

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Technologie digitální polymerázové řetězové reakce (dPCR) a její využití v hematonekologii

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Andrea Štědrá
Studijní program:	N0512A130009 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Jan Grohmann
Rok:	2022

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním diplomové práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne

.....

Poděkování

Ráda bych poděkovala Mgr. Janu Grohmannovi za odborné vedení a věcné připomínky při realizaci této práce. Dále bych chtěla touto cestou poděkovat Mgr. Janě Navrátilové za cenné připomínky při zpracování teoretické i praktické části diplomové práce. V neposlední řadě děkuji i své rodině za veškerou podporu.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Andrea Štědrá
Název práce	Technologie digitální polymerázové řetězové reakce (dPCR) a její využití v hematonekologii
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Laboratoř molekulární biologie Hemato-onkologické kliniky
Vedoucí práce	Mgr. Jan Grohmann
Rok obhajoby práce	2022

Abstrakt

Diplomová práce se zaměřuje na problematiku detekce bodové mutace T315I v kinasové doméně fúzního genu *BCR-ABL1* pomocí digitální PCR (dPCR) u pacientů s chronickou myeloidní leukémií (CML). CML se řadí do skupiny myeloproliferativních neoplázií s incidencí 1–2 případy na 100 000 obyvatel ročně. K léčbě jsou využívány inhibitory tyrosinkinás. U některých pacientů dochází k vývoji rezistence na léčbu. Jedním z důvodů je přítomnost mutací v kinasové doméně fúzního genu. Standardní metodou pro detekci mutací je Sangerovo sekvenování, které však není dostatečně senzitivní. Tento problém překonává dPCR, která je založena na rozdělení reakce do tisíců malých kompartmentů, v nichž probíhá PCR reakce samostatně. V rámci experimentální části byla optimalizována metoda dPCR pro detekci mutace T315I a následně vyšetřeno 28 vzorků ze souboru 14 pacientů. Bodová mutace T315I byla prokázána u 10/14 pacientů. Pomocí dPCR je možné detekovat přítomnost mutované alely v zastoupení až 0,01 %. Technologie dPCR má vyšší citlivost detekce než Sangerovo sekvenování.

Klíčová slova	Chronická myeloidní leukémie, digitální PCR, inhibitory tyrosinkinás, imatinib, rezistence
Počet stran	62
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Bc. Andrea Štědrá
Title	Digital polymerase chain reaction (dPCR) in hematooncology
Type of thesis	Diploma
Department	Laboratory of Molecular Biology, Department of Hematooncology
Supervisor	Mgr. Jan Grohmann
The year of presentation	2022

Abstract

This diploma thesis focuses on the detection of the T315I point mutation in the kinase domain of the *BCR-ABL1* fusion gene by digital PCR (dPCR) in patients with chronic myeloid leukemia (CML). CML belongs to the group of myeloproliferative neoplasms with an incidence of 1–2 cases per 100 000 population per year. Tyrosine kinase inhibitors are used for treatment. Some patients develop resistance to treatment. One of the reasons is the presence of mutations in the kinase domain of the fusion gene. The standard method for detecting mutations is Sanger sequencing, which is not sensitive enough. This problem is overcome by dPCR, which is based on the division of the reaction into several thousand small compartments, in which the PCR reaction takes place separately. In the experimental part, the dPCR method was optimized for the detection of the T315I mutation and subsequently 28 samples from a group of 14 patients were examined. The T315I point mutation was detected in 10/14 patients. Using dPCR, it is possible to detect the presence of a mutated allele in a proportion of up to 0.01 %. dPCR technology has a higher detection sensitivity than Sanger sequencing.

Keywords	Chronic myeloid leukemia, digital PCR, tyrosine kinase inhibitors, imatinib, resistance
Number of pages	62
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

1	Úvod	1
2	Současný stav řešené problematiky	2
2.1	Hematopoéza	2
2.2	Chronická myeloidní leukemie (CML)	4
2.2.1	Historie CML	6
2.3	Molekulární podstata CML	7
2.3.1	Fyziologické funkce genů <i>ABL1</i> a <i>BCR</i>	7
2.3.2	<i>BCR-ABL1</i> translokace	7
2.4	Metody detekce Philadelphského chromozomu a genu <i>BCR-ABL1</i>	10
2.4.1	Polymerázová řetězová reakce (PCR)	10
2.4.1.1	Kvalitativní PCR	11
2.4.1.2	Kvantitativní PCR v reálném čase	12
2.4.1.3	Digitální PCR	12
2.5	Sangerovo sekvenování	15
2.6	Možnosti léčby onemocnění	16
2.6.1	Imatinib	17
2.6.1.1	Rezistence na imatinib	18
2.6.2	Další inhibitory tyrosinkinasy	21
3	Experimentální část	23
3.1	Soubor pacientů	23
3.2	Materiály	23
3.2.1	Komerčně dostupné chemikálie a roztoky	23
3.2.2	Přístroje	23
3.2.3	Laboratorní materiál	24
3.3	Metody	25
3.3.1	Reverzní transkripce RNA na cDNA	25
3.3.2	Amplifikace <i>BCR-ABL1</i> kinasové domény pomocí nested PCR	25
3.3.3	Elektroforetická separace PCR produktů	27
3.3.4	Purifikace PCR produktu z gelu	28
3.3.5	Stanovení koncentrace eluovaného PCR produktu	29
3.3.6	Optimalizace metody dPCR	29
3.3.6.1	Stanovení optimální koncentrace	30
3.3.6.2	Stanovení <i>false rate</i> (specifity) metody dPCR	31
3.3.6.3	Stanovení citlivosti metody dPCR	31
3.3.6.4	Detekce mutace T315I u vybrané skupiny pacientů	31

4	Výsledky	32
4.1	Optimalizace metody dPCR	32
4.1.1	Stanovení optimální koncentrace vzorku	32
4.1.2	Stanovení <i>false rate</i> (specifity) metody dPCR	38
4.1.3	Stanovení citlivosti metody dPCR	39
4.2	Detekce mutace T315I u vybrané skupiny pacientů	43
5	Diskuze	51
6	Závěr	54
7	Seznam použité literatury	55
8	Seznam použitých symbolů a zkratk	61

CÍLE PRÁCE

1. Stručný přehled literárních údajů zaměřených na problematiku stanovení mutací pomocí technologie digitální PCR.
2. Cílem DP je určení mutací pomocí metody digitální PCR u vybrané skupiny hematologických pacientů.
3. Experimentální část: výsledky vlastních analýz provedených metodou digitální PCR.
4. Vyhodnocení zjištěných mutací u vybrané skupiny hematologických pacientů a určení jejich významu v diagnostice hematologických chorob.

1 ÚVOD

Chronická myeloidní leukémie (CML) je onemocnění řadící se do skupiny myeloproliferativních neoplázií. Incidence v České republice je 1–2 případy na sto tisíc obyvatel ročně. Zásadní pro vznik tohoto onemocnění je deregulovaná aktivita nereceptorové tyrosinkinasy Bcr-Abl1, za jejíž vznik je odpovědná chromozomální translokace t(9;22)(q34.1;q11.2) (Deininger *et al.*, 2000). V rámci terapie CML je v současnosti využívána cílená léčba tyrosinkinasovými inhibitory (TKI). Prvním schváleným TKI byl imatinib. Jeho zavedení do klinické praxe v roce 2001 bylo velmi významným milníkem v léčbě CML, které zlepšilo celkové přežívání nemocných (Iqbal & Iqbal, 2014). Později byly pro terapeutické použití zavedeny také inhibitory druhé a třetí generace a v současnosti je jich k dispozici pět. Cílem nových molekul je překonat rezistenci zapříčiněnou bodovými mutacemi v kinasové doméně *BCR-ABL1*. Je známo více než sto bodových mutací, které ovlivňují účinnost léčby TKI. Jednou z nich je i bodová mutace v kodonu T315I, která je nejfrekventovanější. Při potvrzení této mutace je nutné u pacienta změnit léčbu. V současnosti je jediným inhibitorem, který je schopen úspěšně ovlivňovat buňky s touto mutací, inhibitor třetí generace, ponatinib (Massaro *et al.*, 2018).

Teoretická část této práce je zaměřena na současné poznatky o CML, molekulární příčinu tohoto onemocnění a možnosti jeho léčby. Zabývá se literárním přehledem na téma polymerasové řetězové reakce se zaměřením na digitální PCR.

V experimentální části se práce věnuje optimalizaci metody digitální PCR a jejímu využití při detekci mutace T315I v kinasové doméně genu *BCR-ABL1*, která je jednou z nejčastějších příčin rezistence onemocnění u pacientů s CML. Byl sledován také vývoj této mutace v průběhu léčby u vybraných pacientů a výsledky byly korelovány s hladinou transkriptu *BCR-ABL1*.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Hematopoéza

Pojem hematopoéza označuje proces tvorby krevních buněk. Začíná již během embryonálního vývoje, dále pokračuje v průběhu fetálního a neonatálního vývoje a během dospělosti slouží k produkci a obnově krevních buněk (Jagannathan-Bogdan & Zon, 2013).

Hematopoéza se dělí podle období na tři typy (mezoblastovou, hepatolienální a medulární). Prvním typem je primitivní mezoblastová embryonální hematopoéza ve žloutkovém vaku, během níž jsou tvořeny erytroblasty s jádry. Myeloidní buňky, které jsou rovněž produkovány ve žloutkovém vaku, se postupně vyvíjí v mikroglie a Langerhansovy buňky (Golub & Cumano, 2013). Druhý typ embryonální hematopoézy, která začíná fungovat od osmého týdne těhotenství, je charakterizován intraembryonální hematopoézou. U plodu se krvetvorba přemísťuje do jater, která slouží jako důležitý hematopoetický orgán. Zde dochází k diferenciaci hematopoetických kmenových buněk (HSC, hematopoietic stem cell) (Tavian & Peault, 2005; Mims *et al.*, 2019). Některé HSC a progenitory se během vývoje plodu z jater přemísťují do sleziny. Zde pak dochází k diferenciaci na lymfoidní a myeloidní linie (Golub & Cumano, 2013). V období mezi čtvrtým až pátým měsícem těhotenství se hematopoéza aktivuje v kostní dřeni, kde se vyskytuje po celou dobu postnatálního života. U dětí se nachází aktivní kostní dřev ve všech kostech. V dospělosti je krvetvorba omezena zejména na ploché a dlouhé kosti jako sternum, pánev, obratle, žebra a stehenní kost (Mims *et al.*, 2019).

Existují různé typy krevních buněk, které mají odlišné funkce. Leukocyty zahrnují specializované typy buněk a uplatňují se především ve vrozené a získané imunitě (Rieger & Schroeder, 2012). V krvi se vyskytují v množství $4-10 \times 10^9$ na litr. Nejvíce zastoupené jsou neutrofilní granulocyty ($2-7 \times 10^9$ na litr), dále pak lymfocyty B a T a přirozené zabíječe (NK buňky) ($0,8-4 \times 10^9$ na litr). Zbytek bílých krvinek tvoří monocyt, eosinofilní a basofilní granulocyty (Eaves & Eaves, 2006; Faber *et al.*, 2012).

Erytrocyty mají funkci především v zajišťování transportu krevních plynů, kyslíku a oxidu uhličitého (Rieger & Schroeder, 2012). Hodnota erytrocytů v krvi by měla být $4-5,8 \times 10^{12}$ na litr (Faber *et al.*, 2012). Standardní délka života erytrocytů je 120 dní. U dospělé osoby je potřeba každý den obměnit 2×10^{11} erytrocytů pro zachování optimální koncentrace červených krvinek (Eaves & Eaves, 2006).

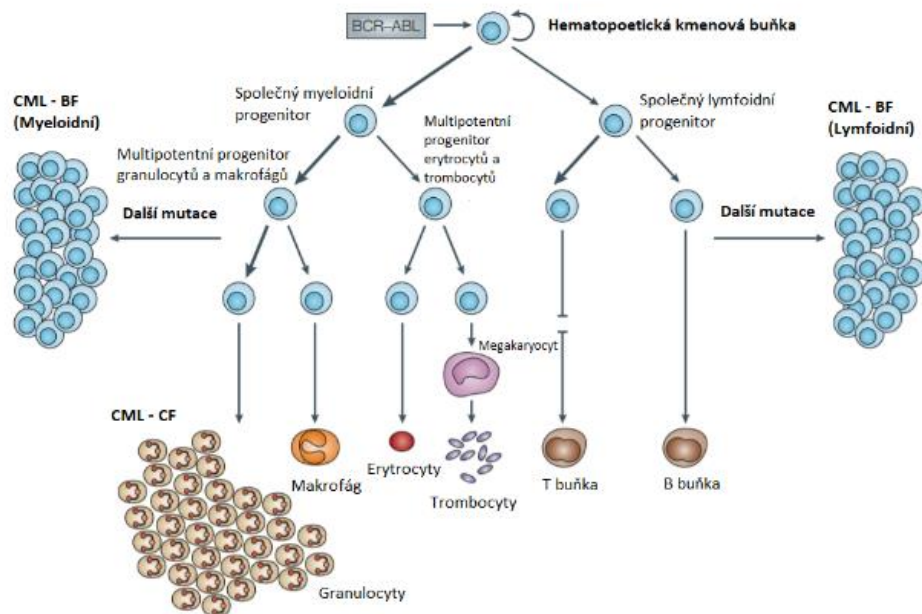
Krevním destičkám (trombocytům) dávají vznik megakaryocyty. Trombocyty mají zásadní úlohu v procesu srážení krve (Rieger & Schroeder, 2012). V krvi se jich vyskytuje přibližně $150\text{--}400 \times 10^9$ na litr a jejich životnost odpovídá devíti dnům (Eaves & Eaves, 2006, Faber *et al.*, 2012).

Všechny typy krevních buněk jsou vytvářeny z HSC, jež se nachází v kostní dřeni, kde je hlavní místo krvetvorby u dospělých. Životnost většiny krevních buněk je krátká. Je nutné, aby docházelo k jejich neustálé obnově. Mechanismy, které řídí produkci těchto nových buněk, jsou pro správnou krvetvorbu klíčové (Rieger & Schroeder, 2012), jejich porušením mohou vznikat hematologické malignity.

Během hematopoézy HSC diferencují v progenitory a prekurzory jednotlivých linií, ze kterých postupně vznikají krevní buňky. Schopnost sebeobnovy a diferenciací jsou dvě zásadní vlastnosti HSC, které jsou nezbytné pro fyziologické fungování hematopoézy (Aqmasheh *et al.*, 2017; Tamma & Ribatti, 2017; Mims *et al.*, 2019). Kmenové buňky vstupují do atypického buněčného cyklu, kdy se dělí asymetricky a vzniká tak kmenová buňka a prekurzor. Diferenciace umožňuje hematopoetickým prekurzorům se vyvinout do různých linií. Tuto schopnost HSC označujeme jako pluripotence (Mims *et al.*, 2019).

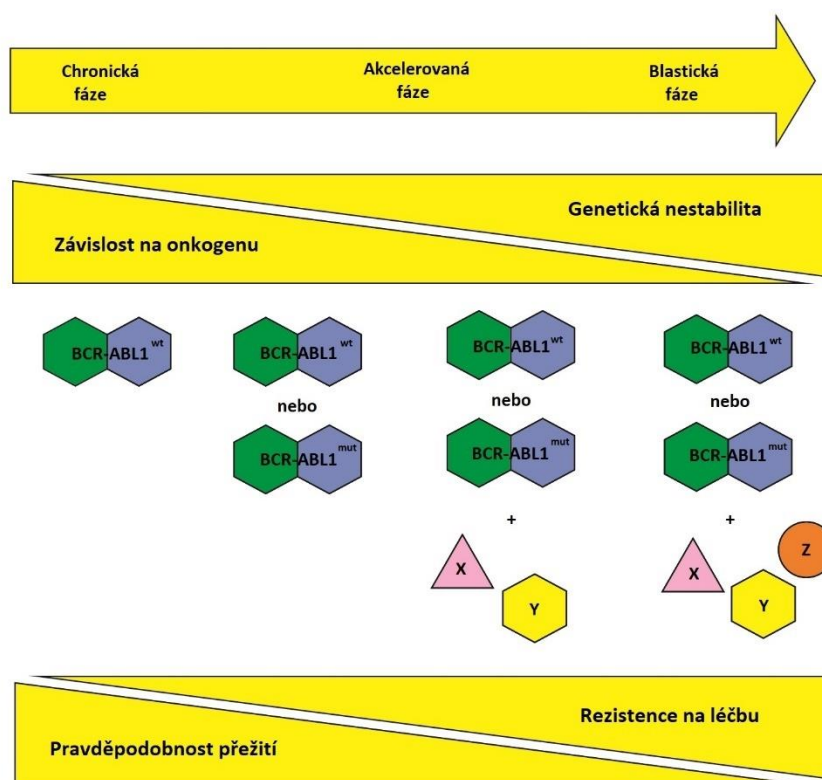
2.2 Chronická myeloidní leukémie (CML)

Chronická myeloidní leukémie je řazena do skupiny myeloproliferativních neoplázií s výskytem 1–2 případů na 100 000 obyvatel ročně (Gupta *et al.*, 2016). Z nově diagnostikovaných případů všech leukémií dospělých představuje téměř 15 % případů (Jabbour & Kantarjian, 2018). CML je pomalu se rozvíjející onemocnění, nejčastěji se vyskytuje u osob ve středním a vyšším věku (Gupta *et al.*, 2016). Medián věku při diagnóze je 60 let (Faderl *et al.*, 1999). Častější výskyt tohoto onemocnění pozorujeme u mužů (Gupta *et al.*, 2016). V 85 % případů je diagnóza stanovena v chronické fázi onemocnění, ostatní pacienti jsou diagnostikováni v akcelerované nebo blastické fázi. U poloviny případů je onemocnění odhaleno náhodně, u asymptomatických jedinců pomocí vyšetření krevního obrazu při preventivní prohlídce (Faderl *et al.*, 1999). Část pacientů má v době diagnózy příznaky, ke kterým patří B-symptomy (ztráta hmotnosti, noční pocení, teploty nereagující na antibiotickou léčbu), únava, hepatosplenomegalie, leukocytóza, anemie a/nebo trombocytóza (Faderl *et al.*, 1999). Predispoziční faktory nejsou známy. Byl pozorován častější výskyt CML u osob vystavených radiačnímu záření a exponovaných jistým druhům chemikálií (Corso *et al.*, 1995).



Obr. 1: Vývoj chronické myeloidní leukémie. Počáteční chronická fáze CML (CML-CF) je charakteristická expanzí řady granulocytárních buněk. Další genetické změny nad rámec aberantní exprese *BCR-ABL1* způsobují progresi CML z chronické fáze do blastické fáze (CML-BF), která je charakteristická akumulací myeloidních nebo lymfoidních blastů. Upraveno dle Ren, 2005.

CML má třífázový průběh. Chronická fáze je charakteristická expanzí granulocytárních elementů (Obr. 1) a vyplavováním nezralých myeloidních prekurzorů (metamyelocyty, myelocyty) do periferní krve. Typická je leukocytóza v periferní krvi a splenomegalie. Buňky si zachovávají schopnost diferencovat a jsou morfologicky i funkčně normální. Symptomy v této fázi onemocnění se buď neprojevují, nebo jsou mírné (Soverini *et al.*, 2018). Onemocnění postupuje z chronické fáze do fáze akcelerované, kdy nabývá na agresivitě. Pro akceleraci je typické vyplavení blastů, jejichž počet v kostní dřeni vzrůstá na 10–19 % (Kantarjian *et al.*, 1990; Thompson *et al.*, 2015), a získání dalších cyto/genetických abnormalit (Obr. 2). Nakonec onemocnění přechází do terminálního blastického zvratu, pro nějž je charakteristická přítomnost minimálně 20 % blastů v kostní dřeni (Arber *et al.*, 2016). Typická je nekontrolovatelná proliferace myeloidních nebo lymfoidních blastů odpovídající stavu akutní leukémie (Obr. 1) (Faderl *et al.*, 1999; Kennedy & Hobbs, 2018). Myeloidní zvrát se vyskytuje dvakrát



Obr. 2: Progrese CML z chronické do blastické fáze. Tento přechod může být spojen se vznikem mutací v kinasové doméně *BCR-ABL1* spojených s rezistencí na TKI s dalšími mutacemi v genech nebo chromozomálními abnormalitami. X, Y a Z představují mutace v jiných místech než v genu *BCR-ABL1*. Upraveno dle Soverini *et al.*, 2018.

častěji než lymfoidní (Minciacchi *et al.*, 2021). Pokud pacient není léčen, onemocnění progreduje do blastické fáze v časovém horizontu 3–5 let (Faderl *et al.*, 1999; Thompson *et al.*, 2015). Díky cílené terapii TKI a pravidelnému monitorování stavu onemocnění incidence akcelerované a blastické fáze výrazně klesla (Baccarani *et al.*, 2013).

V současné době, kdy jsou k léčbě používány zejména TKI, je nejvýznamnějším prognostickým indikátorem rychlost a hloubka odpovědi na léčbu (hematologické/cytogenetické/molekulární). V době diagnózy onemocnění jsou pro stanovení prognózy důležité informace klinického charakteru a laboratorní parametry, jako jsou věk pacienta, velikost sleziny, počet bazofilů, eozinofilů a blastů v periferní krvi. Z těchto parametrů jsou odvozeny hodnoty rizikového skóre (Sokal, EUTOS), které umožňují pacienty dělit podle míry rizika progresu onemocnění. Většina pacientů, u nichž bylo stanoveno nízké riziko, odpovídá na léčbu TKI lépe než pacienti, jejichž rizikové skóre je vysoké (Baccarani *et al.*, 2013).

2.2.1 Historie CML

CML byla poprvé popsána v roce 1845, kdy patologové John Bennett a Rudolf Virchow nezávisle na sobě publikovali informace o pacientech trpících splenomegalií, hepatomegalií a leukocytózou. Popsané příznaky však nesouvisely s žádným známým onemocněním a spojili je právě se změnami v krevtvorbě (Bennett, 1845; Minciacchi *et al.*, 2021). V této době byla CML označována jako chronická granulocytární leukémie. Pacienti byli zpočátku léčeni různými formami arsenu, což vedlo ke zmírnění leukocytózy, nikoliv však k výraznému přežívání pacientů. V roce 1960 byl učiněn zásadní pokrok v objasnění příčiny této nemoci. Jednalo se o objevení spojitosti mezi CML a vznikem abnormálního chromozomu, který byl později označen jako Philadelphský (Ph) chromozom (Minciacchi *et al.*, 2021). Objev umožnily nové technologie pro studium buněk ve stádiu mitózy a je připisován Nowellovi a Hungerfordovi (Nowell & Hungerford, 1960). Rok 1970 byl významný díky izolaci genu *v-ABLI* akutně transformujícího viru způsobujícího myší leukémii. Zásahu na tomto objevu měli Herbert Abelson a David Baltimore (Abelson & Rabstein, 1970; Goldman, 2010). V roce 1973 bylo prokázáno, že Ph chromozom vzniká reciprokou translokací mezi chromozomy 9 a 22 (Goldman, 2010). Dalším významným milníkem byl rok 1984, kdy byla definována oblast zlomů (breakpoint cluster region) v BCR genu a následně v roce 1985 byl identifikován samotný fúzní gen *BCR-ABLI*. Počátkem 80. let

20. století bylo prokázáno, že gen *c-ABL* (*ABL1*), lidský homolog myšního genu *Abelson1*, se nachází v oblasti q34 chromozomu 9 a dochází k jeho translokaci na chromozom 22 (De Klein *et al.*, 1986; Goldman, 2010).

2.3 Molekulární podstata CML

2.3.1 Fyziologické funkce genů *ABL1* a *BCR*

Gen *ABL1* (*ABL* proto-oncogene 1) se nachází na chromozomu 9 (9q34.12) a má jedenáct exonů (Zhou *et al.*, 2018). Tento gen kóduje nerekceptorovou tyrosinkinazu (EC 2.7.10.2), která reaguje na signalizaci růstovými faktory (cytokiny). Jako odpověď na tyto signály dochází k celé řadě buněčných procesů zahrnujících stimulaci buněčné proliferace, diferenciaci a přežívání buněk (Wang, 2014). Protein je složen z několika strukturních domén, jejichž funkce se liší. Tři homologní Src (sarcoma) domény (SH1, SH2 a SH3), se nachází na N-konci. SH1 (Src homology 1) doména má funkci tyrosinkinasy, kdežto domény SH2 a SH3 interagují s dalšími proteiny (Cohen *et al.*, 1995; Deininger *et al.*, 2000). Ve středu molekuly se nachází sekvence bohaté na prolin. Blíže k C-konci se nachází DNA/aktin vazebné motivy a také jaderné lokalizační signály (Deininger *et al.*, 2000).

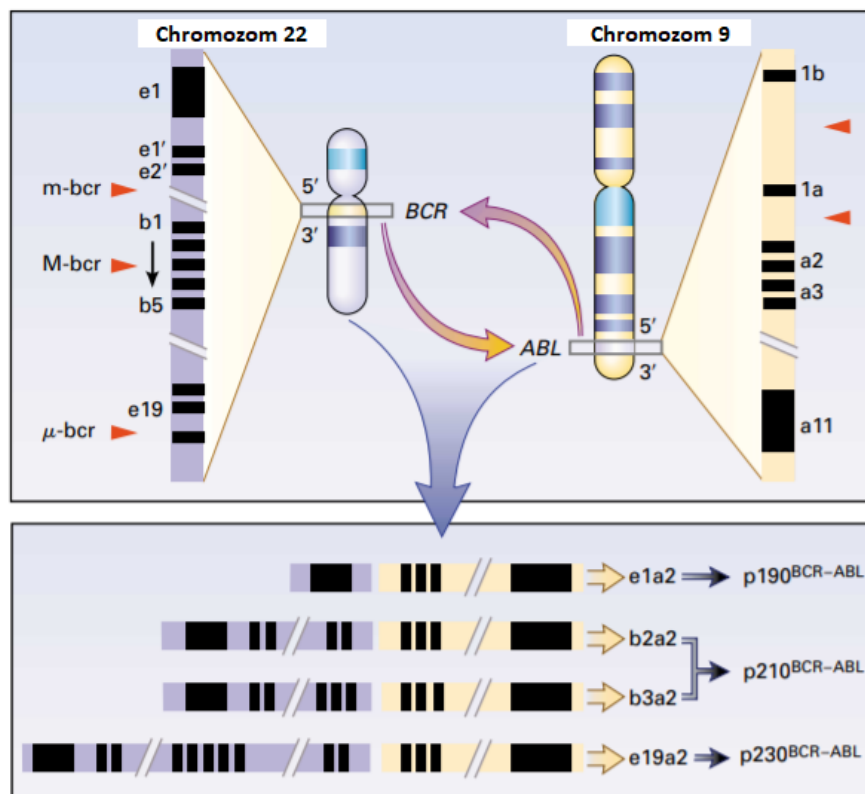
Gen *BCR* (*BCR* Activator Of RhoGEF And GTPase) se nachází na chromozomu 22 (22q11.23) a má 23 exonů (Obr. 3) (Zhou *et al.*, 2018). Je složen z několika strukturních motivů. Funkce serin/threoninové kinasy (EC 1.3.7.8) je kódována prvním exonem. *Coiled-coil* doména nacházející se na N-konci umožňuje tvorbu dimeru *in vivo*. Ve střední části molekuly se nachází domény stimulující výměnu guanidin trifosfátu (GTP) za guanidin difosfát (GDP). C-konec proteinu má GTPasovou aktivitu. Její funkcí je regulace polymerace aktinu a aktivity NADPH oxidasy ve fagocytárních buňkách. Bcr protein může být fosforylován na tyrosinových zbytcích, čímž dochází k vazbě adaptorové molekuly, jež je spojená s aktivací dráhy Ras (Deininger *et al.*, 2000).

2.3.2 *BCR-ABL1* translokace

Charakteristickým znakem CML je přítomnost reciproké translokace t(9;22)(q34.1; q11.2) mezi dlouhými raménky chromozomů 9 a 22. Výsledkem této translokace je fúzní gen kódující fúzní protein Bcr-Abl1 s aberantní funkcí (Ujjan *et al.*, 2015). Tento protein vykazuje konstitutivní tyrosinkinazovou aktivitu, která je zodpovědná za iniciaci a fenotyp buněk CML. Díky ní dochází k nekontrolovatelné

proliferaci buněk v důsledku narušení signálních drah regulujících buněčný cyklus (Lugo *et al.*, 1990; Thompson *et al.*, 2015). Onkoprotein aberantní fosforylací způsobuje deregulaci a nadměrnou aktivaci podřízených intracelulárních transdukčních proteinů, jež regulují růst progenitorových buněk v kostní dřeni (Tauchi *et al.*, 1994; Zhou & Xu, 2015).

Původně byla za vznik Philadelphského chromozomu považována již zmíněná translokace t(9;22)(q34.1;q11.2). Později však bylo prokázáno, že Philadelphský chromozom nemusí vznikat pouze touto cestou, ale existují také variantní translokace postihující část chromozomu 22q11 nesoucí gen *BCR* (Johansson *et al.*, 2002). Tyto variantní Philadelphské chromozomy jsou charakteristické tím, že kromě chromozomu 9 a 22 je do jejich vzniku zapojen i jiný chromozom nebo se může jednat



Obr. 3: Philadelphský chromozom je chromozom 22 vznikající translokací t(9;22)(q34;q11). V sekvenci genu *BCR* na chromozomu 22 existují různá místa zlomu. V závislosti na tom, které zlomy jsou do translokace zahrnuty, jsou různě velké segmenty z genu *BCR* fúzovány s 3' sekvencemi genu *ABL*. Výsledkem jsou fúzní transkripty různých délek, které jsou překládány do proteinových produktů (p190, p210 a p230). Zkratka *m-BCR* označuje minor oblast zlomu, *M-BCR* značí major oblast zlomu a *μ-BCR* značí mikro oblast zlomu. Převzato od Faderl *et al.*, 1999.

o translokaci v rámci komplexní přestavby karyotypu (Sandberg, 1980; Ujjan *et al.*, 2015). Interchromozomální přestavby mohou ústit v kryptickou translokaci, kdy dochází ke vzniku fúzního genu, ale v karyotypu není detekován klasický Ph chromozom. Ve většině případů se t(9;22) v době diagnózy CML vyskytuje jako izolovaná chromozomální změna. Naopak ve fázi blastického zvratu je možné detekovat další cytogenetické změny (monozomie, komplexní změny) a to až u 60–80 % nemocných (Johansson *et al.*, 2002).

V genu *BCR* rozeznáváme tři zlomové oblasti. Jedná se o major oblast, kterou označujeme jako *M-BCR*, minor oblast, jež je označovaná jako *m-BCR* a mikro oblast, značená jako *μ-BCR*. Podle toho, ve které z těchto oblastí dojde ke zlomu, se vytváří různě velký fúzní gen a následně i transkript a protein. Jedná se o proteiny označované p210, p190 a p230 (Obr. 3) (Zhou *et al.*, 2018). Vznikající fúzní proteiny mohou obsahovat pouze některé nebo všechny Bcr domény (Ren, 2005; Zhou *et al.*, 2018). Zlomové místo o velikosti 200 kb v genu *ABL1* se nachází v oblasti mezi exonem 1b a exonem 2.

Všechny typy fúzních proteinů Bcr-Abl1 jsou vždy spjaty se stejným fenotypem CML. Protein p210 je typicky přítomný u většiny pacientů s diagnózou CML, ale protein p190 převládá u Ph⁺ lymfoblastické leukémie. Protein p230 se vyskytuje velmi vzácně (Gong, 2017; Zhou *et al.*, 2018).

Onemocnění se začíná rozvíjet, když část pluripotentních HSC získá Philadelphský chromozom (Goldman & Melo, 2003). Takto modifikované HSC dávají vznik buňkám, které mají proliferační výhodu oproti buňkám fyziologickým. Dochází k situaci, kdy je v kostní dřeni fyziologická hematopoéza postupně vytlačována patologickou (Eaves & Eaves, 1997; Goldman & Melo, 2003). Buňky CML navíc přežívají delší dobu, což je zapříčiněno necitlivostí k apoptickým signálům, které vedou k fyziologické buněčné smrti (Bedi *et al.*, 1994; Goldman & Melo, 2003).

Protein Abl1 se pohybuje mezi jádrem a cytoplazmou a za fyziologických podmínek je lokalizován převážně v jádře. Avšak fúzní protein Bcr-Abl1 má ve své molekule aberantní signální sekvenci, která jej směřuje do cytoplasmy, kde může interagovat s řadou proteinů, čímž se projevuje jeho leukemogenní účinek. Zásadní je, že oligomerizační doména, jež je kódována prvním exonem genu *BCR*, konstitutivně aktivuje tyrosinkinasovou aktivitu Abl1 (Zhou *et al.*, 2018). Důvodem je ztráta *N-cap*, což je regulační oblast se signální sekvencí pro myristoylaci. U proteinu Abl1 je kinasová aktivita regulována právě přítomností *N-cap* (Soverini *et al.*, 2018).

Leukemogenní potenciál onkoproteinu Bcr-Abl1 spočívá v aktivaci dalších signálních molekul v rámci intracelulární signalizace. Jedná se zejména o signální dráhy typu MAPK (Mitogen-activated protein kinase) a JAK-STAT (Janus kinase/Signal Transducers and Activators of Transcription) (Jabbour & Kantarjian, 2018).

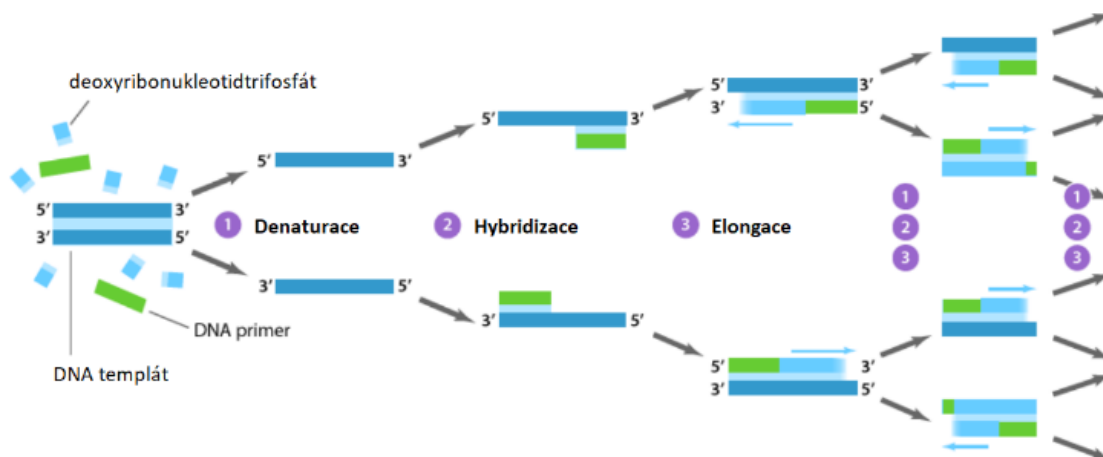
2.4 Metody detekce Philadelphského chromozomu a genu *BCR-ABL1*

Pro potvrzení diagnózy CML je nezbytný průkaz přítomnosti Philadelphského chromozomu či detekce fúzního genu *BCR-ABL1*. Cytogenetické vyšetření karyotypu umožní prokázat přítomnost Philadelphského chromozomu v kultivovaných buňkách z aspirátu kostní dřeně. Přítomnost fúze je možné detekovat i pomocí metody FISH (fluorescence *in situ* hybridization). Tato metoda se opírá o kolokalizaci fluorescenčních sond, které jsou specifické pro geny *BCR* a *ABL1* (Soverini *et al.*, 2020).

Kvalitativní PCR (především její dvoukolová verze) slouží pro detekci transkriptu *BCR-ABL1* na úrovni nukleových kyselin. Po nasazení TKI sledujeme odpověď na léčbu pomocí kvantitativní real time PCR (RT-qPCR) (Soverini *et al.*, 2020). Tato vyšetření jsou prováděna v pravidelných intervalech pro přesné monitorování hladiny transkriptu, tzv. minimální reziduální nemoci (MRD). Pokud u pacienta není optimální odpověď na TKI (nárůst hladiny transkriptu, primární rezistence), je nutné provést *screening* mutací v kinasové doméně Sangerovým sekvenováním nebo dnes již sekvenováním nové generace (NGS) (Jabbour & Kantarjian, 2018).

2.4.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Polymerázová řetězová reakce (PCR) byla vyvinuta v roce 1983 Kary Mullisem (Mullis, 1990). Metoda PCR byla velmi rychle zařazena do molekulární diagnostiky (Houghton & Cockerill, 2006). Umožňuje specifickou detekci cílových úseků nukleových kyselin pomocí amplifikace totožné s mechanismy replikace DNA. Výhodou této metody je požadavek velmi malého množství výchozího materiálu, tedy templátu (DNA/cDNA). Pro provedení PCR reakce je nezbytné mít následující reagenty: vodu, templát, primery, volné deoxynukleotid trifosfáty, pufr, hořčičnaté ionty a enzym termostabilní DNA polymerasu (Garibyan & Avashia, 2013).



Obr. 4: Schéma principu PCR reakce a její jednotlivé kroky. Upraveno dle Benchling. <https://benchling.com/protocols/GP1fQ08o/pcr-amplification-of-gfp/sbs> (16. 1. 2022).

V prvním, denaturačním kroku dochází k zahřátí reakčního roztoku na teplotu 95-98 °C, při níž se komplementární řetězce DNA od sebe oddělí. V dalším kroku se teplota snižuje, což umožní primerům vázat se na komplementární cílové sekvence v DNA. Tato fáze je označována jako fáze *annealingu* a probíhá při teplotách 50–65 °C, a je následovaná fází extenze, kdy se teplota znovu zvyšuje a termostabilní DNA polymerasa prodlužuje vznikající produkt přidáváním deoxynukleotid trifosfátů při teplotě 72 °C. Tyto tři kroky se opakují v cyklech a v každém z cyklů ideálně dochází ke zdvojnásobení počtu molekul PCR produktů (Obr. 4) (Garibyan & Avashia, 2013).

2.4.1.1 Kvalitativní PCR

Pro detekci fúzního genu *BCR-ABL1* se používá dvoukolová PCR. Tato metoda využívá dva různé páry primerů, tzv. vnější a vnitřní primery. V prvním kole dochází k amplifikaci genu *BCR-ABL1* s využitím vnějšího (*extended*) páru primerů. V druhém kole se navazuje vnitřní (*internal*) pár primerů na PCR produkt z prvního kola (Wasserman, 2004). Druhé kolo PCR umožňuje citlivější detekci fúzního genu *BCR-ABL1*. PCR produkty jsou standardně po skončení reakce rozděleny pomocí elektroforézy v agarosovém gelu a vizualizovány díky inkorporaci barviva (EtBr, Gel Red) do dsDNA (Yu *et al.*, 2017).

2.4.1.2 Kvantitativní PCR v reálném čase

Tato metoda umožňuje kvantifikaci PCR produktu v reálném čase (VanGuilder *et al.*, 2008). K detekci a následné kvantifikaci vznikajících produktů se používají interkalační fluorescenční barviva (SYBR green aj.) nebo specifické fluorescenčně značené sondy (TaqMan technologie). Oligonukleotidová sonda má na 5'konci fluorescenční barvivo (fluorofor) a na druhém konci tzv. zhášec (*quencher*), který blokuje nespécifickou fluorescenci fluoroforu. Během extenze polymerasa díky exonukleázové aktivitě odštěpí molekulu fluoroforu, která emituje záření a následně v průběhu polymerace odstraní celou sondu (Yu *et al.*, 2017).

Tato metoda má své využití při monitorování MRD u CML. U pacientů je možné sledovat reziduální hladinu transkriptu *BCR-ABL1*.

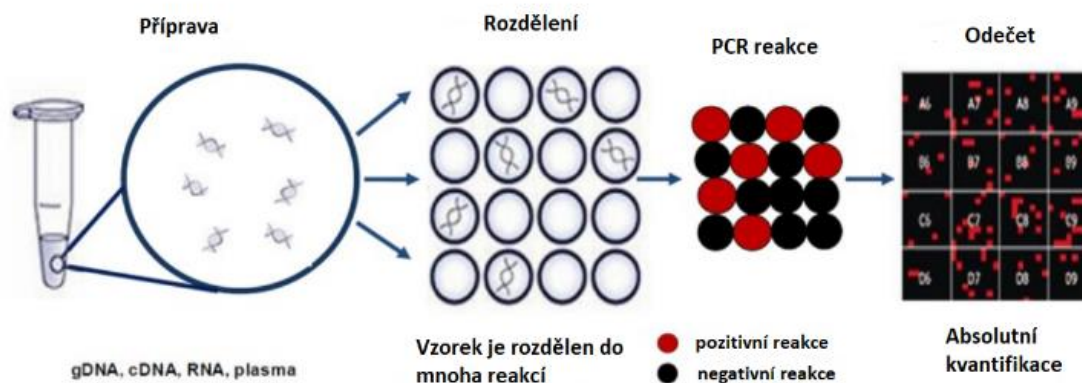
2.4.1.3 Digitální PCR

Digitální PCR je považována za třetí generaci PCR. Jedná se o robustní metodu, která umožňuje absolutní kvantifikaci pomocí rozdělení reakce do velkého množství malých kompartmentů (Day *et al.*, 2013).

Principem je rozdělení nukleových kyselin do jednotlivých nezávislých kompartmentů o malých objemech, do nichž jsou tyto molekuly distribuovány náhodně. Do každého kompartmentu se dostává omezený počet nukleových kyselin tak, že každý obsahuje v ideálním případě jednu nebo žádnou cílovou sekvenci. V každém oddílu probíhá PCR samostatně. Po amplifikaci a ukončení celé reakce je odečten fluorescenční signál v každém z těchto kompartmentů (Mao *et al.*, 2019). Pokud v kompartmentu byla přítomna cílová sekvence, zaznamenaný signál je pozitivní, v opačném případě je signál negativní (Izzo *et al.*, 2019). Na základě zjištěných počtů negativních a pozitivních signálů je vypočtena koncentrace cílové sekvence, k čemuž se využívá analytická metoda založená na Poissonově statistice (Mao *et al.*, 2019).

Digitální PCR je možné rozdělit na dva typy, které se vzájemně liší typem kompartmentace reakční směsi. Jedná se o mikrofluidní dPCR a emulzní „droplet“ dPCR (Mao *et al.*, 2019).

V případě mikrofluidní dPCR se využívají speciální čipy, které umožňují rozdělení reakce do tisíců malých kompartmentů. Reakce je rozdělena do jednotlivých reakčních



Obr. 5: Znárodnění základního principu ddPCR. Vzorek je rozdělen do tisíců na sobě nezávislých reakcí. Po proběhnutí reakce jsou amplifikované cílové sekvence detekovány pomocí fluorescence a je určena koncentrace cílové sekvence. Upraveno dle Mao *et al.*, 2019.

komůrek, které mají přesně definovaný objem, například 0,6 nl. Po skončení reakce je fluorescence detekována pomocí speciálních detektorů. (Mao *et al.*, 2019).

Na tomto principu je založen přístroj QIAcuity Digital PCR System, který byl použit v této práci. Přístroj funguje na základě rozdělení PCR reakce až na 26 000 jednotlivých, na sobě nezávislých kompartmentů. Rozdělení reakce je umožněno pomocí speciálních hrotů, které jsou zasunuty do elastické fólie, jež je připevněna na horní straně čipu. Zasunutím hrotů je vytvořen tlak, který umožní nástřik vzorku do mikrokanálů a jednotlivých reakčních komůrek. Nakonec jsou spojovací mikrokanály uzavřeny díky působení tlaku na spodní stranu čipu. Poté probíhá PCR program a po jeho ukončení je detekována fluorescence ve všech kompartmentech v příslušných fluorescenčních kanálech. Fluorofor FAM má excitační spektrum v oblasti 463–503 nm a jeho emisní spektrum je v oblasti 518–548 nm. Fluorofor HEX má excitační spektrum v oblasti 514–535 nm a jeho emisní spektrum se nachází v oblasti 550–564 nm. Moderní stroje umožňují využití i dalších fluoroforů (CY5, JAKIMA Yellow) a díky tomu i *multiplexing* reakcí.

U emulzní „droplet“ dPCR (Biorad) se vytváří jednotlivé mikroreakce tak, že vzorek je náhodně rozdělen do vodných „kapek“, kolem nichž se nachází olejové médium (Mao *et al.*, 2019). K vytvoření těchto „kapek“ dochází pod tlakem. V každé z těchto „kapek“ probíhá PCR samostatně (Obr. 5). V ideálním případě jsou tyto „kapky“ stejně velké, nepřekrývají se a neslévají se (Váňová *et al.*, 2021).

Výstupem detekce mutací pomocí přístroje QIAcuity Digital PCR System je přehledná tabulka s hodnotami absolutní kvantifikace, 2D *scatterplots*, 1D *scatterplots* a histogramy. Výsledkem absolutní kvantifikace je hodnota koncentrace *wild type* (WT) a mutované (MT) sekvence v analyzovaném vzorku udávaná v jednotkách kopie· μl^{-1} . Tato koncentrace je vypočtena za pomoci Poissonovy statistiky na základě všech validních (negativních a pozitivních) kompartmentů.

2D *scatterplot* obsahuje jednotlivé barevně rozlišené body, kdy každý z těchto bodů představuje intenzitu fluorescence jednoho kompartmentu. 2D *scatterplot* je rozdělen na kvadranty. V levém horním kvadrantu se nachází body, které představují kompartmenty, jejichž fluorescence byla detekována v zeleném kanálu, tedy sekvence obsahuje MT alelu. V pravém dolním kvadrantu se nachází body reprezentující kompartmenty, v nichž byl detekován fluorescenční signál pouze ve žlutém kanálu, což značí přítomnost sekvence s WT alelou. Pravý horní kvadrant obsahuje body, které představují kompartmenty, v nichž byla prokázána přítomnost jak WT, tak také MT sekvence. V posledním, levém dolním kvadrantu, se nachází body reprezentující kompartmenty, v nichž nebyla detekována fluorescence ani ve žlutém, ani v zeleném kanálu, tyto kompartmenty tedy neobsahují MT ani WT sekvenci (Purcell *et al.*, 2016).

V případě 1D *scatterplotů* se jedná o vynesení závislosti intenzity fluorescence na analyzovaném kompartmentu. Pozitivní signály v daném kanálu jsou od negativních odděleny tzv. *thresholdem*. Fluorescence v referenčním detekčním kanálu je měřena s cílem zjistit, kolik je v jedné jamce validních kompartmentů (Purcell *et al.*, 2016).

Dalším výstupem dPCR jsou histogramy. Jedná se o grafy zobrazující četnost kompartmentů, které mají příslušný fluorescenční signál. Zobrazují se vždy kompartmenty jedné jamky na čipu pro vybraný kanál / cílovou sekvenci, v tomto případě MT nebo WT. Histogramy znázorňují fluorescenci referenčního kanálu a vybraného kanálu, které jsou od sebe odděleny *thresholdem* (Purcell *et al.*, 2016).

Výhodou digitální PCR je dosažení velmi vysoké přesnosti i za předpokladu, kdy je pro analýzu k dispozici pouze malé množství templátu. Toho lze využít zejména při analýze obtížných vzorků. Senzitivita u konvenční jednokolové PCR může dosáhnout 1 %, citlivost u dPCR se pohybuje v rozmezí 0,1 % – 0,001 %. Právě proto je dPCR vhodným nástrojem pro detekci vzácných alel/variant somatického původu, a také pro detekci mutací na úrovni cirkulující nádorové DNA (Day *et al.*, 2013;

Mao *et al.*, 2019). Může sloužit k predikci relapsu onemocnění a monitorování MRD (Coccaro *et al.*, 2020).

V porovnání s kvantitativní PCR není potřebná kalibrace pomocí standardů a vytváření kalibračních křivek (Izzo *et al.*, 2019). Nespornou výhodou dPCR je vysoká citlivost a přesnost (Day *et al.*, 2013) v porovnání se Sangerovým sekvenováním a metodami sekvenování nové generace (NGS). Umožňuje stanovit a zachytit mutace ve vzorcích, u nichž výše zmíněné metody nemají dostatečnou citlivost (Soverini *et al.*, 2020).

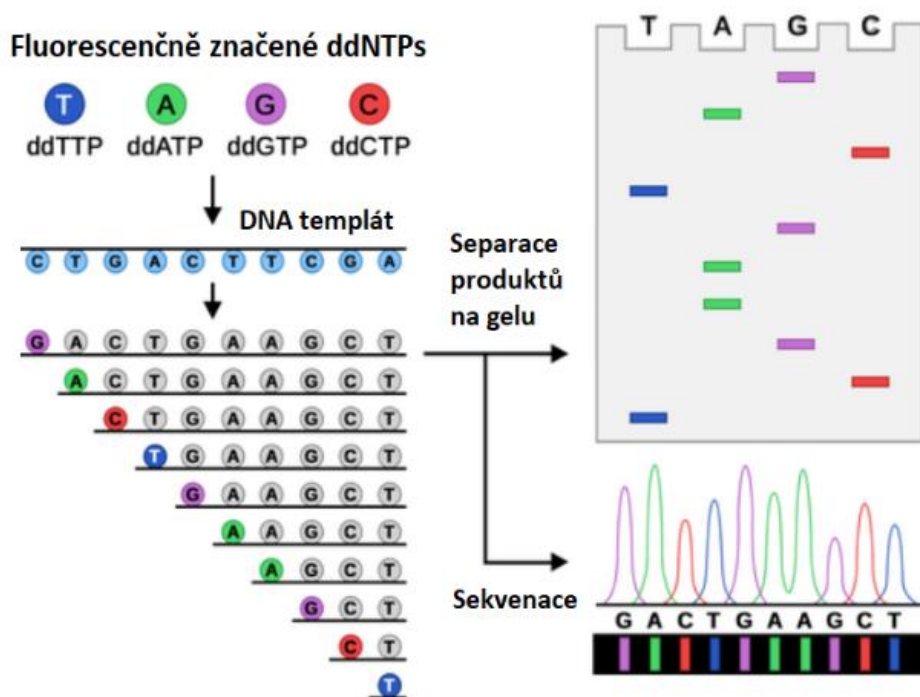
Na poli medicínského výzkumu je velmi často používána v oblasti studia nádorových onemocnění (Olmedillas-López *et al.*, 2017) včetně hematologických malignit (Voso *et al.*, 2019). Metoda dPCR je v oblasti hematonekologie využívána pro detekci somatických mutací (Coccaro *et al.*, 2020). Jedná se o mutace v genech *IDH1/IDH2* (Isocitrát dehydrogenasa 1/Isocitrát dehydrogenasa 2), *MYD88* (*MYD88* innate immune signal transduction adaptor) nebo *c-KIT* (KIT-protoonkogen) (Soverini *et al.*, 2020). Nejvíce studií bylo zaměřeno na Ph-negativní chronické myeloproliferativní neoplázie, jako polycythemia vera nebo primární myelofibróza. U těchto onemocnění se vyskytuje mutace v genu *JAK2* (Janus kinase 2) (Coccaro *et al.*, 2020).

I v rámci akutní myeloidní leukemie, což je nejčastější a zároveň nejzávažnější forma akutní leukemie u dospělých, lze využít monitorování MRD za pomoci dPCR. Je důležité zlepšit možnosti detekce a fenotypovou charakterizaci reziduálních leukemických buněk, které mohou být rezistentní na léčbu (Handschuh *et al.*, 2018; Coccaro *et al.*, 2020).

Další využití této metody je v monitorování MRD také u CML (Coccaro *et al.*, 2020). dPCR by mohla sloužit ke stanovení úrovně transkriptů *BCR-ABL1* při sledování molekulární odpovědi na léčbu TKI, jelikož její citlivost je vyšší než u standardně používané kvantitativní PCR (Soverini *et al.*, 2020).

2.5 Sangerovo sekvenování

Metodou, která se standardně používá pro stanovení mutací v kinasové doméně *BCR-ABL1*, je Sangerovo sekvenování (Obr.6) (Soverini *et al.*, 2020). Princip metody je založen na využití terminačních dideoxynukleotidtrifosfátů (ddNTP), které nemají 3'hydroxylovou skupinu, tudíž nemohou vytvářet fosfodiesterovou vazbu s 5'fosfátem dalšího dNTP a syntéza řetězce DNA je tak ukončena (Chidgeavadze & Beabealashvilli, 1984). Během reakce vznikají různě dlouhé produkty



Obr. 6: Schéma Sangerova sekvenování. V průběhu elongačních cyklů dochází k produkci fragmentů DNA různých délek. Tyto fragmenty jsou vždy zakončeny příslušným ddNTP, který je fluorescenčně značený. Fragmenty jsou následně děleny podle své velikosti na gelu. Potom je detekována a zaznamenána fluorescence příslušných ddNTPs. Upraveno dle: Labster Theory https://theory.labster.com/DNA_sequencing/ (16. 1. 2022)

(Heather & Chain, 2016). Následně probíhá rozdělení produktů dle jejich velikosti za pomoci kapilární elektroforézy a na základě fluorescenčních signálů je určeno pořadí bazí a tím i sekvence templátu. Výsledkem je elektroforetogram (Stranneheim & Lundeberg, 2012).

2.6 Možnosti léčby onemocnění

Cílem léčby CML je zabránit progresi nemoci do akcelerované nebo blastické fáze, eradikovat patologický klon a udržet stávající kvalitu života pacienta s co nejmenšími vedlejšími účinky léčby (Hochhaus *et al.*, 2020).

V minulosti byly pro léčbu CML dostupné látky jako je busulfan, hydroxyurea a interferon- α (Bolin *et al.*, 1982; Kimura *et al.*, 2006). Ty jsou schopné snížit množství leukemických buněk, ale nemají dostatečný účinek na přežívání pacientů. V osmdesátých letech 20. století byl k léčbě preferován interferon- α . Ne všichni pacienti na něm ale měli dostatečnou odpověď (Kimura *et al.*, 2006).

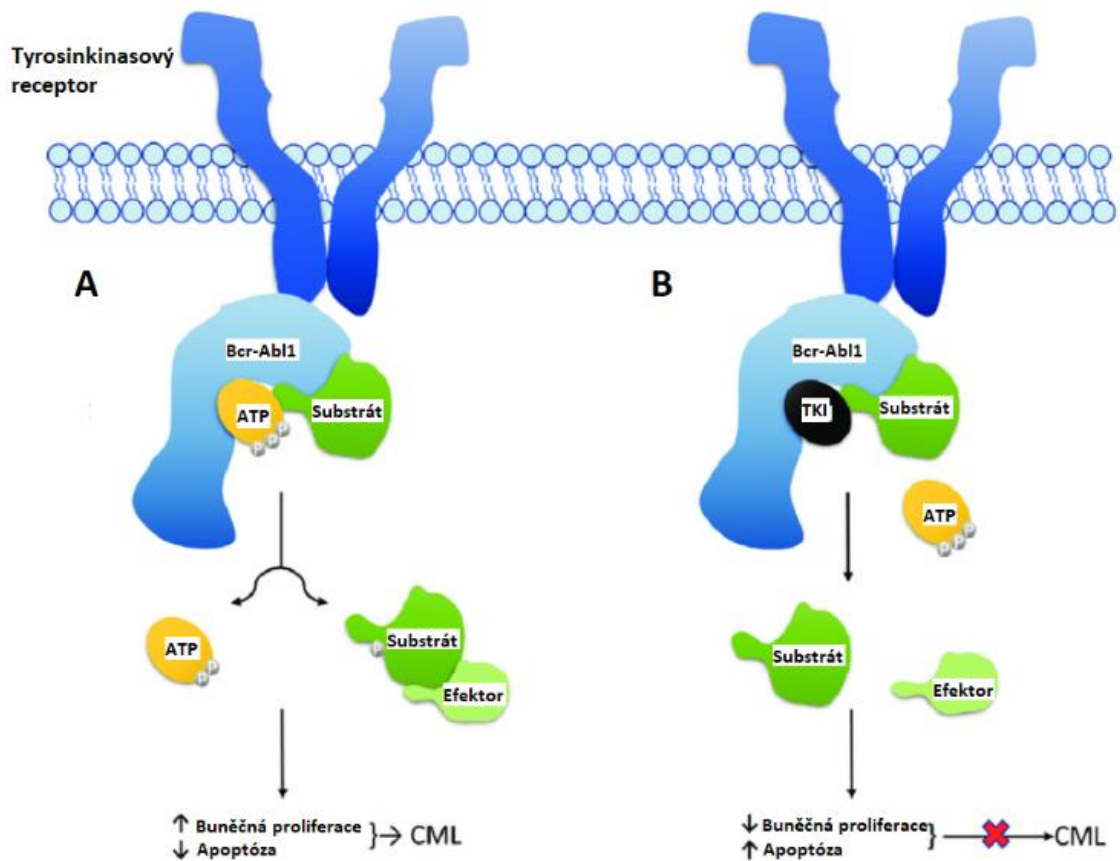
V roce 1998 nastal zásadní zlom díky novým molekulám, inhibitorům tyrosinkinas (TKI). Samotná tyrosinkinasová aktivita onkoproteinu *BCR-ABL1* je zásadní pro maligní transformaci krvetvorných buněk u CML (Lugo *et al.*, 1990). V klinické praxi se v současnosti používá pět TKI – imatinib, nilotinib, dasatinib, bosutinib a ponatinib (García-Gutiérrez & Hernández-Boluda, 2019). Výběr léčebného postupu závisí na aktuálním stavu pacienta a dalších okolnostech v době diagnózy, jako jsou komorbidity, fáze onemocnění, organomegalie.

Odpověď na léčbu TKI je velmi důležitý prognostický faktor. Za dobré výsledky se považuje dosažení kompletní cytogenetické odpovědi nebo vysoké molekulární odpovědi (Lugo *et al.*, 1990, Hochhaus *et al.*, 2020). Ideální je dosažení kompletní hematologické odpovědi po třech měsících léčby, kompletní cytogenetické odpovědi po šesti měsících a dosažení molekulární odpovědi do dvanácti měsíců od zahájení léčby (Izzo *et al.*, 2019). Možností volby je alogenní transplantace HSC, která byla využívána zejména v době před zavedením TKI. Využití této metody je ale výrazně limitováno vysokou posttransplantační mortalitou a komplikacemi s ní spojenými. V současnosti se využívá zejména pro mladší nemocné v pokročilejší fázi onemocnění (Kimura *et al.*, 2006).

2.6.1 Imatinib

Jako léčivo první volby ze skupiny TKI je používán imatinib. Imatinib byl vyvinut na počátku 90. let Lydonem a Drukerem. Působí inhibičně na tyrosinkinasovou aktivitu onkoproteinu Bcr-Abl1, ale bylo zjištěno, že inhibuje také jiné tyrosinkinasy, konkrétně PDGFR (Platelet-derived growth factor receptor) a c-KIT (Druker *et al.*, 1996; Druker & Lydon, 2000; O'Brien & Goldman, 2013).

Jedná se o 2-fenylaminopyrimidinovou sloučeninu, která inhibuje vazbu ATP (donoru fosfátu), na kinasovou doménu onkoproteinu (Carrol *et al.*, 1997). Imatinib působí jako kompetitivní inhibitor (Kennedy & Hobbs, 2018). Dochází k zablokování fosforylace dalších podřízených signálních transdukčních proteinů, které jsou zapojeny do leukemogeneze (Carrol *et al.*, 1997) (Obr. 7). Jeho vazba na neaktivní formu Bcr-Abl1 ji stabilizuje a výsledkem je apoptóza Bcr-Abl1 pozitivních buněk a zamezení jejich další proliferace (Aguilera & Tsimberidou, 2009).



Obr. 7: Mechanismus účinku Bcr-Abl1 tyrosinkinasy (A) a mechanismus účinku TKI (B) u onemocnění CML. Upraveno dle: Manouchehri *et al.*, 2019.

Velkým přínosem jsou pouze mírné vedlejší účinky (Kimura *et al.*, 2006). V některých případech se však mohou vyskytnout nežádoucí účinky, mezi nimiž dominuje nevolnost, únava nebo zvracení (O'Brien & Goldman, 2013).

Účinky imatinibu na všechna stádia CML byly prověřovány v mnoha klinických studiích. Ty ukázaly, že imatinib je méně účinný v akcelerované a blastické fázi v porovnání s pacienty v chronické fázi CML (Kimura *et al.*, 2006; Ottmann *et al.*, 2002).

2.6.1.1 Rezistence na imatinib

Většina pacientů v chronické fázi onemocnění léčených imatinibem odpovídá na léčbu do 12 měsíců poklesem hladiny transkriptu *BCR-ABL1* a normalizací krevního obrazu. U malého procenta pacientů v pokročilejší fázi onemocnění se může vytvořit rezistence na podávaný TKI (Ottmann *et al.*, 2002; Kimura *et al.*, 2006). U pacientů diagnostikovaných v chronické fázi CML, se míra rezistence na imatinib po čtyřech letech léčby pohybuje okolo 20 %, zatímco u pacientů v akcelerované nebo blastické fázi je tato hodnota 70–90 % (Druker *et al.*, 2006). Rezistenci na imatinib lze rozdělit

na primární a sekundární. Primární rezistenci označujeme stav, kdy se neprojeví odpověď na TKI z důvodu necitlivosti CML buněk. Sekundární rezistence se vyvíjí v průběhu terapie a je spojována zejména se vznikem bodových mutací v kinasové doméně Bcr-Abl1 (Tsimberidou, 2009).

Je popsáno několik mechanismů, které jsou za rezistenci zodpovědné. Jedná se o mechanismy zahrnující změnu rovnováhy ve prospěch aktivního stavu kinázy Abl1, posun rovnováhy mezi aktivním a neaktivním stavem nebo změna konformace proteinu Bcr-Abl1, která zabraňuje imatinibu v jeho navázání (Tsimberidou, 2009). Mezi další mechanismy náleží nadměrná amplifikaci genu (přidatný Ph chromozom), nadexprese P-glykoproteinu na povrchu CML buněk (Multi drug resistance protein), jehož substrátem je i imatinib (Arceci, 1993). Tento transportér je nadměrně exprimován zejména u pacientů v blastické fázi a podílí se tak nejen na rezistenci na imatinib, ale také souvisí s nižší účinností chemoterapie využívané v pokročilé fázi nemoci (Milojkovic & Apperley, 2009).

Dalším mechanismem je zvýšení množství $\alpha 1$ kyselého glykoproteinu (orosomukoid) v krevní plasmě, který váže imatinib a způsobuje snížení jeho koncentrace v extracelulárním prostoru a tím dostupnost léčiva v organismu (Kimura *et al.*, 2006; Tsimberidou, 2009). Určitá léčiva, jako je např. erythromycin, jsou schopna vytěsnit imatinib z vazby na tento glykoprotein (Fitos *et al.*, 2006).

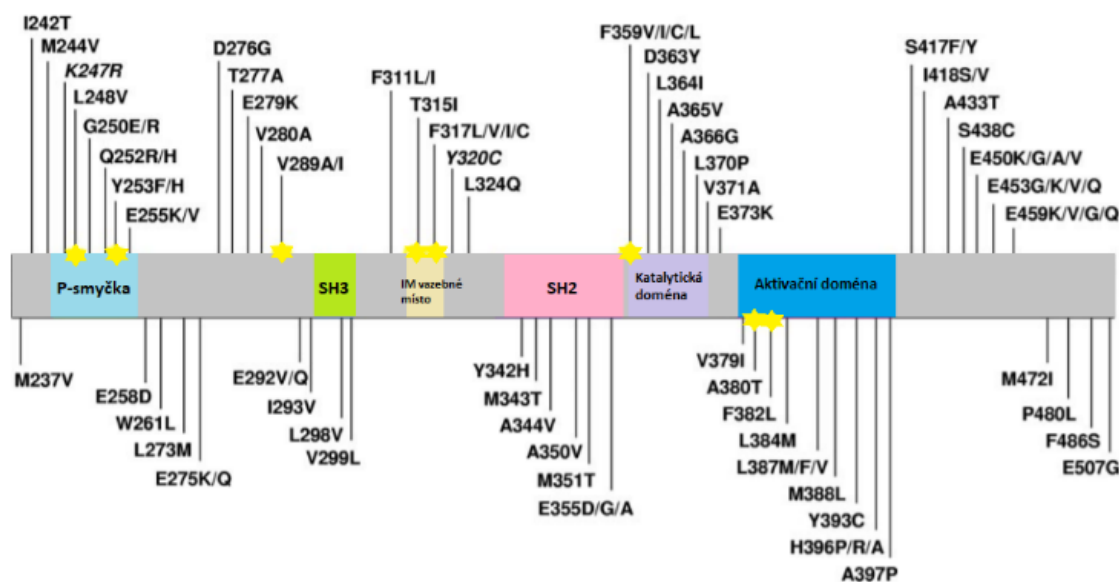
Další možnou příčinou nedostatečné koncentrace imatinibu v buňkách CML je přenašeč hOCT (human organic cation transporter). Jeho polymorfismy mohou ovlivňovat vstup imatinibu do buněk (Milojkovic & Apperley, 2009). Bylo prokázáno, že imatinib je substrátem pro hOCT1, ale ne pro hOCT2 nebo hOCT3. Protože hOCT1 zprostředkovává transport léčiva do buňky více než jeho eflux, jeho down-regulace může negativně ovlivnit odpověď na léčbu (Thomas, 2004).

K rezistenci na imatinib může přispívat nadexprese genů *LYN* (LYN proto-oncogene) a *HCK* (HCK proto-oncogene) (Donato *et al.*, 2003). Stabilizují aktivní konformaci Bcr-Abl1, na niž se imatinib není schopen vázat (Schindler *et al.*, 2000).

Primární selhání léčby imatinibem může být důsledkem přirozené necitlivosti klidových CML buněk na imatinib. Jedná se o buňky, které vstoupily do G0 fáze buněčného cyklu. Rezistence těchto klidových buněk je multifaktoriální a podíl na ní mají také pozměněné mechanismy influxu nebo efluxu léčiva (Milojkovic & Apperley, 2009).

Další faktor související s rezistencí je hladina proteinu Bcr-Abl1. Ta velmi úzce souvisí s rychlostí vzniku subklonů vykazujících rezistenci na imatinib. Bylo prokázáno, že buňky exprimující vysokou hladinu Bcr-Abl1 jsou mnohem méně citlivé na imatinib (Barnes *et al.*, 2005; Milojkovic & Apperley, 2009).

Nejvýznamnější příčinou vzniku rezistence na léčbu imatinibem jsou mutace v kinasové doméně *ABL1* (Obr. 8) (Kantarjian *et al.*, 2004), které interferují s vazbou imatinibu (Gupta *et al.*, 2016). Mechanismus vzniku těchto bodových mutací vede k záměně jedné aminokyseliny v kinasové doméně. Výsledkem je porušená schopnost léčiva vázat se v aktivním místě v důsledku ovlivnění postranních aminokyselinových zbytků důležitých pro kontakt s TKI. Kinasová aktivita proteinu zůstává zachována (Milojkovic & Apperley, 2009). Literatura udává incidenci mutací mezi 40–90 % v důsledku použití různých metod detekce, povahy rezistence a fáze onemocnění (Quintas-Cardama *et al.*, 2009). Bylo identifikováno více než sto různých bodových mutací, které způsobují různou míru rezistence k imatinibu (Corbin *et al.*, 2003). Některé mutace jsou příčinou rezistenci k TKI druhé generace (Corbin *et al.*, 2003; Soverini *et al.*, 2011). Nejčastěji se vyskytující mutací u pacientů léčených imatinibem je mutace T315I. Buňky s touto mutací jsou odolné vůči všem TKI s výjimkou ponatinibu (Milojkovic & Apperley, 2009). V případě této mutace je aminokyselina threonin



Obr. 8: Mapa aminokyselinových substitucí v *Bcr-Abl1* kinasové doméně. Barevně jsou označeny důležité části kinasové domény. Hvězdičky označují polohu aminokyselin, které se přímo účastní vazby imatinibu vodíkovými vazbami nebo van der Waalsovými interakcemi. Upraveno dle Soverini *et al.*, 2011.

v pozici 315 exonu 6 genu *Abl1* zaměněna za isoleucin, což znemožní inhibitorům první a druhé generace se zde vázat. Mutace tak stericky zabraňuje vazbě TKI ovlivněním trojrozměrné konformace katalytického místa (Liu *et al.*, 2020).

Rozlišujeme čtyři místa nejčastějšího výskytu bodových mutací souvisejících s rezistencí vůči imatinibu. První ovlivňují vazebné místo pro imatinib, druhé *P-loop* (ATP vazebné místo), třetí katalytickou doménu a poslední aktivační smyčku (Obr. 8). Mutace v oblasti *P-loop* tvoří téměř 48 % všech mutací rezistence na imatinib (Soverini *et al.*, 2006). Aktivační smyčka *Abl1* kinasy je důležitou regulační doménou. Mutace v ní přispívají ke vzniku otevřené aktivní konformace. Pro aktivitu imatinibu je potřebná uzavřená aktivní konformace (Milojkovic & Apperley, 2009; Soverini *et al.*, 2006).

Rezistence na imatinib může být řešena různými způsoby s ohledem na její mechanismus. Možností je zvýšení dávky, jeho kombinace s jinými látkami nebo zvolení jiného typu inhibitoru (Kimura *et al.*, 2006).

2.6.2 Další inhibitory tyrosinkinasy

Rezistence na imatinib vedla k vývoji nových inhibitorů tyrosinkinasy (Tab. 1). Dasatinib se řadí mezi TKI druhé generace a jeho struktura není odvozena od imatinibu. Výhodou je až 325× vyšší účinnost ve srovnání s imatinibem. Rovněž vykazuje aktivitu u buněk s bodovými mutacemi vyskytujícími se v *Abl1* kinasové doméně. Dasatinib je také schopen cílit na kinasy rodiny SRC, které jsou zapojeny do rezistence na imatinib a také na tyrosinkinasy KIT, PDGFR α/β a tyrosinkinasy ephrinového receptoru (Shah *et al.*, 2004). Dasatinib lze indikovat u pacientů s CML, jež jsou rezistentní nebo intolerantní k imatinibu (Hochhaus *et al.*, 2008) a je vhodným léčivem pro pacienty jak v chronické, blastické, tak i akcelerované fázi onemocnění (Aguilera & Tsimberidou, 2009).

Nilotinib je stejně jako dasatinib řazen mezi TKI druhé generace. Jeho chemická struktura vychází ze struktury imatinibu a byl vyvinut za účelem optimalizace vazby na doménu Bcr-*Abl1*. Ve srovnání s imatinibem je nilotinib 30× účinnější a efektivně účinkuje na řadu bodových mutací kinasové domény Bcr-*Abl1*. Nižší účinnost vykazuje proti tyrosinkinám KIT a PDGFR. Bosutinib není strukturně příbuzný imatinibu. Jedná se o 4-anilino-3-chinolinkarbonitril. Pokud srovnáme jeho účinek s imatinibem, inhibuje Bcr-*Abl1* s vyšší účinností. Váže se na aktivní i neaktivní konformaci kinasové domény

a je schopný cílit i na mutace v kinasové doméně. Naopak je neúčinný vůči tyrosinkinasám PDGFR a KIT (Manley *et al.*, 2005). Ponatinib byl vyvinut k zacílení mutace T315I. Pacienti s touto mutací jsou rezistentní na všechny již zmíněné TKI. Stejně tak je účinný v inhibici dalších tyrosinkinas SRC, *VEGF* (Vascular endothelial growth factor), *FGFR* (Fibroblast growth factor receptor) a *PDGFR* (Gorre *et al.*, 2001).

Tab. 1: Přehled dostupných inhibitorů k léčbě CML a bodových mutací, které zapříčiňují rezistenci k jednotlivým inhibitorům. Upraveno dle Soverini *et al.*, 2019.

Inhibitor	Mutace, které jsou málo citlivé na příslušný inhibitor
Imatinib	M237V, I242T, M244V, K247R, L248V, G250E, G250R, Q252R, Q252H, Y253F, Y253H, E255K, E255V, E258D, W261L, L273M, E275K, E275Q, D276G, T277A, E279K, V280A, V289I, V289I, V289A, E292Q, E292V, I293V, L298V, F311L, F311I, T315I , F317L, F317V, F317I, F317C, Y320C, L324Q, Y342H, M343T, A344V, A350V, M351T, E355D, E355G, E355A, F359V, F359I, F359C, F359L, D363Y, L364I, A365V, A366G, L370P, V371A, E373K, V379I, A380T, F382L, L384M, L387F, L387V, M388L, H396R, H396P, H396A, A397P, S417F, S417Y, I418S, I418V, A433T, S438C, E450K, E450G, E450A, E450V, E453G, E453A, E453K, E453V, E453Q, E459K, E459V, E459G, E459Q, M472I, P480L, F486S
Dasatinib	V299L, T315I , T315A, F317L, F317V, F317I, F317C
Nilotinib	Y253H, E255K, E255V, T315I , F359V, F359I, F359C
Bosutinib	E255V, E255K, V299L, T315I
Ponatinib	T315M, T315L

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Soubor pacientů

Soubor tvořilo 14 pacientů (9 mužů a 5 žen), z nichž 12 bylo diagnostikováno a léčeno s CML a 2 pacienti byli léčeni s Ph+ ALL (akutní lymfoblastická leukémie) na Hemato-onkologické klinice FN a LF UP v Olomouci. Průměrný věk, ve kterém bylo pacientům onemocnění CML diagnostikováno, byl 58 let. Oba pacienti s diagnózou Ph+ ALL podstoupili alogenní transplantaci krvetvorných buněk a následně jim byla indikována udržovací léčba imatinibem, na který se u nich v průběhu léčby vyvinula rezistence.

V rámci experimentální části práce byly využity vzorky RNA izolované z periferní krve. Veškeré analýzy byly provedeny retrospektivně ze vzorků, které byly k dispozici.

3.2 Materiály

3.2.1 Komerčně dostupné chemikálie a roztoky

- Agarosa I (Amresco, USA)
- AmpliTaq Gold DNA Polymerase with Buffer II and MgCl₂ (ThermoFisher Scientific, USA)
- Ethidium bromid (10 g·l⁻¹, Promega, USA)
- High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, USA)
- Marker molekulových hmotností 100 bp DNA Ladder (Promega, USA)
- Nanášecí pufr 6x (Promega, USA)
- Nukleotidy dATP, dCTP, dGTP, dTTP (100 mmol·l⁻¹, Promega, USA)
- Parafínový olej (Lékárna FNOL)
- Primery
- QIAcuity Probe PCR Kit (QIAGEN, Německo)
- QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Německo)
- Qubit dsDNA HS Assay Kits (ThermoFisher Scientific, USA)
- Ultračistá voda

3.2.2 Přístroje

- Centrifuga 5424 (Eppendorf, Německo)
- Centrifuga 5430R (Eppendorf, Německo)

- Centrifuga XX-400 (Palm series)
- Centrifuga Z 323 K (Hermle, Německo)
- Laboratorní mraznička (Liebherr, Německo)
- Laboratorní váhy FA200 (Salter, USA)
- Mikrovlnná trouba (ECG, Česká republika)
- Pipety (Eppendorf, Německo)
- QIAcuity dPCR system (QIAGEN, Německo)
- Qubit fluorometr (Invitrogen, USA)
- Sestava pro horizontální elektroforézu (Schoeller, Česká republika)
- Termoblok Mini Dry Bath (Benchmark Scientific, USA)
- Termobloky (Biosan, Lotyšsko)
- Thermocycler Peqstar (Peqlab, Německo)
- Tiskárna P93DW (Mitsubishi Electric, Japonsko)
- UV transiluminátor (Vilber Lourmat, Francie)
- UV transiluminátor s dokumentačním zařízením (AlphaDigiDoc RT2 (Alpha Innotech, USA)
- Vortex (VWR, USA)
- Výrobek ledu Icematic F100 Compact (CastellIMAC Spa, Itálie)
- Zařízení na úpravu vody Direct-Q 3UV (Millipore, USA)
- Zdroj napětí pro elektroforézu VWR power source (VWR, USA)

3.2.3 Laboratorní materiál

- Centrifugační zkumavky
- Čipy QIAcuity Nanoplate 26k 24-well a fólie pro dPCR (QIAGEN, Německo)
- Epoxidový váleček
- Erlenmayerovy baňky
- Mikrozukavky (Eppendorf, Německo)
- Nitrilové rukavice
- Plastové Pasteurovy pipety
- Plastové stojany na mikrozukavky
- Špičky s filtrem (Eppendorf, Německo)

3.3 Metody

3.3.1 Reverzní transkripce RNA na cDNA

Podle naměřené koncentrace RNA byl stanoven její vstupní objem tak, aby v reakci bylo 1000 ng. Do 0,5 ml mikrozkuřavky bylo postupně pro každý vzorek napipetováno 10 μ l RT-pufu (Applied Biotechnologies), ultračistá voda, RNA a jako poslední 1 μ l enzymu reverzní transkriptasy. Objem vody je variabilní a závisí na objemu RNA. Celkový objem reakce vždy činil 20 μ l.

Mikrozkuřavky byly umístěny do termobloku nastaveného na 37 °C a inkubovány po dobu 1 hodiny. Následně byla provedena inaktivace reverzní transkriptasy v termobloku nastaveném na 95 °C po dobu 5 minut.

3.3.2 Amplifikace *BCR-ABL1* kinasové domény pomocí nested PCR

Výchozím templátem pro amplifikaci sekvence kinasové domény genu *BCR-ABL1* byla cDNA. Využita byla metoda nested PCR, konkrétně její dvoukolová verze podle Soverini *et al.* (2011).

Pro provedení nested PCR byly nejprve připraveny oba *mastermixy* (pro první i druhé kolo PCR reakce) pro příslušný počet vzorků. Pro první kolo nested PCR bylo do mikrozkuřavek o objemu 0,2 ml přidáno 23 μ l připraveného *mastermixu* (Tab. 2) a 2 μ l cDNA. Reakce byla převrstvena kapkou parafinového oleje. Mikrozkuřavky byly krátce zcentrifugovány na stolní centrifuze a umístěny do termocycleru, na kterém byl zvolen příslušný program (Tab. 3).

Po provedení prvního kola nested PCR byly připraveny vzorky pro druhé kolo reakce. K 24 μ l *mastermixu* (Tab. 4) byl přidán 1 μ l produktu z prvního kola PCR. Reakce byla převrstvena kapkou parafinového oleje. Mikrozkuřavky se vzorky byly krátce stočeny na stolní centrifuze a umístěny do termocycleru, na kterém byl zvolen příslušný program pro druhé kolo nested PCR (Tab. 5). Sekvence použitých primerů jsou uvedeny v Tab. 6.

Tab. 2: Reagencie pro první kolo nested PCR pro amplifikaci genu *BCR-ABL1*.

Reagencie	Objem na 1 vzorek (μl)
TK-H ₂ O	17,4
Pufr II (10 \times)	2,5
MgCl ₂ (25 mmol \cdot l ⁻¹)	2,0
dNTPs mix (10 mmol \cdot l ⁻¹)	0,5
Primer B/A F1 (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	0,2
Primer B/A R1 (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	0,2
Gold polymerasa (5 U $\cdot\mu\text{l}^{-1}$)	0,2
cDNA	2,0

Tab. 3: Teplotní profil reakce pro první kolo nested PCR.

Fáze reakce	Teplota	Doba trvání	Opakování
Úvodní denaturace	95 °C	7 min	
Denaturace	95 °C	1 min	
<i>Annealing</i>	50 °C	1 min	35 \times
Extenze	72 °C	3 min	
Závěrečná extenze	72 °C	10 min	
	4 °C	∞	

Tab. 4: Reagencie pro druhé kolo nested PCR pro amplifikaci genu *BCR-ABL1*.

Reagencie	Objem na 1 vzorek (μl)
TK-H ₂ O	18,4
Pufr II (10 \times)	2,5
MgCl ₂ (25 mmol \cdot l ⁻¹)	2,0
dNTPs mix (10 mmol \cdot l ⁻¹)	0,5
Primer B/A F1 (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	0,2
Primer B/A R1 (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	0,2
Gold polymerasa (5 U $\cdot\mu\text{l}^{-1}$)	0,2
Produkt prvního kola reakce	1,0

Tab. 5: Teplotní profil reakce pro druhé kolo nested PCR.

Fáze reakce	Teplota	Doba trvání	Opakování
Úvodní denaturace	95 °C	7 min	
Denaturace	95 °C	1 min	
Annealing	57 °C	1 min	35×
Extenze	72 °C	3 min	
Závěrečná extenze	72 °C	10 min	
	4 °C	∞	

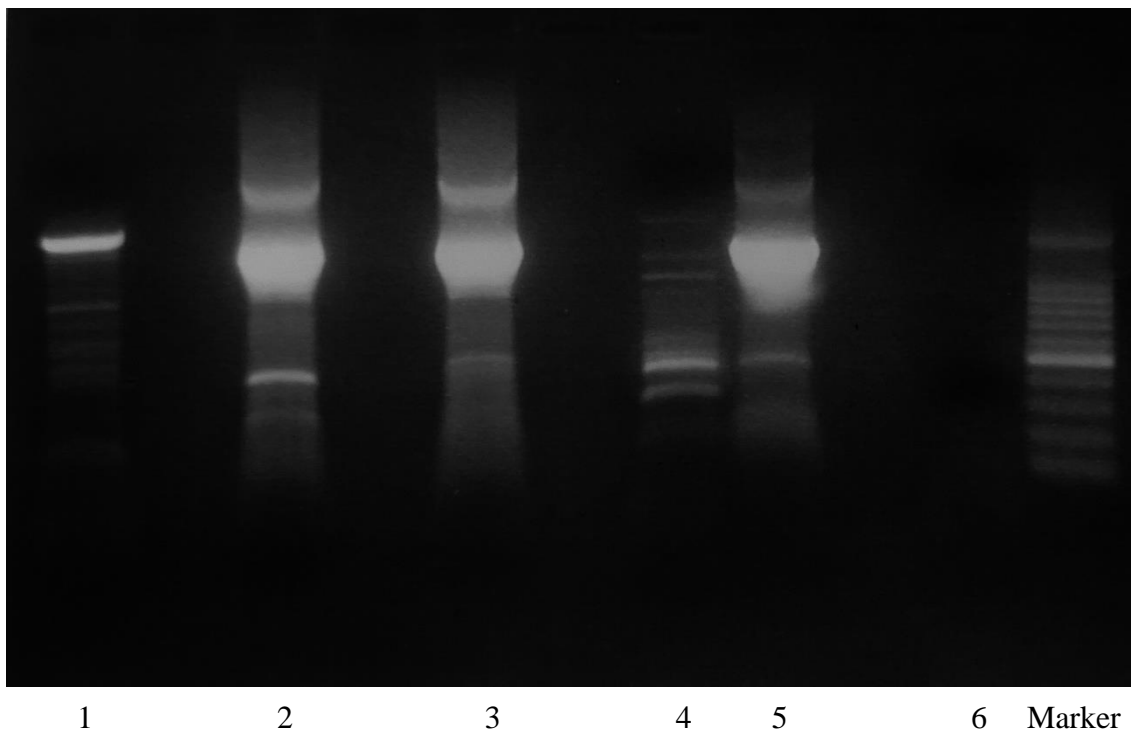
Tab. 6: Sekvence primerů pro první a druhé kolo nested PCR.

Primer	Sekvence primeru
B/A F1	5'-GCT ACG GAG AGG CTG AAG AAG-3'
B/A R1	5'-GCT CGC ATG AGT TCA TAG ACC-3'
B/A F2	5'-CAG ATG CTG ACC AAC TCG TGT-3'
B/A R2	5'-CTT CTC TAG CAG CTC ATA CAC C-3'

3.3.3 Elektroforetická separace PCR produktů

Po provedení druhého kola nested PCR byly produkty obou kol reakcí nanášeny na 1% agarosový gel. Pro přípravu gelu byl 1 g agarosy v Erlenmayerově baňce doplněn 100 ml TBE pufru. Agarosa byla rozvařena v mikrovlnné troubě, v průběhu rozpouštění byl roztok několikrát promíchán. Následně byl roztok ochlazen na teplotu přibližně 45 °C a bylo přidáno 7 µl ethidium bromidu. Takto připravený roztok byl nalit do připravené elektroforetické vany, a nakonec byly umístěny příslušné hřebeny pro vytvoření jamek v gelu.

Po zatuhnutí gelu (přibližně 30 minut) bylo do jamek nanášeno 18 µl PCR produktu spolu se 4 µl nanášecí barvy (6xOrange Loading Dye). Do poslední jamky bylo nanášeno 7 µl markeru molekulových hmotností. Po proběhnutí elektroforézy (100 V, 1 hodina) byl gel vyjmut a přenesen na UV transiluminátor. V dalším kroku byl z gelu pod UV světlem vyřezán specifický produkt PCR reakce a přemístěn do 1,5 ml mikrozkušavky (Obr. 9).



Obr. 9: Elektroforetická separace produktů nested PCR. Do jamky č. 1 byl nanesen produkt prvního kola nested PCR, jehož molekulová hmotnost je vyšší, než je tomu u produktů druhého kola nested PCR (jamky č. 2, 3, 5). Do jamky č. 4 byl nanesen rovněž produkt druhého kola nested PCR, ovšem jeho amplifikace nebyla dostatečná. Do jamky č. 6 byl nanesen pouze *mastermix* bez obsahu vzorku jako netemplátová kontrola. V poslední jamce bylo nanesen 7 μ l markeru molekulových hmotností. Velikost produktů prvního kola reakce: 1616 bp v případě transkriptu b2a2, 1691 bp v případě transkriptu b2a3. Velikost produktů druhého kola reakce: 1334 bp v případě transkriptu b2a2, 1409 bp v případě transkriptu b2a3.

3.3.4 Purifikace PCR produktu z gelu

PCR produkt byl purifikován z gelu za pomoci komerčního kitu QIAquick Gel Extraction Kit dle návodu výrobce. K vyříznutému gelu s PCR produktem bylo přidáno 600 μ l QG pufru. Vzorky byly inkubovány v termobloku při 50 °C po dobu 10 minut do úplného rozpuštění gelu.

Celý objem vzorku byl vždy přenesen na kolonku a centrifugován 1 minutu při 13 000 rpm. Po centrifugaci byl obsah eluční zkumavky odstraněn. Následně bylo na kolonku nanášeno 500 μ l QG pufru, vzorek byl opět centrifugován 1 minutu při 13 000 rpm a obsah z eluční zkumavky byl odstraněn. V následujícím kroku bylo přidáno 725 μ l promývacího PE pufru. Vzorek byl centrifugován 1 minutu při 13 000 rpm a obsah ze sběrné zkumavky byl odstraněn. Poté byla kolonka centrifugována po dobu 2 minut při 13 000 rpm. Kolonka byla přenesena do nové 1,5 ml mikrozkušavky.

Na fritku kolonky bylo nanášeno 40 µl elučního EB pufru. Vzorek byl inkubován 3 minuty při laboratorní teplotě a následně centrifugován 1,5 minuty při 13 000 rpm. Obsah eluční zkumavky s purifikovaným PCR produktem byl přenesen do čisté a označené 1,5 ml mikrozukavky.

3.3.5 Stanovení koncentrace eluovaného PCR produktu

Po purifikaci specifického PCR produktu byla změřena jeho koncentrace fluorometrem Qubit (Invitrogen) a komerčním kitem Qubit dsDNA HS Assay Kits (Invitrogen).

Pro každý vzorek bylo připraveno 200 µl pracovního roztoku smícháním 199 µl Qubit dsDNA HS pufru a 1 µl Qubit dsDNA HS reagentu, což je fluorescenční barvivo. Pro vlastní měření vzorků byly připraveny 0,5 ml mikrozukavky, do nichž bylo přidáno 198 µl připraveného pracovního roztoku a 2 µl PCR produktu. Obsah mikrozukavek byl zvortexován (3 sekundy) a následně inkubován při laboratorní teplotě 2 minuty. Poté byla změřena koncentrace specifického PCR produktu na přístroji Qubit.

3.3.6 Optimalizace metody dPCR

Optimalizace metody dPCR pro detekci bodové mutace T315I v kinasové doméně genu *BCR-ABL1* byla provedena na přístroji QIAcuity Digital PCR System. V rámci optimalizace metody byla stanovena optimální koncentrace templátu, *false rate* a citlivost metody. Specifické primery a TaqMan sondy značené fluorofory FAM (karboxyfluorescein pro MT) a HEX (hexachlorfluorescein pro WT) byly navrženy vedoucím práce (Tab. 7). Přístroj QIAcuity Digital PCR System využívá specifické čipy QIAcuity Nanoplate 26k 24-well, ve kterých je schopen vytvořit až 26 000 mikroreakcí o objemu 0,91 nl.

Tab. 7: Sekvence primerů a sond pro detekci mutace T315I a pro detekci WT alely pomocí dPCR.

	Sekvence
Primer ABL F	5'-TGA AAG AGA TCA AAC ACC CT-3'
Primer ABL R	5'-TCA GGT AGT CCA GGA GGT T-3'
Sonda pro mutaci T315I	5'-6-FAM-CC CCG TTC TAT ATC ATC ATT GAG TTC AT-BHQ-1-3'
Sonda pro WT	5'-6-HEX-CC CCG TTC TAT ATC ATC ACT GAG TTC AT-BHQ-1-3'

3.3.6.1 Stanovení optimální koncentrace

Prvním experimentem bylo provedení koncentrační řady pro stanovení optimální koncentrace templátu pro dPCR. Cílem bylo zjistit, jak koncentrace ovlivňuje rozdělení jednotlivých populací.

Vzorky byly připraveny tzv. *spikováním* v poměru 1:1 ze vzorku se 100% mutací T315I a vzorku s WT *ABL1* kinasovou doménou na výchozí koncentraci $7 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$, $6 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$, $5 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$, $4 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ a $3 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$, které byly následně desítkovým ředěním naředěny až na $0,07 \text{ pg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$, $0,06 \text{ pg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$, $0,05 \text{ pg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$, $0,04 \text{ pg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ a $0,03 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$. Vzorky pozitivní (PK) a negativní kontroly (NK) byly naředěny na $0,05 \text{ pg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$. Vzorky byly na čip nanесeny v triplikátech, jako NTC (netemplátová kontrola, *no template control*) byla použita voda. *Mastermix* pro dPCR byl připraven podle návodu výrobce (Tab. 8). Takto připravené vzorky byly přeneseny do jednotlivých pozic na čipu a ten byl následně přelepen speciální folií. Takto připravený čip byl vložen do přístroje QIAcuity, na kterém byl nastaven příslušný program (Tab. 9). Výsledky byly vyhodnoceny v programu QIAcuity Software Suite 1.2.18.

Tab. 8: Reagencie pro dPCR pro detekci mutace T315I v kinasové doméně genu *BCR-ABL1*.

Reagencie	Objem na 1 vzorek (μl)
TK voda	28
4× <i>mastermix</i> (Qiagen)	10
Forward primer ($8 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	0,32
Reverse primer ($8 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	0,32
Sonda pro WT sekvenci ($4 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	0,16
Sonda pro MT sekvenci ($4 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	0,16
Specifický PCR produkt	1

Tab. 9: Teplotní profil reakce pro detekci mutace T315I v kinasové doméně genu *BCR-ABL1* pomocí dPCR.

Fáze reakce	Teplota	Doba trvání	Opakování
Počáteční aktivace	95 °C	10 min	40×
Denaturace	94 °C	30 s	
Hybridizace/Extenze	59 °C	1 min	

3.3.6.2 Stanovení *false rate* (specificity) metody dPCR

False rate byl stanoven pro ověření specificity sond pro WT a MT sekvenci. Byl zjištěn počet nespecifických amplifikací. Na čip byly naneseny vzorky se 100% mutací T315I (PK) o koncentraci $0,05 \text{ pg} \cdot \mu\text{l}^{-1}$, vzorky s WT *ABL1* kinasové domény (NK) o koncentraci $0,05 \text{ pg} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ a voda jako NTC, vždy v osmi replikátech. Příprava *mastermixu* i teplotní profil reakce byly stejné jako u stanovení optimální koncentrace.

3.3.6.3 Stanovení citlivosti metody dPCR

Pro stanovení citlivosti metody dPCR byly nachystány vzorky naředěním PCR produktu z *BCR-ABL1* pozitivního vzorku se 100% zastoupením mutované alely (MT) T315I do *BCR-ABL1* pozitivního vzorku s WT *ABL1* kinasové domény v různých poměrech. Jednalo se o vzorky naředěné na 100 %; 50 %; 20 %; 10 %; 5 %; 1 %; 0,5 %; 0,2 %; 0,1 %, 0,05 %; 0,01 % a 0 % MT alely T315I o výsledné koncentraci $0,05 \text{ pg} \cdot \mu\text{l}^{-1}$. Příprava *mastermixu* i teplotní profil reakce byly stejné jako u stanovení optimální koncentrace.

3.3.6.4 Detekce mutace T315I u vybrané skupiny pacientů

Pro detekci mutace T315I v genu *BCR-ABL1* byly vybrány vzorky 14 pacientů. U některých byla detekce mutace provedena ve více odběrech z průběhu léčby. Vzorky PCR produktů jako templát pro dPCR byly připraveny naředěním na požadovanou koncentraci ($0,05 \text{ pg} \cdot \mu\text{l}^{-1}$) a na čip byly naneseny v duplikátech. Příprava *mastermixu* i teplotní profil reakce byly stejné jako u stanovení optimální koncentrace.

4 VÝSLEDKY

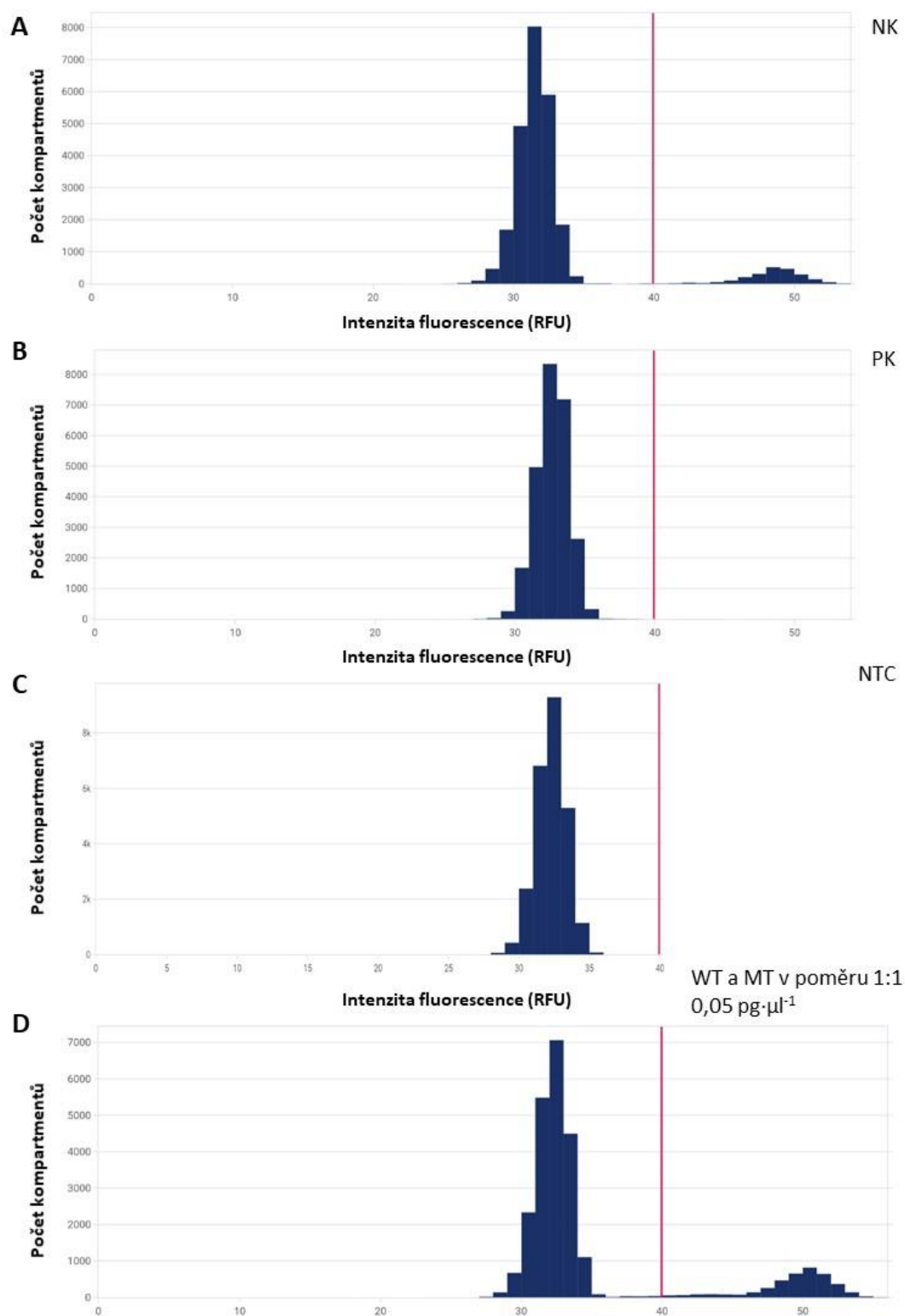
V rámci experimentální části této práce byla optimalizována metoda dPCR pro detekci mutace T315I v kinasové doméně genu *BCR-ABL1* na přístroji QIAcuity Digital PCR System. Následně bylo touto metodou vyšetřeno 28 vzorků celkem od 14 pacientů.

4.1 Optimalizace metody dPCR

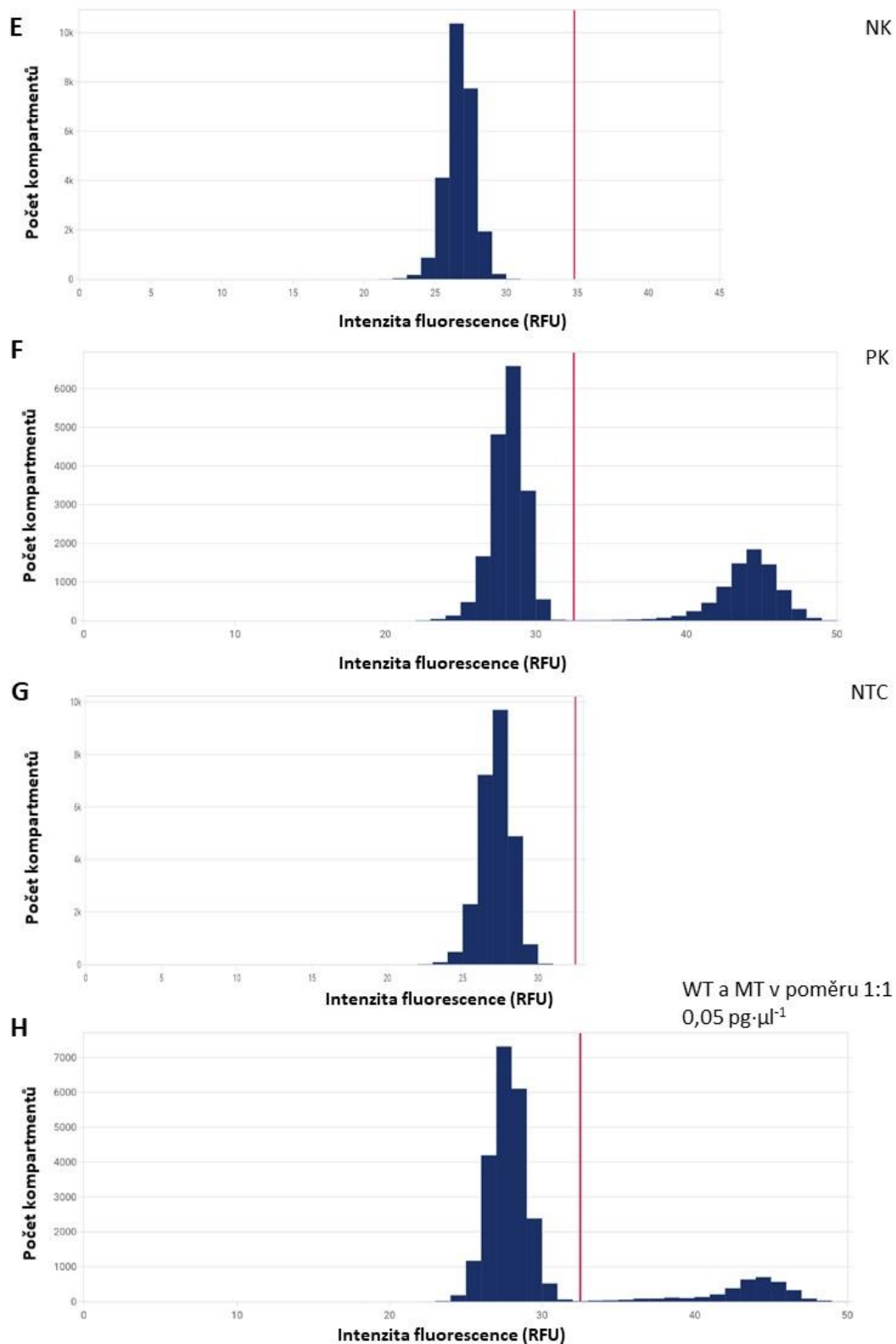
4.1.1 Stanovení optimální koncentrace vzorku

Nejdříve byl nastaven *cut-off* pro fluorescenci obou sond. Obr. 10A představuje histogramy vzorku NK ($0,05 \text{ pg} \cdot \mu\text{l}^{-1}$), vzorku PK ($0,05 \text{ pg} \cdot \mu\text{l}^{-1}$), NTC a vzorku připraveného ředěním MT a WT v poměru 1:1 ve žlutém kanálu, ve kterém je detekována WT sekvence. V případě vzorku NK (Obr. 10A, A) lze jasně vidět dvě oddělené populace. *Cut-off* byl nastaven jako 40 RFU (relativní fluorescenční jednotka). U vzorku PK a NTC není přítomná žádná fluorescence z WT sondy. U vzorku připraveného ředěním WT a MT v poměru 1:1 (Obr. 10A, D) lze pozorovat fluorescenční signál ve žlutém kanálu. V případě PK a NTC nebyla ve žlutém kanálu detekována druhá populace.

Obr. 10B znázorňuje histogramy vzorku NK ($0,05 \text{ pg} \cdot \mu\text{l}^{-1}$), vzorku PK ($0,05 \text{ pg} \cdot \mu\text{l}^{-1}$), NTC a vzorku připraveného ředěním vzorku MT a vzorku WT v poměru 1:1 v zeleném kanálu, ve kterém je naopak detekována MT sekvence. Zde byly pozitivní signály zaznamenány u vzorku PK s jasně definovanou fluorescencí druhé populace (Obr. 10B, F). *Cut-off* byl nastaven na 32 RFU. Oddělení populací je vidět také u vzorku připraveného ředěním WT vzorku a MT vzorku v poměru 1:1 o výsledné koncentraci $0,05 \text{ pg} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ (Obr. 10B, H). Tento vzorek byl pozitivní pro oba sledované kanály. V případě NK a NTC nebylo v zeleném kanálu detekováno oddělení dvou populací.



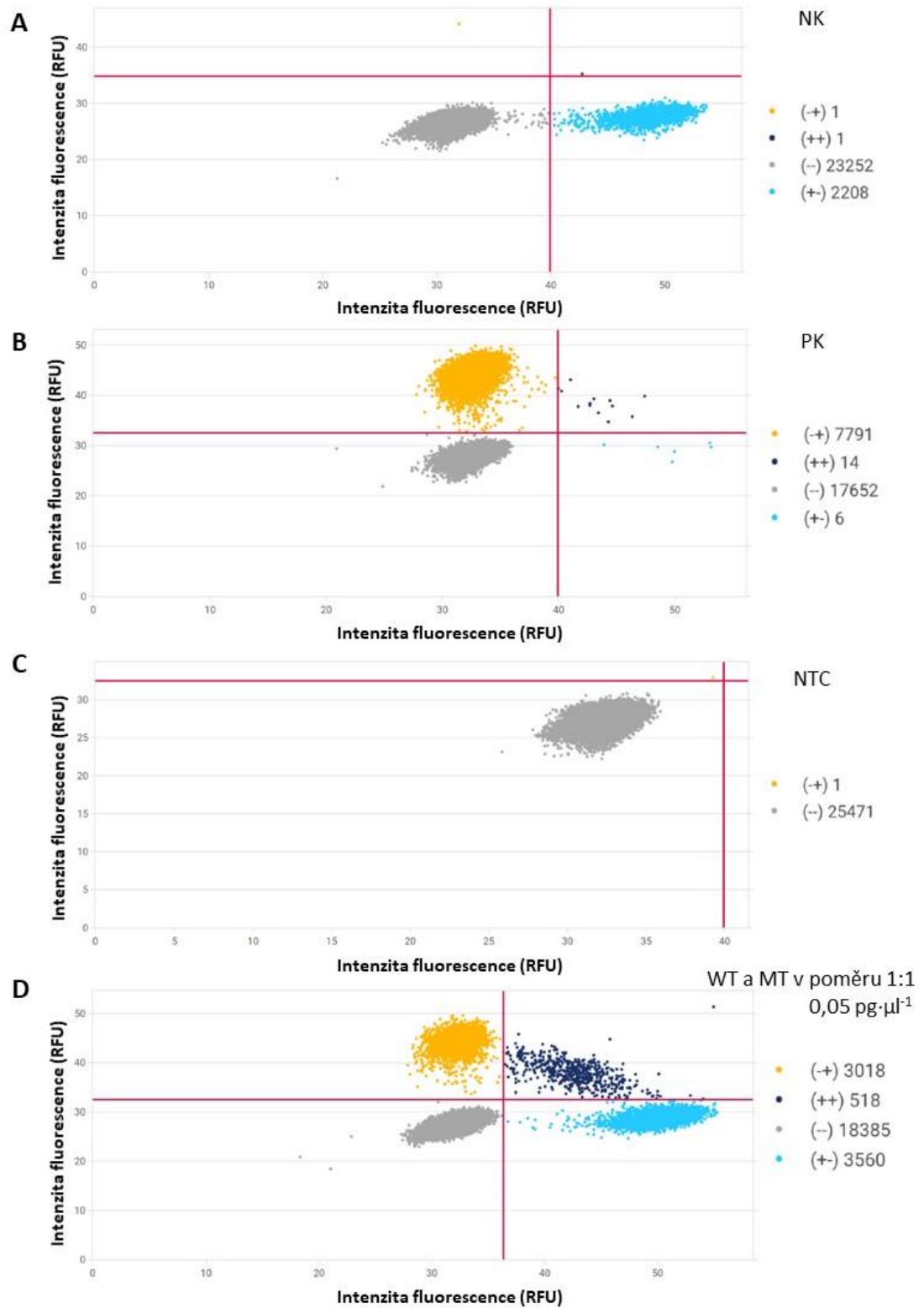
Obr. 10A: Histogramy představující vzorek NK o koncentraci 0,05 pg·μl⁻¹ (A), vzorek PK o koncentraci 0,05 pg·μl⁻¹ (B), vodu (C) a vzorek připravený z *BCR-ABL1* pozitivního vzorku se 100% mutací T315I a *BCR-ABL1* pozitivního vzorku s WT *ABL1* kinasové domény ředěním v poměru 1:1 na výslednou koncentraci 0,05 pg·μl⁻¹ (D). Detekce fluorescenčního signálu ve žlutém kanálu, detekována je tedy WT sekvence.



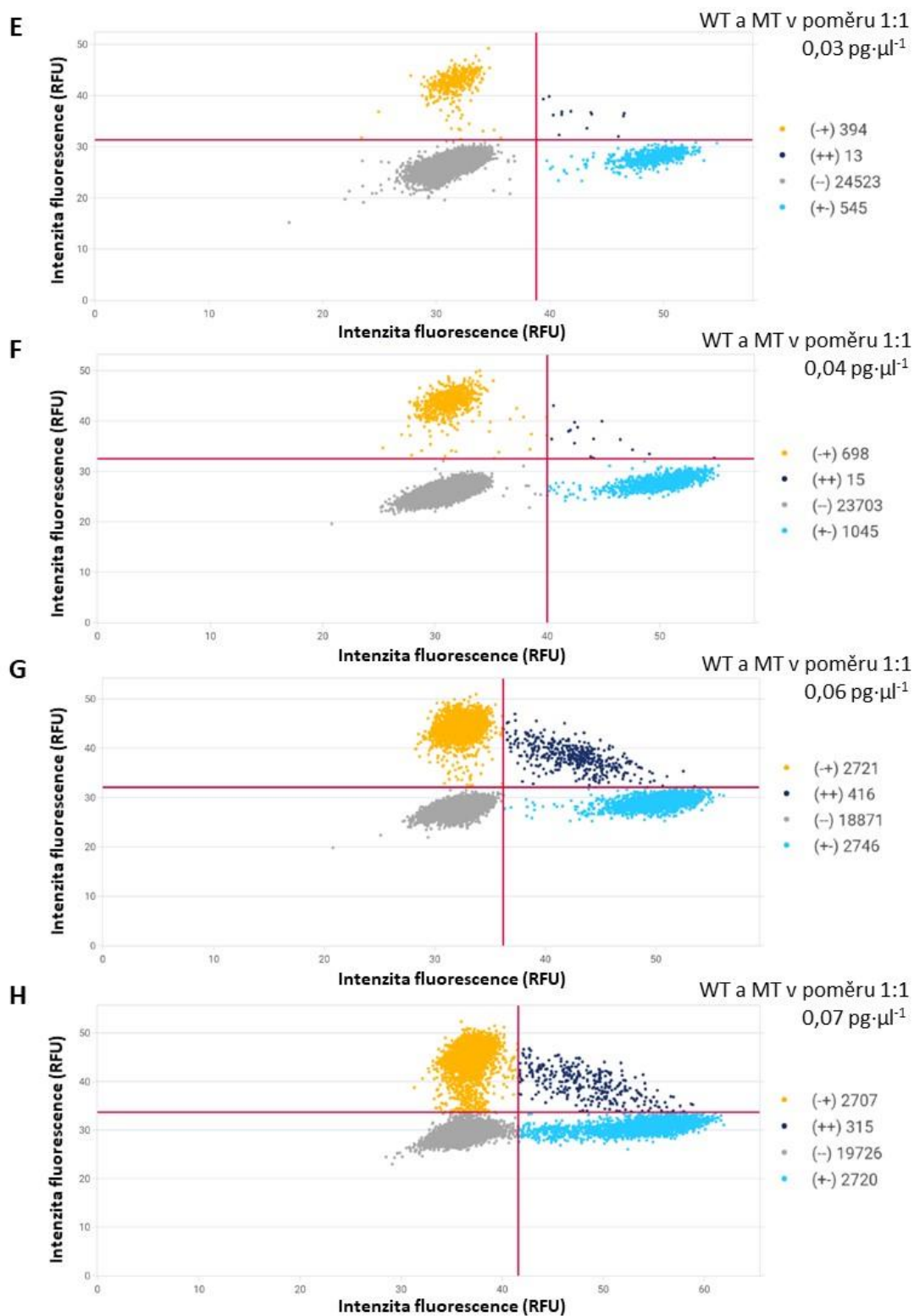
Obr. 10B: Histogramy představující vzorek NK o koncentraci 0,05 pg·μl⁻¹ (E), vzorek PK o koncentraci 0,05 pg·μl⁻¹ (F), NTC (G) a vzorek připravený z *BCR-ABL1* pozitivního vzorku se 100% mutací T315I a *BCR-ABL1* pozitivního vzorku s WT *ABL1* kinasové domény ředěním v poměru 1:1 na výslednou koncentraci 0,05 pg·μl⁻¹ (H). Detekce fluorescenčního signálu v zeleném kanálu, detekována je tedy MT sekvence.

V dalším experimentu byla stanovena optimální koncentrace pomocí ředící řady. Analyzovány byly vzorky specifického PCR produktu z *BCR-ABL1* pozitivního vzorku se 100% podílem MT alely T315I a *BCR-ABL1* pozitivního vzorku s WT *ABL1* kinasovou doménou ředěním v poměru 1:1 na výsledné koncentrace $0,07 \text{ pg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$, $0,06 \text{ pg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$, $0,05 \text{ pg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$, $0,04 \text{ pg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ a $0,03 \text{ pg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$.

Na obrázku č. 11A lze vidět výstupy ve formátu 2D *scatterplotů* představující vzorek NK ($0,05 \text{ pg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$), vzorek PK ($0,05 \text{ pg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$), NTC a vzorek připravený ředěním WT vzorku a MT vzorku v poměru 1:1 o výsledné koncentraci $0,05 \text{ pg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$. V případě vzorku NK byl detekován fluorescenční signál v zeleném kanálu u dvou falešně pozitivních kompartmentů, což odpovídá $0,107 \text{ kopiím}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ (Obr. 11A, A). Při detekci mutace T315I u vzorku se 100% mutací (PK), bylo detekováno 20 kompartmentů pozitivních na fluorescenční signál ve žlutém kanálu, což odpovídá koncentraci $1,1 \text{ kopií}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ (Obr. 11A, B). Důvodem může být přítomnost nespecifické amplifikace nebo přítomnost reziduálního WT subklonu ve vzorku. Je tedy možné, že WT sekvence mohla být v minimálním zastoupení ve vzorku přítomna. Ve vzorku NTC byl detekován fluorescenční signál v zeleném kanálu z jednoho kompartmentu, což lze přisuzovat kontaminaci (Obr. 11A, C). Dále byla detekována mutace T315I ve vzorcích připravených ředěním 100% WT a 100% MT vzorku v poměru 1:1 o různých koncentracích (Obr. 11A, D; Obr. 11B). Porovnáním míry rozdělení jednotlivých populací ve 2D *scatterplotech* byla pro další analýzy vybrána jako nejoptimálnější koncentrace $0,05 \text{ pg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$. Vzorek o této koncentraci vykazoval dostatečnou amplifikaci sekvencí s MT alelou, zároveň bylo možné populace od sebe odlišit na základě fluorescence. V případě koncentrace $0,07 \text{ pg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ přístroj nebyl schopný dostatečně rozlišit jednotlivé populace. Se zvyšující se koncentrací roste míra fluorescence a dochází tak ke splývání populací, stejně jako ke zvyšování frekvence *double* pozitivních kompartmentů.



Obr. 11A: 2D scatterploty představující vzorek NK o koncentraci $0,05 \text{ pg} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ (A), vzorek PK o koncentraci $0,05 \text{ pg} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ (B), NTC (C) a vzorek připravený z *BCR-ABL1* pozitivního vzorku se 100% mutací T315I a *BCR-ABL1* pozitivního vzorku s WT *ABL1* kinasové domény ředěním v poměru 1:1 na výslednou koncentraci $0,05 \text{ pg} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ (D).



Obr. 11B: 2D *scatterplots* představující vzorky připravené z *BCR-ABL1* pozitivního vzorku se 100% mutací T315I a *BCR-ABL1* pozitivního vzorku s WT *ABL1* kinasové domény ředěním v poměru 1:1 na výsledné koncentrace 0,03 $\text{pg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ (E), 0,04 $\text{pg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ (F), 0,06 $\text{pg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ (G), 0,07 $\text{pg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ (H).

4.1.2 Stanovení *false rate* (specificity) metody dPCR

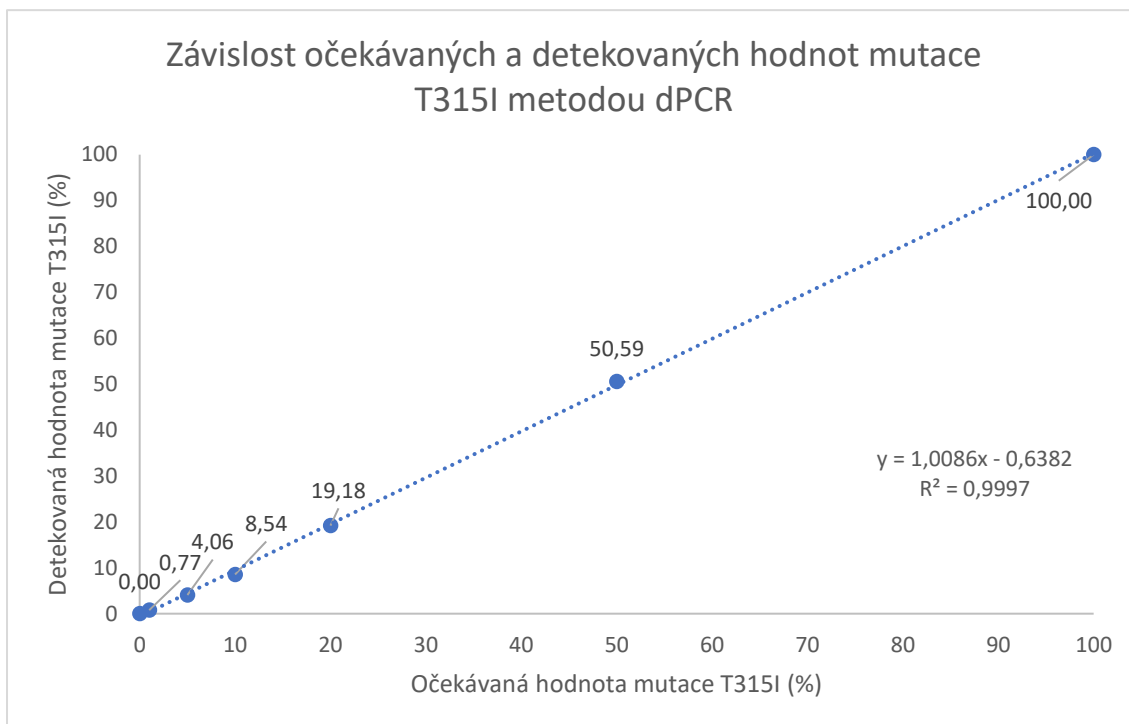
Pro stanovení *false rate* metody dPCR, tedy přítomnost falešně pozitivních kopií v NK vzorcích a falešně negativních kopií v PK vzorcích, byly na čip nanесeny vzorky NK, PK a NTC. Průměrná hodnota falešně negativních kopií v osmi replikátech byla stanovena jako $0,4455 \pm 0,21$ kopie· μl^{-1} a průměrná hodnota falešně pozitivních kopií v osmi replikátech byla stanovena jako $0,4881 \pm 0,128$ kopie· μl^{-1} (Tab. 10). V osmi jamkách, do nichž byla místo vzorku použita voda jako NTC, byl detekován jeden dvojitě pozitivní kompartment, v němž byla detekována WT alela o koncentraci $0,05$ kopie· μl^{-1} a MT alela o koncentraci $0,05$ kopie· μl^{-1} , což lze přisuzovat kontaminaci v průběhu pipetování. Výsledkem je získání průměrných hodnot koncentrací falešně pozitivních a negativních kopií, na jejichž základě byla v dalších experimentech prováděna korekce počtu kopií.

Tab. 10: Počet kopií falešně negativních alel ve vzorku se 100% mutací a počet falešně pozitivních alel ve vzorku se 100% WT alelou.

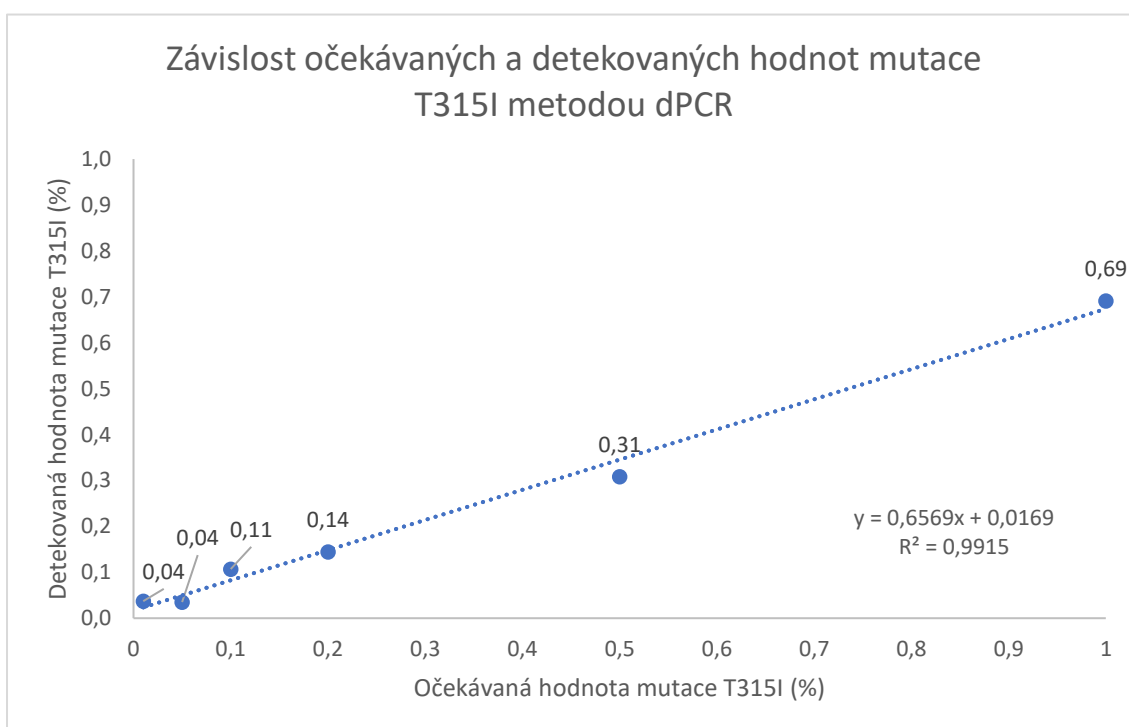
	Falešně negativní (kopie· μl^{-1})	Falešně pozitivní (kopie· μl^{-1})
Jamka č. 1	0,471	0,692
Jamka č. 2	0,747	0,356
Jamka č. 3	0,452	0,63
Jamka č. 4	0,252	0,575
Jamka č. 5	0,202	0,374
Jamka č. 6	0,664	0,43
Jamka č. 7	0,205	0,465
Jamka č. 8	0,571	0,383
PRŮMĚR	0,4455	0,4881
Směrodatná odchylka	0,21	0,128

4.1.3 Stanovení citlivosti metody dPCR

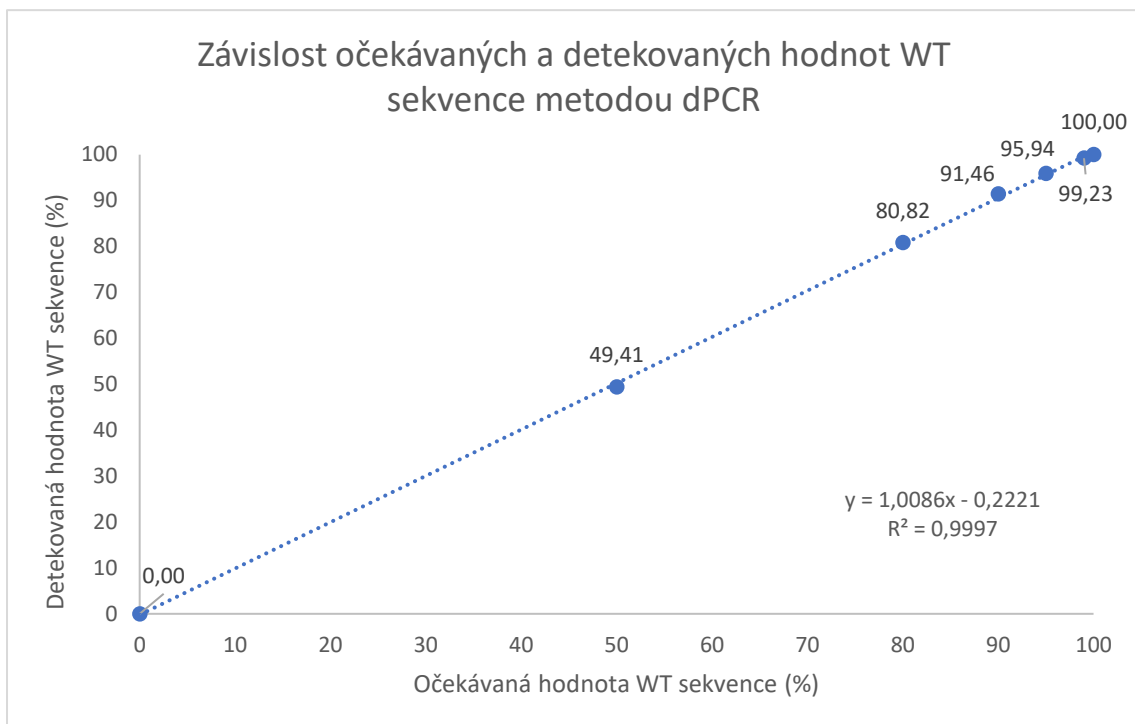
Citlivost metody byla stanovena na základě ředící řady, kdy byl ředěn vzorek se 100% podílem MT alely do vzorku se 100% podílem WT alely. Cílem experimentu bylo ověření deklarované citlivosti metody 0,01 %. Analyzovány byly vzorky naředěné na 100 %, 50 %; 20 %; 10 %; 5 %; 1 %; 0,5 %; 0,2 %; 0,1 %, 0,05 %; 0,01 % a 0 % výskytu MT alely T315I o výsledné koncentraci 0,05 pg·μl⁻¹. Při vyhodnocení dat byla provedena korekce, což znamená, že od detekovaných hodnot koncentrací MT sekvence byla odečtena stanovená průměrná hodnota falešně pozitivních kopií a od zjištěných hodnot koncentrací WT sekvencí byly naopak odečteny průměrné hodnoty falešně negativních kopií. Poté byly výsledné hodnoty vyneseny jako závislost na očekávaných hodnotách výskytu mutace T315I. Pro lepší přehlednost byly nízké hodnoty výskytu MT alely vyneseny do samostatné kalibrační křivky. Dále byly sestrojeny kalibrační křivky závislosti detekovaných hodnot WT sekvencí na jejich očekávaných hodnotách. Byla očekávána lineární závislost, což se po vynesení dat do kalibračních křivek potvrdilo (Obr. 12, 13, 14). Pro nejnižší analyzovanou hodnotu 0,01 % byla pomocí přístroje Qiagen detekována přítomnost 0,04 % MT alely ve vzorku.



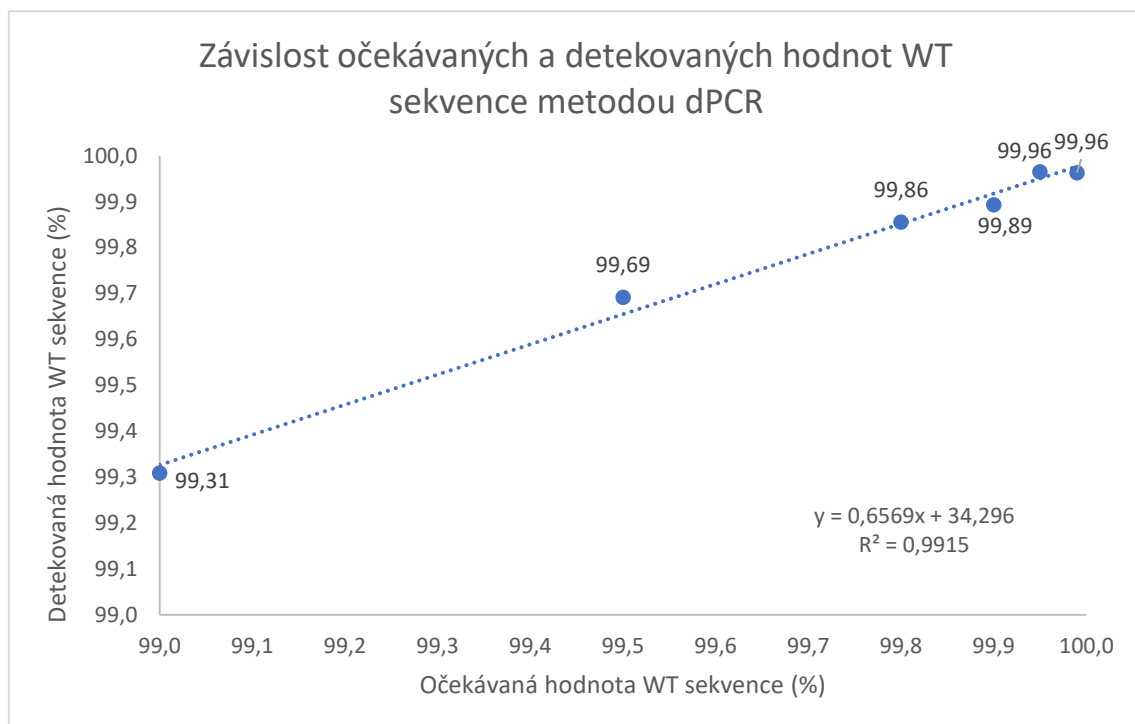
Obr. 12A: Graf znázorňuje korelaci mezi hodnotami detekované mutace T315I po korekci a předpokládanými hodnotami mutace T315I pro vzorky naředěné na 100%; 50 %; 20 %; 10 %; 5 %; 1 %; 0 % přítomnosti MT alely.



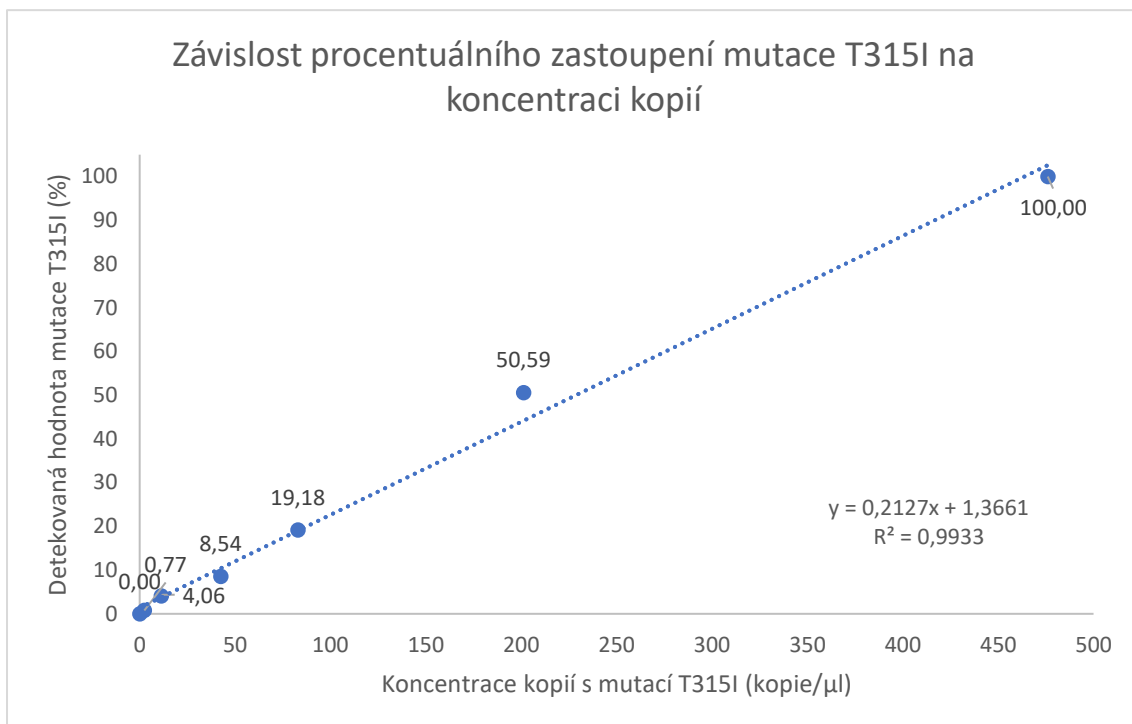
Obr. 12B: Graf znázorňuje korelaci mezi hodnotami detekované mutace T315I po korekci a předpokládanými hodnotami mutace T315I pro vzorky naředěné na 1 %; 0,5 %; 0,2 %; 0,1 %, 0,05 % a 0,01 % přítomnosti MT alely.



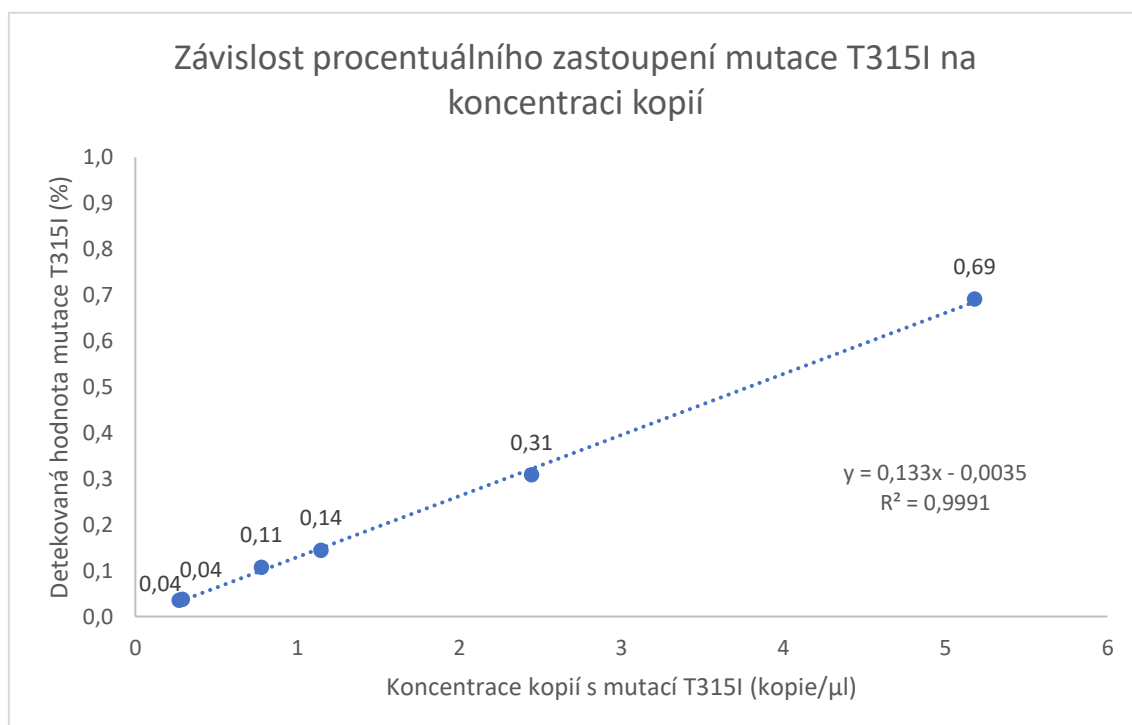
Obr. 13A: Graf znázorňuje korelaci mezi hodnotami WT sekvence po korekci a předpokládanými hodnotami WT sekvence pro vzorky naředěné na 100 %; 50 %; 20 %; 10 %; 5 %; 1 %; 0 % přítomnosti MT alely.



Obr. 13B: Graf znázorňuje korelaci mezi hodnotami WT sekvence po korekci a předpokládanými hodnotami WT sekvence pro vzorky naředěné na 1 %; 0,5 %; 0,2 %; 0,1 %, 0,05 % a 0,01 % přítomnosti MT alely.



Obr. 14A: Graf znázorňuje korelaci mezi hodnotami detekované mutace T315I po korekci a koncentrací kopií PCR produktu s mutací T315I pro vzorky naředěné na 100 %; 50 %; 20 %; 10 %; 5 %; 1 %, 0 % přítomnosti MT alely.



Obr. 14B: Graf znázorňuje korelaci mezi hodnotami detekované mutace T315I po korekci a koncentrací kopií PCR produktu s mutací T315I pro vzorky naředěné na 1 %; 0,5 %; 0,2 %; 0,1 %, 0,05 % a 0,01 % přítomnosti MT alely.

4.2 Detekce mutace T315I u vybrané skupiny pacientů

Soubor pacientů, u nichž byla v rámci experimentální části této práce detekována mutace T315I v kinasové doméně genu *BCR-ABL1*, čítal celkem 14 pacientů a u vybraných pacientů byly analyzovány vzorky z více odběrů. Výsledky a charakteristika souboru je popsána v Tab. 11. Celkový počet analyzovaných vzorků byl 28.

Z celého souboru pacientů byla bodová mutace T315I prokázána u 10 pacientů. U obou pacientů s diagnózou Ph+ ALL byla přítomnost mutace T315I prokázána jak pomocí dPCR, tak také pomocí Sangerova sekvenování. V případě skupiny pacientů s diagnózou CML byla tato mutace detekována u 8/12 pacientů (Tab.11).

Tab. 11: Shrnutí základních údajů o pacientech vyšetřených metodou dPCR. U každého odběru je zaznamenána příslušná hodnota IS (*BCR-ABL1/ABL1*) (%), která byla vyšetřena pomocí RT-qPCR (analýza nebyla součástí této práce), v dalším sloupci je zaznamenáno detekované zastoupení MT alely T315I (%), které bylo vyšetřeno dPCR a v posledním sloupci je zaznamenán údaj o tom, zda byl příslušný vzorek vyšetřen Sangerovým sekvenováním.

Pacient č.	Rok narození, pohlaví	Dg.*	Stav onemocnění	Datum odběru	IS (%) qPCR	dPCR (T315I) %	Sanger. sekven. (T315I)
1	1945, M	CML	Dg.	14.08.2018	75,55	0	NV [†]
			CHR**	26.11.2018	2,32	13,69	- [§]
			CHR	18.02.2019	0,26	78,84	+ [‡]
			CCyR ^{††}	03.06.2019	0,41	99,95	+
			Ztráta CCyR	20.04.2020	9,61	100,00	+
			CCyR	11.11.2020	0,39	100,00	+
2	1959, M	CML	Ztráta MMR ^{‡‡}	28.03.2007	2,39	99,92	+
			MMR	18.03.2015	0,05	99,93	NV
3	1956, M	CML	BZ ^{§§}	27.04.2020	27,74	0	-
			Ztráta hluboké MR	05.11.2020	0,02	98,51	+
			Vyplavení blastů do PK	18.02.2021	7,87	98,46	NV
4	1969, M	CML	Progrese onemocnění	18.07.2012	2,83	83,08	+
			Progrese onemocnění	12.02.2013	2,14	50,97	NV
			MMR nedosažena	16.09.2013	0,35	86,99	NV
5	1943, M	CML	Sekundární rezistence na imatinib	22.03.2006	41,00	99,97	+
6	1951, Ž	CML	BZ – progrese onemocnění	10.03.2010	2,10	0	NV
			BZ – progrese onemocnění	15.12.2010	7,35	0	NV
			BZ – progrese onemocnění	17.02.2011	16,90	33,08	+
7	1976, M	CML	Ztráta MMR	05.09.2008	0,19	0,08	NV
			Ztráta MMR	03.10.2008	0,27	22,46	NV
			Ztráta MMR	24.11.2008	3,32	63,81	+
8	1945, M	CML	MMR nedosažena	02.02.2022	0,27	0	-
9	1974, Ž	CML	MMR nedosažena	02.02.2022	1,92	0	-
10	1954, Ž	CML	Ztráta MMR	24.08.2020	1,44	0	-

Tab. 11: Shrnutí základních údajů o pacientech vyšetřených metodou dPCR. U každého odběru je zaznamenána příslušná hodnota IS (*BCR-ABL1/ABL1*) (%), která byla vyšetřena pomocí RT-qPCR (analýza nebyla součástí této práce), v dalším sloupci je zaznamenáno detekované zastoupení MT alely T315I (%), které bylo vyšetřeno dPCR a v posledním sloupci je zaznamenán údaj o tom, zda byl příslušný vzorek vyšetřen Sangerovým sekvenováním.

pokračování

Pacient č.	Rok narození, pohlaví	Dg.	Stav onemocnění	Datum odběru	IS (%) qPCR	dPCR (T315I) %	Sanger. sekven. (T315I)
11	1938, Ž	CML	CCyR nedosažena	28.08.2019	14,37	0,06	-
12	1947, M	CML	MMR nedosažena	19.02.2020	0,40	0	-
13	2006, M	ALL	Druhý relaps	20.03.2014	50,49	98,36	+
14	1967, Ž	ALL	Ztráta MMR	25.04.2019	0,27	100,00	+

* diagnóza

† vzorek nebyl vyšetřen Sangerovým sekvenováním

‡ mutace T315I byla Sangerovým sekvenováním prokázána

§ mutace T315I nebyla Sangerovým sekvenováním detekována

** úplná hematologická odpověď

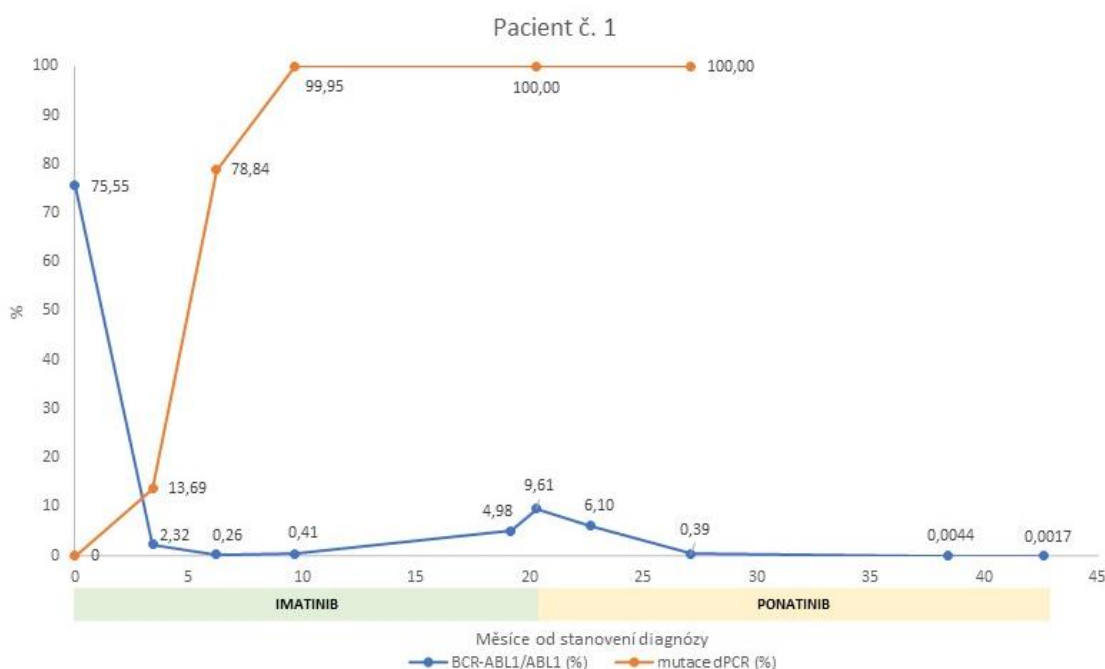
†† úplná cytogenetická odpověď

‡‡ velká molekulární odpověď (hladina transkriptu *BCR-ABL1* je v rozmezí 0,1–0,01 %)

§§ blastický zvrát

Pacientovi č. 1 byla diagnostikována CML v chronické fázi v srpnu 2018 v 73 letech. Cytogenetické vyšetření prokázalo přítomnost fúzního genu *BCR-ABL1*. Sokalovo rizikové skóre bylo vyhodnoceno jako vysoké, Euro rizikové skóre střední a EUTOS nízké. Jedná se o rizikové indexy důležité pro odhad prognózy, které jsou vypočteny na základě věku pacienta, velikosti sleziny, počtu bazofilů, eozinofilů a blastů v krvi. Po potvrzení diagnózy byla pacientovi předepsána hydroxyurea a inhibitor imatinib 400 mg/den. V březnu 2020 bylo u tohoto pacienta vysloveno podezření na selhání léčby na základě kontinuálně narůstající hladiny transkriptu *BCR-ABL1* (Obr. 15). Z tohoto důvodu bylo následující měsíc provedeno Sangerovo sekvenování, které prokázalo přítomnost mutace T315I a pacientovi byla změněna léčba na ponatinib. Po změně inhibitoru pacient odpovídal na léčbu poklesem *BCR-ABL1* až na úroveň hluboké molekulární odpovědi, ovšem mutace i přes současnou léčbu stále zůstává přítomna.

V době diagnózy (14. 8. 2018) nebyla mutace T315I pomocí dPCR detekována. V dalším odběru (26. 11. 2018) došlo k výraznému poklesu transkriptu *BCR-ABL1* v důsledku nasazení imatinibu. U tohoto odběru byla hodnocena přítomnost mutace T315I pomocí dPCR. dPCR mutaci detekovala a prokázala zastoupení mutantní alely v 13,69 %. Přítomnost mutace byla sledována také pomocí Sangerova sekvenování. To nebylo schopné mutaci v tomto případě detekovat, jelikož tato metoda má schopnost



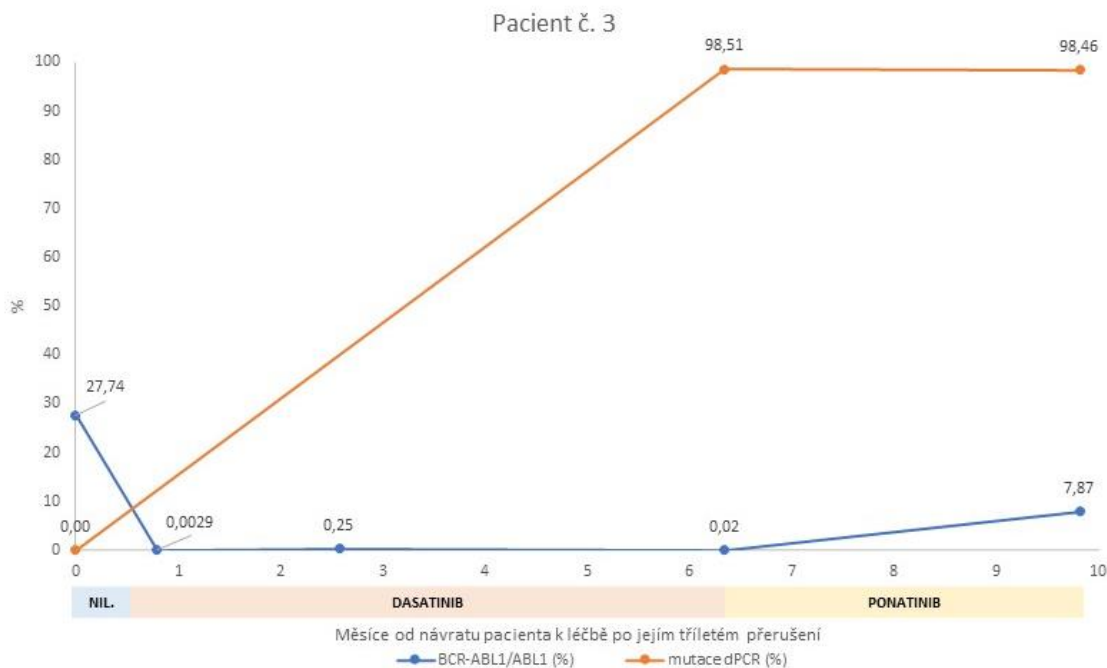
Obr. 15: *Follow-up* pacienta č. 1. Vývoj hladiny transkriptu *BCR-ABL1* vyšetřený pomocí RT-qPCR. Mutace T315I byla detekována pomocí dPCR.

detekovat mutace pouze při zastoupení mutantní alely minimálně 15 %. Následující odběr byl proveden po třech měsících (18. 2. 2019) a vzorek byl opět sekvenován Sangerovou metodou. V tomto případě už bylo sekvenování schopno detekovat mutaci T315I, stejně tak i dPCR prokázala přítomnost MT alely, jejíž zastoupení bylo 79 %. V dalších dvou hodnocených odběrech (3. 6. 2019 a 20. 4. 2020) byla detekována zvýšená hladina transkriptu *BCR-ABL1* a rovněž i dPCR prokázala nárůst MT alely, která dosahovala 100 %.

Pacientovi č. 2 byla diagnostikována CML v akcelerované fázi v lednu 2004. V době stanovení diagnózy měl pacient 45 let. Při stanovení diagnózy bylo v KD přítomno 14 % blastů a pacientovi byla iniciálně nasazena hydroxyurea a následně imatinib 800 mg/den. V dubnu 2007 byla léčba změněna na dasatinib z důvodu rezistence na imatinib. K selhání došlo v srpnu 2007 a byl mu podán interferon α .

Analýzou vzorku ze dne 28. 3. 2007 bylo pomocí dPCR zjištěno zastoupení MT alely T315I 99,92 %. Sangerovo sekvenování rovněž prokázalo přítomnost MT alely. V dalším analyzovaném vzorku, který pochází z odběru po osmi letech, bylo zastoupení MT alely vůči WT 99,93 %, i přesto, že hladina transkriptu *BCR-ABL1* vlivem léčby postupně klesala.

U pacienta č. 3 byla CML diagnostikována v chronické fázi v říjnu 2010. Pacientovi byla předepsána hydroxyurea a následně imatinib. Sokalovo rizikové skóre bylo vyhodnoceno jako nízké. Pacient se dlouhodobě nacházel v hluboké molekulární remisi až do roku 2017, kdy přerušil léčbu. 27. 4. 2020 byl pacient hospitalizován s Ph+ ALL, která vznikla blastickým zvratem CML. Hodnota transkriptu *BCR-ABL1* byla 27,74 % IS. Zároveň byl tento vzorek podroben Sangerovu sekvenování, které neprokázalo přítomnost mutací, a analyzován dPCR, která nepotvrdila přítomnost MT alely T315I (Obr. 16). Pacient podstoupil chemoterapii R-CHOP (rituximab, cyklofosfamid, doxorubicin, vinkristin, prednison). Od 7. 5. 2020 mu byl nasazen dasatinib. Vlivem léčby pacient dosáhl dne 21. 5. 2020 hluboké molekulární odpovědi (0,0029 % IS). V listopadu 2020 bylo na základě vzrůstající hladiny transkriptu *BCR-ABL1* (0,02 % IS) vysloveno podezření na rezistenci. V odběru ze dne 5. 11. 2020 byla již detekována přítomnost homozygotní mutace T315I Sangerovým sekvenováním, s čímž je spojena změna podávaného inhibitoru na ponatinib. Tento vzorek byl analyzován také dPCR, která prokázala 98,52% přítomnost MT alely. V odběru z února 2021 bylo znovu prokázáno vyplavení blastů z kostní dřeně do periferní krve a relaps Ph+ ALL.



Obr. 16: *Follow-up* pacienta č. 3. Vývoj hladiny *BCR-ABL1* vyšetřený pomocí RT-qPCR. Mutace T315I byla detekována pomocí dPCR. NIL. = nilotinib

Pacientovi č. 4 byla diagnostikována CML v květnu 2009, věk v době diagnózy byl 40 let. Vzorky pochází z období, kdy se onemocnění nacházelo v akcelerované fázi. U prvního analyzovaného odběru dPCR prokázala zastoupení MT alely v 83 %, v tomto vzorku byla přítomnost MT alely prokázána rovněž Sangerovým sekvenováním. U dalšího analyzovaného vzorku poměr MT vůči WT alel klesl na hodnotu 50,97 %. V odběru po sedmi měsících došlo opět k nárůstu zastoupení MT alely, ačkoliv hodnota transkriptu *BCR-ABL1* stále klesala díky účinnosti základní léčby.

Pacientovi č. 5 byla diagnostikována CML v září 2002 v 59 letech. Po stanovení diagnózy mu byl nasazen interferon α v kombinaci s imatinibem. Ve vzorku ze dne 22. 3. 2006 byla potvrzena přítomnost mutace T315I Sangerovým sekvenováním i pomocí dPCR. Na základě toho byla pacientovi změněna léčba na hydroxyureu v kombinaci s nilotinibem.

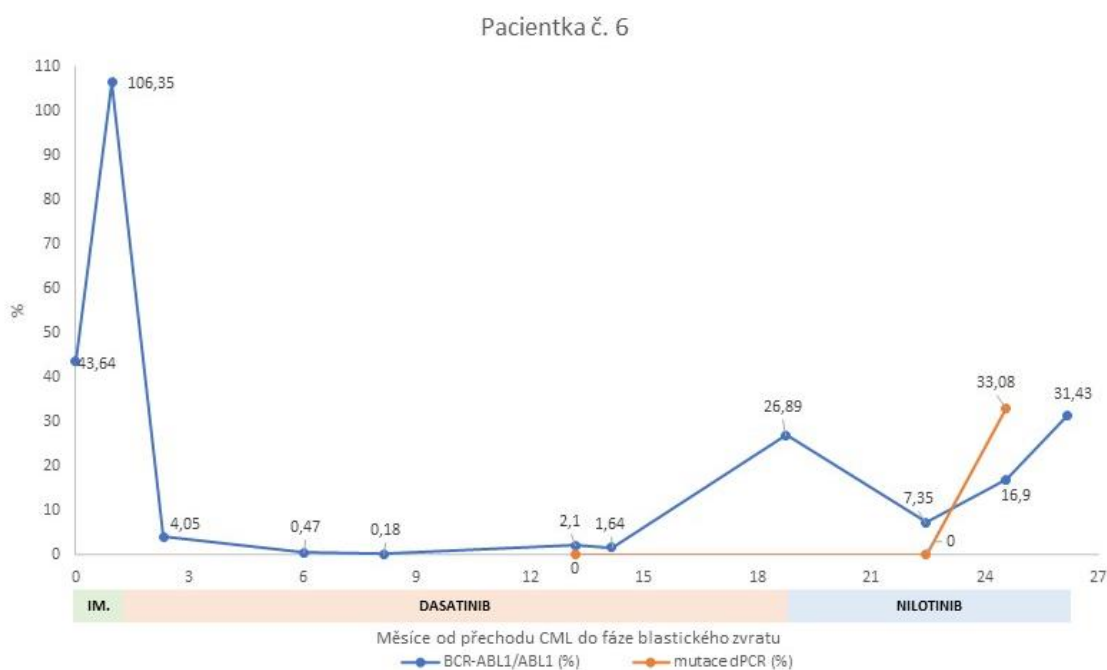
Pacientce č. 6 byla diagnostikována CML v lednu 2003 v 52 letech. Po stanovení diagnózy byla léčena hydroxyureou a interferonem α . Sokalovo rizikové skóre bylo vyhodnoceno jako nízké. Od října 2005 byl pacientce podáván imatinib, který užívala do března 2009, kdy onemocnění dospělo do fáze blastického zvratu (Obr. 17). Nově jí byl nasazen dasatinib. Od března 2010 byly v následujících odběrech Sangerovým sekvenováním detekovány mutace V299L, F317L, L248V. Na konci srpna 2010 došlo

k nárůstu hodnoty transkriptu *BCR-ABL1* na 26,89 % IS a pacientce byla změněna léčba na inhibitor nilotinib. Ve vzorku z odběru 17. 2. 2011 bylo Sangerovým sekvenováním prokázáno heterozygotní zastoupení MT alely T315I. Pomocí dPCR byla tato skutečnost potvrzena a byla detekována přítomnost 33 % MT alely, kdežto v předchozím odběru (15. 12. 2010) mutace T315I detekována nebyla. To potvrdila i analýza dPCR. Pacientka netolerovala léčbu ponatinibem, byla jí předeepsána paliativní terapie v podobě hydroxyurey.

Pacient č. 7 byl diagnostikován s CML v dubnu 2007 v 31 letech v chronické fázi a začal užívat imatinib. Ve třech po sobě následujících odběrech byla pomocí dPCR detekována postupně se zvyšující hladina mutace T315I, jejíž výskyt koreloval s nárůstem transkriptu *BCR-ABL1*.

Pacientovi č. 8 byla CML diagnostikována v listopadu 2020 v 75 letech. V době odběru byl léčen imatinibem. Bylo detekováno zvýšení hladiny transkriptu *BCR-ABL1* a došlo ke ztrátě velké molekulární odpověď (0,38 % IS), ale přítomnost MT alely u něj nebyla Sangerovým sekvenováním ani dPCR prokázána.

Pacientce č. 9 byla CML diagnostikována v září 2021 v 75 letech. Tato pacientka nereagovala na léčbu imatinibem optimálně, ale Sangerovo sekvenování ani dPCR neprokázaly přítomnost mutace T315I.



Obr. 17: *Follow-up* pacientky č. 6. Vývoj hladiny *BCR-ABL1* vyšetřený pomocí RT-qPCR. Mutace T315I byla detekována pomocí dPCR. IM = imatinib

Pacientce č. 10 byla CML diagnostikována v březnu 2018 v 64 letech. Pacientka užívala imatinib. Byla u ní pozorováno selhávání léčebné odpovědi. Sangerovo sekvenování prokázalo přítomnost mutace F317L.

Pacientce č. 11 byla CML diagnostikována v březnu 2019 v 81 letech. Pacientka užívala imatinib, ale odpověď na léčbu nebyla optimální. Narůstala hladina transkriptu *BCR-ABL1*. Bylo provedeno Sangerovo sekvenování, které přítomnost mutací nepotvrdilo. Pomocí dPCR byla detekována přítomnost MT alely v 0,06 %. Vzorky z dalších odběrů pacientky byly rovněž sekvenovány Sangerovým sekvenováním a analyzovány technologií MassArray a přítomnost mutace T315I v nich potvrzena nebyla.

Pacientovi č. 12 byla CML diagnostikována v listopadu 1999 v 52 letech. Pacient užíval imatinib. Vyšetření přítomnosti mutací bylo indikováno na základě nárůstu transkriptu *BCR-ABL1*. Výskyt mutací nebyl prokázán ani Sangerovým sekvenováním, ani pomocí dPCR. U těchto pacientů byla rezistence pravděpodobně zapříčiněna jiným mechanismem než mutací v *ABL1* doméně.

Pacientovi č. 13 byla diagnostikována Ph+ ALL v březnu 2014 v osmi letech. Analyzován byl odběr po transplantaci a chemoterapii v kombinaci s imatinibem. Jednalo se již o druhý relaps onemocnění. Sangerovým sekvenováním byla prokázána přítomnost MT alely, která byla také kvantifikována pomocí dPCR s výsledkem 98,36 %.

Pacientka č. 14 měla diagnostikovanu Ph+ ALL v červnu 2018 v 51 letech. Jedná se o pacientku, která byla léčena standardní chemoterapií v kombinaci s imatinibem. Byla směřována k alogenní transplantaci kostní dřeně. V březnu 2019 byl znovu detekován *BCR-ABL1* transkript pomocí RT-qPCR v kostní dřeni. Následně v odběru z periferní krve z dubna 2019 byla detekována přítomnost MT alely, stejně tak i dPCR prokázala její 100% zastoupení. Pacientce byl nasazen ponatinib.

5 DISKUZE

Zavedení TKI do klinické praxe bylo velmi významným milníkem v léčbě CML. Navzdory velkému úspěchu TKI se u části pacientů vyvine sekundární rezistence na léčbu nebo jsou primárně rezistentní. Primární rezistence má stále neznámou etiologii, sekundární rezistence bývá obvykle spojována s bodovými mutacemi v *BCR-ABL1* kinasové doméně. Tyto mutace jsou detekovány u některých pacientů v době selhání léčby. Proto je jejich identifikace a následné monitorování velmi důležité, zejména z důvodu změny léčby (Alikian *et al.*, 2012).

Existuje řada metod pro detekci mutací v kinasové doméně *BCR-ABL1*. Tyto metody se od sebe liší zejména v senzitivitě a specificitě, časové a finanční náročnosti na provedení analýz (Alikian *et al.*, 2012).

Nejvyužívanější metodou je Sangerovo přímé sekvenování, které je stále používáno na základě doporučení odborných společností. Nevýhodou je nízká senzitivita této metody, která se pohybuje v rozmezí minimálně 15–20 % zastoupení mutantní alely (Cortes *et al.*, 2007; Alikian *et al.*, 2012).

Použití NGS přináší přesnější informace o přítomnosti mutací a jejich zastoupení. Výhodou je možnost detekce širokého spektra mutací v kinasové doméně u více vzorků najednou oproti Sangerovu sekvenování (Soverini *et al.*, 2020). Sekvenování nové generace (NGS) má deklarovanou citlivost v rozmezí 1–5 % mutantní alely. Její potenciál je v citlivosti, která umožní identifikovat mutace i ve vzorcích s nízkou hladinou mutace tam, kde citlivost Sangerova sekvenování není dostačující, v případě zastoupení minoritních klonů do 15 % (Soverini *et al.*, 2020).

Kizilors *et al.* (2019) ve své studii provedli *screening* mutací u 121 pacientů s diagnózou CML v chronické fázi onemocnění za pomoci technologie NGS. Pacienti užívali převážně imatinib. Limit detekce byl stanoven na 1 % a citlivost byla stanovena sekvenováním vzorků o různých koncentracích připravených *spikováním* buněčné linie nesoucí mutaci do vzorku s WT alelou. U vzorků s minimálně 20% zastoupení MT alely bylo provedeno porovnání citlivosti mezi Sangerovým sekvenováním a NGS. Výsledné hodnoty MT detekované pomocí NGS odpovídaly hodnotám zjištěným Sangerovým sekvenováním. Mutace v kinasové doméně byly prokázány u 25 pacientů ze souboru (21 %). V 17 případech byla hladina mutace pod detekčním limitem Sangerova sekvenování (Kizilors *et al.*, 2019). Pomocí NGS identifikovali TKI rezistentní mutace

u pacientů, kteří nevykazovali optimální odpověď na léčbu a u nichž by léčba příslušným TKI mohla v budoucnu selhat.

Další technologií, která byla použita pro detekci mutací v *BCR-ABL1* doméně, je pyrosekvenování. V porovnání s metodou Sangerova sekvenování také dosahuje vyšší senzitivity. Skupina Schumachera *et al.* (2011) stanovila 5% senzitivitu této metody pro detekci mutace T315I. Při detekci nižšího zastoupení MT alely ve vzorku (<5 %) nebyla tato metody schopna mutaci detekovat. Výsledky pyrosekvenování 26 vzorků v této studii korelovaly s výsledky Sangerova sekvenování.

Baer *et al.* (2016) detekovali mutaci T315I pomocí metody sekvenování 454 (Roche). Senzitivita v případě této metody byla stanovena na 1–2 %. Soubor pacientů tvořilo 40 nemocných, u kterých došlo k selhání léčby TKI první a druhé generace a u nichž byla Sangerovým sekvenováním potvrzena přítomnost mutace T315I. U poloviny těchto pacientů byla přítomnost mutace detekována u vzorků již o tři měsíce dříve sekvenováním 454, ale Sangerovým sekvenováním nebyly mutace prokázány. Vzorky dalších 42 pacientů, u kterých nebyla Sangerovým sekvenováním prokázána přítomnost mutace, ale u nichž byla pozorována ztráta molekulární odpovědi, byly sekvenovány metodou 454. V této skupině nebyla u žádného pacienta mutace prokázána.

Z výše uvedených metod má technologie dPCR deklarovanu nejvyšší citlivost. Výzkumná skupina Soverini *et al.* (2020) použila pro detekci T315I pomocí dPCR celkem 44 vzorků pacientů s diagnózou CML. Senzitivita byla stanovena na 0,02 % a mutace T315I byla detekována u 16 % vzorků, které jinými metodami byly vyhodnoceny jako negativní. Srovnáním Sangerova sekvenování s dPCR mělo 25 vzorků výsledky totožné a u 5 vzorků byla mutace detekována pouze pomocí dPCR. Ve srovnání dPCR s NGS byla přítomnost mutace prokázána u 19 vzorků, 2 vzorky byly vyhodnoceny jako pozitivní pomocí NGS, ale dPCR byly stanoveny jako negativní. Ve dvou vzorcích byla mutace detekována pomocí dPCR, ale pomocí NGS zachycena nebyla.

V této práci byl pomocí dPCR proveden *screening* vzorků na přítomnost mutace T315I u souboru 14 pacientů s prokázaným selháním léčby. Z celého souboru pacientů byla bodová mutace T315I prokázána u 10/14 pacientů. U obou pacientů s diagnózou Ph+ ALL byla přítomnost mutace T315I prokázána nejen pomocí dPCR, tak také pomocí Sangerova sekvenování. Ve skupině pacientů s CML byla tato mutace detekována u 8/12 pacientů. Na základě ředící řady byla prokázána citlivost technologie dPCR

pro mutaci T315I 0,01 %, což odpovídá hodnotám ze zmíněných publikací. Výsledky této práce odpovídají výsledkům publikovaným Soverini *et al.* (2020). Bylo prokázáno, že dPCR je schopna detekovat mutaci T315I ve vzorcích s nízkým zastoupením MT alely, kterou Sangerovo sekvenování nezachytí. Jako templát jsme použili specifický PCR produkt, na rozdíl od Soverini *et al.* (2020), která pro detekci mutace používala cDNA a gDNA (genomická DNA).

Největší výhodou dPCR je její vysoká citlivost a možnost zachycení výskytu mutace v časném stádiu onemocnění, kdy je zastoupení klonu s mutací ještě pod detekčním limitem jiných metod. Nevýhodou je nemožnost analyzovat celé spektrum mutací jako u NGS, jelikož pro detekci každé MT alely je třeba navrhnout specifickou sondu komplementární k dané mutaci. Moderní přístroje jsou schopny detekovat fluorescenční signál až v šesti různých barevných kanálech a nabízí možnost multiplexovat reakce. Využití dPCR má význam při *screeningu* mutací, které jsou příčinou rezistence na TKI druhé a třetí generace (jako je právě mutace T315I).

6 ZÁVĚR

V rámci předkládané diplomové práce byla v teoretické části zpracována témata zahrnující obecný úvod o hematopoéze, o onemocnění CML a její molekulární podstatě. Dále byla práce zaměřena na současné možnosti detekce fúzního genu *BCR-ABL1* a bodových mutací v jeho kinasové doméně. Na závěr byly popsány možnosti léčby CML, dostupné inhibitory a problematika rezistence.

Experimentální část se zabývá optimalizací metody dPCR pro detekci mutace T315I v kinasové doméně genu *BCR-ABL1*. V rámci optimalizace metody byla nejprve stanovena optimální koncentrace templátu – specifického PCR produktu. Pro další experimenty byla vybrána koncentrace $0,05 \text{ pg} \cdot \mu\text{l}^{-1}$. V dalším kroku byl stanoven tzv. *false rate*, tedy přítomnost falešně pozitivních kopií v negativním vzorku a falešně negativních kopií v pozitivním vzorku a ve vodě. Tyto hodnoty dále sloužily pro korekci při *screeningu* mutace ve vzorcích pacientů. Byla stanovena citlivost metody dPCR 0,01 % MT alely ve vzorku.

V další části byl proveden *screening* mutací u vybrané skupiny pacientů. Z celého souboru pacientů byla mutace T315I prokázána u 10/14 pacientů. Tři vybraní pacienti byli sledováni v delším časovém úseku.

Technologie dPCR má vyšší citlivost detekce než Sangerovo sekvenování. Navíc je touto metodou možné zastoupení MT alely přesně kvantifikovat.

Je pravděpodobné, že Sangerovo sekvenování bude postupně nahrazeno jinými, citlivějšími technologiemi. Pro *screening* mutací v subklonech se v budoucnu bude spíše využívat technologie NGS. Pro přesnou kvantifikaci zastoupení MT alel se díky své vysoké citlivosti bude pravděpodobně využívat technologie dPCR.

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Abelson, H. T., Rabstein, L. S. (1970). Lymphosarcoma: virus-induced thymic-independent disease in mice. *Cancer Research*, 30(8), 2213–2222. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4318922/>
- Aguilera, D. G., Tsimberidou, A. M. (2009). Dasatinib in chronic myeloid leukemia: a review. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 5(2), 281 – 289. <https://doi.org/10.2147/term.s3425>
- Alikian, M., Gerrard, G., Subramanian, P. G., Mudge, K., Foskett, P., Khorashad, J. S., Lim, A. C., Marin, D., Milojkovic, D., Reid, A. *et al.* (2012). *BCR-ABL1* kinase domain mutations: Methodology and clinical evaluation. *American Journal of Hematology*, 87(3), 298–304. <https://doi.org/10.1002/ajh.22272>
- Aqmasheh, S., Shamsasanjan, K., Akbarzadehlaleh, P., Pashoutan Sarvar, D., Timari, H. (2017). Effects of mesenchymal stem cell derivatives on hematopoiesis and hematopoietic stem cells. *Adv Pharm Bull*, 7(2), 165–177. <https://doi.org/10.15171/apb.2017.021>
- Arber, D. A., Orazi, A., Hasserjian, R., Thiele, J., Borowitz, M. J., Le Beau, M. M., Bloomfield C. D., Cazzola M., Vardiman, J. W. (2016). The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*, 127(20), 2391–2405. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-03-643544>
- Arceci R. J. (1993). Clinical significance of P-glycoprotein in multidrug resistance malignancies. *Blood*, 81, 2215–2222. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8097632/>
- Baccarani, M., Deininger, M. W., Rosti, G., Hochhaus, A., Soverini, S., Apperley, J. F., Cervantes, F., Clark, R. E., Cortes J. E., Hehlmann, R. (2013). European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. *Blood*, 122(6), 872–884. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-05-501569>
- Baer, C., Kern, W., Koch, S., Nadarajah, N., Schindela, S., Meggendorfer, M., Haferlach, C., Haferlach, T. (2016). Ultra-deep sequencing leads to earlier and more sensitive detection of the tyrosine kinase inhibitor resistance mutation T315I in chronic myeloid leukemia. *Haematologica*, 101(7), 830–838. <https://doi.org/10.3324/haematol.2016.145888>
- Barnes, D. J., Palaiologou, D., Panousopoulou, E., Schultheis, B., Yong, A. S. M., Wong, A., Pattacini, L., Goldman, J. M. Melo, J. V. (2005). Bcr-Abl expression levels determine the rate of development of resistance to imatinib mesylate in chronic myeloid leukemia. *Cancer Research*, 65(19), 8912–8919. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-0076>
- Bedi, A., Zehnbauser, B. A., Barber, J. P., Sharkis, S. J., Jones, R. J. (1994). Inhibition of apoptosis by BCR-ABL in chronic myeloid leukemia. *Blood*, 83(8), 2038-2044. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8161775/>
- Benchling. <https://benchling.com/protocols/GP1fQ08o/pcr-amplification-of-gfp/sbs> (16. 1. 2022)
- Bennett, J. H. (1845). Case of Hypertrophy of the Spleen and Liver, which Death Took Place from Suppuration of the Blood. *Edinburgh Medical and Surgical Journal*, 413–423. <https://wellcomecollection.org/works/csn53njq>
- Bolin, R. W., Robinson, W. A., Sutherland, J., Hamman, R. F. (1982). Busulfan versus hydroxyurea in long-term therapy of chronic myelogenous leukemia. *Cancer*, 50(9), 1683-1686. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19821101\)50:9<1683::aid-cncr2820500904>3.0.co;2-x](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19821101)50:9<1683::aid-cncr2820500904>3.0.co;2-x)
- Coccaro, N., Tota, G., Anelli, L., Zagaria, A., Specchia, G., Albano, F. (2020). Digital PCR: A Reliable Tool for Analyzing and Monitoring Hematologic Malignancies. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(9), 3141. <https://doi.org/10.3390/ijms21093141>
- Cohen, G. B., Ren, R., Baltimore, D. (1995). Modular binding domains in signal transduction proteins. *Cell*, 80(2), 237-248. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90406-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90406-9)
- Corbin, A. S., La Rosee, P., Stoffregen, E. P., Druker, B. J., Deininger, M. W. (2003). Several Bcr-Abl kinase domain mutants associated with imatinib mesylate resistance remain sensitive to imatinib. *Blood*, 101(11), 4611-4614. <https://doi.org/1182/blood-2002-12-3659>

- Corso, A., Lazzarino, M., Morra, E., Merante, S., Astori, C., Bernasconi, P., Boni, M., Bernasconi, C. (1995). Chronic myelogenous leukemia and exposure to ionizing radiation--a retrospective study of 443 patients. *Ann Hematol.*, 70(2), 79-82. <https://doi.org/10.1007/BF01834384>
- Cortes, J., Jabbour, E., Kantarjian, H., Yin, C. C., Shan, J., O'Brien, S., Garcia-Manero, G., Giles, F., Breeden, M., Reeves, N. *et al.* (2007). Dynamics of BCR-ABL kinase domain mutations in chronic myeloid leukemia after sequential treatment with multiple tyrosine kinase inhibitors. *Blood*, 110(12), 4005-4011. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-03-080838>
- Day, E., Dear, P. H., McCaughan, F. (2013). Digital PCR strategies in the development and analysis of molecular biomarkers for personalized medicine. *Methods*, 59, 101-107. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2012.08.001>
- De Klein, A., Hagemeijer, A., Bartram, C. R., Houwen, R., Hoefsloot, L., Carbonell, F., Chan, L., Barnett, M., Greaves, M., Kleihauer, E. *et al.* (1986). *bcr* Rearrangement and Translocation of the *c-abl* Oncogene in Philadelphia Positive Acute Lymphoblastic Leukemia. *Blood*, 68(6), 1369-1375. <https://doi.org/10.1182/blood.V68.6.1369.1369>
- Deininger, M.W.N., Goldman, J. M., Melo, J. V. (2000). The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood*, 96(10), 3343-3356. <https://doi.org/10.1182/blood.v96.10.3343>
- Donato, N. J., Wu, J. Y., Stapley, J., Gallick, G., Lin, H., Arlinghaus, R., Talpaz, M. (2003). BCR-ABL independence and LYN kinase overexpression in chronic myelogenous leukemia cells selected for resistance to STI571. *Blood*, 101, <https://doi.org/690-698>. 10.1182/blood.V101.2.690
- Druker, B. J., Lydon, N. B. (2000). Lessons learned from the development of an *abl* tyrosine kinase inhibitor for chronic myelogenous leukemia. *Journal of Clinical Investigation*, 105(1), 3-7. <https://doi.org/10.1172/JCI9083>
- Druker, B. J., Tamura, S., Buchdunger, E., Ohno, S., Segal, G. M., Fanning, S., Zimmermann, J., Lydon, N. B. (1996). Effects of a selective inhibitor of the *Abl* tyrosine kinase on the growth of *Bcr-Abl* positive cells. *Nature Medicine*, 2(5), 561-566. <https://doi.org/10.1038/nm0596-561>
- Druker, J., O'Brien, S., Larson, R. A. (2006). Long-term benefits of imatinib (IM) for patients newly diagnosed with chronic myelogenous leukemia in chronic phase (CML-CP): The 5-year update from the IRIS study. *J Clin Oncol. (Meeting Abstracts)*, 24(18S P1): Abstract 6506. https://doi.org/0.1200/jco.2006.24.18_suppl.6506
- Eaves, C. J., Eaves, A. C. (1997). Stem cell kinetics. *Baillieres Clinical Haematology*, 10(2), 233-257. [https://doi.org/10.1016/s0950-3536\(97\)80005-4](https://doi.org/10.1016/s0950-3536(97)80005-4)
- Eaves, C. J., Eaves, A. C. (2006). Anatomy and physiology of hematopoiesis. *Childhood Leukemias*, 69-105. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511471001.005>
- Faber, E., Juráňová, J., Zuchnická, J., Procházka, V., Hluší, A., Pospíšilová, D., Minařík, J., Papajík, T., Sztokowski, T., Vondráková, J. *et al.* (2012). *Základy hematologické diagnostiky* (1. vydání). Univerzita Palackého v Olomouci.
- Faderl, S., Talpaz, M., Estrov, Z., O'Brien, S., Kurzrock, R., Kantarjian, H. M. (1999). The Biology of Chronic Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine*, 341(3), 164-172. <https://doi.org/10.1056/NEJM199907153410306>
- Fitos, I., Visy, J., Zsila, F., Mády, G., Simonyi, M. (2006). Selective binding of imatinib to the genetic variants of human α 1-acid glycoprotein. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1760(11), 1704-1712. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2006.08.015>
- García-Gutiérrez, V., Hernández-Boluda, J. C. (2019). Tyrosine Kinase Inhibitors Available for Chronic Myeloid Leukemia: Efficacy and Safety. *Frontiers in Oncology*, 9, 603. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00603>
- Garibyan, L., Avashia, N. (2013). Polymerase chain reaction. *The Journal of investigative dermatology*, 133(3), 1-4. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.1>
- Goldman, J. M. (2010). Chronic Myeloid Leukemia: A Historical Perspective. *Seminars in Hematology*, 47(4), 302-311. <https://doi.org/10.1053/j.seminhematol.2010.07.001>

- Goldman, J. M., Melo, J. V. (2003). Chronic Myeloid Leukemia — Advances in Biology and New Approaches to Treatment. *New England Journal of Medicine*, 349(15), 1451–1464. <https://doi.org/10.1056/NEJMra020777>
- Golub, R., Cumano, A. (2013). Embryonic hematopoiesis. *Blood Cells Mol Dis.*, 51(4), 226–231. <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2013.08.004>
- Gong, Z., Medeiros, L. J., Cortes, J. E., Zheng, L., Khoury, J. D., Wang, W., Tang, G., Loghavi, S., Luthra, R., Yang, W., Kantarjian, H. M., Hu, S. (2017). Clinical and prognostic significance of e1a2 BCR-ABL1 transcript subtype in chronic myeloid leukemia. *Blood Cancer Journal*, 7(7), e583. <https://doi.org/10.1038/bcj.2017.62>
- Gorre, M. E., Mohammed, M., Ellwood, K., Hsu, N., Paquette, R., Rao, P. N., Sawyers, C. L. (2001). Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science*, 293(5531), 876–880. <https://doi.org/10.1126/science.1062538>
- Gupta, P., Kathawala, R. J., Wei, L., Wang, F., Wang, X., Druker, B. J., Fu L.-W., Chen, Z.-S. (2016). PBA2, a novel inhibitor of imatinib-resistant BCR-ABL T315I mutation in chronic myeloid leukemia. *Cancer Letters*, 383(2), 220–229. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.09.025>
- Handsuh, L., Kazmierczak, M., Milewski, M. C., Goralski, M., Luczak, M., Wojtaszewska, M., Uszczynska-Ratajczak, B., Lewandowski, K., Komarnicki, M., Figlerowicz, M. (2018). Gene expression profiling of acute myeloid leukemia samples from adult patients with AML-M1 and -M2 through boutique microarrays, real-time PCR and droplet digital PCR. *Int. J. Oncol.*, 52, 656–678. <https://doi.org/10.3892/ijo.2017.4233>
- Heather, J. M., Chain, B. (2016). The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics*, 107(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2015.11.003>
- Hochhaus, A., Baccarani, M., Deininger, M., Apperley, J. F., Lipton, J. H., Goldberg, S. L., Corm, S., Shah, N. P., Cervantes, F., Silver, R. T., *et al.* (2008). Dasatinib induces durable cytogenetic responses in patients with chronic myelogenous leukemia in chronic phase with resistance or intolerance to imatinib. *Leukemia*, 22, 1200–1206. <https://doi.org/10.1038/leu.2008.84>
- Hochhaus, A., Breccia, M., Saglio, G., García-Gutiérrez, V., Réa, D., Janssen, J., Apperley, J. (2020). Expert opinion—management of chronic myeloid leukemia after resistance to second-generation tyrosine kinase inhibitors. *Leukemia*, 34, 1495–1502. <https://doi.org/10.1038/s41375-020-0842-9>
- Houghton, S. G., Cockerill, F. R. (2006). Real-time PCR: Overview and applications. *Surgery*, 139(1), 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.surg.2005.02.010>
- Chidgeavadze, Z., Beabealashvili, R. S. (1984). 2', 3'-Dideoxy-3'aminonucleoside 5'-triphosphates are the terminators of DNA synthesis catalyzed by DNA polymerases. *Nucleic Acids Res.*, 12, 1671–1686. <https://doi.org/10.1093/nar/12.3.1671>
- Iqbal, N., & Iqbal, N. (2014). Imatinib: A Breakthrough of Targeted Therapy in Cancer. *Chemotherapy Research and Practice*, 2014, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2014/357027>
- Izzo, B., Gottardi, E. M., Errichiello, S., Daraio, F., Baratè, C., Galimberti, S. (2019). Monitoring Chronic Myeloid Leukemia: How Molecular Tools May Drive Therapeutic Approaches. *Frontiers in Oncology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00833>
- Jabbour, E., Kantarjian, H. (2018). Chronic myeloid leukemia: 2018 update on diagnosis, therapy and monitoring. *American Journal of Hematology*, 93(3), 442–459. <https://doi.org/10.1002/ajh.25011>
- Jagannathan-Bogdan, M., Zon, L. I. (2013). Hematopoiesis. *Development*, 140, 2463–2467. <https://doi.org/10.1242/dev.083147>
- Johansson, B., Fioretos, T., Mitelman, F. (2002). Cytogenetic and Molecular Genetic Evolution of Chronic Myeloid Leukemia. *Acta Haematologica*, 107(2), 76–94. <https://doi.org/10.1159/000046636>
- Kantarjian, H. M., Keating, M. J., Smith, T. L., Talpaz, M., McCredie, K. B. (1990). Proposal for a simple synthesis prognostic staging system in chronic myelogenous leukemia. *The American journal of medicine*, 88(1), 1–8. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(90\)90119-X](https://doi.org/10.1016/0002-9343(90)90119-X)

- Kantarjian, H., Talpaz, M., O'Brien, S., Garcia-Manero, G., Verstovsek, S., Giles, F., Rios, M. B., Shan, J., Letvak, L., Thomas, D., *et al.* (2004). High-dose imatinib mesylate therapy in newly diagnosed Philadelphia chromosome-positive chronic phase chronic myeloid leukemia. *Blood*, 103(8), 2873-2878. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-11-3800>
- Kennedy, J. A., Hobbs, G. (2018). Tyrosine Kinase Inhibitors in the Treatment of Chronic-Phase CML: Strategies for Frontline Decision-making. *Current Hematologic Malignancy Reports*, 13(3), 202–211. <https://doi.org/10.1007/s11899-018-0449-7>
- Kimura, S., Ashihara, E., Maekawa, T. (2006). New Tyrosine Kinase Inhibitors in the Treatment of Chronic Myeloid Leukemia. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 7(5), 371–379. <https://doi.org/10.2174/138920106778521532>
- Kizilors, A., Crisà, E., Lea, N., Passera, R., Mian, S., Anwar, J., Best, S., Nicolini, F. E., Ireland R., Aldouri, M. *et al.* (2019). Effect of low-level BCR-ABL1 kinase domain mutations identified by next-generation sequencing in patients with chronic myeloid leukaemia: a population-based study. *The Lancet Haematology*, 6(5), e276–e284. [https://doi.org/10.1016/s2352-3026\(19\)30027-4](https://doi.org/10.1016/s2352-3026(19)30027-4)
- Labster Theory https://theory.labster.com/DNA_sequencing/ (16. 1. 2022)
- Liu, J., Zhang, Y., Huang, H., Lei, X., Tang, G., Cao, X., Peng, J. (2020). Recent advances in Bcr-Abl tyrosine kinase inhibitors for overriding T315I mutation. *Chemical Biology & Drug Design*, 97(3), 649–664. <https://doi.org/10.1111/cbdd.13801>
- Lugo, T. G., Pendergast, A. M., Muller, A. J., Witte, O. N. (1990). Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products. *Science*, 247(4946), 1079–1082. <https://doi.org/10.1126/science.2408149>
- Manley, P. W., Cowan-Jacob, S. W., Mestan, J. (2005). Advances in the structural biology, design and clinical development of Bcr-Abl kinase inhibitors for the treatment of chronic myeloid leukaemia. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1754, 3–13. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2005.07.040>
- Manouchehri, A., Kanu, E., Mauro, M. J., Aday, A. W., Lindner, J. R., Moslehi, J. (2019). Tyrosine Kinase Inhibitors in Leukemia and Cardiovascular Events. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 40, 301–308. <https://doi.org/10.1161/atvbaha.119.313353>
- Mao, X., Liu, C., Tong, H., Chen, Y., Liu, K. (2019). Principles of digital PCR and its applications in current obstetrical and gynecological diseases. *Am J Transl Res.*, 11(12), 7209-7222. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6943456/#>
- Massaro, F., Molica, M., Breccia, M. (2018): Ponatinib: A Review of Efficacy and Safety. *Curr Cancer Drug Targets*. 18(9), 847-856. <https://doi.org/10.2174/1568009617666171002142659>
- Milojkovic, D., Apperley, J. (2009). Mechanisms of Resistance to Imatinib and Second-Generation Tyrosine Inhibitors in Chronic Myeloid Leukemia. *Clinical Cancer Research*, 15(24), 7519–7527. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-1068>
- Mims, M. P., Miller-Chism, C., Sosa I. R. (2019). *Handbook of Benign Hematology* (First edition). Springer.
- Minciocchi, V. R., Kumar, R., Krause, D.S. (2021). Chronic Myeloid Leukemia: A Model Disease of the Past, Present and Future. *Cells*, 10(1), 117–140. <https://doi.org/10.3390/cells10010117>
- Mullis, K. B. (1990). The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*, 262(4), 56–61. <https://doi.org/10.1038/scientificamerican0490-56>
- Ning, L., Hu, C., Lu, P., Que, Y., Zhu, X., Li, D. (2020). Trends in disease burden of chronic myeloid leukemia at the global, regional, and national levels: a population-based epidemiologic study. *Experimental Hematology and Oncology*, 9, 29. <https://doi.org/10.1186/s40164-020-00185-z>
- Nowell P.C., Hungerford D.A. (1960): A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science*, 132, 1497. <https://doi.org/10.1007/BF01630378>

- Olmedillas-López, S. García-Arranz, M., García-Olmo, D. (2017). Current and emerging applications of droplet digital PCR in oncology. *Mol. Diagn. Ther.*, **21**, 493–510. <https://doi.org/10.1007/s40291-017-0278-8>
- Ottmann, O. G., Druker, B. J., Sawyers, C. L., Goldman, J. M., Reiffers, J., Silver, R. T., Tura, S., Fischer, T., Deininger, M. W., Schiffer, C. A., *et al.* (2002). SGA phase 2 study of imatinib in patients with relapsed or refractory Philadelphia chromosome-positive acute lymphoid leukemias. *Blood*, **100**(6), 1965–1971. <https://doi.org/10.1182/blood-2001-12-0181>
- Purcell, R. V., Pearson, J., Frizelle, F. A., Keenan, J. I. (2016). Comparison of standard, quantitative and digital PCR in the detection of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*. *Sci. Rep.* **6**, 34554, <https://doi.org/10.1038/srep34554> (2016).
- Quintas-Cardama, A., Kantarjian, H. M., Cortes, J. E. (2009). Mechanisms of primary and secondary resistance to imatinib in chronic myeloid leukemia. *Cancer Control*, **16**(2), 122–131. <https://doi.org/10.1177/107327480901600204>
- Rieger, M. A., Schroeder, T. (2012). Hematopoiesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, **4**(12), a008250. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008250>
- Sandberg, A. A. (1980). Chromosomes and causation of human cancer and leukemia: XL. The Ph1 and other translocations in CML. *Cancer*, **46**(10), 2221–2226. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19801115\)46:10<2221::aid-cnrcr2820461019>3.0.co;2-8](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19801115)46:10<2221::aid-cnrcr2820461019>3.0.co;2-8)
- Shah, N. P., Tran, C., Lee, F. Y., Chen, P., Norris, D., Sawyers, C. L. (2004). Overriding imatinib resistance with a novel ABL kinase inhibitor. *Science*, **305**(5682), 399–401. <https://doi.org/10.1126/science.1099480>
- Schindler, T., Bornmann, W., Pellicena, P., Miller, W. T., Clarkson, B., Kuriyan, J. (2000). Structural mechanism for STI-571 inhibition of abelson tyrosine kinase. *Science*, **289**(5486), 1938–1942. <https://doi.org/10.1126/science.289.5486.1938>
- Schumacher, J. A., Szankasi, P., Bahler, D. W., Ho, A. K., Kelley, T. W. (2011). A pyrosequencing-based test for detection and relative quantification of the BCR-ABL1 T315I point mutation. *Journal of Clinical Pathology*, **64**(7), 618–625. <https://doi.org/10.1136/jcp.2011.089193>
- Soverini, S., Abruzzese, E., Bocchia, M., Bonifacio, M., Galimberti, S., Gozzini, A., Iurlo, A., Luciano, L., Pregno, P., Rosti, G. *et al.* (2019). Next-generation sequencing for BCR-ABL1 kinase domain mutation testing in patients with chronic myeloid leukemia: a position paper. *Journal of Hematology & Oncology*, **12**(1). <https://doi.org/10.1186/s13045-019-0815-5>
- Soverini, S., Bernardi, S., Galimberti, S. (2020). Molecular Testing in CML between Old and New Methods: Are We at a Turning Point?. *J Clin Med*, **29**(12), 3865. <https://doi.org/doi:10.3390/jcm9123865>
- Soverini, S., Colarossi, S., Gnani, A., Rosti, G., Castagnetti, F., Poerio, A., Iacobucci, I., Amabile, M., Abruzzese, E., Orlandi, E., *et al.* (2006). Contribution of ABL kinase domain mutations to imatinib resistance in different subsets of Philadelphia-positive patients: by the GIMEMA Working Party on Chronic Myeloid Leukemia. *Clinical Cancer Research*, **12**, 7374–7379. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-1516>
- Soverini, S., Hochhaus, A., Nicolini, F.E., Gruber, F., Lange, T., Saglio, G., Pane, F., Muller, M. C., Ernst T., Rosti, G., *et al.* (2011). BCR-ABL kinase domain mutation analysis in chronic myeloid leukemia patients treated with tyrosine kinase inhibitors: recommendations from an expert panel on behalf of European LeukemiaNet. *Blood*, **118**(5), 1208–1215. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-12-326405>
- Soverini, S., Mancini, M., Bavaro, L., Cavo, M., Martinelli, G. (2018). Chronic myeloid leukemia: the paradigm of targeting oncogenic tyrosine kinase signaling and counteracting resistance for successful cancer therapy. *Molecular cancer*, **17**, 49. <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0780-6>
- Stranneheim, H., Lundeberg, J. (2012). Stepping stones in DNA sequencing. *Biotechnology Journal*, **7**(9), 1063–1073. <https://doi.org/10.1002/biot.201200153>
- Tamma, R., Ribatti, D. (2017). Bone niches, hematopoietic stem cells, and vessel formation. *Int J Mol Sci.*, **18**(1), 151. <https://doi.org/10.3390/ijms18010151>

- Tauchi, T., Boswell, H. S., Leibowitz, D., Broxmeyer, H. E. (1994). Coupling between p210bcr-abl and Shc and Grb2 adaptor proteins in hematopoietic cells permits growth factor receptor-independent link to ras activation pathway. *Journal of Experimental Medicine*, 179(1), 167–175. <https://doi.org/10.1084/jem.179.1.167>
- Tavian, M., Peault, B. (2005). Embryonic development of the human hematopoietic system. *Int J Dev Biol.*, 49(2–3), 243–250. <https://doi.org/10.1387/ijdb.041957mt>
- Thomas, J. (2004). Active transport of imatinib into and out of cells: implications for drug resistance. *Blood*, 104(12), 3739–3745. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-12-4276>
- Thompson, P. A., Kantarjian, H. M., Cortes, J. E. (2015). Diagnosis and Treatment of Chronic Myeloid Leukemia in 2015. *Mayo Clinic Proceedings*, 90(10), 1440–1454. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2015.08.010>
- Tsimberidou, A. M. (2009). Dasatinib in chronic myeloid leukemia: a review. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 281. <https://doi.org/10.2147/tcrm.s3425>
- Ujjan, I., Akhund, A. A., Baig, A. M., Nizamani, G. S. (2015). The cytogenetic and molecular analysis of chronic myeloid leukemia in tertiary care hospital of Sindh, Pakistan. *Integrative Cancer Science and Therapeutics*, 2(3), 164-167. <https://doi.org/10.15761/ICST.1000133>
- VanGuilder, H. D., Vrana, K. E., Freeman, W. M. (2008). Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *BioTechniques*, 44(5), 619–26. <https://doi.org/10.2144/000112776>
- Váňová, B., Malicherova, B., Burjanivová, T., Liskova, A., Janikova, K., Jasek, K., Lasabova, Z., Tatar, M., Plank L. (2021). Droplet digital PCR as a novel diagnostic tool. Droplet digitálna PCR ako nový diagnostický nástroj. *Klin Onkol.*, 34(1), 33-39. <https://doi.org/10.48095/ccko202133>
- Voso, M. T., Ottone, T., Lavorgna, S., Venditti, A., Maurillo, L., Lo-Coco, F., Buccisano, F. (2019). MRD in AML: The role of new techniques. *Front. Oncol.*, 9, 655. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00655>
- Wang, J. Y. J. (2014). The Capable ABL: What Is Its Biological Function? *Molecular and Cellular Biology*, 34(7), 1188–1197. <https://doi.org/10.1128/MCB.01454-13>
- Wasserman, L. M. (2004). A nested RT-PCR assay to detect BCR/abl. *Methods Mol Med*, 97, 181–9. <https://doi.org/10.1385/1-59259-081-0:105>
- Yu, S., Cui, M., He, X., Jing, R., Wang, H. (2017). A review of the challenge in measuring and standardizing BCR-ABL1. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, 55(10), 1465-1473. <https://doi.org/10.1515/cclm-2016-0927>
- Zhou, H., Xu, R. (2015). Leukemia stem cells: the root of chronic myeloid leukemia. *Protein & Cell* 6(6), 403–412. <https://doi.org/10.1007/s13238-015-0143-7>
- Zhou, T., Medeiros, L. J., Hu, S. (2018). Chronic Myeloid Leukemia: Beyond BCR-ABL1. *Current Hematologic Malignancy Reports*, 13, 435-445. <https://doi.org/10.1007/s11899-018-0474-6>

8 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

<i>ABL1</i>	ABL protoonkogen 1
ALL	akutní lymfoblastická leukémie
<i>BCR</i>	BCR aktivátor RhoGEF a GTPas
<i>BCR-ABL1</i>	fúzní gen <i>BCR-ABL1</i>
BZ	blastický zvrát
CCyr	úplná cytogenetická odpověď
cDNA	komplementární DNA
CML	chronická myeloidní leukémie
ddNTP	dideoxynukleotidtrifosfát
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxynukleotidtrifosfát
dPCR	digitální polymerasová řetězová reakce
FAM	karboxyfluorescein
FGFR	Fibroblast growth factor receptor
FISH	fluorescentní <i>in situ</i> hybridizace
FNOL	Fakultní nemocnice Olomouc
gDNA	genomická DNA
GDP	guanosindifosfát
GTP	guanosintrifosfát
<i>HCK</i>	HCK proto-oncogene
HEX	hexachlorofluorescein
hOCT-1	human organic cation transporter
HSC	hematopoetická kmenová buňka
CHR	úplná hematologická odpověď
<i>IDH1</i>	Isocitrát dehydrogenasa 1
<i>IDH2</i>	Isocitrát dehydrogenasa 2
IS	international scale (mezinárodní stupnice)
JAK	Janus kinase
KD	kinasová doména
<i>KIT</i>	KIT proto-oncogene
<i>LYN</i>	LYN proto-oncogene

MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MMR	velká molekulární odpověď
MRD	minimální reziduální nemoc
mRNA	mediátorová RNA
MT	mutace
<i>MYD88</i>	MYD88 innate immune signal transduction adaptor
NGS	next generation sequencing
NK	negativní kontrola
NTC	netemplátová kontrola
PCR	polymerasová řetězová reakce
PDGFR	Platelet-derived growth factor receptor
PK	pozitivní kontrola
RFU	relativní fluorescenční jednotka
RNA	ribonukleová kyselina
SH	Src homology
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
TKI	tyrosinkinasové inhibitory
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WT	wild type (divoký typ)