitro* growing control cell lines. These results can contribute to the preclinical research.

The randomized clinical trial of European MCL network demonstrated that the alternation of R-CHOP (rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, prednisone) with R-DHAP (rituximab, dexamethasone, cisplatin, HDAC) significantly improves the overall survival of MCL patients compared to R-CHOP alone. So far it has not been elucidated which component of the DHAP regimen (cisplatin, cytarabine, or the combination of both agents) is the key contributor of improved efficacy of the regimen. Recently published results of the Nordic Lymphoma Group MCL trial 5 showed, that single HDAC (in combination with rituximab) is insufficient for the treatment of younger patients with aggressive MCL and the study was prematurely terminated. Using our mouse models of human MCL we experimentally showed, that cisplatin, alone or with cytarabine, is significantly superior to single-agent cytarabine in eliminating lymphoma cells (publication no 2). Our data confirmed the results of the Nordic Lymphoma Group MCL trial 5 concluding that single-agent cytarabine is not appropriate treatment for biologically aggressive MCL.

BCL2 (B-cell lymphoma 2) gene is deregulated in subsets of DLBCL and overexpression of *BCL2* protein is associated with adverse prognosis. The expression status as well as the role of other two key antiapoptotic *BCL2* proteins such as *MCL1* (myeloid-cell

leukemia sequence 1) and BCL-XL (B-cell lymphoma-extra large) for the survival of DLBCL is less clear. By targeting of BCL2 proteins we demonstrated that DLBCL can be divided into biologically distinctive subgroups: BCL2 and/or MCL1 dependent, with minor role left for BCL-XL. BCL2-positive subgroup comprises both BCL2- and MCL1-dependent cells that might be pharmacologically targeted by specific BCL2 inhibitor, drug entitled venetoclax (ABT-199 / GDC0199), plant alkaloid homoharringtonin (HHT), or the combination of both agents (with a marked synergistic efficacy). BCL2-negative DLBCL subgroup appears to be predominantly MCL1-dependent (publication no 3). Our data might have direct implications for novel concepts of experimental therapy of DLBCL targeted at BCL2 and/or MCL1 using ABT-199 and HHT, single agent, or in combination

Implementation of high-dose cytarabine (HDAC) into induction therapy became standard-of-care for all newly diagnosed younger MCL patients. However, many patients relapse even after HDAC-based regimens. Molecular mechanisms responsible for cytarabine resistance in MCL (in contrast to acute leukemias) are unknown and optimal treatment strategy for relapsed/refractory MCL patients remains elusive. In order to study the mechanisms responsible for cytarabine resistance we derived several cytarabine-resistant clones from established MCL cell lines (see publication no 3). We demonstrated that acquired resistance of MCL cells to cytarabine is associated with marked downregulation of deoxycytidinkinase (DCK), an enzyme responsible for the first phosphorylation and thus activation of nucleoside analogs following their entry to the cell. The downregulation of DCK results not only in cytarabine resistance but leads to cross resistance to other nucleoside analogs used in the therapy of MCL (i.e. fludarabine, cladribine, gemcitabine). These results were confirmed in vivo using our established mouse models of human MCL (publication no 4). Our data suggest that nucleoside analogs (namely fludarabine, cladribine and gemcitabine) should not be used for the second-line therapy of MCL patients, who fail after cytarabine-based regimen.

3 Úvod

Agresivní ne Hodgkinovy lymfomy vycházející z B-lymfocytů (B-NHL) představují heterogenní skupinu vzácných hematologických malignit vznikajících nádorovou transformací tzv. periferních lymfocytů v průběhu jejich diferenciaci v sekundárních lymfatických orgánech. Prognóza pacientů s B-NHL doznala v posledních desetiletích zásadního zlepšení, kdy původně nevyléčitelné agresivní malignity lze pomocí kombinovaných imunochemoterapeutických režimů ve vysokém procentu případů zcela vyléčit. Toto zlepšení prognózy (zcela ojedinělé v rámci onkologických onemocnění) bylo možné mimo jiné díky významnému prohloubení poznání patofyziologie B-NHL a díky preklinickému, klinickému a translačnímu výzkumu.

Hlavní pilíře preklinického výzkumu představují etablované buněčné linie a *in vitro* výzkum s pomocí těchto linií, a dále *in vivo* modely, nejčastěji myší modely B-NHL. Kromě myších modelů myších lymfomů se v posledních několika letech zavádějí a standardizují myší modely založené na xenotransplantaci lidských primárních buněk (tj. buněk odebraných přímo pacientovi) do imunodeficitních myší, nejčastěji tzv. NSG (NOD-SCID-gamma) myši. Takové modely se nazývají „patient-derived xenografts“ (PDX) a představují zásadní přiblížení preklinického výzkumu situaci u pacienta. Translační výzkum se snaží integrovat poznatky získané v laboratoři s možnou aplikací do kliniky („from bench to bed-site“), a naopak analýzou primárních buněk, tkáně či tělních tekutin pacienta prohlubovat informace o biologii lymfomů, prognóze konkrétních pacientů či predikci citlivosti daného typu lymfomu u daného pacienta na vybrané protinádorové látky.

Disertační práce se zabývá problematikou agresivních B-NHL a to konkrétně (1) zavedením a charakterizací nových myších modelů využitelných pro preklinický a translační výzkum a (2) identifikaci molekulárních mechanismů predikujících citlivost či rezistenci B-NHL vůči vybraným protilymfomovým látkám.

4 Hypotézy a cíle

Cíl 1A: Zavést a charakterizovat myší model lidského MCL pomocí xenotransplantace ustálených linií a primárních buněk MCL do imunodeficitních myší. Objasnit vliv *in vivo* prostředí na genovou expresi MCL buněk a jejich senzitivitu k vybraným cytotoxickým látkám. Otestovat využití myšího modelu lidského MCL pro experimentální terapii.

Hypotéza: *Primární buňky izolované od pacientů s MCL jsou schopné přijetí v imunodeficitních myších obdobně jako ustálené buněčné linie. Xenotransplantované lymfomové buňky (PDX buňky) budou plně závislé na mikroprostředí myších tkání a nebudou schopny přežít v podmínkách ex vivo / in vitro podobně jako primární lymfomové buňky.*

Cíl 1B: Na myších modelech lidského MCL experimentálně otestovat, které ze tří léčebných ramen zahrnujících cisplatinu, cytarabin a kombinaci obou látek (v ekvitoxických dávkách) vykazuje nejlepší protilymfomový účinek.

Hypotéza: *Cisplatinu představuje klíčovou komponentu chemoterapeutického režimu DHAP. Její vynechání (tj. léčba založená pouze na vysokodávkovaném cytarabinu) způsobí nedostatečnou eliminaci lymfomových buněk a tudíž selhání léčby, zejména u agresivních forem MCL.*

Cíl 2A: Studovat význam antiapoptotických proteinů rodiny BCL2 (BCL2, MCL1 a BCL-XL) pro přežívání buněk DLBCL. Objasnit, zda je terapie cílená na inhibici antiapoptotických proteinů využitelná u pacientů s DLBCL. Definovat podskupinu pacientů s DLBCL, kteří budou nejvíce profitovat z této léčebné strategie.

Hypotéza: *DLBCL je z hlediska závislosti na antiapoptotických proteinech heterogenní skupinou lymfomů. Minimálně ta část DLBCL pacientů, kterým chybí exprese BCL2 proteinu, bude rezistentní na protilymfomový lék venetoclax.*

Cíl 2B: Identifikace molekulárních mechanismů zodpovědných za získanou rezistenci MCL buněk k cytarabinu. Empirický screen cytarabin-rezistentních MCL buněk na panelu vybraných protilymfomových látek za účelem optimální protilymfomové léčby pacientů, u kterých dojde k návratu lymfomu po selhání cytarabinu.

Hypotéza: *Rezistence na cytarabin bude spojena se změnami exprese buněčných transporterů cytarabinu a / nebo se změnou exprese enzymů, které metabolizují cytarabin na aktivní protilymfomovou látku. Mechanismus rezistence na cytarabin bude možné cíleně ověřit u pacientů s MCL, kteří prodělali relaps po selhání cytarabinu. Poznání mechanismu rezistence na cytarabin umožní lépe zacílit výběr vhodné léčby cytarabin-rezistentních forem MCL.*

5 Metody

Níže uvedený seznam představuje metody použité ve čtyřech publikacích, které jsou podkladem dizertační práce. Detailní popis konkrétních metod a další informace (experimentální léčiva, buněčné linie, imunodeficitní myši) jsou uvedeny v jednotlivých publikacích v sekci „Materiály a metody“.

- Analýza genové exprese pomocí expresních čipů (Illumina HumanRef BeadChips)
- Měření apoptózy buněk pomocí Annexinu V
- Dvourozměrná gelová elektroforéza proteinů
- Elektroforéza proteinů v polyakrylamidovém gelu s dodecylsulfátem sodným, westernový přenos a imunodetekce
- Hmotnostní spektrofotometrie
- Imunohistochemická analýza
- In vivo experimenty (xenotransplantace nádorových buněk, experimentální terapie) s použitím imunodeficitních myší (kmen: NOD.Cg-*Prkdc*^{scid} *Il2rg*^{tm1Wjl}/SzJ)
- Konstitutivní zvýšení / snížení exprese antiapoptotických proteinů u vybraných buněčných linií pomocí transdukce připravených lentivirů
- Kultivace buněčných linií in vitro
- Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (PCR v reálném čase)
- Testy cytotoxicity založené na uvolňování radioaktivního chromu (⁵¹Cr release assay) pro detekci protilátkami či komplementem zprostředkované cytotoxicity
- Měření proliferační aktivity buněk (WST-8 cell proliferation assay kit)
- Proteinová imunoprecipitace
- Průtoková cytometrie
- Statistická analýza

6 Výsledky

Výsledky jsou předkládány ve formě čtyř původních prvoautorských publikací týkajících se experimentální terapie B-nehodgkinských lymfomů. Každá z uvedených publikací je samostatně diskutována v kontextu současné literatury.

Publikace číslo 1:

Klanova M, Soukup T, Jaksa R, Molinsky J, Lateckova L, Maswabi BC, Prukova D, Brezinova J, Michalova K, Vockova P, Hernandez-Ilizaliturri F, Kulvait V, Zivny J, Vokurka M, Necas E, Trneny M, Klener P. [Mouse models of mantle cell lymphoma, complex changes in gene expression and phenotype of engrafted MCL cells: implications for preclinical research.](#) Lab Invest. 2014 Jul;94(7):806-17.

Publikace číslo 2:

Klanova M, Soukup T, Molinsky J, Lateckova L, Vockova P, Alam M, Zivny J, Trneny M, Klener P. [Single-agent cytarabine is insufficient for the treatment of human mantle cell lymphoma in mouse xenograft model.](#) Neoplasma. 2016;63(5):774-8.

Publikace číslo 3:

Klanova M, Andera L, Brazina J, Svadlenka J, Benesova S, Soukup J, Prukova D, Vejmelkova D, Jaksa R, Helman K, Vockova P, Lateckova L, Molinsky J, Maswabi BC, Alam M, Kodet R, Pytlik R, Trneny M, Klener P. [Targeting of BCL2 Family Proteins with ABT-199 and Homoharringtonine Reveals BCL2- and MCL1-Dependent Subgroups of Diffuse Large B-Cell Lymphoma.](#) Clin Cancer Res. 2016 Mar 1;22(5):1138-49.

Práce získala cenu České hematologické společnosti za nejlepší publikaci v roce 2015.

Publikace číslo 4:

Klanova M, Lorkova L, Vit O, Maswabi B, Molinsky J, Pospisilova J, Vockova P, Mavis C, Lateckova L, Kulvait V, Vejmelkova D, Jaksa R, Hernandez F, Trneny M, Vokurka M, Petrak J, Klener P Jr. [Downregulation of deoxycytidine kinase in cytarabine-resistant mantle cell lymphoma cells confers cross-resistance to nucleoside analogs gemcitabine, fludarabine and cladribine, but not to other classes of anti-lymphoma agents.](#) Mol Cancer. 2014 Jun 27;13:159.

7 Diskuse

7.1 Publikace číslo 1:

Zavedli a charakterizovali jsme několik myších modelů lidského MCL pomocí xenotransplantace primárních buněk a ustálených buněčných linií MCL do imunodeficitních myší. Nejprve jsme prokázali, že i primární buňky MCL se přihojují v subletálně ozářených imunodeficitních myších (NOD.Cg-*Prkdc*^{scid} *Il2rg*^{tm1Wjl}/SzJ, NSG myši). Vedle přihojení a proliferace převážně cyklin D1+ buněk (buňky izolované od pacientů: VFN-1, VFN-4 a VFN-10), jsme také pozorovali přihojení směsi cyklin D1+, CD20+ a CD3+ buněk (VFN-3, VFN-6, VFN-7 a VFN-8). Ve třech případech (VFN-2, VFN-11 a VFN-12) jsme po xenotransplantaci primárních MCL buněk detekovali přihojení B lymfocytárních klonů pozitivních na virus Epstein-Barrové (EBV). Z uvedeného vyplývá, že myší modely lidského MCL vytvořené xenotransplantací primárních buněk jsou využitelné, avšak tento přístup je zatížen nekonstantním přihojováním primárních buněk a vyžaduje imunohistochemickou analýzu k ověření přihojení MCL buněk (cyklin D1+) a vyloučení proliferace nenádorových buněk, např. T lymfocytů nebo EBV pozitivních B buněčných klonů. V některých případech je pak možné primární buňky ve velkém počtu izolovat z infiltrovaných orgánů (nejčastěji ze zvětšené sleziny) primárních myších recipientů a použít pro retransplantaci do dostatečného počtu sekundárních příjemců.

I když se některé primární buňky úspěšně přihojují v imunodeficitních myších (Chapuy, Cheng et al. 2016; Townsend, Murakami et al. 2016), je nutné zdůraznit, že většina v současné době publikovaných prací využívá pro preklinické testování experimentálních látek myší modely založené na xenotransplantaci ustálených buněčných linií do imunodeficitních myší. Většinou jsou to modely založené na xenotransplantaci nádorových buněk do podkoží imunodeficitních myší, zatímco modely systémového onemocnění vyžadující intravenózní aplikaci buněk jsou používány zřídka (Prasad, Shrivastava et al. 2013; Barth, Mavis et al. 2015; Mani, Chiang et al. 2015). Navíc je velice málo známo o způsobu přihojování a šíření lymfomových buněk v myši po xenotransplantaci, stejně jako o fenotypových změnách lymfomových buněk, ke kterým může docházet vlivem mikroprostředí jednotlivých myších tkání.

V naší práci jsme podrobně studovali a popsali přihojení a šíření 5 komerčně dostupných a široce používaných buněčných linií MCL (Mino, Jeko-1, Granta-519, Hbl-2 a Rec-1) v imunodeficitních NSG myších. Na rozdíl od primárních buněk MCL, které jsou po xenotransplantaci nejdříve detekovány v myší slezině, hlavním místem přihojení buněčných linií MCL je kostní dřeň, odkud se buňky šíří do sleziny, jater a dále v průběhu onemocnění

do centrálního nervového systému a ledvin. K infiltraci dalších orgánů a tkání, jako jsou lymfatické uzliny, vaječníky nebo periferní krev dochází jen u některých buněčných linií MCL. Průměrná doba přežití myši xenotransplantovaných buněčnými liniemi MCL se pohybuje v rozmezí od 22±1 do 54±3 dnů. Biologicky nejagresivněji se *in vivo* chová linie Granta-519, ačkoliv *in vitro* má tato linie nejnižší proliferační aktivitu. Důvody pro rozdílné chování jednotlivých linií *in vivo* jsou nejasné.

Analýzou genové exprese jsme zjistili, že buňky MCL rostoucí *in vivo* v různých myších tkáních mají odlišný profil genové exprese a fenotyp ve srovnání s *in vitro* rostoucími buňkami. Geny kódující chemokiny nebo chemokinové receptory jako CXCL10, CCL3, CCL3L3, CCL4L1, CCL4L2, CXCR4, nebo CCR7 patří k nejvíce deregulovaným genům *in vivo* ve srovnání s *in vitro* rostoucími buňkami. Tento fakt podtrhuje význam vlivu mikroprostředí myších orgánů na fenotyp MCL buněk. Geny účastníci se oxidativní fosforylace patří k nejvíce sniženě exprimovaným, naopak geny kódující molekuly účastníci se signální kaskády spouštěné B buněčným receptorem jsou nejvíce zvýšeně exprimovány. Předpokládáme, že po přihojení v imunodeficitních myších dochází u MCL buněk ke komplexním změnám genové exprese a fenotypu v důsledku adaptace na mikroprostředí myších tkání, kde jsou buňky vystaveny hypoxii, nedostatku živin, interakci s dalšími buňkami a antigeny. Není proto překvapující, že myši retransplantované MCL buňkami izolovanými z primárních příjemců mají významně kratší přežití než myši transplantované kontrolními, *in vitro* rostoucími buňkami.

Dále jsme prokázali, že zavedené myší modely mohou být použity pro preklinické testování experimentálních léčiv. Zajímavé je, že jsme zaznamenali významný rozdíl mezi *in vitro* senzitivitou MCL buněk k některým protilymfomovým látkám a efektivitou těchto látek *in vivo* při terapii myši se systémovým MCL onemocněním. I přesto, že se letální dávka (LD100) gemcitabinu a bortezomibu u buněčné linie Jeko-1 pohybuje *in vitro* v nanomolárních koncentracích (LD100 gemcitabinu (10nM/L), bortezomibu (16nM/L)), bortezomib neprodlužuje celkové přežití myši se systémovým MCL onemocněním a gemcitabin nevede k jeho vyléčení. Předpokládáme, že často pozorovaná diskrepance mezi excelentní *in vitro* senzitivitou k dané látce a její špatnou efektivitou *in vivo*, může být dána změnami fenotypu buněk, ke kterým dochází po xenotransplantaci. Také jsme ukázali, že imunomodulační látka lenalidomid, jejíž protinádorový mechanismus je dán ovlivněním nádorového mikroprostředí (Hernandez-Ilizaliturri, Reddy et al. 2005), neprodlužuje celkové přežití myši xenotransplantovaných buněčnými liniemi MCL (Jeko-1, Mino), ale signifikantně prodlužuje celkové přežití myši xenotransplantovaných NEMO buňkami

(primární buňky odvozené od pacienta s MCL = VFN1). Na rozdíl od Jeko-1 a Mino buněk, pokud jsou NEMO buňky izolovány z myších tkání a kultivovány *in vitro*, rychle podléhají apoptóze, což naznačuje jejich závislost na mikroprostředí myších tkání. Předpokládáme, že právě ovlivnění mikroprostředí při terapii lenalidomidem je zodpovědné za prodloužení celkového přežití myší xenotransplantovaných NEMO buňkami. Myší xenotransplantované NEMO buňkami tak představují vhodný *in vivo* model pro studium mechanismů protinádorového účinku lenalidomidu.

Závěrem, zavedli a charakterizovali jsme myší modely lidského MCL vytvořené xenotransplantací ustálených buněčných linií a primárních buněk do imunodeficitních myší. Prokázali jsme, že buňky přiložené a proliferující v myších tkáních jsou biologicky odlišné a mají komplexní změny genové exprese, imunofenotypu a senzitivity k cytotoxickým látkám ve srovnání s *in vitro* rostoucími MCL liniemi. Tyto závěry mohou být významným přínosem pro preklinický výzkum.

7.2 Publikace číslo 2:

Na základě výsledků několika klinických studií, které testovaly účinnost HDAC jako součásti indukčních chemoterapeutických režimů v léčbě pacientů s MCL se cytarabin stal standardní součástí terapie MCL (Lefrere, Delmer et al. 2002; Delarue, Haioun et al. 2013). Režimy s HDAC tak nahradily či jsou kombinovány s dříve používanými antracyklinovými režimy (CHOP). Vedle kombinace cytarabinu s cisplatinou a kortikoidy (režim DHAP) byla na příklad testována alternace režimu R-hyperCVAD (rituximab, frakcionovaný cyklofosfamid, vinkristin, doxorubicin, dexamethazon) s vysokodávkovaným metotrexátem a cytarabinem (R-HD-Mtx/AraC), která ve srovnání s historickými kontrolami navodila větší procento kompletních remisí a prodloužila celkové přežití pacientů s MCL (Romaguera, Fayad et al. 2005). Dalším běžně používaným režimem je Nordický protokol založený na kombinované imunochemoterapii rituximabem a intenzifikovaným režimem CHOP (R-maxi-CHOP) v alternaci s vysokodávkovaným cytarabinem (R-HDAC) (Geisler, Kolstad et al. 2008). Pravděpodobně žádná randomizovaná klinická studie není schopna porovnat jednotlivé léčebné přístupy, tudíž zůstává nejasné, která komponenta jednotlivých režimů či jejich kombinace vedla k prodloužení celkového přežívání pacientů s MCL. V této práci jsme se zaměřili na otázku, která součást režimu DHAP (cisplatin, cytarabin, případně kombinace obou) je klíčová pro jeho vysokou efektivitu. S použitím myšího modelu agresivního lidského MCL jsme experimentálně porovnali účinnost monoterapie cisplatinou, cytarabinem a tří různých kombinací obou látek (Klanova, Soukup et al. 2014). Jednotlivé terapeutické přístupy

byly předem otestovány a dávkově upraveny tak, aby měly stejnou toxicitu, což je nezbytný předpoklad pro možnost jejich vzájemného porovnání. Prokázali jsme, že cisplatina v monoterapii či kombinace cisplatinu s cytarabinem je účinnější ve srovnání s monoterapií cytarabinem. Naše závěry tak nepřímo potvrzují výsledky klinické studie Nordické lymfomové skupiny, která testovala účinnost cytarabinu v kombinaci s rituximabem (bez další cytotoxické látky) u pacientů s agresivním MCL, a musela být předčasně ukončena pro nedostatečnou efektivitu (Laurell, Kolstad et al. 2014). Z našich výsledků vyplývá, že režim DHAP je účinnější ve srovnání s HDAC u MCL. Naše práce také naznačuje, že cisplatina, i přes známou toxicitu této látky (Delarue, Haioun et al. 2013), je účinným cytostatikem, alespoň v případě agresivních forem MCL.

7.3 Publikace číslo 3:

Zvýšená exprese antiapoptotického proteinu BCL2 bývá nacházena u části DLBCL a je u tohoto onemocnění asociována s nepříznivou prognózou (Hermine, Haioun et al. 1996). Cílená inhibice proteinu BCL2 pomocí specifického nízkomolekulárního inhibitoru, látky s názvem ABT-199 představuje perspektivní léčebnou strategii u některých typů B-NHL. Dle výsledků časných klinických studií testujících ABT-199 v monoterapii u pacientů s relabujícími B-NHL, je však efektivita této cílené terapie u DLBCL méně zřejmá (Davids, Roberts et al. 2012). Je nutné zdůraznit, že deregulace genu *BCL2* vedoucí ke zvýšené expresi antiapoptotického proteinu BCL2 se uplatňuje jen u části DLBCL, ve zbylých případech nelze protein BCL2 detekovat pomocí imunohistochemické analýzy (Kendrick, Redd et al. 2014). Přesto míra exprese proteinu BCL2 není kritériem pro zařazování pacientů s DLBCL do klinických studií testujících efektivitu ABT-199 (Davids MS). V této práci jsme studovali význam hlavních antiapoptotických proteinů rodiny BCL2 (BCL2, MCL1 a BCL-XL) pro přežívání buněk DLBCL a dopad jejich cílené inhibice.

Nejprve jsme porovnali expresní profil BCL2 proteinů (BCL2, MCL1 a BCL-XL) u 18 linií DLBCL a 105 primárních vzorků získaných od pacientů s nově diagnostikovaným DLBCL. Zjistili jsme, že buněčné linie DLBCL představují klinicky relevantní model a využili tyto linie k objasnění námi vytyčených cílů. Ve shodě s dříve publikovanými pracemi jsme zjistili, že absence proteinu BCL2 je asociována s rezistencí na ABT-199 (Souers, Levenson et al. 2013). Látka ABT-199 by tak neměla být používána pro terapii BCL2 negativních DLBCL. Na druhou stranu předpokládáme jeho vysokou účinnost u větší části BCL2 pozitivních DLBCL, pro které se zdá být přítomnost BCL2 proteinu a jím navozená inhibice apoptózy nezbytná pro přežívání lymfomových buněk. Na základě citlivosti DLBCL

linií vůči inhibici antiapoptotického proteinu BCL2 (pomocí ABT-199) a MCL1 (pomocí homoharintoninu, HHT) jsme zjistili, že linie DLBCL mohou být rozděleny do 3 hlavních kategorií: MCL1 dependentní/BCL2 independentní, dominantně BCL2 dependentní (BCL2>MCL1) a MCL1/BCL-2 dependentní. Konkrétně, 9 buněčných linií DLBCL (SU-DHL-4, SU-DHL-5, SU-DHL-10, OCI-LY-7, BJAB, HT, Karpas-422, NUDUL-1 a UPF4D) bylo senzitivních k HHT, ale rezistentních k ABT-199, což ukazuje na jejich dependenci na antiapoptotickém proteinu MCL1. Z 8 DLBCL linií, které byly citlivé na obě látky, bylo 5 buněčných linií (RIVA, OCI-Ly2, OCI-Ly19, HBL-1 a U-2932) významně citlivějších k ABT-199 ve srovnání s HHT, což značí jejich dominantní závislost na antiapoptotickém proteinu BCL2 (BCL2>MCL1). 3 buněčné linie (NU-DHL-1, OCI-Ly3 a TMD8) byly citlivé k oběma látkám, a tedy závislé jak na antiapoptotickém proteinu BCL2, tak MCL1. Pouze 1 buněčná linie (HT) byla rezistentní k oběma látkám, tedy nezávislá na antiapoptotickém působení proteinů BCL2 a MCL1.

Výsledky, které jsme získali odvozením klonů DLBCL linií se změnou expesí proteinů BCL2, MCL1 a BCL-XL, potvrdily předkládané rozdělení DLBCL na biologicky odlišné kategorie dle závislosti na antiapoptotickém proteinu BCL2 a/nebo MCL1. Role antiapoptotického proteinu BCL-XL u DLBCL se zdá být ve srovnání s proteiny BCL2 a MCL1 minoritní. Tuto teorii podporuje zejména téměř identická citlivost DLBCL linií k ABT-199 a k ABT-737 (inhibitor BCL-2, BCL-XL a BCL-w). Toto pozorování (v souladu s dříve publikovanými daty) naznačuje, že inhibice antiapoptotického proteinu BCL2, nikoliv BCL-XL je klíčovým molekulárním mechanismem, který vede ke smrti buněk (Deng, Carlson et al. 2007). Na druhou stranu jsme ukázali, že snížení exprese proteinu BCL-XL zvyšuje senzitivitu DLBCL linií k HHT, analogicky zvýšení exprese proteinu BCL-XL snižuje senzitivitu DLBCL linií k HHT. Navíc získaná rezistence DLBCL linií k HHT je spojená se zvýšením exprese proteinu BCL-XL. Z těchto výsledků vyplývá, že získané zvýšení exprese proteinu BCL-XL může snižovat závislost DLBCL linií na antiapoptotickém proteinu MCL1.

Zvýšení exprese proteinu BCL2 u původně BCL2 negativních linií (SU-DHL-5, UPF4D) nevede k indukci citlivosti BCL2 negativních (ABT-199 rezistentních) linií k ABT-199, což je v souladu s dříve publikovanými daty (Deng, Carlson et al. 2007). Na druhou stranu zvýšení exprese proteinu BCL2 signifikantně snižuje citlivost k HHT. Prokázali jsme, že zvýšeně exprimovaný protein BCL2 může sekvestrovat proapoptotický protein BIM uvolněný z proteinu MCL1 vlivem HHT. Tato data částečně vysvětlují fakt, že BCL2 negativní linie jsou citlivější k HHT ve srovnání s BCL2 pozitivními liniemi (61.9 ± 28.7 % vs. 38.2 ± 32.3 % průměrná míra apoptózy po 24-hodinové inkubaci s 30 nmol/L HHT, $P = 0.07$).

Zatímco závislost DLBCL linií na antiapoptotickém proteinu BCL2 může být spolehlivě testována pomocí ABT-199, určení závislosti DLBCL linií na antiapoptotickém proteinu MCL1 je vzhledem k nedostatku jeho specifických inhibitorů obtížné. Na základě výsledků získaných odvozením klonů se změněnou expresí MCL1 proteinu od HHT-vysoce senzitivní linie Karpas-422 a HHT-nízce senzitivní linie U2932 se zdá, že pouze DLBCL linie vysoce senzitivní k HHT jsou závislé na antiapoptotickém proteinu MCL1. Zatímco apoptóza navozená HHT u linií s nízkou senzitivitou k HHT může být důsledkem dalších protinádorových mechanismů HHT (snížení exprese proteinu MYC, BCL6, cFLIP). Tuto hypotézu jsme podpořili analýzou proteinů, které se u jednotlivých linií vážou na MCL1. Metodou proteinové imunoprecipitace jsme prokázali, že pouze u linií vysoce senzitivních k HHT (UPF4D, SU-DHL-5, NU-DHL-1, NU-DUL-1) sekvestruje protein MCL1 přímý aktivátor apoptózy BIM. Na druhou stranu protein MCL1 izolovaný z buněčných linií nízce senzitivních k HHT (U2932 a HT) váže protein NOXA, tzv. senzitizer apoptózy. Již dříve bylo prokázáno, že pouze buňky, jejichž antiapoptotický protein BCL2 (např. MCL1) váže přímý aktivátor apoptózy (např. protein BIM), jsou na tomto BCL2 proteinu přímo závislé, a tudíž jeho inhibice vyvolá uvolněním přímých aktivátorů apoptózy smrt buněk (Certo, Del Gaizo Moore et al. 2006).

Naše data naznačují, že DLBCL může být rozdělen na biologicky odlišné skupiny závislé na antiapoptotickém proteinu BCL2 a/nebo MCL1. Zatímco podskupina BCL2 pozitivních DLBCL obsahuje jak BCL2, tak MCL1 dependentní případy, které mohou být farmakologicky inhibovány pomocí ABT-199, HHT, či jejich kombinace (s významným synergickým efektem), podskupina BCL2 negativních DLBCL se zdá být převážně závislá na proteinu MCL1. V souladu s dříve publikovanými pracemi i naše výsledky ukazují, že farmakologická inhibice proteinu MCL1 se zdá být racionálním terapeutickým přístupem u DLBCL (Li, Pongtorpipat et al. 2015). V naší práci jsme k inhibici proteinu MCL1 použili HHT. Molekulárním mechanismem protinádorového účinku HHT je inhibice translace proteinů. Jsme si vědomi, že smrt buněk DLBCL vyvolaná HHT je vedle snížení exprese proteinu MCL1 dána i ovlivněním exprese dalších proteinů (Chen, Guo et al. 2011; Lindqvist, Vikstrom et al. 2012). Přesto jsme prokázali, že proapoptotický účinek HHT u HHT-vysoce senzitivních linií je dán právě snížením exprese proteinu MCL1. Závěrem lze říct, že ABT-199 může být účinným lékem u DLBCL, avšak pouze ve skupině BCL2 pozitivních případů. Na druhou stranu HHT se zdá být slibným lékem pro terapii DLBCL bez ohledu na expresní stav BCL2 proteinu, přestože se zdá být účinnějším u BCL2 negativních DLBCL. Současná inhibice proteinu BCL2 a MCL1 (v naší studii pomocí ABT-199 a HHT) vykazuje významný

synergický účinek u většiny BCL2 pozitivních DLBCL a představuje tak novou léčebnou strategii pro tuto podskupinu DLBCL, což jsme prokázali také *in vivo* na myším modelu vytvořeném xenotransplantací primárních buněk DLBCL do imunodeficitních myší. Vzhledem k tomu, že HHT je schváleným protinádorovým lékem a ABT-199 v pokročilých stádiích klinického testování u B-NHL, naše výsledky mohou mít přímý dopad na nové koncepty experimentální terapie DLBCL cílené na inhibici proteinů BCL2 a/nebo MCL1 pomocí ABT-199 a HHT, v monoterapii či kombinaci.

7.4 Publikace číslo 4:

V této práci jsme studovali molekulární mechanismy získané rezistence MCL na cytarabin. Dále jsme si položili otázku, jaká je optimální léčebná strategie pro pacienty s MCL, kteří byli v primoterapii léčení cytarabinem, a dochází u nich k progresi či relapsu onemocnění. Analyzovali jsme pět ustálených buněčných linií MCL se získanou rezistencí k cytarabinu (námi odvozené klony) a deset párových primárních vzorků izolovaných od pacientů s MCL v době diagnózy a po léčbě cytarabinem (při progresi či relapsu onemocnění). V porovnání s kontrolními cytarabin-senzitivními buněčnými liniemi a diagnostickými primárními vzorky jsme u všech MCL linií se získanou rezistencí na cytarabin a u 50 % primárních vzorků izolovaných při progresi (1 ze 2 případů) či relapsu (4 z 8 případů) MCL detekovali sníženou expresi DCK (na úrovni mRNA i proteinu). DCK je enzym, který se účastní syntézy nukleotidů cestou tzv. záchranné dráhy, při níž nejsou puriny a pyrimidiny tvořeny *de novo*, ale jsou syntetizovány z produktů (nukleosidů a bazí) degradace RNA či DNA. Kromě syntézy nukleotidů je funkční DCK nezbytná pro metabolismus cytarabinu po jeho vstupu do buňky, kdy jej fosforyluje a tudíž aktivuje (Lamba 2009). Snížení exprese tohoto enzymu tak může způsobovat rezistenci nádorových buněk na cytarabin, což již bylo popsáno u akutní myeloidní leukémie (Song, Kim et al. 2009). Ačkoliv jsme snížení exprese DCK detekovali u 50 % primárních vzorků izolovaných od pacientů po léčbě cytarabinem, u zbylých 50 % vzorků jsme nezaznamenali žádnou změnu exprese DCK, z čehož vyplývá, že mechanismy rezistence MCL na cytarabin *in vivo* jsou ve srovnání s *in vitro* pozorováními komplexnější. U jednoho ze dvou primárních vzorků získaných od pacientů s progresí na léčbě cytarabinem (primární rezistence na cytarabin) jsme nepozorovali žádnou změnu exprese DCK a mírně vyšší senzitivitu na cytarabin u MCL buněk izolovaných po léčbě cytarabinem ve srovnání s MCL buňkami izolovanými před podáním cytarabinu. Tento stav by mohl být vysvětlen přítomností cytarabin-rezistentních lymfomových kmenových buněk, které přežívají v lymfatických uzlinách či kostní dřeni a

produkují částečně cytarabin-senzitivní klony, které jsou uvolňovány do periferní krve. V takovém případě by eliminace MCL buněk uvolněných do periferní krve a zároveň přetrvávání lymfomových kmenových buněk vedla ke stabilní chorobě či progresi onemocnění na léčbě, což by odpovídalo klinickému průběhu onemocnění u tohoto pacienta.

DCK je enzym, který po vstupu do buňky fosforyluje a aktivuje cytarabin a také další nukleosidová analoga (purinová i pyrimidinová) používaná v protinádorové léčbě (Galmarini, Mackey et al. 2001; Ewald, Sampath et al. 2008). V souladu s tím jsme prokázali, že všechny buněčné linie MCL rezistentní k cytarabinu jsou zkříženě rezistentní k pyrimidinovému analogu gemcitabinu a purinovým analogům fludarabinu a kladribinu. Naopak senzitivita cytarabin-rezistentních MCL linií k dalším protilymfomovým látkám včetně vybraných cytostatik (cisplatina, doxorubicin, bendamustin), cílených léků (temsirolimus, bortezomib) či monoklonálních protilátek (rituximab) zůstala nezměněna anebo byla dokonce vyšší (ibrutinib). Ibrutinib je inhibitor BTK, tedy molekuly, která je klíčovou pro signalizační dráhu BCR (Honigberg, Smith et al. 2010). Možným důvodem pro zvýšení senzitivity cytarabin-rezistentních klonů k ibrutinibu je pozorovaná aktivace této signální dráhy na úrovni mRNA u cytarabin-rezistentních klonů ve srovnání s kontrolními MCL buňkami. Senzitivita cytarabin-rezistentních MCL linií k panelu protilymfomových látek (*in vitro* i *in vivo* na myším modelu lidského MCL) a pozorovaná snížená exprese DCK u cytarabin-rezistentních MCL linií a poloviny primárních MCL po léčbě cytarabinem ukazuje, že rezistence MCL k cytarabinu je dána omezenou schopností jeho aktivace při snížené expresi DCK. Zkřížená rezistence cytarabin-rezistentních linií MCL ke všem testovaným nukleosidovým analogům je vysvětlitelná faktem, že všechny tyto látky jsou substrátem DCK. Naopak zachovaná senzitivita k dalším protilymfomovým látkám (s různými mechanismy účinku) nepřímo ukazuje na jednotný mechanismus cytarabinové rezistence.

Prognóza pacientů s relabujícím či terapeuticky refrakterním MCL je špatná. V současné době neexistuje standardní léčebná strategie pro pacienty s relapsem MCL (Ferrero and Dreyling 2013). K dispozici jsou chemoterapeutické režimy 2. linie, které zahrnují cytostatika jako je cisplatina, fludarabin, gemcitabin nebo bendamustin. Do klinické praxe byly také zavedeny léky ovlivňující nádorové mikroprostředí (lenalidomid), látky inhibující některé aberantně aktivované signální dráhy (temsirolimus, ibrutinib) či inhibitory proteazomu (bortezomib). Prokázali jsme (*in vitro* a *in vivo* na myším modelu MCL), že pacienti, kteří progredují či relabují po režimu založeném na HDAC, by neměli být léčeni nukleosidovými analogy, konkrétně fludarabinem, gemcitabinem a kladribinem. I když předpokládáme, že rezistence k cytarabinu vzniká jen u části z nich, dle našich výsledků je

vhodné u těchto pacientů zvolit jinou skupinu protilymfomových látek. Na základě našich výsledků lze také doporučit, aby vysokodávkovaná chemoterapie (podávaná bezprostředně před autologní transplantací kmenových buněk) neobsahovala nukleosidová analoga zejména u pacientů, kteří dosáhli suboptimální léčebné odpovědi (parciální remise onemocnění, detekovatelná minimální reziduální choroba) po indukční terapii založené na cytarabinu. Bendamustin představuje v současné době velmi slibnou terapeutickou možnost pro pacienty s MCL. Bylo prokázáno, že bendamustin potencuje efekt cytarabinu zvýšením intracelulární koncentrace ara-C-trifosfátu a chemoterapeutický režim R-BAC (rituximab, bendamustin, cytarabin) se zdá být efektivní i u pacientů rezistentních k cytarabinu (Visco, Castegnaro et al. 2012; Visco, Finotto et al. 2013; Hiraoka, Kikuchi et al. 2014). Je možné, že zvýšená intracelulární koncentrace ara-CTP může částečně kompenzovat sníženou hladinu DCK, čímž lze vysvětlit fakt, že kombinace bendamustinu s cytarabinem je účinná i u pacientů, kteří relabují po cytarabinu (Visco, Finotto et al. 2013).

Zavedli a charakterizovali jsme několik modelů lidského MCL pomocí xenotransplantace primárních buněk a ustálených linií MCL do imunodeficitních myší. Naše původní hypotéza se potvrdila, primární buňky se připojují v imunodeficitních myších, ale na rozdíl od ustálených buněčných linií nejsou schopny proliferace *in vitro*, což naznačuje jejich závislost na nádorovém mikroprostředí. Buňky připojené a proliferující v myších tkáních jsou ve srovnání s *in vitro* rostoucími MCL buněčnými liniemi biologicky odlišné a vykazují rozdílnou senzitivitu k cytotoxickým látkám. Tyto závěry (Publikace č. 1) mohou být významným přínosem pro preklinický výzkum. S využitím námi odvozených myších modelů lidského MCL jsme experimentálně prokázali, že cisplatina v monoterapii či kombinace cisplatin s cytarabinem je účinnější ve srovnání s cytarabinem podávaným v monoterapii. Naše původní hypotéza se potvrdila, naše výsledky jsou zároveň v souladu se závěry klinické studie Nordické lymfomové skupiny, která ukázala, že HDAC podávaný v monoterapii není dostatečně účinnou léčbou u agresivních forem MCL (Publikace č.2).

Zjistili jsme, že DLBCL může být rozdělen na biologicky odlišné podskupiny podle závislosti na antiapoptotickém proteinu BCL2 a/nebo MCL1. Podskupina BCL2 pozitivních DLBCL obsahuje jak BCL2-, tak MCL1-dependentní případy, které mohou být farmakologicky inhibovány pomocí cíleného nízkomolekulárního inhibitoru s názvem ABT-199, rostlinného alkaloidu homoharingtoninu, či jejich kombinace (s významným synergickým efektem), podskupina BCL2-negativních DLBCL se zdá být převážně závislá na proteinu MCL1. Tyto výsledky mohou mít přímý dopad na nové koncepty experimentální terapie DLBCL cílené na inhibici proteinů BCL2 a/nebo MCL1 (Publikace č. 3).

Zjistili jsme, že hlavním mechanismem získané rezistence buněk MCL k cytarabinu je snížení exprese DCK, enzymu, který je nezbytný pro fosforylaci, a tedy aktivaci nukleosidových analogů po jejich vstupu do buňky. Snížení exprese DCK vedle rezistence k cytarabinu způsobuje zkříženou rezistenci k dalším nukleosidovým analogům, které jsou používány v léčbě MCL (např. fludarabin, cladribin, gemcitabin). Výsledky naší práce naznačují, že pacienti, kteří progredují či relabují po režimu založeném na HDAC, by neměli být léčeni nukleosidovými analogy, konkrétně fludarabinem, gemcitabinem a cladribinem (Publikace č. 4).

Věříme, že výsledky naší práce mohou mít dopad na vývoj a testování nových léčebných strategií u DLBCL a MCL.

8 Závěry

Zavedli a charakterizovali jsme několik modelů lidského MCL pomocí xenotransplantace primárních buněk a ustálených linií MCL do imunodeficitních myší. Naše původní hypotéza se potvrdila, primární buňky se přihojují v imunodeficitních myších, ale na rozdíl od ustálených buněčných linií nejsou schopny proliferace *in vitro*, což naznačuje jejich závislost na nádorovém mikroprostředí. Buňky přihojené a proliferující v myších tkáních jsou ve srovnání s *in vitro* rostoucími MCL buněčnými liniemi biologicky odlišné a vykazují rozdílnou senzitivitu k cytotoxickým látkám. Tyto závěry (Publikace č. 1) mohou být významným přínosem pro preklinický výzkum. S využitím námi odvozených myších modelů lidského MCL jsme experimentálně prokázali, že cisplatina v monoterapii či kombinace cisplatin s cytarabinem je účinnější ve srovnání s cytarabinem podávaným v monoterapii. Naše původní hypotéza se potvrdila, naše výsledky jsou zároveň v souladu se závěry klinické studie Nordické lymfomové skupiny, která ukázala, že HDAC podávaný v monoterapii není dostatečně účinnou léčbou u agresivních forem MCL (Publikace č.2).

Zjistili jsme, že DLBCL může být rozdělen na biologicky odlišné podskupiny podle závislosti na antiapoptotickém proteinu BCL2 a/nebo MCL1. Podskupina BCL2 pozitivních DLBCL obsahuje jak BCL2-, tak MCL1-dependentní případy, které mohou být farmakologicky inhibovány pomocí cíleného nízkomolekulárního inhibitoru s názvem ABT-199, rostlinného alkaloidu homoharingtoninu, či jejich kombinace (s významným synergickým efektem), podskupina BCL2-negativních DLBCL se zdá být převážně závislá na proteinu MCL1. Tyto výsledky mohou mít přímý dopad na nové koncepty experimentální terapie DLBCL cílené na inhibici proteinů BCL2 a/nebo MCL1 (Publikace č. 3).

Zjistili jsme, že hlavním mechanismem získané rezistence buněk MCL k cytarabinu je snížení exprese DCK, enzymu, který je nezbytný pro fosforylaci, a tedy aktivaci nukleosidových analogů po jejich vstupu do buňky. Snížení exprese DCK vedle rezistence k cytarabinu způsobuje zkříženou rezistenci k dalším nukleosidovým analogům, které jsou používány v léčbě MCL (např. fludarabin, cladribin, gemcitabin). Výsledky naší práce naznačují, že pacienti, kteří progredují či relabují po režimu založeném na HDAC, by neměli být léčeni nukleosidovými analogy, konkrétně fludarabinem, gemcitabinem a kladribinem (Publikace č. 4).

Věříme, že výsledky naší práce mohou mít dopad na vývoj a testování nových léčebných strategií u DLBCL a MCL.

9 Použitá literatura

- Barth, M. J., C. Mavis, et al. (2015). "Ofatumumab Exhibits Enhanced In Vitro and In Vivo Activity Compared to Rituximab in Preclinical Models of Mantle Cell Lymphoma." Clin Cancer Res **21**(19): 4391-4397.
- Certo, M., V. Del Gaizo Moore, et al. (2006). "Mitochondria primed by death signals determine cellular addiction to antiapoptotic BCL-2 family members." Cancer Cell **9**(5): 351-365.
- Davids MS, R. A., Anderson MA, Pagel JM, Kahl BS, Gerecitano JF "The BCL-2-Specific BH3-Mimetic ABT-199 (GDC-0199) Is Active and Well-Tolerated in Patients with Relapsed Non-Hodgkin Lymphoma: Interim Results of a Phase I Study." Blood (ASH Annual Meeting Abstracts) 2012;120:304.
- Davids, M. S., A. W. Roberts, et al. (2012). "The BCL-2-Specific BH3-Mimetic ABT-199 (GDC-0199) Is Active and Well-Tolerated in Patients with Relapsed Non-Hodgkin Lymphoma: Interim Results of a Phase I Study." ASH Annual Meeting Abstracts **120**(21): 304-.
- Delarue, R., C. Haioun, et al. (2013). "CHOP and DHAP plus rituximab followed by autologous stem cell transplantation in mantle cell lymphoma: a phase 2 study from the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte." Blood **121**(1): 48-53.
- Deng, J., N. Carlson, et al. (2007). "BH3 profiling identifies three distinct classes of apoptotic blocks to predict response to ABT-737 and conventional chemotherapeutic agents." Cancer Cell **12**(2): 171-185.
- Ewald, B., D. Sampath, et al. (2008). "Nucleoside analogs: molecular mechanisms signaling cell death." Oncogene **27**(50): 6522-6537.
- Ferrero, S. and M. Dreyling (2013). "The current therapeutic scenario for relapsed mantle cell lymphoma." Curr Opin Oncol **25**(5): 452-462.
- Galmarini, C. M., J. R. Mackey, et al. (2001). "Nucleoside analogues: mechanisms of drug resistance and reversal strategies." Leukemia **15**(6): 875-890.
- Geisler, C. H., A. Kolstad, et al. (2008). "Long-term progression-free survival of mantle cell lymphoma after intensive front-line immunochemotherapy with in vivo-purged stem cell rescue: a nonrandomized phase 2 multicenter study by the Nordic Lymphoma Group." Blood **112**(7): 2687-2693.
- Hermine, O., C. Haioun, et al. (1996). "Prognostic significance of bcl-2 protein expression in aggressive non-Hodgkin's lymphoma. Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte (GELA)." Blood **87**(1): 265-272.
- Hernandez-Ilizaliturri, F. J., N. Reddy, et al. (2005). "Immunomodulatory drug CC-5013 or CC-4047 and rituximab enhance antitumor activity in a severe combined immunodeficient mouse lymphoma model." Clin Cancer Res **11**(16): 5984-5992.
- Hiraoka, N., J. Kikuchi, et al. (2014). "Purine analog-like properties of bendamustine underlie rapid activation of DNA damage response and synergistic effects with pyrimidine analogues in lymphoid malignancies." PLoS One **9**(3): e90675.
- Honigberg, L. A., A. M. Smith, et al. (2010). "The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 blocks B-cell activation and is efficacious in models of autoimmune disease and B-cell malignancy." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(29): 13075-13080.
- Chapuy, B., H. Cheng, et al. (2016). "Diffuse large B-cell lymphoma patient-derived xenograft models capture the molecular and biological heterogeneity of the disease." Blood **127**(18): 2203-2213.
- Chen, R., L. Guo, et al. (2011). "Homoharringtonine reduced Mcl-1 expression and induced apoptosis in chronic lymphocytic leukemia." Blood **117**(1): 156-164.

- Kendrick, S. L., L. Redd, et al. (2014). "BCL2 antibodies targeted at different epitopes detect varying levels of protein expression and correlate with frequent gene amplification in diffuse large B-cell lymphoma." Hum Pathol **45**(10): 2144-2153.
- Klanova, M., T. Soukup, et al. (2014). "Mouse models of mantle cell lymphoma, complex changes in gene expression and phenotype of engrafted MCL cells: implications for preclinical research." Lab Invest **94**(7): 806-817.
- Lamba, J. K. (2009). "Genetic factors influencing cytarabine therapy." Pharmacogenomics **10**(10): 1657-1674.
- Laurell, A., A. Kolstad, et al. (2014). "High dose cytarabine with rituximab is not enough in first-line treatment of mantle cell lymphoma with high proliferation: early closure of the Nordic Lymphoma Group Mantle Cell Lymphoma 5 trial." Leuk Lymphoma **55**(5): 1206-1208.
- Lefrere, F., A. Delmer, et al. (2002). "Sequential chemotherapy by CHOP and DHAP regimens followed by high-dose therapy with stem cell transplantation induces a high rate of complete response and improves event-free survival in mantle cell lymphoma: a prospective study." Leukemia **16**(4): 587-593.
- Li, L., P. Pongtornpipat, et al. (2015). "Synergistic induction of apoptosis in high-risk DLBCL by BCL2 inhibition with ABT-199 combined with pharmacologic loss of MCL1." Leukemia.
- Lindqvist, L. M., I. Vikstrom, et al. (2012). "Translation inhibitors induce cell death by multiple mechanisms and Mcl-1 reduction is only a minor contributor." Cell Death Dis **3**: e409.
- Mani, R., C. L. Chiang, et al. (2015). "ROR1-targeted delivery of OSU-2S, a nonimmunosuppressive FTY720 derivative, exerts potent cytotoxicity in mantle-cell lymphoma in vitro and in vivo." Exp Hematol **43**(9): 770-774 e772.
- Prasad, A., A. Shrivastava, et al. (2013). "Combined administration of rituximab and on 013105 induces apoptosis in mantle cell lymphoma cells and reduces tumor burden in a mouse model of mantle cell lymphoma." Clin Cancer Res **19**(1): 85-95.
- Romaguera, J. E., L. Fayad, et al. (2005). "High rate of durable remissions after treatment of newly diagnosed aggressive mantle-cell lymphoma with rituximab plus hyper-CVAD alternating with rituximab plus high-dose methotrexate and cytarabine." J Clin Oncol **23**(28): 7013-7023.
- Song, J. H., S. H. Kim, et al. (2009). "Defective expression of deoxycytidine kinase in cytarabine-resistant acute myeloid leukemia cells." Int J Oncol **34**(4): 1165-1171.
- Souers, A. J., J. D. Levenson, et al. (2013). "ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets." Nat Med **19**(2): 202-208.
- Townsend, E. C., M. A. Murakami, et al. (2016). "The Public Repository of Xenografts Enables Discovery and Randomized Phase II-like Trials in Mice." Cancer Cell **30**(1): 183.
- Visco, C., S. Castegnaro, et al. (2012). "The cytotoxic effects of bendamustine in combination with cytarabine in mantle cell lymphoma cell lines." Blood Cells Mol Dis **48**(1): 68-75.
- Visco, C., S. Finotto, et al. (2013). "Combination of rituximab, bendamustine, and cytarabine for patients with mantle-cell non-Hodgkin lymphoma ineligible for intensive regimens or autologous transplantation." J Clin Oncol **31**(11): 1442-1449.

10 Seznam publikací doktoranda

Publikace, které jsou podkladem dizertační práce

1. **Klanova M**, Andera L, Brazina J, Svadlenka J, Benesova S, Soukup J, Prukova D, Vejmelkova D, Jakska R, Helman K, Vockova P, Lateckova L, Molinsky J, Maswabi BC, Alam M, Kodet R, Pytlik R, Trneny M, Klener P. *Targeting of BCL2 Family Proteins with ABT-199 and Homoharringtonine Reveals BCL2- and MCL1-Dependent Subgroups of Diffuse Large B-Cell Lymphoma*. Clin Cancer Res. 2016 Mar 1;22(5):1138-49. IF 8.738
2. **Klanova M**, Soukup T, Jakska R, Molinsky J, Lateckova L, Maswabi BC, Prukova D, Brezinova J, Michalova K, Vockova P, Hernandez-Ilizaliturri F, Kulvait V, Zivny J, Vokurka M, Necas E, Trneny M, Klener P. *Mouse models of mantle cell lymphoma, complex changes in gene expression and phenotype of engrafted MCL cells: implications for preclinical research*. Lab Invest. 2014 Jul;94(7):806-17. IF 4.202
3. **Klanova M**, Lorkova L, Vit O, Maswabi B, Molinsky J, Pospisilova J, Vockova P, Mavis C, Lateckova L, Kulvait V, Vejmelkova D, Jakska R, Hernandez F, Trneny M, Vokurka M, Petrak J, Klener P Jr. *Downregulation of deoxycytidine kinase in cytarabine-resistant mantle cell lymphoma cells confers cross-resistance to nucleoside analogs gemcitabine, fludarabine and cladribine, but not to other classes of anti-lymphoma agents*. Mol Cancer. 2014 Jun 27;13:159. IF 5.888
4. **Klanova M**, Soukup T, Molinsky J, Lateckova L, Vockova P, Alam M, Zivny J, Trneny M, Klener P. *Single-agent cytarabine is insufficient for the treatment of human mantle cell lymphoma in mouse xenograft model*. Neoplasma. 2016;63(5):774-8. IF 1.961

Publikace bez vztaku k dizertační práci – s impact faktorem

1. Maswabi BC, Molinsky J, Savvulidi F, Zikmund T, Prukova D, Tuskova D, **Klanova M**, Vockova P, Lateckova L, Sefc L, Zivny J, Trneny M, Klener P. *Hematopoiesis in patients with mature B-cell malignancies is deregulated even in patients with undetectable bone marrow involvement*. Haematologica. 2017 Apr;102(4):e152-e155. IF 6.671
2. Molinsky J, Maswabi B, Prukova D, **Klanova M**, Vockova P, Zikmund T, Savvulidi F, Alam M, Sefc L, Vokurka M, Obrtlíkova P, Trneny M, Klener P Jr. *Significantly higher numbers of proB cells in healthy Caucasians compared to Asians: Is there association with incidence of CLL?* Blood Cells Mol Dis. 2016 Mar;57:118-9. IF 2.731
3. Lorkova L, Scigelova M, Arrey TN, Vit O, Pospisilova J, Doktorova E, **Klanova M**, Alam M, Vockova P, Maswabi B, Klener P Jr, Petrak J. *Detailed Functional and Proteomic Characterization of Fludarabine Resistance in Mantle Cell Lymphoma Cells*. PLoS One. 2015 Aug 18;10(8):e0135314. IF 4.411
4. Molinský J, **Klánová M**, Maswabi B, Soukup T, Trněný M, Nečas E, Živný J, Klener P. *In vivo growth of mantle cell lymphoma xenografts in immunodeficient mice is positively regulated by VEGF and associated with significant up-regulation of CD31/PECAMI*. Folia Biol (Praha). 2013;59(1):26-31. IF 0.833
5. Pospisilova J, Vit O, Lorkova L, **Klanova M**, Zivny J, Klener P, Petrak J. *Resistance to TRAIL in mantle cell lymphoma cells is associated with the decreased expression of purine metabolism enzymes*. Int J Mol Med. 2013 May;31(5):1273-9. IF 2.348

6. Beranova L, Pombinho AR, Spegarova J, Koc M, **Klanova M**, Molinsky J, Klener P, Bartunek P, Andera L. *The plant alkaloid and anti-leukemia drug homoharringtonine sensitizes resistant human colorectal carcinoma cells to TRAIL-induced apoptosis via multiple mechanisms*. Apoptosis. 2013 Jun;18(6):739-50. IF 3.592
7. Leahomschi S, Molinsky J, **Klanova M**, Andera L, Peterka M, Gasova Z, Klener P Sr, Trneny M, Necas E, Simonova T, Zivny J, Klener P Jr. *Multi-level disruption of the extrinsic apoptotic pathway mediates resistance of leukemia cells to TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)*. Neoplasma. 2013;60(2):223-31. IF 1.961
8. Molinsky J, **Klanova M**, Koc M, Beranova L, Andera L, Ludvikova Z, Bohmova M, Gasova Z, Strnad M, Ivanek R, Trneny M, Necas E, Zivny J, Klener P. *Roscovitine sensitizes leukemia and lymphoma cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis*. Leuk Lymphoma. 2013 Feb;54(2):372-80. IF 3.093

Publikace bez vztaku k dizertační práci – bez impact faktoru

1. **Klanova M**, Klener P, Trneny M, Straub J, Spicka I. *Intrapleural bortezomib for the therapy of myelomatous pleural effusion: a case report*. Case Reports Immunol. 2012;2012:978479.