

**Univerzita Karlova**

**1. lékařská fakulta**

Studijní program: Molekulární a buněčná biologie, genetik a virologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie, genetik a virologie



**UNIVERZITA KARLOVA**  
**1. lékařská fakulta**

**MUDr. Monika Krutská**

Hledání polymorfismů v promotorech genů superrodin ABC a SLC transportérů  
a jejich souvislosti s odpovědí na léčbu imatinibem u pacientů s chronickou  
myeloidní leukémií

Search for Polymorphisms in the Promoters of Genes of Superfamily ABC and SLC  
Transporters and Their Association with Response to Imatinib Therapy in Patients with  
Chronic Myeloid Leukemia

Typ závěrečné práce

Disertační

Školitel: doc. Mgr. Kateřina Machová Poláková, Ph.D.

Konzultant: MUDr. Hana Klamová, CSc.

Praha 2024

## **Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 13.6.2024

Monika Krutská

.....

Podpis autora

**Identifikační záznam:**

KRUTSKÁ, Monika. *Hledání polymorfismů v promotorech genů superrodin ABC a SLC transportérů a jejich souvislosti s odpovědí na léčbu imatinibem u pacientů s chronickou myeloidní leukémií* [Search for Polymorphisms in the Promoters of Genes of Superfamily ABC and SLC Transporters and Their Association with Response to Imatinib Therapy in Patients with Chronic Myeloid Leukemia]. Praha, 2024. 110s. Disertační práce. Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta, Ústav klinické a experimentální hematologie 1. LF. Školitel doc. Mgr. Kateřina Machová Poláková Ph.D.

### **Poděkování:**

Ráda bych zde poděkovala svojí školitelce doc. Mgr. Kateřině Machové Polákové, Ph.D. za možnost poodhalit krásu vědeckého poznávání, cenné rady, trpělivost, skvělý profesionální, ale i přátelský přístup. Děkuji svým kolegům s Oddělení molekulární genetiky ÚHKT za vytvoření výtečných podmínek pro práci, za jejich spolupráci, ochotu, rady a obohacující vědecké diskuze, zejména mým kolegům a kamarádům RNDr. Nikolovi Čuříkovi, Ph.D. a Mgr. Václavě Polívkové, Ph.D. Děkuji svým kolegům z klinického pracoviště, především své odborné konzultantce MUDr. Haně Klamové, CSc. Dále bych chtěla poděkovat své rodině za obrovskou dávku trpělivosti a plnou podporu, kterou mi vždy dávala najevo.

# Obsah

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Abstrakt</b>  | <b>5</b>  |
| <b>Abstract</b>  | <b>7</b>  |
| <b>1 Teoretický úvod</b>   | <b>9</b>  |
| 1.1 Chronická myeloidní leukemie (CML) . . . . .   | 9         |
| 1.1.1 Historie . . . . .   | 9         |
| 1.1.2 Filadelfský chromozom, fúzní gen <i>BCR::ABL1</i> a onkoprotein <i>BCR::ABL1</i> . . . . . | 9         |
| 1.1.3 Epidemiologie . . . . .  | 10        |
| 1.1.4 Klinický obraz a fáze onemocnění . . . . .   | 11        |
| 1.1.5 Diagnostika . . . . .  | 12        |
| 1.1.6 Odhad prognózy CML . . . . .   | 13        |
| 1.1.7 Léčba CML . . . . .  | 15        |
| 1.1.8 Vývoj hodnocení léčby . . . . .  | 18        |
| 1.1.9 Remise bez léčby (TFR) . . . . .   | 20        |
| 1.1.10 Rezistence k tyrozinkinázovým inhibitorům (TKI) . . . . .                                 | 20        |
| 1.1.11 Mechanismy transportu léčiv . . . . .   | 21        |
| 1.2 ABC a SLC transportéry . . . . .   | 23        |
| 1.2.1 Obecná charakteristika . . . . .   | 23        |
| 1.2.2 ABC a SLC transportéry a jejich role v transportu imatinibu u pacientů s CML . . . . .     | 25        |
| <b>2 Výchozí hypotéza a cíl práce</b>  | <b>31</b> |
| <b>3 Materiál a metody</b>   | <b>33</b> |
| 3.1 Soubor pacientů . . . . .  | 33        |
| 3.2 Buněčné linie . . . . .  | 37        |
| 3.3 Výběr transportérů a návrh primerů . . . . .   | 38        |
| 3.4 Detekce polymorfismů v promotorech vybraných genů . . . . .                                  | 41        |
| 3.4.1 Příprava vzorků k sekvenování nové generace (NGS) . . . . .                                | 41        |
| 3.4.2 Příprava vzorků pro Sangerovo sekvenování . . . . .  | 43        |
| 3.5 Měření relativní exprese genu <i>SLC22A4</i> a <i>SLC22A5</i> . . . . .                      | 44        |
| 3.5.1 Měření exprese <i>SLC22A4</i> a <i>SLC22A5</i> u patientských vzorků . . . . .             | 44        |
| 3.5.2 Analýza exprese <i>SLC22A4</i> a <i>SLC22A5</i> v buněčných liniích . . . . .              | 45        |
| 3.6 Měření halving time . . . . .  | 45        |
| 3.6.1 Měření transkriptu <i>BCR::ABL1</i> . . . . .  | 46        |

|          |  |            |
|----------|--|------------|
| 3.6.2    | Výpočet halving time . . . . .   | 46         |
| 3.7      | Genotypování SNP . . . . .   | 46         |
| 3.8      | Analýza vazebné nerovnováhy . . . . .  | 47         |
| 3.9      | Statistické analýzy . . . . .  | 47         |
| <b>4</b> | <b>Výsledky</b>  | <b>49</b>  |
| 4.1      | Identifikace kandidátních SNP v promotorech vytipovaných ABC a SLC genů v závislosti na typu odpovědi při léčbě imatinibem . . | 49         |
| 4.2      | Analýzy vazebné nerovnováhy . . . . .  | 58         |
| 4.3      | Genotyp SNP rs460089 promotoru <i>SLC22A4</i> ovlivňuje odpověď na léčbu imatinibem . . . . .                                  | 60         |
| 4.3.1    | Kombinace genotypů SNP promotorů <i>SLC22A4</i> a <i>SLC22A5</i> ovlivňuje odpověď na léčbu imatinibem . . . . .               | 64         |
| 4.4      | SNP rs460089 je nezávislý prediktivní faktor odpovědi na léčbu CML   | 68         |
| 4.5      | Měření exprese <i>SLC22A4</i> a <i>SLC22A5</i> u pacientů s CML a v buněčných liniích . . . . .                                | 72         |
| 4.6      | Validace TaqMan genotypovací eseje . . . . .   | 72         |
| 4.7      | Genotypy rs460089 ovlivňují udržení molekulární remise u pacientů po vysazení imatinibu . . . . .                              | 74         |
| 4.7.1    | Vliv genotypu rs460089 na udržení MMR po ukončení terapie TKI . . . . .  | 75         |
| 4.7.2    | Validace SNP rs460089 jako markeru udržení MMR po ukončení terapie TKI . . . . .   | 78         |
| <b>5</b> | <b>Diskuze</b>   | <b>80</b>  |
| <b>6</b> | <b>Závěry</b>  | <b>87</b>  |
|          | <b>Seznam použité literatury</b>   | <b>89</b>  |
|          | <b>Internetové zdroje</b>  | <b>108</b> |
|          | <b>Seznam publikací autora</b>   | <b>109</b> |

# Seznam zkratek

|          |  |
|----------|--|
| ABC      | rodina membránových transportérů (ATP-binding cassette)  |
| ABL1     | protoonkogen (Abelson murine leukaemia)  |
| ACA      | přídavné cytogenetické změny (additional chromosomal abnormalities)                                      |
| AF       | akcelerovaná fáze CML  |
| ALL      | akutní lymfoblastická leukemie   |
| BCR      | gen nacházející se na dlouhém raménku 22. chromozomu (break-point cluster region)                        |
| BF       | blastická fáze CML   |
| bp       | páry bází  |
| CI       | interval spolehlivosti (confidence intervals)  |
| CML      | chronická myeloidní leukemie   |
| DASA     | dasatinib  |
| DMR      | hluboká molekulární odpověď (deep molecular response)  |
| EFS      | přežití bez události (event-free survival)   |
| ELN      | evropská síť předních odborníků v diagnostice a léčbě leukemií (European LeukemiaNet)                    |
| ELTS     | skórovací systém (EUTOS Long Term Survival)  |
| emPCR    | emulzní polymerázová řetězová reakce   |
| EMR      | časná molekulární odpověď (Early Molecular Response)   |
| EPD      | The Eukaryotic Promoter Database   |
| eQTL     | lokusy exprese kvantitativního znaku (Expression quantitative trait loci)                                |
| EURO-SKI | klinická studie na vysazení tyrozinkinázových inhibitorů (European Stop Tyrosine Kinase Inhibitor Study) |
| FEPT     | Fisherův exaktní test pravděpodobnosti   |
| FISH     | fluorescenční in situ hybridizace  |
| GIST     | gastrointestinální stromální tumor   |
| HT       | halving time   |
| IM       | imatinib   |
| INF-a    | interferon alfa  |

|       |  |
|-------|--|
| IS    | mezinárodní stupnice (international scale)                               |
| KD    | kostní dřev  |
| LD    | vazebná nerovnováha (Linkage disequilibrium)                             |
| MAF   | frekvence minoritních alel (minor allele frequency)                      |
| MDR   | mnohonásobná léková rezistence (multiple drug resistance)                |
| MMR   | velká molekulární odpověď (major molecular response)                     |
| MMT   | Mood's median test   |
| MRD   | měřitelná zbytková choroba (measurable residual disease)                 |
| MRFS  | přežití bez molekulárního relapsu (molecular-relapse-free survival)      |
| NA    | nedostupná data  |
| NCBI  | The National Center for Biotechnology Information                        |
| NGS   | sekvenování nové generace (next-generation sequencing)                   |
| NILO  | nilotinib  |
| NÚ    | nežádoucí účinky   |
| OR    | odds ratio   |
| PALG  | Polish Adult Leukemia Group  |
| Ph    | chromozom – filadelfský chromozom  |
| PK    | periferní krev   |
| PWM   | Position-Weight Matrix   |
| RNA   | Ribonukleová kyselina  |
| SLC   | rodina membránových transportérů (solute carrier)                        |
| SNP   | jednobodový polymorfismus (single nucleotide polymorphism)               |
| STAMP | místo vazby asciminibu (specifically targeting the ABL myristoyl pocket) |
| TF    | transkripční faktor  |
| TFR   | remise bez léčby (treatment-free remission)                              |
| TKI   | tyrozinkinázové inhibitory   |
| TSS   | místo zahájení transkripce (transcription start site)                    |
| USCF  | MT – Pharmacogenetics of Membrane Transporters Database                  |
| UTR   | nepřekládaná oblast DNA (untranslated region)                            |
| WHO   | světová zdravotnická organizace (World Health Organization)              |



# Abstrakt

Chronická myeloidní leukemie (CML) je díky cílené léčbě tyrozinkinázovými inhibitory (TKI) dobře léčitelným onemocněním, které u většiny pacientů není důvodem zkrácení délky života. Pacienti jsou ale zatíženi celoživotní nutností užívání léčby, která je v různé míře toxická. I to mohl být důvod pro zařazení nového cíle léčby do nejnovějších doporučení Evropské leukemické sítě (ELN) pro CML, udržení molekulární remise bez léčby (TFR). Aby pacientům mohla být léčba vysazena, je mimo jiné nutné, aby dosáhli dlouhodobé stabilní hluboké molekulární odpovědi (DMR). Přibližně 10-20 % pacientů je k léčbě TKI rezistentních a DMR nedosáhne. Jedním z důvodů rezistence na stále nejužívanější TKI imatinib (IM) je jeho nedostatečná biologická dostupnost v cílových buňkách, která je způsobena změnou exprese a aktivity membránových přenašečů z rodiny ATP Binding Cassette (ABC) a Solute Carrier (SLC).

Cílem práce bylo nalezení vhodného prognostického markeru dosažení optimální odpovědi na léčbu IM, který by byl dostupný v době diagnózy a pomohl k časnému vytipování pacientů vhodných ke změně terapie na TKI 2. generace a zlepšení jejich šance na dosažení DMR.

Pomocí NGS jsme skrinovali SNP promotorových oblastí 19 genů z rodin ABC a SLC a pomocí Fisherova testu pravděpodobnosti jsme identifikovali SNP související s odpovědí na léčbu. Ty byly analyzovány u 129 pacientů v souvislosti s kumulativním dosažením velké molekulární odpovědi (MMR) a pravděpodobnosti přežití bez události. Následně byly výsledky zkoumány na nezávislé kohortě 269 pacientů zařazených do studií ukončujících léčbu TKI a byla u nich analyzována pravděpodobnost TFR.

Byl identifikován SNP rs460089, který je spjat s odpovědí pacientů s CML léčených IM v první linii. Pacienti s genotypem rs460089-GC měli vyšší pravděpodobnost dosažení MMR ve 12. měsíci od zahájení léčby než pacienti s genotypem rs460089-GG ( $P = 0,0001$ ). Pacienti s genotypem rs460089-GC měli také vyšší pravděpodobnost přežití bez události než pacienti s genotypem rs460089-GG ( $P = 0,00022$ ). Dále jsme prokázali, že genotyp rs460089 ovlivňuje TFR u pacientů zařazených do studií vysazujících TKI. V kohortě celkem 176 pacientů zařazených do studie EURO-SKI jsme prokázali vyšší 6 měsíční pravděpodobnost přežití bez molekulárního relapsu u pacientů s genotypem rs460089-GC (73 %, 95 % CI: 60-82 %) ve srovnání s pacienty s rs460089-GG (51 %, 95 % CI: 41-61 %). Tento výsledek jsme potvrdili analýzou 93 pacientů z polské vysazující studie.

Domníváme se, že skrínink genotypu rs460089 umožní identifikovat pacienty, kteří s vysokou pravděpodobností nedosáhnou optimální odpovědi na léčbu IM a mohli by tak pomoci při rozhodování o včasné změně terapie, případně o vhodnosti vysazení léčby při dosažení DMR.

Klíčová slova: chronická myeloidní leukemie, imatinib, rezistence, SLC transportéry, SNP, TFR

# Abstract

Chronic myeloid leukemia (CML) is a well-treatable disease thanks to targeted therapy with tyrosine kinase inhibitors (TKIs), which in most patients does not result in a shortened lifespan. However, patients are burdened with the lifelong necessity of taking treatment, which is variably toxic. This could be a reason for the inclusion of a new treatment goal in the latest European LeukemiaNet (ELN) recommendations for CML: maintaining treatment-free remission (TFR). To discontinue the treatment, patients must achieve a long-term stable deep molecular response (DMR). Approximately 10-20% of patients are resistant to TKI treatment and do not achieve DMR. One reason for resistance to the most commonly used TKI, imatinib (IM), is its insufficient bioavailability in target cells, caused by changes in the expression and activity of membrane transporters from the ATP Binding Cassette (ABC) and Solute Carrier (SLC) families.

The aim of this study was to find a suitable prognostic marker for achieving an optimal response to IM treatment, which would be available at the time of diagnosis and help in the early identification of patients suitable for a switch to second-generation TKIs, thereby improving their chances of achieving DMR.

Using NGS, we screened SNPs in the promoter regions of 19 genes from the ABC and SLC families and identified SNPs associated with treatment response using Fisher's exact test. These were analyzed in 129 patients in relation to the cumulative achievement of major molecular response (MMR) and event-free survival (EFS). Subsequently, the results were examined in an independent cohort of 269 patients enrolled in TKI discontinuation studies, and their probability of TFR was analyzed.

We identified the SNP rs460089 associated with the response of CML patients treated with IM in the first line. Patients with the rs460089-GC genotype had a higher probability of achieving MMR at 12th month from the start of treatment than patients with the rs460089-GG genotype ( $P = 0.0001$ ). Patients with the rs460089-GC genotype also had a higher probability of EFS than patients with the rs460089-GG genotype ( $P = 0.00022$ ). Additionally, we demonstrated that the rs460089 genotype affects TFR in patients enrolled in TKI discontinuation studies. In a cohort of 176 patients from the EURO-SKI study, we showed a higher 6-month probability of survival without molecular relapse in patients with the rs460089-GC genotype (73%, 95% CI: 60-82%) compared to patients with the rs460089-GG genotype (51%, 95% CI: 41-61%). This result was confirmed by analyzing 93 patients from the Polish discontinuation study.

We believe that the screening for the rs460089 genotype will allow identification of patients at high risk of IM treatment failure and could help in deciding on early change of therapy or the suitability of treatment discontinuation upon achieving DMR.

Keywords: chronic myeloid leukemia, imatinib, resistance, SLC transporters, SNP, TFR

# 1. Teoretický úvod

## 1.1 Chronická myeloidní leukemie (CML)

### 1.1.1 Historie

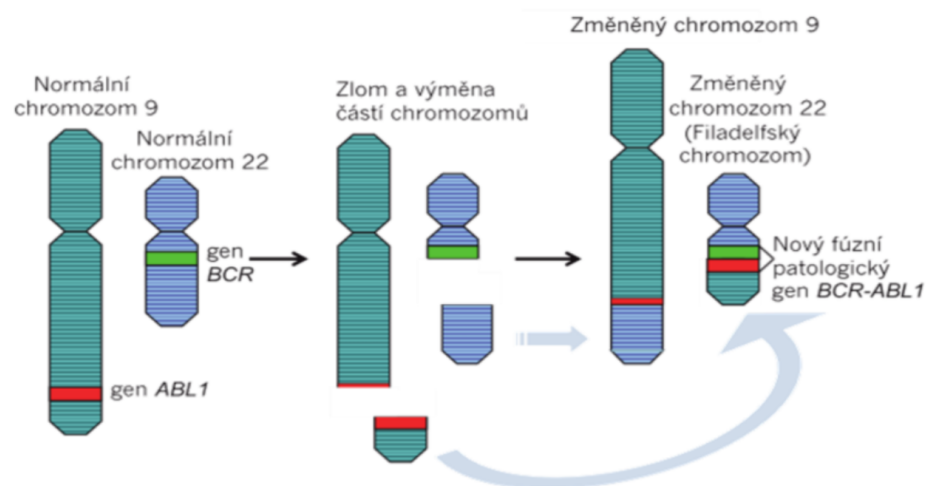
Chronická myeloidní leukemie (CML) je klonální nádorové onemocnění vznikající neoplastickou transformací pluripotentní krvetvorné kmenové buňky. Toto onemocnění bylo poprvé popsáno již v 50. letech 19. století, jako takzvaná bílá krev (leuk = bílá, emia = krev), protože pacienti z důvodu velkého množství bílých krvinek v krevním obraze, měli skutečně krev mléčné barvy. O pravé historii CML můžeme mluvit až od roku 1960, kdy byl pány Nowelem a Hungerfordem popsán filadelfský chromozom (zkrácený 22. chromozom, Ph chromozom), jakožto příčina tohoto onemocnění. Filadelfský chromozom dostal své jméno podle města, kde byl objeven. CML se stala první nádorovou chorobou, u které byla prokázána získaná chromozomální změna (Nowell P.C. et Hungerford D.A., 1960).

### 1.1.2 Filadelfský chromozom, fúzní gen *BCR::ABL1* a onkoprotein *BCR::ABL1*

Filadelfský chromozom byl poprvé objeven v roce 1960, ale až v roce 1973 byl Rowley popsán jeho vznik reciprokou translokací mezi dlouhými raménky chromozomů 9 a 22; t(9;22)(q34;q11) (Rowley J.D., 1973). Při translokaci fúzuje větší část genu *ABL1* (Abelson murine leukaemia) ze zlomeného 9. chromozomu na zlomený 22. chromozom v místě genu *BCR* (breakpoint cluster region) obrázek 1. Ke zlomům při vzniku fúzního genu dochází hned v několika oblastech, ale vždy v intronech. V genu *ABL1* je to po obou stranách, nebo mezi exony Ia a Ib, zatímco v genu *BCR* dochází ke zlomům na třech místech nazývaných M-*BCR* (major), m-*BCR* (minor) a  $\mu$ -*BCR* (micro). Zlom v oblasti M-*BCR* vzniká v intronu 14 před exonem 15 nebo v intronu 13 před exonem 14 a spolu se zlomem v genu *ABL1* tak dává vznik nejčastějším typům přestavby, jejichž transkript e13a2 (dříve označovaný také b2a2) a e14a2 (b3a2) je předlohou pro vznik proteinu o délce 210 kDa (p210<sup>BCR::ABL1</sup>), který se vyskytuje u 99 % případů všech CML (Kurzrock R. et al., 1988). Zlomy v oblastech minor (transkript označený jako e1a2) a mikro (transkript e19a2) jsou předlohou pro proteiny o délce 190 potažmo 230 kDa. Protein p190<sup>BCR::ABL1</sup> se vyskytuje ve zbývajícím 1 % CML, ale vyskytuje se také přibližně u 25-30 % pacientů s akutní lymfoblastickou leukémií (ALL), kde ovšem reguluje jiné signální dráhy (Reckel S. et al., 2017), čímž

je dána i jiná charakteristika onemocnění. S proteinem p230<sup>BCR::ABL1</sup> se u CML setkáváme jen velice zřídka (Melo J.V., 1996). I další objevené zlomy dávající vznik fúznímu genu *BCR::ABL1* se u pacientů s CML vyskytují raritně, jedná se o transkripty označované jako e1a3 (m-*BCR*), e14a3 a e13a3 (M-*BCR*), e19a3 ( $\mu$ -*BCR*). Dále pak bylo zjištěno, že v genu *BCR* dochází ještě ke zlomu v oblasti variant (v-*BCR*), e6a2, který dává vznik proteinu o délce 195 kDa, v intronu 8, e8a2, protein o délce 200 kDa a intronu 18, e18a2 o délce proteinu 225 kDa (Dekking E. et al., 2010). Schématické znázornění zlomů a odpovídajících transkriptů fúzního genu je zobrazeno na obrázku 2. Všechny výše zmíněné fúzní proteiny se vyznačují tyrozinkinázovou aktivitou proteinu c-ABL1. Na rozdíl od něj má však fúzní protein tyrozinkinázu autofosforylovanou, což má za následek nízkou kontrolu regulace. Vzhledem k tomu, že se BCR::ABL1 nachází volně v cytoplazmě (na rozdíl od c-ABL1, který je lokalizován v jádře), má neomezený přístup k substrátům, které díky své vysoké aktivitě může fosforylovat a aktivovat a tím pak dochází ke zrychlené proliferaci, zábraně apoptózy buněk (Cortes J.E. et al., 1995), ale není zcela porušena jejich diferenciací, což dává typický obraz CML v kostní dřeni, zmnožení všech diferenciacních stupňů bílých krvinek. Nalezení hlavní příčiny onemocnění, tedy deregulovanou funkci tyrozinkinázy BCR::ABL1 byla důležitým bodem pro cílenou terapii tohoto onemocnění.

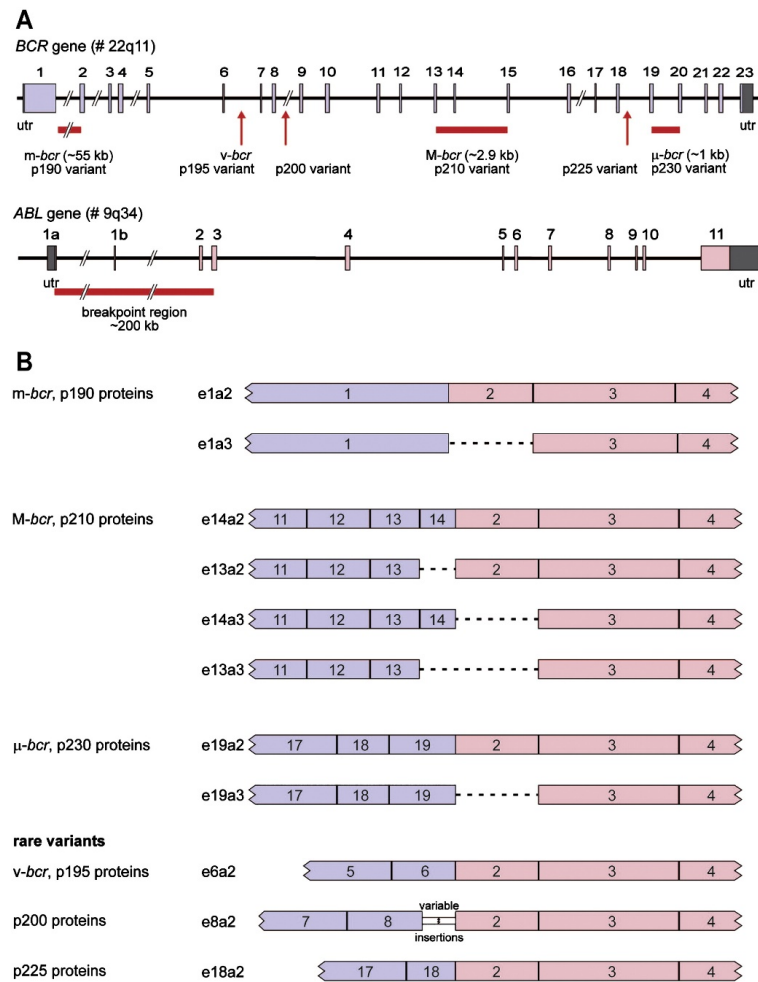
Obrázek 1: Vznik filadelfského chromozomu a fúzního genu *BCR::ABL1* (Hehlmann R. et al., 2007)(upraveno).



### 1.1.3 Epidemiologie

CML představuje asi 15 % všech leukemií. Její incidence stoupá s věkem. V dětství zastává asi 3-5 % leukemií, v dospělosti 20-25 %. Celková incidence je 1-1,5

Obrázek 2: Znázornění struktury genů *BCR* a *ABL1* s vyznačenými oblastmi zlomu (A) a odpovídajícími transkripty fúzního genu *BCR::ABL1* (B) (Dekking E. et al., 2010).



nových onemocnění na 100 000 obyvatel za rok s mírnou převahou u mužů (1,4:1). Počet nových pacientů přibývá s věkem. Medián věku při stanovení diagnózy je 65 let. Nebyla prokázána žádná geografická, rasová ani rodová predispozice. Jediným prokázaným etiologickým faktorem je expozice ionizujícímu záření s latencí mezi expozicí a vznikem choroby 4-11 let. Bylo prokázáno vyšší riziko vzniku CML u přeživších výbuch atomové bomby a únik radioaktivního záření po havárii jaderné elektrárny. Dále dlouhodobá léčba malými dávkami ionizujícího záření vedla s latencí 6 let k několikanásobnému zvýšení výskytu choroby, než je běžné v populaci (Corso A. et al., 1995). U naprosté většiny CML je její etiologie neznámá.

#### 1.1.4 Klinický obraz a fáze onemocnění

Klinický obraz onemocnění je poměrně rozmanitý a záleží v jaké jeho fázi se pacient v daném okamžiku nachází. Donedávna byly rozlišovány 3 fáze onemocnění, chronická fáze, akcelerovaná fáze a blastická fáze, které v sebe plynule přechází,

ale jejich obraz se diametrálně odlišuje. Dle posledních WHO doporučení z roku 2022 je však na základě nových poznatků opuštěno od zařazování pacientů do akcelerované fáze a na CML je nahlíženo již pouze jako na dvoufázové onemocnění (Khoury J.D. et al., 2022). Nejčastěji je CML diagnostikována v chronické fázi, kdy má nemocný spíše jen mírné nespecifické potíže, jako je zvýšená únava. Až 30 % onemocnění je diagnostikováno náhodně např. při preventivní prohlídce či při předoperačním vyšetření. Typickým nálezem je leukocytóza v krevním obraze. Neléčená chronická fáze trvá průměrně 3-4 roky. Postupem času se choroba stává agresivnější, prohlubují se příznaky jako je únava, nevykonnost, objevují se subfebrilie, dochází k úbytku tělesné hmotnosti, vyskytují se bolesti svalů a kloubů a z důvodu zvětšující se sleziny se objevují bolesti pod levým obloukem žeberním. V krevním obraze zaznamenáváme posun doleva – vyplavování nezralých krevních buněk z kostní dřeni (KD). Přibližně 5-10 % pacientů je diagnostikováno v blastické fázi. Ta je nyní definována výskytem alespoň 20 % myeloidních blastů v periferní krvi (PK) nebo KD, nebo průkazem extramedulárního postižení, případně nálezem zvýšeného počtu lymfoblastů v PK nebo KD. Číselná hranice pro počet lymfoblastů zatím nebyla stanovena. Blastická fáze se klinicky projevuje často jako akutní leukemie, stav se komplikuje krvácivými příznaky, infekcemi, anemií, výraznou splenomegalií, která může být doprovázena i hepatomegalií. Objevují se i vaskulární komplikace jako je leukostáza či priapismus. Podle toho, jaký typ blastů nacházíme, mluvíme o blastické fázi myeloblastické (60 %), lymfoblastické (30 %) nebo pokud se vyskytují oba typy blastů současně, pak hovoříme o blastické fázi myelolymfoblastické (10 %). Kritéria pro stanovení fáze onemocnění shrnuje tabulka 1.

### 1.1.5 Diagnostika

Na CML pomyslíme nejčastěji při prohlídce patologického krevního obrazu, ve kterém je dominantní zvýšený počet bílých krvinek v širokém rozmezí  $20-500 \times 10^9/l$ . Může být přítomna trombocytóza, někdy i velmi významná, vzácněji pak trombocytopenie. Rovněž v červených krvinkách můžeme nacházet odchylku ve smyslu erytrocytózy či naopak většinou mírné až středně těžké anémie. V diferenciálním rozpočtu leukocytů nacházíme posun doleva s vyplavením všech vývojových stádií granulocytů. Typicky bývá přítomna eozinofilie a bazofilie. Nutným vyšetřením k diagnóze CML je vyšetření aspirátu KD, ten odhalí zvýšenou buněčnost se zvýšením podílu bílé složky na úkor erytroidní linie (G:E 10:1 až 25:1). Dominují granulocyty různého stupně zralosti, je přítomna eozinofilie a bazofilie. Ovšem pro potvrzení diagnózy je zásadní nález Ph chromozomu cytogenetickým vyšetřením KD a určení transkriptu *BCR::ABL1* pomocí kvalitativní polyme-



Tabulka 1: Kritéria pro stanovení fáze CML (upraveno podle (Hochhaus A. et al., 2020), (Khoury J.D. et al., 2022))

| Fáze onemocnění          | Definice   |
|--------------------------|--|
| <b>Chronická fáze</b>    |  |
| ELN kritéria (2020)      | 15 % blastů v PK/KD<br>$\leq 20$ % basofilů v PK<br>trombocyty $< 100 \times 10^9/l$   |
| WHO kritéria (2022)      | nesplňuje podmínky pro blastickou fázi   |
| <b>Akcelerovaná fáze</b> |  |
| ELN kritéria (2020)      | 15-29 % blastů v PK/KD, nebo $> 30$ % blastů a promyelocytů v PK/KD, blasty $< 30$ %<br>$\geq 20$ % basofilů v PK<br>trombocytopenie $< 100 \times 10^9/l$ |
| WHO kritéria (2022)      | není definována  |
| <b>Blastická fáze</b>    |  |
| ELN kritéria (2020)      | $\geq 30$ % blastů v PK/KD<br>extramedulární krvetvorba mimo slezinu   |
| WHO kritéria (2022)      | $\geq 20$ % myeloblastů v PK/KD<br>extramedulární krvetvorba<br>zvýšený nález lymfoblastů v PK/KD  |

rázové řetězcové reakce s využitím reverzní transkriptázy (reverse transcriptase polymerase chain reaction; RT-PCR), který se dále využívá ke sledování odpovědi na léčbu jako znak MRD (measurable residual disease). Asi u 5 % pacientů s pozitivním transkriptem *BCR::ABL1* nelze Ph chromozom standardní cytogenetickou metodou detekovat, v tom případě je nutno prokázat gen *BCR::ABL1* pomocí fluorescenční in situ hybridizace (FISH) buněk KD nebo PK.

### 1.1.6 Odhad prognózy CML

Jako u většiny onemocnění tak i u CML se snažíme odhadnout její prognózu. A to zejména k tomu, abychom zvolili tu nejlepší možnou léčbu, případně tuto léčbu upravili. K přesnějšímu odhadu nám slouží prognostické faktory, které získáme během diagnózy. Ukázalo se však, že v době tyrozinkinázových inhibitorů (TKI) jsou velmi důležité i prognostické faktory spjaté s odpovědí na léčbu v definovaných časových úsecích, na jejichž základě můžeme změnit terapii pacienta a

zlepšit jeho celkovou prognózu. Jednotlivé prognostické faktory v době diagnózy (věk pacienta, velikost sleziny, množství blastů, a jiné) jsou sdružovány do tří typů skórovacích systému, jejichž výpočet stratifikuje pacienty do nízké, střední a vysoce rizikové skupiny. Jedná se o Hasfordův index, Sokalův index a EUTOS skóre. Vzhledem k tomu, že díky moderní léčbě většina pacientů umírá z jiné příčiny, než je CML, byl vyvinut 4. skórovací systém ELTS (EUTOS Long Term Survival), který předpovídá pravděpodobnost úmrtí na CML (LRD - leukemia-related death) (Pfirrmann M. et al., 2016). Hlavním rozdílem oproti oblíbenému Sokalovu skóre je věk, který je v případě ELTS skóre negativním prognostickým faktorem. Jednotlivé parametry a výpočet skóre je uveden v tabulce 1.2. Ke snadnému zařazení pacientů do jednotlivých rizikových skupin existuje řada automatizovaných programů volně přístupných na internetu (tabulka 2).

V nedávné době byly identifikovány další rizikové faktory, ale jejich účinek zatím nebyl dostatečně prokázán, s výjimkou přídatných cytogenetických změn (ACA; additional chromosomal abnormalities). Vysoce rizikové ACA předpovídají horší odpověď na léčbu a vyšší riziko progresu onemocnění (Fabarius A. et al., 2015; Wang W. et al., 2016; Hehlmann R. et al., 2020) a dle doporučení ELN je řadíme mezi rizikové faktory pro léčbu CML. Rizikové ACA jsou uvedeny v tabulce 3 a jejich objevení během léčby, hodnotíme jako její selhání (Hochhaus A. et al., 2020).

Tabulka 2: Parametry pro výpočet prognostického skóre

| Parametry pro výpočet prognostických skóre |   |
|--|---|
| Parametr                                   | věk   |
|  | velikost sleziny (cm pod žeberní oblouk)  |
|  | počet trombocytů ( $10^9/l$ )   |
|  | počet blastů v PK (%)   |
|  | počet eosinofilů v PK (%)   |
|  | počet bazofilů v PK (%)   |
| Odkaz na stránky s asistovaným výpočtem    |   |
| Sokal+Hasfordovo skóre                     | <a href="https://bloodref.com/myeloid/cml/sokal-hasford">https://bloodref.com/myeloid/cml/sokal-hasford</a>                         |
| EUTOS skóre                                | <a href="https://leukemia-net.org/content/leukemias/cml/eutos_score">https://leukemia-net.org/content/leukemias/cml/eutos_score</a> |
| ELTS skóre                                 | <a href="https://leukemia-net.org/content/leukemias/cml/elts_score">https://leukemia-net.org/content/leukemias/cml/elts_score</a>   |

Tabulka 3: Prognosticky nepříznivé chromosomální abnormality (ACA)

Prognosticky nepříznivé přídavné chromosomální abnormality (ACA)

+8  
+Ph  
i(17q)  
+19  
+21  
-7/7q-  
3q26.2  
11q23  
komplexní změny karyotypu

### 1.1.7 Léčba CML

Léčba onemocnění prošla několika významnými fázemi, a to jednak z důvodu zvýšení znalostí o samotném onemocnění, vývinu nových léčiv a léčebných metod, ale v neposlední řadě i vzhledem ke změně cílů samotné léčby. Nejnovějším cílem léčby se podle nových doporučení ELN stává normální délka přežití pacienta s dobrou kvalitou života bez nutnosti doživotní léčby (Hochhaus A. et al., 2020).

Jako prvním lékem užívaným k léčbě CML je popisován přípravek obsahující arzen, kterým se podařilo u pacienta snížit počet leukocytů, a to již v roce 1885. Jako další metodou do léčby CML byla na začátku 20. století zavedena radioterapie. Pacienti po ozáření sleziny doznali úlevy od potíží spojených s obrovskou slezinou, ale vliv na prodloužení života neměla. Proto bylo ozařování sleziny nahrazeno cytostatikem busulfanem, který přinesl jak úlevu od potíží, tak i prodloužení života na 35-47 měsíců od původních průměrných 32 měsíců. Další lék, který vystřídal busulfan na poli léčby CML byla hydroxyurea, která se v některých indikacích (zejména cytoredukce) v kombinaci s dalšími léky používá dodnes. Zavedení hydroxyurey prodloužilo přežívání pacientů na 48-69 měsíců. Začátek nové éry v léčbě CML přinesla zpráva o úspěšné transplantaci kostní dřeně, která se datuje do roku 1975. Rázem se změnil i pohled na cíl léčby, který již nebyl pouze paliativní, ale s možností transplantace kostní dřeně se stal kurativním. I přes rizika spojená s touto metodou se stala transplantace krvetvorných buněk až do zavedení TKI standartním postupem v léčbě mladších pacientů s nalezeným vhodným dárcem. V letech 1980-2000 se CML stala dokonce nejčastější indikací pro tuto léčebnou metodu vůbec. V 70. a 80. letech 20. století se také zkoušela léčba pomocí vysokých dávek cytostatik, ale ve srovnání s hydroxyureou nepřinesla prodloužení délky života, ale jen zvýšenou toxicitu, proto se léčba neujala. Dalším milníkem v léčbě CML se stalo zavedení do léčebných standardů Interfe-

ronu alfa (INF-a) v 80. letech 20. století. Jedná se o protein, který je lidskému tělu vlastní a slouží k obraně proti virovým nákazám. Pro účely medicíny se vyrábí pomocí bakterií, rekombinantní technologií. Přesná podstata účinku INF-a není u CML jasná, jedná se pravděpodobně o imunomodulační efekt založený na snížení exprese cytokinů a zvýšení exprese adhezivních molekul a histokompatibilních komplexů I. a II. třídy, což způsobuje obnovu adhezivních vlastností buněk. Také se podílí na regulaci apoptózy, buněčného cyklu, diferenciaci a proliferaci buněk. Ve srovnání s ostatními léky dosud užívanými dokázal INF-a snížit počet Ph pozitivních buněk detekovaných cytogeneticky až k nulovým hodnotám a dosáhnout tak prodloužení života na 66-89 měsíců (Kantarjian H.M. et al., 2003). INF-a se spolu s konvenčním cytostatikem cytosinarabiosidem stal zlatým standardem léčby CML u pacientů, u kterých nemohla být provedena transplantace kostní dřeně (Guilhot F. et al., 1997). Ovšem největším průlomem v léčbě CML se stal rok 2001 se zavedením do klinické praxe nového léku imatinib mesylátu (IM). Což byl první, na podstatu onemocnění cílící lék užitý v léčbě nádorového onemocnění. Stal se, a do dnešní doby je, zlatým standardem v první linii léčby CML. Jedná se o specifický kompetitivní inhibitor tyrozinových kináz ABL a tedy i onkoproteinu BCR::ABL1, dále pak inhibuje receptor pro c-KIT, PDGFRalfa a PDGFRbeta. Poté následoval vývoj TKI druhé generace. Jedná se o dasatinib (DASA) – duální inhibitor, který kromě inhibice BCR::ABL1 inhibuje i SRC kinázy, které se také podílejí na patogenezi CML, nilotinib (NILO) – strukturální derivát imatinibu a bosutinib, taktéž duální inhibitor BCR::ABL1 a SRC kináz. TKI druhé generace byly vyvinuty zejména k překonání rezistence na IM způsobené rozvojem mutací v kinázové doméně *BCR::ABL1* (Gorre M.E. et al., 2001). Prokázalo se, že mají vyšší účinek než IM a pacienti jimi léčení dosahují rychleji požadované odpovědi a mají menší pravděpodobnost přechodu do blastické fáze (Shah J.O. et al., 2016; Giles F.J. et al., 2013; Cortes J.E. et al., 2016; Hochhaus A. et al., 2016; Cortes J.E. et al., 2018). Na základě těchto dat, byly schváleny vedle IM jako léky první linie v léčbě CML. Na druhou stranu, tyto skvělé výsledky, jsou vykoupeny častějším výskytem specifických nežádoucích účinků. Vzhledem k tomu, že TKI druhé generace nemají v porovnání s IM statisticky signifikantně lepší pravděpodobnost přežití nemocných, lepší tolerance IM ze strany pacientů a v neposlední řadě i cena jednotlivých preparátů, rozhoduje o tom, že IM zůstává nejvíce užívaným lékem první linie u pacientů v chronické fázi CML s nízkým rizikem. Mezi TKI 3. generace řadíme lék ponatinib, který byl vyvinut k překonání multirezistentní mutace T315I a je zatím jediným schváleným přípravkem, který je schopen potlačit patologický klon buněk nesoucí právě tuto mutaci (O'Hare T. et al., 2009; Lipton J.H. et al., 2016). Nejnověji schváleným lékem chronické fáze CML a to ve 3. linii léčby se stal asciminib, první zástupce tzv. Specifically

Targeting the ABL Myristoyl Pocket (STAMP) inhibitorů. Jedná se o selektivní inhibitor ABL1 potažmo BCR::ABL1 kinázy a to tak, že se váže do myristoylové kapsy ABL1, čímž způsobí změnu její konformace a ve výsledku i její inaktivaci. Vzhledem k tomu, že se váže do jiného místa, než jsou místa typická pro vznik dosud známých mutací způsobujících rezistenci na TKI je asciminib nadějí i pro pacienti s multirezistentními mutacemi typu T315I (Hochhaus A. et al., 2023). Tabulka 4 shrnuje všechny u nás dostupné TKI a jejich užití.

Tabulka 4: Přehled dávkování, nežádoucích účinků a citlivost na některé typy mutací dostupných TKI.

| Název TKI | Definice  |
|-----------|---|
| Imatinib  | <p>Dávkování 1. linie: 400 mg/1xD<br/>AF, BF: 600-800 mg/1xD</p> <p>Důležité NÚ Hematologická toxicita<br/>Retence tekutin - periferní<br/>Dyspepsie<br/>Svalové křeče<br/>Elevace jaterních testů<br/>Exantém</p>  |
| Dasatinib | <p>Dávkování 1., 2. linie: 100 mg/1xD<br/>AF, BF: 140 mg/1xD</p> <p>Důležité NÚ Hematologická toxicita<br/>Retence tekutin - pleurální<br/>Plicní hypertenze<br/>Kardiotoxicita<br/>Reaktivace CMV infekce</p> <p>Citlivost na vybrané mutace v ABL kinázové doméně Y253H<br/>E255K/V<br/>F359V/C/I</p> |
| Nilotinib | <p>Dávkování 1 linie: 300 mg/2xD<br/>2. linie, AF: 400 mg/2xD</p> <p>Důležité NÚ Hematologická toxicita<br/>Exantém<br/>Toxická pankreatitida<br/>Elevace jaterních testů<br/>Hyperglykémie<br/>Hyperlipidémie</p>  |

|  |   |
|--|---|
|  | Kardiotoxicita  |
| Citlivost na vybrané mutace v ABL<br>kinázové doméně | F317L/V/I/C<br>T315A<br>V299/L  |
| <b>Bosutinib</b>                                     |   |
| Dávkování  | 1. linie: 400 mg/1xD<br>2. linie, AF, BF: 500 mg/1xD  |
| Důležité NÚ  | Hematologická toxicita<br>Dyspepsie<br>Elevace jaterních testů<br>Toxická pankreatitida<br>Exantém<br>Nefrotoxicita         |
| Citlivost na vybrané mutace v ABL<br>kinázové doméně | E255K/V<br>F317L/V/I/C<br>F359V/C/I<br>T315A<br>Y253H   |
| <b>Ponatinib</b>                                     |   |
| Dávkování  | 2. linie, AF, BF: 45 mg/1xD   |
| Důležité NÚ  | Hematologická toxicita<br>Dyspepsie<br>Toxická pankreatitida<br>Elevace jaterních testů<br>Kardiotoxicita<br>Žilní trombózy |
| Citlivost na vybrané mutace v ABL<br>kinázové doméně | T315I   |

### 1.1.8 Vývoj hodnocení léčby

Jak jsem se již zmiňovala výše, cíle léčby CML se s časem měnily. Dnešním cílem léčby CML pro vyspělé země se stala nezkrácená délka přežití pacienta vlivem CML s dobrou kvalitou života a nejnověji, bez nutnosti doživotní léčby, tzv. TRF (treatment-free remission) (Hochhaus A. et al., 2020). Abychom tohoto cíle dosáhli, je mimo jiné nutné standardizované hodnocení léčebné odpovědi v přesně daných časových intervalech. S rozvojem nových laboratorních technik si v hodnocení odpovědi již nevystačíme pouze s hodnotami krevního obrazu a aspirátu kostní dřeně pod mikroskopem, kterým jsme mohli hodnotit hematologickou odpověď, ani s vyšetřením cytogenetickým, kde hodnotíme vymizení Ph+ buněk v metafázi buněčného cyklu aspirátu kostní dřeně, ale nejčastěji využíváme měření a

monitorování hladiny transkriptu *BCR::ABL1* reverzně transkriptázovou kvantitativní real time PCR (RT-qPCR). Na základě hladiny transkriptu *BCR::ABL1* je pak možné hodnotit hloubku dosažené molekulární odpovědi. Abychom výsledky stanovení transkriptu a hloubku molekulární odpovědi mohli srovnávat, byla vytvořena standardizovaná metoda, která výsledky z jednotlivých laboratoří převádí podle jim přiřazeného korekčního koeficientu na celková procenta vyjadřovaná v mezinárodním měřítku IS (International Scale) (Cross N.C.P. et al., 2015). Procento transkriptu *BCR::ABL1* je počítáno jako poměr počtu kopií transkriptu *BCR::ABL1* k počtu kopií transkriptu kontrolního genu ve stejném vzorku (nejčastěji *ABL1* nebo *GUSB*). Hodnoty *BCR::ABL1* pak dle logaritmické stupnice převádíme na samotnou hloubku odpovědi: MMR (velká molekulární odpověď) nebo MR 3,0 značí hodnotu 0,1 % IS transkriptu *BCR::ABL1*, MR 4,0 značí 0,01 % IS, MR 4,5 pak 0,0032 % IS a MR 5 značí 0,001 % IS. Hlubokou molekulární odpovědí (DMR) souhrnně označujeme dosažení MR 4,0 a hlubší. V případě, že pacient na léčbu nereaguje optimálně, je nutné terapii časně změnit, a naopak při dosažení DMR, nám probíhající studie umožňují za striktně definovaných podmínek léčbu ukončit a dosáhnout nového cíle léčby CML, což je TFR. Tabulka 5 shrnuje hodnocení odpovědí na léčbu TKI.

Tabulka 5: Kritéria pro posouzení účinnosti TKI dle ELN z roku 2020 (Hochhaus A. et al., 2020).

| Doba hodnocení    | Definice   |
|-------------------|--|
| V době diagnózy   |  |
| Optimální odpověď | nelze použít   |
| Varování          | Vysoké riziko dle ELTS, vysoce rizikové ACA/Ph+                            |
| Selhání léčby     | nelze použít   |
| 3 měsíce          |  |
| Optimální odpověď | hl. transkriptu <i>BCR::ABL1</i> $\leq 10$ % IS                            |
| Varování          | hl. transkriptu <i>BCR::ABL1</i> $> 10$ % IS                               |
| Selhání léčby     | hl. transkriptu <i>BCR::ABL1</i> $> 10$ % IS, nutno potvrdit za 1-3 měsíce |
| 6 měsíců          |  |
| Optimální odpověď | hl. transkriptu <i>BCR::ABL1</i> $\leq 1$ % IS                             |
| Varování          | hl. transkriptu <i>BCR::ABL1</i> $> 1 - 10$ % IS                           |
| Selhání léčby     | hl. transkriptu <i>BCR::ABL1</i> $> 10$ % IS                               |
| 12 měsíců         |  |
| Optimální odpověď | hl. transkriptu <i>BCR::ABL1</i> $\leq 0,1$ % IS                           |
| Varování          | hl. transkriptu <i>BCR::ABL1</i> $> 0,1 - 1$ % IS                          |
| Selhání léčby     | hl. transkriptu <i>BCR::ABL1</i> $> 1$ % IS                                |

### 1.1.9 Remise bez léčby (TFR)

První studie, která se zaměřila na vysazení TKI, přesněji IM, byla studie STIM 1 (Stop Imatinib 1). Tato studie ukázala, že 38 % pacientů po vysazení IM udrželo MMR po dobu 77 měsíců (Etienne G. et al., 2017). Pacienti do ní zařazení museli splňovat základní podmínku, a to držet MR 4,5 alespoň 2 roky před vysazením IM. Rozsáhlá metaanalýza asi 15 studií na více než 500 pacientech, u nichž byl vysazen IM, potvrdila, že 51 % pacientů si udrží MMR (Campiotti L. et al., 2017). Podobné vysazovací studie byly provedeny i v případě TKI 2. generace NILO a DASA. Výsledkem byla podobná čísla jako v případě IM (Rea D. et al., 2017). Zatím nejrozsáhlejší studie, do které bylo zařazeno 755 pacientů známá jako EURO-SKI (European Stop Tyrosine Kinase Inhibitor Study), kam byli zařazováni pacienti, léčeni TKI 1. generace IM i druhé generace DASA a NILO, měla opět podobné výsledky, tedy přibližně 50 % pacientů udrží TFR, a to nezávisle na vysazeném TKI. Důležitým vstupním kritériem, kromě minimální délky léčby TKI před jeho vysazením 3 roky, trváním DMR před vysazením TKI alespoň 1 rok, bylo i pečlivé a standardizované měření transkriptu *BCR::ABL1*. Dalším výsledkem této studie bylo, že 80 % z pacientů, kteří ztratí MMR, ji ztratí do 6-8 měsíců od ukončení léčby TKI a naopak ztráta MMR po 1. roce od vysazení léčby je vzácná. Velice důležitým zjištěním stran bezpečnosti vysazení TKI bylo, že u 95-98 % pacientů se selháním TFR, došlo po znovuzahájení TKI i k znovudosažení MMR (Saussele S. et al., 2018). Na základě výsledků z výše jmenovaných studií, vydala ELN ve svých nových doporučení z roku 2020 jasně definovaná doporučení k vysazování léčby TKI (Hochhaus A. et al., 2020). Mechanismy, které preventují ztrátu TFR dosud nejsou známy, a vzhledem k tomu, že dosažení TFR se stalo novým cílem léčby CML, je nutné se v dalším výzkumu na faktory predikující udržení TFR zaměřit.

### 1.1.10 Rezistence k tyrozinkinázovým inhibitorům (TKI)

Jak již bylo řečeno, léčba CML pomocí TKI zcela změnila prognózu pacientů, přesto přibližně 10-20 % pacientů je k léčbě TKI rezistentní (Jabbour E. et al., 2016). Rezistenci k TKI můžeme rozdělit na primární a získanou. U primární rezistence je pacient k léčbě refrakterní již od jejího zahájení a není schopen dosáhnout požadované úrovně odpovědi v daném časovém období (tabulka 5). Je přítomna asi u 25 % pacientů. Za možné příčiny se považuje nedostatečná inhibice *BCR::ABL1* kinázy (např. nedostatečná hladina TKI) a nedostatečný počet normálních hematopoetických buněk určených k obnově zdravé krvetvorby v KD pacienta. Pokud pacient zprvu na léčbu odpovídá (dosáhne alespoň v časných fázích optimální odpovědi), ale později dojde k její ztrátě, ho-



voříme o získané rezistenci. Z hlediska mechanismů rezistence ji můžeme rozdělit na 1) *BCR::ABL1* závislé, přibližně 50-60 % a 2) na *BCR::ABL1* nezávislé, ty zaujímají asi 40-50 %. (Baccarani M. et al., 2013; Hochhaus A. et al., 2016). K příčinám na *BCR::ABL1* závislých rezistencí patří vznik mutací v kinázové doméně, amplifikace genu *BCR::ABL1*, případně jeho overexprese (Gorre M.E. et al., 2001). Rozvoj mutací v *BCR::ABL1* kinázové doméně představuje intenzivně studovaný mechanismus vzniku získané rezistence na TKI. Bylo popsáno více než 100 mutací, které mění přibližně 50 aminokyselin v různých částech proteinového řetězce a mění tak jeho sférickou strukturu (Balabanov S. et al., 2014). Na tomto jevu je pak založena klinická závažnost dané mutace a předurčuje citlivost k jednotlivým TKI (Soverini S. et al., 2013). Mezi mechanismy rezistence na *BCR::ABL1* nezávislé patří neochota pacienta spolupracovat (non-compliance). Užívání léku pacientem je zcela klíčovým momentem a přes veškeré poučování pacienta se ochota pravidelného užívání léku pohybuje kolem 70 % (Eliasson L. et al., 2011; Geissler J. et al., 2017). K dalšímu důležitému faktoru nezávislému na *BCR::ABL1* patří klonální evoluce, kdy dochází k porušení mechanismu opravy DNA a vzniku nestabilního genomu. Nejčastěji se s ním setkáváme v pokročilé fázi CML. Jedná se o chromozomální abnormality (trizomie chromozomu 8, izochromozom 17), vznik bodových mutací či epigenetických změn v dalších genech (mutace *DNMT3A*, zvýšená methylace p15) (Kim T. et al., 2017). Jiným důležitým mechanismem je aktivace alternativních signálních drah (např. PI3K/AKT, JAK/STAT a RAS/MAPK) (Vakana E. et al., 2013), případně změny v metabolismu a drahách leukemických kmenových buněk (např. metabolický posun, Hypoxia/HIF-1 $\alpha$  a Alox5/p-catenin). Mezi hojně studované mechanismy patří také změny exprese mikroRNA (např. miR-203 a miR-150) (Bueno M.J. et al., 2008; Srutova K. et al., 2018) a změny v mikroprostředí kostní dřeně. Mezi na *BCR::ABL1* nezávislé mechanismy, které způsobují přežití CML buněk a umožňují jejich adaptaci na léčbu je nedostatečná koncentrace TKI uvnitř buňky. Ta může být, mimo jiné, způsobena změnou exprese a aktivity jednotlivých lékových přenašečů, kam patří influxní přenašeče z rodiny SLC a efluxní přenašeče z rodiny ABC (Assouline S. et al., 2011; White D.L. et al., 2006).

### 1.1.11 Mechanismy transportu léčiv

Účinek léčiva, ať mluvíme o účinku toxickém nebo terapeutickém je závislý na jeho koncentraci v cílovém místě. K tomu, aby se léčivo do cílového místa dostalo, musí překonat řadu bariér, jedná se zejména o biologické membrány. Základní strukturu buněčných, ale i organelových membrán tvoří fosfolipidová dvojvrstva, do které jsou zakotveny transportní proteiny. Vzhledem k vlastnostem fosfolipidů

se membrána spontánně formuje do hydrofilní (polární) vrstvy, která je orientována ven a hydrofobní (nepolární) vrstvy, která je uvnitř. To způsobuje hlavní vlastnost membrány tedy semipermeabilitu. K tomu, aby léčivo přes membránu proniklo, je využíváno několik mechanismů transportu, který je často dán chemickou podstatou léčiva. Mechanismy transportu můžeme rozdělit na pasivní difuzi, transport zprostředkovaný transmembránovými přenašeči, vezikulární transport a filtraci.

Pasivní difuze je hlavním mechanismem, kterým překonávají léčiva biologické membrány, je dána Fickovým zákonem a je závislá na schopnosti léčiva difundovat, na jeho koncentraci na obou stranách membrány a také na velikosti plochy, přes kterou léčivo difunduje. Pasivní difuze je nespecifická a podle vlastností jednotlivých léčiv je také rozdílně účinná. Obecně lze říci, že pasivní difuzí jsou dobře přenášena lipofilní léčiva na rozdíl od hydrofilních (je to dáno složením biologických membrán). Dalším faktorem, který upravuje pasivní difuzi je elektrický náboj léčiva, kdy ionizovaná forma je hydrofilní a má tedy tendenci k horšímu přestupu, na rozdíl od neionizované formy, která je lipofilní. Jakou formu bude daná sloučenina mít záleží na pH prostředí, ve kterém se nachází. Toho se využívá například změnou pH moči k lepší eliminaci některých léčiv ledvinami.

Transport zprostředkovaný přenašeči může být pasivní, poté mluvíme o facilitované difuzi, nebo aktivní. Facilitovaná difuze je také, jako pasivní difuze závislá na rozdílu koncentrací, ale je zprostředkována membránovými proteiny, nevyžaduje energii a umožňuje přestup hydrofilnějších látek. Aktivní transport také, podobně jako facilitovaná difuze umožňuje přestup přes membrány hydrofilnějším látkám, ale za cenu energie, která nejčastěji vzniká hydrolýzou ATP. Díky tomu však může docházet k transportu i proti koncentračnímu gradientu. Základními vlastnostmi transmembránových transportérů je jejich selektivita k různým typům léčiv, která však může být různá, jejich saturabilita, která může být ovlivněna mírou jejich exprese, a dále možnost je inhibovat. Hlavními dvěma skupinami, které se podílejí na přenosu léčiv, včetně imatinibu jsou ABC a SLC transportéry.

Vezikulární transport je u člověka velmi vzácný. Jedná se zejména o endocytózu, kdy se přenášená látka naváže na membránu, která se následně vchlípí do buňky. Tohoto mechanismu se využívá zejména u monoklonálních protilátek (Thurber G.M. et al., 2008).

Posledním mechanismem přenosu léčiv přes membrány je filtrace, kdy k přestupu dochází póry a je tedy přísně limitována velikostí léčiva. Hlavním místem kde se filtrace uplatňuje, jsou glomeruly v ledvinách.

## 1.2 ABC a SLC transportéry

### 1.2.1 Obecná charakteristika

Jednou z obrovských genových rodin transportních proteinů zajišťujících řízený transport velké skupiny substrátů přes plazmatickou membránu nebo membrány subplazmatických organel proti chemickému gradientu jsou ABC transportéry, které potřebnou energii k přenosu substrátu získávají hydrolýzou ATP. ABC transportéry jsou rozšířeny ve všech formách života. U prokaryotických organismů zastávají funkci jak importní, tak exportní. U většiny eukaryotických organismů, včetně člověka pak mají funkci exportní až na 4 výjimky, sítnicový importér ABCA4, chloridový kanál CFTR (kódovaný genem *ABCC7*) a receptory sulfonylurey SUR1 (kódovaný genem *ABCC8*) a SUR2 (kódovaný genem *ABCC9*) (Thomas C. et Tampé R., 2018). ABC transportéry přenášejí řadu endogenních substrátů, od malých anorganických a organických molekul, jako jsou aminokyseliny, cukry, nukleosidy a vitamíny až po větší organické sloučeniny, včetně peptidů, lipidů, oligonukleotidů a polysacharidů, tak i mnoho exogenních substrátů včetně léčiv (Chen Z. et al., 2016).

Základní struktura lidských ABC transportérů je celkem konzervativní. Transportéry sestávají z celkem 4 domén, ze dvou cytoplazmatických domén vázajících nukleotidy (NBDs – nukleotide-binding domains), které jsou odpovědné za vazbu a hydrolýzu ATP, a dvou transmembránových domén (TMDs – trans-membrane domains), které se podílejí na rozpoznávání substrátu a jeho přenosu přes lipidovou membránu. Některé ABC geny kódují tak zvané polotransportéry z anglického half-transporters, to znamená, že mají pouze jednu NBD a jednu TMD doménu. Polotransportéry pak pracují buď jako homodiméry nebo ve formě heterodiméru, který vytváří s jiným polotransportérem (Thomas C. et Tampé R., 2020).

V lidském genomu je dosud známo 48 genů kódujících ABC transportní proteiny a ty jsou na základě jejich struktury, která je evolučně konzervována, rozděleny do 7 podrodin (A-G) (Dean M. et Annilo T., 2005). To, že jsou ABC transportéry pro funkci organismu vysoce důležité, dokládají zárodečné mutace v minimálně 12 ABC genech, spojené se ztrátou funkce transportéru, která prokazatelně souvisí s vážným dědičným onemocněním. Jedná se například o cystickou fibrózu (*ABCC7*, CFTR), pseudoxanthoma elasticum (*ABCC6*), Stargardtovu chorobu (*ABCA4*), Tangierovu chorobu (*ABCA1*) nebo Harlequin ichthyosis (*ABCA12*) (Tarling E.J. et al., 2013).

Bylo prokázáno, že se ABC transportéry podílejí na transmembránovém pohybu většiny léků a jejich metabolitů, včetně velkého počtu protinádorových léčiv. De-

fekty v těchto genech pak mohou být důležité z hlediska lékových rezistencí, farmakokinetiky a jiných farmakogenetických poruch (Lage H., 2008). V současné době je známo již 20 ABC transportérů, které mají schopnost transportovat přes membrány protirakovinná léčiva. Jedná se o transportéry spadající do 4 genových podrodin - *ABCA*, *ABCB*, *ABCC* a *ABCG* (Thomas C. et Tampé R., 2018)

Druhou velice rozsáhlou skupinou membránových transportérů, které mají rozhodující význam pro buněčný uptake, ale také eflux velkého množství endogenních i exogenních substrátů, jsou SLC transportéry. Většina SLC transportérů, se nachází na buněčné membráně, ale stejně jako ABC transportéry jsou i SLC transportéry distribuovány také na subcelulárních membránách organel uvnitř buňky. SLC transportéry zprostředkovávají pohyb molekul přes cytoplazmatické i intracelulární membrány buď ve směru koncentračního gradientu, a to uniportem či usnadněnou difuzí, nebo za využití koncentračního gradientu jiné látky, symportem nebo antiportem. Ke své činnosti tedy nepotřebují energii získanou z ATP jako předchozí skupina ABC transportérů.

V současné době je známo přes 450 členů superrodiny SLC transportérů, které se odlišují svojí sekvencí, strukturou a funkcí (Pizzagalli M.D. et al., 2020). Jednotliví členové jsou právě na základě své struktury, zejména počtu alfa helixů, procházejících přes membránu, tzv. transmembrane helices a hlavně sekvenční homologie rozděleny do menších skupin (rodin), kterých rozeznáváme celkem 65 (označovaných *SLC1-SLC64*, *SLCO*). Členové jedné rodiny musí mít shodnou identitu sekvencí alespoň ve 20-25 % (Povey S. et al., 2001; Hediger M.A. et al., 2013). Navzdory svému společnému evolučnímu původu mohou členové jedné rodiny vázat substráty s různými fyzikálně-chemickými vlastnostmi. V poslední době se objevují i novější modely klasifikace založené na shlukování a fylogenetické analýze nebo na kombinaci funkční a fylogenetické analýzy (Perland E. et Fredriksson R., 2017).

SLC proteiny transportují, jak už bylo zmíněno výše, širokou škálu molekul, a vzhledem k tomu, že většinu léčiv bychom mohli strukturou zařadit do těchto skupin, jsou tyto transportéry nezbytné pro transport řady léčiv přes plazmatické membrány. Je popsáno již více než 20 rodin s potvrzenou funkcí transportu léčiv (César-Razquin A. et al., 2018) z nichž nejvíce druhů léčiv přenášejí transportéry z podrodin SLC15, SLC22, SLC28, SLC 29, SLC47 a SLCO. To, jaké substráty se na daný transportér budou vázat ovlivňují tvar a fyzikálně-chemické vlastnosti vazebného místa. SLC transportéry hrají důležitou roli při zajištění mnoha buněčných funkcí a podobně jako předchozí skupina transportérů mohou stát za rezistencí buněk k chemoterapii a to tím, že mohou regulovat absorpci,

distribuci, metabolismus a eliminaci daného léku. Pro řadu léčiv je typické, že interagují hned s několika typy SLC transportérů. Typy SLC transportérů a jejich možné substráty je možné vyhledat v dostupných databázích, jako je např. Bioparadigms (<https://slc.bioparadigms.org/>).

### 1.2.2 ABC a SLC transportéry a jejich role v transportu imatinibu u pacientů s CML

Obrovským problémem v léčbě nádorů je rezistence na protinádorová léčiva. Zejména pak mnohonásobná léková rezistence (MDR), která způsobuje odolnost rakovinných buněk vůči širokému spektru strukturálně a mechanicky nepříbuzných léčiv, snižuje odpověď na chemoterapii a vede k jejímu selhání. Nadměrná exprese ABC transportérů je jedním z přispívajících faktorů vedoucím k MDR, způsobené nadměrným efluxem léčiva z cílové buňky a jeho nízkou intracelulární koncentrací (El-Awady R. et al., 2017). Naopak snížená exprese převážně influxních SLC transportérů v nádorových buňkách může v konečném důsledku také způsobit nízkou koncentraci léčiva uvnitř buňky a umožnit buňce rozvinout lékovou rezistenci (Neul C. et al., 2016).

Bylo prokázáno, že některé transportéry léčiv z rodin ABC a SLC, mají důležitou roli v intracelulárních hladinách IM a dalších TKI a mohou být zodpovědné za rezistenci pacientů na IM.

Nejvíce studovanými efluxními transportéry jsou ABCB1 a ABCG2. Jejich důležitost v aktivním transportu byla *in vitro* již několikrát prokázána. Důležitou práci, která potvrdila vliv transportérů ABCB1 (P-gp; MDR1 (multidrug resistance protein 1)) ale také influxního SLC22A1 (OCT1 (organic cation transporter 1)), na intracelulární koncentraci IM, byla práce Bouchet et al. Experiment byl *in vitro* proveden na buněčných liniích K562 a liniích K562dox, které nadměrně exprimují ABCB1. Část buněk obou linií byla vystavena účinku IM a část buněk byla také vystavena účinku specifických inhibitorů transportérů, PSC 833 (inhibitor ABCB1) a prazosinu (inhibitor SLC22A1). *In vitro* měření ukázala vyšší intracelulární koncentrace IM v buněčné linii K562 než v K562dox, tedy buněčné linie s overexprimovaným efluxním transportérem ABCB1. Ovšem při inkubaci buněk v PSC 833 byly intracelulární koncentrace IM v obou buněčných liniích totožné, což ukazuje na vliv ABCB1 na transport IM. Měření intracelulární koncentrace IM v buněčných liniích K562 vystavených inkubaci s prazosinem, inhibitorem influxního přenašeče SLC22A1, ukázalo přibližně o 50 % nižší intracelulární koncentraci IM než u buněk bez inkubace v prazosinu. Byla tedy potvrzena účast transportéru SLC22A1 na influxu IM do nitra buňky. Další částí práce pak bylo srovnání intra-

celulární koncentrace IM u pacientů, kteří dosáhli MMR ve 12. měsíci od zahájení terapie IM a pacientů, kteří ji nedosáhli. Výsledkem byly významně vyšší průměrné intracelulární i plazmatické koncentrace u pacientů s dosažením MMR než u pacientů bez dosažení MMR, což naznačuje, že intracelulární koncentrace IM je důležitým faktorem dosažení MMR (Bouchet S. et al., 2013). Další práce, která potvrdila, že vysoká exprese *ABCB1* je spojena s nižší mírou dosažení MMR je práce Eadie et al. V této práci se autoři zaměřili hlavně na klinický význam včasné identifikace zvýšení exprese mRNA *ABCB1* po zahájení léčby IM, která by mohla předpovídat rezistenci na léčbu. U pacientů s vysokonásobným vzestupem exprese mRNA byla skutečně významně nižší pravděpodobnost dosažení časné molekulární odpovědi (Eadie L.N. et al., 2016). Jiná skupina autorů se pak věnovala expresi efluxového transportéru *ABCB1* a influxového transportéru *SLC22A1*. Výsledkem bylo, že pacienti s nízkou hladinou mRNA *ABCB1* a vysokou mRNA *SLC22A1* byli spojeni s optimální molekulární odpovědí, zatímco inverzní hladiny mRNA studovaných transportérů byly spojeny s pacienty, kteří nereagovali optimálně (da Cunha Vasconcelos F. et al., 2016). Na základě klinické korelace mezi expresí mRNA a odpovědí na léčbu IM se začala zkoumat role polymorfismů, které by na expresi, případně aktivitu proteinu mohly mít vliv.

Gurney et al. zkoumali souvislost mezi třemi nejběžnějšími variantami *ABCB1*, 1236T>C, 2677G>T/A a 3435C>T, a clearance IM u 8 pacientů s CML a 14 pacientů s gastrointestinálním stromálním tumorem (GIST). Uvedli, že míra snížení clearance IM byla významně nižší u pacientů s genotypem TT ve všech třech lokusech (Gurney H. et al., 2007). Následně Dulucq et al. hodnotili klinický dopad variant *ABCB1* na odpověď na IM v kohortě 90 pacientů s CML ve Francii. V této studii pacienti s genotypem 1236TT nebo 2677TT/TA dosáhli významně vyšší míry MMR (Dulucq S. et al., 2008). Nicméně v další studii Deenik et al. u 46 pacientů s CML v Nizozemsku zjistili, že genotypy 1236CT/TT, 3435TT a 2677TT byly ve skutečnosti spojeny se sníženým výskytem MMR (Deenik W. et al., 2010) a to v souladu s původní zprávou naznačující nižší snížení clearance IM u pacientů s genotypy TT (Gurney H. et al., 2007). V reakci na to Dulucq et al. rozšířili svou analýzu na větší kohortu celkem 557 pacientů a uvedli, že alela 2677G byla skutečně spojena s vyšší mírou dosažení MMR (Dulucq S. et al., 2010). Různé závěry učiněné v těchto studiích byly pravděpodobně ovlivněny velikostí kohort pacientů.

To, že je IM substrátem dalšího efluxního transportéru ABCG2, známého též jako BCRP (breast cancer resistance protein), který je často zvýšeně exprimován v lidských nádorových buňkách a je tedy asociován se vznikem rezistence k léčbě

onkologických onemocnění, bylo potvrzeno prací Burger et al. Pomocí panelu dobře definovaných buněčných linií s různou mírou exprese *ABCG2* a specifického inhibitoru tohoto transportéru, fumitremorginu C prokázali, že linie s overexpresovaným *ABCG2* mají nižší intracelulární koncentrace IM, která se po přidání fumitremorginu C opět obnovuje (Burger H. et al., 2004). Vzhledem k tomu, že *ABCG2* je vysoce exprimován i v gastrointestinálním traktu, může hrát roli nejen v buněčné rezistenci nádorových buněk, ale také ovlivňovat gastrointestinální absorpci IM. K podobným výsledkům došla i skupina kolem Nakanishiho et al., kteří zkoumali rezistenci na IM u buněčných linií K562 a upravených linií K562, které nadměrně exprimovaly *ABCG2* (K562/BCRP-MX10). Výsledkem bylo, že buňky K562/BCRP-MX10 vykazovaly 2-3 násobné zvýšení rezistence oproti neupraveným K562. Rezistence na IM byla zcela odstraněna fumitremorginem C (Nakanishi T. et al., 2006). Na rozdíl od řady *in vitro* studií, které podporují roli *ABCG2* v rezistenci na terapii IM je jen málo klinických studií, které by hodnotily roli exprese a polymorfismů *ABCG2* u pacientů s CML. Jednou z nich je práce de Lima et al., kteří zkoumali expresi mRNA a SNP ve vytipovaných transportérech souvisejících s rezistencí na IM u celkem 118 pacientů s CML. Měření ukázala, že exprese mRNA *ABCG2* u pacientů, kteří neodpověděli na léčbu IM, byla vyšší, a to jak před zahájením léčby IM, tak i při léčbě IM, navíc *ABCG2* byl nadměrně exprimován u pacientů, kteří nedosáhli MMR. Z toho vyplývá, že zvýšená exprese *ABCG2* by mohla mít vliv na rezistenci vůči IM (de Lima L.T. et al., 2015). Další studie s celkem 215 pacienty s CML prováděná v Malajsii hodnotila dva SNP genu *ABCG2* 34G>A a 421C>A. Výsledkem studie bylo, že diplotyp 34A\_421A genu *ABCG2* významně koreluje s lepší odpovědí na IM. Kromě toho byla genotypová varianta 421C>A v *ABCG2* spojena s častějším dosažením MMR (Au A. et al., 2014). Tomuto tématu se také věnovala metaanalýza zahrnující celkem 2577 zejména asijských pacientů, která ukazuje signifikantní korelaci mezi minimální koncentrací IM a dosažením odpovědi na IM. Dále bylo zjištěno, že pravděpodobnost úspěchu léčby se zvyšuje s přítomností polymorfismu 421C>A genu *ABCG2* (Jiang Z.P. et al., 2016), podobně jako ve studii Au et al. (Au A. et al., 2014).

Druhým neméně důležitým článkem k dostatečné intracelulární koncentraci léčiva jsou influxní transportéry, zejména z rodiny SLC. Nejvíce studovaným transportérem IM je bezesporu transportér SLC22A1 (OCT1). Thomas et al. byli první, kteří navrhli, že SLC22A1 zprostředkovává transport IM do nitra buněk. Využili k tomu experimenty na buněčných liniích s řadou známých inhibitorů SLC22A1, po jejichž použití došlo k významnému poklesu intracelulární koncentrace IM, ta se ovšem nesnížila při použití specifických inhibitorů SLC22A2 (OCT2) a SLC22A3 (OCT3) což preferuje SLC22A1 jako hlavní přenašeč IM. Kromě toho bylo zjiš-

těno, že SLC22A1 je exprimován jak v *BCR::ABL1* pozitivních buněčných liniích (KYO1, LAMA84 a KCL22), tak v primárních buňkách pacientů s CML (Thomas J. et al., 2004). Další, kdo přinesl důkaz o roli SLC22A1 jako transportéru IM byli Wang et al., kteří pro svou práci vykultivovali buněčnou linii KCL22 s overexpresí SLC22A1 a prokázali, že intracelulární koncentrace IM byla vyšší právě u linie s overexprimovaným SLC22A1 (Wang L. et al., 2007). Na základě zjištění, že SLC22A1 je důležitým transportérem IM, zkoumali Crossman et al., zda exprese mRNA *SLC22A1* koreluje s citlivostí na IM, což prokázali zvýšenou mRNA *SLC22A1* u pacientů, kteří reagují na léčbu IM, ve srovnání s pacienty, kteří na léčbu nereagují (Crossman L.C. et al., 2005). Významnou korelaci mezi zvýšenou expresí mRNA *SLC22A1* a odpovědí na léčbu IM u pacientů s CML prokázali i další autoři (Gromicho M. et al., 2012; Marin D. et al., 2010), některé z těchto studií však byly zpochybněny prací Giannoudis et al., kterým se nepodařilo potvrdit vliv exprese *SLC22A1* na odpověď pacientů s CML na IM a upozornili na to, že primery navrhnuté jinými autory k měření exprese *SLC22A1* mohou zahrnovat běžné genetické varianty, které mohou vést k neanalyzovatelné směsi mRNA a způsobit tak experimentální artefakt (Giannoudis A. et al., 2013). To se nakonec potvrdilo u práce Wang et al., kteří po změně primerové sekvence, která již nezahrnovala známou genetickou abnormalitu M420del, již nepotvrdili původní korelaci s vyšší hladinou exprese mRNA *SLC22A1* u pacientů s dobrou odpovědí na léčbu IM (Wang L. et al., 2007). Zajímavostí však je, že Kim et al. sice nenalezli korelaci mezi expresí mRNA *SLC22A1* u pacientů s CML a jejich odpovědí na léčbu IM, ale pozorovali významně sníženou expresi mRNA *SLC22A1* u pacientů v době prokázané rezistence na IM ve srovnání s dobou před zahájením terapie IM, což naznačuje možnou roli exprese *SLC22A1* u rozvoje rezistence k IM (Kim Y.K. et al., 2014). Další diskutovanou otázkou bylo, zda je *SLC22A1* exprimován a má vliv na vychytávání IM v nezralých CD34+ leukemických buňkách. Nies et al. dospěli k závěru, že protein SLC22A1 nebyl exprimován v primárních CD34+ CML buňkách, a to na základě dvou pozorování: jednak změření velmi nízké exprese *SLC22A1* mRNA a za druhé úplnému nedostatku SLC22A1 v plazmatické membráně. Tento závěr byl však založen pouze na analýze 4 vzorků CD34+ buněk pacientů s CML (Nies A.T. et al., 2014). Davies et al. také nedetekovali expresi mRNA *SLC22A1* v buňkách CD34+, a to ani v CD34+ buňkách od pacientů s CML, ale ani od zdravých dárců (Davies A. et al., 2009). Ovšem Engler et al. pozorovali, že CD34+ buňky od pacientů s CML mají sníženou expresi mRNA *SLC22A1* i vychytávání IM, než pozorovali v kompartmentu CD34-, tedy více diferencovaných buněk (Engler J.R. et al., 2010). Tato snížená exprese byla také pozorována u zdravých dárců, ale nepromítla se do snížení funkční aktivity SLC22A1, což ukazuje, že exprese mRNA *SLC22A1*



nemusí nutně předpovídat samotnou funkci transportéru v buňkách CD34+. Důležité je, že protein SLC22A1 je vysoce posttranskripčně regulován (Ciarimboli G. et Schlatter E., 2004), není tedy zcela neočekávané, že exprese nemusí přímo souviset s funkcí samotného proteinu. Navíc víme, že nediferencované CD34+ leukemické buňky nejsou zrovna IM příliš cílené (Corbin A.S. et al., 2011), což trochu zpochybňuje relevantnost a důležitost SLC22A1 jako transportéru v tomto kompartmentu buněk.

Naopak jsou již dobře známé důsledky genetických polymorfismů na funkci a aktivitu přenašečů léčiv, jako je SLC22A1. Bylo popsáno více funkčně relevantních nesynonymních genetických variant *SLC22A1* (Giannoudis A. et al., 2013; Kerb R. et al., 2002), které in vitro vedly k dramatickým účinkům na transport typických substrátů SLC22A1. Na základě toho se předpokládalo, že genetické varianty budou mít vliv i na funkci SLC22A1, tedy na transport jeho substrátů, včetně změněné farmakokinetiky IM, což by mohlo mít důsledek i pro pacienty s CML léčených právě IM. Nejzajímavěji se jevily varianty C480G, A1222G a M420del, ovšem závěry ohledně jejich prediktivní vypovídací hodnoty se u různých autorů liší (Di Paolo A. et al., 2014; Vine J. et al., 2014; Koren-Michowitz M. et al., 2013; de Lima L.T. et al., 2015). Tyto rozporuplné výsledky mohou vyplývat z řady faktorů, včetně velkého rozdílu ve velikosti kohort pacientů a jejich různým etnickým složením u různých autorů, či v různosti studovaných variant.

Mezi další transportéry, které se zkoumaly ve smyslu ovlivnění transportu a následně i efektu IM, patří influxní transportéry *SLCO1B3*, *SLCO1A2*, *SLC22A4* a efluxní transportéry *ABCA3* a *ABCG2*. Hlavní motivací proč začít zkoumat další lékové přenašeče, než ty zmíněné výše, byla nejednoznačnost výsledků, zda se jedná o hlavní transportéry IM. Jedna studie například uvedla, že IM selhal ve vazbě na SLC22A1, jeho exprese korelovala s expresí jiných přenašečů, čímž potenciálně působil jako zástupný biomarker pro tyto proteiny. A naopak je zmíněna důležitost jiného transportéru a to *SLCO1A2* (*OATP1A2*) (Hu S. et al., 2008). Cílem čínské studie bylo zkoumat vztah mezi minimální koncentrací IM a vytipovanými polymorfismy v genech *SLC22A4*, *SLC22A5*, *SLCO1A2*, *SLCO1B3* a *ABCG2* a dosažením MMR u celkem 171 pacientů s CML. Z výsledků studie vyplývá, že pacienti nesoucí alelu A v *SLCO1A2* 361G>A dosahují častěji MMR než pacienti nesoucí alelu G (Wang Q. et al., 2020). Podobný cíl měla i práce brazilské skupiny, ti zkoumali vztah mezi polymorfismy v genech *SLCO1B3*, *SLCO1A2* a *ABCA3* s odpovědí na IM u 118 pacientů s CML. Z výsledků vyplývá, že studované polymorfismy v genech *SLCO1A2* (včetně 361G>A) a *ABCA3* se neliší v četnosti u pacientů s dobrou odpovědí na IM od pacientů bez odpovědi, naopak genotypy mají podobné frekvence mezi pacienty s odpovědí a bez ní. Ovšem

genotypy *SLCO1B3* 699GG a 334TT byly častější ve skupině pacientů s odpovědí (63,8 %) než ve skupině pacientů bez odpovědi na IM (44,7 %,  $P = 0,042$ ) (de Lima L.T. et al., 2014). Vliv polymorfismu 334TT genu *SLCO1B3* na odpověď pacientů s CML na IM potvrzuje i práce iránské skupiny Mohammadi et al. Ti ve své práci na celkem 132 pacientů s CML ukázali, že pacienti, kteří nesou kombinaci polymorfismů *SLC22A1* 480CC a 1222AG a *SLCO1B3* 334TT/TG měli vyšší frekvenci dosažení kompletní cytogenetické odpovědi (Mohammadi F. et al., 2021). Naopak v práci egyptských výzkumníků je dominantní alela 334TT genu *SLCO1B3* spojena s nepříznivou odpovědí na rozdíl od genotypu 334GG/TG. Práce byla provedena celkem na 102 pacientech s CML (Omran M.M. et al., 2020). Dalším studovaným transportérem IM byl *SLC22A4*. Italská skupina kolem Angeliny et al. popisuje ve své práci na celkem 189 pacientech v chronické fázi CML signifikantní asociaci alely C v polymorfismu rs1050152 s častějším dosažení MMR (Angelini S. et al., 2013). V jiné práci se tatáž skupina zaměřila na pacienty s pokročilými GIST léčenými IM a potvrdili, že alela C v SNP rs1050152 v genu *SLC22A4* spolu s alelami G ve dvou SNP genu *SLC22A5* (rs2631367 a rs2631372) významně prodloužila dobu do progresu onemocnění (Angelini S. et al., 2013).

I když se zdá, že existuje mnoho důkazů, že exprese transportních přenašečů, případně jejich polymorfismy, mohou být příčinou rezistence pacientů k IM, nejednotné výsledky jednotlivých výzkumných skupin zatím brání zavedení postupů monitorování exprese či skrínink polymorfismů jako prediktivních markerů odpovědi na léčbu IM do běžné klinické praxe. Na rozporuplnosti dat se jistě můžou podílet malé kohorty pacientů, různost jejich etnické příslušnosti, ale i variabilní metodiky prací či samotné cíle výzkumu, např. dosažení cytogenetické vs. molekulární odpovědi. Závěrem je nutné říci, že se domníváme, že tento směr výzkumu není slepou uličkou a je nutné se mu dále věnovat.

## 2. Výchozí hypotéza a cíl práce

Chronická myeloidní leukémie se stala díky znalosti její patofyziologické podstaty velmi dobře léčitelným onemocněním, a to díky vysoce účinné terapii tyrozinkinázovými inhibitory, cílícími právě na patofyziologickou podstatu onemocnění. Doposud nejvíce užívaným lékem v první linii léčby CML je TKI 1. generace IM. Přibližně u 10-20 % pacientů však léčba IM selhává. Úspěšnost léčby IM je mimo jiné ovlivňována farmakokinetickými faktory, zejména jeho koncentrací v cílových, tedy leukemických buňkách. IM je závislý na transportu zprostředkovaným membránovými přenašeči. Na jeho koncentraci uvnitř buňky má vliv míra exprese a aktivita těchto membránových přenašečů. Dosavadní práce se zabývaly vlivem jednobodových polymorfismů v kódujících oblastech genů z rodin ABC a SLC lékových přenašečů s nejednoznačnými výsledky. Expze transportérů může být daleko významněji ovlivněna polymorfismy v jejich promotorových oblastech, hlavních místech regulace exprese. To může v případě přenašečů IM hrát zásadní roli v jeho distribuci a následně i v odpovědi na léčbu. Promotorové oblasti ABC a SLC genů jsou známé svou vysokou variabilitou. Bylo publikováno více jak 500 polymorfismů v promotorech genů celkem 107 transportérů z rodin ABC a SLC u zdravých lidí různých etnických skupin (Hesselton S.E. et al., 2009). Cílem naší práce bylo studovat polymorfismy v promotorech vybraných ABC a SLC genů u pacientů s CML, které dosud studovány nebyly. Domníváme se, že tyto polymorfismy, které se přirozeně vyskytují u pacientů s CML, mohou ovlivňovat dostupnost léku v cílových buňkách a sehrát významný podíl na rozvoji rezistence u jednotlivých pacientů.

Cílem práce bylo u vytipovaných přenašečů z rodin ABC a SLC, které jsou anotovanými přenašeči množství léčiv, nalézt polymorfismy v jejich proximálních promotorech – známých variabilních místech hrající důležitou roli v regulaci exprese genů, které by mohly predikovat odpověď pacientů s CML na léčbu IM.

Konkrétní cíle, jejichž naplnění je obsahem této disertační práce:

1. Sestavení panelu promotorových oblastí vybraných genů, jež mohou mít souvislost s transportem IM ve všech kompartmentech a identifikovat polymorfismy, které se vyskytují ve studované kohortě pacientů.
2. Hodnocení korelace mezi jednotlivými nalezenými polymorfismy s odpovědí pacientů v chronické fázi CML na léčbu IM ve 12 měsíci léčby.
3. Hodnocení vlivu nalezených polymorfismů na expresi konkrétních přenašečů.

4. Ověření nalezených polymorfismů jako prediktivních markerů dosažení optimální odpovědi pacientů s CML na IM a zároveň i jako prediktivních markerů udržení molekulární odpovědi po vysazení léčby IM.

# 3. Materiál a metody

## 3.1 Soubor pacientů

Pro naše analýzy jsme retrospektivně sestavili soubor 83 pacientů s CML, kteří byli diagnostikováni a léčeni na ÚHKT (Ústav hematologie a krevní transfuze) v době mezi roky 2004 a 2013. Podmínkami pro zařazení pacienta do souboru, které byla velmi přísné ze snahy vyvarovat se zkreslení výsledků při prvotních analýzách, byly: 1) diagnóza v chronické fázi CML, 2) dostupnost vzorku požadovaného materiálu před zahájením léčby IM, 3) léčba první linie IM dávkou 400 mg za den, 4) dobrá spolupráce pacienta, 5) minimální doba sledování odpovědi pacienta na léčbu 48 měsíců. Na základě sledování odpovědi na léčbu ve 12. měsíci byli pacienti rozděleni na 2 skupiny dle doporučení ELN z roku 2013 (Baccarani M. et al., 2013). Na skupinu Responders ( $BCR::ABL1 \leq 0,1 \% IS$ ;  $n = 40$ ; optimal) a skupinu Non-responders ( $BCR::ABL1 > 0,1 \% IS$  a/nebo  $Ph+ > 0 \%$ ;  $n = 43$ ; warning a failure). Do studie nebyli zařazeni pacienti s výskytem mutací v kinázové doméně  $BCR::ABL1$ , jako jednou z nejčastějších příčin rezistence na IM (Gambacorti-Passerini C.B. et al., 2003).

V průběhu práce se nám i díky spolupráci s Fakultní nemocnicí Hradec Králové, podařilo rozšířit kohortu pacientů s CML o dalších 46 pacientů, kteří splňovali stejná kritéria jako první skupina. Jen doba sledování odpovědi byla alespoň 12 měsíců.

Třetí soubor pacientů, který byl použit i jako validační kohorta, bylo 301 pacientů z center z Německa, České republiky, Švédska, Finska, Norska a Řecka zařazených do studie EURO-SKI, kteří byli před zařazením do studie léčeni IM v první linii. EURO-SKI byla otevřená multicentrická, nekontrolovaná studie, která vznikla na předpokladu přetrvávání molekulární remise u pacientů s CML i po vysazení léčby TKI. Jejím hlavním cílem bylo posouzení doby trvání alespoň MMR po ukončení terapie TKI. Mezi sekundární cíle pak patřilo identifikace klinických a biologických faktorů ovlivňujících přetrvávání kompletní molekulární remise po ukončení terapie TKI (např. úroveň DMR, rizikové skóre, délka léčby TKI, typ předlčení TKI), ale i hodnocení kvality života u pacientů po ukončení léčby TKI, či hodnocení medicínsko-ekonomického dopadu při ukončení terapie TKI. Do této studie se zapojilo celkem 10 zemí napříč Evropou, včetně 6 center z České republiky. Hlavním požadavkem pro zařazení pacienta do studie byla délka léčby TKI před zařazením minimálně 3 roky a dosažení molekulární remise onemocnění alespoň na úrovni MR4, ověřené akreditovanou laboratoří (Saussele S. et al.,

2018).

Poslední skupinou pacientů bylo 103 pacientů s CML léčených IM v Polsku, kteří se po splnění výše uvedených kritérií rozhodli pro vysazení IM. Tito pacienti jsou registrováni ve webové databázi „Polish Stop Imatinib“ na [hematoonkologia.pl](http://hematoonkologia.pl), kterou koordinuje Polish Adult Leukemia Group (PALG). Tabulky 6 a 7 shrnují základní údaje o souborech pacientů.

Materiálem pro níže použité metody byly celkové leukocyty izolované z periferní krve.

Tato práce byla vedena v souladu se zásadami Helsinské deklarace a byla schválena jednotlivými etickými komisemi nemocnic, od jejichž pacientů byly vzorky využity. Všichni pacienti poskytli písemný informovaný souhlas s použitím jejich vzorků pro tuto výzkumnou práci.

Tabulka 6: Charakteristika pacientů, pacienti pro vytipování prognostického markeru.

|   | Pacienti zařazení do NGS<br>(n = 83) | Pacienti rozšiřující původní kohortu (n =46) |
|---|--------------------------------------|--|
| <b>Pohlaví</b>  |                                      |  |
| ženy, počet (procenta)  | 35 (42)                              | 19 (41)                                      |
| muži, počet (procenta)  | 48 (58)                              | 27 (59)                                      |
| <b>Medián věku</b>  |                                      |  |
| roky (rozmezí)  | 54 (18-84)                           | 56 (19-80)                                   |
| <b>EUTOS skóre, počet (procenta)</b>  |                                      |  |
| nízké   | 64 (77)                              | 41 (89)                                      |
| vysoké  | 17 (21)                              | 5 (11)                                       |
| nezjištěno  | 2 (2)                                |  |
| <b>Sokal skóre, počet (procenta)</b>  |                                      |  |
| nízké   | 34 (41)                              | 21 (46)                                      |
| střední   | 23 (28)                              | 18 (39)                                      |
| vysoké  | 23 (28)                              | 7 (15)                                       |
| nezjištěno  | 3 (3)                                |  |
| <b>Hasford skóre, počet (procenta)</b>  |                                      |  |
| nízké   | 27 (33)                              | 14 (30)                                      |
| střední   | 39 (47)                              | 26 (57)                                      |
| vysoké  | 14 (17)                              | 6 (13)                                       |
| nezjištěno  | 3 (3)                                |  |
| <b>1. linie léčby</b>   |                                      |  |
|   | imatinib 400 mg/den                  | imatinib 400 mg/den                          |
| <b>Odpověď na léčbu ve 12 měsíci od zahájení užívání IM, počet (procenta)</b> |                                      |  |
| optimální odpověď   | 40 (48)                              | 32 (68)                                      |
| varování  | 13 (16)                              | 4 (10)                                       |
| selhání léčby   | 30 (36)                              | 10 (22)                                      |
| <b>Dosažení stabilní MMR</b>  |                                      |  |
| počet (procenta)  | 51 (61)                              | 33 (72)                                      |
| medián měsíců od zahájení užívání IM (rozmezí)                                | 39,1 (3-51)                          | 7,7 (4-21)                                   |

Změna terapie na TKI 2. generace z důvodu selhání léčby IM, ztráty odpovědi  
nebo progresse onemocnění

---

|  |               |              |
|--|---------------|--------------|
| počet (procenta)                                     | 27 (33)       | 11 (24)      |
| medián měsíců od<br>zahájení užívání IM<br>(rozmezí) | 29,8 (12-113) | 22,3 (12-62) |

Umrtí během léčby IM, počet

---

|                       |   |   |
|-----------------------|---|---|
| v souvislosti s CML   | 3 | 2 |
| bez souvislosti s CML | 5 | 2 |



Tabulka 7: Charakteristika pacientů, pacienti pro validaci prognostického markeru.

|  | Pacienti zařazení do studie EURO-SKI (n = 176) | Pacienti z polské ukončující studie (n = 93) |
|--|--|--|
| <b>pohlaví</b>                                       |  |  |
| ženy, počet (procenta)                               | 86 (49)  | 52 (56)                                      |
| muži, počet (procenta)                               | 90 (51)  | 41 (44)                                      |
| <b>medián věku při ukončení TKI</b>                  |  |  |
| roky (rozmezí)                                       | 60 (23-84)                                     | 61 (23-83)                                   |
| <b>Genotyp SNP rs460089, počet (procenta)</b>        |  |  |
| GC   | 62 (35)  | 39 (42)                                      |
| GG   | 96 (55)  | 41 (44)                                      |
| CC   | 18 (10)  | 13 (14)                                      |
| <b>Medián délky užívání TKI před jejich ukončení</b> |  |  |
| roky (rozmezí)                                       | 6,8 (3,1-13,5)                                 | 9,7 (3,1-14,4)                               |
| <b>Medián doby trvání DMR před ukončením TKI</b>     |  |  |
| roky (rozmezí)                                       | 4,1 (1,1-12,8)                                 | 6,8 (2,0-11,5)                               |
| <b>Medián doby užívání TKI před dosažením DMR</b>    |  |  |
| roky (rozmezí)                                       | 1,7 (0,3-9,5)                                  | 1,7 (0,1-10,8)                               |
| <b>Typ transkriptu BCR::ABL1, počet (procenta)</b>   |  |  |
| e13a2  | 39 (26)  | 24 (26)                                      |
| e14a2  | 94 (62)  | 51 (55)                                      |
| e13a2+e14a2  | 18 (12)  | 18 (19)                                      |

## 3.2 Buněčné linie

Buněčné linie použité v této práci nejsou uvedeny v databázi chybně identifikovaných buněčných linií, byly získány z prověřených center buněčných zdrojů; Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Německo a ATCC-American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, USA. S buněčnými liniemi se zacházelo dle doporučení dodavatele a byly kultivovány ve vhodném médiu. V experimentu byly použity do 2 měsíců po rozmrazení.

Jedná se o zavedené leukemické a lymfomové *BCR::ABL1+* i *BCR::ABL1-* buněčné linie.

- CML-T1 – linie vytvořená v roce 1987 z *BCR::ABL1+* (b2-a2) buněk periferní krve 36 leté pacientky s CML v blastické fázi nesoucí povrchové znaky T-buněk (DSMZ č. ACC 7)
- JURKAT – linie vytvořená v roce 1976 z buněk periferní krve 14 letého pacienta s T-ALL (DSMZ č. ACC 282)
- K562 - linie vytvořená v roce 1970 z *BCR::ABL1+* (b3-a2) buněk pleurálního výpotku 53 leté pacientky v blastické fázi CML (DSMZ č. ACC 10)
- KCL-22 – linie vytvořená v roce 1981 z *BCR::ABL1+* (b2-a2) buněk pleurálního výpotku 32 leté pacientky v blastické fázi CML (DSMZ č. ACC 519)
- MAVER-1 – linie vytvořená v roce 2003 z buněk periferní krve 82 letého pacienta s lymfomem z plášťových buněk (DSMZ č. ACC 717)
- MEG-01 – linie vytvořená v roce 1983 z *BCR::ABL1+* (b2-a2) buněk kostní dřeně 55 letého muže s CML v megakaryocytární blastické fázi (DSMZ č. ACC 364)
- RAMOS – linie vytvořená v roce 1972 z buněk ascitické tekutiny 3 letého pacienta s Burkittovým lymfomem (DSMZ č. ACC 603)
- SUP-B15 – linie vytvořena v roce 1984 z *BCR::ABL1+* (e1-a2) buněk kostní dřeně 9 letého pacienta s B-prekurzorovou ALL (DSMZ č. ACC 389)
- Z-138 – linie vytvořená z lidských lymfoblastů od pacienta s diagnózou lymfomu z plášťových buněk (ATCC č. CRL-3001)

### 3.3 Výběr transportérů a návrh primerů

Na základě *in silico* analýz jsme vybrali celkem 19 transportérů ze superrodin ABC a SLC (4 ABC a 15 SLC) s anotovanou funkcí lékových přenašečů. Jedná se o transportéry exprimující se v jaterních buňkách, játra mají hlavní podíl na metabolismu IM, v tenkém střevě, kde se IM vstřebává a samozřejmě v kostní dřeni a leukocytech, jakožto cíl léčby IM (Tabulka 8.). S využitím databází The National Center for Biotechnology Information (NCBI), Pharmacogenetics of Membrane Transporters Database (USCF PMT) a The Eukaryotic Promoter Database (EPD) jsme analyzovali sekvence promotorových oblastí, které zahrnují i oblast

Tabulka 8: Druhy tkání s expresí transportéru kódovaného vybraným genem.

| Gen            | Tkáňová exprese transportéru   |
|----------------|--|
| <i>ABCB1</i>   | ubikviterní, zvláště pak v játrech, ledvinách, tenkém střevě, mozku, kostní dřeni, krvi                                  |
| <i>ABCB11</i>  | zvláště v játrech, tenkém střevě, prsa, méně i v ostatních tkáních   |
| <i>ABCC5</i>   | játra, leukemické buňky, buňky melanomu  |
| <i>ABCG5</i>   | játra, méně v tenkém střevě, vaječnicích, leukocytech  |
| <i>SLC22A1</i> | ubikviterní, silně v játrech   |
| <i>SLC22A2</i> | ubikviterní, silně v ledvinách   |
| <i>SLC22A3</i> | placenta, kosterní svalstvo, prostata, játra, ledviny, mozek   |
| <i>SLC22A4</i> | krev, kostní dřev, průdušnice, fetální játra, méně v ledvinách, kosterním svalstvu, prostatě, plicích, placentě          |
| <i>SLC22A5</i> | zvláště v ledvinách, kosterním svalstvu, srdci, placentě, méně v tenkém střevě, leukocytech, kromě CD20+ B-lymfocytů     |
| <i>SLC22A7</i> | ledviny, játra   |
| <i>SLC22A8</i> | ubikviterní, zvláště v ledvinách, játrech  |
| <i>SLC28A1</i> | ledviny, játra, mononukleární buňky  |
| <i>SLC28A2</i> | zvláště v ledvinách, srdci, monocytech, méně v ostatních tkáních   |
| <i>SLC28A3</i> | slinivka, kostní dřev, průdušnice, prsní žláza, játra, prostata, střevo, mozek, plíce, placenta, varlata, ledviny, srdce |
| <i>SLC29A2</i> | kosterní svalstvo, játra, plíce, placenta, mozek, srdce, ledviny, vaječníky  |
| <i>SLC29A3</i> | placenta, děloha, ovaria, slezina, lymfatické uzliny, kostní dřev  |
| <i>SLC47A1</i> | nadledviny, ledviny, játra, děloha, kůže, méně v ostatních tkáních   |
| <i>SLC47A2</i> | zvláště v ledvinách, méně v ostatních tkáních  |
| <i>SLC01A2</i> | ubikviterní  |

proximálního promotoru, místa, kam se váží jak zesilující, tak i zeslabující transkripční faktory. Jedná se o variantní oblasti lišící se například svou délkou či vzdáleností od místa zahájení transkripce (TTS). Některé proximální promotory svou délkou zasahují do prvního exonu, u jiných je vzdálenost ke start-kodonu i přes 100 bp. Pro tyto oblasti jsme navrhli pomocí programů Primer3 plus: <https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>, Primer-BLAST: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> a OligoAnalyzer 3.1: <https://eu.idtdna.com/calc/analyzer> primerové páry generující jednotlivé amplikony (Tabulka 9).

Tabulka 9: Sekvence primerů pro amplifikaci vybraných promotorů genů ABC a SLC.

| Gen            | Chromozom | Forward primer                  | Reverse primer                  | Délka fragmentu (bp) |
|----------------|-----------|---------------------------------|---------------------------------|----------------------|
| <i>ABCB1</i>   | 7         | 5' AAGAAAGGAAGTAAGTAGGGAGTT3'   | 5' GCCAGATCCCACAATACATACA3'     | 1247                 |
| <i>ABCB11</i>  | 2         | 5' GCACAGAGTGAAGAAGGTTAG3'      | 5' GAAGACAGCAACCAAGAGTCA3'      | 1272                 |
| <i>ABCC5</i>   | 3         | 5' CAGGTGGCGTTTCTCTC3'          | 5' AAAGCATCGGATACAAGGTAGG3'     | 1227                 |
| <i>ABCG5</i>   | 2         | 5' TCTGGGAGCCTCTGTTTACT3'       | 5' GAGTTTGAGCCTGACCAACA3'       | 1035                 |
| <i>SLC22A1</i> | 6         | 5' CACACACACAAATGAAGAGGTG3'     | 5' CAGGAACTCCCATGTTACAGAG3'     | 1069                 |
| <i>SLC22A2</i> | 6         | 5' GGCACCGTGTAGTTCAGTT3'        | 5' ACAAGACTCCTCTGGAATGC3'       | 1327                 |
| <i>SLC22A3</i> | 6         | 5' ATTCAAACCAACCACCAACAC3'      | 5' GACGAAGAGGAAGCGAAG3'         | 996                  |
| <i>SLC22A4</i> | 5         | 5' CAGTGCCCTCCATGACTGTG3'       | 5' GCTGAGCAGGAAGAAGATGAG3'      | 1149                 |
| <i>SLC22A5</i> | 5         | 5' GGGCATCTGGACTAGAAATGAAA3'    | 5' CACAATGGTGGACAGGTAGAC3'      | 1099                 |
| <i>SLC22A7</i> | 6         | 5' AGTGTTTGGAGAATCAGATGAGAA3'   | 5' AGATGGCAGGAGGAAGT3'          | 1100                 |
| <i>SLC22A8</i> | 11        | 5' TGGCTACAAAGGACAGATTAGAG3'    | 5' CTCAGGTGAGACTGGACATTT3'      | 1221                 |
| <i>SLC28A1</i> | 15        | 5' CCCTTTACTGTCAAACCCTTCTG3'    | 5' AGAGCGAGACTCTACCTCAA3'       | 1014                 |
| <i>SLC28A2</i> | 15        | 5' CTGCCCTCCTGGGTTCAAAT3'       | 5' CAAAACATTTGGGCCCTCAGAATAAG3' | 1392                 |
| <i>SLC28A3</i> | 9         | 5' GGACAATAACCCAGGCTTTCTTT3'    | 5' TGAGTTCCCAACAACCTCAC3'       | 1299                 |
| <i>SLC29A2</i> | 11        | 5' GGATGGCGGTGATGAAGAA3'        | 5' GAGCGACACTCAGTCTCAAA3'       | 1020                 |
| <i>SLC29A3</i> | 10        | 5' TTTTGAGATGGAGTCTTTGCTCTG3'   | 5' AGCCACCGTCTGGATACT3'         | 1228                 |
| <i>SLC47A1</i> | 17        | 5' CAAATCCCTGAATCCAAACTTCC3'    | 5' AAAGCCCGCCAAAGTCA3'          | 1216                 |
| <i>SLC47A2</i> | 17        | 5' CAAGCGATTTCTCTGCCCTCTC3'     | 5' CCACCTGCTCTGTGACTT3'         | 1221                 |
| <i>SLCO1A2</i> | 12        | 5' ATCCCTGTCTTCCATTTAAGTCTCTC3' | 5' TGTGTGCCCTGTATGTTATACATCT3'  | 1096                 |

## 3.4 Detekce polymorfismů v promotorech vybraných genů

Jako výchozí materiál pro detekci polymorfismů v promotorových oblastech byla použita genomická DNA. Ta byla izolována z uložených lyzátů celkových leukocytů periferní krve obsahujících 10 miliónů buněk na 1 ml lyzátu pomocí TRIzol® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA) nebo guanidiniumthiokyanátu (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Německo). K samotné detekci polymorfismu byly použity dvě metody. První metodou bylo masivní paralelní sekvenování nové generace (NGS), které bylo využito pro detekci polymorfismů u všech 19 vybraných promotorových oblastí u první skupiny pacientů ( $n = 83$ ). Druhou metodou bylo Sangerovo sekvenování, které bylo využito u přidané skupiny pacientů ( $n = 46$ ) již pouze k detekci SNP v promotorech dvou vytipovaných genů *SLC22A4* a *SLC22A5*.

### 3.4.1 Příprava vzorků k sekvenování nové generace (NGS)

Prvním krokem pro NGS byla příprava ampliconové knihovny. Vstupním materiálem pro přípravu knihoven byly pomocí PCR amplifikované cílové oblasti 19 vybraných genů genomické DNA. K amplifikaci byly použity 3 rozdílné protokoly (tabulka 10). V jednom protokolu byl použit kit FastStart™ High Fidelity PCR System (Roche Applied Science, Basel, Švýcarsko) a pro dva protokoly kit AccuPrimeSupermix I (Thermo Fisher Scientific). Produkty PCR jsme ověřili elektroforézou na agarózovém gelu se zobrazením pod UV transluminátorem a kvantifikovali s využitím přístroje 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA USA).

Promotorové oblasti od 38 pacientů byly sekvenovány metodou 454 GS Junior/GS Junior+ (Roche Applied Science). Příprava knihovny byla provedena dle manuálu Rapid Library Preparation Method Manual (Roche Applied Science). Při fragmentaci jednotlivých vzorků pomocí nebulizace musel být protokol poupraven a zvýšen tlak nebulizace na 55 psi a délka na 2 min 30 s. Další kroky přípravy knihoven: Fragment End Repair, AMPure bead preparation, Adaptor Ligation, Small Fragment Removal, byly provedeny dle protokolu výrobce. Ke kontrole kvality připravené knihovny byl opět použit 2100 Bioanalyzer s využitím High Sensitivity DNA chip (Agilent Technologies) a ke kvantifikaci pak KAPA Library Quantification Kits For Roche 454 GS Titanium platform (Kapa Biosystems, Wilmington, MA USA). Vzhledem k tomu, že během přípravy knihovny (Adaptor Ligation) byla ke každému vzorku ligována specifická sekvence (Multiple Identifier's MID), díky které je možné od sebe jednotlivé vzorky oddělit, bylo 19 cílových oblastí

Tabulka 10: Protokoly amplifikace promotorových oblastí vybraných genů.

| a. pro geny <i>ABCB11</i> a <i>SLC22A1</i> |             |  |
|--|-------------|--|
| Reagencie                                  | Objem       | Amplifikační program   |
| Celkový objem pro vzorek                   | 20 $\mu$ l  | 1. krok 94°C po dobu 2min<br>2. krok 94°C pod dobu 15s<br>3. krok 63,5°C po dobu 30s<br>4. krok 68°C po dobu 1min 30s<br>krok 2-4 opakovat 35x |
| AccuPrime™SuperMix I                       | 10 $\mu$ l  |  |
| Forward primer (10 $\mu$ M/ $\mu$ l)       | 0,5 $\mu$ l |  |
| Reverse primer (10 $\mu$ M/ $\mu$ l)       | 0,5 $\mu$ l |  |
| H <sub>2</sub> O                           | 8,0 $\mu$ l |  |
| DNA (50-100 ng)                            | 1,0 $\mu$ l |  |

| b. pro geny <i>ABCB1</i> , <i>SLC22A2</i> , <i>SLC22A8</i> , <i>SLCO1A2</i> |             |  |
|---|-------------|--|
| Reagencie   | Objem       | Amplifikační program   |
| Celkový objem pro vzorek  | 20 $\mu$ l  | 1. krok 94°C po dobu 2min<br>2. krok 94°C pod dobu 15s<br>3. krok 59,3°C po dobu 30s<br>4. krok 68°C po dobu 1min 30s<br>krok 2-4 opakovat 35x |
| AccuPrime™SuperMix I  | 10 $\mu$ l  |  |
| Forward primer (10 $\mu$ M/ $\mu$ l)  | 0,5 $\mu$ l |  |
| Reverse primer (10 $\mu$ M/ $\mu$ l)  | 0,5 $\mu$ l |  |
| H <sub>2</sub> O  | 8,0 $\mu$ l |  |
| DNA (50-100 ng)   | 1,0 $\mu$ l |  |

| c. pro geny <i>ABCC5</i> , <i>ABCG5</i> , <i>SLC22A3</i> , <i>SLC22A4</i> , <i>SLC22A5</i> , <i>SLC22A7</i> , <i>SLC28A1</i> , <i>SLC28A2</i> , <i>SLC28A3</i> , <i>SLC29A2</i> , <i>SLC29A3</i> , <i>SLC47A1</i> , <i>SLC47A2</i> |               |   |
|--|---------------|---|
| Reagencie  | Objem         | Amplifikační program  |
| Celkový objem pro vzorek   | 25 $\mu$ l    | 1. krok 95°C po dobu 1min<br>2. krok 95°C pod dobu 30s<br>3. krok 62,2°C po dobu 30s<br>4. krok 72°C po dobu 1min 13s<br>krok 2-4 opakovat 35x<br>5. krok 72°C po dobu 5min |
| FastStart High Fidelity Enzyme Blend   | 0,25 $\mu$ l  |   |
| 100% DMSO  | 1,5 $\mu$ l   |   |
| 10x Pufr s 18 mM MgCl <sub>2</sub>   | 2,5 $\mu$ l   |   |
| dNTPs (10 $\mu$ M)   | 0,5 $\mu$ l   |   |
| Forward primer (10 $\mu$ M/ $\mu$ l)   | 2 $\mu$ l     |   |
| Reverse primer (10 $\mu$ M/ $\mu$ l)   | 2 $\mu$ l     |   |
| H <sub>2</sub> O   | 15,25 $\mu$ l |   |
| DNA (50-100 ng)  | 1,0 $\mu$ l   |   |

od 12 pacientů ekvimolárně, dle absolutní kvantifikace, poolováno do jediného vzorku, který byl následně použit do emulzní PCR (emPCR), která předchází samotné sekvenaci. EmPCR byla provedena dle protokolu emPCR Amplification Manual – Lib-L (Roche Applied Science). Sekvence byla provedena podle protokolu Sequencing Manual (Roche Applied Science). Vzhledem k dostupnosti nové sady pro dlouhé čtení ampliconů byla u promotorových oblastí od 24 pacientů při přípravě knihoven vynechána fragmentace. K emPCR a následné sekvenaci pak byly použity kity pro dlouhá čtení GS Junior+ emPCR Kit (Lib-L), GS Junior+ Sequencing Kit XL+ (Roche Applied Science). Maximální počet ampliconů, který byl použit v jedné sekvenační analýze metodou 454 GS Junior/ GS Junior + (Roche Applied Science) byl 228. Knihovna z promotorových oblastí 55 pacientů byla připravena spolupracující laboratoří dr. Beneše; Gene Core Heidelberg a následně sekvenována přístrojem MiSeq (Illumina, San Diego, CA USA). Pro ověření možnosti zaměňovat obě metody bez vlivu na nalezená SNP byly promotorové oblasti od 10 pacientů sekvenovány oběma metodami. Všechny sekvence byly hodnoceny a SNP vyhledávány pomocí softwaru NextGENe (Softgenetics, State College, PA USA).

### 3.4.2 Příprava vzorků pro Sangerovo sekvenování

První krok pro přípravu vzorků k Sangerovu sekvenování je identický jako pro sekvenování nové generace. Tedy amplifikace vybraného úseku genomické DNA. Metodou Sangerova sekvenování jsme analyzovali SNP pouze v promotorech genů *SLC22A4* a *SLC22A5* u přidané skupiny celkem 46 pacientů a 9 testovaných buněčných linií. Dále bylo Sangerovo sekvenování k vyhledání SNP promotorové oblasti genu *SLC22A4* využito jako nástroj pro validaci genotypové eseje TaqMan SNP Genotyping Assays C\_\_\_\_2390965\_10 (Thermo Fisher Scientific) u 301 DNA vzorků získaných od pacientů zařazených do EURO-SKI studie. Amplifikaci DNA jsme uskutečnili pomocí PCR s užitím FastStart™ High Fidelity PCR System (Roche Applied Science) ve shodě s protokolem uvedeným v tabulce 10 c. Produkty jsme purifikovali pomocí QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Německo) dle výrobního protokolu a kontrola produktu proběhlé PCR byla opět provedena na 2 % agarózovém gelu. Následovala jednosměrná sekvenační PCR s užitím ABI PRISM Big Dye terminator Version 3.1 (Thermo Fisher Scientific) dle protokolu uvedeném v tabulce 11. Sekvenační produkty byly poté přečištěny pomocí kitu DyeEx 2.0 Spin kit (Qiagen). Purifikované vzorky byly vysušeny ve SpeedVac SPD 111V P1 (Thermo Fisher Scientific), rozpuštěny ve 25 µl formamidu (Thermo Fisher Scientific) a denaturovány. Oba řetězce byly sekvenovány v genetickém analyzátoru AB 3500 (Thermo Fisher Scientific).

Tabulka 11: Protokol pro sekvenační PCR.

| Reagencie                           | Objem | Amplifikační program   |
|-------------------------------------|-------|--|
| Celkový objem pro vzorek            | 4,5µl | 1. krok 96°C po dobu 10s<br>2. krok 55°C po dobu 10s<br>3. krok 60°C po dobu 4min<br>krok 1-3 opakovat 25x |
| Big Dye 3.1                         | 1,0µl |  |
| Primer forward/reverse (10 pmol/µl) | 1,0µl |  |
| 5x Sekvenační pufr                  | 1,0µl |  |
| DNA (purifikovaná)                  | 1,5µl |  |

Sekvence byly hodnoceny a SNP vyhledávány v programu Mutation Surveyor (Softgenetics).

### 3.5 Měření relativní exprese genu *SLC22A4* a *SLC22A5*

Pro měření relativní exprese slouží jako vstupní materiál kódující DNA (cDNA), kterou jsme připravili z izolované RNA z buněčných lyzátů uložených v TRIzol® (Thermo Fisher Scientific) či guanidiniumthiokyanátu (SERVA Electrophoresis GmbH) metodou reverzní transkripce.

#### 3.5.1 Měření exprese *SLC22A4* a *SLC22A5* u pacientských vzorků

RNA byla izolována z buněčných lyzátů celkových leukocytů periférní krve uložených v TRIzol® (Thermo Fisher Scientific) či guanidiniumthiokyanátu (SERVA Electrophoresis GmbH) v koncentraci 10 miliónů buněk/ml. Kvantifikace RNA a její čistota byla stanovena na přístroji NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific). K přepisu do cDNA bylo použito 500 ng RNA s použitím reverzní transkriptázy M-MLV (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA) a náhodných hexamerů.

K měření hladiny exprese byla použita metoda qRT-PCR s použitím komerčně dostupných esejí TaqMan® Gene Expression Assays Hs01548718\_m1 pro gen *SLC22A4* a Hs00929869\_m1 pro gen *SLC22A5* (Thermo Fisher Scientific), s použitím TaqMan™ Gene Expression Master Mixu (Thermo Fisher Scientific). Jako způsob kvantifikace byla zvolena relativní kvantifikace ke kontrolnímu genu *GUSB* (β-glucuronidáza). Měření probíhalo na přístroji StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, USA). Vyhodnocení



probíhalo v programu StepOne™ (Applied Biosystems), kde pro *GUSB* byl manuálně nastaven treshold na hodnotu 20000, pro geny *SLA22A4* a *SLC22A5* na hodnotu 0,05. Vzhledem k použitým esejím byl reportér nastaven na FAM a quencher na NFQ-MGB. Relativní kvantifikace cílových genů (*SLC22A4* a *SLC22A5*) byla vyhodnocena metodou delta Ct a metodou  $2^{-\text{delta delta Ct}}$ .

### 3.5.2 Analýza exprese *SLC22A4* a *SLC22A5* v buněčných liniích

Buňky všech použitých buněčných linií byly jednotlivě kultivovány při teplotě 37 °C a atmosféře obsahující 5 % CO<sub>2</sub> v médiu dle doporučení dodavatele. Před vytvořením lyzátů byly kultury po odstranění kultivačního média promyty PBS (solný roztok fosfátem pufrovaný) a spočítány pomocí trypanové modři (Sigma-Aldrich s.r.o., St. Louis, Missouri, USA) na přístroji TC20 Automat Cell counter (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornie, USA). Získané buňky byly lyzovány v TRIzol® (Thermo Fisher Scientific) v koncentraci 1x10<sup>6</sup> buněk/ml.

Koncentrace a čistota celkové RNA byla stanovena na spektrofotometru NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific). K transkripci do cDNA pomocí iScript cDNA Synthesis Kit (č. 170-8891; BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA) bylo použito 200 ng RNA. Postup byl proveden dle doporučení výrobce. K relativní kvantifikaci exprese byl použit 7900HT Fast Real-time PCR Systém (Thermo Fisher Scientific) s použitím komerčních esejí TaqMan® Gene Expression Assays Hs01548718\_m1 pro gen *SLC22A4* a Hs00929869\_m1 pro gen *SLC22A5* (Thermo Fisher Scientific). Jako kontrolní gen byl použit *GAPDH* (Glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza). K vyhodnocení byl použit výpočet delta Ct.

## 3.6 Měření halving time

Víme, že pacienti s dosažením rychlého poklesu transkriptu *BCR::ABL1* při léčbě IM ve třech měsících ( $BCR::ABL1 \leq 10\%$  IS) mají lepší prognózu než pacienti s pomalým poklesem (optimal x failure, dle ELN z roku 2013 (Baccarani M. et al., 2013)). Není však jisté, jestli je s výhodou u pacientů s pomalejším poklesem hned měnit léčbu. Je totiž možné, že pokles není dostatečný vzhledem k náloži leukemických buněk v době diagnózy. Možným přesnějším nástrojem pro určení prognózy může být halving time, doba (měřena ve dnech) za kterou poklesne hladina transkriptu *BCR::ABL1* z výchozí hodnoty na polovinu. Susan Branford et al. (Branford S. et al., 2014) spočetli, že pacienti, kteří mají více než 10 % IS transkriptu *BCR::ABL1* ve třech měsících mají i tak dobrou prognózu pokud je

jejich halving time kratší než 76 dní. My jsme v naší práci u pacientů počítali halving time ve 3 a 6 měsících abychom zjistili, zda je rozdílný pokles transkriptu závislý na přítomných polymorfismech.

### 3.6.1 Měření transkriptu *BCR::ABL1*

Ke kvantifikaci hladin transkriptu *BCR::ABL1* u pacientů v období diagnózy, ve 3 měsících a v 6 měsících léčby IM jsme využili metodu qRT-PCR dle operačního postupu 04, příloha 11 oddělení molekulární genetiky ÚHK T s využitím kontrolního genu *GUSB*, standardizovanou v rámci projektu EUTOS for CML ELN (The European Treatment Outcome Study) (Müller M.C. et al., 2009). Výsledky jsou uváděny v mezinárodním měřítku IS.

### 3.6.2 Výpočet halving time

Míra změny hladiny transkriptu *BCR::ABL1* oproti době diagnózy byla u každého pacienta měřena v době mediánu 3,1 měsíc (1,6-4,6 měsíce) a mediánu 6,2 měsíců (4,5-8,9 měsíce) od zahájení léčby IM. Výpočet halving time byl proveden podle metody Susan Branford et al. (Branford S. et al., 2014) dle vzorce:

$$c = \frac{-\ln(2)}{k}$$

$c$  je halving time,  $k$  je změna hladiny transkriptu *BCR::ABL1* od doby diagnózy dělená počtem dnů od zahájení užívání IM v době měření halving time (3. nebo 6. měsíc), podle vzorce:

$$k = \frac{\ln(b) - \ln(a)}{d}$$

$a$  je hodnota hladiny transkriptu *BCR::ABL1* v době diagnózy a  $b$  je hodnota hladiny transkriptu *BCR::ABL1* v době, ke které vztahujeme halving time a  $d$  je počet dnů mezi jednotlivými měřeními.

## 3.7 Genotypování SNP

Jako rychlý a spolehlivý přístup ke genotypování jednotlivých SNP byla použita esej TaqMan SNP genotyping assay (ThermoFisher Scientific) s využitím RT-PCR systému StepOnePlus™ (Sigma-Aldrich s.r.o.). K vyhodnocení detekovaných alel byl použit software dodávaný výrobcem přístroje StepOnePlus (Sigma-Aldrich s.r.o.).

Pro genotypování SNP rs1050152 (*SLC22A4*) byla použita komerčně dostupná TaqMan SNP Genotyping Assays C\_\_\_\_3170459\_30 (ThermoFisher Scientific), která pro další sledované SNP rs460089 (*SLC22A4*) dostupná nebyla. Pokus o vytvoření námi navržené eseje pro rozlišení jednotlivých alel selhal, z důvodu četného obsahu nukleotidů G a C v sekvenci obklopující testované SNP. Proto byla provedena analýza vazebné nerovnováhy (LD), viz. odstavec níže. Byly nalezeny tři SNP, který dokonale predikují alely SNP rs460089. Na základě *in silico* analýzy parametrů sekvence obklopující konkrétní SNP pro analýzu alelické diskriminace byl vybrán SNP rs156322 (*SLC22A4*) a byla použita komerčně dostupná esej TaqMan SNP Genotyping Assays C\_\_\_\_2390965\_10 (ThermoFisher Scientific). Jako vstupní materiál do esejí byla použita genomická DNA izolovaná z celkových leukocytů periferní krve jednotlivých pacientů v koncentraci 10-15 ng/μl a jako pozitivní kontrola byly použity 3 buněčné linie nesoucí různé genotypy SNP rs460089; MEG01 = CC, CML-T1 = GC a KCL-22 = GG. Reakční směs a podmínky PCR byly provedeny dle doporučení výrobce.

### 3.8 Analýza vazebné nerovnováhy

Vazebná nerovnováha (LD; Linkage disequilibrium) je nenáhodná asociace mezi alelami dvou a více lokusů, čehož se dá využít ve vazebných analýzách mezi markerem a funkčními polymorfismy. My jsme použili analýzu LD námi genotypovaných SNP k nalezení polymorfismů s významně vysokou LD, které jsou identifikovány v nekódujících oblastech *SLC22A4* a *SLC22A5* pomocí webového nástroje LD link od National Cancer Institute: <https://analysistools.nci.nih.gov/LDlink/> (Machiela M.J. et Chanock S.J., 2015). SNP s vysokým skóre dle databáze RegulomeDB (Boyle A.P. et al., 2012), která ukazuje pravděpodobnost jejich regulačního účinku na expresi genu, byly zkoumány pomocí nástroje LDproxy. S využitím funkce LDmatrix jsme vytvořily Heatmapu párových statistik LD. Frekvence haplotypů byly vyhodnoceny pomocí utility LDhap. Všechny analýzy byly provedeny na evropské populaci.

### 3.9 Statistické analýzy

Fisherův exaktní test pravděpodobnosti (2x2 nebo 2x3) byl použit k analýze frekvence alel v jednotlivých kohortách pacientů. K hodnocení asociace mezi genotypy a halving time *BCR::ABL1* byl použit Kruskal-Wallisův test. Křivky kumulativní incidence dosažení stabilní MMR během léčby IM byly vypočteny užitím Mann-Whitneyho testu. Kaplan-Meierova metoda byla použita k odhadu přežití bez události (EFS). EFS jsme definovali jako ztrátu MMR, nový výskyt mutace

v kinázové doméně *BCR::ABL1*, progresu onemocnění, nebo úmrtí související s CML během léčby IM. Mezi zařazenými pacienty byli i ti, u nichž byla převedena léčba na TKI druhé generace. K ověření statisticky významných nezávislých faktorů pro dosažení stabilní MMR a EFS byly použity univariantní a multivariantní analýzy. Pro výpočet analýz byl použit log-rank test a analýza Coxovou metodou. Statistické analýzy byly provedeny pomocí MATLABu verze R2015b a webových nástrojů: <https://vassarstats.net>. Grafy byly vytvořeny pomocí software GraphPad Prism version 4.03 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA)

U souboru pacientů s přerušením terapie IM, který byl pro statistické analýzy rozdělen na pacienty zařazené do EURO-SKI a pacienty léčených v Polsku, jež nebyli do EURO-SKI zařazeni, byly užity následující statistické metody: 95 % interval spolehlivosti (CI) dle Wilsona byl použit k výpočtu stanovení podílu pacientů držících MMR i šest měsíců po vysazení IM, tzv. MRFS (molecular-relapse-free survival). Odds ratio (OR) bylo z důvodu srovnání univariantních a multivariantních analýz vypočítáno pomocí logistické regrese. Podobně jako výše k odhadu EFS, byla u pacientů po vysazení IM využita k odhadu MRFS Kaplan-Meierova metoda. Pro výpočet univariantních a multivariantních analýz byla použita Coxova metoda. Variantními daty do analýz byl jak genotyp SNP rs460089, tak pohlaví pacienta, věk v době vysazení IM, trvání léčby TKI před jeho vysazením, doba trvání DMR před vysazením TKI a doba léčby od zahájení TKI a dosažení DMR. Statistické analýzy byly provedeny pomocí SAS 9.4.

## 4. Výsledky

### 4.1 Identifikace kandidátních SNP v promoto-rech vytipovaných ABC a SLC genů v závislosti na typu odpovědi při léčbě imatinibem

Na základě studované literatury již víme, že obě rodiny transportních proteinů jsou velice různorodé a to jak funkcí jednotlivých proteinů, tak z toho vyplývající rozdílnou expresí v různých typech tkání. Za pomoci využití softwarů a databází (NCBI, USCF, PMT a EPD) jsme identifikovali geny jednotlivých proteinů a jejich lokalizaci v genomu. Promotorové oblasti jednotlivých ABC a SLC genů, se liší např. počtem bází či vzdáleností od místa zahájení transkripce. Na základě *in silico* analýz jsme k identifikaci SNP v promotorové oblasti vybrali celkem 19 genů, 4 patří do rodiny ABC a 15 do rodiny SLC. Proteiny kódované těmito vybranými geny mají anotovanou funkci lékového přenašeče a hojně se exprimují v tkáních významných pro farmakokinetiku IM. Jedná se o játra, důležitý orgán z hlediska metabolismu léčiva, tenké střevo, ve kterém dochází k jeho absorpci, kostní dřeň a leukocyty, jako cílové buňky účinku IM, tedy inhibice BCR::ABL1 tyrosinkinázy. V tabulce 8 je souhrn tkání exprimující ABC a SLC proteiny.

Metodou NGS jsme vyšetřili celkem 1486 ampliconů, tedy amplifikovaných sekvencí promotorových oblastí vybraných 19 genů u skupiny 83 pacientů s CML v chronické fázi v době diagnózy, kteří byli dále léčeni IM v první linii (tabulka 6). Celkem bylo identifikováno 95 SNP, z toho 7 SNP dosud nebylo popsáno v databázi NCBI. Většina SNP se nacházela v promotorové oblasti, ale vzhledem k designu našich ampliconů (tabulka 9), které obsahovaly i nejbližší okolí místa zahájení transkripce, jsme identifikovali i 12 SNP mimo promotor. A to 9 SNP v exonu 1 genů *SLC22A1*, *SLC22A5*, *SLC22A8*, *SLCO1A2* a 3 SNP v intronu 1 genů *SLC28A1*, *SLC28A3* a *SLC47A2*. Všechny nalezené SNP včetně jejich MAF (minor allele frequency) pro evropskou populaci jsou shrnuty v tabulce 12.

Tabulka 12: Nalezená SNP v amplifikovaných regionech 19 vybraných genů na sestavě 83 pacientů s CML.

| Gen           | č. SNP | Anotace | SNP ID      | Pozice Assembly<br>GRCh38.p2 | dle | pozice TSS      | Vzdálenost od TSS | Záměna nukleotidu | MAF / MinorAlleleCount (Global) | Řetězec |
|---------------|--------|---------|-------------|------------------------------|-----|-----------------|-------------------|-------------------|---------------------------------|---------|
| <i>ABCB1</i>  | 1      | ANO     | rs4148727   | Ch.7; 87713450               |     |                 | -127              | A/G               | G=0.0639/320                    |         |
|               | 2      | ANO     | rs562417804 | Ch.7; 87713530               |     | Ch.7; 87713323  | -207              | A/G               | NA                              |         |
|               | 3      | NE      | NA          | Ch.7; 87713808               |     |                 | -485              | T/C               | NA                              | Reverse |
|               | 4      | ANO     | rs28381714  | Ch.7; 87714150               |     |                 | -827              | T/C               | C=0.0044/22                     |         |
| <i>ABCB11</i> | 5      | ANO     | rs13416851  | Ch.2; 169031103              |     |                 | 190               | T/A               | A=0.0711/356                    |         |
|               | 6      | ANO     | rs568098536 | Ch.2; 169031294              |     |                 | -1                | A/G               | G=0.0044/22                     |         |
|               | 7      | ANO     | rs114352891 | Ch.2; 169031926              |     |                 | -633              | A/G               | G=0.0028/14                     |         |
|               | 8      | ANO     | rs144239146 | Ch.2; 169032035              |     | Ch.2; 169031293 | -742              | C/T               | T=0.0020/10                     | Reverse |
| <i>ABCC5</i>  | 9      | ANO     | rs77027514  | Ch.2; 169032160              |     |                 | -867              | T/C               | C=0.0036/18                     |         |
|               | 10     | ANO     | rs115998826 | Ch.2; 169032229              |     |                 | -936              | G/A               | A=0.0038/19                     |         |
|               | 11     | ANO     | rs9869029   | Ch.3; 184017498              |     |                 | 441               | G/C               | C=0.3117/1561                   |         |
|               | 12     | NE      | NA          | Ch.3; 184017843              |     |                 | 96                | C/G               | NA                              |         |
| <i>ABCG5</i>  | 13     | ANO     | rs56843723  | Ch.3; 184017856              |     | Ch.3; 184017939 | 83                | G/A               | A=0.0134/67                     | Reverse |
|               | 14     | ANO     | rs60553229  | Ch.3; 184018121              |     |                 | -182              | G/A               | A=0.0046/23                     |         |
|               | 15     | ANO     | rs59502966  | Ch.3; 184018302              |     |                 | -363              | G/C               | C=0.0008/4                      |         |
| <i>ABCG5</i>  | 16     | NE      | NA          | Ch.2; 43839624               |     |                 | -805              | T/A               | NA                              |         |
|               | 17     | ANO     | rs11887534  | Ch.2; 43839108               |     |                 | -289              | G/C               | C=0.0605/303                    |         |
|               | 18     | NE      | NA          | Ch.2; 43839056               |     | Ch.2; 43838819  | -237              | C/A               | NA                              | Reverse |
|               | 19     | ANO     | rs3806471   | Ch.2; 43839035               |     |                 | -216              | T/G               | G=0.4894/2451                   |         |
|               | 20     | ANO     | rs55853083  | Ch.2; 43838797               |     |                 | 22                | T/G               | G=0.0192/96                     |         |

|                |           |             |                 |                 |                 |      |     |               |         |
|----------------|-----------|-------------|-----------------|-----------------|-----------------|------|-----|---------------|---------|
| <i>SLC22A1</i> | 21        | ANO-exon1   | rs1867351       | Ch.6; 160122091 | Ch.6; 160121831 | 260  | T/C | C=0.2812/1408 | Forward |
|                | 22        | ANO-exon1   | rs12208357      | Ch.6; 160122116 |                 | 285  | C/T | T=0.0204/102  |         |
| <i>SLC22A2</i> | 23        | ANO         | rs55920607      | Ch.6; 160259003 | Ch.6; 160258931 | -72  | G/A | A=0.0136/68   | Reverse |
|                | 24        | ANO         | rs60249401      | Ch.6; 160259181 |                 | -250 | C/T | T=0.0072/36   |         |
| <i>SLC22A3</i> | 25        | NE          | NA              | Ch.6; 160347795 | Ch.6; 160348373 | -578 | C/A | NA            | Forward |
|                | 26        | ANO         | rs551032        | Ch.6; 160347828 |                 | -545 | T/C | NA            |         |
|                | 27        | NE          | NA              | Ch.6; 160348198 |                 | -175 | T/G | NA            |         |
|                | 28        | ANO         | rs555754        | Ch.6; 160348391 |                 | 18   | G/A | A=0.4301/2154 |         |
| <i>SLC22A4</i> | 29        | ANO         | rs460089        | Ch.5; 132294079 | Ch.5; 132294452 | -373 | G/C | C=0.3175/1590 | Forward |
|                | 30        | ANO         | rs460271        | Ch.5; 132294369 |                 | -83  | G/C | C=0.3169/1587 |         |
| <i>SLC22A5</i> | 31        | ANO         | rs2631369       | Ch.5; 132369574 | Ch.5; 132369709 | -135 | G/C | C=0.3564/1785 | Forward |
|                | 32        | ANO         | rs2631368       | Ch.5; 132369605 |                 | -104 | T/G | G=0.3564/1785 |         |
|                | 33        | ANO         | rs2631367       | Ch.5; 132369766 |                 | 57   | G/C | C=0.2670/1337 |         |
|                | 34        | ANO-exon1   | rs2631365       | Ch.5; 132370257 |                 | 548  | T/C | C=0.4862/2435 |         |
|                | 35        | ANO         | rs4646298       | Ch.5; 132369527 |                 | -182 | C/T | T=0.1172/587  |         |
|                | 36        | ANO         | rs13180169      | Ch.5; 132369834 |                 | 125  | G/T | T=0.1182/592  |         |
|                | 37        | ANO         | rs13180186      | Ch.5; 132369866 |                 | 157  | G/T | T=0.1190/596  |         |
|                | 38        | ANO-exon1   | rs13180043      | Ch.5; 132369895 |                 | 186  | C/T | T=0.1190/596  |         |
|                | 39        | ANO-exon1   | rs13180295      | Ch.5; 132369896 |                 | 187  | G/A | A=0.1188/595  |         |
|                | 40        | ANO         | rs60978556      | Ch.5; 132369654 |                 | -55  | C/A | A=0.0030/15   |         |
| 41             | ANO-exon1 | rs369724970 | Ch.5; 132369947 | 238             | G/A             | NA   |     |               |         |
| 42             | ANO-exon1 | rs202088921 | Ch.5; 132370108 | 399             | C/T             | NA   |     |               |         |

|                |    |             |             |                 |                 |      |     |               |         |
|----------------|----|-------------|-------------|-----------------|-----------------|------|-----|---------------|---------|
| <i>SLC22A7</i> | 43 | ANO         | rs17209379  | Ch.3; 184017498 | Ch.6; 43298260  | -767 | A/C | C=0.0521/261  | Forward |
|                | 44 | ANO         | rs527536195 | Ch.3; 184017843 |                 | -389 | C/T | T=0.0004/2    |         |
|                | 45 | ANO         | rs70953674  | Ch.3; 184018121 |                 | -312 | C/G | G=0.0138/69   |         |
|                | 46 | NE          | NA          | Ch.3; 184018302 |                 | -126 | C/G | NA            |         |
| <i>SLC22A8</i> | 47 | ANO-exon1   | rs548209219 | Ch.3; 184017498 | Ch.11; 63015845 | 183  | C/T | T=0.0002/1    | Reverse |
|                | 48 | ANO         | rs4963227   | Ch.3; 184017843 |                 | 167  | T/C | C=0.0984/493  |         |
|                | 49 | ANO         | rs3809069   | Ch.3; 184017856 |                 | -455 | A/G | G=0.1823/913  |         |
|                | 50 | ANO         | rs147652943 | Ch.3; 184017856 |                 | -493 | G/T | T=0.0010/5    |         |
|                | 51 | ANO         | rs948979    | Ch.3; 184017856 |                 | -509 | G/T | T=0.2762/1383 |         |
|                | 52 | ANO         | rs948980    | Ch.3; 184018121 |                 | -572 | C/G | G=0.2738/1371 |         |
|                | 53 | ANO         | rs575301877 | Ch.3; 184018302 |                 | -649 | G/A | A=0.0012/6    |         |
| <i>SLC28A1</i> | 54 | ANO         | rs113290327 | Ch.3; 184017498 | Ch.15; 84884661 | -459 | C/T | T=0.0114/57   | Forward |
|                | 55 | ANO         | rs1451537   | Ch.3; 184017843 |                 | -222 | A/G | G=0.0491/246  |         |
|                | 56 | ANO         | rs59738243  | Ch.3; 184018121 |                 | 90   | G/A | A=0.0923/462  |         |
|                | 57 | ANO-intron1 | rs12910396  | Ch.3; 184018302 |                 | 211  | C/T | T=0.4287/2147 |         |
|                | 58 | ANO         | rs750247657 | Ch.15; 45251272 |                 | -958 | T/C | NA            |         |
|                | 59 | ANO         | rs28524974  | Ch.15; 45251330 |                 | -900 | C/T | T=0.3948/1977 |         |
|                | 60 | ANO         | rs2413777   | Ch.15; 45251356 |                 | -874 | C/T | T=0.1180/591  |         |
| <i>SLC28A2</i> | 61 | ANO         | rs3759895   | Ch.15; 45251672 | Ch.15; 45252230 | -558 | G/A | A=0.4766/2387 | Forward |
|                | 62 | ANO         | rs2413776   | Ch.15 ;45251972 |                 | -258 | A/G | G=0.4942/2475 |         |
|                | 63 | ANO         | rs2413775   | Ch.15; 45252090 |                 | -140 | T/A | A=0.4876/2442 |         |
|                | 64 | ANO         | rs2899376   | Ch.15; 45252121 |                 | -109 | G/T | T=0.0527/264  |         |
|                | 65 | ANO         | rs536462691 | Ch.15; 45252145 |                 | -85  | G/A | A=0.0002/1    |         |

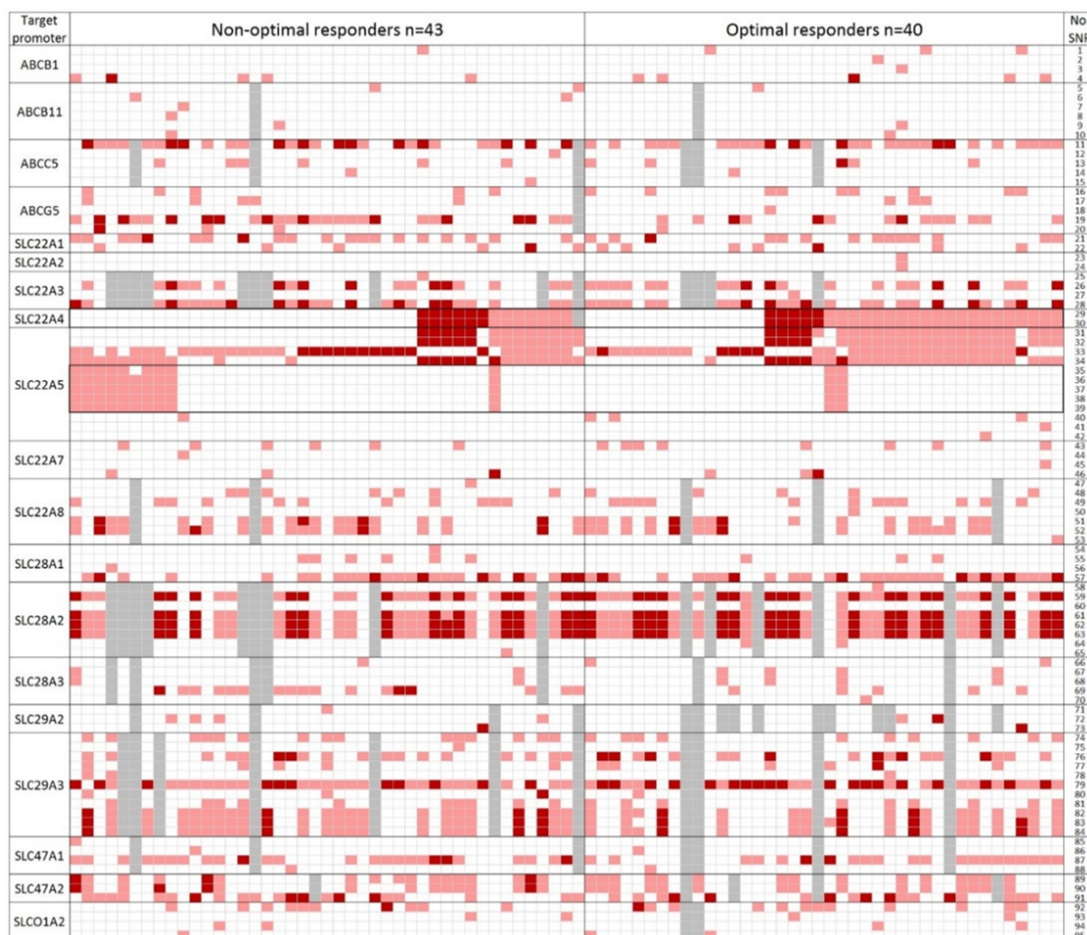


|    |             |             |                 |                 |                |     |               |         |
|----|-------------|-------------|-----------------|-----------------|----------------|-----|---------------|---------|
| 66 | ANO-intron1 | rs62566622  | Ch.9; 84368139  | Ch.9; 84368498  | 359            | G/T | T=0.0138/69   | Reverse |
|    | 67          | ANO         | rs10868153      |                 | Ch.9; 84368453 | 45  | T/G           |         |
| 68 | ANO         | rs7023720   | Ch.9; 84368594  | Ch.9; 84368498  | -96            | G/T | T=0.1056/529  | Reverse |
| 69 | ANO         | rs12378361  | Ch.9; 84368757  |                 | -259           | G/T | T=0.1212/607  |         |
| 70 | ANO         | rs146575608 | Ch.9; 84369163  |                 | -665           | G/T | T=0.0016/8    |         |
| 71 | ANO         | rs534979238 | Ch.11; 66372019 | Ch.11; 66372476 | 457            | C/A | A=0.0002/1    | Reverse |
| 72 | ANO         | rs72557994  | Ch.11; 66372169 |                 | 307            | G/C | C=0.0373/187  |         |
| 73 | ANO         | rs12281049  | Ch.11; 66372383 |                 | 93             | A/G | G=0.0753/377  |         |
| 74 | ANO         | rs10999768  | Ch.10; 71318450 | Ch.10; 71319253 | -803           | T/C | C=0.1372/687  | Forward |
| 75 | ANO         | rs181262940 | Ch.10; 71318666 |                 | -587           | G/A | A=0.0086/43   |         |
| 76 | ANO         | rs4747148   | Ch.10; 71318690 |                 | -563           | T/G | G=0.2091/1047 |         |
| 77 | ANO         | rs67346255  | Ch.10; 71318902 | Ch.10; 71319253 | -351           | G/A | A=0.0178/89   | Forward |
| 78 | ANO         | rs72542476  | Ch.10; 71318950 |                 | -303           | T/C | C=0.0018/9    |         |
| 79 | ANO         | rs7924115   | Ch.10; 71319105 |                 | -148           | G/C | C=0.4028/2017 |         |
| 80 | ANO         | rs72542477  | Ch.10; 71319119 | Ch.10; 71319253 | -134           | C/G | G=0.0284/142  | Forward |
| 81 | ANO         | rs72542481  | Ch.10; 71319247 |                 | -6             | C/T | T=0.1086/544  |         |
| 82 | ANO         | rs17525188  | Ch.10; 71319390 |                 | 137            | G/A | A=0.4824/2416 |         |
| 83 | ANO         | rs41300554  | Ch.10; 71319472 | Ch.10; 71319253 | 219            | T/C | C=0.4836/2422 | Forward |
| 84 | ANO         | rs7067937   | Ch.10; 71319545 |                 | 292            | C/G | G=0.4824/2416 |         |
| 85 | ANO         | rs548503955 | Ch.17; 19533060 |                 | -794           | A/G | G=0.0002/1    |         |
| 86 | ANO         | rs111369428 | Ch.17; 19533393 | Ch.17; 19533854 | -461           | G/C | C=0.0076/38   | Forward |
| 87 | ANO         | rs2252281   | Ch.17; 19533874 |                 | 20             | T/C | C=0.3035/1520 |         |
| 88 | ANO         | rs61733934  | Ch.17; 19534026 |                 | 172            | C/T | T=0.0080/40   |         |

|                |    |             |            |                 |                 |      |     |               |         |
|----------------|----|-------------|------------|-----------------|-----------------|------|-----|---------------|---------|
| <i>SLC47A2</i> | 89 | ANO-intron1 | rs4925045  | Ch.17; 19716128 | Ch.17;19716730  | 602  | G/C | C=0.3133/1569 | Reverse |
|                | 90 | ANO         | rs12943590 | Ch.17; 19716685 |                 | 45   | G/A | A=0.3155/1580 |         |
|                | 91 | ANO         | rs34834489 | Ch.17; 19716951 |                 | -221 | G/A | A=0.2694/1349 |         |
| <i>SLCO1A2</i> | 92 | ANO-exon1   | rs10841795 | Ch.12; 21334610 | Ch.12; 21334898 | 288  | A/G | G=0.0515/258  | Reverse |
|                | 93 | ANO         | rs3764043  | Ch.12; 21335070 |                 | -172 | C/T | T=0.0877/439  |         |
|                | 94 | ANO         | rs58502637 | Ch.12; 21335091 |                 | -193 | A/G | G=0.0276/138  |         |
|                | 95 | ANO         | rs61364007 | Ch.12; 21335141 |                 | -243 | G/A | A=0.0118/59   |         |

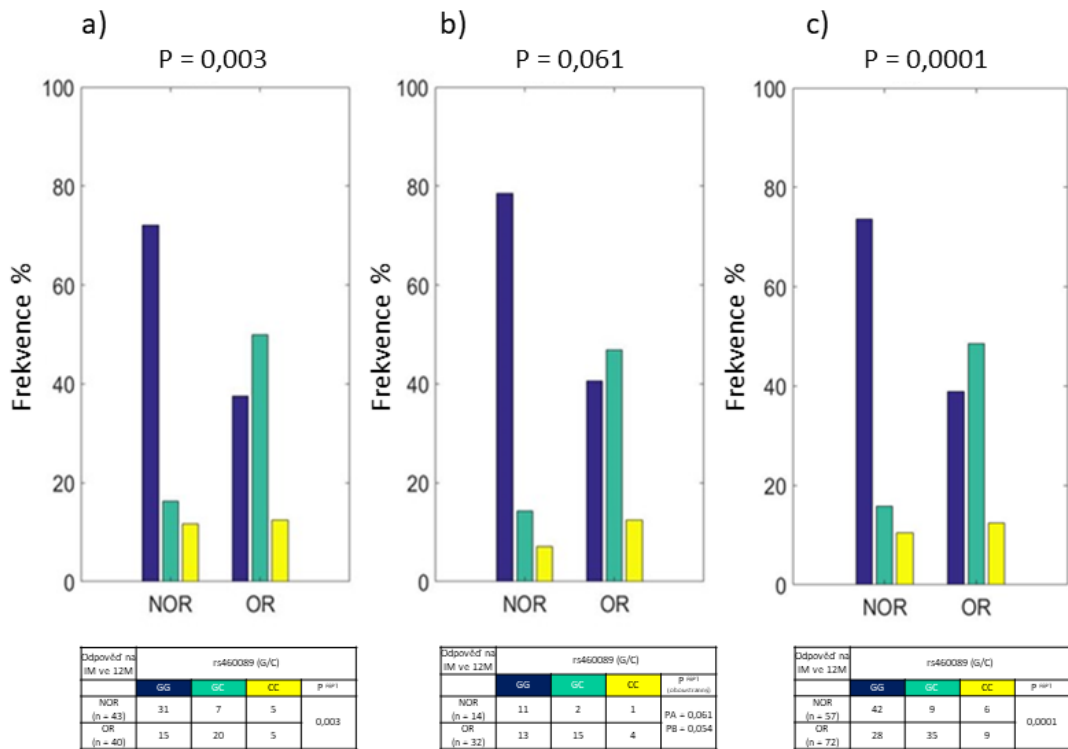
Pro jednodušší vizualizaci výsledků jsme na základě odpovědi pacientů na léčbu IM ve 12. měsíci od zahájení léčby vytvořili color mapu, kde každý čtvereček znázorňuje každý genotypovaný SNP pro každého pacienta (obrázek 3). Již tato vizualizace naznačovala asociaci některých SNP k odpovědi na léčbu. Fisherovým exaktním testem pravděpodobnosti (FEPT) jsme našli 2 SNP (rs460089; rs460271) v promotoru genu *SLC22A4*, které byly signifikantně asociovány s odpovědí pacientů na léčbu IM ve 12. měsíci od zahájení léčby. Tyto 2 SNP jsou navzájem ve vysoké vazebné nerovnováze, z čehož plyne, že typ alely jednoho SNP přesně předvídá typ alely ve druhém SNP, proto jsme pro další měření využívali jen SNP v tabulce 12 označené jako č. 29 rs460089 G/C. Na základě analýzy FEPT jsme zjistili, že frekvence genotypu GG SNP rs460089 se signifikantně častěji objevuje ve skupině pacientů s neoptimální odpovědí na IM, naopak genotyp GC je signifikantně častější u pacientů s optimální odpovědí na IM ( $P = 0,003$ ; obrázek 4). Pro 5 dalších SNP (rs4646298; rs13180169; rs13180186; rs13180043; rs13180295), v tabulce 12 označených jako č. 35-39, nacházejících se v promotoru zahrnující i 5' UTR oblast genu *SLC22A5*, které se zdály asociované s odpovědí na léčbu IM, nebyl FEPT signifikantní. I těchto 5 SNP bylo ve vzájemné vysoké vazebné nerovnováze a k analýze byl vybrán zástupce rs13180043. Pro validaci asociace odpovědi na léčbu IM s SNP rs460089 jsme vytvořili kohortu dalších 46 pacientů. Výsledky FEPT pro jednotlivé frekvence alel rs460089 a typu odpovědi na léčbu nebyly u této samostatné skupiny signifikantní, což pravděpodobně souviselo s malým počtem pacientů ( $P = 0,061$ ; obrázek 4). FEPT jsme tedy provedli na sloučené kohortě celkem 129 pacientů a potvrdili jsme signifikantní asociaci rs460089 s odpovědí na léčbu IM ( $P = 0,0001$ ; obrázek 4). Frekvence GG v rs460089 byla signifikantně četnější u skupiny pacientů neoptimálně odpovídajících na léčbu IM, na rozdíl o genotypu GC, který byl signifikantně častější u pacientů s optimální odpovědí. Výsledky pro genotyp CC nebylo možné relevantně hodnotit z důvodu velice nízké frekvence těchto alel v běžné evropské populaci, zahrnující i pacienty s CML. Výsledky pro SNP rs13180043 v promotoru *SLC22A5* nebyly signifikantní ani na společné skupině pacientů ( $P = 0,204$ ; obrázek 5a). Na základě publikace Angeliny et al. (Angelini S. et al., 2013) a jejím výsledkům o roli SNP rs1050125 lokalizovaném v exonu 9 v genu *SLC22A4*, který měl souvislost s odpovědí na léčbu IM u pacientů s CML, jsme genotypovali i tento SNP. Bylo pozorováno větší zastoupení genotypu CT tohoto SNP u pacientů s optimální odpovědí na IM, ale FEPT pro jednotlivé frekvence alel nebyl signifikantní ( $P = 0,119$ ; obrázek 5b).

Obrázek 3: Color mapa distribuce genotypů stanovených NGS u nalezených SNP v 19 promotorových oblastí ABC a SLC genů u 83 pacientů s optimální a neoptimálně odpovědí na léčbu IM po 12 měsících.



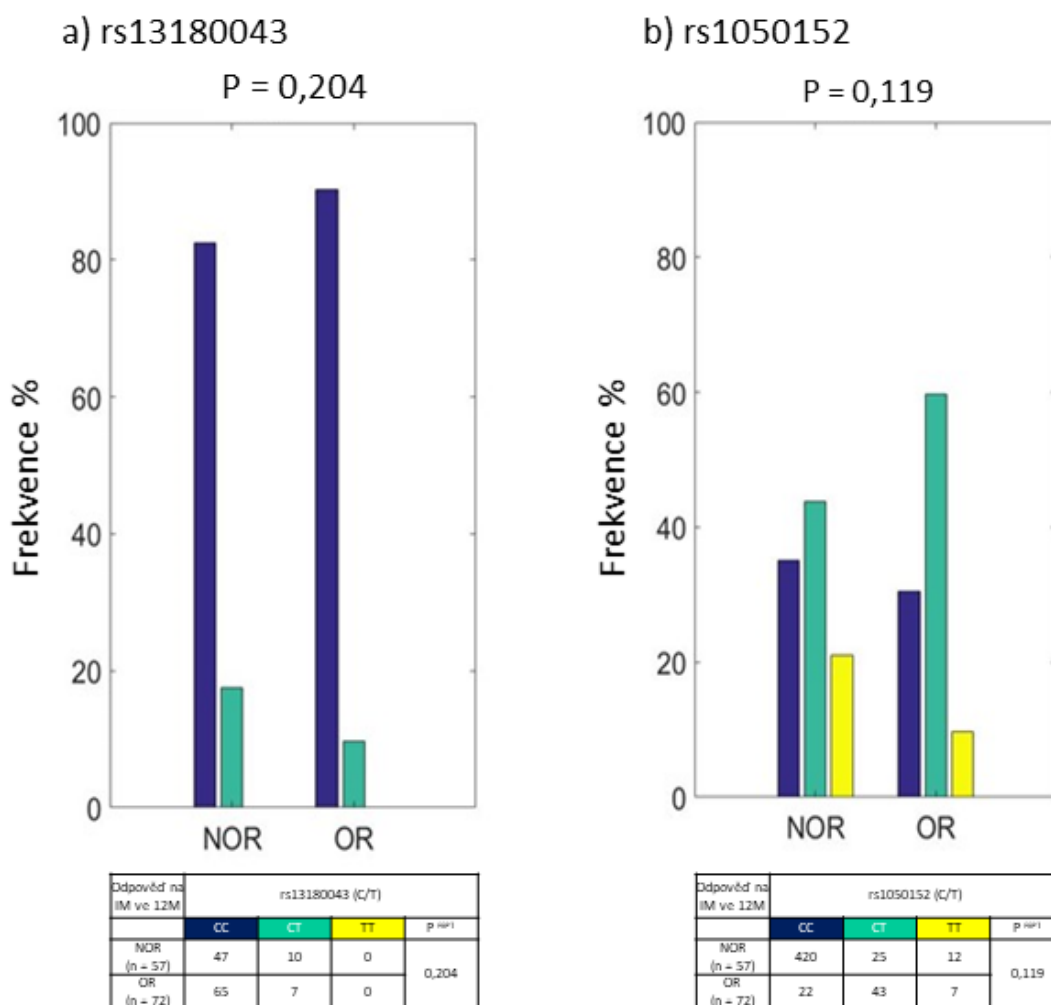
Každý čtverec znázorňuje každý genotypovaný SNP pro každého pacienta. Červené čtverce = homozygoti minoritních alel; růžové čtverce = heterozygoti; bílé čtverce = homozygoti majoritních alel; šedé čtverce = neanalyzováno

Obrázek 4: Frekvence genotypů rs460089 u pacientů s optimální a neoptimální odpovědí na imatinib po 12 měsících; a) iniciační kohorta pacientů; b) přidaná kohorta pacientů; c) sloučení obou kohort pacientů.



IM: imatinib; NOR: pacienti neodpovídající optimálně; OR: pacienti s optimální odpovědí;  
FEPT: Fischer exact probability test

Obrázek 5: Frekvence genotypů a) rs13180043 a b) rs1050152 u pacientů s optimální a neoptimální odpovědí na IM po 12 měsících od zahájení léčby. Výsledek pro sloučenou kohortu pacientů.



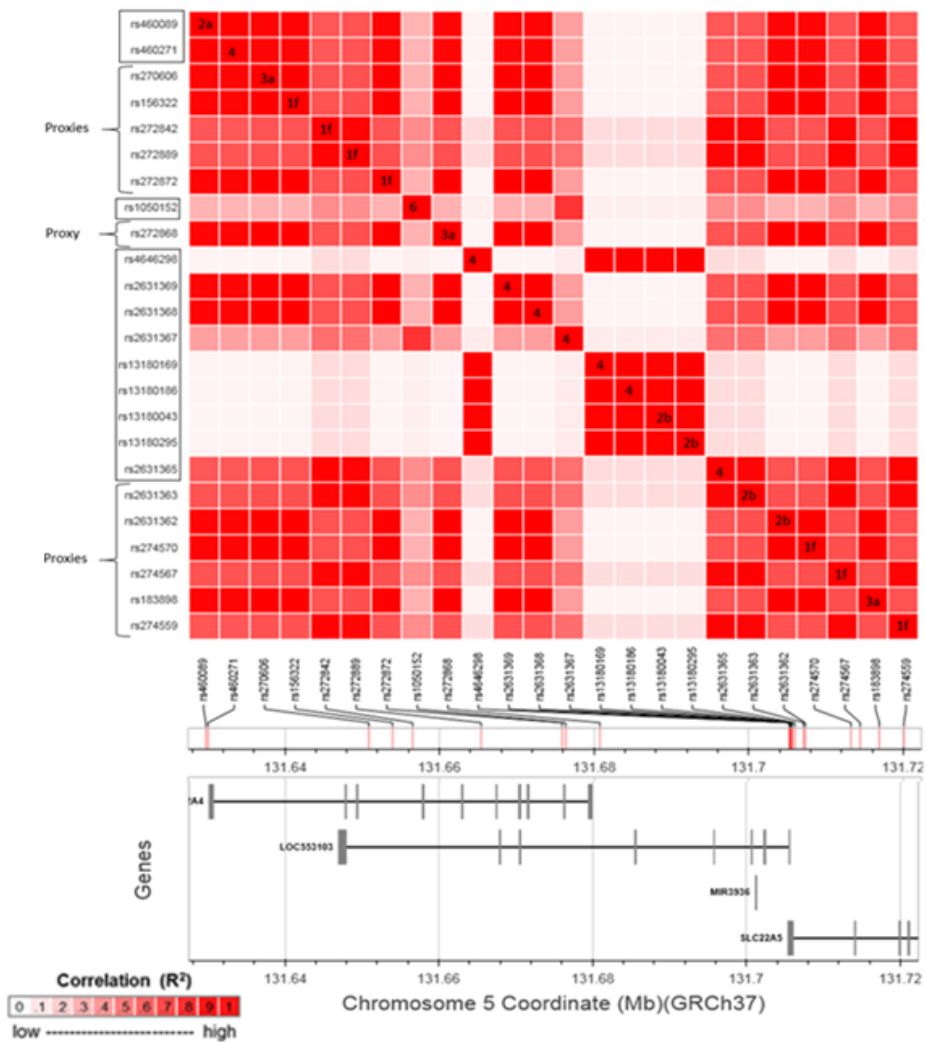
IM: imatinib; NOR: pacienti neodpovídající optimálně; OR: pacienti s optimální odpovědí;  
FEPT: Fischer exact probability test

## 4.2 Analýzy vazebné nerovnováhy

S nalezenými SNP v promotorech genu *SLC22A4* a *SLC22A5* jsme provedli analýzu vazebné nerovnováhy. Vazebná nerovnováha je nenáhodná asociace mezi alelami dvou a více lokusů, čehož se dá využít ve vazebných analýzách např. mezi markerem a funkčními polymorfismy. Z analýzy jsme vyloučili SNP rs60978556, rs369724970 a rs202088921 nacházející se v promotoru genu *SLC22A5*, z důvodu velmi malé frekvence zastoupení minoritních alel, které byly nalezeny pouze u 4 pacientů ze 129. Naopak do analýzy byl přidán již dříve zmiňovaný SNP rs1050152 nacházející se v exonu 9 genu *SLC22A4*, který byl Angelini et al. (Angelini S. et al., 2013) reportován jako SNP mající vliv na odpověď na léčbu IM. Pomocí

nástroje LDmatrix jsme z analyzovaných SNP vytvořili interaktivní heatmapu, ukazující studované SNP s jejich takzvanými proxy, tedy SNP ve významné vazebné nerovnováze (Obrázek 6). Objevili jsme dvě skupiny SNP, které se nacházejí ve významné vazebné nerovnováze s SNP, které leží dle databáze RegulomeDB (Boyle A.P. et al., 2012) v anotovaných regulačních oblastech obou genů ( $R^2 = 0,98-1,0$ ;  $P < 0,0001$ ). Jedná se o skupinu genotypovaných SNP v promotoru genu *SLC22A4* rs460089, rs4602271 a *SLC22A5* rs2631369 a rs2631368, které jsou ve významné vazebné nerovnováze ( $R^2 = 0,98-1,0$ ;  $P < 0,0001$ ) se 7 SNP ležícími v regulačních lokusech obou genů. Jedná se o SNP rs270606, rs156322, rs272872 a rs272868 v genu *SLC22A4* a rs2631362, rs274570 a rs183898 v genu *SLC22A5*. Druhou skupinu tvoří SNP promotoru *SLC22A5* rs2631365, který je ve významné vazebné nerovnováze ( $R^2 = 0,98-1,0$ ;  $P < 0,0001$ ) s 5 funkčními SNP ležícími v intronech obou genů. Jedná se o rs272842 a rs272889 v genu *SLC22A4* a rs2631363, rs274567 a rs274559 v genu *SLC22A5*. Dalšími zajímavými SNP byly analyzované SNP rs13180043 a rs13180295 ležící v nekódující oblasti genu *SLC22A5*, které jsou ve vzájemné významné vazebné nerovnováze ( $R^2 = 1,0$ ;  $P < 0,0001$ ), pro které nebyly nalezeny zajímavé proxies, ale dle databáze RegulomeDB jsou to pravděpodobná místa ovlivňující vazbu transkripčních faktorů. Podle Position-Weight Matrix (PWM) se na sekvenci v místě obou SNP, které byly nalezeny v genomu buněčných linií K562, váže transkripční faktor (TF) HIC1, známý jako lidský tumor supresorový gen. HIC1 funguje jako negativní modulátor signální dráhy Wnt, která reguluje osud buněk během embryonálního vývoje a její nefyziologická aktivace způsobuje rakovinné bujení v dospělosti (Valenta T. et al., 2006). Další velice důležitou skutečností, kterou nám databáze RegulomeDB ukázala je, že námi vytipované SNP rs460089 nacházející se v promotoru genu *SLC22A4* je také místo ovlivňující vazbu TF. Jedná se o místo, na které se dle PWM v buněčné linii K562 váže heterodimer MYC:MAX, který jako onkoprotein aktivuje transkripci a stimuluje buněčnou proliferaci. Poslední zařazený SNP do analýzy vazebné nerovnováhy a studovaný dle databáze RegulomeDB byl SNP rs1050152, který se nejvíce jeví jako pravděpodobný pro vazbu TF, stejně SNP v promotoru genu *SLC22A5* rs2631367 se kterým je ve významné vazebné nerovnováze ( $R^2 = 0,79$ ;  $P < 0,0001$ ). Na základě těchto analýz jsme se dále věnovali SNP rs460089, a rs2631365 a rs13180043.

Obrázek 6: Ukázka interaktivní heatmapy vazebné nerovnováhy genotypovaných SNP a jejich proxies. SNP v boxech byly genotypovány.



Skóre RegulomeDB u jednotlivých SNP, odráží míru pravděpodobnosti ovlivnění vazby transkripčních regulačních proteinů, motivů DNA a struktury chromatinu. 1f - eQTL + TF binding / DNase peak; 2a - TF binding + matched TF motif + matched DNase Footprint + Dnase peak; 2b - TF binding + any motif + DNase Footprint + DNase peak; 3a - TF binding + any motif + DNase peak; 4 - TF binding + DNase peak; 6 - other

### 4.3 Genotyp SNP rs460089 promotoru *SLC22A4* ovlivňuje odpověď na léčbu imatinibem

Testovali jsme, zda genotypy vytipovaných SNP rs460089, rs2631365 nebo rs13180043 jsou asociovány s dosažením časné molekulární odpovědi (EMR), která je definována jako hladina transkriptu *BCR::ABL1*  $\leq 10$  % po 3 měsících léčby (Baccarani M. et al., 2013). Údaje pro zhodnocení EMR byly k dispozici pro 117 ze 129 pacientů. V tomto měření se nám nepodařilo najít významnou souvislost mezi genotypy a dosažením EMR jak ukazuje tabulka 13. Musíme si však uvědomit, že EMR je definováno na základě pouze jediného měření hladiny transkriptu



*BCR::ABL1/GUSB*, přičemž variabilita v jediném měření může EMR ovlivnit. Vypočetli jsme tedy *BCR::ABL1* halving time (HT) v 6 měsících, kdy bylo možné měřit hladiny transkriptu *BCR::ABL1/GUSB* hned ze tří po sobě jdoucích měření (v době zahájení léčby IM, ve 3 měsících a v 6 měsících léčby) u 119 pacientů ze 129. Zjistili jsme, že genotyp rs460089-GC byl spojen s významně kratším HT6 hladiny *BCR::ABL1* ve srovnání s genotypem rs460089-GG ( $P < 0,0001$ ). Pro další sledované SNP rs2631365 a rs13180043 nebyl nalezen signifikantní rozdíl mezi genotypy a HT6 *BCR::ABL1*. Výsledky ukazuje tabulka 14.

Tabulka 13: Rozdíl ve frekvenci genotypů rs460089, rs2631365, rs13180043 mezi pacienty s EMR a non EMR.

|                    | EMR n=86                  | Non-EMR n=31 |
|--------------------|---------------------------|--------------|
| <hr/>              |                           |              |
| Genotyp rs460089   |                           |              |
| GG                 | 42                        | 19           |
| GC                 | 33                        | 8            |
| CC                 | 11                        | 4            |
|                    | $P^{\text{FEPT}} = 0,470$ |              |
| <hr/>              |                           |              |
| Genotyp rs2631365  |                           |              |
| TT                 | 31                        | 12           |
| TC                 | 45                        | 14           |
| CC                 | 10                        | 5            |
|                    | $P^{\text{FEPT}} = 0,671$ |              |
| <hr/>              |                           |              |
| Genotyp rs13180043 |                           |              |
| CC                 | 77                        | 25           |
| CT                 | 9                         | 6            |
| TT                 | 0                         | 0            |
|                    | $P^{\text{FEPT}} = 0,470$ |              |

<sup>FEPT</sup> Fischer exact probability test

Tabulka 14: Asociace mezi genotypy rs460089, rs2631365, rs13180043 a HT *BCR::ABL1* v 6 měsících

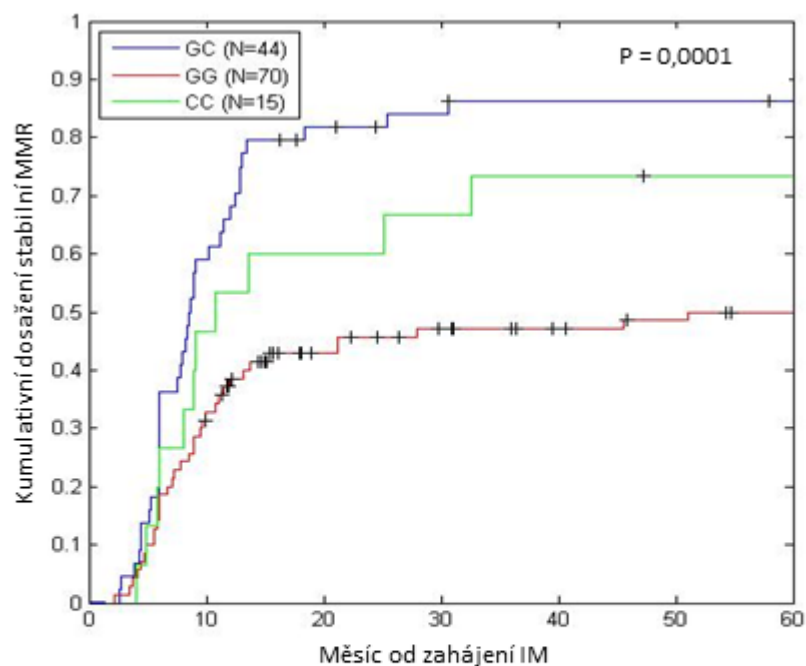
| Genotyp rs460089a                          | GG         | GC         |
|--|------------|------------|
| HT6 medián ve dnech (počet)                | 33,1 (61)  | 21,25 (43) |
| Medián = 27,0 / $P^{\text{MMT}} < 0,00001$ |            |            |
| Genotyp rs2631365a                         | TT         | TC         |
| HT6 medián ve dnech (počet)                | 32,29 (44) | 25,41 (54) |
| Medián = 27,4 / $P^{\text{MMT}} = 0,223$   |            |            |
| Genotyp rs13180043 <sup>a</sup>            | CC         | CT         |
| HT6 medián ve dnech (počet)                | 26,4 (100) | 28,34 (17) |
| Medián = 27,0 / $P^{\text{MMT}} = 0,177$   |            |            |

<sup>a</sup> homozygot pro minoritní alelu nebyl z důvodu nízkých čísel zahrnut

<sup>MMT</sup> Mood's median test

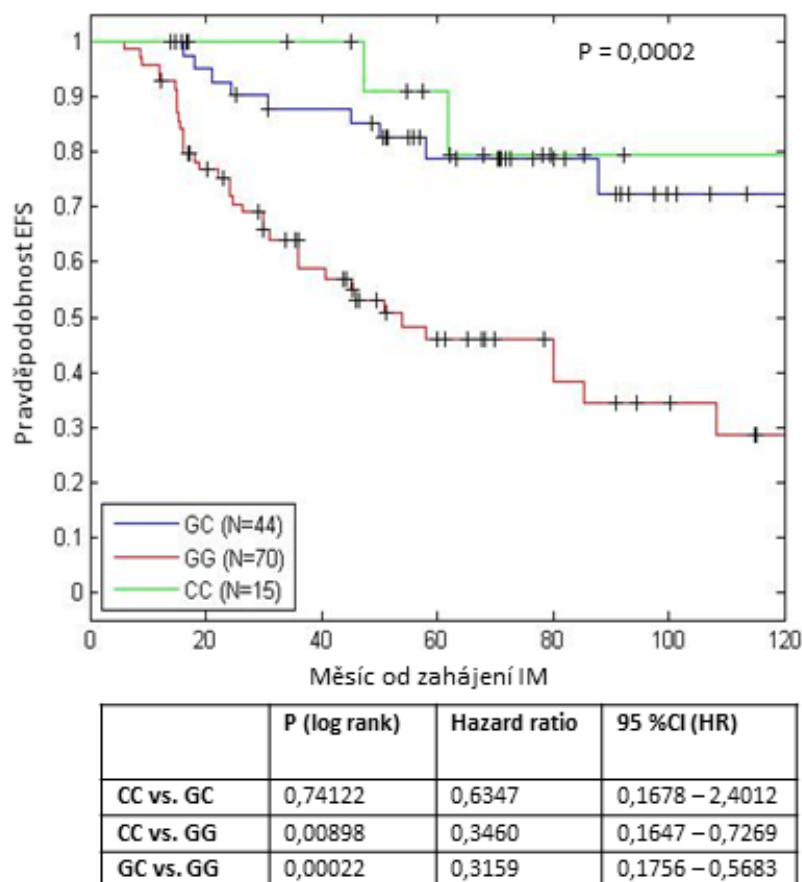
Dalším důležitým zjištěním bylo, že pacienti s genotypem rs460089-GC mají signifikantně významnější kumulativní dosažení MMR než pacienti s genotypem rs460089-GG (Obrázek 7). Pacienti s genotypem rs460089-GC měli také významně vyšší pravděpodobnost přežití bez události (EFS), čímž je myšleno: ztráta odpovědi, rozvoj *BCR::ABL1* mutací rezistentních k léčbě, progresi nebo úmrtí v souvislosti s CML v průběhu léčby IM; než pacienti s genotypem rs460089-GG (obrázek 8). Výsledky pro zbývající genotyp rs460089-CC nelze spolehlivě interpretovat pro malou frekvenci výskytu.

Obrázek 7: Kumulativní dosažení stabilní MMR během léčby IM ve spojení s genotypy rs460089. Údaje v tabulce ukazují pravděpodobnost dosažení MMR ve 12, 18 a 24 měsíci od zahájení užívání IM



|    | 12 M     | 18 M   | 24 M     |
|----|----------|--------|----------|
| GC | 0,6591   | 0,7955 | 0,8182   |
| GG | 0,3714   | 0,4286 | 0,4571   |
| CC | 0,5333   | 0,6000 | 0,6000   |
| P  | < 0,0001 | 0,0001 | < 0,0001 |

Obrázek 8: Pravděpodobnost přežití bez události během léčby IM ve spojení s genotypy rs460089



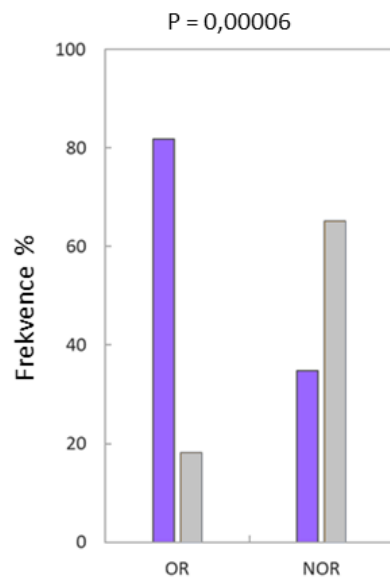
#### 4.3.1 Kombinace genotypů SNP promotorů *SLC22A4* a *SLC22A5* ovlivňuje odpověď na léčbu imatinibem

Jak již bylo zmíněno výše, jako další zajímavý SNP, který by mohl mít souvislost s odpovědí na léčbu IM u pacientů s CML je SNP rs2631365 (promotorová oblast *SLC22A5*), který jsme genotypovali na celkové kohortě 129 pacientů. Jako samostatný predikční faktor tento SNP nebyl signifikantní, ale dle provedeného FEPT hraje významnou roli v kombinaci s SNP rs460089. Podařilo se nám prokázat, že genotyp SNP rs2631365-TC, který mělo 60 pacientů z celkem 129 vyšetřených, souvisí s odpovědí na léčbu IM. Kombinovaný genotyp rs460089-GG\_rs2631365-TC byl signifikantně častější u pacientů s neoptimální odpovědí na léčbu IM, zatímco genotyp rs460089-GC\_rs2631365-TC byl významně častější u pacientů s optimální odpovědí ( $P = 0,00006$ ; obrázek 9), významnost tohoto rozdílu byla větší, než pokud se jednalo pouze o dříve zmiňovaný genotyp SNP rs460089. Podobné výsledky jsou i spojené s významně delším HT v 6 měsících, kdy pacienti s nepříznivým kombinovaným genotypem rs460089-GG\_rs2631365-TC byli spo-

jeni s významně delším *BCR::ABL1* HT v 6 měsících ve srovnání s pacienty nesoucí kombinovaný genotyp rs460089-GC\_rs2631365-TC ( $P = 0,004$ ; tabulka 15). Obdobně je tomu u kumulativního dosažení stabilní MMR a pravděpodobnosti přežití bez události. Kombinovaný genotyp rs460089-GC\_rs2631365-TC byl spojen s vyšší kumulativní pravděpodobností dosažení stabilní MMR během léčby IM ve srovnání s kombinovaným genotypem rs460089-GG\_rs2631365-TC ( $P < 0,0001$ ; obrázek 10). Pacienti s genotypem rs460089-GC\_rs2631365-TC měli vyšší pravděpodobnost EFS ve srovnání s pacienty s rs460089-GG\_rs2631365-TC ( $P < 0,0001$ ; obrázek 11).

Třetí zajímavý SNP, který je ve významné vazebné nerovnováze a může hrát úlohu v regulaci exprese přenašečů IM je rs13180043. Dle provedeného FEPT jsme zjistili, že frekvence kombinovaného genotypu SNP rs460089-GC\_rs13180043-CC je významně vyšší u pacientů s optimální odpovědí na léčbu IM ve 12 měsících než u pacientů na léčbu odpovídajících neoptimálně (tabulka 16). Podobně HT v 6 měsících byl u pacientů s příznivým kombinovaným genotypem rs460089-GC\_rs13180043-CC kratší než u pacientů s kombinovaným genotypem rs460089-GG\_rs13180043-CC (tabulka 17). Je nutné ale poznamenat, že 35 pacientů z 38, kteří měli příznivý kombinovaný genotyp rs460089-GC\_rs13180043-CC, nesli také genotyp rs2631365-TC, a pouze 10 pacientů z 56 s kombinovaným genotypem rs460089-GG\_rs13180043-CC mělo také genotyp rs2631365-TC.

Obrázek 9: Frekvence genotypů rs460089\_rs2631365 u pacientů s optimální a neoptimální odpovědí na imatinib po 12 měsících.



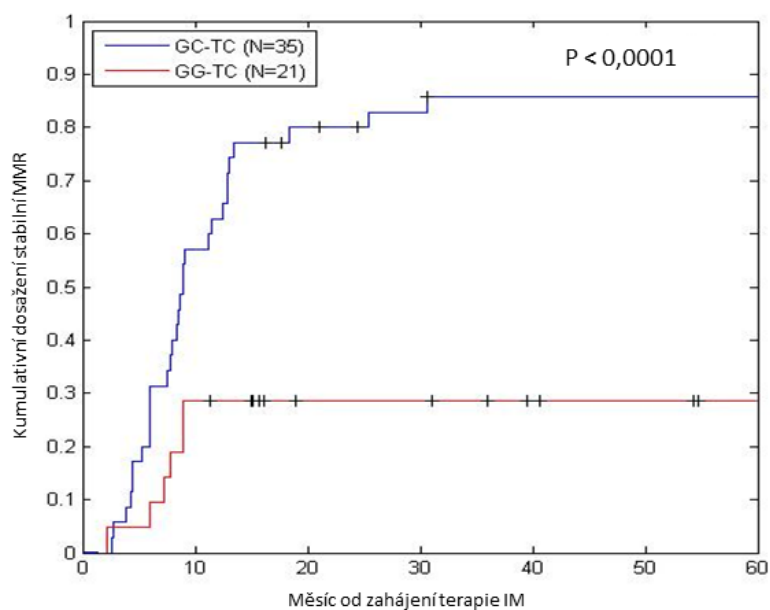
| Odpověď na IM ve 12M | rs460089 (G/C)_rs2631365 (T/C) |       | p <sup>FEPT</sup> |
|----------------------|--------------------------------|-------|-------------------|
|                      | GC_TC                          | GG_TC |                   |
| OR (n=33)            | 27                             | 6     | 0,00006           |
| NOR (n=23)           | 8                              | 15    |                   |

IM: imatinib; NOR: pacienti neodpovídající optimálně; OR: pacienti s optimální odpovědí; <sup>FEPT</sup>: Fischer exact probability test

Tabulka 15: Rozdíl v *BCR::ABL1* halving time v 6. měsíci a kombinací genotypu rs460089\_rs2631365

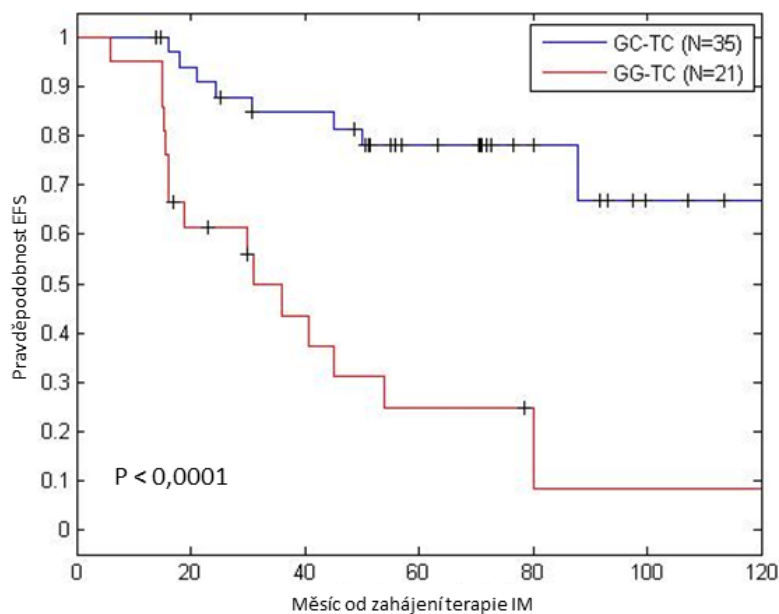
| Genotyp rs460089_rs2631365                | GG_TC      | GC_TC      |
|---|------------|------------|
| HT6 medián ve dnech (počet)               | 36,34 (18) | 21,48 (34) |
| Medián = 25,41 / P <sup>MMT</sup> = 0,004 |            |            |

Obrázek 10: Kumulativní dosažení stabilní MMR během léčby IM ve spojení s kombinací genotypů rs460089\_rs2631365



|       | 12 M    | 18 M    | 24 M    |
|-------|---------|---------|---------|
| GC-TC | 0,6286  | 0,7714  | 0,8000  |
| GG-TC | 0,2857  | 0,2857  | 0,2857  |
| P     | 0,00006 | 0,00006 | 0,00006 |

Obrázek 11: Pravděpodobnost přežití bez události během léčby IM ve spojení s kombinací genotypů rs460089\_rs2631365



|                 | p log rank | HR     | 95 %CI (HR)      |
|-----------------|------------|--------|------------------|
| GC-TC vs. GG-TC | 0,00001    | 9,1943 | 3,6203 – 23,3500 |

Tabulka 16: Rozdíl mezi frekvencí genotypu rs460089 u pacientů s optimální a neoptimální odpovědí na IM ve 12. měsíci při nosičství genotypu rs1318004-CC

| Genotyp rs460089_rs13180043 | GG_CC | GC_CC | CC_CC |
|-----------------------------|-------|-------|-------|
| Odpověď na IM ve 12 měsíci  |       |       |       |
| optimální odpověď           | 26    | 30    | 9     |
| neoptimální odpověď         | 33    | 8     | 6     |

$P^{\text{FEPT}} = 0,0023$

Tabulka 17: Rozdíl v *BCR::ABL1* halving time v 6. měsíci a kombinaci genotypu rs460089\_rs13180043

| Genotyp rs460089_rs13180043 | GG_CC      | GC_CC      |
|-----------------------------|------------|------------|
| HT6 medián ve dnech (počet) | 33,15 (50) | 21,25 (37) |

Medián = 27,10 /  $P^{\text{MMT}} = 0,002$

## 4.4 SNP rs460089 je nezávislý prediktivní faktor odpovědi na léčbu CML

Vzhledem k tomu, že SNP v promotoru genu *SLC22A4* rs460089 ve výše provedených analýzách vycházelo jako nejsilnější predikující faktor odpovědi na léčbu CML imatinibem, chtěli jsme tyto výsledky potvrdit další analýzou. Provedli jsme tedy univariantní a následně multivariantní analýzu parametrů předpovídajících odpověď na léčbu IM. Jako nezávislé faktory do těchto analýz byly zařazeny riziková skóre CML dle Sokala, Hasforda a EUTOS skóre, dále denní dávka IM a tři SNP v promotorech genů *SLC22A4* a *SLC22A5* rs460089, rs2631365 a rs13180043. Nezávislé faktory z univariantní analýzy, které měly  $P < 0,05$  byly zařazeny do analýzy multivariantní. Pro obě analýzy bylo vypočítáno jak odds ratio (OR) tak hazard ratio (HR), jak ukazuje tabulka 18. Jako cílový bod multivariantní analýzy bylo zvoleno dosažení MMR, které bylo hodnoceno logistickou regresí a EFS, které bylo analyzováno Coxovým modelem proporcionálních rizik. Z výsledků multivariantní analýzy vyšel genotyp SNP rs460089-GC jako prediktivní faktor pro dosažení MMR ve všech časových bodech ve srovnání s genotypem rs460089-GG (OR pro rs460089-GC bylo 0,28; 95 % CI = 0,06–0,42;  $P = 0,0003$ ). Podobně, genotyp rs460089-GC predikoval lepší EFS než genotyp rs460089-GG (pro rs460089-GC bylo HR 0,28; 95 % CI = 0,14–0,59;  $P = 0,0008$ ). Pro zbývající



genotyp rs460089-CC výsledky nelze spolehlivě interpretovat pro nízké zastoupení počtu pacientů s touto variantou. Můžeme tedy shrnout, že i multivariantní analýza určuje rs460089 jako nezávislý predikující faktor dosažení MMR a přežití bez události u pacientů s CML léčených IM (tabulka 18).

Tabulka 18: Univariantní a multivariantní analýza parametrů predikujících odpověď na léčbu imatinibem

| Univariate              | No MMR N (%) | MMR N (%) | OR    | 95 % CI OR   | P value | N   | Events N | HR   | CI (95 % HR) | P value |
|-------------------------|--------------|-----------|-------|--------------|---------|-----|----------|------|--------------|---------|
| imatinib dose           |              |           |       |              |         |     |          |      |              |         |
| imatinib 400 mg/day     | 33 (73)      | 75 (89)   | 0     | 0            | 0       | 108 | 37       | 0    | 0            | 0       |
| imatinib 200-300 mg/day | 12 (27)      | 9 (11)    | 2.86  | (1.16-7.89)  | 0.0251  | 21  | 11       | 1.64 | (0.84-3.23)  | 0.1482  |
| risk score              |              |           |       |              |         |     |          |      |              |         |
| Eutos Low               | 31 (72)      | 74 (88)   | 0     | 0            | 0       | 105 | 34       | 0    | 0            | 0       |
| Eutos High              | 12 (27)      | 10 (12)   | 2.86  | (1.12-7.32)  | 0.0452  | 22  | 12       | 1.53 | (1.10-2.13)  | 0.0121  |
| Sokal Low               | 13 (31)      | 42 (50)   | 0     | 0            | 0       | 55  | 17       | 0    | 0            | 0       |
| Sokal Intermediate      | 11 (26)      | 30 (36)   | 1.18  | (0.47-3.00)  | 0.8130  | 41  | 9        | 0.79 | (0.46-2.13)  | 0.5772  |
| Sokal High              | 18 (43)      | 12 (14)   | 4.85  | (1.86-12.65) | 0.0019  | 30  | 19       | 1.69 | (1.22-2.36)  | 0.0016  |
| Hasford Low             | 11 (26)      | 30 (36)   | 0     | 0            | 0       | 41  | 11       | 0    | 0            | 0       |
| Hasford Intermediate    | 18 (43)      | 47 (56)   | 0.104 | (0.43-2.52)  | 1.2000  | 65  | 21       | 1.13 | (0.55-2.35)  | 0.7344  |
| Hasford High            | 13 (31)      | 7 (8)     | 05.06 | (1.60-15.99) | 0.0058  | 20  | 13       | 1.71 | (1.14-2.55)  | 0.0095  |
| SNPs                    |              |           |       |              |         |     |          |      |              |         |
| rs460089                |              |           |       |              |         |     |          |      |              |         |
| GG                      | 35 (78)      | 35 (42)   | 0     | 0            | 0       | 70  | 37       | 0    | 0            | 0       |
| CC                      | 4 (9)        | 11 (13)   | 0.36  | (0.10-1.25)  | 0.1530  | 15  | 2        | 0.43 | (0.21-0.87)  | 0.0197  |
| GC                      | 6 (13)       | 38 (45)   | 0.15  | (0.06-0.43)  | <0.0001 | 44  | 9        | 0.28 | (0.13-0.58)  | 0.0006  |
| rs13180043              |              |           |       |              |         |     |          |      |              |         |
| CC                      | 35 (78)      | 77 (92)   | 0     | 0            | 0       | 112 | 41       | 0    | 0            | 0       |
| CT                      | 10 (2)       | 7 (8)     | 3.14  | (1.11-8.94)  | 0.0321  | 17  | 10       | 1.91 | (0.95-3.81)  | 0.0677  |



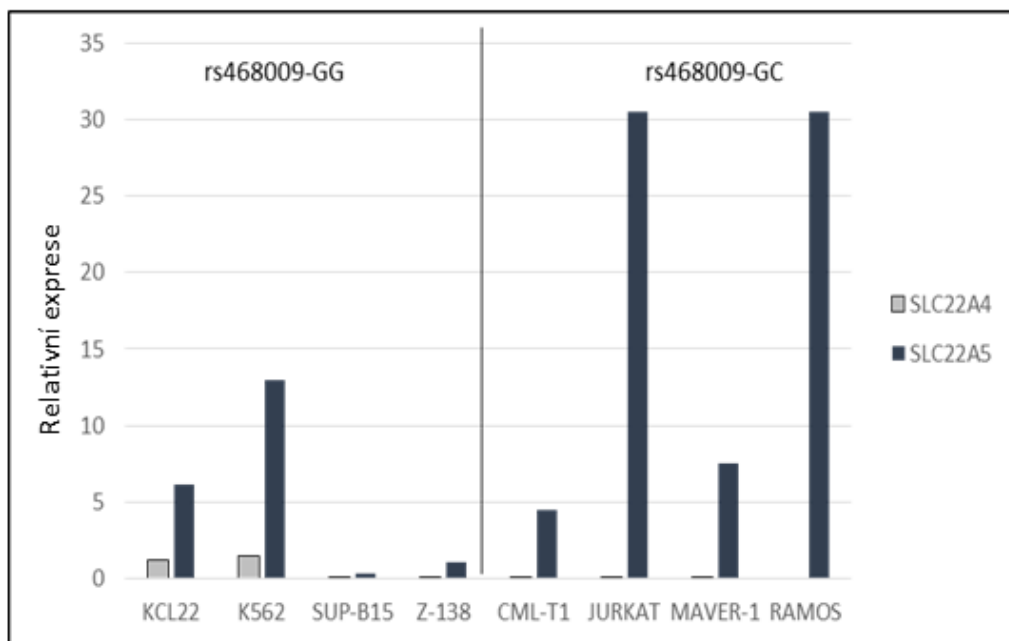
## 4.5 Měření exprese *SLC22A4* a *SLC22A5* u pacientů s CML a v buněčných liniích

Na základě výsledků předešlých měření, jsme se rozhodli provést měření exprese transkriptů genů *SLC22A4* a *SLC22A5* a zhodnotit rozdíl jejich exprese na základě genotypů SNP rs460089. Celkem byla měřena exprese u 70 pacientů nesoucí genotyp rs460089-GG a 44 pacientů nesoucí genotyp rs460089-GC. Rozdíl ve změřené expresi nebyl signifikantní. Vzhledem k tomu, že jako výchozí materiál pro měření exprese byla dostupná pouze RNA z lyzátu celkových leukocytů periferní krve, tedy směs různých typů zralých buněk bílé krevní řady, mohla být analýza ovlivněná rozdílnou expresí těchto genů v rámci buněčných subpopulací. Rozhodli jsme se tedy využít pro experiment buněčné linie odvozené z blastů pacientů v blastické fázi CML. Celkem bylo použito 8 buněčných linií, u kterých jsme genotypovali SNP rs460089 a rs2631365. 4 buněčné linie, konkrétně KCL22, K562, SUP-B15, Z-138 byly nositelkami genotypu rs460089-GG a 4 linie, CML-T1, JURKAT, MAVER-1 a RAMOS pak nositelkami genotypu rs460089-GC. 5 linií, KCL22, SUB-B15, JURKAT, MAVER-1 a RAMOS pak nesly i zkoumaný genotyp rs2631365-TC. Dále jsme měřili hodnoty exprese transkriptů obou genů. U všech testovaných buněčných linií jsme změřili významně nižší expresi genu *SLC22A4* než genu *SLC22A5* ( $P = 0,02$ ). Všechny 4 linie nesoucí genotyp rs460089-GG a 2 linie nesoucí genotyp rs460089-GC exprimovaly významně méně *SLC22A5* než zbylé 2 linie nesoucí genotyp rs460089-GC JURKAT a RAMOS (obrázek 12) Kombinovaný genotyp rs460089-GG\_ rs2631365-TC měly pouze 2 linie KCL22 a SUB-B15, které měly relativní expresi *SLC22A5* nižší než zbylé 3 linie nesoucí genotyp rs2631365-TC a to v kombinaci s genotypem rs460089-GC (obrázek 13). Tento výsledek nám naznačuje, že heterozygotní genotyp může mít vliv na regulaci transkripce genu *SLC22A5*, který jako transportér IM může ovlivňovat jeho intracelulární koncentraci.

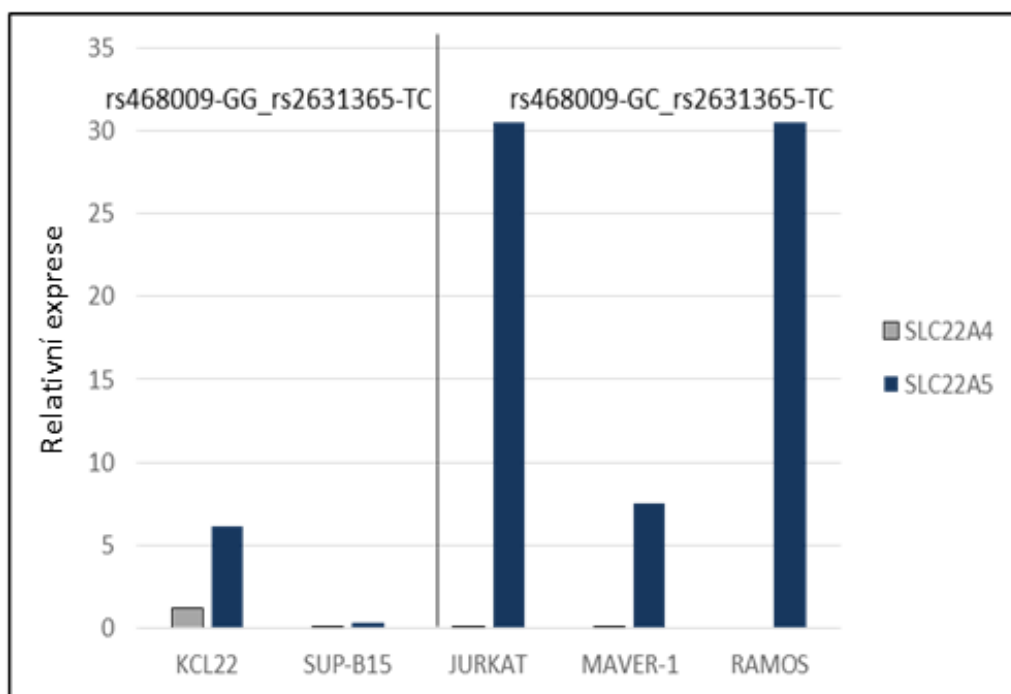
## 4.6 Validace TaqMan genotypovací eseje

Aby mohl být SNP rs460089 využit jako marker predikce odpovědi na léčbu CML, je nutné, aby jeho vyšetření bylo rychlé a levné, což obecně nabízejí komerčně dostupné TaqMan genotypovací eseje. Na neštěstí, obecně promotory genů jsou oblasti bohaté na sekvence nukleotidů G a C, které mohou bránit navrhnutí dobře fungujících primerů. Ne jinak je tomu v oblasti obklopující SNP rs460089. Komerční esej pro genotypování tohoto SNP nebyla dostupná a pokus o návrh vlastní eseje selhal právě z důvodu bohatosti okolní sekvence na nukleotidy G a C. Na základě znalostí o vazebné nerovnováze, jsme se rozhodli genotypovat SNP,

Obrázek 12: Relativní hladiny mRNA *SLC22A4* a *SLC22A5* ve všech 8 testovaných liniích.



Obrázek 13: Relativní hladiny mRNA u buněčných linií nesoucích genotypy rs460089-GG\_rs2631365-TC nebo rs460089-GC\_rs2631365-TC



který se nachází ve významné vazebné nerovnováze s rs460089, a to SNP rs156322 a využít komerčně vyráběnou TaqMan esej pro tento SNP, pro určení genotypu SNP rs460089. Abychom si byli jisti, že lze tuto metodu aplikovat, byla validována

na celkem 301 vzorcích pacientů zařazených do studie EURO-SKI. U všech 301 vzorků byla Sangerovou metodou provedena sekvenace ampliconu zahrnujícího promotorovou oblast genu *SLC22A4* a určen genotyp SNP rs460089. Následně pro stejné vzorky byla použita TaqMan genotypovací esej pro SNP rs156322, přičemž dle výsledků LD ( $R^2 = 0,981$ ) alela C SNP rs156322 predikuje alelu C SNP rs460089 a alela T rs156322 predikuje alelu G SNP rs460089. Výsledky sekvenace se u celkem 297 vzorků z 301 shodovaly s výsledky genotypovací eseje jak bylo predikováno analýzou LD. Pouze u 4 vzorků z 301 bylo dle genotypovací eseje využívající jako marker SNP rs156322 identifikováno SNP rs460089 jako GG genotyp, přímé sekvenování však ukázalo, že se jedná o genotyp GC. Tyto 4 vzorky byly identifikovány jako homozygoti TT v rs156322, ale jedna alela T nesegredovala s alelou G, ale s alelou C rs460089. Podrobnější analýzou dat bylo zjištěno, že 2 pacienti jsou asiaté, jeden pacient pochází z Řecka a jeden z Německa, ale o jejich rase nemáme přesnější informaci. Za použití LDlink bylo zjištěno, že korelace alel těchto dvou SNP je nižší u asijské populace s  $R^2 = 0,969$  než u evropské s  $R^2 = 0,981$ . Tuto validovanou esej jsme dále použili k určení genotypu rs460089 u dalších 103 vzorků, pocházejících od pacientů z Polska, majících evropský původ.

Frekvence genotypů rs460089 u 301 pacientů zařazených do EURO-SKI studie byla 48 % pro GG genotyp, 42 % pro GC genotyp a 11 % pro genotyp CC. Téměř totožné výsledky jsme pozorovali i u druhé skupiny pacientů pocházejících z Polska. GG genotyp byl pozorován u 45 % pacientů, GC u 43 % pacientů a CC pouze u 13 % pacientů. Celková frekvence alely G v SNP rs460089 se v naší analýze rovná 68 % a alely C 32 %. Toto rozložení frekvence alel v našem vzorku zahrnujícím 404 pacientů přesně odpovídá udávané frekvenci v evropské populaci (tabulka 12).

## 4.7 Genotypy rs460089 ovlivňují udržení molekulární remise u pacientů po vysazení imatinibu

Jak už bylo zmíněno výše, novým cílem léčby CML je udržení molekulární odpovědi i po vysazení léčby TKI. K tomu aby vysazení léčby bylo bezpečné, je nutné definovat jak vhodné pacienty, kterým lze léčbu vysadit, tak nastavit přesný protokol léčebného managementu těchto pacientů (za jakých okolností léčbu vysadit, pravidelné monitorování stavu choroby a v případě relapsu rychle reagovat a znovu zahájit terapii). K tomu slouží množství proběhlých i stále probíhajících studií. My jsme si chtěli ověřit, zda SNP rs460089, tedy jeho genotyp může hrát

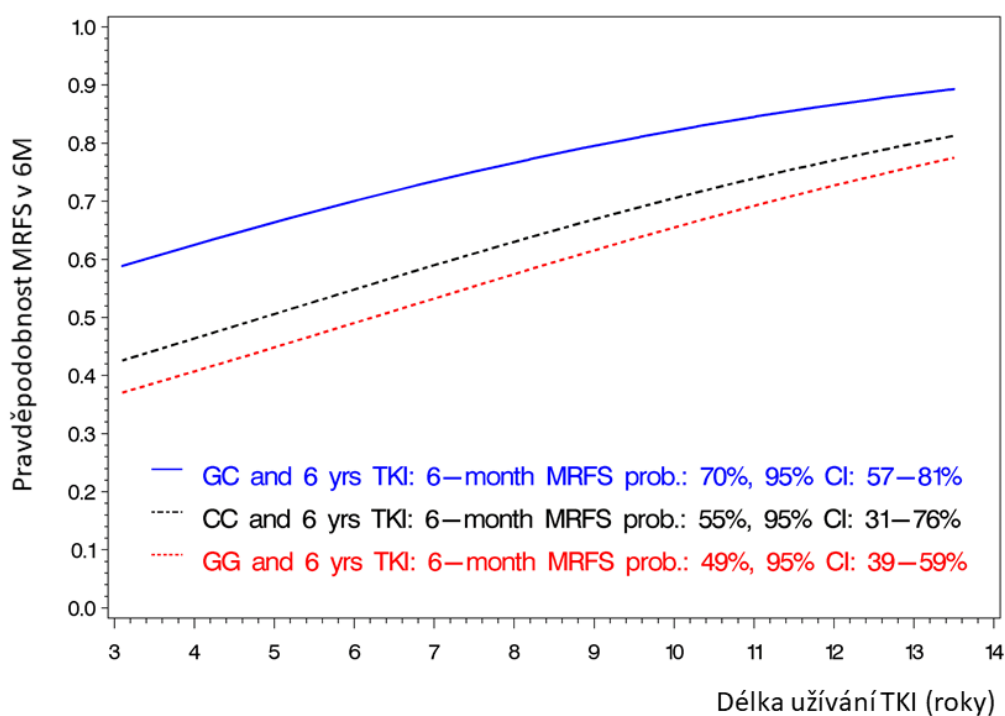
vliv na udržení molekulární odpovědi po vysazení IM. Pro analýzu jsme použili vzorky od pacientů zařazených do vysazujících studií EURO-SKI (tzv. learning kohorta) a polské vysazující studie, která sloužila pro validaci. Dle dostupnosti dat potřebných pro analýzu bylo finálně analyzováno 176 pacientů v learning kohortě a 93 pacientů ve validační kohortě (tabulka 7).

#### 4.7.1 Vliv genotypu rs460089 na udržení MMR po ukončení terapie TKI

Z celkem 176 vzorků byl genotyp rs460089-GG identifikován u 96 pacientů (55 %), genotyp GC u 62 (35 %) a CC genotyp u 18 (10 %) pacientů. Velkou molekulární odpověď si 6 měsíců po vysazení TKI udrželo 105 pacientů (60 %, 95 % CI: 52–67 %). Největší pravděpodobnost udržení MMR měli pacienti, kteří nesli genotyp rs460089-GC (73 %, 95 % CI: 60–82 %), následovali pacienti s genotypem CC (61 %, 95 % CI: 39–80 %) a nejmenší pravděpodobnost udržení MMR měli pacienti s genotypem GG (51 %, 95 % CI: 41–61 %). Celkově ve statistické analýze vyšlo SNP rs460089 jako signifikantně významný prediktivní marker pro udržení MMR po vysazení TKI ( $P = 0,0286$ ) s výrazně vyšší pravděpodobností u genotypu GC ve srovnání s genotypem GG (OR = 2,539, 95 % CI: 1,278–5,045,  $P = 0,0078$ ).  $P$  hodnota není signifikantní pro srovnání genotypu CC proti GG (OR = 1,507, 95 % CI: 0,539–4,216,  $P = 0,4343$ ) a ani při srovnání genotypu CC proti GC (OR = 1,684, 95 % CI: 0,539–4,216,  $P = 0,3527$ ). Vzhledem k tomu, že pacienti zařazení do této analýzy nebyli léčeni pouze IM, ale i dalšími TKI, zaměřili jsme se i na to, zda mohl mít vliv na udržení odpovědi právě typ TKI, které bylo vysazeno. Z celkového počtu 176 pacientů jich 150 bylo léčeno před vysazením imatinibem, 14 dasatinibem a 12 nilotinibem. Ke změně z imatinibu na TKI 2. generace nedošlo kvůli selhání terapie, ale z důvodů špatné tolerance IM pacienti. Mnohočetnou analýzou logistické regrese jsme neprokázali vliv typu vysazeného TKI v kombinaci s genotypem rs460089 na udržení MMR 6 měsíců po ukončení léčby, ale musíme podotknout, že se jedná o malý podíl pacientů, kteří byli léčeni TKI 2. generace. V této analýze jsme však pozorovali vliv délky užívání TKI před jeho vysazením ve spojení s genotypem SNP rs460089 (OR = 1,185, 95 % CI: 1,034–1,357,  $P = 0,0144$ ). Delší trvání léčby TKI sice zvýšilo pravděpodobnost udržení MMR 6 měsíců po jeho vysazení, přesto predikce jejího udržení pomocí genotypu SNP rs460089 zůstává signifikantní ( $P = 0,0442$ ). Vyšší pravděpodobnost udržení MMR 6 měsíců po vysazení mají pacienti s genotypem rs460089-GC než pacienti s genotypem GG (OR = 2,430, 95 % CI: 1,209–4,884,  $P = 0,0127$ ). Křivky pravděpodobnosti udržení MMR 6 měsíců po vysazení TKI v závislosti na délce léčby a genotypu shrnuje obrázek 14. Výsledek prokázaného

vlivu délky užívání TKI před jeho vysazením na udržení MMR je ve shodě s výsledky vysazovacích studií. Ve studii EURO-SKI vypočetli, že čas užívání TKI před jeho vysazením asociovaný s vyšší pravděpodobností udržení MMR 6 měsíců po vysazení je 5,8 let (Saussele S. et al., 2018). Na naší kohortě pacientů se ukázala pravděpodobnost udržení MMR alespoň 6 měsíců od vysazení TKI při 6 letém trvání léčby u genotypu GC 70 % (95 % CI: 57–81 %), u genotypu CC 55 % (95 % CI: 31–76 %) a u genotypu GG 49 % (95 % CI: 39–59 %) (obrázek 14).

Obrázek 14: Křivky pravděpodobnosti pro 6 měsíční udržení MMR po vysazení léčby TKI pro kombinaci jednotlivých genotypů SNP rs460089 a délky trvání léčby TKI před jejím vysazením

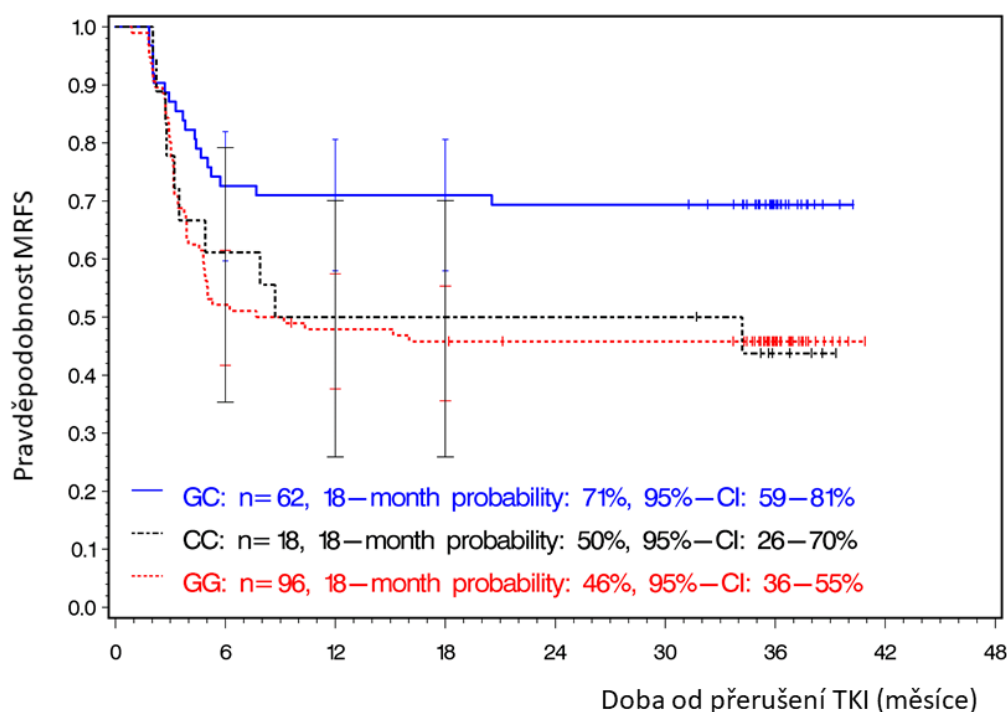


Dalším studovaným parametrem bylo přežití bez molekulárního relapsu (MRFS) po vysazení TKI. Medián délky pozorování byl 36 měsíců. Nejkratší doba sledování u pacienta, který neztratil MMR, byla 10 měsíců. Z celkem 105 pacientů, kteří udrželi MMR 6 měsíců po vysazení TKI, bylo pouze deset pacientů, u kterých došlo k pozdější ztrátě MMR. Celkově jsme na naší kohortě pacientů změřili pravděpodobnost bez molekulárního relapsu po dobu 18 měsíců na 55 % (95 % CI: 47–62 %). I tady jsme zkoumali, zda může SNP rs460089 predikovat pravděpodobnost MRFS a vyšlo nám, že jeho asociace s MRFS je signifikantní  $P = 0,0147$  (obrázek 15). Pacienti s genotypem GC, měli signifikantně vyšší pravděpodobnost MRFS než pacienti s genotypem GG (HR: 0,474, 95 % CI: 0,280–0,802,  $P = 0,0054$ ). Pravděpodobnost MRFS už nebyla signifikantní ve srovnání genotypů GC a CC (HR: 0,484, 95 % CI: 0,225–1,042,  $P = 0,0635$ ). Při využití Coxova modelu proporcionálních rizik přežití u MRFS vychází genotyp SNP rs460089-GC



mnohem prognosticky příznivější než genotyp GG. Logistická část modelu, která vyjadřuje poměr rizika ztráty MMR mezi genotypy GC a GG, byla signifikantní ve prospěch genotypu GC. Ukazuje, že podíl ztráty MMR u pacientů s genotypem GC je menší než u pacientů s genotypem GG (OR = 0,373; 95 % CI: 0,190–0,731, P = 0,0041). V analýze přežití se model zabývá tím, zda u pacientů, kteří ztratili MMR, měl genotyp SNP rs460089 vliv na délku trvání MMR od ukončení léčby TKI. V tomto případě jsme významnost mezi genotypy GC a GG SNP rs460089 nepozorovali (HR: 0,922, 95 % CI: 0,542–1,567, P = 0,7632). Tato pozorování jsou v souladu s průběhem Kaplan-Meierových křivek, jak ukazuje obrázek 15. Při použití vícenásobného Coxova modelu proporcionálních rizik přežití u MRFS s přidáním dalšího parametru do logistické části a to důležitého faktoru doby trvání léčby TKI, před jejím vysazením a do analýzy přežití, parametru věku v době vysazení TKI, se obraz výsledků nezměnil. Šance ztráty MMR byla menší u pacientů s genotypem GC než u pacientů s genotypem GG (OR = 0,373, 95 % CI: 0,185–0,752, P = 0,0058), kdežto typ genotypu rs460089 na dobu, kdy ke ztrátě MMR došlo, vliv neměl (HR = 0,911, 95 % CI: 0,536–1,559, P = 0,7307).

Obrázek 15: Pravděpodobnost přežití bez molekulárního relapsu po vysazení TKI v závislosti na typu genotypu SNP rs460089 u celkem 176 pacientů zařazených v learning kohortě

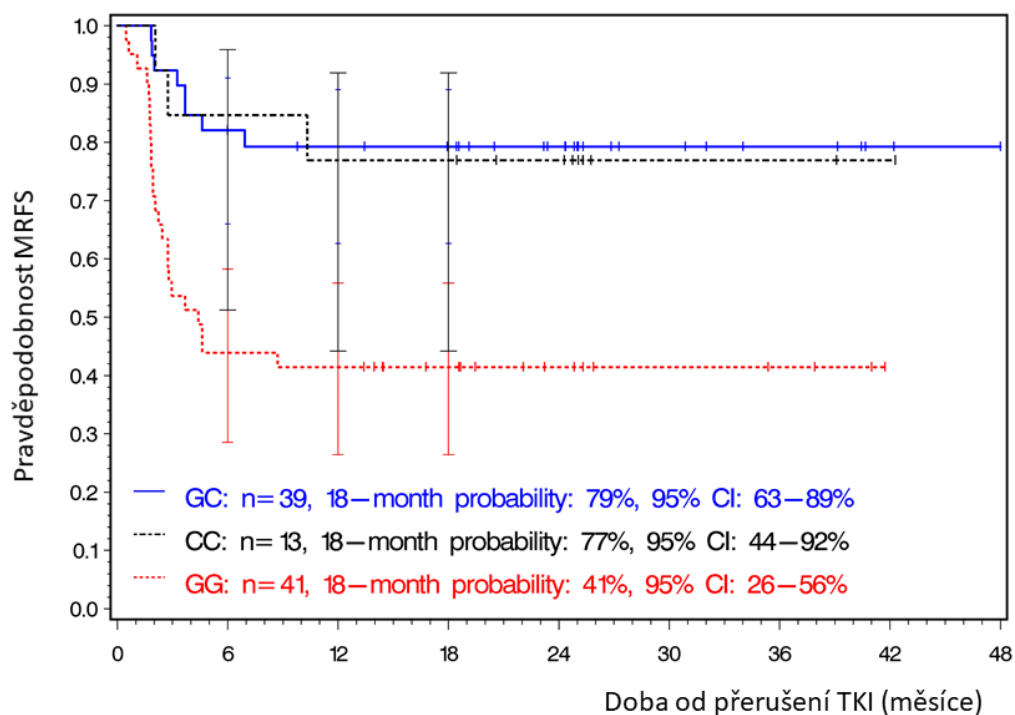


## 4.7.2 Validace SNP rs460089 jako markeru udržení MMR po ukončení terapie TKI

K tomu, abychom výše popsané výsledky potvrdili, jsme využili skupinu pacientů zařazených do databáze z polských vyřazovacích studií. Celkem se jednalo o 103 pacientů, u kterých byl vysazen IM a byly dostupné vzorky ke genotypování. Nakonec jsme museli 8 pacientů vyřadit pro předléčení INF-a a 2 pacienty pro chybějící klinická data. Celkem tedy bylo využito k validování výsledků vlivu genotypu SNP rs460089 na udržení MMR 6 měsíců po ukončení terapie IM a MRFS 93 pacientů, kteří splňovali vstupní kritéria. Základní data o validační skupině pacientů jsou v tabulce 7. Z 93 pacientů jich 61 (66 %, 95 % CI: 55–74 %) udrželo MMR 6 měsíců po vysazení IM. Pacienti, kteří nesli genotyp rs460089-GC měli pravděpodobnost udržení MMR 82 % (95 % CI: 67–91 %), pacienti s genotypem CC 85 % (95 % CI: 58–96 %) a nejmenší pravděpodobnost udržení MMR měli pacienti s genotypem GG 44 % (95 % CI: 41–61 %). Opět nám vyšla signifikantně významná asociace genotypu SNP rs460089 a udržení MMR 6 měsíců po ukončení terapie IM ( $P = 0,0009$ ). S významně vyšší pravděpodobností pro genotyp GC ve srovnání s genotypem GG ( $OR = 5,841$ , 95 % CI: 2,097–16,269,  $P = 0,0007$ ). Ve validační kohortě na rozdíl od pacientů zařazených do learning kohorty vyšla signifikantně významná pravděpodobnost udržení MMR 6 měsíců po ukončení léčby i ve srovnání genotypu CC s genotypem GG ( $OR = 7,027$ , 95 % CI: 1,380–35,794,  $P = 0,0189$ ). Tyto rozdílné výsledky u obou kohort pacientů u genotypu CC si vysvětlujeme značně menším podílem zastoupení tohoto genotypu v populaci. Pokud srovnáme genotyp CC s genotypem GC, významnost není signifikantní ( $OR = 0,831$ , 95 % CI: 0,150–4,615,  $P = 0,8326$ ). Po provedení vícečetné analýzy logistické regrese vyšla opět délka léčby IM před jeho vysazením spolu s genotypem SNP rs460089 jako signifikantní pro pravděpodobnost udržení MMR 6 měsíců po ukončení terapie ( $OR = 1,274$ , 95 % CI: 1,021–1,588,  $P = 0,0319$ ). Delší trvání léčby TKI výrazně zvýšilo pravděpodobnost udržení MMR 6 měsíců po vysazení, přesto predikce jejího udržení pomocí genotypu SNP rs460089 zůstává signifikantní ( $P = 0,0011$ ). Vyšší pravděpodobnost udržení MMR 6 měsíců po vysazení mají pacienti s genotypem rs460089-GC než pacienti s genotypem GG ( $OR = 5,998$ , 95 % CI: 2,075–17,339,  $P = 0,009$ ). Pokud srovnáme genotypy CC a GG vyjde nám na rozdíl od learning kohorty i tady významně vyšší pravděpodobnost udržení MMR u genotypu CC ( $OR = 7,767$ , 95 % CI: 1,473–40,939,  $P = 0,0157$ ). I u validační skupiny pacientů jsme hodnotili vliv genotypu rs460089 na MRFS. Medián sledování pacientů byl 25 měsíců. Minimální doba sledování pacientů bez molekulárního relapsu byla 6 měsíců. Pouze 3 pacienti ztratili molekulární odpověď po uplynutí 6 měsíců od vysazení IM. Pravděpodobnost MRFS

v 18 měsících od ukončení léčby IM byla 62 % (95 % CI: 51–71 %). A opět, stejně jak v předchozí skupině, jak ukazuje obrázek 16, byl SNP rs460089 signifikantně asociován s udržení MRFS po vysazení IM ( $P = 0,0011$ ). Pacienti s genotypem GC měli významně větší pravděpodobnost MRFS než pacienti s genotypem GG (HR: 0,252, 95 % CI: 0,113–0,561,  $P = 0,0007$ ), ne už ale ve srovnání s pacienty s genotypem CC (HR: 0,900, 95% CI: 0,239–3,395,  $P = 0,8769$ ). Ve validačním modelu s využitím dat od polských pacientů nám na rozdíl od výsledků pacientů v learning kohortě vyšla i významně signifikantní pravděpodobnost MRFS u pacientů s genotypem CC ve srovnání s pacienty s genotypem GG HR = 0,279 (95 % CI: 0,084–0,929,  $P = 0,0376$ ). Při využití Coxova modelu proporcionálních rizik přežití u MRFS se nám ukázalo, že pacienti s genotypem GC i CC mají nižší pravděpodobnost ztráty MMR než pacienti s genotypem GG. OR pro pacienty s genotypem GC je 0,186 (95 % CI: 0,069–0,502,  $P = 0,0009$ ) a u genotypu CC je OR = 0,213 (95 % CI: 0,051–0,890,  $P = 0,0340$ ). Podobně jako u pacientů zařazených do learning kohorty, u pacientů se ztrátou MMR neměl genotyp GC ani CC vliv na dobu trvání MMR po vysazení léčby. HR pro genotyp GC = 0,617 (95 % CI: 0,275–1,386,  $P = 0,2425$ ), pro genotyp CC se HR = 0,341 (95 % CI: 0,079–1,475,  $P = 0,1501$ ).

Obrázek 16: Pravděpodobnost přežití bez molekulárního relapsu po vysazení TKI v závislosti na typu genotypu SNP rs460089 u celkem 93 pacientů zařazených do polské ukončující studie



## 5. Diskuze

Na přelomu tisíciletí se do běžné klinické praxe léčby CML dostal první tyrozinkinázový inhibitor imatinib, čímž se stala CML velmi dobře léčitelnou chorobou s dlouhodobým přežitím. Prognóza pacientů se ještě zlepšila při nástupu TKI druhé a třetí generace, které dokázaly s velkou četností překonat významný mechanismus rezistence pacientů k imatinibu, a to vznik mutací v tyrozinkinázové doméně *BCR::ABL1*. Pacienti, kteří neoptimálně odpovídají na prvoliniovou léčbu, a vyvinuli mutaci v tyrozinkinázové doméně *BCR::ABL1*, jejichž monitorace se stala u pacientů s neoptimální odpovědí běžnou rutinní praxí, by měli být převedeni na jiné TKI, který je na danou mutaci účinný (Soverini S. et al., 2011). Klinické studie s druhogeneračním TKI dasatinibem a nilotinibem v první linii léčby navíc ukázaly, že ve srovnání s dosud nejhojněji využívaným imatinibem, pacienti dosahují častěji a dříve molekulární odpovědi (Jain P. et al., 2013). Dle registrační studie dasatinibu (DASISION) bylo dosažení MMR u pacientů v první linii signifikantně vyšší, ale vliv na celkové přežití již byl bez statistické significance (Cortes J.E. et al., 2016), podobné výsledky byly i v registrační studii s nilotinibem (ENESTnd) (Hochhaus A. et al., 2016).

Užívání preparátů 2. a 3. generace v první linii u všech pacientů by bylo finančně velice náročné a navíc je spojené s vyšším toxickým zatížením pacientů. Proto je imatinib a nyní i jeho generika, stále nejužívanějším lékem v první linii u pacientů v chronické fázi CML. Přesto jistě existuje významná část pacientů, kteří by mohli z volby TKI 2. generace (případně i 3. generace) v první linii profitovat (Hochhaus A. et al., 2020).

V dnešní době zatím nemáme jednoduchý spolehlivý marker, který by již v době diagnózy u pacientů v chronické fázi CML mohl předvídat průběh léčby a usnadnil výběr vhodného prvoliniového TKI. Mutace v kinázové doméně *BCR::ABL1* se v době diagnózy chronické fáze CML nevyskytují (Soverini S. et al., 2011; Machova Polakova K. et al., 2014). Mutace v dalších genech asociovaných s nádorovým onemocněním se dle recentních dat vyskytují především v genu *ASXL1*, ale na vyhodnocení jejich dopadu na prognózu onemocnění si budeme muset ještě počkat (Schönfeld L. et al., 2022; Bidikian A. et al., 2022). Potenciální zdroj vhodných markerů nabízí farmakogenetika. Pacienti s různými variacemi DNA v kódovacích nebo regulačních úsecích genů, jejichž produkty jsou klíčové pro transport léčiv, mohou mít vrozené predispozice k neoptimální odpovědi na léčbu u farmak závislých na přenosu pomocí těchto transportérů. V důsledku nízké exprese, chybné lokalizace nebo snížení aktivity transportérů může docházet k subletální

koncentraci léčiva uvnitř buňky a vznikat prostor pro rozvoj rezistence. Jedním z takových léků je právě i imatinib, který je závislý na transportu pomocí přenašečů z rodin ABC a SLC (Thomas J. et al., 2004).

Na téma nalezení farmakogenetického markeru, který by předvídal odpověď na léčbu TKI u pacientů s CML bylo publikováno již několik prací, které ovšem přinášejí velice rozdílné výsledky (Polillo M. et al., 2015). Hlavním důvodem rozporuplných výsledků pro nalezené markery predikce odpovědi je zejména nekoherentnost jednotlivých studií. Byly prováděny na různě velkých a také geograficky rozdílných kohortách pacientů (například kavkazská vs. asijská populace) (Petain A. et al., 2008; Di Paolo A. et al., 2014; Singh O. et al., 2012), byly využívány různé metodiky prováděných vyšetření a v neposlední řadě se analýzy omezily na předem vybraný počet polymorfismů nacházejících se pouze v exonech zkoumaných genů, které hrají roli v distribuci a metabolismu léčiva (Kim D.H.D. et al., 2009; Angelini S. et al., 2013).

V naší práci jsme se vyhnuli skríninku polymorfismů v exonech genů, jako předchozí práce, ale pomocí ultra širokého NGS jsme provedli skrínink polymorfismů v promotorových oblastech celkem 19 ABC a SLC genů. Na základě výsledků jsme sestavili genotypy pro jednotlivé polymorfismy a s využitím asociační analýzy se nám podařilo identifikovat genotypy, které se s různou frekvencí vyskytovaly u pacientů s optimální a neoptimální odpovědí na léčbu imatinibem. Genotyp rs460089-GC (SNP nacházející se v promotorové oblasti genu *SLC22A4*, kódující přenašeč imatinibu) se častěji objevoval u pacientů s optimální odpovědí na léčbu imatinibem a byl spojen se signifikantně vyšší pravděpodobností dosažení MMR než dosahovali pacienti s genotypem rs460089-GG. Výsledky pacientů s genotypem rs460089-CC také naznačují dosahování lepší odpovědi na léčbu imatinibem, ale vzhledem k velmi malému množství pacientů s tímto genotypem, nelze data spolehlivě interpretovat. Dalším zajímavým genotypem, který se častěji vyskytoval u pacientů s optimální odpovědí na imatinib, byl rs2631365-TC v promotorové oblasti genu *SLC22A5* (kódující transportér jehož substrátem je také imatinib). Měření však nebyla signifikantní. Významně signifikantní se však ukázala pravděpodobnost dosažení MMR a EFS u pacientů, kteří nesli tento genotyp právě v kombinaci s již dříve zmiňovaným genotypem rs460089-GC. Provedli jsme analýzu vazebné nerovnováhy, která nám ukázala, že SNP rs460089, je ve významné vazebné nerovnováze se třemi regulačními lokusy umístěnými v intronech genu *SLC22A4*, jedním regulačním lokusem v downstream umístění a třemi regulačními lokusy v intronech genu *SLC22A5*. Z databáze RegulomeDB vyplývá, že 4 lokusy byly potvrzeny jako takzvané lokusy exprese kvantitativního znaku (eQTL), neboli genomové lokusy, které vysvětlují variace v hladinách exprese

mRNA v monocytech, které regulují expresi genů *SLC22A4* a *SLC22A5*. Dva lokusy a samotný lokus rs460089 jsou dokonce konzervovanými místy pro vazbu samotných transkripčních faktorů. Vzhledem k tomu, že rs460089 je ve vysoce signifikantní vazebné nerovnováze s těmito 7 regulačními lokusy, alely rs460089 přesně předpovídají i alely těchto sedmi regulačních lokusů.

Druhý již výše zmíněný SNP rs2631365 byl ve významné vazebné nerovnováze s 5 regulačními lokusy. Dvě regulační místa se nacházejí v intronech genu *SLC22A4* a tři v intronech genu *SLC22A5*. Když jsme tedy srovnávali kumulativní dosažení MMR, byl kombinovaný genotyp rs460089-GC\_rs2631365-TC signifikantně příznivější než genotyp rs460089-GG\_rs2631365-TC. Podobně tomu bylo i u přežití bez události. Na základě analýz vazebné nerovnováhy víme, že genotyp rs460089-GC\_rs2631365-TC odráží heterozygotní genotyp celkem 13 regulačních lokusů pro geny *SLC22A4* a *SLC22A5*, který je dle našich výsledků významně příznivý pro dosažení MMR a EFS (obrázky 10 a 11). U takto heterozygotního genotypu může alela na jednom chromozomu a odpovídající alela na homologním chromozomu obsahujícím dvě různé kopie vzájemně interagovat a způsobovat transvekci, což může vest k aktivaci nebo naopak k represi genové transkripce (Lee A.M. et Wu C.t., 2006; Ou S.A. et al., 2009).

Výsledky z analýz genové exprese v testovaných buněčných liniích ukázaly velmi silnou expresi genu *SLC22A5* a nízkou expresi genu *SLC22A4* nezávisle na typu genotypu. Přesto byla transkripce *SLC22A5* pozorována u buněčných linií, které nesou kombinovaný genotyp rs460089-GC\_rs2631365-TC vyšší ve srovnání s liniemi s genotypem rs460089-GG\_rs2631365-TC. To nastiňuje právě i vliv genotypu na regulaci exprese genu *SLC22A5*, což následně může mít vliv na koncentraci imatinibu uvnitř buněk. K odhalení celkového principu schopnosti vzájemné regulace různých alel obsazujících regulační lokusy na regulaci exprese obou genu je nutné provedení vysoce rozsáhlých funkčních analýz.

Dalšími směry studování vztahu k expresi genů *SLC22A4* a *SLC22A5* a distribuci imatinibu by mohly být analýzy vazby nebo naopak deplece transkripčních faktorů ve vztahu k určité kombinaci genotypů, případně analýza modifikací histonů a úrovně metylace DNA CpG ostrůvku v promotorech těchto genů, které ovlivňují genovou expresi.

SNP v genu *SLC22A4* a jejich případný vliv na dosažení MMR u pacientů s CML zkoumala již ve své práci skupina vědců kolem Angeliny et al. (Angelini S. et al., 2013). Ti ve své práci uvedli, že SNP rs1050152 nacházející se v exonu *SLC22A4*, má vliv na dosažení MMR. Pacienti nesoucí alelu rs1050152-CT měli během léčby imatinibem vyšší frekvenci dosažení MMR než pacienti s genotypem

rs1050152-TT. Pro srovnání jsme provedli sledování frekvence výskytu genotypu rs1050152-CT u pacientů s optimální odpovědí. Trend jsme pozorovali podobný jako kolektiv autorů Angelini S. et al, ale výsledek nebyl statisticky signifikantní. Podle databáze regulomeDB není SNP rs1050152 regulační pro expresi, ale nachází se ve vazebné nerovnováze s alelami regulačních lokusů. Tato vazebná nerovnováha však není tak vysoká, aby dokonale předvíдалa alely regulačních lokusů, což se domníváme, může být důvodem, proč se na našem souboru pacientů nepodařilo častější výskyt rs1050152-TC u pacientu s dosažením MMR statisticky prokázat. Nicméně, ve velkém souboru pacientů lze předpokládat, že zaznamenanou významně vyšší míru dosažení MMR při léčbě imatinibem u pacientu s rs1050152-CT by bylo možné nalézt.

Na základě našich dosažených výsledků o možném prognostickém významu SNP rs460089 v dosažení MMR u pacientů v chronické fázi CML léčených imatinibem a na základě nového cíle léčby, dle nejnovějšího doporučení ELN (Hochhaus A. et al., 2020) tedy udržení MMR bez léčby TKI, jsme zkoumali rs460089 také jako možný prognostický faktor pro udržení remise po vysazení imatinibu u pacientů s CML. První studie, která se zabývala bezpečným vysazením TKI byla francouzská studie STIM1 (Etienne G. et al., 2017), kde výsledkem bylo, že 38 % pacientů udrží MMR i po vysazení TKI. Později bylo provedeno mnoho studií, na toto téma, které shrnuje metaanalýza 15 studií s více než 500 pacienty, která prokázala, že průměrně ztratí molekulární odpověď 51 % pacientů po vysazení imatinibu, což ukazuje vysokou reprodukovatelnost výsledků (Campiotti L. et al., 2017).

Bylo také potvrzeno, že pokud se dodržují stanovená doporučení, včetně důsledné monitorace pacientů a měření hladiny transkriptu *BCR::ABL1*, je vysazení TKI zcela bezpečné. Přibližně 95 % pacientů, u kterých dojde ke ztrátě MMR a je u nich promptně znovu zahájena terapie TKI, opět dosáhnou molekulární odpovědi (Hochhaus A. et al., 2020). Zatím jsou publikovány pouze jednotky případů, u kterých došlo k progresi onemocnění i po znovuzahájení terapie TKI a museli být léčeni chemoterapií následovanou transplantací krvetvorných buněk (Dulucq S. et al., 2022).

Hlavním predikčním faktorem pro udržení remise bez léčby, na kterém se jednotlivé studie shodovaly, je doba užívání TKI. Čím delší je doba užívání TKI, tím je větší pravděpodobnost udržení remise bez léčby. Například pro studii EURO-SKI byla hraniční délka léčby imatinibem 5,8 roku. Pacienti s délkou léčby kratší než 5,8 let měli pravděpodobnost udržení TFR 41 %, pacienti s délkou léčby imatinibem více než 5,8 let pak 63 % (Saussele S. et al., 2018). Dalším prognostickým markerem udržení TFR, na kterém se studie shodovaly, byla hloubka a doba trvání molekulární odpovědi (Takahashi N. et al., 2011; Mahon F.X. et al., 2024).

Z dalších studií vyplývá, že významným mechanismem rozhodujícím o udržení MMR je imunoprofil pacientů. Například pacienti, kteří byli v minulosti léčeni INF-a, měli dle japonské retrospektivní studie větší pravděpodobnost udržet MMR po ukončení léčby TKI než pacienti, kteří nebyli nikdy INF-a léčeni. Přičemž míra TFR byla 76 % u pacientů s předchozí léčbou IFN-a ve srovnání s pouze 23 % u pacientů bez IFN-a. Kromě toho byla terapie IFN-a vyhodnocena v této studii jako nezávislý prediktor molekulárního relapsu během 12 měsíců (OR 0,0419 (95 % CI 0,0044–0,4035)  $P = 0,0060$ ) (Takahashi N. et al., 2011). Ve studii TWISTER pak měli pacienti ve skupině IFN-a + imatinib také lepší pravděpodobnost TFR (52 %) než pacienti ve skupině pouze s imatinibem (34 %) (Ross D.M. et al., 2013).

Přestože přesný mechanismus účinku IFN-a není jasný, jednou z navrhovaných možností je jeho účinek na aktivaci imunitních efektorových buněk (Talpez M. et al., 2012). To podporují i výsledky dílčí studie ke studii EURO-SKI, provedenou Nordic CML study group (NCMLSG), ve které bylo ukázáno, že pacienti s vyšším zastoupením zralých (CD57+) a cytotoxických (CD16+ a CD57+) NK buněk v době přerušeni TKI, měli vyšší pravděpodobnost udržení remise bez léčby (Ilander M. et al., 2016). Má se za to, že vyšší hladiny NK buněk mohou být schopny, jak přímo zabíjet leukemické kmenové buňky, tak potencovat adaptivní imunitní reakce, a tím udržovat remisi po přerušeni léčby. Že je udržení TFR imunitně podmíněné naznačuje i práce Schütz et al., ve které uvádějí, že snížené množství CD86+ plazmatických dendritických buněk (buněk prezentujících antigen a stimulujících T lymfocyty k jejich cytotoxické aktivitě) podporuje udržení TFR (Schütz C. et al., 2017).

Velmi slibnou navrhovanou možností jak predikovat udržení TFR by mohlo být měření *BCR::ABL1* na podkladě DNA (Machova Polakova K. et al., 2020). Pacienti s nedetekovatelným *BCR::ABL1* v DNA i transkriptem *BCR::ABL1* v mRNA udrželi TFR téměř ve všech případech, zatímco u pacientů s pozitivitou v obou cílech bylo udržení TFR pouze 20 %. Zajímavou skupinou pak byli pacienti s negativním transkriptem *BCR::ABL1* v mRNA, ale pozitivní s *BCR::ABL1* v DNA, u nich byla šance na udržení TFR a ztrátu odpovědi vyrovnaná. Analýza je ovšem náročná, vyžadující přesnou identifikaci *BCR::ABL1* fúze a navržení sady primerů a sond pro každého jednotlivého pacienta.

Jak jsem již zmiňovala výše, naší další snahou v předkládané práci bylo zjistit, zda i SNP rs460089 má prediktivní hodnotu pro udržení remise bez léčby u pacientů s CML. Do práce jsme zahrnuli celkem 176 pacientů, kteří byli zařazeni do studie EURO-SKI, a zkoumali jsme, zda má u těchto pacientů genotyp SNP rs460089 vliv na udržení remise po ukončení léčby imatinibem. Pro všechny paci-



enty byla léčba TKI první linií, nikdo nebyl předléčen INF-a, aby nebyl výsledek zkreslen tímto faktorem, který může vést k větší pravděpodobnosti udržení TFR. Pacienti s genotypem rs460089-GC měli větší pravděpodobnost udržení MMR než pacienti s genotypem rs460089-GG. Tento výsledek byl signifikantně významný. Pacientů s genotypem rs460089-GC, kteří udrželi MMR po dobu 6 měsíců od vysazení imatinibu, bylo 73 % (95 % CI: 60-82 %), kdežto pacientů s genotypem rs460089-GG bylo pouze 51 % (95 % CI: 41-61 %). Procento pacientů, s genotypem rs460089-GG, kteří udrželi MMR po vysazení léčby, se velice blíží celkovému procentu pacientů, kteří udrželi TFR i v závěrech vysazovacích studií, kde přibližně 40-50 % pacientů udrželo MMR po vysazení TKI. Kdežto druhá skupina, s příznivým genotypem rs460089-GC dosáhla o celých 20 % lepších výsledků. Jako další nezávislý prediktivní faktor udržení MMR se ukázala celková délka léčby TKI před jejich vysazením. Čím delší byla celková doba léčby TKI, tím byla větší pravděpodobnost udržení MMR po jejím vysazení. Tento prediktivní faktor se opakoval již v předchozích studiích. Převaha genotypu rs460089-GC nad genotypem rs460089-GG ohledně udržení MMR po vysazení TKI byla potvrzena i v druhé, validační, kohortě pacientů. Tam bylo zařazeno celkem 93 pacientů z polské vysazovací skupiny. Vyšlo nám, že pacienti s genotypem rs460089-GC mají pravděpodobnost udržení TFR dokonce 82 % (95 % CI: 67-91 %), kdežto pacienti s nepříznivým genotypem rs460089-GG pouhých 44 % (95 % CI: 30-59 %). Tento rozdíl 38 procentních bodů je jistě klinicky relevantní. Jako další nezávislý faktor, který ve validační skupině pacientů ovlivňoval udržení MMR po vysazení TKI, se ukázal být doba trvání hluboké molekulární odpovědi u jednotlivých pacientů. I zde byla patrná přímá úměrnost. Pacienti s delším trváním DMR měli větší pravděpodobnost udržet TRF než pacienti, kteří měli dobu trvání DMR kratší. I doba trvání DMR byla v řadě vysazovacích studií hodnocena jako prognostický faktor. Vliv genotypu na pravděpodobnost udržení remise bez léčby můžeme přisuzovat tomu, že heterozygotní forma genotypu je spojena s dostatečnou koncentrací imatinibu umožňující účinnější cílení na buňky CML během léčby ve srovnání s homozygotní formou genotypu rs460089-GG. Vliv genotypu rs460089-CC na pravděpodobnost přežití bez relapsu po vysazení léčby nemůžeme na základě této práce posoudit. V první kohortě pacientů měli pacienti 6 měsíční pravděpodobnost přežití bez relapsu 61 % (95 % CI: 39–80 %), kdežto v druhé skupině zahrnující pacienty z polské vysazovací skupiny dosahovala 6 měsíční pravděpodobnost přežití bez relapsu u pacientů s genotypem rs460089-CC dokonce 85 % (95 % CI: 58–96 %). Tato nekoherentnost ve výsledku v obou skupinách může být dána chybou malých čísel při nízké frekvenci zastoupení tohoto genotypu v jednotlivých kohortách pacientů i v celkové populaci.

Na základě našich výsledků, které jsme potvrdili i v nezávislé validační kohortě, se domníváme, že bychom mohli genotypizaci SNP rs460089 zařadit do schématu testování u pacientů s CML, kteří budou léčeni imatinibem. Genotypizaci je možné provést již v době diagnózy nebo kdykoliv během léčby imatinibem, a to pomocí poměrně rychlého a levného genotypizačního testu TaqMan rs156322, které je dobře použitelným markerem pro rs460089 u evropské populace, což jsme také v naší práci potvrdili. Pro pacienty jiného etnika je vhodné zvolit metodu přímého sekvenování. Na základě znalosti genotypu rs460089 bychom se pak mohli u hraničních výsledků hladiny transkriptu *BCR::ABL1* v 6., potažmo ve 12. měsíci po zahájení léčby IM snadněji rozhodovat o změně léčby na TKI 2. generace u pacientů s nepříznivým genotypem rs460089-GG.

Po dosažení hluboké molekulární odpovědi, která trvá minimálně 2 roky a délce léčby TKI alespoň 5 let je možné zvážit vysazení imatinibu (nezávisle na typu genotypu rs460089), jak je doporučeno v ELN 2020 (Hochhaus A. et al., 2020). Přestože víme, že celková doba léčby TKI je nezávislým prognostickým faktorem pro udržení TFR, provedli jsme multivariantní analýzu na sledování vlivu délky léčby imatinibem na udržení TFR v závislosti na genotypu rs460089. Zjistili jsme, že dlouhá doba trvání léčby imatinibem zvyšuje pravděpodobnost přežití bez molekulárního relapsu po vysazení léčby u všech genotypů. Přičemž nejvýraznější vliv jsme pozorovali u pacientů s nepříznivým genotypem rs460089-GG. A i přes vliv délky léčby imatinibem na pravděpodobnost přežití bez molekulárního relapsu po vysazení léčby jsme pozorovali signifikantní rozdíl mezi pacienty nesoucími genotypy rs460089-GC a rs460089-GG. Z toho plynoucí závěr, že pacienti s rizikovým genotypem potřebují delší dobu léčby imatinibem před jeho vysazením, aby si zvýšili šance na udržení remise bez léčby, může podpořit individuální rozhodnutí pacientů i jejich lékařů při zvažování pokračování v terapii s případnou toxicitou, či dřívějším vysazením léčby a vystavení se vyššímu riziku ztráty molekulární odpovědi.

Domníváme se, že farmakogenetický marker rs460089 prokázal prognostický vliv na udržení remise po vysazení léčby u pacientů s CML léčených imatinibem v první linii. Důležité je, že výsledek byl ověřen na nezávislém vzorku pacientů. Jeho prognostický význam byl nezávislý na již zavedených prognostických faktorech celkové délce léčby imatinibem a doby trvání hluboké molekulární odpovědi před ukončením léčby, a naopak je doplňoval. Při dalším rozšiřování souboru pacientů a pravidelném vyhodnocování důsledku genotypu by rs460089 mohl být kandidátním parametrem pro tvorbu prediktivního TFR skóre, na jehož definování se v celosvětovém kontextu pracuje.

## 6. Závěry

V rámci plnění prvního cíle se nám podařilo sestavit panel celkem 19 genů kódujících transportéry s anotovanou nebo potenciální funkcí transportu imatinibu. A to jak na úrovni střevního, jaterního, renálního kompartmentu, tak i kompartmentu kostní dřeně. Pomocí sekvenování nové generace jsme sekvenovali celkem 1420 amplikonů zahrnujících promotorové oblasti těchto 19 vybraných genů. Celkem jsme našli 95 různých jednobodových polymorfismů, z toho sedm nebylo do té doby popsáno v databázi NCBI. Tím jsme potvrdili, že promotory ABC a SLC genů jsou vysoce variabilní oblasti s MAF pohybující se od jednotek případů až téměř k 50 % zastoupení.

Po provedení Fisherova exaktního testu pravděpodobnosti se nám podařilo vytipovat SNP rs460089 v promotoru genu *SLC22A4*, který signifikantně asocioval s odpovědí pacientů s CML na léčbu IM ve 12. měsíci od zahájení léčby. Zjistili jsme, že frekvence genotypu rs460089-GG je ve skupině pacientů, kteří na léčbu neodpovídají optimálně, signifikantně vyšší než ve skupině optimálně odpovídajících pacientů, zatímco genotyp GC je zastoupen signifikantně častěji u pacientů s optimální odpovědí. Dále jsme pomocí Mann-Whitneyho testu prokázali, že genotyp rs460089-GC je spojen s vyšší kumulativní incidencí dosažení MMR ve 12. měsíci léčby IM. Pacienti s genotypem GC dosahovali MMR v 66 %, kdežto pacienti s genotypem GG pouze ve 37 %. Podobné výsledky přinesla analýza Kaplan-Meierovou metodou, která byla použita k odhadu EFS. Pacienti s genotypem GC měli signifikantně větší pravděpodobnost EFS než pacienti s genotypem GG. Po provedení univariantní i multivariantní analýzy nám rs460089 vyšel jako nezávislý prediktivní faktor dosažení MMR.

Dalším cílem bylo měření mRNA vytipovaných transportérů u pacientů s optimální a neoptimální odpovědí. Expres, kterou jsme měřili z lyzátu směsi jaderných buněk periferní krve oproti kontrolními genu *GUSB* nebyla signifikantně asociována s odpovědí pacientů léčených IM ve 12. měsíci. Nenalezli jsme ani významný rozdíl v expresi transportéru u pacientů nesoucí genotyp GG a genotyp GC. Toto mohlo být způsobeno i použitím RNA ze směsi různě zralých leukocytů, kde může být různá exprese genu v závislosti na jejich subpopulaci. Proto jsme provedli měření exprese u definovaných buněčných linií odvozených z blastických buněk CML a agresivních lymfomů, kde 4 linie nesly genotyp GG a 4 linie genotyp GC. Všechny linie měly nižší expresi mRNA *SLC22A4* než *SLC22A5*, linie s GC genotypem měly v průměru vyšší expresi *SLC22A5* než linie s GG genotypem, rozdíl v expresi *SLC22A4* nebyl v závislosti na genotypu nalezen.

Nepodařilo se nám tedy prokázat, že genotyp SNP rs460089 způsoboval zvýšení relativní exprese genu *SLC22A4* na úrovni mRNA.

Posledním cílem této práce bylo validovat marker SNP rs460089 nejen jako možný prognostický marker dosažení MMR, ale také jako prognostický marker udržení molekulární odpovědi po vysazení IM. Celkem jsme provedli analýzu na 269 pacientech zařazených do studií s vysazením TKI. Na dvou nezávislých skupinách, jedné čítající 176 pacientů a druhé čítající 93 pacientů jsme potvrdili, že rs460089 je nezávislý prognostický marker předvídající udržení molekulární odpovědi po vysazení IM. Pacienti s genotypem GC měli 73 % (respektive 82 % ve validační kohortě) pravděpodobnost udržení molekulární remise po vysazení IM oproti pacientům s genotypem GG, kteří měli pravděpodobnost udržení molekulární remise po vysazení IM pouze 51 % respektive 44 %.

Na základě výsledků předložených v této práci se domníváme, že genotypizaci SNP rs460089 bychom mohli zařadit do schématu testování u pacientů s CML, kteří budou léčeni IM. Na základě znalosti genotypu bychom pak mohli u hraničních výsledků hladiny transkriptu *BCR::ABL1* v 6., potažmo 12. měsíci po zahájení léčby IM snadněji rozhodovat o změně léčby na TKI 2. generace. Dále by znalost genotypu mohla rozhodovat i o vhodnosti pacienta k vysazení terapie IM. Případně po jak dlouhé době od zahájení TKI či dosažení hluboké molekulární odpovědi léčbu přerušit. Mohl by být jednou ze součástí prediktivního TFR skóre, které se nyní definuje. Nutno ovšem podotknout, že molekulární mechanismus vlivu rs460089 na výsledek léčby IM u pacientů s CML a na pravděpodobnost udržení molekulární remise po ukončení léčby není zatím experimentálně vysvětlen a je jistě třeba ho ještě prostudovat.

# Seznam použité literatury

- Angelini, S., Pantaleo, M. A., Ravegnini, G., Zenesini, C., Cavrini, G., Nannini, M., Fumagalli, E., Palassini, E., Saponara, M., Di Battista, M., Casali, P. G., Hrelia, P., Cantelli-Forti, G. et Biasco, G. (2013). Polymorphisms in octn1 and octn2 transporters genes are associated with prolonged time to progression in unresectable gastrointestinal stromal tumours treated with imatinib therapy. *Pharmacological Research*, **68**(1), 1–6. ISSN 1043-6618. doi: 10.1016/j.phrs.2012.10.015.
- Assouline, S. et Lipton, J. (2011). Monitoring response and resistance to treatment in chronic myeloid leukemia. *Current Oncology*, **18**(2), 71–83. ISSN 1718-7729. doi: 10.3747/co.v18i2.391.
- Au, A., Aziz Baba, A., Goh, A. S., Wahid Fadilah, S. A., Teh, A., Rosline, H. et Ankathil, R. (2014). Association of genotypes and haplotypes of multi-drug transporter genes abcb1 and abcg2 with clinical response to imatinib mesylate in chronic myeloid leukemia patients. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **68**(3), 343–349. ISSN 0753-3322. doi: 10.1016/j.biopha.2014.01.009.
- Baccarani, M., Deininger, M. W., Rosti, G., Hochhaus, A., Soverini, S., Apperley, J. F., Cervantes, F., Clark, R. E., Cortes, J. E., Guilhot, F., Hjorth-Hansen, H., Hughes, T. P., Kantarjian, H. M., Kim, D.-W., Larson, R. A., Lipton, J. H., Mahon, F.-X., Martinelli, G., Mayer, J., Müller, M. C., Niederwieser, D., Pane, F., Radich, J. P., Rousselot, P., Saglio, G., Saußebe, S., Schiffer, C., Silver, R., Simonsson, B., Steegmann, J.-L., Goldman, J. M. et Hehlmann, R. (2013). European leukemianet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. *Blood*, **122**, 872–884. ISSN 1528-0020. doi: 10.1182/blood-2013-05-501569.
- Balabanov, S., Braig, M. et Brümmendorf, T. H. (2014). Current aspects in resistance against tyrosine kinase inhibitors in chronic myelogenous leukemia. *Drug Discovery Today: Technologies*, **11**, 89–99. ISSN 1740-6749. doi: 10.1016/j.ddtec.2014.03.003.
- Bidikian, A., Kantarjian, H., Jabbour, E., Short, N. J., Patel, K., Ravandi, F., Sasaki, K. et Issa, G. C. (2022). Prognostic impact of asxl1 mutations in chronic phase chronic myeloid leukemia. *Blood Cancer Journal*, **12**(10). ISSN 2044-5385. doi: 10.1038/s41408-022-00742-1.

- Bouchet, S., Dulucq, S., Pasquet, J.-M., Lagarde, V., Molimard, M. et Mahon, F.-X. (2013). From in vitro to in vivo: intracellular determination of imatinib and nilotinib may be related with clinical outcome. *Leukemia*, **27**(8), 1757–1759. ISSN 1476-5551. doi: 10.1038/leu.2013.13.
- Boyle, A. P., Hong, E. L., Hariharan, M., Cheng, Y., Schaub, M. A., Kasowski, M., Karczewski, K. J., Park, J., Hitz, B. C., Weng, S., Cherry, J. M. et Snyder, M. (2012). Annotation of functional variation in personal genomes using regulomedb. *Genome Research*, **22**(9), 1790–1797. ISSN 1088-9051. doi: 10.1101/gr.137323.112.
- Branford, S., Yeung, D. T., Parker, W. T., Roberts, N. D., Purins, L., Braley, J. A., Altamura, H. K., Yeoman, A. L., Georgievski, J., Jamison, B. A., Phillis, S., Donaldson, Z., Leong, M., Fletcher, L., Seymour, J. F., Grigg, A. P., Ross, D. M. et Hughes, T. P. (2014). Prognosis for patients with cml and >10imatinib depends on the rate of bcr-abl1 decline. *Blood*, **124**(4), 511–518. ISSN 1528-0020. doi: 10.1182/blood-2014-03-566323.
- Bueno, M. J., Pérez de Castro, I., Gómez de Cedrón, M., Santos, J., Calin, G. A., Cigudosa, J., Croce, C. M., Fernández-Piqueras, J. et Malumbres, M. (2008). Genetic and epigenetic silencing of microrna-203 enhances abl1 and bcr-abl1 oncogene expression. *Cancer Cell*, **13**(6), 496–506. ISSN 1535-6108. doi: 10.1016/j.ccr.2008.04.018.
- Burger, H., van Tol, H., Boersma, A. W. M., Brok, M., Wiemer, E. A. C., Stoter, G. et Nooter, K. (2004). Imatinib mesylate (sti571) is a substrate for the breast cancer resistance protein (bcrp)/abcg2 drug pump. *Blood*, **104**(9), 2940–2942. ISSN 1528-0020. doi: 10.1182/blood-2004-04-1398.
- Campiotti, L., Suter, M. B., Guasti, L., Piazza, R., Gambacorti-Passerini, C., Grandi, A. M. et Squizzato, A. (2017). Imatinib discontinuation in chronic myeloid leukaemia patients with undetectable bcr-abl transcript level: A systematic review and a meta-analysis. *European Journal of Cancer*, **77**, 48–56. ISSN 0959-8049. doi: 10.1016/j.ejca.2017.02.028.
- Chen, Z., Shi, T., Zhang, L., Zhu, P., Deng, M., Huang, C., Hu, T., Jiang, L. et Li, J. (2016). Mammalian drug efflux transporters of the atp binding cassette (abc) family in multidrug resistance: A review of the past decade. *Cancer Letters*, **370**(1), 153–164. ISSN 0304-3835. doi: 10.1016/j.canlet.2015.10.010.
- Ciarimboli, G. et Schlatter, E. (2004). Regulation of organic cation transport. *Pflugers Archiv - European Journal of Physiology*, **449**(5), 423–441. ISSN 1432-2013. doi: 10.1007/s00424-004-1355-5.

- Corbin, A. S., Agarwal, A., Loriaux, M., Cortes, J., Deininger, M. W. et Druker, B. J. (2011). Human chronic myeloid leukemia stem cells are insensitive to imatinib despite inhibition of bcr-abl activity. *Journal of Clinical Investigation*, **121**(1), 396–409. ISSN 0021-9738. doi: 10.1172/jci35721.
- Corso, A., Lazzarino, M., Morra, E., Merante, S., Astori, C., Bernasconi, P., Boni, M. et Bernasconi, C. (1995). Chronic myelogenous leukemia and exposure to ionizing radiation—a retrospective study of 443 patients. *Annals of hematology*, **70**, 79–82. ISSN 0939-5555. doi: 10.1007/BF01834384.
- Cortes, J. E., Talpaz, M., Beran, M., O’Brien, S. M., Rios, M. B., Stass, S. et Kantarjian, H. M. (1995). Philadelphia chromosome-negative chronic myelogenous leukemia with rearrangement of the breakpoint cluster region. long term follow-up results. *Cancer*, **75**(2), 464–470. ISSN 1097-0142. doi: 10.1002/1097-0142(19950115)75:2<464::aid-cnrcr2820750209>3.0.co;2-e.
- Cortes, J. E., Saglio, G., Kantarjian, H. M., Baccarani, M., Mayer, J., Boqué, C., Shah, N. P., Chuah, C., Casanova, L., Bradley-Garelik, B., Manos, G. et Hochhaus, A. (2016). Final 5-year study results of dasision: The dasatinib versus imatinib study in treatment-naïve chronic myeloid leukemia patients trial. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, **34**, 2333–2340. ISSN 1527-7755. doi: 10.1200/JCO.2015.64.8899.
- Cortes, J. E., Gambacorti-Passerini, C., Deininger, M. W., Mauro, M. J., Chuah, C., Kim, D.-W., Dyagil, I., Glushko, N., Milojkovic, D., le Coutre, P., Garcia-Gutierrez, V., Reilly, L., Jeynes-Ellis, A., Leip, E., Bardy-Bouxin, N., Hochhaus, A. et Brümmendorf, T. H. (2018). Bosutinib versus imatinib for newly diagnosed chronic myeloid leukemia: Results from the randomized before trial. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, **36**, 231–237. ISSN 1527-7755. doi: 10.1200/JCO.2017.74.7162.
- Cross, N. C. P., White, H. E., Colomer, D., Ehrencrona, H., Foroni, L., Gottardi, E., Lange, T., Lion, T., Machova Polakova, K., Dulucq, S., Martinelli, G., Oppliger Leibundgut, E., Pallisgaard, N., Barbany, G., Sacha, T., Talmaci, R., Izzo, B., Saglio, G., Pane, F., Müller, M. C. et Hochhaus, A. (2015). Laboratory recommendations for scoring deep molecular responses following treatment for chronic myeloid leukemia. *Leukemia*, **29**(5), 999–1003. ISSN 1476-5551. doi: 10.1038/leu.2015.29.
- Crossman, L. C., Druker, B. J. et Deininger, M. W. N. (2005). hoct 1 and

- resistance to imatinib. *Blood*, **106**(3), 1133–1134. ISSN 1528-0020. doi: 10.1182/blood-2005-02-0694.
- César-Razquin, A., Girardi, E., Yang, M., Brehme, M., Saez-Rodriguez, J. et Superti-Furga, G. (2018). In silico prioritization of transporter–drug relationships from drug sensitivity screens. *Frontiers in Pharmacology*, **9**. ISSN 1663-9812. doi: 10.3389/fphar.2018.01011.
- da Cunha Vasconcelos, F., Mauricio Scheiner, M. A., Moellman-Coelho, A., Mencalha, A. L., Renault, I. Z., Rumjanek, V. M. et Maia, R. C. (2016). Low abcb1 and high oct1 levels play a favorable role in the molecular response to imatinib in cml patients in the community clinical practice. *Leukemia Research*, **51**, 3–10. ISSN 0145-2126. doi: 10.1016/j.leukres.2016.10.005.
- Davies, A., Jordanides, N. E., Giannoudis, A., Lucas, C. M., Hatzieremia, S., Harris, R. J., Jørgensen, H. G., Holyoake, T. L., Pirmohamed, M., Clark, R. E. et Mountford, J. C. (2009). Nilotinib concentration in cell lines and primary cd34+ chronic myeloid leukemia cells is not mediated by active uptake or efflux by major drug transporters. *Leukemia*, **23**(11), 1999–2006. ISSN 1476-5551. doi: 10.1038/leu.2009.166.
- de Lima, L. T., Bueno, C. T., Vivona, D., Hirata, R. D. C., Hirata, M. H., Hungria, V. T. d. M., Chiattonne, C. S., Zanichelli, M. A., Chauffaille, M. d. L. L. F. et Guerra-Shinohara, E. M. (2014). Relationship between slco1b3 and abca3 polymorphisms and imatinib response in chronic myeloid leukemia patients. *Hematology*, **20**(3), 137–142. ISSN 1607-8454. doi: 10.1179/1607845414y.0000000181.
- de Lima, L. T., Vivona, D., Bueno, C. T., Hirata, R. D. C., Hirata, M. H., Luchessi, A. D., de Castro, F. A., Chauffaille, M. d. L. F., Zanichelli, M. A., Chiattonne, C. S., Hungria, V. T. M. et Guerra-Shinohara, E. M. (2015). Reduced abcg2 and increased slc22a1 mrna expression are associated with imatinib response in chronic myeloid leukemia. *Medical Oncology*, **31**(3). ISSN 1559-131X. doi: 10.1007/s12032-014-0851-5.
- Dean, M. et Annilo, T. (2005). Evolution of the atp-binding cassette (abc) transporter superfamily in vertebrates. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, **6**(1), 123–142. ISSN 1545-293X. doi: 10.1146/annurev.genom.6.080604.162122.
- Deenik, W., van der Holt, B., Janssen, J. J. W. M., Chu, I. W. T., Valk, P. J. M., Ossenkoppele, G. J., van der Heiden, I. P., Sonneveld, P., van Schaik, R. H. N.



- et Cornelissen, J. J. (2010). Polymorphisms in the multidrug resistance gene *mdr1* (*abcb1*) predict for molecular resistance in patients with newly diagnosed chronic myeloid leukemia receiving high-dose imatinib. *Blood*, **116**(26), 6144–6145. ISSN 1528-0020. doi: 10.1182/blood-2010-07-296954.
- Dekking, E., van der Velden, V. H. J., Böttcher, S., Brüggemann, M., Sonneveld, E., Koning-Goedheer, A., Boeckx, N., Lucio, P., Sedek, L., Szczepański, T., Kalina, T., Kovac, M., Evans, P., Hoogeveen, P. G., Flores-Montero, J., Orfao, A., Comans-Bitter, W. M., Staal, F. J. T., van Dongen, J. J. M. et EuroFlow Consortium (EU-FP6, L. S. H. B.-C. T.-.-. (2010). Detection of fusion genes at the protein level in leukemia patients via the flow cytometric immunobead assay. *Best practice & research. Clinical haematology*, **23**, 333–345. ISSN 1532-1924. doi: 10.1016/j.beha.2010.09.010.
- Di Paolo, A., Polillo, M., Capecchi, M., Cervetti, G., Baratè, C., Angelini, S., Guerrini, F., Fontanelli, G., Arici, R., Ciabatti, E., Grassi, S., Bocci, G., Hrelia, P., Danesi, R., Petrini, M. et Galimberti, S. (2014). The c.480c>g polymorphism of *hoct1* influences imatinib clearance in patients affected by chronic myeloid leukemia. *The Pharmacogenomics Journal*, **14**(4), 328–335. ISSN 1473-1150. doi: 10.1038/tpj.2014.7.
- Dulucq, S., Bouchet, S., Turcq, B., Lippert, E., Etienne, G., Reiffers, J., Molimard, M., Krajcinovic, M. et Mahon, F.-X. (2008). Multidrug resistance gene (*mdr1*) polymorphisms are associated with major molecular responses to standard-dose imatinib in chronic myeloid leukemia. *Blood*, **112**(5), 2024–2027. ISSN 1528-0020. doi: 10.1182/blood-2008-03-147744.
- Dulucq, S., Preudhomme, C., Guilhot, F. et Mahon, F.-X. (2010). Response: is there really a relationship between multidrug resistance gene (*mdr1*) polymorphisms and major molecular response to imatinib in chronic myeloid leukemia? *Blood*, **116**(26), 6145–6146. ISSN 1528-0020. doi: 10.1182/blood-2010-08-298794.
- Dulucq, S., Hayette, S., Cayuela, J.-M., Bauduer, F., Chabane, K., Chevallier, P., Cony-Makhoul, P., Flandrin-Gresta, P., Jeune, C. L., Bris, Y. L., Legros, L., Maisonneuve, H., Roy, L., Mahon, F.-X., Sloma, I., Rea, D. et Nicolini, F. E. (2022). Onset of blast crisis in chronic myeloid leukemia patients in treatment-free remission. *Haematologica*, **107**(12), 2944–2949. ISSN 0390-6078. doi: 10.3324/haematol.2022.280740.
- Eadie, L. N., Dang, P., Saunders, V. A., Yeung, D. T., Osborn, M. P., Grigg, A. P., Hughes, T. P. et White, D. L. (2016). The clinical significance of *abcb1* over-

- reexpression in predicting outcome of cml patients undergoing first-line imatinib treatment. *Leukemia*, **31**(1), 75–82. ISSN 1476-5551. doi: 10.1038/leu.2016.179.
- El-Awady, R., Saleh, E., Hashim, A., Soliman, N., Dallah, A., Elrasheed, A. et Elakraa, G. (2017). The role of eukaryotic and prokaryotic abc transporter family in failure of chemotherapy. *Frontiers in Pharmacology*, **7**. ISSN 1663-9812. doi: 10.3389/fphar.2016.00535.
- Eliasson, L., Clifford, S., Barber, N. et Marin, D. (2011). Exploring chronic myeloid leukemia patients' reasons for not adhering to the oral anticancer drug imatinib as prescribed. *Leukemia Research*, **35**(5), 626–630. ISSN 0145-2126. doi: 10.1016/j.leukres.2010.10.017.
- Engler, J. R., Frede, A., Saunders, V. A., Zannettino, A. C. W., Hughes, T. P. et White, D. L. (2010). Chronic myeloid leukemia cd34+ cells have reduced uptake of imatinib due to low oct-1 activity. *Leukemia*, **24**(4), 765–770. ISSN 1476-5551. doi: 10.1038/leu.2010.16.
- Etienne, G., Guilhot, J., Rea, D., Rigal-Huguet, F., Nicolini, F., Charbonnier, A., Guerci-Bresler, A., Legros, L., Varet, B., Gardembas, M., Dubruille, V., Tulliez, M., Noel, M.-P., Ianotto, J.-C., Villemagne, B., Carré, M., Guilhot, F., Rousset, P. et Mahon, F.-X. (2017). Long-term follow-up of the french stop imatinib (stim1) study in patients with chronic myeloid leukemia. *Journal of Clinical Oncology*, **35**(3), 298–305. ISSN 1527-7755. doi: 10.1200/jco.2016.68.2914.
- Fabarius, A., Kalmanti, L., Dietz, C. T., Lauseker, M., Rinaldetti, S., Haferlach, C., Göhring, G., Schlegelberger, B., Jotterand, M., Hanfstein, B., Seifarth, W., Hänel, M., Köhne, C.-H., Lindemann, H. W., Berdel, W. E., Staib, P., Müller, M. C., Proetel, U., Balleisen, L., Goebeler, M.-E., Dengler, J., Falge, C., Kanz, L., Burchert, A., Kneba, M., Stegelmann, F., Pfreundschuh, M., Waller, C. F., Spiekermann, K., Brümmendorf, T. H., Edinger, M., Hofmann, W.-K., Pfirrmann, M., Hasford, J., Krause, S., Hochhaus, A., Saußebe, S. et Hehlmann, R. (2015). Impact of unbalanced minor route versus major route karyotypes at diagnosis on prognosis of cml. *Annals of Hematology*, **94**(12), 2015–2024. ISSN 1432-0584. doi: 10.1007/s00277-015-2494-9.
- Gambacorti-Passerini, C. B., Gunby, R. H., Piazza, R., Galiotta, A., Rostagno, R. et Scapozza, L. (2003). Molecular mechanisms of resistance to imatinib in philadelphia-chromosome-positive leukaemias. *The Lancet Oncology*, **4**(2), 75–85. ISSN 1470-2045. doi: 10.1016/s1470-2045(03)00979-3.

- Geissler, J., Sharf, G., Bombaci, F., Daban, M., De Jong, J., Gavin, T., Pelouchova, J., Dziwinski, E., Hasford, J. et Hoffmann, V. S. (2017). Factors influencing adherence in cml and ways to improvement: Results of a patient-driven survey of 2546 patients in 63 countries. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, **143**(7), 1167–1176. ISSN 1432-1335. doi: 10.1007/s00432-017-2372-z.
- Giannoudis, A., Wang, L., Jorgensen, A. L., Xinarianos, G., Davies, A., Pushpakom, S., Liloglou, T., Zhang, J.-E., Austin, G., Holyoake, T. L., Foroni, L., Kottaridis, P. D., Müller, M. C., Pirmohamed, M. et Clark, R. E. (2013). The hct1 snps m420del and m408v alter imatinib uptake and m420del modifies clinical outcome in imatinib-treated chronic myeloid leukemia. *Blood*, **121**(4), 628–637. ISSN 1528-0020. doi: 10.1182/blood-2012-01-405035.
- Giles, F. J., Swords, R. T., Nagler, A., Hochhaus, A., Ottmann, O. G., Rizzieri, D. A., Talpaz, M., Clark, J., Watson, P., Xiao, A., Zhao, B., Bergstrom, D., Le Coutre, P. D., Freedman, S. J. et Cortes, J. E. (2013). Mk-0457, an aurora kinase and bcr-abl inhibitor, is active in patients with bcr-abl t315i leukemia. *Leukemia*, **27**, 113–117. ISSN 1476-5551. doi: 10.1038/leu.2012.186.
- Gorre, M. E., Mohammed, M., Ellwood, K., Hsu, N., Paquette, R., Rao, P. N. et Sawyers, C. L. (2001). Clinical resistance to sti-571 cancer therapy caused by bcr-abl gene mutation or amplification. *Science (New York, N.Y.)*, **293**, 876–880. ISSN 0036-8075. doi: 10.1126/science.1062538.
- Gromicho, M., MAGALHÃES, M., TORRES, F., DINIS, J., FERNANDES, A. R., RENDEIRO, P., TAVARES, P., LAIRES, A., RUEFF, J. et RODRIGUES, A. S. (2012). Instability of mrna expression signatures of drug transporters in chronic myeloid leukemia patients resistant to imatinib. *Oncology Reports*, **29**(2), 741–750. ISSN 1791-2431. doi: 10.3892/or.2012.2153.
- Guilhot, F., Chastang, C., Michallet, M., Guerci, A., Harousseau, J. L., Maloisel, F., Bouabdallah, R., Guyotat, D., Cheron, N., Nicolini, F., Abgrall, J. F. et Tanzer, J. (1997). Interferon alfa-2b combined with cytarabine versus interferon alone in chronic myelogenous leukemia. french chronic myeloid leukemia study group. *The New England journal of medicine*, **337**, 223–229. ISSN 0028-4793. doi: 10.1056/NEJM199707243370402.
- Gurney, H., Wong, M., Balleine, R. L., Rivory, L. P., McLachlan, A. J., Hoskins, J. M., Wilcken, N., Clarke, C. L., Mann, G. J., Collins, M., Delforce, S.-E., Lynch, K. et Schran, H. (2007). Imatinib disposition and abcb1 (mdr1, p-

glycoprotein) genotype. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, **82**(1), 33–40. ISSN 1532-6535. doi: 10.1038/sj.clpt.6100201.

Hediger, M. A., Clémenton, B., Burrier, R. E. et Bruford, E. A. (2013). The abcs of membrane transporters in health and disease (slc series): Introduction. *Molecular Aspects of Medicine*, **34**(2–3), 95–107. ISSN 0098-2997. doi: 10.1016/j.mam.2012.12.009.

Hehlmann, R., Hochhaus, A. et Baccarani, M. (2007). Chronic myeloid leukaemia. *The Lancet*, **370**(9584), 342–350. ISSN 0140-6736. doi: 10.1016/s0140-6736(07)61165-9.

Hehlmann, R., Voskanyan, A., Lauseker, M., Pfirrmann, M., Kalmanti, L., Rinaldetti, S., Kohlbrenner, K., Haferlach, C., Schlegelberger, B., Fabarius, A., Seifarth, W., Spieß, B., Wuchter, P., Krause, S., Kolb, H.-J., Neubauer, A., Hossfeld, D. K., Nerl, C., Gratwohl, A., Baerlocher, G. M., Burchert, A., Brümendorf, T. H., Hasford, J., Hochhaus, A., Saußele, S., Baccarani, M., von Weikersthal, L. F., Hahn, M., Schlimok, G., Reichert, D., Janssen, J., Martens, U., Majunke, P., Reichert, P., Neben, K., Korsten, S., Scholz, C., Oldenkott, B., Heßling, J., Kingreen, D., Sperling, C., Schelenz, C., Blau, I., Urmersbach, A., Ludwig, W., Le Coutre, P., Arnold, R., de Wit, M., Pezzutto, A., Schäfer, E., Schroers, R., Lochter, A., Behringer, D., Ko, Y., Weidenhöfer, S., Verbeek, W., Brossart, P., Trenn, G., Pommerien, W., Krauter, J., Doering, G., Munzinger, H., Diekmann, C., Hertenstein, B., Stier, S., Möller-Faßbender, F., Hänel, M., Zöller, T., Lamberti, C., Koch, B., Henzel, A., Wagner, S., Schmalenbach, A., Hoffknecht, M., Ehninger, G., Kiani, A., Illmer, T., Aul, C., Flaßhove, M., Henneke, F., Simon, M., Müller, L., Becker, H., Janz, R., Eckart, M. J., Fuchs, R., Schlegel, F., Wattad, M., Rudolph, R., Beelen, D. W., Lindemann, A., Linck, D., Wassman, Jäger, E., Al-Batran, S., Reiber, T., Waller, C. F., Hoeffkes, H., Schulz, L., Tajrobehkar, K., Mittermüller, J., Pralle, H., Runde, V., Hoyer, A., Tessen, H., Trümper, L., Schmidt, C., Sieber, M., Eschenburg, H., Depenbusch, R., Rösel, S., Lindemann, H. W., Wolf, H., Spohn, C., Moeller, R., Hossfeld, D., Zander, A., Schafhausen, P., Köster, H., Hollburg, W., Schmitz, N., Dürk, H., Hemeier, M., Grote-Metke, A., Weischer, H., Bechtel, B., Balleisen, L., Sosada, M., Ho, A., Petersen, V., Dengler, J., Bildat, S., Hahn, L., Dietzfelbinger, H., Gröschel, W., Bartholomäus, A., Freier, W., Sievers, B., Pfreundschuh, I.-M., Herrmann, T., Fauser, A., Menzel, J., Kemmerling, M., Hansen, R., Link, H., Schatz, M., Bentz, M., Prümmer, O., Kneba, M., Heymanns, J., Schmitz, S., Scheid, C., Lollert, A., Neise, M., Planker, M., Stauch, M., Schröder, M., Kempf, B., Vehling-Kaiser, U., Kremers, S., Köchling, G., Müller, L., Hartmann, F., Neuhaus, T., Fetscher, S., Kämpfe, D., Heil, G., Uppenkamp,

- M., Goldmann, B., Huber, T. F., Hieber, U., Plöger, C., Griesshammer, M., Lange, C., Göttler, B., Lunsken, C., Schiel, X., Scheidegger, C., Stötzer, O., Hitz, H., Schick, H., Völkl, S., Spiekermann, K., Berdel, W., Hebart, H., Ladda, E., Schmidt, P., Burkhardt, U., Hentschke, S., Falge, C., Reschke, D., Köhne, C. A., Müller-Naendrup, C., Sauer, M., Frühauf, S., Ranft, K., Dencausse, Y., Sandritter, B., Baake, G., Hofknecht, M., Dengler, R., Edinger, M., Schenk, M., Wehmeier, A., Weidelich, H.-P., Pihusch, R., Stahlhut, K., Baldus, M., Matzdorff, A., Geer, T., Schanz, S., Käfer, G., Gassmann, W., Priebe-Richter, C., Demandt, M., Springer, G., Fiechtner, H., Denzlinger, C., Schleicher, J., Assman, D., Gaeckler, R., Adam, G., Waladkhani, A., Rendenbach, B., Forstbauer, H., Kanz, L., Jacki, S., Stegelmann, F., Kalhori, N., Nusch, A., Langer, W., Müller, F., Brettner, S., Uebelmesser, B., Kamp, T., Schadeck-Gressel, C., Josten, K., Klein, O., Schwerdtfeger, R., Baurmann, H., Strotkötter, H., Fett, W., Raghavachar, A., Maintz, C., Goebler, M. C., Schlag, R., Else, W., Wernli, M., Heim, D., Wullemin, W., Hess, U., Gmür, J. et Mayer, J. (2020). High-risk additional chromosomal abnormalities at low blast counts herald death by cml. *Leukemia*, **34**(8), 2074–2086. ISSN 1476-5551. doi: 10.1038/s41375-020-0826-9.
- Hesselton, S. E., Matsson, P., Shima, J. E., Fukushima, H., Yee, S. W., Kobayashi, Y., Gow, J. M., Ha, C., Ma, B., Poon, A., Johns, S. J., Stryke, D., Castro, R. A., Tahara, H., Choi, J. H., Chen, L., Picard, N., Sjödin, E., Roelofs, M. J. E., Ferrin, T. E., Myers, R., Kroetz, D. L., Kwok, P.-Y. et Giacomini, K. M. (2009). Genetic variation in the proximal promoter of abc and slc superfamilies: Liver and kidney specific expression and promoter activity predict variation. *PLoS ONE*, **4**(9), e6942. ISSN 1932-6203. doi: 10.1371/journal.pone.0006942.
- Hochhaus, A., Saglio, G., Hughes, T. P., Larson, R. A., Kim, D.-W., Issaragrisil, S., le Coutre, P. D., Etienne, G., Dorlhiac-Llacer, P. E., Clark, R. E., Flinn, I. W., Nakamae, H., Donohue, B., Deng, W., Dalal, D., Menssen, H. D. et Kantarjian, H. M. (2016). Long-term benefits and risks of frontline nilotinib vs imatinib for chronic myeloid leukemia in chronic phase: 5-year update of the randomized enestnd trial. *Leukemia*, **30**, 1044–1054. ISSN 1476-5551. doi: 10.1038/leu.2016.5.
- Hochhaus, A., Baccarani, M., Silver, R. T., Schiffer, C., Apperley, J. F., Cervantes, F., Clark, R. E., Cortes, J. E., Deininger, M. W., Guilhot, F., Hjorth-Hansen, H., Hughes, T. P., Janssen, J. J. W. M., Kantarjian, H. M., Kim, D. W., Larson, R. A., Lipton, J. H., Mahon, F. X., Mayer, J., Nicolini, F., Niederwieser, D., Pane, F., Radich, J. P., Rea, D., Richter, J., Rosti, G., Rousselot, P., Saglio, G., Saübele, S., Soverini, S., Steegmann, J. L., Turkina, A., Zaritsky, A. et

- Hehlmann, R. (2020). European leukemianet 2020 recommendations for treating chronic myeloid leukemia. *Leukemia*, **34**, 966–984. ISSN 1476-5551. doi: 10.1038/s41375-020-0776-2.
- Hochhaus, A., Réa, D., Boquimpani, C., Minami, Y., Cortes, J. E., Hughes, T. P., Apperley, J. F., Lomaia, E., Voloshin, S., Turkina, A., Kim, D.-W., Abdo, A., Fogliatto, L. M., le Coutre, P., Sasaki, K., Kim, D. D. H., Saussele, S., Annunziata, M., Chaudhri, N., Chee, L., García-Gutiérrez, V., Kapoor, S., Allepuz, A., Quenet, S., Bédoucha, V. et Mauro, M. J. (2023). Asciminib vs bosutinib in chronic-phase chronic myeloid leukemia previously treated with at least two tyrosine kinase inhibitors: longer-term follow-up of ascembl. *Leukemia*, **37**(3), 617–626. ISSN 1476-5551. doi: 10.1038/s41375-023-01829-9.
- Hu, S., Franke, R. M., Filipinski, K. K., Hu, C., Orwick, S. J., de Bruijn, E. A., Burger, H., Baker, S. D. et Sparreboom, A. (2008). Interaction of imatinib with human organic ion carriers. *Clinical Cancer Research*, **14**(10), 3141–3148. ISSN 1557-3265. doi: 10.1158/1078-0432.ccr-07-4913.
- Ilander, M., Olsson-Strömberg, U., Schlums, H., Guilhot, J., Brück, O., Lähteenmäki, H., Kasanen, T., Koskenvesa, P., Söderlund, S., Höglund, M., Markevörn, B., Sjölander, A., Lotfi, K., Dreimane, A., Lübking, A., Holm, E., Björman, M., Lehmann, S., Stenke, L., Ohm, L., Gedde-Dahl, T., Majeed, W., Ehrencrona, H., Koskela, S., Saussele, S., Mahon, F.-X., Porkka, K., Hjorth-Hansen, H., Bryceson, Y. T., Richter, J. et Mustjoki, S. (2016). Increased proportion of mature nk cells is associated with successful imatinib discontinuation in chronic myeloid leukemia. *Leukemia*, **31**(5), 1108–1116. ISSN 1476-5551. doi: 10.1038/leu.2016.360.
- Jabbour, E. et Kantarjian, H. (2016). Chronic myeloid leukemia: 2016 update on diagnosis, therapy, and monitoring. *American Journal of Hematology*, **91**(2), 252–265. ISSN 1096-8652. doi: 10.1002/ajh.24275.
- Jain, P., Kantarjian, H., Nazha, A., O'Brien, S., Jabbour, E., Romo, C. G., Pierce, S., Cardenas-Turanzas, M., Verstovsek, S., Borthakur, G., Ravandi, F., Quintás-Cardama, A. et Cortes, J. (2013). Early responses predict better outcomes in patients with newly diagnosed chronic myeloid leukemia: results with four tyrosine kinase inhibitor modalities. *Blood*, **121**(24), 4867–4874. ISSN 1528-0020. doi: 10.1182/blood-2013-03-490128.
- Jiang, Z.-P., Zhao, X.-L., Takahashi, N., Angelini, S., Dubashi, B., Sun, L. et Xu, P. (2016). Trough concentration and abcg2 polymorphism are better to predict

- imatinib response in chronic myeloid leukemia: A meta-analysis. *Pharmacogenomics*, **18**(1), 35–56. ISSN 1744-8042. doi: 10.2217/pgs-2016-0103.
- Kantarjian, H. M., O'Brien, S., Cortes, J., Giles, F. J., Faderl, S., Issa, J.-P., Garcia-Manero, G., Rios, M. B., Shan, J., Andreeff, M., Keating, M. et Talpaz, M. (2003). Results of decitabine (5-aza-2'deoxyctidine) therapy in 130 patients with chronic myelogenous leukemia. *Cancer*, **98**, 522–528. ISSN 0008-543X. doi: 10.1002/cncr.11543.
- Kerb, R., Brinkmann, U., Chatskaia, N., Gorbunov, D., Gorboulev, V., Morhninweg, E., Keil, A., Eichelbaum, M. et Koepsell, H. (2002). Identification of genetic variations of the human organic cation transporter hoct1 and their functional consequences. *Pharmacogenetics*, **12**(8), 591–595. ISSN 0960-314X. doi: 10.1097/00008571-200211000-00002.
- Khoury, J. D., Solary, E., Abla, O., Akkari, Y., Alaggio, R., Apperley, J. F., Bejar, R., Berti, E., Busque, L., Chan, J. K. C., Chen, W., Chen, X., Chng, W.-J., Choi, J. K., Colmenero, I., Coupland, S. E., Cross, N. C. P., De Jong, D., Elghetany, M. T., Takahashi, E., Emile, J.-F., Ferry, J., Fogelstrand, L., Fontenay, M., Germing, U., Gujral, S., Haferlach, T., Harrison, C., Hodge, J. C., Hu, S., Jansen, J. H., Kanagal-Shamanna, R., Kantarjian, H. M., Kratz, C. P., Li, X.-Q., Lim, M. S., Loeb, K., Loghavi, S., Marcogliese, A., Meshinchi, S., Michaels, P., Naresh, K. N., Natkunam, Y., Nejati, R., Ott, G., Padron, E., Patel, K. P., Patkar, N., Picarsic, J., Platzbecker, U., Roberts, I., Schuh, A., Sewell, W., Siebert, R., Tembhare, P., Tyner, J., Verstovsek, S., Wang, W., Wood, B., Xiao, W., Yeung, C. et Hochhaus, A. (2022). The 5th edition of the world health organization classification of haematolymphoid tumours: Myeloid and histiocytic/dendritic neoplasms. *Leukemia*, **36**(7), 1703–1719. ISSN 1476-5551. doi: 10.1038/s41375-022-01613-1.
- Kim, D. H. D., Sriharsha, L., Xu, W., Kamel-Reid, S., Liu, X., Siminovitch, K., Messner, H. A. et Lipton, J. H. (2009). Clinical relevance of a pharmacogenetic approach using multiple candidate genes to predict response and resistance to imatinib therapy in chronic myeloid leukemia. *Clinical Cancer Research*, **15** (14), 4750–4758. ISSN 1557-3265. doi: 10.1158/1078-0432.ccr-09-0145.
- Kim, T., Tyndel, M. S., Zhang, Z., Ahn, J., Choi, S., Szardenings, M., Lipton, J. H., Kim, H.-J. et Kim Dong Hwan, D. (2017). Exome sequencing reveals dnmt3a and asxl1 variants associate with progression of chronic myeloid leukemia after tyrosine kinase inhibitor therapy. *Leukemia Research*, **59**, 142–148. ISSN 0145-2126. doi: 10.1016/j.leukres.2017.06.009.

- Kim, Y.-K., Lee, S.-S., Jeong, S.-H., Ahn, J.-S., Yang, D.-H., Lee, J.-J., Shin, M.-G. et Kim, H.-J. (2014). Oct-1,abcb1, andabcg2expression in imatinib-resistant chronic myeloid leukemia treated with dasatinib or nilotinib. *Chonnam Medical Journal*, **50**(3), 102. ISSN 2233-7393. doi: 10.4068/cmj.2014.50.3.102.
- Koren-Michowitz, M., Buzaglo, Z., Ribakovsky, E., Schwarz, M., Pessach, I., Shimon, A., Beider, K., Amariglio, N., Ie Coutre, P. et Nagler, A. (2013). Oct1 genetic variants are associated with long term outcomes in imatinib treated chronic myeloid leukemia patients. *European Journal of Haematology*, **92**(4), 283–288. ISSN 1600-0609. doi: 10.1111/ejh.12235.
- Kurzrock, R., Gutterman, J. U. et Talpaz, M. (1988). The molecular genetics of philadelphia chromosome-positive leukemias. *The New England journal of medicine*, **319**, 990–998. ISSN 0028-4793. doi: 10.1056/NEJM198810133191506.
- Lage, H. (2008). An overview of cancer multidrug resistance: a still unsolved problem. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **65**(20), 3145–3167. ISSN 1420-9071. doi: 10.1007/s00018-008-8111-5.
- Lee, A. M. et Wu, C.-t. (2006). Enhancer–promoter communication at the yellow-gene of *Drosophila melanogaster*: Diverse promoters participate in and regulate transinteractions. *Genetics*, **174**(4), 1867–1880. ISSN 1943-2631. doi: 10.1534/genetics.106.064121.
- Lipton, J. H., Chuah, C., Guerci-Bresler, A., Rosti, G., Simpson, D., Assouline, S., Etienne, G., Nicolini, F. E., le Coutre, P., Clark, R. E., Stenke, L., Andorsky, D., Oehler, V., Lustgarten, S., Rivera, V. M., Clackson, T., Haluska, F. G., Baccarani, M., Cortes, J. E., Guilhot, F., Hochhaus, A., Hughes, T., Kantarjian, H. M., Shah, N. P., Talpaz, M., Deininger, M. W. et investigators, E. P. I. C. (2016). Ponatinib versus imatinib for newly diagnosed chronic myeloid leukaemia: an international, randomised, open-label, phase 3 trial. *The Lancet. Oncology*, **17**, 612–621. ISSN 1474-5488. doi: 10.1016/S1470-2045(16)00080-2.
- Machiela, M. J. et Chanock, S. J. (2015). Ldlink: a web-based application for exploring population-specific haplotype structure and linking correlated alleles of possible functional variants. *Bioinformatics*, **31**(21), 3555–3557. ISSN 1367-4803. doi: 10.1093/bioinformatics/btv402.
- Machova Polakova, K., Kulvait, V., Benesova, A., Linhartova, J., Klamova, H., Jaruskova, M., de Benedittis, C., Haferlach, T., Baccarani, M., Martinelli, G.,



- Stopka, T., Ernst, T., Hochhaus, A., Kohlmann, A. et Soverini, S. (2014). Next-generation deep sequencing improves detection of bcr-abl1 kinase domain mutations emerging under tyrosine kinase inhibitor treatment of chronic myeloid leukemia patients in chronic phase. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, **141**(5), 887–899. ISSN 1432-1335. doi: 10.1007/s00432-014-1845-6.
- Machova Polakova, K., Zizkova, H., Zuna, J., Motlova, E., Hovorkova, L., Gottschalk, A., Glauche, I., Koblihova, J., Pecherkova, P., Klamova, H., Stastna Markova, M., Srbova, D., Benesova, A., Polivkova, V., Jurcek, T., Zackova, D., Mayer, J., Ernst, T., Mahon, F. X., Saussele, S., Roeder, I., Cross, N. C. P. et Hochhaus, A. (2020). Analysis of chronic myeloid leukaemia during deep molecular response by genomic per: a traffic light stratification model with impact on treatment-free remission. *Leukemia*, **34**(8), 2113–2124. ISSN 1476-5551. doi: 10.1038/s41375-020-0882-1.
- Mahon, F.-X., Pfirrmann, M., Dulucq, S., Hochhaus, A., Panayiotidis, P., Almeida, A., Mayer, J., Hjorth-Hansen, H., Janssen, J. J., Mustjoki, S., Martinez-Lopez, J., Vestergaard, H., Ehrencrona, H., Machová Poláková, K., Olsson-Strömberg, U., Ossenkoppele, G., Berger, M. G., Etienne, G., Dengler, J., Brümmendorf, T. H., Burchert, A., Réa, D., Rousselot, P., Nicolini, F. E., Hofmann, W.-K., Richter, J., Saussele, S., Mayer, J., Voglová, J., Faber, E., Klamova, H., Vestergaard, H., Koskenvesa, P., Mahon, F.-X., Etienne, G., Berger, M. G., Rousselot, P., Nicolini, F. E., Charbonnier, A., Legros, L., Réa, D., Guilhot, F., Escoffre-Barbe, M., Huguet, F., Gyan, E., Brümmendorf, T. H., Waller, C., Dengler, J., Hochhaus, A., Saußele, S., Burchert, A., Kunzmann, V., Pagoni, M. N., Panayiotidis, P., Janssen, J. J., Ossenkoppele, G., Westerweel, P. E., de Greef, G. E., Gruber, F., Hjorth-Hansen, H., Almeida, A., Martinez-Lopez, J., Lotfi, K., Richter, J., Stenke, L., Olsson-Strömberg, U. et Söderlund, S. (2024). European stop tyrosine kinase inhibitor trial (euro-ski) in chronic myeloid leukemia: Final analysis and novel prognostic factors for treatment-free remission. *Journal of Clinical Oncology*, **42**(16), 1875–1880. ISSN 1527-7755. doi: 10.1200/jco.23.01647.
- Marin, D., Bazeos, A., Mahon, F.-X., Eliasson, L., Milojkovic, D., Bua, M., Apperley, J. F., Szydlo, R., Desai, R., Kozlowski, K., Paliompeis, C., Latham, V., Foroni, L., Molimard, M., Reid, A., Rezvani, K., de Lavallade, H., Guallar, C., Goldman, J. et Khorashad, J. S. (2010). Adherence is the critical factor for achieving molecular responses in patients with chronic myeloid leukemia who achieve complete cytogenetic responses on imatinib. *Journal of Clinical Oncology*, **28**(14), 2381–2388. ISSN 1527-7755. doi: 10.1200/jco.2009.26.3087.

- Melo, J. V. (1996). The molecular biology of chronic myeloid leukaemia. *Leukemia*, **10**, 751–756. ISSN 0887-6924.
- Mohammadi, F., Rostami, G., Assad, D., Shafiei, M., Hamid, M. et Jalaeikhoo, H. (2021). Association of slc22a1,slco1b3 drug transporter polymorphisms and smoking with disease risk and cytogenetic response to imatinib in patients with chronic myeloid leukemia. *Laboratory Medicine*, **52**(6), 584–596. ISSN 1943-7730. doi: 10.1093/labmed/lmab023.
- Müller, M. C., Cross, N. C. P., Erben, P., Schenk, T., Hanfstein, B., Ernst, T., Hehlmann, R., Branford, S., Saglio, G. et Hochhaus, A. (2009). Harmonization of molecular monitoring of cml therapy in europe. *Leukemia*, **23**(11), 1957–1963. ISSN 1476-5551. doi: 10.1038/leu.2009.168.
- Nakanishi, T., Shiozawa, K., Hassel, B. A. et Ross, D. D. (2006). Complex interaction of bcrp/abcg2 and imatinib in bcr-abl-expressing cells: Bcrp-mediated resistance to imatinib is attenuated by imatinib-induced reduction of bcrp expression. *Blood*, **108**(2), 678–684. ISSN 1528-0020. doi: 10.1182/blood-2005-10-4020.
- Neul, C., Schaeffeler, E., Sparreboom, A., Laufer, S., Schwab, M. et Nies, A. T. (2016). Impact of membrane drug transporters on resistance to small-molecule tyrosine kinase inhibitors. *Trends in Pharmacological Sciences*, **37**(11), 904–932. ISSN 0165-6147. doi: 10.1016/j.tips.2016.08.003.
- Nies, A. T., Schaeffeler, E., van der Kuip, H., Cascorbi, I., Bruhn, O., Kneba, M., Pott, C., Hofmann, U., Volk, C., Hu, S., Baker, S. D., Sparreboom, A., Ruth, P., Koepsell, H. et Schwab, M. (2014). Cellular uptake of imatinib into leukemic cells is independent of human organic cation transporter 1 (oct1). *Clinical Cancer Research*, **20**(4), 985–994. ISSN 1557-3265. doi: 10.1158/1078-0432.ccr-13-1999.
- Nowell, P. C. et Hungerford, D. A. (1960). Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. *Journal of the National Cancer Institute*, **25**, 85–109. ISSN 0027-8874.
- O’Hare, T., Shakespeare, W. C., Zhu, X., Eide, C. A., Rivera, V. M., Wang, F., Adrian, L. T., Zhou, T., Huang, W.-S., Xu, Q., Metcalf, C. A., Tyner, J. W., Loriaux, M. M., Corbin, A. S., Wardwell, S., Ning, Y., Keats, J. A., Wang, Y., Sundaramoorthi, R., Thomas, M., Zhou, D., Snodgrass, J., Commodore, L., Sawyer, T. K., Dalgarno, D. C., Deininger, M. W. N., Druker, B. J. et Clackson, T. (2009). Ap24534, a pan-bcr-abl inhibitor for chronic myeloid leukemia,

- potently inhibits the t315i mutant and overcomes mutation-based resistance. *Cancer cell*, **16**, 401–412. ISSN 1878-3686. doi: 10.1016/j.ccr.2009.09.028.
- Omran, M. M., Abdelfattah, R., Moussa, H. S., Alieldin, N. et Shouman, S. A. (2020). Association of the trough, peak/trough ratio of imatinib, pyridine-n-oxide imatinib and abcg2 snps 34 g>a and slco1b3 334 t>g with imatinib response in egyptian chronic myeloid leukemia patients. *Frontiers in Oncology*, **10**. ISSN 2234-943X. doi: 10.3389/fonc.2020.01348.
- Ou, S. A., Chang, E., Lee, S., So, K., Wu, C.-t. et Morris, J. R. (2009). Effects of chromosomal rearrangements on transvection at theyellowgene of drosophila melanogaster. *Genetics*, **183**(2), 483–496. ISSN 1943-2631. doi: 10.1534/genetics.109.106559.
- Perland, E. et Fredriksson, R. (2017). Classification systems of secondary active transporters. *Trends in Pharmacological Sciences*, **38**(3), 305–315. ISSN 0165-6147. doi: 10.1016/j.tips.2016.11.008.
- Petaïn, A., Kattygnarath, D., Azard, J., Chatelut, E., Delbaldo, C., Geoerger, B., Barrois, M., Seronie-Vivien, S., LeCesne, A. et Vassal, G. (2008). Population pharmacokinetics and pharmacogenetics of imatinib in children and adults. *Clinical Cancer Research*, **14**(21), 7102–7109. ISSN 1557-3265. doi: 10.1158/1078-0432.ccr-08-0950.
- Pfırrmann, M., Baccarani, M., Saussele, S., Guilhot, J., Cervantes, F., Ossenkoppele, G., Hoffmann, V. S., Castagnetti, F., Hasford, J., Hehlmann, R. et Simonsson, B. (2016). Prognosis of long-term survival considering disease-specific death in patients with chronic myeloid leukemia. *Leukemia*, **30**, 48–56. ISSN 1476-5551. doi: 10.1038/leu.2015.261.
- Pizzagalli, M. D., Bensimon, A. et Superti-Furga, G. (2020). A guide to plasma membrane solute carrier proteins. *The FEBS Journal*, **288**(9), 2784–2835. ISSN 1742-4658. doi: 10.1111/febs.15531.
- Polillo, M., Galimberti, S., Baratè, C., Petrini, M., Danesi, R. et Di Paolo, A. (2015). Pharmacogenetics of bcr/abl inhibitors in chronic myeloid leukemia. *International Journal of Molecular Sciences*, **16**(9), 22811–22829. ISSN 1422-0067. doi: 10.3390/ijms160922811.
- Povey, S., Lovering, R., Bruford, E., Wright, M., Lush, M. et Wain, H. (2001). The hugo gene nomenclature committee (hgnc). *Human Genetics*, **109**(6), 678–680. ISSN 1432-1203. doi: 10.1007/s00439-001-0615-0.

- Rea, D., Nicolini, F. E., Tulliez, M., Guilhot, F., Guilhot, J., Guerci-Bresler, A., Gardembas, M., Coiteux, V., Guillerm, G., Legros, L., Etienne, G., Pignon, J.-M., Villemagne, B., Escoffre-Barbe, M., Ianotto, J.-C., Charbonnier, A., Johnson-Ansah, H., Noel, M.-P., Rousselot, P. et Mahon, F.-X. (2017). Discontinuation of dasatinib or nilotinib in chronic myeloid leukemia: interim analysis of the stop 2g-tki study. *Blood*, **129**(7), 846–854. ISSN 1528-0020. doi: 10.1182/blood-2016-09-742205.
- Reckel, S., Hamelin, R., Georgeon, S., Armand, F., Jolliet, Q., Chiappe, D., Moniatte, M. et Hantschel, O. (2017). Differential signaling networks of bcr-abl p210 and p190 kinases in leukemia cells defined by functional proteomics. *Leukemia*, **31**, 1502–1512. ISSN 1476-5551. doi: 10.1038/leu.2017.36.
- Ross, D. M., Branford, S., Seymour, J. F., Schwarzer, A. P., Arthur, C., Yeung, D. T., Dang, P., Goynes, J. M., Slader, C., Filshie, R. J., Mills, A. K., Melo, J. V., White, D. L., Grigg, A. P. et Hughes, T. P. (2013). Safety and efficacy of imatinib cessation for cml patients with stable undetectable minimal residual disease: results from the twister study. *Blood*, **122**(4), 515–522. ISSN 1528-0020. doi: 10.1182/blood-2013-02-483750.
- Rowley, J. D. (1973). Chromosomal patterns in myelocytic leukemia. *The New England journal of medicine*, **289**, 220–221. ISSN 0028-4793. doi: 10.1056/NEJM197307262890422.
- Saussele, S., Richter, J., Guilhot, J., Gruber, F. X., Hjorth-Hansen, H., Almeida, A., Janssen, J. J. W. M., Mayer, J., Koskenvesa, P., Panayiotidis, P., Olsson-Strömberg, U., Martinez-Lopez, J., Rousselot, P., Vestergaard, H., Ehrencrona, H., Kairisto, V., Machová Poláková, K., Müller, M. C., Mustjoki, S., Berger, M. G., Fabarius, A., Hofmann, W.-K., Hochhaus, A., Pffirmann, M., Mahon, F.-X., Ossenkoppele, G., Pagoni, M. N., Söderlund, S., Escoffre-Barbe, M., Etienne, G., Dengler, J., Huguet, F., von Bubnoff, N., Klamova, H., Faber, E., Guilhot, F., Lotfi, K., Rea, D., Brümmendorf, T. H., de Greef, G. E., Stenke, L., Nicolini, F. E., Legros, L., Burchert, A., Voglova, J., Charbonnier, A., Gyan, E., Kunzmann, V. et Westerweel, P. E. (2018). Discontinuation of tyrosine kinase inhibitor therapy in chronic myeloid leukaemia (euro-ski): a prespecified interim analysis of a prospective, multicentre, non-randomised, trial. *The Lancet Oncology*, **19**(6), 747–757. ISSN 1470-2045. doi: 10.1016/s1470-2045(18)30192-x.
- Schönfeld, L., Rinke, J., Hinze, A., Nagel, S. N., Schäfer, V., Schenk, T., Fabisch, C., Brümmendorf, T. H., Burchert, A., le Coutre, P., Krause, S. W., Saussele,

- S., Safizadeh, F., Pfirrmann, M., Hochhaus, A. et Ernst, T. (2022). Asxl1 mutations predict inferior molecular response to nilotinib treatment in chronic myeloid leukemia. *Leukemia*, **36**(9), 2242–2249. ISSN 1476-5551. doi: 10.1038/s41375-022-01648-4.
- Schütz, C., Inselmann, S., Sausslele, S., Dietz, C. T., Müller, M. C., Eigendorff, E., Brendel, C. A., Metzelder, S. K., Brümmendorf, T. H., Waller, C., Dengler, J., Goebeler, M. E., Herbst, R., Freunek, G., Hanzel, S., Illmer, T., Wang, Y., Lange, T., Finkernagel, F., Hehlmann, R., Huber, M., Neubauer, A., Hochhaus, A., Guilhot, J., Xavier Mahon, F., Pfirrmann, M. et Burchert, A. (2017). Expression of the ctla-4 ligand cd86 on plasmacytoid dendritic cells (pdc) predicts risk of disease recurrence after treatment discontinuation in cml. *Leukemia*, **31**(4), 829–836. ISSN 1476-5551. doi: 10.1038/leu.2017.9.
- Shah, J. O., Herrera, S. J., Roberts, D. B., Gunn, G. B. et Gidley, P. W. (2016). Complications of tympanostomy tubes in head and neck cancer patients. *American journal of otolaryngology*, **37**, 356–361. ISSN 1532-818X. doi: 10.1016/j.amjoto.2015.10.006.
- Singh, O., Chan, J. Y., Lin, K., Heng, C. C. T. et Chowbay, B. (2012). Slc22a1-abcb1 haplotype profiles predict imatinib pharmacokinetics in asian patients with chronic myeloid leukemia. *PLoS ONE*, **7**(12), e51771. ISSN 1932-6203. doi: 10.1371/journal.pone.0051771.
- Soverini, S., Hochhaus, A., Nicolini, F. E., Gruber, F., Lange, T., Saglio, G., Pane, F., Müller, M. C., Ernst, T., Rosti, G., Porkka, K., Baccarani, M., Cross, N. C. P. et Martinelli, G. (2011). Bcr-abl kinase domain mutation analysis in chronic myeloid leukemia patients treated with tyrosine kinase inhibitors: recommendations from an expert panel on behalf of european leukemianet. *Blood*, **118**(5), 1208–1215. ISSN 1528-0020. doi: 10.1182/blood-2010-12-326405.
- Soverini, S., De Benedittis, C., Papayannidis, C., Paolini, S., Venturi, C., Iacobucci, I., Luppi, M., Bresciani, P., Salvucci, M., Russo, D., Sica, S., Orlandi, E., Intermesoli, T., Gozzini, A., Bonifacio, M., Rigolin, G. M., Pane, F., Baccarani, M., Cavo, M. et Martinelli, G. (2013). Drug resistance and bcr-abl kinase domain mutations in philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia from the imatinib to the second-generation tyrosine kinase inhibitor era: The main changes are in the type of mutations, but not in the frequency of mutation involvement. *Cancer*, **120**(7), 1002–1009. ISSN 1097-0142. doi: 10.1002/cncr.28522.

- Srutova, K., Curik, N., Burda, P., Savvulidi, F., Silvestri, G., Trotta, R., Klammova, H., Pecherkova, P., Sovova, Z., Koblihova, J., Stopka, T., Perrotti, D. et Polakova, K. M. (2018). Bcr-abl1 mediated mir-150 downregulation through myc contributed to myeloid differentiation block and drug resistance in chronic myeloid leukemia. *Haematologica*, **103**(12), 2016–2025. ISSN 1592-8721. doi: 10.3324/haematol.2018.193086.
- Takahashi, N., Kyo, T., Maeda, Y., Sugihara, T., Usuki, K., Kawaguchi, T., Usui, N., Okamoto, S., Ohe, Y., Ohtake, S., Kitamura, K., Yamamoto, M., Teshima, H., Motoji, T., Tamaki, T., Sawada, K. et Ohyashiki, K. (2011). Discontinuation of imatinib in japanese patients with chronic myeloid leukemia. *Haematologica*, **97**(6), 903–906. ISSN 1592-8721. doi: 10.3324/haematol.2011.056853.
- Talpaz, M., Hehlmann, R., Quintás-Cardama, A., Mercer, J. et Cortes, J. (2012). Re-emergence of interferon- $\alpha$  in the treatment of chronic myeloid leukemia. *Leukemia*, **27**(4), 803–812. ISSN 1476-5551. doi: 10.1038/leu.2012.313.
- Tarling, E. J., Vallim, T. Q. d. A. et Edwards, P. A. (2013). Role of abc transporters in lipid transport and human disease. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, **24**(7), 342–350. ISSN 1043-2760. doi: 10.1016/j.tem.2013.01.006.
- Thomas, C. et Tampé, R. (2018). Multifaceted structures and mechanisms of abc transport systems in health and disease. *Current Opinion in Structural Biology*, **51**, 116–128. ISSN 0959-440X. doi: 10.1016/j.sbi.2018.03.016.
- Thomas, C. et Tampé, R. (2020). Structural and mechanistic principles of abc transporters. *Annual Review of Biochemistry*, **89**(1), 605–636. ISSN 1545-4509. doi: 10.1146/annurev-biochem-011520-105201.
- Thomas, J., Wang, L., Clark, R. E. et Pirmohamed, M. (2004). Active transport of imatinib into and out of cells: implications for drug resistance. *Blood*, **104**(12), 3739–3745. ISSN 1528-0020. doi: 10.1182/blood-2003-12-4276.
- Thurber, G. M., Schmidt, M. M. et Wittrup, K. D. (2008). Antibody tumor penetration: Transport opposed by systemic and antigen-mediated clearance. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **60**(12), 1421–1434. ISSN 0169-409X. doi: 10.1016/j.addr.2008.04.012.
- Vakana, E., Arslan, A. D., Szilard, A., Altman, J. K. et Plataniias, L. C. (2013). Regulatory effects of sestrin 3 (sesn3) in bcr-abl expressing cells. *PLoS ONE*, **8**(11), e78780. ISSN 1932-6203. doi: 10.1371/journal.pone.0078780.

- Valenta, T., Lukas, J., Doubravska, L., Faflek, B. et Korinek, V. (2006). Hic1 attenuates wnt signaling by recruitment of tcf-4 and  $\beta$ -catenin to the nuclear bodies. *The EMBO Journal*, **25**(11), 2326–2337. ISSN 1460-2075. doi: 10.1038/sj.emboj.7601147.
- Vine, J., Cohen, S. B., Ruchlemer, R., Goldschmidt, N., Levin, M., Libster, D., Gural, A., Gatt, M. E., Lavie, D., Ben-Yehuda, D. et Rund, D. (2014). Polymorphisms in the human organic cation transporter and the multidrug resistance gene: correlation with imatinib levels and clinical course in patients with chronic myeloid leukemia. *Leukemia & Lymphoma*, **55**(11), 2525–2531. ISSN 1029-2403. doi: 10.3109/10428194.2014.893307.
- Wang, L., Giannoudis, A., Lane, S., Williamson, P., Pirmohamed, M. et Clark, R. (2007). Expression of the uptake drug transporter hoct1 is an important clinical determinant of the response to imatinib in chronic myeloid leukemia. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, **83**(2), 258–264. ISSN 1532-6535. doi: 10.1038/sj.clpt.6100268.
- Wang, Q., Jiang, Z.-P., Zeng, J., Zhu, Y., Cai, H.-L., Xiang, D.-X., He, Q., Shi, X.-L., Zhong, A.-N., Zhao, X.-L. et Xu, P. (2020). Effects of trough concentration and solute carrier polymorphisms on imatinib efficacy in chinese patients with chronic myeloid leukemia. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, **23**(1), 1–9. ISSN 1482-1826. doi: 10.18433/jpps30559.
- Wang, W., Cortes, J. E., Tang, G., Khoury, J. D., Wang, S., Bueso-Ramos, C. E., DiGiuseppe, J. A., Chen, Z., Kantarjian, H. M., Medeiros, L. J. et Hu, S. (2016). Risk stratification of chromosomal abnormalities in chronic myelogenous leukemia in the era of tyrosine kinase inhibitor therapy. *Blood*, **127**(22), 2742–2750. ISSN 1528-0020. doi: 10.1182/blood-2016-01-690230.
- White, D. L., Saunders, V. A., Dang, P., Engler, J., Zannettino, A. C. W., Cambareri, A. C., Quinn, S. R., Manley, P. W. et Hughes, T. P. (2006). Oct-1-mediated influx is a key determinant of the intracellular uptake of imatinib but not nilotinib (amn107): reduced oct-1 activity is the cause of low in vitro sensitivity to imatinib. *Blood*, **108**(2), 697–704. ISSN 1528-0020. doi: 10.1182/blood-2005-11-4687.

# Internetové zdroje

- [https://leukemia-net.org/content/leukemias/cml/elts\\_score](https://leukemia-net.org/content/leukemias/cml/elts_score)
- [https://leukemia-net.org/content/leukemias/cml/eutos\\_score](https://leukemia-net.org/content/leukemias/cml/eutos_score)
- <https://bloodref.com/myeloid/cml/sokal-hasford>
- <https://slc.bioparadigms.org/>
- <https://hematoonkologia.pl>
- <https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>
- <https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>
- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>
- <https://analysistools.nci.nih.gov/LDlink/>
- <https://vassarstats.net>



# Seznam publikací autora

## Publikace k tématu disertace

- Machova Polakova K, Albeer A, Polivkova V, **Krutska M**, Vlcanova K, Curik N, Fabarius A, Klamova H, Spiess B, Waller CF, Brümmendorf TH, Dengler J, Kunzmann V, Burchert A, Belohlavkova P, Mustjoki S, Faber E, Mayer J, Zackova D, Panayiotidis P, Richter J, Hjorth- Hansen H, Kamińska M, Płonka M, Szczepanek E, Szarejko M, Bober G, Hus I, Grzybowska- Izydorczyk O, Wasilewska E, Paczkowska E, Niesiobędzka-Krężel J, Giannopoulos K, Mahon FX, Sacha T, Sauße S, Pfirrmann M. The SNP rs460089 in the gene promoter of the drug transporter OCTN1 has prognostic value for treatment-free remission in chronic myeloid leukemia patients treated with imatinib. *Leukemia*. 2024 Feb;38(2):318-325. doi: 10.1038/s41375-023-02109-2. **IF** (k datu publikace) = **11,4**
- **Jaruskova M**, Curik N, Hercog R, Polivkova V, Motlova E, Benes V, Klamova H, Pecherkova P, Belohlavkova P, Vrbacky F, Machova Polakova K. Genotypes of SLC22A4 and SLC22A5 regulatory loci are predictive of the response of chronic myeloid leukemia patients to imatinib treatment. *J Exp Clin Cancer Res*. 2017 Apr 18;36(1):55. doi: 10.1186/s13046-017-0523-3. **IF** (k datu publikace) = **6,22**
- Machova Polakova K, Kulvait V, Benesova A, Linhartova J, Klamova H, **Jaruskova M**, de Benedittis C, Haferlach T, Baccarani M, Martinelli G, Stopka T, Ernst T, Hochhaus A, Kohlmann A, Soverini S. Next-generation deep sequencing improves detection of BCR-ABL1 kinase domain mutations emerging under tyrosine kinase inhibitor treatment of chronic myeloid leukemia patients in chronic phase. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2015 May;141(5):887-99. doi: 10.1007/s00432-014-1845-6. **IF** (k datu publikace) = **3,14**
- Linhartova J, Hovorkova L, Soverini S, Benesova A, **Jaruskova M**, Klamova H, Zuna J, Machova Polakova K. Characterization of 46 patient-specific BCR-ABL1 fusions and detection of SNPs upstream and downstream the breakpoints in chronic myeloid leukemia using next generation sequencing. *Mol Cancer*. 2015 Apr 18;14:89. doi: 10.1186/s12943-015-0363-8. **IF** (k datu publikace) = **5.89**

### Ostatní publikace za dobu studia:

- Koblihova J, Srutova K, **Krutska M**, Klamova H, Machova Polakova K. AFLP-AFLP in silico-NGS approach reveals polymorphisms in repetitive elements in the malignant genome. PLoS One. 2018 Nov 8;13(11):e0206620. doi: 10.1371/journal.pone.0206620. eCollection 2018. **IF** (k datu publikace) = **2,78**
- Valka J, Sobotkova M, **Krutská M**, Soukup P. Diferenciální diagnostika a léčba anémie. Med. praxi 2021; 18(1): 14–20
- Valka J, **Krutska M**, Sobotková M, Soukup P. Midostaurin, aktuální přehled a klinické zkušenosti ÚHKT v roce 2021 – kazuistika. Onkologická revue 2021; 8(6): 69-76. ISSN: 2464- 7195
- **Krutska M**, Valka J, Soukup P. Kazuistika pacientky s posttransplantačním relapsem FLT3-ITD pozitivní akutní myeloidní leukemie léčené gilteritinibem. Aktuální témata v onkologii očima českých lékařů. 2022; 7(4): 144-147. ISSN: 2464-6148.