

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Genetika, molekulární biologie a virologie



Bc. Karolína Šeborová

Expres genů *TP53* na úrovni mRNA u pacientů s myelodysplastickým syndromem

The expression of *TP53* gene at the mRNA level in patients with myelodysplastic syndrome

Diplomová práce

Vedoucí závěrečné práce: Mgr. Monika Belíčková

Praha, 2017

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 28. 4. 2017

.....

Karolína Šeborová

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala své školitelce Mgr. Monice Beličkové, za veškerý čas strávený odborným vedením této práce a za možnost práci vypracovat na Oddělení genomiky Ústavu hematologie a krevní transfúze pod jejím vedením. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Jitce Veselé, Ing. Barboře Pejšové a MUDr. Janu Válkovi za naučení laboratorních metod. Za statistické vyhodnocení děkuji Ing. Pavle Pecherkové, PhD. A v neposlední řadě své rodině za podporu během celého studia.

Abstrakt

Myelodysplastický syndrom (MDS) je heterogenní skupinou onemocnění, pro které je charakteristická neefektivní hematopoéza zapříčiněná poškozením diferenciací pluripotentní hematopoetické kmenové buňky. Mutace v genu *TP53* se nacházejí přibližně u 10 % MDS pacientů a jsou negativním prognostickým faktorem. Stejný efekt jako mutace může mít i změněná exprese genu *TP53*. Mutace či deregulovaná exprese tohoto genu mají vliv na mnoho buněčných procesů včetně apoptózy, procesu oprav DNA, růstu buněk a angiogeneze.

V této práci byly studovány hladiny expresí mRNA jednotlivých genů zahrnutých v signální dráze p53 v CD34⁺ pluripotentních hematopoetických buňkách kostní dřene pacientů s MDS v nízkém riziku.

Pacienti s MDS vykazovali ve srovnání se zdravými jedinci zvýšenou expresi genů indukující apoptózu, regulující buněčný cyklus a opravy DNA (*BAX*, *BBC3*, *CCNE1*, *CDC25A*, *CDKN1A*, *FAS*, *GADD45A*). Pacienti s mutací *TP53* měli sníženou expresi apoptotických genů (*BAX*, *PIDD*, *TRAF2*) a zvýšenou expresi genu inhibujícího apoptózu (*BCL2A1*), což ukazuje na sníženou aktivitu drah apoptózy, čímž může patologický klon buněk získat růstovou výhodu. Deregulace 21 genů (*BAX*, *BBC3*, *EGR1*, *KAT2B*, *MDM2* atd.) byla pozorována při porovnání pacientů s del(5q) a bez delece. Z univariantské analýzy vyplynulo, že kromě mutace *TP53* má i změna exprese genů *BTG2*, *CCNH*, *CDK4* a *E2F3* vliv na celkové přežití pacientů s MDS. Souhrnně dosažené výsledky ukazují, že pacienti s MDS s nízkým rizikem mají celkově deregulovanou signální dráhu p53 i bez signifikantní změny exprese genu *TP53* a navíc nejen samotná mutace může ovlivnit celkové přežití pacientů.

Klíčová slova: myelodysplastický syndrom, gen *TP53*, mutace, del(5q), genová exprese

Abstract

Myelodysplastic syndrome (MDS) is a heterogeneous group of diseases characterized by ineffective hematopoiesis which is caused by damage of differentiation of pluripotent haematopoietic stem cells. *TP53* gene mutations are identified approximately in 10% of MDS and represent a negative prognostic factor. Altered *TP53* gene expression may have similar effect as the mutation. Mutations or deregulated expression of this gene have an impact on many cellular processes including apoptosis, DNA repair, cell growth and angiogenesis.

In this work, the expression mRNA levels of genes involved in p53 signalling pathway were studied in CD34⁺ pluripotent haematopoietic cells from bone marrow of patients with low-risk MDS.

MDS patients showed increased expression of genes involved in apoptosis induction, regulation of cell cycle and DNA repair (*BAX*, *BBC3*, *CCNE1*, *CDC25A*, *CDKN1A*, *FAS*, *GADD45A*) as compared to healthy subjects. The patients with *TP53* mutation had decreased expression of apoptotic genes (*BAX*, *PIDD*, *TRAF2*) and increased gene expression of apoptotic inhibitor (*BCL2A1*), indicating a reduced activity of apoptotic pathways and that way the pathological cell clone may gain a growth advantage. Deregulation of 21 genes (*BAX*, *BBC3*, *EGR1*, *KAT2B*, *MDM2* etc.) was observed in patients with del (5q) compared to those without the deletion. The univariate analysis showed that, in addition to the *TP53* mutation, the change in *BTG2*, *CCNH*, *CDK4* and *E2F3* gene expression also affected the overall survival of MDS patients. In summary, the results show that low-risk MDS patients have an overall deregulated p53 signalling pathway even without significant change in *TP53* gene expression and, moreover, not only the mutation alone may affect overall survival of the patients.

Key words: myelodysplastic syndrome, *TP53* gene, mutation, del(5q), gene expression

OBSAH

OBSAH.....	6
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	8
1 ÚVOD.....	11
2 LITERÁRNÍ PŘEHLED	13
2.1 MYELOYDYSPLASTICKÝ SYNDROM.....	13
2.1.1 DEFINICE MDS.....	13
2.1.2 EPIDEMIOLOGIE.....	13
2.1.3 KLINICKÉ PROJEVY.....	14
2.2 DIAGNOSTIKA A KLASIFIKACE	15
2.2.1 Diagnostika	15
2.2.1.1 Cytogenetická vyšetření.....	16
2.2.1.2 Molekulárně genetická vyšetření	16
2.2.2 Klasifikace	17
2.2.2.1 FAB klasifikace.....	17
2.2.2.2 IPSS-R prognostický skórovací systém	17
2.2.2.3 WHO klasifikace a prognostický systém	19
2.3 SPECIÁLNÍ FORMY MDS.....	21
2.4 LÉČBA.....	21
2.5 PATOGENEZE	23
2.5.1 Chromozomální aberace.....	26
2.5.2 Somatické mutace	29
2.6 GEN TP53 A PROTEIN P53.....	30
2.6.1 Domény proteinu p53.....	30
2.6.2 Proteiny rodiny p53.....	31
2.6.3 Izoformy p53	31
2.6.4 Aktivace p53	32
2.6.5 Posttranslační modifikace p53	33
2.6.6 Regulace p53.....	33
2.6.7 Dráhy řízené p53.....	34
2.6.8 Exprese p53 a TP53	35
2.6.9 Mutace TP53	36
3 CÍLE PRÁCE.....	38
4 METODY	39
4.1 SOUBOR PACIENTŮ	39
4.2 POUŽITÉ ROZTOKY A CHEMIKÁLIE	41
4.3 OSTATNÍ MATERIÁL.....	42
4.4 IZOLACE BUNĚK.....	42
4.5 IZOLACE RNA	44
4.6 INTEGRITA RNA	46
4.7 REAL-TIME PCR	46
4.8 KVANTIFIKACE GENOVÉ EXPRESE.....	48
4.9 KARYOTYP A MUTACE TP53	48
4.10 STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ DAT	48

5 VÝSLEDKY	49
5.1 POROVNÁNÍ SKUPINY PACIENTŮ S MDS SE ZDRAVÝMI KONTROLAMI	49
5.2 POROVNÁNÍ SKUPINY PACIENTŮ S MUTACÍ TP53 A DEL(5Q) SE SKUPINOU POUZE S DEL(5Q).....	53
5.3 POROVNÁNÍ SKUPINY PACIENTŮ S DEL(5Q) SE SKUPINOU PACIENTŮ BEZ DELECE	57
5.4 UNIVARIATNÍ ANALÝZA CELKOVÉHO PŘEŽITÍ	63
5.5 MULTIVARIANTNÍ ANALÝZA	65
5.6 VALIDACE ZÍSKANÝCH DAT	65
6 DISKUZE	66
7 SOUHRN	70
8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	71
PŘÍLOHA Č. 1	I
PŘÍLOHA Č. 2	II
PŘÍLOHA Č. 3	IV

Seznam použitých zkratek

5mC	5 – methyl cytosin
ALIP	abnormálně lokalizované nezralé prekurzory
AML	akutní myeloidní leukémie
APAF-1	apoptotic protease activating factor 1
APC	adenomatous polyposis Coli
ARF	alternative reading frame
ASXL1	additional sex combs like 1
ATG	antithymocytární globulin
ATM	ATM serin/threonin protein kináza
ATR	ATR serin/threonin protein kináza
Bad	Bcl-2 associated agonist of cell death
bcl-2	B-cell lymphoma 2
BCOR	Bcl-6 corepressor
BLK	BLK tyrosin protein kináza
BMI	body mass index
CBL	Cbl proto-oncogene
CD34 ⁺	cluster of differentiation
CDKN2A, 2B	cyclin dependent kinase inhibitor
CDR	comonn deleted region
CGH	komparativní genomová hybridizace
CMML	chronická myelomonocytická leukémie
c-Myc	Myc proto-oncogene
CpG	cytosin-fosfát-guanosin
Cs-A	cyklosporin A
CSF1R	colony stimulating factor 1 receptor
DBA	Diamond-Blackfan anémie
DIAPH1	diaphanous related formin1
DISC	death-inducing signaling complex
DMNT1, 3A, 3B	DNA methyl transferáza 1, 3A, 3B
DNA-PK	DNA dependentní protein kináza
DRAM	DNA-damage regulated autophagy modulator
EGR1	early growth response 1
EPO	erythropoetin
ETV6	transkripční faktor
EVI1	ecotropic virus integration site 1 protein homolog
EZH2	enhancer of zeste homolog 2
FAB klasifikace	francouzsko-americko britská klasifikace
FAD	apoptosis-inducing factor
FAS	Fas cell surface death receptor
FAT2	FAT atypical cadherin 2
FISH	fluorescence in-situ hybridizace

FLI1	Fli-1 proto-oncogene
GADD45A	growth arrest and DNA damage inducible
GM-CSF	granulocyte macrophage colony-stimulating factor
Hb	hemoglobin
HIF-1 α	hypoxia inducible factor 1 alpha
HSC	hematopoetická kmenová buňka
HUMARA	lidský androgenní receptor
Chk1,2	checkpoint kinase 1,2
IDH1, IDH2	isocitrate dehydrogenase 1/2
IL	interleukin
IPSS	mezinárodní prognostický skórovací systém
WHO	Světová zdravotnická organizace
IRF-1	interferon regulátory factor 1
JAK2	Janus kinase 2
JMML	juvenilní myelomonocytická leukémie
KRAS	KRAS proto-oncogene, GTPáza
MDS	myelodysplastický syndrom
MDS/MPN	myelodysplasticko-myeloproliferativní onemocnění
MDS-EB	MDS s nadbytkem blastů
MDS-MLD	MDS s multilineární dysplázií
MDS-RS	MDS s prstenčitými sideroblasty
MDS-SLD	MDS s jednou dysplastickou linií
MDS-U	MDS-neklasifikovaný
miRNA – 145, miR – 146a	mikroRNA
MPN	myeloproliferativní onemocnění
NF1	neurofibromin 1
NK buňky	nature killer buňky
NRAS	NRAS proto-oncogene, GTPáza
PCR	polymerázová řetězová reakce
PKC	protein kináza C
PRPF8	pre-mRNA processing factor 8
RA	refrakterní anémie
RAD21	cohesin complex component
RAD51	rekombinase
RAEB	refrakterní anémie s excesem blastů
RAEB-T	refrakterní anémie s excesem blastů v transformaci
RARS	refrakterní anémie s prstenčitými sideroblasty
RBM22	RNA binding motif protein 22
RCMD	refrakterní cytopenie s multilineární dysplázií
RCMD-RS	refrakterní cytopenie s multilinerání dysplázií a prstenčitými sideroblasty

RCUD	refrakterní cytopenie s dysplázií v jedné řadě
RPS14	ribosomální protein S14
RUNX1	Runt related transcription factor 1
SETPB1	SET binding protein 1
SF1/3A/B1	splicing factor 1/3a subunit 1/3b subunit1
SMC1A/3	structural maintenance of chromosomes 1A/3
SNP	jednobodový polymorfismus
SPARC	secreted protein acidic and cystein rich
SRSF2	serine and ariginine rich splicing factor 2
STAG2	stromal antigen 2
SV40 virus	Simian virus 40
t-AML	therapy related AML
TET2	Tet methylcytosine dioxygenase 2
TIRAP	TIR domain containing adaptor protein
t-MDS	therapy-related MDS
TNF	tumor necrosis factor
TNFR	tumor necrosis factor receptor
TP53	tumor protein 53
TRADD	tumor necrosis factor receptor type-1 associated DEATH domain protein
TRAF6	TNF receptor associated factor 6
U2AF1, 2	U2 small nuclear auxilliary factor 1/2
VEGF	vascular endothelial growth factor
WPPS	WHO classification-Based Prognostic Scoring System
XRCC3	X-ray repair cross complementing 3
ZRSR2	zinc-finger CCNH type, RNA binding motif and serine/arginine rich 2

1 Úvod

Myelodysplastický syndrom (MDS) je označení pro heterogenní skupinu hematologických onemocnění, pro které je charakteristické esenciální poškození hematopoetické kmenové buňky. Toto onemocnění postihuje především starší populaci, ale občas je diagnostikováno i u dětí. Pacienti trpí cytopenií a dysplázií kostní dřeně, symptomy se odvíjejí od postižení dané vývojové linie krevních řad. Heterogenita MDS způsobuje také problémy s klasifikací tohoto onemocnění, proto existuje více klasifikačních systémů, které jsou založeny zejména na krevním obrazu, karyotypu a počtu blastů. V posledních letech jsou s rozvojem moderních technologií molekulární genetiky a sekvenačních metod nalézány molekulární změny, které by mohly být příčinou vzniku onemocnění. Výzkumné studie jsou zaměřeny na objasnění příčin onemocnění, možnosti zpřesnění klasifikačních a prognostických systémů a hlavně na objevení nových léčebných postupů. Např. mutace v genu *SF3B1* je už zavedena jako pomocný diagnostický faktor v klasifikaci vydané WHO v roce 2016. Nyní se uvažuje např. i o mutacích *TP53*, které jsou už pravidelně vyšetřovány při diagnostice leukémií. Vzhledem k heterogenitě onemocnění existuje i mnoho příčin vzniku tohoto onemocnění. Primární poškození buňky, které je základní příčinou vzniku MDS, je způsobeno mutacemi různých genů a chromozomálními aberacemi. K rozvoji onemocnění přispívají také změny genové exprese genů, které se podílejí na regulaci buněčné proliferace, apoptózy, oprav DNA, buněčného cyklu atd.

Zjištění hladiny exprese genu *TP53* by mělo být podstatné, neboť tento gen má klíčovou funkci v regulaci celé řady buněčných procesů, jako jsou apoptóza, buněčný cyklus, oprava DNA, proliferace, senescence a autofágie. Tento gen je také nejčastěji mutovaným genem u nádorových onemocněních, u 50 % pacientů se solidními nádory a přibližně u 10 % pacientů s hematologickými malignitami, včetně MDS. Bylo prokázáno, že mutace *TP53* jsou negativním prognostickým faktorem u MDS a významně ovlivňují klinický stav pacientů.

Práce je součástí dlouhodobých výzkumných záměrů Oddělení genomiky ÚHK, které se zabývá expresními a mutačními analýzami v rámci patogeneze MDS a akutní myeloidní leukémie (AML). Diplomová práce je pokračováním studie publikované v roce 2016 v časopise *Oncotarget* pod názvem: *TP53 mutations variant allele frequency is a potential predictor for clinical outcome of patients with lower-risk myelodysplastic syndromes*, zaměřené na studium mutací *TP53* a jejich vlivu na stav pacientů. Předkládaná

práce se zabývá sledováním exprese genu *TP53* u pacientů s nízko-rizikovým MDS, vlivem mutace a del(5q) na regulaci celé signální dráhy p53, a dále vztahem mezi aberantní genovou expresí *TP53* a klinickým stavem pacienta.

2 Literární přehled

2.1 Myelodysplastický syndrom

2.1.1 Definice MDS

Myelodysplastický syndrom (MDS) byl původně označován jako preleukemický stav. Teprve Bennet *et al.*, 1976 poprvé vyznačil refrakterní anémii s nadbytkem blastů a chronickou myelomonocytární leukémií, které posloužily jako základ pro novou skupinu onemocnění, doplněnou dalšími typy onemocnění v roce 1982 (Bennet *et al.*, 1982).

MDS je heterogenní skupina klonálních onemocnění krvetvorby, způsobených poruchou diferenciací pluripotentní kmenové buňky. Je charakterizován neefektivní hematopoézou, která vede k cytopenii (trombocytopenii, leukopenii, anémii), dysplazii kostní dřeně a zvýšenému riziku přechodu onemocnění do AML.

Pro časnou fázi MDS je charakteristický nález zvýšené apoptózy buněk kostní dřeně, způsobující periferní cytopenii se zachováním buněčnosti kostní dřeně se známkou dysplazie. V pokročilé fázi MDS získává abnormální hematopoetická kmenová buňka růstovou výhodu oproti normálním hematopoetickým buňkám, dochází ke klonální expanzi abnormálních buněk a zvýšenému počtu nezralých buněk se sníženou apoptózou a nestabilitou genomu (Greenberg *et al.*, 2002; Heaney *et al.*, 1999; Raza *et al.*, 1995; Raza *et al.*, 1996). Přechod do akutní myeloidní leukémie nastává, pokud nejsou schopny nezralé buňky se správně diferencovat a přestanou podléhat apoptóze (Parker *et al.*, 1998, Parker *et al.*, 2000).

Můžeme rozlišit dvě základní formy MDS, a to tzv. primární MDS, u kterého nejsou pozorovatelné vnější vlivy na vznik onemocnění (tvoří asi 90 % všech případů), a tzv. sekundární MDS, kde se na vzniku onemocnění podílejí vnější vlivy (Adam *et al.*, 2004).

2.1.2 Epidemiologie

Incidence MDS není úplně přesná, průměrně se pohybuje mezi 2 - 5 případy na 100 000 obyvatel za rok. Počet nemocných se zvyšuje s věkem, před 40-tým rokem života bývá diagnostikován vzácně, ale u obyvatel nad 60 let se incidence pohybuje mezi 20 - 50 případy na 100 000 obyvatel za rok. Medián věku při určení diagnózy je 70 let. Incidence v Evropě a USA je velmi podobná (Aul *et al.*, 2001; Sekeres, 2010; Rollinson *et al.*, 2008; Phekoo *et al.*, 2006; Neukirchen *et al.*, 2011; Sekeres *et al.*, 2008). I když MDS je spíše onemocněním starších lidí, existuje i dětská forma MDS, která je velmi vzácná

a tvoří pouze 4 % případů diagnostikovaných hematoonkologických onemocnění u dětí (Hasle *et al.*, 2003). MDS je častěji diagnostikován u mužů než u žen, kromě subtypu del(5q), který je častější u žen (Neukirchen *et al.*, 2011). Ročně přibude přibližně 12 000 nových pacientů v USA a 20 000 v Evropě (Germinig *et al.*, 2008). Pacienti většinou přežívají 23-34 měsíců od stanovení diagnózy (Phekoo *et al.*, 2006; Irwin *et al.*, 2011).

V České republice přesná statistika incidence a prevalence neexistuje, ale nedá se očekávat, že by se výrazně lišila od celosvětových statistik.

2.1.3 Klinické projevy

Hlavním klinickým příznakem myelodysplastického syndromu je cytopenie. Onemocnění se projevuje podle přítomnosti cytopenie v dané krvetvorné buněčné linii. Pacienti přichází k lékaři zejména s únavou, sníženou fyzickou výkonností, dušností, hučením v uších a bledostí, tyto příznaky jsou charakteristické pro těžkou anémii. Až 80 % pacientů má koncentraci hemoglobinu pod 100g/l. 25-30 % pacientů trpí četnými infekčními onemocněními a jejich častější recidivě při granulocytopenii. Při trombocytopenii, která se vyskytuje u 10 % pacientů, trpí zhoršenou krevní srážlivostí a krvácivými projevy, nejčastěji kožními a slizničními, ženy trpí i abnormálně silným menstruačním krvácením a krvácením mimo menstruační cyklus. Většinou nebývají zvětšené lymfatické uzliny, u CMML a smíšených myelodysplasticko – myeloproliferativních chorob (MDS/MPD) a MDS s fibrózou dřeně může být zaznamenáno zvětšení jater a sleziny. U 15 % pacientů se mohou vyskytovat i autoimunní defekty: artritida, horečka, myozitida, neuropatie, pleuritida, perikarditida a Sweet syndrom (Mayer a Starý, 2002; Adam *et al.*, 2004).

2.2 Diagnostika a klasifikace

2.2.1 Diagnostika

Stanovení diagnózy MDS je komplexní proces opírající se o nálezy v periferní krvi a kostní dřeni, zahrnuje několik odlišných vyšetření – morfologické, cytochemické, imunofenotypizační, cytogenetické a molekulárně genetické vyšetření.

Důležitá je tzv. diferenciální diagnostika, díky níž lze vyloučit jinou příčinu cytopenie, jako např. nedostatek vitamínu B12, nedostatek kyseliny listové či železa, paroxysmální noční hemoglobinurii, autoimunní hemolytickou anemii, aplastickou anémii, myeloproliferační choroby s projevy myelodysplazie, chronickou idiopatickou neutropenií dospělých a cytopenii způsobenou toxickým vlivem léků (Adam *et al.*, 2004).

European LeukemiaNet v publikaci sepsané Malcovati *et al.*, 2013 rozdělila vyšetření do tří základních skupin uvedených v Tab. č. 1.

Tabulka č. 1 – Přehled typů vyšetření

Kategorie	Vyšetření	Výsledek
Základní (povinná)	krevní obraz a diferenciální rozpočet	hodnocení dysplazie, počet blastů
	sternální punkce	hodnocení dysplazie, počet blastů a prstenčitých sideroblastů
	biopsie kostní dřene	posouzení buněčnosti, CD34 buněk a stupně fibrózy
	cytogenetika	detekce abnormalit chromozomů
Doporučená	FISH	při selhání G-pruhování
	imunofenotypizace	detekce abnormalit v jednotlivých buněčných liniích
Navrhovaná	SNP array	detekce chromozomálních aberací
	mutační analýza kandidátních genů	detekce somatických mutací

Níže jsou podrobněji popsány pouze metody cytogenetiky a molekulárně genetická vyšetření, která jsou stěžejní pro tuto práci. Více informací o jednotlivých diagnostických metodách je možno nalézt v přehledového článku Malcovati *et al.*, 2013 a Čermák in Mayer, 2002.

2.2.1.1 Cytogenetická vyšetření

Cytogenetická vyšetření jsou využívána k určení klonality u pacientů a zejména abnormalit nacházejících se v karyotypu. Abnormální karyotyp je detekován u více než 50 % pacientů s primárním MDS a 80 % pacientů se sekundárním MDS. Nejčastěji nalézányi aberacemi jsou úplné či částečné delece chromozomů, přídavné chromozomy a méně častými jsou vyvážené translokace.

Využíváno je zejména klasické G pruhování chromozomů, při kterém musí být hodnoceno minimálně 20 buněk v metafázi. Používána je i novější metoda FISH (fluorescenční in-situ hybridizace), která je indikována zejména pokud nelze provést G pruhování.

2.2.1.2 Molekulárně genetická vyšetření

Molekulárně genetická vyšetření se v minulosti zaměřovala ve větší míře na průkaz klonality krvetvorby analýzou chromozomu X, která je založena na rozdílnosti mateřského a otcovského chromozomu X. K odlišení chromozomů se používají polymorfni oblasti, např. gen HUMARA (lidský androgenní receptor). Samotná analýza je založena na štěpení DNA místně specifickými restrikcni endonukleázami. Polyklonální charakter krvetvorby odpovídá normální stavu, pokud je prokázán monoklonální, pak pravděpodobně došlo k expanzi jedné buňky.

V poslední době dochází k rozvoji metod molekulární genetiky v rámci diagnostiky hematologických onemocnění. Diagnostika se zaměřuje na jednotlivé geny související s onemocněním, ať už se jedná o detekci somatických mutací, či sledování genové exprese. Zejména somatické mutace vybraných genů mohou sloužit jako velmi dobrý prognostický a diagnostický faktor, např. gen *TP53* či *SF3B1* (Haferlach, 2012).

Většina molekulárně genetických metod je založena na polymerázové řetězcové reakci (PCR) a slouží k získání většího množství vstupního materiálu pro další vyšetření (např. sekvenování) nebo přímo k detekci mutací, sledování vývoje choroby, detekci chimérismu po alogenní transplantaci kostní dřeně, detekci minimální zbytkové nemoci, detekci patogenů a markerů nádorových buněk, vyšetření klonality lymfocytů. Sleduje se také genová exprese jednotlivých genů pomocí varianty PCR, tzv. real - time PCR.

Novější metody jsou založeny na čípech (microarrays), které umožňují zpracování více vzorků během jediného pokusu. V případě sledování genové exprese detekují paralelně velké množství genů (stovky až desetitisíce). Dále se používají tzv. SNP čipy pro stanovení genotypu. Pokud se spojí s dalšími technikami je možno i studovat regulaci

genové exprese či epigenetické změny (Pospíšilová *et al.* in Penka *et al.*, 2011). Pro vyšetření mutací jsou využívány metody sekvenování nové generace (NGS), kdy v jediném pokusu probíhají tisíce paralelních sekvenačních reakcí. Což je zajištěno klonální amplifikací primárního produktu pomocí PCR.

Všechny tyto novější metody jsou zatím předmětem výzkumných záměrů, v praxi pro diagnostiku onemocnění nejsou zatím rutinně používány. V nejbližší budoucnosti se dá očekávat zařazení vyšetření mutačního stavu vybraných genů pomocí NGS do rutinní diagnostiky pro přesnější určení typu onemocnění a jako přesnější prognostické kritérium. Mezi kandidátní geny patří *SF3B1*, *TP53*, *NRAS* či *RUNX1*.

2.2.2 Klasifikace

Nejdůležitějším krokem k úspěšné léčbě pacienta s MDS je správné určení diagnózy, ale heterogenita onemocnění a s tím i rozličný klinický obraz to komplikuje. Dnes je proto diagnóza stanovována podle několika systémů, které se používají souběžně. Ke stanovení správné diagnózy a prognózy se používají současně následující klasifikační a prognostické systémy.

2.2.2.1 FAB klasifikace

Jako první systém pro klasifikaci MDS byla tzv. FAB (francouzsko-americko-britská) klasifikace, která byla publikována v roce 1982 (Bennet *et al.*, 1982) [Příloha č. 2]. Tato klasifikace je částečně používána dodnes, zejména proto, že z ní vycházejí novější klasifikační systémy. FAB klasifikace rozděluje MDS do pěti subtypů onemocnění zejména podle na procentuálního zastoupení blastů v periferní krvi a kostní dřeni.

2.2.2.2 IPSS-R prognostický skórovací systém

V roce 1997 byl vydán IPSS (Mezinárodní prognostický skórovací systém), který umožňuje na základě procentuálního obsahu blastů v kostní dřeni, počtu cytopenií a karyotypu zařadit pacienta do prognostické skupiny, která předpovídá délku trvání choroby a riziko přechodu do AML. Tento systém lze uplatnit pouze na pacienty s *de novo* MDS (Greenberg *et al.*, 1997).

V roce 2012 byl systém revidován na IPPS-R a byly přidány další prognostické hodnoty jako hladina hemoglobinu, počet krevních destiček a neutrofilů (Greenberg *et al.*, 2012) [Tab. č. 2 a č. 3].

Tabulka č. 2. – Mezinárodní prognostický skórovací systém

Kritérium/Hodnota	0	0.5	1	1.5	2	3	4
Cytogenetika (karyotyp)	velmi dobrý	-	dobrý	-	intermediární	nepříznivý	velmi nepříznivý
Blasty v KD (%)	≤ 2	-	> 2 < 5	-	5 - 10	> 10	-
Hemoglobin (g/dL)	≥ 10	-	8 < 10	< 8	-	-	-
Krevní destičky (x10⁹/L)	≥ 100	50 < 100	< 50	-	-	-	-
Neutrofily (x10⁹/L)	≥ 0.8	< 0.8	-	-	-	-	-

Kategorie rizika	Skóre	Přežití (roky)*	Přechod do AML*
velmi nízká	≤ 1.5	8.8	NR
nízká	> 1.5 - 3	5.3	10.8
intermediární	> 3 - 4.5	3.0	3.2
vysoká	> 4.5 - 6	1.6	1.4
velmi vysoká	> 6	0.8	0.73

- neprokazatelný
NR – kritérium nedosaženo
* medián (roky), do 25 % AML

Tabulka č. 3 – Rozdělení karyotypů do prognostických skupin

Prognostické podskupiny	Cytogenetická abnormalita	Medián přežití (roky)	Medián přechodu do AML (25%)
Velmi dobrá	-Y, del(11q)	5.4	NR
Příznivá	normální, del(5q), del(12p), del(20q), dvě aberace zahrnující del(5q)	4.8	9.4
Intermediální	del(7q), +8, +19, i(17q), jakýkoli jiný jeden nebo dva nezávislé klony	2.7	2.5
Špatná	-7, inv(3)/t(3q)/del(3q), dvě aberace zahrnující -7/del(7q), komplex 3 abnormalit	1.5	1.7
Velmi špatná	komplex více jak 3 abnormalit	0.7	0.7

2.2.2.3 WHO klasifikace a prognostický systém

Následující klasifikační WHO (World Health Organisation) systém z roku 2001 byl následně roku 2008 a 2016 revidován. WHO klasifikace z roku 2001 oproti FAB klasifikaci rozdělila refrakterní anémii na dvě skupiny: RA s dysplazií pouze v červené řadě a na refrakterní cytopenii s dysplazií ve více řadách (RCMD) a CMML přesunula do skupiny smíšených myelodysplasticko-myeloproliferativních chorob (MDS/MPD). Podskupina RAEB-T byla zařazena do subtypů AML. Nejdůležitější změnou je snížení hranice počtu blastů v kostní dřeni z 30 % na 20 % pro stanovení diagnózy MDS (Vardiman *et al.*, 2002).

V revidovaném klasifikačním systému WHO z roku 2008 byla podskupina RA nahrazena podskupinou RCUD (refrakterní cytopenie s dysplazií v jedné řadě) (Swerdlow *et al.*, 2008). V tomto klasifikačním systému jsou jako hodnotící kritéria použita kromě počtu blastů v periferní krvi a kostní dřeni i počet dysplazií či cytogenetické abnormality. Rozdíly mezi klasifikačními tabulkami MDS z roku 2001 a 2008 jsou uvedeny v Příloze č. 2.

V roce 2016 byla vydána aktuální verze klasifikačního systému WHO. Došlo k úpravě terminologie: termín "*refrakterní anémie*" a "*refrakterní cytopenie*" jsou nahrazeny termínem "*myelodysplastický syndrom*", který je doplněn příslušnými kritérii. Nejnovější klasifikace MDS podle WHO je uvedena v tabulce č. 4, včetně kritérií (Arber *et al.*, 2016).

Druhým prognostickým systémem je WPPS (WHO Classification-Based Prognostic Scoring System). Tento systém má 4 rizikové skupiny (Malcovati *et al.*, 2007) [Příloha č. 2].

Tabulka č. 4 – WHO klasifikace MDS z roku 2016

Pojmenování	Dysplastická linie	Cytopenie ¹	% prstenčitých sideroblastů v KD	% blastů v PK	% blastů v KD	Auerovy tyčky	Karyotyp
MDS s jednou dysplastickou linií (MDS-SLD)	1	1 nebo 2	<15 %/<5 %*	< 1 %	< 5 %	žádné	jakýkoliv, pokud nenaplní všechna kritéria pro izolovanou del(5q)
MDS s multilineární dysplázií (MDS-MLD)	2 nebo 3	1 - 3	<15 %/<5 %*	< 1 %	< 5 %	žádné	jakýkoliv, pokud nenaplní všechna kritéria pro izolovanou del(5q)
MDS s prstenčitými sideroblasty (MDS-RS)							
MDS-RS s jednou dysplastickou linií (MDS-RS-SLD)	1	1 nebo 2	≥15 %/≥5 %*	< 1 %	< 5 %	žádné	jakýkoliv, pokud nenaplní všechna kritéria pro izolovanou del(5q)
MDS-RS s multilineární dysplázií (MDS-RS-MLD)	2 nebo 3	1 - 3	≥15 %/≥5 %*	< 1 %	< 5 %	žádné	jakýkoliv, pokud nenaplní všechna kritéria pro izolovanou del(5q)
MDS s izolovanou del(5q)	1 - 3	1 - 2	žádný nebo jakýkoliv	< 1 %	< 5 %	žádné	osamocená del(5q) nebo s jednou přidanou abnormalitou mimo -7 nebo del(7q)
MDS s nadbytkem blastů (MDS-EB)							
MDS-EB-1	0 - 3	1 - 3	žádný nebo jakýkoliv	2 – 4 %	5 – 9 %	žádné	jakýkoliv
MDS-EB-2	0 - 3	1 - 3	žádný nebo jakýkoliv	5 – 19 %	10 – 19 %	ano	jakýkoliv
MDS, neklasifikovaný (MDS-U)							
s 1 % blastů v periferní krvi	1 - 3	1 - 3	žádný nebo jakýkoliv	1 %	< 5 % [§]	žádné	jakýkoliv
s jednou dysplastickou linií a pancytopenií	1	3	žádný nebo jakýkoliv	< 1 %	< 5 %	žádné	jakýkoliv
definována na základě cytogenetické abnormality	0	1 - 3	< 15 % [!]	< 1 %	< 5 %	žádné	MDS-definující abnormalita
Dětská refrakterní cytopenie	1 - 3	1 - 3	žádné	< 2 %	< 5 %		jakýkoliv

¹ definice cytopenie: hemoglobin (< 10 g/dL), počet krevních destiček (< 100 x 10⁹/L), absolutní počet neutrofilů (< 1.8 x 10⁹/L), zřídka může být MDS prezentován mírnou anémií, nebo trombocytopenií nad těmito hranicemi. Počet monocytů v periferní krvi musí být < 1 x 10⁹/L

* pokud je přítomna mutace *SF3B1*

§ jedno procento blastů v periferní krvi musí být zaznamenáno minimálně při 2 odlišných příležitostech

[!] případy s ≥ 15 % prstenčitých sideroblastů mají dle definice signifikantní erytroidní dysplázií a jsou řazeny jako MDS-RS-

2.3 Speciální formy MDS

V rámci klasifikace tohoto heterogenního onemocnění můžeme oddělit ještě několik speciálních typů MDS, které mají specifické znaky. A to sekundární (t-MDS), hypoplastický MDS, myelodysplázie s fibrózou a dětské MDS.

Tzv. sekundární MDS vzniká většinou jako následek chemoterapie a radioterapie. Onemocnění se může objevit i několik let po ukončení terapie, ale většina případů je diagnostikována v rozmezí 5 - 10 let po ukončení terapie. Pacienti mají horší prognózu než pacienti s *de novo* MDS, méně reagují na léčbu (zejména na léčbu cytostatiky) a častěji progredují do AML. Onemocnění má rychlý průběh, pacienti trpí těžkou cytopenií. Medián přežití je 6,5 měsíce od stanovení diagnózy. Velmi signifikantní rozdíl je v počtu chromozomálních abnormalit, u *de novo* MDS je to 45 %, u t-MDS to je 84 % (Singh *et al.*, 2007; De Roos *et al.*, 2007; Mauritzson *et al.*, 2002; Čermák in Mayer, 2002).

Hypoplastická forma MDS má velmi podobné klinické projevy jako aplastická anémie, proto je velmi těžké je od sebe odlišit (Barret *et al.*, 2000). Od aplastické anémie se hypoplastická forma MDS liší zejména počtem CD34 pozitivních buněk, které jsou u MDS v normálním či zvýšeném počtu, ale u aplastické anémie je jejich počet snížený (Matsui *et al.*, 2006).

MDS se značnou fibrózou v kostní dřeni pro pacienta znamená horší prognózu přežití. Pacienti většinou mají multilineární dysplázii, více chromozomálních abnormalit (horší cytogenetickou prognózu), pokročilou cytopenii s nutností transfúzí, a to vše při zvýšené buněčnosti kostní dřene. Pro tuto formu jsou charakteristické klastry CD34 pozitivních buněk, které slouží jako negativní prognostický faktor pro přechod do AML (Marisavlejević *et al.*, 2004; Maschek *et al.*, 1992; Della Porta *et al.*, 2009).

MDS je u dětí diagnostikován méně častěji než u dospělých, incidence je přibližně 1-2 nemocné děti z miliónu (Passmore *et al.*, 2003). Liší se také svými klinickými projevy, typy cytogenetických aberací a je léčen především alogenní transplantací kostní dřene. Má svůj odlišný klasifikační systém o 3 hlavních kategoriích: MDS/MPN, nemoci asociované s Downovým syndromem a MDS (Hasle *et al.*, 2003). U dětských pacientů je v 90 % nalézána hepatosplenomegalie, v 75 % lymfadenopatie, v 70 % bledost, v 60 % horečka a v 40 % kožní vyrážka. U dětí je mnoho predisponujících okolností, které vedou k rozvoji MDS jako např. trisomie 21. chromozomu (Downův syndrom), familiární monosomie 7. chromozomu, Fanconiho anémie, a předešlá chemoterapie či radioterapie atd. (Čermák, 2002).

2.4 Léčba

Léčebný postup je pro každého pacienta vždy individuální, což je dáno heterogenním charakterem tohoto onemocnění. Výběr vždy závisí na závažnosti zdravotního stavu pacienta, zařazení do prognostické skupiny a dalších možných přidružených zdravotních komplikací. Léčebné metody můžeme rozdělit do 2 hlavních skupin podle rizikových skupin pacientů: léčebné postupy pro pacienty s nízkým či středním-1 rizikem a pro pacienty se středním-2 či vysokým rizikem dle IPSS-R.

Další možností je rozdělení podle cíle léčby: symptomatická léčba, látky podporující diferenciaci buněk ve zralé funkční prekurzory a postupy pro eliminaci patologického klonu (Čermák in Mayer *et al.*, 2002).

Stručný přehled léčebných metod byl zpracován na základě publikace České hematologické společnosti a České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně – Léčebné postupy v hematologii, Čermák in Mayer *et al.*, 2002 a přehledového článku Malcovatti *et al.*, 2013. Podrobnější informace o jednotlivých možnostech léčby je možno dohledat např. ve člancích Fenaux *et al.*, 2013 a Sekeres *et al.*, 2014.

U pacientů s nízkým či středním-1 rizikem (IPSS-R 0-1) je snaha o ovlivnění symptomů, zlepšení kvality života pacienta, zpoždění progresu onemocnění do AML. Léčebnými strategiemi jsou u této skupiny pacientů: sledování stavu pacienta, transfúze, chelatační léčba, podávání růstových faktorů krvetvorby, imunomodulační a imunosupresivní léčba, alogenní transplantace krvetvorných buněk.

U pacientů se středním-2 a vysokým rizikem (IPSS-R 1,5-2) je cílem zvrátit přirozený průběh onemocnění a prodloužit dobu života pacienta. Pro dosažení těchto cílů jsou indikovány tyto typy léčby: nízkodávková a kombinovaná chemoterapie, hypometylační léčba, alogenní transplantace krvetvorných buněk.

V Příloze č. 3 jsou uvedeny schémata léčebných postupů pro výběr správné léčby pro pacienta.

2.5 Patogeneze

Patogeneze myelodysplastického syndromu není stále podrobně vysvětlena, ale s rozvojem molekulárně genetických technik jsou pomalu objasňovány molekulární faktory a mechanismy zapojené do patogeneze onemocnění.

Hlavním krokem v patogenezi, a to tím nejdůležitějším, je primární poškození hematopoetické kmenové buňky. Tato poškozená buňka může mít určitou proliferační výhodu ve srovnání se zdravými buňkami, čímž dochází postupně k nárůstu populace CD34⁺, která je charakteristická pro pokročilou fázi onemocnění. Primární poškození buňky je způsobeno buď somatickými mutacemi nebo chromozomálními aberacemi, které mohou vzniknout spontánně či po působení toxických látek. Poškozená buňka je zastavena v nejbližším kontrolním bodě buněčného cyklu (nejčastěji v G1 kontrolním bodě), kde může nastat oprava genetické informace, pokud poškození nejde opravit, dojde k procesu apoptózy.

V patogenezi se uplatňují zejména pozměněné procesy jako abnormální apoptóza, genetická nestabilita, potlačení normální krvetvorby, porucha diferenciacie a proliferace hematopoetických kmenových buněk. Somatické mutace a chromozomální aberace postihují geny, jejichž produkty fungují jako transkripční faktory nebo se uplatňují v sestřihu RNA, signálních drahách, opravě DNA, epigenetických procesech jako metylace DNA či histonová modifikace. S velkou pravděpodobností právě kombinace chromozomálních abnormalit a somatických mutací je odpovědná za heterogenitu onemocnění (Mayer a Starý, 2002; Pospíšilová *et al.*, 2013).

Důležitou roli v patogenezi hraje programovaná buněčná smrt - apoptóza. Frekvence apoptózy diferencovaných buněk je vyšší v časně fázi onemocnění a projeví se periferní cypenií. V pozdní fázi onemocnění je frekvence apoptózy naopak nižší, což vede k nárůstu populace nediferencovaných buněk s možným vývojem onemocnění do AML (Parker and Mufti, 2001). Pro zvýšenou frekvenci apoptózy buněk je charakteristické snížení exprese *bcl-2* a abnormální exprese *c-Myc*, *Bad*, zvýšená exprese *bcl-2* svědčí pro transformaci do AML (Davis and Greenberg, 1998; Čermák in Pospíšilová *et al.*, 2013).

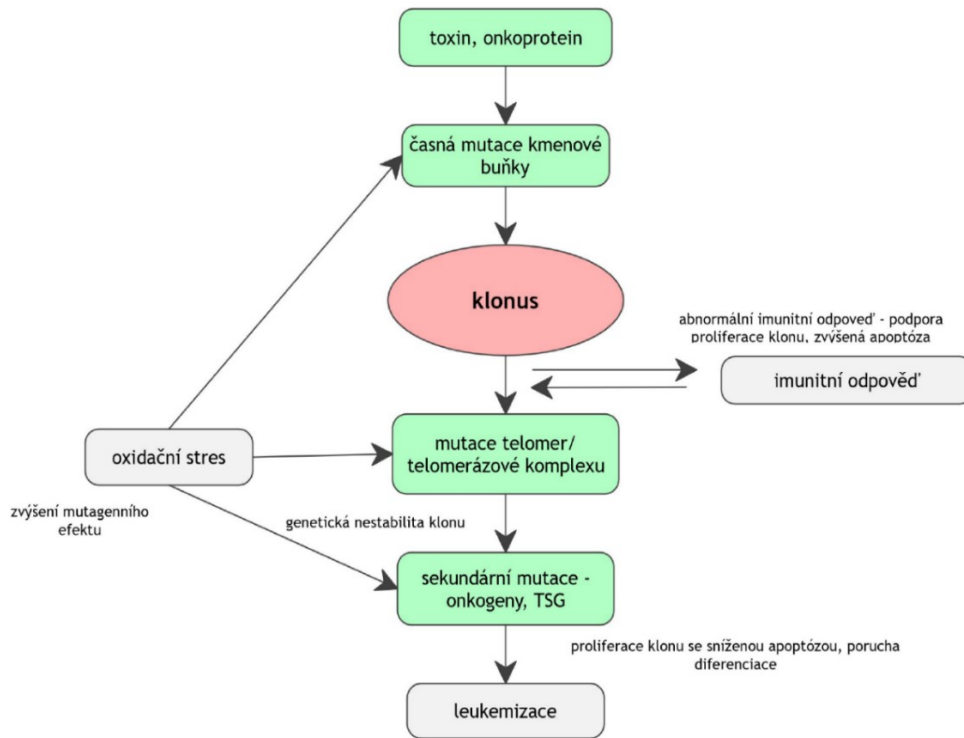
Apoptotická dráha je aktivována pomocí TNF, který se váže na receptory TNF1 a TNF2. Pokud se TNF naváže na TNF1 spustí formaci tzv. smrt-indukujícího signalizačního komplexu (DISC), který obsahuje TNFR asociovaný s doménou smrti (TRADD) a Fas asociovaný s doménou smrti (FADD). TRADD a FAD jsou aktivátory kaspáz, které dále spouští apoptózu (Scott *et al.*, 2009; Dickens *et al.*, 2012). V rámci studia patogeneze onemocnění jsou studovány i rizikové faktory vnějšího prostředí. Bylo

prokázáno vyšší riziko výskytu MDS u lidí, kteří kouří nebo dlouhodobě kouřili. Ve studii Ma *et al.*, 2011 bylo zjištěné zvýšené riziko úrtní u pacientů s nízko rizikovým MDS ve spojení s kuřáctvím.

Studován je i vliv alkoholu, ale jednoznačný vliv na vznik onemocnění nebyl prokázán (Du *et al.*, 2010). Ve studiích zaměřených na obezitu bylo zjištěno, že u pacientů s BMI vyšším než 25 je vyšší riziko vzniku MDS (Ma *et al.*, 2009). Zvýšené riziko vzniku MDS je také asociováno s vystavením lidí pesticidům a rozpouštědlům, jako např. benzen (Strom *et al.*, 2005; Kokouva *et al.*, 2011; Lv *et al.*, 2011). Lidé s autoimunitními onemocněními jsou také náchylnější ke vzniku MDS (Dalamaga *et al.*, 2002).

Podstatnou úlohu na rozvoji onemocnění má také imunitní systém. U pacientů s autoimunitními poruchami, jako systémový lupus erythematoses, Sjögrenův syndrom, Raynaudova choroba, pacientů s plicními infiltráty, polychondritidou, periferní polyneuropatií, glomerulonefritidou, ulcerózní kolitidou, autoimunitní cytopenií, artritidou, akutní či systémovou kožní vaskulitidou, přítomností autoprotilátek, monoklonální gamapatií, hypo- či hyper-gamaglobulinémií se častěji rozvíjí MDS. Většina anomálií v imunitním systému je zaměřena na T buňky a konkrétně na pozměněný TCR receptor, abnormálně jsou také exprimovány regulační T lymfocyty (Treg), které jsou aktivovány ve větší míře v pokročilejší fázi onemocnění a napomáhají transformaci do AML. Sníženou funkci mají NK (natural killer) buňky a jsou také asociovány s pozdní fázi onemocnění (Fozza and Longinotti, 2012). K aktivaci imunitní odpovědi dochází při primárním poškození buňky ať už mutací nebo po působení škodlivé látky. Svoji roli mají také cytotoxické T lymfocyty, které jsou aktivovány při poškození hematopoetické kmenové buňky ve spojení se zvýšenou produkcí cytokinů jako TNF- α , TNF- β , Fas ligandu či IL1- β , které jsou schopny podpořit proliferaci časných progenitorů a spustit apoptózu buněk v pozdním diferenačním stavu. Aktivace Fas ligandu vede k jeho vazbě na CD95(Fas) receptor a ke spuštění kaspázové signální dráhy, která může degradovat DNA (Čermák in Pospíšilová *et al.*, 2013).

Pravděpodobně je také narušena správná funkčnost mikroprostředí pro krvetvorbu. Vrstva, která obsahuje hlavně fibroblasty, produkuje u pacientů s MDS větší množství cytokinu Il-6, vrstva obsahující makrofágy produkuje více TNF- α . Produkce těchto cytokinů stimuluje VEGF faktor, který odpovídá za expanzi patologického klonu při současném usmrcení zdravé buňky (Čermák in Pospíšilová *et al.*, 2013).



Obrázek č. 1: Pravděpodobný vývoj myelodysplastického syndromu (*Převzato a upraveno z Čermák in Pospíšilová et al., 2013*)

V souvislosti s patogenezí MDS jsou studovány i telomery, obzvláště jejich délka a aktivita enzymu telomerázy. Telomery jsou ve zdravých buňkách periferní krve zkracovány zhruba o 40 - 80bp za rok (Iwama *et al.*, 1998). Pokud je telomera zkrácena pod kritickou hranici, dochází k degradaci DNA a následné eliminaci buněk. Některé buňky této kontrole však mohou uniknout, pokud z nich vznikne patologický nesmrtelný klon, který má aktivní telomerázu. Telomery jsou u pacientů s MDS výrazně zkráceny, ale např. u pacientů s monosomií 7. chromozomu byly identifikovány výrazně delší telomery i ve srovnání se zdravými pacienty. Tohoto stavu je patrně dosaženo alternativním prodlužováním telomer (Lange *et al.*, 2009). Výraznější zkrácování telomer souvisí s progresí onemocnění, ale i s výskytem chromozomálních aberací (Sieglová *et al.*, 2004). Též byla studována asociace mezi mutacemi a délkou telomer. Pacienti s MDS nesoucí somatické mutace měli méně buněk s kratšími telomerami, ale pokud u pacientů bylo $\geq 80\%$ buněk s krátkými telomerami, vykazovali zhoršené přežití a měli celkově špatnou prognózu (Hwang *et al.*, 2016).

Pro přechod z časně fáze onemocnění do pozdní fáze je charakteristická genetická nestabilita, která může být způsobena mutacemi a vede k aberantním formám produktů jako NADP(H) chinon oxidoreduktáza, glutathion(S) transferáza, které nejsou schopni

zajistit správný průběh reparace DNA (*RAD51*, *XRCC3*) a tím k nestabilitě. Genetická nestabilita patologického klonu může vést k dalším mutacím prohlubujícím onemocnění (Starý in Mayer, 2002).

2.5.1 Chromozomální aberace

Chromozomální aberace jsou detekovány u ~50 % pacientů s MDS za pomoci klasických cytogenetických metod, tak novějších přístupů jako SNP či CGH. Pomocí těchto metod bylo identifikováno 19 abnormalit, jak balancovaných, tak nebalancovaných přestaveb chromozomů, vyskytujících se u pacientů s diagnózou MDS (Schanz *et al.*, 2012; Gondek *et al.*, 2008).

Studium karyotypu je vhodné pro určení klonality jako prognostického faktoru.

Tabulka č. 5: Přehled chromozomálních aberací nalézáných u pacientů s MDS (*Převzato a upraveno z Visconte et al., 2014*)

Typ aberace	Chromozomální aberace	Primární MDS (%)	Sekundární MDS (%)	
Nebalancované	-5, del(5q)	10	40	
	-7, del(7q)	10	50	
	+8	10	23	
	del(20q)	5-8	2.2	
	-Y	5	nevyužitelná	
	i(17q), t(17q)	3-5	vzácná	
	del(11q)	3	3.9	
	del(12p), t(12p)	3	nevyužitelná	
	-13, del(13q)	3	1.2	
	idic(X)(q13)	1-2	nevyužitelná	
	del(9q)	1-2	nevyužitelná	
	Balancované	t(11;16)(q23;p13.3)		3
		t(3;21)(q26.2;q22.1)		2
		t(1;3)(p36.3;q21.2)		nevyužitelná
t(2;11)(p21;q23)			nevyužitelná	
inv(3)(q21q26.2)		1	0.2	
t(6;9)(p23;q34)		1	0.2	
t(11q23)		1	12	
t(21q22)		1	2.6	
t(15;17)			2	
inv(16)			2	
t(8;16)		0.3		

Níže jsou podrobněji popsány pouze 3 nejčastější chromozomální aberace a charakterizace.

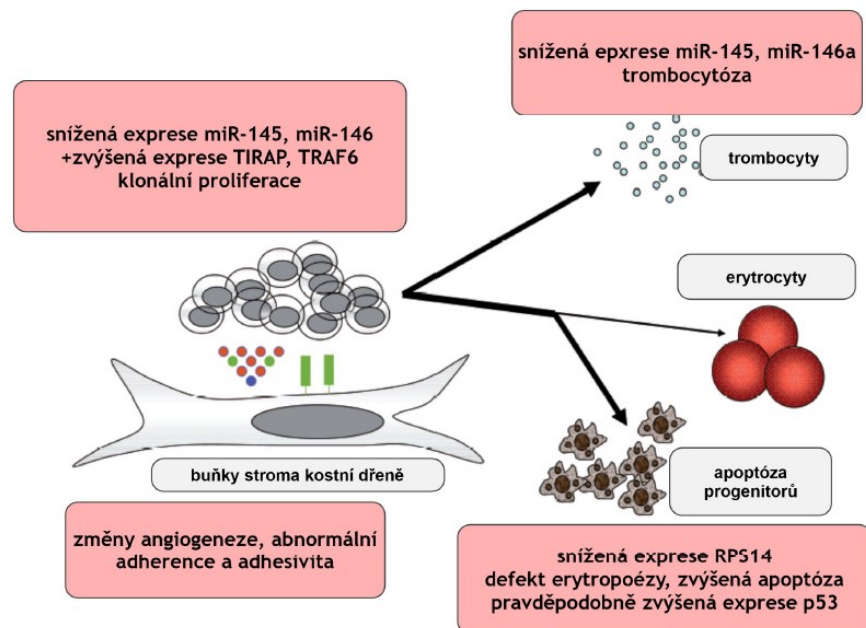
Aberace 7. chromozomu (monosomie 7. chromozomu, del(7q)) se vyskytuje v ~10 % *de novo* MDS případů, a u ~50 % případů t-MDS, častější je též u dětských pacientů. Je spojena se špatnou prognózou. Intersticiální delece 7q je asociována s horším průběhem onemocnění než izolovaná delece. Běžně deletovaná oblast (tzv. CDR) se nachází v oblasti 7q22 – 7q32-34. Delece způsobuje deregulaci RAS signální dráhy ve spojení s mutacemi genů *KRAS* a *NRAS* (Kardos *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2003; Le Beau *et al.*, 1996; Side *et al.*, 2004; Schanz *et al.*, 2011; Haase *et al.*, 2007).

Trisomie 8. chromozomu se nachází přibližně u 10 % pacientů s MDS, je jí přisuzováno střední riziko a její výskyt je spojen s pozdní fází onemocnění. Je nalézána zejména v myeloidních prekurzorech, kromě CD34⁺CD38⁻CD90⁻ kmenových buněk. Myeloidní prekurzory s trisomií 8 mají více exprimovány anti-apoptické geny, tím vzniká výhoda pro patologický klon. Pacienti jsou vhodnými kandidáty pro imunosupresivní léčbu, zejména pokud mají i HLA-DR15 fenotyp (Schanz *et al.*, 2011; Nilsson *et al.*, 2002; Sloand *et al.*, 2005; Sloand *et al.*, 2007).

Delece na 5. chromozomu patří mezi nejčastější cytogenetické aberace u MDS s frekvencí 10-15 % (Haase *et al.*, 2007). Intersticiální delece je lokalizována mezi pruhy 5q31 – 5q33. V rámci této oblasti byl stanoven tzv. CDR1 o velikosti přibližně 1,5Mb v intervalu 5q32 – 5q33 a je asociován s fenotypem 5q-syndromu (anémii a méně častou progresí do AML). Druhý stanovený CDR2 se nachází kolem lokusu 5q31 a je spíše asociována s t-MDS, agresivním průběhem a častější transformací do AML. V CDR1 bylo identifikováno 40 kandidátních genů pro patogenezi 5q-syndromu (Boultonwood *et al.*, 2002; Lai *et al.*, 2001; Boultonwood *et al.*, 2000). Přehled kandidátních genů lokalizovaných v CDR oblastech je uveden v Příloze č. 1. Charakteristickými příznaky 5q-syndromu jsou makrocytická anémie, normální či zvýšený počet krevních destiček, které jsou způsobeny haploinsuficiencí genů v CDR oblasti 5. chromozomu (Berghe Van den *et al.*, 1974; Ebert *et al.*, 2008).

MDS typu del(5q) je oproti ostatním zvláštní tím, že častěji postihuje ženy (2:1). Pokud se vyskytuje izolovaně bez dalších aberací, mají pacienti lepší prognózu s minimální transformací do AML. Zhoršení prognózy pacienta je často spojeno s mutací genu *TP53*. Pacienti s izolovanou del(5q) lépe reagují na léčbu lenalidomidem (67 % versus 3 %), dosahují v 50 % kompletní remise a v 55-70 % transfúzní nezávislosti, ale pokud je u pacientů detekována mutace *TP53*, pacienti na léčbu nereagují (Adés *et al.*,

2009; Kantarjian *et al.*, 2009; Boultonwood *et al.*, 1994; Greenberg *et al.*, 1997; Christiansen *et al.*, 2001; Fenaux *et al.*, 2011; Jädersten *et al.*, 2009). Na obrázku č. 2 je zobrazen předpokládaná patogeneze 5q-syndromu.



Obrázek č. 2: Schéma předpokládané patogeneze 5q-syndromu (*Převzato a upraveno z Jädersten et al., 2010*)

Monoalelická delece genu *RPS14* kódujícího ribozomální protein S14, který je součástí 18S prekurzoru pre-rRNA a výsledné 40S podjednotky vede k narušení formování malé ribozomální podjednotky. Delece vede k poškození diferenciaci erytrocytů a tím k makrocytické anémii. Zatím bylo identifikováno min. 10 ribozomálních proteinů (*RPS14*, *RPS24*), jejichž haploinsuficience způsobuje podobné projevy např. Diamond-Blackfan anémie (DBA). Narušení formování ribozomů (tzv. ribozomální stres) vede k aktivaci dráhy p53 u erytroidních progenitorů a následné akumulaci p21, zastavení buněčného cyklu a k apoptóze. U myších modelů se podařilo obnovit diferenciaci erytrocytů skrz inaktivaci p53, což naznačuje nové možnosti ve vývoji léčebných postupů u pacientů s del(5q) (Ebert *et al.*, 2008; Narla *et al.*, 2010; Barlow *et al.*, 2010; Dutt *et al.*, 2011).

2.5.2 Somatické mutace

S využitím metod sekvenování nové generace bylo odhaleno mnoho somatických mutací u pacientů s MDS. Tyto mutace ve spojení s cytogenetickými abnormalitami jsou zdrojem heterogenity v patogenezi a klinických příznaků MDS. Mutace některých genů jsou specifické pro daný subtyp MDS či pro fázi onemocnění, buď jsou mutace základem vzniku MDS, nebo jsou příčinou transformace do AML. Proto je těmto mutacím přisuzován jistý prognostický faktor, ať už pozitivní, nebo negativní. Mutace alespoň 1 genu byla odhalena minimálně u 90 % pacientů (Papaemmanuil *et al.*, 2013). Nejčastěji jsou mutovány geny, které se podílejí na epigenetické regulaci (*TET2*, *DNMT3A*, *IDH1*, *IDH2*, *ASXL1*, *EZH2*), sestřihu RNA (*SF3B1*, *SRSF2*, *U2AF1*, *ZRSR2*), přenosu signálu (*CBL*, *JAK2*, *NRAS*, *KRAS*), oprav DNA (*TP53*), tvorbě kohezinového komplexu (*STAG2*, *SMC3*, *RAD21*) a transkripční faktory (*RUNX1*, *BCOR*, *ETV6*).

2.6 Gen *TP53* a protein p53

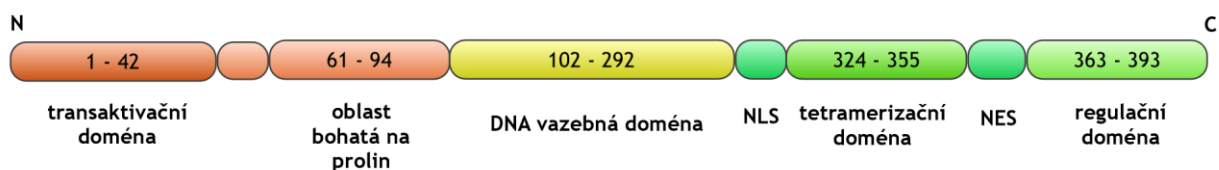
Gen *TP53* a jeho produkt protein p53 patří mezi nejstudovanější objekty v rámci patogeneze maligních onemocnění. I přes veškeré snažení nejsou doposud objasněny přesné funkce p53 a poškození signálních drah, které se podílejí na vzniku a progresi onemocnění. Tento protein je označován jako "strážce genomu", protože odpovídá na mnoho rozdílných stresových podnětů a tím i značné množství odpovědí na tyto stimuly (Lane, 1992). p53 byl nejdříve považován za onkogen, až v průběhu let byl označen jako tumor supresor. Protein p53 funguje jako transkripční faktor aktivující širokou škálu genů podílejících se na různých buněčných procesech – zastavení buněčného cyklu, opravě DNA, apoptóze, senescenci.

Divoká forma (tzv. wild-type) p53 při rozpoznání poškození DNA zastaví buněčný cyklus v nejbližším kontrolním bodě a aktivuje opravu DNA. Pokud lze DNA opravit, je opravena, a buněčný cyklus pokračuje dále. Při neopravitelném poškození DNA je navozena apoptóza buňky.

Lidský gen *TP53* se nachází na krátkém raménku chromozomu 17 (17p13a je složen z 11 exonů (první je nekódující) a 10 intronů je 20kb (Benchimol, 1985; Lamb and Crawford, 1986). Produktem tohoto genu je protein o molekulové váze 53 kDa, který je tvořen 393 aminokyselinami. Protein je charakterizován třemi strukturními doménami: transaktivační doménou (N konec), DNA vazebnou doménou (centrální oblast) a oligomerizační doménou (C konec) (Vogelstein and Kinzler, 1994). Tento protein, který má jméno podle své molekulové hmotnosti, byl objeven při studiu SV40 viru (Lane and Crawford, 1979).

2.6.1 Domény proteinu p53

N konec proteinu je tvořen transaktivační doménou, která je zodpovědná za vazbu transkripčních faktorů – obecných i specifických faktorů, regulačních faktorů (např. p300/CBP). Na oblast bohatou na prolin (tvořena opakováním PXXP sekvence) s regulační a stabilizační funkcí se váže negativní regulátor MDM2. Centrální část je DNA specificky vazebná doména tvořená dvěma kopiemi 10bp konsensus sekvence 5'- PuPuPuC(A/T) - (T/A)GPyPyPy - 3' oddělenými 0-13bp. C konec proteinu je složen z tetramerizační a negativní regulační domény na samém konci, obsahující fosforylační a acetylační místa. Nachází se zde také jaderný exportní a importní signál (Joeger *et al.* in Hainaut and Wiman, 2005; Bai *et al.*, 2006).



Obrázek č. 3 - Schématické zobrazení struktury p53 – N konec je tvořen transaktivační doménou (AMK zbytky 1–42) a oblastí bohatou na prolin (61 - 94), dále navazuje DNA vazebná doména (102 - 292), NLS (jaderný lokalizační signál), tetramerizační doména (324 - 355), NES (jaderný exportní signál) a na samém C konci proteinu regulační doména (363 - 393) (Převzato a upraveno z Bai *et al.*, 2006).

2.6.2 Proteiny rodiny p53

Rodinu p53 tvoří 3 proteiny: p53, p63 a p73. Tyto proteiny jsou výrazně strukturně homologní, největší homologii sdílí v DNA vazebné doméně. Proteiny p63 a p73 byly objeveny později než p53, v roce 1997. Od proteinu p53 se liší zejména přítomností tzv. SAM domény (sterile alpha domain). Geny kódující tyto proteiny mají 14 exonů (Kaghat *et al.*, 1997; Wei *et al.*, 2012).



Obrázek č. 4 - Rodina p53 proteinů – Schéma struktury jednotlivých členů rodiny p53 proteinů s vyznačenou homologií mezi jednotlivými doménami (převzato z Wei *et al.*, 2012).

Proteiny p63 a p73 mají také svoje izoformy jako p53, a to dvě hlavní varianty: dlouhé izoformy (TA) s transaktivační doménou a kratší izoformy (Δ N) s kratším N koncem (Wei *et al.*, 2012). Právě svojí homologií jsou p63, p73 schopny aktivovat cílové geny p53 a regulovat tak osud buňky, někdy i p53 funkčně nahradit (Jost *et al.*, 1997; Kaghad *et al.*, 1997). Fungují též jako transkripční faktory a tumor supresory.

2.6.3 Izoformy p53

Jako u ostatních genů vzniká s pomocí alternativního sestřihu více variant proteinu, u genu *TP53* bylo identifikováno 12 izoform. Izoformy vznikají díky vnitřnímu promotoru v intronu 4, alternativnímu sestřihu v intronu 9 a intronu 2, alternativní iniciací

translace (alternativní ATG – protein nemá prvních 40 AMK) nebo iniciací ze dvou promotorů situovaných před exonem 1. Některé z izoform vzniklé z uvedených mechanismů jsou tkáňově specifické a jsou exprimovány v různé míře v normálních lidských tkáních. Základní p53 (p53 α) není nikdy exprimován sám v normálním stavu, vždy je s ním koexprimováno několik izoform (Bourdon *et al.*, 2005).

Je pravděpodobné, že spolupracují s p53 na vzniku a progresi nádorových onemocnění. Abnormální exprese izoform p53 by mohla odpovídat za nejasné výsledky vztahu p53 a prognózy pro pacienta. Např. izoforma $\Delta 133p53\alpha$ se podílí na odpovědi na poškození DNA. Více informací o rolích izoform p53 v buněčných procesech je možno nalézt v Khoury *et al.*, 2011. Nové studie naznačují, že p53 nepracuje sám, ale na jednotlivých procesech, které ovlivňují život buňky, se podílí dohromady s vlastními izoformami (Bourdon, 2014). U nádorových onemocnění jsou studovány zejména izoformy p53 β a $\Delta 133p53$ (Khoury and Bourdon, 2010). Jeví se, že by míra exprese izoform p53 u pacientů s AML mohla být propojena s mírou přežití a mírou úspěšnosti chemoterapie (Anensen *et al.*, 2006).

2.6.4 Aktivace p53

Protein p53 je aktivován širokou škálou stresových podnětů – poškození DNA, onkogeny, narušená biogeneze ribozomů, ztráta adhezivního kontaktu buněk či hypoxie. Stresové podněty se dají rozdělit do dvou hlavní skupin:

1. genotoxický stres – cytotoxické látky, radiace, karcinogenní látky, oxidační radikály
2. negenotoxický stres – hypoxie, ztráta adheze, taxany, cytokiny, špatná biogeneze ribozomů, onkogeny

Poškození DNA aktivuje p53 pomocí ATR/ATM kináz či Chk1/2, DNA-PK, PKC, které fosforylují N konce a acetylují C konce p53. Onkogeny aktivují p14^{ARF} a p16, které inhibují Mdm2 a tím aktivují protein p53.

Mdm2 je také inhibován nesprávným složením ribozomů, které vytváří tzv. ribozomální stres. Uvolněné ribozomální proteiny (L5, L11, L23) jsou schopny se vázat s Mdm2 a inhibovat jeho funkci. Dochází tedy k aktivaci a stabilizaci p53 a navození zastavení buněčného cyklu nebo apoptózy (Dutt *et al.*, 2011).

Hypoxie vede k aktivaci HIF1 α , ten stabilizuje a aktivuje p53 či VHL, který přímo aktivuje p53 (shrnuto v Horn and Vousden, 2007; Pluquet and Hainaut, 2001).

Aktivace proteinu p53, pro jeho vlastní transkripční aktivitu s ovlivněním cílových genů, zahrnuje tři kroky: stabilizace p53, vazba na DNA a transkripční aktivace.

Úvodním krokem je znemožnění vazby negativního regulátoru Mdm2, a to posttranslačními modifikacemi vazebného místa (zejména fosforylací). Následujícím krokem je sekvenčně specifická vazba na DNA pomocí DNA specifické domény nebo nesespecifickou vazbou skrz C koncovou doménu. Třetím a posledním krokem je interakce s obecnými transkripčními faktory (např. TFIID), která vede k aktivaci transkripce.

p53 aktivuje geny podílející se na průběhu apoptózy, zastavení buněčného cyklu, senescenci či opravě DNA. Směr působení záleží na původu stresu, který aktivuje p53 a typu buňky (shrnuto v Shaikh and Niranjana, 2015).

2.6.5 Posttranslační modifikace p53

Posttranslační modifikace ovlivňují stabilitu proteinu p53 a zahrnují zejména fosforylace, acetylace, ubikvitinace a metylace. Modifikovány jsou zejména N a C konce proteinu. Tyto modifikace obecně ústí v stabilizaci proteinu p53 a následnou akumulaci p53 v jádře, také zabraňují degradaci p53 – znemožněním vazby Mdm2 (Xu, 2003; Brooks and Gu, 2003).

Fosforylace především stabilizují p53 a podporují sekvenčně specifickou vazbu na DNA. Tato modifikace bývá indukována poškozením DNA způsobeným ionizačním či UV zářením. Fosforylovány jsou seriny a threoniny na N konci proteinu p53, méně v C konci (Siliciano *et al.*, 1997). Fosforylace je prováděna mnoha kinázami, která vede k případné disociaci Mdm2 a tím stabilizaci proteinu (Shieh *et al.*, 1997).

Acetylace lysinových zbytků probíhá na C konec proteinu, v okolí tetramerizační domény. Podporuje sekvenčně specifickou vazbu s DNA, zatímco deacetylace tuto aktivitu umlčuje. Ovlivňuje také stabilitu inhibicí ubikvitinace pomocí Mdm2, pravděpodobně soupeří o stejné aminokyselinové zbytky. Acetylace stabilizuje protein p53 a aktivuje transkripci (Gu *et al.*, 1997; Barlev *et al.* 2001).

Ubikvitinační proces vedoucí k degradaci proteinu pomocí proteasomu je v případě p53 řízen Mdm2. Ubikvitinace p53 je poměrně frekventovaná v normální buňce a udržuje nízkou hladinu p53.

Více informací o jednotlivých posttranslačních modifikacích a jejich regulačních funkcích je možno dohledat zde – Kruse and Gu, 2008; Bode and Dong, 2004.

2.6.6 Regulace p53

O regulaci aktivity proteinu p53 se stará několik regulačních smyček, a to jak negativních, tak pozitivních. Negativní zpětné smyčky jsou zprostředkovány

prostřednictvím: Mdm2, Cop-1, Pirh-2, p73 Δ N, cyklin G, Wip-1 a Siah-1. Pozitivní zpětné smyčky potom skrz: PTEN-AKT, p14/19^{ARF} a Rb. Všechny tyto smyčky jsou autoregulační (Harris and Levine, 2005) a udržují poločas života p53 v normální buňce v řádu pár minut, v poškozené buňce je poločas života prodloužen do řádu hodin (Lakin and Jackson, 1999).

Nejdůležitější regulační dráhou je regulace pomocí Mdm2, který za normálních podmínek udržuje nízkou hladinu p53. Je to E3 ubikvitin ligáza. Tato negativní regulační smyčka funguje na principu, že p53 indukuje expresi Mdm2, který pak degraduje p53. p53 si sám reguluje Mdm2 vazbou do jeho promotoru. Zvýšená míra exprese Mdm2 vede ke snížení hladiny p53. Podílí se též na transportu p53 z jádra do cytoplasmy, zabraňuje vazbě transkripčních faktorů a je schopen vázat případné represory.

Mdm2 má i své regulační proteiny, které regulují jeho funkci. Protein Akt svojí vazbou na Mdm2 a jeho následnou fosforylací podporují funkci Mdm2 a tím degradaci p53. Funkce Mdm2 je inhibována proteinem ARF, dochází k přerušení transportu p53 z jádra do cytoplasmy. Existují další proteiny ovlivňující aktivitu Mdm2 a p53, např. nucleophosmin, 14-3-3- σ , β -catenin (Oren *et al.*, 2002; Nag *et al.*, 2013).

Mdm2 má izoformu Mdmx (Mdm4, splice variant Mdm2), která je také schopna inhibovat aktivitu proteinu p53, ale nedegraduje ho jako Mdm2 (Nag *et al.*, 2013).

2.6.7 Dráhy řízené p53

Po aktivaci je p53 schopen se vázat do specifických sekvencí v DNA a tímto aktivovat transkripci příslušných genů podílejících se na řízení důležitých buněčných procesů.

Apoptóza je spouštěna vnitřní či vnější dráhou, které aktivují důležité kaspázy zprostředkovávající samotnou apoptózu. Vnější dráha je aktivována transmembránovými receptory s doménou smrti (Fas, DR15 či PERP receptor). Je aktivován DISC (smrt indukující signální komplex) komplex, který dále aktivuje kaskádu kaspáz (kaspáza 8 a 3), která následně spouští apoptózu. Vnitřní dráha je spouštěna mitochondriemi, které uvolní cytochrom c do cytoplasmy, kde společně s APAF-1 a prokaspázou 9 tvoří tzv. apoptozóm. V apoptozómu už aktivovaná kaspáza 9 dále aktivuje kaspázu 3, 6 a 7. Vnitřní dráha je regulována zvláště proteiny Bcl-2 rodiny (Bcl-X_L, Bax, Bak), Noxa, PUMA, Bid (shrnutí v Haupt *et al.*, 2003).

p53 se podílí také na regulaci buněčného cyklu. Pokud je aktivován poškozením DNA, tak indukuje zastavení buněčného cyklu v některém kontrolním bodu a navodí

reparaci DNA či apoptózu, pokud to jinak nelze. Protein p53 je schopen buňku pozastavit v G1/S kontrolním bodu, kde je kontrolován stav před replikací DNA. Dochází k stimulaci p21, inhibitoru cyklin dependentních kináz, které společně s cykliny regulují buněčný cyklus. p53 se podílí na kontrole S fáze. Reguluje též přechod z G2 fáze do mitózy, kde 14-3-3- σ disociuje komplex B1/cdc1 a udržují tím přerušeni buněčného cyklu (Giono and Manfredi, 2006).

Oprava DNA iniciovaná p53 je řízena *GADD45*, který indukuje excizní opravu DNA. *GADD45* se také pravděpodobně podílí na regulaci kontrolního bodu v G2 fázi (Giono and Manfredi, 2006).

Autofágie může být p53 stimulována i inhibována. Stimuluje aktivaci DRAM lysozomálního proteinu, který je nutný pro autofágii. Autofágie se zdá být inhibována deficiencí p53, protože v této situaci je hromaděn p14^{ARF}, který může též indukovat autofágii (Zilfou and Lowe, 2009).

Dalšími procesy řízenými p53 je senescence, která je iniciována zkrácením telomer, poškozením DNA či onkogeny, a angiogeneze, kde p53 inhibuje formaci nových krevních zásobení pro nádor (Itahana *et al.*, 2001; Teodoro *et al.*, 2007; Rufini *et al.*, 2013).

Sebeobnova a klid hematopoetických kmenových buněk jsou také regulovány p53, v této fázi buněk je hladina p53 vyšší než u plně diferencovaných buněk. p53 reguluje homeostázu mezi kmenovými a diferencovanými buňkami. Nízká hladina p53 stimuluje proliferaci hematopoetických kmenových buněk, vysoké množství p53 vede k eliminaci progenitorových buněk (Pant *et al.*, 2012; Asai *et al.*, 2011).

2.6.8 Expres p53 a TP53

Kromě mutací je studována i míra exprese jak mRNA *TP53*, tak i proteinová exprese. Abnormální exprese může vést jako v případě mutací k narušení správného průběhu regulačních procesů života buňky. Expresní studie probíhají na úrovni mRNA (pomocí microarrays či RT-PCR), ale převážně na úrovni proteinů (imunohistochemie).

U myelodysplastického syndromu s nízkým rizikem byla pozorována zvýšená exprese proteinu, která byla asociována s rychlejší transformací onemocnění do AML a tedy kratší dobou života. Proto je zvýšená exprese využívána jako znak progresu onemocnění (Duarte *et al.*, 2014; Saft *et al.*, 2014). O signální dráze p53 u pacientů s MDS není mnoho informací, studie se většinou zaměřují na samotný protein p53, či pouze na část dráhy. Ve studii Wei *et al.*, 2013 pozorovali zvýšenou expresi p53 u pacientů s del(5q) v erytroidních prekurzorech, společně se sníženou expresí *MDM2*. Po léčbě lenalidomidem

došlo ke zvýšení exprese *MDM2* a tím ke snížení aktivity p53. Zvýšená exprese p53 byla pozorována u pacientů s mutací *TP53* ve srovnání s pacienty bez mutace. Úroveň zvýšení exprese mRNA genu *TP53*, ale neodpovídala míře exprese na úrovni proteinu. Protein byl exprimován v mnohem větší míře oproti mRNA u pacientů s mutací (Kulasekaraj *et al.*, 2013). Podobné výsledky publikoval Dutt *et al.*, 2011, když zaznamenali zvýšenou akumulaci p53 u pacientů s del(5q), bez výrazně zvýšené exprese mRNA genu *TP53*, pouze se zvýšenou expresí cílových genů p53. Důležitost správné exprese p53 pro správnou diferenciaci hematopoetických kmenových buněk byla prokázána též ve studii Mahfoudhi *et al.*, 2016, studující inhibitory MDM2 a následnou zvýšenou expresi p53, která měla cytotoxický efekt na hematopoetické progenitorové buňky.

Studii zaměřených pouze na expresi mRNA genu *TP53* u MDS není mnoho a jejich výsledky jsou nejednoznačné. Ve studii provedené skupinou Pellagatti *et al.*, 2010 byla pozorována zvýšená exprese genů p53 signální dráhy (*FAS*, *CD82*, *WIG1*, *CASP3*, *SESN3*, *TNFRSF10B*, *BAX*, *DDB2*, *BID*) a snížená exprese genu *MDM4* u pacientů s del(5q). Publikace zaměřená na kvantitativní analýzu exprese genu *TP53* u pacientů s MDS detekovala sníženou hladinu mRNA (Totzke *et al.*, 2001). Další práce zabývající se expresí genu *TP53* na úrovni mRNA nedetekovala žádné signifikantní rozdíly mezi pacienty MDS a kontrolami (Lopes *et al.*, 2016).

2.6.9 Mutace *TP53*

Somatické mutace genu *TP53* jsou popsány u skoro všech typů rakovinových onemocnění, většina mutací je lokalizována do DNA vazebné domény mezi kodóny 125–300. Mutace jsou frekventovanější u solidních nádorů, kde se vyskytují skoro v 50 %, u hematologických malignit, včetně MDS, okolo 10 %. Přes 70 % těchto mutací jsou jednobodové substituční mutace, nejčastěji to jsou mutace v těchto místech: R175, G245, R248, R249, R273, R282. Nejčastější jsou substituce typu - G:C> A:T v CpG, G:C > A:T, G:C > T:A, A:T > G:C. Mutace jsou často lokalizovány do CpG ostrůvků v kodónech, které kódují sekvence nutné pro správnou vazbu p53 na DNA. Dalšími typy mutací jsou mutace posunové, nesmyslné či tzv. tiché mutace. Mutace ovlivňují strukturu DNA vazebné domény a tím schopnost vazby p53 na DNA. Neschopnost vazby p53 a DNA je dána konformační změnou proteinu. Důsledkem je ovlivnění transkripční aktivity p53 a mnoha dalších genů, které p53 ovlivňuje. Důsledkem mutací *TP53* je také narušená regulace řízení MDM2, proto dochází ke zvyšování poločasu života p53 a vyšší

koncentraci mutovaného p53 (Olivier et al., 2010; Joerger et al., 2005; Hainaut and Hollstein, 2000).

Aktuální databázi mutací genu *TP53* lze nalézt na: [IARC TP53 Database \(http://p53.iarc.fr/\)](http://p53.iarc.fr/).

Následkem mutací získá protein nové onkogenní funkce či ztrácí své transkripční schopnosti (Muller and Vousden, 2010; Brosh and Rotter, 2009). Mutace vedoucí ke ztrátě funkce vede k prodloužení poločasu života mutovaného p53 a postupnému nahrazení wild-type formy p53. Dochází k narušení normálních funkcí p53. Protein p53 může také mutací získat nové funkce, kdy může ovlivňovat nové geny a přestat ovlivňovat geny, které ovlivňuje wild-type forma. Dochází k inhibici tumor supresorové funkce. Mutace mají dominantně negativní efekt, jsou schopny ovlivňovat wild-type formu p53 (Millau *et al.*, 2009; Blagosklonny, 2000).

Mutantní forma p53 podporuje proliferaci a přežití buněk, vedoucí ke vzniku metastáz a progresi nádorového onemocnění. Důsledkem je genetická nestabilita, která vede k dalším mutacím. Protein p53 se podílí na regulaci diferenciaci a případné dediferenciaci progenitorových buněk. (Rivlin *et al.*, 2011).

Mutacím genu *TP53* je přisuzován negativní prognostický význam u pacientů s hematologickými malignitami, jsou asociovány s kratší dobou života, komplexním karyotypem, častěji po chemoterapii a u starších pacientů (Peller and Rotter, 2003).

U pacientů s MDS je frekvence mutací okolo 10 %, a je spojena s komplexním karyotypem. Častěji se vyskytuje u pacientů s vysokým rizikem, ale nalezeny byly i u pacientů s nízkým rizikem, kde se vysokou mírou podílí na progresi onemocnění. V několika studiích byla nalezena vyšší frekvence výskytu mutací *TP53* s jedním subtypem MDS, a to s del(5q). U těchto pacientů došlo k zhoršení prognózy oproti pacientům bez mutace. Mutace *TP53* jsou často asociovány s progresí onemocnění, s horší prognózou a ztrátou léčebné odpovědi (Kulasekaraj *et al.*, 2013; Jädersten *et al.*, 2011; Belickova *et al.*, 2016).

3 Cíle práce

- Vyšetřit hladinu exprese mRNA genu *TP53* a genů zahrnutých v signální dráze p53 (83 genů) v CD34⁺ hematopoetických kmenových buňkách pacientů s myelodysplastickým syndromem s nízkým rizikem leukemické transformace.
- Porovnat zjištěné hladiny expresí jednotlivých genů mezi skupinami pacientů s mutací v genu *TP53*, bez mutace, pacientů s del(5q), bez delece a zdravými kontrolami s cílem zjistit vliv mutace genu *TP53* a del(5q) na expresi genů p53 signální dráhy. Dále detekovat deregulované geny signální dráhy společné pro celou skupinu MDS pacientů.
- Určit vztah mezi hladinou exprese jednotlivých genů p53 signální dráhy a klinickými parametry pacientů.

4 Metody

4.1 Soubor pacientů

Do studie bylo zahrnuto celkem 17 pacientů, jejichž charakteristika je uvedena v tabulce č. 6 a 5 hematologicky zdravých kontrolních jedinců (2 ženy a 3 muži, průměrný věk 69,8 let).

Tabulka č. 6 - Charakteristika pacientů zahrnutých ve studii

	Všichni (%)	Pacienti s mutací a delecí (%)	Pacienti s mutací (%)	Pacienti s delecí (%)	Pacienti bez delecí (%)
Počet pacientů	17	4	2	6	5
Pohlaví					
Žena	10 (59)	3 (75)	0	5 (83)	2 (40)
Muž	7 (41)	1 (25)	2 (100)	1 (17)	3 (60)
Průměrný věk (rozsah)	65,6 (48-82)	76,25 (71-82)	62 (49-75)	60,7 (48-71)	64,4 (60-68)
Krevní obraz					
Hemoglobin, průměr (g/l)	92,6	91,5	84	93,2	96,2
Neutrofilů, průměr (10 ⁹ g/l)	2,03	1,82	1,33	1,73	2,85
Krevní destičky, průměr (10 ⁹ g/l)	304,88	202,75	187,5	434	278,6
Blasty	3,01	3,9	1,85	3,97	1,6
WHO klasifikace 2016					
MDS-MLD	8 (47)	2 (50)	1 (50)	3 (50)	2 (40)
MDS s del(5q)	5 (29)	2 (50)	0 (0)	3 (50)	0 (0)
MDS-RS-MLD	2 (12)	0 (0)	1 (50)	0 (0)	1 (20)
MDS-RS	2 (12)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (40)
IPSS					
nízké	9 (53)	2 (50)	0 (0)	3 (50)	4 (80)
střední-1	8 (47)	2 (50)	2 (100)	3 (50)	1 (20)
IPSS-R					
velmi nízké	2 (12)	1 (25)	0 (0)	0 (0)	1 (20)
nízké	8 (47)	2 (50)	1 (50)	2 (33)	3 (60)
střední	6 (35)	1 (25)	1 (50)	3 (50)	1 (20)
NA	1 (6)	0 (0)	0 (0)	1 (17)	0 (0)
Karyotyp					
del(5q)	10 (59)	5 (100)	0 (0)	6 (100)	0 (0)
bez del(5q)	7 (41)	0 (0)	2 (100)	0 (0)	5 (100)
Mutace TP53					
mutace	6 (35)	5 (100)	2 (100)	0 (0)	0 (0)
bez mutace	11 (65)	0 (0)	0 (0)	6 (100)	5 (100)

Tabulka č. 7 - Charakteristika pacientů použitých pro validaci dat

	Všichni (%)	Pacienti s mutací a delecí (%)	Pacienti s mutací (%)	Pacienti s delecí (%)	Pacienti bez delecí (%)
Počet pacientů	35	8	4	18	5
Pohlaví					
Žena	26 (74)	6 (75)	3 (75)	16 (88,96)	1 (20)
Muž	9 (26)	2 (25)	1 (25)	2 (11,12)	4 (80)
Průměrný věk (rozsah)	65,23 (22-82)	70,25 (54-79)	55,5 (40-75)	64,83 (22-82)	66,4 (52-79)
Krevní obraz					
Hemoglobin, průměr (g/l)	92,6	99,5	94,75	87,11	99,6
Neutrofily, průměr (10 ⁹ g/l)	2,38	1,78	0,99	3,15	1,47
Krevní destičky, průměr (10 ⁹ g/l)	311,65	279,4	199,5	390,67	183,6
Blasty	3,76	3,54	3,88	4,22	2,36
WHO klasifikace 2016					
MDS-MLD	13 (37)	1 (12,5)	3 (75)	5 (28)	4 (80)
MDS s del(5q)	18 (51)	7 (87,5)	0 (0)	11 (61,16)	0 (0)
MDS-RS-MLD	2 (6)	0 (0)	1 (25)	0 (0)	1(20)
MDS-SLD	1 (3)	0 (0)	0 (0)	1 (5,56)	0 (0)
MDS-EB-2	1 (3)	0 (0)	0 (0)	1 (5,56)	0 (0)
IPSS					
nízké	16 (45,5)	4 (50)	0 (0)	10 (55,6)	2 (40)
střední-1	16 (45,5)	3 (37,5)	3 (75)	8 (44,48)	2 (40)
střední-2	2 (6)	1 (12,5)	0 (0)	0 (0)	1 (20)
vysoké	1 (3)	0 (0)	1 (25)	0 (0)	0 (0)
IPSS-R					
velmi nízké	3 (9)	1 (12,5)	0 (0)	1 (5,56)	1 (20)
nízké	16 (45,5)	5 (62,5)	2 (50)	7 (38,92)	2 (40)
střední	12 (33,5)	1 (12,5)	1 (25)	9 (50,04)	1 (20)
vysoké	3 (9)	1 (12,5)	0 (0)	1 (5,56)	1 (20)
velmi vysoké	1 (3)	0 (0)	1 (25)	0 (0)	0 (0)
Karyotyp					
del(5q)	26 (74)	8 (100)	0 (0)	18 (100)	0 (0)
bez del(5q)	9 (26)	0 (0)	4 (100)	0 (0)	5 (100)
Mutace TP53					
mutace	12 (34)	8 (100)	4 (100)	0 (0)	0 (0)
bez mutace	23 (66)	0 (0)	0 (0)	18 (100)	5 (100)

4.2 Použité roztoky a chemikálie

Tabulka č. 8 - Použité chemikálie

Chemikálie	Výrobce
Ficoll-Paque™ PLUS	GE Healthcare Life Sciences
autoMACS® Pro Washing Solution	Miltenyi Biotec GmbH
autoMACS® Rinsing Solution	Miltenyi Biotec GmbH
CD34 MicroBead Kit, human (CD34 Microbeads + FcR Blocking Reagent)	Miltenyi Biotec GmbH
96 % ethanol	Merck Chemicals
Quibit RNA HS Assay Kit	ThermoFisher Scientific Inc
3(2)M NaAc (pH=4,1)	Sigma-Aldrich®
Glykogen (20mg/μl)	ThermoFisher Scientific Inc
2-propanol	Sigma-Aldrich®
Nuclease free water	ThermoFisher Scientific Inc
RNase Free DNase Set (RNase free Buffer RDD, RNase free water, RNase free DNase I)	Qiagen®
High Sensitivity RNA ScreenTape Sample Buffer	Agilent Technologies
High Sensitivity RNA ScreenTape Ladder	Agilent Technologies
RT ² First Strand Kit (Buffer GE, 5x Buffer BC3, RE3 Reverse Transcriptase Mix, Control P2, RNase-Free Water)	Qiagen®
RT ² SYBR Green Mastermix (Hotstart DNA Taq Polymerase, PCR Buffer, dNTP mix, SYBR Green dye, ROX passive reference dye)	Qiagen®
TaqMan Gene expression Assay; Hs00355782_m1	ThermoFisher Scientific Inc
SuperScript™ II Reverse Transcriptase	Invitrogen™

Tabulka č. 9 - Použité roztoky (roztoky ředěny deionizovanou H₂O, pokud neuvedeno jinak)

Roztok	Složení
PBS (10x zásobní roztok - 500ml) - pracovní koncentrace 1x	40g NaCl 1g KCl 0,94g KH ₂ PO ₄ 7,7g Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O - pH=7,4
PBS + 2mM EDTA (500ml)	2ml 0,5 M EDTA 50ml 10x PBS 450ml H ₂ O
MACS pufr (500ml)	50ml 10x PBS 2,5g BSA 2ml 0,5M EDTA doplnit H ₂ O
Lyzační roztok na erytrocyty (10x zásobní roztok - 500ml) - pracovní koncentrace 1x	41,46g 1,55 M NH ₄ Cl 3,95g 0,1 M NH ₄ HCO ₃ 1 ml 0,5 M EDTA

ITG + mercaptoethanol (50ml)	50ml ITG, 360µl mercaptoethanolu
70 % ethanol	
75 % ethanol	ředěn Nuclease-free water
Fenol	vysycený vodou
Chloroform : isoamylalkohol (49:1)	

4.3 Ostatní materiál

High Sensitivity RNA ScreenTape (Agilent Technologies)

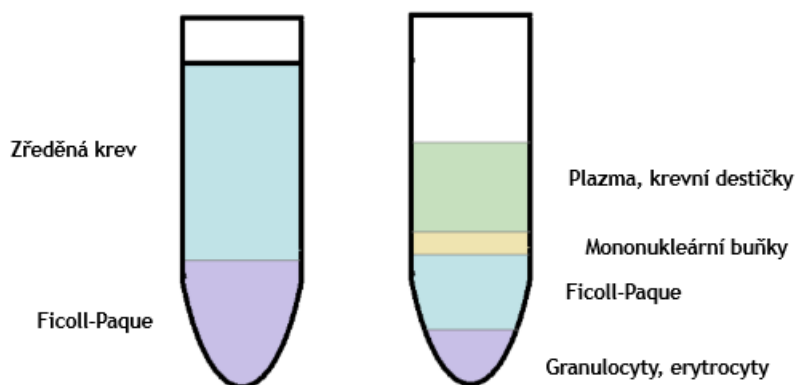
96-well plate containing dried assays - p53 signaling pathway (human) (Qiagen®)

Optical Adhesive Film (Qiagen®)

4.4 Izolace buněk

Cílem izolace bylo získat čistou populaci CD34⁺ hematopoetických pluripotentních buněk z kostní dřeně pacientů. Odběr biologického materiálu byl prováděn v rámci rutinních odběrů. Vzorek kostní dřeně je odebírán do zkumavek s EDTA, která slouží jako protisrážlivý prostředek. Při rutinním zpracování kostní dřeně jsou izolovány též mononukleární buňky, granulocyty, CD34⁺ a CD34⁻ buňky. Pro tuto studii byly vybrány CD34⁺ buňky, které jsou zodpovědné za krvetvorbu. Jejich izolace byla realizována dle následujícího protokolu a práce probíhala v laminárním boxu.

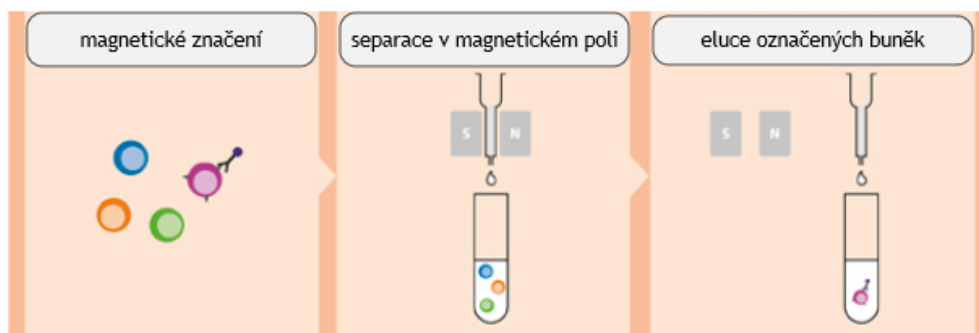
Nejprve byly odděleny mononukleární buňky (monocyty, lymfocyty) od granulocytů, erytrocytů a krevních destiček pomocí gradientové centrifugace. Kostní dřeň byla zředěna přibližně v poměru 1:1 roztokem PBS, podle množství kostní dřeně. Takto naředěná kostní dřeň byla pomocí Pasteurovy pipety opatrně navrstvena na Ficoll-Paque, který byl připraven do 50 ml zkumavky, v poměru Ficoll-Paque: krev - 3:4. Vzorek byl centrifugován 35 minut, při 400g, v 4 °C (centrifuga Hettich Universal 320R). Po centrifugaci byly buňky rozděleny dle hustotního gradientu od dna falkony – viz. obrázek č. 5.



Obrázek č. 5 – Schéma gradientové centrifugace

Byl odebrán bílý prstenec obsahující mononukleární buňky pomocí Pasteurovy pipety a přenesen do nové 50ml zkumavky. Z původní falkony byl odebrán Ficoll-Paque a s granulocyty a erytrocyty bylo pokračováno podle protokolu na izolaci granulocytů. K odebraným mononukleárním buňkám bylo přidáno 20 ml pufru PBS + 2mM EDTA a překlápěním promícháno. Pokud se vytvářely shluky, byla suspenze přefiltrována přes filtr zvlhčený PBS + 2mM EDTA. Následovala centrifugace 10 minut, na 350g, při 4 °C (Hettich Universal 320R). V případě, že po centrifugaci vznikl čirý supernatant, byl supernatant opatrně slit a k peletě buněk bylo přidáno 10 ml PBS + 2mM EDTA a následně bylo promícháno překlápěním. Suspenze buněk byla centrifugována 10 minut, na 350g, při 4 °C (Hettich Universal 320R). Po centrifugaci byl odebrán supernatant a peleta byla rozpuštěna v 300μl PBS. 100μl (1/3) suspenze byla odebráno k dokončení izolace mononukleárních buněk. Ze zbylých 2/3 suspenze buněk byly izolovány CD34⁺ buňky.

Izolace CD34⁺ buněk je založena na použití monoklonálních protilátek, které jsou konjugovány s paramagnetickou partikulí. Suspenze buněk je označena navázáním specifické magneticky označené monoklonální protilátky (anti-CD34⁺). Takto označená buněčná suspenze prochází kolonou umístěnou v magnetickém poli, neoznačené buňky touto kolonou prochází. Označené buňky se udržují v koloně, z níž jsou vytlačeny až po vyjmutí kolony z magnetického pole. Schéma magnetické separace viz. obrázek č. 6.



Obrázek č. 6 - Znárodnění průběhu magnetické separace (převzato a upraveno z <http://www.miltenyibiotec.com/en/>)

K suspenzi buněk bylo přidáno 5 ml MACS pufru a byla centrifugována 10 minut, na 300g, při 4 °C (Hettich Universal 320R). Poté byl opatrně odebrán supernatant a peleta buněk byla rozpuštěna v 300 µl MACS pufru, následně bylo přidáno 100µl FcR Blocking Reagent a 100 µl CD34⁺ Micro Beads. Suspenze buněk byla 30 minut inkubována při 4-8 °C. Po inkubaci bylo přidáno 5 ml MACS pufru pro zastavení značící reakce a vzorek byl centrifugován 10 minut, na 350g, při 4 °C (Hettich Universal 320R). Následně byl odebrán supernatant a peleta buněk byla resuspendována v 500 µl MACS pufru a přepipetována do 15 ml zkumavky pro autoMACS® Pro Separator (Milteneyi Biotec GmbH). Do stojánku separátoru buněk byly připraveny tři zkumavky: 1. se vstupním vzorkem, 2. pro neoznačené buňky (v tomto případě CD34⁻) a 3. zkumavka pro označené buňky (CD34⁺ buňky). Po skončení separace byla suspenze buněk opatrně přelita z 15 ml zkumavek do 2 ml zkumavek, které byly centrifugovány 5 minut na 3000 otáček na centrifuze MiniSpin (Eppendorf). Následně byl opatrně odebrán supernatant a získaná peleta buněk, pokud měla bílou barvu, byla rozpuštěna v 500 µl ITG+merkaptioethanolu. Pokud byla peleta buněk červená, byl odebrán supernatant a byl přidán 1 ml lyzačního roztoku na erytrocyty. Buňky byly nechány po dobu 10 minut při 4 °C, aby proběhla lýze buněk. Poté byl vzorek centrifugován po dobu 5 minut při 3000 otáčkách (Eppendorf MiniSpin). Pokud peleta buněk zbělala, byl odebrán supernatant a buňky byly rozpuštěny v ITG+merkaptioethanolu. Pokud ne, tento krok byl opakován.

Vyizolované buňky byly skladovány při -80 °C.

4.5 Izolace RNA

RNA byla izolována pomocí fenol-chloroformové metody dle následujícího protokolu.

K rozmraženým buňkám bylo přidáno 50 μ l 3 M NaAc (pH=4,1), 450 μ l fenolu určeného pro izolaci RNA a 125 μ l chloroform:isoamylalkoholu (49:1). Suspenze buněk byla promíchána pomocí vortexu (IKA MS 3 Basic) po dobu 10-ti sekund (do bílého zbarvení) a následně inkubována 15 minut na ledu. Po inkubaci byl vzorek centrifugován 15 minut, na 18659g, při 4 °C (centrifuga Hettich Mikro 200R). Poté byla opatrně odpipetována horní vodná fáze, obsahující RNA, do nové 1,5ml low-binding zkumavky (zkumavky s hladkým homogenním povrchem uvnitř). Ze zbytku vzorku v původní zkumavce byly poté dle příslušného protokolu izolovány proteiny a DNA. K odebrané vodné fázi byl přidán 1 μ l glykogenu (20mg/ μ l) a stejný objem ledového 2-propanolu jako vodné fáze, promíchání překlápěním. Vzorek byl ponechán přes noc v -20 °C.

Druhý den byl vzorek centrifugován 15 minut, na 18659g, při 4 °C (Hettich Mikro 200R). Poté byl opatrně odstraněn supernatant a ke zbylé peletě bylo přidáno 500 μ l vychlazeného 75 % ethanolu a vzorek byl zvortexován (IKA MS 3 Basic). Následovala centrifugace 15 minut, na 18659g, při 4 °C (Hettich Mikro 200R). Po tomto odmytí solí byl odebrán supernatant a peleta byla vysušena při pokojové teplotě v laminárním boxu po dobu 5 minut. Peleta byla poté rozpuštěna ve 20 μ l Nuclease Free H₂O po dobu 20 minut. Posledním krokem druhého dne bylo ošetření DNAázou, k rozpuštěné RNA bylo přidáno 80 μ l DNAáze směsi (69,3 μ l H₂O, 10 μ l RDD Buffer, 0,7 μ L DNAazy) a vzorek byl inkubován 5 minut při pokojové teplotě. Reakce byla zastavena přidáním 10 μ l 3M NaAc, 110 μ l 2-propanolu a vzorek byl ponechán přes noc v -20 °C.

Třetí den byl vzorek centrifugován 15 minut, na 18659g, při 4 °C (Hettich Mikro 200R) a poté byl odstraněn supernatant. Získaná peleta byla opláchnuta v 500 μ l 75 % ethanolu a centrifugována 15 minut, na 18659g, při 4 °C (Hettich Mikro 200R), následně odstraněn supernatant. Peleta byla vysušena 5 minut v laminárním boxu při pokojové teplotě. Vysušená peleta byla rozpuštěna ve 12 μ l RNAase free H₂O po dobu 20 minut. Koncentrace RNA byla následně změřena na fluorimetru Qubit® (ThermoFisher Scientific Inc.) a vzorky byly do dalšího použití uchovány v -80 °C.

4.6 Integrita RNA

Integrita RNA byla určována pomocí metody založené na poměru ribozomálních podjednotek 18S a 28S, které na výsledném elektroforegramu tvoří každá jeden pruh. Pokud jsou přítomny pouze tyto dva pruhy, není RNA degradována. Při přítomnosti více pruhů je RNA degradována. Integritu RNA odráží tzv. RIN (RNA integrity number), který může nabývat hodnoty v rozmezí 1-10. Hodnota 1 značí degradovanou RNA, hodnota 10 je přiřazována intaktní RNA (Mueller *et al.*, 2016).

Pro účely stanovení genové exprese mRNA jsou využívány vzorky s RIN > 7.

Integrita RNA byla stanovována na přístrojích TapeStation 2200 a TapeStation 4200 (Agilent Technologies) za použití High Sensitivity RNA Screen Tape kitu.

Nejprve byly všechny reagenty ponechány 30 minut při pokojové teplotě. Během této doby byla izolovaná RNA naředěna s Nuclease free H₂O (0,2μl RNA + 1,8μl H₂O). K vzorku RNA byl poté přidán High Sensitivity RNA Sample Buffer, byl stočen na minicentrifuze (Gilson®) a promíchán na vortexu po dobu 1 minut na 2000 rpm. Poté byl stočen, aby vzorek klesl na dno zkumavky. Následně byl denaturován při 72 °C po dobu 3 minut. Po denuraci byl vzorek umístěn na 2 minuty na led a následně stočen na minicentrifuze. Posledním krokem bylo vložení vzorku do přístroje, který byl nastaven podle příslušného protokolu.

4.7 Real-time PCR

Expresi genu *TP53* byla měřena pomocí real-time PCR za použití kitu od firmy Qiagen®, zaměřeného na signální dráhu p53, takže kromě samotného genu *TP53*, bylo obsaženo dalších 83 genů jeho signální dráhy, 5 housekeepingových genů pro normalizaci dat (*ACTB*, *B2M*, *GADPH*, *HPRT1*, *RPLP0*), kontrolu pro případnou kontaminaci DNA (HGDC), 3 kontroly pro správně proběhlou reverzní transkripci (RTC) a v poslední řadě 3 kontroly pro správně proběhnutou PCR (PPC). Pracovní protokol se skládá ze tří hlavních kroků: eliminace DNA, syntéza cDNA (reverzní transkripce) a real-time PCR.

Prvním krokem byla eliminace DNA. Reagenty byly před prací 15s centrifugovány (minicentrifuga Gilson®) a uchovávány během práce na ledu. DNA eliminační směs byla připravena ze 2μl Buffer GE, RNA 25ng - 5μg a byla doplněna do 10μl Nuclease-free H₂O. Tato směs byla inkubována po dobu 5 minut při 42 °C, poté byla ihned položena na 1 minutu na led.

Následně byl připraven roztok pro reverzní transkripci o objemu 10μl: 5x Buffer BC3 5μl, Control P2 1μl, RE3 Reverse Transcriptase Mix 2μl, Nuclease-free H₂O 3μl.

Tento připravený roztok o objemu 10µl byl přidán k 10µl DNA eliminační směsi, následně byl inkubován při 42 °C po dobu 15 minut v termocyleru (Biometra GmbH) a reakce byla zastavena zvýšením teploty na 95 °C na 5 minut. Ke směsi bylo po reverzní transkripci přidáno 91µl Nuclease-free H₂O a byl umístěn na led.

Posledním krokem byla příprava PCR směsi. RT² SYBR Green Mastermix byl centrifugován 15s (minicentrifuga Gilson®). Do 5ml zkumavky byla připravena směs následujícího složení: 1350µl RT² SYBR Green Mastermix, 102µl cDNA mixu a 1248µl Nuclease-free H₂O. PCR směs byla důkladně promíchána propipetováním a následně po 25µl rozpipetována do 96-ti jamkové destičky, která byla na závěr zakryta adhezivním filmem. Destička s PCR směsí byla centrifugována 1 minutu na 1000g pro odstranění bublin.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	APAF1	ATM	ATR	BAI1	BAX	BBC3	BCL2	BCL2A1	BID	BIRC5	BRCA1	BRCA2
B	BTG2	CASP2	CASP9	CCNB1	CCNE1	CCNG1	CCNH	CDCD24A	CDCD25C	CDK1	CDK4	CDKN1A
C	CDKN2A	CHEK1	CHEK2	CRADD	DNMT1	E2F1	E2F3	EGFR	EGR1	EI24	ESR1	FADD
D	FAS	FASLG	FOXO3	GADD45A	GML	HDAC1	HK2	IGF1R	IL6	JUN	KAT2B	KRAS
E	MCL1	MDM2	MDM4	MLH1	MSH2	MYC	MYOD1	NF1	NFKB1	PCNA	PIDD	PPM1D
F	PRC1	PRKCA	PTEN	PTTG1	RB1	RELA	PRRM	SESN2	SIAH1	SIRT1	STAT1	TADA3
G	TNF	TNFRS10B	TNFRS10D	TP53	TP53AIP1	TP53BP2	TP63	TP73	TRAF2	TSC1	WT1	XRCC5
H	ACTB	B2M	GAPDH	HPRT1	RPLP0	HGDC	RTC	RTC	RTC	PPC	PPC	PPC

Obrázek č. 7 - Rozložení sledovaných genů na 96-ti jamkové destičce

Následně byl nastaven cycler StepOnePlus od Applied Biosystems na následující program pro real-time PCR.

Počet cyklů	Doba trvání	Teplota
1	10 min	95 °C
40	15 s	95 °C
	1 min	60 °C

Validace exprese byla provedena pomocí kvantitativní polymerázové řetězové reakce v reálném čase (qRT-PCR) genu *CDKN1A* (TaqMan Gene expression Assay; Hs00355782_m1; ThermoFisher) v buňkách CD34⁺ vybraných MDS pacientů. RNA byla přepsána do cDNA reverzní transkripcí s použitím SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen™). Beta-2-mikroglobulin (*B2M*) byl použit jako vnitřní kontrola. Reakce byla provedena v duplikátech na přístroji RotorGene 3000 (Qiagen®). Podmínky tepelného cyklu byly následující.

Počet cyklů	Doba trvání	Teplota
1	5 min	95 °C
45	20 s	95 °C
	1 min	60 °C

4.8 Kvantifikace genové exprese

Primární analýza dat z kvantitativní PCR byla provedena pomocí programu StepOne™ Software (ver. 2.2.2, Applied Biosystems), jejímž prostřednictvím byly zjištěny hodnoty C_T (threshold cycle), které vypovídají o cyklu PCR, ve kterém došlo k překročení prahu fluorescence. Manuálně byl stanoven práh pro C_T hodnotu na 0.2. Relativní kvantifikace genové exprese byla hodnocena pomocí $\Delta\Delta C_T$ metody. Změna genové exprese pro každý gen mezi kontrolní a experimentální skupinou byla počítána pomocí vzorce $2^{(-\Delta\Delta C_T)}$.

4.9 Karyotyp a mutace *TP53*

Stanovení karyotypu pacientů a identifikace mutací *TP53* bylo předmětem předešlé studie. Karyotyp byl stanovován pomocí G pruhování a potvrzen FISH/mFISH. Identifikace mutací byla provedena pomocí sekvenování na Roche 454 Junior Systém. Podrobněji popsáno v Belickova *et al.*, 2016.

4.10 Statistické zpracování dat

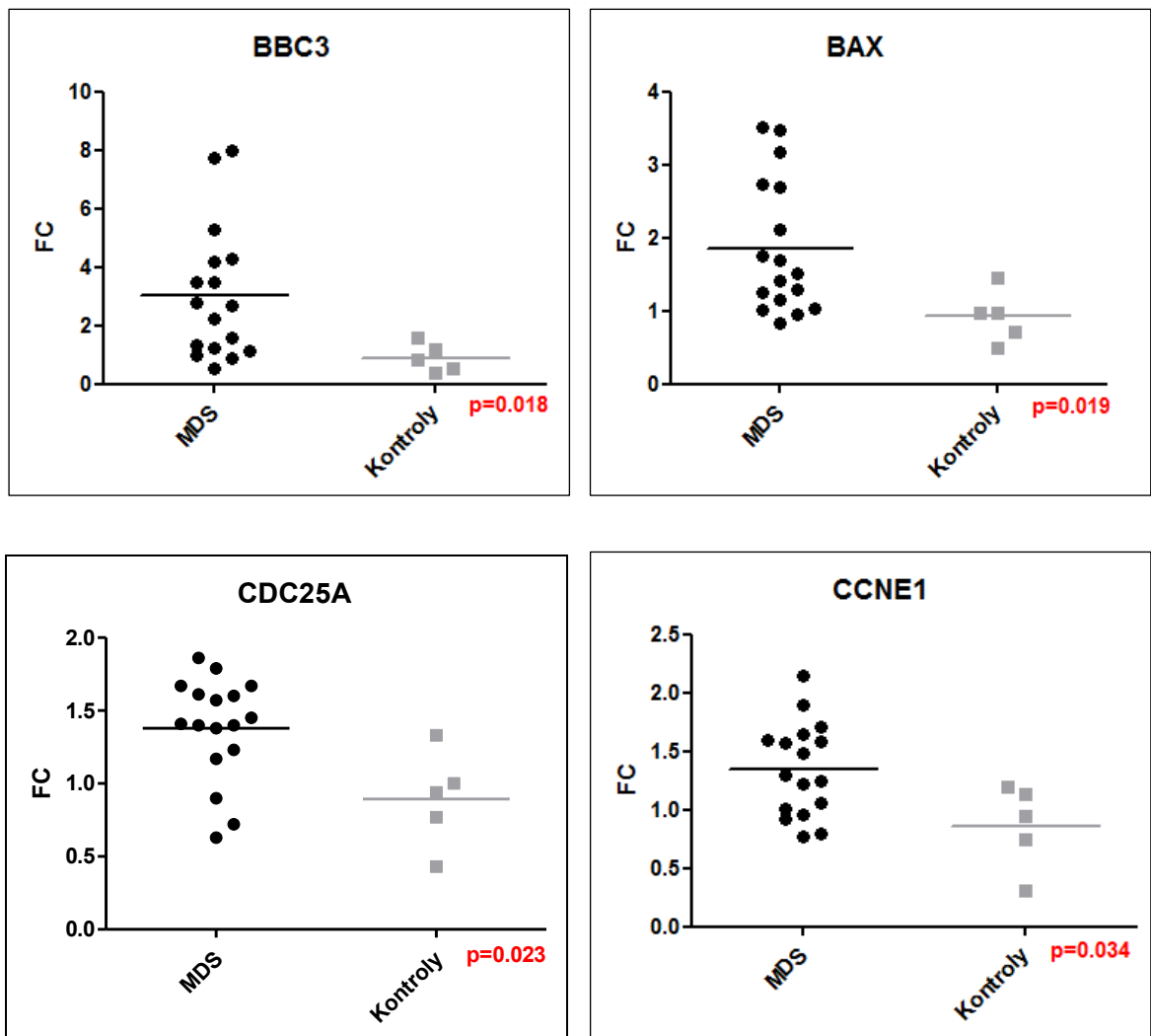
Statistické vyhodnocení dat bylo provedeno v programu GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software) a MedCalc statistickým softwarem. Porovnání pacientů s MDS se zdravými kontrolními jedinci bylo provedeno nepárovým t-testem. Vzájemné porovnání dvou skupin pacientů bylo provedeno s pomocí Mann-Whitney testu. Univariantní a multivariantní analýza byla provedena s použitím Coxovy regrese (Coxův model proporcionálních rizik) k identifikaci rizikových faktorů závislých na OS. Kaplan-Meierovy křivky byly použity k demonstraci vztahu mezi vybranými proměnnými a OS. Pro všechna testování byla zvolena hladina významnosti 0,05.

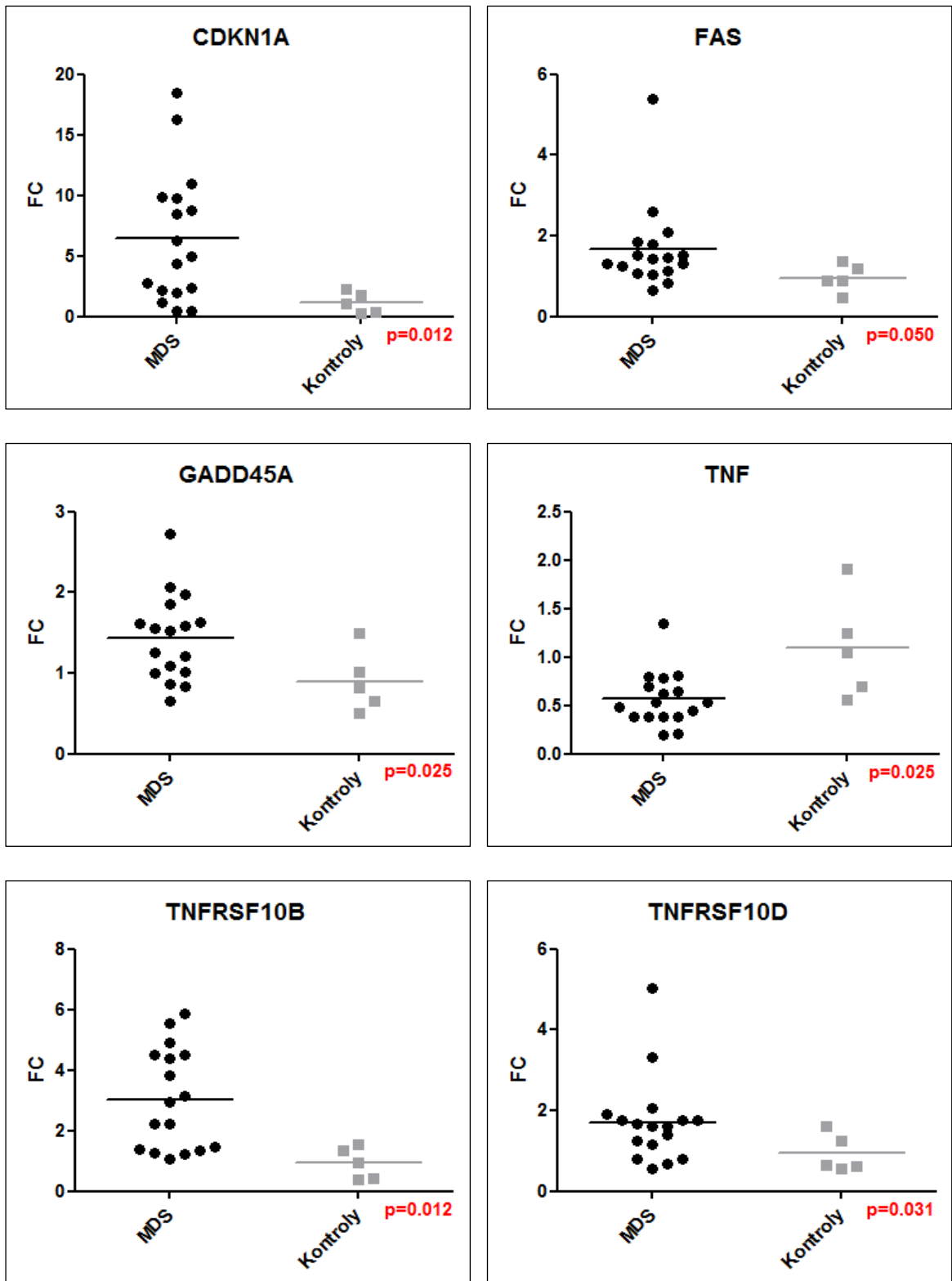
5 Výsledky

5.1 Porovnání skupiny pacientů s MDS se zdravými kontrolami

Při porovnání naměřené genové exprese u pacientů s MDS (n=17) s hematologicky zdravými jedinci (n=5) byla detekována aberantní exprese 10 genů, z nichž u 9 genů byla exprese zvýšená a 1 genu snížena. Signifikantní změny byly nalezeny u následujících genů: zvýšená exprese mRNA genů regulující apoptózu (*BAX*, *BBC3*, *FAS*, *TNFRSF10B*, *TNFRSF10D*), buněčný cyklus (*CDKN1A*(p21), *CDC25A*, *CCNE1*) a opravy DNA (*GADD45A*). Snížena exprese byla nalezena u genu *TNF*, který má řadu rozmanitých funkcí.

Porovnání změn exprese jednotlivých genů mezi pacienty a kontrolní skupinou jsou zobrazeny v obrázku č. 8.

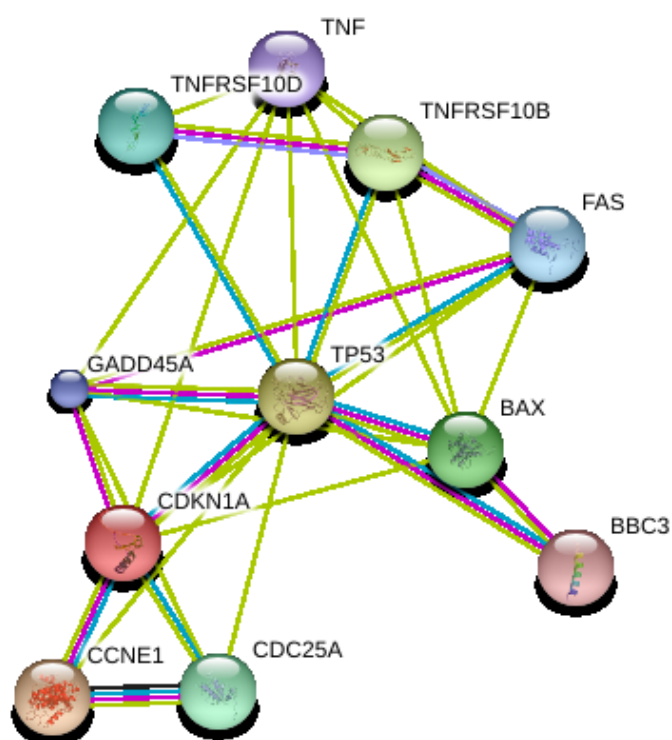




Obrázek č. 8 – Grafické znázornění rozdílu genové exprese mezi pacienty s MDS (MDS) a kontrolními vzorky (Kontroly) v jednotlivých genech. FC (fold change): změna exprese genu.

Vzájemné interakce signifikantně aberantně exprimovaných genů

Gen *TP53* reguluje všechny detekované geny (*TNFRSF10B*, *TNF*, *TNFRSF10D*, *FAS*, *BAX*, *BBC3*, *CDC25A*, *CDKN1A*, *GADD45A*, *CCNE1*). Nejvíce exprimovaným genem byl *CDKN1A*, známý pod jménem p21, který je aktivován jak *TP53*, tak i *GADD45*. *CDKN1A* inhibuje *CCNE1* kódující cyklin E, nutný pro přechod z G1 do S fáze a reguluje další cyklin-dependentní kinázy G1 fáze. *GADD45A* dále aktivuje geny *FAS* a *BAX*, tedy vnější i vnitřní dráhu apoptózy, pokud nelze DNA opravit. *BAX* je také aktivován *BBC3* (PUMA), a to nepřímo tím, že inhibuje antiapoptotické geny. Zvýšenou expresi vykazovaly též geny podílející se na aktivaci vnější dráhy apoptózy (*FAS*, *TNFRSF10B*), kromě *TNF*, který byl exprimován méně. Geny *TNFRSF10B* a *TNFRSF10D* jsou homology. *TNFRSF10B* indukuje apoptózu skrz Fas/FasL dráhu, *TNFRSF10D* oproti tomu inhibuje TRAIL indukovanou dráhu apoptózy.



žlutá	často se vyskytují společně v textu
fialová	homologie
růžová	experimentálně potvrzená homologie
modrá	interakce známá z databáze
černá	exprimovány současně

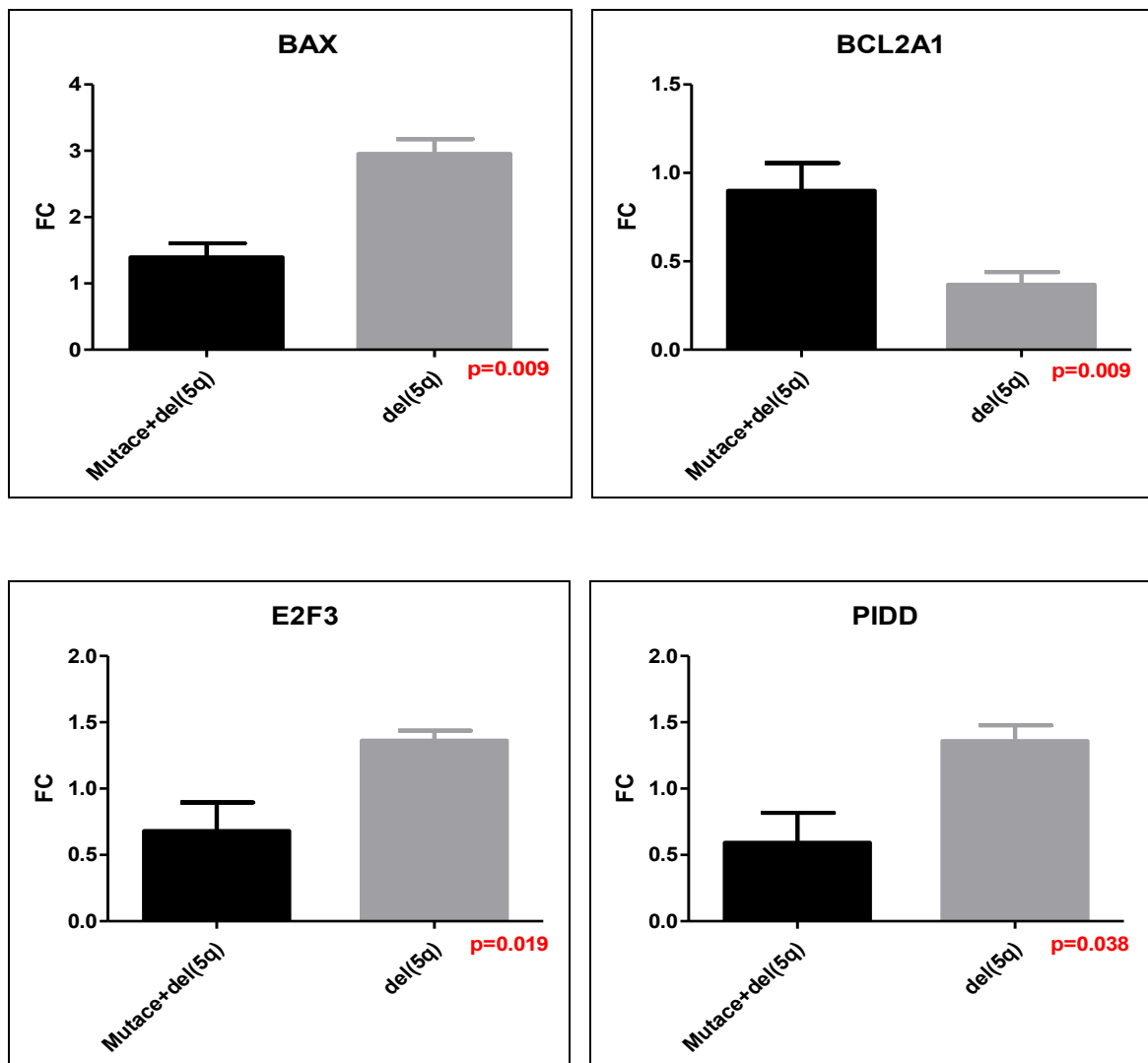
Obrázek č. 9 - Schéma vzájemných interakcí aberantně exprimovaných genů u pacientů s MDS ve srovnání se zdravými kontrolami (vytvořeno pomocí <http://string-db.org>).

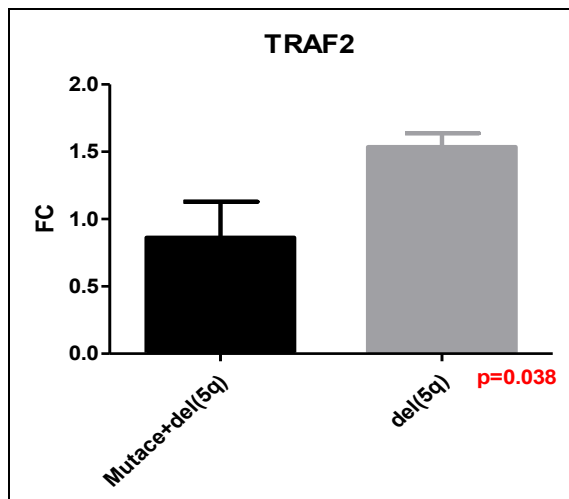
5.2 Porovnání skupiny pacientů s mutací *TP53* a del(5q) se skupinou pouze s del(5q)

S cílem zjistit, jakým způsobem ovlivňují mutace v genu *TP53* expresi ostatních genů signální dráhy byly porovnány skupiny pacientů s identifikovanou mutací *TP53* a del(5q) (n=4) s pacienty, kteří měli pouze del(5q) (n=6). Signifikantní změna genové exprese byla nalezena u těchto genů ovlivňujících apoptózu (*BAX*, *BCL2A1*, *PIDD* a *TRAF2*) a regulaci buněčného cyklu (*E2F3*).

U genů *BAX*, *E2F3*, *PIDD*, *TRAF2* byla naměřena snížená exprese u pacientů s mutací *TP53* a del(5q) oproti pacientům pouze s del(5q), u genu *BCL2A1* zvýšená exprese.

Porovnání změn exprese jednotlivých genů mezi pacienty a kontrolní skupinou jsou zobrazeny v obrázku č. 11.

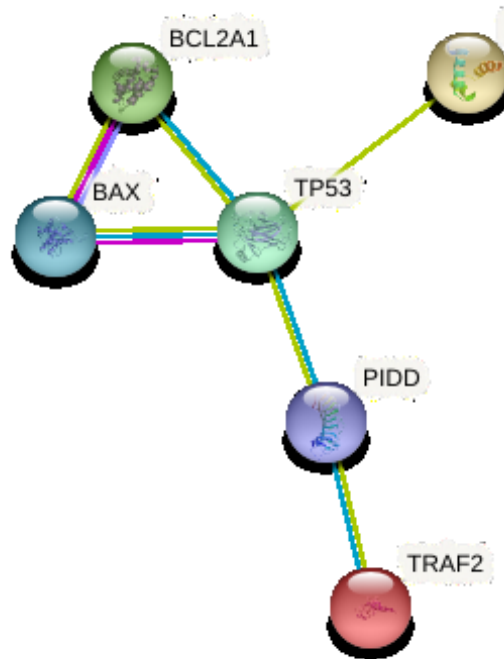




Obrázek č. 11 – Grafické znázornění rozdílu genové exprese mezi pacienty s mutací *TP53* a del(5q) (mutace+del(5q)) a pacienty pouze s del(5q) (del(5q)). FC (fold change): změna exprese genu.

Vzájemné interakce signifikantně aberantně exprimovaných genů

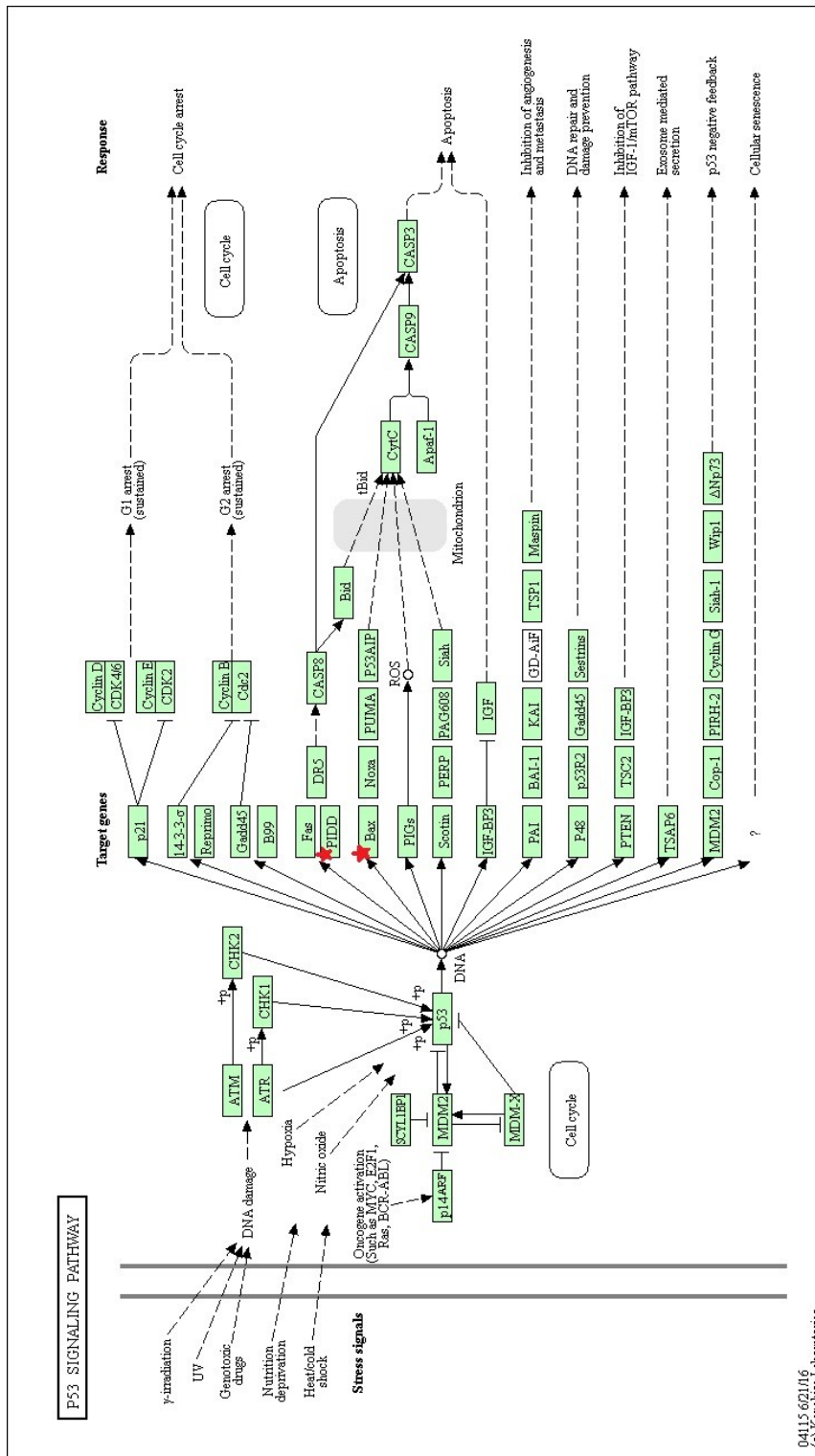
Gen *TP53* ve wild-type formě reguluje geny *BAX* a *PIDD*, funguje pro ně jako transkripční faktor. Oba geny se podílí na indukci apoptózy. *BAX* tvoří heterodimer s genem *BCL2* a funguje jako aktivátor apoptózy. Produkt genu *PIDD* se podílí na tvorbě tzv. piddozomu, který je součástí dráhy spouštějící apoptózu přes aktivaci kaspázové kaskády. Protein kódovaný *BCL2A1* genem je schopný snížit uvolňování cytochromu c, tím že inhibuje proapoptotické geny aktivované *TP53*, které by mohly uvolnit cytochrom c. *TRAF2* je asociován s TNF receptorem a po tvorbě dimeru s *TRAF1* je schopen vázat inhibitory apoptózy. *TRAF2* a *PIDD* jsou propojeny NF- κ B dráhou. Transkripční faktor *E2F3* je jedním z regulátorů buněčného cyklu, který aktivuje cílové geny nutné pro přechod buňky z G1 fáze do S fáze.



žlutá	často se vyskytují společně v textu
fialová	homologie
růžová	experimentálně potvrzená homologie
modrá	interakce známá z databáze

Obrázek č. 12 - Schéma vzájemných interakcí aberantně exprimovaných genů u pacientů s del(5q) a mutací *TP53* ve srovnání s pacienty, kteří měli pouze del(5q) (vytvořeno pomocí <http://string-db.org>).

Na obrázku č.13 jsou znázorněny vztahy aberantních genů v p53 signální dráze dle biologické databáze drah KEGG.



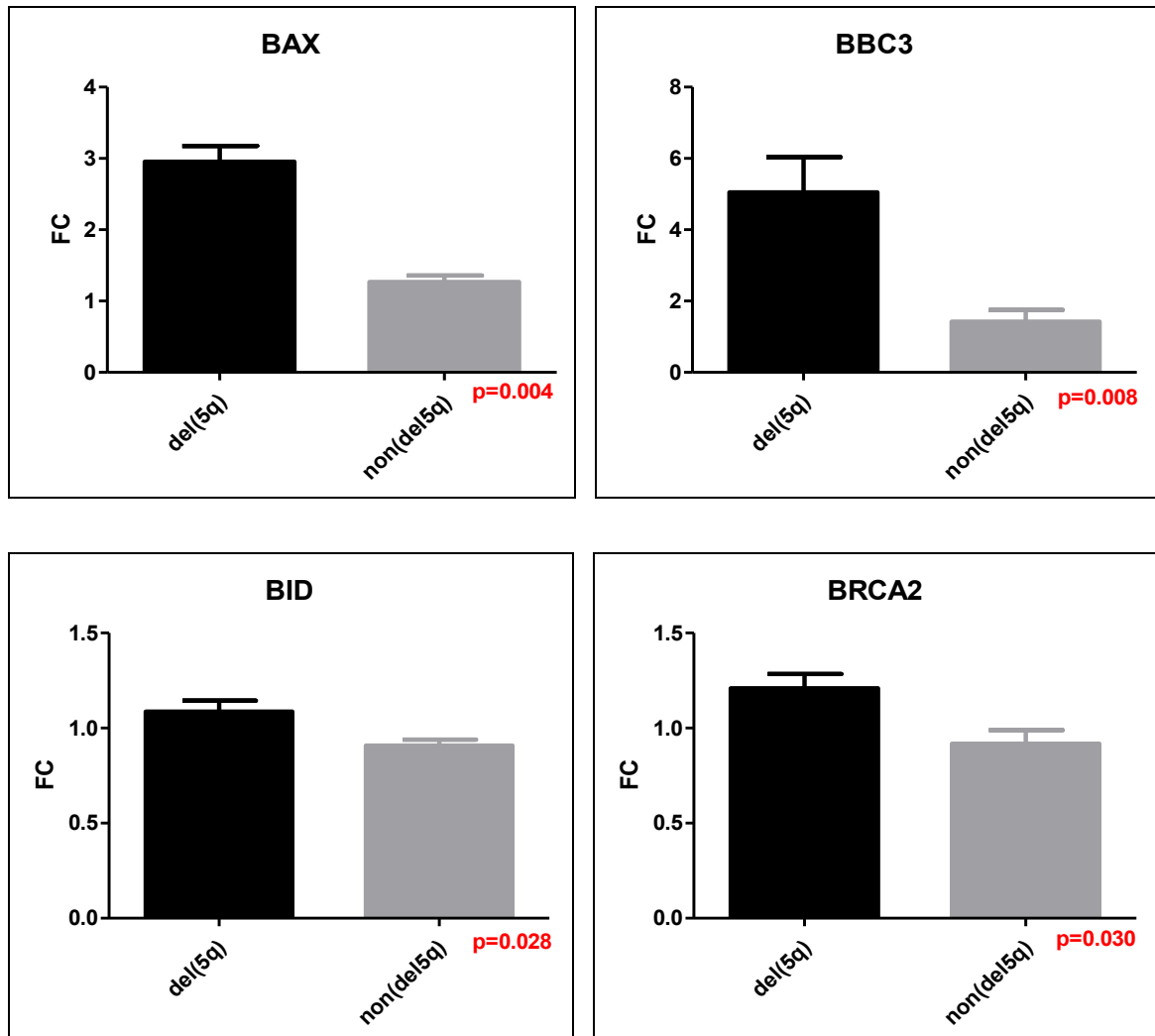
Obrázek č. 13 - Signální dráhy p53 s vyznačením aberantně exprimovaných genů, označeny červenou hvězdičkou (získáno z <http://www.genome.jp/kegg/pathway.html> a upraveno).

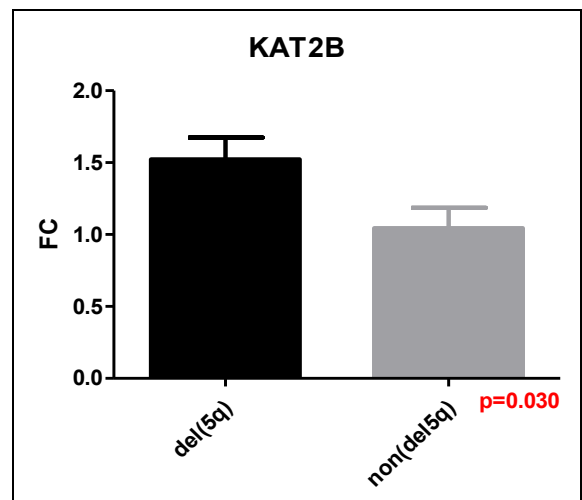
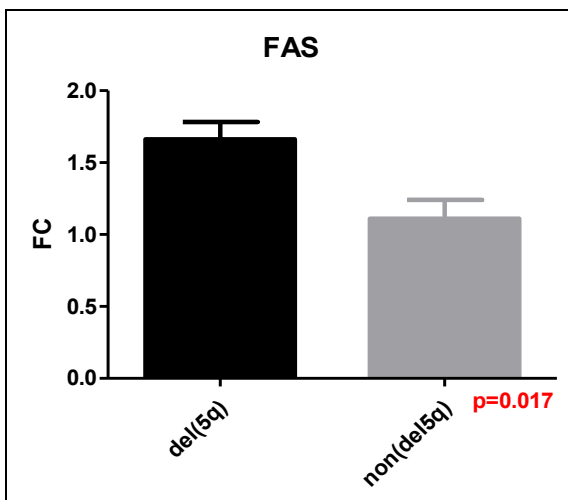
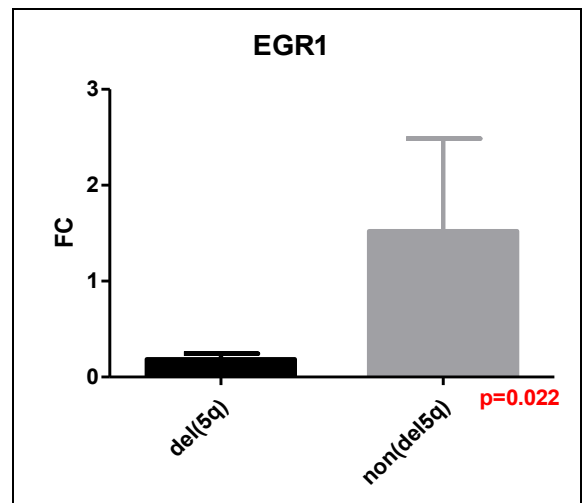
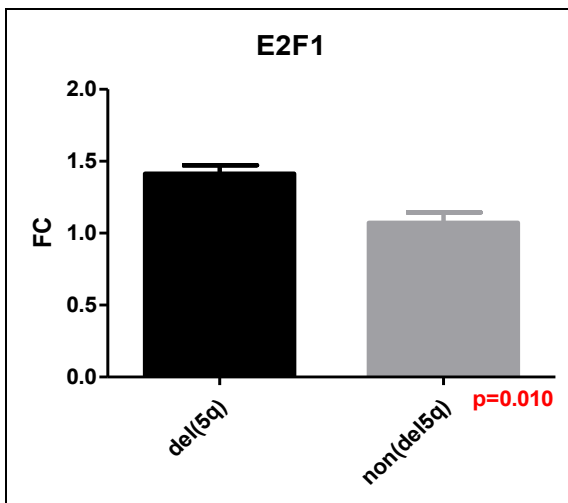
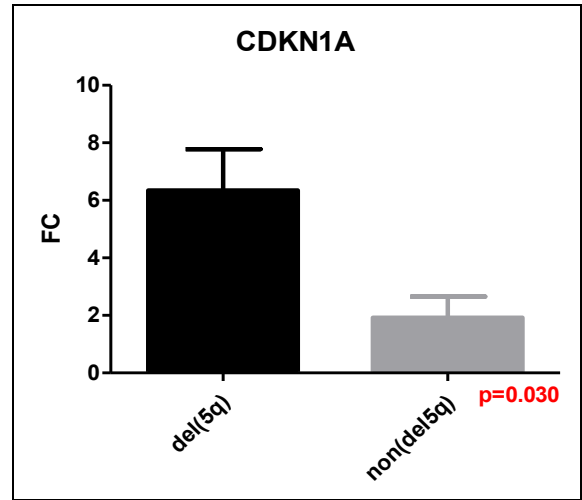
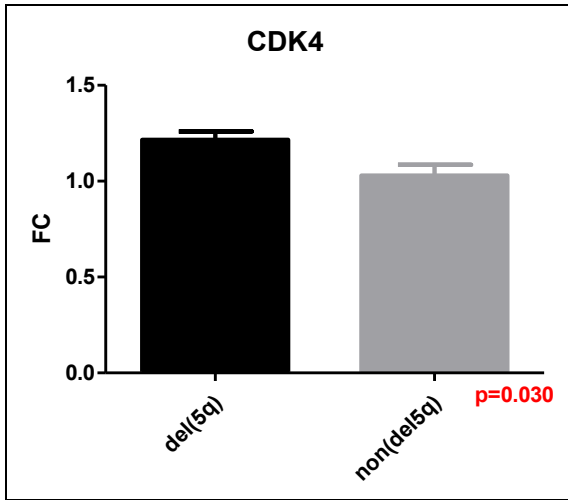
5.3 Porovnání skupiny pacientů s del(5q) se skupinou pacientů bez delece

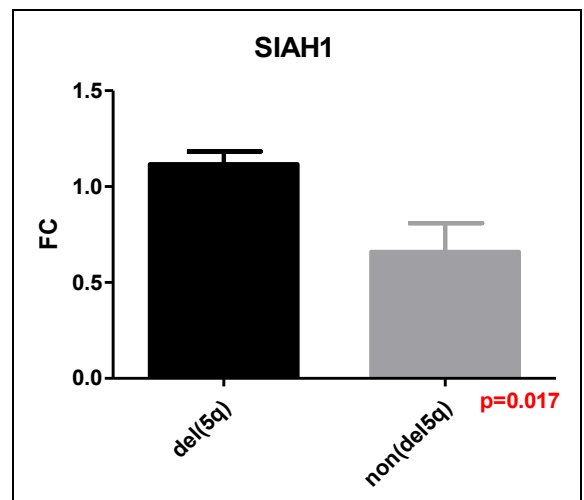
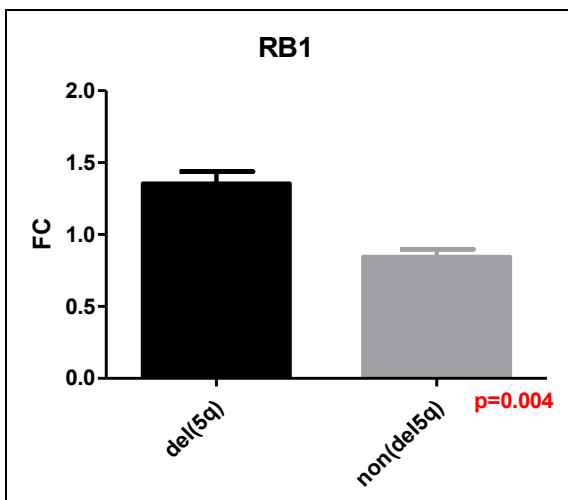
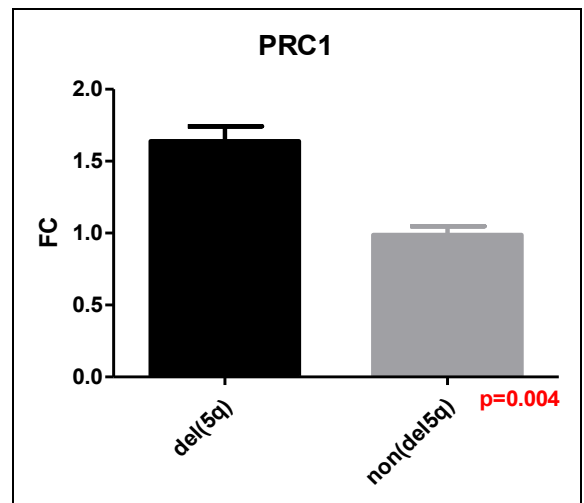
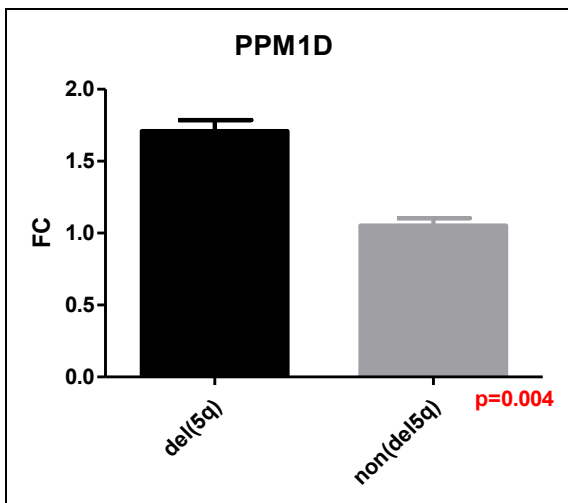
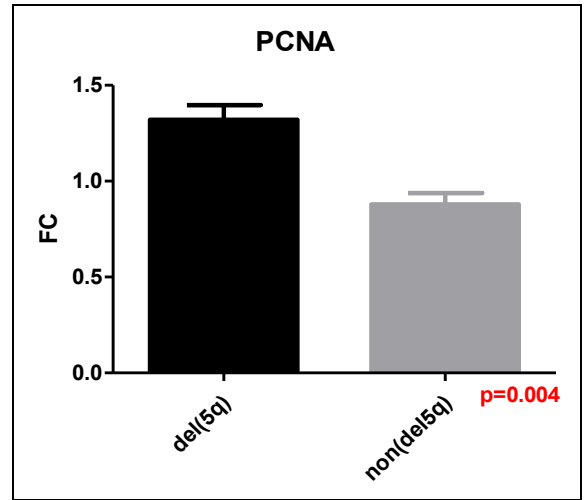
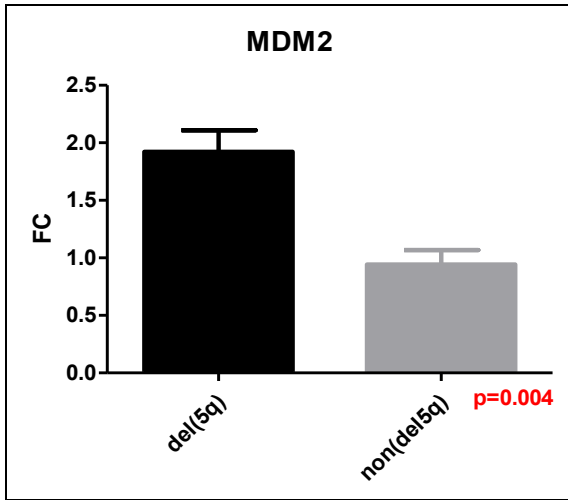
Při porovnání skupiny pacientů s del(5q) (n=6) a bez delece (n=5) byla signifikantní změna genové exprese nalezena u genů indukujících apoptózu (*BAX*, *BBC3*, *BID*, *FAS*, *TNFRSF10B*), inhibujících apoptózu (*TNFRSF10D*), podílejících se na procesu apoptózy (*SIAH1*, *TP53BP2*), regulaci buněčného cyklu (*BRCA2*, *CDK4*, *E2F1*, *PRC1*, *KAT2B*, *TADA3*, *RBI*), opravě DNA (*XRCC5*), zastavení buněčného cyklu (*CDKN1A*, *KAT2B*), regulaci proliferace (*EGR1*, *E2F1*, *PCNA*, *KAT2B*, *MDM2*, *PPM1D*).

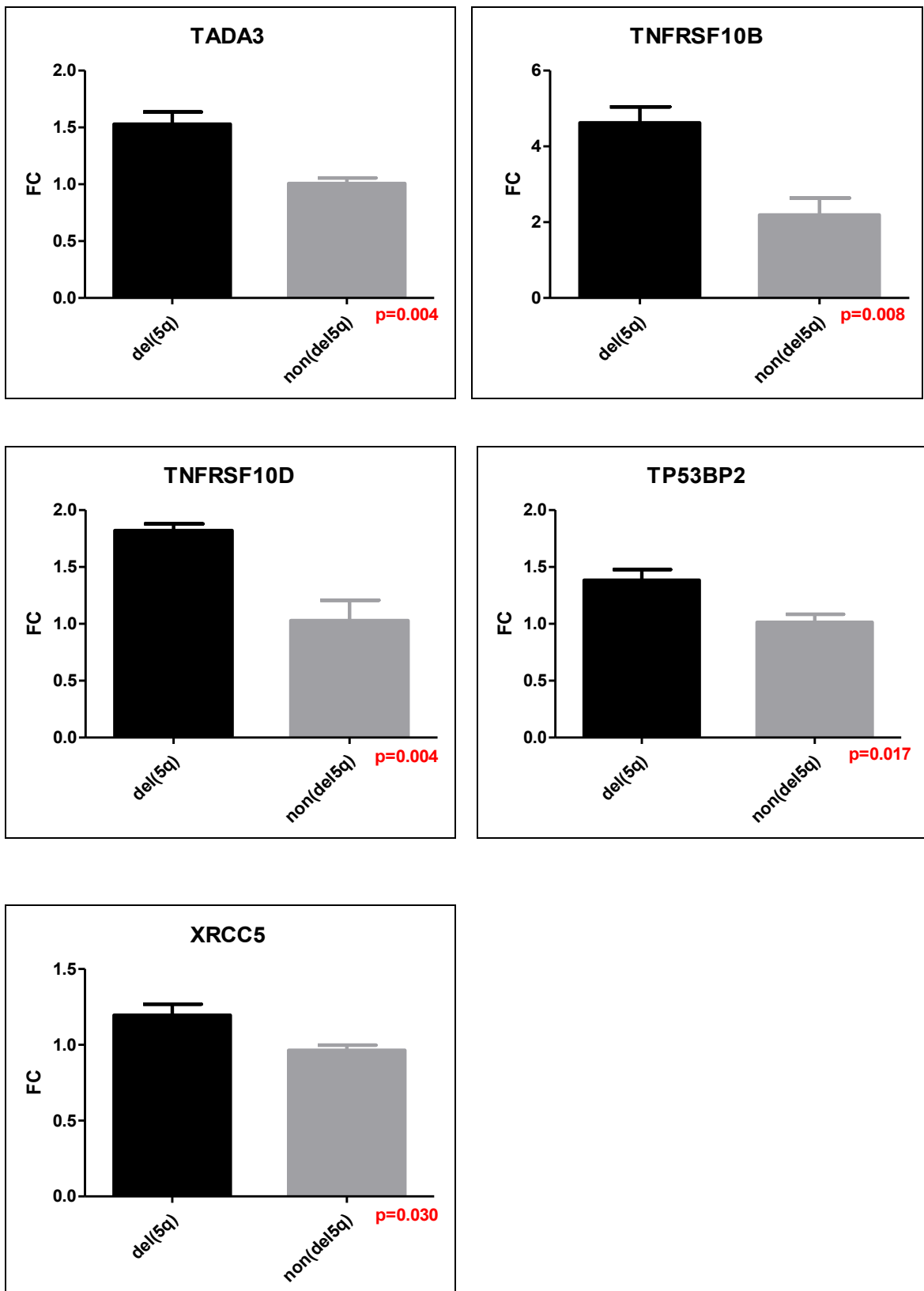
U všech výše vypsanych genů byla pozorována zvýšená exprese u pacientů s del(5q) oproti pacientům bez delece. Pouze u genu *EGR1* byla exprese nižší.

Porovnání změn exprese jednotlivých genů mezi pacienty a kontrolní skupinou jsou zobrazeny v obrázku č. 14.





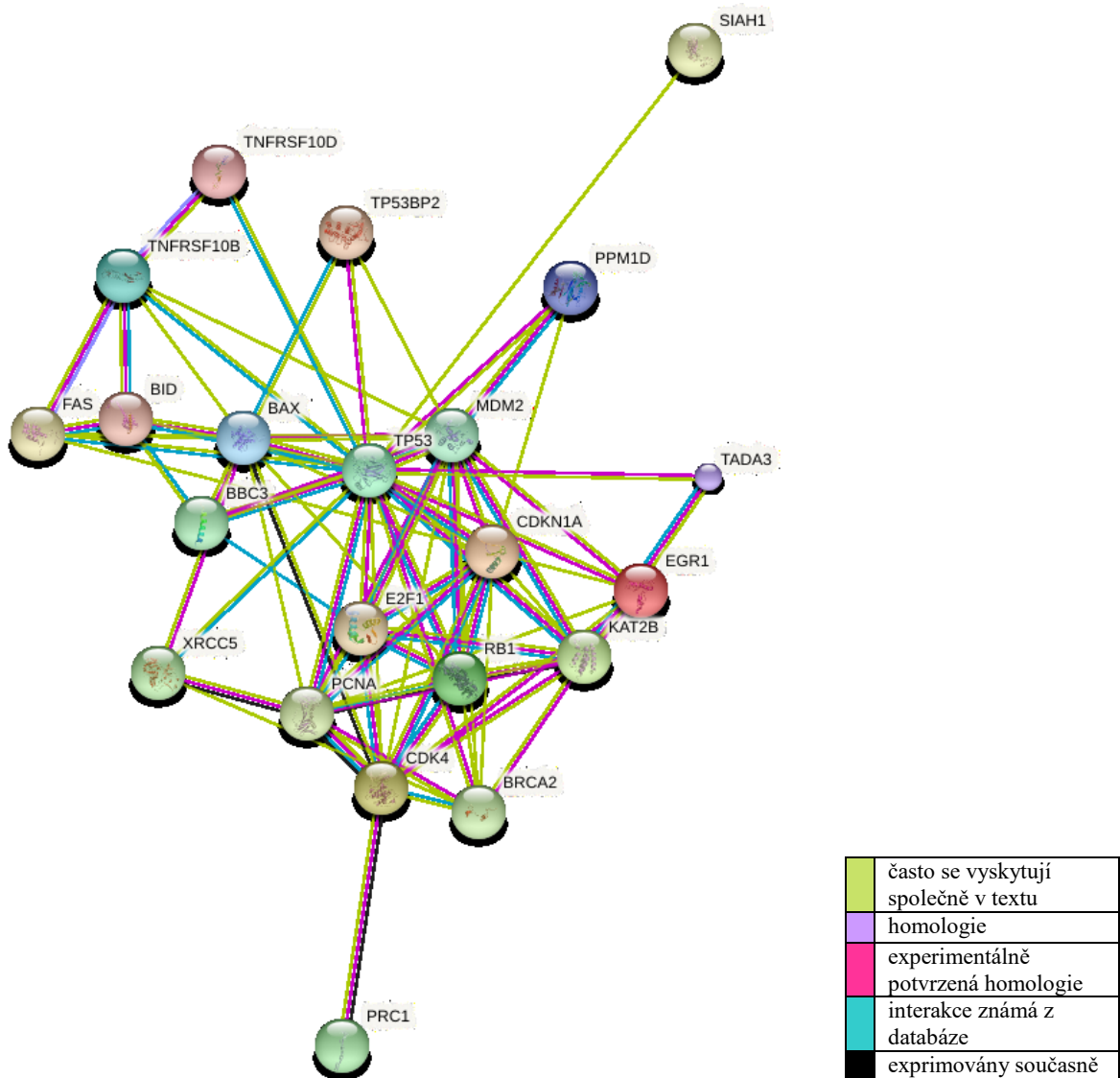




Obrázek č. 14 – Grafické znázornění rozdílu genové exprese mezi pacienty s del(5q) (del(5q)) a pacienty bez delece (non(del5q)). FC (fold change): změna exprese.

Vzájemné interakce signifikantně aberantně exprimovaných genů

Gen *TP53* přímo reguluje geny *BAX*, *BBC3*, *BID*, *FAS*, *TNFRSF10B*, *SIAH1* a *TNFRSF10D*, které se podílí na indukci a regulaci apoptózy. Gen *TP53BP2* stimuluje transkripční funkci *TP53*. Z genů podílejících se na regulaci buněčného cyklu *TP53* přímo nereguluje žádný, ale oni regulují jeho. Jedná se o geny *BRCA2*, *E2F1* a *TADA3*. V procesu zastavení buněčného cyklu *TP53* reguluje *CDKN1A* (p21), *KAT2B* reguluje *TP53*. Geny *PCNA*, *PPM1D* jsou *TP53* regulovány v procesu diferenciaci, zato geny *EGR1*, *E2F1*, *KAT2B* a *MDM2* regulují *TP53*. Gen *XRCC5* je regulován *TP53* a podílí se na indukci oprav DNA. Geny *TP53* a *RB1* se společně podílí na regulaci průchodu kontrolními body buněčného cyklu.



Obrázek č. 15 - Schéma vzájemných interakcí aberantně exprimovaných genů u pacientů s del(5q) ve srovnání s pacienty bez delece (vytvořeno pomocí <http://string-db.org>).

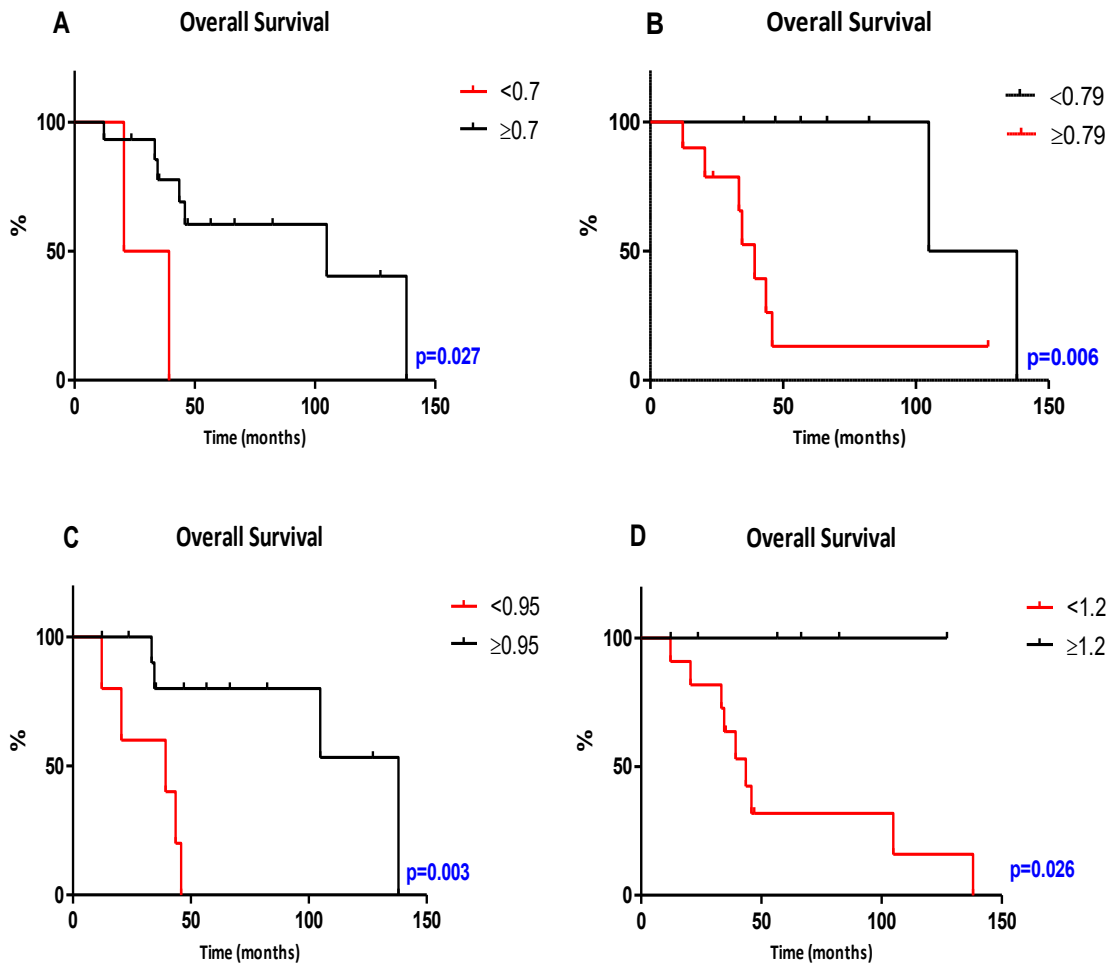
5.4 Univariatní analýza celkového přežití

Pro zjištění možného prognostického významu naměřených změn genové exprese na celkové přežití pacientů (OS) byla provedena univariatní analýza. Kromě změny exprese jednotlivých genů byly analyzovány i další klinické parametry jako věk, blasty v kostní dřeni, hladina hemoglobinu, počet neutrofilů a krevních destiček, přítomnost del(5q) a mutace *TP53*. Signifikantní vliv na celkové přežití byl identifikován u přítomnosti mutace *TP53* ($p=0,0105$) a exprese genů *BTG2* ($p=0,0392$), *CCNH* ($p=0,0075$), *CDK4* ($p=0,0186$), *E2F3* ($p=0,0131$).

Tabulka č. 10 – Univariatní analýza pro celkové přežití (OS) (HR (hazard ratio), CI (confidence interval)).

Parametr	OS (celkové přežití)		
	p hodnota	HR	95 % CI
Věk (roky)	0,1605	1,0673	0,9749 - 1,1684
Blasty v kostní dřeni	0,9302	0,983	0,6711 - 1,4398
Hemoglobin (g/l)	0,2385	1,0269	0,9828 - 1,0729
Neutrofilů (10^9 g/l)	0,866	1,0603	0,5389 - 2,0863
Krevní destičky (10^9 /l)	0,141	0,997	0,9930 - 1,0010
Karyotyp – del(5q)	0,9993	0,9994	0,2473 - 4,0383
mutace <i>TP53</i>	0,0105	8,4248	1,6607 - 42,7380
<i>BTG2</i>	0,0392	1,3919	1,0182 - 1,9029
<i>CCNH</i>	0,0075	3 199,4016	8,8452 - 1157255,4599
<i>CDK4</i>	0,0186	0,0262	0,0013 - 0,5355
<i>E2F3</i>	0,0131	0,0628	0,0071 - 0,5531

U pacientů se změnou exprese genu *BTG2* $<0,7$ bylo zjištěno výrazně kratší celkové přežití (medián OS: 29, 9 měsíců) oproti pacientům s expresí $\geq 0,7$ (medián OS: 104,9 měsíců) [Obr. č. 17-A]. Změny exprese genu *CCNH* $<0,79$ byly asociovány s delším celkovým přežitím (medián OS: 121,45 měsíců) oproti pacientům se změnou genové exprese $\geq 0,79$ (medián OS: 39,3 měsíců) [Obr. č. 17-B] U genu *CDK4* se změnou genové exprese $<0,95$ bylo zjištěno kratší celkové přežití (medián OS: 39,3 měsíců) oproti pacientům se změnou exprese $\geq 0,95$ (medián OS: 138 měsíců) [Obr. č. 17-C]. Pacienti se změnou exprese genu *E2F3* $<1,2$ měli kratší celkové přežití (medián OS: 43,5 měsíců) u pacientů s hodnotou $\geq 1,2$ nemohl být OS stanoven [Obr. č. 17-D].



Obrázek č. 17 – Kaplan-Meirovy křivky celkového přežití (OS) – Graf A (OS pro gen *BTG2*), Graf B (OS pro gen *CCNH*), Graf C (OS pro gen *CDK4*), Graf D (OS pro gen *E2F3*).

5.5 Multivariantní analýza

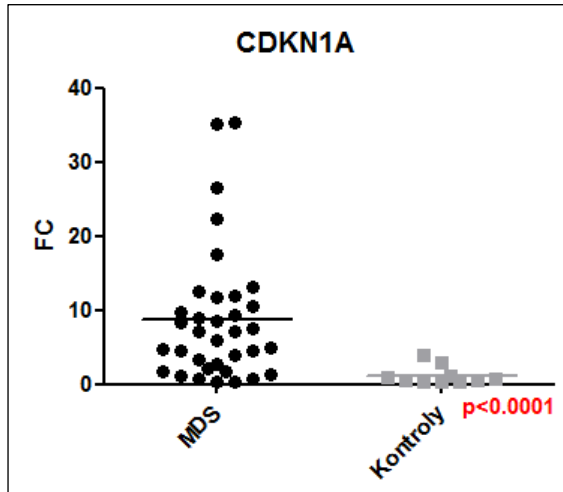
Multivariantní Cox-regresní analýza pro zjištění vlivu sledovaných parametrů na celkové přežití (OS) byla provedena u hodnot, které vyšly signifikantně z univariantní analýzy (mutace *TP53*, změna genové exprese *BTG2*, *CDK4*, *CCNH*, *E2F3*). Tato analýza odhalila signifikantní negativní prognostický význam na OS pouze u změny exprese genu *CCNH* ($p=0,0459$).

Tabulka č. 11 – Multivariantní analýza pro celkové přežití (OS) (HR (hazard ratio), CI (confidence interval)).

Parametr	p hodnota	HR	95 % CI
<i>BTG2</i>	0,6722	0,8148	0,3170 - 2,0941
<i>CCNH</i>	0,0459	116059657,2968	1,5448 - 8,72E+015
<i>CDK4</i>	0,2502	0,0000	1,76539E-019 - 69364,6397
<i>E2F3</i>	0,3667	123333,7348	0,0000 - 12,27932E+015
<i>TP53</i>	0,2869	269,2345	0,0096 - 7577333,7345

5.6 Validace získaných dat

Validace výsledků byla provedena u genu *CDKN1A* (p21), který vykazoval největší změny genové exprese. Validační skupina se skládala z 35 pacientů s MDS a 11 hematologicky zdravých jedinců. Výsledky jsou znázorněny na obrázku č. 18.



Obrázek č. 18 – Graf znázorňující rozdíl genové exprese genu *CDKN1A* mezi pacienty s MDS (MDS) a zdravými jedinci (Kontroly). FC (fold change): změna exprese.

6 Diskuze

Cílem této diplomové práce bylo vyšetřit hladiny exprese mRNA genů zahrnutých v signální dráze p53 v CD34⁺ pluripotentních hematopoetických buňkách pacientů s hematologickým onemocněním typu MDS, konkrétně u pacientů s nízkým rizikem leukemické transformace do AML. Vzhledem k tomu, že onemocnění MDS je vysoce heterogenní, vybrání pacienti byli rozděleni ještě do podskupin podle přítomnosti genetických abnormalit, a to přítomnosti mutace v genu *TP53* nebo del(5q).

Při porovnání genové exprese mezi všemi zařazenými MDS pacienty a hematologicky zdravými jedinci byla zjištěna zvýšená exprese mRNA genů *BAX*, *BBC3*, *CCNE1*, *CDC25A*, *CDKN1A*, *FAS*, *GADD45*, *TNFRSF10B*, *TNFRSF10D* a snížená exprese mRNA genu *TNF* u pacientů. Tyto výsledky ukazují na zvýšenou aktivitu signální dráhy p53 i bez signifikantní změny exprese mRNA genu *TP53*, tak jak bylo publikováno v práci Dutt *et al.*, (2011). Z hlediska biologických procesů byla zvýšená exprese zjištěna u genů indukujících apoptózu (*BAX*, *FAS*, *BBC3*, *TNFRSF10B*) a regulujících buněčných cyklus (*CDKN1A*, *CDC25A*, *CCNE1*), což je v souladu s předchozími výsledky práce Bouscaryho *et al.*, (1997), která prokázala zvýšenou expresi *FAS* genu v CD34⁺ buňkách, navíc hodnota exprese negativně korelovala s počtem myeloblastů. Podobné porovnání s počtem blastů nebylo možné v naší studii provést, protože byli zařazeni pouze nízkorizikovní pacienti s počtem blastů do 5 %. U časných forem MDS s nadměrnou apoptózou (zejména u RA) je obecně nalézána zvýšená exprese TNF cytokinu na úrovni proteinu i mRNA (Stifter *et al.*, 2005; Kitigawa *et al.*, 1997). V naší kohortě pacientů s nízkým rizikem však byly hladiny *TNF* mRNA snižené, což podporuje hypotézu o dvojí roli genu *TNF* v patogenezi MDS, kdy může nejen vyvolávat apoptózu, ale i stimulovat proliferaci raných hematopoetických progenitorů (Shetty *et al.*, 1996; Mundle *et al.*, 1999). Zvýšená exprese genů indukujících apoptózu buněk odpovídá morfologickým nálezům u pacientů s nízkorizikovým MDS, a to nálezu cytopenie, kdy dochází k předčasné apoptóze zralejších krvetvorných buněk. Zvýšená apoptóza nejvýrazněji postihuje zejména erytroidní řadu, proto dochází ke ztrátě erytrocytů a následné anémii. Také u pacientů v této studii byla naměřena snížená hodnota hemoglobinu (92,6 g/l vs. referenční hodnota 140-200 g/l).

U všech vyšetřovaných pacientů byla dále zjištěna zvýšená exprese genů regulujících progresi buněčného cyklu v reakci na poškození DNA (*CDKN1A*, *CDC25A*, *CCNE1*

a *GADD45A*). Tyto geny se podílejí zejména na regulaci přechodu z G1 do S fáze. Gen *CDKN1A* (p21), který byl ze všech genů exprimován nejvíce, tlumí činnost cyklin-dependentních kináz G1 fáze a tím brání vstupu buněk do dalších fází buněčného cyklu. Předpokládá se, že jeho hladina se zvyšuje v reakci na poškození DNA (Levine *et al.*, 2006). Naše výsledky jsou ve shodě s prací Xiao *et al.*, (2013), kteří zjistili zvýšenou expresi genu *CDKN1A* na proteinové úrovni, tak i úrovni mRNA v CD34⁺ buňkách u 30 MDS pacientů s nízkým rizikem. Byla také zjištěna zvýšená exprese tumor supresorového genu *GADD45A*, který hraje roli v buněčném stresu a je schopen, kromě oprav DNA a zastavení buněčného cyklu v G2/M fázi, též aktivovat i *CDKN1A* a tím zastavit cyklus v G1 fázi (Liebermann and Hoffman, 2007).

S cílem zjistit, jakým způsobem ovlivňuje mutace *TP53* expresi genů celé signální dráhy p53, byly porovnávány hladiny expresí jednotlivých genů mezi pacienty s mutací *TP53* a bez mutace. Navíc všichni pacienti zařazení do obou porovnávaných skupin nesli del(5q). U pacientů s mutací byla zjištěna snížená exprese tří genů indukujících apoptózu (*BAX*, *PIDD*, *TRAF2*) a zvýšená exprese genu inhibujícího apoptózu (*BCL2A1*). Výsledky naznačují sníženou aktivitu drah apoptózy a tím možnosti nárůstu poškozených buněk nesoucí mutaci v genu *TP53* v průběhu onemocnění, především při progresi choroby, tak jak jsme pozorovali v předchozí studii (byl pozorován nárůst mutační zátěže) (Belickova *et al.*, 2016). Dá se předpokládat, že u patologického klonu (v našem případě *TP53* mutovaného klonu) dojde k nekontrolovanému buněčnému dělení díky snížené apoptóze a tento klon nakonec přeroste ostatní buňky. Kulasekararaj *et al.*, (2013), ve své publikaci popisuje zvýšenou expresi proteinu p53 u MDS pacientů s mutací *TP53* bez významně zvýšené hladiny *TP53* mRNA ve srovnání s pacienty bez mutace, stejně jako bylo popsáno v publikaci Dutt *et al.*, (2011), což je v souladu s našimi výsledky.

5q-syndrom je specifický subtyp MDS, který vykazuje typické molekulární, cytogenetické, morfologické a klinické znaky jako např. přítomnost izolované del(5q), blasty v kostní dřeni pod 5%, normální nebo často zvýšený počet krevních destiček, makrocytickou anémii a často hypoplastickou erytropoézu. Patofyziologie 5q-syndromu vychází především z haploinsufficience genů mapovaných do CDR v del(5q). V další části studie jsme se tedy zaměřili na vliv del(5q) na expresi genů signální dráhy p53. Komparativní analýza mezi pacienty s del(5q) a pacienty bez delece identifikovala 21 aberantně exprimovaných genů. U pacientů s del(5q) byla pozorována zvýšená exprese genů indukujících apoptózu (*BAX*, *BBC3*, *BID*, *FAS*, *TNFRSF10B*, *TP53BP2*) a výsledky ukazují, že dochází k aktivaci jak vnější (*FAS*, *TNFRSF10B*), tak i vnitřní dráhy apoptózy

(*BBC3*, *BID*, *BAX*, *TP53BP2*). Aktivita vnitřní dráhy byla ovlivněna větším počtem deregulovaných genů než té vnější dráhy u tohoto souboru pacientů. Tyto výsledky jsou ve shodě se studií Pellagatti *et al.*, (2010b), kteří popsali zvýšenou expresi genů *FAS*, *TNFRSF10B* a *BAX* u MDS pacientů s del(5q) v CD34⁺ buňkách. U vyšetřených pacientů byla také diagnostikována anémie, projevující se sníženou hladinou hemoglobinu a sníženým počtem neutrofilů ($1,73 \cdot 10^9$ ku $2,85 \cdot 10^9$ g/l).

Další skupina genů se zvýšenou expresí u pacientů s del(5q) zahrnovala geny regulující buněčný cyklus, konkrétně geny *BRCA2*, *CDK4*, *E2F1*, *PRC1*, *TADA3*, *RBI* a *CDKN1A*(p21). Expese genu *CDKN1A* (p21) byla mnohonásobně zvýšena u pacientů s del(5q) oproti pacientům bez delece, podobné nálezy publikoval Dutt *et al.*, 2011 ve své práci, kde popsal akumulaci p21 v erytroidních progenitorových buňkách pacientů s 5q- syndromem. Výše popsané geny se zvýšenou expresí tlumí činnost cyklin-dependentních kináz, tím brání vstupu buněk do dalších kol buněčného cyklu a umožní tak provedení opravy poškozeného genomu. Účastní se hlavně tzv. prvního kontrolního bodu buněčného cyklu na konci G1 fáze (Wu *et al.*, 2010; Bertoli *et al.*, 2013; Indovina *et al.*, 2015). V práci Pellagatti *et al.*, (2010b) byla popsána zvýšenou exprese genů *RBI*, *E2F1* a *BRCA2* u pacientů s časnými stádii MDS oproti pacientům s pokročilými stádii, v našem souboru nízkorizikových pacientů byla exprese zvýšená oproti zdravým kontrolám.

Pacienti s del(5q) měli zvýšenou hladinu exprese genu *XRCC5*, který se podílí na opravě dvouřetězcových zlomů DNA, konkrétně na nehomologním spojování volných konců (NHEJ). Ve studii Ribeiro *et al.*, (2016) byl studována vztah mezi bodovým polymorfismem (rs3835) genu *XRCC5*, jehož A/G genotyp asociuje se vznikem MDS, a hladinou exprese na úrovni mRNA. Žádný vztah však nebyl nalezen. V jiné práci, zabývající se tímto genem zjistili, že exprese tohoto genu vzrůstá s věkem vyšetřovaných osob v reakci na oxidativní stress (Hazane *et al.*, 2005).

S regulací buněčného cyklu je v těsném spojení též proces proliferace. U genů regulujících proliferaci byla změna exprese pozorována u genů *E2F1*, *PCNA*, *KAT2B*, *MDM2* a *PPM1D*. U všech byla exprese zvýšena, kromě genu *EGRI*, který byl exprimován méně, což bylo způsobeno jeho umístěním v deletované oblasti (CDR) na 5q. *EGRI* mimo jiné funguje jako transkripční faktor pro *TP53*.

Z výsledků univariální analýzy pro celkové přežití (OS) vyplynulo, že kromě přítomnosti mutace genu *TP53*, která měla vliv na OS (HR: 8,4248, p=0,0105), byly statisticky významné též změny exprese genů *BTG2*, *CCNH*, *CDK4* a *E2F3*. Zdá se tedy, že i když samotná změna exprese není statisticky významná, může mít vliv na OS, jako

u genů *BTG2* a *CCNH*. Pacienti se zvýšenou expresí *BTG2* genu měli medián OS 105 měsíců oproti 30 měsícům pacientů se sníženou expresí. Podobné výsledky vlivu exprese genu *BTG2* na OS byly popsány u pacientů s rakovinou prsu v práci Powell *et al.*, (2016). Ve studii Dorn *et al.*, (2010) byla popsána zvýšená exprese cyklinu H (gen *CCNH*) jako nejsilnějšího negativního prognostického indikátoru pro přežití u pacientů s gastrointestinálním stromálním tumorem. V našem souboru pacientů byla zjištěna asociace zvýšené exprese transkripčního faktoru *E2F3* s lepším celkovým přežitím pacientů, stejně jako u pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic (Gao *et al.*, 2016).

Multivariantní analýza ukázala, že exprese genu *CCNH* je nejsilnější nezávislý prognostický faktor u pacientů s MDS s nízkým rizikem. Exprese ostatních genů, ani klinické parametry v našem souboru pacientů nebyly signifikantní nezávislé prognostické faktory.

Na základě zjištěných dat lze říci, že geny signální dráhy p53 jsou celkově deregulované u MDS s nízkým rizikem i bez signifikantní změny exprese klíčového genu *TP53*. Apoptóza je u nízkorizikových pacientů zvýšena, což odpovídá předchozím výsledkům. V tomto případě je apoptóza a zastavení buněčného cyklu žádoucí, protože může dojít k reparačním opravám poškozené DNA či eliminaci maligních buněk. Tyto procesy jsou ještě prohloubeny u pacientů s *del(5q)*, což je v souladu s jejich lepší prognózou. Naopak potlačení apoptózy bylo pozorováno u pacientů nesoucí mutaci v genu *TP53*, kteří mají nejkratší dobu přežití. Vzhledem k předchozím pracím popisující zvýšenou expresi proteinu p53 zejména u pacientů s mutací v genu *TP53* jsme očekávali také změnu na úrovni mRNA. Tato hypotéza se však nepotvrdila. Akumulace proteinu p53 v jádře je pravděpodobně způsobena prodlouženým poločasem rozpadu mutovaného p53 oproti proteinu divokého typu.

Výsledky této diplomové práce plánujeme použít při studii rozšířené o MDS pacienty s vyšším rizikem a o párové vzorky z doby diagnózy a z průběhu progresu onemocnění.

7 Souhrn

Předmětem této diplomové práce byla analýza exprese mRNA genu *TP53* a genů signální dráhy p53 u pacientů s MDS s nízkým rizikem. Celkově byla změřena exprese 83 genů, následně bylo provedeno statistické vyhodnocení zjištěných dat mezi MDS pacienty a kontrolní skupinou zdravých jedinců, mezi skupinami pacientů s mutací v genu *TP53* a bez mutace a pacientů s del(5q) a bez delece. Byly zjištěny vzájemné interakce deregulovaných genů v databázi STRING a vztahy genů dle biologické databáze drah KEGG. Byla provedena validace výsledků u genu *CDKN1A*. Byla provedena univariantní a multivariantní analýza dat jednotlivých genových expresí a klinických parametrů vzhledem k celkovému přežití pacientů.

U pacientů s MDS byly oproti zdravým jedincům zjištěny zvýšené exprese mRNA genů regulující apoptózu, buněčný cyklus a opravy DNA (*BAX*, *BBC3*, *CCNE1*, *CDC25A*, *CDKN1A*, *FAS*, *GADD45A*, *TNFRSF10B*, *TNFRSF10D*) a snížená exprese genu *TNF*, prozánětlivého cytokinu. Při porovnání pacientů s mutací *TP53* a bez mutace, byla pozorována převážně snížená exprese genů podporující apoptózu (*BAX*, *PIDD*, *TRAF2*) a zvýšená exprese antiapoptického genu *BCL2A1* u pacientů nesoucí mutaci. U pacientů s del(5q) v porovnání s pacienty bez delece bylo zjištěno nejvíce aberantně exprimovaných genů a to 21. Zvýšená exprese byla zjištěna u genů regulující proliferaci, apoptózu a buněčný cyklus (*BAX*, *BBC3*, *BID*, *FAS*, *TNFRSF10B*, *TNFRSF10D*, *TP53BP2*, *BRCA2*, *CDK4*, *E2F1*, *PRC1*, *TADA3*, *RBI*, *CDKN1A*, *XRCC5*, *SIAH1*, *PCNA*, *KAT2B*, *PPM1D*, *MDM2*).

Pomocí univariantní analýzy byl zjištěn vliv mutace *TP53* a změny exprese genů *BTG2*, *CCNH*, *CDK4* a *E2F3* na celkové přežití pacientů. Multivariantní analýza ukázala, že exprese genu *CCNH* je nejsilnější nezávislý prognostický faktor u pacientů s MDS s nízkým rizikem.

Výsledky naší práce potvrzují značnou deregulaci signální dráhy p53 u pacientů s MDS bez signifikantní změny exprese mRNA genu *TP53*. Výsledky této diplomové práce budou sloužit jako úvodní data rozšířené studie zabývající se p53 signální dráhou u pacientů MDS.

8 Seznam použité literatury

- Adam, Z., Vaníček, J., Vorlíček J. a kolektiv (2004) Diagnostické a léčebné postupy u maligních chorob. 2., aktualizované a doplněné vydání Praha: Grada, 2004. ISBN 80-247-0896-5.
- Adès, L., Boehrer, S., Prebet, T., Beyne-Rauzy, O., Legros, L., Dreyfus, F., Stamatoullas, A., Chaury, M.P., Delaunay, J., Laurent, G. *et al.* (2009). Efficacy and safety of lenalidomide in intermediate-2 or high-risk myelodysplastic syndromes with 5q deletion : results of a phase 2 study. *Blood*, 113(17), 3947–3952.
- Anensen, N., Oyan, A. M., Bourdon, J. C., Kalland, K. H., Bruserud, O. and Gjertsen, B. T. (2006). A distinct p53 Protein Isoform Signature Reflects the Onset of Induction Chemotherapy for Acute Myeloid Leukemia. *Clinical Cancer Research*, 12(13), 3985–3992.
- Arber, D. A., Orazi, A., Hasserjian, R., Borowitz, M. J., Beau, M. M. Le, Bloomfield, C. D., Cazzola, M. and Vardiman, J. W. (2016). The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*, 127(20), 2391–2406.
- Asai, T., Liu, Y., Bae, N. and Nimer, S. D. (2011). The p53 Tumor Suppressor protein Regulates Hematopoietic Stem Cell Fate. *Journal of Cellular Physiology*, 226(9), 2215–2221.
- Aul, C., Giagounidis, A., Germing, U. (2001). Epidemiological features of myelodysplastic syndromes: results from regional cancer surveys and hospital-based statistics. *International Journal of Hematology*, 73(4), 405-410
- Bai, L. and Zhu, W. (2006). p53 : Structure , Function and Therapeutic Applications. *Journal of Cancer Molecules*, 2(4), 141–153.
- Barlev, N. A., Liu, L., Chehab, N. H., Mansfield, K., Harris, K. G., Halazonetis, T. D., and Berger, S. L. (2001). Acetylation of p53 activates transcription through recruitment of Coactivators/Histone Acetyltransferases. *Molecular Cell*, 8(6), 1243–1254.
- Barlow, J. L., Drynan, L. F., Hewett, D. R., Holmes, L. R., Lane, A. L., Jolin, H. E., Pannel, R., Middleton, A. J., Wong, S. H, Warren, A. J. *et al.* (2010). A p53-dependent mechanism underlies macrocytic anemia in a mouse model of human 5q- syndrome. *Nature Medicine*, 16(1), 59–66.
- Barrett, J., Sauntharajah, Y., & Molldrem, J. (2000). Myelodysplastic syndrome and aplastic anemia: distinct entities or diseases linked by a common pathophysiology? *Seminars in Hematology*, 37(1), 15–29.
- Belickova, M., Vesela, J., Jonasova, A., Pejsova, B., Votavova, H., Merkerova, M. D., Zemanova, Z., Brezinova, J., Mikulenkova, D., Lauermannova, M. *et al.* (2016). TP53 mutation variant allele frequency is a potential predictor for clinical outcome of patients with lower-risk myelodysplastic syndromes. *Oncotarget*, 7(24), 36266–36279.
- Benchimol, S., Lamb, P., Crawford, L. V., Sheer, D., Shows, T. B., Bruns, G. A. P. and Peacock, J. (1985). Transformation Associated p53 Protein Is Encoded by a Gene on Human Chromosome 17. *Somatic Cell and Molecular Genetics*, 11(5), 505–510.
- Bennett, J. M., Catovsky, D., Daniel, M. T, Flandrin, G., Galton, D. A. G., Gralnick, H. R. and Sultan, C. (1976). Proposals for the Classification of the Acute Leukaemias. *British Journal of Haematology*, 33(4), 451–458.
- Bennett, J. M., Catovsky, D., Daniel, M. T., Flandrin, G., Galton, D. A. G., Gralnick, H. R. and Sultan, C. (1982). Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *British Journal of Haematology*, 51(2), 189–99.

- Berghe, H. Van den, Cassiman, J. J., David, G., Fryns, J. P., Michaux, J. L., and Sokal, G. (1974). Distinct haematological disorder with deletion of long arm of No. 5 chromosome. *Nature*, 251(5474), 437–438.
- Bertoli, C., Skotheim, J.M., de Bruin, R.A.M. Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2013;14(8):518-528.
- Blagosklonny, M. V. (2000). p53 from complexity to simplicity: mutant p53 stabilization, gain-of-function, and dominant-negative effect. *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 14, 1901–1907.
- Bode, A. M. and Dong, Z. (2004). Post-translational modification of p53 in tumorigenesis. *Nature Reviews. Cancer*, 4(10), 793–805.
- Boultonwood, J., Fidler, C., Strickson, A. J., Watkins, F., Gama, S., Kearney, L., Tosi, S., Kasprzyk, A., Cheng, J.-F., Jaju, R. J. and Wainscoat, J. S. (2002). Narrowing and genomic annotation of the commonly deleted region of the 5q- syndrome. *Blood*, 99(12), 4638–4641.
- Boultonwood, J., Fidler, C., Strickson, A. J., Watkins, F., Kostrzewa, M., Jaju, R. J., Müller, U. and Wainscoat, J. S. (2000). Transcription mapping of the 5q- syndrome critical region: cloning of two novel genes and sequencing, expression, and mapping of a further six novel cDNAs. *Genomics*, 66(1), 26–34.
- Boultonwood, J., Lewis, S., and Wainscoat, J. S. (1994). The 5q- Syndrome. *The Journal Fo The American Society of Hematology*, 84(10), 3253–3260.
- Boultonwood, J., Pellagatti, A., Mckenzie, A. N. J. and Wainscoat, J. S. (2010). Advances in the 5q- syndrome. *Blood*, 116(26), 5803–5811.
- Bourdon, J. (2014). p53 isoforms change p53 paradigm. *Molecular & Cellular Oncology*, 1(4), e969136.
- Bourdon, J. C., Fernandes, K., Murray-Zmijewski, F., Liu, G., Diot, A., Xirodimas, D. P., Saville, M. K. and Lane, D. P. (2005). p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity. *Genes & Development*, 19, 2122–2137.
- Brooks, C. L. and Gu, W. (2003). Ubiquitination, phosphorylation and acetylation: The molecular basis for p53 regulation. *Current Opinion in Cell Biology*, 15(2), 164–171.
- Brosh, R. and Rotter, V. (2009). When mutants gain new powers: news from the mutant p53 field. *Nature Reviews. Cancer*, 9(10), 701–713.
- Čermák, J. (2002). Doporučené postupy pro praktické lékaře: Myelodysplastický syndrom. ČLS JEP, projekt MZ ČR, reg. č. o/017/301, dostupný on-line <http://www.cls.cz/dp>
- Dalamaga, M., Petridou, E., Cook, F. E. and Trichopoulos, D. (2002). Risk factors for myelodysplastic syndromes: a case-control study in Greece. *Cancer Causes & Control*, 13(7), 603–608.
- Davis, R. E. and Greenberg, P. L. (1998). Bcl-2 expression by myeloid precursors in myelodysplastic syndromes: relation to disease progression. *Leukemia Research*, 22(9), 767–777.
- De Roos, A. J., Deeg, H. J. and Davis, S. (2007). A population-based study of survival in patients with secondary myelodysplastic syndromes (MDS): impact of type and treatment of primary cancers. *Cancer Causes & Control*, 18(10), 1199–208.
- Della Porta, M. G. D., Malcovati, L., Boveri, E., Travaglino, E., Pietra, D., Pascutto, C., Passamonti, F., Invernizzi, R., Castello, A., Magrini, U. *et al.* (2009). Clinical relevance of bone marrow fibrosis and CD34-positive cell clusters in primary mvelodvsplastic syndromes. *Journal of Clinical Oncology*, 27(5), 754–762.

- Dickens, L. S., Powley, I. R., Hughes, M. A. and MacFarlane, M. (2012). The “complexities” of life and death: Death receptor signalling platforms. *Experimental Cell Research*, 318(11), 1269–1277.
- Dorn, J., Spatz, H., Schmieder, M., Barth, T.F.E, Blatz, A., Henne-Bruns, D., Knippschild, U. and Kramer, K. Cyclin H expression is increased in GIST with very-high risk of malignancy. *BMC Cancer*. 2010;10:350.
- Du, Y., Fryzek, J., Sekeres, M. A. and Taioli, E. (2010). Smoking and alcohol intake as risk factors for myelodysplastic syndromes (MDS). *Leukemia Research*, 34(1), 1–5.
- Dutt, S., Narla, A., Lin, K., Mullally, A., Abayasekara, N., Megerdichian, C., Wilson, F. H., Currie, T., Khanna-Gupta, A., Berliner, N. *et al.* (2011). Haploinsufficiency for ribosomal protein genes causes selective activation of p53 in human erythroid progenitor cells. *Blood*, 117(9), 2567–2576.
- Duarte, F. B., Gonçalves, R. P., Barbosa, M. C., Rocha Filho, F. D., De Jesus Dos Santos, T. E., Dos Santos, T. N. and De Vasconcelos, P. R. L. (2014). Tumor suppressor p53 protein expression: Prognostic significance in patients with low-risk myelodysplastic syndrome. *Revista Brasileira de Hematologia E Hemoterapia*, 36(3), 196–201.
- Ebert, B. L., Pretz, J., Bosco, J., Chang, C. Y., Tamayo, P., Galili, N., Raza, A., Root, D. E., Attar, E., Ellis, S. R. and Todd, R. (2008). Identification of RPS14 as a 5q- syndrome gene by RNA interference screen. *Nature*, 451(7176), 335–339.
- Fenaux, P. and Adés, L. (2013). How we treat lower-risk myelodysplastic syndromes. *Blood*, 121(21), 4280–4296.
- Fenaux, P., Giagounidis, A., Selleslag, D., Beyne-rauzy, O., Mufti, G., Mittelman, M., Muus, P., Boerckhorst, P., Sanz, G., Canizo, C. del *et al.* (2011). A randomized phase 3 study of lenalidomide versus placebo in RBC transfusion-dependent patients with Low- / Intermediate-1-risk myelodysplastic syndromes with del5q. *Blood*, 118(14), 3765–3777.
- Fozza, C. and Longinotti, M. (2012). Are T-cell dysfunctions the other side of the moon in the pathogenesis of myelodysplastic syndromes? *European Journal of Haematology*, 88(5), 380–387.
- Gao,Z.,Shi,R.,Yuan,K.,Wang,Y.Expression and prognostic value of E2F activators in NSCLC and subtypes: a research based on bioinformatics analysis. *Tumour Biol*. 2016 Nov;37(11):14979-14987
- Germing, U., Aul, C., Niemeyer, C. M., Haas, R. and Bennett, J. M. (2008). Epidemiology, classification and prognosis of adults and children with myelodysplastic syndromes. *Annals of Hematology*, 87(9), 691–699.
- Giono, L. E. and Manfredi, J. J. (2006). The p53 Tumor Suppressor Participates in Multiple Cell Cycle Checkpoints. *Journal of Cellular Physiology*, 207(1), 13–20.
- Gondek, L. P., Tiu, R., O’Keefe, C. L., Sekeres, M. A., Theil, K. S. and Maciejewski, J. P. (2008). Chromosomal lesions and uniparental disomy detected by SNP arrays in MDS, MDS/MPD, and MDS-derived AML. *Blood*, 111(3), 1534–1542.
- Greenberg, P. L., Cox, C., LeBeau, M. M., Fenaux, P., Morel, P., Sanz, G., Sanz, M., Vallespi, T., Hamblin, T., Osier, D. *et al.* (1997). International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood*, 89(6), 2079–88.
- Greenberg, P. L., Tuechler, H., Schanz, J., Sanz, G., Garcia-Manero, G., Solé, F., Bennett, J. M., Bowen, D., Fenaux, P., Dreyfus, F. *et al.* (2012). Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood*, 120(12), 2454–2465.

- Greenberg, P. L., Young, N. S. and Gattermann, N. (2002). Myelodysplastic syndromes. *Hematology*, 136–161.
- Gu, W. and Roeder, R. G. (1997). Activation of p53 Sequence-Specific DNA Binding by Acetylation of the p53 C-Terminal Domain. *Cell*, 90(4), 595–606.
- Haase, D., Germing, U., Schanz, J., Pfeilstöcker, M., Nösslinger, T., Hildebrandt, B., Kundgen, A., Lubbert, M., Kunzmann, R., Giagounidis, A. A. N. *et al.* (2007). New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: Evidence from a core dataset of 2124 patients. *Blood*, 110(13), 4385–4395.
- Haferlach, T. (2012). Molecular genetics in myelodysplastic syndromes. *Leukemia Research*, 36(12), 1459–1462.
- Hainaut, P. and Hollstein, M. (2000). P53 and Human Cancer: the First Ten Thousand Mutations. *Advances in Cancer Research*, 77, 81–137.
- Hainaut, P. and Wiman, K. G. (2005). *25 Years of p53 Research*. (P. Hainaut & K. G. Wiman, Eds.). Springer.
- Harris, S. L. and Levine, A. J. (2005). The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene*, 24(17), 2899–2908.
- Hasle, H., Niemeyer, C. M., Chessells, J. M., Baumann, I., Bennett, J. M., Kerndrup, G. and Head, D. R. (2003). A pediatric approach to the WHO classification of myelodysplastic and myeloproliferative diseases. *Leukemia*, 17(2), 277–282.
- Haupt, S., Berger, M., Goldberg, Z. and Haupt, Y. (2003). Apoptosis - the p53 network. *Journal of Cell Science*, 116, 4077–85.
- Hazane, F., Valenti, K., Sauvaigo, S., Peinnequin, A., Mouret, C., Favier, A., Beani, J.C. Ageing effects on the expression of cell defence genes after UVA irradiation in human male cutaneous fibroblasts using cDNA arrays. *J Photochem Photobiol B*. 2005 Jun 1;79(3):171-90.
- Heaney, M. and Golde, D. W. (1999). Myelodysplasia. *The New England Journal of Medicine*, 340(21), 1649–1660.
- Horn, H. F. and Vousden, K. H. (2007). Coping with stress: multiple ways to activate p53. *Oncogene*, 26(9), 1306–1316.
- Hwang, S. M., Kim, S. Y., Kim, J. A., Park, H.-S., Park, S. N., Im, K., Kim, K., Kim, S.-M. and Lee, D. S. (2016). Short telomere length and its correlation with gene mutations in myelodysplastic syndrome. *Journal of Hematology & Oncology*, 9(1), 62.
- Chen, G., Zeng, W., Miyazato, A., Billings, E., Maciejewski, J., Kajigaya, S., Sloand, E. M. and Young, N. S. (2004). Distinctive gene expression profiles of CD34 cells from patients with myelodysplastic syndrome characterized by specific chromosomal abnormalities. *Blood*, 104(13), 4210–4218.
- Christiansen, D. H., Andersen, M. K. and Pedersen-Bjergaard, J. (2001). Mutations with loss of heterozygosity of p53 are common in therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia after exposure to alkylating agents and significantly associated with deletion or loss of 5q, a complex karyotype, and a poor prognosis. *Journal of Clinical Oncology*, 19(5), 1405–1413.
- Indovina, P., Pentimalli, F., Casini, N., Vocca, I., Giordano, A. RB1 dual role in proliferation and apoptosis: Cell fate control and implications for cancer therapy. *Oncotarget*. 2015;6(20):17873-17890.

- Irwin, J., D'Souza, A., Johnson, L. and Carter, J. (2011). Myelodysplasia in the Wellington region 2002-2007: Disease incidence and treatment patterns. *Internal Medicine Journal*, 41(5), 399–407.
- Itahana, K., Dimri, G. and Campisi, J. (2001). Regulation of cellular senescence by p53. *European Journal of Biochemistry*, 62687, 142784-279123–1428.
- Iwama, H., Ohyashiki, K., Ohyashiki, J. H., Hayashi, S., Yahata, N., Ando, K., Toyama, K., Hoshika, A., Takasaki, M., Mori, M. and Shay, J. W. (1998). Telomeric length and telomerase activity vary with age in peripheral blood cells obtained from normal individuals. *Human Genetics*, 102(4), 397–402.
- Jädersten, M. (2010). Pathophysiology and treatment of the myelodysplastic syndrome with isolated 5q deletion. *Haematologica*, 95(3), 348–351.
- Jädersten, M., Saft, L., Pellagatti, A., Göhring, G., Wainscoat, J. S., Boultonwood, J., Porwit, A., Schlegelberger, B. and Hellström-Lindberg, E. (2009). Clonal heterogeneity in the 5q-syndrome: P53 expressing progenitors prevail during lenalidomide treatment and expand at disease progression. *Haematologica*, 94(12), 1762–1766.
- Jädersten, M., Saft, L., Smith, A., Kulasekararaj, A., Pomplun, S., Göhring, G., Hedlund, A., Hast, R., Schlegelberger, B., Porwit, A. *et al.* (2011). TP53 mutations in Low-Risk Myelodysplastic Syndromes With del(5q) Predict Disease Progression. *Journal of Clinical Oncology*, 29(15), 1971–1979.
- Joerger, A. C., Ang, H. C., Veprintsev, D. B., Blair, C. M. and Fersht, A. R. (2005). Structures of p53 cancer Mutants and Mechanism of Rescue by Second-site Suppressor Mutations. *Journal of Biological Chemistry*, 280(16), 16030–16037.
- Jost, C. A., Marin, M. C. and Kaelin, W. G. (1997). P73 is a human p53-related protein that can induce apoptosis. *Nature*, 389(6647), 191–4.
- Kaghad, M., Bonnet, H., Yang, A., Creancier, L., Biscan, J.-C., Valent, A., Minty, A., Chalon, P., Lelias, J.-M., Dumont, X. *et al.* (1997). Monoallelically Expressed Gene Related to p53 at 1p36, a Region Frequently Deleted in Neuroblastoma and Other Human Cancers. *Cell*, 90(4), 809–19.
- Kantarjian, H., O'Brien, S., Ravandi, F., Borthakur, G., Fader, S., Bueso-Ramos, C., Abruzzo, L., Pierce, S., Sahn, J., Issa, J.P. and Garcia-Manero, G. (2009). The Heterogenous Prognosis Of Patients With Myelodysplastic syndrom (MDS) And Chromosome 5 Abnormalities: How Does It Relate To The Original Lenalidomide Experience in MDS? *Cancer*, 115(22), 5202–5209.
- Kardos, G., Baumann, I., Passmore, S. J., Locatelli, F., Hasle, H., Schultz, K. R., Starý, J., Schmitt-Graeff, A., Fischer, A., Harbott, J. *et al.* (2003). Refractory anemia in childhood: A retrospective analysis of 67 patients with particular reference to monosomy 7. *Blood*, 102(6), 1997–2003.
- Khoury, M. P. and Bourdon, J. (2010). The Isoforms of the p53 Protein. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2, 1–11.
- Khoury, M. P. and Bourdon, J. (2011). p53 Isoforms: An Intracellular Microprocessor? *Genes & Cancer*, 2(4), 453–65.
- Kitagawa, M., Saito, I., Kuwata, T., Yoshida, S., Takahashi, M., Tanizawa, T., Kamiyama, R., Hirokawa, K. Overexpression of tumor necrosis factor (TNF)-alpha and interferon (IFN)-gamma by bone marrow cells from patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 1997(11):2049–2054.

- Kokouva, M., Bitsolas, N., Hadjigeorgiou, G. M., Rachiotis, G., Papadoulis, N. and Hadjichristodoulou, C. (2011). Pesticide exposure and lymphohaematopoietic cancers: a case-control study in an agricultural region (Larissa, Thessaly, Greece). *BMC Public Health*, 11(1), 5.
- Kruse, J. P. and Gu, W. (2008). SnapShot: p53 Posttranslational Modifications. *Cell*, 133(5), 5–6.
- Kulasekararaj, A. G., Smith, A. E., Mian, S. A., Mohamedali, A. M., Krishnamurthy, P., Lea, N. C., Gäken, J., Pennaneach, C., Ireland, R., Czepulkowski, B. *et al.* (2013). TP53 mutations in myelodysplastic syndrome are strongly correlated with aberrations of chromosome 5, and correlate with adverse prognosis. *British Journal of Haematology*, 160(5), 660–672.
- Lai, F., Godley, L. A., Joslin, J., Fernald, A. A., Liu, J., Espinosa, R., Zhao, N., Pamintuan, L., Till, B. G., Larson, R. A. *et al.* (2001). Transcript map and comparative analysis of the 1.5-Mb commonly deleted segment of human 5q31 in malignant myeloid diseases with a del(5q). *Genomics*, 71(2), 235–45.
- Lakin, N. D. and Jackson, S. P. (1999). Regulation of p53 in response to DNA damage. *Oncogene*, 18(53), 7644–7655.
- Lamb, P. and Crawford, L. (1986). Characterization of the Human p53 Gene. *Molecular and Cellular Biology*, 6(5), 1379–1385.
- Lane, D. P. (1992). p53, guardian of the genome. *Nature*.
- Lane, D. P. and Crawford, L. V. (1979). T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature*, 278, 261–263.
- Lange, K., Holm, L., Nielsen, K. V., Hahn, A., Hofmann, W., Kreipe, H., Schlegelberger, B. and Gohring, G. (2010). Telomere Shortening and Chromosomal Instability in Myelodysplastic Syndromes. *Genes, Chromosomes & Cancer*, 49, 260–269.
- Le Beau, M. M., Espinosa, R., Davis, E., Eisenbart, J. D., Larson, R. A. and Green, E. D. (1996). Cytogenetic and molecular delineation of a region of chromosome 7 commonly deleted in malignant myeloid diseases. *Blood*, 88(6), 1930–1935.
- Liebermann, D. A. and Hoffman, B. (2007). Gadd45 in the response of hematopoietic cells to genotoxic stress. *Blood Cells Mol Dis*, 39(3), 329–335.
- Lopes MR, Machado-Neto JA, Traina F, Campos P de M, Saad STO, Favaro P. Differential profile of *CDKN1A* and *TP53* expressions in bone marrow mesenchymal stromal cells from myeloid neoplasms. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. 2016;38(4):368-370.
- Ly, L., Lin, G., Lin, G., Gao, X., Wu, C., Dai, J., Yang, A., Zou, H., Sun, H., Gu, M. *et al.* (2011). Case-control study of risk factors of myelodysplastic syndromes according to World Health Organization classification in a Chinese population. *American Journal of Hematology*, 86(2), 163–169.
- Ma, X., Lim, U., Park, Y., Mayne, S. T., Wang, R., Hartge, P., Hollenbeck, A. R. and Schatzkin, A. (2009). Obesity, lifestyle factors, and risk of myelodysplastic syndromes in a large US cohort. *American Journal of Epidemiology*, 169(12), 1492–1499.
- Ma, X., Wang, R., Galili, N., Mayne, S. T., Wang, S. A., Yu, H. and Raza, A. (2011). Cigarette smoking shortens the survival of patients with low-risk myelodysplastic syndromes. *Cancer Causes and Control*, 22(4), 623–629.
- Mahfoudhi, E., Lordier, L., Marty, C., Pan, J., Roy, A., Roy, L., Rameau, P., Abbes, S., Debili, N., Raslova, H. *et al.* (2016). P53 activation inhibits all types of hematopoietic progenitors and all stages of megakaryopoiesis. *Oncotarget*, 5(22).

- Malcovati, L., Germing, U., Kuendgen, A., Della Porta, M. G., Pascutto, C., Invernizzi, R., Giagounidis, A., Hildebrandt, B., Bernasconi, P., Knipp, S. *et al.* (2007). Time-dependent prognostic scoring system for predicting survival and leukemic evolution in myelodysplastic syndromes. *Journal of Clinical Oncology*, 25(23), 3503–3510.
- Malcovati, L., Hellström-Lindberg, E., Bowen, D., Adés, L., Cermak, J., Canizo, C., Della Porta, M. G., Fenaux, P., Gattermann, N., Germing, U. *et al.* (2013). Diagnosis and treatment of primary myelodysplastic syndromes in adults: recommendations from the European LeukemiaNet. *Blood*, 122(17), 2943–2964.
- Malcovati, L., Karimi, M., Papaemmanuil, E., Ambaglio, I., Jädersten, M., Jansson, M., Elena, C., Galli, A., Walldin, G., Della Porta, M.G. *et al.* (2015). SF3B1 mutation identifies a distinct subset of myelodysplastic syndrome with ring sideroblasts. *Blood*, 126(2), 233–241.
- Marisavljević, D., Rolović, Z., Cemerikić, V., Bošković, D. and Čolović, M. (2004). Myelofibrosis in primary myelodysplastic syndromes. *Medical Oncology*, 21(4), 325–331.
- Maschek, H., Georgii, A., Kaloutsi, V., Werner, M., Bandecar, K., Kressel, M. G., Choritz, H., Freund, M. and Hufnagl, D. (1992). Myelofibrosis in primary myelodysplastic syndromes: A retrospective study of 352 patients. *European Journal of Haematology*, 73(4), 208–214.
- Matsui, W. H., Brodsky, R. a, Smith, B. D., Borowitz, M. J. and Jones, R. J. (2006). Quantitative analysis of bone marrow CD34 cells in aplastic anemia and hypoplastic myelodysplastic syndromes. *Leukemia*, 20(3), 458–62.
- Mauritzson, N., Albin, M., Rylander, L., Billström, R., Ahlgren, T., Mikoczy, Z., Björk, J., Strömberg, U., Nilsson, P.G., Mitelman, F. *et al.* (2002). Pooled analysis of clinical and cytogenetic features in treatment-related and de novo adult acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes based on a consecutive series of 761 patients analyzed 1976-1993 and on 5098 unselected cases reported in the . *Leukemia*, 16(12), 2366–78.
- Mayer, J. a Starý, J. (2002) Leukemie. Praha: *Grada*, 2002. ISBN 80-7169-991-8.
- Mayer, J. Léčebné postupy v hematologii: doporučení České hematologické společnosti A České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně. Praha: *Česká hematologická společnost České lékařské společnosti J.E. Purkyně*, 2016. ISBN 978-80-260-9718-1.
- Millau, J. F., Bastien, N. and Drouin, R. (2009). P53 transcriptional activities: A general overview and some thoughts. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, 681(2–3), 118–133.
- Mueller, O., Lightfoot, S. and Schroeder, A. (2004). RNA Integrity Number (RIN) – Standardization of RNA Quality Control Application. *Agilent Technologies*, 1–8.
- Nag, S., Qin, J., Srivenugopal, K. S., Wang, M. and Zhang, R. (2013). The MDM2-p53 pathway revisited. *Journal of Biomedical Research*, 27(4), 254–71.
- Narla, A. and Ebert, B. L. (2010). Ribosomopathies : human disorders of ribosome dysfunction. *Blood*, 115(16), 3196–3206.
- Neukirchen, J., Schoonen, W.M., Strupp, C., Gattermann, N., Aul, C., Haas, R., Germing, U. (2011). Incidence and Prevalence of Myelodysplastic syndromes: data from the Düsseldorf MDS-registry. *Leukemia Research*, 35(12), 1591-6.
- Nilsson, L., Åstrand-Grundstro, I., Anderson, K., Arvidsson, I., Hokland, P., Bryder, D., Kjeldsen, L., Johansson, B., Hellström-Linberg, E., Hast, R. and Jacobsen, S. E. W. (2002). Involvement and functional impairment of the CD34+ CD38- Thy-1+ hematopoietic stem cell pool in myelodysplastic syndromes with trisomy 8. *Blood*, 100(1), 259–267.
- Olivier, M., Hollstein, M. and Hainaut, P. (2010). TP53 Mutations in Human Cancers: Origins, Consequences, and Clinical Use. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(1), 1–17.

- Oren, M., Damalas, A., Gottlieb, T., Michael, D., Taplick, J., Martinez Leal, J. F., Maya, R., Moas, M., Seger, R., Taya, Y. and Ben-Ze'EV, A. (2002). Regulation of p53. *Annals New York Academy of Sciences*, 973, 374–383.
- Pant, V., Quintás-cardama, A., Lozano, G., Pant, V. and Quintá, A. (2012). The p53 pathway in hematopoiesis : lessons from mouse models , implications for humans. *Blood*, 120(26), 5118–5127.
- Papaemmanuil, E., Gerstung, M., Malcovati, L., Tauro, S., Gundem, G., Loo, P. Van, Yoon, C.J., Ellis, P., Wedge, D.C., Pellagatti, A. *et al.* (2013). Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. *Blood*, 122(22), 3616–3627.
- Parker, J. E., Fishlock, K. L., Mijovic, A., Czepulkowski, B., Pagliuca, A. and Mufti, G. J. (1998). “Low-risk” myelodysplastic syndrome is associated with excessive apoptosis and an increased ratio of pro- versus anti-apoptotic bcl-2-related proteins. *British Journal of Haematology*, 103(4), 1075–1082.
- Parker, J. E. and Mufti, G. J. (2001). Role of apoptosis in the pathogenesis of myelodysplastic syndromes. *International Journal of Hematology*, 73, 416–428.
- Parker, J. E., Mufti, G. J., Rasool, F., Mijovic, A., Devereux, S. and Pagliuca, A. (2000). The role of apoptosis , proliferation , and the Bcl-2 – related proteins in the myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia secondary to MDS, 96(12), 3932–3938.
- Passmore, S. J., Chessells, J. M., Kempski, H., Hann, I. M., Brownbill, P. A. and Stiller, C. A. (2003). Paediatric myelodysplastic syndromes and juvenile myelomonocytic leukaemia in the UK: A population-based study of incidence and survival. *British Journal of Haematology*, 121(5), 758–767.
- Pellagatti, A., Cazzola, M., Giagounidis, A., Perry, J., Malcovati, L., Della Porta, M., Jadersten, M., Killick, S., Verma, A., Norbury, C.J. *et al.* (2010b). Deregulated gene expression pathways in myelodysplastic syndrome hematopoietic stem cells. *Leukemia*, 24, 756–764.
- Pellagatti, A., Hellström-Lindberg, E., Giagounidis, A., Perry, J., Malcovati, L., Della Porta, M. G., Jadersten, M., Killick, S., Fidler, C., Cazzola, M. *et al.* (2008). Haploinsufficiency of RPS14 in 5q- syndrome is associated with deregulation of ribosomal- and translation-related genes. *British Journal of Haematology*, 142(1), 57–64.
- Pellagatti, A., Marafioti, T., Paterson, J. C., Barlow, J. L., Drynan, L. F., Giagounidis, A., Pileri, S.A., Cazzola, M., McKenzie, A.N.J., Wainscoat, J.S. and Boultonwood, J. (2010a). Induction of p53 and up-regulation of the p53 pathway in the human 5q- syndrome. *Blood*, 115(13), 2721–2723.
- Peller, S. and Rotter, V. (2003). TP53 in hematological cancer: Low incidence of mutations with significant clinical relevance. *Human Mutation*, 21(3), 277–284.
- Penka, M., Tesařová, E. a kolektiv (2011) Hematologie a transfúzní lékařství. *Grada*. 1 vydání. ISBN 978-80-247-3459-0
- Pheeko, K. J., Richards, M. A., Moller, H. and Schey, S. A. (2006). The incidence and outcome of myeloid malignancies in 2,112 adults patients in South East-England. *Haematologica*, 91, 1400–1404.
- Pluquet, O. and Hainaut, P. (2001). Genotoxic and non-genotoxic pathways of p53 induction. *Cancer Letters*, 174(1), 1–15.
- Pospíšilová, Š., Dvořáková, D. a Mayer, J. (2013). Molekulární hematologie. Praha: *Galén*. ISBN 978-80-7262-942-8.

- Powell, E., Shao, J., Yuan, Y., Chen, H., Cai, S., Echeverria, G., Mistry, N., Decker, K., Schlosberg, C., Do, K. et al. p53 deficiency linked to B cell translocation gene 2 (BTG2) loss enhances metastatic potential by promoting tumor growth in primary and metastatic sites in patient-derived xenograft (PDX) models of triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2016 Jan 27;18(1).
- Rajagopalan, S., Andreeva, A., Rutherford, T. J., & Fersht, A. R. (2010). Mapping the physical and functional interactions between the tumor suppressors p53 and BRCA2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(19), 8587–8592.
- Raza, A., Gezer, S., Mundle, S., Gao, X. Z., Alvi, S., Borok, R., Rifkin, S., Iftikhar, A., Shetty, V., Parcharidou, A. et al. (1995). Apoptosis in bone marrow biopsy samples involving stromal and hematopoietic cells in 50 patients with myelodysplastic syndromes. *Blood*, 86(1), 268–76.
- Raza, A., Mundle, S., Shetty, V., Alvi, S., Chopra, H., Span, Parcharidou, A., Dar, S., Venugopal, P., Borok, R. et al. (1996). Novel Insight into the biology of myelodysplastic syndromes: excessive apoptosis and the role of cytokines. *International Journal of Hematology*, 63(4), 265-278.
- Ribeiro, H.L., Soares, M.A.R., Costa, M.B., Farias, I.R., de Paula Borges, D., de Oliveira, R.T., de Sousa, J.C., Magalhães, S.M., Pinheiro, R.F. Influence of functional polymorphisms in DNA repair genes of myelodysplastic syndrome. *Leuk Res.* 2016 Sep; 48:62-72.
- Rivlin, N., Brosh, R., Oren, M. and Rotter, V. (2011). Mutations in the p53 tumor suppressor gene: Important milestones at the various steps of tumorigenesis. *Genes & Cancer*, 2(4), 466–474.
- Rollison, D. E., Howlader, N., Smith, M. T., Strom, S. S., Merritt, W. D., Ries, L. A., Edwards, B.K. and List, A.F. (2008). Epidemiology of myelodysplastic syndromes and chronic myeloproliferative disorders in the United States, 2001-2004, using data from the NAACCR and SEER programs. *Blood*, 112(1), 45–52.
- Rufini, A., Tucci, P., Celardo, I. and Melino, G. (2013). Senescence and aging: the critical roles of p53. *Oncogene*, 32(43), 5129–43.
- Saft, L., Karimi, M., Ghaderi, M., Matolcsy, A., Mufti, G. J., Kulasekararaj, A., Gohring, G., Giagounidis, A., Selleslag, D., Muus, P. et al. (2014). p53 protein expression independently predicts outcome in patients with lower-risk myelodysplastic syndromes with del(5q). *Haematologica*, 99(6), 1041–1049.
- Satoh, Y., Matsumura, I., Tanaka, H., Harada, H., Harada, Y., Matsui, K., Shibata, M., Mizuki, M. and Kanakura, Y. (2012). C-terminal mutation of RUNX1 attenuates the DNA-damage repair response in hematopoietic stem cells. *Leukemia*, 26(2), 303–11.
- Scott, F. L., Stec, B., Pop, C., Dobaczewska, M. K., Lee, J., Monosov, E., Robinson, H., Salesen, G.S., Schwarzenbacher, R. and Riedl, S. J. (2009). The Fas/FADD death domain complex structure unravels signaling by receptor clustering. *Nature*, 457(7232), 1019–1022.
- Sekeres, M. A. (2010). The epidemiology of myelodysplastic syndromes. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 24(2), 287–294.
- Sekeres, M. A. and Cutler, C. (2014). How we treat higher-risk myelodysplastic syndromes. *Blood*, 123(6), 829–837.
- Sekeres, M. A., Schoonen, W. M., Kantarjian, H., List, A., Fryzek, J., Paquette, R. and Maciejewski, J. P. (2008). Characteristics of US patients with myelodysplastic syndromes: Results of six cross-sectional physician surveys. *Journal of the National Cancer Institute*, 100(21), 1542–1551.

- Shetty, V., Mundle, S., Alvi, S., Showel, M., Broady-Robinson, L., Dar, S., Borok, R., Showel, J., Gregory, S., Rifkin, S. Measurement of apoptosis, proliferation and three cytokines in 46 patients with myelodysplastic syndromes. *Leuk Res.* 1996 (20):891–900.
- Shieh, S. Y., Ikeda, M., Taya, Y. and Prives, C. (1997). DNA Damage-Induced Phosphorylation of p53 Alleviates Inhibition by MDM2. *Cell*, 91(3), 325–334.
- Schanz, J., Steidl, C., Fonatsch, C., Pfeilstöcker, M., Nösslinger, T., Tuechler, H., Valent, P., Hildebrandt, B., Giagounidis, A., Aul, C. *et al.* (2011). Coalesced multicentric analysis of 2,351 patients with myelodysplastic syndromes indicates an underestimation of poor-risk cytogenetics of myelodysplastic syndromes in the International Prognostic Scoring System. *Journal of Clinical Oncology*, 29(15), 1963–1970.
- Schanz, J., Tüchler, H., Solé, F., Mallo, M., Luño, E., Cervera, J., Granada, I., Hildebrandt, B., Slovak, M.L., Ohyashiki, K. *et al.* (2012). New comprehensive cytogenetic scoring system for primary myelodysplastic syndromes (MDS) and oligoblastic acute myeloid leukemia after MDS derived from an international database merge. *Journal of Clinical Oncology*, 30(8), 820–829.
- Side, L. E., Curtiss, N. P., Teel, K., Kratz, C., Wang, P. W., Larson, R. A., Le Beau, M.M. and Shannon, K. M. (2004). RAS, FLT3, and TP53 Mutations in Therapy-Related Myeloid Malignancies with Abnormalities of Chromosomes 5 and 7. *Genes Chromosomes and Cancer*, 39(3), 217–223.
- Sieglová, Z., Žilovcová, S., Čermák, J., Říhová, H., Březinová, D., Dvořáková, R., Marková, M., Maaloufova, J., Sajdová, J., Březinová, J. *et al.* (2004). Dynamics of telomere erosion and its association with genome instability in myelodysplastic syndromes (MDS) and acute myelogenous leukemia arising from MDS: A marker of disease prognosis? *Leukemia Research*, 28(10), 1013–1021.
- Siliciano, J. D., Canman, C. E., Taya, Y., Sakaguchi, K., Appella, E. and Kastan, M. B. (1997). DNA damage induces phosphorylation of the amino-terminus of p53. *Genes & Development*, 11, 3471–3481.
- Singh, Z. N., Huo, D., Anastasi, J., Smith, S. M., Karrison, T., Le Beau, M. M., Larson, R.A. and Vardiman, J. W. (2007). Therapy-related myelodysplastic syndrome: Morphologic subclassification may not be clinically relevant. *American Journal of Clinical Pathology*, 127(2), 197–205.
- Sloand, E. M., Mainwaring, L., Fuhrer, M., Ramkissoon, S., Risitano, A. M., Keyvanafar, K., Lu, J., Basu, A., Barret, A.J. and Young, N. S. (2005). Preferential suppression of trisomy 8 compared with normal hematopoietic cell growth by autologous lymphocytes in patients with trisomy 8 myelodysplastic syndrome. *Blood*, 106(3), 841–851.
- Sloand, E. M., Pfannes, L., Chen, G., Shah, S., Solomou, E. E., Barrett, J. and Young, N. S. (2007). CD34 cells from patients with trisomy 8 myelodysplastic syndrome (MDS) express early apoptotic markers but avoid programmed cell death by up-regulation of antiapoptotic proteins. *Blood*, 109(6), 2399–2405.
- Smith, S. M., Le Beau, M. M., Huo, D., Karrison, T., Sobecks, R. M., Anastasi, J., Vardiman, J.W., Rowley, J.D. and Larson, R. A. (2003). Clinical-cytogenetic associations in 306 patients with therapy-related myelodysplasia and myeloid leukemia: The University of Chicago series. *Blood*, 102(1), 43–52.
- Stifter, G., Heiss, S., Gastl, G., Tzankov, A., Stauder, R. Over-expression of tumor necrosis factor-alpha in bone marrow biopsies from patients with myelodysplastic syndromes: relationship to anemia and prognosis. *Eur J Haematol.* 2005;75(6):485-91.

- Strom, S., Gu, Y., Gruschkus, S., Pierce, S. and Estey, E. (2005). Risk factors of myelodysplastic syndromes: a case-control study. *Leukemia*, 19(August), 1912–1918.
- Swerdlow, S. H., Campo, E., Harris, N. L., Jaffe, E. S., Pileri, S. A. Stein, H., Thiele, J., Vardiman, J. W. (2008). *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues* (4th ed.). International Agency for Research on Cancer.
- Teodoro, J. G., Evans, S. K. and Green, M. R. (2007). Inhibition of tumor angiogenesis by p53: a new role for the guardian of the genome. *Journal of Molecular Medicine*, 85(11), 1175–1186.
- Totzke, G., Brüning, T., Vetter, H., Schulze-Osthoff, K. and Ko, Y. (2001). P53 downregulation in myelodysplastic syndrome—a quantitative analysis by competitive RT-PCR. *Leukemia*, 15(10), 1663–4.
- Vardiman, J. W., Harris, N. L. and Brunning, R. D. (2002). The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood*, 100(7), 2292–2302.
- Visconte, V., Tiu, R. V. and Rogers, H. J. (2014). Pathogenesis of myelodysplastic syndromes: An overview of molecular and non-molecular aspects of the disease. *Blood Research*, 49(4), 216–227.
- Vogelstein, B. and Kinzler, K. W. (1994). X-rays strike p53 again. *Nature*, 370, 174–175.
- Wei, J., Zaika, E. and Zaika, A. (2012). P53 family: Role of Protein Isoforms in Human Cancer. *Journal of Nucleic Acids*, 2012.
- Wei, S., Chen, X., McGraw, K., Zhang, L., Komrokji, R., Caceres, G., Billingsley, D., Sokol, L., Lancet, J., Fortenbery, N. *et al.* (2013). Lenalidomide promotes p53 degradation by inhibiting MDM2 auto-ubiquitination in myelodysplastic syndrome with chromosome 5q deletion. *Oncogene*, 32(9), 1110–1120.
- Wu, J., Lu, L.-Y., Yu, X. The role of BRCA1 in DNA damage response. *Protein & Cell*. 2010;1(2):117-123.
- Xiao, Y., Wang, J., Song, H., Zou, P., Zhou, D., Liu, L. CD34+ cells from patients with myelodysplastic syndrome present different p21 dependent premature senescence. *Leuk Res*. 2013; 37(3):333-40.
- Xu, Y. (2003). Regulation of p53 responses by post-translational modifications. *Cell Death and Differentiation*, 10(4), 400–3.
- Zilfou, J. T. and Lowe, S. W. (2009). Tumor suppressive functions of p53. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 1(5), 1–12.
- Zulfin, S. and Niranjana, K. (2015). Tumour Biology: p53 Gene Mechanisms. *Journal of Clinical & Cellular Immunology*, 6(4), 1–6.

Příloha č. 1

Přehled kandidátních genů v patogenezi 5q-syndromu (*Převzato a upraveno z Boulwood et al., 2010*)

Gen	Lokalizace na chromozomu	Delece u 5q (5q13-q33)	Delece v oblasti CDR1	Delece v oblasti CDR2	Hematologický fenotyp u myši s knock-outem
<i>APC</i>	5q22	ANO	NE	NE	anémie, makrocytóza, MDS/myeloproliferativní fenotyp
<i>IRF1</i>	5q31.1	ANO	NE	NE	porušena myelopoéza
<i>EGR1</i>	5q31.2	ANO	ANO	NE	žádný hematologický fenotyp
<i>CTNNA1 (α-catenin)</i>	5q31.2	ANO	NE	NE	žádný knock-out
<i>DIAPH1</i>	5q31.3	ANO	NE	NE	myeloproliferativní defekt
<i>CSF1R</i>	5q32	ANO	NE	ANO	zvýšený počet primitivních progenitorových buněk
<i>miR-145</i>	5q32	ANO	NE	ANO	trombocytóza, neutropenie, dysplázie megakaryocytů
<i>miR-146a</i>	5q33.3	ANO	NE	NE	trombocytóza, neutropenie, dysplázie megakaryocytů
<i>miR-143, miR-145</i>	5q32	ANO	NE	ANO	strukturní modifikace aorty, bez hematologického fenotypu
<i>SPARC</i>	5q33	ANO	NE	ANO	trombocytopenie
<i>FAT2</i>	5q33	ANO	NE	ANO	žádný fenotyp
<i>RPS14</i>	5q33	ANO	NE	ANO	makrocytická anémie
<i>RBM22</i>	5q33	ANO	NE	ANO	makrocytická anémie
<i>NPM1</i>	5q35.1	NE	NE	NE	myelodysplázie, myeloidní malignity

Příloha č. 2

FAB klasifikace MDS

FAB klasifikace	% blastů v PK	% blastů v KD	% prstenčitých sideroblastů v KD	Počet monocytů v PK	Aurerovy tyčky v blastech
Refrakterní anémie (RA)	< 1	< 5	< 15	< 1.0 x 10 ⁹ /L	nepřítomny
Refrakterní anémie s prstenčitými sideroblasty (RARS)	< 1	< 5	≥ 15	< 1.0 x 10 ⁹ /L	nepřítomny
Refrakterní anémie s nadbytkem blastů (RAEB)	≤ 5	5 - 20	< 15/ ≥15	< 1.0 x 10 ⁹ /L	nepřítomny
Refrakterní anémie s nadbytkem blastů v transformaci (RAEB-T)	> 5	21 - 30	< 15/ ≥15	< 1.0 x 10 ⁹ /L	možná přítomnost
Chronická myelomonocytární leukémie (CMML)	< 5	≤ 20	< 15	≥ 1.0 x 10 ⁹ /L	nepřítomny

PK (periferní krev), KD (kostní dřevě)

WHO klasifikace z roku 2001 a 2008

WHO 2001	WHO 2008
Refrakterní anémie (RA)	Refrakterní cytopenie s dysplázií v jedné řadě (RCUD): Refrakterní anémie (RA) Refrakterní neutropenie (RN) Refrakterní trombocytopenie (RT)
Refrakterní anémie s prstenčitými sideroblasty (RARS)	Refrakterní anémie s prstenčitými sideroblasty (RARS)
Refrakterní cytopenie s multilineární dysplázií (RCMD)	Refrakterní cytopenie s multilineární dysplázií (RCMD)
Refrakterní cytopenie s multilineární dysplázií a prstenčitými sideroblasty (RCMD-RS)	
Refrakterní anémie s nadbytkem blastů-1 (RAEB-1)	Refrakterní anémie s nadbytkem blastů-1 (RAEB-1)
Refrakterní anémie s nadbytkem blastů-2 (RAEB-2)	Refrakterní anémie s nadbytkem blastů-2 (RAEB-2)
Myelodysplastický syndrom, neklasifikovaný (MDS-U)	Myelodysplastický syndrom, neklasifikovaný (MDS-U)
MDS asociovaný s izolovanou del(5q)	MDS asociovaný s izolovanou del(5q)

Prognostický systém založený na WHO klasifikaci

Kritérium/Hodnota	0	1	2	3
Kategorie WHO	RA, RARS, 5q-	RCMD, RCMD-RS	RAEB-1	RAEB-2
Karyotyp	dobrý	intermediární	nepříznivý	-
Závislost na transfúzi^o	ne	normální	-	-

Kategorie: 0 - velmi nízký

1 - nízký

2 - intermediální

3 až 4 - vysoký

5 až 6 - velmi vysoké

Karyotyp: příznivý - normální, -Y, del(5q), del(20q)

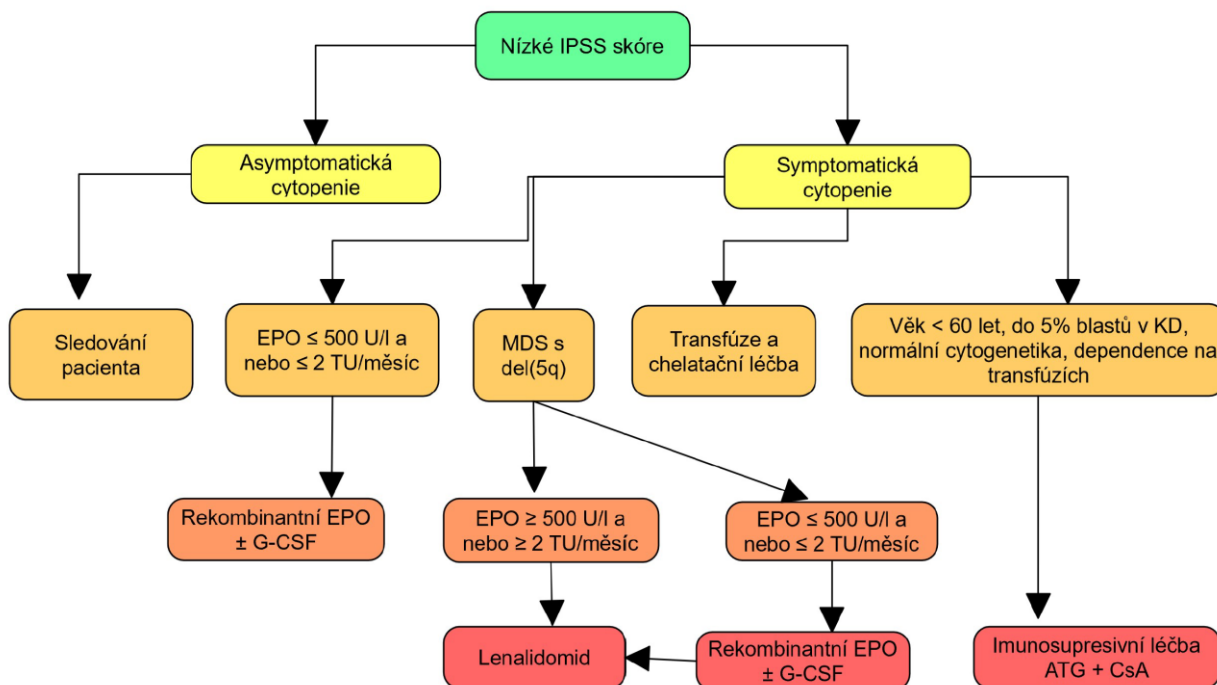
špatný - komplex více jak 3 abnormalit, anomálie na chromozomu 7

intermediální - další abnormality

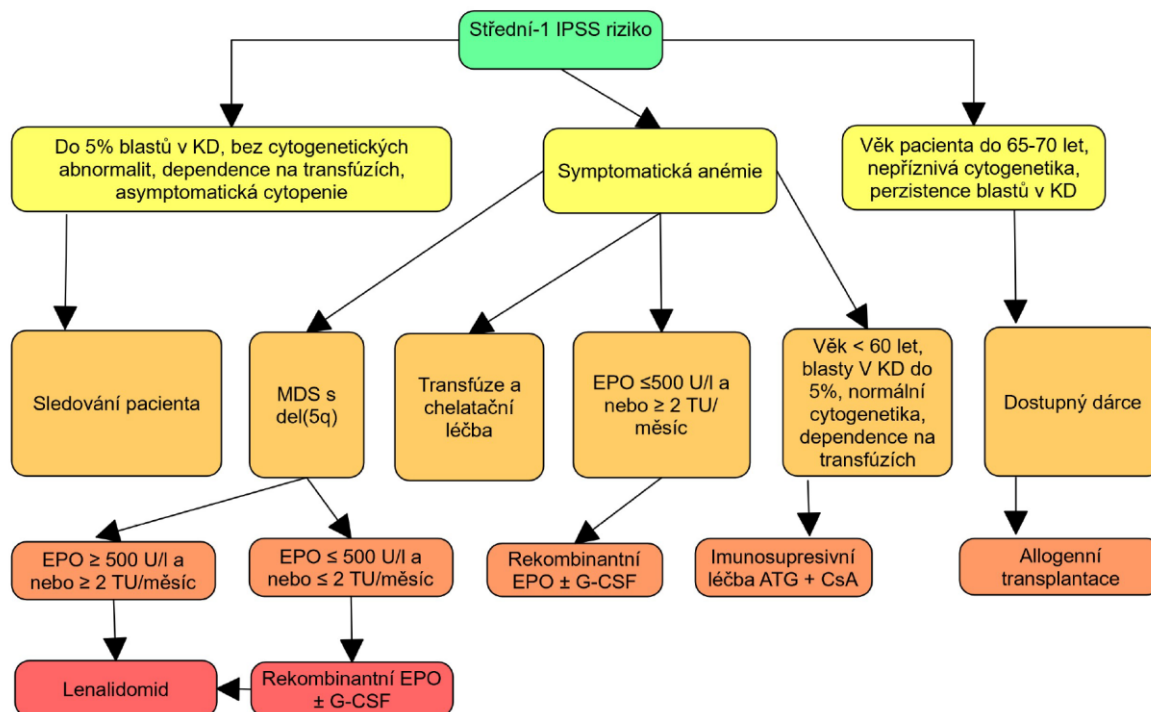
^o Závislost na transfúzi je definována jako potřeba minimálně jedné transfúze každých 8 týdnů po dobu 8 měsíců.

Příloha č. 3

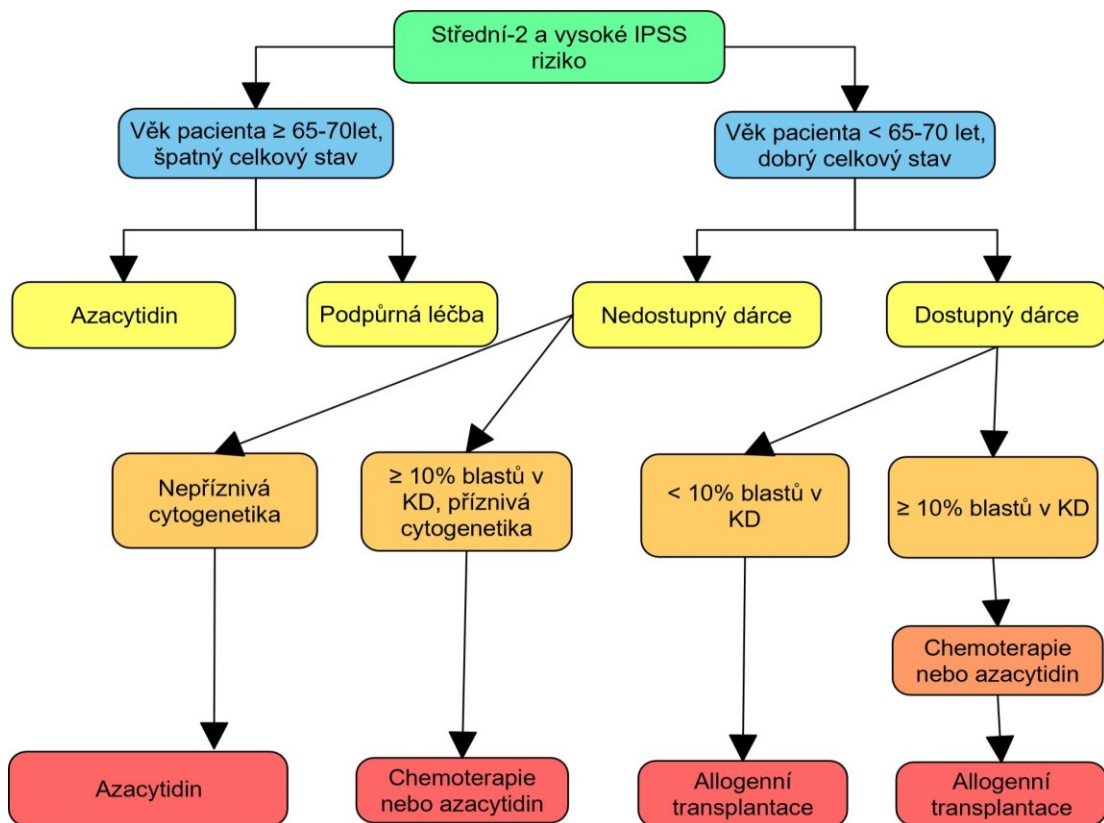
Léčebný postup pro pacienty s primárním MDS: nízké IPSS skóre



Léčebný postup pro pacienty s primárním MDS: střední-1 IPSS skóre



Léčebný postup pro pacienty s primárním MDS: střední-2 a vysoké IPSS skóre



(Převzato a upraveno z Malcovati et al., 2013)