

Univerzita Karlova

1. lékařská fakulta

Autoreferát disertační práce



UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta

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

Monika Krutská

Praha, 2024

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

Obor: Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie

Předseda oborové rady: doc. RNDr. Dana Holá, Ph.D.

Školící pracoviště: Ústav klinické a experimentální hematologie 1. LF UK a ÚHKT

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

Konzultant: MUDr. Hana Klamová, CSc.

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

Obsah:

Abstrakt	4
Abstract	5
1. Teoretický úvod	6
2. Výchozí hypotéza a cíl práce	7
3. Materiál a metodika	8
3.1. Soubor vyšetřovaných pacientů	8
3.2. Návrh primerů a PCR promotorových oblastí	8
3.3. Cílené sekvenování vybraných promotorových oblastí	8
3.4. Genotypizační analýza	9
3.5. Analýza vazebné nerovnováhy	9
3.6. Měření relativní exprese genu <i>SLC22A4</i> a <i>SLC22A5</i>	10
3.7. Výpočet halving time <i>BCR::ABL1</i>	10
3.8. Statistické analýzy	11
4. Výsledky	11
4.1. Identifikace SNP v promotorech genů <i>ABC</i> a <i>SLC</i> asociovaných s odpovědí pacientů s CML	11
4.2. Analýzy vazebné nerovnováhy	13
4.3. Genotyp SNP rs460089 ovlivňuje odpověď na léčbu imatinibem	14
4.4. Kombinace genotypů SNP promotorů <i>SLC22A4</i> a <i>SLC22A5</i> ovlivňuje odpověď na léčbu imatinibem	15
4.5. SNP rs460089 je nezávislý prediktivní faktor odpovědi na léčbu CML	17
4.6. Měření exprese <i>SLC22A4</i> a <i>SLC22A5</i> u pacientů s CML a v buněčných liniích	17
4.7. Validace TaqMan genotypovací eseje	18
4.8. Genotypy ovlivňují udržení molekulární remise u pacientů po vysazení IM	19
5. Diskuze	22
6. Závěr	26
Seznam použité literatury	27
Seznam publikací autora	30

Abstrakt:

Chronická myeloidní leukemie (CML) je díky cílené léčbě tyrozin kinázovými 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 skrínovali 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 (promotoru *SLC22A4*), 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 skríning genotypu rs460089 umožní identifikovat pacienty, kteří s vysokou pravděpodobností nedosáhnou optimální odpovědi na léčbu IM a mohl 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 (promoter of *SLC22A4*) 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:

Chronická myeloidní leukemie (CML) je klonální nádorové onemocnění vznikající neoplastickou transformací pluripotentní krvetvorné kmenové buňky. CML představuje asi 15 % všech leukemií. Celková incidence je 1-1,5 nových onemocnění na 100 000 obyvatel za rok s mírnou převahou u mužů (1,4:1). Incidence stoupá s věkem, medián věku při stanovení diagnózy je 65 let. Patofyziologickým podkladem tohoto onemocnění je Filadelfský chromozóm (Ph), který vzniká reciprokovou translokací chromozómů 9 a 22. Touto translokací vzniká patologický fúzní gen *BCR::ABL1*, což je gen který kóduje onkoprotein BCR::ABL1, tyrozin kinázu s deregulovanou aktivitou. Tato aktivita vede mimo jiné k unikání postižených buněk apoptotickým procesům, k jejich zrychlené proliferaci, ale nebrání buněčné diferenciaci. To vede k typickému obrazu onemocnění v periferní krvi, leukocytóze s vyplavováním nezralých forem granulocytů. Díky znalosti patofyziologické podstaty onemocnění mohl být na začátku 21. století uveden do klinické praxe 1. cílený lék CML imatinib (IM), tyrozin kinázový inhibitor (TKI), který navázáním do místa pro vazbu ATP brání fosforylaci a tím i aktivaci tyrozin kinázy. I přes příchod TKI 2. a 3. generace, zůstává IM stále nejčastěji užívaným lékem první linie u pacientů v chronické fázi CML. Ačkoliv se CML stala s příchodem TKI velmi dobře léčitelným onemocněním s dobrou prognózou, přibližně u 10-20 % pacientů léčebných IM se rozvine rezistence, která může způsobit přechod do blastické fáze onemocnění, svým obrazem připomínající akutní leukemii se všemi důsledky (Jabbour E. et al., 2016; Hochhaus A. et al., 2020). Mezi známé mechanismy rezistence k TKI patří nadměrná exprese *BCR::ABL1*, přídavné cytogenetické abnormality nebo vznik mutací v kinázové doméně *BCR::ABL1*, které brání, nebo snižují sílu vazby v cílovém místě TKI (Gorre M. E. et al. 2001; Gambacorti-Passerini C. B. et al., 2003; Soverini S. et al. 2014). Dalším důležitým mechanismem rezistence je nedostatečná koncentrace TKI uvnitř leukemické buňky, která způsobí její přežití a následně adaptaci na léčbu. IM je léčivo, jehož dostupnost v cílové buňce je závislá na transportu pomocí transmembránových proteinů z rodin ATP Binding Cassette (ABC) a Solute Carrier (SLC).

Genetická variabilita efluxních (ATB) a influxních (SLC) transportérů ovlivňuje expresi a aktivitu jednotlivých přenašečů, čímž může ovlivnit dostupnost léčiva na všech úrovních, absorpci v trávicím traktu, metabolismu v játrech, distribuci i intracelulární koncentraci v leukemické buňce. Lidský genom obsahuje 48 genů kódujících ABC transportéry, z nichž 10 bylo spojeno s mnohočetnou lékovou rezistencí nádorových buněk (Vasiliou V. et al., 2009). Rodina SLC pak kóduje přes 450 genů sdružených do celkem 65 podrodin, z nichž již 20 má popsanou funkci lékového přenašeče (César-Razquin A. et al., 2018).

Několik studií zkoumalo transportéry ve vztahu k terapeutické odpovědi pacientů s CML. Nejlépe prozkoumaným transportérem pro eflux IM u pacientů s CML je ABCB1 (MDR1, P-glykoprotein), u kterého byla prokázána nadměrná exprese při blastické fázi a příspěvi ke snížené účinnosti chemoterapie v pokročilé fázi onemocnění (Singh O. et al., 2012, Burger H. et al., 2004). Dalším studovaným efluxním transportérem, jehož substrátem je IM je ABCG2 (Burger H. et al., 2004).

Nejvíce studovaným transportérem z rodiny SLC ve vztahu k výsledku léčby CML je SLC22A1 (OCT1). Ukázalo se, že dosažení velké molekulární odpovědi (MMR, tj. $\leq 0,1$ % *BCR::ABL1* IS; IS – International Scale) bylo častěji pozorováno během léčby IM u pacientů se zvýšenou aktivitou SLC22A1 bez ohledu na denní dávku IM, kdežto pacienti s normální či sníženou aktivitou tohoto transportéru profitovali ze zvýšení dávky IM a dosáhli

častěji MMR než pacienti se standardní dávkou (White D. L. et al., 2007; Gromicho M. et al., 2013). Naproti tomu Hu et al. přisuzují SLC22A1 menší význam v transportu IM. A popisuje signifikantně vyšší afinitu IM k SLC transportérům SLCO1A2, SLCO1B3 a SLC22A5 ve srovnání s transportéry SLC22A1, SLC22A2, SLC22A3, SLC22A4, SLC22A6, SLC22A7 a SLC22A8 (Hu S. et al., 2008).

V souvislosti s odpovědí na léčbu CML IM byly studovány jednonukleotidové polymorfismy (SNP) v kódujících oblastech genů pro některé přenašeče IM. Například SNP rs683369 v exonu 2 *SLC22A1* byl spojen se špatnou odpovědí na IM u pacientů s CML asijského původu (Kim D. H. et al., 2009). V italské studii zase uvedli, že alela rs1050152-C genu *SLC22A4* byla významně spojena s MMR (Angelini S. et al., 2013). Byly také popsány souvislosti genotypů rs2032582, rs1128503 a rs60023214 genu *ABCB1* s odpovědí na IM, i když výsledky zde byly poměrně rozporuplné (Dulucq S. et al., 2008; Ni L. N. et al., 2011; Maffioli M. et al., 2011).

2. Výchozí hypotéza a cíl práce:

CML se stala s příchodem TKI dobře léčitelným onemocněním, přesto 10-20 % pacientů je k léčbě IM rezistentních. Jedním z důvodů může být nedostatečná koncentrace IM v leukemických buňkách. Transport IM je závislý na transportních přenašečích z rodin ABC a SLC. Jejich změněná exprese a aktivita může mít vliv na intracelulární koncentraci IM a tím i na odpověď na léčbu. Dosud byly studovány SNP v kódujících oblastech těchto transportérů. Z práce Hesselson SE et al. víme, že oblasti promotorů ABC a SLC transportérů jsou velice polymorfní. Ve své práci publikovali více než 500 polymorfismů v promotorové oblasti u 107 ABC a SLC genů zdravých osob (Hesselson S. E. et al., 2009). Domníváme se, že tyto polymorfismy, které se přirozeně vyskytují i 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 metodika:

3.1. Soubor vyšetřovaných pacientů:

Skríninkovou kohortu pro vyhledávání SNP v 19 promotorových oblastech genů ABC a SLC tvořilo celkem 83 pacientů. Podmínkami pro zařazení byly: 1) diagnóza v chronické fázi CML, 2) dostupnost vzorku 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 ($BCR::ABL1 \leq 0,1\% \text{ IS}$; $n = 40$; optimal) a skupinu Non-responders ($BCR::ABL1 > 0,1\% \text{ IS}$; $n = 43$; warning a failure). Do studie nebyli zařazení pacienti s výskytem mutací v kinázové doměně $BCR::ABL1$. V průběhu práce se 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. Na této kohortě byl proveden skrínink SNP v promotorových oblastech 2 genů, *SLC22A4* a *SLC22A5*.

Validační kohortu pro posouzení prognostického faktoru dosažení MMR rs460089 v promotoru *SLC22A4* a zároveň jako skríninkovou kohortu pro analyzování TFR a 6 měsíčního MRFS tvořilo 301 pacientů zařazených do mezinárodní studie za přísných podmínek ukončující léčbu TKI, EUROPEan Stop Kinase Inhibitor (EURO-SKI). Pro validaci výsledků pravděpodobnosti udržení TFR a dosažení 6 měsíčního MRFS byla sestavena kohorta 103 pacientů s CML léčených v Polsku, kteří pod koordinací Polish Adult Leukemia Group (PALG) vysadili TKI.

3.2. Návrh primerů a PCR promotorových oblastí:

Sekvence promotorových oblastí 19 genů byly analyzovány s využitím databází The National Center for Biotechnology Information (NCBI), Pharmacogenetics of Membrane Transporters Database (UCSF PMT) a The Eukaryotic Promoter Database (EPD). Pomocí nástrojů Primer3 plus, Primer-BLAST a OligoAnalyzer 3.1 byly navrženy primery pro generování amplikonů o délce 1000–1500 bp zahrnujících celou oblast promotoru, příležitostně přesahujících do prvních exonů a intronů. Genomová DNA byla izolována pomocí TRIzol® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA) nebo guanidiniumthiocyanátu (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Německo) z uložených buněčných lyzátů o koncentraci 10×10^6 buněk/ml. Knihovna amplikonů pro NGS analýzu byla vytvořena PCR s využitím navržených primerových párů a systému FastStart™ High Fidelity PCR (Roche Applied Science, Basel, Švýcarsko) nebo AccuPrime Supermix I (Thermo Fisher Scientific). Produkty PCR byly ověřeny elektroforézou na agarózovém gelu se zobrazením pod UV transiluminátorem a kvantifikovány s využitím přístroje 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA USA).

3.3. Cílené sekvenování vybraných promotorových oblastí:

Promotorové oblasti od 38 pacientů byly sekvenovány pomocí systému NGS GS Junior (technologie 454; Roche Applied Science). Knihovny amplikonů byly připraveny podle návodu výrobce pomocí soupravy Rapid Library Preparation kit (Roche Applied

Science). Nebulizace produktů PCR na požadované délky 400–600 bp byla provedena pod tlakem 55 psi po dobu 2,5 minuty. Další kroky přípravy knihoven: Fragment End Repair, AMPure bead preparation, Adaptor Ligation, Small Fragment Removal, byly provedeny dle protokolu výrobce. Kvalita připravených amplikonových knihoven byla stanovena pomocí 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) s použitím High Sensitivity DNA čipu (Agilent Technologies). Pro kvantifikaci nebulizované knihovny amplikonů byla použita sada KAPA Library Quantification Kit pro platformu Roche 454 GS Titanium (Kapa Biosystems, Wilmington, MA USA). V každém běhu NGS bylo analyzováno 19 amplikonů od 12 pacientů, díky možnosti využití vícenásobných identifikátorů (MID; Roche Applied Science) ligujících se na konce amplikonů. Spojené vzorky byly zpracovány emulzní PCR podle emPCR Amplification Manual Lig-L (Roche Applied Science). Sekvence byla provedena podle protokolu Sequencing Manual (Roche Applied Science). Vzhledem k dostupnosti nové sady (GS Junior+ Sequencing Kit XL+; Roche Applied Science) pro dlouhé sekvenování amplikonů byl v analýzách amplikonů u 24/38 pacientů vynechán krok fragmentace amplikonu. 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). Sekvenční analýza a identifikace SNP byly provedeny pomocí softwaru NextGENe (Softgenetics, State College, PA USA). Metodou Sangerova sekvenování jsme analyzovali SNP v promotorech genů *SLC22A4* a *SLC22A5* u přidáné skupiny celkem 46 pacientů a 9 testovaných buněčných linií. Dále bylo Sangerovo sekvenování využito jako nástroj pro validaci genotypové eseje TaqMan SNP Genotyping Assays C__2390965_10 (Thermo Fisher Scientific) u 301 DNA vzorků pacientů zařazených do EURO-SKI studie.

3.4. Genotypizační analýza:

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

Pro genotypování SNP rs1050152 (*SLC22A4*) byla použita komerčně dostupná TaqMan SNP Genotyping Assays C__3170459_30 (ThermoFisher Scientific). Pro SNP rs460089 (*SLC22A4*) není komerční eseje dostupná a pokus o navržení vlastní eseje selhal pro bohatý výskyt GC nukleotidů obklopující sekvenci testovaného SNP. Na základě analýzy vazebné nerovnováhy (LD) byl vybrán SNP rs156322 (*SLC22A4*) s komerčně dostupnou esejí TaqMan SNP Genotyping Assays C__2390965_10 (ThermoFisher Scientific), který dokonale predikuje alely SNP rs460089. Jako vstupní materiál do experimentů 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.

3.5. 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. Analýza LD genotypovaných SNP k identifikaci polymorfismů v nekódujících oblastech *SLC22A4* a *SLC22A5* byla provedena pomocí nástroje LDlink 1.1 <http://analysis-tools.nci.nih.gov/LDlink/> (Machiela M. J. et al., 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 byla vytvořena Heatmapa párových statistik LD. Frekvence haplotypů byly vyhodnoceny pomocí utility LDhap. Všechny analýzy byly provedeny na Evropské populaci.

3.6. Měření relativní exprese genu *SLC22A4* a *SLC22A5*:

Celková RNA byla izolována z buněčných lysátů uložených v TRIzol® (Thermo Fisher Scientific) v koncentraci 1 x 10⁶ buněk/ml. Množství RNA bylo stanoveno na spektrofotometru NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific). 200 ng RNA bylo transkribováno do cDNA pomocí iScript cDNA Synthesis Kit (č. 170-8891; BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA). K relativní kvantifikaci exprese byl použit 7900HT Fast Real-time PCR Systém (Thermo Fisher Scientific) s použitím TaqMan® Gene Expression Assays Hs01548718_m1 pro gen *SLC22A4* a Hs00929869_m1 pro gen *SLC22A5* (Thermo Fisher Scientific). Jako kontrolní gen byl použit *GUSB* (β-glucuronidáza) u patientských vzorků a *GAPDH* (Glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza) u buněčných linií. K vyhodnocení byl použit výpočet delta Ct.

3.7. Výpočet halving time *BCR::ABL1*:

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 jisté, jestli je s výhodou u pacientů s pomalejším poklesem transkriptu hned měnit léčbu. Je 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 jejich halving time je kratší než 76 dní. 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 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. 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).

3.8. Statistické analýzy:

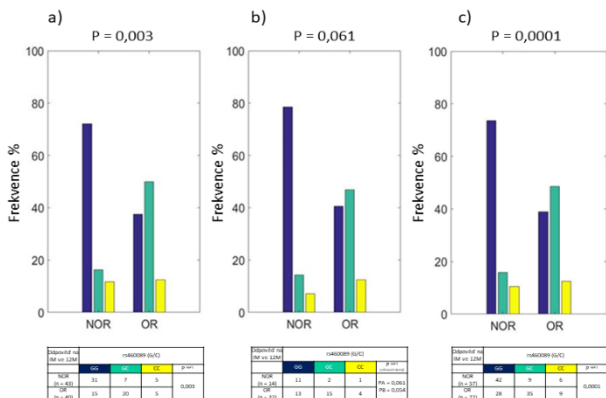
Fisherův exaktní test pravděpodobnosti (FEPT) byl použit k analýze frekvence alel v jednotlivých kohortách pacientů. K hodnocení asociace mezi genotypy a halving time *BCR::ABL1* byl použit Kruskal-Wallisův test. Křivky kumulativní incidence dosažení stabilní MMR během léčby IM byly vypočteny užitím Mann-Whitneyho testu. Kaplan-Meierova metoda byla použita k odhadu EFS. 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: <http://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, 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. Odds ratio (OR) bylo z důvodu srovnání univariantních a multivariantních analýz vypočítáno pomocí logistické regrese. K odhadu MRFS, byla u pacientů po vysazení IM využita Kaplan-Meierova metoda. Variantními daty do analýz byl genotyp SNP rs460089, 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 SNP v promotorech genů ABC a SLC asociovaných s odpovědí pacientů s CML:

Počáteční skrinink SNP 19 promotorových oblastí byl proveden u 83 pacientů s CML. V celkem 1486 analyzovaných amplikonů jsme detekovali 95 SNP, z toho 7 SNP dosud nebylo popsáno v databázi NCBI. Návrh primeru umožnil identifikaci 12 SNP mimo promotorové oblasti; celkem 9 SNP v exonu 1 genů *SLC22A1*, *SLC22A5*, *SLC22A8*, *SLC01A2* a 3 SNP v intronu 1 genů *SLC28A1*, *SLC28A3*, *SLC47A2*).

Na základě FEPT byly v promotoru *SLC22A4* identifikovány 2 SNP ve vysoké LD (rs460089 G/C; rs460271 G/C), které byly signifikantně asociovány s odpovědí pacientů na léčbu IM ve 12. měsíci od zahájení léčby. Frekvence genotypů GG obou SNP byla významně vyšší u pacientů s neoptimální odpovědí na IM, zatímco genotypy GC byly spojeny s optimální odpovědí ($P = 0,003$; obrázek 1a). Pro validaci asociace odpovědi na léčbu IM se SNP rs460089 byla použita kohorta čítající 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 1b). 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 1c).

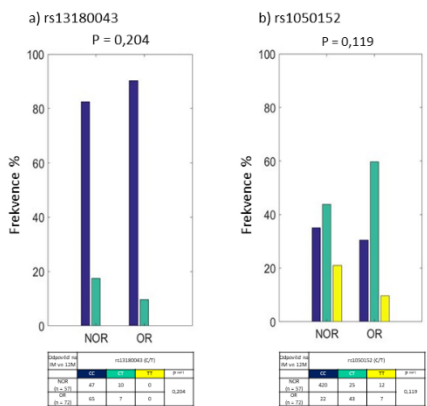


obrázek 1) Frekvence genotypů rs460089 u pacientů s optimální a neoptimální odpovědí na imatinib po 12 měsících; a) iniciální kohorta pacientů; b) přidaná kohorta pacientů; c) sloučení obou kohort pacientů.

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

FEPT odhalil další potenciálně zajímavé SNP v LD lokalizované v promotoru zahrnující i 5' UTR oblast *SLC22A5* (rs4646298 C/T; rs13180169 G/T; rs13180186 G/T; rs13180043 C/T; rs13180295 G/A) vykazující častější heterozygotní genotyp u pacientů s neoptimální odpovědí ve srovnání s pacienty s optimální odpovědí. Rozdíly ve frekvencích genotypu těchto 5 SNP v rozšířené kohortě pacientů s CML (n = 129) však nebyly statisticky signifikantní (P = 0,204; obrázek 2a).

Na základě publikace Angeliny et al. (Angelini S. et al., 2013) 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 u pacientů s optimální odpovědí na IM, ale FEPT pro jednotlivé frekvence alel nebyl signifikantní (P = 0,119; obrázek 2b).



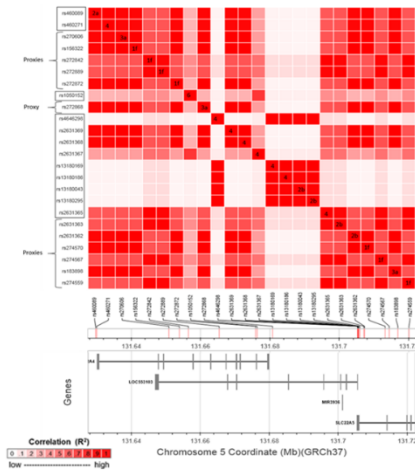
obrázek 2) Frekvence genotypů a) rs13180043 a b) rs1050125 u pacientů s optimální a neoptimální odpovědí na IM po 12 měsících od zahájení léčby. Výsledek pro sloučenou kohortu pacientů.

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

4.2. Analýzy vazebné nerovnováhy:

S identifikovanými SNP v promotorech genů *SLC22A4* a *SLC22A5* byla provedena analýza LD. LD je nenáhodná asociace mezi alelami dvou a více lokusů, čehož se dá využít ve vazebných analýzách např. mezi markerem a funkčními polymorfismy. Z analýzy byly vyloučeny SNP rs60978556, rs369724970 a rs202088921 (*SLC22A5*), z důvodu velmi malé frekvence zastoupení minoritních alel, které byly nalezeny pouze u 4 pacientů ze 129. Do analýzy byl přidán SNP rs1050152 nacházející se v exonu 9 *SLC22A4*, který byl Angelini et al. (Angelini S. et al., 2013) reportován jako SNP mající vliv na odpověď na léčbu IM.

Pomocí nástroje LDmatrix byla vytvořena interaktivní heatmapa, ukazující studované SNP s jejich takzvanými proxy, tedy SNP ve významné LD (Obrázek 3). Objevili jsme dvě skupiny SNP, které byly ve významné LD 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 SNP v promotoru *SLC22A4* rs460089, rs4602271 a *SLC22A5* rs2631369 a rs2631368, které jsou ve významné LD ($R^2 = 0,98-1,0$; $P < 0,0001$) 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 LD ($R^2 = 0,98-1,0$; $P < 0,0001$) 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 LD ($R^2 = 1,0$; $P < 0,0001$), nebyly pro ně 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 vytipovaný 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 LD a studovaný dle databáze RegulomeDB byl SNP rs1050152, který se nejeví jako pravděpodobný pro vazbu TF, stejně jako SNP v promotoru genu *SLC22A5* rs2631367 se kterým je ve významné LD ($R^2 = 0,79$; $P < 0,0001$).



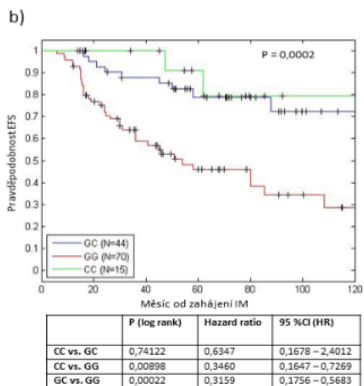
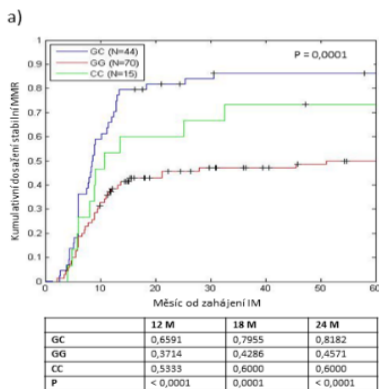
obrázek 3) Ukázka interaktivní heatmapy vazebné nerovnováhy genotypovaných SNP a jejich proxies. SNP v boxech byly genotypovány.

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 ovlivňuje odpověď na léčbu imatinibem:

Testovali jsme, zda genotypy 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. Je nutné si ale uvědomit, že EMR je definována na základě 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) a to u 119 pacientů ze 129. Zjistili jsme, že genotyp rs460089-GC byl spojen s významně kratším HT6 hladiny $BCR::ABL1$ ve srovnání s rs460089-GG ($P < 0,0001$). Pro další sledované SNP rs2631365 a rs13180043 nebyl nalezen signifikantní rozdíl mezi genotypy a HT6 $BCR::ABL1$.

Dalším důležitým zjištěním bylo, že pacienti s genotypem rs460089-GC mají signifikantně významnější kumulativní dosažení MMR než pacienti s genotypem rs460089-GG (Obrázek 4a). Pacienti s genotypem rs460089-GC měli také významně vyšší pravděpodobnost EFS, čímž je myšleno: ztráta odpovědi, rozvoj $BCR::ABL1$ mutací rezistentních k léčbě, progresse nebo úmrtí v souvislosti s CML v průběhu léčby IM; než pacienti s genotypem rs460089-GG (obrázek 4b). Výsledky pro zbývající genotyp rs460089-CC nelze spolehlivě interpretovat pro malou frekvenci výskytu.

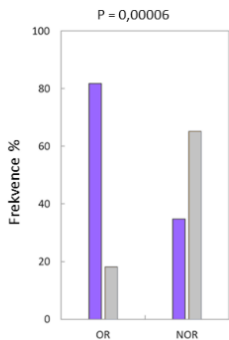


obrázek 4) a) Kumulativní dosažení stabilní MMR během léčby IM ve spojení s genotypy rs460089. Údaje v tabulce ukazují pravděpodobnost dosažení MMR ve 12, 18 a 24 měsících od zahájení užívání IM. b) Pravděpodobnost EFS během léčby IM ve spojení s genotypy rs460089.

4.4. Kombinace genotypů SNP promotorů *SLC22A4* a *SLC22A5* ovlivňuje odpověď na léčbu imatinbem:

Další zajímavý SNP, který by mohl mít souvislost s odpovědí na léčbu IM u pacientů s CML je SNP rs2631365 (*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 5), 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 spojeni s významně delším *BCR::ABL1* HT v 6 měsících ve srovnání s pacienty nesoucí kombinovaný genotyp rs460089-GC_rs2631365-TC ($P = 0,004$).

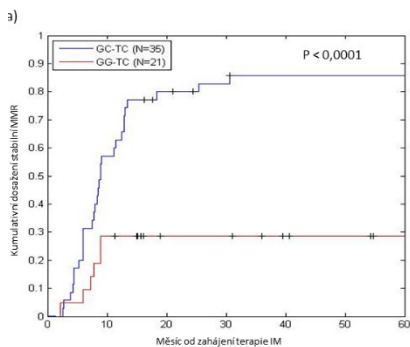
Obdobně je tomu u kumulativního dosažení stabilní MMR a pravděpodobnosti EFS. Kombinovaný genotyp rs460089-GC_rs2631365-TC byl spojen s vyšší kumulativní pravděpodobností dosažení stabilní MMR během léčby IM ve srovnání s kombinovaným genotypem rs460089-GG_rs2631365-TC ($P < 0,0001$; obrázek 6a). Pacienti s genotypem rs460089-GC_rs2631365-TC měli vyšší pravděpodobnost EFS ve srovnání s pacienty s rs460089-GG_rs2631365-TC ($P < 0,0001$; obrázek 6b).



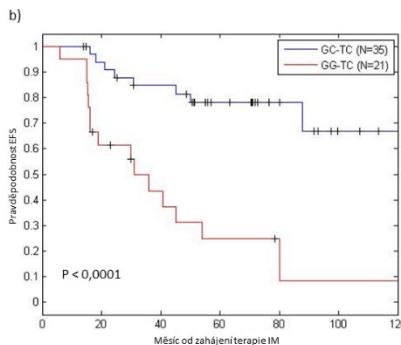
obrázek 5) Frekvence genotypů rs460089_rs2631365 u pacientů s optimální a neoptimální odpovědí na imatinib po 12 měsících.

Odpověď na IM ve 12M	rs460089 (G/C)_rs2631365 (T/C)		p ^{FEPT}
	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; ^{FEPT}: Fischer exact probability test



	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



	p ^{FEPT}	HR	95 %CI (HR)
GC-TC vs. GG-TC	0,00001	9,1943	3,6209 – 23,3500

obrázek 6) a) Kumulativní dosažení stabilní MMR během léčby IM ve spojení s kombinací genotypů rs460089_rs2631365. b) Pravděpodobnost EFS během léčby IM ve spojení s kombinací genotypů rs460089_rs2631365.

Třetí zajímavé SNP, který je ve významné LD 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. 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. 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.

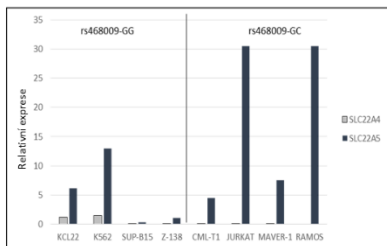
4.5. SNP rs460089 je nezávislý prediktivní faktor odpovědi na léčbu CML:

Vzhledem k tomu, že SNP v promotoru *SLC22A4* rs460089 ve výše provedených analýzách vycházelo jako nejsilnější predikující faktor odpovědi na léčbu CML IM, 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 *SLC22A4* a *SLC22A5* rs460089, rs2631365 a rs13180043. Významné nezávislé faktory z univariantní analýzy, byly zařazeny do analýzy multivariantní. Pro obě analýzy bylo vypočítáno jak odds ratio (OR) tak hazard ratio (HR). 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.

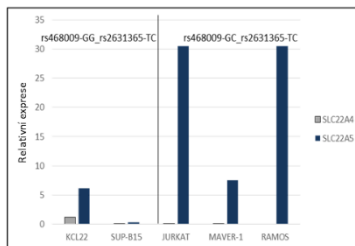
4.6. Měření exprese *SLC22A4* a *SLC22A5* u pacientů s CML a v buněčných liniích:

Na základě výsledků předešlých měření, jsme se rozhodli provést měření exprese transkriptů *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. Jako výchozí materiál pro měření exprese byla dostupná pouze RNA z lyzátů celkových leukocytů periferní krve, analýza tak mohla být ovlivněna rozdílnou expresí těchto genů v rámci buněčných subpopulací. Následně jsme pro experiment využili 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 *SLC22A4* než *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 7). 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 8). Tento výsledek nám naznačuje, že heterozygotní genotyp může mít vliv na regulaci transkripce *SLC22A5*, který jako transportér IM může ovlivňovat jeho intracelulární koncentraci.



obrázek 7) Relativní hladiny mRNA SLC22A4 a SLC22A5 ve všech 8 testovaných liniích.



obrázek 8) Relativní hladiny mRNA u buněčných linií nesoucích genotypy rs460089-GG_rs2631365-TC nebo rs460089-GC_rs2631365-TC.

4.7. Validace TaqMan genotypovací esej:

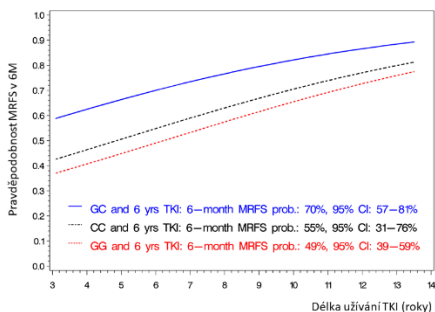
K využití SNP rs460089 jako markeru predikce odpovědi na léčbu CML, je nutné, aby jeho vyšetření bylo rychlé a levné, to obecně nabízejí komerčně dostupné TaqMan genotypovací esej. Komerční esej pro tento SNP nebyla dostupná a pokus o návrh vlastní esej selhal z důvodu bohatosti okolní sekvence na GC. Na základě znalostí o LD, jsme genotypovali komerčně vyráběnou TaqMan esejí SNP pro SNP rs156322, které se nachází ve významné LD s rs460089. Abychom si byli jisti, že lze tuto metodu aplikovat, byla validována celkem na 301 vzorcích pacientů zařazených do studie EURO-SKI. U všech 301 vzorků byla Sangerovou metodou provedena sekvenace ampliconu zahrnujícího promotorovou oblast *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 esej jak bylo predikováno analýzou LD. Pouze u 4 vzorků z 301 bylo dle genotypovací esej 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 nesegregovala s alelou G, ale s alelou C rs460089. Podrobnější analýzou dat bylo zjištěno, že 2 pacienti jsou asiati, další 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.

4.8. Genotypy ovlivňují udržení molekulární remise u pacientů po vysazení IM:

Novým cílem léčby CML je udržení TRF. 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. K tomu slouží množství proběhlých i stále probíhajících studií. My jsme ověřovali, zda genotyp SNP rs460089 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.

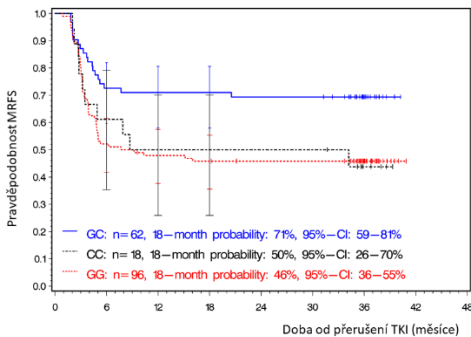
Z celkem 176 vzorků byl genotyp rs460089-GG identifikován u 96 pacientů (55 %), genotyp GC u 62 (35 %) a CC genotyp u 18 (10 %) pacientů. Velkou molekulární odpověď si 6 měsíců po vysazení TKI udrželo 105 pacientů (60 %, 95 % CI: 52–67 %). Největší pravděpodobnost udržení MMR měli pacienti, kteří nesli genotyp SNP 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, $P = 0,0078$). Dále jsme 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 9.



obrázek 9) 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 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 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 10). 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 10. 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, parametr 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, $P = 0,7307$).

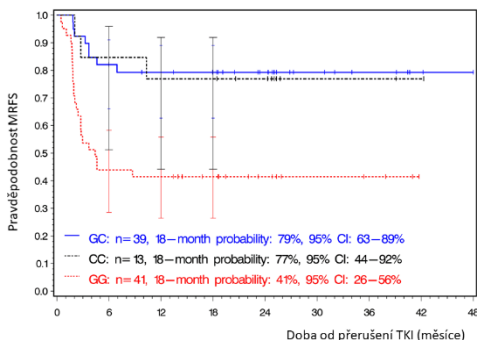


obrázek 10) Pravděpodobnost přežití bez molekulárního relapsu po vysazení TKI v závislosti na typu genotypu SNP rs460089 u celkem 176 pacientů zařazených do EURO-SKI.

K validaci výše popsaných výsledků bylo využito celkem 93 pacientů zařazených do polských ukončujících studií. 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 v learning kohortě 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. 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 11, bylo SNP rs460089 signifikantně asociováno s udržením 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 validační kohortě 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 se OR = 0,213 (95 % CI: 0,051–0,890, P = 0,0340). Podobně jako u pacientů zařazených do EURO-SKI, 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 11) 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:

Vstupem TKI do terapie CML se stalo toto onemocnění velmi dobře léčitelné. S vývojem TKI 2. a 3. generace může být léčba ještě více personalizována. Například pacienti, kteří vyvinuli mutaci v tyrozin kinázové doméně *BCR::ABL1*, jejichž monitorace se stala u pacientů s neoptimální odpovědí běžnou rutinní praxí, by se měli převést na jiné TKI, které je na danou mutaci účinný (Soverini S. et al., 2011). Klinické studie s druhogeneračním TKI dasatinibem (DASA) a nilotinibem (NILO) v první linii léčby navíc ukázaly, že ve srovnání s dosud nejhodněji využívaným IM, pacienti dosahují častěji a dříve molekulární odpovědi (Jain P. et al., 2013). Dle registrační studie DASA (DASISION) bylo dosažení MMR u pacientů v první linii signifikantně vyšší, ale vliv na celkové přežití již byl bez statistické signifikance (Cortes J. E. et al., 2016), podobné výsledky byly i v registrační studii s NILO (ENESTnd) (Hochhaus A. et al., 2016).

Užívání preparátů 2. a 3. generace v první linii u všech pacientů by bylo finančně mnohem náročnější a spojené s vyšším toxickým zatížením pacientů. Proto je IM 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., 2015). 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 (Schonfeld L. et al., 2022; Bidikian A. et al., 2022). Potenciální zdroj vhodných markerů nabízí farmakogenetika. Pacienti s různými variacemi DNA v kódujících nebo regulačních úsecích genů, jejichž produkty jsou klíčové pro transport léčiv, mohou mít vrozené predispozice k neoptimální odpovědi na léčbu u farmak závislých na transportu 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 IM, 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 nalezení markery predikce odpovědi je zejména nekoherentnost jednotlivých studií (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 (Kim D. H. et al., 2009; Angelini S. et al., 2013).

V naší práci jsme se vyhnuli skříninku polymorfismů v exonech genů, ale pomocí ultra širokého NGS jsme provedli skřínink polymorfismů v promotorových oblastech celkem 19 ABC a SLC genů. Na základě výsledků jsme sestavili genotypy pro jednotlivé polymorfismy a s využitím asociací analýzy se nám podařilo identifikovat genotypy, které se s různou frekvencí vyskytovaly u pacientů s optimální a neoptimální odpovědí na léčbu

IM. Genotyp rs460089-GC (SNP nacházející se v promotorové oblasti genu *SLC22A4*, kódující přenašeč IM) se častěji objevoval u pacientů s optimální odpovědí 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 IM, 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 IM, byl rs2631365-TC v promotorové oblasti *SLC22A5* (kódující transportér, jehož substrátem je také IM). Měření však nebyla signifikantní. Významně signifikantní se však ukázala pravděpodobnost dosažení MMR a EFS u pacientů, kteří nesli tento genotyp právě v kombinaci s genotypem rs460089-GC (*SLC22A4*). Provedli jsme analýzu LD, 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 transkripčních faktorů. Vzhledem k tomu, že rs460089 je ve vysoce signifikantní LD s těmito 7 regulačními lokusy, alely rs460089 přesně předpovídají i alely těchto sedmi regulačních lokusů.

Druhý SNP rs2631365 byl ve významné LD s 5 regulačními lokusy. Dvě regulační místa se nacházejí v intronech *SLC22A4* a tři v intronech *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 EFS. Na základě analýz LD víme, že genotyp rs460089-GC_rs2631365-TC odráží heterozygotní genotyp celkem 13 regulačních lokusů pro *SLC22A4* a *SLC22A5*, který je dle našich výsledků významně příznivý pro dosažení MMR a EFS. 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 represii genové transkripce (Lee A. M. et al., 2006; Ou S. A. et al., 2009).

Výsledky z analýz genové exprese v testovaných buněčných liniích ukázaly velmi silnou expresi *SLC22A5* a nízkou expresi *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 IM 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 *SLC22A4* a *SLC22A5* a distribuci IM 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 *SLC22A4* a jejich případný vliv na dosažení MMR u pacientů s CML zkoumala již ve své práci skupina vědců kolem Angeliny S. (Angeliny 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 IM 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 pacientu lze předpokládat, že zaznamenanou významně vyšší míru dosažení MMR při léčbě IM 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 IM 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 IM 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 IM, což ukazuje vysokou reprodukovatelnost výsledků (Campiotti L. et al., 2017).

Bylo také potvrzeno, že pokud se dodržují stanovená doporučení, 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 IM 5,8 roku. Pacienti s délkou léčby kratší než 5,8 let měli pravděpodobnost udržení TFR 41 %, pacienti s délkou léčby 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., 2018; 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 INF-a ve srovnání s pouze 23 % u pacientů bez IFN-a. (Takahashi N. et al., 2012). Přestože přesný mechanismus účinku IFN-a není jasný, jednou z navrhovaných možností je jeho účinek na aktivaci imunitních efektorových buněk (Talpez M. et al., 2013). 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 přerušení TKI, měli vyšší pravděpodobnost udržení remise bez léčby (Ilander M. et al., 2017). Má se za to, že vyšší hladiny NK buněk mohou být schopny, jak přímo zabít leukemické kmenové buňky, tak potencovat adaptivní imunitní reakce, a tak udržovat remisi po přerušení léčby.

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.

Naší další snahou v předkládané práci bylo zjistit, zda i SNP rs460089 má prediktivní hodnotu pro TFR 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 IM. Pro všechny pacienty byla léčba TKI první linií, nikdo nebyl předlčen 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 IM 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 polských vysazovacích studií. 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 ukázala být doba trvání DMR u jednotlivých pacientů. Pacienti s delším trváním DMR měli větší pravděpodobnost udržet TFR než pacienti, kteří měli dobu trvání DMR kratší. I doba trvání DMR byla v řadě vysazovacích studií hodnocena jako prognostický faktor.

Na základě našich výsledků, které jsme potvrdili i v nezávislé validační kohortě pacientů, se domníváme, že bychom mohli genotypizaci SNP rs460089 zařadit do schématu testování u pacientů s CML, kteří budou léčeni IM. Genotypizaci je možné provést již v době diagnózy nebo kdykoliv během léčby, 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 DMR, která trvá minimálně 2 roky, a délce léčby TKI alespoň 5 let je možné zvážit vysazení IM (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 IM na udržení TFR v závislosti na genotypu rs460089. Zjistili jsme, že dlouhá doba trvání léčby IM zvyšuje pravděpodobnost MRFS po vysazení léčby u všech genotypů. Přičemž nejvýraznější vliv jsme pozorovali u pacientů s nepříznivým genotypem rs460089-GG. A i přes vliv délky léčby IM na MRFS 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 IM 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.

6. Závěr:

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 se domníváme, že farmakogenetický marker rs460089 prokázal prognostický vliv i na udržení remise po vysazení léčby u pacientů s CML léčených IM 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 IM a doby trvání DMR před ukončením léčby, a naopak je doplňoval. Znalost genotypu by mohla rozhodovat o vhodnosti pacienta k vysazení terapie IM. Případně po jak dlouhé době od zahájení TKI či dosažení DMR léčbu ukončit. Mohl by být jednou ze součástí prediktivního TFR skóre, které se nyní celosvětově 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, Soverini S et al., Association between imatinib transporters and metabolizing enzymes genotype and response in newly diagnosed chronic myeloid leukemia patients receiving imatinib therapy. *Haematologica*. 2013;98:193–200

Angelini S, Pantaleo MA et al., Polymorphisms in OCTN1 and OCTN2 transporters genes are associated with prolonged time to progression in unresectable gastrointestinal stromal tumours treated with imatinib therapy. *Pharmacol Res*. 2013 Feb;68(1):1-6.

Baccarani M, Deininger MW et al., European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. *Blood*. 2013 Aug 8;122(6):872-84.

Bidikian A, Kantarjian H et al., Prognostic impact of ASXL1 mutations in chronic phase chronic myeloid leukemia. *Blood Cancer J*. 2022 Oct 28;12(10):144. doi: 10.1038/s41408-022-00742-1. PMID: 36307398; PMCID: PMC9616867.

Boyle AP, Hong EL et al., Annotation of functional variation in personal genomes using RegulomeDB. *Genome Res*. 2012 Sep;22(9):1790-7.

Branford S, Yeung DT et al., Prognosis for patients with CML and >10% BCR-ABL1 after 3 months of imatinib depends on the rate of BCR-ABL1 decline. *Blood*. 2014 Jul 24;124(4):511-8.

Burger H, van Tol H et al., Imatinib mesylate (STI571) is a substrate for the breast cancer resistance protein (BCRP)/ABCG2 drug pump. *Blood*. 2004 Nov 1;104(9):2940-2.

Campiotti L, Suter MB et al., Imatinib discontinuation in chronic myeloid leukaemia patients with undetectable BCR-ABL transcript level: A systematic review and a meta-analysis. *Eur J Cancer*. 2017 May;77:48-56.

César-Razquin A, Girardi E et al., In silico Prioritization of Transporter-Drug Relationships From Drug Sensitivity Screens. *Front Pharmacol*. 2018 Sep 7;9:1011.

Cortes JE, Talpaz M et al., Philadelphia chromosome-negative chronic myelogenous leukemia with rearrangement of the breakpoint cluster region. Long-term follow-up results. *Cancer*. 1995 Jan 15;75(2):464-70.

Di Paolo A, Polillo M et al., The c.480C>G polymorphism of hOCT1 influences imatinib clearance in patients affected by chronic myeloid leukemia. *Pharmacogenomics J*. 2014 Aug;14(4):328-35.

Dulucq S, Bouchet S et al., Multidrug resistance gene (MDR1) polymorphisms are associated with major molecular responses to standard-dose imatinib in chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2008 Sep 1;112(5):2024-7.

Dulucq S, Hayette S et al., Onset of blast crisis in chronic myeloid leukemia patients in treatment-free remission. *Haematologica*. 2022 Dec 1;107(12):2944-2949.

Etienne G, Guilhot J et al., Long-Term Follow-Up of the French Stop Imatinib (STIM1) Study in Patients With Chronic Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol.* 2017 Jan 20;35(3):298-305.

Gambacorti-Passerini CB, Gunby RH et al., Molecular mechanisms of resistance to imatinib in Philadelphia-chromosome-positive leukaemias. *Lancet Oncol.* 2003 Feb;4(2):75-85.

Gorre ME, Mohammed M et al., Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science.* 2001 Aug 3;293(5531):876-80.

Gromicho M, Magalhães M et al., Instability of mRNA expression signatures of drug transporters in chronic myeloid leukemia patients resistant to imatinib. *Oncol Rep.* 2013 Feb;29(2):741-50.

Hesselson SE, Matsson P et al., Genetic variation in the proximal promoter of ABC and SLC superfamilies: liver and kidney specific expression and promoter activity predict variation. *PLoS One.* 2009 Sep 9;4(9):e6942.

Hochhaus A, Saglio G et al., 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.* 2016 May;30(5):1044-54.

Hochhaus A, Baccarani M et al., European LeukemiaNet 2020 recommendations for treating chronic myeloid leukemia. *Leukemia.* 2020 Apr;34(4):966-984.

Hu S, Franke RM et al., Interaction of imatinib with human organic ion carriers. *Clin Cancer Res.* 2008 May 15;14(10):3141-8.

Jabbour E, Kantarjian H. Chronic myeloid leukemia: 2016 update on diagnosis, therapy, and monitoring. *Am J Hematol.* 2016 Feb;91(2):252-65.

Jain P, Kantarjian H et al., Early responses predict better outcomes in patients with newly diagnosed chronic myeloid leukemia: results with four tyrosine kinase inhibitor modalities. *Blood.* 2013;121:4867-74.

Kim DH, Sriharsha L et al., Clinical relevance of a pharmacogenetic approach using multiple candidate genes to predict response and resistance to imatinib therapy in chronic myeloid leukemia. *Clin Cancer Res.* 2009;15:4750-8.

Lee AM, Wu CT. Enhancer-promoter communication at the yellow gene of *Drosophila melanogaster*: diverse promoters participate in and regulate trans interactions. *Genetics.* 2006;174:1867-80.

Maffioli M, Camós M et al., Correlation between genetic polymorphisms of the hOCT1 and MDR1 genes and the response to imatinib in patients newly diagnosed with chronic-phase chronic myeloid leukemia. *Leuk Res.* 2011 Aug;35(8):1014-9.

Mahon FX, Pfirrmann M et al., EURO-SKI Investigators. European Stop Tyrosine Kinase Inhibitor Trial (EURO-SKI) in Chronic Myeloid Leukemia: Final Analysis and Novel Prognostic Factors for Treatment-Free Remission. *J Clin Oncol.* 2024 Mar 12;JCO2301647.

Machiela MJ, Chanock SJ. LDlink: a web-based application for exploring population-specific haplotype structure and linking correlated alleles of possible functional variants. *Bioinformatics*. 2015 Nov 1;31(21):3555-7.

Machova Polakova K, Zizkova H et al., Analysis of chronic myeloid leukaemia during deep molecular response by genomic PCR: a traffic light stratification model with impact on treatment-free remission. *Leukemia*. 2020;34:2113–124.

Machova Polakova K, Kulvait V et al., 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.

Müller MC, Cross NC et al., Harmonization of molecular monitoring of CML therapy in Europe. *Leukemia*. 2009 Nov;23(11):1957-63.

Ni LN, Li JY et al., Multidrug resistance gene (MDR1) polymorphisms correlate with imatinib response in chronic myeloid leukemia. *Med Oncol*. 2011 Mar;28(1):265-9.

Ou SA, Chang E et al., Effects of chromosomal rearrangements on transvection at the yellow gene of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. 2009 Oct;183(2):483-96.

Petain A, Kattygnarath D et al., Population pharmacokinetics and pharmacogenetics of imatinib in children and adults. *Clin. Cancer Res*. 2008;14:7102–7109.

Polillo M, Galimberti S et al., Pharmacogenetics of BCR/ABL Inhibitors in Chronic Myeloid Leukemia. *Int J Mol Sci*. 2015 Sep 21;16(9):22811-29.

Saussele S, Richter J et al., Discontinuation of tyrosine kinase inhibitor therapy in chronic myeloid leukaemia (EURO-SKI): A prespecified interim analysis of a prospective, multicentre, non-randomised, trial. *Lancet Oncol*. 2018;19:747–757.

Schönfeld L, Rinke J et al., ASXL1 mutations predict inferior molecular response to nilotinib treatment in chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2022 Sep;36(9):2242-2249.

Singh O., Chan J.Y. et al., SLC22A1-ABCB1 haplotype profiles predict imatinib pharmacokinetics in Asian patients with chronic myeloid leukemia. *PLoS ONE*. 2012;7:e51771.

Soverini S, De Benedittis C et al., 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*. 2014 Apr 1;120(7):1002-9.

Soverini S, Hochhaus A et al., 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*. 2011;118:1208–15

Takahashi N, Kyo T et al., Discontinuation of imatinib in Japanese patients with chronic myeloid leukemia. *Haematologica*. 2012;97:903–906.

Takahashi N, Tauchi T et al., Deeper molecular response is a predictive factor for treatment-free remission after imatinib discontinuation in patients with chronic phase chronic myeloid leukemia: The JALSG-STIM213 study. *Int. J. Hematol.* 2018;107:185–193.

Talpaz M, Hehlmann R et al., Re-emergence of interferon- α in the treatment of chronic myeloid leukemia. *Leukemia.* 2013 Apr;27(4):803-12.

Thomas J, Wang L et al., Active transport of imatinib into and out of cells: implications for drug resistance. *Blood.* 2004 Dec 1;104(12):3739-45.

Valenta T, Lukas J et al., HIC1 attenuates Wnt signaling by recruitment of TCF-4 and beta-catenin to the nuclear bodies. *EMBO J.* 2006 Jun 7;25(11):2326-37.

Vasiliou V, Vasiliou K et al., Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family. *Hum Genomics.* 2009 Apr;3(3):281-90.

White DL, Saunders VA et al., 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.* 2006 Jul 15;108(2):697-704.

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-Izydorzyc O, Wasilewska E, Paczkowska E, Niesiołędzka-Krzętel 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) = **6,2**
- 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) = **3,1**

- 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) = **5,9**

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) = **2,8**
- 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 ÚHKKT 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.