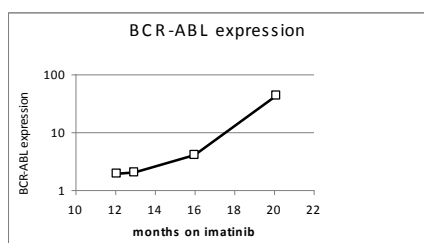
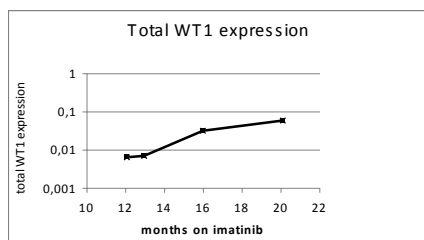
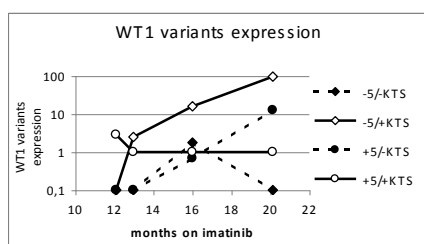


Studium heterogenity chronické myeloidní leukémie – vztah k rezistenci na léčbu

Chronická myeloidní leukémie (CML) je charakteristická přítomností fúzního genu *bcr-abl*, který je tvořen translokací chromozomů 9 a 22. Cílená léčba proti produktu tohoto genu, konstitučně aktivní kináze BCR-ABL, se ukázala jako velmi účinná, nicméně zhruba třetina pacientů vykazuje buď rezistenci vůči léčbě anebo její netoleranci. Stav pacienta je sledován monitorováním transkriptu BCR-ABL, který ve většině případů odráží průběh nemoci. Rezistence však může být na BCR-ABL závislá i nezávislá a mohou nastat situace, kdy běžné monitorování transkriptu BCR-ABL neodhalí daný problém včas. Je zjevné, že navzdory klíčové roli BCR-ABL je CML velmi heterogenní nemocí, a proto je potřeba hledat pomocné ukazatele, které by mohly napomoci odhalit rezistenci s dostatečným předstihem. Současným cílem (lékařů i vědců) je zjistit příčiny rezistence a podle toho nastavit optimální léčbu.

V naší laboratoři jsme se zaměřili na studium heterogenity CML, hledání a testování mechanismů rezistence a jejich ukazatelů, i na vytipování možných klinických markerů pro volbu léčby a možnou predikci odpovědi na léčbu. Vybrali jsme 2 přístupy sledování: 1) testování obecných leukemických nebo ještě širěji rakovinných markerů, které by byly relativně nezávislé na drahách typických pro CML – tj. především na BCR-ABL, a naopak odhalily i možnou aktivitu alternativních drah pohánějících progresi CML, a dále 2) komplexnější přístup – pomocí proteinových čipů, které sledují jednotlivé proteiny v širším kontextu a nabízí tak vedle vytipování nových potenciálních markerů také možnost nalezení molekul, které rezistenci k léčbě způsobují, tedy nových potenciálních cílů léčby.

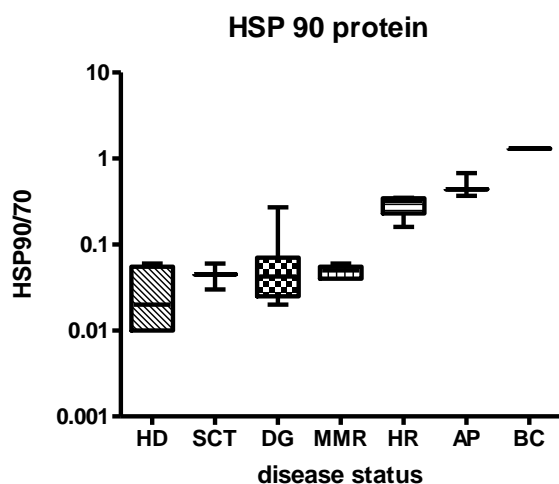
Mezi tzv. „obecnými“ ukazateli, které souvisejí s více metabolickými drahami, se jako velmi vhodná ukázala hladina transkriptu **WT1** (Gen Wilmsova tumoru) a některých jeho sestřihových variant (Obr.1) (Lopotová 2012).



Obr. 1 Expresní kinetika 4 hlavních sestřihových variant WT1 v průběhu onemocnění CML:

Příklad časového průběhu hladin celkové WT1 a 4 jejích variant (– 5/-KTS, – 5/+KTS, +5/-KTS a +5/+KTS) v porovnání s hladinou transkriptu BCR-ABL u relabující CML.

Dalším zajímavým proteinem, který by mohl sloužit jako ukazatel rizika, je chaperonový protein **HSP90**, který ovlivňuje konformaci, stabilitu a aktivitu mnoha proteinů včetně onkogenních. Nárůst jeho exprese při riziku zhoršení onemocnění patrně souvisí s vyšší aktivitou výkonných molekul leukemické buňky (Obr.2) (Žáčková 2013).



Obr2. Hladina proteinu HSP90 u pacientů CML v souvislosti s odpovědí na léčbu.

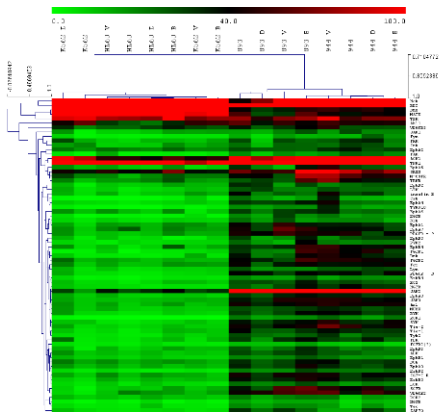
Poměr HSP90/70 v různých fázích onemocnění, 27 testovaných pacientů: HD (n=5), zdravý dárce; SCT (n=3), kompletní molekulární remise po transplantaci kmenových buněk (BCR-ABL negativita - nested RT-PCR, citlivost 10–5); DG (n=15), diagnóza (bez léčby, příp na hydroxyuree až 2,5 měs.); MMR (n=7), velká molekulární odpověď ($\leq 0.1\%$ BCR-ABL transkriptu); HR (n=5), hematologický relaps; AP (n=3), akcelerovaná fáze ($>10\%$ a $< 30\%$ myeloblastů v periferní krvi); BC (n=1), blastická krize ($>30\%$ myeloblastů v periferní krvi);

Dalším možným pomocným testem pro odhalení rezistence je sledování citlivosti leukemických buněk pacientů **ex vivo**. Tento test prokáže míru citlivosti samotných leukemických buněk vůči testovanému inhibitoru a může odhalit možnou rezistenci na léčbu. V naší studii provedené na 51 pacientech sensitivita *ex vivo* souhlasila v 90% případů s odpovědí na léčbu *in vivo* v následujících 12 měsících a tento test lze použít prakticky v jakémkoli stádiu onemocnění.

Komplexnější pohled na metabolismus nádorové buňky může poskytnout analýza pomocí čipů. Proteinové čipy se ukazují jako vhodné pro vytipování drah aktivních v patogenezi a pro tzv. „fingerprinting“, kdy určitý charakter profilu může být charakteristický pro dané onemocnění (Obr3.), případně pro typ odpovědi na léčbu.

Pomocí arrayů testujících fosforylované a nefosforylované proteiny dále sledujeme rozdílné parametry u pacientů odpovídajících na léčbu od těch, kteří neodpovídají. V současné době

ověřujeme vytipované proteiny/dráhy, které hrají roli u progresu CML a rezistence na léčbu. Podrobně se zabýváme zejména studiem HSP90, jeho interakčními partnery a posttranslačními modifikacemi souvisejícími s progresí onemocnění a rezistencí na léčbu.



Obr3. Profil vybraných fosfoproteinů u leukemických linií.

Buněčné linie myeloidní řady HL60 (odvozená od AML) a K562 (odvozená od CML) jsou porovnány s liniemi mnohočetného myelomu (U893) a plasmocelulární leukémie (U944). Klastrováním se linie rozdělily dle svého původu. Jemnější změny jsou po působení vybraných inhibitorů.

Reference:

Lopotová T, Polák J, Schwarz J, Klamová H, Moravcová J. Expression of four major WT1 splicing variants in acute and chronic myeloid leukemia patients analyzed by newly developed four real-time RT PCRs. *Blood Cells Mol Dis*. 2012 Jun 15;49(1):41-7.

Žáčková M, Moučková D, Lopotová T, Ondráčková Z, Klamová H, Moravcová J. Hsp90 - a potential prognostic marker in CML. *Blood Cells Mol Dis*. 2013 Mar;50(3):184-9.