

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
LÉKAŘSKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ



**Faktory regulující expresi genů rodiny ABC transportních  
proteinů**

Elements regulating the expression of ABC transport protein genes

**Habilitační práce**

**RNDr. Pavel Dvořák, Ph.D.**

## **Prohlášení autora**

Prohlašuji, že jsem předkládanou habilitační práci vypracoval samostatně a řádně jsem citoval všechny použité prameny a literaturu. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu. Souhlasím s uložením a zpřístupněním této práce v Lékařské knihovně Lékařské fakulty UK v Hradci Králové a elektronické verze v informačním systému Univerzity Karlovy.

V Plzni, 1. ledna 2020

RNDr. Pavel Dvořák, Ph.D.

## **Poděkování**

Velmi rád bych poděkoval panu doc. RNDr. Pavlu Součkovi, CSc., vedoucímu Laboratoře farmakogenomiky v Biomedicínském centru LF UK v Plzni, za uvedení do problematiky ABC proteinů a možnost studovat s jeho pomocí toto velmi zajímavé téma do hloubky.

Za cenné rady v mém profesním životě bych rád poděkoval vedoucí Ústavu histologie a embryologie LF UK v Plzni paní prof. MUDr. Mileně Králíčkové, Ph.D.

V neposlední řadě bych rád poděkoval svým rodičům a rodině za podporu a toleranci, bez kterých bych se neobešel.

## Abstrakt

Teoretická část předkládané habilitační práce přináší definování cílů popisovaného výzkumu a shrnuje hlavní současné poznatky o struktuře a funkci genů a proteinů rodiny ABC. Jde o evolučně velmi starobylou rodinu zastoupenou téměř u všech známých forem života. Označení ABC se váže k přítomnosti dvou ATP vázajících domén, což je pro tuto proteinovou rodinu hlavní charakteristický znak. Popisované informace jsou zaměřeny především na eukaryotní živočišné buňky a na význam pro člověka. V textu bylo charakterizováno všech 7 podrodin, jejichž zástupci byly u člověka popsány. Fyziologický význam ABC proteinů, který daleko přesahuje jejich základní transportní funkci, je demonstrován popisem čtyř monogenních onemocnění, které se rozvíjejí na podkladě mutací v ABC genech (cystická fibróza, adrenoleukodystrofie, Stargardtova choroba a Tangierova choroba). Teoretická část je dále zaměřena na vztah ABC genů a proteinů ke vzniku rezistence na léčiva. Text se věnuje především rezistenci nádorových buněk na chemoterapeutickou léčbu, ačkoli mnohé mechanismy vzniku rezistence na podkladě ABC genů jsou platné i pro rezistenci bakteriálních buněk na léčbu antibiotickou. Zdůrazněni jsou tři zástupci ABC genů – *ABCBI*, *ABCC1* a *ABCG2* – u nichž byl prokázán transport řady protinádorových léčiv a vztah ke vzniku mnohočetné lékové rezistence. Úskalím při hledání účinného blokátoru rezistence vzniklé na podkladě zvýšené aktivity ABC přenašečů jsou překrývající se spektra transportovaných léčiv mezi jednotlivými zástupci. Na molekulární úrovni bylo ovlivnění exprese ABC genů spojeno především se změnami v úzce propojených signálních drahách PI3K/AKT/MTOR a RAS/MAPK uplatňujícími se velmi významně v kancerogenezi. Mezi další mechanismy vedoucí ke vzniku rezistence u nádorových buněk a působících společně s ABC pumpami patří aktivace a inaktivace léčiv, změny v cílech léčiv, změny v efektivitě oprav poškození DNA nebo deregulace apoptózy. Ke konci teoretické části je zmíněn význam nádorových kmenových buněk a vlivu celého nádorového mikroprostředí na rozvoj neoplázií. Výsledková část habilitační práce se skládá z 8 příspěvků publikovaných v odborných periodikách a úvodních komentářů ke každému z nich. Autor habilitační práce se na těchto příspěvcích podílel jako první autor v 5 případech, korespondenční autor v 1 případě a spoluautor ve 2 případech. Všechny tyto příspěvky spojuje tematika ABC genů a proteinů a rezistence nádorů na chemoterapeutickou léčbu. První příspěvek ve formě review přinesl komplexní pohled na problematiku kontrolovaného přerušování léčby s tyrozinkinázovými inhibitory u chronické myeloidní

leukemie. Vzhledem k tomu, že tyrozinkinázové inhibitory patří mezi substráty transportované ABC proteiny, může být vyšší aktivita ABC přenašečů zodpovědná za vznik rezistence na tento typ léčiv. Druhý příspěvek představil výsledky retrospektivní studie 376 pacientů s akutní myeloidní leukemií. Ve studii byla zpracována podrobná cytogenetická charakteristika skupiny pacientů s velmi nepříznivou prognózou a předpokládanou rezistencí na podávanou chemoterapii a cytogenetická data byla vztažena k datům klinickým. Třetí příspěvek popisoval bioinformatickou práci studující vzory exprese (expresní profily) lidských ABC genů u nádorů prsu, kolorekta a pankreatu. Poprvé byly publikovány výsledky podporující hypotézu, že lze nalézt expresní profily ABC genů společné pro různé typy zhoubných nádorů. Čtvrtý příspěvek přímo navázal na téma studované ve třetím příspěvku. Byla ověřena naše hypotéza, že také expresní profily ABC genů v nenádorových buňkách, které se nacházejí v okolí nádorových struktur, mohou ovlivňovat rozvoj nádorů a korelovat se známými klinicko-patologickými znaky prediktivního či prognostického významu. Pátý příspěvek, pokračující v tématu předchozích dvou příspěvků, měl za cíl ověřit prognostický a prediktivní potenciál expresních profilů ABC genů u nádorů ovaria. Studie poukázala na společný vztah série ABC proteinů, u kterých je známa funkce v transportu léčiv, a ABC proteinů, u kterých evidenci o jejich transportní funkci nemáme, ke klinicko-patologickým charakteristikám nádoru ovaria. Pochopení vzájemně provázaných vztahů mezi ABC proteiny může v budoucnu pomoci najít inhibitor účinný současně na více transportérů. Duktální adenokarcinom pankreatu, na který se soustředil šestý příspěvek, je jedním z nejvíce problematických nádorů současné západní populace a i přes určité pokroky v jeho léčbě zůstává prognóza pacientů s tímto typem nádoru extrémně špatná. Vysoký stupeň rezistence na chemoterapeutickou léčbu je u nádorů pankreatu způsoben kombinací několika mechanismů, kde ústřední roli hraje i vyloučení léčiva z nádorových buněk ABC transportními proteiny. Naše závěry mohou částečně vysvětlovat slabý účinek dosud zkoušených cílených KRAS inhibitorů u nádoru pankreatu. Sedmý příspěvek navázal na příspěvek šestý v tématice duktálního adenokarcinomu pankreatu. Práce se zaměřila na studium interakcí mezi konvenčním paclitaxelem a experimentálním taxanem SB-T-1216 a expresí genů KRAS signální dráhy u *in vitro* i *in vivo* modelů nádorů pankreatu. Léčba taxany způsobila celkovou downregulaci KRAS signální dráhy u všech použitých modelů, ale tato reakce byla nezávislá na KRAS mutačním statusu. V naší studii se nepodařilo najít případné biomarkery či cíle pro cílenou terapii duktálního adenokarcinomu pankreatu s využitím taxanů mezi geny KRAS signální

dráhy a bude nutné se zaměřit i na jiné mechanismy deregulované u tohoto nádorového onemocnění. Osmý příspěvek otevřel nový směr výzkumu regulace exprese ABC genů v naší laboratoři. Výzkum se zaměřuje na vyhledávání funkčně významných sekvencí v nekódujících oblastech genů. Konkrétně byla v tomto příspěvku řešena oblast 5' nekódujících oblastí genu *ABCA1*. S využitím bioinformatických nástrojů byly vytipovány evolučně nejvíce konzervované zástupci sledovaných typů elementů se známým vlivem na translaci genů. Algoritmus postupu ve vyhledávání funkčních elementů navržený v naší práci může být univerzálně využit i u dalších genů a najít své uplatnění i v klinické praxi při hodnocení nalezených odchylek u vyšetřovaných pacientů. V závěrečných částech habilitační práce je uveden seznam dalších 21 prací, na kterých se autor podílel v roli prvního autora nebo spoluautora a které se zabývají příbuznými cytogenetickými či molekulárně genetickými tématy. Celkovou snahou předkládaného výzkumu je posunout hranice poznání v oblasti významu ABC genů a proteinů pro vznik rezistence a napomoci tím zlepšení léčby onkologických pacientů.

## **Abstract**

The aims of the research and a summary of the recent knowledge about the structure and function of genes and proteins from the ABC family are described in the theoretical part of the thesis. ABC family belongs to the oldest and most diverse families from the evolutionary point of view and members of the family can be found in almost every form of life on Earth. The name ABC is based on the presence of two ATP-binding domains (ATP-binding cassette), which is the main characteristic feature of the proteins organized within the group. Information described in the thesis is focused on the eukaryotic animal cells and the importance for humans. All 7 subfamilies, which were found in human cells, are characterized. The importance of ABC proteins in physiological processes, which is not limited to the basic transport functions, is demonstrated by the description of four human monogenic diseases, which are connected with the mutations in the ABC genes (cystic fibrosis, adrenoleukodystrophy and Stargardt and Tangier diseases). The theoretical part is then focused on the relationship between ABC genes and proteins and the development of resistance to drugs. The resistance of cancer cells to chemotherapy is discussed mainly, although the mechanisms leading to resistance of bacterial cells to antibiotics are often similar. The three members – *ABCB1*, *ABCC1* and *ABCG2* – which were connected to the development of multi-drug resistance in many experimental studies are stressed. The obstacle in the search for a potent inhibitor of the resistance based on high activity of ABC transporters is the overlap between the spectrums of the transported drugs. On molecular level the regulation of the expression of ABC genes was connected with the changes in the closely related signaling pathways PI3K/AKT/MTOR and RAS/MAPK, which are known for their significant involvement in carcinogenesis. The other mechanisms leading to the development of cancer cell resistance, which work together with ABC transporters, are for example activation and inactivation of drugs, changes in the targets of drugs, changes in the effectivity of DNA repair systems and deregulation of apoptosis. The theory of cancer stem cells and the influence of the whole cancer microenvironment is mentioned at the end of the theoretical part. The experimental part of the thesis consists of 8 original articles and commentaries to each of them. The author of the thesis is the first author in 5 articles, corresponding author in 1 article and coauthor in 2 articles. All articles are dealing with the theme of ABC genes and proteins and the resistance of cancer cells to chemotherapy. The first article in the form of review brings a complex view to the issue of controlled tyrosine

kinase inhibitor treatment discontinuation in patients with chronic myelogenous leukemia. Tyrosine kinase inhibitors, used in the first line treatment of this entity, are substrates for the ABC transporters and for that reason high activity of ABC proteins can stand behind the resistance to this type of therapy. The second article introduced the results of a retrospective study of 376 patients with acute myelogenous leukemia. A detailed cytogenetic characteristics of a subgroup of patients with very unfavorable prognosis and presumed resistance to the administered chemotherapy was conducted and cytogenetic data were correlated to clinical data. The third article describes a bioinformatics study revealing the patterns of expression (expression profiles) of human ABC genes in breast, colorectal and pancreatic cancers. The results supporting the hypothesis about the existence of ABC gene expression profiles common to several cancer types were published for the first time. The fourth article broadens the topic researched in the third article. Arguments in favor of the hypothesis that also the ABC gene expression profiles of non-tumor cells surrounding cancer cells can influence the development of tumors and correlate with known clinico-pathological features of prognostic or predictive values were shown. The aim of the fifth article, continuing with the same topic as the previous two, was to verify the prognostic or predictive potential of ABC gene expression profiles in ovarian cancer. The study disclosed the relationships between series of ABC proteins with known drug transport function and ABC proteins without known drug transport function and clinico-pathological markers of ovarian cancers. The knowledge about the complex relationships between ABC genes and proteins can help in search for a pan-ABC transporter inhibitor. Pancreatic ductal adenocarcinoma, which was the research target of the sixth article, represents one of the most problematic cancers of our population and although there were some improvement in the treatment of this disease the prognosis of the patients stays dismal. The high level of chemoresistance of the pancreatic tumors has its reasons in combination of several mechanisms where the efflux of chemotherapeutics conducted by the ABC pumps plays a major role. Our results can in part explain the low impact of the targeted KRAS inhibitors, which were tested in pancreatic cancers so far. The seventh article continued in the pancreatic ductal adenocarcinoma research. The work focused on the study of interactions between conventional paclitaxel and experimental taxane SB-T-1216 and the expression of KRAS signaling pathway genes in pancreatic cancer models *in vitro* and *in vivo*. The treatment with taxanes ended in downregulation of the genes of KRAS signaling pathway in all models used, however this reaction was not dependent on the KRAS mutational status. We were not able to define new

biomarkers or targets for specific treatment among KRAS pathway genes and it will be important to look for other mechanisms deregulated in this type of cancer in the future. The eighth article opens a new direction in the research of ABC gene expression regulation in our laboratory. The research focuses on the search for the functionally important elements in non-coding parts of genes. The sequences of the 5' untranslated regions of the *ABCA1* gene were screened in this article. With the help of bioinformatics tools the most evolutionarily conserved elements from the elements with known influence on translation were collected. The workflow defined in the study can be universally applied in search for functional elements also in other genes and can find its application in clinical practice where changes found in patients are addressed. At the end of the thesis a list of other 21 works, where the author of the thesis cooperated as first author or coauthor and which deal with related cytogenetic or molecular biology topics, is disclosed. The research discussed within this thesis aims to reveal new information about the ABC genes and proteins and their contribution to the development of chemoresistance and help in the fight against oncological diseases.



## Seznam použitých zkratek

5'UTRs	5' netranslatované oblasti genů
aa	amino acids; aminokyseliny
ABC	ATP-binding cassette; domény vázající ATP v ABC transportních proteinech
ADP	adenosin di-fosfát
AKT	RAC-Alpha Serine/Threonine-Protein Kinase; AKT kináza
ALD	adrenoleukodystrofie
AML	akutní myeloidní leukemie
ATP	adenosin tri-fosfát
bp	base pairs; párů bází
CML	chronická myeloidní leukemie
CRc	kompletní cytogenetická remise
CSCs	cancer stem cells; nádorové kmenové buňky
FISH	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
KRAS	Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog; KRAS protoonkogen
MDR	multidrug resistance; mnohočetná léková rezistence
MRP	multidrug resistance protein; protein způsobující mnohočetnou lékovou rezistenci
MTOR	Mechanistic Target Of Rapamycin Kinase; MTOR kináza
NBD	nucleotide-binding domain; nukleotid vázající doména
OS	overall survival; celkové přežití
PARP	poly ADP ribose polymerase enzyme; enzym PARP
PDAC	pankreatický duktální adenokarcinom
PFS	progresion-free survival; doba přežití do progresu
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase; PI3K kináza
qRT-PCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase
TKI	tyrozinkinázové inhibitory
TMD	transmembrane domain; transmembránová doména
VLCFA	very long-chain fatty acids; mastné kyseliny s velmi dlouhým řetězcem

## Obsah

1	Cíle práce.....	12
2	Rodina ABC membránových přenašečů.....	14
2.1	ABC proteiny a jejich struktura .....	14
2.2	ABC geny a jejich struktura.....	15
2.2.1	Podrodina ABCA (ABC1).....	16
2.2.2	Podrodina ABCB (MDR/TAP) .....	16
2.2.3	Podrodina ABCC (CFTR/MRP).....	17
2.2.4	Podrodina ABCD (ALD).....	18
2.2.5	Podrodina ABCE (OABP).....	18
2.2.6	Podrodina ABCF (GCN20) .....	18
2.2.7	Podrodina ABCG (White) .....	19
2.3	Fyziologická lokalizace a funkce ABC proteinů .....	19
2.4	Lidská vrozená onemocnění spojená s disfunkcí ABC proteinů .....	20
2.4.1	Cystická fibróza .....	21
2.4.2	Příklady dalších onemocnění .....	22
3	ABC proteiny a rezistence buněk na léčiva .....	24
3.1	Rezistence nádorových buněk na chemoterapii .....	25
3.1.1	Export léčiv spojený s ABC proteiny .....	25
3.1.2	Další mechanismy vedoucí ke vzniku rezistence u nádorových buněk.....	30
3.1.3	Nádorové kmenové buňky .....	32
3.1.4	Nádorové mikroprostředí.....	32
4	Materiál a použité metody .....	34
4.1	Analyzované vzorky .....	34
4.2	Cytogenetické metody .....	34
4.3	Molekulárně-genetické metody .....	35

4.4	Statistické a bioinformatické metody.....	35
5	Výsledky výzkumu .....	38
5.1	Příspěvek I .....	38
5.2	Příspěvek II .....	46
5.3	Příspěvek III.....	56
5.4	Příspěvek IV .....	75
5.5	Příspěvek V .....	90
5.6	Příspěvek VI .....	103
5.7	Příspěvek VII .....	114
5.8	Příspěvek VIII.....	125
6	Shrnutí výsledků a cílů práce.....	151
7	Závěr.....	157
8	Literatura .....	158
9	Seznam publikací zahrnutých do výsledkové části .....	166
10	Seznam dalších publikací autora nezahrnutých do výsledkové části .....	168
11	Seznam nejvýznamnějších konferenčních příspěvků autora.....	173

# 1 Cíle práce

- I. Zhodnotit rizika vzniku rezistence při kontrolovaném přerušení cílené léčby s využitím tyrozinkinázových inhibitorů u pacientů s chronickou myeloidní leukemií.
- II. Zpracovat podrobnou cytogenetickou charakteristiku pacientů s akutní myeloidní leukemií, kteří po dvou chemoterapeutických pokusech o dosažení remise onemocnění nedosáhli kompletní cytogenetické remise, a vztáhnout cytogenetická data k datům klinickým.
- III. Na základě dat o měření hladiny exprese lidských ABC genů u nádorových vzorků ověřit hypotézu o existenci expresních profilů ABC genů, které jsou společné více typům zhoubných nádorů a mají klinický význam.
- IV. Zjistit zda také expresní profily ABC genů v nenádorových tkáních, které se nacházejí v okolí nádorových struktur, mohou ovlivňovat rozvoj nádorů a korelovat se známými klinicko-patologickými znaky prediktivního či prognostického významu.
- V. Ověřit prognostický a prediktivní potenciál stanovení expresních profilů ABC genů u nádorů ovaria.
- VI. Zhodnotit prognostický význam exprese genů účastnících se signálních drah aktivovaných KRAS GTPázou a jeho asociaci s klinickými údaji u pacientů s resektabilními nádory pankreatu.
- VII. Studovat interakce mezi konvenčním paclitaxelem a experimentálním taxanem SB-T-1216 a expresí genů KRAS signální dráhy u *in vitro* i *in vivo* modelů nádorů pankreatu.

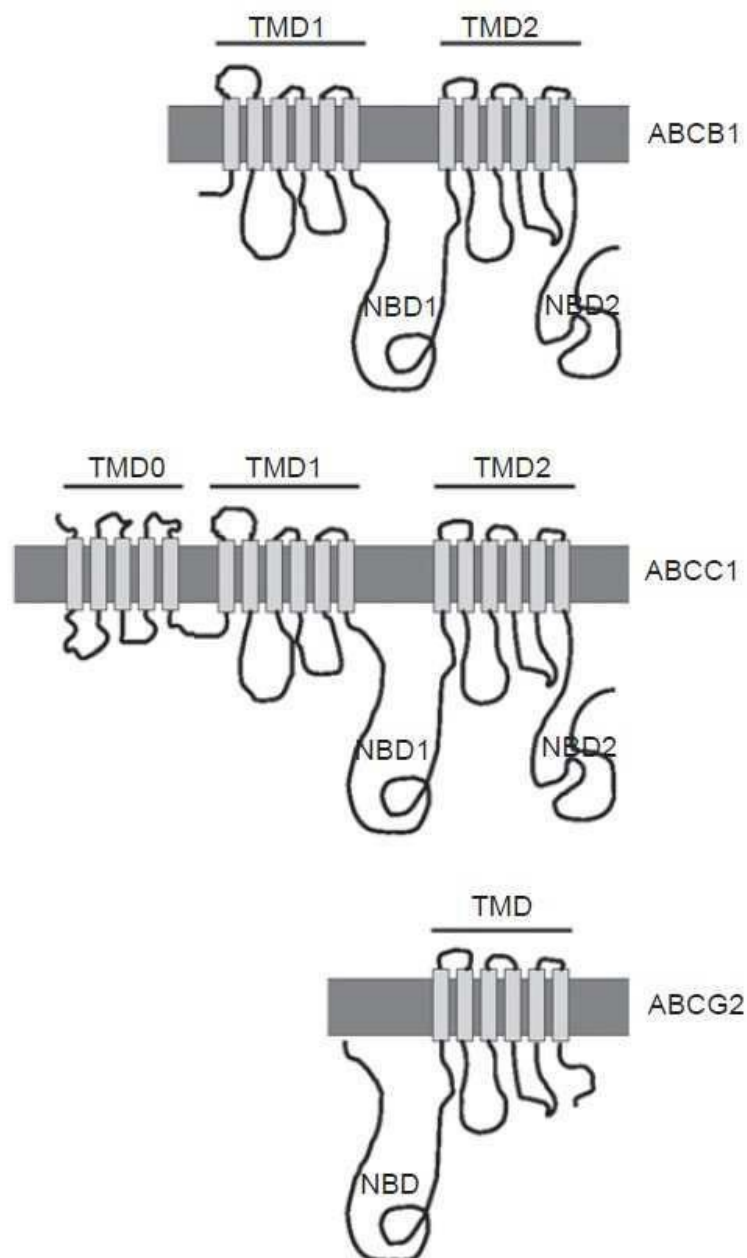
- VIII. Vyhledat funkčně významné sekvence v 5' nekódující oblasti lidského genu *ABCA1* a vypracovat algoritmus postupu ve vyhledávání těchto sekvencí univerzálně použitelný pro další geny.

## 2 Rodina ABC membránových přenašečů

Proteiny z rodiny ABC (*ATP-binding cassette*) membránových přenašečů (ABC proteiny) lze nalézt **u všech v současnosti žijících skupin organismů** od bakterií po primáty. Tvoří společně jednu z největších a nejstarobyljších proteinových rodin, kterou lze označit také jako tzv. superrodinu či nadrodinu. Jsou všeobecně známy pro svoji schopnost transportovat širokou škálu látek (substrátů) přes cytoplasmatické i vnitrobuněčné biomembrány jak po směru koncentračního gradientu, tak především proti němu. Potřebnou chemickou energii získávají **hydrolyzou molekul ATP**, které jsou na membránový přenašeč vázány pomocí dvou charakteristických proteinových domén – ABC domén (Davidson et al., 2008; Moitra, 2013).

### 2.1 ABC proteiny a jejich struktura

Typické ABC transportní proteiny obsahují dvě ATP vázající domény (v literatuře označované jako *nucleotide-binding domains* – NBDs nebo *nucleotide-binding folds* - NBFs) a dvě transmembránové domény (*transmembrane domains* - TMDs). **ATP vázající domény** obsahují několik vysoce konzervovaných motivů – Walker A, Walker B, C-loop, H-loop a Q-loop. Motiv C (C-loop), který bývá uložen v prostoru 90 až 120 aminokyselin mezi Walker A a Walker B, blíže Walker B, je specifický pro ABC proteiny a odlišuje je od jiných proteinů vázajících ATP. **Transmembránové domény** jsou tvořeny 6 až 12 membránou procházejícími alfa-helixy a jsou zodpovědné za specifickou vazbu a transport substrátů (Dean et al., 2001; Vasiliou et al., 2009). Některé ABC proteiny však vykazují odchylky od této základní struktury dvou NBDs a dvou TMDs. Bližší informace o struktuře konkrétních ABC proteinů jsou uvedeny v dalších částech práce, [obrázek 1](#) schematicky znázorňuje organizaci struktury ABC proteinů.



**Obrázek 1** – Struktura vybraných ABC transportních proteinů (obrázek byl převzat s laskavým svolením autora z publikace Zhang, 2007, v časopise Cell Research)

## 2.2 ABC geny a jejich struktura

Eukaryotní geny kódující ABC proteiny (ABC geny) jsou organizovány jako tzv. plný transportér (*full transporter*) nebo poloviční transportér (*half transporter*). Produkt genů označovaných jako plný transportér sám vytváří funkční protein a má obvykle strukturu

dvou NBDs a dvou TMDs. Produkt genů označovaných jako poloviční transportér se pro vytvoření funkčního proteinu musí spojit s produktem jiného polovičního transportéru a má obvykle strukturu jen jedné NBD a jedné TMD. Může docházet ke spojení dvou produktů stejného genu (*homodimerization*) nebo s produktem jiného polovičního transportéru (*heterodimerization*) (Dean et al., 2001).

V lidském genomu bylo popsáno 48 genů kódujících ABC proteiny. Na základě podobnosti v sekvenci aminokyselin a organizaci proteinových domén byly tyto geny rozděleny do 7 hlavních podskupin (podrodin). Jde o **podrodiny** - **ABCA** (dříve ABC1), **ABCB** (MDR/TAP), **ABCC** (CFTR/MRP), **ABCD** (ALD), **ABCE** (OABP), **ABCF** (GCN20) a **ABCG** (White) (Barbet et al., 2012; Kathawala et al., 2015). Lidský genom dle současných poznatků dále obsahuje 22 **pseudogenů**, o kterých se předpokládá určitý vztah k protein kódujícím ABC genům. U některých z těchto pseudogenů byla dokonce prokázána jejich transkripce a naznačen vztah k ovlivnění míry exprese jejich protein kódujících protějšků (Piehler et al., 2008).

### 2.2.1 Podrodina ABCA (ABC1)

Podrodina ABCA je v lidském genomu zastoupena 12 geny kódujícími výhradně plné transportéry. Pět genů – *ABCA5*, *A6*, *A8*, *A9* a *A10* – je umístěno pohromadě v jednom klastru v oblasti 17q24.3 na dlouhém raménku chromosomu 17. Zbývajících sedm ABCA genů je rozprostřeno po 6 různých chromosomech. Proteiny kódované těmito geny patří mezi jedny z největších molekul v ABC rodině, často s více než 2000 aminokyselinami. Je známa jejich účast v **transportu cholesterolu** a jeho derivátů (A1), derivátů vitamínu A (A4) a různých léčiv (A2, A3). Evoluční studie naznačují, že ABCA geny, které původně vznikly jako poloviční transportéry, následně prošly genovou duplikací. Některé skupiny ABCA genů byly v různých eukaryotních liniích ztraceny, u kvasinek ABCA geny nenalézáme vůbec (Dean et al., 2001; Holland et al., 2003; Moitra, 2013; <https://www.genecards.org/>).

### 2.2.2 Podrodina ABCB (MDR/TAP)

Do podrodiny ABCB je řazeno 11 genů, z nichž 4 kódují plné transportéry a 7 poloviční transportéry. U člověka jde o jedinou podrodinu obsahující oba typy transportérů. Geny



*ABCB2* a *B3* jsou společně umístěny v oblasti 6p21.3 a geny *ABCB4* a *B5* v oblasti 7p21.1, ostatních 7 genů je rozptýleno na 5 chromosomech. Pro významnou spojitost proteinu ABCB1 (MDR1/PGY1) se vznikem **rezistence u nádorových buněk** byl tento protein u člověka prvním klonovaným a charakterizovaným proteinem z rodiny ABC proteinů. Fyziologicky významnou transportní úlohu plní tento protein, uložený v cytoplasmatické membráně, u buněk hematoencefalické bariéry a v játrech. Proteiny ABCB4 a B11 jsou oba také přítomny v cytoplasmatické membráně především jaterních buněk, kde se účastní sekrece žlučových kyselin. Produkty polovičních transportérů *ABCB2* a *B3* (*TAP1* a *TAP2*) vytvářejí heterodimér, který zprostředkovává transport cizorodých proteinů a jejich částí do endoplasmatického retikula, kde jsou tyto proteiny následně předány k vystavení jako antigeny molekulami MHC glykoproteinů I. třídy. Poloviční transportér ABCB9, který je homologní s TAP proteiny, umožňuje transport peptidů do lysosomů. Poloviční transportéry ABCB6, B7, B8 a B10 se podílejí na metabolismu železa a transportu Fe/S proteinových prekurzorů především do mitochondrií. ABCB5 je spojován s transportem léčiv u kmenových buněk (Dean et al., 2001; Holland et al., 2003; Moitra, 2013; <https://www.genecards.org/>).

### 2.2.3 Podrodina ABCC (CFTR/MRP)

Dvanáct plných transportérů, kteří patří do podrodiny ABCC, má v lidském organismu velmi rozdílné funkce - transport iontů, buněčné receptory či odstraňování pro buňku toxických látek. Geny *ABCC1* a *C6* jsou společně uloženy v oblasti 16p13.1 a geny *ABCC11* a *C12* v oblasti 16q12.1, ostatních 8 genů leží na 8 různých chromosomech. Protein CFTR (*ABCC7*) působící v cytoplasmatické membráně jako kanál pro chloridové ionty se uplatňuje při exokrinní sekreci v mnoha tkáních, mutace v genu *CFTR* způsobují **cystickou fibrózu** (blíže popsána v dalším textu). Proteiny *ABCC8* a *C9* se podílejí na regulaci draslíkových kanálů, které ovlivňují sekreci inzulinu. Proteiny *ABCC8* a *C9* vystupují jako receptory pro lék sulfonylureu, která se používá jako perorální antidiabetikum. Devět genů této podrodiny – *ABCC1* (*MRP1*), *C2*, *C3*, *C4*, *C5*, *C6*, *C10*, *C11* a *C12* – jsou označovány jako tzv. **MRP příbuzné geny** (*multidrug resistance protein*). Proteiny *ABCC1*, *C2* a *C3* odstraňují z buněk řadu léčiv, které jsou konjugovány s tripeptidem glutathionem (např. doxorubicin, daunorubicin a vinkristin). Proteiny *ABCC4* a *C5* jsou spojeny s rezistencí na

nukleosidy (analogy purinu jako např. fludarabin) (Dean et al., 2001; Holland et al., 2003; Moitra, 2013; <https://www.genecards.org/>).

#### 2.2.4 Podrodina ABCD (ALD)

Podrodina ABCD obsahuje 4 geny rozložené v lidském genomu na 4 různých chromosomech. Všechny kódují poloviční transportéry, kteří fungují jako homo či heterodiméry. Jsou lokalizováni v membráně peroxisomů, kde se podílejí na transportu **mastných kyselin s velmi dlouhým řetězcem**. Adrenoleukodystrofie (ALD) je vzácná recesivní choroba vznikající na podkladě mutací v *ABCD1* genu (blíže popsána v dalším textu) (Dean et al., 2001; Holland et al., 2003; Moitra, 2013; <https://www.genecards.org/>).

#### 2.2.5 Podrodina ABCE (OABP)

Jediným zástupcem této podrodiny je protein ABCE1. Ačkoliv ATP-vázající doména tohoto proteinu jednoznačně vykazuje příbuznost s doménami ostatních ABC proteinů, proteinu ABCE1 chybí transmembránové domény charakteristické pro transportní proteiny. Experimenty neprokázali transportní funkci tohoto ABC proteinu. Bylo však zjištěno, že **interaguje s RNazou L** (ribonukleázou L) a inhibuje její endoribonukleázovou aktivitu. Ribonukleázová aktivita RNAzy L se může uplatňovat při regulaci obratu mRNA v buňkách, ale především je aktivována v rámci **vrozené (neadaptivní) imunitní odpovědi** na přítomnost některých virových RNA molekul v buňce v rámci interferonem indukované cesty (Dean et al., 2001; Holland et al., 2003; Moitra, 2013; <https://www.genecards.org/>).

#### 2.2.6 Podrodina ABCF (GCN20)

Tři zástupci ABCF podrodiny u člověka jsou uloženi na třech různých chromosomech a stejně jako protein ABCE1 tvořeni dvěma ATP-vázajícími doménami, ale žádnou transmembránovou doménou. Gen *ABCF2* leží v oblasti 7q36.1 v blízkosti genu *ABCB8*. Také u těchto proteinů nebyla transportní funkce evidována. Protein ABCF1 je vyžadován při iniciaci mRNA translace zprostředkované 5' čepičkou (5' *cap*) či IRES elementem. Paralogem tohoto genu je gen *ABCF3*, který vykazuje antivirotický efekt proti flavivirům

(např. virus západonilské horečky) (Dean et al., 2001; Holland et al., 2003; Moitra, 2013; <https://www.genecards.org/>).

### 2.2.7 Podrodina ABCG (White)

Lidská podrodina ABCG je tvořena pěti polovičními transportéry, kteří mají invertovanou stavbu ve srovnání s ostatními ABC transportéry, tj. NBD doména je uložena blíže N konci a TMD doména blíže C konci. Geny *ABCG5* a *G8* leží vedle sebe v oblasti 2p21, ostatní geny jsou rozesety po třech různých chromosomech. Z historického pohledu jsou nejvíce studovanými geny patřícími také do ABCG podrodiny geny *white (w)*, *scarlet (st)* and *brown (bw)* u octomilky obecné (*Drosophila melanogaster*). Produkty genů *w* a *st* a *w* a *bw* vytvářejí heterodimery, které transportují přes cytoplasmatickou membránu pigmentových buněk v oku octomilek kromě jiných látek i prekurzory pigmentů - guanin a tryptofan (Mackenzie et al., 1999). Na experimentech s křížením bělookých samečků a červenookých samiček octomilek popsal Morgan poprvé v roce 1910 x-vázanou dědičnost a poskytl tím experimentální podporu chromosomové teorii dědičnosti. Lidské transportéry ABCG1 a G4 se podílí na **transportu lipidů** a jejich homeostáze. Analýzy buněčných linií rezistentních na mitoxantron, u nichž nebyla prokázána overexprese *ABCB1* ani *ABCC1*, vedly v několika laboratořích současně k objevu genu *ABCG2 (BCRP)* zodpovědného za **rezistenci** v těchto buňkách. Zvýšená exprese genu *ABCG2* byla také prokázána v subpopulaci hematopoetických kmenových buněk. Mutace genů *ABCG5* a *G8* byly prokázány u pacientů se sitosterolémií, onemocněním charakterizovaným poruchou v **transportu sterolů** včetně cholesterolu (Dean et al., 2001; Holland et al., 2003; Moitra, 2013; <https://www.genecards.org/>).

## 2.3 Fyziologická lokalizace a funkce ABC proteinů

ABC proteiny jsou součástí cytoplasmatické membrány všech známých typů buněk a u eukaryotních buněk je nacházíme také v membránách, které ohraničují vnitrobuněčné orgány. Mezi tyto orgány patří endoplasmatické retikulum, peroxisomy či mitochondrie (Dean et al., 2001; Dean a Annilo, 2005).

Přenos látek s využitím ABC pump je vždy jednosměrný. U bakteriálních buněk byly nalezeny jak tzv. **ABC importéry**, přenášející látky do nitra bakteriální buňky, tak tzv. **ABC exportéry**, které přenášejí látky mimo bakteriální buňku. U eukaryotních buněk byly popsány ABC transportéry pumpující přenášený substrát z cytosolu mimo eukaryotní buňku nebo z cytosolu do nitra buněčných organel (Dean et al., 2001; Falasca a Linton, 2012; Li et al., 2007).

Jako přenašeči velkého spektra látek od iontů a aminokyselin přes peptidy, lipidy, steroly a vitamíny až po malé proteiny tvoří ABC proteiny nedílnou součást mnoha **fyziologických buněčných procesů** (Dean et al., 2001). U bakteriálních buněk a eukaryotních vnitrobuněčných organel jsou spjati s přísunem látek účastnících se metabolických procesů. Dále jde zejména o odstraňování odpadních látek a detoxikaci vnitřního prostředí buněk, přenos buněčných signálů, výměnu lipidů či iontovou rovnováhu na membránách (Aye et al., 2009; Barbet et al., 2012; Theodoulou a Kerr, 2015). Jejich fyziologické tkáňové rozmístění a vyšší exprese v tkáních s hlavní funkcí bariéry včetně hematoencefalické bariéry či v trávicím traktu podtrhuje jejich protektivní funkci (Kachalaki et al., 2016). ABC proteiny bez TMD domén hrají důležitou úlohu při translaci mRNA (Barbet et al., 2012).

## **2.4 Lidská vrozená onemocnění spojená s disfunkcí ABC proteinů**

Fyziologický význam ABC proteinů je zřetelný také z příkladů mnohých lidských monogenních i komplexních onemocnění, která jsou spojena s nedostatečnou či špatnou funkcí těchto proteinů (Dean et al., 2001; Falasca a Linton, 2012; Theodoulou a Kerr, 2015). Popsaná monogenní onemocnění vzniklá na podkladě mutací v ABC genech vykazují autosomálně i gonosomálně recesivní typ dědičnosti. Mezi nejznámější patří cystická fibróza, adrenoleukodystrofie, Stargardtova choroba nebo Tangierova choroba. Heterozygoti pro mutace v ABC genech pak mají vyšší riziko výskytu některých komplexních chorob.

### 2.4.1 Cystická fibróza

**Cystická fibróza** je onemocnění s vysokým výskytem v kavkazských populacích včetně populace české s frekvencí výskytu přibližně 1:3000. Tato frekvence choroby odpovídá frekvenci výskytu přenašečů kolem 1:25. Gen *CFTR* je umístěn na dlouhém raménku chromosomu 7, zabírá přibližně 180000 párů bází (*base pairs*, bp) a kóduje 1480 aminokyselin (*amino acids*, aa). CFTR protein tvoří transmembránový kanál zprostředkovávající přenos chloridových a hydrogenuhličitanových aniontů, především v epitelálních buňkách. CFTR transportér se dále podílí na regulaci přenosu sodíkových iontů úzkou spoluprací s epitelálním sodíkovým kanálem (ENaC) (Elborn, 2016). Bylo popsáno více než 1500 mutací v genu *CFTR* asociovaných s cystickou fibrózou (Bowen a Hull, 2015; Elborn, 2016). Podle mechanismu, který způsobuje sníženou či špatnou funkci proteinu a vyvolává vznik cystické fibrózy, lze rozdělit mutace v *CFTR* genu na 6 kategorií:

1) absence syntézy proteinu, 2) předčasná degradace proteinu, 3) chybná regulace funkce proteinu, např. sníženou schopností vazby ATP, 4) porucha ve vlastním transportu chloridových iontů, 5) snížené množství normálních CFTR transkriptů a 6) snížená životnost, resp. zvýšená výměna CFTR přenašečů v biologické membráně (Rowe et al., 2005). Nejčastější mutace v kavkazských populacích, která je označována Phe508del (dříve  $\Delta F508$ ) a klasifikována do 2. třídy - předčasná degradace proteinu, byla v této populaci popsána u přibližně 70 % mutantních *CFTR* alel a 90 % pacientů s cystickou fibrózou (Bowen a Hull, 2015; Křenková et al., 2013). Na úrovni DNA jde o delecii tří bází kódujících aminokyselinu fenylalanin umístěnou v proteinu na pozici 508.

Porucha funkce CFTR transportéru se promítá do narušení acidobazické rovnováhy na povrchu epitelových tkání. Cystická fibróza se klinicky manifestuje především onemocněním plic, nedostatečnou funkcí slinivky břišní a gastrointestinálními poruchami. Mezi další potenciální konsekvence patří diabetes mellitus, onemocnění jater a kostí a neplodnost (především u mužů). Jde o život limitující onemocnění s mediánem přežití 44 let, nedostatečná schopnost dýchání je příčinou 90 % úmrtí (Bowen a Hull, 2015). Konzervativní symptomatická léčba je v současnosti nahrazována léčbou malými molekulami, které napravují či zlepšují funkci CFTR proteinů dle specifického typu mutace v *CFTR* genu (Mall a Galiotta, 2015). Léčba s pomocí těchto nových druhů léků v rámci pravidel tzv. **personalizované medicíny** by měla dále zlepšit přežití a kvalitu života pacientů

s cystickou fibrózou. Zvýšené riziko některých onemocnění slinivky břišní a plic bylo popsáno také u heterozygotních nosičů mutantní alely genu *CFTR* (Dean et al., 2001; Polgreen et al., 2018; Steiner et al., 2011).

#### 2.4.2 Příklady dalších onemocnění

X-vázaná **adrenoleukodystrofie (X-ALD)** je nejčastější peroxisomální onemocnění, které je podmíněno mutacemi v genu *ABCD1* uloženém na dlouhém raménku chromosomu X. Tento gen kóduje transmembránový protein ABCD1, dříve označovaný jako ALDP, který je uložen v membráně peroxisomů a zprostředkovává transport mastných kyselin s velmi dlouhým řetězcem (*very long-chain fatty acids*, VLCFA) k odbourání uvnitř této vnitrobuněčné organely (Engelen et al., 2012). Defekt ve funkci ABCD1 proteinu se promítne do zvýšené hladiny VLCFA v plasmě a tkáních. Klinické spektrum u mužů postižených touto chorobou má rozsah od izolované adrenokortikální nedostatečnosti a pomalu progredující myelopatie až po devastující mozečkovou demyelinizaci. Tyto symptomy mohou být chybně diagnostikovány jako hyperkinetické poruchy (ADHD) či roztroušená skleróza. Také u většiny žen nesoucích alelu pro X-ALD v heterozygotním stavu se symptomy choroby manifestují do 60 let věku. Onemocnění se vyskytuje ve všech světových populacích s frekvencí u mužů přibližně 1:20000 (Moser et al., 2007). U X-ALD nebyly zatím popsány žádné genotyp-fenotypové korelace a průběh a závažnost onemocnění jsou stále u jednotlivých pacientů nepředpověditelné (Berger et al., 2014).

V případě velmi heterogenní **Stargardovy choroby** jde o nejčastější vrozenou makulární dystrofii u dětí i dospělých s prevalencí přibližně 1:9000. Tato choroba vykazuje autosomálně recesivní typ dědičnosti a souvisí s mutacemi v genu *ABCA4* (Tanna et al., 2017). Gen *ABCA4*, skládající se z 50 exonů, je rozsáhlý a velmi polymorfní, dosud bylo popsáno přes 900 choroby způsobujících mutací v tomto genu. Jedná se o ABC transportér exprimovaný výhradně v cytoplasmatické membráně světločivných buněk sítnice oka, kde zajišťuje odsun toxických produktů fototransdukce (retinoidů, např. N-retinylidene-PE) mimo cytosol buněk. Stargardova choroba se nejčastěji manifestuje progresivní oboustrannou ztrátou centrálního vidění, poruchami barevného vidění a fotofobií, nástup onemocnění bývá obvykle v dětství či rané dospělosti. Obecně lze říci, že varianty typu *missence* jsou spojeny s mírnější formou choroby a pozdějším nástupem, zatímco varianty

typu *null* s více závažnou formou a dřívějším nástupem (Schulz et al., 2017; Tanna et al., 2017). Mutace v tomto genu byly také asociovány s dalšími onemocněními zraku, jako jsou retinitis pigmentosa, dystrofie tyčinek a čípků či stařecká makulární dystrofie.

Velmi vzácná **Tangierova choroba** s populačním výskytem přibližně 1:600000 je způsobena mutacemi typu loss-of-function v obecně známém genu *ABCA1*, jehož produkt hraje ústřední roli při transportu cholesterolu z tkání v rámci lipoproteinové metabolické dráhy (Hooper et al., 2017; Oram, 2000). ABCA1 transportér přenáší vnitrobuněčný cholesterol a fosfolipidy přes cytoplasmatickou membránu a umožňuje jejich vazbu na apolipoproteiny. Na biochemické úrovni se choroba prezentuje extrémně nízkými hladinami HDL cholesterolu (HDL-C) a apoproteinu ApoA-I. Na buněčné úrovni lze detekovat akumulaci esterů cholesterolu v tkáních bohatých na makrofágy, neboť makrofágy jsou nejvíce zasažený typ buněk (Maranghi et al., 2019). Mezi klinické znaky typické pro pacienty s Tangierovou chorobou patří zvětšené oranžovo-žluté krční a nosní mandle, hepatosplenomegalie, lymfadenopatie, anémie, trombocytopenie, periferní neuropatie a mírná neprůsvitnost rohovky. Pacienti s touto chorobou mají také vyšší riziko ischemické choroby srdeční (Hooper et al., 2017).

### 3 ABC proteiny a rezistence buněk na léčiva

**Rezistence buněk na antimikrobiální či protinádorovou chemoterapeutickou léčbu** je jedním z hlavních příčin selhání při léčbě jak infekčních, tak nádorových onemocnění. Patogenní organismy stejně tak jako nádorové buňky si vyvinuly celou řadu mechanismů, kterými se brání proti cytotoxickému ataku způsobenému chemoterapeutiky. Běžná je rezistence proti jednomu typu antimikrobiálních či protinádorových léčiv. Jedním z dobře prostudovaných příkladů je rezistence bakterií na penicilinová, cefalosporinová a další příbuzná  $\beta$ -laktamová antibiotika způsobená přítomností plazmidy kódovaných  $\beta$ -laktamáz. **Mikroorganismy i nádorové buňky** však mohou vykazovat rezistenci současně k více typům léčiv, která jsou odlišná svojí strukturou i mechanismem působení. Tento fenomén byl nazván **mnohočetná léková rezistence** (*multidrug resistance, MDR*) (Lage, 2003; Lubelski et al., 2007).

Byly popsány různé **hlavní typy MDR fenotypů**. Jedním z prvních popsáných MDR fenotypů, je fenotyp nádorových buněk zprostředkovaný transmembránovým transportérem ze skupiny ABC pump – známým jako **P-glykoprotein (P-gp)** či Multidrug resistance protein 1 (MRP1). Současné oficiální označení pro protein P-gp je ABCB1 (ATP-dependent translocase ABCB1); gen, který tento protein kóduje, je označen *ABCB1*. Tento fenotyp je charakterizován dobře definovaným spektrem transportovaných léčiv a také látkami, které rezistenci na jednotlivé typy léčiv potlačují, tzv. chemosenzitivizující látky (*chemosensitisers, MDR modulators*). Do první skupiny patří mimo jiné antracykliny daunorubicin a doxorubicin, vinca alkaloidy vinblastin a vinkristin, epipodofylotoxiny etoposid a teniposid, antibiotika actinomycin D, dactinomycin a mitomycin C, taxan paclitaxel a mnohá další hydrofobní amfipatická léčiva. Do druhé skupiny bychom zařadili například blokátory kalciového kanálu verapamil a nifedipin, imunosupresivní látku cyclosporin A, antiaritmika quinin a quinidin, steroidní hormony progesteron a tamoxifen a některá antibiotika a inhibitory HIV proteázy (Lage, 2003; Lubelski et al., 2007).

Velké množství dalších transportérů spojených s MDR fenotypem bylo popsáno u nádorových buněk i různých patogenních mikroorganismů v posledních 15 letech. Navíc, průchod různých dalších léčiv do farmakologicky chráněných oblastí jako jsou mozek, varle



či plod, může být velmi významně limitován ochranným působením ABC transportérů na hranicích těchto oblastí (Schinkel a Jonker, 2012).

### 3.1 Rezistence nádorových buněk na chemoterapii

Jedním ze základních pilířů protinádorové léčby je léčba chemoterapeutická, jejíž účinnost však může být značně limitována vnikem rezistence. Rezistence na chemoterapeutika může být rozdělována na dvě široké kategorie: vrozenou (primární) a získanou (sekundární). V případě **vrozené rezistence** většina buněk nádoru již před kontaktem s chemoterapeutiky nese faktory, které zamezují účinku léčiv. **Získaná rezistence** se může vyvinout až v průběhu léčby nádoru, který byl iniciálně na léčiva senzitivní. Příčinou mohou být mutace vzniklé během léčby, různé druhy adaptivní odpovědi buněk nebo selekce minoritních rezistentních subklonů (Holohan et al., 2013; Kachalaki et al., 2016).

Byla popsána celá řada konkrétních **mechanismů**, které mohou vést ke vzniku rezistentních buněk. Patří mezi ně **zvýšená hladina vylučování léčiv**, **změny v metabolismu léčiv** nebo **mutace cílů léčiv**. Vzhledem k tomu, že nádory jsou velmi adaptivní, aktivace **signálních drah** pro přežití buněk a naopak utlumení proapoptotických drah může také ve výsledku vyústit v rezistenci nádoru. Jako další významné faktory uplatňující se při vzniku rezistence byly identifikovány **epigenetické změny** a působení lokálního **nádorového mikroprostředí** (Holohan et al., 2013; Kachalaki et al., 2016). V poslední době je často diskutováno selhání léčby na podkladě přežití tzv. **nádorových kmenových buněk**, které jsou přirozeně rezistentní k mnoha léčebným přístupům.

#### 3.1.1 Export léčiv spojený s ABC proteiny

Cíle cytotoxických léčiv jsou obvykle uloženy intracelulárně. Zvýšené vylučování protinádorového léku cytoplasmatickými transportéry mimo cytosol má za důsledek snížení jeho koncentrace uvnitř buňky pod účinnou hladinu. U mnoha ABC transportérů byla souvislost s MDR experimentálně prokázána - ABCA2, ABCA3, ABCB1 (MDR1/Pgp), ABCB4 (MDR2/MDR3), ABCB5, ABCC1 (MRP1), ABCC2 (MRP2/cMOAT), ABCC3 (MRP3), ABCC10 (MRP7) a ABCG2 (BCRP/MXR/ABC-P) (Kachalaki et al., 2016). U dalších je podobný vztah suspektní a čeká na potvrzení.

### *3.1.1.1 ABCB1/MDR1/P-gp*

Transportér ABCB1 je nejvíce prostudovaným ABC transportérem a je považován za první objevený faktor spojený s MDR. V publikovaných studiích byla zvýšená exprese tohoto transportéru prokázána u leukemií, sarkomů, neuroblastomů, nádorů prsu a dalších nádorů a spojena se špatným klinickým průběhem (Shukla et al., 2011). V nádorových buňkách brání akumulaci celé řady protinádorových léčiv ze skupin antracyklinů (doxorubicin či daunorubicin), taxanů (docetaxel či paclitaxel), vinka alkaloidů (vinblastin či vinkristin), antibiotik (actinomycin-D) a dalších (např. teniposid, etoposid či bisantren). Spektrum přenášených léčiv je však mnohem širší a zahrnuje i inhibitory HIV proteázy, imunosupresiva, antiaritmika, analgetika, antihistaminika a další (Baran et al., 2007; Chen et al., 2016; Kachalaki et al., 2016; Shukla et al., 2011).

Nádory pocházející z epitelálních buněk (např. nádory tlustého střeva, ledvin, mozku a jater) vykazují přirozeně zvýšenou hladinu exprese ABCB1 proteinu. Jiné nádory si zvýšenou hladinu tohoto proteinu mohou vyvinout v průběhu chemoterapeutické léčby, zvýšená exprese je buďto indukována v řadě buněk nádoru nebo jsou selekcí vybrány buňky vyšší expresi vykazující (Ambudkar et al., 2005). Nejvýraznější korelace mezi expresí ABCB1 a lékovou rezistencí byla prokázána u akutní myeloidní leukemie. Exprese ABCB1 byla detekována u přibližně 30 % pacientů při záchytu onemocnění, zatímco u více než 50 % pacientů v době relapsu (Schaich et al., 2005; Kachalaki et al., 2016).

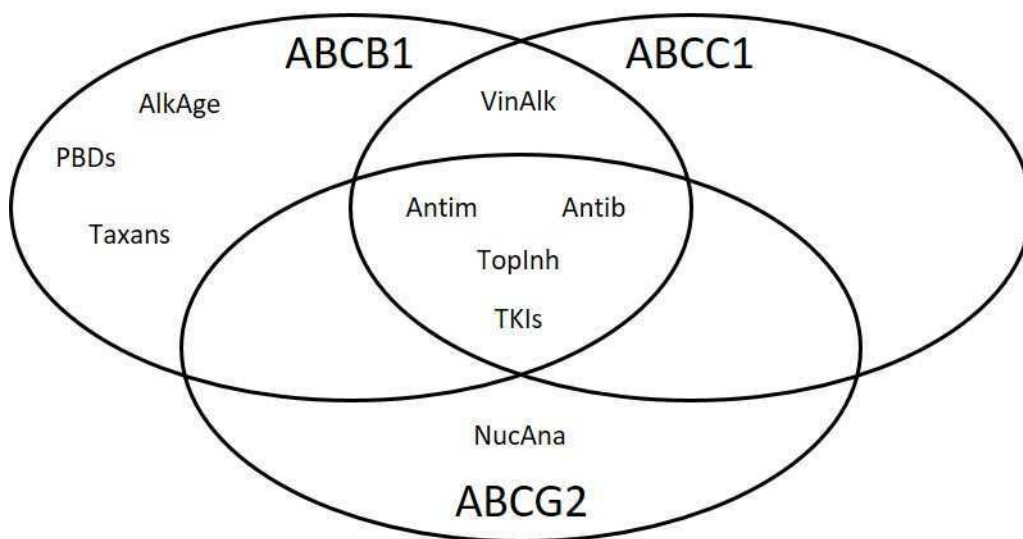
### *3.1.1.2 ABCC1/MRP1*

Protein ABCC1 je exprimován ve většině tkání za fyziologického stavu a tím také v mnoha typech nádorů, zejména u nemalobuněčných plicních nádorů, nádorů ezofageálních a některých typů leukemií. Tento přenašeč byl spojen s transportem látek konjugovaných s glukuronidem, sulfátem nebo glutationem, leukotrienu C4, ale také řady protinádorových léčiv ze skupin vinka alkaloidů (vinkristin) či antracyklinů (doxorubicin). Prognostický význam zvýšené hladiny ABCC1 proteinu však nevycházel jednoznačně a je stále nerozhodnutým tématem (Kachalaki et al., 2016; Shukla et al., 2011).

### *3.1.1.3 ABCG2/BCRP/MXR*

Transportér ABCG2 se stejně jako ABCB1 uplatňuje v buňkách tvořících biologické bariéry jako např. hematoencefalické bariéry či v gastrointestinálním traktu s úkolem odstraňování toxických látek z více citlivých prostředí. Jeho exprese byla detekována v nádorech

ezofageálních, žaludku i tlustého střeva, ale také v normálních i nádorových kmenových buňkách. Z transportovaných protinádorových léčiv byly prokázány především antracykliny (daunorubicin a doxorubicin), etoposid, topotekan, mitoxantron a metotrexát, ale i inhibitory tyrosin kináz jako např. imatinib a erlotinib (Chen et al., 2016; Holohan et al., 2013; Kachalaki et al., 2016; Shukla et al., 2011).



**Obrázek 2** – Jedním z úskalí inhibice ABC proteinů v klinické praxi jsou překrývající se spektra transportovaných protinádorových léčiv. Na obrázku jsou znázorněny množiny léčiv, které jsou transportovány nejvýznamnějšími ABC transportéry uplatňujícími se při vzniku mnohočetné lékové rezistence (adaptováno dle Chen et al., 2016, Kathawala et al., 2015 a Kunjachan et al., 2013). Zkratky: Antib, antibiotics; Antim, antimetabolites; AlkAge, alkylating agents; NucAna, nucleoside analogs; PBDs, platinum-based drugs; TKIs, tyrosine kinase inhibitors; TopInh, topoisomerase inhibitors; VinAlk, vinca alkaloids.

#### 3.1.1.4 Inhibitory ABC proteinů v klinické praxi

Již od prvních experimentů spojujících zvýšenou expresi ABC transportérů se vznikem rezistence na protinádorová léčiva se objevily snahy o vyvinutí **inhibitorů**, které by při současném podání s chemoterapeutikem pomohly zajistit jeho dostatečnou koncentraci v cílových buňkách. V preklinických studiích již byly testovány tři generace ABC inhibitorů (především inhibitorů ABCB1, např. zosuquidar a tariquidar) s velmi slibnými výsledky na

buněčných liniích. V klinických studiích u pacientek s nádory prsu však současné podávání inhibitorů ABCB1 proteinu a standardní protinádorové chemoterapeutické léčby vykazovalo jen velmi omezený či žádný přínos (Chen et al., 2016; Holohan et al., 2013; Kathawala et al., 2015). Pro použití v klinické praxi nebyl dosud schválen žádný ABC inhibitor. Mezi další důvody patří také vysoká toxicita, neočekávané interakce s jinými léky a možný vliv na vznik jiných forem rezistence.

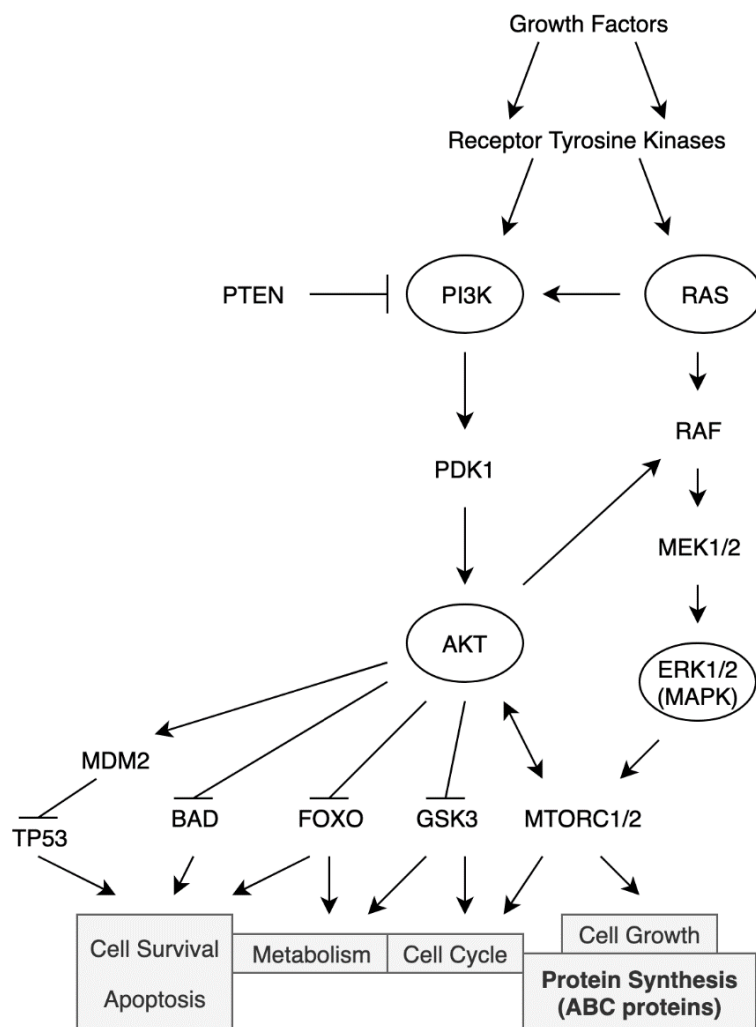
Mezi důvody selhání dosud vyvinutých ABC inhibitorů může patřit překryv spekter transportovaných léčiv u tří nejvýznamnějších ABC transportérů spojovaných s MDR, prezentovaný na [obrázku 2](#). Lze se také opodstatněně domnívat, že na transportu protinádorových léčiv se podílejí mnozí další zástupci z rodiny ABC proteinů, kteří mohou hbitě vykompenzovat případné zablokování některých transportérů. Zvýšená exprese více ABC genů i z různých podrodin byla již u různých nádorů popsána (Chen et al., 2016; Dvorak et al., 2017; Holohan et al., 2013; Kathawala et al., 2015).

Zajímavá je situace s běžně klinicky používanými **tyrozinkinázovými inhibitory** (TKI) jako např. imatinibem, erlotinibem či sorafenibem. Na jedné straně jsou substráty některých ABC transportérů, které mohou být příčinou vzniku rezistence na tyto léčiva, na druhé straně mohou působit i jako inhibitory těchto proteinů. Role TKI jako inhibitorů ABC proteinů při MDR je předmětem současného výzkumu (Deng et al., 2014; Chen et al., 2016; Kathawala et al., 2015). Narůstá také počet přírodních látek (především ze skupin flavonoidů, kumarinů, terpenoidů a alkaloidů), u kterých jsou popisovány účinky proti nádorovým buňkám s rozvinutou MDR (Chen et al., 2016; Kathawala et al., 2015).

#### *3.1.1.5 Molekulární mechanismy ovlivňující expresi ABC transportérů*

Na molekulární úrovni bylo ovlivnění exprese ABC transportérů spojeno především se změnami v PI3K/AKT/MTOR signální dráze ([obrázek 3](#)). Experimentální studie ukázaly, že inhibice PI3K/AKT/MTOR signální dráhy může efektivně zvrátit MDR na podkladě ABCB1 (P-gp) u některých typů nádorů a aktivovaný AKT je naopak spojen se zvýšenou rezistencí (Mao et al., 2014). PTEN reguloval ABCG2 a populaci nádorových kmenových buněk skrz PI3K/AKT/MTOR signální dráhu u chronické myeloidní leukemie v práci Huang et al., 2014. Komponenty MTOR větve signální dráhy byly asociovány s CFTR proteinem v práci Reilly et al., 2017. Zvýšení exprese ABCA1 bylo navozeno inhibicí PI3K/AKT/MTOR signální dráhy s využitím kyseliny zoledroniové v publikaci autorů

Castella et al., 2017. **Obrázek 3** dále vyzdvihuje úzké propojení signální dráhy PI3K/AKT/MTOR s další dráhou RAS/ERK, která se také významně uplatňuje v kancerogenezi.



**Obrázek 3** – Obrázek schematicky zachycuje nejvýznamnější kroky dvou úzce propojených signálních drah spojených na molekulární úrovni s regulací exprese ABC transportních proteinů. Jde o signální dráhy PI3K/AKT a RAS/ERK, které se významně uplatňují také při kancerogenezi. Přepřacováno dle Carnero a Paramio, 2014; Danielsen et al., 2015; Hemmings a Restuccia, 2012; Luo et al, 2003; Saini et al., 2013; Wee a Wang, 2017.

### 3.1.2 Další mechanismy vedoucí ke vzniku rezistence u nádorových buněk

#### 3.1.2.1 Aktivace a inaktivace léčiv

Rezistence na protinádorová léčiva může být dále způsobena vyšší mírou inaktivace léčiva či nedostatečnou mírou aktivace na jeho nejúčinnější formu. Tyto mechanismy bývají vysoce specifické pro každou skupinu chemoterapeutik. Například kapecitabin, neaktivní forma antimetabolitu 5-fluorouracilu (5-FU), je na aktivní formu léčiva přeměňován enzymem tymidinfosforylázou. Ačkoliv aktivita tymidinfosforylázy bývá vyšší v nádorových buňkách než v buňkách normálních tkání, gen pro tento enzym může být v nádorových buňkách potlačen metylací, což klinicky vyúsťuje v rezistenci na kapecitabin. Tato epigenetická modifikace je nádorově specifická a může být zvrácena léčbou s inhibitory DNA metyltransferáz (Holohan et al., 2013; Kachalaki et al., 2016).

#### 3.1.2.2 Změny v cíli léčiva

Mutace v genech produkujících cíle protinádorových léčiv či změny exprese těchto genů v průběhu chemoterapeutické léčby může také vyústit v rezistenci. Mutace v DNA stojí například za pozorovanou rezistencí na imatinib, který je účinným inhibitorem onkogenní tyrozinkinázy BCR-ABL1 způsobující vznik chronické myeloidní leukemie a výjimečně i akutních forem leukemií. Missence mutace T315I v kinázové doméně BCR-ABL1, označovaná též jako tzv. *gatekeeper* mutace, zabraňuje navázání imatinibu na molekulu tyrozinkinázy, zatímco nijak neovlivňuje katalytickou funkci onkogenního enzymu. Až třetí generaci inhibitorů BCR-ABL1 kinázy (ponatinib) se podařilo překonat tento typ rezistence (Gorre et al., 2001; Holohan et al., 2013; Rossari et al., 2018).

Buňky nádoru prsu pozitivního na expresi estrogenových receptorů potřebují ke svému růstu hormon estrogen. Na této skutečnosti byla založena účinná terapie antagonisty estrogenových receptorů, z nichž nejznámějším je tamoxifen. V mnoha případech byl popsán vznik rezistence na tamoxifen skrze snížení počtu estrogenových receptorů na povrchu nádorových buněk. Ačkoliv tento vážný klinický problém může být řešen změnou na jinou endokrinní léčbu, optimální léčebná strategie je stále zájmem výzkumu (Hurvitz a Pietras, 2008; Johnston, 2010; Kachalaki et al., 2016).

### 3.1.2.3 Změny v opravě poškození DNA

Mnohá protinádorová léčiva indukují poškození DNA ať už přímo či nepřímo. Kapacita opravných mechanismů v nádorových buňkách má proto přímý vliv na efektivitu léčby. Poškození molekul DNA indukuje v buňkách na prvním místě zastavení buněčného cyklu. V mnohých nádorech je však regulace zastavení buněčného cyklu vyražena vlivem *gain-of-function* mutací v onkogenech (např. KRAS) a *loss-of-function* mutací v tumor supresorových genech (např. TP53). Mezi důležité komponenty mašinérie opravných mechanismů poškozené DNA patří enzym PARP1 (*poly(ADP-ribose) polymerase 1*), uplatňující se při opravě jednovláknových zlomů. Produkty genů *MLH1* a *MSH2* se zase uplatňují v tzv. *mismatch repair* (MMR) systému. ERCC1 (excision repair cross-complementing 1) je zásadní složkou tzv. *nucleotide-excision repair* (NER) systému. Koncept tzv. **syntetické letality** je založen na zjištění, že nádorové buňky často vykazují nefunkčnost v minimálně jedné DNA opravné dráze a naopak závislost na dráze obvykle v normálních buňkách nepoužívané. Zablokování těchto méně obvyklých drah může potom vést ke specifické smrti nádorových buněk (Holohan et al., 2013; Kachalaki et al., 2016).

### 3.1.2.4 Deregulace apoptózy

Výsledky výzkumů ukazují, že skupina antiapoptotických genů, které bývají v nádorových buňkách deregulované, zahrnuje poměrně malý okruh genů. Jde zejména o členy **BCL2** genové rodiny, proteiny inhibující apoptózu (**IAPs**) a inhibitor kaspázy 8 **FLIP**. Tato situace vybízí k využití v protinádorové léčbě (Holohan et al., 2013).

Proteiny BCL2, BCLXL či MCL1 mají antiapoptotickou roli při apoptóze zprostředkované mitochondriemi a blokují permeabilizaci vnější membrány těchto organel. Další členové BCL2 rodiny – BAX, BAD či BAK - vykazují naopak proapoptotickou funkci. Vzájemná rovnováha nebo nerovnováha mezi členy BCL2 rodiny je kritickou událostí pro další osud buňky (Chipuk et al., 2010). Inhibitory antiapoptotických členů BCL2 rodiny jsou nadějnými farmaky testovanými v současnosti (Holohan et al., 2013).

Výše zmíněné mechanismy vzniku chemorezistence nepůsobí obvykle izolovaně a jedná se o **komplexní působení poruch ve více mechanismech současně**.

### 3.1.3 Nádorové kmenové buňky

**Stochastický model** kancerogeneze předpokládá, že každá transformovaná buňka nádorové masy může dát vznik nádoru novému. Částečně jiný pohled na mechanismy kancerogeneze přinesl novější model zahrnující tzv. **nádorové kmenové buňky** (*cancer stem cells, CSCs*). Dle této teorie jsou nádory řízeny subpopulací pluripotentních CSCs, které mají schopnost generovat různé populace diferencovaných buněk vytvářejících vlastní nádorovou masu a jsou zodpovědné za přežití nádoru a jeho metastazování (Holčáková et al., 2014; Holohan et al., 2013; Klener a Klener, 2013). Teorie CSCs zásadně ovlivňuje pohled na farmakologický boj s nádorovými onemocněními a toto téma se rychle stalo středem zájmu mnoha výzkumných týmů. Účinná protinádorová léčba musí zřejmě zahrnovat i eradikaci CSCs.

CSCs byly dosud identifikovány a izolovány z celé řady nádorů původem z různých tkání. Jejich incidence v rámci různých nádorů byla velmi variabilní, od přibližně 1 % u akutní myeloidní leukemie po 80 % u akutní lymfoblastické leukemie (Cojoc et al., 2015; Di a Zhao, 2014). CSCs mohou být identifikovány pomocí charakteristických povrchových proteinů (markerů), jako např. CD133, CD44, CD24 a  $\alpha 2\beta 1$  integrin, ale jednoznačná identifikace těchto buněk není dosud vyjasněna (Holohan et al., 2013; Peitzsch et al., 2013). U CSCs z různých typů nádorů byly prokázány vysoké hladiny exprese ATP-binding cassette (ABC) transportních proteinů a s nimi asociované aktivování PI3K/AKT signální dráhy (Bleau et al., 2009). Mezi další mechanismy, které udržují silnou chemo- i radiorezistenci CSCs patří zejména vysoká aktivita aldehyd dehydrogenáz (ALDH), mechanismů opravujících poškozenou DNA a antiapoptotických proteinů z rodiny BCL2. Velkou roli budou hrát také stimulační faktory (růstové faktory, cytokiny) **nádorového mikroprostředí** (Cojoc et al., 2015; Di a Zhao, 2014).

Vzhledem k pozorování, že i více diferencované buňky nádoru se mohou zpětně přeměnit na buňky vykazující charakteristiky CSCs, se lze domnívat, že oba zmiňované modely kancerogeneze se překrývají a je nutné je studovat společně (Holohan et al., 2013).

### 3.1.4 Nádorové mikroprostředí

Nádorové mikroprostředí zahrnuje heterogenní populaci nediferencovaných a diferencovaných buněk, jejichž vzájemné interakce hrají zásadní úlohu ve vývoji a progresi



nádoru. Endoteliální buňky a jejich prekurzory jsou nezbytné pro nádorovou angiogenezi zajišťující nádorové mase přísun kyslíku a živin. Složení extracelulární matrix podporující růst buněk je vytvářeno spolupůsobením fibroblastů, myofibroblastů, mesenchymálních kmenových buněk a vlastních nádorových buněk. Významnou podporu pro svůj rozvoj potřebuje nádor také od některých buněk imunitního systému – makrofágů a supresorových buněk myeloidního původu (*myeloid-derived suppressor cells*, MDSCs). Naopak u cytotoxických T buněk a NK buněk je známo jejich protinádorové působení (Kise et al., 2016; Shaked, 2019). V neposlední řadě poskytuje nádorové mikroprostředí nádorovým buňkám i fyzickou ochranu před působením cytotoxických látek (Holohan et al., 2013).

Publikované studie potvrdily, že životní prostředí obklopující proliferující nádorové buňky se vyznačuje nedostatkem kyslíku, živin a glukózy a má nízké pH. Nádorové buňky se postupně adaptují na tyto jinak živým buňkám velmi nepříznivé podmínky a naopak je výhodně využívají ke svému prospěchu (Weber a Kuo, 2012). V tomto prostředí jsou nádorové buňky například schopné přejít z aerobního na anaerobní metabolismus, což je velmi problematické pro diferencované buňky nenádorových tkání. Výzkum v této problematice se zaměřil na transkripční faktor HIF1, který je aktivován v hypoxickém prostředí. Mezi cíli tohoto transkripčního faktoru jsou např. enzymy glykolitické cesty, růstové faktory či erytropoetin.

Buňky stroma nejsou jen pouhými pozorovateli, ale ukázalo se, že mezi nimi a nádorovými buňkami probíhá oboustranná, dynamická a spleťtá komunikace. Především s nádorem asociované fibroblasty (*cancer associated fibroblasts*, CAFs) vylučují faktory, které svým autokrinním i parakrinním působením zvyšují agresivitu fenotypu nádorových buněk (Weber a Kuo, 2012).

## 4 Materiál a použité metody

### 4.1 Analyzované vzorky

Ve studiích, kde se analyzoval karyotyp nádorových buněk pomocí cytogenetických metod, byly vyšetřovány vzorky periferní krve či kostní dřeně získané od pacientů s podezřením na určitou hematologickou malignitu. Nádorový karyotyp byl vyšetřován v rámci standardního vyšetřovacího postupu zavedeného na Hematoonkologickém oddělení Fakultní nemocnice v Plzni v laboratořích Ústavu lékařské genetiky.

Vzorky nádorové tkáně solidních tumorů a párové vzorky nenádorových tkání byly získány po chirurgickém odstranění těchto tkání onkologickým pacientům na domluvených zdravotnických pracovištích. Jednalo se o vzorky nádorů prsu, kolorekta, pankreatu a vaječníků z pracovišť Fakultní nemocnice v Plzni, Fakultní nemocnice v Brně, Fakultní nemocnice v Motole, Ústav klinické a experimentální medicíny v Praze a Medicon v Praze.

Buněčné linie byly používány jako model nádoru pankreatu v práci Oliverius et al., 2019. Jednalo se o lidské buněčné linie PaCa-44, MiaPaCa-2 a BxPc-3. Z pohledu genu *KRAS*, velmi často mutovaného u pacientů s nádory pankreatu, nese linie PaCa-44 mutaci G12V, MiaPaCa-2 mutaci G12C a BxPc-3 wild-type alely. Linie byly kultivovány podle zavedených postupů v Ústavu klinické a experimentální medicíny v Praze.

### 4.2 Cytogenetické metody

Nádorový karyotyp byl stanovován na podkladě barvení chromosomů metodou G-pruhování doplněnou molekulárně-cytogenetickou metodou fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH). Nestimulované krátkodobé kultury ze vzorků periferní krve či kostní dřeně byly obvykle zpracovány po 24 až 72 hodinové kultivaci. Barvení chromosomů bylo prováděno dle standardních postupů ve vypufrovaném roztoku Giemsova barviva po předchozím působení enzymu trypsinu (Michalová, 1999). Analýzy karyotypů byly provedeny s pomocí počítačového karyotypovacího systému Ikaros (MetaSystems) a zapsány dle mezinárodní cytogenetické nomenklatury (ISCN). U metody FISH využívající vazby synteticky

připravené jednořetězcové DNA sondy s navázanou fluorescenční značkou dle pravidel komplementarity bází k předem denaturované vyšetřované dvouřetězcové DNA byly dodržovány protokoly doporučené k jednotlivým sondám jejich výrobcí. Byly používány komerčně dostupné lokus-specifické, centromerické i malovací FISH sondy od firem Abbott-Vysis, Cytocell, Kreatech nebo Zytovision. Světelný signál navázané DNA sondy byl detekován pomocí fluorescenčního mikroskopu a analyzován v programu Isis (MetaSystems).

### **4.3 Molekulárně-genetické metody**

Isolace celkové RNA, kontrola kvantity a kvality RNA, syntéza cDNA a preamplifikace cDNA byly zpracovávány dle postupů zavedených v oddělení toxikogenomiky Státního zdravotního ústavu v Praze. Nařaděná amplifikovaná cDNA byla vstupním materiálem pro kvantitativní polymerázovou řetězovou reakci v reálném čase (qRT-PCR) s použitím TaqMan Gene Expression Assays (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific) na různých přístrojových platformách (RotorGene 6000, ViiA™ 7 Real-Time PCR System). Pro jednotlivé typy nádorů byly vybrány specifické sety referenčních genů (housekeeping genů) dle předchozích zkušeností laboratoře. Mezi analyzované geny (*genes of interest*, GOI) patřily lidské geny rodiny ABC transportních proteinů, vybrané geny SLC transportních proteinů a geny KRAS signální dráhy. Protokol pro qRT-PCR byl převzat dle doporučení výrobců použitých reagensů (New England Biolabs Inc, MBI Fermentas Inc, Top-Bio s.r.o., Life Technologies Corp) a byl v souladu se standardními mezinárodními doporučeními (MIQE Guidelines - Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments; Bustin et al., 2009).

### **4.4 Statistické a bioinformatické metody**

Získaná data byla vyhodnocována s využitím běžně používaných statistických metod jako např. korelační a regresní analýza, Mann-Whitneyův U test, Kruskal-Wallisův test, ANOVA, analýza přežití na podkladě Kaplan-Meierovy metody a log-rank testu a další. Jako statisticky signifikantní byly označeny výsledky s hodnotou  $p < 0,05$  v oboustranném testu.

Statistické výpočty a grafická interpretace jejich výsledků byly prováděny ve statistických programech Statistica, SPSS a PAST.

Jako hlavní metoda pro relativní kvantifikaci expresních dat byla vybrána normalizace k setu referenčních genů dle standardní delta-delta Ct metody (Schmittgen a Livak, 2008). Alternativní metody normalizace dat – normalizace k průměrné Ct hodnotě daného analyzovaného genu v celém souboru – byly testovány v některých popisovaných studiích. Hodnoty násobku změny (*fold change*) byly dále zpracovávány metodami hierarchického klastrování a zobrazovány formou barevných map, tzv. heat-map. K těmto účelům byly využity internetové bioinformatické programy Heatmapper a Shinyheatmap.

Pro porovnání námi vypočtených křivek přežití s křivkami přežití spočítaných na podkladě volně dostupných mezinárodních databázových dat (Gene Expression Omnibus, The Cancer Genome Atlas) byly použity internetové programy Kaplan-Meier Plotter a PrognoScan. Analýzy biologického a funkčního významu nalezených výsledků a vztahů mezi geny byly založeny na dotazech a podrobném vyhledávání informací ve volně dostupných mezinárodních databázích molekulárně-biologických dat jako jsou National Center for Biotechnology Information (NCBI), GeneCards (Weizmann Institute of Science), UniProt (European Bioinformatics Institute, Swiss Institute of Bioinformatics a Protein Information Resource), Ensembl genome database project (European Bioinformatics Institute a Wellcome Trust Sanger Institute) nebo UCSC Genome Browser (University of California, Santa Cruz). Interakce mezi geny a proteiny byly zkoumány a vizualizovány ve formě grafických sítí s podporou programů STRING (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins) a Cytoscape.

V rámci přístupů komparativní biologie využívaných v některých z popisovaných studií šlo např. o metody seřazování nukleotidových sekvencí (*alignment*) a vyhledávání sekvenčních motivů se známým nebo pravděpodobným funkčním významem (*motif discovery*). Aplikované programy skupiny Clustal, T-Coffee a MAFFT využívají tzv. progresivní alignment. Vizuelně atraktivní a dobře srozumitelné zobrazení výsledků alignmentu sekvencí bylo možné sestavit v programu Jalview. Programy RegRNA 2.0 a MEME suite jsme používali pro vyhledávání motivů v kolekci sekvencí různých zástupců obratlovců. Pro hledání otevřených čtecích rámců (*open reading frames*) v sekvenčních datech lze

alternativně využít programy ORFfinder a NetStart. Sekundární struktura vybraných RNA sekvencí byla predikována servery RNAstructure a RNAfold.

## 5 Výsledky výzkumu

Výsledková část habilitační práce se skládá z 8 příspěvků publikovaných v odborných periodikách a úvodních komentářů ke každému z nich. Všechny tyto příspěvky spojuje tematika ABC genů a proteinů a s nimi spojená rezistence nádorů na chemoterapeutickou léčbu. Autor habilitační práce se na těchto příspěvcích podílel jako první autor v 5 případech, korespondenční autor v 1 případě a spoluautor ve 2 případech. Seznam dalších 21 prací, na kterých se autor podílel v roli prvního autora nebo spoluautora a které se zabývají příbuznými cytogenetickými či molekulárně genetickými tématy, je uveden v dalších částech práce. Výzkumné aktivity autora jsou významnou měrou podpořeny nepřetržitou praxí v oboru klinická genetika na Ústavu lékařské genetiky LF UK a FN Plzeň, kde od roku 2006 působí na pozici odborného pracovníka v laboratorních metodách. Na bioinformatickou analýzu molekulárně genetických dat se autor začal zaměřovat na Ústavu biologie LF UK v Plzni, kde současně působí od roku 2014.

### 5.1 Příspěvek I

**Citace příspěvku:** DVORAK, P., LYSAK, D. and VOKURKA, S., 2015, Discontinuation of tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia patients – worldwide battlefield. *Neoplasma*. 2015. Vol. 62, no. 02, p. 167-171. DOI 10.4149/neo\_2015\_021. AEPRESS, s.r.o.

**Impakt faktor časopisu:** IF(2018) 1.771

Chronická myeloidní leukemie (CML) patří mezi myeloproliferativní maligní onemocnění. Její celosvětová roční incidence je asi 2 případy na 100000 obyvatel, a ačkoliv se může objevit v každé věkové skupině, průměrný věk při diagnóze CML se nachází v páté a šesté dekádě lidského života.

Porozumění mechanismům patogeneze chronické myeloidní leukemie (CML) na molekulární i buněčné úrovni a zavedení cílené terapie s využitím inhibitorů tyrozinkináz (TKI) může být považováno za učebnicový příklad úspěšného boje proti nádorovému onemocnění. CML je charakterizována klonální poruchou hematopoetické kmenové buňky,

kteřá je výsledkem onkogenního působení abnormálního fúzního proteinu BCR-ABL1. Téměř ve 100 % případů vznikne fúze genů BCR a ABL1 na podkladě chromosomové translokace mezi dlouhým (q) raménkem chromosomu 9 a dlouhým raménkem chromosomu 22. Cytogenetický zápis pro tuto translokaci je t(9;22)(q34;q11). Nově vytvořený protein se v buňce chová jako konstitutivně aktivovaná tyrozin kináza. Na základě rozpoznání mechanismu vzniku tohoto onemocnění byl do klinické praxe uveden první inhibitor tyrozin kináz (TKI) – imatinib mesylát (Gleevec). Tento inhibitor první generace účinně blokuje fungování onkogenního fúzního proteinu a je schopen zastavit progresi onemocnění. Pro překonání mutací v *BCR-ABL1* genu, které způsobují neúčinnost imatinibu, byly postupně vyvinuty ještě účinnější inhibitory TKI druhé (dasatinib, nilotinib) a třetí (bosutinib, ponatinib) generace. Vzhledem k tomu, že TKI patří mezi substráty transportované ABC proteiny, může být vyšší aktivita ABC přenašečů zodpovědná za vznik rezistence na tyto léčiva.

Mezinárodní doporučení pro léčbu CML shodně stanovují, aby pacienti optimálně reagující na primární léčbu TKI byli trvale, bez přestání, léčeni standardním dávkováním léčiva. Přesto v klinické praxi existují situace, kdy k přerušení léčby TKI dochází. Za prvé jde o případy vzniku rezistence na podávanou TKI léčbu nebo netolerovatelné toxicity, a zde je pak nutné hledat nové léčebné strategie. Za druhé se jedná o vliv sociokulturních faktorů, jako jsou ochota nemocného spolupracovat při dlouhodobé léčbě (compliance), těhotenství či subjektivní přání pacienta. Nemalý může být i ekonomický vliv spojený s neustále se zvyšujícími náklady na protinádorovou léčbu.

Klinické studie zabývající se kontrolovaným vysazením léčby s TKI u pacientů s definovanou hlubokou molekulární odpovědí již v posledních letech probíhají a jsou publikovány první výsledky. Publikované výsledky ukazují, že asi 40 % pacientů s vysazenou léčbou zůstalo v hluboké molekulární odpovědi během celých dvou let, po které studie většinou probíhaly. U valné většiny ze zbývajících 60 % pacientů, kteří dosaženou odpověď ztratili většinou během prvních 6 měsíců vysazení, byla hluboká molekulární odpověď znovu nastolena po obnovení TKI léčby.

Otázkou stále zůstává, zda přerušení tyrozinkinázové léčby nemůže zvýšit výskyt případů rezistence na tuto léčbu především tím, že umožní větší proliferaci nádorových buněk, a tím i vznik větší heterogenity mezi nimi. Vzhledem k tomu, že hlavním mechanismem vzniku

sekundární rezistence na TKI jsou bodové mutace v BCR-ABL1 tyrozinkinázové doméně, je to teoreticky pravděpodobné. Zásadní je také nalezení prediktivního faktoru spojeného s rychlejší rekurencí onemocnění po kontrolovaném vysazení TKI léčby, který se zatím nalézt nepodařilo. Také ochota optimálně odpovídajících pacientů k účasti na studiích s vysazením léčby je menší a pochopitelná.

Příspěvek ve formě review přinesl komplexní pohled na problematiku kontrolovaného přerušování léčby s TKI a diskuzi nad dosud otevřenými otázkami z pohledu laboratorní a klinické praxe.

## 5.2 Příspěvek II

**Citace příspěvku:** DVORAK, P., LYSAK, D., VOKURKA, S., KARAS, M. and SUBRT, I., 2015, Allogeneic stem cell transplantation can improve outcome of AML patients without complete cytogenetic response after induction and consolidation treatment. *Neoplasma*. 2015. Vol. 62, no. 01, p. 140-145. DOI 10.4149/neo\_2015\_018. AEPRESS, s.r.o.

**Impakt faktor časopisu:** IF(2018) 1.771

Akutní myeloidní leukemie (AML) je onemocnění vzniklé v důsledku klonální expanze myeloidních blastů v periferní krvi, kostní dřeni nebo i jiné tkáni. Jedná se o onemocnění heterogenní na klinické, morfologické a genetické úrovni a může zahrnovat pouze jednu nebo všechny myeloidní buněčné linie. Celosvětově je roční incidence této choroby asi 3 případy na 100000 lidí s mírnou převahou mužů, průměrný věk při diagnóze je 65 let.

Komentovaný příspěvek předkládá retrospektivní analýzu 376 postupně diagnostikovaných pacientů s AML. Z tohoto celkového souboru bylo 256 (68 %) léčeno standardní indukční chemoterapií "7+3" následovanou konsolidačním/intenzifikačním režimem "4+3" s vysokými dávkami cytarabinu a mitoxantronu. Z 256 pacientů léčených režimy "7+3" i "4+3" byl při cytogenetickém vyšetření nádorových buněk z kostní dřene nalezen u 120 (47 %) pacientů normální karyotyp a u zbývajících 136 (53 %) pacientů byla nalezena alespoň jedna cytogenetická aberace. Naše studie se zaměřila na pacienty, kteří po uvedených dvou pokusech o dosažení remise onemocnění nedosáhli kompletní cytogenetické remise (CRc), tj. při kontrolním vyšetření po léčbě byly stále přítomné cytogenetické změny. Nedosažení



CRc znamenalo pro tyto pacienty velmi špatnou prognózu vývoje onemocnění a předpoklad časné progresse. U pacientů s nedosaženou CRc lze také předpokládat různé stupně rezistence vůči podávaným protinádorovým léčivům.

Mezi pacienty léčenými oběma režimy a majícími alespoň jednu cytogenetickou aberaci v karyotypu bylo vyhledáno 25 (18 %) pacientů bez dosažení CRc a tito pacienti byli dále analyzováni z pohledu laboratorních a klinických dat. Nejprve byly porovnány dvě podskupiny těchto pacientů – s a bez současného dosažení kompletní morfologické remise

(16 versus 9 pacientů). V obou skupinách bylo pozorováno shodné zastoupení spektra cytogenetických aberací s nejvyšším výskytem tzv. aberací spojených s myelodysplastickými změnami. Mezi tyto změny patří především delece dlouhého raménka (q raménka) chromosomu 5 (delece 5q), ztráta celého chromosomu 5, delece q raménka chromosomu 7, ztráta celého chromosomu 7, aberace krátkého raménka (p raménka) chromosomu 17 a delece q raménka chromosomu 11. S myelodysplasií je také asociován tzv. komplexní karyotyp, definovaný jako karyotyp se třemi a více nesouvisejícími aberacemi. Komplexní karyotyp, jehož součástí byla delece 5q, tvořil přibližně třetinu všech karyotypů v obou porovnávaných skupinách. U AML tvoří skupinu se střední prognózou pacienti s normálním karyotypem nebo s aberacemi nezahrnutými mezi aberace spojené s dobrou či naopak špatnou prognózou. V podskupině bez dosažené morfologické kompletní remise byl pouze jeden pacient (z 9 pacientů, 11 %) náležející při diagnóze do střední prognostické skupiny, v podskupině s dosaženou morfologickou kompletní remisí bylo takových pacientů pět (31 %).

Zajímavým pozorováním bylo, že u 4 z 25 pacientů byly chemoterapií eliminovány subklony vzniklé klonálním vývojem (tj. s vyšším počtem cytogenetických aberací), zatímco méně odvozené klony dále proliferovaly a vykazovaly vyšší stupeň rezistence. Toto pozorování by mohlo naznačovat, že rezistence by mohla být během vývoje nádoru v některých subpopulacích nádorových buněk i samovolně ztracena.

V rámci pacientů bez CRc byli dále porovnání pacienti, kteří podstoupili allogenní transplantaci kostní dřeně, s pacienty, kteří pro tento typ léčby indikováni nebyli. I pro pacienty s takto nepříznivou prognózou bylo demonstrováno, že allogenní transplantace kostní dřeně představuje kurativní léčbu. 40 % pacientů po transplantaci bylo dlouhodobě naživu. Doba přežití do progresu (PFS) a celkové přežití (OS) pro celou skupinu transplantovaných pacientů bylo 2,7 a 2 roky, zatímco pro skupinu netransplantovaných pacientů byla tato čísla 0,2 roku pro PFS a 0,3 roku pro OS. Důležitým faktem však bylo, že 67 % pacientů, kteří zemřeli po absolvované transplantaci, zemřelo na jiné příčiny než je progresu AML. Jednou z možných cest k dalšímu zlepšení přežití velmi rizikových pacientů s AML by mohlo být zaměření se na zdravotní problémy nesouvisející přímo s progresí základního maligního onemocnění.

### **5.3 Příspěvek III**

**Citace příspěvku:** DVORAK, P., PESTA, M. and SOUCEK, P., 2017, ABC gene expression profiles have clinical importance and possibly form a new hallmark of cancer. *Tumor Biology*. 2017. Vol. 39, no. 5, p. 101042831769980. DOI 10.1177/1010428317699800. SAGE Publications

**Indexováno v** MEDLINE/PubMed a Scopus

Ačkoliv se spektrum možností pro léčbu určitých typů zhoubných nádorů velmi rozšířilo, léčebné režimy většiny nádorů jsou stále založeny na chirurgické léčbě a použití cytotoxických protinádorových léčiv nebo ionizujícího záření. Celosvětovým problémem při používání chemoterapie založené na cytotoxických léčivech je častý vznik rezistence, což výrazně snižuje léčebný účinek. Zvýšená aktivita ATP-binding cassette (ABC) proteinů, které mimo jiné zajišťují detoxikaci vnitrobuněčného prostředí přenosem velkého spektra látek mimo buňku, je jedním ze známých mechanismů vzniku nádorové rezistence.

Omezený počet prací se dosud zabýval genovým expresním profilem založeným na měření exprese všech 49 lidských ABC genů (včetně pseudogenu *ABCC13*) u vybraných typů zhoubných nádorů. Vztah k etablovaným klinicko-patologickým znakům byl vyhodnocován především vzhledem ke změnám v expresi jednotlivých ABC genů. Hlavním cílem prezentovaného článku bylo ověřit naši hypotézu o existenci ABC expresních profilů společných více typům zhoubných nádorů. Tyto obecné ABC expresní profily by dle naší hypotézy mohly být novým atributem karcinogeneze a významně korelovat s některými ze známých prognostických či prediktivních faktorů.

Naše sjednocená nádorová databáze expresních genových dat byla založena na třech samostatných souborech pacientů se třemi různými typy nádorů – nádory prsu, kolorekta a pankreatu. Hodnoty genové exprese 49 ABC genů byly ze 151 tkáňových vzorků získány shodným způsobem ve všech případech. Stanovení míry upregulace či downregulace bylo vztaženo k mediánu naměřených Ct hodnot nezávisle na hodnotách referenčních genů.

Předmětem dalšího studia bylo vyhodnocení a vizualizace výsledků bioinformatické analýzy expresních dat založené na hierarchickém klastrování Wardovou metodou.

Prezentovaná práce přinesla poprvé výsledky podporující hypotézu, že lze nalézt vzory exprese ABC genů (ABC expresní profily) společné pro různé typy zhoubných nádorů. Práce vycházela z předchozích vlastních výsledků sledování ABC expresních profilů u jednotlivých typů nádorů a také z publikovaných studií hodnotících ABC profily v různých tkáních včetně populací kmenových buněk. Na začátku diskuze k výsledkům příspěvku byl podán přehled publikovaných ABC expresních profilů (založených na hodnocení všech popsanych ABC genů) vytvářejících charakteristiku určitých typů nádorů (v porovnání s expresními profily u příslušné nenádorové tkáně) nebo s prokazovaným klinickým významem.

Pro zachování informací specifických pro jednotlivé typy nádorů byl použitý postup klastrování dat aplikován nejprve na samostatné soubory jednotlivých typů nádorů a až poté na sjednocenou databázi. Byly odhaleny charakteristické ABC expresní profily obsahující vzorky od všech tří sledovaných typů nádorů (obecné profily) a tím podporující naši hypotézu. Dále byla sledována korelace takto vymezených obecných ABC profilů s klinicko-patologickými znaky dostupnými pro všechny analyzované vzorky. Jednalo se o údaje o pohlaví, věku, rozsahu postižení regionálních lymfatických uzlin (pN status), rozsahu nádoru (pT status), histologickém stupni diferenciaci, tzv. grade, a klinickém stadiu, tzv. stage. Nově byl spočítán tzv. faktor relativního rizika relapsu onemocnění. Následně byla provedena funkční *in silico* analýza popisovaných obecných ABC profilů.

U některých definovaných obecných ABC profilů byly nalezeny statisticky významné vztahy k rozsahu postižení regionálních lymfatických uzlin, rozsahu nádoru, histologickému stupni diferenciaci a klinickému stadiu. Co se týče funkční charakteristiky těchto obecných ABC profilů, množství silně pozmeněných funkcí v jednotlivých profilech bylo značné a vytyčení několika charakteristicky změněných funkcí nebylo možné. Bylo provedeno vyhodnocení četnosti ABC genů mezi nejvíce up- a down-regulovanými geny v rámci obecných profilů. Geny *ABCC7*, *ABCA3*, *ABCA8*, *ABCA12* a *ABCC8* se v této statistice vyskytovaly s nejvyšší četností a lze usuzovat, že na poli procesů ovlivňovaných ABC geny v nádorových buňkách hrají klíčovou roli. Velmi zajímavý je výskyt genu *ABCC7* na prvním místě. Gen *ABCC7*, s oficiálně doporučenou zkratkou *CFTR*, je transmembránový

přenašeč spojený především s transportem chloridových iontů mimo buňku a je všeobecně známa jeho kauzální role při vzniku cystické fibrózy. Několik současných prací však již naznačilo i jeho klíčovou úlohu při patogenezi některých typů zhoubných nádorů, především gastrointestinálního traktu.

V práci bylo naznačeno, že tyto obecné expresní profily ABC genů by mohly vytvářet nový charakteristický rys kancerogeneze. Hlavní limitací předkládané práce byl menší počet hodnocených pacientů a typů nádorů, proto bude potřeba výsledky současné práce dále ověřit na větších a z pohledu typů nádorů různorodějších souborech.

## 5.4 Příspěvek IV

**Citace příspěvku:** DVORAK, P., HLAVAC, V., MOHELNIKOVA-DUCHONOVA, B., LISKA, V., PESTA, M. and SOUCEK, P., 2017, Downregulation of ABC Transporters in Non-neoplastic Tissues Confers Better Prognosis for Pancreatic and Colorectal Cancer Patients. *Journal of Cancer*. 2017. Vol. 8, no. 11, p. 1959-1971. DOI 10.7150/jca.19364. Ivyspring International Publisher

**Impakt faktor časopisu:** IF(2018) 3.182

Tato práce přímo navazuje na naši studii mapující expresní profily lidských ABC genů u nádorových vzorků ze tří typů nádorů publikovanou v roce 2017 v časopise *Tumor Biology*. Východiskem práce je evidence o tom, že genetické změny v nádorových buňkách a interakce buněk v rámci nádorového mikroprostředí jsou stejnou měrou zásadní pro progresi nádoru jako celku. Práce měla z cíl ověřit naši hypotézu, že také expresní profily ABC genů v nenádorových buňkách, nacházejících se v okolí nádorových struktur, mohou ovlivňovat rozvoj nádorů a korelovat se známými klinicko-patologickými znaky prediktivního či prognostického významu.

Expresce lidských ABC genů byla měřena z nenádorové kontrolní tkáně odebírané párově k nádorové tkáni během chirurgické léčby. Jednalo se o vzorky ze dvou studií prováděných na pacientech s kolorektálním karcinomem (Colorectal I a II), jedné studii u nádorů pankreatu a jedné studii u nádoru prsu. Studie Colorectal I zahrnovala heterogenní skupinu 51 pacientů patologických stadií II, III a IV, zatímco Colorectal II obsahovala homogennější skupinu 60

pacientů pouze stadia II bez postižení uzlin a vzdálených metastáz. U všech pacientů byly k dispozici klinická data a data o v současné praxi stanovovaných prediktivních a prognostických markerech. Komentovaná práce se s využitím bioinformatických nástrojů a metod pro analýzu expresních dat snažila ověřit naši počáteční hypotézu.

Expresní data všech studovaných skupin vzorků klastrovala do tří základních klastrů, a to klastru s většinou ABC genů upregulovaných, většinou genů downregulovaných a do třetího

klastru s heterogenně deregulovanými ABC geny. U skupiny Colorectal I vykazoval klastr s většinou ABC genů downregulovaných statisticky signifikantně méně pacientů se vzdálenými metastázami v porovnání s ostatními dvěma základními klastry. U skupiny Colorectal II bylo v klastru charakterizovaném downregulací ABC genů významně méně pacientů, u kterých byla zahájena onkologická léčba (onkologická léčba byla zahajována u více rizikových pacientů). Ve skupině dat od pacientů s karcinomem pankreatu měl klastr s downregulovanými geny statisticky významně nejlepší křivku přežití (overall survival, OS). Žádná statisticky významná korelace mezi základními klastry a klinickopatologickými znaky nebyla prokázána u dat pacientů s nádory prsu.

Protože hodnocení exprese všech lidských ABC genů by stále bylo v rutinní praxi obtížným a finančně náročným procesem, provedli jsme zúžení počtu sledovaných ABC genů tak, aby byly nalezené statisticky významné vztahy zachovány. Výsledkem bylo navržení dvou panelů obsahujících 10 resp. 5 ABC genů jako prognostických markerů u kolorektálního karcinomu resp. karcinomu pankreatu. Tento zajímavý výsledek bioinformatického vyhodnocení našich prvotních studií s menším počtem nasbíraných vzorků by měl být dále ověřen na rozsáhlejších souborech pacientů s různými typy nádorů.

## 5.5 Příspěvek V

**Citace příspěvku:** SEBOROVA, K., VACLAVIKOVA, R., SOUCEK, P., ELSNEROVA, K., BARTAKOVA, A., CERNAJ, P., BOUDA, J., ROB, L., HRUDA, M. and **DVORAK, P.**, 2019, Association of ABC gene profiles with time to progression and resistance in ovarian cancer revealed by bioinformatics analyses. *Cancer Medicine*. 2019. Vol. 8, no. 2, p. 606-616. DOI 10.1002/cam4.1964. Wiley

**Impakt faktor časopisu:** IF(2018) 3.357

Nádory ovarií tvoří heterogenní onemocnění a u žen jsou jednou z nejčastějších příčin úmrtí na nádorové onemocnění. Mezi rizikové faktory tohoto onemocnění patří dědičná dispozice, věk včetně vyššího věku při prvním těhotenství, obezita, hormonální terapie či kouření. Naopak faktory snižující riziko vzniku nádoru ovaria jsou těhotenství, kojení a orální antikoncepce. Epiteliální tumory tvoří nejčastější typ nádorů ovaria, dalšími méně častými typy jsou nádory z germinálních buněk a nádory z buněk stromatu a zárodečných pruhů.

Chirurgická léčba následovaná chemoterapií může být v dnešní době doplňována cílenými léčebnými režimy. Jde o léčiva nazývaná jako inhibitory angiogeneze nebo PARP inhibitory v případě pozitivity na mutace v genech *BRCA1* či *BRCA2*. Vznik rezistence na chemoterapii však stále zůstává nejzávažnější léčebnou komplikací. ABC transportní proteiny jsou spojovány s jednou z hlavních příčin vzniku rezistence – zvýšeným vylučováním léčiv z cytosolu nádorových buněk. Tato práce navázala na naše předchozí studie mapující význam expresních profilů ABC transportních genů u různých typů nádorů i nenádorové okolní tkáně. Jedním z výstupů těchto studií byl cíl ověřit prognostický či prediktivní potenciál ABC profilů u dalších typů nádorů.

V našem článku jsou popisovány bioinformatické analýzy expresních dat panelu 39 ABC genů u dvou skupin pacientů s nádory ovaria. První skupinu tvořilo 60 pacientů s primárními nádory určenými blíže jako typ epiteliální. Druhá skupina zahrnovala vzorky peritoneálních metastáz u 29 pacientů. Expresní data byla nezávisle normalizována dvěma různými způsoby, klastrována a statisticky vyhodnocována, výsledky obou přístupů byly následně



porovnávány. V prvním případě se jednalo o normalizaci vzhledem k hodnotám exprese setu referenčních genů, v druhém případě o normalizaci na medián Ct hodnot jednotlivých vyšetřovaných genů. Expresní data pak byla vztahována k dostupným klinickopatologickým ukazatelům. Výsledky získané na podkladě těchto dvou postupů se v některých údajích shodovaly a v jiných odlišovaly. Jako nejvíce relevantní byly pak přijaty výsledky, které se shodovaly u obou přístupů.

Naše výsledky ověřily publikované vztahy dvou dobře prostudovaných ABC genů – ABCB1 a ABCG2 – ke klinickým faktorům prognostického a prediktivního charakteru u pacientů s nádory ovarií. Upregulace těchto genů byla spojena s horší senzitivitou na chemoterapii a kratším časem do progresu onemocnění. Navíc jsme prokázali podobné vztahy i pro další ABC geny. Downregulace genu ABCB1 také korelovala s horší senzitivitou na chemoterapii a kratším časem do progresu onemocnění. Naopak downregulace genů *ABCC4*, *ABCC10*, *ABCD3*, *ABCE1*, *ABCF1*, *ABCF2* a *ABCF3* korelovala s lepší senzitivitou na chemoterapii a delším časem do progresu onemocnění. Studie jednoznačně poukázala na společný vztah série ABC proteinů, u kterých je známa funkce v transportu léčiv, a ABC proteinů, u kterých evidenci o jejich transportní funkci nemáme, ke klinicko-patologickým charakteristikám nádoru ovaria. Pochopení vzájemně provázaných vztahů mezi ABC proteiny může v budoucnu pomoci překonat obtíže při hledání účinných inhibitorů pro klinickou praxi.

## 5.6 Příspěvek VI

**Citace příspěvku:** LEMSTROVA, R., BRYNYCHOVA, V., HUGHES, D., HLAVAC, V., DVORAK, P., DOHERTY, J., MURRAY, H., CROCKARD, M., OLIVERIUS, M., HLAVSA, J., HONSOVA, E., MAZANEC, J., KALA, Z., LOVECEK, M., HAVLIK, R., EHRMANN, J., STROUHAL, O., SOUCEK, P., MELICHAR, B. and MOHELNIKOVA-DUCHONOVA, B., 2017, Dysregulation of KRAS signaling in pancreatic cancer is not associated with KRAS mutations and outcome. *Oncology Letters*. 2017. DOI 10.3892/ol.2017.6946. Spandidos Publications

**Impakt faktor časopisu:** IF(2018) 1.871

Duktální adenokarcinom pankreatu je jedním z nejvíce problematických nádorů současné

západní populace a i přes určité pokroky v jeho léčbě zůstává prognóza pacientů s tímto typem nádoru extrémně špatná. Současné možnosti cílené terapie úspěšně se uplatňující u některých jiných typů nádorů jsou u nádoru pankreatu velmi omezené. Jedinou kurativní léčebnou metodou může být chirurgické odstranění tumoru, po radikální operaci je doporučena adjuvantní chemoterapie. Chemoterapie tvoří také hlavní složku paliativního léčebného přístupu. Vysoký stupeň rezistence na chemoterapeutickou léčbu je u nádorů pankreatu způsoben kombinací několika mechanismů, kde ústřední roli hraje i vyloučení léčiva z nádorových buněk ABC transportními proteiny.

Výskyt mutací v genu *KRAS* je u pacientů s nádorem pankreatu popisován v 75 až 90 % případů a jde tedy o nejčastější a nejhranější genetickou změnu. Mutace v *KRAS* obvykle způsobují trvalou aktivaci produkovaného proteinu s GTPázovou funkcí. Tím dochází také k aktivaci celé řady signálních drah na tuto GTPázu navázaných.

Hlavním cílem komentované studie bylo zhodnotit prognostický význam exprese genů účastnících se signálních drah aktivovaných *KRAS* GTPázou a jeho asociaci s klinickými údaji u pacientů s resektabilními nádory pankreatu. Exprese 52 genů byla stanovována metodou qRT-PCR u 45 vzorků z odebraného nádoru a kontrolní nenádorové tkáně.

U 80 % našich pacientů byla prokázána mutace v KRAS genu. Geny čtyř signálních drah navazujících na KRAS vykazovali rozdílnou expresi mezi nádorovými a párovými nenádorovými vzorky. Rozdíl v expresi genů však nebyl zaznamenán mezi skupinami KRAS mutovaných a nemutovaných pacientů. Také signifikantní vztah ke klinickým charakteristikám či prognóze nebyl nalezen u žádného z genů, s výjimkou genu RAF1. Naše závěry mohou částečně vysvětlovat slabý účinek dosud zkoušených cílených KRAS inhibitorů u nádoru pankreatu.

## 5.7 Příspěvek VII

**Citace příspěvku:** OLIVERIUS, M., FLASAROVA, D., MOHELNIKOVA-DUCHONOVA, B., EHRLICHOVA, M., HLAVAC, V., KOCIK, M., STROUHAL, O., DVORAK, P., OJIMA, I. and SOUCEK, P., 2019, KRAS pathway expression changes in pancreatic cancer models by conventional and experimental taxanes. *Mutagenesis*. 2019. DOI 10.1093/mutage/gez021. Oxford University Press (OUP). in press

**Impakt faktor časopisu:** IF(2018) 2.898

Ačkoliv pankreatický duktální adenokarcinom (PDAC) je jedním z méně častých nádorových onemocnění (s celosvětovou incidencí na 12. místě), z pohledu mortality se jedná o čtvrtou nejčastější příčinu úmrtí v této kategorii onemocnění. Systémovou chemoterapii je dnes léčeno přes 80 % pacientů s PDAC, ale úspěšnost léčby je velmi malá. Ani na poli cílené protinádorové léčby se u tohoto typu nádoru zatím nepodařilo najít účinnější látky. Popsaná situace vyústí v celou řadu experimentálních i klinických studií hledajících nové možnosti léčby cílené na PDAC. V poslední době přinesla nadějně zlepšení přežití pacientů kombinace taxanu nab-paclitaxelu a gemcitabinu současně s dalším chemoterapeutickým režimem, např. leucovorinem nebo 5-fluorouracilem, označovaná jako FOLFIRINOX.

Je známo, že na molekulární úrovni je u PDAC klíčová deregulace KRAS signální dráhy. Naše práce se zaměřila na studium interakcí mezi konvenčním paclitaxelem a experimentálním taxanem SB-T-1216 a expresí genů KRAS signální dráhy u *in vitro* i *in vivo* modelů PDAC. Snažili jsme se najít případné biomarkery či cíle pro možnou budoucí cílenou terapii.

Pro *in vivo* studium změn v hladině transkriptů a proteinů KRAS signální dráhy po léčbě experimentálním taxanem SB-T-1216 byl použit myší xenogenní model PDAC s lidskou buněčnou linií PaCa-44. Současně byl vliv paclitaxelu na KRAS signální dráhu testován s využitím tří buněčných linií BxPc-3, MiaPaCa-2 a PaCa-44. Vzhledem k tomu, že linie BxPc-3 je charakterizována wild-type KRAS statusem zatímco linie MiaPaCa-2 a PaCa-44

mutovaným KRAS statusem, bylo možné hodnotit také vliv KRAS statusu na danou problematiku.

Na základě informací obsažených v databázích KEGG a BioCarta bylo pro testování v naší studii vybráno 42 genů souvisejících s KRAS signální drahou. Ke stanovení hladiny transkriptů těchto genů byla využita metoda kvantitativní real-time PCR (qRT-PCR). Hladina klíčových proteinů KRAS dráhy pak byla stanovována s využitím metody Western blot. Při statistickém zpracování dat byl využit statistický program SPSS, pro hierarchické klastrování pak volně dostupné bioinformatické programy Heatmapper a Shinyheatmap.

V rámci komparace naměřených expresních profilů bylo v naší studii zjištěno, že často používané *in vitro* buněčné modely se liší v základním transkripčním profilu KRAS signální dráhy. Nebyl však pozorován žádný rozdíl v senzitivitě na podávané taxany mezi liniemi s KRAS wild-type a mutovaným statusem. Obecně bylo možné konstatovat, že léčba taxany způsobila downregulaci KRAS signální dráhy jak u *in vitro*, tak u *in vivo* modelů PDAC, ale tato reakce byla nezávislá na KRAS mutačním statusu. V naší studii se nepodařilo najít případné biomarkery či cíle pro cílenou terapii PDAC s využitím taxanů mezi geny KRAS signální dráhy a bude nutné se zaměřit i na jiné mechanismy deregulované u tohoto nádorového onemocnění.

## 5.8 Příspěvek VIII

**Citace příspěvku:** DVORAK, P., LEUPEN, S. and SOUCEK, P., 2019, Functionally Significant Features in the 5' Untranslated Region of the ABCA1 Gene and Their Comparison in Vertebrates. *Cells*. 2019. Vol. 8, no. 6, p. 623. DOI 10.3390/cells8060623. MDPI AG

**Impakt faktor časopisu:** IF(2018) 5.656

Enormní nárůst dat generovaný novými metodami sekvenování genomů vyvíjí tlak na efektivní třídění relevantnosti získaných informací. Nalezení funkčně významných úseků v nekódujících oblastech genů napomáhá tomuto procesu třídění. 5' netranslatované oblasti genů (5'UTRs) předcházejí protein kódujícím oblastem v primární struktuře eukaryotních genů. Hlavní funkce těchto oblastí je spatřována v regulaci zahájení translace a tím v

regulaci finálního množství produkované bílkoviny. Množství různých struktur nebo motivů v těchto oblastech ovlivňuje efektivitu nasednutí translačního aparátu na příslušné molekuly mRNA. Jedná se o sekundární či terciární RNA struktury jako např. *pseudoknots*, *hairpins* a *G-quadruplexy*, předčasné start a stop kodony (*upstream start/stop codons*), předčasné otevřené čtecí rámce (*upstream open reading frames*, uORFs), vazebná místa pro RNA vázající proteiny nebo Kozak sekvence v bezprostředním sousedství startovacího kodonu hlavního čtecího rámce. Význam studia těchto oblastí podtrhuje existence lidských chorob způsobených mutacemi v nekódujících místech genů.

Nalezení funkčně významných sekvencí v 5'UTR oblasti genu *ABCA1* bylo cílem komentované práce. Lidský gen *ABCA1* kóduje 247 kDa veliký transmembránový protein s transportní funkcí hrající důležitou úlohu při biosyntéze lipoproteinů o vysoké hustotě (HDL) a buněčné rovnováze cholesterolu. V lidských buňkách je gen *ABCA1* široce exprimován s nejvyšší mírou u makrofágů, hepatocytů a enterocytů. Vrozené mutace v tomto genu vyúsťují v Tangiérův syndrom projevující se hlavně nízkými hladinami HDL v plasmě, depozicí cholesterolu v tkáňových makrofázích a častějším vznikem aterosklerózy. Získané mutace byly popsány u nádorových onemocnění.

V naší studii byl navržen následující algoritmus vyhledávání funkčně významných DNA sekvencí. 1) shromáždění DNA sekvencí zástupců různých skupin obratlovců, 2) analýzy vyhledávající shodná místa v souboru DNA sekvencí (alignment analyses), 3) predikce předčasných start a stop kodonů a možných předčasných otevřených čtecích rámců, 4) analýza obsahu bází G a C a známých funkčních motivů, 5) predikce nejpravděpodobnější sekundární struktury a 6) propojení všech získaných relevantních informací. Vstupními daty v naší studii byly sekvence lidského *ABCA1* genu a sekvence ortologních genů od 55 dalších zástupců obratlovců.

S využitím volně dostupných bioinformatických nástrojů byly vytipovány nejvíce evolučně konzervované jevy u jednotlivých sledovaných charakteristik. Mezi faktory zřejmě nejvíce ovlivňující zahájení translace u *ABCA1* genu lze jmenovat exonové a intronové enhancery a silencery - sc35, ighg2 cgamma2, ctnt, gh-1 a fibronectin eda exon, transkripční faktory - TFIIA, NFAT1, NFAT4 a HOXA13, vazebné místo pro mikroRNA hsa-miR-4474-3p a v neposlední řadě nově popsaný předčasný otevřený čtecí rámec. Tento čtecí rámec se překrývá s hlavním čtecím rámcem u primátů a dle predikcí může kódovat bioaktivní malý peptid.

Kromě uvedených závěrů, které mohou najít své uplatnění i v klinické praxi při hodnocení nalezených odchylek u vyšetřovaných pacientů, jsme se v článku snažily celou problematiku zasadit i do obecného evolučně-biologického pohledu na vývoj genů, kde je ještě plno nezodpovězených otázek.

## **6 Shrnutí výsledků a cílů práce**

V rámci předkládaného výzkumu se sjednocujícím tématem ABC transportních proteinů a jejich vztahu ke vzniku rezistence na chemoterapeutickou léčbu pro nádorová onemocnění se podařilo publikovat 8 prací v renomovaných zahraničních periodikách. Autor habilitační práce se na těchto příspěvcích podílel jako první či korespondenční autor v 6 případech a jako spoluautor ve 2 případech. Autor se na tomto výzkumu podílel jak v rámci laboratorního zpracování vzorků, tak analýzy získaných dat. Mezi hlavní přínosy autorovi vlastní práce patří zásadní rozšíření bioinformatického hodnocení molekulárně biologických dat a zavedení nových bioinformatických postupů a metod, které dosud na pracovištích autora nebyly využívány.

- I. První příspěvek** přinesl shrnutí problematiky kontrolovaného přerušování léčby s TKI u chronické myeloidní leukemie z pohledu laboratorní a klinické praxe. TKI

představují úspěšnou léčebnou strategii u mnoha typů nádorů. Protože patří mezi substráty transportované ABC proteiny ven z buněk, může být vyšší aktivita ABC přenašečů zodpovědná za vznik rezistence na tento typ léčiv. TKI několika generací standardně používané k léčbě CML účinně blokují konstitutivně aktivovaný fúzní protein BCR-ABL1 a jeho onkogenní funkce. Mezinárodní doporučení pro léčbu CML shodně doporučují, aby pacienti optimálně reagující na primární léčbu TKI v léčbě bez přestání pokračovali se standardním dávkováním stále dál. Přesto v klinické praxi existují situace, kdy k přerušení léčby TKI dochází. Ať už se jedná o případy vzniku sekundární rezistence nebo netolerovatelné toxické vedlejší účinky TKI léčby, nebo o neochotu nemocného plně spolupracovat při léčbě (compliance), těhotenství či subjektivní přání pacienta. Klinické studie zabývající se kontrolovaným vysazením léčby TKI u pacientů s definovanou hlubokou molekulární odpovědí již v posledních letech probíhají a jsou publikovány první spíše nadějně výsledky. Otázkou však stále zůstává, zda přerušení TKI léčby nemůže zvýšit výskyt případů rezistence na tuto léčbu. Případná proliferace zbylých nádorových buněk by zvýšila jejich heterogenitu. Důležitým cílem pro další výzkum je nalezení prediktivního faktoru spojeného s rychlejší rekurencí onemocnění po kontrolovaném vysazení TKI léčby, který zatím nebyl jednoznačně definován.



**II. Druhý příspěvek** představil výsledky retrospektivní studie 376 pacientů s AML. Ve studii byla zpracována podrobná cytogenetická charakteristika skupiny pacientů s velmi nepříznivou prognózou a předpokládanou rezistencí na podávanou chemoterapii. Jednalo se o pacienty, kteří ani po dvou chemoterapeutických pokusech o dosažení remise onemocnění nedosáhli kompletní cytogenetické remise. Zajímavé bylo pozorování, že u několika pacientů došlo po chemoterapeutické léčbě k vymizení klonální evolucí odvozenějších subklonů (s vyšším počtem cytogenetických změn), zatímco méně odvozené klony dále proliferovaly a vykazovaly vyšší stupeň rezistence. I pro pacienty s takto nepříznivou prognózou bylo demonstrováno, že allogenní transplantace kostní dřeně představuje kurativní léčbu. Důležitým faktem však také bylo, že 67 % pacientů, kteří zemřeli po absolvované transplantaci kostní dřeně, zemřeli na jiné příčiny než je progresse AML. Jednou z možných cest k dalšímu zlepšení přežití vysoce rizikových pacientů s AML by mohlo být zaměření se na zdravotní problémy nesouvisející přímo s progresí základního maligního onemocnění.

**III. Třetí příspěvek** popisoval práci studující vzory exprese (expresní profily) lidských ABC genů u nádorů prsu, kolorekta a pankreatu. Poprvé byly publikovány výsledky podporující hypotézu, že lze nalézt expresní profily ABC genů společné pro různé typy zhoubných nádorů. Podkladem těchto výsledků byly bioinformatické analýzy dat o měření hladiny exprese ABC genů u vzorků nádorových tkání odebraných při chirurgické léčbě. U některých definovaných obecných ABC expresních profilů byly nalezeny statisticky významné vztahy k rozsahu postižení regionálních lymfatických uzlin, rozsahu nádoru, histologickému stupni diferenciaci a klinickému stadiu. Tyto výsledky by mohly souviset se známými, ale i dosud neznámými funkcemi ABC proteinů. V další části práce byla provedena analýza nejčastěji deregulovaných ABC genů v měřených vzorcích. Jednalo se o geny *ABCC7*, *ABCA3*, *ABCA8*, *ABCA12* a *ABCC8*, které byly vyzdvíženy jako geny pravděpodobně hrající klíčové role na poli procesů ovlivňovaných ABC geny v nádorových buňkách. Velmi zajímavý je výskyt genu *ABCC7* (*CFTR*) v tomto seznamu na prvním místě. V práci bylo naznačeno, že tyto obecné expresní profily ABC genů by mohly vytvářet nový rys charakteristický pro kancerogenezi.

**IV. Čtvrtý příspěvek** přímo navazoval na práci a výsledky popisované ve třetím příspěvku. Dle prací publikovaných v poslední době je zřejmé, že genetické změny v nádorových buňkách a interakce buněk v rámci nádorového mikroprostředí jsou stejnou měrou zásadní pro progresi nádoru jako celku. Naše práce si kladla za cíl ověřit hypotézu, že také expresní profily ABC genů v nenádorových buňkách, nacházejících se v okolí nádorových struktur, mohou ovlivňovat rozvoj nádorů a korelovat se známými klinicko-patologickými znaky prediktivního či prognostického významu. Expresní data všech studovaných skupin vzorků klastrovala do tří základních klastrů, a to klastru s většinou ABC genů upregulovaných, většinou genů downregulovaných a do třetího klastru s heterogenně deregulovanými ABC geny. U pacientů s nádory kolorekta vykazoval klastr s většinou ABC genů downregulovaných statisticky významně méně pacientů se vzdálenými metastázami a méně pacientů, u kterých byla zahájena onkologická léčba (onkologická léčba byla zahajována u více rizikových pacientů). Ve skupině dat od pacientů s karcinomem pankreatu měl klastr s downregulovanými ABC geny statisticky významně nejlepší křivku přežití (overall survival). Žádná statisticky významná korelace mezi základními klastry a klinickopatologickými znaky nebyla prokázána u dat pacientů s nádory prsu. Protože hodnocení exprese všech lidských ABC genů by stále bylo v rutinní praxi obtížným a finančně náročným procesem, provedli jsme zúžení počtu sledovaných ABC genů tak, aby byly nalezené statisticky významné vztahy zachovány. Výsledkem bylo navržení dvou panelů obsahujících 10 resp. 5 ABC genů jako prognostických markerů u kolorektálního karcinomu resp. karcinomu pankreatu. Tyto zajímavé výsledky bioinformatického vyhodnocení našich dat lze považovat za argumenty ve prospěch testované hypotézy. Mezi limity práce patří menší počet hodnocených vzorků, a proto by mělo následovat ověření na rozsáhlejších souborech pacientů s různými typy nádorů.

**V. Pátý příspěvek**, pokračující v tématu předchozích dvou prací, si kladl za cíl ověřit prediktivní či prognostický potenciál expresních profilů ABC genů u nádorů ovaria. V článku jsou popisovány bioinformatické analýzy expresních dat panelu 39 ABC genů u dvou skupin pacientů s nádory ovaria (60 pacientů s primárními nádory a 29 pacientů s peritoneálními metastázami). Expresní data byla nezávisle normalizována dvěma různými způsoby, klastrována a statisticky vyhodnocována, výsledky obou

přístupů pak byly porovnávány. Výsledky získané na podkladě těchto dvou postupů se v některých údajích shodovaly a v jiných odlišovaly. Jako nejvíce relevantní byly přijaty výsledky, které se shodovaly u obou přístupů. Naše výsledky ověřily publikované vztahy dvou dobře prostudovaných ABC genů – ABCB1 a ABCG2 – ke klinickým faktorům prognostického a prediktivního charakteru u pacientů s nádory ovarií. Upregulace těchto genů byla spojena s horší senzitivitou na chemoterapii a kratším časem do progresse onemocnění. Navíc jsme prokázali podobné vztahy i pro další ABC geny. Downregulace genu ABCB11 také korelovala s horší senzitivitou na chemoterapii a kratším časem do progresse onemocnění. Naopak downregulace genů *ABCC4*, *ABCC10*, *ABCD3*, *ABCE1*, *ABCF1*, *ABCF2* a *ABCF3* korelovala s lepší senzitivitou na chemoterapii a delším časem do progresse onemocnění. Studie jednoznačně poukázala na společný vztah série ABC proteinů, u kterých je známa funkce v transportu léčiv, a ABC proteinů, u kterých evidenci o jejich transportní funkci nemáme, ke klinicko-patologickým charakteristikám nádoru ovaria. Pochopení vzájemně provázaných vztahů mezi ABC proteiny může v budoucnu pomoci překonat obtíže při hledání účinných inhibitorů pro klinickou praxi.

**VI. Šestý příspěvek** se zaměřil na studium ductálního adenokarcinomu pankreatu. Jedná se o jeden z nejvíce problematických typů nádorů současné západní populace a i přes určité pokroky v jeho léčbě zůstává prognóza pacientů extrémně špatná. Vysoký stupeň rezistence na chemoterapeutickou léčbu je u nádorů pankreatu způsoben kombinací několika mechanismů, kde ústřední roli hraje i vyloučení léčiva z nádorových buněk ABC transportními proteiny. Hlavním cílem popisované studie bylo zhodnotit prognostický význam exprese genů účastnících se signálních drah aktivovaných GTPázou KRAS a jeho asociaci s klinickými údaji u pacientů s resekabilními nádory pankreatu. Exprese 52 genů byla stanovována metodou qRT-PCR u 45 vzorků z odebraného nádoru a kontrolní nenádorové tkáně. Geny čtyř signálních drah navazujících na KRAS vykazovali rozdílnou expresi mezi nádorovými a párovými nenádorovými vzorky. Rozdíl v expresi genů však nebyl zaznamenán mezi skupinami KRAS mutovaných a nemutovaných pacientů. Také signifikantní vztah ke klinickým charakteristikám či prognóze nebyl nalezen u žádného z genů, s výjimkou genu *RAF1*. Naše závěry mohou částečně vysvětlovat slabý účinek dosud zkoušených cílených KRAS inhibitorů u nádoru pankreatu.

**VII. Sedmý příspěvek** navázal na příspěvek šestý v tématice duktálního adenokarcinomu pankreatu. Práce se zaměřila na studium interakcí mezi konvenčním paclitaxelem a experimentálním taxanem SB-T-1216 a expresí genů KRAS signální dráhy u *in vitro* i *in vivo* modelů PDAC. Snažili jsme se najít případné biomarkery či cíle pro možnou budoucí cílenou terapii. Na základě informací obsažených v databázích KEGG a BioCarta bylo pro testování v naší studii vybráno 42 genů souvisejících s KRAS signální drahou. V rámci komparace naměřených expresních profilů bylo v naší studii zjištěno, že často používané *in vitro* buněčné modely se liší v základním transkripčním profilu KRAS signální dráhy. Nebyl však pozorován žádný rozdíl v senzitivě na podávané taxany mezi liniemi s KRAS wild-type a mutovaným statutem. Obecně bylo možné konstatovat, že léčba taxany způsobila downregulaci KRAS signální dráhy jak u *in vitro*, tak u *in vivo* modelů PDAC, ale tato reakce byla nezávislá na KRAS mutačním statusu. V naší studii se nepodařilo najít případné biomarkery či cíle pro cílenou terapii PDAC s využitím taxanů mezi geny KRAS signální dráhy a bude nutné se zaměřit i na jiné mechanismy deregulované u tohoto nádorového onemocnění.

**VIII. Osmý příspěvek** otevřel nový směr našeho výzkumu regulace exprese ABC genů. Enormní nárůst dat generovaný novými metodami sekvenování genomů vyvíjí tlak na efektivní třídění relevantnosti získaných informací. Nalezení funkčně významných úseků v nekódujících oblastech genů napomáhá tomuto procesu třídění. Význam studia těchto oblastí podtrhuje existence lidských chorob způsobených mutacemi v nekódujících místech genů. Nalezení funkčně významných sekvencí v 5'UTR oblasti genu *ABCA1* bylo cílem komentované práce. Na začátku práce byl navržen algoritmus postupu pro vyhledávání funkčně významných DNA sekvencí, který může být univerzálně využit pro hledání funkčních elementů v sekvencích jiných genů. S využitím bioinformatických nástrojů byly následně vytipovány nejvíce evolučně konzervované elementy u jednotlivých skupin faktorů, které mají známý funkční význam pro zahájení translace. Mezi faktory zřejmě nejvíce ovlivňující zahájení translace u *ABCA1* genu lze jmenovat exonové a intronové enhancery a silencery - *sc35*, *ighg2*, *cgamma2*, *cntt*, *gh-1* a *fibronectin* eda exon, transkripční faktory - *TFIIA*, *NFAT1*, *NFAT4* a *HOXA13*, vazebné místo pro mikroRNA *hsa-miR-4474-3p* a v neposlední řadě nově popsany předčasný otevřený čtecí rámeček. Tento čtecí rámeček se

překrývá s hlavním čtecím rámcem u primátů a dle predikcí může kódovat bioaktivní malý peptid. Kromě uvedených závěrů, které mohou najít své uplatnění i v klinické praxi při hodnocení nalezených odchylek u vyšetřovaných pacientů, jsme se v článku snažily celou problematiku zasadit i do obecného evolučně-biologického pohledu na vývoj genů, kde je ještě plno nezodpovězených otázek.

## 7 Závěr

Rodina ABC genů a proteinů patří mezi největší a evolučně nejstarší. Během dlouhého vývoje si zástupci této rodiny osvojili rozmanité spektrum biologických funkcí, které jsou současnou vědou postupně odhalovány. Transportní funkce mnohých ABC proteinů, která byla objevena již na začátku jejich zkoumání, je stále z lékařského pohledu považována za nejdůležitější. Především jejich schopnost rychlého vyčerpání chemoterapeutických léčiv z vnitřku buněk má zásadní důsledky ve formě rezistence buněk na podávanou léčbu. Ačkoliv možnosti terapeutického ovlivnění funkce ABC proteinů jsou již aktivně studovány po mnoho let, výsledků převaditelných do klinické praxe je zatím stále málo. Jedním z důvodů bude velká rozmanitost a složitost vztahů ovlivňujících expresi a funkci těchto proteinů. Primárním cílem předkládané habilitační práce bylo přispět k výzkumu ABC genů a proteinů novými údaji i metodami, které by napomohly v pochopení tohoto složitého systému.

Rezistence nádorových buněk na podávanou chemoterapeutickou léčbu je velkým klinickým úskalím současného boje s nádorovými onemocněními všech typů nádorů. Ačkoliv klasické necílené chemoterapeutické režimy jsou nahrazovány režimy cílenými na konkrétní typy a subtypy nádorů, obecné principy vzniku rezistence platí i pro tyto nová léčiva. Jednou ze snah o řešení tohoto problému je ještě podrobnější charakterizace vlastností nádorových buněk dle jejich genetických predispozic. Tomu napomáhá bouřlivý rozvoj molekulárně genetických technik.

S mohutným nástupem precizních laboratorních technik produkujících enormní množství výsledků bude čím dál důležitější umět vybírat a vyhledávat informace, které mají pro výzkumníky a jiné laboratorní analytiky zásadní význam. K tomuto účelu mohou být vhodně využity postupy bioinformatického vyhodnocování dat. Také mnohé již dříve publikované výsledky mohou být při použití nových bioinformatických nástrojů využity k nalezení nových souvislostí a závěrů. Výše hodnocené práce na téma ABC genů a proteinů a rezistence na chemoterapeutickou léčbu byly koncipovány tak, aby zviditelnily silné stránky a možnosti současné bioinformatiky. Cíle stanovené v úvodu práce byly vesměs splněny a přibylo množství nových otázek, které jsou základem pro další výzkum v této oblasti.

## 8 Literatura

- Aye, I., Singh, A. and Keelan, J. (2009). Transport of lipids by ABC proteins: Interactions and implications for cellular toxicity, viability and function. *Chemico-Biological Interactions*, 180(3), pp.327-339.
- Ambudkar, S., Sauna, Z., Gottesman, M. and Szakacs, G. (2005). A novel way to spread drug resistance in tumor cells: functional intercellular transfer of P-glycoprotein (ABCB1). *Trends in Pharmacological Sciences*, 26(8), pp.385-387.
- Baran, Y., Gür, B., Kaya, P., Ural, A., Avcu, F. and Gündüz, U. (2007). Upregulation of multi drug resistance genes in doxorubicin resistant human acute myelogenous leukemia cells and reversal of the resistance. *Hematology*, 12(6), pp.511-517.
- Barbet, R., Peiffer, I., Hutchins, J., Hatzfeld, A., Garrido, E. and Hatzfeld, J. (2012). Expression of the 49 human ATP binding cassette (ABC) genes in pluripotent embryonic stem cells and in early- and late-stage multipotent mesenchymal stem cells. *Cell Cycle*, 11(8), pp.1611-1620.
- Berger, J., Forss-Petter, S. and Eichler, F. (2014). Pathophysiology of X-linked adrenoleukodystrophy. *Biochimie*, 98, pp.135-142.
- Bleau, A., Hambardzumyan, D., Ozawa, T., Fomchenko, E., Huse, J., Brennan, C. and Holland, E. (2009). PTEN/PI3K/Akt Pathway Regulates the Side Population Phenotype and ABCG2 Activity in Glioma Tumor Stem-like Cells. *Cell Stem Cell*, 4(3), pp.226-235.
- Bowen, S. and Hull, J. (2015). The basic science of cystic fibrosis. *Paediatrics and Child Health*, 25(4), pp.159-164.
- Bustin, S., Benes, V., Garson, J., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M., Shipley, G., Vandesompele, J. and Wittwer, C. (2009). The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry*, 55(4), pp.611-622.
- Carnero, A. and Paramio, J. (2014). The PTEN/PI3K/AKT Pathway in vivo, Cancer Mouse Models. *Frontiers in Oncology*, 4.

- Castella, B., Kopecka, J., Sciancalepore, P., Mandili, G., Foglietta, M., Mitro, N., Caruso, D., Novelli, F., Riganti, C. and Massaia, M. (2017). The ATP-binding cassette transporter A1 regulates phosphoantigen release and V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell activation by dendritic cells. *Nature Communications*, 8(1).
- Chen, Z., Shi, T., Zhang, L., Zhu, P., Deng, M., Huang, C., Hu, T., Jiang, L. and 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), pp.153-164.
- Chipuk, J., Moldoveanu, T., Llambi, F., Parsons, M. and Green, D. (2010). The BCL-2 Family Reunion. *Molecular Cell*, 37(3), pp.299-310.
- Cojoc, M., Mäbert, K., Muders, M. and Dubrovskaja, A. (2015). A role for cancer stem cells in therapy resistance: Cellular and molecular mechanisms. *Seminars in Cancer Biology*, 31, pp.16-27.
- Danielsen, S., Eide, P., Nesbakken, A., Guren, T., Leithe, E. and Lothe, R. (2015). Portrait of the PI3K/AKT pathway in colorectal cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1855(1), pp.104-121.
- Davidson, A., Dassa, E., Orelle, C. and Chen, J. (2008). Structure, Function, and Evolution of Bacterial ATP-Binding Cassette Systems. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 72(2), pp.317-364.
- Dean, M. and Annilo, T. (2005). EVOLUTION OF THE ATP-BINDING CASSETTE (ABC) TRANSPORTER SUPERFAMILY IN VERTEBRATES. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 6(1), pp.123-142.
- Dean, M., Rzhetsky, A. and Allikmets, R. (2001). The Human ATP-Binding Cassette (ABC) Transporter Superfamily. *Genome Research*, 11(7), pp.1156-1166.
- Deng, J., Shao, J., Markowitz, J. and An, G. (2014). ABC Transporters in Multi-Drug Resistance and ADME-Tox of Small Molecule Tyrosine Kinase Inhibitors. *Pharmaceutical Research*, 31(9), pp.2237-2255.



- Di, C. and Zhao, Y. (2014). Multiple drug resistance due to resistance to stem cells and stem cell treatment progress in cancer (Review). *Experimental and Therapeutic Medicine*, 9(2), pp.289-293.
- Dvorak, P., Pesta, M. and Soucek, P. (2017). ABC gene expression profiles have clinical importance and possibly form a new hallmark of cancer. *Tumor Biology*, 39(5), p.101042831769980.
- Elborn, J. (2016). Cystic fibrosis. *The Lancet*, 388(10059), pp.2519-2531.
- Engelen, M., Kemp, S., de Visser, M., van Geel, B., Wanders, R., Aubourg, P. and Poll-The, B. (2012). X-linked adrenoleukodystrophy (X-ALD): clinical presentation and guidelines for diagnosis, follow-up and management. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 7(1), p.51.
- Falasca, M. and Linton, K. (2012). Investigational ABC transporter inhibitors. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 21(5), pp.657-666.
- Gorre, M. (2001). Clinical Resistance to STI-571 Cancer Therapy Caused by BCR-ABL Gene Mutation or Amplification. *Science*, 293(5531), pp.876-880.
- Hemmings, B. and Restuccia, D. (2012). PI3K-PKB/Akt Pathway. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(9), pp.a011189-a011189.
- Holčaková, J., Nekulová, M., Orzol, P. and Vojtěšek, B. (2014). Mechanizmy lékové rezistence a nádorové kmenové buňky. *Klinická onkologie*. 27(Suppl 1), pp. S34-S41. ISSN 0862-495X.
- Holland, I.B., Cole, S.P.C., Kuchler, K., Higgins, C.F. (2003) ABC proteins: from bacteria to man. Academic Press; London, UK.
- Holohan, C., Van Schaeybroeck, S., Longley, D. and Johnston, P. (2013). Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nature Reviews Cancer*, 13(10), pp.714-726.
- Hooper, A., McCormick, S., Hegele, R. and Burnett, J. (2017). Clinical utility gene card for: Tangier disease. *European Journal of Human Genetics*, 25(7), pp.e1-e3.

- Huang, F., Zhang, L., Wu, D., Yuan, X., Chen, F., Zeng, H., Yu, Y. and Zhao, X. (2014). PTEN Regulates BCRP/ABCG2 and the Side Population through the PI3K/Akt Pathway in Chronic Myeloid Leukemia. *PLoS ONE*, 9(3), p.e88298.
- Hurvitz, S. and Pietras, R. (2008). Rational management of endocrine resistance in breast cancer. *Cancer*, 113(9), pp.2385-2397.
- Johnston, S. (2010). New Strategies in Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer. *Clinical Cancer Research*, 16(7), pp.1979-1987.
- Kachalaki, S., Ebrahimi, M., Mohamed Khosroshahi, L., Mohammadinejad, S. and Baradaran, B. (2016). Cancer chemoresistance; biochemical and molecular aspects: a brief overview. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 89, pp.20-30.
- Kathawala, R., Gupta, P., Ashby, C. and Chen, Z. (2015). The modulation of ABC transporter-mediated multidrug resistance in cancer: A review of the past decade. *Drug Resistance Updates*, 18, pp.1-17.
- Kise, K., Kinugasa-Katayama, Y. and Takakura, N. (2016). Tumor microenvironment for cancer stem cells. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 99, pp.197-205.
- Klener, P. jr. and Klener, P. (2013). *Principy systémové protinádorové léčby*. Grada; Praha, CZ. ISBN 9788024741710.
- Křenková, P., Piskáčková, T., Holubová, A., Balaščáková, M., Krulišová, V., Čamajová, J., Turnovec, M., Libík, M., Norambuena, P., Štambergová, A., Dvořáková, L., Skalická, V., Bartošová, J., Kučerová, T., Fila, L., Zemková, D., Vávrová, V., Koudová, M., Macek, M., Krebsová, A. and Macek, M. (2013). Distribution of CFTR mutations in the Czech population: Positive impact of integrated clinical and laboratory expertise, detection of novel/de novo alleles and relevance for related/derived populations. *Journal of Cystic Fibrosis*, 12(5), pp.532-537.
- Kunjachan, S., Rychlik, B., Storm, G., Kiessling, F. and Lammers, T. (2013). Multidrug resistance: Physiological principles and nanomedical solutions. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(13-14), pp.1852-1865.

- Lage, H. (2003). ABC-transporters: implications on drug resistance from microorganisms to human cancers. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 22(3), pp.188-199.
- Li, G., Shi, P. and Wang, Y. (2007). Evolutionary dynamics of the ABCA chromosome 17q24 cluster genes in vertebrates. *Genomics*, 89(3), pp.385-391.
- Lubelski, J., Konings, W. and Driessen, A. (2007). Distribution and Physiology of ABC-Type Transporters Contributing to Multidrug Resistance in Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71(3), pp.463-476.
- Luo, J., Manning, B. and Cantley, L. (2003). Targeting the PI3K-Akt pathway in human cancer. *Cancer Cell*, 4(4), pp.257-262.
- Mackenzie, S., Brooker, M., Gill, T., Cox, G., Howells, A. and Ewart, G. (1999). Mutations in the white gene of *Drosophila melanogaster* affecting ABC transporters that determine eye colouration. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1419(2), pp.173-185.
- Mall, M. and Galiotta, L. (2015). Targeting ion channels in cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis*, 14(5), pp.561-570.
- Mao, Z., Zhou, J., Luan, J., Sheng, W., Shen, X. and Dong, X. (2014). Tamoxifen reduces P-gp-mediated multidrug resistance via inhibiting the PI3K/Akt signaling pathway in ER-negative human gastric cancer cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 68(2), pp.179-183.
- Maranghi, M., Truglio, G., Gallo, A., Grieco, E., Verrienti, A., Montali, A., Gallo, P., Alesini, F., Arca, M. and Lucarelli, M. (2019). A novel splicing mutation in the ABCA1 gene, causing Tangier disease and familial HDL deficiency in a large family. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 508(2), pp.487-493.
- Michalová, K. (1999). *Úvod do lidské cytogenetiky*. Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, Brno, CZ. ISBN 8070132817.
- Moitra, K. (2013). *ABC transporters in human disease*. San Rafael, Calif.: Morgan & Claypool.

- Moser, H., Mahmood, A. and Raymond, G. (2007). X-linked adrenoleukodystrophy. *Nature Clinical Practice Neurology*, 3(3), pp.140-151.
- Oram, J. (2000). Tangier disease and ABCA1. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1529(1-3), pp.321-330.
- Peitzsch, C., Kurth, I., Kunz-Schughart, L., Baumann, M. and Dubrovskaja, A. (2013). Discovery of the cancer stem cell related determinants of radioresistance. *Radiotherapy and Oncology*, 108(3), pp.378-387.
- Piehler, A., Hellum, M., Wenzel, J., Kaminski, E., Haug, K., Kierulf, P. and Kaminski, W. (2008). The human ABC transporter pseudogene family: Evidence for transcription and gene-pseudogene interference. *BMC Genomics*, 9(1), p.165.
- Polgreen, P., Brown, G., Hornick, D., Ahmad, F., London, B., Stoltz, D. and Comellas, A. (2018). CFTR Heterozygotes Are at Increased Risk of Respiratory Infections: A Population-Based Study. *Open Forum Infectious Diseases*, 5(11).
- Reilly, R., Mroz, M., Dempsey, E., Wynne, K., Keely, S., McKone, E., Hiebel, C., Behl, C. and Coppinger, J. (2017). Targeting the PI3K/Akt/mTOR signalling pathway in Cystic Fibrosis. *Scientific Reports*, 7(1).
- Rossari, F., Minutolo, F. and Orciuolo, E. (2018). Past, present, and future of Bcr-Abl inhibitors: from chemical development to clinical efficacy. *Journal of Hematology & Oncology*, 11(1).
- Rowe, S., Miller, S. and Sorscher, E. (2005). Cystic Fibrosis. *New England Journal of Medicine*, 352(19), pp.1992-2001.
- Saini, K., Loi, S., de Azambuja, E., Metzger-Filho, O., Saini, M., Ignatiadis, M., Dancey, J. and Piccart-Gebhart, M. (2013). Targeting the PI3K/AKT/mTOR and Raf/MEK/ERK pathways in the treatment of breast cancer. *Cancer Treatment Reviews*, 39(8), pp.935-946.
- Schaich, M., Soucek, S., Thiede, C., Ehninger, G. and Illmer, T. (2005). MDR1 and MRP1 gene expression are independent predictors for treatment outcome in adult acute myeloid leukaemia. *British Journal of Haematology*, 128(3), pp.324-332.

- Schinkel, A. and Jonker, J. (2012). Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64, pp.138-153.
- Schmittgen, T. and Livak, K. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*, 3(6), pp.1101-1108.
- Schulz, H., Grassmann, F., Kellner, U., Spital, G., Rüther, K., Jägle, H., Hufendiek, K., Rating, P., Huchzermeyer, C., Baier, M., Weber, B. and Stöhr, H. (2017). Mutation Spectrum of the ABCA4 Gene in 335 Stargardt Disease Patients From a Multicenter German Cohort—Impact of Selected Deep Intronic Variants and Common SNPs. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 58(1), p.394.
- Shaked, Y. (2019). The pro-tumorigenic host response to cancer therapies. *Nature Reviews Cancer*, 19(12), pp.667-685.
- Shukla, S., Ohnuma, S. and V. Ambudkar, S. (2011). Improving Cancer Chemotherapy with Modulators of ABC Drug Transporters. *Current Drug Targets*, 12(5), pp.621-630.
- Steiner, B., Rosendahl, J., Witt, H., Teich, N., Keim, V., Schulz, H., Pfützer, R., Lühr, M., Gress, T., Nickel, R., Landt, O., Koudova, M., Macek, M., Farre, A., Casals, T., Desax, M., Gallati, S., Gomez-Lira, M., Audrezet, M., Férec, C., des Georges, M., Claustres, M. and Truninger, K. (2011). Common CFTR haplotypes and susceptibility to chronic pancreatitis and congenital bilateral absence of the vas deferens. *Human Mutation*, 32(8), pp.912-920.
- Tanna, P., Strauss, R., Fujinami, K. and Michaelides, M. (2016). Stargardt disease: clinical features, molecular genetics, animal models and therapeutic options. *British Journal of Ophthalmology*, 101(1), pp.25-30.
- Theodoulou, F. and Kerr, I. (2015). ABC transporter research: going strong 40 years on. *Biochemical Society Transactions*, 43(5), pp.1033-1040.
- Vasiliou, V., Vasiliou, K. and Nebert, D. (2008). Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family. *Human Genomics*, 3(3), pp.281-290.

Weber, C. and Kuo, P. (2012). The tumor microenvironment. *Surgical Oncology*, 21(3), pp.172-177.

Wee, P. and Wang, Z. (2017). Epidermal Growth Factor Receptor Cell Proliferation Signaling Pathways. *Cancers*, 9(12), p.52.

Zhang, J. (2007). Use of arrays to investigate the contribution of ATP-binding cassette transporters to drug resistance in cancer chemotherapy and prediction of chemosensitivity. *Cell Research*, 17(4), pp.311-323.

## 9 Seznam publikací zahrnutých do výsledkové části

1. **DVORAK, P.**, LYSAK, D. and VOKURKA, S., 2015, Discontinuation of tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia patients – worldwide battlefield. *Neoplasma*. 2015. Vol. 62, no. 02, p. 167-171. DOI 10.4149/neo\_2015\_021. AEPress, s.r.o.

IF(2018) 1.771

2. **DVORAK, P.**, LYSAK, D., VOKURKA, S., KARAS, M. and SUBRT, I., 2015, Allogeneic stem cell transplantation can improve outcome of AML patients without complete cytogenetic response after induction and consolidation treatment. *Neoplasma*. 2015. Vol. 62, no. 01, p. 140-145. DOI 10.4149/neo\_2015\_018. AEPress, s.r.o.

IF(2018) 1.771

3. **DVORAK, P.**, PESTA, M. and SOUCEK, P., 2017, ABC gene expression profiles have clinical importance and possibly form a new hallmark of cancer. *Tumor Biology*. 2017. Vol. 39, no. 5, p. 101042831769980. DOI 10.1177/1010428317699800. SAGE Publications
4. **DVORAK, P.**, HLAVAC, V., MOHELNIKOVA-DUCHONOVA, B., LISKA, V., PESTA, M. and SOUCEK, P., 2017, Downregulation of ABC Transporters in Non-neoplastic Tissues Confers Better Prognosis for Pancreatic and Colorectal Cancer Patients. *Journal of Cancer*. 2017. Vol. 8, no. 11, p. 1959-1971. DOI 10.7150/jca.19364. Ivyspring International Publisher

IF(2018) 3.182

5. SEBOROVA, K., VACLAVIKOVA, R., SOUCEK, P., ELSNEROVA, K., BARTAKOVA, A., CERNAJ, P., BOUDA, J., ROB, L., HRUDA, M. and **DVORAK, P.**, 2019, Association of ABC gene profiles with time to progression and resistance in ovarian cancer revealed by bioinformatics analyses. *Cancer Medicine*. 2019. Vol. 8, no. 2, p. 606-616. DOI 10.1002/cam4.1964. Wiley

IF(2018) 3.357

6. LEMSTROVA, R., BRYNYCHOVA, V., HUGHES, D., HLAVAC, V., **DVORAK, P.**, DOHERTY, J., MURRAY, H., CROCKARD, M., OLIVERIUS, M., HLAVSA, J., HONSOVA, E., MAZANEC, J., KALA, Z., LOVECEK, M., HAVLIK, R., EHRMANN, J., STROUHAL, O., SOUCEK, P., MELICHAR, B. and MOHELNIKOVA-DUCHONOVA, B., 2017, Dysregulation of KRAS signaling in pancreatic cancer is not associated with KRAS mutations and outcome. *Oncology Letters*. 2017. DOI 10.3892/ol.2017.6946. Spandidos Publications

IF(2018) 1.871

7. OLIVERIUS, M., FLASAROVA, D., MOHELNIKOVA-DUCHONOVA, B., EHRLICHOVA, M., HLAVAC, V., KOCIK, M., STROUHAL, O., **DVORAK, P.**, OJIMA, I. and SOUCEK, P., 2019, KRAS pathway expression changes in pancreatic cancer models by conventional and experimental taxanes. *Mutagenesis*. 2019. DOI 10.1093/mutage/gez021. Oxford University Press (OUP). in press

IF(2018) 2.898

8. **DVORAK, P.**, LEUPEN, S. and SOUCEK, P., 2019, Functionally Significant Features in the 5' Untranslated Region of the ABCA1 Gene and Their Comparison in Vertebrates. *Cells*. 2019. Vol. 8, no. 6, p. 623. DOI 10.3390/cells8060623. MDPI AG

IF(2018) 5.656



# 10 Seznam dalších publikací autora nezahrnutých do výsledkové části

## Příspěvky v periodikách s IF

1. **DVORAK, P.**, LEUPEN, S. and SOUCEK, P., 2019, Circulating and circular RNAs and the need for rationalization and synthesis of the research spiral. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*. 2019. Vol. 28, no. 6, p. 833-838. DOI 10.17219/acem/94148. Wroclaw Medical University

IF(2018) 1.227

2. **DVORAK, P.**, LYSAK, D., VOHRADSKA, P. and SUBRT, I., 2019, Precise determination of primary cytogenetic abnormalities provides added value for stratification of chronic lymphocytic leukemia patients. *Neoplasma*. 2019. Vol. 66, no. 01, p. 128-139. DOI 10.4149/neo\_2018\_180201n71. AEPRESS, s.r.o.

IF(2018) 1.771

3. PESTA, M., CEDIKOVA, M., **DVORAK, P.**, DVORAKOVA, J., KULDA, V., SRBECKA, K., MULLER, L., BOUCHALOVA, V., KRALICKOVA, M., BABUSKA, V., KUNCOVA, J. and MULLEROVA, D., 2018, Trends in gene expression changes during adipogenesis in human adipose derived mesenchymal stem cells under dichlorodiphenyldichloroethylene exposure. *Molecular & Cellular Toxicology*. 2018. Vol. 14, no. 4, p. 369-379. DOI 10.1007/s13273-018-0041-1. Springer Science and Business Media LLC

IF(2018) 1.830

4. KULDA, V., SVATON, M., MUKENSABL, P., HRDA, K., **DVORAK, P.**, HOUDEK, Z., HOUFKOVA, K., VRZAKOVA, R., BABUSKA, V., PESEK, M. and PESTA, M., 2017, Predictive relevance of miR-34a, miR-224 and miR-342 in patients with advanced squamous cell carcinoma of the lung undergoing palliative

chemotherapy. *Oncology Letters*. 2017. DOI 10.3892/ol.2017.7337. Spandidos Publications

IF(2018) 1.871

5. PARMAR, H. S., HOUDEK, Z., PESTA, M., VACLAVA, C., **DVORAK, P.** and HATINA, J., 2017, Protective Effect of Aspirin Against Oligomeric A $\beta$ 42 Induced Mitochondrial Alterations and Neurotoxicity in Differentiated EC P19 Neuronal Cells. *Current Alzheimer Research*. 2017. Vol. 14, no. 8. DOI 10.2174/1567205014666170203104757. Bentham Science Publishers Ltd.

IF(2018) 3.271

6. MULLEROVA, D., PESTA, M., DVORAKOVA, J., CEDIKOVA, M., KULDA, V., **DVORAK, P.**, BOUCHALOVA, V., KRALICKOVA, M., BABUSKA, V., KUNCOVA, J., LANGMAJEROVA, J. and MULLER, L., 2017, Polychlorinated Biphenyl 153 in Lipid Medium Modulates Differentiation of Human Adipocytes. *PHYSIOLOGICAL RESEARCH*. 2017. Vol. 66, p. 653-662. Institute of Physiology of the Czech Academy of Sciences

IF(2018) 1.701

7. MÜLLEROVÁ, D., PEŠTA, M., ČEDÍKOVÁ, M., DVOŘÁKOVÁ, J., KULDA, V., SRBECKÁ, K., MÜLLER, L., **DVOŘÁK, P.**, KRIPNEROVÁ, M., KRÁLÍČKOVÁ, M., BABUŠKA, V. and KUNCOVÁ, J., 2016, DDE downregulates PLIN2 expression during differentiation of mesenchymal stem cells into adipocytes in lipid-enriched medium. *Journal of Applied Biomedicine*. 2016. Vol. 14, no. 2, p. 113-117. DOI 10.1016/j.jab.2016.01.002. University of South Bohemia in Ceske Budejovice - Faculty of Health and Social Sciences

IF(2018) 1.573

8. HATINA, J., KRIPNEROVÁ, M., TUKOVÁ, J., ŠRÁMEK, J., **DVOŘÁK, P.**, PEŠTA, M., DOBRÁ, J., BABUŠKA, V., RACEK, J., SOBOL, M., PHILIMONENKO, A., HOZÁK, P., CZUBA, Z., SCHULZ, W.A., STRELL, C., GRIMM, S., JENNEK, S. and FRIEDRICH, K.-H., 2015, Tumor-Stroma-

Interaktionen im Harnblasenkarzinom. *Urologe*. 2015. Vol. 54, no. 4, p. 516-525.  
DOI 10.1007/s00120-014-3754-3. Springer Science and Business Media LLC

IF(2018) 0.550

9. **DVORAK, P.**, LYSAK, D., VOKURKA, S., MICHALOVA, K., SAROVA, I., JONASOVA, A., HRUBA, M., RYKOVSKA, A. and SUBRT, I., 2013, The translocation t(2;11)(p21;q23) without MLL gene rearrangement-a possible marker of good prognosis in myelodysplastic syndrome patients. *Hematological Oncology*. 2013. Vol. 32, no. 2, p. 82-86. DOI 10.1002/hon.2089. Wiley

IF(2018) 3.439

10. HRUBA, M., **DVORAK, P.**, WEBEROVA, L. and SUBRT, I., 2012, Independent coexistence of clones with 13q14 deletion at reciprocal translocation breakpoint and 13q14 interstitial deletion in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia & Lymphoma*. 2012. Vol. 53, no. 10, p. 2054-2062. DOI 10.3109/10428194.2012.668682. Informa UK Limited

IF(2018) 2.674

11. VOKURKA, S., KOZA, V., LYSAK, D., KARAS, M., **DVORAK, P.**, JINDRA, P., HRABETOVA, M. and VOZOBULOVA, V., 2010, Successful Peripheral Blood Stem Cells Collection in Imatinib Pretreated and Nilotinib-Treated Chronic Myeloid Leukemia Patient. *Journal of Oncology*. 2010. Vol. 2010, p. 1-3. DOI 10.1155/2010/460859. Hindawi Limited

IF(2018) 2.600

12. **DVORAK, P.**, HRUBA, M. and SUBRT, I., 2009, Development of acute myeloid leukemia associated with Ph-negative clone with inv(3)(q21q26) during imatinib therapy for chronic myeloid leukemia. *Leukemia Research*. 2009. Vol. 33, no. 6, p. 860-861. DOI 10.1016/j.leukres.2008.09.021. Elsevier BV

IF(2018) 2.066

## Příspěvky v recenzovaných periodikách bez IF

1. SVATOŇ, M., KULDA, V., MUKENŠNABL, P., TOPOLČAN, O., PEŠEK, M., **DVOŘÁK, P.**, FIALA, O., ROUŠAROVÁ, M., HRDÁ, K. and PEŠTA, M., 2017, Vliv exprese vybraných protein kódujících genů a mikroRNA na riziko relapsu plicních adenokarcinomů stadia 1. *Studia Pneumologica et Phthiseologica*. 2017. Vol. 77, no. 3, p. 93-103. ISSN 1213-810X. Trios, s.r.o.
2. **DVOŘÁK P.**, VOHRADSKÁ P., VOTAVA T., DOLEŽALOVÁ L., SMÍŠEK P., ČERNÁ Z., ŠUBRT I., 2015, Postavení cytogenetického vyšetření v současném managementu léčby dětské akutní lymfoblastické leukemie. *Onkologie*. 2015. Vol. 9, no. 1, p. 38-42. ISSN 1802-4475. Solen
3. KRIPNEROVÁ, M., **DVOŘÁK, P.**, PEŠTA, M., KUNCOVÁ, J., VLAS, T., LEBA, M., HOLUBEC, L., HATINA, J., 2015, Odvození a charakterizace buněčného modelu multilékové rezistence uroteliálního karcinomu. *Česká urologie*. 2015. Vol. 19, no. 4, p. 281–290. ISSN 2336-5692. Česká lékařská společnost J. E. Purkyně
4. JUNGOVÁ A., HOLUBOVÁ M., VOKURKA S., LYSÁK D., JINDRA P., **DVOŘÁK P.**, 2014, Hodnocení exprese antigenu CD45 u pacientů s mnohočetným myelomem a jeho vliv na dobu do první progresse nebo relapsu. *Transfúze a Hematologie Dnes*. 2014. Vol. 20, no. 2, p. 53-57. ISSN 1213-5763. ČLS JEP
5. **DVOŘÁK P.**, LYSÁK D., VOKURKA S., VOZOBULOVÁ V., 2014, Koncept přerušování biologické léčby tyrozinkinázovými inhibitory u chronické myeloidní leukemie. *Onkologie*. 2014. Vol. 8, no. 3, p. 129-130. ISSN 1802-4475. Solen
6. NEUWIRTOVÁ R., ZEMANOVÁ Z., BŘEZINOVÁ J., BELIČKOVÁ M., **DVOŘÁK P.**, OLTOVÁ A., JONÁŠOVÁ A., ČERMÁK J., ŠPONEROVÁ D., ULLRICHOVÁ J., MAŠKOVÁ Z., ČERVÍNEK L., SMĚLÍKOVÁ Y., VOZOBULOVÁ V., POLONYOVÁ E., SVOBODA M., MICHALOVÁ K., 2014: Jsme oprávněni řadit nemocné s dvěma samostatnými buněčnými klony a to s delecí 5q a s trizomií 8 jako podskupinu myelodysplastického syndromu typu 5q-

syndromu? *Transfuze a Hematologie Dnes*. 2014. Vol. 20, no. 1, p. 25-31. ISSN 1213-5763. ČLS JEP

7. VOKURKA, S., LYSÁK, D., KARAS, M., KOZA, V., **DVOŘÁK, P.**, HRABĚTOVÁ, M., JINDRA, P. and VOZOBULOVÁ, V., 2010, Úspěšný odběr periferních krvetvorných buněk u pacientky s chronickou myeloidní leukémií léčenou nilotinibem. Kazuistika. *Transfuze a Hematologie Dnes*. 2010. Vol. 16, no. 2, p. 101-103. ISSN 1213-5763. ČLS JEP
8. **DVOŘÁK, P.**, 2005, Rok na boarding school v Anglii. Učitel'ské noviny, 34/2005, s. 18-19. ISSN 0139-5718

#### **Příspěvky v monografiích a skriptech**

1. KŘÍŽKOVÁ, V., ŠIGUTOVÁ, P., HOLUBOVÁ, M., ŠTAMBACHOVÁ, A., DOLEJŠOVÁ, M., LYSÁK, D., **DVOŘÁK, P.**, VLAS, T., BUFKA, J., VAŇKOVÁ, L., HRUBÁ, K., NGUYEN, T. H., MARŠÁLOVÁ, L., BOUŘ, P., 2020, Blood and Blood Components, Hematopoiesis, Selected Methods Used in Cytology, Histology and Hematology. in press

# 11 Seznam nejvýznamnějších konferenčních příspěvků

## autora

1. **DVORAK, P.**, HLAVAC, V., MOHELNIKOVA-DUCHONOVA, B., LISKA, V., PESTA, M., SOUCEK, P., 2018, ABC gene expression profiles in non-neoplastic tissues form new prognostic markers for colorectal and pancreatic cancers. In: Abstract Book - ABC2018 - 7th FEBS Special Meeting on ABC Proteins, March 6-March 12, 2018, Innsbruck, Austria, 114 p.
2. **DVOŘÁK, P.**, HLAVÁČ, V., MOHELNÍKOVÁ-DUCHOŇOVÁ, B., LIŠKA, V., PEŠTA, M., SOUČEK, P., 2017, Nízká exprese genů pro ABC transportní proteiny v nenádorové tkáni znamená lepší prognózu u pacientů s nádory pankreatu a kolorekta. In: Sborník abstrakt - 21. celostátní konference DNA diagnostiky, Plzeň, 9.–10. 11. 2017. EUROVERLAG. ISBN 978-80-7177-947-6
3. **DVORAK, P.**, SOUCEK, P., 2016, General network of ABC genes correlations. In: Abstract Book - ABC2016 - 6th FEBS Special Meeting on ABC Proteins, March 5-March 11, 2016, Innsbruck, Austria, 132 p.
4. **DVOŘÁK P.**, VOHRADSKÁ P., VOTAVA T., DOLEŽALOVÁ L., ČERNÁ Z., ŠUBRT I., 2014: Vliv cytogenetických aberací na stanovení prognózy u dětských akutních lymfoblastických leukémií. XXVI. Plzeňské pediatrické dny, 21.-22.3.2014, Plzeň.
5. **DVOŘÁK P.**, HRUBÁ M., VOKURKA S., RYKOVSKÁ A., ŠUBRT I., 2012: Vzácné rekurentní aberace chromosomů u myelodysplastických syndromů. 45. výroční cytogenetická konference s mezinárodní účastí, 13.-14. 9. 2012, Olomouc.
6. **DVORAK P.**, LYSAK D., VOKURKA S., MICHALOVA K., SAROVA I., JONASOVA A., HRUBA M., RYKOVSKA A., SUBRT I., 2013: The t(2;11)(p21;q23) without MLL rearrangement - a possible marker of good prognosis in MDS patients. In: European Journal of Human Genetics, Volume 21, Supplement

2, European Human Genetics Conference 2013 - Abstracts, June 2013, Paris, France, Nature Publishing Group, 678 p.

7. **DVOŘÁK P.**, LYSÁK D., VOKURKA S., MICHALOVÁ K., ŠÁROVÁ I., JONÁŠOVÁ A., HRUBÁ M., RYKOVSKÁ A., ŠUBRT I., 2013: Translokace t(2;11)(p21;q23) bez přestavby MLL genu je pravděpodobně spojena s dobrou prognózou u pacientů s MDS. In: Sborník abstrakt - XXVII. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí, Vydavatelství UP Olomouc, Univerzita Palackého v Olomouci, květen 2013, Olomouc, s. 89. ISBN 978-80-244-3480-3
8. **DVOŘÁK, P.**, HRUBÁ, M., ŠUBRT, I., 2009: Přetrvávající cytogenetické klony po chemoterapeutické léčbě u pacientů s akutní myeloidní leukémií. In: Transfuze a hematologie dnes, Supplementum 1, XXIII. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí – abstrakta, Česká lékařská společnost J. E. Purkyně, červen/2009, s. 78. ISSN 1213-5763
9. **DVOŘÁK, P.**, HRUBÁ, M., ŠUBRT, I., 2008: Vznik AML související s Ph-negativním klonem s inv(3)(q21q26) během terapie imatinibem pro CML – kasuistika a porovnání s publikovanými pracemi. VII. Hradecký den cytogenetiky a molekulární genetiky, 16. 4. 2008, Hradec Králové.
10. **DVOŘÁK, P.**, ŠVECOVÁ, M., 2001: Současný stav a možnosti integrace informačních a komunikačních technologií (IKT) ve výuce přírodopisu a biologie. In: Švecová, M. a kol. [eds.]: Didaktika biologie a didaktika geologie – současnost a perspektivy, UK PřF, Praha 2001, s. 125 – 129. (Sborník referátů z mezinárodní konference) ISBN 80-86561-01-1