

**Svoluji k zapůjčení mé diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovateli. Převzaté údaje je vypůjčovateli nucen řádně ocitovat.**

**Univerzita Karlova v Praze  
Přírodovědecká fakulta  
Katedra genetiky a mikrobiologie**

**Změny v hladinách transkriptů WT1,  
Bcl-2, p21Cip, Ki-67 a mBCR-ABL  
v průběhu chronické myeloidní leukémie**

**Tereza Lopotová**

**Praha, 2007**

Vedoucí práce: **RNDr. Jana Moravcová, CSc.**

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

*[Signature]*

*Děkuji vedoucí práce, RNDr. Janě Moravcové, Csc. za věnovaný čas, předané zkušenosti a velmi laskavý přístup.*

*Dále děkuji Mgr. Janě Rulcové, Bc. Václavě Zmekové, Kateřině Vlčanové a Mgr. Karlu Fišerovi, PhD. za uvedení do základních molekulárně biologických metod.*

*Mgr. Kateřině Machové, PhD. děkuji za uvedení do problematiky detekce mutací a za poskytování cenných rad v průběhu práce.*

*Mgr. Jaroslavu Polákovi děkuji za poskytnutí standardů pro PCR v reálném čase a praktických rad při používání této metody.*

*RNDr. Zdeně Zemanové, CSc. a MUDr. Haně Klamové, CSc. děkuji za poskytnutí cytogenetických a klinických údajů týkajících se pacientů.*

*Celému kolektivu Oddělení molekulární genetiky ÚHKT, oddělení molekulární genetiky děkuji za vytvoření příjemného pracovního prostředí.*

Diplomová práce byla prováděna v letech 2005 až 2007 v rámci grantového projektu NR/8758-3 IGA MZ ČR s názvem „Časné markery rezistence k imatinibu při léčbě chronické myeloidní leukémie“.

## **Changes in the levels of WT1, Bcl-2, p21Cip, mBCR-ABL, and Ki-67 transcripts in the course of chronic myeloid leukemia (CML)**

Imatinib mesylate is a prototype of a molecular targeted therapy now used successfully in clinical practice in treatment of CML and other diseases. Some patients with CML, however, experience primary or secondary resistance to this drug. The aim of this study was to determine potential new markers of resistance to this type of therapy.

We monitored changes in the levels of WT1, Ki-67, p21Cip, mBCR-ABL, and Bcl-2 transcripts by reverse transcriptase real-time PCR using TaqMan probes. After comparing both today used quantitative methods – 1) with the use of standard curve and 2) the two delta delta Ct method, we chose the latter one. The first step in finding a new marker was statistical analysis of differences in gene expression in various types of response to the treatment. For statistical analysis we used ANOVA test or Kruskal-Wallis test. As the tests for multiple comparison, the Tukey's and Dunn's tests were used.

The results of statistical analysis showed that the only possible early marker of relapse on therapy from the genes monitored in this study was WT1. The others were rather possible markers of blastic phase of the disease (p21Cip, Bcl-2) or poor response to treatment (Ki-67). The results of monitoring kinetics of changes in 18 patients mostly confirmed the results obtained from statistical analysis. Mutations in BCR-ABL kinase domain do not seem to have any influence on the expression of all those genes.

The amounts of mBCR-ABL were very low or undetectable in patients' blood samples. Therefore, it was not possible to quantify it. The mBCR-ABL was detected rather in cells from patients with suboptimal response or resistance to treatment.

**Key words:** CML, BCR-ABL, imatinib, resistance, mutation, marker, gene expression, WT1, p21Cip, Bcl-2, Ki-67, mBCR-ABL

**Klíčová slova:** CML, BCR-ABL, imatinib, rezistence, mutace, marker, genová exprese, WT1, p21Cip, Bcl-2, Ki-67, mBCR-ABL

# Obsah

<b>1. Úvod .....</b>	<b>10</b>
<b>2. Přehled literatury .....</b>	<b>12</b>
2.1. Charakteristika chronické myeloidní leukémie (CML) .....	12
2.1.1. Klinická charakteristika a časový průběh CML .....	12
2.1.2. Epidemiologie.....	12
2.2. Biologie CML .....	13
2.2.1. Ph translokace, fúzní geny a jejich součásti .....	13
2.2.1.1. Philadelphský chromozóm .....	13
2.2.1.2. Geny účastníci se Ph translokace a fúzní produkt translokace.....	14
2.2.1.2.1. Gen c-abl a jeho produkt.....	14
2.2.1.2.2. Gen bcr a jeho produkt.....	15
2.2.1.2.3. Fúzní gen BCR-ABL a jeho produkt .....	16
2.2.1.2.4. Fúzní gen ABL-BCR a jeho produkt .....	17
2.2.2. Charakteristické znaky leukemických buněk .....	17
2.2.2.1. Morfologické, biochemické a funkční abnormality CML buněk .....	17
2.2.2.2. Mitogenní signalizace a inhibice apoptózy .....	18
2.2.2.3. Změny buněčného cyklu .....	19
2.2.2.4. Deregulace degradace proteinů proteazómy .....	19
2.2.2.5. Vyšší rychlost zkracování telomer .....	19
2.2.2.6. Změny sestřihu .....	20
2.2.2.7. Nezávislost CML buněk na růstových faktorech .....	20
2.2.3. Signální dráhy ovlivňované BCR-ABL .....	20
2.2.3.1. Ras/Raf/MEK/ERK dráha .....	20
2.2.3.2. JAK/STAT dráha.....	21
2.2.3.3. Fosfatidylinositol-3kinázová (PI3K) dráha .....	22
2.2.4. Mechanizmy progresu CML .....	23
2.2.4.1. Genetická nestabilita a role sekundárních genetických abnormalit v progresi CML .....	23
2.2.4.2. Progrese nezávislá na BCR-ABL .....	25
2.2.4.3. Navození sebeobnovovacího potenciálu CML progenitorů .....	25
2.2.4.4. Blokování diferenciac.....	25
2.2.4.5. Hypermetylace promotorových oblastí některých genů.....	25
2.3. Léčba CML.....	26
2.3.1. Současné léčebné postupy .....	26
2.3.1.1. Transplantace kmenových buněk (TKB).....	26
2.3.1.2. Chemoterapie .....	26
2.3.1.3. Interferon $\alpha$ (IFN) .....	27
2.3.1.4. Molekulárně cílená terapie ( MCT ).....	27
2.3.1.4.1. Imatinib mesylát .....	27
2.3.1.4.2. Dasatinib .....	30
2.3.2. Odpovědi pacientů na léčbu a možnosti predikce těchto odpovědí.....	31
2.3.2.1. Monitorování odpovědi na léčbu.....	31
2.3.2.2. Kritéria odpovědi na léčbu .....	32
2.3.2.3. Potenciální nové molekulární markery.....	35
2.3.2.3.1. WT1 .....	35
2.3.2.3.2. Bcl-2.....	36
2.3.2.3.3. p21Cip.....	37
2.3.2.3.4. Ki-67 .....	38
2.3.2.3.5. mBCR.-ABL .....	38
<b>3. Materiál a metody .....</b>	<b>39</b>
3.1. Materiál.....	39

3.1.1.	Použité roztoky, chemikálie, reagensie .....	39
3.1.1.1.	Roztoky a chemikálie použité při izolaci buněk.....	39
3.1.1.2.	Roztoky a chemikálie použité při izolaci RNA.....	39
3.1.1.3.	Reagensie a roztoky použité při reverzní transkripci (RT) .....	40
3.1.1.4.	Roztoky a chemikálie použité při elektroforéze RNA/DNA.....	40
3.1.1.5.	Roztoky a reagensie použité při „end-point“ PCR a při PCR v reálném čase.....	40
3.1.1.6.	Materiál a roztoky použité pro purifikaci produktů PCR.....	41
3.1.1.7.	Roztoky a reagensie použité pro sekvenaci.....	42
3.1.2.	Laboratorní materiál .....	42
3.1.3.	Přístrojové vybavení a použitý software.....	42
3.1.4.	Biologický materiál .....	43
3.2.	Metody.....	43
3.2.1.	Příprava roztoků .....	43
3.2.2.	Izolace celkových leukocytů z periferní krve.....	44
3.2.3.	Izolace RNA .....	45
3.2.3.1.	Izolace RNA kyselou fenol-chloroformovou extrakcí (CHOMCZINSKY, SACCHI 1987, modifikace dle MORAVCOVÁ et al. 1998) .....	45
3.2.3.2.	Izolace RNA pomocí RNeasy kitu (Quiagen).....	46
3.2.4.	Elektroforéza nukleových kyselin .....	46
3.2.4.1.	Elektroforéza RNA.....	46
3.2.4.2.	Elektroforéza DNA.....	47
3.2.5.	Stanovení koncentrace nukleových kyselin.....	47
3.2.6.	Reverzní transkripce.....	47
3.2.7.	Testy primerů a sond pro PCR v reálném čase.....	48
3.2.8.	Příprava standardů pro PCR v reálném čase.....	48
3.2.9.	PCR v reálném čase.....	49
3.2.9.1.	Princip PCR v reálném čase .....	49
3.2.9.2.	Postup.....	52
3.2.9.3.	Metody kvantifikace.....	54
3.2.9.3.1.	Kvantifikace pomocí standardní křivky (tzv. absolutní kvantifikace).....	54
3.2.9.3.2.	Kvantifikace metodou delta delta Ct (tzv. relativní kvantifikace).....	56
3.2.9.4.	Hodnocení exprese mBCR-ABL.....	56
3.2.10.	Statistická hodnocení.....	56
3.2.11.	Příprava PCR produktu pro sekvenaci.....	57
3.2.11.1.	Dvoustupňová PCR .....	57
3.2.11.2.	Přečištění produktů 2.PCR .....	58
3.2.11.3.	Kontrola specifity PCR .....	59
3.2.11.4.	Sekvenační reakce .....	59
3.2.11.5.	Přečištění produktu sekvenační reakce.....	59
3.2.11.6.	Příprava vzorku pro sekvenaci .....	60
3.2.12.	Vyhodnocení sekvenace .....	60
<b>4.</b>	<b>Výsledky.....</b>	<b>61</b>
4.1.	Opakovatelnost a reprodukovatelnost PCR v reálném čase.....	61
4.2.	Porovnání kvantifikace pomocí standardní křivky a kvantifikace metodou delta delta Ct.....	64
4.3.	Statistické hodnocení rozdílnosti exprese WT1, p21Cip, Bcl-2 a Ki-67 u různých odpovědí na léčbu .....	64
4.3.1.	Expres WT1 .....	65
4.3.2.	Expres Bcl-2 .....	65
4.3.3.	Expres p21Cip.....	65
4.3.4.	Expres Ki-67 .....	66
4.4.	Výsledky sledování kinetiky exprese genů WT1, Bcl-2, p21Cip, a Ki-67 .....	71
4.4.1.	Pacienti s dobrou odpovědí na léčbu .....	74
4.4.2.	Pacienti s primární rezistencí k imatinibu .....	75
4.4.3.	Pacienti se sekundární rezistencí k imatinibu.....	76



4.4.3.1.	Pacienti, u nichž byla nalezena mutace BCR-ABL kinázové domény.....	76
4.4.3.2.	Pacienti, u nichž nebyla nalezena mutace kinázové domény BCR-ABL.....	77
4.4.4.	Pacienti se suboptimální odpovědí bez relapsu .....	79
4.5.	Hodnocení exprese mBCR-ABL .....	99
4.5.1.	Výskyt mBCR-ABL ve vzorcích pacientů s různou odpovědí na léčbu .....	99
4.5.2.	Výskyt mBCR-ABL u jednotlivých pacientů v průběhu onemocnění .....	100
4.5.3.	Porovnání výskytu mBCR-ABL u pacientů s mutací a bez mutace kinázové domény BCR-ABL .....	105
<b>5.</b>	<b>Diskuze .....</b>	<b>106</b>
<b>6.</b>	<b>Souhrn .....</b>	<b>113</b>
<b>7.</b>	<b>Prezentace:.....</b>	<b>114</b>
<b>8.</b>	<b>Seznam zkratk .....</b>	<b>115</b>
<b>9.</b>	<b>Seznam literatury .....</b>	<b>117</b>

# 1. Úvod

Chronická myeloidní leukémie je onemocnění známé již od roku 1845 a posledních zhruba dvacet let velmi intenzivně studované. Za tuto dobu výzkum dosáhl alespoň částečného pochopení patogeneze onemocnění a umožnil tak vývoj nových, účinnějších léků. V klinické praxi se tak dnes s úspěchem používá imatinib mesylát, prototyp molekulárně cílené terapie. Spolu se zavedením monitorování pacientů na molekulární úrovni (sledování exprese BCR-ABL citlivou metodou reverzně transkriptázové PCR) tento lék umožnil výrazné prodloužení a zároveň také zkvalitnění života pacientů s CML.

Stále však existují pacienti, kteří vykazují rezistenci k léčbě, nebo odpovídají nedostatečně a posléze progredují do fatální terminální fáze onemocnění – blastické krize. Proto je nutné nalézt markery, které by byly schopny tuto progresi odhalit a potvrdit ji v časném stádiu, aby bylo možné včas změnit a zintenzívnit léčbu a pokusit se tento nepříznivý vývoj zastavit nebo alespoň oddálit. Nejsme navíc daleko od doby, kdy pacienti budou mít výrazně více možností léčby, než mají dnes. Potom bude především důležité, abychom byli schopni rozhodnout o vhodnosti daného typu léčby pro konkrétního pacienta. V tomto ohledu budou molekulární markery jakožto markery nejčasnější velmi významné. K nalezení takových markerů směřovala i tato práce.

## **Cíle práce:**

Cílem diplomové práce bylo hledání potenciálních nových markerů dobré a špatné odpovědi na léčbu imatinibem u pacientů s CML, dále se zaměřením na markery přechodu chronické fáze onemocnění do fáze akcelerované a blastické krize. Tyto markery by měly doplnit a upřesnit informace získané monitorováním hladiny BCR-ABL – specifického markeru CML.

Jako potenciální markery byly testovány geny WT1, Ki-67, p21Cip, Bcl-2 a transkript mBCR-ABL, který vzniká alternativním sestřihem pre-mRNA BCR-ABL.

Úkolem bylo:

1. Zavést metody kvantitativní reverzně transkriptázové PCR v reálném čase pro sledování hladin jednotlivých transkriptů.
2. Kvantifikovat hladiny transkriptů ve vzorcích pacientů s různou odpovědí na léčbu.
3. Statisticky vyhodnotit schopnost jednotlivých transkriptů charakterizovat stav onemocnění a určit možnost jejich použití jako markerů průběhu onemocnění.
4. Sledovat změny v hladinách daných transkriptů u pacientů s CML v průběhu léčby a graficky zobrazit kinetiku změn.
5. Metodou přímého sekvenování detekovat mutace v kinázové doméně BCR-ABL u pacientů sledované skupiny, u kterých byla zjištěna primární nebo sekundární rezistence k léčbě.
6. Porovnat kinetiku hladin jednotlivých transkriptů s kinetikou transkriptu BCR-ABL a výsledky cytogenetických a hematologických vyšetření.
7. Porovnat výsledky u pacientů s mutacemi v kinázové doméně BCR-ABL a bez mutací a zhodnotit, zda mutace mají či nemají na expresi sledovaných genů vliv.
8. Na základě těchto porovnání charakterizovat jednotlivé transkripty jako potenciální markery stavu a prognózy CML.

## **2. Přehled literatury**

### **2.1. Charakteristika chronické myeloidní leukémie (CML)**

#### **2.1.1. Klinická charakteristika a časový průběh CML**

Chronická myeloidní leukémie (CML) je neoplastické onemocnění, které vzniká v důsledku maligní transformace kmenové hematopoetické buňky. Jsou proto postiženy všechny krevní řady. CML je charakterizována progresivním průběhem, kdy lze většinou rozeznat tři stádia. První stádium se nazývá chronická fáze (CP) a jedná se v podstatě o fázi preneoplastickou. Je charakterizována silnou expanzí myeloidní řady, buňky jsou ale většinou plně diferencované. Onemocnění v CP dobře odpovídá na léčbu a po snížení počtu bílých krvinek jsou pacienti většinou bez významnějších klinických potíží. Při konvenční léčbě dochází zhruba po třech až šesti letech k akceleraci onemocnění (akcelerovaná fáze, AP) a většinou k rychlému přechodu do blastické krize (BC), terminálního stádia CML. CML v blastické krizi připomíná svojí prudkostí akutní leukémie. Je však velmi odolná k léčbě a většinou po krátké době končí smrtí pacienta. Jednotlivé případy blastické krize se liší morfologií blastů. U zhruba 60% případů mají blasty myeloidní morfologii a exprimují myeloidní markery, v dalších 30% se objevuje fenotyp podobný akutní lymfoidní leukémii. Pacienti s lymfoidní blastickou krizí odpovídají na léčbu účinnou při akutní lymfoidní leukémii. Zbýlých 10% tvoří vzácné zvraty s megakaryoblasty a erytroblasty.

CML je onemocnění značně heterogenní, agresivita a příznaky se liší u jednotlivých pacientů. K běžným příznakům patří jinak nevysvětlitelné horečky, ztráty váhy, zvýšená únava, bolesti kloubů a kostí atd. (CLARKSON et al. 2003).

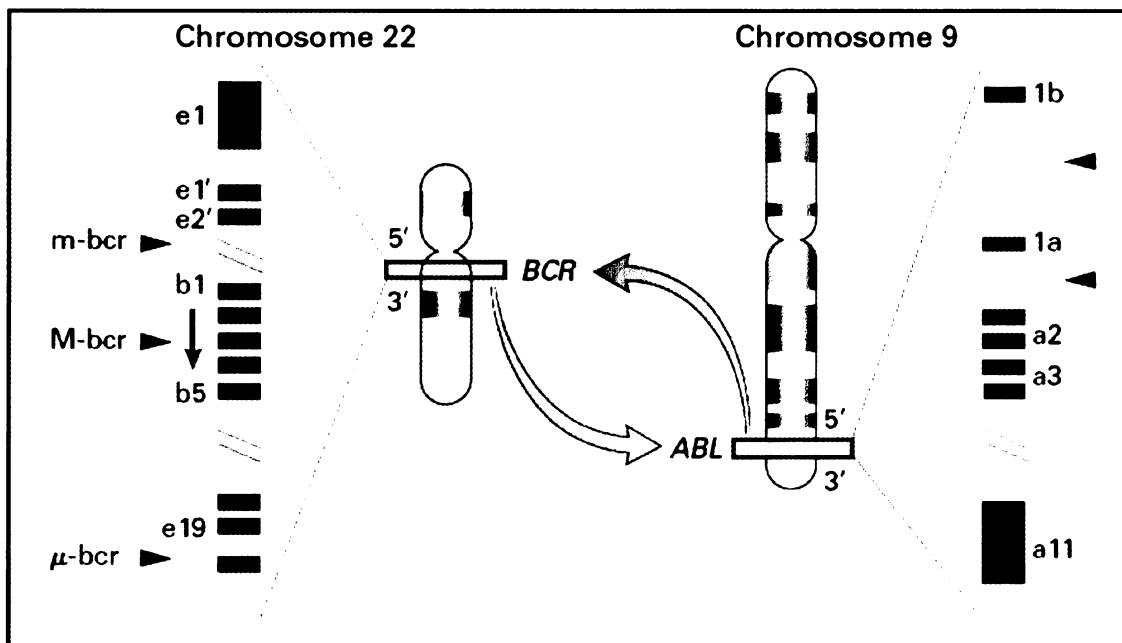
#### **2.1.2. Epidemiologie**

Incidence CML se uvádí mezi 1 až 2 případy na sto tisíc lidí. V rámci všech leukémií tvoří CML asi 15% až 20%. Výskyt onemocnění roste s věkem, maxima dosahuje v šesté věkové dekádě. Poměr mužů a žen trpících CML je 3:2. Důkazy o rodinném výskytu jsou vzácné (MEYER et al. 2002, ADAM et al. 2001)

## 2.2. Biologie CML

### 2.2.1. Ph translokace, fúzní geny a jejich součásti

Příčinou rozvoje CML je reciproká translokace mezi chromozómy 9 a 22 (viz obr. 2.1), kterou vzniká fúzní gen BCR-ABL. O produktu genu BCR-ABL, proteinu p210 BCR-ABL bylo prokázáno, že hraje zásadní roli v patogenezi CML.



Obr. 2.1 Translokace  $t(9;22)(q34;q11)$  - červené šipky naznačují nejčastější zlomové oblasti (FADERL a TALPAZ 1999)

#### 2.2.1.1. Philadelphský chromozóm

Produktem Ph translokace a zároveň cytogenetickým markerem CML je tzv. Philadelphský (Ph) chromozóm. Jedná se o chromozóm 22 zkrácený reciprokou translokací  $t(9,22)(q34,q11)$ . Ph chromozóm je detekován přibližně u 95% pacientů s CML, menší procentuální zastoupení má také u některých dalších typů leukémií.

U 5% pacientů se nevyskytuje klasický Ph chromozóm, ale tzv. komplexní translokace, která zahrnuje ještě další chromozómy. U těchto pacientů je detekován fúzní gen BCR-ABL.

Mechanismus, jakým je Ph chromozóm poprvé vytvořen, je zatím neznámý. Jediným skutečně dokázaným vnějším faktorem je ionizující záření. Latence mezi

expozicí záření a rozvojem choroby je čtyři až deset let (DEININGER et al. 1998). Translokaci by mohly napomoci také 76 kb dlouhé duplikony v blízkosti genů BCR a ABL (SALGIO et al. 2002). Vliv může mít i přiblížení obou genů v jádře hematopoetických prekursorů při přechodu z S do G2 a během G2 fáze buněčného cyklu (NEVES et al. 1999).

Přítomnost fúzního transkriptu BCR-ABL byla prokázána i v krvi přibližně 27% zdravých jedinců, jiná forma BCR-ABL označovaná jako minor (mBCR-ABL) dokonce v 69% testovaných vzorků (BOSE et al. 1998). Existují v zásadě dvě teorie, které vysvětlují, proč většina těchto lidí CML neonemocní – buď se imunitnímu systému podaří včas maligní klon vymýtit, nebo se jedná o buňku v terminálním stádiu diferenciaci, která se již dále nedělí a nemůže dát vznik malignímu klonu.

## 2.2.1.2. Geny účastníci se Ph translokace a fúzní produkt translokace

### 2.2.1.2.1. *Gen c-abl a jeho produkt*

Gen *abl* je lidský homolog *v-abl* onkogenu Abelsonova viru, který způsobuje leukémii u myší. Leží v oblasti 9q,34, je dlouhý 225 kb. Transkribuje se z něho 6 nebo 7 kb dlouhá mRNA. První exon se vyskytuje ve dvou variantách 1b nebo 1a.

Protein ABL (145 kD) je nереceptorová tyrozin kináza. Pokud N-konec proteinu tvoří exon 1a, potom se kináza vyskytuje v jádře. Exon 1b umožňuje myristylaci a výsledný protein je tak kotven v cytoplazmatické membráně buňky. Uvnitř proteinu nacházíme několik významných domén, viz. obr. 2.2. Jako vazebná místa pro různé proteiny účastníci se signální transdukce slouží ABL kináze SH2 a SH3 domény. Vlastní kinázová doména (SH1) je tvořena 260 aminokyselinami. Na prolin bohaté oblasti v centru molekuly proteinu umožňují interakce s SH3 doménami dalších proteinů. Směrem k C-konci byly nalezeny jaderný lokalizační signál, tři kyselé DNA vázající oblasti rozpoznávající AT bohaté sekvence a jeden aktin vázající motiv.

Kinázová aktivita ABL je za normálních podmínek přísně regulována. Jedním z jejích regulátorů je Rb protein, který kinázu váže a tím inhibuje. Hyperfosforylace Rb při přechodu buňky do S fáze buněčného cyklu potom způsobí rozpad komplexu Rb-ABL a kináza je tak v S fázi aktivní (WELSH a WANG 1993). Podle jiných prací je pro regulaci aktivity ABL primárně významná inhibiční interakce SH3 domény s linkerem mezi katalytickou doménou a SH2 doménou. Regulátory ABL pak patrně způsobují

narušení této interakce a tedy aktivaci kinázy nebo naopak (BARILA et SUPERTI 1998). Na regulaci cytoplazmatického ABL se podílí také BCR (XIAOYANG et al. 2003). Mimo to je ABL regulován adhezí buňky, disociace od extracelulární matrix jej inhibuje (WOODRING et al. 2001).

Jaderný ABL je významný proapoptotický protein, který hraje klíčovou roli v buněčné odpovědi na genotoxický stres. ABL se podílí na spuštění apoptózy v buňkách vystavených ionizujícímu nebo gama záření (AGAMI et al. 1999, YUAN et al. 1999). Jedním z nově zjištěných substrátů ABL je I $\kappa$ B kináza. Fosforylací této kinázy ABL aktivuje Nf $\kappa$ B dependentní dráhu a umožňuje apoptózu (KAWAI et al. 2002). Mimo to cytoplazmatický c-ABL hraje významnou roli v transmissi integrinové signalizace (LEWIS et al. 1996).



**Obr. 2.2 Schématické znázornění proteinu p145ABL – SH1-3 – Src homologii domény 1 až 3, NLS – jaderné lokalizační signály, DBD – DNA vazebná doména, NES – jaderný exportní signál, ABD – aktin vazebná doména (část G vázající globulární a část F vázající filamentární aktin) (REN 2005)**

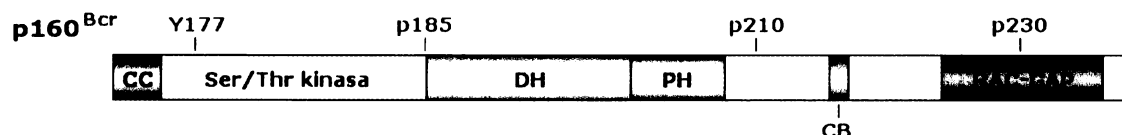
#### 2.2.1.2.2. Gen bcr a jeho produkt

Gen bcr leží v oblasti 22q,11.21. Je dlouhý 135 kb, zahrnuje 23 exonů a jeho přepisem vznikají 2 mRNA – 4,5 a 6,7 kb dlouhé.

Produktem genu je v obou případech 160 kDa velký protein vykazující Ser/Thr kinázovou aktivitu. BCR protein (169 kDa), viz obr. 2..3, má několik funkčních domén, z nichž jednou z nejdůležitějších je oligomerizační doména s coiled-coil motivem, která je kódována prvním bcr exonem a zajišťuje oligomerizaci BCR proteinu. Další významné oblasti jsou SH2 vázající doména, DH (Dbl homology) doména s GEF (guanin nucleotide exchange factor) funkcí a PH (plecstrin homology) doména. C-konec proteinu má GTPázovou aktivitu pro Rac, malou GTPázu z Ras superrodiny, která reguluje polymerizaci aktinu a aktivitu NADPH oxidázy ve fagocytujících buňkách (DIEKMAN et al. 1991, HEYWORTH et al. 1993). BCR je exprimován ve

všech tkáních, zvláště v embryogenezi (FIORETOS et al. 1995) a jeho buněčná lokalizace je zejména cytoplazmatická (DHUT et al. 1990).

Oblast BCR proteinu kódovaná prvním bcr exonem inhibuje aktivitu ABL i BCR-ABL tyrozinkinázy (LIU et al. 1996). Dále BCR funguje také jako negativní regulátor Wnt dráhy interakcí s  $\beta$ -kateninem. BCR-ABL však tuto regulaci ruší fosforylací BCR, která brání vazbě  $\beta$ -kateninu (RESS a MOELLING 2005).



**Obr. 2.3 Schématické znázornění proteinu BCR** – CC – oligomerizační coiled-coil motiv, Ser/Thr kinasa – serin/threonin kinázová doména, DH – Dbl guanin nucleotide exchange factor homologní doména, Ph – plecstrin homologii doména, CB – předpokládaná doména závislá na vápníku vážící lipidy, RAC-GAP – GTPase Rac activating doména, p185 a p210 jsou nejčastější místa zlomu a Y177 je vazebné místo pro adaptorový protein Grb2 (LAURENT al. 2001)

### 2.2.1.2.3. Fúzní gen BCR-ABL a jeho produkt

Ph translokací dochází k připojení téměř celého genu abl z 9q34 za počáteční exony genu bcr na 22q11, viz obr. 2.4. Zlomové oblasti jsou lokalizovány téměř výlučně v oblastech intronů. Zlom v genu abl nastává v oblasti delší než 300 kb na jeho 5' konci před 1b, za 1a, nebo nejčastěji mezi těmito dvěma exony (MELO 1996). Výsledný transkript BCR-ABL je však vždy sestřižen tak, že abl sekvence v BCR-ABL začíná exonem 2 (MORRIS et al. 1991).

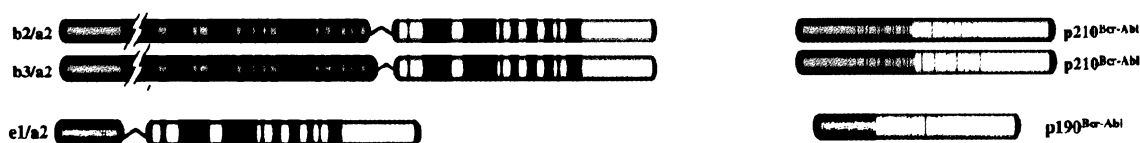
Zlomové oblasti uvnitř genu bcr spadají při CML do jedné ze dvou oblastí, označovaných v anglické literatuře break point cluster regions ( odtud název BCR ): Více než 90% pacientů s CML má zlom v oblasti dlouhé 5,8 kb, která obsahuje exony 12 až 16, označované také jako b1 až b5. Tato sekvence se nazývá major break point cluster region (M-bcr). Díky alternativnímu sestřihu mohou vznikat fúzní transkripty se spojením e13a2 (b2a2) nebo e14a2 (b3a2), viz obr. 3. Obě mRNA jsou potom překládány do p210 BCR-ABL proteinu (HEISTERKAMP et al. 1985). Ten nejčastěji způsobuje právě CML, ale může být spojován i s ALL, AML a vzácně také s dalšími



onemocněními. (Označení BCR-ABL v dalším textu znamená právě p210 či MBCR-ABL, nebude-li uvedeno jinak. )

U pacientů s CML se zřídka vyskytuje také zlom v oblasti dlouhé 54,4 kb mezi alternativními exony e2' a e2, která nese označení minor break point cluster region (m-bcr). Vzniklá e1a2 mRNA se překládá do proteinu p190BCR-ABL (HERMANS et al. 1987), někdy označovaného také jako p185.

Někdy se vyskytují i případy CML s jinými spojeními BCR-ABL, jako např. b2a3 (MORA VCOVÁ et al. 2005).



**Obr. 2.4 Fúzní geny a jejich proteinové produkty** – vlevo – fúzní geny, vpravo – proteiny, znázorněny jsou fúzní varianty, které se v souvislosti s CML vyskytují nejčastěji (REN 2005)

BCR-ABL funguje v buňkách jako tyrozinkináza a vyskytuje se na rozdíl od ABL výhradně v cytoplazmě. V důsledku ztráty prvního exonu a fúze s BCR je BCR-ABL kináza konstitutivně aktivní, zcela neregulovaná.

#### 2.2.1.2.4. Fúzní gen ABL-BCR a jeho produkt

Ph translokací vzniká kromě Ph chromozómu také nový 9q+ chromozóm. Přibližně u 20% pacientů se v tomto chromozómu vyskytují delece, které pravděpodobně vznikají již již v průběhu Ph translokace. Pokud jsou dostatečně velké, ukázalo se, že mohou souviset s významně kratší dobou přežití. Horší prognóza se však patrně týká pouze pacientů léčených interferonem  $\alpha$  (IFN), nikoliv pacientů léčených imatinibem. (HUNTLEY et al. 2003). Přítomnost mRNA ABL-BCR je nalézána přibližně u 70% pacientů (MELO et al. 1993).

### 2.2.2. Charakteristické znaky leukemických buněk

#### 2.2.2.1. Morfologické, biochemické a funkční abnormality CML buněk

Pro CML buňky jsou typické některé morfologické abnormality jako např. hyper- nebo hyposegmentace nebo prstencové jádro polymorfonukleárních leukocytů

(LANGENHIJSEN 1984). U zralých i nezralých CML buněk byla pozorována přítomnost eosinofilních i basofilních granulí v jedné buňce, která ukazuje na atypičnost rozvoje buněčných řad při CML (DOAN a REINHART 1941).

Mezi biochemické abnormality patří např. hypersialyzace membránových proteinů nebo různé kvantitativní změny membránových proteinů a proteinů granul (BAKER et al. 1985, EVANS et al. 1985). Tyto odlišnosti od zdravých buněk pak způsobují různé funkční defekty. Mezi ně patří opožděná migrace neutrofilů do extravaskulárního prostoru, zhoršení fagocytárních a baktericidních aktivit, defektní chemotaxe (BANERJII et al. 1972, ANKLESARIA et al. A 1985, ANKLESARIA et al. B 1985) nebo defektní adheze. CML buňky i jejich progenitory se špatně váží k stromatu, především k fibronektinu, glykoproteinu extracelulární matrix kostní dřeně. CML buňky se naopak narozdíl od normálních progenitorů váží k bazálním membránám, především přes vazbu na kolagen typu IV. To přispívá k jejich množení, protože za normálního stavu je interakce hematopoetických kmenových buněk s mikroprostředím kostní dřeně významná pro regulaci proliferace a diferenciaci (VERFAILLIE et al. 1992). Význam zde může mít zjištěná nízká exprese LFA-3 (CD58), L-selektinu, chemokinových receptorů a dalších molekul významných pro adhezi CML buněk (JONGEN-LAVRENIC et al. 2005). Mimo to BCR-ABL přispívá ke zvýšené polymeraci F-aktinu, který pak snižuje mobilitu integrinů uvnitř membrány a brání tak jejich klastrování (WERTHEIM et al. 2003). To vedle adheze ovlivňuje také buněčnou signalizaci a může tedy rovněž přispívat k dalším výše uvedeným funkčním defektům a rozvoji maligního fenotypu buněk.

#### 2.2.2.2. Mitogenní signalizace a inhibice apoptózy

Společným rysem leukemických buněk je zvýšená proliferace a defektní apoptóza. Obojí vede k expanzi maligního klonu.

Společným mechanismem zajišťujícím přežívání a proliferaci hematopoetických buněk je modulace exprese cyklinu D2 a p27Kip1 proteinu (PARADA et al. 2001).

Celkový mechanismus inhibice apoptózy není přesně znám. BCR-ABL zřejmě mimo jiné v CML buňkách blokuje uvolňování cytochromu c z mitochondrií a brání tak aktivaci kaspázy 3 (WICKREMASHINGHE a HOFFBRAND 1999). Kritickou roli hraje proteinkináza C (PKC), která je nutná pro rezistenci k apoptóze indukované

chemoterapeutickými agens (DI BACCO et al. 2000). PKC zprostředkovává fosforylaci BAD proteinu (HOLTZ et al. 2005).

Molekulární podklad vzniku proliferační výhody zatím rovněž není zcela znám. Předpokládá se, že si ji leukemické progenitory zajišťují konstitutivní expresí autokrinních faktorů stimulujících růst - interleukinu 3 (IL-3) a faktoru stimulujícího kolonie granulocytů (G-CSF). Některé experimentální práce ukazují, že BCR-ABL může indukovat expresi zmíněných cytokinů, ale také některých receptorů růstových faktorů (JIANG et al. 1999).

#### 2.2.2.3. Změny buněčného cyklu

Bedi et al. studovali změny v buněčném cyklu způsobené expresí genu BCR-ABL v buňkách linie BaF-3 (pre-B) s konstitutivně exprimovaným BCR-ABL. Zjistili, že BCR-ABL pozastavuje buněčný cyklus na přechodu mezi fázemi G2 a M, případně prodlužuje fázi G2 zesílenou fosforylací cyklin dependentní kinázy, čímž dává buňce čas na opravy škod způsobených cytotoxickými agens (např. léčivy) a na segregaci abnormálního karyotypu (BEDI et al. 1995). BCR-ABL tak brání apoptóze a umožňuje přežívání transformovaných leukemických buněk.

#### 2.2.2.4. Deregulace degradace proteinů proteazómy

V CML buňkách dochází k nadměrné expresi enzymu E2 konjugujícího ubikvitin. Tento enzym přenáší ubikvitin aktivovaný enzymem E1 na ubikvitin-protein-ligázu E3, na kterou se specificky váže substrátový protein. V CML buňkách jsou proto nadměrně degradovány např. p53 a p27Kip, proteiny významné pro udržení normální hematopoézy (SALESSE a VERFAILIE 2003).

#### 2.2.2.5. Vyšší rychlost zkracování telomer

Během života buňky dochází přirozeně ke zkracování telomer, v leukocytech zdravých lidí průměrně o 40 párů bazí za rok. Telomery CML buněk jsou v porovnání s telomery normálních buněk výrazně kratší, průměrný rozdíl je přibližně 1 kb. Rychlost zkracování je větší v akcelerované fázi a blastické krizi než v chronické fázi a

stupeň zkrácení telomery je větší u pacientů, kteří přešli do blastické krize rychle ve srovnání s pacienty, kteří prošli dlouhou chronickou fází (DRUMMOND et al. 2004).

Telomeráza se skládá ze dvou hlavních podjednotek hTR (komplementární sekvence RNA k DNA sekvenci telomery) a hTERT (proteinová katalytická podjednotka s reverzní transkriptázovou aktivitou). Hladina hTR je v CML buňkách snížena, hladina hTERT je srovnatelná s hladinou v normálních Ph- progenitorech. Předpokládá se tedy, že za rychlé zkracování telomer v CML buňkách je zodpovědná deregulace hTR, spolu s vyšší aktivitou buněk v buněčném cyklu (DRUMMOND et al. 2005).

#### 2.2.2.6. Změny sestřihu

Expresie různých proteinů účastnících se tohoto děje je v BCR-ABL + buňkách zvýšena (SALESSE a VERFAILIE 2003). Alternativním sestřihem tak v souvislosti s tím může u některých pacientů docházet ke vzniku mBCR-ABL. Sledování jeho výskytu u pacientů bylo jedním z úkolů této práce.

#### 2.2.2.7. Nezávislost CML buněk na růstových faktorech

CML buňky dosahují nezávislosti na růstových faktorech postupně, v chronické fázi jsou ještě na růstových faktorech závislé. Mechanismus, jakým BCR-ABL+ buňky dosahují nezávislosti na růstových faktorech, není zatím úplně jasný. Významná je zřejmě produkce autokrinně působících faktorů CML buňkami (CLARKSON et al. 2003).

### 2.2.3. Signální dráhy ovlivňované BCR-ABL

Souhrnný obrázek drah významných v BCR-ABL zprostředkované leukemogenezi ukazuje obr. 2.5.

#### 2.2.3.1. Ras/Raf/MEK/ERK dráha

Tato dráha je centrální dráhou signální transdukce, která přenáší signál z různých povrchových receptorů buňky do buněčného jádra. Její stimulace vede k proliferaci buněk a inhibici apoptózy. Je označovaná jako MAPkinázová dráha

(mitogen-activated protein kinase) a může být stimulována mitogeny, cytokiny a růstovými faktory. Může interagovat s JAK/STAT i fosfatidylinositol-3-kinázovou (PI3K) dráhou (STEELMAN et al. 2004).

Ras protein je membránová GTPáza, která se vyskytuje v různých signálních drahách, mimo jiné právě v Raf/MEK/ERK. V řadě lidských maligních onemocnění se lze setkat s jejími mutacemi, v CML jsou však vzácné. BCR-ABL spolu s proteiny Grb2, Shc a Sos stabilizuje aktivní formu Ras proteinu (SKORSKI et al. 1994). Podle některých autorů má Ras v CML antiproliferační účinek, který je potlačován Myc, jehož exprese během progresu CML roste. Myc brání transkripci p21Cip, inhibitoru cyklin dependentních kináz, jehož prostřednictvím Ras působí zastavení buněčného cyklu (GARTEL et al. 2001). Tímto mechanismem tedy Myc ruší Ras proteinem spuštěnou a zřejmě hlavně Raf-MEK-ERK zprostředkovanou dráhu inhibice buněčného růstu (VAQUÉ et al. 2004). Na druhé straně však existují práce, podle nichž Ras při CML stimuluje proliferaci a brání apoptóze (MORGAN M. A. et al 2001). Tento rozpor může být mimo jiné dán nejasnou rolí právě proteinu p21Cip v CML. K deregulaci Ras dráhy v BCR-ABL+ buňkách přispívá zřejmě také nízká hladina produktu genu NF1, neurofibrominu, který funguje jako negativní regulátor Ras dráhy (JONGEN-LAVRENIC et al. 2005).

BCR-ABL aktivuje expresi Raf1. Tento jev se potom podílí na inhibici apoptózy v CML buňkách (SALOMONI et al. 1998). Raf1 aktivuje totiž vedle ERK také signální dráhy vedoucí k aktivaci integrinů a buněčných funkcí regulovaných integriny, které jsou významné pro regulaci proliferace, apoptózy a migrace buněk. Na úrovních níže od BCR-ABL je aktivován přes Rap-1 také B-Raf (MIZUCHI et al. 2005).

### 2.2.3.2. JAK/STAT dráha

Významná signální dráha je také JAK/STAT, která přímo spojuje aktivaci cytokinových receptorů s genovou expresí. Skládá se ze tří rodin proteinů - JAK (Janus family of tyrosinkinases), STAT (signal transducers and activators of transcription) a CIS/SOCS (cytokine-induced SH2-containing proteins/suppressors of cytokine signaling) rodiny, která downreguluje aktivitu JAK/STAT dráhy. Ta začíná aktivací cytokinového receptoru a pokračuje aktivací JAK kinázy, po níž JAK fosforyluje STAT na specifickém tyrozinu. To zajistí jeho dimerizaci, zvýšení stability a přesun do jádra, kde

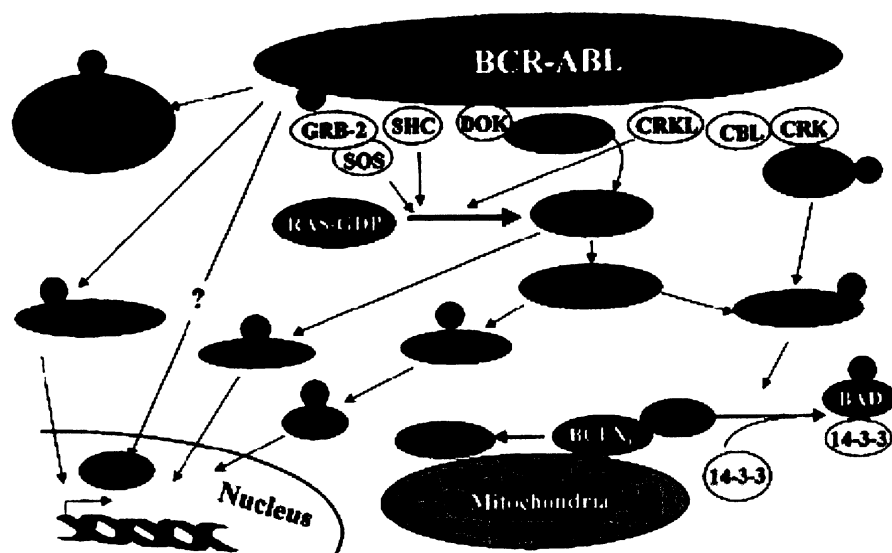
působí jako aktivátor transkripce. Interakci JAK/STAT a RAF/MEK/ERK dráhy představuje fosforylace STAT proteinu na treoninu, kterou zřejmě zprostředkovává ERK a která má regulační úlohu.

STAT faktory mohou být v CML buňkách aktivovány nezávisle na JAK kinázách BCR-ABL proteinem (ILLARIA a VAN ETTEN 1996).

#### 2.2.3.3. Fosfatidylinositol-3kinázová (PI3K) dráha

Fosfatidylinositolkinázy (PIK) představují rodinu proteinů katalyzujících přenos  $\gamma$ -fosfátu z ATP na fosfoinositidy. Patří do ní tři třídy PI3K, z nichž pro hematopoetické buňky je nejdůležitější PI3K první třídy, multipodjednotkový protein regulovaný aktivací receptoru pro růstové faktory. Aktivita PI3K je spojena především s cytoskeletární organizací, buněčným dělením a inhibicí apoptózy. PI3K se skládá z katalytické podjednotky p110 se serin/threoninkinázovou aktivitou a regulační p85 podjednotky, která stabilizuje a inhibuje p110. PI3K fosforyluje fosfoinositidy, které aktivují PDK, fosforylující Akt ( proteinkináza B, PKB ) (STEELMAN et al. 2004).

Pro proliferaci BCR-ABL+ buněk je aktivita PI3 kinázové dráhy podmínkou. Zároveň jde o hlavní dráhu zprostředkující antiapoptotický efekt BCR-ABL (SHET et al. 2002). BCR-ABL nepřímo přes p85, regulační podjednotku, interaguje s PI3K. Ta je pak v komplexu s BCR-ABL a dalšími proteiny, např. Gab2 aktivována (SATTLER et al. 2002). Mimo to BCR-ABL inhibuje expresi SHIP1 fosfatázy, která je jednou z fosfatáz inhibujících aktivitu Akt kinázy (SATTLER et al. 1999).



Obr. 2.5. Signální dráhy ovlivňované BCR-ABL proteinem (GOLDMAN a MELO 2003)

#### 2.2.4. Mechanizmy progresu CML

Mechanismus progresu choroby do fáze blastické krize není dosud plně objasněn. Jsou pouze známy některé dílčí mechanismy nebo jevy, které progresi doprovázejí. Ukazuje se také, že se patrně mechanismy progresu u jednotlivých pacientů liší a tedy, že mechanismů progresu je více.

##### 2.2.4.1. Genetická nestabilita a role sekundárních genetických abnormalit v progresi CML

Během progresu CML dochází v buňkách k navození genetické nestability. Exprese BCR-ABL, která je primárním předpokladem progresu choroby, podporuje vznik sekundárních genetických změn typických pro blastickou krizi přinejmenším nepřímo, zajištěním zvýšené proliferace, která je v tomto směru sama o sobě rizikovým faktorem (CALBRETTEA, PERROTTI 2004). Pro progresi onemocnění je proto vysoce prediktivní kinetika BCR-ABL transkriptů, nárůst hladiny BCR-ABL během léčby je důležitým markerem relapsu a progresu (MORAVCOVÁ et al. 2003).

Přestože je BCR-ABL za normálních podmínek protein výhradně cytoplazmatický, ukázalo se, že v leukemických buňkách vystavených genotoxickému stresu translokuje do jádra, kde narušuje opravu DNA (DIEROV et al. 2004).

Existuje také několik studií poukazujících na vztah mezi expresí BCR-ABL a aktivitou nebo expresí proteinů účastnících se oprav DNA, zvláště dvouřetězcových

zlomů. V BCR-ABL pozitivních buňkách tak byla např. zjištěna snížená hladina DNA-PKcs proteinů, která způsobuje vyšší citlivost vůči ionizujícímu záření a vyšší frekvenci vzniku chromozomálních abnormalit po vystavení buněk tomuto záření. Poruchy oprav DNA spolu s rezistencí k apoptóze mohou být vysvětlením nevyhnutelné progresse choroby směrem k blastické krizi (DEUTSCH et al. 2001). Další studie uvedla do souvislosti expresi BCR-ABL s negativní regulací BRCA 1, proteinu účastnícího se udržování genomové integrity. Nedostatek BRCA 1 v CML buňkách chronické fáze ale i blastické krize má zřejmě za následek častější výměnu sesterských chromatid a zvýšený výskyt chromozomových aberací po poškození DNA (DEUTSCH et al. 2003). Dále existuje také studie zabývající se BCR-ABL dráhou vedoucí ke zvýšené expresi nebo aktivitě RAD51, proteinu, který se účastní oprav a homologních rekombinací. BCR-ABL tak vlastně zvyšuje účinnost těchto oprav prostřednictvím RAD51, čímž však paradoxně snižuje genomickou stabilitu. Příliš vysoká opravná aktivita totiž vede ke zvýšení frekvence inter- i intrachromozomálních delecí a chromozomálních translokací v oblastech Alu sekvencí. Mimo to dochází v CML také k deregulaci i dalších genů významných v opravách DNA, jako jsou XBP (xeroderma pigmentosum group B protein) a DNA polymeráza  $\beta$  (DEUTSCH et al. 2003). Mikrosatelitová instabilita spojována s progresí nádorů se v progresi CML patrně neuplatňuje (MORI et al. 2003).

Sekundární cytogenetické a molekulární změny jsou nalézány během progresse onemocnění směrem k blastické krizi u mnoha pacientů, Bacher et al uvádí 60 až 80 %. V chronické fázi se tyto změny vyskytují pouze přibližně v 5% (BACHER et al. 2004).

Chromozomální aberace zahrnují chromozómy 8, 17, 19 a 22. Mezi nejčastější patří duplikace Ph chromozómu a trizomie chromozómu 8 a naopak spíše výjimečně se objevuje ztráta 7. chromozómu (BACHER et al. 2004). Z molekulárních změn jsou u myeloidní blastické krize časté mutace v oblasti tumor supresorového genu p53 na chromozómu 17 (BRUSA et al. 2003).

Zajímavé je, že 20% až 40% pacientů sekundární abnormality nemá, a přesto je jejich prognóza pouze nepatrně lepší než prognóza pacientů s přídatnými změnami. Tento fakt by mohla vysvětlit teorie, podle níž ke vzniku blastické krize stačí působení BCR-ABL proteinu mechanismem alterované regulace genů závislým na dávce BCR-ABL (CALBRETTEA a PERROTTI 2004).



#### 2.2.4.2. Progrese nezávislá na BCR-ABL

Podle některých studií příčin rezistence na imatinib skutečně dochází u některých pacientů k progresi choroby bez závislosti na BCR-ABL, ve které hraje roli konstitutivně aktivní NfκB (DONATO et al. 2003) nebo nadměrná aktivace Src kináz, např. kinázy LYN. Ta je důležitou složkou cytokinové signální transdukce a hraje klíčovou roli v regulaci růstu a apoptózy hematopoetických buněk. Předpokládá se, že LYN může v některých případech nezávisle na BCR-ABL vyvolávat u CML buněk rezistenci vůči apoptóze a podporovat růst drahami odlišnými od těch, využívaných BCR-ABL (DONATO et al. 2004). Vysoká aktivita LYN byla spojena s overexpresí Bcl-2 (DAI et al. 2004). Exprese Bcl-2 je přitom obecně podmínkou tumorogenní aktivity BCR-ABL (SÁNCHEZ-GARCÍA a GRUTZ 1995).

#### 2.2.4.3. Navození sebeobnovovacího potenciálu CML progenitorů

Jedním z mechanismů přispívajících k progresi CML je aktivace β-kateninové dráhy v granulocyt-makrofágových progenitorech, která vede k navození sebeobnovovacího potenciálu těchto progenitorů. Soudí se, že tento mechanismus se uplatňuje v produkci blastů, která je typická pro blastickou krizi. Mezi cílové geny β-kateinové dráhy patří geny Myc a cyklin D1 (JAMIESON et al. 2004).

#### 2.2.4.4. Blokování diferenciac

Pro blastickou krizi je typická blokáce diferenciac CML buněk. Přesná role BCR-ABL v tomto procesu není zatím známa, ukazuje se ale, že souvisí s narušením regulace některých hematopoetických transkripčních faktorů (SCHUSTER et al. 2003).

#### 2.2.4.5. Hypermetylace promotorových oblastí některých genů

Během progrese dochází ke specifické metylaci promotorových oblastí některých genů, která vede k jejich transkripčnímu umlčení (KUSY et al. 2004). Dochází k tomu např. u promotorů genu c-ABL. Stupeň metylace během progrese roste z nulových hodnot v chronické fázi k hypermethylaci v blastické krizi a postupně tak dochází k inaktivaci c-ABL (ASIMAKOPOULOS et al. 1999). Na progresi onemocnění to může mít vliv proto, že ABL je významný proapoptotický protein.

## 2.3. Léčba CML

### 2.3.1. Současné léčebné postupy

Léčbu CML lze v zásadě rozdělit do dvou skupin - transplantaci a léčbu medikamentózní.

#### 2.3.1.1. Transplantace kmenových buněk (TKB)

Pod tímto pojmem rozumíme přenos kmenových buněk zdravého dárce do oběhu příjemce, kde mají za úkol obnovit krvetvorbu příjemce, předtím chemoterapeuticky úplně nebo částečně zničenou. V klinické praxi jsou využívány tři typy transplantací - alogenní příbuzenská nebo nepříbuzenská, syngenní nebo autologní.

Alogenní transplantace je zatím jedinou metodou, která může vést patrně až k trvalému vyléčení. Protože je CML onemocnění středního až vyššího věku, pro dvě třetiny pacientů nemůže být transplantace indikována jako terapeutický přístup z důvodu vysokého rizika výkonu (PEGGS, MACKINNON 2003). Riziko relapsu po alogenní transplantaci činí přibližně 20%. Zavedení monitorování hladiny BCR-ABL pomohlo změně špatné prognózy relapsu po TKB na dobrou – monitorování umožňuje detekovat relaps včas. V případě, že k relapsu pacienta po alogenní TKB dojde, se s úspěchem používají infuze dárcovských lymfocytů, které působí GVL (graft versus leukemia) efektem, tzv. adoptivní imunoterapie (KOLB et al. 1995), nebo imatinib.

#### 2.3.1.2. Chemoterapie

Při léčbě CML se z chemoterapeutik používají především busulfan, hydroxyurea a cytosin arabinosid (Ara-C, cytarabin).

Busulfan je alkylační činidlo používané ke snížení počtu bílých krvinek. Nevýhodou jsou vedlejší účinky, k nimž patří dlouhodobý útlum krvetvorby, plicní fibrózy a zhoršení výsledků transplantace kmenových buněk (HEHLMANN et al. 1993).

Hydroxyurea, inhibitor ribonukleotidreduktázy, který inhibuje syntézu DNA, vykazuje oproti busulfanu rychlejší účinek a lepší profil vedlejších účinků (HEHLMANN et al. 1993). Hydroxyurea se dnes používá ke snížení počtu bílých krvinek pacientů v době diagnózy.

Cytosin arabinosid brání inkorporaci 2'-deoxycitidinu do DNA. Je schopen při podávání v nízkých dávkách opakovaně u některých pacientů navodit až kompletní cytogenetickou odpověď (ROBERTSON et al. 1993).

#### 2.3.1.3. Interferon $\alpha$ (IFN)

Protinádorový účinek IFN je dán patrně kombinací přímého antiproliferačního účinku a nepřímých účinků zprostředkovaných imunitním systémem. IFN působí stimulačně na NK-buňky a makrofágy a zároveň stimuluje expresi MHC gp I, nádorově specifických antigenů a adhezivních molekul nádorových buněk. Uvádí se také, že IFN má přímé cytostatické efekty na nádorové buňky (JONASCH a HALUSKA 2001). IFN monoterapie navozuje hematologickou až cytogenetickou odpověď u pacientů s CML (TALPAZ et al. 1986). Další zlepšení přineslo použití kombinace IFN s cytarabinem (GUILHOT et al. 1997). Mezi nevýhody IFN patří především různé vedlejší účinky. Z důvodu netolerance tohoto léku přerušuje terapii 10 až 20% pacientů (SILVER et al. 1999).

#### 2.3.1.4. Molekulárně cílená terapie (MCT)

Principem MCT je specifická inhibice některé z molekul účastných na vzniku, resp. rozvoji CML.

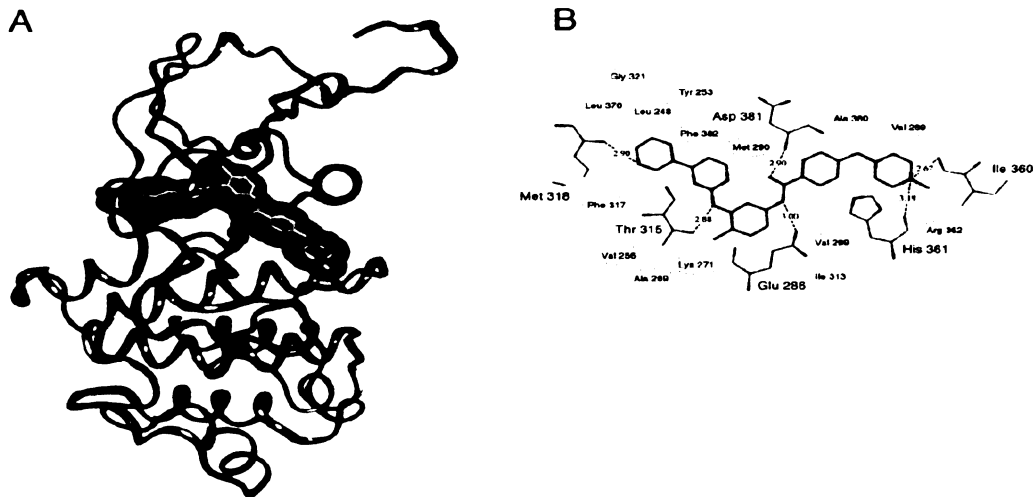
##### 2.3.1.4.1. Imatinib mesylát

Imatinib mesylát (STI 571, obchodní názvy Glivec, v USA Gleevec, dále pouze imatinib), viz obr. 2.6, patří mezi molekulárně cílená agens určená k léčbě CML ale i dalších nádorových onemocnění. V klinické praxi byl poprvé použit v roce 1998, kdy proběhla první fáze klinických zkoušek. V léčbě CML je dnes používán jako léčebný prostředek první volby. Působí jako selektivní inhibitor ABL, BCR-ABL, PDGFR, c-Kit a patrně také ARG tak, že kompetuje s ATP o vazebné místo v molekule kinázy. Imatinib váže výhradně neaktivní formu BCR-ABL kinázy (BUCHDUNGER et al 2000, OKUDA et al. 2001). Je účinný ve všech fázích CML, nejlepší výsledky dává jeho použití v chronické fázi. V porovnání s IFN imatinib navozuje signifikantně více kompletních hematologických a cytogenetických odpovědí (O'BRIEN et al. 2003).

Inhibice BCR-ABL kinázy imatinibem vede k diferenciaci a/nebo apoptóze buněk linie K562 (JACQUEL et al. 2003). Nově byla zjištěna také indukce autofágie působením imatinibu. Ta může vést k zastavení buněčného cyklu a apoptóze, někdy však naopak rakovinným buňkám může pomáhat recyklací proteinů a organel zničených léčbou (ERTMER et al. 2007).

V současné době je již známo také několik mechanismů rezistence vůči imatinibu. Lze rozlišit dva její hlavní typy. Primární rezistence se projeví nepřítomností účinku léčby již od jejího zahájení. Tzv. sekundární rezistence se projeví ztrátou efektivity léčby po primární odpovědi (HOCHHAUS, LA ROSEÉ 2004).

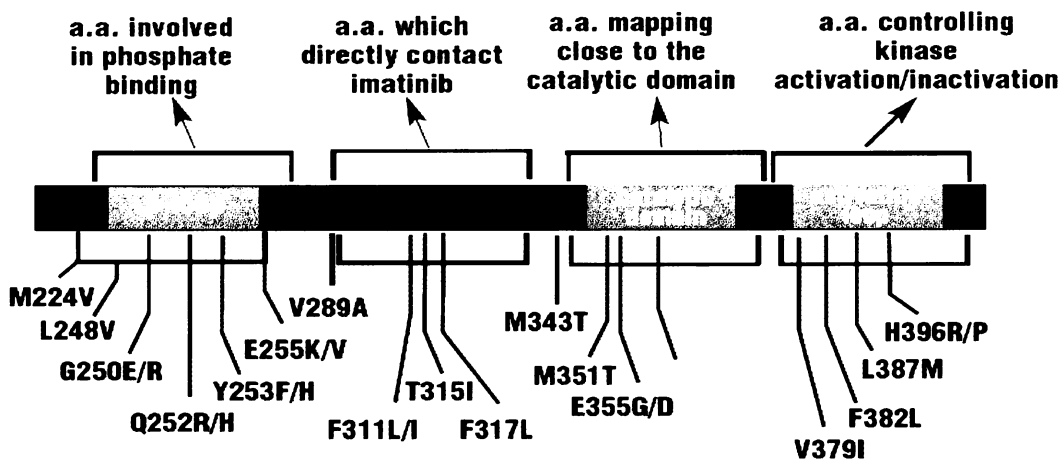
V literatuře je rezistence k imatinibu členěna na rezistenci na BCR-ABL závislou na nezávislou. Rozlišení umožňuje sledování fosforylace substrátů BCR-ABL jako např. CRKL (HOCHHAUS et al. 2002). Donedávna se předpokládalo, že hlavním mechanismem BCR-ABL závislé rezistence jsou mutace v tomto fúzním genu (BRANFORD et al. 2002). Často detedkované mutace uvádí obr. 2.7. Většina mutací přitom v nepřítomnosti imatinibu nepřináší buňkám žádnou růstovou výhodu (MIETHING et al. 2006). Pro vznik rezistence měly být významné především mutace v místech důležitých pro vazbu imatinibu, tj. především v kinázové doméně BCR-ABL. Mutace v P smyčce mohou souviset s horší prognózou pacientů (BRANDFORD et al. 2003). V současné době se ukazuje, že přítomnost mutované alely ne vždy vysvětluje klinickou rezistenci k imatinibu (KHORASHAD et al. 2006, MACHOVA et al. 2007). Je ale možné, že některé mutace BCR-ABL přispívají k přežívání malých populací maligních progenitorů, které jsou potenciálním zdrojem relapsu (CHU et al. 2005). Dalšími mechanismy rezistence závislé na BCR-ABL je overexprese BCR-ABL, k níž může docházet důsledku duplikace Ph chromozómu nebo genomické amplifikace BCR-ABL.



**Obr. 2.6 Vazba imatinibu do kinázové domény ABL** (NALGAR et al. 2002)

**A** – schématické znázornění kinázové domény ABL (zeleně) a navázaného imatinibu (modře), aktivační smyčka je vyznačena červeně, její N-konec (motiv DFG dle názvů aminokyselin) oranžově, tmavě zeleně je znázorněn úsek spojující oba laloky domény a  $\alpha$ C helix

**B** – Schéma znázorňující interakce ABL s imatinibem – atomy dusíku jsou znázorněny modře, kyslíku červeně, síry žlutě a uhlíku oranžově, imatinib je zbarven zeleně, vodíkové můstky jsou znázorněny čárkovanými čarami, v čárkovaných oválech jsou aminokyselinové zbytky, které interagují van der Waalovými silami



**Obr. 2.7 Bodové mutace v kinázové doméně BCR-ABL** – mutace, které způsobují záměny aminokyselin - první skupina mutací (G250E, Q252R, Y253F/H, E255K/V) se nachází v oblasti, která tvoří fosfát vazebnou smyčku (P-loop), druhá skupina (V289A, F311L, T315I, F317L) jsou mutace, které se nachází v oblasti, která přímo vodíkovými vazbami nebo van der Waalovými silami interaguje s imatinibem, třetí skupina mutací (M351T, E355G) spadá do oblasti katalytické domény, čtvrtá skupina (H396R/P) se vyskytuje v oblasti aktivační smyčky (MARTINELLI et al. 2005)

Mechanismů rezistence nezávislé na BCR-ABL je rovněž více. Imatinib je do buněk transportován aktivně prostřednictvím hOCT1 proteinu (human organic cation transporter). Snížená exprese nebo aktivita tohoto proteinu by tak mohla být jednou z příčin rezistence k imatinibu, ať už primární nebo sekundární (THOMAS et al. 2004). Existuje také mechanismus multidrogové rezistence, kdy P-glykoprotein, produkt MDR1 genu, zajišťuje aktivní eflux imatinibu z buňky (MAHON et al. 2003). V některých případech může být rezistence důsledkem vývoje nemoci, během kterého se mohou objevit nové početní nebo strukturální cytogenetické aberace, které vedou k proliferaci leukemických buněk nezávislé na BCR-ABL. Rezistence může být také dána regulací fosforylace tyrozinu 393 BCR-ABL. Pro vazbu imatinibu je nutné, aby byl defosforylován (MIETHING et al. 2003).

Pravděpodobnost rozvoje rezistence a relapsu obecně roste s pokročilejší fází CML. Důležitý faktor umožňující předejít rezistenci je optimální způsob zahájení léčby, tzn. nasazení plné dávky imatinibu co nejdříve (HOCHHAUS, LA ROSEÉ 2004). Relaps a rezistence v chronické fázi CML se vyskytují podstatně méně při užití imatinibu jako první terapie než při použití imatinibu až po předchozím selhání IFN. V případě mírné rezistence je možné jako terapii použít stupňování dávek imatinibu (DEININGER et al. 2004) nebo kombinovanou terapii (HOCHHAUS, LA ROSEÉ 2004).

#### 2.3.1.4.2. Dasatinib

Dasatinib (BMS-354825, Sprycel), viz obr. 2.8, je novým inhibitorem BCR-ABL tyrozin kinázy. Rozdíl oproti imatinibu spočívá v tom, že dasatinib je schopen vázat jak aktivní tak i neaktivní formu kinázy BCR-ABL (TOKARSKI et al. 2004). Navíc dasatinib inhibuje Src kinázy (CARTER et al. 2005). Dasatinib je účinný i proti mutantním formám BCR-ABL kinázy s výjimkou vysoce rezistentní formy nesoucí mutaci T315I. Výsledky první fáze klinických testů ukázaly, že dasatinib navozuje hematologickou nebo až cytogenetickou remisi u pacientů, kteří netolerovali, nebo byli rezistentní k imatinibu (TALPAZ et al. 2006). Dasatinib je cílen na časnější progenitory než imatinib, nicméně nejprimitivnější CML buňky v G0 fázi jsou rezistentní i k dasatinibu (COPLAND et al. 2006).



**Obr. 2.8 Vazba dasatinibu do kinázoé domény BCR-ABL: P smyčka (P-loop) je znázorněna žlutě, aktivační smyčka červeně (TALPAZ et al. 2006 b)**

### **2.3.2. Odpovědi pacientů na léčbu a možnosti predikce těchto odpovědí**

#### 2.3.2.1. Monitorování odpovědi na léčbu

Odpověď na léčbu je možné monitorovat na úrovni klinické (celkový stav pacienta, stav sleziny, jater apod.), na úrovni hematologické (krevní obraz a charakteristika jednotlivých krevních elementů) a dále na úrovni cytogenetické a molekulárně genetické. Cytogenetické metody využívají konvenční techniky, tzv. G-pruhování (barvení chromozómů podle Giemse) nebo metod FISH (fluorescence in situ hybridization). Metodou G-pruhování je možné zjistit počet Ph chromozómů v daném počtu metafází (v ÚHKT je analýza prováděna rutinně na 22 metafázích, pokud je ovšem možné je získat), případně je možno zjistit další chromozomální aberace. Metody FISH využívají fluorescenční sondy, které hybridizují k vybraným úsekům DNA, které zahrnují předpokládanou aberaci. Citlivost těchto metod je zhruba 1 až 5%.

Molekulárně genetické metody se zaměřují na sledování transkriptu BCR-ABL. K monitorování využívají kvantitativní reverzně transkriptázová PCR (Q-RT-PCR), v případě dosažení BCR-ABL negativity kvalitativní dvoustupňové RT-PCR. Tyto metody dosahují citlivosti 0,001 až 0,0001%, což umožní zjistit jednu leukemickou buňku mezi  $10^5$  až  $10^6$  normálních leukocytů. Citlivost RT-PCR je tedy minimálně tisíckrát vyšší než citlivost ostatních metod včetně cytogenetických. Další výhodou RT-PCR je sledování exprese genu na úrovni transkripce, ne tedy pouze přítomnosti

markeru jako v případě cytogenetických metod. Expres genu vždy ukazuje na aktivitu maligního klonu. Nárůst a vysoká hladina transkriptu BCR-ABL jednoznačně signalizují špatnou odpověď na léčbu a špatnou prognózu, naproti tomu pokles a nízká hladina BCR-ABL dobrou odpověď na léčbu a dobrou prognózu. Q-RT-PCR je zaváděna jako vyšetřovací metoda od roku 1992, z počátku pro potřebu časného zjištění relapsu u pacientů po TKB. Přestože TKB je doposud jediným kurativním léčebným přístupem, prudké potransplantační relapsy, které ohrožují 10 až 30% pacientů, přecházející rychle do blastické krize, vyžadovaly zavedení velmi citlivé metody schopné včas detekovat znovu se rozvíjející maligní klon. Pomocí Q-RT-PCR je možno zjistit relaps i o několik měsíců dříve než ostatními metodami. Je možno říci, že Q-RT-PCR přispěla ke změně prognózy pacientů relabujících po TKB z velmi špatné ve velmi dobrou. V současnosti se Q-RT-PCR využívá k monitorování odpovědi na léčbu u všech pacientů s CML. Pro vyšetření je využívána periferní krev pacientů, ne kostní dřeň, takže vyšetření pacienta nezatěžují a mohou být prováděna často, což zvyšuje jejich prognostický význam.

V laboratoři molekulární genetiky ÚHKT byla kvantitativní RT-PCR pro BCR-ABL zavedena v roce 1994. Jednalo se o kompetitivní RT-PCR (MORAVCOVA et al. 1998). Od letošního roku byla v rámci celosvětové standardizace monitorování transkriptu BCR-ABL zavedena RT-PCR v reálném čase. Používaný kontrolní gen  $\beta 2$  - mikroglobulin (B2M) zajišťuje plnou návaznost obou metod.

#### 2.3.2.2. Kritéria odpovědi na léčbu

Odpověď na léčbu u jednotlivých pacientů je hodnocena podle klinických, hematologických a cytogenetických kritérií. V důsledku nedokončené standardizace metody molekulární kritéria nebyla ještě jednoznačně stanovena.



Typ odpovědi na léčbu	Stupeň odpovědi na léčbu	Definice
Molekulární odpověď	<ul style="list-style-type: none"> <li>Kompletní molekulární odpověď, remise (CMR)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>nepřítomnost transkriptu BCR-ABL, zjištěno dvoustupňovou (nested) RT-PCR</li> </ul>
Cytogenetická odpověď (CR)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Kompletní cytogenetická odpověď, remise (CCR)</li> <li>Částečná (partial) cytogenetická odpověď (pCR)</li> <li>Malá (minor) cytogenetická odpověď (mCR)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>0% Ph+ buněk v kostní dřeni</li> <li>1 – 34 % Ph+ buněk v kostní dřeni</li> <li>35 - 94% Ph+ buněk v kostní dřeni</li> </ul>
Hematologická odpověď (HR)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Kompletní hematologická odpověď (CHR)</li> <li>Částečná hematologická odpověď (pHR)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>leukocyty méně než <math>10 \times 10^9 / l</math> krve, trombocyty méně než <math>450 \times 10^9 / l</math> krve, nepřítomnost nezralých buněk v periferní krvi, nepřítomnost splenomegalie</li> <li>jakýkoliv pokles množství krevních buněk</li> </ul>
Bez odpovědi na léčbu (NR)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Primární rezistence</li> <li>Sekundární rezistence</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>nepřítomnost odpovědi na léčbu od jejího zahájení</li> <li>ztráta odpovědi na léčbu</li> </ul>

Dále je průběh onemocnění a stav pacienta dělen do tří fází:

**Chronická fáze (CP)** - pacient dobře odpovídá na léčbu, nemoc nenese znaky akcelerované fáze.

**Akcelerovaná fáze (AP)** je charakterizována alespoň jedním z následujících znaků: 10 až 30% blastů v periferní krvi nebo kostní dřeni, 20 a více % blastů a promyelocytů v periferní krvi nebo kostní dřeni, 20 a více % bazofilů v periferní krvi nebo kostní dřeni, trombocytopenie méně než  $100 \times 10^9/l$  krve bez vztahu k léčbě, progresivní splenomegalie, přídatné chromozomální aberace.

**Blastická krize (BC)** – pacient má více než 30% blastů v periferní krvi nebo kostní dřeni.

### Definice relapsu a rezistence

Relapsy onemocnění se dělí na relapsy hematologické, cytogenetické a molekulární. Relapsy nejsou tak přesně definovány jako odpovědi na léčbu, na rozdíl od odpovědi na léčbu je nejpřesněji definován relaps molekulární. Je to z důvodů, aby bylo možno včas zahájit léčbu relapsů u pacientů po TKB, které jsou, jak již bylo uvedeno, velmi prudké a proto život ohrožující.

Typ relapsu	Definice
Molekulární relaps	desetinásobný nebo vyšší nárůst hladiny transkriptu BCR-ABL při CCR (tzv. dynamická definice)
Cytogenetický relaps	detekce Ph chromozómů po CCR nebo obecně nárůst procentuálního počtu Ph chromozómu
Hematologický relaps	zhoršení krevního obrazu nad normální hodnoty, nebo obecně nárůst hodnot

Relapsem onemocnění se často obecně míní relaps zjištěný konvenčními klinickými a hematologickými metodami – tedy relaps hematologický.

### Rezistence

Pacient neodpovídá ani na zvýšené dávky léčiva. Při získání rezistence mohl pacient projít všemi druhy výše uvedených relapsů. Rezistence k léčbě provází akceleraci onemocnění.

### 2.3.2.3. Potenciální nové molekulární markery

Přestože transkript BCR-ABL je velmi důležitým molekulárním markerem CML, jehož kvantifikace pomáhá charakterizovat stav a prognózu pacientů, hledají se stále další markery. Cílem je najít markery s ještě vyšším prognostickým významem, které pomohou již ve stádiu diagnózy naznačit příští vývoj onemocnění pacienta nebo určit co nejdříve akceleraci onemocnění a signalizovat přechod do blastické krize, aby léčba mohla být zahájena co nejdříve a umožní zastavit nebo alespoň oddálit nepříznivý vývoj onemocnění. Hledání a testování nových molekulárních markerů bylo i náplní této práce. Dále jsou uvedeny geny, které byly v rámci této práce testovány.

#### 2.3.2.3.1. *WT1*

WT1, který kóduje transkripční faktor se čtyřmi motivy zinkového prstu, patří mezi tumor supresorové geny. K tomuto označení WT1 vedlo pozorování souvislosti přítomnosti mutací WT1 s rozvojem Wilmsova tumoru (odtud odvozen název genu). Je však známo, že u jiných maligních onemocnění, a to jak u pevných nádorů (OJI et al. 1999) tak u maligních onemocnění krve (INOUE et al. 1998), funguje rostoucí exprese WT1 jako nespecifický marker progresu onemocnění. Známý je prognostický význam jeho exprese např. u myelodysplastického syndromu a u akutních myeloidních leukémií (INOUE et al. 1994, TAMAKI et al. 1999).

U člověka existuje 24 WT1 izoforem v důsledku alternativního sestřihu, editace RNA (SHARMA et al. 1994) a alternativních míst počátku translace. Frekvence editace je ale poměrně nízká (MROWKA a SCHEDL 2000) a množství variant lišících se N-koncem proteinu malé (SCHARNHORST et al. 1999). Hlavní izoformy jsou proto 4: Gen WT1 obsahuje dva alternativně sestřihované exony 5 a 9. Exon 9 obsahuje dvě alternativní donorová místa sestřihu, která která umožňují zařazení (+KTS varianta) nebo naopak nezahrnutí KTS sekvence (-KTS varianta) mezi třetí a čtvrtý motiv zinkového prstu. Poměr KTS+ a - variant je konstantní u řady typů buněk, poměr variant s a bez exonu 5 se liší jak mezi typy buněk, tak u různých vývojových stádií (PRITCHARD a RENSHAW 1997). Zdá se, že WT1 KTS- varianty fungují jako transkripční regulátory, WT1 KTS+ zřejmě hrají navíc roli v sestřihu (WAGNER et al. 2003). WT1 + a -KTS varianty navíc rozeznávají odlišná místa na DNA (HEWITT et

al. 1996). Vliv WT1 na transkripci cílových genů je dále ovlivňován interakcemi s dalšími proteiny (SCHARNHORST et al. 2000).

WT1 tak cílové geny může ovlivňovat transkripčně i posttranskripčně. Protein obsahuje domény, které nezávisle na sobě jsou schopny aktivovat nebo reprimovat transkripci (WANG et al. 1995).

Mezi cílové geny WT1 patří např. p21Cip (ENGLERT et al. 1997), Bcl-2 (HEWITT et al. 1995) a MDR1 (McCOY et al. 1999). V případě p21Cip jde o indukci exprese, u zbývajících dvou genů se jedná o represí. Patrně ale záleží na konkrétní situaci, práce byly prováděny na různých buněčných liniích. V leukemických buněčných liniích tak naopak WT1 může stimulovat expresi MDR1 (HIROSE et al. 1998).

#### 2.3.2.3.2. *Bcl-2*

Bcl-2 patří do rodiny Bcl-2 proteinů, známých především jako regulátorů apoptózy. Je hlavním představitelem podskupiny této proteinové rodiny, která se vyznačuje přítomností BH1 (Bcl-2 homologních) až BH4 domén. Je negativním regulátorem apoptózy. Vyskytuje se v buňce především ve vnější mitochondriální membráně, kde brání uvolňování cytochromu c z mitochondrií. Mimo to se nachází také v membráně endoplazmatického retikula, kde brání uvolňování  $Ca^{2+}$  iontů do cytosolu, čímž rovněž brání apoptóze (ANNIS et al. 2004).

Bcl-2 hraje roli také v regulaci buněčného cyklu. Overexprese může zastavit buněčný cyklus v G1 fázi (MARVEL et al. 1994).

Funkci Bcl-2 navíc ovlivňuje fosforylace, která je možná na třech místech tohoto proteinu. Význam fosorylace je zatím nejasný, zdá se, že záleží na buněčném kontextu (BONNEFOY-BERARD et al. 2004).

V souvislosti s CML bylo publikováno, že Bcl-2 je podmínkou pro rozvoj leukémie zprostředkovaný BCR-ABL (SÁNCHEZ-GARCÍA a GRUTZ 1995). Overexprese Bcl-2 při CML navíc může signalizovat nezávislost onemocnění na BCR-ABL, viz kapitola 2.2.4.2.

### 2.3.2.3.3. p21Cip

Protein p21Cip je známý především jako inhibitor cyklin dependentní kinázy 2, který asociuje s komplexem kinázy s cykliny A, D, E v jádře. Buňky mohou být takto proteinem p21Cip zastaveny v G1, příp. také G2 fázi (BUNZ et al. 1998). Tento Mechanismus by mohl být zajímavý z hlediska možnosti vzniku klidových CML buněk rezistentních k léčbě, které mohou být poté příčinou relapsu.

Expresi p21Cip indukuje v reakci na poškození DNA protein p53 (ZAKUT a GIVOL 1995). Aktivaci exprese p21Cip proteinem p53 však brání protein Myc, který tak ovlivňuje výslednou odpověď buňky – pokud je dostatek Myc pro inhibici exprese p21Cip, Myc favorizuje apoptózu, pokud p53 indukuje expresi p21Cip, dochází k zastavení buněčného cyklu (GARTEL et al. 2001). V buňkách linie K562 stimuluje expresi p21Cip Ras protein (Ras/Raf/MEK/ERK dráhou), o němž se proto předpokládá, že má v CML antiproliferační účinek (DELGADO et al. 2006).

p21Cip může ale fungovat nejen jako inhibitor replikace DNA a progresu buněčného cyklu, ale také opačně. Příkladem takového působení je inhibice exportu cyklinu D1 z jádra (ALT et al. 2002) a podíl na tvorbě komplexů cyklinu s kinázou.

Navíc se ukázalo, že v CML buňkách je p21Cip převážně cytoplazmatický. Jaderné lokalizaci p21Cip proteinu brání interakce s regulačními proteiny (např. kalmodulem), nebo fosforylace blízko jaderného lokalizačního signálu tohoto proteinu, kterou zajišťuje mimo jiné kináza Akt (AGELL et al. 2006). Dráha vedoucí k aktivaci Akt je přitom v CML upregulovaná. Tím lze akumulaci p21Cip v cytoplazmě CML buněk vysvětlit.

Role proteinu p21Cip v hematopoetických buňkách není dosud jasná. Protein p21Cip byl nalezen ve vysoké hladině v cytoplazmě promyelomonocytů v komplexu s BRAP proteinem (ASADA et al. 2004). Carreira et al, v roce 2005 dále zjistili, že exprese p21Cip proteinu může být indukovaná MITF proteinem, potenciálním novým antiproliferačním markerem, a následovaná hypofosforylací Rb proteinu. Obojí potom přispívá k výstupu z buněčného cyklu v G1 fázi. Normálně potom následuje aktivace diferenciace, která je však u leukemických buněk blokována. Role p21Cip v nezralých hematopoetických buňkách ale rovněž není zatím jasná. V cytoplazmě nezralých monocytů patrně působí proapoptoticky (ASADA et al. 1999), v diferencujících granulocytech potom naopak antiapoptoticky (GHANEM a STEINMAN 2006).

#### 2.3.2.3.4. *Ki-67*

Ki-67 je jaderný antigen rozpoznávaný protilátkou původně označenou právě Ki-67, která selektivně značí pouze jádra proliferujících buněk (GERDES et al. 1983).

Gen obsahuje alternativně sestříhovaný exon 7. Vznikají tak 2 různé mRNA a dva různé proteiny (SCHLUTER et al. 1993). Ki-67 je exprimován během všech aktivních fází buněčného cyklu, chybí v G0 buňkách a není detekovatelný ani během oprav DNA (GERDES et al. 1984). V G1 fázi se Ki-67 vyskytuje v perinukleárním prostoru, v pozdějších fázích spíše v jaderné matrix (VERHEYEN et al. 1989a). Během metafáze obklopuje chromozómy (VERHEYEN et al. 1989b). Protein obsahuje tzv. PEST sekvenci, která je zodpovědná za jeho krátký poločas rozpadu. V anafázi a telofázi množství proteinu rychle klesá (BRUNO a DARZYNKIEWITZ 1992). Ki-67 patrně hraje významnou roli v buněčné proliferaci a patří mezi proteiny významné pro udržování buněčného cyklu (SCHLUTER et al. 1993).

Ki-67 se již používá jako prognostický marker u některých maligních onemocnění, obvykle se však sleduje množství proteinu. Poprvé tento gen jako marker proliferace na úrovni mRNA použila dr. Ulmannová ve své disertační práci (ULMANNOVA 2003).

#### 2.3.2.3.5. *mBCR.-ABL*

V CML buňkách může alternativním splicingem primární mRNA vznikat vedle proteinu p210 také p190. Sestřih je indukován exonem 2 genu ABL, který navozuje splicing upstream bcr exonů i v případě jiných zlomových oblastí (LICHTY a KEIMEL-REID 2000). p190 má ve srovnání s p210 přibližně pětkrát vyšší tyrozinkinázovou aktivitu a větší transformační potenciál. Proto lze předpokládat, že pokud se vyskytuje u pacientů s CML, může se podílet na progresi choroby. Rozdíly mezi p210 a p190 BCR-ABL v tyrozinkinázové a transformační aktivitě mohou souviset s přídatnými Dbl-homologními (DH) a Ph doménami, které jsou přítomny pouze v p210 (TELEGEEV et al. 2004). Myší mononukleární buňky transfekované jednou z těchto forem fúzního genu se liší v expresi některých dalších genů (ADVANI et al. 2004).

## 3. Materiál a metody

### 3.1. Materiál

#### 3.1.1. Použité roztoky, chemikálie, reagensie

##### 3.1.1.1. Roztoky a chemikálie použité při izolaci buněk

*NH<sub>4</sub>Cl* (Merck)

*NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>* (Fluka)

*EDTA* (Sigma)

*NaCl* (Lachema)

*KCl* (Lachema)

*NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>* (Merck)

*KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>* (Lachema)

*Guanidin thiokyanát* (GT) (Serva)

*Na<sub>3</sub>citrátu* (Serva)

*N-lauroylsarcosin-Na* (Serva)

*Merkaptoetanol* (Amresco)

*Trypanová modř* (Sigma)

*Tkáňová voda* (TK voda) – deionizovaná voda

##### 3.1.1.2. Roztoky a chemikálie použité při izolaci RNA

*CH<sub>3</sub>COONa* (Serva)

*CH<sub>3</sub>COOH* (Penta)

*8-hydroxychinolinem* (Merck)

*Fenol* (Sigma)

*Chloroform* (Sigma)

*Izoamylalkohol* (Sigma)

*Etanol* (Merck)

*2-propanol* (Merck)

*Aqua pro injectione* (tj. voda pro injekční účely, voda RNA kvality) (Infusia)

*RNeasy kit* (Quiagen)

### 3.1.1.3. Reagencie a roztoky použité při reverzní transkripci (RT)

*5x pufr pro reverzní transkriptázu Superscript II* (Invitrogene)

*Reverzní transkriptáza Superscript II* (Invitrogene)

*RNasin Plus 40* (Amersham Biotechnologies)

*Náhodné hexamery* (Promega) – 250 pmol/μl, přímo před použitím naředěny na 25 pmol/μl

*Mix deoxyribonukleotidů* (dNTP: dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Promega) - 10 mM každý

*Aqua pro injectione* (Infusia)

### 3.1.1.4. Roztoky a chemikálie použité při elektroforéze RNA/DNA

*Ficoll 400* (Pharmacia)

*Orange G* (Chemapol)

*TRIS base* (Merck)

*Ethidium bromid* (Sigma) - 10 mg/1 ml vody

*EDTA* (0,5 M, pH 8) - roztok byl doplněn do 500 ml destilovanou vodou.

*100 bp DNA ladder* (Fermentas) - 3x ředěný v Orange G

*Agaróza* (Amresco)

### 3.1.1.5. Roztoky a reagencie použité při „end-point“ PCR a při PCR v reálném čase

*10x pufr pro FastStart Taq DNA polymerázu bez MgCl<sub>2</sub>* (Roche)

*Pufr pro Taq polymerázu* (Promega)

*Taq polymeráza* (Promega) – 5 U/μl

*FastStart Taq DNA polymeráza* (Roche) - 5 U/μl

*MgCl<sub>2</sub>* (Roche) - 25 mM

*Mix deoxyribonukleotidů* (dNTP: dATP, dCTP, dGTP, dTTP) - 10 mM každý (Promega)

*Primery* (Sigma, KR1, pro mBCR-ABL Ipsogen) - pracovní koncentrace 20 μM, zásobní roztok 100 μM, dodavatel, sekvence a původ viz tab. 4.1

*TaqMan sondy* (Sigma) - pracovní koncentrace 20 μM, zásobní roztok 100 μM, sekvence a původ viz tab. 4.2



*Sybr Green I* (SG I) (Boehringer Mannheim) – 800 x ředěný na pracovní koncentraci  
*Aqua pro injectione* (Infusia)

*Standardy* – standardy pro mBCR-ABL (Ipsogen), pro p21Cip, Bcl-2, WT1, B2M a Ki-67 byly připraveny v laboratořích oddělení molekulární genetiky ÚHK

Gen	Primer	Sekvence (5'→3')	Zdroj
B2M	F R	GAG TAT GCC TGC CGT GTG AAT CCA AAT GCG GCA TCT	Gabert et al. 2003
p21Cip <sup>Waf1/Cip1</sup>	F R	CTGGAGACTCTCAGGGTCGAA GGCGTTTGGAGTGGTAGAAATCT	*
Bcl-2	F R	CCTGGTGGACAACATCGCCCTGT GCCGGTTCAGGTACTCAGTCAT	Dai et al. 2004
WT1	F R	ACAGGGTACGAGAGCGATAACCA CACACGTCGCACATCCTGAAT	Cilloni et al. 2004
Ki-67	F R	GGTGTGCAGAAAATCCAAAGA ACTGTCCCTATGACTTCTGGTTG	**
mBCR-ABL	F R	CTGGCCCAACGATGGCGA CACTCAGACCCTGAGGCTAA	Gabert et al. 2003

**Tab. 3.1 Sekvence a původ primerů pro real time-PCR**

\* = primery navrženy firmou TIB MolBiol, \*\* = primery navrženy pomocí Universal ProbeLibrary ProbeFinder

Gen	Sekvence (5'→3')	Zdroj
B2M	CCT CCA TGA TGC TGC TTA CAT GTC TC	Gabert et al. 2003
P21Cip	ACGGCGGCAGACCAGCATGA	*
Bcl-2	CCTGGTGGACAACATCGCCCTGT	Dai et al., 2004
WT1	CAACGCCCATCCTCTGCGGAGCCCA	Cilloni et al. 2004
Ki-67	GCTGAGGA	**
mBCR-ABL	CCCTTCAGCGGCCAGTAGCATCTGA	Gabert et al. 2003

**Tab. 3.2 Sekvence a původ TaqMan sond pro real time-PCR**

\* = navržena firmou TIB MolBiol, \*\* = navržena pomocí Universal Probe Library ProbeFinder

### 3.1.1.6. Materiál a roztoky použité pro purifikaci produktů PCR

*Nucleospin extract kit* (Quiagen)

*DyeEx 2,0 Spin kit* (Quiagen)

*QIAquick PCR purification kit* (Quiagen)

*Glykogen* (Fermentas) – 20 mg/ml

*Izopropanol* (Merck)

### 3.1.1.7. Roztoky a reagentie použité pro sekvenaci

*HiFi polymeráza Accuprime* (Invitrogen)

*10x pufr* (Invitrogen)

*5x sequencing pufr* (Invitrogen)

*BigDye 3.1* (Invitrogen)

*Primery* (Invitrogen) – sekvence a původ viz tab. 4.3

*Formamid* (Applied Biosystems)

Gen	Primer	Sekvence (5'→3')	Zdroj
BCR-ABL	F R	TGACCAACTCGTGTGTGAACTC TCCACTTCGTCTGAGATACTGGATT	Brandford et al. 2002, Willis et al. 2006
ABL	F R	TGGTTCATCATCATTCAACGG GATACTGGATTCCTGGAACA	*

**Tab. 3.3 Sekvence a původ primerů pro sekvenaci**

\* = navrženo pomocí Primer3 software

### 3.1.2. Laboratorní materiál

Zkumavky 0,5 ml, 1,5 ml (Eppendorf)

Stripy, zkumavky 0,2ml (Corbett Research)

### 3.1.3. Přístrojové vybavení a použitý software

Centrifuga pro izolaci buněk – Rotanta 46R (Schoeller Pharma, Německo)

Centrifuga pro izolaci RNA – Hettich 16/16R (Schoeller Pharma, Německo)

Centrifugy pro purifikace – Minispin plus (Eppendorf), 5417C (Eppendorf, Německo)

Elektroforetická vana (Pharmacia Biotech, Německo)

Transluminátor Gel Doc 2000 (BioRad, USA)

Cyklery – GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystems, USA), Rotor Gene 3000 (Corbett Research, Austrálie)

Spektrofotometr –ND-1000 (NanoDrop Technologies, USA)

Termoblok – Termomixer Comfort (Eppendorf, Německo)

Sekvenátor – Genetic Analyser 3130 (Applied Biosystems, USA)

RotorGene 6 (Corbett Research, Austrálie) – vyhodnocování PCR v reálném čase  
GraphPad Prism verze 3 (GraphPad Software, USA) – statistická hodnocení, tvorba příslušných grafů  
MutationSurvivor verze 3.01 (Softgenetics, USA) – vyhodnocování sekvence  
Databáze NCBI – ověřování specifiky primerů a polohy pro nasednutí primerů pro PCR v reálném čase  
Microsoft Excel

### 3.1.4. Biologický materiál

Výchozím materiálem byly pro tuto práci vzorky periferní krve pacientů s CML a zdravých dárců. Veškeré odběry byly provedeny podle směrnic Národní referenční laboratoře pro DNA diagnostiku pro odběr vzorku na základě informovaného souhlasu pacientů a dárců podle pravidel etické komise ÚHK. Periferní krev byla odebírána v objemu 10 až 20 ml do antikoagulačního média, citrátu sodného.

Pro přípravu pozitivních kontrol a kalibrátoru byl použit lyzát buněčné linie K562 (koncentrace buněk  $10^7$  /ml), který poskytla Mgr. Jana Rulcová.

## 3.2. Metody

### 3.2.1. Příprava roztoků

*Lyzační roztok* - 10x koncentrovaný zásobní roztok byl připraven rozpuštěním směsi 41,45 g chloridu amonného ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ), 3,95 g hydrogenuhličitanu amonného ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) a 0,186 g EDTA ve 300 ml TK  $\text{H}_2\text{O}$  pomocí magnetického míchadla. Vzniklý roztok byl doplněn do 500 ml TK  $\text{H}_2\text{O}$ , která byla autoklávovaná 20 min při  $100^\circ\text{C}$ . Takto připravený roztok byl přefiltrován přes filtr Stericup (0,22  $\mu\text{m}$ ). Pro izolaci buněk byl používán 1x koncentrovaný roztok vzniklý smícháním 100 ml 10x koncentrovaného lyzačního roztoku s 900 ml autoklávované TK  $\text{H}_2\text{O}$ .

*Roztok PBS* - 10x koncentrovaný zásobní roztok byl připraven smícháním 80 g chloridu sodného ( $\text{NaCl}$ ), 2 g chloridu draselného ( $\text{KCl}$ ), 15,4 g dihydrogenfosforečnanu sodného ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) a 2 g dihydrogenfosforečnanu draselného ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) s 800 ml TK  $\text{H}_2\text{O}$  pomocí magnetického míchadla. Výsledný roztok byl doplněn TK  $\text{H}_2\text{O}$  do 1000 ml. Pro izolaci buněk byl používán 1x koncentrovaný roztok připravený smícháním 100 ml 10x koncentrovaného PBS roztoku s 900 ml TK  $\text{H}_2\text{O}$ .

Bylo nutné upravit pH na 7,4 (pomocí 50% NaOH nebo 17,5% HCl). Roztok 1x PBS byl před použitím autoklávován.

*Roztok guanidium thiokyanátu (GT)* – byl připravován rozpuštěním 283,56 g guanidinthiokyanátu v 300 ml TK H<sub>2</sub>O. Do roztoku bylo přidáno 15 ml 1M Na<sub>3</sub>citrátu a 8,75 ml 35% N-lauroylsarcosine-Na. Po vychladnutí byl roztok doplněn TK H<sub>2</sub>O do 600 ml.

*GT s merkaptoetanol* (*ME*) *pro lýzi buněk* - bylo smícháno 50ml GT a 360 µl merkaptoetanolu.

*Roztok 1M Na<sub>3</sub> citrátu* – bylo rozpuštěno 29,4 g Na<sub>3</sub>citrátu ve 100 ml TK H<sub>2</sub>O a pomocí 1M HCl bylo upraveno pH na 7.

*Roztok trypanové modři* - pracovní 0,4% roztok byl připravován ředěním 47,5 µl komerčně dodané trypanové modři do 142,5 µl PBS.

*Na acetát (2 M, pH 4,0)* - 8,2 g Na acetátu (CH<sub>3</sub>COONa) bylo rozpouštěno v 10 ml vody RNA kvality a pomocí koncentrované kyseliny octové (CH<sub>3</sub>COOH) bylo pH upraveno na 4,0. Roztok byl doplněn do objemu 50 ml vodou RNA kvality.

*Fenol* – vysycený vodou, byl doplněn 8-hydroxychinolinem v koncentraci 0,1g/100ml, pH 4

*Směs chloroform : izoamylalkohol* - 49:1

*Orange G* - bylo smícháno 10 g Ficoll 400 a 50 mg Orange G, výsledný roztok byl doplněn do 50 ml 0,5x TAE.

*Tris acetátový pufr pro elektroforézu (TAE)* - zásobní pufr 50x TAE byl připraven rozpuštěním 60,5 g TRIS base (MH = 121,1) v 200ml TK vody, dále bylo přidáno 14,25 ml kyseliny octové a 25,0 ml 0,5 M EDTA, celkový objem byl doplněn TK vodou do 250 ml. Pracovní roztok byl 1xTAE 50x ředěný TK vodou.

### **3.2.2. Izolace celkových leukocytů z periferní krve**

Výchozím materiálem pro tuto práci byly lyzáty celkových leukocytů pacientů. Lyzáty zdravých buněk jsem připravila stejným způsobem jako byly připravovány lyzáty buněk pacientů.

Celkové leukocyty byly z periferní krve izolovány metodou osmotické lýzy retikulocytů (tj. rozpad erytrocytů v hypotonickém prostředí a následná izolace celkových leukocytů).

Postup izolace je následující: Nejprve byly vzorky 5x naředěny vychlazeným (4°C) 1x koncentrovaným lyzačním roztokem (tj. obvykle 40 ml lyzačního roztoku a 10 ml krve) a promíchány několikerým otočením zkumavek dnem vzhůru. Po té byly ponechány 30, maximálně 40 min v lednici (do vyčeření vzorku). Následovala centrifugace 20 min při 540g při 4°C. Po slití supernatantu byl sediment ihned resuspendován v 5 ml lyzačního roztoku. Následovala centrifugace 10 min při 540g při 4°C. Opět byl slit supernatant a sediment resuspendován v 5 ml PBS. Po centrifugaci stejné jako v předchozím bodě a slití supernatantu byl sediment opět resuspendován v PBS, přidané množství záleželo na počtu buněk, minimálně 1 ml. Suspenze by měla být mírně průhledná. Pro určení počtu buněk bylo smícháno 142,5 µl PBS, 47,5 µl trypanové modři a 10 µl vzorku. Počítáním buněk v Bürkerově komůrce v alespoň 10 čtvercích byla následně stanovována koncentrace leukocytů. Počítány přitom byly pouze buňky živé, které se v roztoku nezbarvily modře. Po té bylo množství buněk rozpočítáno po 10 000 000 až 20 000 000. Vypočítané množství bylo rozpipetováno do popsaných sterilních zkumavek. Vzorky byly poté stočeny na mikrocentrifuze 5 min při 1200 nebo 1500g. Leukocyty byly lyzovány roztokem GT s ME, jehož bylo ke vzorkům přidáno takové množství, aby koncentrace buněk byla 10 000 000 nebo 20 000 000/ml. Vzorky byly vortexovány do vzniku homogenního lyzátu a skladovány v -80°C.

### **3.2.3. Izolace RNA**

#### **3.2.3.1. Izolace RNA kyselou fenol-chloroformovou extrakcí (CHOMCZINSKY, SACCHI 1987, modifikace dle MORAVCOVÁ et al. 1998)**

Do sterilních 1,5 ml plastikových zkumavek bylo napipetováno postupně 50 µl roztoku Na acetátu, 450 µl kyselého fenolu (před upotřebením promíchaného, aby byl prosycen vodou) a 500 µl homogenního lyzátu leukocytů (pro následnou PCR v reálném čase koncentrace  $10^7$  buněk/ml). Nakonec bylo přidáno 125 µl chloroformu smíšeného s izoamylalkoholem (49:1). Po následném důkladném zamíchání (přibližně 1 min vortexování a promíchávání) se vzorek mléčně zakalil, nebo bylo přidáno navíc malé množství směsi chloroformu a izoamylalkoholu. Vzorky byly poté na 10 min umístěny do chladicího stojánku. Následovala centrifugace při 10000g při 4°C po dobu 20 min. Po centrifugaci bylo odebíráno 400 až 420 µl vrchní vodné fáze do nových sterilních 1,5 ml zkumavek. Bylo třeba postupovat opatrně, aby nedošlo k nasátí mezifáze, která obsahuje DNA. K odebranému supernatantu byl potom přidán stejný

objem (tj. 400 až 420 ml) ledově vychlazeného (-20°C) izopropanolu. Následně byly vzorky opatrně promíchány několikerým převrácením zkumavek dnem vzhůru (nebezpečí degradace RNA) a ponechány po dobu minimálně 40 min v mrazicím boxu (příp. byly takto ponechány přes noc). Poté byly vzorky opět centrifugovány 20 min při 10000g při 4°C. Po slití a okapání supernatantu na sterilní filtrační papír bylo k sedimentu přidáno 500 µl etanolu vychlazeného na -20°C a vzorek byl centrifugován 10 min při 10000g při 4°C. Tento krok byl opakován dvakrát. Po druhém slití etanolu byly vzorky centrifugovány na mikrocetrifuze a zbytek etanolu byl odsát pipetou. Bylo přidáno 20 µl vody RNA kvality. RNA byla ve vodě rozpuštěna inkubací ve vodní lázni o teplotě 55°C po dobu 10 min následované 15 min při pokojové teplotě. Před uložením do mrazicího boxu byla RNA zchlazena na ledové lázni. Krátkodobě byla RNA skladována při teplotě -20°, dlouhodobě při teplotě -80°C.

#### 3.2.3.2. Izolace RNA pomocí RNeasy kitu (Quiagen)

Celková RNA byla pro sekvenaci izolována pomocí kitu RNeasy. Protokol byl upraven v počátečních krocích izolace. Buněčný lyzát je nutno nejprve důkladně promíchat. 200 µl homogenního lyzátu se odpipetuje do čisté 1,5 ml zkumavky. K lyzátu se přidá 200 µl 70% etanolu. Uzavřené zkumavky se promíchají otáčením dnem vzhůru a zpět. Postup pokračuje od bodu 5 návodu výrobce.

### 3.2.4. Elektroforéza nukleových kyselin

#### 3.2.4.1. Elektroforéza RNA

Pro zjištění stavu vyizolované RNA či pro nalezení případné DNA kontaminace byla prováděna RNA elektroforéza v 1,5% agarózovém gelu. Gel byl připraven smícháním 0,9 g agarózy s 60 ml 1xTAE pufrem. Po povaření v mikrovlnné troubě následovaném krátkým schlazením (na přibližně 60°C) byly přidány 4 µl EtBr. Gel byl poté nalit na nosič a ponechán na vzduchu ztuhnout. Po ztuhnutí byl gel přenesen do elektroforetické vany a zalit elektroforetickým pufrem. 3µl RNA byly smíchány se 7µl Orange G a nanoseny na gel.

### 3.2.4.2. Elektroforéza DNA

DNA elektroforéza byla prováděna pro detekci PCR produktu a ověření specifity reakce ve 2% agarózovém gelu připraveném smícháním 2 g agarózy se 100 ml pufru 0,5xTAE. Po povaření a zchlazení jako v případě přípravy gelu pro RNA elektroforézu bylo přidáno 5  $\mu$ l EtBr. DNA byla na gel nanášena po PCR v množství 13  $\mu$ l (ze směsi 25  $\mu$ l PCR produktu s 8  $\mu$ l Orange G). Spolu se vzorky bylo nanášeno 10  $\mu$ l velikostního markeru pro kontrolu velikosti PCR produktu.

### 3.2.5. Stanovení koncentrace nukleových kyselin

Koncentrace nukleových kyselin byla stanovována měřením na spektrofotometru ND 1000 (NanoDrop Technologies). Zároveň byla takto příp. sledována také kvalita nukleových kyselin. Poměr absorbancí A260/A280 vyšší než 1,8 potvrzoval nepřítomnost proteinů ve vzorku, poměr A260/A230 mezi 1,8 a 2,2 nepřítomnost solí. Měření koncentrace roztoku RNA bylo používáno pro kontrolu čistoty RNA a výtěžku izolace RNA, měření koncentrace DNA bylo použito pro stanovení koncentrace PCR produktů připravených jako standardů pro real time-PCR. Měření probíhalo v množství 1  $\mu$ l.

### 3.2.6. Reverzní transkripce

Reakční směs pro reverzní transkripci pro jeden vzorek obsahovala:

Komponenta	Množství ( $\mu$ l)	Finální koncentrace
RNA H <sub>2</sub> O	0,75	
10x pufr	2,0	
DTT (dithiotreitol, 100 mM)	1,0	10 mM
dNTP (10 mM)	0,5	0,5 mM
RNasin (40 U/ $\mu$ l)	0,25	1 U/ $\mu$ l
Superscript II (200 U/ $\mu$ l)	0,5	10 U/ $\mu$ l

Pro priming byly používány náhodné hexamery a postup práce byl následující: Do 0,5 ml zkumavek byly na ledové lázni napipetovány 2  $\mu$ l hexamerů (250 pM), k nimž byly přidány 3  $\mu$ l RNA. Směs byla inkubována přesně 5 min ve vodní lázni o teplotě 70°C. Poté byly vzorky ihned přenášeny do ledové lázně. Následně bylo ke směsi přidáno 5  $\mu$ l reakční směsi a vzorek byl inkubován 10 min při 25°C a 90 min při

42°C. Reakce byla ukončena inkubací 3 min v 95°C. Po zchlazení na ledové lázni byla cDNA skladována v teplotě -20°C.

Reverzní transkripce byla zpravidla prováděna v celkovém objemu 30 µl při zachování výše uvedeného poměru (tj. 6 µl hexamerů, 9 µl RNA a 15 µl reakční směsi).

Pro real time-PCR byla připravená cDNA ředěná vodou RNA kvality v poměru 2:3.

### **3.2.7. Testy primerů a sond pro PCR v reálném čase**

Sekvence a specifita všech primerů a sond byly ověřeny pomocí programu Blast databáze NCBI. Používané primery nasedají na cDNA do dvou sousedních exonů. Tím je zabráněno amplifikaci úseku z genomové DNA. Výjimkou jsou primery pro Ki-67, které leží oba v posledním exonu genu. Před reverzní transkripcí byla proto kontrolována případná kontaminace RNA genomovou DNA pomocí RNA ELFO. Kvalita primerů byla dále ověřena také pomocí PCR v reálném čase s nespecifickým barvivem SyberGreen I, viz kapitola 3.2.9.1.

### **3.2.8. Příprava standardů pro PCR v reálném čase**

Pro p21Cip byl použit standard připravený klonováním PCR produktu do plazmidu. Standard připravil a poskytl Mgr. Jaroslav Polák.

V případě všech ostatních standardů použitých v této práci se jednalo o přečištěné PCR produkty. Standard pro WT1 poskytl Mgr. Jaroslav Polák, pro Bcl-2 a B2M Mgr. Jana Rulcová.

Standard pro Ki-67 jsem připravila následujícím způsobem: Primery pro real time-PCR byly použity pro klasickou PCR, která proběhla dle programu: 95°C 3 min, 25x 94°C 30s, 60°C 30s, 72°C 30s. Reakční směs pro jeden vzorek obsahovala:



Komponenta	Množství (μl)	Finální koncentrace
TK H <sub>2</sub> O	16,2	
5x pufr+Mg	5,5	
dNTP (10mM)	0,5	0,2 mM
Forward primer (20μM)	0,3	0,26 μM
Reverse primer (20μM)	0,3	0,26 μM
Taq polymeráza (5U/μl)	0,2	0,04 U/μl

K 23 μl reakční směsi byly přidány 2 μl cDNA.

Specifita reakce byla ověřena pomocí DNA ELFO ve 2% agarózovém gelu. PCR produkty byly poté přečištěny pomocí kitu Nucleospin extract podle pokynů výrobce. Koncentrace připravených standardů byly změřena na spektrofotometru.

### 3.2.9. PCR v reálném čase

#### 3.2.9.1. Princip PCR v reálném čase

Jedná se o metodu umožňující sledování nárůstu množství PCR produktu v každém cyklu PCR měřením fluorescence emitované detektorem PCR produktu. Je tak možné sledovat reakci během exponenciální fáze, v níž množství PCR produktu přímo koreluje s počátečním množstvím templátu vloženého do reakce.

Detektorem může být nespecifická DNA vazebná sonda Syber Green (viz obr. 3.1), nebo některá z řady typů sond specifických pro daný amplicon. Vzhledem k vyšší specifitě byly v této práci použity duálně značené specifické sondy typu TaqMan, tzv. hydrolyzační sondy (viz obr. 3.2). Tento typ detekce je založen na využití 5' exonukleázové aktivity DNA polymerázy, která hydrolyzuje sondu nasednutou na ampliconu ve fázi syntézy. Sonda je na 5' konci značena fluorochromem označovaným jako reporter a na 3' konci tzv. zhášečem. V našem případě byl fluorochromem FAM, zhášečem TAMRA. Tato dvojice fluorochrom-zhášeč funguje na principu označovaném jako FRET (fluorescence resonance energy transfer). Pokud je sonda intaktní, zhášeč pohlcuje energii fluorochromu a emituje ji v podobě světla o vlnové délce, která není přístrojem sledována. Pokud však dojde k syntéze, sonda je aktivní polymerázou štěpena, fluorochrom je oddělen od zhášeče a přestává jím být ovlivňován. Volný

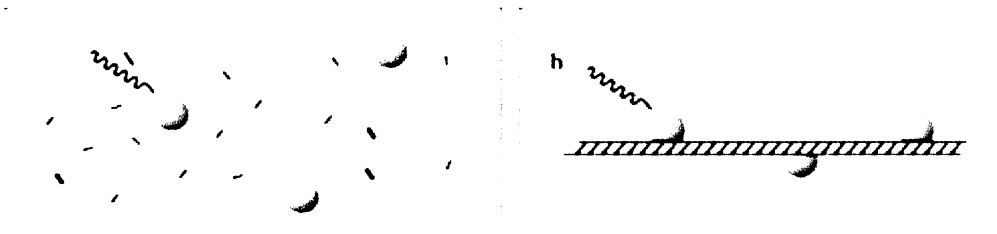
fluorochrom potom emituje fluorescenci o vlnové délce, která je speciálním cyklem detekována. Kvantifikace celkové fluorescence každého vzorku koncem syntetické fáze každého cyklu umožňuje sledovat nárůst množství PCR produktu a kvantifikaci transkriptu.

Použití barviva Syber Green je výhodné pro testování primerů. Jedná se o interkalátor, který se váže do malého žlábků dvouřetězcové DNA. Pomocí analýzy teploty tání PCR produktu je možné zjistit, zda reakce s danými primery probíhá specificky, či vzniká produktů více. Rovněž je z křivky patrná případná tvorba primerů-dimerů, které mohou snižovat citlivost reakce.

Pro Ki-67 byl v této práci použit poměrně nový typ sondy, která obsahuje modifikované tzv. LNA (od „locked nucleic acid“, někdy také BNA od „bridged nucleic acid“) monomery, viz obr. 3.3. Tyto monomery jsou bicyklické sloučeniny strukturně podobné RNA nukleotidům, v nichž je konformace furanózového kruhu „uzamčena“ metylenovým můstkem, který spojuje 2' O ribózy s C'4 ribózy. Tato modifikace zvyšuje lokálně organizaci fosfátové kostry a vede ke vzniku stabilnější A konformace. LNA sondy jsou oproti klasickým DNA sondám specifičtější ([www.gene-quantification.com](http://www.gene-quantification.com), BUSTIN 2004).

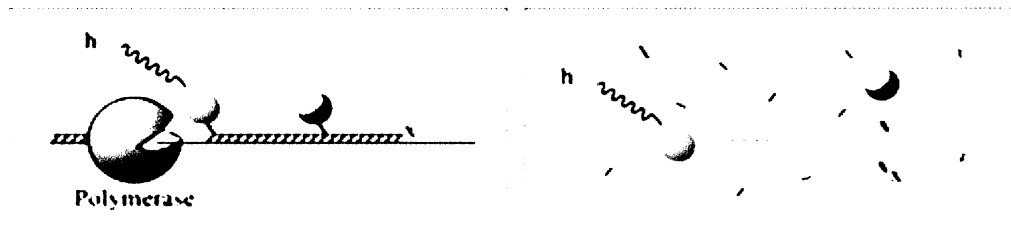


### SYBR Green

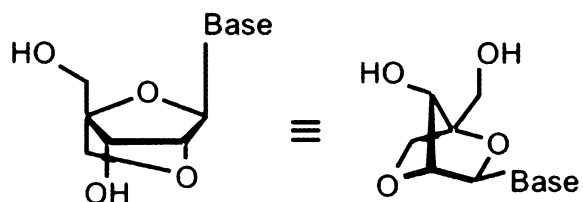


Obr. 3.1 Princip fungování barviva Syber Green - Syber Green funguje jako nespecifický detektor dsDNA

### TaqMan Probes



Obr. 3.2 Princip fungování TaqMan sond (tzn. hydrolyzačních sond) pro PCR v reálném čase – po rozštěpení sondy 5' exonukleázovou aktivitou polymerázy v průběhu syntézy DNA dochází k oddálení flurochromu od zhášeče a tedy k emimisi fluorescence



Obr. 3.3 Monomer LNA (locked nucleic acid)

### 3.2.9.2. Postup

PCR se sondami byla prováděna podle programu :

95°C 10min

cyklování:

95°C	15s	}	50x
60°C	60s		

Reakční směs pro jeden vzorek pro geny p21Cip, B2M, Bcl-2, WT1 a mBCR-ABL:

Komponenta	Množství (μl)	Finální koncentrace
RNA H <sub>2</sub> O	12,2	
5x pufr	2,50	
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	4,00	5 mM
dNTP (10 mM)	0,50	0,25 mM
Forward primer (20 μM)	0,375	0,3 μM
Reverse primer (20μM)	0,375	0,3 μM
Sonda (20μM)	0,3	0,3 μM
Fast Start Taq polyméřaza (5U/μl)	0,25	0,05 U/μl

K 20 μl reakční směsi bylo přidáno 5 μl cDNA.

Reakční směs pro jeden vzorek pro gen Ki-67:

Komponenta	Množství (μl)	Finální koncentrace
RNA H <sub>2</sub> O	12,00	
5x pufr	2,50	
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	4,00	5 mM
dNTP (10mM)	0,50	0,25 mM
Forward primer (20μM)	0,25	0,25 μM
Reverse primer (20μM)	0,25	0,25 μM
Sonda (20μM)	0,25	0,25 μM
Fast Start Taq polymeráza (5U/μl)	0,25	0,05 U/μl

Ke 20 μl reakční směsi bylo přidáváno 5 μl cDNA.

Při použití barviva SyberGreen I byl použit program:

94°C 3min

cyklování:

94°C 25s } 45x

62°C 25s }

72°C 25s }

86°C 15s }

40°C 2min

50°C 1min

Analýza křivky teploty tání probíhala v teplotním intervalu 55° až 90°C, v každém kroku byl nárůst o jeden stupeň, 30s 1. krok, 5s všechny ostatní kroky

Reakční směs pro jeden vzorek obsahovala:

Komponenta	Množství (μl)	Finální koncentrace
RNA H <sub>2</sub> O	11,8	
5x pufr	2,0	
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	2,8	3,5 mM
dNTP (10 mM)	0,4	0,2 mM
Forward primer (30μM)	0,5	0,75 μM
Reverse primer (30μM)	0,5	0,75 μM
SyberGreen I (800x ředěný)	0,8	
Fast Start Taq polymeráza (5U/μl)	0,2	0,05 U/μl

K 19 μl byl přidán 1μl cDNA.

V každé PCR reakci byly vedle vzorků pacientů v paralelách měřeny také standardy (3 až 5 různých ředění), kalibrátor (viz kapitola 3.2.9.3) v triplikátu a RNA H<sub>2</sub>O, tedy vzorek bez templátu jako negativní kontrola (tj. kontrola kontaminace).

### 3.2.9.3. Metody kvantifikace

V této práci byly prováděny dva způsoby kvantifikace – pomocí standardní křivky a metodou delta delta Ct.

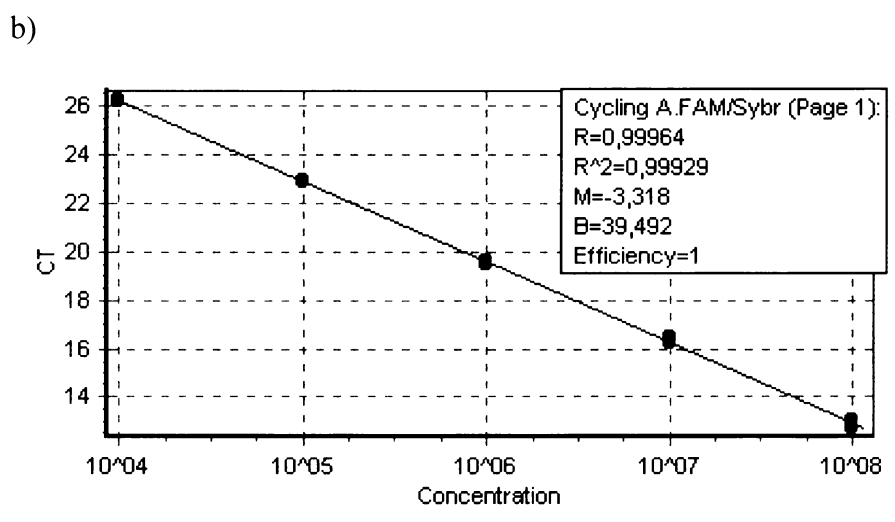
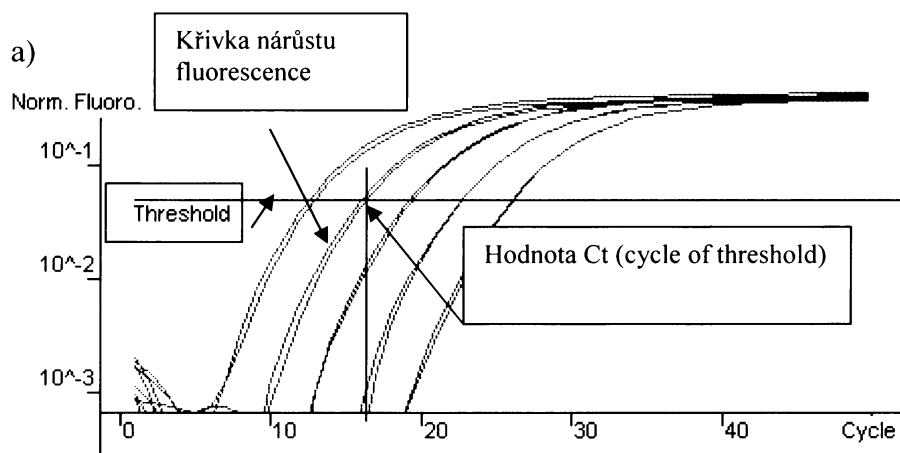
#### 3.2.9.3.1. Kvantifikace pomocí standardní křivky (tzv. absolutní kvantifikace)

Tento způsob kvantifikace je založen na tvorbě standardní křivky pomocí amplifikace vzorků o známe koncentraci templátu. Každé koncentraci templátu (počet kopií DNA) odpovídá určité Ct (cycle of threshold). Koncentrace DNA u neznámého vzorku je pomocí software z kalibrační křivky odečtena. Výstup z rel-time PCR hodnocené touto metodou ukazuje obr. 3.4.

Hodnota Ct je odečítána v okamžiku, kdy množství amplifikovaného produktu překročí tzv. threshold. Ten je nastaven počítačovým software buď automaticky nebo může být nastaven manuálně. V této práci byl threshold nastavován ve všech reakcích na 0,05.

Amplifikace standardů byla prováděna v každé reakci. Standardní křivky, příklad viz obr., byly vytvářeny na základě 3 až 5 různých desetinasobných ředění standardů pipetovaných v duplikátech. Ředění standardů byla přitom na základě počátečních testů exprese u pacientů zvolena tak, aby se počet kopií daného transkriptu ve vzorcích pohyboval v rozmezí mezi těmito ředěními. Tento postup napomáhá dosažení maximální přesnosti měření.

Výsledná hodnota počtu kopií transkriptu byla normalizována vztahem k počtu kopií kontrolního genu, beta 2 mikroglobulinu, B2M. Kontrolní gen slouží jednak k odstranění vlivu odlišného výtěžku izolace RNA a rozdílné efektivity reverzní transkripce na výsledek a jednak pro orientační kontrolu kvality vzorku. Pokud byl počet kopií B2M nižší než 900 000, byl vzorek testován znovu s přípravou od izolace (referenční mez podle RULCOVÁ et al. 2007).



**Obr. 3.4 a) Výstup z PCR v reálném čase, křivky nárůstu fluorescence (resp. PCR produktu) standardů pro B2M; b) Standardní křivka B2M (koncentrace dána počtem kopií)**

### 3.2.9.3.2. Kvantifikace metodou delta delta Ct (tzv. relativní kvantifikace)

Metoda delta delta Ct nevyžaduje použití standardů, ale tzv. kalibrátoru. Kalibrátor je vzorek, který je dobře charakterizován a který má nějaký vztah k testovaným vzorkům. U pacientů s leukémiemi je to např. vzorek pacienta v době diagnózy nebo buňky leukemické linie, které mají tu výhodu, že jich lze připravit velké množství. cDNA připravená z tohoto vzorku se přidává ke každé skupině kvantifikovaných vzorků a slouží k odstranění variability mezi jednotlivými kvantifikacemi a jako pozitivní kontrola pro PCR. V této práci byla jako kalibrátor použita buněčná linie K562 desetkrát ředěná na úrovni lyzátu buňkami zdravého dárce. (koncentrace  $10^7$  buněk/ml).

Výsledkem kvantifikace metodou delta delta Ct, je hodnota ve tvaru  $2^{\Delta\Delta Ct}$ , kde  $\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{sledovaného genu}} - Ct_{\text{kontrolního genu}})_{\text{vzorku}} - (Ct_{\text{sledovaného genu}} - Ct_{\text{kontrolního genu}})_{\text{kalibrátoru}}$ . Jedná se o hodnoty udávající relativní nárůst (hodnota větší než 1) nebo pokles (hodnota menší než 1) exprese sledovaného genu vzhledem ke kalibrátoru.

Podmínkou pro možnost použití této metody je shodná účinnost exprese sledovaného a kontrolního genu (AROCHO et al. 2006). Účinnosti všech reakcí byly porovnány na základě účinností počítaných podle standardních křivek. Ve všech případech se účinnost reakcí pohybovala v rozmezí 0,95 až 1.

### 3.2.9.4. Hodnocení exprese mBCR-ABL

Transkript mBCR-ABL se v buňkách pacientů vyskytuje ve velmi malých koncentracích, buněčná linie K562 je pro mBCR-ABL zcela negativní. Exprese mBCR-ABL nebyla kvantifikována, byla hodnocena pouze pozitivita či negativita. Jako pozitivní kontrola pro PCR byly používány komerčně dostupné standardy (Ipsogen). Negativní vzorky byly testovány dvakrát pro vyloučení falešně negativního výsledku.

### 3.2.10. Statistická hodnocení

Statistické hodnocení bylo provedeno pomocí softwaru GraphPadPrism verze 3 (GraphPad Software, USA) následujícím způsobem. Nejprve byly všechny skupiny hodnot testovány na normální rozložení dat (tj. rozložení dat podle Gausse), které je podmínkou možnosti použití parametrických testů. V případě, že rozložení dat nebylo



normální a nepodařilo se jej dosáhnout doporučenými transformacemi dat (např. převedením dat na log10), byl dále proveden neparametrický test, konkrétně Kruskal-Wallisův test. Pokud bylo rozložení dat normální, nebo se jej podařilo přepočtem dosáhnout, byl dále proveden Burtlettův test pro analýzu rozptylu sledovaných skupin dat, který v tomto případě upřesňuje, zda je či není vhodné použít parametrický test ANOVA. Pokud byl výsledek Burtlettova testu negativní, byla použita ANOVA. Pokud byl výsledek pozitivní, pak byl proveden Kruskal-Wallisův test.

ANOVA test i jeho neparametrická obdoba Krukall-Wallisův test však uvádí pouze, zda se v rámci testovaných skupin dat vyskytují signifikantní rozdíly, či nikoliv. Neuvádí ale mezi kterými skupinami dat konkrétně rozdíly jsou. Proto byly dále provedeny tzv. testy mnohonásobného porovnávání určené právě pro identifikaci konkrétních rozdílů. Jednalo se o test Tukeyho v případě ANOVA testu a v případě Kruskal-Wallisova testu o test Dunnův. Veškeré testy byly zvoleny na základě doporučení manuálu k software GrafPad Prism3.

### 3.2.11. Příprava PCR produktu pro sekvenaci

Pro detekci mutací v kinázové doméně BCR-ABL byla použita metoda přímé sekvenace. Příprava vzorku pro sekvenaci zahrnuje dvě PCR reakce, které slouží k amplifikaci templátu pro sekvenaci. V první PCR je amplifikována větší oblast fúzního genu BCR-ABL, ve druhé pak již pouze kinázová doména ABL. První PCR tak zajišťuje vytvoření nadbytku BCR-ABL ve vzorku oproti ABL, což následně zajistí sekvenaci pouze kinázové domény BCR-ABL, nikoliv kinázy ABL .

#### 3.2.11.1. Dvoustupňová PCR

1. PCR: V prvním kroku byly použity primery pro gen BCR-ABL. Reakční směs pro jeden vzorek obsahovala:

Komponenta	Množství (μl)	Finální koncentrace
H <sub>2</sub> O	19,3	
10x pufr	2,5	
Forward primer (10μM)	0,5	0,2 μM
Reverse primer (10μM)	0,5	0,2 μM
HiFi Accuprime polymeráza (5U/μl)	0,2	0,04 U/μl

Ke 23  $\mu\text{l}$  reakční směsi byly přidány 2  $\mu\text{l}$  cDNA.

1.PCR probíhala podle programu:

94°C 2 min  
94°C 15 s } 35x  
60°C 30 s }  
68°C 2 min }

2.PCR: Ve druhém kroku byl použit primerový pár uvedený výše pro gen ABL.

Reakční směs obsahovala:

Komponenta	Množství ( $\mu\text{l}$ )	Finální koncentrace
H <sub>2</sub> O	15,8	
10x pufr	2	
Forward primer (10 $\mu\text{M}$ )	0,5	0,25 $\mu\text{M}$
Reverse primer (10 $\mu\text{M}$ )	0,5	0,25 $\mu\text{M}$
HiFi Accuprime polymeráza (5U/ $\mu\text{l}$ )	0,5	0,05 U/ $\mu\text{l}$

K 19  $\mu\text{l}$  reakční směsi byl přidán 1  $\mu\text{l}$  100x ředěného PCR produktu. Reakce proběhla podle programu:

94°C 2 min  
94°C 10 s } 35x  
55°C 30 s }  
68°C 59 s }

### 3.2.11.2. Přečištění produktů 2.PCR

Přečištění produktů 2.PCR bylo provedeno pomocí QIAquick PCR purification kitu. Postup byl proveden podle protokolu výrobce. Výsledná eluace byla provedena v 25  $\mu\text{l}$  EB pufru (10 mM Tris-Cl, pH 8,5).

### 3.2.11.3. Kontrola specifity PCR

PCR produkty z 1. i 2. PCR byly podrobeny elektroforéze v agarózovém gelu pro kontrolu specifity a účinnosti reakce PCR.

### 3.2.11.4. Sekvenační reakce

Reakční směs pro jeden vzorek obsahovala:

Komponenta	Množství (μl)	Finální koncentrace
H <sub>2</sub> O	5,5	
BigDye 3.1	1	
Sekvenační pufr (5x sequencing buffer)	1	
Primer (10 μM)	1	1 μM

K 8,5 μl reakční směsi bylo přidáno 1,5 μl PCR produktu. Pro každý vzorek byly provedeny dvě reakce – amplifikace za použití forward i reverse primeru.

Amplifikace proběhla dle programu:

96°C 10s	} 25x
55°C 10s	
60°C 4min	

### 3.2.11.5. Přečištění produktu sekvenační reakce

Pro purifikaci byl použit kit DyeEx 2.0 Spin, nebo byla prováděna purifikace pomocí precipitace v 75% izopropanolu. V případě kitu bylo postupováno dle pokynů výrobce.

Postup purifikace pomocí precipitace byl následující: K PCR produktu 2. PCR bylo přidáno 80 μl 75% izopropanolu. Směs byla přepipetována do čistých 1,5 ml zkumavek, do nichž byl předem napipetován 1 μl glykogenu (20 mg/ml, napomůže zviditelnění pelet DNA). Následovala centrifugace při 12000 g 20 min. Po odebrání supernatantu bylo přidáno 250 μl 75% izopropanolu. Po lehkém zvertexování proběhla centrifugace při 12000 g 5 min. Po odebrání supernatantu byly otevřené zkumavky vloženy do termobloku a temperovány 1 až 2 min při 55°C pro evaporaci zbylého izopropanolu.

#### 3.2.11.6. Příprava vzorku pro sekvenaci

Do zkumavek s vysušeným PCR produktem bylo přidáno 20  $\mu$ l formamidu. DNA byla denaturována při 96°C 2 min. Takto připravené vzorky byly přeneseny na sekvenační destičku.

#### 3.2.12. Vyhodnocení sekvenace

Vyhodnocení sekvenace bylo prováděno pomocí software MutationSurvivor verze 3.01 (Softgenetics, USA), který umožňuje vedle identifikace mutace v daném vzorku porovnáním se standardem také kvantifikaci. Výsledkem je procentuální zastoupení mutované a nemutované formy. V případě neshody výsledků forward a reverse sekvenace, nebo v případě nečitelnosti sekvence v jednom z obou směrů, byl test opakován.

## 4. Výsledky

### 4.1. Opakovatelnost a reprodukovatelnost PCR v reálném čase

Před vlastním hodnocením genové exprese u pacientů bylo třeba zhodnotit opakovatelnost a reprodukovatelnost daných reakcí. Pod pojmem opakovatelnost zde rozumíme variabilitu výsledků PCR v reálném čase opakované tentýž den, tzn. bez zamražení cDNA mezi oběma reakcemi. Reprodukovatelností je potom míněno hodnocení variability výsledků real time-PCR opakovaných ve čtyřech různých dnech.

Pro veškeré experimenty, jejichž výsledky byly do opakovatelnosti a reprodukovatelnosti zařazeny, byly jako templáty použity stejné cDNA získané ze tří různých ředění lyzátu linie K562 ( $10^7$  buněk/ml) lyzátem směsi buněk zdravých dárců ( $10^7$  buněk/ml). Jednalo se o ředění 100x, 1000x a 10 000x. V každé reakci byla měřena všechna tři ředění, každé pro každý gen v triplikátu. Do reprodukovatelnosti byly zařazeny rovněž výsledky získané v rámci opakovatenosti. Opakovatelnost tedy vychází z šesti hodnot pro každý gen, reprodukovatelnost z dvanácti.

Opakovatelnost i reprodukovatelnost byla hodnocena u všech genů s výjimkou transkriptu mBCR-ABL. V tomto případě se hodnoty exprese pohybovaly na hranici citlivosti metody a nebyla tedy prováděna kvantifikace.

Vzhledem k tomu, že všechny hodnoty vycházejí z jediné cDNA, byla těmito pokusy hodnocena pouze opakovatelnost a reprodukovatelnost vlastní PCR, nikoliv metod jí předcházejících. Takové hodnocení nebylo nutné, protože vliv rozdílného výtěžku izolace RNA nebo odlišné účinnosti reverzní transkripce na výsledek odstraní vztažení hodnot týkajících se sledovaného genu k hodnotám kontrolního genu.

Na základě daných měření jsme pomocí Microsoft Excel vypočítali směrodatnou odchylku a variační koeficient pro hodnoty Ct a pro počty kopií. Výsledky získané na základě hodnot Ct jsou sice zavádějící, protože se jedná o logaritmickou závislost, avšak v literatuře se uvádějí. Pro porovnatelnost jsme tedy toto hodnocení rovněž provedli. Tabulky 4.1 až 4.4 uvádějí výsledky. Výsledky spadají do rozmezí uváděného v literatuře, jakožto rozmezí pro měření s maximální přesností v rámci možností metody (BUSTIN 2004).

Pokud se hodnoty Ct v rámci paralely lišily o více než 0,7, bylo měření opakováno. Měření bylo opakováno také v případě, že počet kopií kontrolního genu nepřesáhl 900 000 (referenční mez podle RULCOVÁ et al. 2007).

Gen	Ředění	Variační koeficient (%)
B2M	10 <sup>3</sup> x	0,41
	10 <sup>4</sup> x	1,14
	10 <sup>5</sup> x	0,84
p21Cip	10 <sup>3</sup> x	0,61
	10 <sup>4</sup> x	0,55
	10 <sup>5</sup> x	0,73
Bcl-2	10 <sup>3</sup> x	0,54
	10 <sup>4</sup> x	0,45
	10 <sup>5</sup> x	0,52
Ki-67	10 <sup>3</sup> x	0,79
	10 <sup>4</sup> x	0,33
	10 <sup>5</sup> x	0,32
WT1	10 <sup>3</sup> x	0,35
	10 <sup>4</sup> x	0,45
	10 <sup>5</sup> x	0,7

**Tab. 4.1 Opakovatelnost – variační koeficienty získané na základě Ct**

Gen	Ředění	Variační koeficient (%)
B2M	10 <sup>3</sup> x	6,28
	10 <sup>4</sup> x	11,25
	10 <sup>5</sup> x	7,25
p21Cip	10 <sup>3</sup> x	9,39
	10 <sup>4</sup> x	6,63
	10 <sup>5</sup> x	12,25
Bcl-2	10 <sup>3</sup> x	10,69
	10 <sup>4</sup> x	9,13
	10 <sup>5</sup> x	14,9
Ki-67	10 <sup>3</sup> x	19,44
	10 <sup>4</sup> x	10,81
	10 <sup>5</sup> x	7,48
WT1	10 <sup>3</sup> x	11,42
	10 <sup>4</sup> x	8,88
	10 <sup>5</sup> x	13,68

**Tab. 4.2 Opakovatelnost – variační koeficienty získané na základě počtu kopií**

Gen	Ředění	Variační koeficient (%)
B2M	10 <sup>3</sup> x	1,13
	10 <sup>4</sup> x	0,91
	10 <sup>5</sup> x	0,92
P21Cip	10 <sup>3</sup> x	0,92
	10 <sup>4</sup> x	0,67
	10 <sup>5</sup> x	0,64
Bcl-2	10 <sup>3</sup> x	0,53
	10 <sup>4</sup> x	0,67
	10 <sup>5</sup> x	0,7
Ki-67	10 <sup>3</sup> x	0,79
	10 <sup>4</sup> x	0,34
	10 <sup>5</sup> x	0,48
WT1	10 <sup>3</sup> x	0,43
	10 <sup>4</sup> x	0,55
	10 <sup>5</sup> x	0,72

**Tab. 4.3 Reprodukovatelnost – variační koeficienty pro jednotlivé geny a ředění získané na základě Ct**

Gen	Ředění	Variační koeficient (%)
B2M	10 <sup>3</sup> x	21,6
	10 <sup>4</sup> x	22,14
	10 <sup>5</sup> x	23,72
P21Cip	10 <sup>3</sup> x	19,56
	10 <sup>4</sup> x	22,61
	10 <sup>5</sup> x	20,01
Bcl-2	10 <sup>3</sup> x	22,68
	10 <sup>4</sup> x	25,03
	10 <sup>5</sup> x	26,74
Ki-67	10 <sup>3</sup> x	19,32
	10 <sup>4</sup> x	11,17
	10 <sup>5</sup> x	10,47
WT1	10 <sup>3</sup> x	24,93
	10 <sup>4</sup> x	23,76
	10 <sup>5</sup> x	28,72

**Tab. 4.4 Reprodukovatelnost – variační koeficienty pro jednotlivé geny a ředění získané na základě počtu kopií**

## 4.2. Porovnání kvantifikace pomocí standardní křivky a kvantifikace metodou delta delta Ct

Srovnání bylo provedeno na základě 50 hodnot pro všechny sledované geny s výjimkou transkriptu mBCR-ABL, který, jak bylo uvedeno, nebyl kvantifikován. Protože rozložení dat bylo v tomto případě normální, nebo se normálního rozložení podařilo dosáhnout převedením hodnot na jejich logaritmus, byl použit parametrický Spearmanův test. Korelační koeficienty uvádí tab. 4.5. Z tabulky je zřejmé, že výsledky získané oběma metodami dobře korelují.

Gen	Korelační koeficient
WT1	0,91
Bcl-2	0,93
p21Cip	0,88
Ki-67	0,89

**Tab. 4.5 Korelace výsledků PCR v reálném čase získaných v pomoci standardní křivky a pomoci metody delta delta Ct**

## 4.3. Statistické hodnocení rozdílnosti exprese WT1, p21Cip, Bcl-2 a Ki-67 u různých odpovědí na léčbu

Celkem bylo hodnoceno 127 vzorků od 20 různých pacientů. Vzorky pokrývaly všechny typy odpovědí na léčbu – kompletní cytogenetické odpovědi (CCR), částečné cytogenetické odpovědi (pCR), malé cytogenetické odpovědi (mCR), hematologické odpovědi (HR), bez odpovědi na léčbu v chronické nebo akcelerované fázi onemocnění (NR), bez odpovědi na léčbu v blastické krizi (BC). ZK značí zdravé kontroly. Těmi byly vzorky zdravých mužů a žen ve věkovém rozmezí, které maximálně připomíná věkové rozmezí pacientů (muži ve věku 47, 48, 67, 68, 77 a 78 let, ženy ve věku 52, 55, 66, 75, 78). Sledovaní pacienti byli léčeni hydroxyureou, kombinací hydroxyurey s IFN, samotným IFN, imatinibem, nebo v případě blastické krize intenzivní chemoterapií. Výsledky jsou znázorněny na obr. 4.1 až 4.4 grafy, k nimž jsou připojeny i příslušné výsledky statistického hodnocení.



#### **4.3.1. Exprese WT1**

Výsledky statistického hodnocení rozdílnosti exprese u jednotlivých odpovědí na léčbu (obr 4.1) ukázaly signifikantní rozdíly mezi téměř všemi hlavními odpověďmi na léčbu, tj. CCR, HR a NR. V CCR je exprese WT1 prakticky totožná s hodnotou, která je ve zdravých krevních buňkách. Výsledek je velmi podobný statistickému hodnocení exprese BCR-ABL u jednotlivých odpovědí na léčbu. Rozdíly hodnot u dobrých odpovědí jsou však menší, u horších odpovědí naopak větší. WT1 se na základě těchto výsledků jevil jako vhodný kandidát na pomocný marker pročasné zjištění progresu onemocnění.

#### **4.3.2. Exprese Bcl-2**

Statistické hodnocení rozdílnosti exprese Bcl-2 u různých odpovědí na léčbu (obr. 4.2) ukázalo jako signifikantně odlišný pouze rozdíl mezi vzorky BC a vzorky ostatních neodpovídajících pacientů a pacientů v CCR. Výsledky však mohou být částečně ovlivněny malým počtem vzorků některých odpovědí (např. pCR). Protože ani trend exprese není jednoznačný (snižování nebo naopak postupné zvyšování exprese směrem k horší odpovědi na léčbu), nebude Bcl-2 vhodným markerem pro sledování průběhu léčby. Mohl by spíše sloužit jako pomocný marker přechodu blastické krize.

#### **4.3.3. Exprese p21Cip**

Test oddělil od ostatních odpovědí BC, rozdíl nebyl signifikantní pouze ve srovnání s CCR, při níž rovněž dochází k nárůstu exprese. Zdravé kontroly vykazují expresi výrazně vyšší ve srovnání se všemi reakcemi na léčbu, viz obr. 4.3. Pokles exprese p21Cip se zhoršující se odpovědí na léčbu potvrzuje jeho roli inhibitoru cyklin dependentních kináz. Nárůst exprese v blastické krizi patrně souvisí s nárůstem podílu blastů v periferní krvi (v nezralých krevních buňkách byla nalezena vysoká hladina p21Cip proteinu, viz kapitola 2.3.2.3.3). p21Cip se podobně jako Bcl-2 na základě výsledků statistiky jevil spíše jako potenciální marker přechodu do akutních fází onemocnění.

#### 4.3.4. Exprese Ki-67

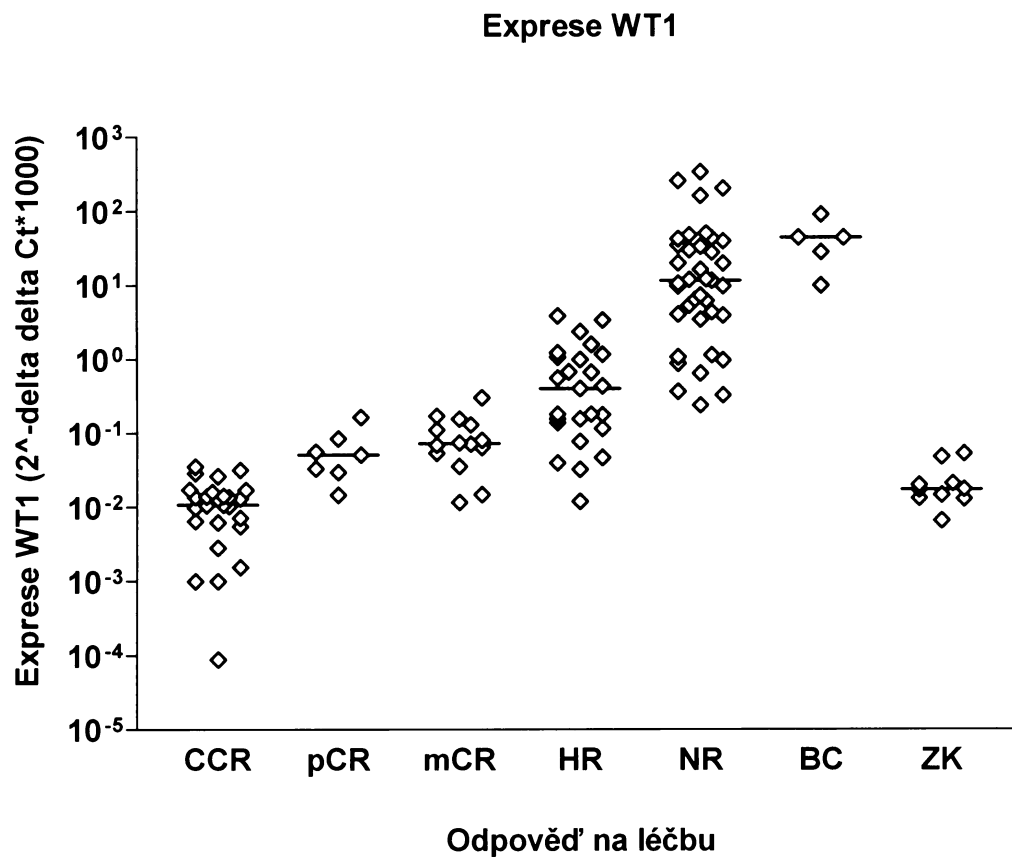
Testy ukázaly signifikantní rozdíl mezi skupinou pacientů neodpovídajících na léčbu a téměř všemi ostatními typy odpovědi na léčbu a mezi vzorky blastické krize a hematologické nebo kompletní cytogenetické odpovědi, viz obr. 4.4. Na základě tohoto výsledku jsme o Ki-67 uvažovali spíše jako o potenciálním markeru skupiny pacientů neodpovídajících na léčbu, tj. markeru rezistence k léčbě.

#### Vysvětlivky k obr. 4.1 až 4.5

Grafy ukazují expresi u jednotlivých odpovědí na léčbu – BC značí blastickou krizi, NR značí vzorky pacientů bez odpovědi na léčbu, HR hematologické odpovědi, mCR malou cytogenetickou odpověď, pCR částečnou cytogenetickou odpověď, CCR kompletní cytogenetickou odpověď a ZK zdravé kontroly. Příčné čáry značí mediány exprese v jednotlivých odpovědích.

Tabulka ukazuje výsledky statistického hodnocení. Statisticky významné rozdíly jsou vyznačeny oranžovým zbarvením polí tabulky.

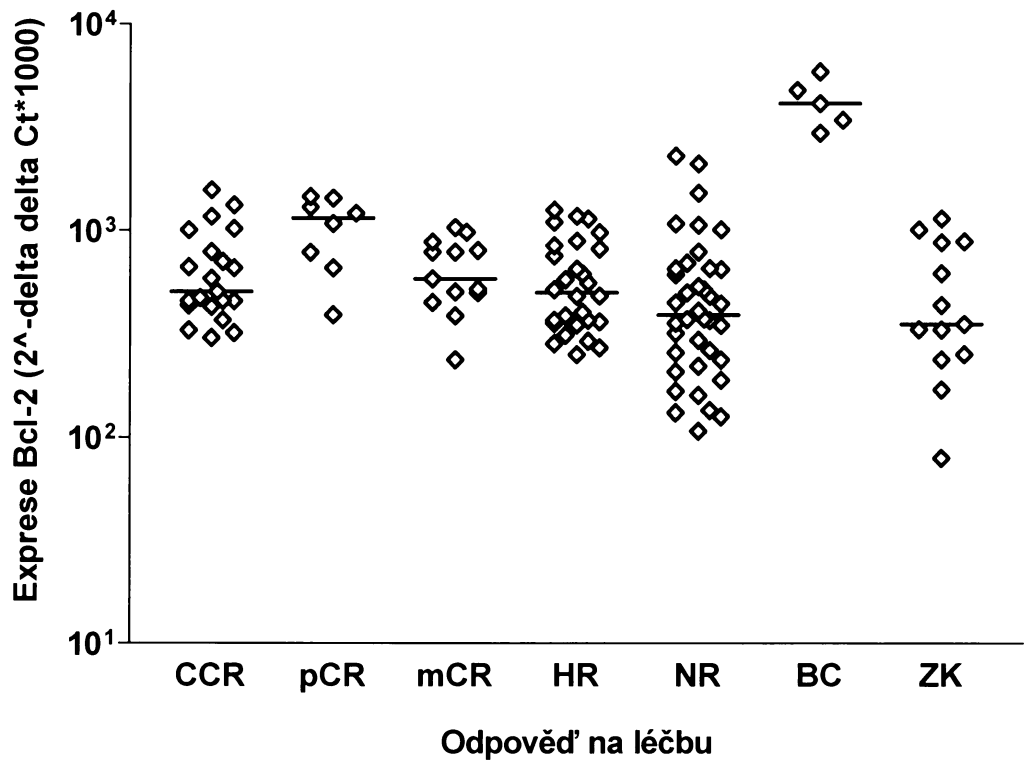
Na obr. 4.5 je pro porovnání uveden graf ukazující expresi BCR-ABL u jednotlivých odpovědí na léčbu (RULCOVÁ et al. 2007).



Odpovědi	Tukeyho test
BC vs NR	P > 0.05
BC vs HR	P < 0.001
BC vs mCR	P < 0.001
BC vs pCR	P < 0.001
BC vs CCR	P < 0.001
BC vs ZK	P < 0.001
NR vs HR	P < 0.001
NR vs mCR	P < 0.001
NR vs pCR	P < 0.001
NR vs CCR	P < 0.001
NR vs ZK	P < 0.001
HR vs mCR	P > 0.05
HR vs pCR	P > 0.05
HR vs CCR	P < 0.001
HR vs ZK	P < 0.001
mCR vs pCR	P > 0.05
mCR vs CCR	P < 0.001
mCR vs ZK	P > 0.05
pCR vs CCR	P < 0.05
pCR vs ZK	P > 0.05
CCR vs ZK	P > 0.05

**Obr. 4.1** Expese WT1 u různých odpovědí na léčbu

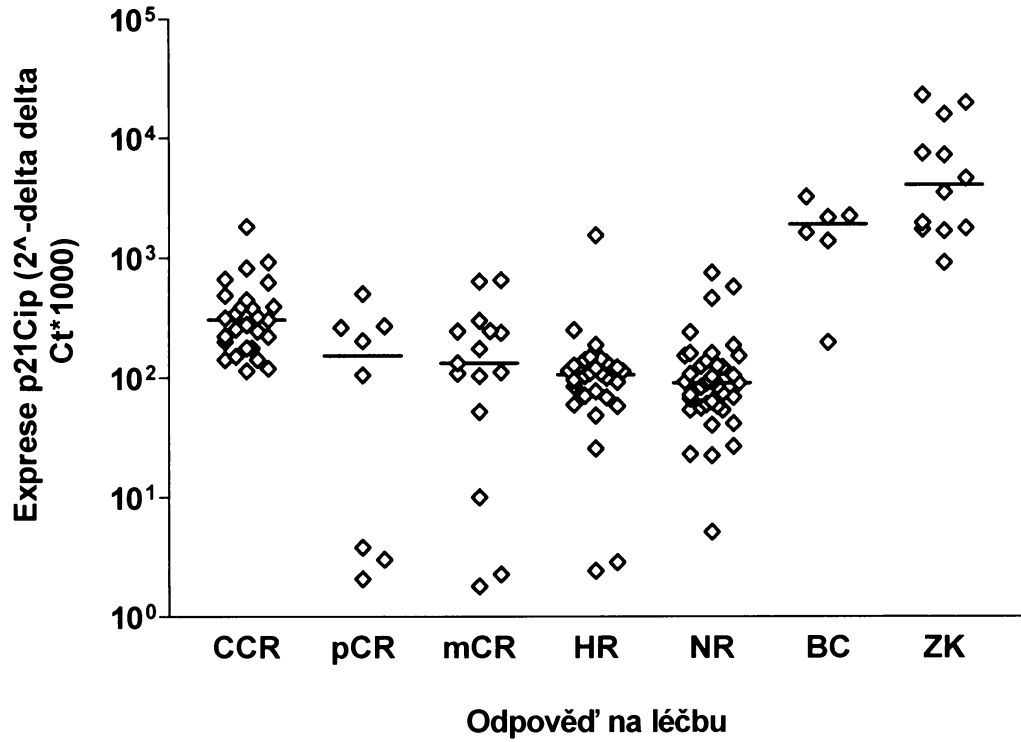
### Expresse Bcl-2



Odpovědi	Tukeyho test
BC vs NR	P < 0.001
BC vs HR	P < 0.001
BC vs mCR	P < 0.01
BC vs pCR	P > 0.05
BC vs CCR	P < 0.001
BC vs ZK	P < 0.001
NR vs HR	P > 0.05
NR vs mCR	P > 0.05
NR vs pCR	P > 0.05
NR vs CCR	P > 0.05
NR vs ZK	P > 0.05
HR vs mCR	P > 0.05
HR vs pCR	P > 0.05
HR vs CCR	P > 0.05
HR vs ZK	P > 0.05
mCR vs pCR	P > 0.05
mCR vs CCR	P > 0.05
mCR vs ZK	P > 0.05
pCR vs CCR	P > 0.05
pCR vs ZK	P > 0.05
CCR vs ZK	P > 0.05

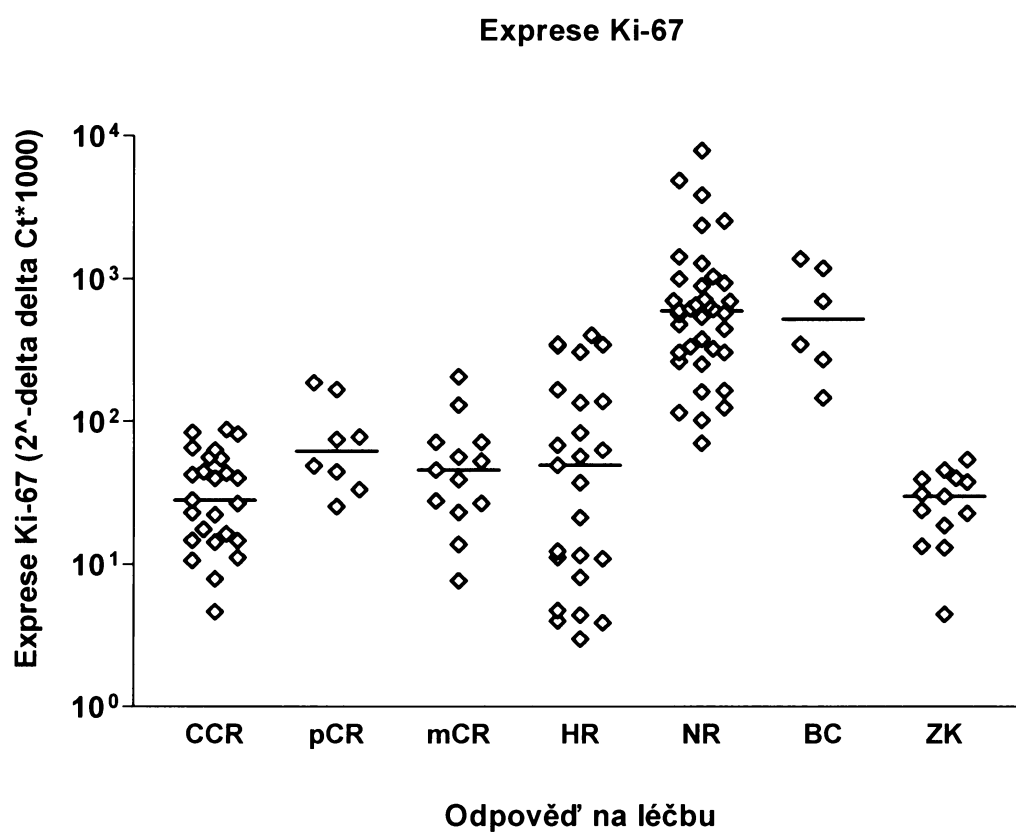
Obr. 4.2 Expresse Bcl-2 u různých odpovědí na léčbu

### Expres p21Cip



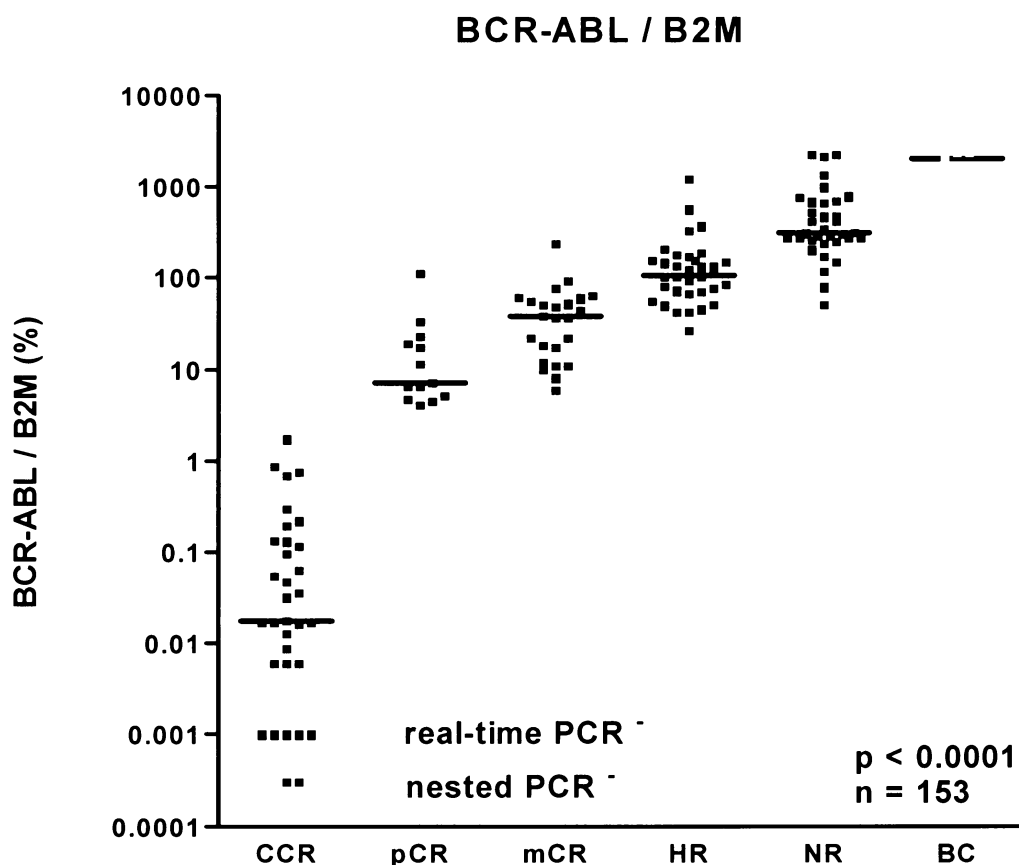
Odpovědi	Tukeyho test
BC vs NR	P < 0.001
BC vs HR	P < 0.001
BC vs mCR	P < 0.001
BC vs pCR	P < 0.001
BC vs CCR	P > 0.05
BC vs ZK	P < 0.001
NR vs HR	P > 0.05
NR vs mCR	P > 0.05
NR vs pCR	P > 0.05
NR vs CCR	P < 0.001
NR vs ZK	P < 0.001
HR vs mCR	P > 0.05
HR vs pCR	P > 0.05
HR vs CCR	P < 0.01
HR vs ZK	P < 0.001
mCR vs pCR	P > 0.05
mCR vs CCR	P < 0.05
mCR vs ZK	P < 0.001
pCR vs CCR	P < 0.01
pCR vs ZK	P < 0.001
CCR vs ZK	P < 0.001

Obr. 5.3 Expres p21Cip u různých odpovědí na léčbu



Odpovědi	Dunnův test
BC vs NR	P > 0.05
BC vs HR	P > 0.05
BC vs mCR	P > 0.05
BC vs pCR	P > 0.05
BC vs CCR	P < 0.01
BC vs ZK	P < 0.01
NR vs HR	P < 0.001
NR vs mCR	P < 0.001
NR vs pCR	P > 0.05
NR vs CCR	P < 0.001
NR vs ZK	P < 0.001
HR vs mCR	P > 0.05
HR vs pCR	P > 0.05
HR vs CCR	P > 0.05
HR vs ZK	P > 0.05
mCR vs pCR	P > 0.05
mCR vs CCR	P > 0.05
mCR vs ZK	P > 0.05
pCR vs CCR	P > 0.05
pCR vs ZK	P > 0.05
CCR vs ZK	P > 0.05

**Obr. 4.4 Expresse Ki-67 u různých odpovědí na léčbu**



Obr.4.5 Expres BCR-ABL u různých odpovědí na léčbu (RULCOVÁ et al. 2007)

#### 4.4. Výsledky sledování kinetiky exprese genů WT1, Bcl-2, p21Cip, a Ki-67

V rámci hodnocení kinetiky exprese bylo sledováno 18 pacientů léčených imatinibem, ať už primárně po zaléčení pouze hydroxyureou nebo po selhání IFN. Stručnou charakteristiku pacientů uvádí tabulka 5.6.

Sledované pacienty jsme rozdělili do skupin podle reakce na léčbu imatinibem:

1. Pacienti s dobrou odpovědí na léčbu
2. Pacienti s primární rezistencí k imatinibu
3. Pacienti se sekundární rezistencí k imatinibu
4. Pacienti se suboptimální odpovědí na léčbu bez relapsu

Pacient č.	Přestavba	Pohlaví	Věk v době diagnózy	Předléčba
1	b3a2	Ž	58	HU, IFN
2	b2a2	M	57	HU, IFN
3	b3a2	M	64	HU, IFN
4	b3a2	M	34	HU, IFN
5	b3a2	Ž	57	HU, IFN
6	b2a2	M	64	HU, IFN
7	<b>b3a2</b>	<b>M</b>	<b>32</b>	<b>HU</b>
8	b3a2	Ž	58	HU, IFN
9	b2a2	M	49	HU, IFN+Ara-C
10	b3a2	M	21	HU, IFN
11	b3a2	M	55	HU, IFN
12	b3a2	Ž	57	HU, IFN
13	<b>b3a2</b>	<b>Ž</b>	<b>57</b>	<b>HU</b>
14	b2a2	M	57	HU, IFN+Ara-C
15	b3a2	Ž	61	HU, HU+IFN
16	b3a2	M	43	IFN+HU
17	b2a2	Ž	31	HU, IFN
18	b3a2	Ž	58	ICT

**Tab. 4.6 Charakteristika pacientů – část první:** M – muž, Ž – žena, žlutá pole zahrnují pacienty s dobrou odpovědí na léčbu, oranžová pacienty s primární rezistencí, šedá pacienty se suboptimální odpovědí na léčbu, zelená pacienty se sekundární rezistencí bez mutací kinázové domény BCR-ABL, modrá pacienty s mutacemi v kinázové doméně BCR-ABL



Pacient č.	Stav při zahájení léčby imatinibem	Nejlepší dosažená odpověď	Relaps	Mutace (měsíc objevení)	Počet vzorků před STI
1	Cr	CMR	-	ND	3
2	pCR	CMR	-	ND	2
3	mCR	CMR	-	ND	0
4	CR	Prim. rez.	-	E255K	4
5	CP, dg	Prim. rez.	AP	ND	0
6	Hr	CHR	-	Wt	9
7	Hr	CHR	Hr	F317L (15.), M351T (17.)	3
8	Cr	CCR	Cr	Wt	1
9	Hr, AP	CCR	Cr	Wt	1
10	Hr	CCR	Hr	Wt	12
11	Hr	CHR	Hr, AP	Wt	8
12	Hr	CHR	Hr, AP	Wt	0
13	CP, dg	mCR	Hr	F359V (26.)	0
14	AP	HR	Hr, BC	Wt	2
15	Hr, AP	CHR	Hr	M244V (47.)	3
16	Hr	CCR	Hr	F317L (74.), G250E (75.)	2
17	Hr	HR	Hr	Y253H (56.)	1
18	Hr	CHR	Hr	F311I (86.)	0

**Tab 4.6 Charakteristika pacientů – část druhá:** žlutá pole zahrnují pacienty s dobrou odpovědí na léčbu, oranžová pacienty s primární rezistencí, šedá pacienty se suboptimální odpovědí na léčbu, zelená pacienty se sekundární rezistencí bez mutací kinázové domény BCR-ABL, modrá pacienty se sekundární rezistencí s mutacemi v kinázové doméně BCR-ABL; Cr značí cytogenetický relaps, pCR částečnou cytogenetickou odpověď, mCR malou cytogenetickou odpověď, CP chronickou fázi, dg dobu diagnózy, Hr hematologický relaps, AP akcelerovanou fázi, CMR kompletní molekulární odpověď, Prim. rez. primární rezistenci, CHR kompletní hematologickou odpověď, CCR kompletní cytogenetickou odpověď, mCR malou cytogenetickou odpověď, HR hematologickou odpověď, BC blastickou krizi, wt bez mutace, ND netestováno.

#### 4.4.1. Pacienti s dobrou odpovědí na léčbu

Skupina obsahuje tři pacienty (číslo 1 až 3, obr. 4.6 až 4.8), kteří po nasazení imatinibu dosáhli kompletní cytogenetické odpovědi. Všichni dosáhli také určitého stupně molekulární odpovědi, hladina BCR-ABL klesla u všech pacientů o 3 až 4 řády. U pacienta č.1 se podařilo dosáhnout až déletrvajících BCR-ABL negativity (kompletní molekulární remise), což je nejlepší odpověď na léčbu imatinibem vůbec.

Hladina WT1 se při dosažení nejlepší individuální odpovědi pohybovala kolem 0,1 až 1, což je hodnota velmi blízká hladině ve zdravých buňkách. Pouze u pacienta č.2 pokles WT1 koreloval s poklesem BCR-ABL. Jednalo se ale o pokles v důsledku zaléčení pacienta hydroxyureou, nikoliv imatinibem. Po nasazení imatinibu hladina WT1 naopak mírně stoupla a dostala se tak zhruba na hodnotu zdravých buněk. U zbylých dvou pacientů byl pokles mírnější. U pacienta č. 3 je pokles nižší (celkově zhruba o 1 řád) patrně z důvodu dobrého stavu (normální hodnoty krevního obrazu) v době zahájení léčby imatinibem. U pacienta č. 1 došlo po nasazení imatinibu k poklesu pouze o dva řády, avšak zajímavé je, že jde o pokles na hodnotu velmi nízkou, nižší než je medián ve zdravých buňkách. Po 70. měsíci došlo ke zvýšení hladiny WT1 zhruba o jeden řád na hladinu zdravých buněk. Celkem tedy po nasazení imatinibu došlo u této skupiny pacientů k poklesu exprese WT1 nejvýše o dva řády, a to u pacienta č. 1, v porovnání s téměř šesti řády poklesu exprese BCR-ABL.

Expres Bcl-2 vykazuje velmi malé výkyvy. U pacientů č. 2 a 1 zpočátku velmi mírně rostla, po nasazení imatinibu došlo k zastavení nárůstu, u pacienta č. 1 dokonce k mírnému poklesu až na hladinu ve zdravých buňkách. Pacient č. 3 reagoval na imatinib nejvýrazněji, snížením hladiny Bcl-2 o 2,5 řádu a to navíc pod hladinu zdravých buněk. Jde o vůbec nejnižší námi zjištěnou hladinu. Hodnoty byly ověřeny dvěma nezávislými měřeními (tj. s přípravou vzorku od izolace RNA).

Expres p21Cip byla relativně stabilní u pacientů č. 1 a č. 3. U pacienta č. 2 došlo k nárůstu hladiny zhruba o půl řádu směrem k hladině ve zdravých buňkách. Tento nárůst, jak plyne ze statistického hodnocení, patrně znamená počáteční zlepšení stavu pacienta. Po nasazení imatinibu se hladina stabilizovala.

Expres Ki-67 vykazovala u všech pacientů podobnou kinetiku jako expres WT1. Pokles byl nejvyšší u pacienta č. 2 (2 řády), kde pokračoval i po nasazení imatinibu.

#### 4.4.2. Pacienti s primární rezistencí k imatinibu

Skupina zahrnuje pouze dva pacienty – č. 4 a č. 5 (obr. 4.9 a 4.10). Výskyt primární rezistence není příliš častý a obvykle není spojován s výskytem mutací. Pacient č. 5 je navíc zajímavý tím, že hladina BCR-ABL u něj zůstává po celý průběh onemocnění stabilní, nereaguje na změny krevního obrazu. Tento jev může naznačovat nezávislost onemocnění na BCR-ABL (které bylo navíc do jisté míry potvrzeno dalšími výsledky naší laboratoře – pacient má aktivované Src kinázy). Krevní obraz se nepodařilo normalizovat hydroxyureou a nedošlo ani ke snížení hladiny BCR-ABL (trvale nad 100%). Pacientka zůstala i 100% Ph pozitivní. Druhý pacient této skupiny, č. 4, špatně snášel IFN a byl proto převeden na imatinib. Odpověď na tento lék nebyla u něj zaznamenána žádnou z rutinně používaných vyšetřovacích metod (tj. hematologické, cytogenetické nebo molekulární vyšetření BCR-ABL).

Expres WT1 u obou pacientů koreluje s jejich stavem, tj. s krevním obrazem. U pacienta č. 4 je tak poměrně stabilní, mírný nárůst hladiny po 70. měsíci může odrážet obdobně mírný nárůst leukocytů. U pacienta č. 5 WT1 lépe než BCR-ABL signalizuje změny krevního obrazu. U pacienta č. 5 je navíc patrné, že WT1 roste na hladinu blastické krize již v akcelerované fázi.

Expres Bcl-2 je u obou pacientů stabilní, blízká hladině zjištěné v buňkách zdravých jedinců. Neukazuje tedy na to, že by se mohlo jednat o případ rezistence nezávislé na BCR-ABL, kdy vysoká hladina Bcl-2 naznačuje roli Src kinázy LYN v CML (viz. kapitola 2.2.4.2).

Expres p21Cip je rovněž poměrně stabilní. Mírný pokles po nasazení imatinibu u pacienta č. 4 může značit primární rezistenci. Celkově nižší hladina ukazuje na primární rezistenci také u pacienta č. 5.

Expres Ki-67 koreluje s krevními obrazy pacientů. tj., u pacienta č. 4 je stabilní, celkově pouze velmi mírně nad normální hladinou. To je zvláštní, pokud uvážíme, že mutace E255K, kterou jsme u pacienta našli, dle literatury zvyšuje aktivitu BCR-ABL a přináší buňkám proliferační výhodu. U pacienta č. 5 hladina dokonce přesáhla medián exprese v blastické krizi, což zřejmě ukazuje na agresivní formu onemocnění. Expres zde byla navíc zvýšena od diagnózy a lze tedy říci, že signalizovala zhoršení pacienta předem.

U genů Ki-67, Bcl-2 a p21Cip bylo zaznamenáno u pacienta č. 5 prudké jednorázové zvýšení exprese zhruba v 15. měsíci, který lze označit za počátek nástupu fáze akcelerace. Tento zvláštní výkyv byl ověřen dvěma nezávislými měřeními.

#### **4.4.3. Pacienti se sekundární rezistencí k imatinibu**

Skupina zahrnuje 12 pacientů. Sekundární rezistencí rozumíme ztrátu efektivity léčby po počáteční pozitivní reakci. Protože sekundární rezistence bývá často spojována s mutacemi kinázové domény BCR-ABL, rozdělili jsme tuto skupinu na pacienty s mutací a pacienty bez mutace. Snažili jsme se potom zjistit, zda mutovaná forma BCR-ABL může způsobit změny v expresi námi sledovaných genů.

##### **4.4.3.1. Pacienti, u nichž byla nalezena mutace BCR-ABL kinázové domény**

Skupina zahrnuje 6 pacientů (číslo 7, 13, 15, 16, 17, 18, obr. 4.11 až 4.16), kteří po počáteční odpovědi na léčbu po určité době získali rezistenci k léčbě a relabovali. U všech pacientů se jednalo o relaps hematologický. U dvou pacientů (číslo 13 a 15) byl relaps úspěšně zaléčen zvýšenou dávkou imatinibu, dva pacienti (číslo 7 a 16) podstoupili TKB a dva (číslo č. 17 a 18) byli převedeni do klinické studie dasatinibu.

Mutace, které jsme u pacientů našli by měly být dle literatury vesměs překonatelné zvýšenou dávkou imatinibu, pouze mutace F317L bývá spojována s rezistencí k imatinibu.

Expese WT1 vykazovala velmi výrazné výkyvy v rozpětí od blastické krize po CCR u pacienta č. 17. Tyto výkyvy korelovaly místy s kinetikou krevního obrazu, ale hladina WT1 zde byla celkově vyšší oproti ostatním pacientům. Výkyvy exprese byly potvrzeny dvěma nezávislými testy. U všech ostatních pacientů hladina WT1 měla podobný průběh jako krevní obraz, resp. BCR-ABL. S výjimkou pacienta č. 15 byl nárůst exprese WT1 v porovnání s BCR-ABL výraznější (u pacienta č. 7 téměř 1,5 řádu ve srovnání s 0,5 řádu BCR-ABL, u č. 16 3 řády ve srovnání s 2 řády BCR-ABL, u č. 18 3 řády ve srovnání s 1,5 řádu). U pacienta č. 16 navíc nárůst WT1 o několik týdnů předcházela nárůstu BCR-ABL. U pacientů č. 7 a 13 by se rovněž dalo hovořit o časnějším nárůstu.

Exprese Bcl-2 byla opět velmi zvláštní u pacienta č. 17, kde vykazovala značné výkyvy pod hladinu ve zdravých buňkách. Tyto změny ale opět nebylo možné spojovat s jinými změnami stavu pacienta. U zbylých pacientů můžeme vidět náznaky korelace s krevním obrazem. Výjimkou je pacient č. 15, u kterého exprese Bcl-2 nekoreluje příliš s krevním obrazem, nicméně po nasazení imatinibu dochází k zastavení nárůstu exprese, stabilizaci a později dokonce k poklesu hladiny. To lze s ohledem na funkci Bcl-2 proteinu chápat spíše jako pozitivní reakci.

Exprese p21Cip byla u pacientů č. 15 a 18 poměrně stabilní. U pacienta č. 15 neodráží ani počáteční zvýšenou hladinu leukocytů. U pacienta č. 7 vykazovala p21Cip výkyvy s ohledem na statistické hodnocení spíše opačné, avšak zároveň také tak malé, že je možné považovat expresi rovněž za spíše stabilní. U pacientů č. 17, 13 a 16 vyazuje p21Cip výkyvy, které v souladu se statistikou korelují s krevním obrazem. Pokud dochází k nárůstu leukocytů, p21Cip klesá a opačně.

Exprese Ki-67 korelovala u všech pacientů skupiny velmi dobře s krevním obrazem. Ke změnám v expresi dochází prakticky současně se změnami hladiny leukocytů.

#### 4.4.3.2. Pacienti, u nichž nebyla nalezena mutace kinázové domény BCR-ABL

Skupina zahrnuje 6 pacientů (číslo 8, 9, 10, 11, 12 a 14, obr. 4.17 až 4.22), kteří po počáteční odpovědi na léčbu imatinibem relabovali. Ve dvou případech se jednalo o relaps do fáze akcelerace, v jednom případě do blastické krize. Tito tři pacienti zemřeli, ostatní se podařilo zachránit zvýšenou dávkou imatinibu, pacient č. 10 byl transplantován.

Exprese WT1 korelovala ve všech případech s krevním obrazem, s výjimkou pacienta č. 9, kde docházelo ke značným výkyvům. Ve všech případech tak byl průběh exprese podobný expresi BCR-ABL. U pacientů 10, 12 a 8 došlo stejně jako u BCR-ABL po nasazení imatinibu k počátečnímu poklesu. U pacienta č. 12 byl pokles exprese dokonce výraznější. U pacienta č. 11 díky nedostatku vzorků v „kritické“ oblasti nelze říci, zda po nasazení imatinibu došlo nejprve k poklesu exprese či nikoliv. Lze však shrnout, že WT1 reagovala ve všech případech na nasazení imatinibu velmi podobně jako BCR-ABL. U všech pacientů této skupiny byl nárůst exprese výraznější než u BCR-ABL a u pacientů č. 8 a 12 byl nárůst exprese WT1 také časnější (začal o několik týdnů dříve než nárůst BCR-ABL). U pacientů č. 10, 11 a 14 opět z důvodu

nedostatku vzorků nelze posoudit, zda nárůst WT1 je či není časnější než nárůst BCR-ABL. U pacienta č. 12 je patrné, že se hladina WT1 v akcelerované fázi (při velkém nárůstu leukocytů nebo při výskytu blastů) dostává již na hodnotu blastické krize. Dále pak výrazně nestoupá.

Exprese Bcl-2 u většiny pacientů slabě koreluje s krevním obrazem. Pokud se krevní obraz zhoršuje, hladina Bcl-2 roste mírně nad hladinu ve zdravých buňkách. Rozdíly jsou však opět příliš malé. U pacienta č. 9 exprese Bcl-2 vykazuje značné výkyvy a to směrem hluboko pod hladinu ve zdravých buňkách. Nezdá se, že by tyto změny souvisely s změnami v krevním obraze. U pacienta č. 12 exprese Bcl-2 trvale roste, s výrazným zvýšením po 40. měsíci. Po 45. měsíci se potom v krevním obraze objevují blasty. U pacienta č. 14 Bcl-2 vysokou hladinou jasně signalizuje blastickou krizi. U obou těchto pacientů tedy Bcl-2 reaguje na výskyt vyššího podílu blastů v periferní krvi, tj. na přechod do blastické krize. U pacienta č. 12 se sice jednalo pouze o akceleraci, avšak o tom, že by k blastickému zvratu patrně došlo svědčí i prudký pokles trombocytů (data neuvedena).

Kinetika exprese p21Cip odpovídá výsledku statistického hodnocení. U většiny pacientů tak platí, že při mírném zhoršení stavu pacienta hladina p21Cip klesá, pokud je krevní obraz normální, potom je exprese na úrovni zdravých buněk. Výjimkou je pacient č. 11, u něhož exprese p21Cip neodpovídá výsledku statistiky. Trend exprese je spíše opačný. U pacienta č. 9 je p21Cip nižší než ve zdravých buňkách, což patrně odráží fakt, že pacient byl na počátku měření ve fázi akcelerace. Postupný nárůst exprese po nasazení imatinibu lze chápat jako signalizaci normalizace krevního obrazu. Nárůst po 70. měsíci potom mohl signalizovat tendenci k přechodu zpět do akutní fáze onemocnění. U pacienta č. 12 exprese p21Cip nejprve klesla, po 58. měsíci naopak vzrostla. Tento nárůst může v souladu se statistickým hodnocením signalizovat přechod k blastické krizi. U pacienta č. 14 prudký nárůst exprese signalizuje blastickou krizi zcela jasně.

Exprese Ki-67 koreluje s krevním obrazem. Při zvýšení hladiny leukocytů nad normální hodnoty, Ki-67 rychle stoupá až na hladinu mediánu blastické krize (podobně jako u předchozí skupiny patrně díky malému rozdílu mezi hladinou v BC a CCR).

#### 4.4.4. Pacienti se suboptimální odpovědí bez relapsu

Skupina obsahuje jediného pacienta. Pacient č. 6 (obr. 4.23) více méně bez ohledu na typ léčby vykazoval stabilní vysokou hladinu BCR-ABL, která odpovídala kritickému stavu mezi hematologickou odpovědí a navozením rezistence k léčbě. V průběhu hematologického relapsu během léčby IFN došlo dále k nárůstu BCR-ABL zhruba o 1,5 řádu. Po zaléčení imatinibem došlo k navození kompletní hematologické remise a poklesu BCR-ABL. Hladina BCR-ABL se však v průběhu dalších 50 měsíců přesto pohybovala trvale kolem 100%.

U pacienta č. 6 WT1 reagovala na nasazení imatinibu snížením hladiny celkem zhruba o 2 řády, až na hladinu zdravých buněk. Lze říci, že zde vystihuje stav pacienta lépe než BCR-ABL, který, jak již bylo uvedeno, zůstává na hladině 100% i přes normální hodnoty krevního obrazu.

Expres Bcl-2 je stabilní na úrovni zdravých buněk. Pouze při relapsu a následné odpovědi došlo k rozkolísání hladiny, která se však následně po nasazení imatinibu stabilizovala.

Expres p21Cip vykazuje malé výkyvy, které souhlasí s výsledkem statistiky. Tj., mezi 20. a 60. měsícem došlo k poklesu hladiny, která odpovídá zvýšeným hodnotám leukocytů. Mimo toto rozmezí je p21Cip na úrovni exprese v CCR.

Expres Ki-67 opět koreluje s krevním obrazem. Zajímavé je, že vzorek z 20. měsíce, ve kterém byla hodnota leukocytů na hladině zdravých buněk, vykazuje hladinu Ki-67 stále velmi vysokou blízkou blastické krizi. To lze chápat jako náznak možnosti, že Ki-67 u některých pacientů funguje jako časný marker

#### Vysvětlivky k obr. 4.6 až 4.23

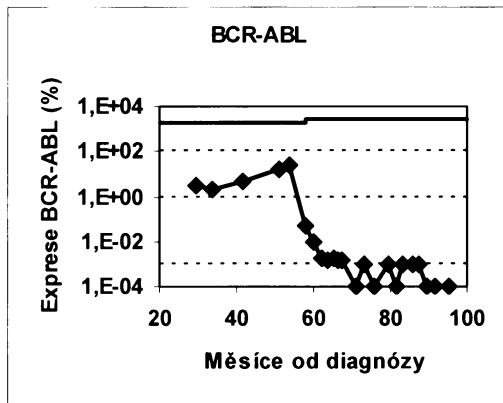
Veškeré výsledky jsou znázorněny grafy v semilogarotmickém vynesení, s logaritmickým měřítkem na ose y. Křivka ukazuje průběh exprese konkrétního genu vyjádřený hodnotami  $2^{-\Delta\Delta C_t} \times 1000$ . Modře čárkovaně je vyznačen medián hladiny v BC, světle zeleně čárkovaně medián hladiny ve zdravých buňkách a oranžově medián hladiny v CCR (pouze u p21Cip).

Grafy průběhu krevního obrazu a exprese BCR-ABL jsou převzaty z databáze pacientů naší laboratoře. Expres BCR-ABL je vyjádřena v % (jedná se o výsledky kompetitivní RT-PCR). Graf znázorňující expresi BCR-ABL má osu y v logaritmickém

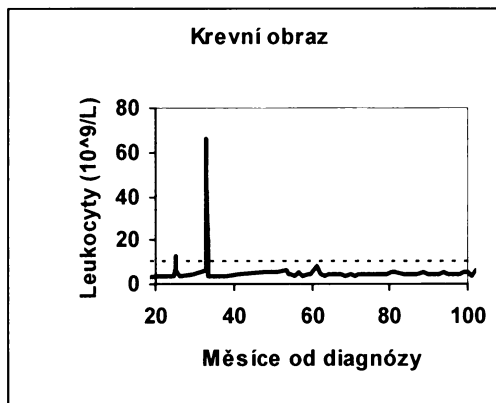
měřítku. Čárkované linie vyznačují odspoda RT-PCR negativitu, 1% BCR-ABL a 100% BCR-ABL. Plné linie v horní části grafu vymezují období, kdy pacient postupoval určitou léčbu – zelená barva značí HU, modrá IFN a červená imatinib.

Grafy týkající se jednoho pacienta jsou zahrnuty vždy v jednom obrázku, který je rozdělen na části A (průběh exprese BCR-ABL) a B (průběh krevního obrazu), které zahrnují převzaté grafy a dále na části prezentující vlastní výsledky této práce - C (exprese WT1), D (exprese Bcl-2), E (exprese p21Cip) a F (exprese Ki-67). U pacienta č. 3 nebyl k dispozici krevní obraz.

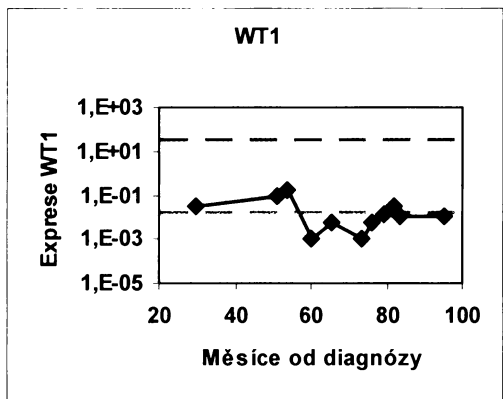




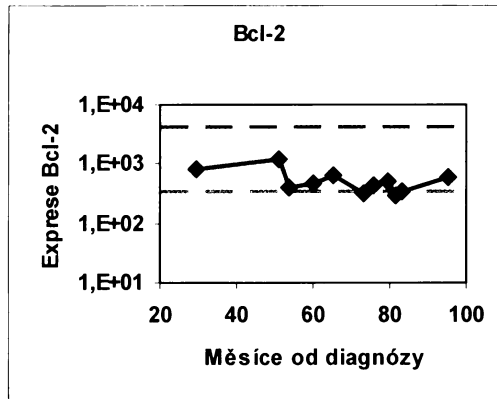
A



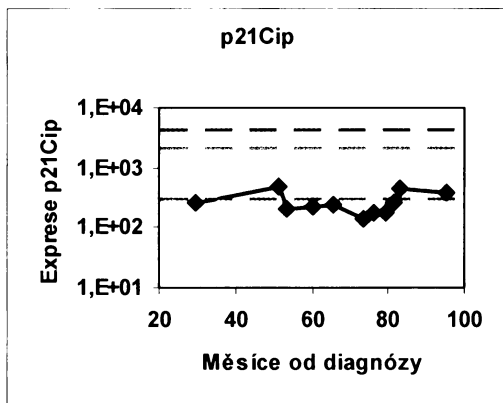
B



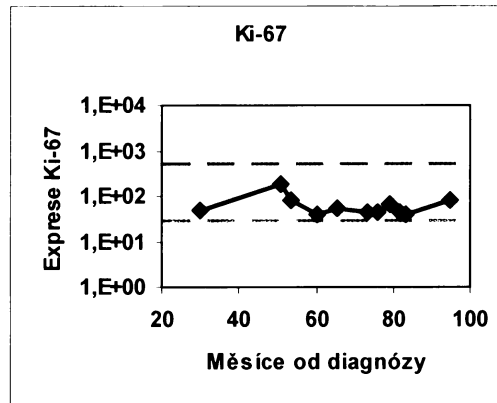
C



D

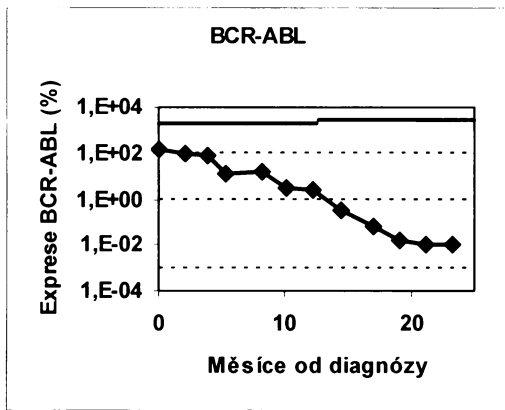


E

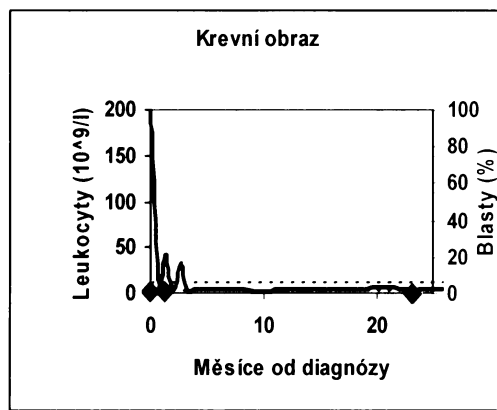


F

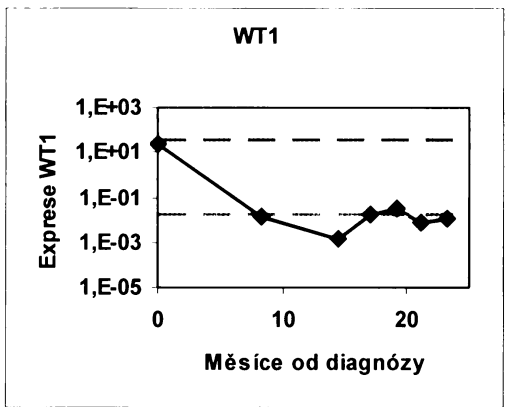
Obr. 4.6 Pacient č. 1



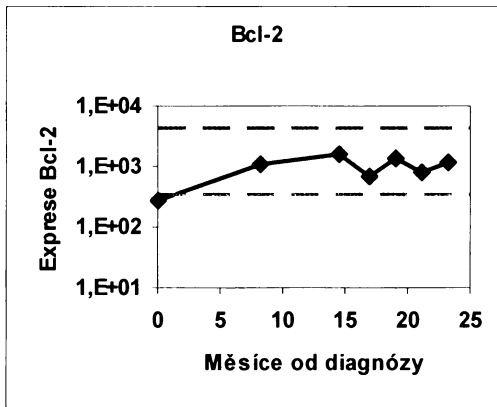
A



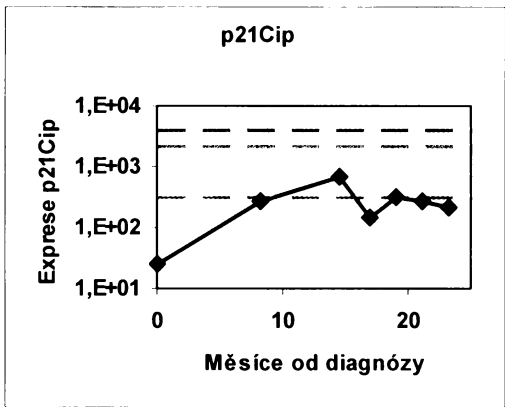
B



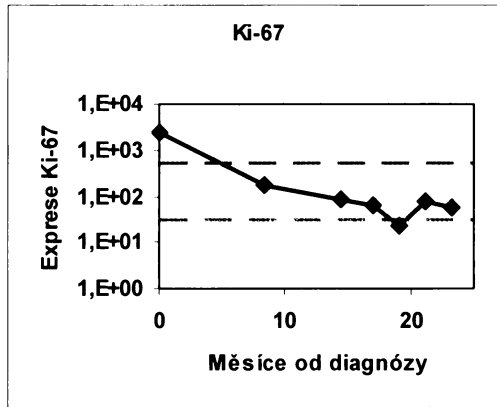
C



D

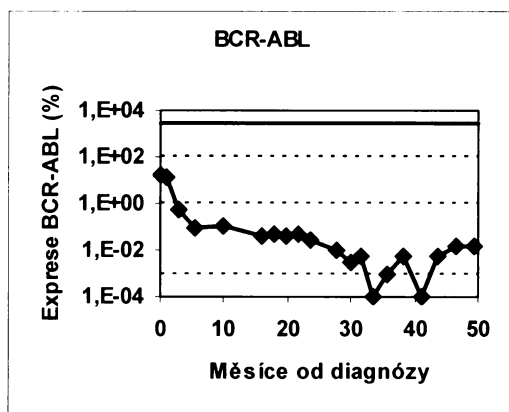


E

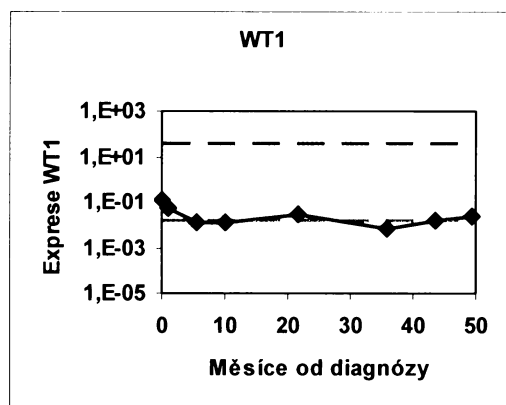


F

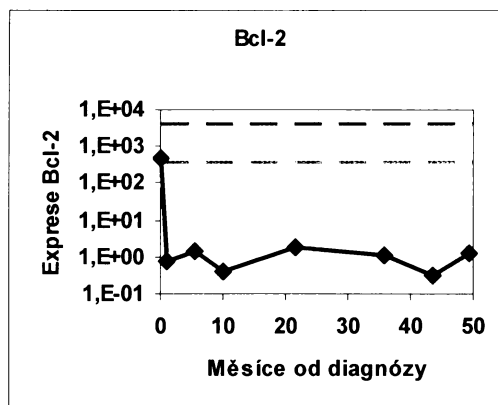
Obr. 4.7 Pacient č. 2



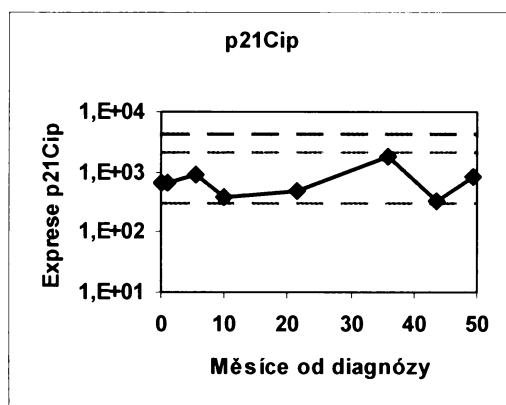
A



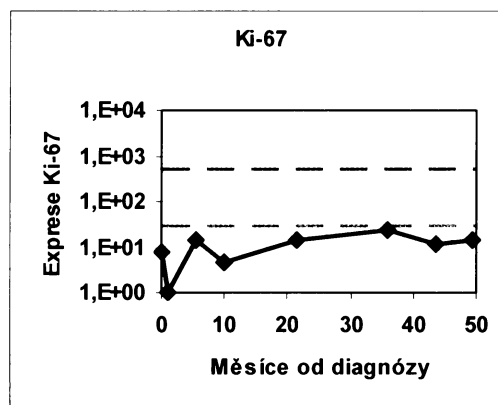
C



D

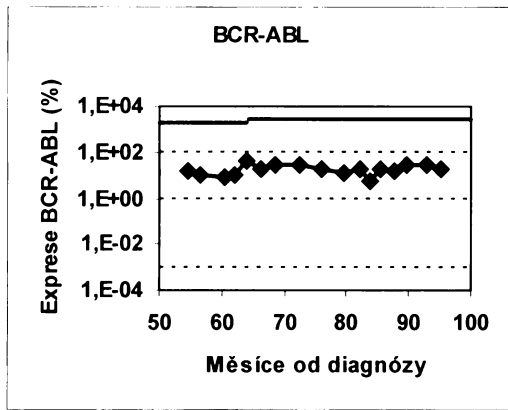


E

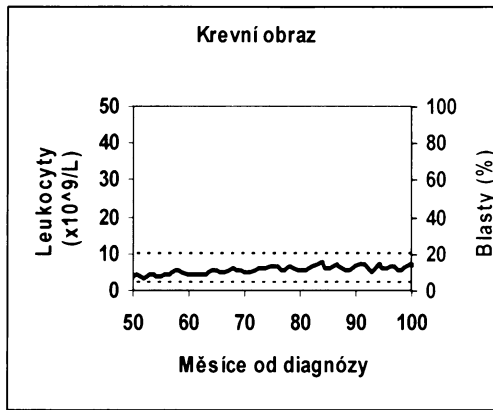


F

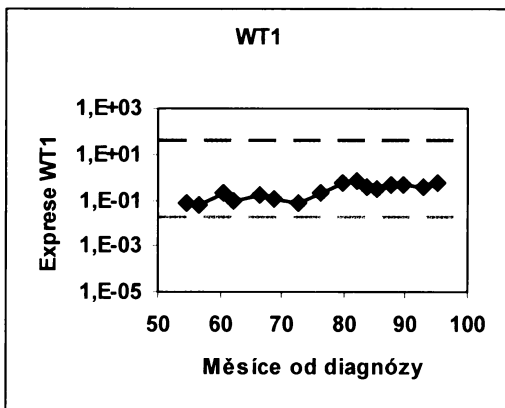
Obr 4.8 Pacient č. 3



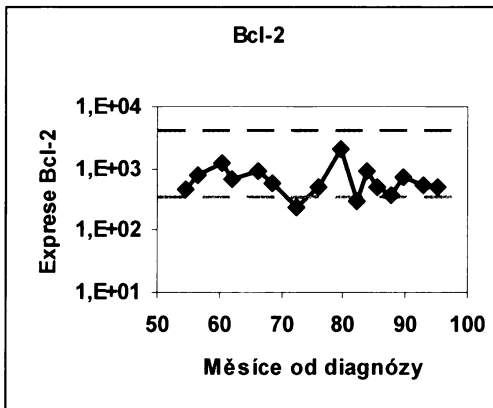
A



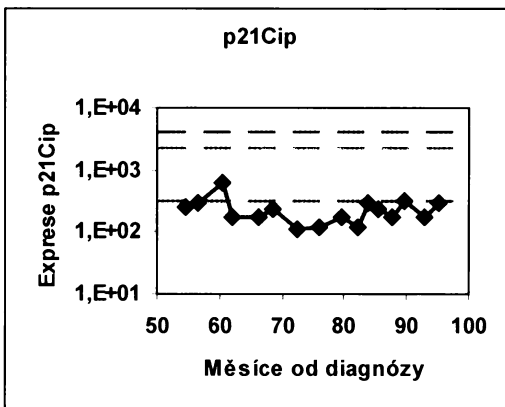
B



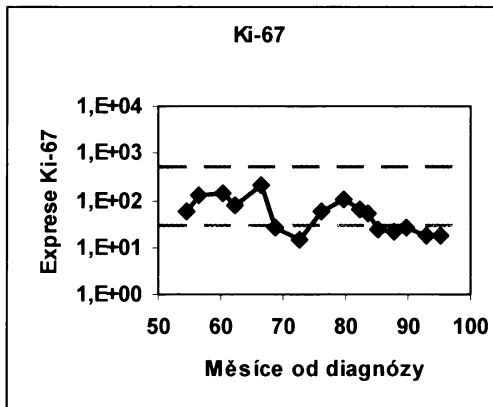
C



D

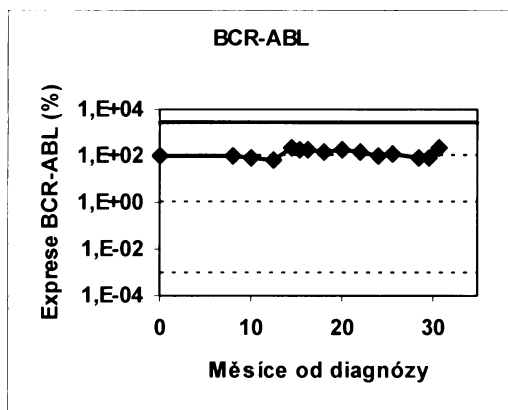


E

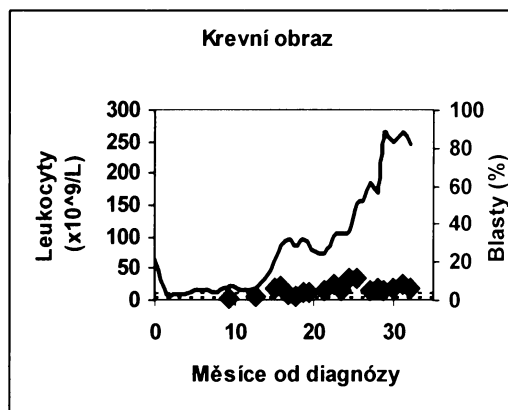


F

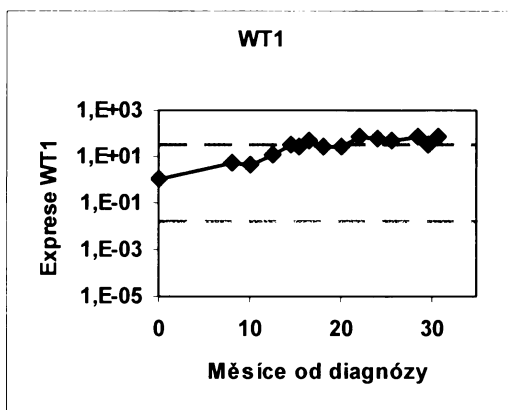
Obr. 4.9 Pacient č. 4



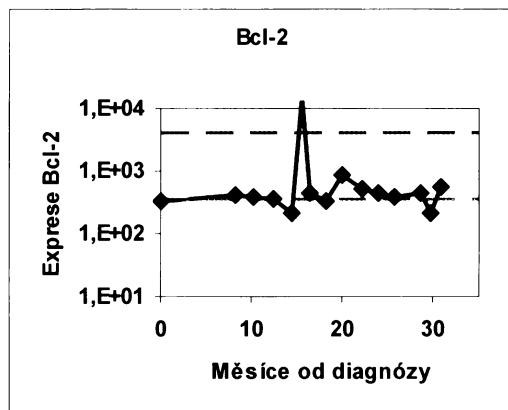
A



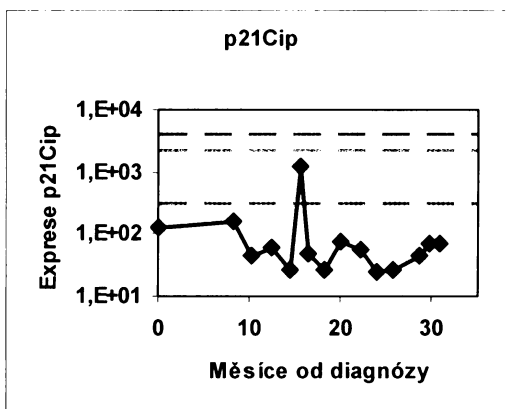
B



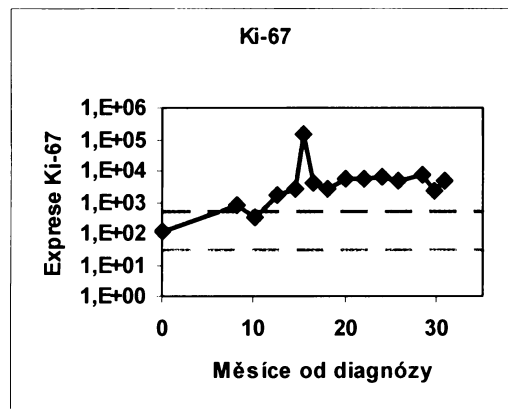
C



D

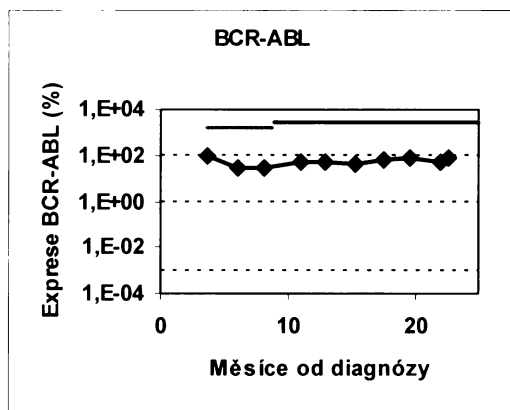


E

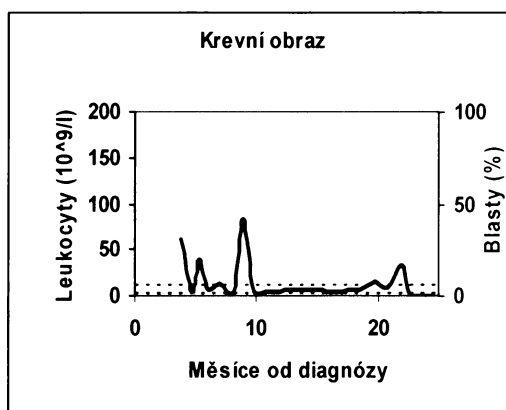


F

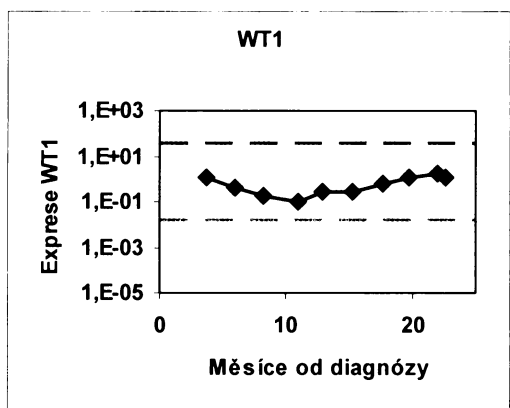
Obr. 4.10 Pacient č. 5



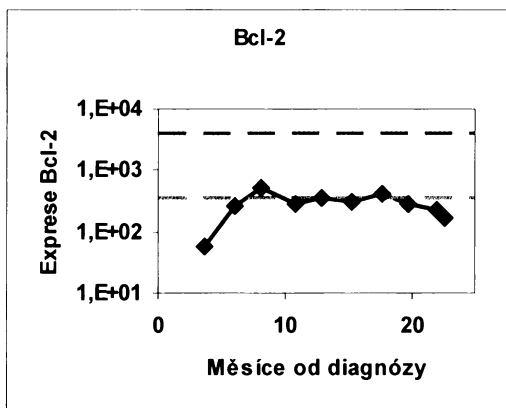
A



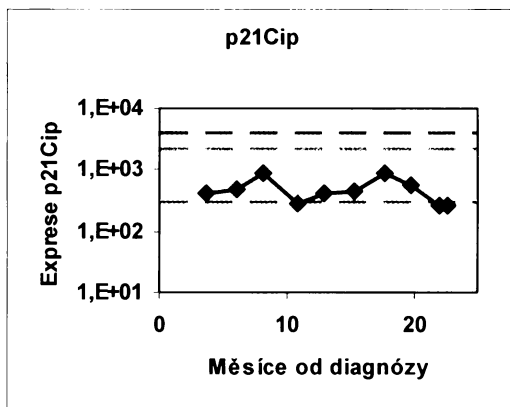
B



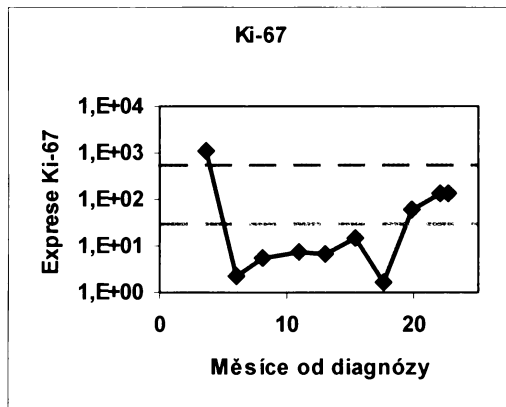
C



D

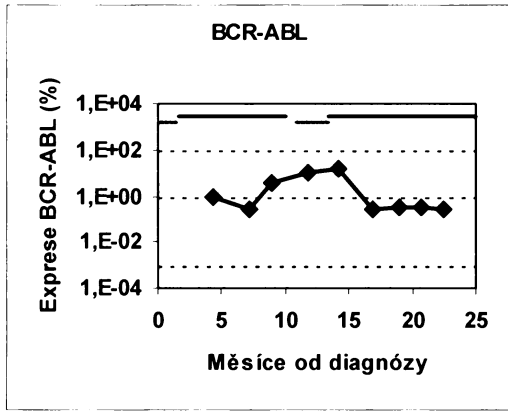


E

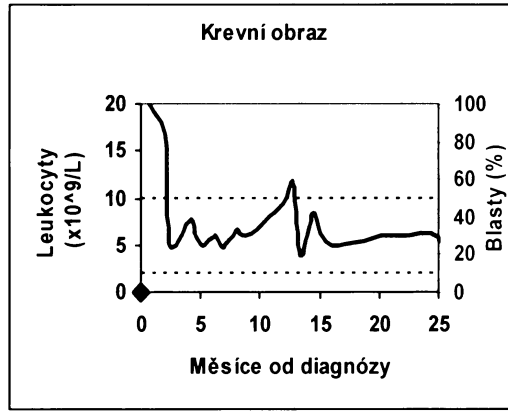


F

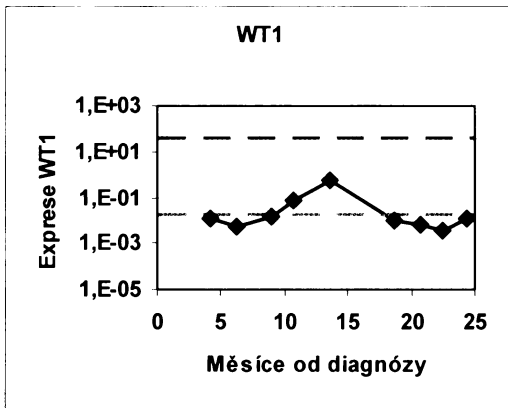
Obr. 4.11 Pacient č. 7



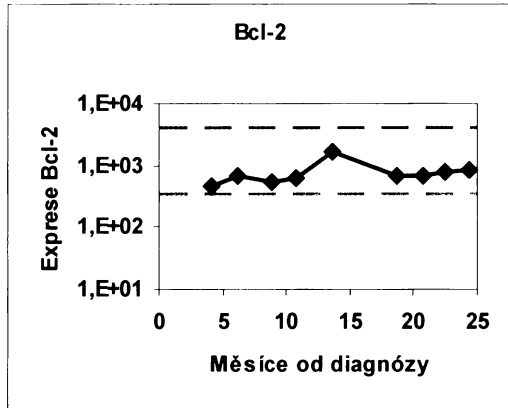
A



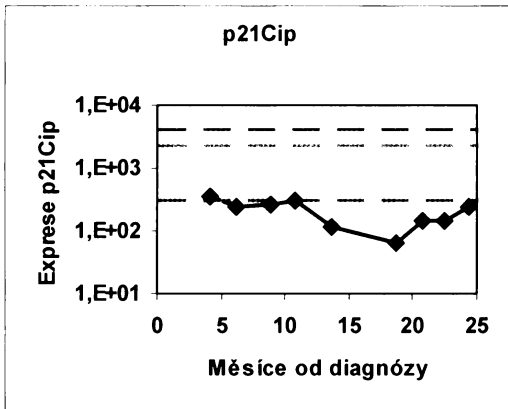
B



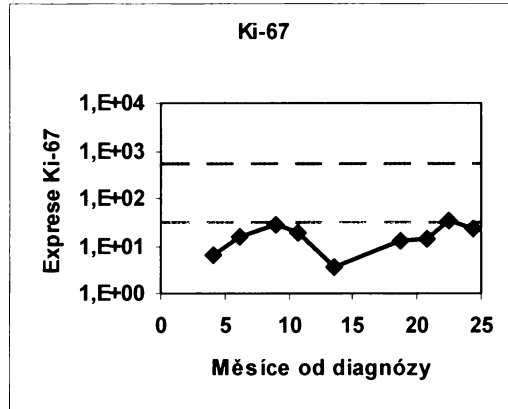
C



D

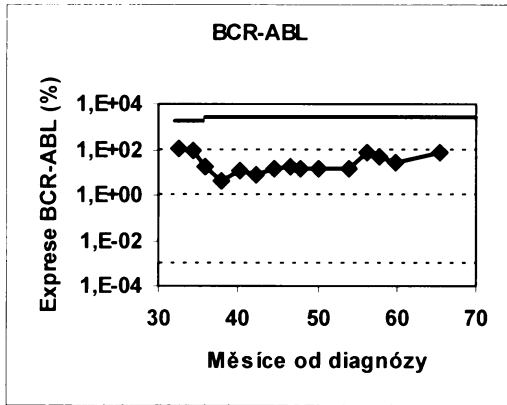


E

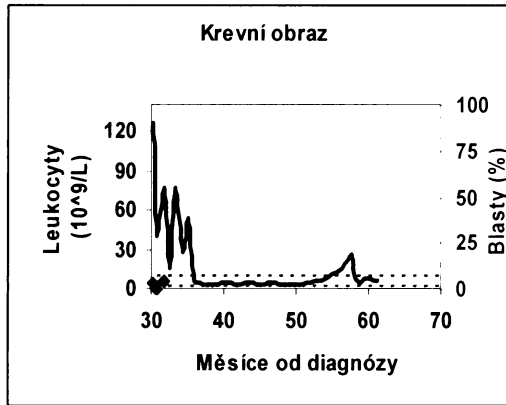


F

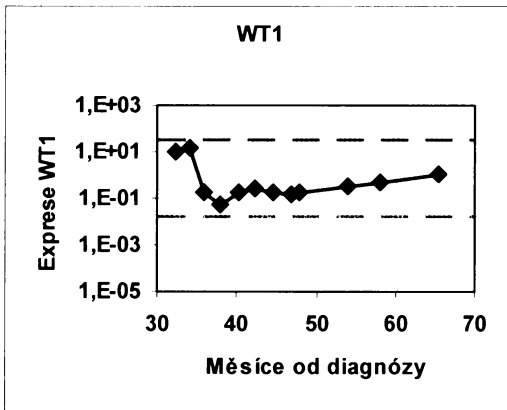
Obr. 4.12 Pacient č.13



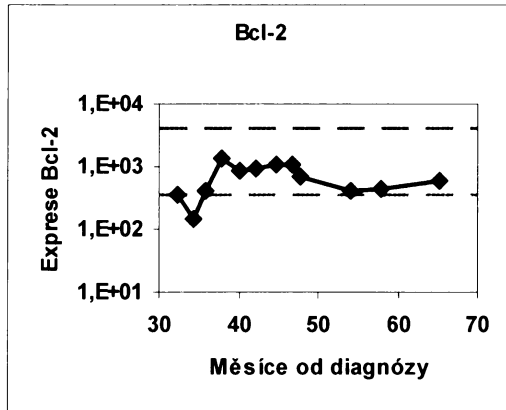
A



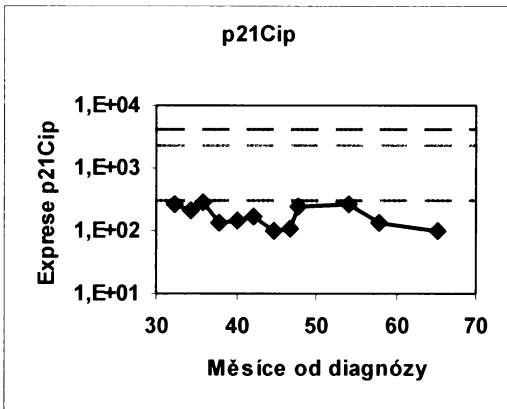
B



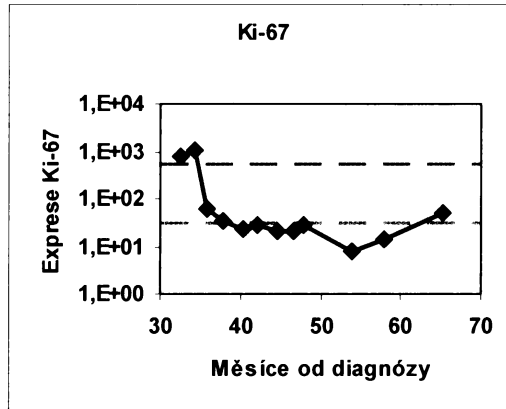
C



D



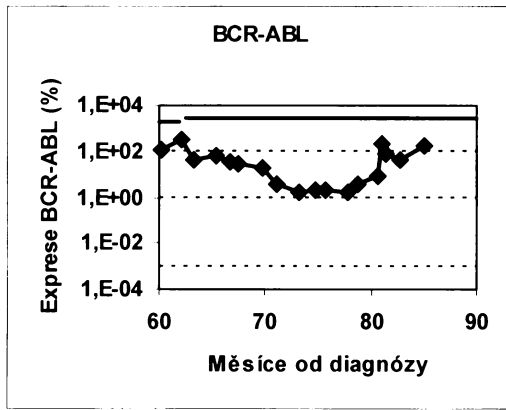
E



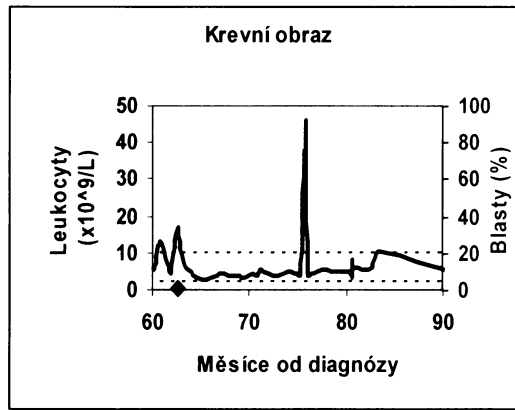
F

Obr. 4.13 Pacient č. 15

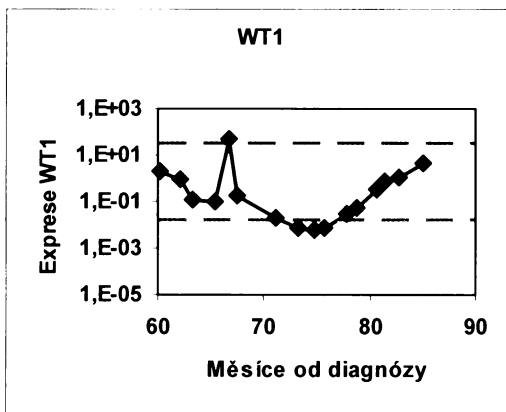




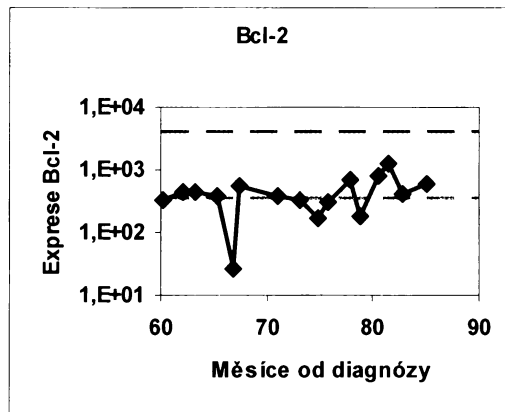
A



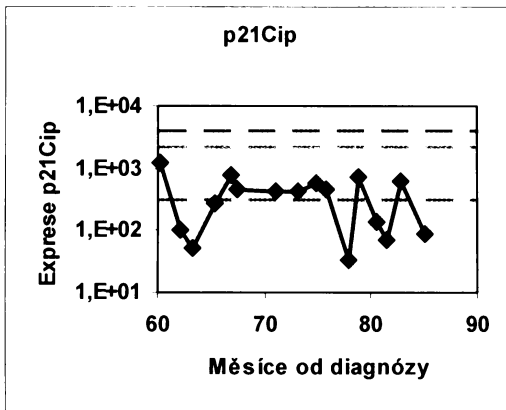
B



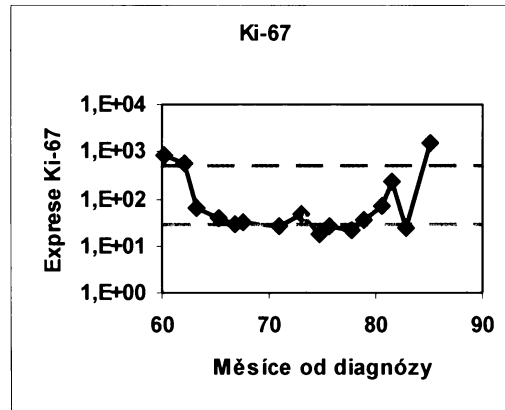
C



D

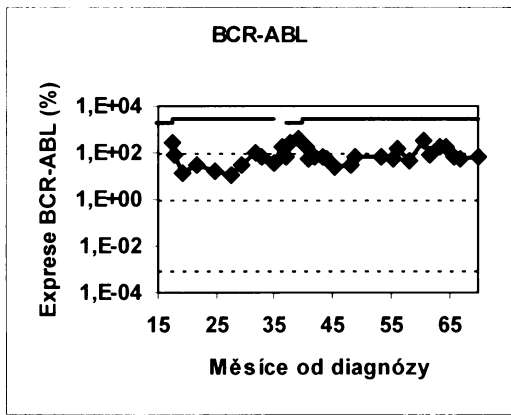


E

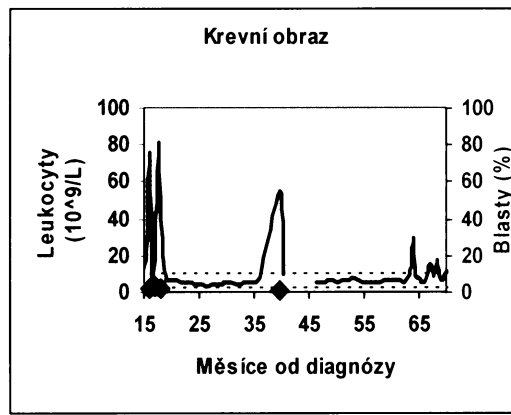


F

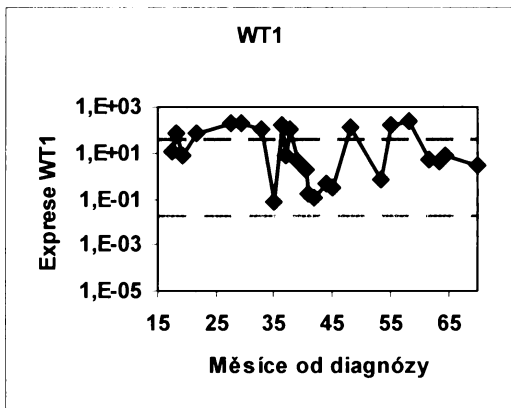
Obr. 4.14 Pacient č. 16



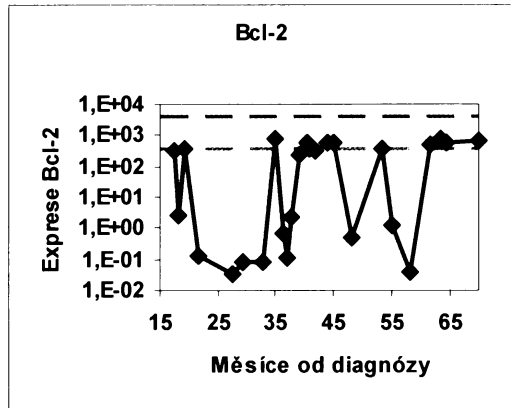
A



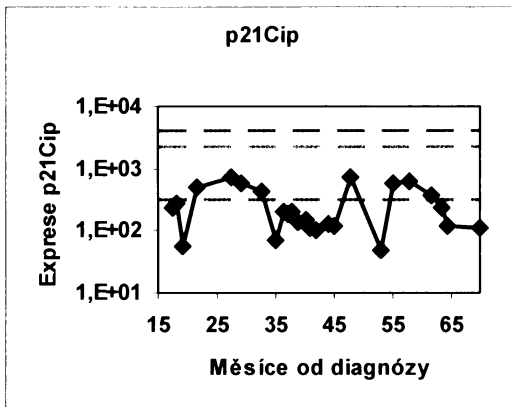
B



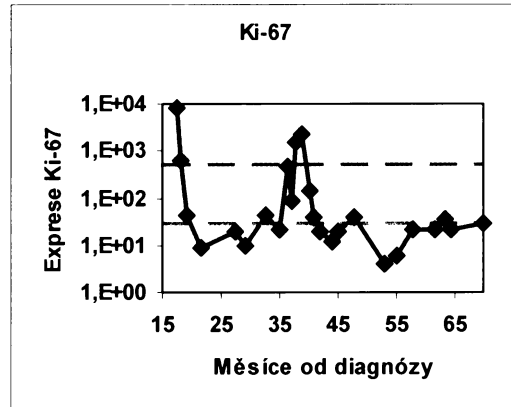
C



D

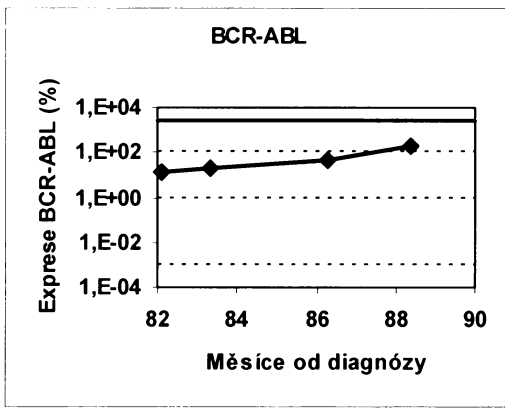


E

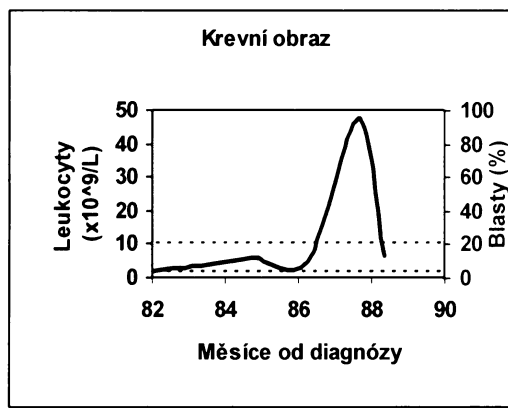


F

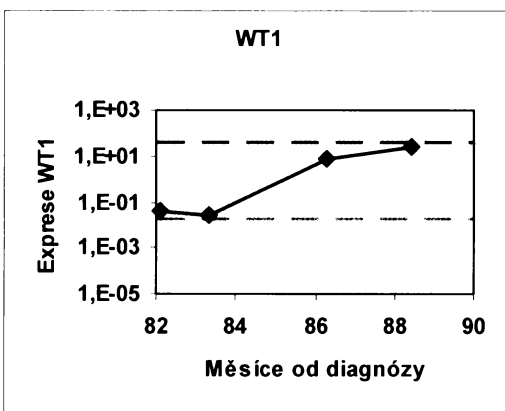
Obr. 4.15 Pacient č. 17



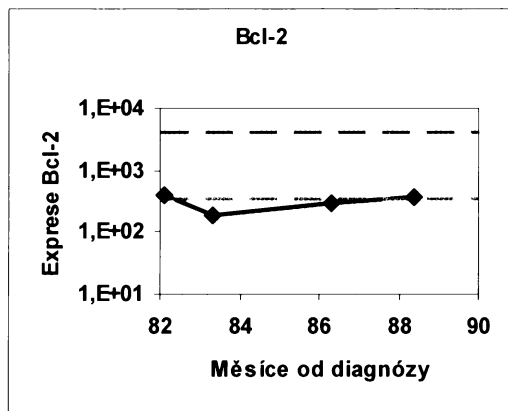
A



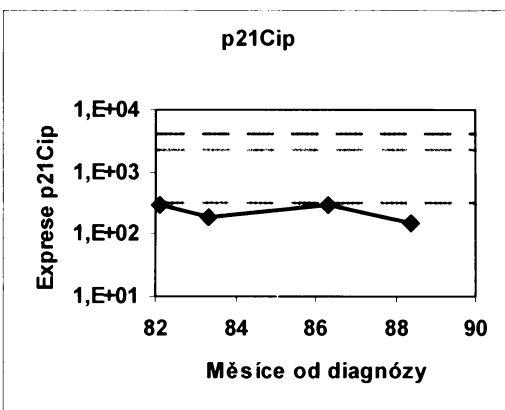
B



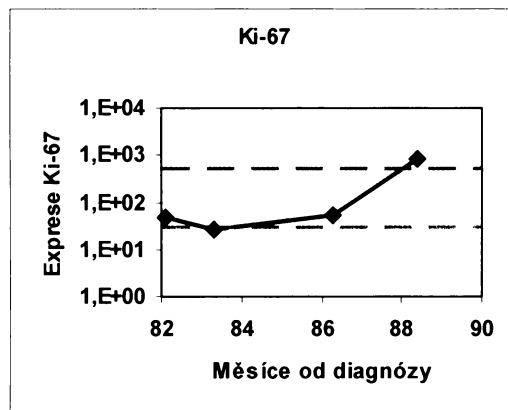
C



D

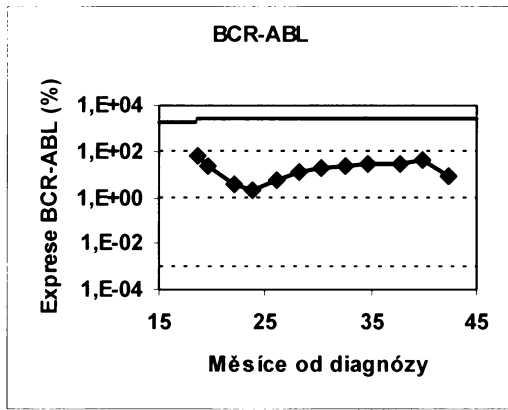


E

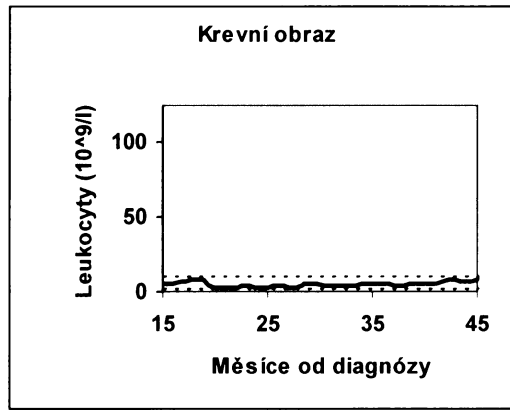


F

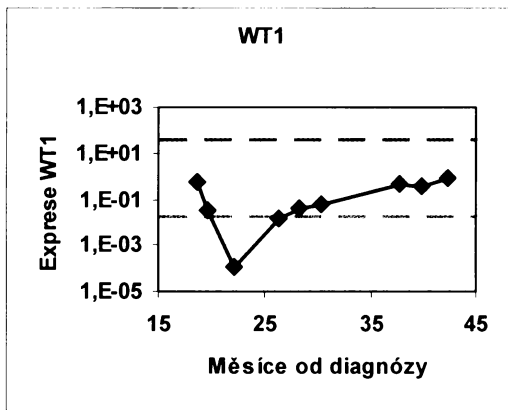
Obr. 4.16 Pacient č. 18



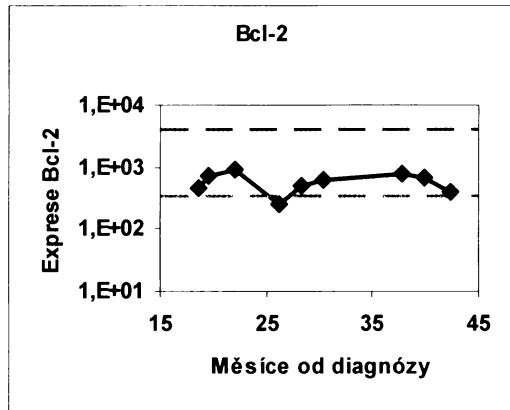
A



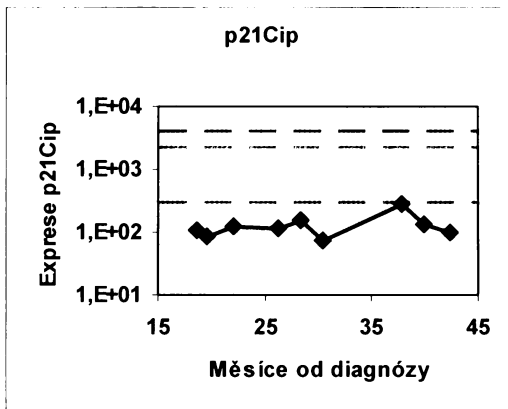
B



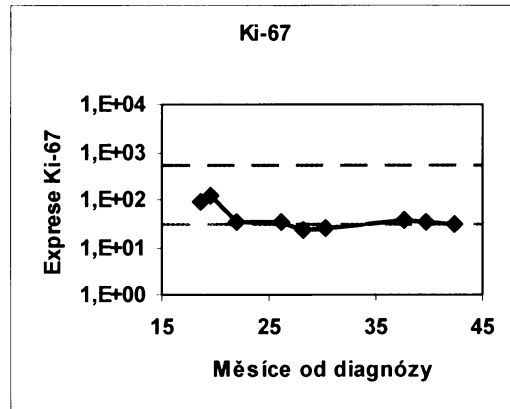
C



D

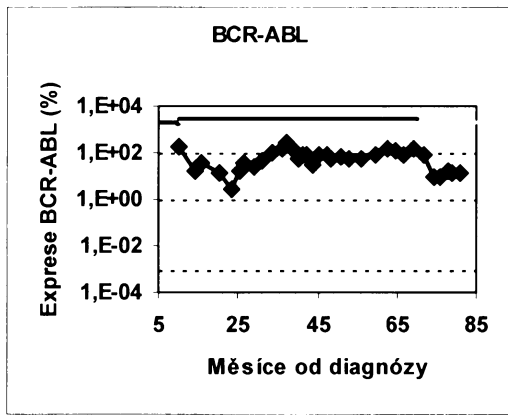


E

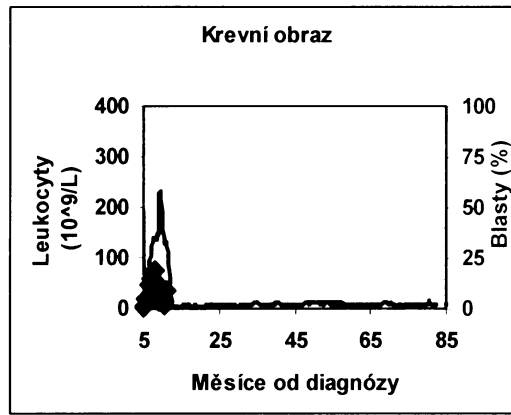


F

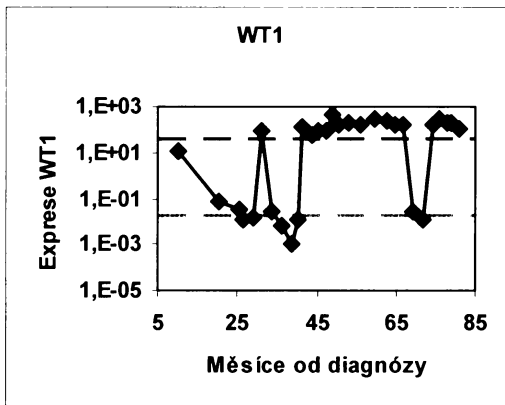
Obr. 4.17 Pacient č. 8



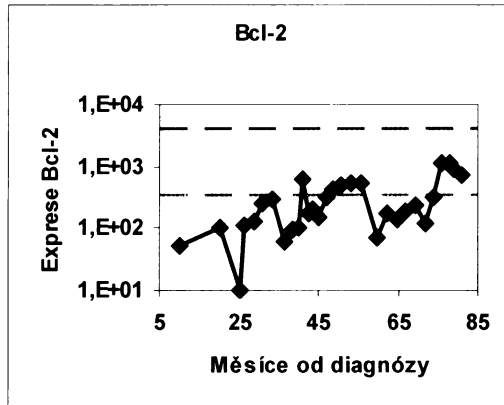
A



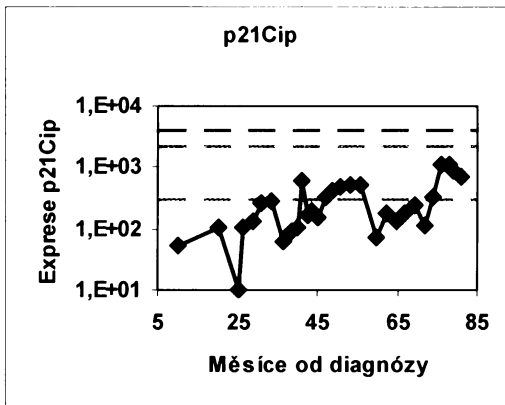
B



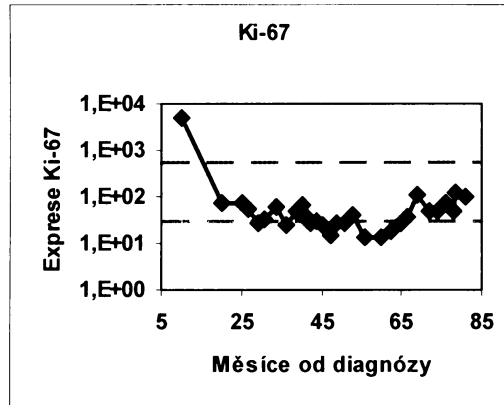
C



D

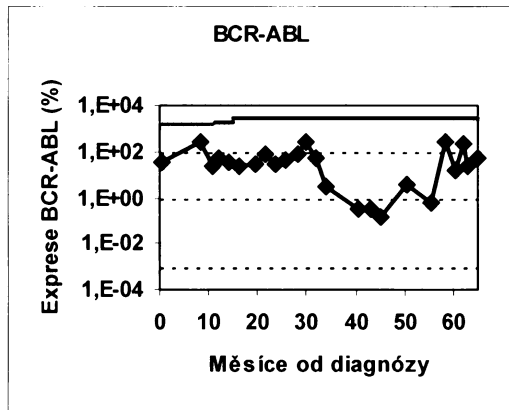


E

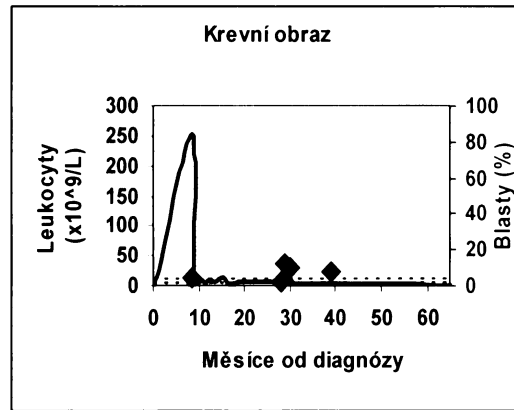


F

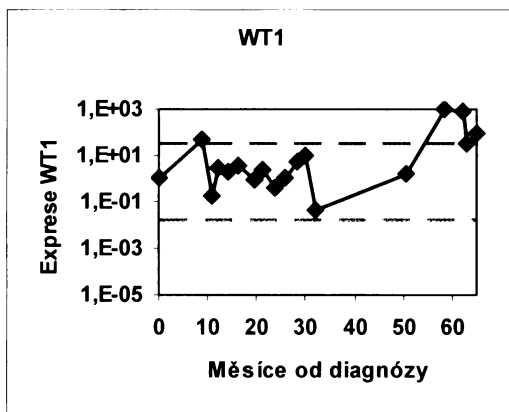
Obr. 4.18 Pacient č. 9



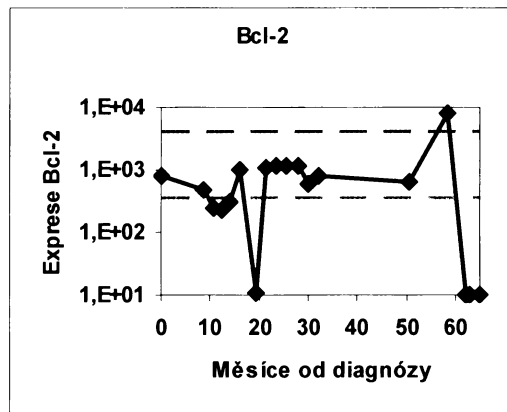
A



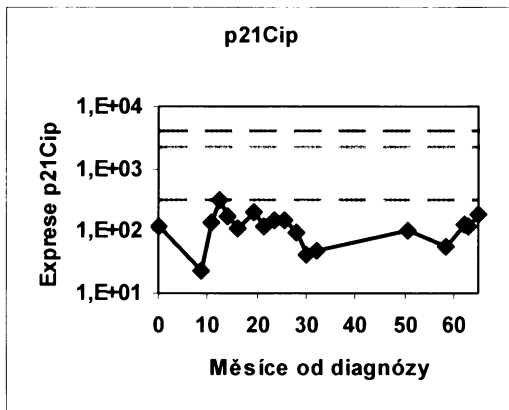
B



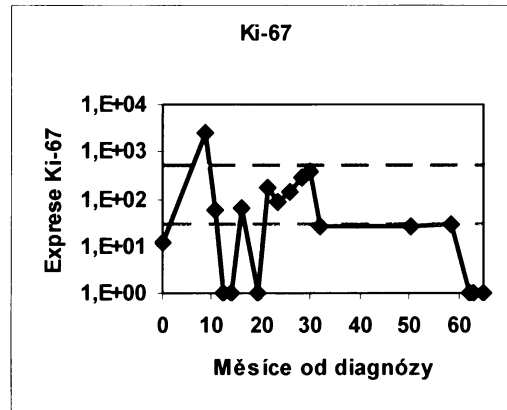
C



D

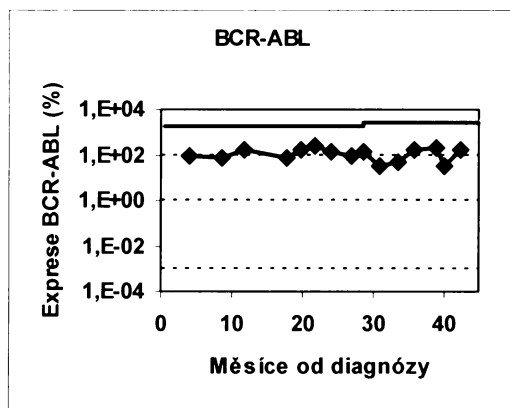


E

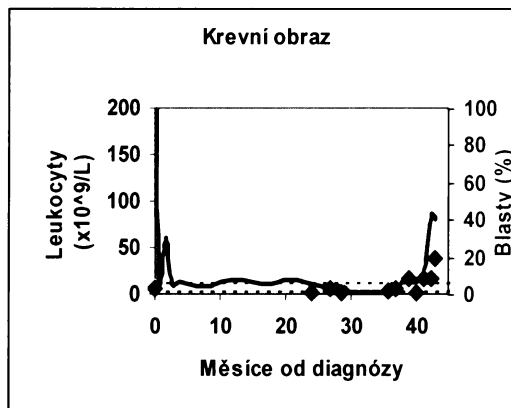


F

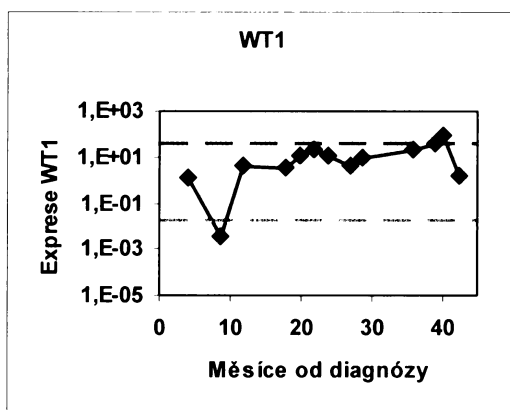
Obr. 4.19 Pacient č. 10



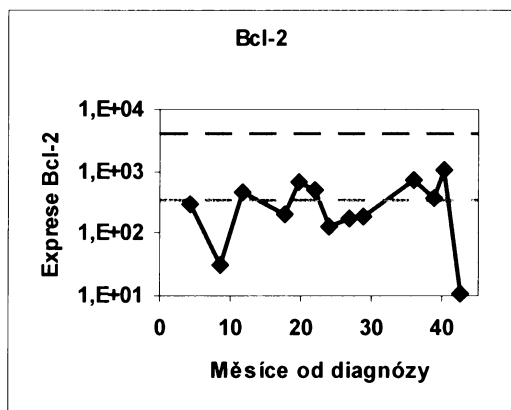
A



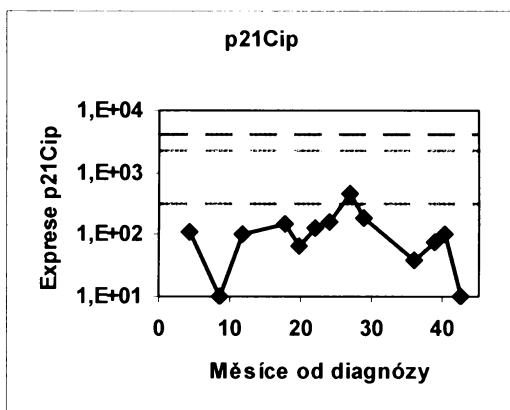
B



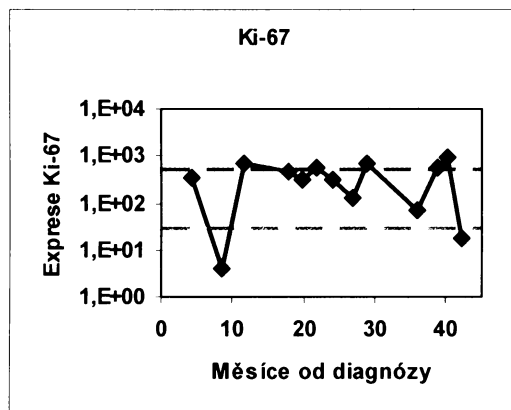
C



D

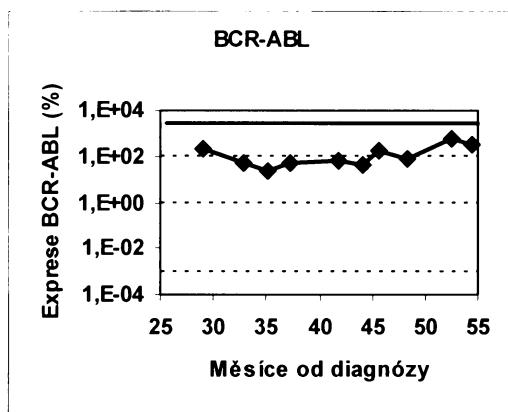


E

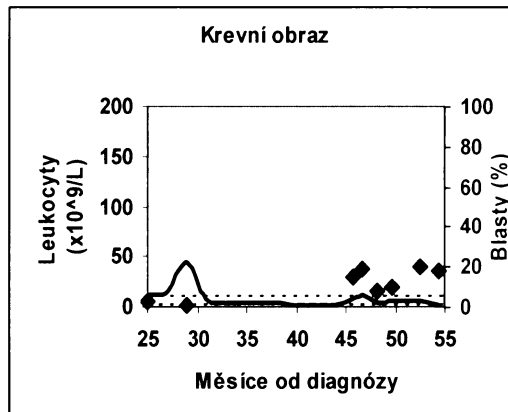


F

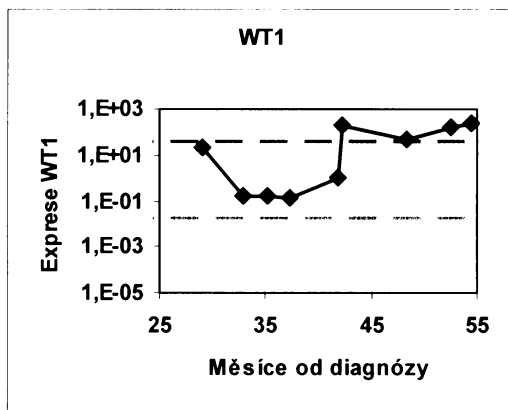
Obr. 4.20 Pacient č. 11



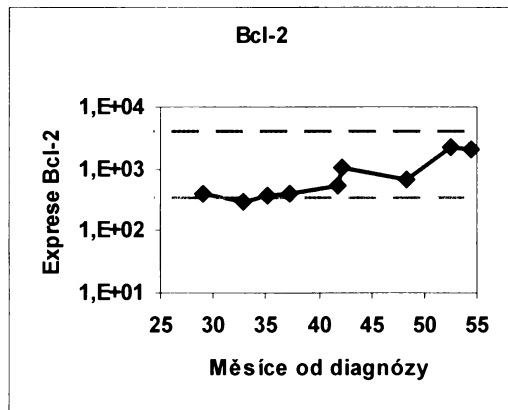
A



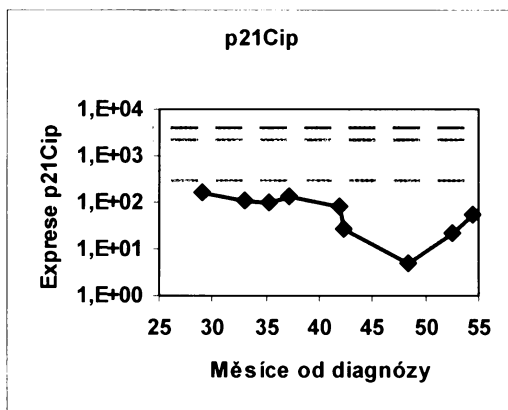
B



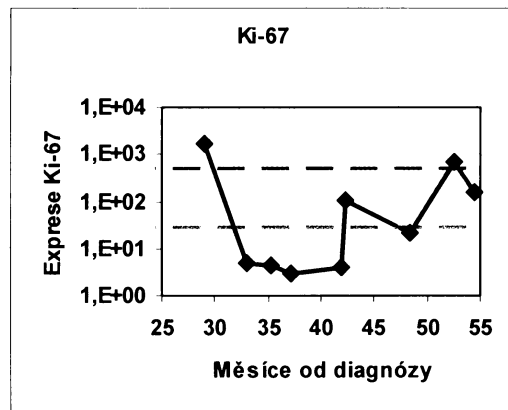
C



D



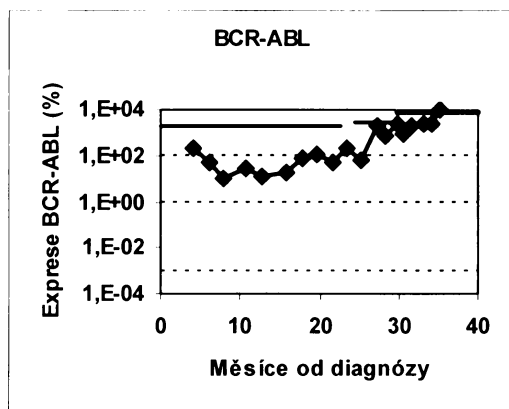
E



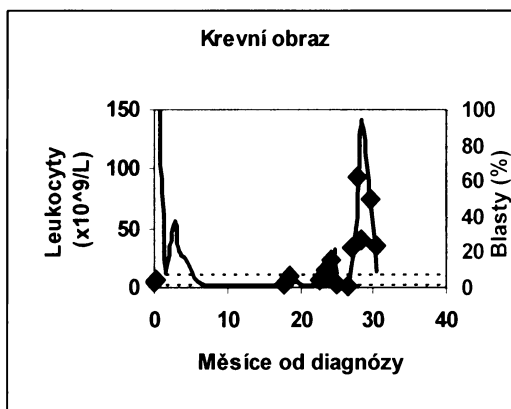
F

Obr. 4.21 Pacient č. 12

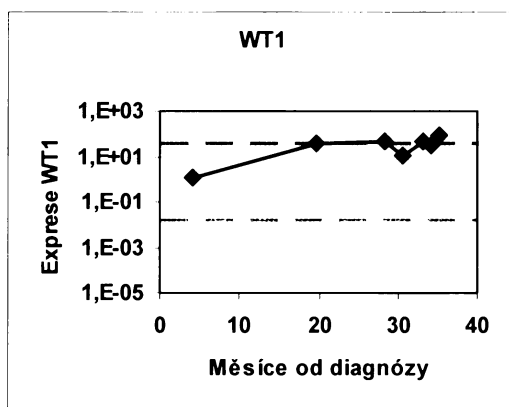




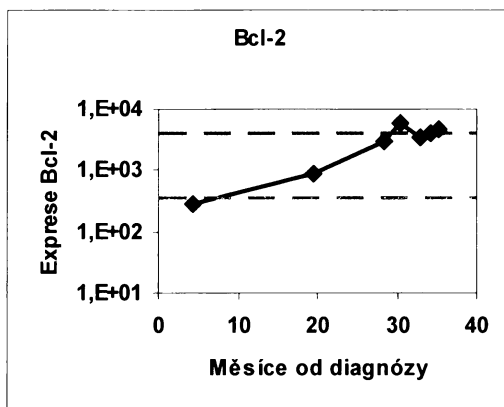
A



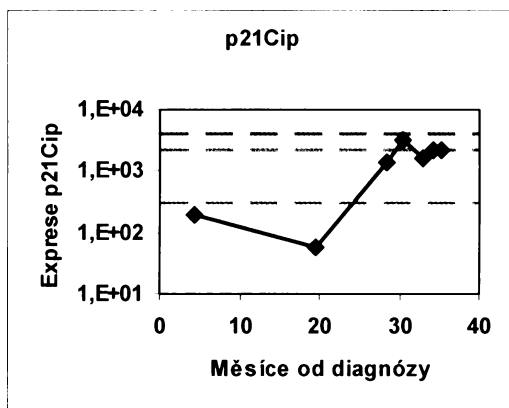
B



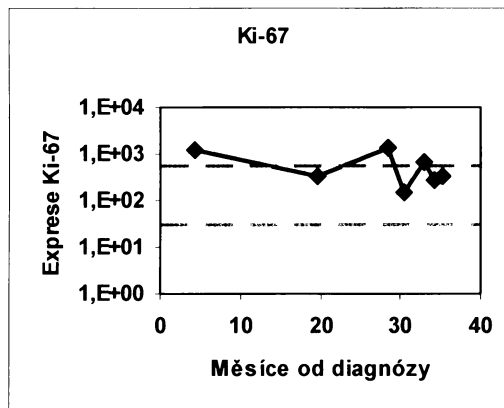
C



D

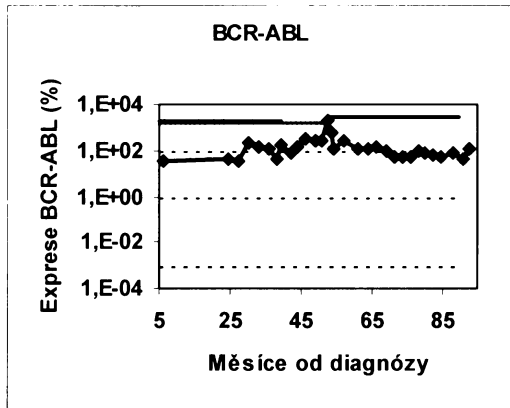


E

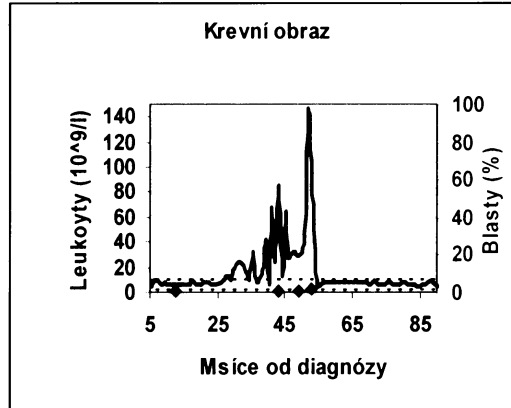


F

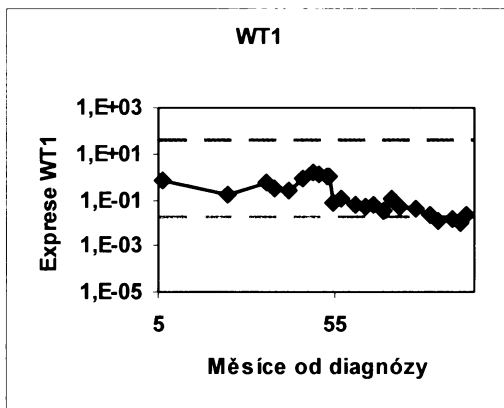
Obr. 4.22 Pacient č. 14



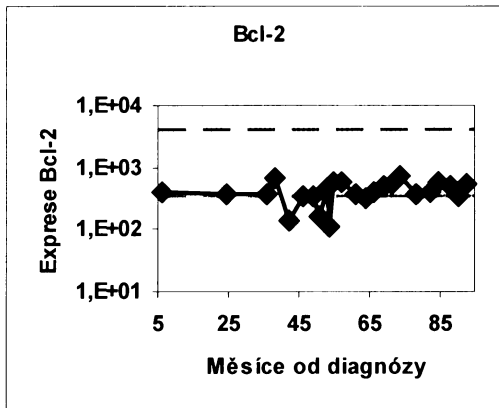
A



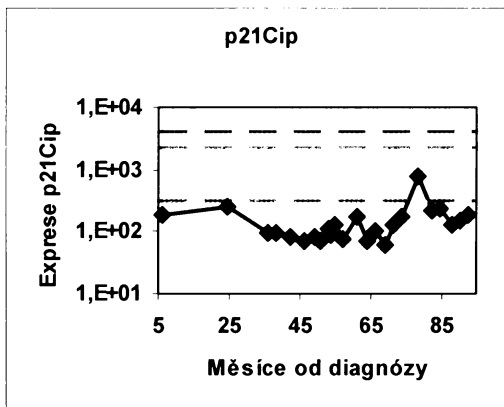
B



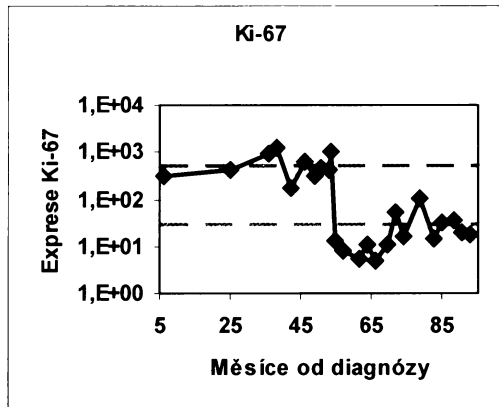
C



D



E



F

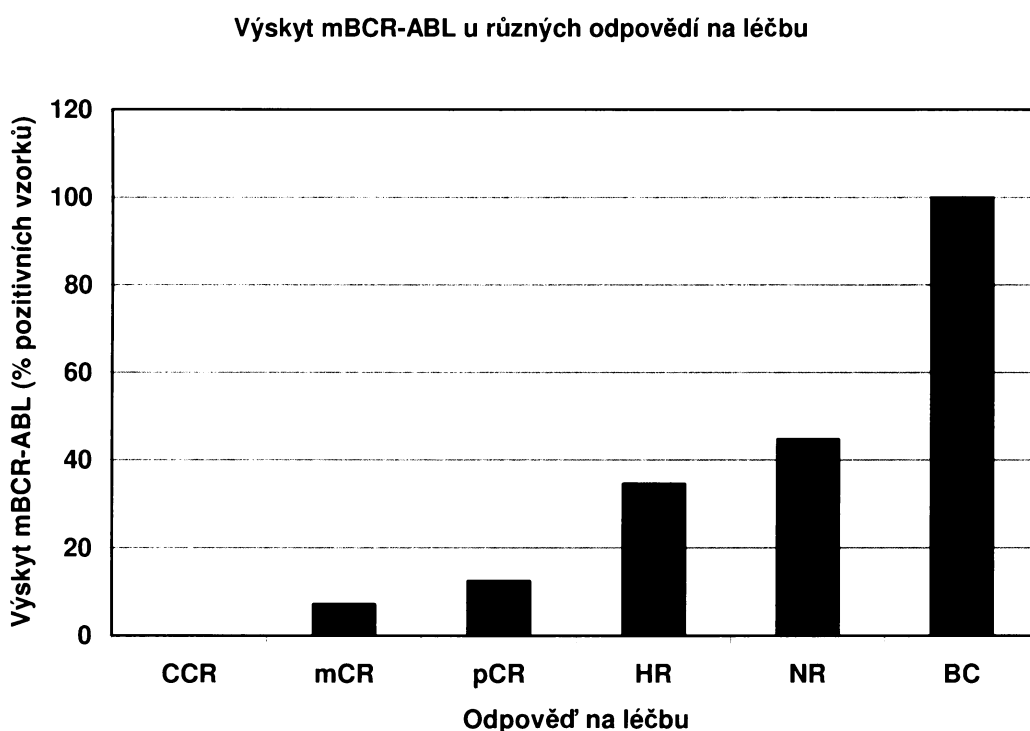
Obr. 4.23 Pacient č. 6

## 4.5. Hodnocení exprese mBCR-ABL

Expres mBCR-ABL byla u všech pacientů natolik nízká, že ji nebylo možno přesně kvantifikovat. Hodnotili jsme proto pouze výskyt transkriptu, tedy pozitivitu či negativitu vzorku.

### 4.5.1. Výskyt mBCR-ABL ve vzorcích pacientů s různou odpovědí na léčbu

Hodnocení výskytu mBCR-ABL bylo provedeno na týchž vzorcích jako statistické hodnocení exprese WT1, Bcl-2, p21Cip a Ki-67 při různých odpovědích na léčbu. Graf na obr. 4.24 ukazuje výskyt transkriptu mBCR-ABL ve vzorcích různých odpovědí na léčbu (% pozitivních vzorků z testovaných vzorků dané odpovědi). Je patrné, že výskyt transkriptu vzrůstá směrem ke zhoršující se odpovědi na léčbu. Vzhledem k tomu, že obdobně stoupá směrem k horší odpovědi na léčbu i BCR-ABL, zdá se na základě tohoto hodnocení, že BCR-ABL může tvořit určité velmi malé procento celkového množství BCR-ABL transkriptu.



Obr. 4.24 Výskyt transkriptu BCR-ABL u různých odpovědí na léčbu

#### **4.5.2. Výskyt mBCR-ABL u jednotlivých pacientů v průběhu onemocnění**

Při tomto hodnocení jsme vycházeli ze stejného rozdělení pacientů jako při hodnocení kinetiky exprese WT1, Bcl-2, p21Cip a Ki-67. Výsledky znázorňují grafy uvedené v rámci obr. 4.25.

##### **1. Pacienti odpovídající dobře na léčbu**

Pacienti odpovídající dobře na léčbu byli pro mBCR-ABL vždy negativní.

##### **2. Pacienti s primární rezistencí k léčbě**

Pacienti primárně rezistentní k léčbě imatinibem vykazovali v obou případech vysokou hladinu BCR-ABL. Přesto byl pacient č. 4 pro mBCR-ABL negativní.

##### **3. Pacienti se sekundární rezistencí k léčbě**

###### **Pacienti s mutacemi v kinázové doméně BCR-ABL**

U pacienta č. 7 se mBCR-ABL vyskytoval téměř po celé sledované období. Pacienti č. 13, 15 a 16 byli pro mBCR-ABL po celé sledované období negativní. U pacientů č. 17 a 18 jsme mBCR-ABL detekovali pouze v několika vzorcích.

###### **Pacienti bez mutace v kinázové doméně BCR-ABL**

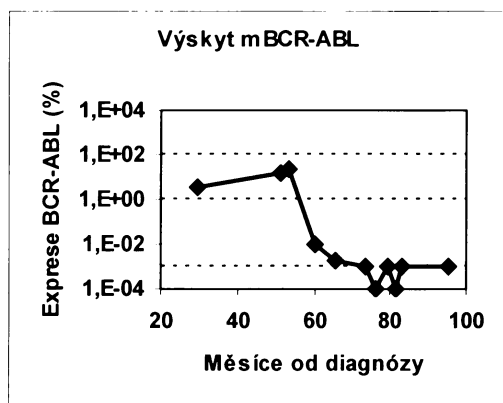
Pacienti č. 10 a 11 byli pro mBCR.-ABL negativní, přesto že se u nich hladina BCR-ABL pohybovala trvale kolem 100%. U pacientů 9 a 12 se mBCR-ABL vyskytoval pouze v několika málo vzorcích. U pacienta č. 8 se mBCR.-ABL vyskytoval pouze ve vzorcích, v nichž se hladina BCR-ABL blíží 100%. Pacient č. 14 vykazoval přítomnost mBCR-ABL po celé sledované období. Tento pacient měl hladinu BCR-ABL trvale nad 100%.

##### **4. Pacienti se suboptimální odpovědí na léčbu**

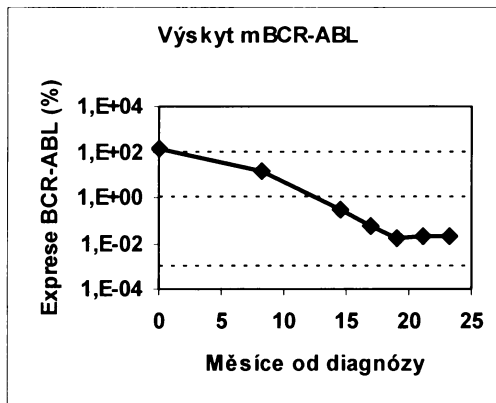
Skupina obsahuje jediného pacienta, který byl pro mBCR-ABL pozitivní téměř ve všech testovaných vzorcích.

## Vysvětlivky k obr. 4.25

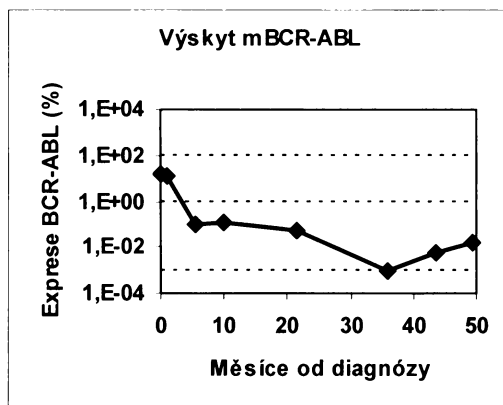
Grafy mají na ose y logaritmické měřítko a znázorňují průběh exprese BCR-ABL. Datová řada obsahuje pouze vorky testované na přítomnost mBCR-ABL, nikoliv celý průběh exprese BCR-ABL. Černé body vyznačují negativní vzorky, červené pozitivní.



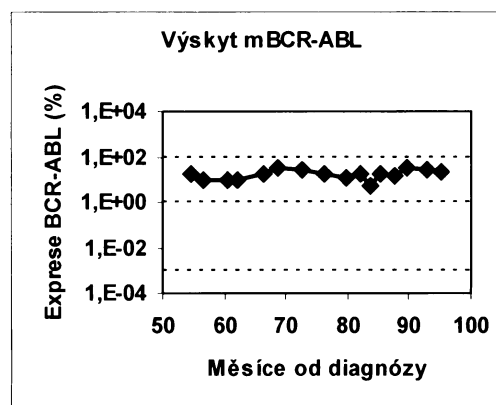
A Pacient č. 1



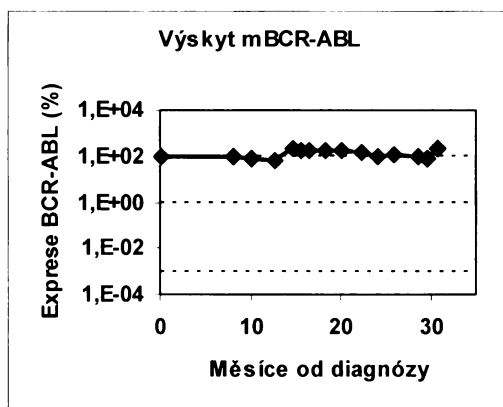
B Pacient č. 2



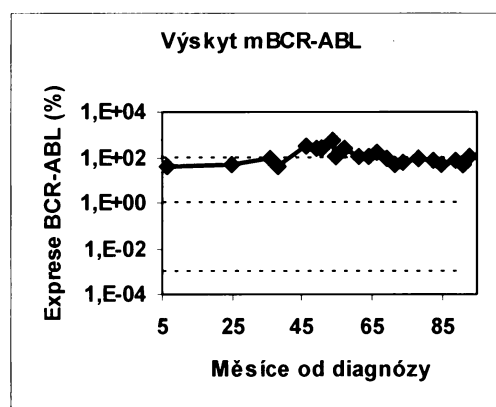
C Pacient č. 3



D Pacient . 4

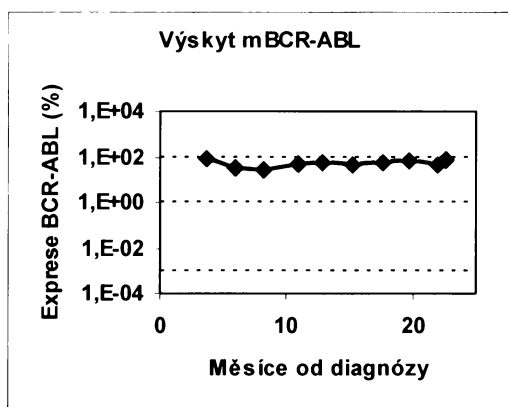


E Pacient č. 5

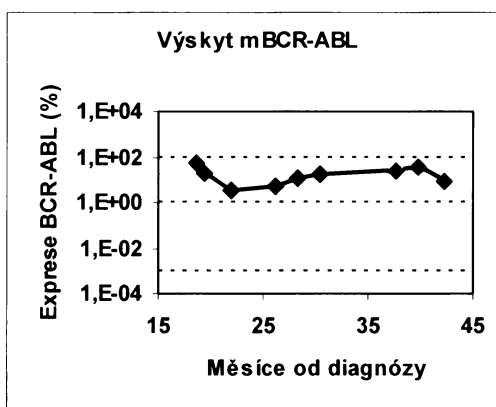


F Pacient č. 6

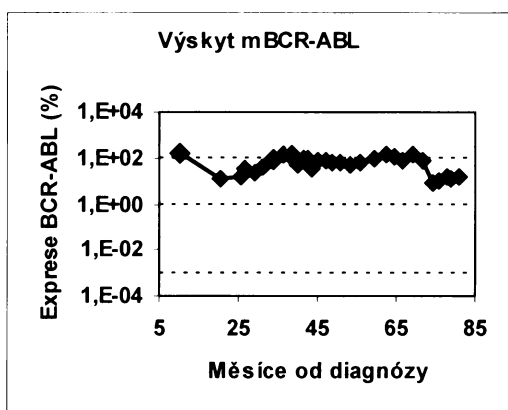
Obr. 4.25 Část první – pacienti č. 1 až 6



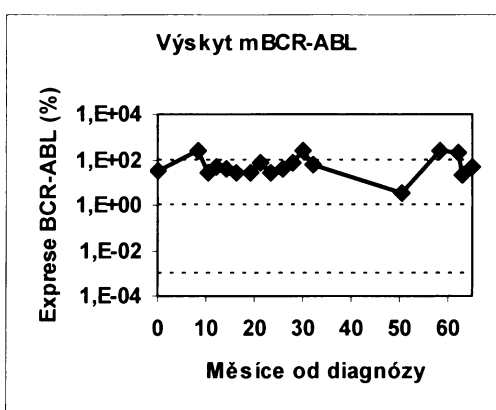
**A Pacient č. 7**



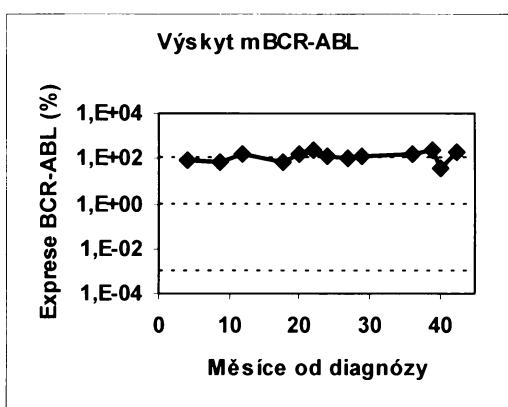
**B Pacient č. 8**



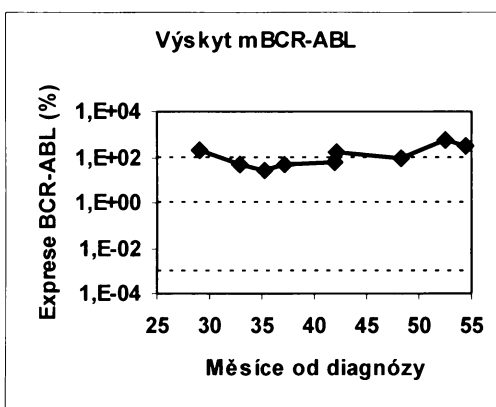
**C Pacient č. 9**



**D Pacient č. 10**

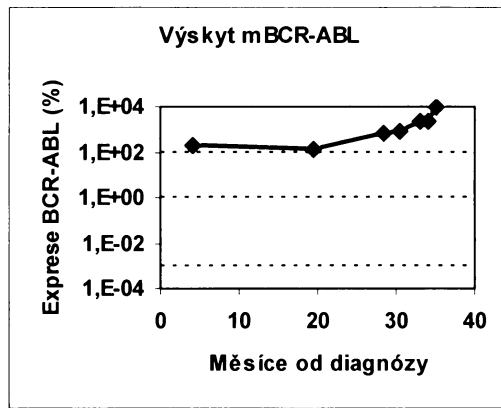
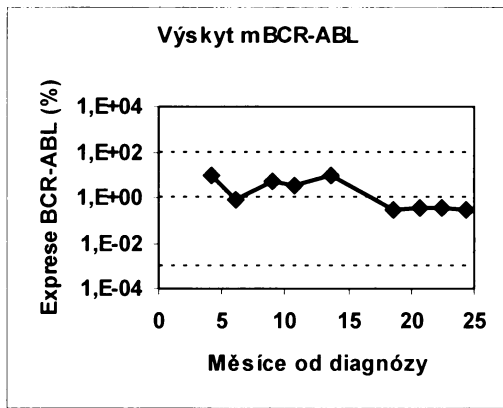


**E Pacient č. 11**



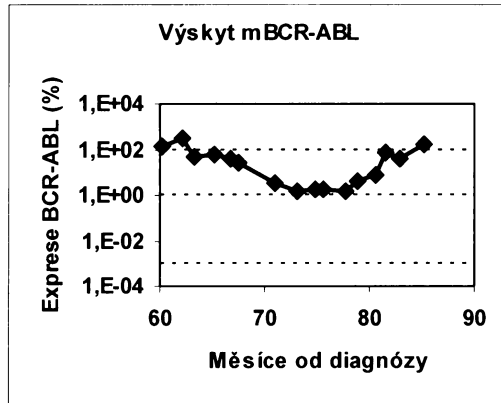
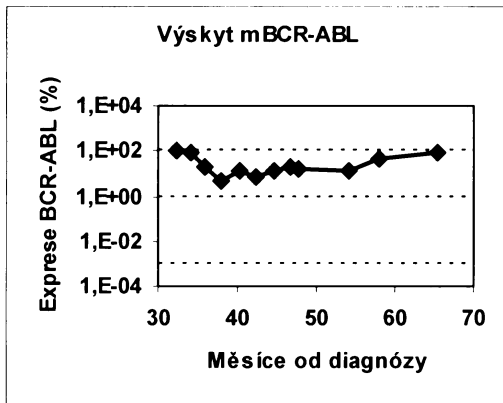
**F Pacient č. 12**

**Obr. 4.25 Část druhá – pacienti č. 7 až 12**



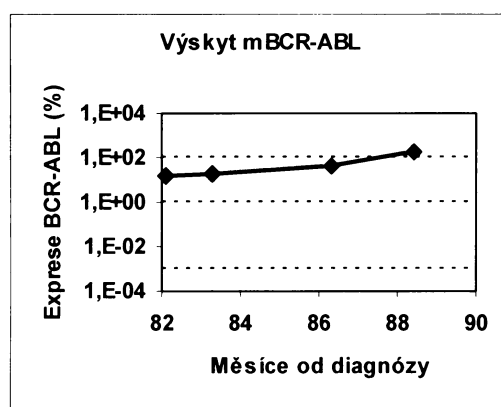
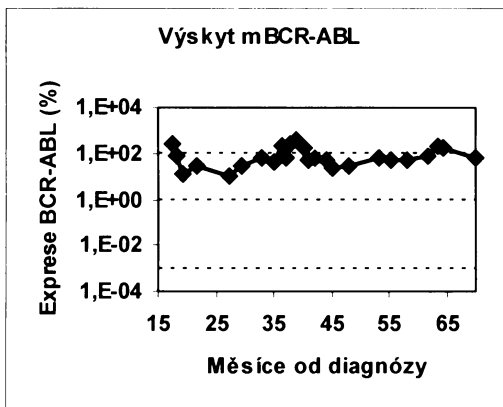
A Pacient č. 13

B Pacient č. 14



C Pacient č. 15

D Pacient č. 16

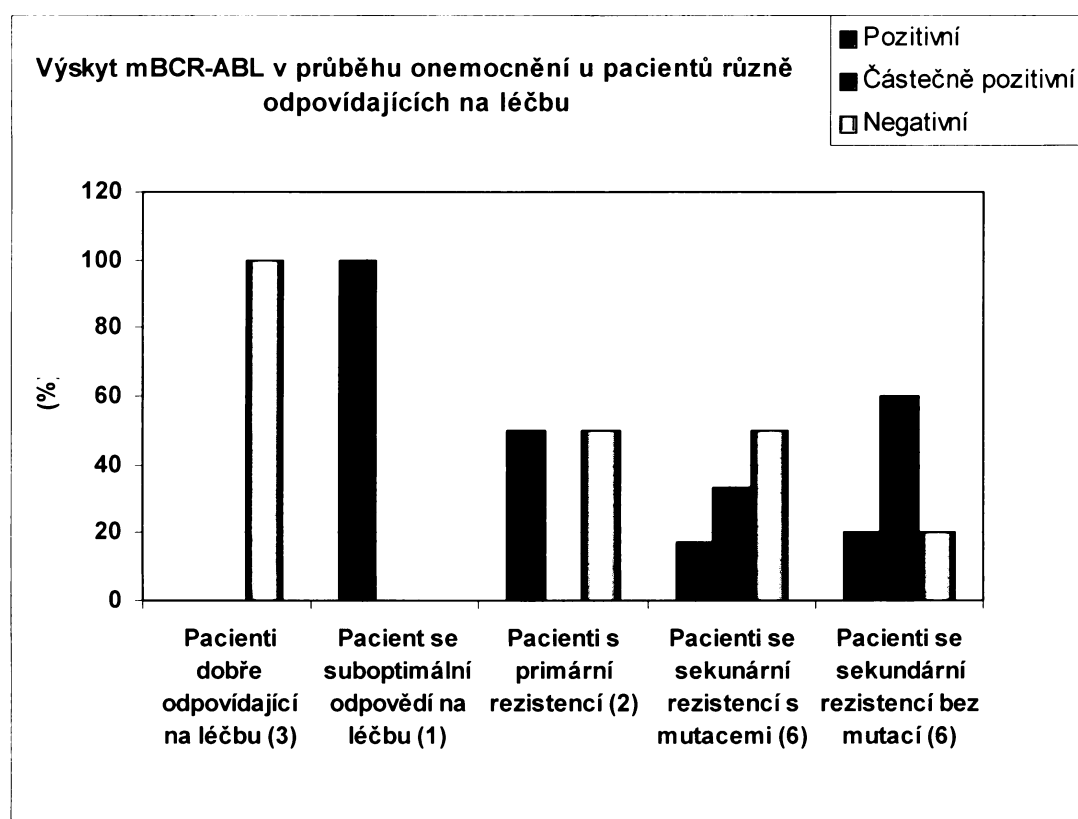


E Pacient č. 17

F Pacient č. 18

Obr. 4.25 Část třetí – pacienti č. 13 až 14

Shrnutí popsaných výsledků, tj. procentuální zastoupení pacientů pozitivních (více než polovina testovaných vzorků pozitivní), částečně pozitivních (méně než polovina testovaných vzorků pozitivní) a negativních (nepřítomnost transkriptu mBCR-ABL ve všech testovaných vzorcích) pro mBCR-ABL v rámci jednotlivých skupin, ukazuje graf na obr. 4.26. mBCR-ABL zcela chybí u pacientů dobře odpovídajících na léčbu, pacienti s horší odpovědí na léčbu (suboptimální odpověď nebo rezistence) jsou pro mBCR-ABL často pozitivní.

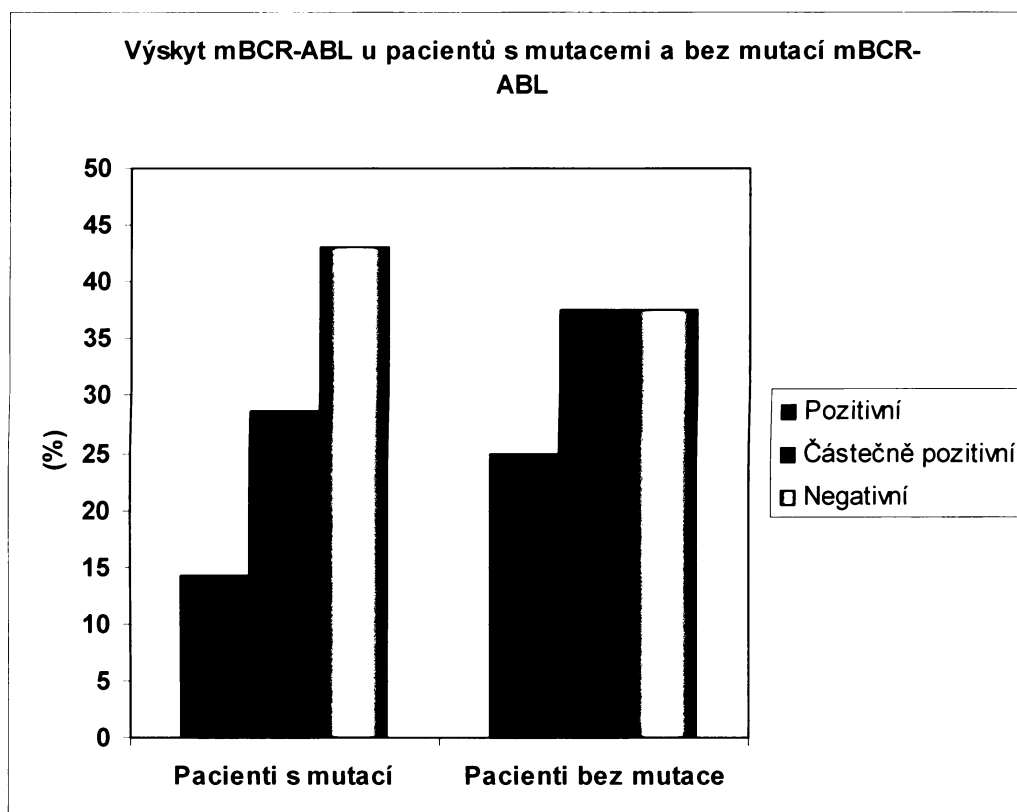


**Obr. 4.26 Výskyt mBCR-ABL u jednotlivých skupin pacientů v průběhu onemocnění - % pacientů pozitivních, částečně pozitivních a negativních (kritéria v textu, viz kapitola 4.5.2) v rámci jednotlivých skupin pacientů dle odpovědi na léčbu, čísla uvedená v závorkách za názvy jednotlivých skupin (tj. popisky na ose x) vyjadřují počet pacientů dané skupiny (samotné procentuální zastoupení negativních, částečně pozitivních a pozitivních pacientů by mohlo být zavádějící, protože počty pacientů v jednotlivých skupinách nejsou shodné a navíc jsou velmi nízké)**



#### 4.5.3. Porovnání výskytu mBCR-ABL u pacientů s mutací a bez mutace kinázové domény BCR-ABL

Výsledek je vyjádřen grafem na obr. č. 4.27, který ukazuje procentuální zastoupení pacientů pozitivních, částečně pozitivních a negativních (kritéria viz kap. 3.5.2). Výskyt transkriptu mBCR-ABL není patrně ovlivněn přítomností mutace kinázové domény mBCR-ABL. Mírně vyšší procento pozitivních pacientů v rámci skupiny pacientů bez mutace může být způsobeno malým počtem testovaných pacientů.



Obr. 4.27 Výskyt mBCR-ABL u pacientů s mutacemi BCR-ABL a bez mutace

## 5. Diskuze

Tématem této práce bylo monitorování exprese vybraných genů v průběhu CML za účelem zjistit, zda by se změny v expresi některého z genů mohly stát prognostickým markerem relapsu, případně markerem přechodu do akcelerované fáze nebo blastické krize nebo markerem pro předpověď typu odpovědi na léčbu. Jednalo by se o markery doplňující monitorování hladiny transkriptu BCR-ABL – specifického markeru CML.

Protože se jedná o práci, jejíž výstup by bylo případně možné zavést do praxe, bylo třeba zvolit metodu vhodnou pro rutinní monitorování, tj. citlivou a jednoduchou na provedení. Zvolili jsme tedy metodu RT-PCR v reálném čase se specifickými sondami typu TaqMan. Právě pro snadnost provedení byly izolovány celkové leukocyty, nikoliv jednotlivé frakce buněk, které by patrně vypověděly více o mechanismu onemocnění. Z lyzátu celkových leukocytů se provádí i rutinní monitorování hladiny BCR-ABL.

Protože častou příčinou sekundární rezistence bývají mutace kinázové domény BCR-ABL, snažili jsme se zjistit, zda přítomnost mutace může ovlivnit expresi některého ze sledovaných genů. Mutace jsme detekovali přímou sekvenací kinázové domény BCR-ABL. Vyhodnocovací software MutationSurvivor navíc umožňuje určit podíl mutované formy, což umožňuje usoudit, zda se u daného pacienta mutace podílí na progresi či nikoliv.

Velkým problémem studií prováděných na vzorcích pacientů je často nedostatek materiálu nebo nedostatek vzorků v určité fázi onemocnění. Během této práce jsme tak neměli k dispozici dostatek vzorků blastické krize a přechodu do ní (pouze pacient č. 14). Některé výsledky by tak bylo zapotřebí potvrdit u většího počtu pacientů.

Výběr genů probíhal na základě literárních údajů (Bcl-2, mBCR-ABL), výsledků naší laboratoře (p21Cip), nebo obojího (WT1, Ki-67).

První zpráva o detekci exprese WT1 u pacienta v akcelerované fázi CML se objevila v roce 1993 (MIAGI et al., 1993). Od té doby bylo publikováno několik prací o možnosti využití genu WT1 jako nespecifického markeru průběhu onemocnění (SUGIYMA 1997, ZI-XING et al. 2004, UZUNEL a PRINGDEN 2004, CILLONI et al. 2003). Výsledky ale byly nejednotné a studie nebyly kompletní co do zastoupení všech typů pacientů dle odpovědi na léčbu (řada prací se snažila testovat WT1 jako marker

relapsu po TKB). Příčinou nejednotnosti výsledků mohla být nejednotnost metodiky. Většina prací používala reverzně transkriptázovou PCR v reálném čase, avšak s odlišnými kontrolními geny (např. abl, který je pro sledování genové exprese u pacientů s CML s typickou přestavbou BCR-ABL zcela nevhodný – RULCOVÁ et al. 2007). Podrobná studie exprese WT1 u pacientů s CML s různou odpovědí na léčbu a v různých fázích onemocnění tedy dosud chyběla.

V rámci statistického hodnocení jsme zjistili, že se zhoršující se odpovědí na léčbu hladina WT1 statisticky významně narůstá. Rozdíly mezi mediány rostou směrem ke zhoršující se odpovědi na léčbu. To je pro gen, který je kandidátem na marker relapsu, výhodou, protože při zhoršení stavu pacienta (tj. při relapsu) by nárůst exprese WT1 měl být prudký, tj. jasně zaznamatelný. Na základě porovnání výsledku statistického hodnocení WT1 s obdobným hodnocením BCR-ABL je zřejmé, že WT1 vykazuje prudší nárůst než BCR-ABL.

Kinetiky exprese WT1 dobře korelovaly s kinetikami exprese BCR-ABL a s průběhem onemocnění. U téměř všech testovaných relapsů byl však nárůst exprese WT1 vyšší než nárůst exprese BCR-ABL, jak nanačovalo již statistické hodnocení. Naproti tomu u pacientů s dobrou odpovědí na léčbu byl pokles exprese WT1 až o 3 řády menší než u BCR-ABL. Toto pozorování rovněž odpovídá výsledku statistického hodnocení, které ukázalo malé rozdíly mezi mediány dobrých odpovědí na léčbu. Příčinou těchto malých rozdílů v hladinách mezi jednotlivými odpověďmi je fakt, že WT1 má oproti BCR-ABL určitou bazální hladinu exprese, zatímco BCR-ABL klesá až do PCR negativity. Pro předpověď dobré odpovědi na léčbu imatinibem tak WT1 není vhodným markerem.

Velmi důležitý výsledek je, že u nejméně 40% relapsů se nárůst hladiny WT1 projevil dokonce o několik týdnů dříve než nárůst BCR-ABL. Toto ukazuje na prognostický význam exprese WT1 u některých pacientů s CML, na možnost funkce WT1 jako časného markeru relapsu. WT1 může být tedy citlivým pomocným markerem relapsu v chronické fázi k BCR-ABL. Dle míry exprese WT1 v jediném vzorku lze určit stav onemocnění, kinetika exprese naznačuje prognózu.

Mimo to je pravděpodobné, že WT1 není pouze markerem, ale zároveň jednou z příčin relapsu. Bylo prokázáno, že onkogenně působí tzv. sWT1 forma, tj. WT1 protein, který vzniká z transkriptu, který je přepisován z druhého promotoru genu. Tento protein tak má zkrácený N-konec, v důsledku čehož postrádá část významnou pro represi transkripce (HOSSAIN et al. 2006). Je tak možné, že vliv na progresi onemocnění má

právě tato varianta, která je v leukemických buňkách nadměrně exprimována. Naše výsledky toto nemohou přímo potvrdit, protože námi použité primery sledují všechny varianty WT1 dohromady. Přesto jsme ale detekcí vysoké exprese WT1 směrem k progresi onemocnění potvrdili možnost jeho využití jako terapeutického cíle u pacientů s CML, zejména v pokročilých fázích onemocnění.

Ki-67 je gen, jehož exprese je specifická pro buňky v aktivních fázích buněčného cyklu. To je důvodem, proč je již u některých pevných nádorů používán jako prognostický marker. Veškeré práce však sledují Ki-67 na úrovni proteinu. Na úrovni mRNA použila poprvé Ki-67 jako maker proliferace Mgr. Ulmannova, PhD (2003). Jako marker pro monitorování stavu onemocnění u pacientů s CML gen Ki-67 nebyl dosud testován.

Statistické hodnocení exprese Ki-67 neukázalo velké rozdíly mezi jednotlivými odpověďmi na léčbu. Signifikantní byl pouze rozdíl mezi blastickou krizí a pacienty bez odpovědi na léčbu a ostatními odpověďmi, který představoval pouze zhruba jeden řád. Toto je nevýhodou, pokud hledáme gen, jehož expresi by bylo možné použít jako marker rezistence k léčbě.

Sledování kinetiky exprese ukázalo, že exprese Ki-67 reaguje při byt' malém zhoršení krevního obrazu nárůstem na hladinu mediánu hodnot v blastické krizi. K nárůstu exprese Ki-67 však dochází až prakticky současně s nárůstem leukocytů nebo s výskytem blastů. Proto je prediktivní význam exprese Ki-67 minimální.

Pouze u dvou pacientů (č. 5 a 6) trvale vysoká hladina Ki-67 při nízké hladině leukocytů v daném vzorku patrně signalizovala určitou formu rezistence a pozdější hematologický relaps. Pacient č. 5 zemřel na následky choroby, u pacienta č. 6 došlo k relapsu. Naše výsledky tak ukazují na možnost fungování Ki-67 jako časného markeru rezistence pro zřejmě malou skupinu pacientů (v našem případě se jednalo pouze o dva pacienty z osmnácti). Patrně tak nemá význam testovat dále Ki-67 na větším vzorku pacientů za účelem nalezení markeru pro rutinní použití. Sledování exprese Ki-67 může mít význam spíše pro výzkum.

Bcl-2 je gen pro antiapoptický protein, jehož zásadní význam pro možnost rozvoje leukémie prostřednictvím BCR-ABL byl prokázán (SÁNCHEZ-GARCÍA a GRUTZ 1995). Do této studie byl zařazen na základě práce, která uvedla do souvislosti overexpresi Bcl-2 s aktivací kinázy LYN u pacientů s onemocněním nezávislým na

BCR-ABL, kde jeho roli přejímá právě nadměrně aktivní LYN. Autoři studií na buněčných liniích zjistili změny nejen na úrovni proteinu, ale i transkriptu Bcl-2 (DAI et al. 2004). Vzhledem k významné roli Bcl-2 v leukemogenezi jsme prováděli celkové hodnocení exprese jako u ostatních genů, nikoliv pouze u vytypovaných pacientů s onemocněním nezávislým na BCR-ABL (v naší laboratoři sledujeme aktivitu BCR-ABL nepřímo měřením fosforylace proteinu CRKL a aktivitu dalších kináz). Kináza LYN je aktivní i v blastické krizi, proto bylo možné předpokládat, že by se mohlo jednat o marker blastické krize.

Statistické hodnocení ukázalo nejednotný trend v expresi v průběhu onemocnění, tj. chybí jednoznačný nárůst nebo pokles směrem ke zhoršující se odpovědi. Protože však velký rozptyl v rámci jednotlivých odpovědí mohl výsledek statistického hodnocení zkreslit, případně mohl skrýt určitou skupinu pacientů, u nichž by Bcl-2 měl jistou výpovědní hodnotu (je třeba brát ohled na heterogenitu mechanismů patogeneze CML), provedli jsme rovněž sledování kinetiky exprese u pacientů všech odpovědí na léčbu.

Kinetika exprese Bcl-2 byla u většiny pacientů v CP převážně stabilní, nebo s malými výkyvy, které však většinou nekorelovaly ani s hladinou BCR-ABL ani s krevním obrazem. Výjimkou jsou pacienti č. 9 a 17, u nichž vykazovala exprese Bcl-2 značné výkyvy. Ani zde je však nebylo možné spojovat se změnami krevního obrazu nebo exprese BCR-ABL. Výrazný nárůst exprese můžeme vidět u pacienta č. 14, kde naznačuje přechod do blastické krize. Pro nedostatek vzorků však nelze říci, zda předchází nárůst BCR-ABL, či nikoliv. Podobný nárůst v souvislosti s výskytem blastů můžeme vidět také u pacientů č. 11 a 12 v akcelerované fázi, kde Bcl-2 BCR-ABL předchází. Bcl-2 tak může mít prognostický význam pro detekci přechodu do akcelerované fáze, možná i blastické krize, a mohl by tak sloužit jako pomocný marker pro detekci tohoto přechodu.

Výrazný nárůst exprese Bcl-2 naopak chybí u pacienta č. 18, kde došlo k výraznému nárůstu leukocytů, v krevním obraze ale chyběly blasty. Naše výsledky tak zároveň ukazují, že rostoucí hladina Bcl-2 souvisí s nárůstem blastů (pacienti č. 11 a 12 vs. pacient č. 18). Význam Bcl-2 v hematopoetických kmenových i progenitorových buňkách byl prokázán. Bcl-2 je nejen chrání před apoptózou, ale je také významný pro lymfohematopoézu (DOMEN et al. 2000, MATSUZAKI et al. 1997). V nezralých leukemických buňkách typických pro blastickou krizi overexprese Bcl-2 může také souviset s rezistencí k chemoterapeutikům (DOMEN a WEISSMAN 2003).

Naše výsledky zároveň přispívají k úvahám o využití Bcl-2 jako potenciálního terapeutického cíle u pacientů v pokročilých fázích CML.

Gen p21Cip byl do studie vybrán na základě předchozích studií provedených v naší laboratoři, které ukázaly, že se jeho hladina prudce zvýšila před přechodem do blastické krize. p21Cip by tak mohl být dobrým markerem signalizujícím nástup blastické krize. V rámci této práce jsme provedli celkové hodnocení exprese p21Cip v průběhu CML.

Výsledky statistického hodnocení, v zásadě potvrdilo sledování kinetiky exprese. Hladina p21Cip se pohybovala přibližně na hladině mediánu exprese v CCR, pokud se hodnoty krevního obrazu pohybovaly v normálním rozmezí. Nižší hladina p21Cip značí zhoršení stavu pacienta, tj. hematologický relaps nebo primární rezistenci (pacienti č. 4 a 5). Pokud začne exprese p21Cip po předchozím poklesu růst k nebo nad hladinu mediánu exprese v CCR, může to ukazovat na přechod do AP nebo BC. Zdá se však, že nárůst p21Cip vždy souvisí s výskytem blastů (u pacienta č. 18 došlo k velkému nárůstu leukocytů bez výskytu blastů a hladina p21Cip zůstala stabilní). U všech sledovaných relapsů do akutních fází byl nárůst p21Cip výraznější než nárůst BCR-ABL. K nárůstu však docházelo současně (u pacienta č. 14 pro malý počet vzorků toto nelze určit). Důvodem výraznější kinetiky exprese p21Cip oproti BCR-ABL při přechodu do akutních fází onemocnění je počáteční pokles exprese p21Cip při zhoršení stavu, výsledný nárůst na hodnotu blastické krize pak představuje až dva řády, viz pacient č. 14.

p21Cip tedy může fungovat jako pomocný marker k BCR-ABL pro přechod do blastické krize (samotné sledování exprese p21Cip je zavádějící – nárůst z hladiny nižší než medián exprese v CCR může znamenat zlepšení stavu nebo přechod do akutní fáze CML). Pokles p21Cip pod hladinu mediánu exprese v CCR a následný nárůst směrem k nebo nad hladinu mediánu exprese v CCR při vysoké hladině BCR-ABL však ukazují na přechod do fáze akcelerace nebo blastické krize. Snížená hladina p21Cip při vysoké hladině BCR-ABL může ukazovat na suboptimální odpověď na léčbu nebo primární rezistenci k léčbě. Sledování exprese p21Cip tak upřesňuje výsledky získané monitorováním BCR-ABL.

Vzhledem k výrazně vyšší tyrozinkinázové aktivitě proteinu p190 jsme se domnívali, že by se přítomnost mBCR-ABL mohla podílet na horší prognóze pacientů

a přispívat k rozvoji rezistence k imatinibu (a tedy signalizovat rezistenci). Expresi mBCR-ABL u pacientů s CML byla již publikována. Salgio et al. (1997) uvedli, že expresi mBCR-ABL detekovali u téměř všech pacientů s CML v době diagnózy. Zjistili, že mBCR-ABL tvoří 20 až 30% celkového množství BCR-ABL transkriptu. Van Rhee et al. (1996) naproti tomu uvedli, že mBCR-ABL tvoří pouze 0,1 až 1% BCR-ABL. Nejednotnost výsledků může být dána odlišnou metodikou, ale také může souviset s odlišným biologickým materiálem. Zatímco Salgio et al. testovali vzorky kostní dřeně, van Rhee et al. (1996) detekovali mBCR-ABL ve vzorcích kostní dřeně a periferní krve.

Dle našich výsledků z analýzy periferní krve se transkript mBCR-ABL vyskytuje v buňkách pouze některých pacientů a to ve velmi malém množství (hodnoty většinou na hranici citlivosti metody). Jednalo se o natolik nízké počty kopií, že kvantifikace nemohla být provedena. Vzhledem k tomu, že se transkript nevyskytoval u všech ale pouze u některých pacientů, viděli jsme přesto jako zajímavé dále sledovat, zda alespoň výskyt mBCR-ABL nemá pro pacienty prognostický význam.

Hodnocení výskytu transkriptu mBCR-ABL v jednotlivých vzorcích s různou odpovědí na léčbu ukázalo, že výskyt transkriptu roste se zhoršující se odpovědí na léčbu. Protože exprese BCR-ABL směrem ke zhoršující se odpovědi na léčbu rovněž roste, zdálo se, že výsledek potvrzuje pozorování uváděné Van Rhee et al., že mBCR-ABL vzniká v buňkách pacientů vždy jako určité velmi malé procento BCR-ABL.

Abychom zjistili, zda výskyt mBCR-ABL u pacientů s CML může mít prognostický význam, sledovali jsme dále výskyt transkriptu u jednotlivých pacientů různě odpovídajících na léčbu v průběhu onemocnění. Přestože transkript mBCR-ABL byl detekován hlavně u pacientů s vysokými hladinami transkriptu BCR-ABL, nemůžeme potvrdit, že by se jednalo o určitou procentuální frakci BCR-ABL. U některých pacientů s vysokou hladinou BCR-ABL (pacient č. 4 a další dva pacienti mimo tuto studii, jeden s overexpresí BCR-ABL), ale dlouhodobě v CHR bez klinických příznaků nemoci jsme mBCR-ABL nenalezli v žádném z testovaných vzorků. U pacientů dobře odpovídajících na léčbu se mBCR-ABL rovněž nevyskytoval ani v prvních vzorcích, kdy měl pacient ještě obvykle poměrně vysokou hladinu BCR-ABL (u některých pacientů srovnatelnou s pacienty v relapsu). Je možné, že se u těchto tří pacientů jedná o mechanismy CML s mírnějším průběhem, jejichž společným znakem může být nezvýšená hladina enzymů odpovědných za sestřih pre-mRNA.

Cílem této práce bylo též zjistit, zda existuje rozdíl v expresi sledovaných genů mezi pacienty s mutovanou formou BCR-ABL a pacienty s divokým typem kinázy. Hladina WT1, kterou jsme vybrali jako nejlepší marker relapsu ze sledovaných kandidátů, odpovídala intenzitě relapsu. Vyšší hladiny exprese u pacientů bez mutace jsou tak dány tím, že relapsy byly obecně výraznější u pacientů bez mutace. Exprese ostatních genů ani četnost výskytu transkriptu mBCR-ABL nevykazovaly mezi těmito dvěma skupinami významný rozdíl.

Pozorování obecně výraznějších relapsů u pacientů bez mutací ve srovnání s pacienty s mutacemi je samo o sobě velmi zajímavý fakt. Mutace v kinázové doméně BCR-ABL vedou i v přítomnosti imatinibu k obnovení aktivity BCR-ABL. Většina mutací, které jsme u pacientů zahrnutých do této studie našli, je obvykle překonatelná vyšší dávkou imatinibu. Pokud pacient dostává suboptimální dávku pro inhibici této mutované formy BCR-ABL (tj. dávku, která se běžně pacientům podává a je účinná, pokud pacient nemá mutaci), může dojít k postupné selekci mutovaného klonu, a tedy k pozvolnému relapsu. U pacientů, kde k relapsu dochází z jiného důvodu (např. aktivace jiných kináz), který není vůbec potlačován (imatinib je selektivní inhibitor pouze ABL, BCR-ABL, PDGFR, c-Kit a příp. ARG), může být relaps prudší.

Prognostický význam pro detekci relapsu v chronické fázi má tedy ze sledovaných genů pouze WT1, který lze považovat i za samostatně fungující marker. p21Cip a Bcl-2, jak již bylo uvedeno, doplňují informace o stavu pacienta při přechodu do fáze akcelerace nebo blastické krize. Pokud sledujeme výšku hladin a kinetiku exprese p21Cip, Ki-67 a Bcl-2 samostatně, nelze většinou určit stav pacienta. Pokud máme ovšem k dispozici kinetiku exprese obou těchto genů společně s WT1 a BCR-ABL, je většinou možné udělat si dobrý obrázek o stavu i prognóze onemocnění. Toto je možné využít pro výzkum, ale pro rutinní praxi, kde záleží na jednoduchosti a ceně metody, to zatím není možné.



## 6. Souhrn

Pomocí PCR v reálném čase jsme provedli celkové hodnocení změn v hladinách transkriptů WT1, p21Cip, Bcl-2, Ki-67 a mBCR-ABL v průběhu CML u pacientů se všemi typy odpovědí na léčbu za účelem nalézt případný časný marker primární či sekundární rezistence k léčbě, nebo marker akcelerace choroby a blastické krize. Zaměřili jsme se přitom na markery rezistence k léčbě imatinibem.

Na základě výsledků statistického hodnocení i sledování kinetiky exprese v průběhu onemocnění u jednotlivých pacientů jsme jako nejlepší marker vzniku rezistence k léčbě vybrali expresi genu WT1, která má jako jediná prognostický význam v detekci relapsu v chronické fázi. Zjistili jsme, že při použití systému měření (významný vliv na výsledek má volba kontrolního genu) WT1 funguje jako časnější marker relapsu v chronické fázi než BCR-ABL u více než 40% pacientů. U téměř všech sledovaných relapsů je nárůst exprese WT1 výraznější než nárůst exprese BCR-ABL. Zjištění hladiny WT1 v jediném vzorku pacienta umožňuje odhadnout stav pacienta, kinetika naznačuje další vývoj CML. WT1 doplňuje informace získané monitorováním BCR-ABL, ale mohl by sloužit i jako samostatný marker.

Ke změnám v expresi Bcl-2 dochází až při přechodu do akcelerované fáze nebo blastické krize. Bcl-2 tak upřesňuje informace získané monitorováním BCR-ABL. Pacienta, u něhož by vysoká exprese Bcl-2 signalizovala rezistenci v důsledku ztráty závislosti onemocnění na BCR-ABL, jsme nezachytili.

Potvrdili jsme výsledky předchozích testů, které ukazovaly na možnost využití p21Cip jako markeru přechodu do akcelerované fáze nebo blastické krize. Změny v expresi p21Cip nepředchází nárůst BCR-ABL, avšak výška hladiny a kinetika exprese p21Cip doplňují informace získané monitorováním BCR-ABL.

Ki-67 velmi dobře koreluje se stavem onemocnění, prognostický význam ale pro pacienty s CML nemá – k nárůstu exprese Ki-67 dochází současně se změnami v krevním obraze.

Transkript mBCR-ABL nelze použít jako pomocný marker rezistence k imatinibu. Hladiny transkriptu mBCR-ABL jsou příliš nízké, aby mohly být využity jako citlivý marker. Přesto naše výsledky ukazují na možnost vlivu výskytu tohoto transkriptu na prognózu pacientů s horším stavem.

Dále jsme zjistili, že přítomnost mutací v kinázové doméně nemá na hladinu testovaných transkriptů vliv.

## **7. Prezentace:**

**K. Machová, T. Lopotová, J. Rulcová, V. Zmeková, K. Vlčanová, Zemanová Z., Klamová H., Moravcová J. (2007):** BCR-ABL mutated clone progression and elimination in CML patients treated with ABL kinase inhibitors, abstrakt na 12. kongres European Hematology Association

**Lopotová T, Machová K, Zmeková V, Vlčanová K, Rulcová J, Zemanová Z, Klamová H, Moravcová J. (2007)** Prognostický význam exprese genu WT1 u pacientů s CML, abstrakt na 21. Olomoucké hematologické dny

**K. Machová, T. Lopotová, J. Rulcová, V. Zmeková, K. Vlčanová, Zemanová Z., Klamová H., Moravcová J. (2007):** Sledování kinetiky mutací v BCR-ABL u pacientů s CML léčených inhibitory tyrozin kináz, abstrakt na 21. Olomoucké hematologické dny

## 8. Seznam zkratk

AP	akcelerovaná fáze
Ara-C	cytosin arabinosid, cytarabin
BC	blastická krize
BH	Bcl-2 homologní
BNA	bridged nucleic acid
B2M	beta 2 mikroglobulin
CR	cytogenetická odpověď
CCR	kompletní cytogenetická odpověď, remise
CG	cytogenetická odpověď
CHR	kompletní hematologická odpověď
CIS	cytokine-induced SH2-containing proteins
CML	chronická myeloidní leukémie
CMR	kompletní molekulární remise
CP	chronická fáze
Cr	cytogenetický relaps
Ct	cycle of threshold
dg	v době diagnózy
GT	guanidin thiokyanát
hOCT	human organic cation transporter
Hr	hematologický relaps
HR	hematologická odpověď
HU	hydroxyurea
ICT	intenzivní chemoterapie
IFN	interferon $\alpha$
JAK	Janus kinase
LNA	locked nucleic acid
MAPK	mitogen-activated proteinkinase
mCR	malá cytogenetická odpověď
MCT	molekulárně cílená terapie
ME	merkptoetanol
MHC gp I	major histocompatibility glycoproteins 1. class
Mr	molekulární relaps
NR	pacienti bez odpovědi na léčbu
pCR	částečná cytogenetická odpověď

PDK.....	fosfatidylkináza
Ph chromozóm.....	Philadelphský chromozóm
Ph+ buňky .....	buňky obsahující Ph chromozóm
PI3K .....	fosfatidyliositol-3-kináza
PKB .....	proteinkináza B
Q-RT-PCR.....	kvantitativní reverzně transkriptázová RT-PCR
SH.....	Src homologní
SOCS .....	supressors of cytokine signaling
STAT .....	signal transducers and activators of transcription
TKB.....	transplantace kmenových buněk

## 9. Seznam literatury

**Adam Z., Vorlíček J.** (2001): Hematologie II, Přehled hematologických maligních nemocí, 1. vydání, Grada Publishing, Avicenum, Praha

**Advani A. S., Dressman H. K., Quiroz M., Taylor G. A., Pendergast A. M.** (2004): Elevated expression of a subset of interferon inducible genes in primary bone marrow cells expressing p185 Bcr-Abl versus p210 Bcr-Abl by DNA microarray analysis. *Leukemia Research* 28: 285 – 294

**Agami, R., Blandino, G., Oren, M., Shaul, Y.** (1999): Interaction of c-Abl and p73-alpha and their collaboration to induce apoptosis. *Nature* 399: 809-813

Agell N., Jaumot M., Rodriguez-Vilarrupla A., Brun S., Abella N., Canela N., Estanyol J. M., Bachs O. (2006): The diverging roles of calmodulin and PKC in the regulation of p21 intracellular localization. *Cell cycle* 1: 3 – 6

**Alt J. R., Gladden A. B., Diehl J. A.** (2001): p21(Cip1) promotes cyclin D1 nuclear accumulation via direct inhibition of nuclear export. *The Journal of Biological Chemistry* 277, 8517-23

**Anklesaria P.N.** et al. (1985 a) citováno podle Clarkson B., Strife A., Wisniewski D., Lambek C. L., Liu C. (2003): Chronic myelogenous leukemia as a paradigm of early cancer. *Leukemia* 17: 1211 – 1262

**Anklesaria P. N. et al.** (1985 b) citováno podle Clarkson B., Strife A., Wisniewski D., Lambek C. L., Liu C. (2003): Chronic myelogenous leukemia as a paradigm of early cancer. *Leukemia* 17: 1211 – 1262

**Annis M. G., Yethon J. A., Leber B., Andrews D. W.** (2004): There is more to life and death than mitochondria: Bcl-2 proteins at the endoplasmic reticulum. *Biochimica et Biophysica Acta* 1644: 115 – 124

**Arocho A., Chen B., Ladanyi M., Pan Q.** (2006): Validation of the 2-DeltaDeltaCt calculation as an alternate method of data analysis for quantitative PCR of BCR-ABL P210 transcripts. *Diagnostic Molecular Pathology* 15: 56-61

**Asada M., Ohmi K., Delia D., Enosawa S., Suzuki S., Yuo A., Suzuki H., Mizutani S.** (2004): Brap2 functions as a cytoplasmic retention protein for p21 during monocyte differentiation. *Molecular and Cellular Biology* 18: 8236 – 8243

**Asada M., Yamada T., Ichijo H., Delia D., Miyazono K., Fukumuro K., Mizutani S.** (1999): Apoptosis inhibitory activity of cytoplasmic p21(Cip1/WAF1) in monocytic differentiation. *The EMBO Journal* 5: 1223 - 1234

**Asimakopoulos F. A., Shteper P. J., Krichevsky S., Fibach E., Polliack a., Rachmillewitz E., Ben-Neriah Y., Ben-Yehuda D.** (1999): ABL1 methylation is a distinct molecular event associated with clonal evolution of chronic myeloid leukemia. *Blood* 94: 2452 – 2460

**Bacher U., Hafferlach T., Hiddemann W., Schnittger S., Kern W., Schoch C.** (2004): Additional chromosomal abnormalities in Philadelphia-positive ALL and CML demonstrate a different cytogenetic pattern at diagnosis and follow different pathways at progression. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 157, 53 – 61

**Baker M. A. et al.** (1985) citováno podle Clarkson B., Strife A., Wisniewski D., Lambek C. L., Liu C. (2003): Chronic myelogenous leukemia as a paradigm of early cancer. *Leukemia* 17: 1211 – 1262

**Banerjee T. K.** (1972) citováno podle Clarkson B., Strife A., Wisniewski D., Lambek C. L., Liu C. (2003): Chronic myelogenous leukemia as a paradigm of early cancer. *Leukemia* 17: 1211 – 1262

**Barila, D., Superti-Furga G.** (1998): An intramolecular SH3-domain interaction regulates c-Abl activity. *Nature Genetics* 18: 280-282

**Bedi A., Barber J. P., Bedi G. C., el-Deiry W. S., Sidransky D., Vala m. S., Akhtar A. J., Hilton J., Jones J. R.** (1995): BCR-ABL mediated inhibition of apoptosis with delay of G2/M transition after DNA damage: a mechanism of resistance to multiple anticancer agents. *Blood* 86: 1148-1158

**Bonnefoy-Berard N., Aouacheria A., Verschelde C., QuemeneurL., Marcais A., Marcel J.** (2004): Kontrol of proliferation by Bcl-2 family members. *Biochimica et Biophysica Acta* 1644: 159 - 168

**Bose S., Deininger M., Gora-Tybor J., Goldman J. M., Melo J. V.** (1998): The presence of typical and atypical BCR-ABL fusion genes in leukocytes of normal individuals: biologic significance and implications for the assessment of minimal residual disease. *Blood* 92: 3362-3367

**Branford S., Rudzki Z., Walsh S., Grigg A., Arthur C., Taylor K., Herrmann R., Lynch K., Hughes T.** (2002): High frequency of point mutations clustered within the adenosine triphosphate-binding region of BCR/ABL in patients with chronic myeloid leukemia or Ph-positive acute lymphoblastic leukemia who develop imatinib (STI571) resistance. *Blood* 99: 3472-3475

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

**Bruno S., Darzynkiewicz Z.** (1992): Cell cycle dependent expression and stability of the nuclear protein detected by Ki-67 antibody in HL-60 cells. *Cell proliferation*: 25, 31-40

**Brusa G., Benvenuti M., Mazzacurati L., Mancini M., Pattacini I., Martinelli G., Barbieri E., Greenberger J. S., Baccarani M., Santuchi M. A.** (2003): p53 loss of function enhances genomic instability and accelerates clonal evolution of murine myeloid progenitors expressing the p210BCR-ABL tyrosin kinase. *Haematologica* 88: 622 – 630

**Buchdunger E., Cioffi C. L., Law N., Stover D., Ohno-Jones S., Druker B. J., Lydon N. B.** (2000): Abl protein kinase inhibitor STI571 inhibits in vitro signal transduction mediated by c-Kit and platelet-derived growth factor receptors. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 295: 139 – 145

**Bunz F., Dutriaux A., Lengauer C., Waldman T., Zhou S., Brown J. P., Sedivy J. M., Kinzler K. W., Vogelstein B.** (1998) Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science* 5393, 1497 – 1501

**Bustin S.** (2004): A-Z of quantitative PCR, INTERNATIONAL UNIVERSITY LINE Biotechnology Series, USA

**Calabretta B., Perrotti D.** (2004): The biology of CML blast crisis. *Blood* 103: 4010 – 4022

**Carter T. A., Wodicka L. M., Shah N. P., Velasco A. M., Fabian M. A., Treiber D. K., Milanov Z. V., Aterridge C. E., Biggs W. H., Edeen P. T., Floyd M., Ford J. M., Grotzfeld R. M., Herrgard S., Insko D. E., Mehta S. A., Patel H. K., Pao W., Sawyers C. L., Varmus H., Zarrinkar P. P., Lockhart D. J.** (2005): Inhibition of drug-resistant mutants of ABL, KIT, and EGF receptor kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 11011-6.

**Cilloni D., Messa F., Gottardi E., Fava M., Arruga F., Defilippi I., Carturan S., Messa E., Morotti A., Giugliano E., Rege-Cambrin G., Alberti D., Baccarani M., Saglio G.** (2004): Sensitivity to imatinib therapy may be predicted by testing Wilms tumor gene expression and colony growth after a short in vitro incubation. *Cancer* 101: 979 - 88

**Clarkson B., Strife A., Wisniewski D., Lambek C. L., Liu C.** (2003): Chronic myelogenous leukemia as a paradigm of early cancer. *Leukemia* 17: 1211 – 1262

**Copland M., Hamilton A., Elrick L. J., Baird W. J., Allan E. K., Jordanides N., Barow M., Mountford J. C., Holyoake T. L.** (2006): Dasatinib (BMS-354825) targets an earlier progenitor population than imatinib in primary CML but does not eliminate the quiescent population. *Blood* 107: 4532 - 4539

**Dai Y., Rahmani M., Corey S. J., Dent P., Grant S.** (2004): A BCR/ABL independent, Lyn-dependent form of imatinib mesylate (STI-571) resistance is associated with altered expression of Bcl-2. *The Journal of Biological Chemistry* 33: 34227 - 34239

**Deininger M. W., Bose S., Gora-Tybor J.** (1998): Selective induction of leukemia-associated fusion genes by high dose ionizing radiation. *Cancer Research* 58: 421-425

**Deininger M. W., Buchdunger E., Druker B. J.** (2005): The development of imatinib as a therapeutic agent for chronic myeloid leukemia. *Blood* 7: 2640 – 2653

**Delgado M. D., Vaque J. P., Arozarena I., Irazola M., Martínez C., Crespo P., León J.** (2000): H-, K- and N-Ras inhibit myeloid leukemia cell proliferation by a p21WAF1-dependent mechanism. *Oncogene* 10: 783 – 790



**Deutsch E., Dugray A., AbdulKarim M., Marangoni E., Magiorrella L., Vaganay S., Kacher R., Rasy S. D., Eschwege F., Vainchenker W., Turhan A. G., Bourhis J. (2001):** BCR-ABL down-regulates the DNA repair protein DNA-Pkcs. *Blood* 97: 2084 – 2090

**Deutsch E., Jarrousse S., Bet D., Dugray A., Bonnet m. L., Vozenin- Brotons M. C., Guilhot T., Turhan A. G., Feunteun J., Bourhis J. (2003):** Down-regulation of BRCA1 in BCR\_ABL-expressing hematopoietic cells. *Blood* 101: 4583 - 4588

**Dhut, et al., Chaplin T., Young B. D. (1990):** BCR-ABL and BCR proteins: biochemical characterization and localization. *Leukemia* 11: 745 - 750

**Di Bacco A., Keeshan K., McKenna S. L., Cotter T. G. (2000):** Molecular abnormalities in chronic myeloid leukemia: deregulation of cell growth and apoptosis. *The Oncologist* 5: 405 – 415

**Diekmann D., Brill S., Garrett M. D., Totty N., Hsuan J., Monfries C., Hall C., Lim L., Hall A. (1991):** Bcr encodes a GTPase-activating protein for p21rac. *Nature* 351: 400 - 402

**Dierov J. K., Dierova R., Carrol M. (2002):** BCR-ABL translocates to the nucleus after DNA damage and disrupts an ATR-dependent intra-S phase checkpointinteracts. *Cancer Cell* 3: 275 – 285

**Doan C. A. Reinhart H. L. (1941)** citováno podle Clarkson B., Strife A., Wisniewski D., Lambek C. L., Liu C. (2003): Chronic myelogenous leukemia as a paradigm of early cancer. *Leukemia* 17: 1211 – 1262

**Domen J., Cheshier S. H., Weissman I. L. (2000):** The role of apoptosis in the regulation of hematopoietic stem cells: Overexpression of Bcl-2 increases both their number and repopulation potential. *The Journal of experimental medicine* 191: 253-64

**Domen J., Weissman I. L. (2003):** Hematopoietic stem cells and other hematopoietic cells show broad resistance to chemotherapeutic agents in vivo when overexpressing bcl-2. *Experimantal hematology* 31: 631 - 639

**Donato N. J., Wu J. Y., Stapley J., Gallick G., Lin H., Arlinghaus R., Talpaz M. (2003):** BCR-ABL independence and LYN kinase overexpression in chronic myelogeneous leukemia cells selected for resistance to STI571. *Blood* 101: 690 – 698

**Donato N. J., Wu J. Y., Stapley J., Lin H., Arlinghaus R., Aggarwal B. B., Shishodia S., Albitar M., Hayes K., Kantarjian H., Talpaz M.** (2004): Imatinib mesylate resistance through BCR-ABL independence in chronic myelogenous leukemia. *Cancer Research* 64: 672 – 677

**Drummond M. W., Hoare S. F., Monaghan A., Graham S. M., Alcorn M. J., Keith W. N., Holyoake T. L.** (2005): Dysregulated expression of the major telomerase components in leukemic stem cells. *Leukemia* 19: 381 – 389

**Drummond M. W., Lennard A., Brummendorf T. H., Holyoake T.** (2004): Telomere shortening correlates with prognostic score at diagnosis and proceeds rapidly during progression of chronic myeloid leukemia. *Leukemia and Lymphoma* 45: 1775 – 1781

**Englert Ch., Maheswaran S., Garvin J. A., Kreidberg J., Haber D. A.** (1997): Induction of p21 by the Wilms' tumor suppressor gene WT1. *Cancer Research* 67: 1429 – 1434

**Ertmer A., Huber V., Gilch S., Yiohshimori T., Erfle V., Duyster J., Elsassner H.-P., Schatzl H. M.** (2007): The anticancer drug imatinib induces cellular autophagy. *Leukemia advance online publication*: 1 - 7

**Evans W. H.** et al. (1985) citováno podle Clarkson B., Strife A., Wisniewski D., Lambek C. L., Liu C. (2003): Chronic myelogenous leukemia as a paradigm of early cancer. *Leukemia* 17: 1211 – 1262

**Faderl S., Talpaz M., Estrov Z., Kantarjian H.M.** (1999) The biology of chronic myeloid leukemia. *The New England Journal of Medicine* 341, 164 – 172

**Fioretos T., Woncken J. W., Baram T. Z., Kamme F., Groffen J., Heisterkamp N.** (1995): Regional localization and developmental expression of the BCR gene in rodent brain. *Cellular and Molecular Biology Research* 41: 97 - 102

**Gabert J., Beillard E., van der Velden V. H., Bi W., Grimwade D., Pallisgaard N., Barbany G., Cazzaniga G., Cayuela J. M., Cave H., Pane F., Aerts J. L., De Micheli D., Thirion X., Pradel V., Gonzalez M., Viehmann S., Malec M., Saglio G., van Dongen J. J.** (2003): Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia - a Europe Against Cancer program. *Leukemia* 17: 2318 - 2357

**Gartel A. L., Ye X., Goufman E., Shianov P., Hay N., Najmabadi F., Tyner A. L. (2001):** Myc represses the p21(WAF1/CIP1) promoter and interacts with Sp1/Sp3. Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America 98: 4510 – 4515

**Gerdes J., Lemke H., Baisch H., Wackr H.-H. (1984):** Cell cycle analysis of cell proliferation-associated human nuclear antigendefined by the monoclonal antipody Ki-67. Journal of Imunnology 133: 1710 - 1715

**Gerdes J., Schwab U., Lemke H., Sten H. (1983):** Production of mouse monoclonal antipody reactive with a human nuclear antigenassociated with cell proliferation. International Journal of Cancer 31: 13 - 20

**Ghanem L., Steinman R. (2006):** A proapoptotic function of p21 in differentiating granulocytes. Leukemia Research 11: 1315 – 1323

**Goldman J. M., Melo J. V. (2003)** Chronic myeloid leukemia – advances in biology and new approaches to treatment. The New England Journal of Medicine 349, 1451 – 1464

**Guilhot F., Chastang C., Michallet M., Guerci A., Harousseau J. L., Maloisel F., Bouabdallah R., Guyotat D., Cheron N., Nicolini F., Abgrall J. F., Tanzer J. (1997):** Interferon alfa-2b combined with cytarabine versus interferon alone in chronic myelogeneous leukemia. The New England Journal of Hematology 337: 223 - 229

**Heisterkamp N., Stam K., Groffen J., de Klein A., Grosveld K. (1985):** Structural organization of the bcr gene and its role in the Ph' translocation. Nature 315: 758 - 761

**Hehlmann R., Heimpel H., Hasford J., Kolb H. J., Pralle H., Hossfeld D. K., Queisser w., Loffler H., Heinze B., Georgii A., P.v. Wussow, C. Bartram, M. GrieBhammer, L. Bergmann, U. Essers, C. Falge, A. Hochhaus, U. QueiBer, C. Sick, P. Meyer, N. Schmitz, K. Verpoort, H. Eimermacher, F. Walther, M. Westerhausen, U.R. Kleeberg, A. Heilein, A. Kabisch. C. Barz, R. Zimmermann, G. Meuret, A. Tichelli, W.E. Berdel, L. Kanz, B. Anger, F.J. Tigges, L. Schmid, W. Brockhaus, R. Zankovich, U. Schlafer, WeiBenfels, K. Mainzer, A. Tobler, M. Perker, J. Hohnloser, D. Messener, J. Thiele, T. Buhr, H. Ansari, and the German CML Study Group (1993):** Randomized comparision of busulfan and hydroxyurea in chronic myelogeneous leukemia: prolongation of survival by hydroxyurea. Blood 82: 398 - 407

**Hermans A., Heisterkamp N., von Lindern N., van Baal S., Meijer D., van der Plas D., Wiedemann L. M., Groffen J., Bootsma D., Grosveld G. (1987):** Unique fusion of bcr and c-abl genes in Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukemia. *Cell* 51: 34 – 40

**Hewitt S. M., Fraizer C. G., Wu Y.-J., Rauscher F. J., Saunders G. F. (1996):** Differential function of Wilms' tumor gene WT1 splice isoforms in transcriptional regulation. *The Journal of Biological Chemistry* 15: 8588 – 8592

**Hewitt S. M., Hamada S., McDonnell T. J., Rauscher F. J. 3rd, Saunders G. F. (1995):** Regulation of the proto-oncogenes bcl-2 and c-Myc by the Wilms' tumor suppressor gene WT1. *Cancer Research* 22: 5386 – 5389

**Heyworth P. G., Knaus U. G., Settleman J., Curnutte J. T., Bokoch G. M. (1993):** Regulation of NADPH oxidase activity by Rac GTPase activating protein(s). *Molecular and Cellular Biology* 4: 1217 - 1223

**Hidehiko K., Linghu N., Zhi-Min Y. (2002)** Inactivation of NFκB-dependent cell survival, a novel mechanism for the proapoptotic function of c-Abl. *Molecular and Cellular Biology*: 6079–6088

**Hirose M., Kuroda Y. (1998):** p53 may mediate the mdr-1 expression via the WT1 gene in human vincristine-resistant leukemia/lymphoma cell lines. *Cancer Letters* 2: 165 - 171

**Hochhaus A., Kreil S., Corbin A. S., La Rosee P., Muller M. C., Lahaye T., Hanfstein B., Schoch C., Cross N. C., Berger U., Gschaidmeier H., Drunker B. J., Hehlmann R. (2002):** Molecular and chromosomal mechanisms of resistance to imatinib (STI571) therapy. *Leukemia* 16: 2190 – 2196

**Hochhaus A., La Roseé P. (2004):** Imatinib therapy in chronic myelogenous leukemia: strategies to avoid and overcome resistance. *Leukemia* 18: 1321 – 1331

**Holtz M. S., Forman S. J., Bhatia R. (2005):** Nonproliferating CML CD34+ progenitors are resistant to apoptosis induced by a wide range of proapoptotic stimuli. *Leukemia* 19: 1034 – 1041

**Hossain A., Nixon M., Kuo M. T., Saunders G. F. (2006):** N-terminally truncated WT1 protein with oncogenic properties overexpressed in leukemia. *The Journal of Biological Chemistry* 281, 28122 - 28130

**Huntly B. J., Bench A., Green A. R. (2003):** Double jeopardy from a single translocation: deletions of the derivative chromosome 9 in chronic myeloid leukemia. *Blood* 102: 1160 – 1168

**Chomczynski P., Sacchi N. (1987):** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical biochemistry* 162: 156-159

**Chu S., Xu H., Shah N. P. (2005):** Detection of BCR-ABL kinase mutations in CD34+ cells from chronic myelogenous leukemia patients in complete cytogenetic remission on imatinib mesylate treatment *Blood*. 105: 2093-2098

**Illaria R. L., Van Etten R. A. (1996):** P210 and P190BCR/ABL Induce the Tyrosine Phosphorylation and DNA Binding Activity of Multiple Specific STAT Family Members. *The Journal of Biological Chemistry* 49: 31704 – 31710

**Inoue K., Sugiyama H., Ogawa H., Nakagawa M., Yamagami T., Miwa H., Kita K., Hiraoka A., Masaoka T., Nasu K. (1994):** WT1 as a new prognostic factor and a new marker for the detection of minimal residual disease in acute leukemia. *Blood* 84: 3071 – 3079

**Inoue K., Tamaki H., Ogawa H., Oka Y., Soma T., Tatekawa T., Oji Y., Tsuboi A., Kim E. H., Kawakami M., Akiyama T., Kishimoto T., Sugiyama H. (1998):** Wlms' tumor gene (WT1) competes with differentiation-induced signal in hematopoietic progenitor cells. *Blood* 8: 2969 – 2976

**Jacquel A., Herrant M., Legros L., Belhacene N., Luciano F., Pages G., Hofman P., Auberger P. (2003):** Imatinib induces mitochondria-dependent apoptosis of the BCR-ABL positive K562 cell line and its differentiation towards erythroid lineage. *The faseb journal* 17: 2347

**Jamieson C. H. M., Ailles L. E., Dylla S. J., Muijtjens M., Jones C., Zehnder J. L., Gotlib J., Li K., Manz M. G., Keating A., Sawyers C. L., Weissman I. L. (2004):** Granulocyte-macrophage progenitors as candidate leukemic stem cells in blast-crisis CML. *The New England Journal of Hematology* 351: 657 – 667

**Jiang X., Lopez A., Holyoake T. L., Eaves A., Eaves C.** (1999): Autocrine production and action of IL-3 and granulocyte-colony stimulating factor in chronic myeloid leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 12804-12809

**Jiixin L., Yun W., Arlinghaus R. B.** (1996): Sequences within the first exon of BCR inhibit the activated tyrosine kinases of c-Abl and the Bcr-Abl oncoprotein. *Cancer Research* 56: 5120-5124

**Jonasch E., Haluska F. G.** (2001): Interferon in oncological practice: Review of interferon biology, clinical applications, and toxicities. *The Oncologist* 6: 34 – 55

**Jongen-Lavrencic M., Salesse S., Delwel R., Verfaillie C. M.** (2005): BCR/ABL-mediated downregulation of genes implicated in cell adhesion and motility leads to impaired migration toward CCR7 ligands CCL19 and CCL21 in primary BCR/ABL –positive cells. *Leukemia* 19: 373 – 380

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

**Kolb H. J., Schattenberg A., Goldman J. M., Hertenstein B., Jacobsen N., Arcese W., Ljungman P., Ferrant A., Verdonck L., Niederwieser D., van Rhee F., Mittermueler J., de Witte T., Holler E., Ansari H., European group for blood and marrow transplantation working party chronic leukemia** (1995): Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow graft patients. *Blood* 86: 2041 - 2050

**Kusy S., Larsen Ch.-J., Roche J.** (2004): p14ARF, p15INK4b and p16INK4a methylation status in chronic myelogenous leukemia. *Leukemia and Lymphoma* 45: 1989 – 1994

**Langenhuijsen M.** (1984) citováno podle Clarkson B., Strife A., Wisniewski D., Lambek C. L., Liu C. (2003): Chronic myelogenous leukemia as a paradigm of early cancer. *Leukemia* 17: 1211 – 1262

**Laurent E., Talpaz M., Kantarjian H., Kurzrock R.** (2001): The BCR gene and Philadelphia chromosome positive leukemogenesis. *Cancer Research* 61: 2343

**Lewis J. M., Baksaran M., Taagepera S., Schwartz M. A., Wang J. Y. (1996):** Integrin regulation of c-Abl tyrosine kinase activity and cytoplasmic-nuclear transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America* 93: 15174 – 15179

**Lichty B. D., Keimel-Reid S. (2000):** Exon-skipping in BCR/ABL is induced by ABL exon 2. *The Biochemical journal* 348: 63 – 69

**Ling X., Ma G., Sun T., Liu J., Arlinghaus R. B. (2003)** BCR and ABL interaction: Onkogenic activation of c-Abl by sequestering Bcr. *Cancer Research* 63: 298 – 303

**Mahon F.-X., Belloc F., Lagarde V., Chollet C., Moreau-Gaudry F., Reiffers J., Goldman J. m., Melo J. V. (2003):** MDR1 gene overexpression confers resistance to imatinib mesylate in leukemia cell line models. *Blood* 101: 2368 – 2373

**Machová K., Lopotová T., Rulcová J., Zmeková V., Vlčanová K., Zemanová Z., Klamová H., Moravcová J. (2007):** BCR-ABL mutated clone progression and elimination in CML patients treated with ABL kinase inhibitors, abstrakt na EHA

**Marcel J., Perlina G. R., Rival A. L., Collins M. K. (1994):** Growth factor starvation of Bcl-2 overexpressing murine bone marrow cells induced refractoriness to IL-3 stimulation of proliferation. *Oncogene* 9: 1117 – 1122

**Martinelli G., Soverini S., Rosti G., Cilloni D., Baccarani M. (2005):** New tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia. *Hematologica* 90: 534 - 541

**Matsuzaki Y., Nakayama K., Nakayama K., Tomita T., Isoda M., Loh D. Y., Nakauchi H. (1997):** Role of bcl-2 in the development of lymphoid cells from the hematopoietic stem cell. *Blood*. 89: 853-862

**Mayer J., Starý J. (2002):** Leukémie, Grada publishing, Avicenum, Praha

**McCoy C., McGee S. B., Cornwell M. M. (1999):** The Wilms' tumor suppressor, WT1, inhibits 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate activation of the multidrug resistance-1 promoter. *Cell growth & differentiation* 6: 377 – 386

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

**Melo J. V., Gordon D. E., Cross N. C., Goldman J. M.** (1993): The ABL-BCR fusion gene is expressed in chronic myeloid leukemia. *Blood* 81: 158 - 165

**Miething C., Feihl S., Mugler C., Grundler R., von Bubnoff N., Lordick F., Peschel C., Duyster J.** (2006): The BCR-ABL mutations T315I a Y253H do not confer a growth advantage in the absence of imatinib. *Leukemia* 20: 650 - 657

**Miething C., Mugler C., Grundler R., Hoepfl J., Bai R.-Y., Peschel C., Duyster J.** (2003): Phosphorylation of tyrosine 393 in the kinase domain of BCR-ABL influences the sensitivity towards imatinib in vivo. *Leukemia* 17: 1695 - 1699

**Miyagi T., Ahuja H., Kubota T., Kubonishi I., Koeffler H. P., Miyoshi I.** (1993): Expression of the candidate Wilm's tumor gene, WT1, in human leukemia cells. *Leukemia*. 7: 970 - 977

**Mizuchi D., Kurosu T., Kida A., Jin Z. H., Jin A., Arai A., Miura O.** (2005): BCR/ABL activates Rap1 and B-Raf to stimulate the Mek/Erk signaling pathway in hematopoietic cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 326: 645 – 651

**Moravcová J., Lukášová m., Starý J., Haškovec C.** (1998): Simple competitive RT-PCR assay to monitor minimal residual disease in CML patients after bone marrow transplantation. *Leukemia* 12: 1303 – 1312

**Moravcova J., Rulcova J., Polak J., Zemanova Z., Klamova H., Haskovec C.** (2005) CML patient with rare b2a3 (e13a3) variant of BCR-ABL transcript: complete molecular response to imatinib. *Leukemia Research* 11: 1365 - 1366

**Moravcová J., Zmeková V., Klamová H., Voglova J., Faber E., Michalova K., Rabasova J., Jarosova M.** (2003): Differences and similarities in kinetics of BCR-ABL transcript levels in CML patients treated with imatinib mesylate for chronic or accelerated disease phase. *Leukemia Research* 28: 415 – 419

**Morgan M. A., Dolp O., Reuter C. W.** (2001): Cell-cycle activation of mitogen-activated protein kinase (MEK-1/2) in myeloid leukemia cell lines and induction of growth inhibition and apoptosis by inhibitors of Ras signaling. *Blood* 97: 1823 - 1834



**Mori N., Takeuchi S., Tasaka T., Lee S., Spira S., Ben Yehuda D., Mizoquchi H., Schiller G., Koeffler H.- K.** (1997): Absence of microsatellite instability during the progression of chronic myelocytic leukemia, *Leukemia* 11: 151 - 152

**Morris C. M., Heisterkamp N., Groffen J., Fitzgerald P. H.** (1991): Entire ABL gene is joined with 5'-BCR in some patients with Philadelphia-positive leukemia, *Blood* 78: 1078 – 1084

**Mrowka C., Schedl A.** (2000): Wilms' tumor suppressor gene WT1: from structure to renal pathophysiologic features. *Journal of the American Society of Nephrology.* 16: 106 – 115

**Neves H., Ramos C., da Silva M. G., Parreira A., Parreira L.** (1999): The nuclear topography of ABL, BCR, PML and RAR $\alpha$  genes: evidence of gene proximity in specific phases of the cell cycle and stages of hematopoietic differentiation. *Blood* 93: 1197-1207

**Oji Y., Ogawa H., Tamaki H., Oka Y., Tsuboi A., Kim E. H., Soma T., Tatekawa T., Kawakami M., Asada M., Kishimoto T., Sugiyama H.** (1999): Expression of the Wilms' tumor gene WT1 in solid tumors and its involvement in tumor cell growth. *Cytotherapy* 2: 194 – 204

**Okuda K., Weisberg E., Gilliland D. G., Griffen J. D.** (2001): ARG tyrosine kinase activity is inhibited by STI571. *Blood* 97: 2440 - 2448

**O'Brien D. G., Guilhot F., Larson R. A., Gathmann I., Baccarani M., F. Cervantes, Cornelissen J. J., Fischer T., Hochhaus A., Hughes T., Lechner K., Nielsen J. L., Rousset P., Reiffers J., Saglio G., Shepherd J., Simonsson B., Gratwohl A., Goldman J. M., Kantarjian H., Taylor K., Verhoef G., Bolton A. E., Capdeville R., Druker B. J.** (2003): Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic phase chronic myeloid leukemia. *The New England Journal of Hematology* 348: 994 – 1004

**Parada Y., Banerji L. Glassford J, Lea NC, Collado M, Rivas C, Lewis JL, Gordon MY, Thomas NS, Lam EW.** (2001): BCR-ABL and interleukin 3 promote hematopoietic cell proliferation and survival through modulation of cyclin D2 and p27Kip1 expression. *The Journal of Biological Chemistry* 276: 23572 – 23580

**Peggs K., Mackinnon S. (2003):** Imatinib mesylate – the new gold standard for treatment of chronic myeloid leukemia. *The New England Journal of Hematology* 348: 1048 - 1050

**Pritchard J. K., Renshaw J. (1997):** Regarding „expression of the Wilms'tumor gene (WT1) in normal hematopoiesis“. *Experimental Hematology* 25: 1311 – 1312

**Ren R. (2005)** Mechanisms of BCR-ABL in the pathogenesis of chronic myelogenous leukemia. *Nature reviews. Cancer* 5, 172

**Ress A., Moelling K. (2005):** BCR is a negative regulator of the Wnt signaling pathway. *The Embo Journal Reports* 6: 1095 - 1100

**Robertson L. E., Hall R., Keating M. J., Estey E., Kantarjian H. M., McLaughlin P., Hagemeister F. B., Plunkett W. (1993):** Hematologic remission and cytogenetic improvement after treatment of stable-phase chronic myelogenous leukemia with continuous infusion of low-dose cytarabine. *The American Journal of Hematology* 43: 95 – 102

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

**Salesse S., Dylla S. J., Verfaillie C. M. (2004):** p210 BCR/ABL-induced alteration of pre-mRNA splicing in primary human CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Leukemia* 18: 727 – 733

**Salesse S., Verfaillie C. M. (2003):** BCR/ABL-mediated increased expression of multiple known and novel genes that may contribute to the pathogenesis of chronic myelogenous leukemia. *Molecular Cancer Therapeutics* 2: 173 – 182

**Saglio G., Pane F., Martinelli G., Guerrasio A. (1997):** BCR/ABL transcripts and leukemia phenotype: unsolved puzzle. *Leukemia and Lymfoma* 26: 281 – 286

**Salgio G., Storlazzi C. T., Giugliano E., Surace C., Anelli L., Rege-Cambrin G., Zagaria A., Jimenez Velasco A., Heiniger A., Scaravaglio P., Torres Gomez A., Roman Gomez A., Archidiacono N., Banfi S., Rocchi M. (2002):** A 76-kb duplicon maps close to the BCR gene on chromosome 22 and the ABL gene on chromosome 9: possible involvement in the genesis of

the Philadelphia chromosome translocation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 99: 9882 – 9887

**Salomoni P., Wasik M. A., Riedel R. F., Reiss K., Choi J. K., Skorski T., Calabretta B.** (1998): Expression of Constitutively Active Raf-1 in the Mitochondria Restores Antiapoptotic and Leukemogenic Potential of a Transformation-deficient BCR/ABL Mutant. The Journal of Experimental Medicine 12: 1995 - 2007

**Sánchez-García I., Grutz G.** (1995): Tumorigenic activity of the BCR-ABL onkogenes is mediated by Bcl-2. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 92: 5287 - 5291

**Sattler M., Mohi M. G., Pride Y. B., Quinnan L. R., Malouf N. A., Podar K., Gesbert F., Iwasaki H., Li S., Van Etten R. A., Gu H., Griffin J. D., Neel B. G.** (2002): Critical role for Gab2 in transformation by BCR/ABL. Cancer Cell 5: 479 – 492

**Sattler M., Verma S., Byrne Ch. H., Schrikhande K., Winkler T., Algate P. A., Rohrschneider R. H., Griffin J. D.** (1999): BCR/ABL Directly Inhibits Expression of SHIP, an SH2-Containing Polyinositol-5-Phosphatase Involved in the Regulation of Hematopoiesis. Molecular and cellular biology 11: 7473 - 7480

**Sharma P. M., Bowman M., Madden S. L., Rauscher F. J., Sukumar S.** (1994): RNA editing in the Wilms' tumor susceptibility gene, WT1. Genes & development. 8: 270 – 731

**Shet A. S., Jahagirdar B. N., Verfaillie C. M.** (2002): Chronic myelogenous leukemia: mechanisms underlying disease progression. Leukemia 16: 1402 – 1411

**Scharnhorst V., Dekker P., van der Eb A. J., Jochemsen A. J.** (1999): Internal translation initiation generates novel WT1 isoforms with distinct biological properties. The Journal of Biological Chemistry 274: 23456 – 23462

**Scharnhorst V., Dekker P., van der Eb A. J., Jochemsen A. G.** (2000): Physical interaction between Wilms tumor 1 and p73 proteins modulates their functions. The Journal of Biological Chemistry 14: 10202 – 10211

**Schlüter C., Duhrow M., Wohlenberg C., Becker M. H. G., Key G., Flad H.-D., Gerdes J.** (1993): The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: A very large, ubiquitous

nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins. *The Journal of Cell Biology* 123: 513 - 522

**Schuster Ch., Foster K., Dierks H., Elsasser A., Behre G., Simon N., Danhauser-Riedl S., Hallek M., Warmuth M.** (2003): The effects of Bcr-Abl on C/EBP transcription-factor regulation and neutrophilic differentiation are reversed by the Abl kinase inhibitor imatinib mesylate. *Blood* 101: 655 – 663

**Silver R. T., Woolf S. H., Hehlmann R., Appelbaum F. R., Anderson J., Bennett C., Goldman J. M., Guilhot F., Kantarjian H. M., Lichtin A. E., Talpaz M., Tura S.** (1999): An evidence-based analysis of the effect of busulfan, hydroxyurea, interferon, and allogeneic bone marrow transplantation in treating the chronic phase of chronic myeloid leukemia: developed for American society of hematology. *Blood* 94: 1517 - 1536

**Skorski T., Kanakaraj P., Ku D. H., Nieborowska-Skorska M., Canaani E., Zon G., Perussia B., Calabretta B.** (1994): Negative regulation of p120GAP GTPase promoting activity by p210bcr/abl: implication for RAS-dependent Philadelphia chromosome positive cell growth. *The Journal of Experimental Hematology* 179: 1855-65

**Steelman L. S., Pohnert S. C., Shelton J. G., Franklin R. A., Bertrand F. E., McCubrey J. M.** (2004): JAK/STAT, Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt and BCR-ABL in cell cycle and leukemogenesis. *Leukemia* 18: 189 – 218

**Sugiyama H.** (1998): Wilms tumor gene (WT1) as a new marker for the detection of minimal residual disease in leukemia. *Leukemia and Lymphoma* 30: 55 – 61

**Talpaz M., McCredie K. B., Kantarjian H. M., Trujillo J. M., Keating M. J., Gutterman J. U.** (1986): Chronic myelogenous leukaemia: haematological remissions with alpha interferon. *The british journal of hematology* 64: 87 - 95

**Talpaz M., Shah N. P., Kantarjian H., Donato N., Nicoll J., Paquette R., Cortes J., O'Brien S., Nicaise C., Bleickardt E., Blackwood-Chirchir A. M., Iyer V., Chen T.-T., Huang F., Decillis A. P., Sawyers Ch. L.** (2006): Dasatinib in Imatinib-Resistant Philadelphia Chromosome-Positive Leukemias. *The New England Journal of Medicine* 354: 2531 - 2541

**Tamaki H., Ogawa H., Ohyashiki K., Ohyashiki J. H., Iwama H., Inoue K., Soma T., Oka Y., Tatekawa T., Oji Y., Tsuboi A., Kim E. H., Kawakami M., Fuchigami K., Tomonaga M., Toyama K., Aozasa K., Kishimoto K., Sugiyama H.** (1999): The Wilms' tumor gene WT1 is a good marker for diagnosis of disease progression of myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 13: 393 – 396

**Telegeev G. D., Dubrovskaya A. N., Dybkov M. D., Maliuta S. S.** (2004): Influence of BCR/ABL fusion proteins on the course of Ph leukemias. *Acta Biochimica Polonica* 51: 845 – 849

**Thomas J., Wang L., Clark R. E., Pirmohamed P.** (2004): Active transport of imatinib into and out of cells: implications of drug resistance. *Blood* 104: 3739 – 3745

**Tokarski J., Hewitt J., Chang C. Y., Cheng J. D., Wittekind M., Kiefer S. E., Kish K., Lee F. Y., Borzilleri F., Lombardo L. J., Xie D., Zhang Y., Klei H. E.** (2004): The structure of Dasatinib (BMS-354825) bound to activated ABL kinase domain elucidates its inhibitory activity against imatinib-resistant ABL mutants.

**Ulmannová V.** (2003): Expres regulátorů buněčného cyklu během diferenciace a apoptózy u lidských leukemických buněčných linií. *Disertační práce*

**Uzunel M., Ringden O.** (2004): Poor correlation of kinetics between BCR-ABL and WT1 transcript levels after allogeneic stem cell transplantation. *Bone marrow transplantation* 1: 47 – 52

**Van Rhee F., Hochhaus A., Lin F., Melo J. V., Goldman J. M., Cross N. C. P.** (1996): p190 BCR-ABL mRNA is expressed at low levels in p210-positive chronic myeloid and acute lymphoblastic leukemias. *Blood* 87: 5213 - 5217

**Vaqué J. P., Navascues J., Shiiro Y., Laiho M., Ajemjo N., Mauleon D., Matallanas D., Crespo P., Leon J.** (2004): Myc antagonizes Ras-mediated growth arrest in leukemia cells through the inhibition of the Ras-ERK-p21Cip1 pathway. *The Journal of Biological Chemistry* 280: 1112 - 1122

**Verfaillie C. M., McCarthy J. B., McGlave P.B.** (1992): Mechanisms underlying abnormal trafficking of malignant progenitors in chronic myelogenous leukemia. Decreased adhesion to

stroma and fibronectin but increased adhesion to the basement membrane components laminin and collagen type IV. *The Journal of Clinical Investigation* 90: 1232 - 1241

**Verheijen R. H., Kuijpers H., van Driel R., Beck L. M., van Dierendonck J., Brakenhoff G. C., Ramaekers F. C. S.** (1989 a): Ki-67 detects a nuclear matrix-associated proliferation-related antigen II. Localization in mitotic cells and association with chromosomes. *Journal of Cell Science* 92: 531 - 540

**Verheijen R. H., Kuijpers H., Schlingemann J. O., Boehmer A. L. M., van Driel R., Brakenhoff G. C., Ramaekers F. C. S.** (1989 b): Ki-67 detects a nuclear matrix-associated proliferation-related antigen I. Intracellular localization during interphase. *Journal of Cell Science* 92: 123 - 130

**Wagner K.-D., Wagner N., Schedl A.** (2003): The complex life of WT1. *Journal of Cell Science* 16: 1653 – 1658

**Wang Z.Y., Qui Q. Q., Gurrieri M., Huang J., Deuel T. F.** (1995): WT1, the Wilms' tumor suppressor gene product, represses transcription through an interactive nuclear protein. *Oncogene* 10: 1243 – 1247

**Welch P. J., Wang J. Y.** (1993): A C-terminal protein-binding domain in the retinoblastoma protein regulates nuclear c-Abl tyrosine kinase in the cell cycle. *Cell* 75: 779 - 790

**Wertheim J. A., Perera S. A., Hammer D. A., Ren R., Boettiger D., Pear W.S.** (2003): Localization of BCR-ABL to F-actin regulates cell adhesion but does not attenuate CML development. *Blood* 102: 2220 – 2228

**Wickremasinghe R. G., Hoffbrand A. V.** (1999): Biochemical and genetic control of apoptosis: Relevance to normal hematopoiesis and hematological malignancies. *Blood* 93: 3587 – 3600

**Woodring P. J., Hunter T., Wang J. Y. J.** (2001): Inhibition of c-Abl Tyrosine Kinase Activity by Filamentous Actin. *The Journal of Biological Chemistry* 276: 27104 – 27110

**Yang M. J., Liu T. C., Chang J. G., Lin P. M., Lin S. F.** (2003): JunB gene expression is inactivated by methylation in chronic myeloid leukemia. *Blood* 101: 3205 – 3211

**Yuan Z. M., Shioya H., Ishiko T., Sun X., Gu J., Huang Y. Y., Lu H., Kharbanda S., Weichselbaum R., Kufe D. (1999):** p73 is regulated by tyrosine kinase c-Abl in the apoptotic response to DNA damage. *Nature* 399: 814-817

**Zakut R., Givol D. (1995):** The tumor suppression function of p21Waf is contained in its N-terminal half ('half-WAF'). *Oncogene* 2: 393 – 395