

Abstrakt

Nádorová heterogenita bola rozoznávaná už desiatky rokov. Predmetom tejto práce sú molekulárne mechanizmy ovplyvňujúce klonálnu heterogenitu hematologických ochorení, konkrétne myeloproliferatívnych neoplázií (MPN) a lymfómov z plášťových buniek so zameraním sa na niekoľko zdedených genetických faktorov, zápal, obranné mechanizmy poškodenia DNA (DDR) v procese leukemickej transformácie a liečebné stratégie.

V prvom rade sa venujem štúdiu dedičných mutácií v géne *JAK2*, ako tieto mutácie ovplyvňujú iniciáciu a progresiu MPN ochorení a ako môžu prispievať k ďalším genómovým zmenám v mutovanom klone. V štúdiu, ktorú vykonalo naše spolupracujúce laboratórium v Utahu v USA¹, analyzovali mutačné rozpätie 31 pacientov s *JAK2* V617F-pozitívnym polycytémia vera ochorením. Identifikovali dve nové dedičné mutácie v géne *JAK2*, *JAK2* T108A a *JAK2* L393V. Ďalšia štúdia², ktorú vykonalo naše spolupracujúce laboratórium v Olomouci, charakterizovala dve zdedené mutácie *JAK2*, E846D a R1063H, v prípade dedičnej erytrocytózy sprevádzanej megakaryocytárnou atypiou. Mutácia *JAK2* R1063H bola spočiatku opísaná u 3 z 93 pacientov polycytémie vera, ktoré boli *JAK2* V617F-pozitívne.³ Naším cieľom bolo identifikovať úlohu vybraných zdedených mutácií v géne *JAK2* pri iniciácii a progresii MPN ochorení. Ukazujeme, že mutácie *JAK2* T108A a L393V sú slabo aktivujúce, vedú k zvýšenej senzitivite na erytropoetin, ktoré môžu predurčovať bunky nesúce tieto mutácie na zvýšenie rýchlosti rastu (proliferácie) vo fyziologických podmienkach. Preto je možné, že tieto dva varianty môžu predchádzať získaniu mutácie *JAK2* V617F v priebehu ochorenia a prispievať k ďalším genómovým zmenám v mutovanom klone a prípadne aj k leukemickej transformácii. Ďalej sme charakterizovali dvojitý mutant *JAK2* V617F/R1063H v kohorte MPN pacientov z Belgicka a Rumunska. Ukázalo sa, že obe mutácie spolupracujú na zvyšovaní signalizácie JAK-STAT charakteristickej pre mutant *JAK2* V617F. MPN pacienti s týmito dvoma mutáciami majú zvýšené množstvo bielych krviniek a následne zvýšené množstvo neutrofilov, čo by mohlo byť dôsledkom zvýšenej biochemickej asociácie mutantu *JAK2* R1063H s receptorom faktora stimulujúceho kolónie granulocytov (G-CSFR).

V druhom rade sa sústredim na charakterizovanie ochrannej úlohy proteínu KAP1 v progresii MPN ochorení. Predpokladáme, že podobný proces aktivácie komponentov DRR, ako je opísaný v pevných nádoroch, sprevádza priebeh MPN a že aktivácia nádorovej supresorovej bariéry pôsobí

proti progresii akútnej leukémie. Na charakterizáciu úlohy proteínu KAP1 v DDR u buniek pozitívnych na *JAK2 V617F* sme vytvorili HEL (ľudská erytroleukémia, *JAK2 V617F*-pozitívne) bunkovú líniu nesúcu alelu *JAK2 WT* a následne sme v týchto bunkách vyradili gén *KAP1*. *KAP1* bude ďalej študovaný v tomto settingu, bude skúmaná jeho úloha v proliferácii buniek pri indukovanom poškodení DNA, diferenciácia a jeho vplyv na genómovú nestabilitu.

V treťom rade sa sústredím na identifikáciu úlohy prolylhydroxylázy 1 (*EGLN2/PHD1*) a transkripčného faktora *FOXO3A* v lymfóme z plášťových buniek (mantle cell lymphoma, MCL). Bol popísané⁴, že neschopnosť *PHD1* hydroxylovať *FOXO3A* podporuje jeho akumuláciu v bunkách, čo následne potláča expresiu cyklínu D1 ešte neznámym mechanizmom. Cyklín D1 je nadmerne exprimovaný v MCL a preto je zaujímavé, či by chelácia železa, ktorá inhibuje funkciu *PHD1*, bola prospešná pri downregulácii cyklínu D1 v bunkách MCL. Ukázalo sa, že chelácia železa vedie k zníženiu hladiny mRNA a proteínov cyklínu D1 v bunkových líniiach MCL⁵, molekulárny mechanizmus však zostáva neznámy. Chelácia železa bola predtým popísaná v proteázovej degradácii cyklínu D1 mechanizmom nezávislým od ubiquitínu.⁶ V našej štúdii sme ukázali, že v bunkových líniiach MCL je chelácia železa účinná pri inhibícii proliferácie, indukcii apoptózy a zastavenia bunkového cyklu pomocou regulácie cyklínu D1. Ukazuje sa tiež, že nadmerná expresia cyklínu D1 v týchto bunkách spôsobuje, že sú náchylnejšie na cheláciu. Zistili sme, že cyklín D1 v bunkách MCL uniká regulačnému okruhu *PHD1 - FOXO3A* a downregulácia cyklínu D1 pri deplecii železa je regulovaná iným neznámym mechanizmom. Ďalej sme skúmali úlohu *NQO1* (o ktorom sa preukázalo, že sa podieľa na proteazomálnej degradácii nezávislej od ubiquitínu) použitím inhibítora *NQO1* dicumarolu, aby sa zistilo, či jeho nedostupnosť môže viesť k destabilizácii proteínu cyklínu D1 v bunkových líniiach MCL. Bunky ošetrované DIC vykazovali zníženie hladín mRNA a proteínu cyklínu D1. Nie je jasné, či sledovaná represia cyklínu D1 je výsledkom *NQO1*, ktorý má špecifickú ochrannú úlohu pri degradácii proteínov alebo je výsledkom nešpecifickej inhibície jeho oxidoredukčnej aktivity.

1. Wang L, Swierczek SI, Drummond J, et al. Whole-exome sequencing of polycythemia vera revealed novel driver genes and somatic mutation shared by T cells and granulocytes. *Leukemia*. 2014;28(4):935–938.
2. Kapralova K, Horvathova M, Pecquet C, et al. Cooperation of germ line JAK2 mutations E846D and R1063H in hereditary erythrocytosis with megakaryocytic atypia. *Blood*. 2016;128(10):1418–23.
3. Levine RL, Wadleigh M, Cools J, et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell*. 2005;7(4):387–397.
4. Zhang Q, Gu J, Li L, et al. Control of Cyclin D1 and Breast Tumorigenesis by the EglN2 Prolyl Hydroxylase. *Cancer Cell*. 2009;16(5):413–424.
5. Vazana-Barad L, Granot G, Mor-Tzuntz R, et al. Mechanism of the antitumoral activity of deferasirox, an iron chelation agent, on mantle cell lymphoma. *Leuk. Lymphoma*. 2013;54(4):851–9.
6. Nurtjahja-Tjendraputra E, Fu D, Phang JM, Richardson DR. Iron chelation regulates cyclin D1 expression via the proteasome: a link to iron deficiency-mediated growth suppression. *Blood*. 2007;109(9):4045–54.