

Univerzita Karlova

1. lékařská fakulta

Autoreferát disertační práce



UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta

Studium regulačních vlastností onkogenních mikroRNA za normálních a patologicky změněných podmínek s cílem využít znalosti k odhalení nových tumorů.

Study of the regulatory properties of oncogenic microRNAs under normal and pathologically altered conditions in order to detect new tumors.

MUDr. Nina Dusílková

Praha 2021

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

Obor: Fyziologie a patofyziologie člověka

Předseda oborové rady: prof. MUDr. Otomar Kittnar, CSc.

Školící pracoviště: Ústav patologické fyziologie a BIOCEV 1.LF UK

Školitel: prof. MUDr. Tomáš Stopka, PhD.

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

Obsah

1. Úvod.....	6
2. Hypotéza a cíle práce	9
3. Pacienti a metody	9
4. Výsledky	11
5. Diskuse.....	22
6. Závěr	25
7. Použitá literatura	27

Abstrakt:

Onkogenní mikroRNA (miRNA) jsou malé molekuly RNA, které inhibují posttranslační regulační mechanismy na epigenetické úrovni. miRNA jsou často deregulovány u malignit a díky své stabilitě jsou detekovatelné v nebuněčných frakcích periferní krve. V naší laboratoři jsme provedli několik studií, které zkoumaly a využívaly miRNA jako biomarkery pro různé hematologické malignity (např. chronická lymfocytární leukémie, Hodgkinův lymfom) a solidní nádory (např. karcinom prsu). Cílem těchto studií bylo zjistit souvislost miRNA s patofyziologickými a klinickými aspekty jednotlivých onemocnění. Zde jsme potvrdili význam konkrétních miRNA nebo jejich komplexů při sledování onemocnění. Kombinací klinických, molekulárně biologických a statistických analýz se nám podařilo najít soubory miRNA, které nad očekávání plnily nejen diagnostickou, ale i prognostickou roli.

Tato práce se zaměřuje na výzkum mikroRNA v diagnostice hematologické malignity - primárního kožního T-buněčného lymfomu (CTCL). V tomto onemocnění byla prokázána nádorová specifita některých miRNA. Jejich aberantní exprese ve vzorcích tkání pacientů s CTCL získaných z kožních biopsií správně odlišila maligní onemocnění od kontrolních vzorků nezhoubných kožních lézí. Zde jsme si položili otázku, zda by tyto miRNA mohly být použity jako plazmatické biomarkery pro klinické sledování CTCL. Z opakovaných vzorků periferní krve pacientů s CTCL a kontrolních vzorků s benigním kožním onemocněním jsme detekovali miRNA pomocí specificky aktivované RT-PCR. Výsledkem bylo stanovení modelu založeného na upregulaci miR-155 a downregulaci miR-203 a miR-205 se 100% specificitou a 94% senzitivitou ze vzorků plazmy pacientů s CTCL. Model 3 miRNA v po sobě jdoucích vzorcích byl v souladu s klinickým stavem pacientů, s léčebnou odpovědí a se změnou velikosti nádoru. Kvantifikace vybraných mikroRNA v plazmě představuje specifickou metodu hodnocení CTCL, která je cenným nástrojem pro diagnostiku CTCL a sledování odpovědi na léčbu.

Klíčová slova: mikroRNA; mycosis fungoides; Sézarého syndrom; kožní T-buněčné lymfomy (CTCL); atopická dermatitida.

Abstract:

Oncogenic microRNAs (miRNAs) are small RNA molecules that inhibit post-translational regulatory mechanisms at the epigenetic level. miRNAs are often deregulated in malignancies and due to their stability are detectable in non-cellular fractions of peripheral blood. In our laboratory, we have performed several studies that have investigated and utilized miRNAs as biomarkers for various hematological tumors (e.g., chronic lymphocytic leukemia, Hodgkin`s lymphoma) and solid tumors (e.g., breast cancer). The aim of these studies was to find the association of miRNAs with pathophysiological and clinical aspects of each disease. Here, we confirmed the importance of particular miRNA or its complex during disease monitoring. Combining clinical, molecular biological and statistical analyses, we were able to find miRNA sets that fulfilled not only a diagnostic role but also a prognostic role beyond expectations.

The main focus of this thesis is on the investigation of microRNAs in the diagnosis of a hematological malignancy - primary cutaneous T-cell lymphoma (CTCL). Tumor specificity of some miRNAs has been demonstrated. Their aberrant expression in tissue samples of CTCL patients obtained from skin biopsies, correctly distinguished malignant disease from control samples of benign skin lesions. Here, we asked whether these miRNAs could be used as plasma biomarkers for clinical monitoring of CTCL. From repeated peripheral blood samples from CTCL patients and controls with benign skin disease, we detected miRNAs using specifically activated RT-PCR. As a result, was established a model based on upregulation of miR-155 and downregulation of miR-203 and miR-205 with 100% specificity and 94% sensitivity from plasma samples of CTCL patients. The model of 3 miRNAs in consecutive samples was consistent with the clinical status of patients, with therapeutic response, and with change in tumor size. Quantification of selected microRNAs in plasma is a specific method to evaluate CTCL, which is a valuable tool for diagnosing CTCL and monitoring response to therapy.

Keywords: microRNA; mycosis fungoides; Sézary syndrome; cutaneous T-cell lymphomas (CTCL); atopic dermatitis.

1. Úvod

Hematologické malignity jsou jednou z nejčastějších skupin rakoviny, tvoří 6,5% ze všech druhů malignit na celém světě, z toho přibližně 9,0% ve Spojených státech a Evropě (Tietsche de Moraes Hungria, Chiattonne et al. 2019). Jsou to klonální choroby původem z hematopoetických buněk buď zcela nezralých, nebo na určitém stupni vývoje. Biologie a chování různých typů hematologických nádorů je velmi heterogenní. V závislosti na lokalizaci nádoru, buněčném prostředí a souboru genetických mutací, může být stupeň zdravotního rizika pro pacienta rozdílný, sahající od léčitelných malignit nízkého rizika až do vysoce agresivních forem. I přes obecnou heterogenitu maligních onemocnění vykazují nádorové buňky určité společné rysy, které jsou shrnuty do aktuálně akceptovaného modelu tzv. „Hallmarks of cancer“. Model obsahuje základní znaky a vlastnosti podporující vznik a přežití nádorové buňky či tkáně, jako jsou schopnost neomezené replikace, únik před faktory potlačující růst, odolnost vůči buněčné smrti, indukce angiogeneze, aktivace invazivity a schopnost tvořit metastáze (Hanahan and Weinberg 2011). Základem těchto charakteristických vlastností je nestabilita genomu, která vytváří genetickou rozmanitost maligních buněk a schopnost mikroprostředí nádoru podporovat onkogenezi spolu se zánětem. Genomické a epigenetické změny jsou v současné době identifikovatelné dostupnými, ale zatím ne vždy rutinními vyšetřovacími metodami. U nádorových onemocnění, u kterých často není objasněná patofyziologie maligního procesu, navíc chybí prognostické markery, které by zhodnotily a předpověděly jak možný scénář dalšího vývoje onemocnění, tak i odpověď na určitou terapii nebo možnou rezistenci. Identifikace markerů, které by umožnily efektivně stanovit diagnózu, rizikové skóre, predikovat prognózu a přispět k vývoji nových diagnostických a terapeutických nástrojů, je předmětem zvýšeného zájmu základního biomedicínského výzkumu.

V lidském a v jiných organizmech byla objevena početná skupina buněčných modulátorů zvaných mikroRNA (miRNA), které významně zasahují do biologických procesů cestou regulace genové exprese. miRNA působí tak, že se váží na principu komplementarity k homologním úsekům messenger RNA (mRNA). Výsledkem je narušená stabilita exprese mRNA, která vede hlavně k inhibici translace nebo k degradaci mRNA. Tím dochází k patologické regulaci genové exprese, což může vést k různým patologickým dysfunkcím včetně maligních zvrátů (Mitchell, Parkin et al. 2008).

Obečně miRNA hrají důležitou roli v patogenezi maligní transformace tím, že působí jako činitel nadprodukovaný a synergický s nádorovou transformací, miRNA s touto funkcí jsou označovány jako onkogenní či onko-miR. Nedostatečně produkované miRNA a současně potlačující růst nádoru jsou označovány jako tumor-supresor. Množství a spektrum miRNA se liší podle typu tkáně a patofyziologického stavu organismu. Celogenomové profilování ukázalo, že specifický soubor exprimovaných miRNA (miRnom) umožňuje s vysokou přesností odlišit různé typy rakoviny a identifikovat původ tkáně dokonce i u ne-diferencovaných nádorů, které jsou jinak obtížně diagnostikovatelné např. při metastazování (Iorio and Croce 2017). To svědčí o tom, že nádorová tkáň zachovává jedinečný expresní profil tkáňově specifických miRNA (Rosenfeld, Aharonov et al. 2008). Dále se ukázalo, že miRNA mohou být transportovány z chorobou postižené tkáně do krevního oběhu. Měření hladin cirkulujících miRNA v krvi může být úspěšně aplikováno v diagnostice zejména v případech, kdy je žádoucí použití šetrných méně invazivních metod.

miRNA-155 je nejvíce studovanou mikroRNA, a proto je jednou z mála, u které byl relativně dostatečně popsán mechanismus regulace. Ve studii (Vargova, Curik et al. 2011) autoři prokázali, že exprese miRNA-155 je spojená s proteinem MYB, který se váže do promotorové oblasti genu *MIR155HG* (kóduje maturovanou miR-155, zvaný také *BIC* - B-Cell Receptor Inducible) a tím ho transkripčně aktivuje. Navíc ve studii, byly popsány další zajímavé cíle pro gen *MYB*: *BCL2*, *CD5*; a pro gen *MIR155HG* jsou: *PU.1*, *SHIP1*, *SATB1*, *CHD6*.

Ve studii (Huskova, Korecka, 2015) jsme zjišťovali regulační vliv miR-155 a jeho cílového produktu *PU.1* v šesti nejčastějších maligních lymfoproliferacích: difuzní velkobuněčný B-buněčný lymfom (DLBCL), chronická lymfocytární leukemie (B-CLL), Hodgkinův lymfom (HL), folikulární lymfom (FL), MZL (lymfom marginální zóny) a MCL (lymfom pláštěvých buněk). S využitím dat genové exprese testovali jsme asociaci mezi hladinami miR-155 a *PU.1* a klinickými rysy souvisejícími s přežíváním a prognózou jednotlivých typů onemocnění. Zde se podařilo potvrdit, že aberantní exprese miR-155 a *PU.1* jsou spojeny s klinickým chováním zkoumaných malignit. Byly podpořeny úvahy o onkogenně miR-155 tím, že v našem souboru dat pacienti HL s vyšší expresí miR-155 měli signifikantní horší odpověď na terapii a kratší celkové přežití.

Ve studii (Vargova, Pešta et al. 2017) byl zkoumán vzájemný mechanismus působení miRNA-155 a miRNA-150 v průběhu onemocnění CLL. Na základě stanovení genové expresi a regresní statistické analýzy, bylo ukázáno spojení klasických klinických

markerů pro CLL a rizika progresi onemocnění právě s aberantní expresí miR-155. Tyto výsledky potvrzují již dříve diskutovanou hypotézu, že miR-155 podporuje progresi maligních onemocnění a vyšší hladiny exprese miR-155 se asociují s nižším OS.

Ve studii (Sochor, Bašová et al. 2014) se podařilo definovat soubor onkogenních miRNA, které hrají významnou roli v malignizačním procesu karcinomu prsu, pomocí kterého jsme hodnotili statistický význam jejich exprese během léčby pacientek ve vztahu rizikovým parametrům. Naše práce ukázala, že exprese sérových onkomiRů se asociuje s diagnostickými kritérii karcinomu prsu, zejména u vysoce rizikových pacientů, a může být potenciálně užitečná pro sledování onemocnění. Velkým přínosem studii bylo stanovení časových bodů odběrů vzorků každého pacienta ve spojení s průběhem onemocnění a jeho léčbou. Zde se podařilo ukázat dynamiku exprese vybraných miRNA v průběhu hodnocení a navázání expresních profilů na změny spojené s léčebnou strategií.

Zde prezentovaný výzkum se opírá o předchozí výzkumné studie a věnuje se vývoji a potvrzení metody, která by umožnila diagnostikovat s poměrně vysokou mírou jistoty maligní hematologické onemocnění kožní T-buněčný lymfom (CTCL) a dále rozlišit jednotlivé typy a stádia tohoto onemocnění (Dusilkova, Basova et al. 2017). Kožní T-buněčný lymfom představuje heterogenní skupinu potenciálně devastujících kožních malignit, patogeneze, kterých stále není úplně objasněna. V raných stádiích je klinická i histopatologická diagnóza často obtížná kvůli schopnosti CTCL se „maskovat“ za benigní kožní zánětlivé dermatózy. Vzhledem k nedostatku spolehlivých biomarkerů je také obtížné předvídat průběh choroby, odpověď na terapii nebo stupeň progresu. Potenciál využití miRNA v roli diagnostických a prognostických biomarkerů se jeví jako velice slibný. Metoda spočívá ve stanovení molekul specifických miRNA v krevním séru pacienta v průběhu onemocnění. Práce ukazuje, že plazmatické hladiny specifických miRNA jsou spojeny s patognomickými rysy studovaného maligního onemocnění a detekce specifických miRNA může přidávat informace nad rámec aktuálně používaných skórovacích systémů.

2. Hypotéza a cíle práce

Budeme ověřovat hypotézu, že v **periferní krvi pacientů s CTCL cirkulují specifické miRNA, jejich aberantní exprese v porovnání s kontrolními vzorky, odliší maligní kožní T-lymfom od benigních kožních diagnóz.**

Předpokládáme, že na rozdíl od dosavadních proběhlých studií, které využívaly vzorky kožních biopsií, cirkulující miRNA v periferní krvi pacientů CTCL mají stejnou eventuálně významnější diagnostickou a prognostickou hodnotu.

Konkrétní cíle navazující na hypotézu

1. Identifikace miRNA účastnicích se lymfo-kancerogenezi v oblasti kůže.
2. Stanovení hladin exprese vybraných miRNA ve vzorcích periferní krve pacientů s CTCL, benigními dermatózami a kontrolních vzorků od zdravých dárců.
3. Studium vzájemné interakce klinických znaků CTCL a hladin exprese vybraných miRNA v závislosti na stadiu onemocnění.
4. Statistické ověření modelu exprese miRNA ve vzorcích CTCL.

3. Pacienti a metody

V předkládaném projektu byly využity vzorky periferní krve (N=47) od kohorty pacientů s CTCL, konkrétně s mycosis fungoides (MF) a Sézarého syndromem (SS) a od pacientů s benigním onemocněním kůže (psoriáza, atopická dermatitida) a zdravých dobrovolníků, ve spolupráci s 1. interní klinikou – hematologie a Dermatovenerologickou klinikou Všeobecné fakultní nemocnice (VFN) během období 2012 – 2016. Vzorky byly zpracovány a skladovány formou kryoprezervace na Ústavu patologické fyziologie 1. LF UK. Vzorky od každého pacienta MF/SS byly odebrány 3-krát v průběhu sledování a léčby, s průměrným intervalem mezi vzorky 5 měsíců (od 2 do 14 měsíců).

Z každého vzorku plasmy pacientů a kontrol byla izolována RNA za použití miRNeasy® Mini Kit (Qiagen, Hilden, Německo). Reverzní transkripce byla prováděna pomocí vysokokapacitní cDNA reverzní transkripční soupravy doplněné o miR-specifické primery (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Amplifikace byla provedena softwarem LightCycler verze 1.5.0.SP3 480 real-time PCR systém (Roche, Basel,

Švýcarsko) na 384 jamkových destičkách. Kvantitativní polymerázová řetězová reakce probíhala 45 cyklů při 95°C po dobu 15 s a 60°C po dobu 1 minuty. Relativní exprese byla vypočítána z hodnot Cp miRNA ve srovnání s kontrolními miR-103 a miR-423-5p, které jsou stabilně exprimovány a proto byly použity jako normalizační faktor. Výsledky byly porovnány s expresí stejných miRNA ze vzorků plazmy zdravých dárců.

Studie genové exprese: Onkogenní mikroRNA-155 a PU.1 v nejčastějších lymfoidních malignitách (Huskova, Korecka et al. 2015)

Ve studii byla měřena exprese miR-155 a PU.1 v lymfatických uzlinách a v některých extranodálních tkáních infiltrovaných maligním lymfomem. Zde byly využity lyzáty získané biopsií lymfatických uzlin od 131 pacientů, lyzáty tkáni normálních lymfatických uzlin (biopsií nenádorově zvětšených/reaktivních lymfatických uzlin od 6 dárců) a mononukleární buňky CD19⁺ periferní krve 22 zdravých dárců. Exprese PU.1 se porovnávaly s hodnotami referenčního genu GAPDH; miR-155 s referenčním genem RNU44. Hodnoty exprese byly vypočítány algoritmem $\Delta\Delta CT$.

Model regulace progresu chronické lymfocytární leukemii pomocí miR-155/miR-150 (Vargova, Pesta et al. 2017)

V klinickém hodnocení jsme hodnotili vzájemný vztah onkogenního miR-155 a tumorsupresora miR-150 s klinickými a rutinními laboratorními parametry v CD19⁺ buňkách periferní krve kohorty 127 pacientů CLL pomocí multivariátní analýzy a zjistili jeho souvislost s celkovým přežíváním a progresí.

Onkogenní mikroRNA: miR-155, miR-19a, miR-181b a miR-24 umožňují sledování časného karcinomu prsu v séru (Sochor, Basova et al. 2014)

Ve studii byla využita séra 63 pacientek s časným karcinomem prsu (EBC, early breast cancer), která byla odebrána v letech 2010–2013 a to v určitých časových bodech sledování. EBC byl definován jako nádor, který se nerozšířil mimo prsní tkáň nebo do axilární lymfatické uzliny (to zahrnuje duktální karcinom in situ a invazivní BC fáze I, IIA, IIB a IIIA). Pro jednotlivé odběry každého pacienta byly definovány časové body:

- jeden den před chirurgickou operací pro BC (časový bod I),
- 14–28 dní po operaci před jakoukoli nechirurgickou léčbou BC (časový bod II),
- 14–28 dnů po první linii léčby: chemoterapie nebo radioterapie (časový bod III),
- po relapsu onemocnění, který byl pozorován u 3 pacientek ve studii (časový bod IV).

Relativní exprese miRNA byla vypočtena z CT onkomiRů (miR-155, miR-19a, miR-181b, miR-24) ve vztahu k expresi referenční miRNA let-7a. v

4. Výsledky

Ze všech dostupných studií o využití miRNA v CTCL jsme vybrali výzkum dánské skupiny (Ralfkiaer, Hagedorn et al. 2011), kde autoři na velkém souboru vzorků kožních biopsií od pacientů s MF, SS a benigních dermatóz zkoumali aberantní expresi celkem 668 miRNA. Ve výsledku studii byl vypracován klasifikátor miRNA, který s velkou jistotou odlišil maligní kožní onemocnění od benigní dermatózy. V naší studii jsme použili tento model miRNA (tj. miRNA-155, miRNA-203, miRNA-205), který navíc byl rozšířen o doplňující miRNA, nápomocné v diferenciální diagnostice a predikci rizika. Ze všech nabízených v rešeršní práci miRNA jsme se rozhodli o přidání miRNA-223 a miRNA-22, které se zdají být klíčovými faktory v patogenezi CTCL:

miR-155 je důležitý pro podporu proliferace a progresu nádoru. Bylo prokázáno, že miR-155 je významně upregulován v T-buňkách v pozdějších stádiích CTCL ve srovnání s lymfocyty v raných stádiích onemocnění (Moyal, Barzilai et al. 2013). Funkčně miR-155 reguluje více signálních drah potenciálních pro maligní transformaci, např. cílí na organizaci chromatinu a na transkripční faktor SATB1 (speciální AT-vážíci protein 1), jehož inhibice podporuje proliferaci maligních T-buněk, indukuje expresi cytokinů IL-5 a IL-9, které se podílejí na patogenezi CTCL jako růstové a zánětlivé faktory (Fredholm, Willerslev-Olsen et al. 2018). V maligních T-buňkách je zvýšená aberantní aktivace STAT5, která zvyšuje expresi genu *BIC/MIR155HC* pro miRNA-155, což výsledně usnadňuje proliferaci v maligních T-buňkách (Kopp, Ralfkiaer et al. 2013). MiR-155 je epigeneticky aktivován prostřednictvím onkogenu MYB, který se váže a aktivuje strukturu chromatinu v blízkosti hostitelského genu pro miR-155 (Vargova, Curik et al. 2017). Výsledkem je, že upregulace miR-155 blokuje normální imunitní funkci při lymfoidních malignitách zaměřením na důležité transkripční a signální faktory, jako jsou PU.1 nebo SHIP1-PIP3-AKT (Huskova, Korecka et al. 2015).

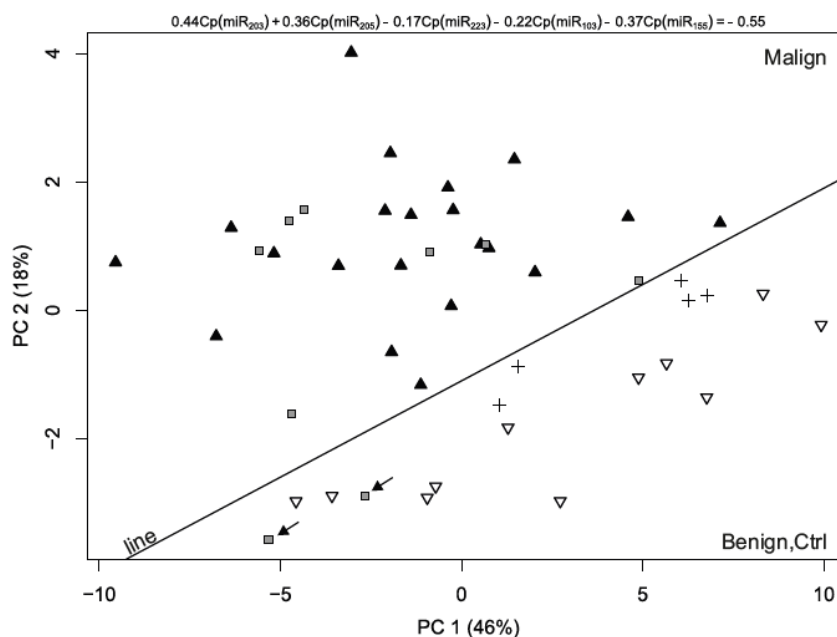
miRNA-205 je regulována transkripčními faktory Tp53 a izoformou p63, a podílí se na kontrole procesu epiteliálně-mezenchymálního přechodu (EMT), při kterém epiteliální buňky ztrácejí svoji polaritu a adhezi, a získávají migrační a invazivní vlastnosti (Tran,

Choi et al. 2013). Snížení exprese miRNA-205 v CTCL tkáních je možnou známkou aktivity maligního procesu, zvýšení jeho invazivity a tedy celkové progrese onemocnění. Cílem miRNA-203 je supresor cytokinové signalizace 3 (SOCS-3), který se účastní zánětlivých odpovědí a funkcí keratinocytů. Tato miRNA je často aberantně exprimována jak u benigních zánětlivých dermatóz, tak i maligních změn na kůži (Sonkoly, Wei et al. 2007), (Ralfkiaer, Hagedorn et al. 2011). Exprese této tkáňově specifické miRNA je v CTCL snižená a je možným markerem poruchy normální funkce epidermálních buněk s podporou zánětlivých a maligních kožních změn.

Kromě toho v CTCL mohou hrát roli další miRNA, včetně miRNA-22 a miRNA-223, jejich inhibice umožňuje vysokou expresi kritických transkripčních faktorů včetně GATA3 a protoonkogenů, jako je E2F1 (E2F Transcription Factor 1) a MYC, společně přispívajících k patogenezi a progrese CTCL (McGirt, Adams et al. 2014). Exprese miRNA-22 u CTCL snížena přes STAT signální dráhu, její úloha v patogenezi onemocnění tkví v absenci potlačovací aktivity na *MYC* (Sibbesen, Kopp et al. 2015).

Jako první krok sledování jsme pomocí qPCR určili expresní hladiny miRNA-155, miRNA-203, miRNA-205, miRNA-223 a miRNA-22 (společně s referenčními miRNA-103, miRNA-423-5p) ve vzorcích plazmy pacientů s CTCL, pacientů s benigními kožními lézemi (BKL) a zdravých kontrol. Výsledná data expresních hladin jsme hodnotili pomocí analýzy hlavních komponent (PCA principal component analysis). Hlavní komponenty jsou vzájemně ortogonální vektory, které popisují maximální variaci v datové sadě týkající se exprese miRNA. Pozorovali jsme, že vzorky CTCL se oddělily od BKL a zdravých kontrol. (Obr. 1.) Analýza PCA ukázala, že BKL jsou ve srovnání se zdravými kontrolami vzdálenější od CTCL, což lze připsat skutečnosti, že BKL vykazovaly výrazně sníženou expresi miR-155. Kromě toho dva vzorky SS označené šipkami byly velmi blízko ke skupině BKL. Při detailní kontrole dat bylo zjištěno, že tyto dva vzorky od pacienta s SS byly odebrány v době kompletní remise, kdy laboratorní a klinické příznaky onemocnění nejvíce odpovídaly BKL.

Obrázek 1. PCA analýza expresního profilu miRNA u pacientů s maligním onemocněním kůže, benigními dermatózami a zdravých kontrol.



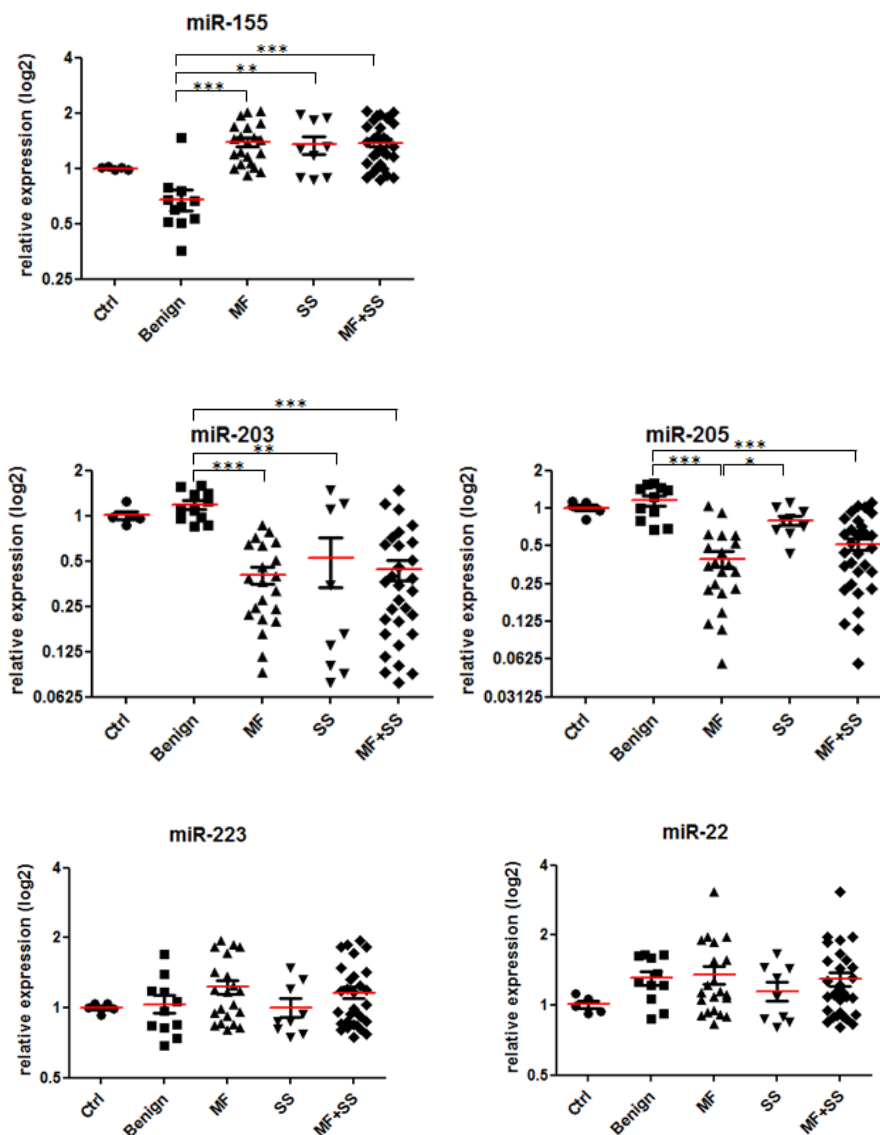
Analýza hlavních komponent (PCA) pomocí údajů o expresi diagnostických miR-155, miR-203, miR-205, miR-22, miR-223 a referenčních miR-103, miR423-5p u skupiny pacientů s maligním onemocněním kůže (Malign) a skupiny pacientů s benigními dermatózami a zdravých kontrol (Benign, Ctrl). Vzorec pro linii oddělující maligní vzorky od benigních je ukázán v horní části obrázku. Vzorky MF jsou označeny jako tmavý trojúhelník, vzorky SS jsou označeny jako šedý obdélník, vzorky BKL jsou označeny jako prázdný trojúhelník, kontrolní vzorky jsou označeny křížkem. Šipky označují dva vzorky pacienta SS3 v kompletní remisi.

Pomocí expresních profilů vybraných 5-miRNA bylo 11 z 11 vzorků od pacientů s BKL klasifikováno jako benigní, zatímco 34 z 36 vzorků od pacientů v různých stadiích onemocnění CTCL bylo klasifikováno jako maligní. Specifita detekce CTCL vs. BKL pomocí miRNA v plazmě byla 100% (interval spolehlivosti 71–100%, $p = 0,001$ s použitím přesného binomického testu) a senzitivita byla 94% (interval spolehlivosti 81–99%, $p = 1,941 \times 10^{-8}$).

Pro další pochopení toho, které miRNA jsou více signifikantní pro diferenciální diagnostiku pacientů s CTCL, jsme hodnotili expresi každé miRNA samostatně. Data ukázaly, že průměrné hladiny miRNA-155 byly významně upregulovány jak u pacientů s MF, tak i u SS ve srovnání s BKL a kontrolními vzorky. Odpovídajícím způsobem byly průměrné hladiny miRNA-203 a miRNA-205 významně sníženy. (Obrázek 2).

V případě hladiny miR-223 nebyl zjištěn signifikantní rozdíl mezi pacienty MF/SS a benigními kožními onemocněními nebo zdravými dobrovolníky. U miRNA-22, která by mohla hrát klíčovou roli v maligní transformaci kožních T-buněčných lymfomů, a její účast ve změnách expresi celého modelu se očekávala, tak se zde také neukázaly signifikantní rozdíly mezi hladinami u vzorků benigních a maligních onemocnění.

Obrázek 2. Exprese mikroRNA (miR-155, miR-203, miR-205, miR-223 a miR-22) v plasmě pacientů MF/ SS a pacientů s benigním kožním onemocněním a zdravých dobrovolníků.



Expresní hladiny miR-155, miR-203, miR-205, miR-223, miR-22 ve vzorcích plazmy pacientů s BKL (Benign n=11), MF (n=21), SS (n=9), Ctrl (n=6) v log₂ měřítku. Průměr p -hodnot± standartní odchylka (Kruskal-Wallis, * $p = 0,05$, ** $p = 0,01$, *** $p = 0,001$).

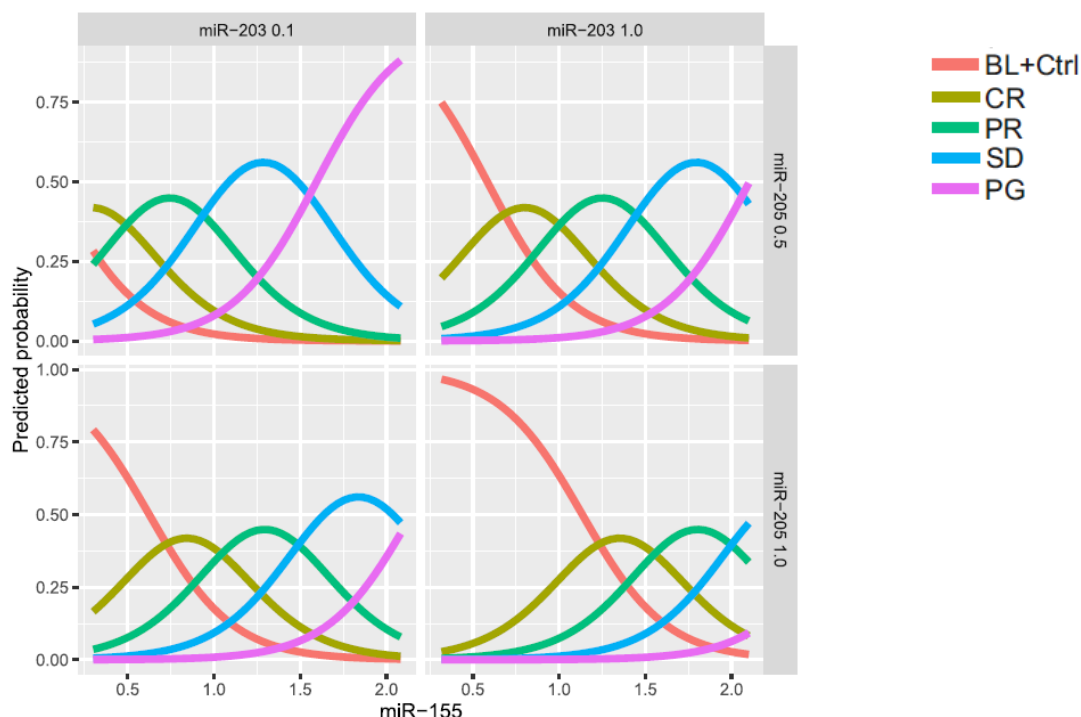
V uvedených výsledcích se potvrdila klíčová role onkogenní miRNA-155 v diagnostice CTCL. Její vzájemné hodnocení s tumorsupresorovými miRNA-203 a miRNA-205 v plazmě pacientů dovolilo odlišit maligní diagnózy od benigních. Tyto výsledky přinesly očekávané závěry, že stanovení hladin exprese výše uvedených miRNA z plazmy pacientů CTCL je přesným nástrojem pro diagnostiku MF a SS.

V dalších krocích hodnocení jsme zkoumali úroveň exprese jednotlivých miRNA ve vztahu ke klinickému stadiu CTCL a terapeutické odpovědi. Trendy zvyšování exprese miR-155 a vzájemné snižování exprese miR-203 a miR-205 byly pozorovatelné ve vyšších stádiích onemocnění. To bylo zvláště patrné mezi stadiem nízkého rizika IA (papuly a plaky) a vyššího rizika IIB (tumor >1cm a postižení lymfatických uzlin, periferní krve). V porovnání s benigními kožními lézemi byly zjištěny silné signifikantní rozdíly v expresi miR-155, -203 a -205 vzorků MF a SS bez terapeutické odpovědi (tj. ve stavu progresi onemocnění PD). U vzorků s terapeutickou odpovědí (parciální nebo kompletní remise PR/CR) hodnoty exprese těchto miRNA se blížily k hodnotám benigních vzorků nebo zdravých kontrol. Hladiny miR-223 a miR-22 nebyly ve srovnání s kontrolami a BL výrazně změněny a distribuce jejich dat byla o něco heterogennější.

Expresní hladiny vybraných miRNA oddělily pacienty s CTCL od skupiny kontrolních vzorků a BKL a ukázalo se, že pacienti se zvýšenou nádorovou zátěží (tj. ve vyšších rizikových klinických stádiích a/nebo při progresi onemocnění) mají vyšší hladiny miR-155 a nižší hladiny miR-203 a miR-205. Při příznivé odpovědi na terapii mají hladiny miR-155, miR-203 a miR-205 tendenci se normalizovat, což se stalo předmětem našich dalších analýz.

Pomocí multivariační ordinální logistické regresní analýzy jsme vyhodnotili hladiny miRNA v plazmě CTCL ve vztahu k přínosu léčby (Obr. 3), náležitost ke klinickému stadiu, velikosti nádoru dle TNMB klasifikace a diferenciální diagnostice mezi zdravými kontrolami, benigními lézemi BL a CTCL. Výsledky ukázaly, že miR-155 a miR-203 významně ovlivňují příslušnost ke každému ze všech čtyř hodnocení, zatímco miR-205 je signifikantně asociovaná pouze s hodnocením terapeutické odpovědi. Ostatní miRNA (miR-223, miR-22) nebo jiné rutinně stanovené parametry v plazmě (LDH, p2-mikroglobulin) neměly vliv na příslušnost k žádnému z hodnocení.

Obrázek 3. Předpoklad pravděpodobnosti určité terapeutické odpovědi na základě úrovně exprese vybraných miRNA



Model multivariační ordinální logistické regresní analýzy vyjadřuje pravděpodobnost, že pacient/vzorek bude mít konkrétní terapeutickou odpověď (CR, PR, SD, PG) nebo patřit k BL a zdravé kontrole. Na ose X jsou znázorněny zvyšující se logaritmované (\log_2) hladiny relativní exprese miR-155. Na ose Y (vlevo) je označena úroveň pravděpodobnosti (od 0 do 1,0). Každý graf je označen určitou expresní hodnotou pro miR-203 (0,1 vs. 1,0) a miR-205 (0,5 vs. 1,0). Při vysokých hladinách miR-203 (1,0) a miR-205 (1,0) – graf dole vpravo, je největší pravděpodobnost, že vzorek bude patřit ke kohortě BL+Contr, za podmínky že hladina miR-155 bude od 0 do 1,0. Další zvýšení hladiny miR-155 od 1,0 přes 1,5 do 2,0 predikuje pravděpodobnost, že vzorek bude náležet k CTCL kohortě se snižující se odpovědí na terapii: od CR, přes PR, SD k PD.

Regresní analýza ukázala vedoucí role miR-155 a její patofyziologický význam jako onkogenního činitele. Zvýšená exprese miR-155 v sadě patientských vzorků vždy asociovala s maligní diagnózou, horším klinickým stadiem, horší prognózou v odpovědi na léčbu a větší nádorovou zátěží. Zde se také potvrdila role jak miR-203, tak miR-205 jako tumorsupresorových miRNA. miR-203 je tkáň-specifická a snížení exprese této miRNA je známkou zhoršujícího klinického stavu pacientů s kožním onemocněním. Patofyziologický mechanismus miR-205 je spojen s procesem kontroly EMT, kde snížení exprese miR-205 spojeno s aktivací procesu invazivity a tím i progresi CTCL. Proto

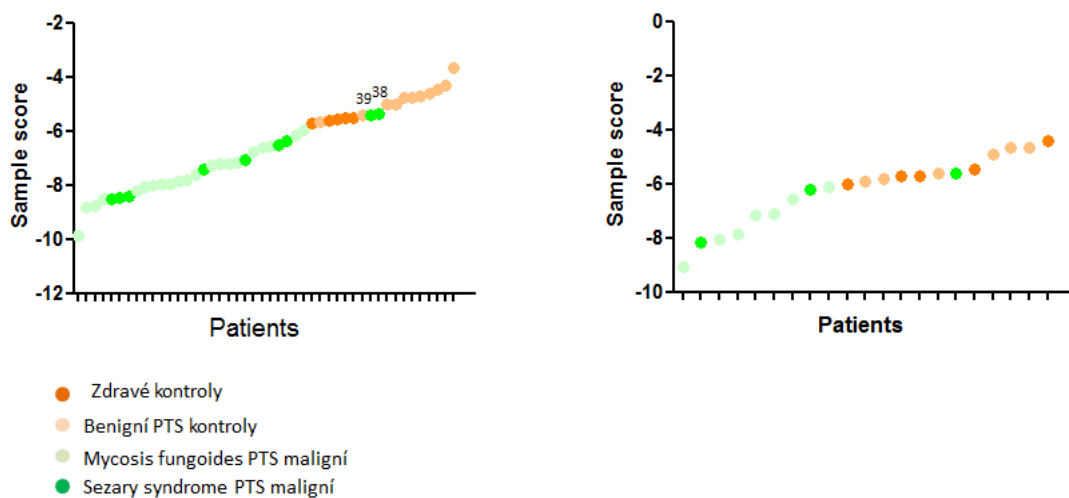
v regresní analýze hladiny exprese miR-205 byly signifikantní jen v případě hodnocení progresi a odpovědi na léčbu.

Z předchozích analýz vyplynulo, že významnou roli v diagnostice a prognostice onemocnění CTCL z vybraných miRNA hrají jen miR-155, miR-203 a miR-205. Proto jsme využili vzorec na výpočet „Sample skóre“ od autorů Ralfkiaer a kol., kteří se ve svém článku z roku 2011 zabývali stejnou otázkou, ale na vzorcích tkáně od pacientů MF a SS získaných průbojníkovou biopsií, který s 95% specifitou odlišil benigní od maligních onemocnění (Ralfkiaer, Hagedorn et al. 2011)

$$S = Cp_{mir155} - Cp_{\frac{mir203}{2}} - Cp_{\frac{mir205}{2}}$$

Vzorec porovnává korelaci mezi expresí onkomiRu-155 a supresorových miR-203 a miR-205. „Sample skóre“ (hodnota S ve vzorci) vypočítaný pro každý vzorek plasmy z naší sady pacientů CTCL, od BKL a kontrol ukázal, že distribuce hodnoty S rozdělila vzorky na dvě skupiny (Obr. 4), kde jedna skupina obsahovala vzorky pacientů MF/SS a druhá skupina - vzorky pacientů s benigním kožním onemocněním a se zdravými kontrolními vzorky. Oddělovací hranice na základě sample skóre byla rovna -6 („cut-off“). „Sample skóre“ pro medián hodnot expresí mikroRNA ze všech tří vzorků od každého pacienta ukázal stejný trend rozdělení pacientů s maligním a benigním onemocněním. Důležité je, že skoro všichni pacienti MF byli klasifikováni jako maligní nezávisle na stupni onemocnění. Pouze jeden pacient s diagnózou SS3, jak už i bylo dříve ukázáno, se v případě dvou ze třech vzorků (vzorky 38 a 39) a také v případě mediánu hodnot dostal nad referenční hranici („cut-off“) do kontrolní skupiny.

Obrázek 4. „Sample skóre“ plazmatických vzorků od pacientů s benigním a maligním kožním onemocněním



Grafické zobrazení hodnoty S zvlášť pro každý vzorek od pacientů CTCL, BKL a kontrol (vlevo) a medián hodnot expresí mikroRNA ze všech tří vzorků od každého pacienta (vpravo). Označení vzorků: oranžový kruh - zdravá kontrola, růžový kruh - BKL, světlé zelený kruh – MF, tmavě zelený kruh – SS.

Stanovení plazmatických hladin onkogenních mikroRNA miR-155 a dvou supresorových miR-203 a miR-205 představuje velmi užitečný nástroj, jak pro diagnostické rozlišení od benigních kožních lézí, tak pro monitorování pacientů s CTCL s využitím vzorků plazmy periferní krve.

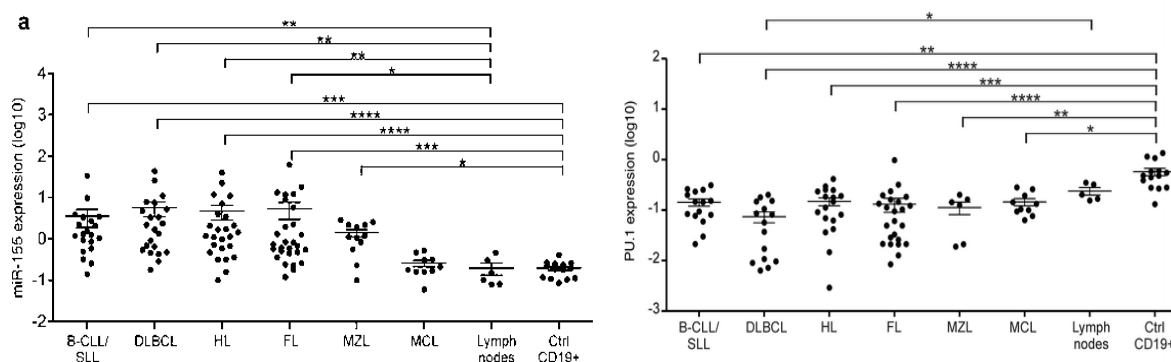
Cílem této studie bylo pomocí expresního profilu vybraných miRNA najít nástroj pro přesnější potvrzení diagnózy pacientů s mycosis fungoides a Sézarého syndromem. Dle výše uvedených analýz se potvrdil signifikantní význam souborů miR-155, miR-203 a miR-205 nejen pro diagnostiku CTCL a přesné odlišení od benigních kožních lézí, ale zde uvádíme i model predikcí pro odpověď na léčbu pacientů CTCL, rozsah tumorů a náležitost ke klinickému stádiu. Toto 3 miR-skóre vzorků plazmy pacientů CTCL je využitelné při hodnocení klinických odpovědí na CTCL a může být použito při zavádění nových terapií k vyhodnocení jejich účinnosti a hodnocení zbývajících nádorové zátěže. Význam miR-223 a miR-22 se ve výzkumu nepotvrdil.

4.1. Vedlejší výsledky

Studie genové exprese: Onkogenní mikroRNA-155 a PU.1 v nejčastějších lymfoidních malignitách (Huskova, Korecka et al. 2015)

Data z provedených měření souhrnně ukázaly, že úroveň exprese miR-155 v tkáni infiltrované lymfomy je významně vyšší než v normálních B-buňkách a v nenádorových reaktivních lymfatických uzlinách, zatímco exprese PU.1 byla značně downregulována. Předpokládá se, že tato rozdílná exprese může poukazovat na rozdíly v biologii studovaných typů lymfoproliferaci (LPD).

Obrázek 5a. Exprese miR-155 a PU.1 v lymfomech.



Expresce miR-155 (graf vlevo) a PU.1 (graf vpravo) v lymfoproliferativních onemocněních ve srovnání s CD19+ B-buňkami periferní krve zdravých dárců a reaktivních lymfatických uzlin. Jsou zobrazeny výsledky statistických testů (Tukeyho HSD-test a Studentův t-test). Hladiny významnosti: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. (Huskova, Korecka et al. 2015).

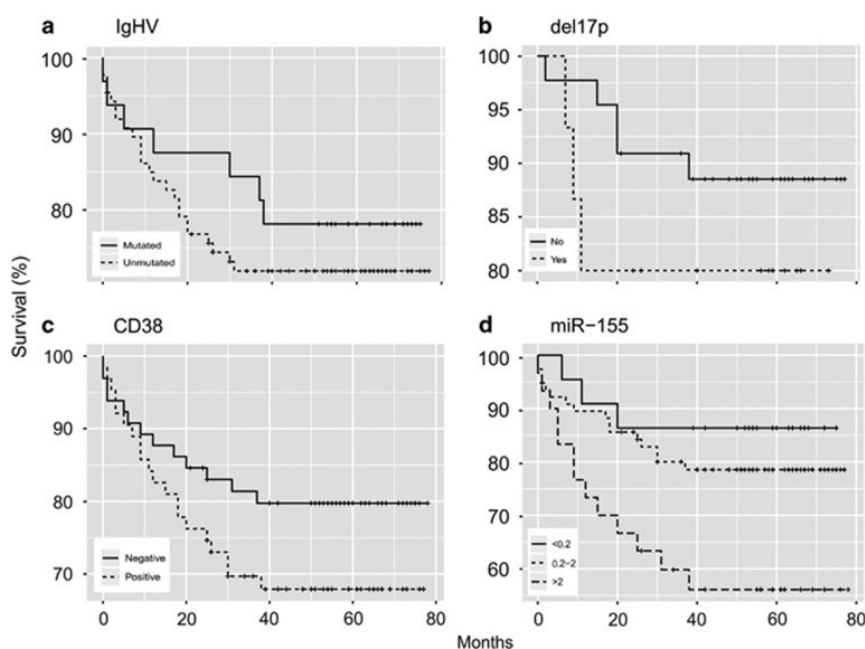
Následně jsme se zaměřili na možné variace exprese pro miR-155 a PU.1 u rozličných typů vzorků zvláště. Konkrétně jsme zkoumali rozdíly exprese ve vztahu k podtypům lymfomů, tj. rozdělení vzorků dle typu onemocnění (primární nádor, progresse, relaps nebo transformace), lokalizace nádoru (nodální nebo extranodální) a odpovědi na terapii. Významný rozdíl byl nalezen v expresi miR-155 ve vzorcích HL rozdělených podle odpovědi na terapii. Pacienti s HL byli přiřazeni k vhodné terapii na základě mnoha kritérií, včetně klinického hodnocení a biopsie. Většina pacientů reagovala na léčbu dobře a dosáhla úplné remise. Některé pacienti, označované jako refrakterní HL, na léčbu nereagovaly nebo došlo k časnému relapsu (do 1 roku po remisi). Konkrétně, ve zkoumaném souboru dat byly tři případy refrakterní HL, které vykazovaly konzistentně a

významně vysoké hladiny miR-155 ve srovnání s tumory, které dosáhly dlouhodobé remise. Důležité je, že tito pacienti v době diagnózy nevykazovali žádné známky toho, že jejich nemoc mohla být na léčbu refrakterní. Naše práce proto navrhla stanovení miR-155 pro odhalování prognostiky HL, které by mohlo být použito k identifikaci pacientů, které by s velkou pravděpodobností byly náchylní k horší odpovědi na terapii. Dále jsme využili Coxův model proporcionálních rizik expresních hladin miR-155 a PU.1 pro každý typ LPD. Pouze u Hodgkinova lymfomu tento model odhalil poměr rizika s hraniční významností. Tento výsledek znamená, že v našem souboru dat mají pacienti HL s vyšší expresí miR-155 kratší přežití. Pokud by data byla validována na větším souboru dat, to by podporovalo začlenění stanovení hladin miR-155 do rutinního zkoumání a do prognostických modelů pro HL.

Model regulace progresu chronické lymfocytární leukemii pomocí miR-155/miR-150 (Vargova, Pesta et al. 2017)

Statisticky byly vyhodnoceny klinické parametry a markery zvýšeného rizika CLL a úrovně studovaných miR-155, miR-150 a PU.1. Dle Kaplan – Meier grafu celkového přežívání pacientů s CLL se ukázalo, že aberantní stav klinických parametrů: IgVH, exprese CD38 a del17p, byl detekován u pacientů s nižším OS na rozdíl od těch, které tyto patologické změny neměli (Obrázek 6 a-c). Hladiny miR-155 byly rozděleny do tří expresních intervalů a jejich přidružení k OS jsou prezentovány v grafu (Obrázek 5 d). V závislosti na expresní úrovni miR-155 dosáhl OS plató na 86% pro nízkou hladinu miR-155 (relativní exprese méně než 0,2), na 79% pro střední úroveň exprese (0,2 – 2) a 56% pro úroveň vysokého miR-155 (s relativní expresí nad 2). Tyto výsledky potvrzují již dříve diskutovanou hypotézu, že miR-155 podporuje progresi maligních onemocnění a vyšší hladiny exprese miR-155 se asociují s nižším OS.

Obrázek 6. Graf celkového přežívání pacientů CLL ve vztahu k rizikovým faktorům.



Obrázek 6 (a-d). Kaplan – Meier graf celkového přežívání pacientů s CLL (% , osa Y), v čase (měsíce, osa X) ve vztahu k: (a) stav IgVH (mutovaný, nemutovaný); (b) stav del17p (ano, ne); (c) exprese CD38 (pozitivní, negativní); (d) úrovně exprese miR-155 (méně než 0,2; od 0,2 do 2; nad 2).

Pomocí vícerozměrného Coxova modelu proporcionálních rizik jsme vymezili roli každého ze zkoumaných faktorů: miR-150, miR-155, PU.1 v porovnání se standardními parametry, jako jsou základní laboratorní parametry (počet destiček a lymfocytů), včetně negativních prediktivních markerů: IgVH, CD38 a del17p. Výsledkem bylo zjištění, že dle výše uvedených hodnot se dále predikovat náležitost vzorků/pacientů k jedné z klinických fází onemocnění CLL(1-6). Tyto fáze odrážejí stabilitu CLL, její progresi a požadavky na léčbu. Fáze 1-6 označují stav sledování onemocnění: bez zahájení léčby (fáze 1 až 3 „check and wait“) a stavu indikované terapie (fáze 4 až 6). Z celkem 19 charakteristik onemocnění pouze pozitivita CD38, lymfocytóza, Trisomie12, delece 17p, nízké krevní destičky a miR-155 měly statisticky významný vliv na postupující fáze CLL. miR-155 jediným parametrem, který měl významný dopad na příslušnost k riziku progresi do více pokročilé fázi onemocnění.

Onkogenní mikroRNA: miR-155, miR-19a, miR-181b a miR-24 umožňují sledování časného karcinomu prsu v séru (Sochor, Basova et al. 2014)

Pomocí analýzy podélných vícerozměrných dat jsme zjišťovali, zda jsou úrovně exprese onkomiRů odlišné mezi časovým bodem I a jinými časovými body během sledování a

terapii nebo kontrolními vzorky. Zjistili jsme, že expresní profily čtyř sérových oncomiRů v době diagnózy (časový bod I) se výrazně liší od většiny vzorků v časovém bodu II. Po operaci (bod II) a chemo- nebo radioterapii (bod III) počet pacientů, kteří měli zvýšené hladiny oncomiRů v séru, se výrazně snížil. Například pro miR-155: 27 pacientů mělo při diagnóze zvýšenou expresi, následně jen 15 pacientů v časovém bodě II a pouze 7 pacientů v bodu III. Vzhledem k tomu, že většina pacientů ve vzorku III vykazovala normální hladiny nebo jen mírně zvýšené oncomiRy a dle klinických vyšetření pacienti nevykazovali známky daného onemocnění, dospěli jsme k závěru, že oncomiRy jsou spojeny s biologií nádorů. Důležité je, že tři pacienti s relapsem (vzorek IV) vykazovali zvýšenou expresi vybraných oncomiRů, což skutečně naznačuje, že exprese oncomiRů v séru souvisí s opětovným nádorovým růstem.

5. Diskuse

miRNA jsou velmi stabilní epigenetické modifikátory posttranskripční exprese, často zapojené do kancerogenezi. Jejich hladiny jsou detekovatelné jak v pevných tkáních, tak i v periferní krvi, a proto se nabízejí jako biomarkery pro diagnostický a prognostický screening u pacientů s různými typy onemocnění, včetně rakoviny. Ve výzkumných pracích, které probíhaly v naší laboratoři (laboratoř prof. MUDr. Tomáše Stopky, PhD.) v letech 2013 – 2018 jsme hodnotili expresi miRNA různých malignit ve vztahu ke klinickým charakteristikám onemocnění, standartním laboratorním markerům a vybraným statistickým hodnotám.

Prvotní práce se věnovaly výzkumu jedné z nejsledovanější miRNA- miR-155. Výsledná data poskytla nepřímý důkaz, že aktivita miR-155 je spojená s maligní proliferací v LPD. Vzhledem k dříve publikovaným zjištěním o vlivu miR-155 na diferenciaci B-buněk (Dahl and Simon 2003), (Lu, Nakagawa et al. 2014), tato data společně podporují roli miR-155 a jejího cílového produktu PU.1 v patofyziologii LPD. Analýza exprese miR-155 a PU.1 ve vztahu ke klinickým a molekulárním charakteristikám pacientů přinesla několik klinicky použitelných pozorování, které následně podpořily hypotézu o přímé účasti miR-155 v progresi onemocnění CLL.

Jiná studie, provedena na vzorcích séra pacientek s BC také potvrdila přímou účast těchto malých RNA molekul v procesech spojených s kancerogenezi. Byl předložen výsledek práce, kde nádorová tkáň, skutečně produkovala oncomiRy, a že jejich zvýšené hladiny v

séru odrážely charakter a aktuální stav tohoto onemocnění. Proto detekce onkomiRů může být navíc užitečná pro detekci relapsu, je však zapotřebí mnohem delšího sledování.

V případě výzkumu CTCL jsme použili hodnocení expresí vybraných miRNA na vzorcích plazmy pacientů s MF a SS v několika časových bodech onemocnění, což nám umožnilo porovnat dynamické změny v úrovni miRNA souvisejí s biologií CTCL s klinickými výsledky. miR-155, miR-203 a miR-205 byly skutečně odlišně regulovány v CTCL ve srovnání s kontrolními vzorky od pacientů s BKL nebo kontrolními vzorky. Navíc prediktivní 3-miR-skóre dříve generované pro nádorové tkáně (Ralfkiaer, Hagedorn et al. 2011) a validované na kohortě nezávislých pacientů (Marstrand, Ahler et al. 2014) úspěšně oddělil CTCL od kontrol a BKL při implementaci dat získaných z plazmy. Velikost efektu separace vzorků pomocí PCA však byla relativně menší ve srovnání s daty generovanými z větších datových souborů pomocí microarray. Studované miRNA jsou v CTCL biologii velmi jedinečné. Zatímco miR-155 působí jako onkogen v mnoha různých typech nádorových buněk, miR-203 a miR-205 jsou supresory nádoru exprimované v keratinocytech. Další práce ukazuje, že downregulace miR-203 a miR-205 narušuje epidermální diferenciaci a zvyšuje invazivitu (Ning and Andl 2015) a urychluje buněčnou proliferaci (Chim, Wong et al. 2011). miR-155 je zase epigeneticky aktivován prostřednictvím onkogenu MYB, který se váže a aktivuje strukturu chromatinu v blízkosti hostitelského genu pro miR-155 (Vargova, Curik, 2017). Výsledkem je, že upregulace miR-155 blokuje normální imunitní funkci při lymfoidních malignitách zaměřením na důležité transkripční a signální faktory, jako jsou PU.1 nebo SHIP1-PIP3-AKT (Huskova, Korecka, 2015). Další studie naznačila, že dráha STAT5-BIC-miR-155 může být zodpovědná za řízení buněčné proliferace během maligní transformace T-buněk (Kopp, Ralfkiaer et al. 2013). Tato představa je také podporována myším modelem s nadprodukcí miR-155 (Costinean, Zanesi et al. 2006), která vede k lymfomům. Soubor tří miRNA může potenciálně zprostředkovat mechanismy odpovědné za změnu mikroprostředí a maligní transformací, jak je uvedeno v jiných studiích (Krejsgaard, Lindahl, 2017).

Je velmi důležité správně diagnostikovat a odlišit CTCL od benigních lézí, s přesností předpovědět možnost potenciálního relapsu CTCL. Naše práce ukazuje, že toho lze dosáhnout pomocí specifické detekce mikroRNA v plazmě. Hladiny tří nejdůležitějších miRNA (miR-155, miR-203, miR-205) měly skutečně významné účinky na terapeutickou odpověď, zatímco miR-155 a miR-203 měly navíc významné účinky na příslušnost ke

klinickému stadiu a na velikosti nádoru. Výhodou naší práce ve srovnání s předchozími výzkumy využívající biopsii kůže je to, že umožňuje využití plazmy periferní krve, která je relativně snadno získatelná při rutinních návštěvách pacientů.

Výsledkem je, že data miRNA jsou kvantitativní a vysoce reprodukovatelná. Význam prediktivního skóre je částečně způsoben skutečností, že miR-155 je přímo zapojen do biologie progresu MF, což je podporováno i jinými pracemi (Moyal, Barzilai et al. 2013). Je zajímavé, že upregulace samotného miR-155 není schopna úplně rozlišit mezi časnou MF a zánětlivou dermatózou a oddělit pacienty a kontroly, dále podporuje použití klasifikátoru několika miRNA. Skóre ve skutečnosti mělo původně obsahovat další dva miR, miR-223 a miR-22, které byly dříve prokázány upregulované v nádorové tkáni CTCL, zatímco v plazmě MF nebo SS (jak je ukázáno na Obr. 9 a Obr. 10) hladiny miR-223 a miR-22 nebyly významně ovlivněny. Navíc, jak ukazuje další studie, hladiny miR-223 jsou v CTCL sníženy, zatímco jejich cíle byly vzájemně upregulované (McGirt, Adams et al. 2014). Podobně jiná studie zaznamenala snížení miR-223 během progresu MF na pokročilé MF. Dále bylo pozorováno snížení miR-22 v obou formách CTCL, MF i SS, ve srovnání s kontrolami v jiné studii (Sibbesen, Kopp et al. 2015).

Dohromady nástroj zahrnující detekci miRNA v plazmě umožňuje jak správně diagnostikovat CTCL a odlišit od benigních lézí, tak i umožňuje monitorování progresu CTCL. Přestože naše práce představuje počáteční nálezy na relativně malé kohortě pacientů, jsme přesvědčeni, že spojování úrovní miR s klinickým výsledkem umožňuje zahájit další validační studie u pacientů s CTCL.

6. Závěr

Stanovení plazmatických hladin mikroRNA v hematologických malignitách představuje velmi užitečný nástroj jak pro diagnostické rozlišení např. od benigních lézí, tak pro monitorování průběhu onemocnění. Ve studiích, které byly provedeny na poli mikroRNA, jsme využili různé přístupy a metody pro co nejdetailnější hodnocení. Velkým přínosem je možnost využití vzorků plazmy a/nebo séra periferní krve u pacientů se solidními nádory (což na jedné straně odráží biologii nádorové hmoty a její schopnost secernovat molekuly do periferního řečiště, a na straně druhé ukazuje na skutečnost, že miRNA hrají významnou roli v komunikaci mezi nádorem, imunitním systémem a mikroprostředí tumoru). Výsledné soubory miRNA, kde často hraje role vzájemné působení několika onkogenních a supresorových miRNA, jsou využitelné nejen při diferenciální diagnostice nádorů, ale mají potenciál při hodnocení aktuálního klinického stavu pacienta a tím i přesnější stanovení léčebných odpovědí. Využití miRNA skórovacích systému dovolí kvantifikovat klinické objektivní výsledky a subjektivní znaky. Navíc, miRNA mohou předpovídat možný scénář vývoje onemocnění se stanovením prognostického rizika pro každého pacienta v aktuálním čase. Výše uvedené výsledky práce mohou být použity při zavádění nových terapií k vyhodnocení jejich účinnosti a hodnocení zbývajících nádorové zátěže.

Seznam publikací doktoranda:

1. **Dusílková N**, Bašová P, Polívka J, Kodet O, Kulvait V, Pešta M, Trněný M, Stopka T. Plasma miR-155, miR-203, and miR-205 are Biomarkers for Monitoring of Primary Cutaneous T-Cell Lymphomas. *Int J Mol Sci.* 2017 Oct 15;18(10):2136. doi: 10.3390/ijms18102136.PMID: 29036928 **(IF 4.5)**
2. Vargova K, Pesta M, Obrtlíkova P, **Dusílková N**, Minarik L, Vargova J, Berkova A, Zemanova Z, Michalova K, Spacek M, Trneny M, Stopka T. MiR-155/miR-150 network regulates progression through the disease phases of chronic lymphocytic leukemia. *Blood Cancer J.* 2017 Jul 21;7(7):e585. doi: 10.1038/bcj.2017.63.PMID: 28731457 **(IF 7.6)**
3. Sochor M, Basova P, Pesta M, **Dusílková N**, Bartos J, Burda P, Pospisil V, Stopka T. Oncogenic microRNAs: miR-155, miR-19a, miR-181b, and miR-24 enable monitoring of early breast cancer in serum. *BMC Cancer.* 2014 Jun 18;14:448. doi: 10.1186/1471-2407-14-448.PMID: 24938880 **(IF 3.3)**
4. Huskova H, Korecka K, Karban J, Vargova J, Vargova K, **Dusílková N**, Trneny M, Stopka T. Oncogenic microRNA-155 and its target PU.1: an integrative gene expression study in six of the most prevalent lymphomas. *Int J Hematol.* 2015 Oct;102(4):441-50. doi: 10.1007/s12185-015-1847-4. Epub 2015 Aug 11.PMID: 26261072 **(IF 2.24)**
6. Vargova J, Vargova K, **Dusílková N**, Kulvait V, Pospisil V, Zavadil J, Trneny M, Klener P, Stopka T. Differential expression, localization and activity of MARCKS between mantle cell lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Blood Cancer J.* 2016 Sep 23;6(9):e475. doi: 0.1038/bcj.2016.80.PMID: 27662204 **(IF 7.6)**

7. Použitá literatura

Costinean, S., N. Zanesi, Y. Pekarsky, E. Tili, S. Volinia, N. Heerema and C. M. Croce (2006). "Pre-B cell proliferation and lymphoblastic leukemia/high-grade lymphoma in E(mu)-miR155 transgenic mice." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(18): 7024-7029.

Dusilkova, N., P. Basova, J. Polivka, O. Kodet, V. Kulvait, M. Pesta, M. Trneny and T. Stopka (2017). "Plasma miR-155, miR-203, and miR-205 are Biomarkers for Monitoring of Primary Cutaneous T-Cell Lymphomas." Int J Mol Sci **18**(10).

Fredholm, S., A. Willerslev-Olsen, O. Met, L. Kubat, M. Glud, S. L. Mathiasen, C. Friese, E. Blumel, D. L. Petersen, T. Hu, C. Nastasi, L. M. Lindahl, T. B. Buus, T. Krejsgaard, M. A. Wasik, K. L. Kopp, S. B. Koralov, J. L. Persson, C. M. Bonefeld, C. Geisler, A. Woetmann, L. Iversen, J. C. Becker and N. Odum (2018). "SATB1 in Malignant T Cells." J Invest Dermatol **138**(8): 1805-1815.

Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." Cell **144**(5): 646-674.

Huskova, H., K. Korecka, J. Karban, J. Vargova, K. Vargova, N. Dusilkova, M. Trneny and T. Stopka (2015). "Oncogenic microRNA-155 and its target PU.1: an integrative gene expression study in six of the most prevalent lymphomas." Int J Hematol **102**(4): 441-450.

Chim, C. S., K. Y. Wong, C. Y. Leung, L. P. Chung, P. K. Hui, S. Y. Chan and L. Yu (2011). "Epigenetic inactivation of the hsa-miR-203 in haematological malignancies." J Cell Mol Med **15**(12): 2760-2767.

Iorio, M. V. and C. M. Croce (2017). "MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review." EMBO Mol Med **9**(6): 852.

Kopp, K. L., U. Ralfkiaer, L. M. Gjerdrum, R. Helvad, I. H. Pedersen, T. Litman, L. Jonson, P. H. Hagedorn, T. Krejsgaard, R. Gniadecki, C. M. Bonefeld, L. Skov, C. Geisler, M. A. Wasik, E. Ralfkiaer, N. Odum and A. Woetmann (2013). "STAT5-mediated expression of oncogenic miR-155 in cutaneous T-cell lymphoma." Cell Cycle **12**(12): 1939-1947.

Marstrand, T., C. B. Ahler, U. Ralfkiaer, A. Clemmensen, K. L. Kopp, N. A. Sibbesen, T. Krejsgaard, T. Litman, M. A. Wasik, C. M. Bonefeld, K. Gronbaek, L. M. Gjerdrum, R. Gniadecki, E. Ralfkiaer, C. Geisler, A. Woetmann, M. A. Ropke, C. Glue, L. Skov and N. Odum (2014). "Validation of a diagnostic microRNA classifier in cutaneous T-cell lymphomas." Leuk Lymphoma **55**(4): 957-958.

McGirt, L. Y., C. M. Adams, D. A. Baerenwald, J. P. Zwerner, J. A. Zic and C. M. Eischen (2014). "miR-223 regulates cell growth and targets proto-oncogenes in mycosis fungoides/cutaneous T-cell lymphoma." J Invest Dermatol **134**(4): 1101-1107.

Mitchell, P. S., R. K. Parkin, E. M. Kroh, B. R. Fritz, S. K. Wyman, E. L. Pogosova-Agadjanyan, A. Peterson, J. Noteboom, K. C. O'Briant, A. Allen, D. W. Lin, N. Urban, C.

W. Drescher, B. S. Knudsen, D. L. Stirewalt, R. Gentleman, R. L. Vessella, P. S. Nelson, D. B. Martin and M. Tewari (2008). "Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(30): 10513-10518.

Moyal, L., A. Barzilai, B. Gorovitz, A. Hirshberg, N. Amariglio, J. Jacob-Hirsch, L. Maron, M. Feinmesser and E. Hodak (2013). "miR-155 is involved in tumor progression of mycosis fungoides." *Exp Dermatol* **22**(6): 431-433.

Ning, M. S. and T. Andl (2015). "Concise review: custodians of the transcriptome: how microRNAs guard stemness in squamous epithelia." *Stem Cells* **33**(4): 1047-1054.

Ralfkiaer, U., P. H. Hagedorn, N. Bangsgaard, M. B. Lovendorf, C. B. Ahler, L. Svensson, K. L. Kopp, M. T. Vennegaard, B. Lauenborg, J. R. Zibert, T. Krejsgaard, C. M. Bonefeld, R. Sokilde, L. M. Gjerdrum, T. Labuda, A. M. Mathiesen, K. Gronbaek, M. A. Wasik, M. Sokolowska-Wojdylo, C. Queille-Roussel, R. Gniadecki, E. Ralfkiaer, C. Geisler, T. Litman, A. Woetmann, C. Glue, M. A. Ropke, L. Skov and N. Odum (2011). "Diagnostic microRNA profiling in cutaneous T-cell lymphoma (CTCL)." *Blood* **118**(22): 5891-5900.

Rosenfeld, N., R. Aharonov, E. Meiri, S. Rosenwald, Y. Spector, M. Zepeniuk, H. Benjamin, N. Shabes, S. Tabak, A. Levy, D. Lebanony, Y. Goren, E. Silberschein, N. Targan, A. Ben-Ari, S. Gilad, N. Sion-Vardy, A. Tobar, M. Feinmesser, O. Kharenko, O. Nativ, D. Nass, M. Perelman, A. Yosepovich, B. Shalmon, S. Polak-Charcon, E. Fridman, A. Avniel, I. Bentwich, Z. Bentwich, D. Cohen, A. Chajut and I. Barshack (2008). "MicroRNAs accurately identify cancer tissue origin." *Nat Biotechnol* **26**(4): 462-469.

Sibbesen, N. A., K. L. Kopp, I. V. Litvinov, L. Jonson, A. Willerslev-Olsen, S. Fredholm, D. L. Petersen, C. Nastasi, T. Krejsgaard, L. M. Lindahl, R. Gniadecki, N. P. Mongan, D. Sasseville, M. A. Wasik, L. Iversen, C. M. Bonefeld, C. Geisler, A. Woetmann and N. Odum (2015). "Jak3, STAT3, and STAT5 inhibit expression of miR-22, a novel tumor suppressor microRNA, in cutaneous T-Cell lymphoma." *Oncotarget* **6**(24): 20555-20569.

Sochor, M., P. Basova, M. Pesta, N. Dusilkova, J. Bartos, P. Burda, V. Pospisil and T. Stopka (2014). "Oncogenic microRNAs: miR-155, miR-19a, miR-181b, and miR-24 enable monitoring of early breast cancer in serum." *BMC Cancer* **14**: 448.

Sonkoly, E., T. Wei, P. C. Janson, A. Saaf, L. Lundeberg, M. Tengvall-Linder, G. Norstedt, H. Alenius, B. Homey, A. Scheynius, M. Stahle and A. Pivarcsi (2007). "MicroRNAs: novel regulators involved in the pathogenesis of psoriasis?" *PLoS One* **2**(7): e610.

Tietsche de Moraes Hungria, V., C. Chiattonne, M. Pavlovsky, L. M. Abenoza, G. P. Agreda, J. Armenta, C. Arrais, O. Avendano Flores, F. Barroso, A. L. Basquiera, C. Cao, M. S. Cugliari, A. Enrico, L. M. Fogliatto, K. M. Galvez, D. Gomez, A. Gomez, D. de Iracema, D. Farias, L. Lopez, W. A. Mantilla, D. Martinez, M. J. Mela, C. E. Miguel, R. Ovilla, L. Palmer, C. Pavlovsky, C. Ramos, G. Remaggi, R. Santucci, S. Schusterschitz, C. L. Sossa, E. Tuna-Aguilar, J. Vela, T. Santos, O. de la Mora, G. Machnicki, M. Fernandez and P. Barreyro (2019). "Epidemiology of Hematologic Malignancies in Real-

World Settings: Findings From the Hemato-Oncology Latin America Observational Registry Study." J Glob Oncol **5**: 1-19.

Vargova, J., K. Vargova, N. Dusilkova, V. Kulvait, V. Pospisil, J. Zavadil, M. Trneny, P. Klener and T. Stopka (2016). "Differential expression, localization and activity of MARCKS between mantle cell lymphoma and chronic lymphocytic leukemia." Blood Cancer J **6**(9): e475.

Vargova, K., N. Curik, P. Burda, P. Basova, V. Kulvait, V. Pospisil, F. Savvulidi, J. Kokavec, E. Necas, A. Berkova, P. Obrtlíkova, J. Karban, M. Mraz, S. Pospisilova, J. Mayer, M. Trneny, J. Zavadil and T. Stopka (2011). "MYB transcriptionally regulates the miR-155 host gene in chronic lymphocytic leukemia." Blood **117**(14): 3816-3825.

Vargova, K., M. Pesta, P. Obrtlíkova, N. Dusilkova, L. Minarik, J. Vargova, A. Berkova, Z. Zemanova, K. Michalova, M. Spacek, M. Trneny and T. Stopka (2017). "MiR-155/miR-150 network regulates progression through the disease phases of chronic lymphocytic leukemia." Blood Cancer J **7**(7): e585.