

Univerzita Karlova
1. lékařská fakulta

Autoreferát disertační práce



**MYELOUDYSPLASTICKÝ SYNDROM –
HLEDÁNÍ MOLEKULÁRNÍ PODSTATY**

Monika Beličková

Praha 2017

Doktorské studijní programy v biomedicině

Univerzita Karlova a Akademie věd České republiky

Obor: Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie

Předseda oborové rady: prof. RNDr. Zdena Palková, CSc.

Školící pracoviště: Ústav hematologie a krevní transfuze

Školitel: Doc. MUDr. Jaroslav Čermák, CSc.

Obsah	Stránka
Obsah	3
Abstrakt: česká verze	4
Abstrakt: anglická verze	5
1. ÚVOD	
1.1 Myelodysplastický syndrom	6
1.2 Mutace v genu <i>TP53</i>	
1.3 Hypometylační léčba u MDS	7
1.4 Bodové polymorfismy	7
2. CÍLE PRÁCE A HYPOTÉZY	7
3. KLINICKÉ SOUBORY, METODY A VÝSLEDKY	
3.1 Mutace v genu <i>TP53</i>	
3.1.1 Klinický soubor	8
3.1.2 Metody	8
3.1.3 Výsledky	9
3.2 Predikce odpovědi na hypometylační léčbu	
3.2.1 Klinický soubor	10
3.2.2 Metody	11
3.2.3 Výsledky	11
3.3 Bodové polymorfismy asociované s MDS	
3.3.1 Klinický soubor	12
3.3.2 Metody	13
3.3.3 Výsledky	13
4. DISKUSE A ZÁVĚRY	
4.1 Diskuze a závěry k tématu - Mutace v genu <i>TP53</i>	13
4.2 Diskuze a závěry k tématu - Predikce léčebné odpovědi na hypometylační činidla	15
4.3 Diskuze a závěry k tématu - Identifikace bodových polymorfismů asociovaných s MDS	17
5. SOUHRN	18
6. LITERATURA	19
PUBLIKACE AUTORA K TÉMATU DISERTACE	23

ABSTRAKT:

Klíčová slova: Myelodysplastický syndrom; mutace v genu *TP53*; hypometylační léčba; asociační studie; jednonukleotidové polymorfismy

Myelodysplastický syndrom (MDS) je heterogenní skupina klonálních hematopoietických onemocnění s neefektivní hematopoézou. Je charakterizován morfologickou dysplázií, periferní cypopenií postihující jednu či více vývojových buněčných linií a zvýšeným rizikem transformace do akutní myeloidní leukemie (AML). Časné fáze MDS se dají považovat za premalignní onemocnění. Patogeneze MDS nebyla doposud dostatečně vysvětlena, ale s rozvojem molekulárně genetických a cytogenetických metod dochází postupně k objasňování vzniku a vývoje choroby.

Vedle cytogenetických změn, které jsou součástí používaného prognostického systému (IPSS-R), se do popředí dostávají také somatické mutace nacházející se v různých genech. V klinické praxi však nejsou zatím rutinně používány. Jeden z cílů této práce bylo sledování mutací v genu *TP53* u pacientů s nízkým rizikem MDS, kteří mají obecně dobrou prognózu a u kterých tato zjištění mají zvláště relevantní prognostický význam. Vyšetřili jsme celkem 154 pacientů s nízkým rizikem MDS a u 13% z nich jsme detekovali mutaci. Po rozdělení pacientů podle přítomnosti *del(5q)* jsme zjistili signifikantní rozdíly v zastoupení mutací. U 23,6% pacientů s delecí byla zachycena mutace na rozdíl od 3,8% pacientů bez delecce. Multivariantní analýzou jsme zjistili, že mutace v genu *TP53* (HR 3,7) je nejsilnější prognostický faktor pro celkové přežití (OS), tak i pro přežití bez progresu (PFS). Dále jsme zjistili, že malé *TP53*-mutované subklony nemají stejný nepříznivý prognostický dopad na OS a PFS u pacientů s nižším rizikem MDS, tak jako klony s vysokou mutační zátěží. Byla zjištěna korelace ve velikosti mutovaného klonu mezi buňkami izolovanými z periferní krve a kostní dřeně. Na základě zjištěných výsledků se domníváme, že by mělo být určování mutací v genu *TP53* u pacientů s nízkým rizikem MDS prováděno rutinně v době stanovení diagnózy, v průběhu choroby, a před zahájením léčby.

Hypometylační terapie pomocí azacitidinu (AZA) se v současné době používá v léčbě pacientů s pokročilými formami MDS, kteří nejsou indikováni k transplantaci krvetvorných buněk. Na léčbu AZA pozitivně reaguje pouze polovina pacientů a klinický stav pacientů po selhání léčby AZA je velmi špatný. Proto jsme se zaměřili na identifikaci markerů, které by mohly predikovat léčebnou odpověď na AZA. Identifikovali jsme zvýšenou expresi několika ribozomálních genů u pacientů bez odpovědi před zahájením léčby AZA, což pravděpodobně odráželo intenzivní proteosyntézu v proliferativních/neoplastických buňkách. Předpokládáme, že selhání léčby je výsledkem vysoké míry proliferace a pokročilého stavu onemocnění, který nelze hypometylační léčbou již zvrátit.

Jednonukleotidové polymorfismy (SNPs) v sekvenci DNA jsou nejvíce rozšířené polymorfismy v genomu člověka a mohou sloužit k odhalování genetických predispozic k onemocněním v rámci asociačních studií. Pokusili jsme se najít SNPs, které by s MDS souvisely ať již přímo nebo by byly ve vazebné nerovnováze se skutečnou kauzální alelou. Nalezli jsme devět bodových polymorfismů, které souvisely s MDS fenotypem. Z toho tři SNPs jsou lokalizovány v DNA reparačních genech (*LIG1*, *RAD52*, *MSH3*) a jeden SNP v genu, který chrání buňky před oxidačním poškozením (*GPX3*). Dále byly identifikovány dva SNPs (*ROS1*, *STK6*), jejichž genotyp byl asociován s celkovým přežitím pacientů. Domníváme se, že tyto geny by se mohly podílet na vzniku MDS.

Výsledky předkládané disertační práce poskytují další informace o molekulárním pozadí MDS a možných mechanismech vedoucích ke vzniku či progresi onemocnění a jsou také podkladem pro další studie zaměřené na aplikaci těchto nálezů do klinické praxe.

ABSTRACT:

Key words: Myelodysplastic syndrome; mutations in *TP53* gene; hypomethylation therapy; association study; single nucleotide polymorphisms

Myelodysplastic syndrome (MDS) is a heterogeneous group of clonal hematopoietic stem cell disorders with ineffective hematopoiesis. It is characterized by morphological dysplasia, peripheral cytopenias affecting one or more cell lineages and an increased risk of transformation into acute myeloid leukemia (AML). The early stages of MDS can be considered a premalignant disease. The pathogenesis of MDS has not been fully explained yet, but due to the development of molecular genetic and cytogenetic methods, the origin and development of the disease is gradually being elucidated.

In addition to the cytogenetic changes that are part of the prognostic system (IPSS-R), the somatic mutations found in different genes come to the forefront of interest. However, they are not routinely used in clinical practice. One of the objectives of this study was monitoring of mutations in *TP53* gene in lower-risk MDS patients who generally have a good prognosis and for whom these findings have a particularly relevant prognostic significance. We investigated a total of 154 patients with lower-risk MDS, and 13% of them had a mutation. After dividing patients according to the presence of del(5q), we observed significant differences in the incidence of the mutations. The mutations were detected in 23.6% of patients with deletion compared to 3.8% of patients without deletion. Using multivariate analysis, we determined that the mutation in *TP53* gene (HR 3.7) is the strongest prognostic factor for both overall survival (OS) and progression-free survival (PFS). We also found that small *TP53*-mutated subclones did not have the same unfavorable prognostic impact on OS and PFS in patients with low-risk MDS as the clones with high mutational burden. A high correlation in the size of the mutated clone was found between cells isolated from peripheral blood and bone marrow. Based on these findings, we assume that the *TP53* mutations should be routinely detected at the time of diagnosis, during the course of the disease, and prior to initiation of treatment, in patients with lower-risk MDS.

Azacitidine (AZA) hypomethylation therapy is currently used for the treatment of patients with advanced stages of MDS who are not indicated for hematopoietic stem cell transplantation. Approximately only half of the patients respond positively to the AZA therapy and the clinical patient outcome after AZA treatment failure is very poor. Therefore, we focused on the identification of markers that could predict the response to AZA therapy. We detected an increased expression of several ribosomal genes in non-responsive patients before AZA treatment that likely reflected an intensive proteosynthesis in proliferative/neoplastic cells. We suppose that a possible treatment failure results from a high rate of proliferation and advanced state of the disease cannot be reversed by demethylation treatment.

Single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in the DNA sequence are the most common polymorphisms in the human genome, and can serve to detect genetic predispositions to disease in association studies. We attempted to identify SNPs that could be related to MDS either directly or were in linkage disequilibrium with the actual causal allele. We found nine point polymorphisms that were associated with MDS phenotype. Of these, three SNPs are located in DNA repair genes (*LIG1*, *RAD52*, and *MSH3*) and one in the gene protecting the cells from oxidative damage (*GPX3*). In addition, two SNPs (*ROS1*, *STK6*), whose genotype was associated with overall survival of the patients, were identified. We hypothesize that these genes may be involved in the pathogenesis of MDS.

The results of the presented dissertation provide further information on the molecular background of MDS and possible mechanisms leading to the onset or progression of the disease and also represent the basis for further studies aimed at applying these findings to clinical practice.

1. ÚVOD

1.1. Myelodysplastický syndrom

Myelodysplastický syndrom (MDS) je heterogenní skupina klonálních hematopoietických onemocnění s neefektivní hematopoézou. Je charakterizován morfologickou dysplázií a periferní cypopenií postihující jednu či více vývojových linií a zvýšeným rizikem transformace do akutní myeloidní leukemie (AML). Časné fáze MDS se dají považovat za premaligní (preleukemické) onemocnění (Nimer SD, 2008).

Většina případů, 80% až 90%, vzniká *de novo* a jejich etiologie je nejasná. Tento typ MDS označujeme jako primární. Zatímco 10% až 20% případů vzniká druhotně. Tento typ MDS nazýváme jako sekundární a vzniká po radioterapii nebo po chemoterapii (alkylačními cytostatiky či inhibitory topoizomerázy II) nebo za různě dlouhou dobu po expozici např. benzenu, insekticidům, pesticidům nebo organickým rozpouštědlům.

Incidence MDS se přibližně pohybuje kolem 3-5 případů na 100 000 obyvatel za rok. Průměrný věk pacienta je 65 let. Diagnostická vyšetření se opírají o nálezy v periferní krvi (PK) a vyšetření kostní dřeně (KD). Pro klasifikaci MDS syndromů bylo vytvořeno několik klasifikačních systémů, které jsou založeny hlavně na hodnocení počtu a typu cypopenií a procentu myeloblastů v KD. Používán je hlavně WHO (World Health Organization) klasifikační systém z roku 2016 (Arber DA et al., 2016). Pro zhodnocení prognózy a přežití pacientů je zavedeno také několik prognostických systémů. Nejnovější je IPSS-R (Revised International Prognostic Scoring System), který zařazuje pacienty do pěti kategorií rizika (velmi nízké až po velmi vysoké) na základě prognózy vývoje onemocnění s rozdílnou dobou přežití pacientů a dobou progresu onemocnění do AML (Greenberg PL et al., 2012). Léčba pacientů je individualizovaná a založena na rizikovosti onemocnění. Léčebná strategie pro pacienty s nižším a středním rizikem spočívá v podpůrné, stimulační (podávání růstových faktorů krvetvorby), chelatační, imunosupresivní nebo imunomodulační terapii. Cílem léčby je zlepšení kvality a prodloužení délky života. U pacientů s vysokým rizikem je terapie zaměřena na vymýcení patologického klonu a na prevenci transformace do AML.

Patogeneze MDS, i když je intenzivně zkoumána, není dosud objasněna. Předpokládá se, že stejně jako u ostatních nádorových onemocnění, se jedná o vícestupňový proces, který mění normální buňku na nádorovou. Dochází k postupnému hromadění genetických a epigenetických změn. Přibližně u 55% MDS pacientů se nachází klonální cytogenetická aberace, u sekundárního MDS je to až 80%. Nejčastěji detekovanými aberacemi jsou úplné či částečné delece chromozomů, přídatné chromozomy a méně častými jsou vyvážené translokace (Haase D et al., 2007; Mallo M et al., 2011; Kern W et al., 2010; Gondek LP et al., 2008; Zemanova Z et al., 2014). 90% pacientů s MDS nese alespoň jednu somatickou mutaci v některém z genů mutovaných u myeloidních malignit.

1.2. Mutace v genu *TP53*

Vedle cytogenetických změn, které jsou součástí používaného prognostického systému IPSS-R, se do popředí dostávají také somatické mutace nacházející se v různých genech. V klinické praxi nejsou zatím rutinně používány, ale probíhá mezinárodní výzkum zaměřený na mutační analýzy a jejich zařazení do prognostického skórovacího systému (IPSS-Rm: The Revised International Prognostic Scoring System "Molecular").

Mutace v tumor supresorovém genu *TP53*, který je mutovaný u většiny nádorů včetně hematologických malignit, jsou v současné době nejvíce diskutovány. Je to klíčový regulační faktor celé řady genů ovlivňujících proliferaci, apoptózu, reparaci DNA a angiogenezi. *TP53* často podléhá bodovým záměnám, nejčastěji typu missense v DNA-vazebné doméně. Důsledkem mutací jsou zkrácené a nefunkční formy proteinu nebo konformačně pozměněný protein. Mutace v tomto genu jsou často spojovány s pokročilými stádii MDS, nachází se až u 70% pacientů s komplexním karyotypem a 35% pacientů s MDS související s terapií. U pacientů s nízkým rizikem se vyskytuje přibližně u 10% pacientů. (Sebaa A et al., 2012;

Fidler C et al., 2004; Kulasekararaj AG et al., 2013; Jädersten M et al., 2011; Sallman DA et al., 2017; Wong TN et al., 2015; Saft L et al. 2014).

1.3. Hypometylační léčba u MDS

Hypometylační terapie se v současné době používá v terapii nemocných s pokročilými formami MDS, kteří nejsou indikováni k transplantaci krvetvorných buněk (Itzykson R et al., 2011; Fenaux P, et al, 2011; Silverman LR et al., 2002; Diesch J et al., 2016). Princip terapie je založen na existenci abnormální epigenetické modifikaci, konkrétně abnormální DNA metylaci. Metylace DNA je reverzibilní proces a lze ji změnit pomocí specifických molekul, inhibitorů DNMT, jako jsou 5-azacytidin (azacitidin) nebo 5-aza-2'-deoxycitidin (decitabin). V České republice je léčba azacitidinem (obchodní název Vidaza) hrazena z prostředků veřejného zdravotního pojištění. Cílem terapie je zvýšení počtu červených krvinek, nezávislost na transfuzích, zvýšení hladiny hemoglobinu, zvýšení počtu bílých krvinek nebo krevních destiček a/nebo snížení procenta blastů v KD a celková stabilizace onemocnění. Azacitidin (AZA) je ribonukleosidový analog cytidinu s antineoplastickými účinky, které jsou řízeny hlavně dvěma mechanismy: inhibicí DNMT při nízkých dávkách, což vede k hypometylaci DNA; a přímou cytotoxicitu v abnormálních hematopoetických buňkách KD v důsledku inkorporace azacitidinu do DNA a RNA ve vysokých dávkách, což vede ke smrti buněk (Glover AB et al., 1987). Oba mechanismy snižují počet abnormálních krevních buněk a pomáhají řídit růst buněk.

Několik klinických studií ukázalo, že po podání AZA dosáhnou někteří pacienti trvalého hematologického zlepšení a terapie významně prodlouží OS (Itzykson R et al, 2011; Fenaux P et al., 2009; Zeidan AM et al., 2016). Nicméně pouze přibližně polovina pacientů reaguje na léčbu a výsledek pacientů po selhání léčby AZA je velmi špatný. Proto je žádoucí identifikovat pacienty, kteří budou na léčbu pozitivně reagovat a navrhnout alternativní přístupy k léčbě pacientů, kteří nereagují.

1.4. Bodové polymorfismy

SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) nebo-li jednonukleotidové (bodové) polymorfismy v sekvenci DNA jsou nejvíce rozšířené polymorfismy v genomu člověka. Jejich odhadované množství je několik milionů a tvoří asi 85% genetických polymorfismů člověka. SNPs se dále sdružují do bloků – haplotypů, které se zpravidla dědí společně. SNPs jsou vhodným genetickým markerem pro svoji frekvenci (na každých 500 až 1000bp), stabilitu a relativně rovnoměrné rozmístění v genomu. SNPs mohou sloužit k odhalování genetických predispozic k onemocněním v rámci asociačních studií, kdy se konkrétní varianta SNP, nalezená u jedinců s nemocí porovná se zdravými jedinci. Případná statisticky významná odlišnost upozorní, že tato alela nějakým způsobem s onemocněním souvisí nebo je ve vazebné nerovnováze (linkage disequilibrium) se skutečnou kauzální alelou a slouží tedy víceméně jako její marker. Sestavení podrobné SNPs mapy může být využito ke zjištění genů podílejících se na vzniku dané choroby.

2. CÍLE PRÁCE A HYPOTÉZY

Cílem předkládané disertační práce bylo s využitím moderních technologií molekulární genetiky zkoumat procesy podílející se na vzniku a rozvoji MDS.

Specifické cíle a hypotézy:

Hypotéza č. I.: U pacientů s MDS s nízkým rizikem se vyskytují mutace v genu *TP53* a mají zásadní vliv na průběh nemoci.

Cíle I.: Mutace v genu *TP53*

a) Zjistit incidenci mutací v genu *TP53* u MDS s nízkým rizikem.

- b) Zjistit vliv mutace na přežití pacientů.
- c) Určit velikost mutační zátěže v jednotlivých typech buněk.

Hypotéza č. II.: Existuje určitý expresní vzorec genů, který by mohl predikovat odpověď hypometylační léčby.

Cíle II.: Predikce léčebné odpovědi na hypometylační činidla.

- a) Zjistit, zda expresní profil pacientů před léčbou odpovídá reakci na terapii.
- b) Zjistit změny genové exprese vyvolané léčbou.

Hypotéza č. III.: Existují polymorfismy, které jsou sdruženy s MDS.

Cíle III.: Identifikace bodových polymorfismů asociovaných s MDS

3. KLINICKÉ SOUBORY, METODY A VÝSLEDKY

3.1 Mutace v genu *TP53*

3.1.1 Klinický soubor

Vzorky KD a / nebo PK byly získány od 154 pacientů léčených na Ústavu hematologie a krevní transfuze (n = 82) a 1. Interní kliniky - Klinika hematologie VFN a 1. LF UK v Praze (n = 72), Praha. Vzorky byly získány během rutinního klinického hodnocení. Dále bylo vyšetřeno 10 zdravých kontrolních vzorků odpovídajícího věku a dva vzorky pupečnickové krve. Čtyři z deseti kontrolních vzorků byly izolovány z KD a zbývajících šest vzorků bylo izolováno z PK. Průměrný věk kontrol byl 64,7 let (rozsah: 30-80 let). Všechny subjekty poskytly informovaný souhlas a studie byla schválena místní etickou komisí. Všichni pacienti byli klasifikováni podle IPSS kategorií. Do studie byli zařazeni pouze pacienti MDS spadající do skupiny s nižším rizikem progresu do AML. To znamená, pacienti s nízkým (n=70) nebo středním-1 rizikem (n=81) definovaných dle IPSS. Tři pacienty nebylo možné zařadit, protože cytogenetická data nebyla dostupná. Podle WHO 2008 klasifikace mělo 6 pacientů refrakterní anemii (RA), 6 refrakterní anemií s prstenčitými sideroblasty (RARS), 92 refrakterní cytopenií s multilineární dysplázií (RCMD), 6 RCMD s prstenčitými sideroblasty (RCMD-RS), 38 MDS s izolovanou delecí (5q) a 6 refrakterní anemií s přebytkem blastů 1 (RAEB-1). Průměrná doba sledování pacientů byla 58,6 měsíce (rozmezí: 0-253). Během této doby 23,4% pacientů (n=36) progredovalo (alespoň do RAEB-2) a 34% pacientů (n=53) zemřelo. Údaje od 58,4% pacientů (n=90) bylo cenzorováno k poslednímu známému dni a 7,1% (n=11) bylo cenzorováno ke dni transplantace hematopoetických kmenových buněk. Průměrná doba vyšetření mutačního stavu byla 32,1 měsíce (rozmezí: 0-131 měsíců). Celkově 103 pacientů (66,9%) obdrželo podpurnou léčbu, 8 pacientů (5,2%) bylo léčeno azacitidinem pro progresi onemocnění, 28 pacientů (18,2%) dostávalo lenalidomid a 2 pacienti (1,3%) dostali azacitidin po předchozí léčbě lenalidomidem.

3.1.2 Metody

Mononukleárních buňky byly separovány pomocí gradientové centrifugace a DNA byla izolována vysolovací metodou. Pro určení nukleotidové sekvence bylo použito amplikonové sekvenování genu *TP53* (exony 4-11) na přístroji GS Junior 454 (Roche, Indianapolis, IN). Na přípravu knihovny byly použity primery, které byly validovány v rámci IRON-II (Interlaboratory Robustness Of Next generation sequencing) European LeukemiaNet. Pokud byla objevena mutace, byly vyšetřeny i další buněčné populace (CD34+, CD34-, CD14+, CD3+, granulocyty, mononukleární buňky) a všechny dostupné předchozí i následné odběry. Celkově bylo vyšetřeno 310 vzorků na mutace v genu *TP53*. Mutace *TP53* byly anotovány pomocí databáze IARC TP53 (<http://p53.iarc.fr>). Ze sekvenačních dat jsme získali tzv. variantní alelickou frekvenci (VAF), která byla definována jako počet čtení nesoucí mutaci vydělená celkovým počtem čtení. 50% mutantní alelická zátěž v oblastech s diploidní DNA v

homogenní buněčné populaci naznačuje, že všechny buňky obsahující danou variantu jsou v heterozygotním stavu (100% buněk nese heterozygotní formu mutace). Kaplan-Meierova analýza byla použita pro odhad křivek přežití a log-rank test pro porovnání dvou kritérií. Srovnání dle jednotlivých sledovaných faktorů (univariátní analýza) bylo provedeno pomocí log-rank testu, multivariátní analýza Coxovou metodou. Korelace velikosti mutovaných klonů v různých typech buněk byla měřena pomocí Spearmanova korelačního koeficientu. P-hodnoty (oboustranný test) menší než 0,05 byly považovány za statisticky významné. Analýza byla provedena za použití IBM SPSS Statistics (IBM, NY, USA) a grafy byly připraveny za použití GraphPad Prism verze 6.00 (La Jolla, CA, USA).

3.1.3 Výsledky

TP53 mutace byly identifikovány u 1/8 pacientů s nižším rizikem MDS a 1/4 pacientů s del(5q).

Celkově jsme identifikovali 33 mutací u 20 ze 154 nízkorizikových pacientů (13,0%). Pacienti s del(5q) vykazovali nápadně zvýšenou prevalenci mutací ve srovnání s pacienty bez del(5q) 23,6% (17/72) oproti 3,8% (3/79). Šest pacientů mělo dvě mutace, jeden pacient měl tři mutace a jeden pacient nesl šest mutací. Všechny mutace byly lokalizovány v sekvenčně specifické DNA vazebné doméně p53.

TP53 mutace v různých buněčných liniích

Dále byla stanovena alelická frekvence mutací u různých typů buněk. CD3+ T-buňky byly použity jako kontroly pro rozlišení mutace zárodečné od somatické. Slabé % VAF detekované v těchto buňkách bylo pravděpodobně způsobené kontaminací mutovaných buněk v izolované frakci. Výsledky ukazují, že všechny zjištěné mutace v genu *TP53* jsou somatické. Mezi jednotlivými typy buněk KD a PK (CD34+, CD34-, CD14+ a granulocyty) byl spočítán korelační koeficient za použití Pearsonova korelačního testu (rozmezí: $r=0.833-0.933$).

Rozdělení pacientů podle velikosti mutovaného klonu a doby první detekce

Pomocí webového nástroje Cutoff Finder (<http://molpath.charite.de/cutoff/>) byla stanovena optimální hladina VAF, která rozdělila pacienty podle délky celkového přežití do několika skupin. Tato hladina byla stanovena na 6,21 % VAF (HR 14.36, 95% CI: 3.08–66.91; $p=3.7E-5$). Podle této hladiny byli pacienti s mutací rozděleni do tří skupin podle velikosti mutovaného klonu a doby, kdy se u nich poprvé objevila mutace. První skupinu tvořili pacienti, u nichž *TP53* mutace byla přítomna již v době diagnózy a ve větším % buněk (> 6% VAF). Tuto skupinu tvořilo 35% pacientů. Druhou skupinu reprezentovalo 35% pacientů a mutace byla diagnostikována také již v době diagnózy, ale pouze v malém počtu buněk (< 6% VAF). Poslední skupinu tvořilo 25% pacientů, u nichž mutace byla detekována až v průběhu onemocnění, v průměru 31,4 měsíce od stanovení diagnózy (rozmezí: 18.6-48 měsíců). Pouze jednoho pacienta s mutací jsme nemohli hodnotit, protože vzorek nebyl v době diagnózy dostupný. První dostupný vzorek byl až 8,75 roků od stanovení diagnózy a byla detekována sestříhová mutace s 1,61% VAF.

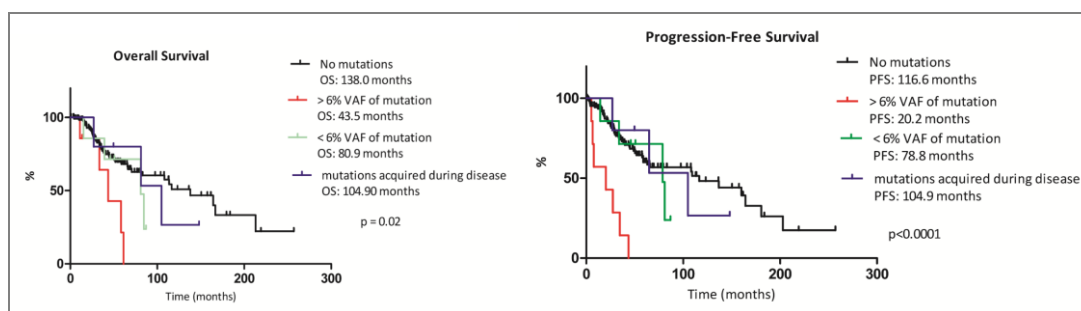
Univariátní analýza

Byla provedena jednorozměrná analýza OS a přežití bez progresu (PFS) k následujícím proměnným: věk, pohlaví, % blastů v KD, hodnota hemoglobinu a neutrofilů, počtu krevních destiček, IPSS, IPSS-R, del(5q) a mutace v genu *TP53*. Jako významné prediktory OS byly stanoveny: pohlaví ($p = 0,001$) a krevní destičky ($p = 0,017$). Pohlaví ($p = 0,001$), počet destiček ($p = 0,003$) a mutační stav *TP53* ($p = 0,037$) byly prediktory pro PFS.

Analýza prognostického vlivu *TP53* mutací na OS neodhalila žádné významné rozdíly v přežití mezi pacienty bez mutace a s mutací bez ohledu na velikost mutovaného klonu a doby detekce. Medián OS byl 138 měsíců ve skupině pacientů bez mutace a 80,9 měsíců ve

skupině s mutací ($p = 0,09$). Podrobnější analýza prognostického vlivu mutací, tzn. rozdělení pacientů do 3 skupin popsaných výše, výrazně změnila křivky přežití. První skupina pacientů s mutací detekovanou v době diagnózy s $VAF > 6\%$ (průměrná VAF: 43,4%; rozmezí: 23,9 až 76,8%) měla významně kratší OS 43,5 měsíců ve srovnání se skupinou bez mutace se 138 měsíci ($p = 0,003$; HR 12.2, 95% CI: 2.34-63.49). Druhá skupina, která zahrnovala pacienty s mutací *TP53* detekovanou v době diagnózy s $VAF < 6\%$ (průměrná VAF: 2,1%; rozmezí: 0,3 až 4,7%), a třetí skupina zahrnovala pacienty, kteří získali mutaci v průběhu onemocnění (průměr: 31,4 měsíců po stanovení diagnózy), nevykázaly významné změny v OS ($p = 0,77$ a $p = 0,99$). (Obrázek č.1).

Dále jsme analyzovali PFS podle mutačního statusu genu *TP53* s použitím Kaplan-Meierovy analýzy. Pacienti s mutací měli signifikantně kratší PFS ve srovnání s pacienty bez mutace (medián: 54,2 vs. 116,6 měsíce; $p = 0,033$; HR = 2,22, 95% CI: 1,07-4,63), bez ohledu na velikost mutovaného klonu a času první detekce (Obrázek č.12C). PFS se významně změnilo, pokud byli pacienti rozděleni do 3 skupin popsaných výše. PFS se rapidně snížil ve skupině pacientů s mutací detekovanou v době diagnózy a s $VAF > 6\%$ na 20,2 měsíce oproti 116,6 měsíců ve skupině bez mutace ($p < 0,0001$, HR = 79,46, 95% CI: 14,17 až 445,6). Ve skupině pacientů s mutací identifikovanou v době diagnózy a $VAF < 6\%$ a ve skupině pacientů, kteří získali mutace v průběhu onemocnění, jsme nezjistili žádné významné změny v PFS ($p = 0,53$ a $p = 0,79$). Obrázek č.1.



Obrázek č. 1. Celkové přežití (OS) a přežití bez progresu (PFS) podle mutačního statusu *TP53*. Pacienti rozděleni podle mutační zátěže a doby první detekce do čtyř skupin.

Multivariantní analýza

Byl použit Coxův regresní model proporcionálních rizik pro stanovení vlivu každé proměnné vzhledem k OS a PFS. Proměnné zahrnovaly: věk, pohlaví, % blastů v KD, hemoglobin, neutrofilů, počet krevních destiček, karyotyp, del(5q), rizikové skupiny IPSS, IPSS-R a *TP53* mutace. Multivariantní analýzou bylo zjištěno, že *TP53* mutace (HR 4,389, 95% CI: 1,842 - 10,455, $p = 0,001$), počet destiček (HR 0,451, 95% CI: 0,214-0,951; $p = 0,036$) a pohlaví (HR 2,777, 95% CI: 1,404-5,494; $p = 0,003$) jsou statisticky významné pro OS. *TP53* mutace (HR 3,743, 95% CI: 1,741-8,044; $p = 0,001$), pohlaví (HR 2,636, 95% CI: 1,409-4,930; $p = 0,002$) a počet krevních destiček (HR 0,386 95% CI: 0,198 až 0,752; $p = 0,005$) jsou statisticky významné pro PFS.

3.2 Predikce odpovědi na hypometylační léčbu

3.2.1 Klinický soubor

Byly vyšetřeny CD34+ hematopoetické pluripotentní buňky od 32 pacientů léčených azacitidinem a 10 zdravých kontrol. 19 pacientů bylo s diagnózou MDS, 3 pacienti s chronickou myelomonocytární leukémií (CMML) a 10 s akutní myeloidní leukémií s *myelodysplasií* příbuznými změnami (AML-MRC). Diagnózy byly stanoveny podle WHO klasifikace. Vzorky byly odebrány při rutinních vyšetřeních s informovaným souhlasem na Klinice hematologie 1 Interní kliniky VFN a Ústavu hematologie a krevní transfúze v Praze. Medián věku pacientů byl 68 let s rozsahem od 22 do 85 let. Medián věku kontrol byl 67 let

s rozsahem od 21 do 80 let. AZA byl podáván podle doporučení a to 75mg/m² denně po dobu 7 dnů každých 28 dnů. Medián podávaných cyklů léčby azacitidinem byl 13 s rozmezí od 3 do 32 cyklů. Odpověď byla hodnocena podle kritéria mezinárodní pracovní skupiny (IWG) pro MDS (Cheson BD et al., 2006) a AML (Cheson BD et al., 2003). Jako pacienti reagující na léčbu jsou považováni ti, kteří dosáhnou kompletní remise (CR), parciální remise (PR), kompletní remise ve dřeni (mCR) nebo hematologické zlepšení (HI). Jako pacienti nereagující na léčbu jsou považováni ti, kteří vykazují stabilitu nemoci (SD) a progresi nemoci (PD).

3.2.2 Metody

Mononukleárních buňky byly separovány pomocí gradientové centrifugace s roztokem Ficoll-Hypaque a RNA byla izolována pomocí guanidin-thiokyanát-fenol-chloroformové metody. HumanHT-12 V4 Expression BeadChip (Illumina, San Diego, CA) byl použit pro vytvoření profilů mRNA exprese. Kvantitativní PCR v reálném čase byla použita pro ověření expresních dat z microarray analýz

OS bylo definováno jako doba od zahájení léčby azacitidinem až do úmrtí z jakékoli příčiny. Pacienti, kteří zůstali naživu, byli cenzurováni v době posledního sledování. Kaplan-Meierova analýza byla použita pro stanovení křivek přežití. Statistické analýzy byly provedeny pomocí GraphPad Prism 4. Expresní hodnoty byly nejdříve normalizovány za použití kvantilové normalizace. Nepárový neparаметrický test (Mann-Whitney) byl použit pro porovnání hladin exprese. Dendrogram byl sestaven pomocí softwaru MeV, MultiExperiment Viewer, verze 4.9.0.

3.2.3 Výsledky

Charakteristika odpovědi pacientů na léčbu

Ve studii byly zpracovány vzorky od 32 pacientů, kteří postoupili léčbu azacitidinem. Odpověď léčby byla hodnocena mezi 3 až 8 cyklem. Devět pacientů (28,1%) progredovalo, 10 (31,3%) mělo onemocnění beze změn a 13 (40,6%) pacientů dosáhlo kompletní či částečné odpovědi na léčbu

Rozdílná genová mRNA exprese mezi pacienty s a bez odpovědi na léčbu před zahájením terapie

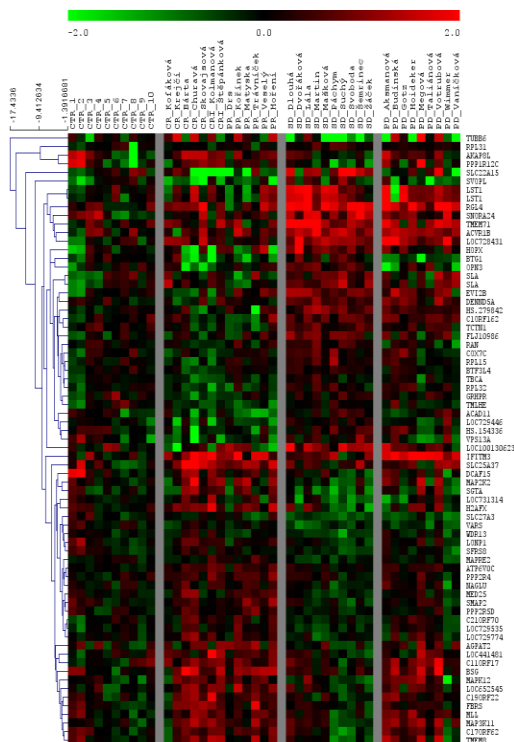
Expresní analýza byla provedena v CD34+ pluripotentních hematopoetických buňkách získaných od 32 pacientů před léčbou a 10 zdravých kontrol. Pacienti byli rozděleni podle odpovědi na respondery a nerespondery. Identifikovali jsme 52 odlišně exprimovaných genů ($p < 0,01$) mezi takto rozdělenými pacienty. Seznam genů byl anotován pomocí databáze DAVID <https://david.ncifcrf.gov/>. Tyto deregulované geny podle funkční anotace byly zařazeny: „ribozomy“ (4 geny: *RPL32*, *RPL28*, *RPL31* a *MRPS10*), "vazba nukleotidů" (12 genů: *MKI67IP*, *NKIRAS1*, *ACTG1*, *ACVR1B*, *GRHPR*, *MAST3*, *ACAD11*, *PPP2R4*, *PDK3*, *SLC27A3*, *TUBB6* a *VAR5*) a "mitochondrie" (7 genů: *MRPS10*, *NIT2*, *PDK3*, *SLC25A37*, *SLC27A3*, *TMLHE* a *VAR5*). V databázi KEGG PATHWAY byly zjištěny tyto deregulované dráhy: ribozom ($p = 0,02$; *RPL28*, *RPL31* a *RPL32*), a signální dráha Wnt ($p = 0,05$; *FRAT2*, *PPP2R5D* a *TBL1X*).

Rozdílná genová mRNA exprese mezi pacienty s odpovědí na léčbu a pacienty beze změny onemocnění před zahájením terapie

Bylo identifikováno 71 rozdílně exprimovaných genů. Nejčastěji zastoupené funkční kategorie mezi deregulovanými geny byly "ATP" (7 genů: *ATP6VOC*, *ACVR1B*, *LONP1*, *MAOK12* a *MAP2K2* a další), "protoonkogeny" (5 genů: *BTG1*, *HOPX*, *C11orf17*, *EVI2B* a *MLL*), a "buněčný cyklus" (7 genů: *H2AFX*, *RAN*, *ACVR1B*, *MAPRE2*, *MAPK12*, *MAP3K11* a *MLL*). „Ribozom“ ($p = 0,03$; *RPL15*, *RPL31*, a *RPL32*) a „MAPK signální dráha“ ($p = 0,05$;

MAPK12, *MAP3K11*, *MAP2K2*, a *ACVR1B*) byly identifikovány jako deregulované dráhy. Heatmapa z hierarchické shlukové analýzy těchto genů na obrázku č. 2

Celkově bylo nalezeno mezi skupinami pacientů rozdělených podle odpovědi 5 rozdílně exprimovaných genů souvisejících s ribozomy (*RPL15*, *RPL28*, *RPL31*, *RPL32*, *MRPS10*, *MRPS21*) a 13 ribosomálních pseudogenů (*RPS26L*, *LOC650646*, *LOC402057*, *LOC648103*, *LOC44087*, *LOC646785*, *LOC392008*, *LOC100131572*, *LOC390578*, *LOC100129952*, *LOC441550*, *LOC442162*, *LOC650646*, *LOC642210*). Byla nalezena korelace úrovně exprese ribosomálního genu *RPL28* a délkou přežití po podání azacitidinu.



Obrázek č. 2. Heatmapa 71 alterovaných genů mezi pacienty s odpovědí na léčbu a pacienty bez reakce (onemocnění beze změny).

Analýza genové exprese před a po léčbě AZA

Změna exprese 167 genů u responderů, 26 genů u nereagujících se stabilní chorobou a 13 genů u pacientů bez odpovědi s progresí onemocnění byla odhalena porovnáním hodnot exprese u pacientů před a po léčbě. Vennův diagram identifikoval 18 genů (*AGPAT2*, *ANKRD54*, *ELOVL1*, *FIZ1*, *FKBP2*, *GPR56*, *GRAMD4*, *HINT3*, *LOC93622*, *LPIN1*, *MLF2*, *MRPS18B*, *MYCN*, *PTK2*, *RAC3*, *RNASEH2C*, *LOC644511* a *SLC8A*; $P = 0,001$), u nichž došlo po léčbě k signifikantní změně exprese specificky u responderů, ale ne u pacientů bez odpovědi. Tyto geny by mohly být kandidáty pro sledování odpovědi na léčbu.

3.3 Bodové polymorfismy asociované s MDS

3.3.1 Klinický soubor

SNPs profil byl sestaven se vzorků 198 pacientů s *de novo* MDS nebo AML-MRC a kontrolní skupiny sestávající se z 292 vzorků kavkazské populace. Vzorky byly odebírány s informovaným souhlasem na Ústavu hematologie a krevní transfuze a Klinice hematologie 1. Interní kliniky VFN v Praze. Medián věku pacientů byl 63 let (rozsah: 18-89 let) a medián věku kontrol 61 let (rozsah: 19-98 let). Ženy tvořily 69,7% skupiny pacientů a 65,4% kontrol. Diagnózy MDS byly založené na standardních diagnostických WHO kritériích

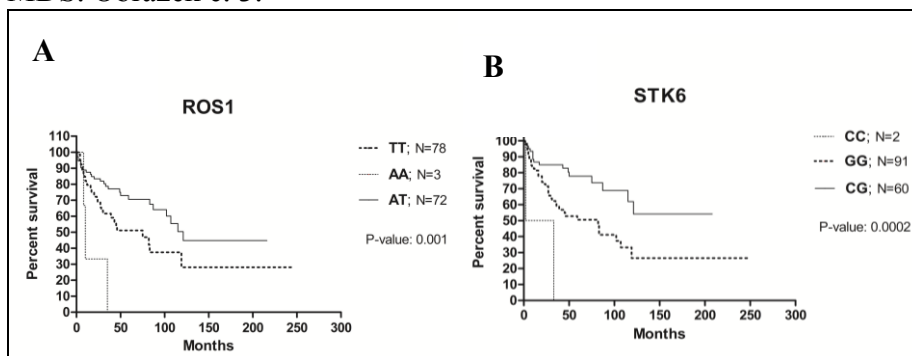
3.3.2 Metody

Na sestavení SNPs profilu byly použity granulocyty pacientů a kontrol. Granulocyty byly získány rozdělením podle jejich hmotnostního gradientu. Výsledky SNP analýzy byly ověřeny u tří vybraných genů (*LIG1*, *RAD52*, *GPX3*) pomocí SNPs TaqManAssay (Life Technologies, USA). CD3+ a CD14+ buňky byly použity pro rozlišení zárodečného nebo somatického původu genotypu příslušné alely v *LIG1*, *RAD52* a *GPX3* genech u 68 pacientů. Hrubá data byla importována do GenomeStudio V2009.2 (Illumina) pro shlukovací analýzy a kontrolu kvality genotypování. Výpočty byly provedeny v statistickém programovacím jazyku R (verze 2.12.0; R-project.org). Bylo vyřazeno celkem 35 vzorků s „call rate“ <90% a 15 SNP s „call rate“ <80%. Dále byly stanoveny odchylky od Hardy-Weinbergovi rovnováhy (HWE) v kontrolních vzorcích a dalších 22 SNP s p-hodnotami <3,56·10⁻⁵ (Bonferroni korekce pro mnohočetné testování: 0,05 / 1406) bylo odstraněno. Takže do další analýzy vstoupilo 1384 SNP a 455 vzorků. Byla použita korekce typu FDR (false-discovery rate) pro mnohočetné testování na 5% úrovni významu podle Benjamini–Hochberga. Při hodnocení byly použity následující statistické metody: Chí-kvadrát test, odds ratio (OR) - podíl šancí a 95 % interval spolehlivosti (CI). P-hodnoty (oboustranný test) menší než 0,05 byly považovány za statisticky významné. Křivky přežití byly vytvořeny pomocí Kaplan-Meierovy metody a rozdíly mezi genotypy byly hodnoceny pomocí log-rank testu.

3.3.3 Výsledky

SNP asociační studie

Analyzovali jsme 1 421 SNPs nacházejících se v 408 genech, které se určitým způsobem podílejí na karcinogenezi. Provedenou studií jsme detekovali devět bodových polymorfismů, které jsou asociovány s MDS (p <0,0002). Čtyři z těchto kandidátních SNPs se nachází v genech, jejichž funkcí jsou opravy DNA či ochrana před oxidačním poškozením (*LIG1*, *RAD52*, *MSH3* a *GPX3*). Dále, dva z devíti kandidátních SNPs se nachází v genech transmembránových transportérů (*ABCB1* a *SLC4A2*). Dále bylo zjištěno, že genotyp genů *ROS1* (c-ros oncogene 1) a *STK6* (aurora kinase A) souvisí s celkovým přežitím pacientů MDS. Obrázek č. 3.



Obrázek č. 3: Celkové přežití pacientů v závislosti na genotypu v genu *ROS1* a *STK6*

4. DISKUSE A ZÁVĚRY

4.1. Diskuze a závěry k tématu - Mutace v genu *TP53*

V tomto projektu jsme se zabývali přítomností mutací v tumor supresorovém genu *TP53* u pacientů s nízkým rizikem MDS, mutační zátěží v jednotlivých typech buněk a jejich vlivem na klinický průběh onemocnění. Výskyt mutací v genu *TP53* je častý a dobře popsán u solidních nádorů a v posledních letech je také zkoumán u hematologických onemocnění.

Jako nástroj pro detekci mutací jsme použili metodu NGS, která díky vysoké citlivosti je schopna zachytit mutace s nízkou frekvencí.

Mutace v genu *TP53* byly popsány u vysoce rizikového MDS a byly asociovány s komplexním karyotypem (Sallman et al., 2016; Sallman et al., 2017; Wong et al., 2015). V tomto projektu jsme se zaměřili na pacienty s nízkým rizikem s dobrou prognózou, nicméně jsou mezi nimi i pacienti, kteří progredují, aniž by bylo možné zjistit, z jakých příčin.

Vyšetřili jsme celkem 154 pacientů s nízkým rizikem MDS. Detekovali jsme 33 mutací u 20 pacientů (13%). Zjistili jsme asociaci mezi mutací *TP53* a *del(5q)*, kdy u 23,6% pacientů nesoucí *del(5q)* se vyskytovala mutace, ale pouze u 3,8% pacientů bez delece.

Dvě třetiny mutací byly detekovány již v době diagnózy a jedna třetina vznikla až v průběhu onemocnění. Většina mutací zjištěných u pacientů s nižším rizikem MDS měla nízkou hodnotu VAF (<6%). Tyto mutace lze nalézt pouze za použití citlivé NGS technologie, která je schopna identifikovat mutace s nízkým zastoupením. Některé z těchto identifikovaných mutací by nebyly detekovány klasickým Sangerovým sekvenováním, které má citlivost maximálně 20% VAF.

Negativní účinek malých *TP53* mutovaných subklonů na OS byl popsán u chronické lymfocytární leukémie (Rossi et al., 2014; Landau et al., 2013). Navíc Papaemmanuil a kol. (Papaemmanuil et al., 2013) ukázali, že subklonální události jsou pravděpodobně podobně prognosticky důležité jako klonální. Přesný prognostický význam malého *TP53* mutovaného klonu u pacientů s nízkým rizikem MDS však není znám. K posouzení dopadu mutační zátěže *TP53* na přežití MDS jsme určili optimální mezní hodnotu VAF pro zjištění rozdílů v přežití pacientů, která byla stanovena na úrovni 6%.

Pacienty bylo tedy možné rozdělit do 3 skupin, a to podle velikosti mutační zátěže (nad a pod 6% VAF) a doby prvního výskytu mutace. První skupina pacientů, u nichž byla mutace detekována již v době diagnózy s vyšší mutační zátěží (>6% VAF) měla median OS 43,5 měsíců oproti 138 měsícům pacientů bez mutace (HR 12.18; $p=0.003$). Stejně tak tato skupina pacientů měla zkrácené přežití bez progresu (PFS; progression-free survival) na 20,2 měsíce oproti 116,6 měsícům u pacientů bez mutace (HR 79.5; $p<0.0001$). Druhá skupina pacientů, u nichž byla mutace detekována v době diagnózy s <6% VAF a třetí skupina, která mutaci získala, až v průběhu nemoci, neměla signifikantně zkrácené OS a PFS oproti pacientům bez mutace. Tato zjištění naznačují, že malé *TP53*-mutované subklony nemají stejný nepříznivý prognostický dopad na OS a PFS, tak jako klony s vysokou mutační zátěží u pacientů s nižším rizikem MDS. To je v souladu se studií Jäderstena a kol., kteří zjistili, že malé *TP53*-mutované subklony mohou být stabilní určitou dobu před progresí onemocnění (Jädersten et al., 2011). Stejně tak, jako zjištění Wonga a kol., že v PK 44% zdravých jedinců ve věku 50 let je možné detekovat velmi malé subklony s mutací v genu *TP53* (Wong et al., 2015). Mutace v *TP53* se mohou objevit v různých fázích maligní transformace, mutace jsou přítomny jak u MDS s nižším rizikem, tak u pacientů s vyšším rizikem, stejně jako u AML. Mutace genu *TP53* pravděpodobně přispívají k různým krokům tohoto procesu (Rivlin et al., 2011). *TP53* mutace mohou iniciovat maligní transformaci u MDS s nižším rizikem, indukovat agresivnější růst klonů nebo poskytnout výhody přežití pro mutované buňky, jako je zvýšená proliferace nebo snížená apoptóza v pokročilých stádiích MDS. V naší kohortě pacientů přítomnost mutací *TP53* pravděpodobně představovala jednu z časných událostí maligní transformace. Nicméně naše zjištění naznačují, že pacienti s nízkým rizikem MDS mohou přežívat s malými subklony *TP53* po dobu několika let, na rozdíl od těch s vyššími riziky MDS a leukemií, jak je popsáno v některých studiích (Volkert et al., 2014; Rossi et al., 2014; Landau et al., 2013; Devillier et al., 2015). Předpokládáme, že pacienti s nižším rizikem MDS mají více indolentní formy MDS než pacienti s agresivním, proliferativním MDS a AML.

Zvětšení mutovaného klonu po léčbě LEN u většiny pacientů (deset z jedenácti pacientů) může odrážet selektivní tlak léčby na mutované buňky. Nicméně toto zvýšení

mutační zátěže v reakci na léčbu může trvat až několik let. V naší studii jsme nezaznamenali významné rozdíly v OS a PFS mezi skupinami pacientů léčených LEN s mutacemi a bez nich.

Dále jsme multivariantní analýzou zjistili, že *TP53* mutace (HR 3.7), pohlaví (HR 2.6) a počet destiček (HR 0.39) jsou nezávislé prognostické faktory pro PFS a *TP53* mutace (HR 4.4), pohlaví (HR 2.8) a počet destiček (HR 0.5) pro OS. Je zajímavé, že mužští pacienti s nízkým rizikem MDS měli horší prognózu než pacienti ženského pohlaví, tak jak bylo popsáno již dříve (Malcovati et al., 2005; Nösslinger et al., 2010). Stejně jako byla dříve popsána souvislost mezi nízkým počtem krevních destiček a horším přežíváním u pacientů s nižším rizikem MDS (Garcia-Manero et al., 2008; Jonasova et al., 2012).

Dále byla zjištěna korelace ve velikosti VAF mezi buňkami izolovanými z PK a KD, což naznačuje, že PK může sloužit jako spolehlivý materiál pro detekci genových mutací *TP53*, a že není nutné zatěžovat pacienty s aspirací KD. Dokonce i mutace s nízkou alelickou frekvencí (přibližně 1% VAF) byly detekovatelné ve vzorcích PK i KD. V naší studii jsme nezaznamenali žádný případ, kdyby byla mutace zjištěna pouze v KD, ale nebyla detekována v PK. Je možné, že při časném záchytu lze mutaci detekovat nejprve v KD a až později v PK, ale takový případ jsme nezaznamenali.

Závěrem lze říci, že naše studie poskytuje komplexní analýzu *TP53* mutací v různých typech buněk a sériových vzorcích pacientů výhradně s nižším rizikem MDS. Výsledky naznačují, že vyšetřování mutací v genu *TP53* u pacientů s nižším rizikem MDS s del(5q) by mělo být prováděno rutinně pro predikci rizik a umožnění včasné terapeutické intervence. Mutační analýza by měla být prováděna v době stanovení diagnózy, v průběhu choroby, a před zahájením léčby lenalidomidem. Mutace lze stanovovat na buňkách PK, protože výsledky odpovídají výsledkům z buněk KD. Naše data poskytují důkaz, že mutační status genu *TP53* je důležitým prediktorem PFS a OS, stejně jako počet krevních destiček a pohlaví, u pacientů s nižším rizikem MDS. Zvláště pak, velikost mutovaného klonu a fáze nemoci, kdy se mutace prvně objeví, představují významné faktory, které určují průběh nemoci.

Stanovené Cíle Ia), Ib) i Ic) byly splněny. Byla zjištěna incidence mutace v genu *TP53* u pacientů s nízkým rizikem MDS, vliv mutace na klinický průběh nemoci i určena mutační zátěž v jednotlivých typech buněk.

4.2 Diskuze a závěry k tématu - Predikce léčebné odpovědi na hypometylační činidla

Identifikace spolehlivých prediktivních biomarkerů pro epigenetickou léčbu by umožnila výběr individuální terapie, a proto je velmi žádoucí. V souladu s tím jsme provedli expresní profilování v CD34+ buňkách KD pacientů s MDS, rozdělených podle odpovědi na léčbu, a detekovali jsme geny, které by mohly predikovat výsledek léčby.

Funkční anotací rozdílně exprimovaných genů mezi pacienty s a bez odpovědi na léčbu jsme identifikovali zvýšenou hladinu mRNA několika ribozomálních genů. Pacienti s progresí měli hladinu ribozomálních genů nejvyšší. Navíc hladina exprese genu *RPL28* korelovala s délkou přežití. Dále byly zjištěny deregulované MAPK a Wnt signální dráhy, které se podílí na regulaci buněčné proliferace. Deregulované MAPK geny (*MAPK12*, *MAP3K11*, *MAP2K2* a *ACVR1B*) ovlivňují všechny tři cesty MAP kináz prostřednictvím genů *ERK*, *JNK* a *MAPK*. Změna DNA metylace komponent MAPK dráhy byla dříve popsána u pacientů s CMML léčených decitabinem, hypometylačním činidlem (Meldi et al., 2015). Jeden z účinků aktivace MAPK zahrnuje změny v translaci mRNA. Dále jsme zjistili změny v kanonické signální dráze Wnt, která se podílí na regulaci proliferace buněk prostřednictvím cílových genů, které pomáhají modulovat rychlost nebo frekvenci proliferace buněk.

Podle studie Sridhara a kol., up-regulace ribozomálních genů je spojena s transformací do AML (Sridhar et al., 2009) a narušení tvorby zralých ribozomů, které kontrolují biosyntézu bílkovin, je spojeno s maligním vývojem (Ruggero et al., 2003). Buňky se zvýšenou proliferací mají vyšší poptávku na syntézu bílkovin, a tyto nároky jsou splněny právě

prostřednictvím změn v rychlosti biogeneze ribozomu (Donati et al., 2012). V nedávně době byla v oblasti hematologie diskutována tzv. „Dameshekova hádanka“, která se zabývá paradoxem přechodu od hypo- k hyper-proliferaci při ribozomopatiích. Ribozomopatie jsou onemocnění, u kterých byly nalezeny mutace v proteinech, které se přímo nebo nepřímo podílejí na sestavování ribozomů (De Keersmaecker et al., 2015). Mezi ribozomopatie můžeme zařadit i MDS s izolovanou del(5q) (Barlow et al., 2010).

MDS s vyšším rizikem spolu s AML představují heterogenní skupinu maligních onemocnění charakterizovaných nekontrolovaným růstem klonálních leukemických krvetvorných buněk a je pro ně typické zvýšení proliferačních faktorů. Zjištěná zvýšená exprese ribozomálních genů u pacientů, kteří na léčbu AZA neodpověděli, odráží pravděpodobně vysokou míru proliferace spojenou s progresí a agresivitou nemoci. Domníváme se, že u pacientů s rozvinutou progresí, která odpovídá zvýšené proliferaci a tím zvýšeným nárokům na biogenezi ribozomů, nelze léčbou AZA již tento proces zvrátit.

Dále byla také zjištěná zvýšená úroveň exprese dvou onkogenů (*EVI2B* a *HOPX*) u pacientů bez odpovědi na léčbu. Gen *EVI2B* je lokalizován ve velkém intronu tumor supresorového genu *NFI* (Largaespada et al., 1995) a jeho vyšší hladina spolu s *EVI2A* byla detekována v buněčné linii myeloidní leukémie (Rücker et al., 2006). Úroveň exprese genu *HOPX* byla začleněna do prognostických modelů AML, kdy jeho zvýšená exprese je nezávislým negativním prognostickým faktorem (Lin et al., 2013).

U pacientů, kteří na léčbu reagovali, došlo po léčbě AZA k signifikantní změně exprese několika genů, které ovlivňují proliferaci (*MYCN*, *RAC3*, *PTK2*, *MLF2*). Gen *MYCN* patří do rodiny proto-onkogenů *MYC*, která kóduje transkripční faktory řídící proliferaci buněk, diferenciaci a apoptózu, a její nadměrná exprese může vést k tumorogenezi (Delgado et al., 2010). Členové rodiny *MYC* byli popsáni jako klíčoví regulátoři biogeneze ribozomů a kontroly translace (Boon et al., 2001). Gen *RAC3* hraje důležitou úlohu v mnoha biologických procesech a je spojován s neopláziemi. Jeho zvýšená exprese byla zjištěna v buněčné linii lidské chronické myeloidní leukémie K562 (Colo et al., 2007). Gen *PTK2* kóduje tyrosinkinázu podílející se na proliferaci, adhezi a migraci buněk a jeho exprese pozitivně koreluje s počtem bílých krvinek při diagnóze a mediánem přežití u AML (Recher et al., 2004). Navíc myeloidní leukemický faktor 2 (*MLF2*) je spojován s myeloidní leukémií.

AZA je ribonukleosid, to znamená, že do RNA se začleňuje v 80-90% a do DNA pouze v 10-20%. Inkorporace AZA do RNA vede k rozložení polyribosomů, defektům transferové RNA a inhibici produkce proteinů. Inkorporace AZA do DNA inhibuje metylaci DNA. Studie Gagnon-Kugler a kol. naznačila, že účinky inhibitorů metylace DNA obecně, včetně AZA, mohou být spíše způsobeny cytotoxickými účinky zprostředkovanými narušením biogeneze ribozomů, než reaktivací nádorových supresorových genů (Gagnon-Kugler et al., 2009; Moss et al., 2011). Přehledová práce Ruggera, týkající se ribozomů a nádorů, ukázala těsný vztah mezi těmito dvěma procesy (Ruggero et al., 2003). Buněčný růst a proliferace jsou spojeny se změnami rychlosti produkce ribozomů. Existuje důležitý vztah mezi buněčným cyklem a produkcí ribozomů. Tato rovnováha se udržuje v buňce prostřednictvím klíčových kontrolních bodů, které zajišťují, že translace proteinů nastává na příslušných úrovních a v určitých časech v buněčném cyklu. V nádorových buňkách může být tato rovnováha narušena, což vede k deregulaci syntézy rRNA.

Naše studie ukázala, že nereagující pacienti na AZA léčbu vykazovali vysokou expresi ribozomálních genů před léčbou, která pravděpodobně odrážela intenzivní proteosyntézu v proliferativních buňkách. Naše údaje podporují hypotézu, že možné selhání léčby je výsledkem vysoké míry proliferace a naznačují, že pokročilý stav onemocnění nelze zvrátit demetylační léčbou. Další studie jsou potřebné k potvrzení těchto výsledků v nezávislé kohortě pacientů.

Specifické cíle IIa) i IIb) byly splněny. Byla nalezena skupina genů, která by mohla predikovat reakci na léčbu, a byly popsány geny, jejichž exprese byla léčbou signifikantně ovlivněna.

4.2 Diskuze a závěry k tématu - Identifikace bodových polymorfismů asociovaných s MDS

Asociační studie byla provedena mezi vybranými SNPs a skupinou MDS pacientů. Nejvýznamnější asociaci vykazoval rs13240966 SNP ($p = 7.00E-11$), který se nachází v genu *SLC4A2*. Tento gen kóduje membránový transportní protein, který se podílí na regulaci intracelulárního pH. Zjistili jsme souvislost mezi homozygotním C/C genotypem a pacienty MDS (OR 4,86; 95% CI 2,74-8,62). Asociace tohoto SNP s rakovinou močového měchýře byla již dříve popsána (Andrew et al., 2009). Také jsme našli významnou asociaci mezi MDS a polymorfismem rs2235074 v genu, který kóduje další transmembránový protein patřící do transportérové rodiny ABC. Konkrétně gen *ABCBI*, který je zodpovědný za sníženou akumulaci léků v multilékově rezistentních buňkách a často je zodpovědný za odolnost vůči protinádorovým lékům. V naší kohortě pacientů, jedinci s heterozygotním genotypem A/G byli spojeni s náchylností k MDS (OR 3.79; 95% CI 2.30-6.24). Některé polymorfismy nacházející se v tomto genu byly již popsány u akutní lymfoblastické leukemie a byly spojeny se špatnou prognózou (Rao et al., 2010).

Gen kódující *LIG1* byl representován polymorfismem rs20580. Zjistili jsme vztah mezi homozygotním A/A genotypem tohoto genu a MDS ($p = 1.65E-06$; OR 3.28; 95% CI 1.77-6.06). Protein *LIG1* se účastní oprav DNA vystřížením nukleotidů (nucleotide excision repair, NER). Tento polymorfismus byl dáván do souvislosti s rakovinou plic (Lee et al., 2008). Nalezli jsme další dva polymorfismy v genech spojených s opravami DNA, které souvisely s MDS. První z těchto polymorfismů byl rs11226 SNP ($p = 1,70E-04$) genu *RAD52*, který se podílí na opravě dvouvláknové DNA a homologní rekombinaci. Druhý polymorfismus, rs3797896 ($p = 2,16E-04$) je lokalizován v genu *MSH3*, který je součástí oprav chybného párování bází (mismatch repair, MMR). Byly nalezeny další varianty genů zapojených do oprav DNA asociované s MDS ($p < 0,01$), včetně rs2238335 v genu *BLM*, rs2308327 v *MGMT*, rs4149963 v *EXO1a* a rs7607076 v *MSH2* genu. Několik studií ukázalo, že polymorfismy v genech reagující na DNA poškození (DNA damage-response genes, DDR) a v genech oprav DNA ovlivňují schopnost opravit poškozenou DNA (Shin et al., 2008; Beesley et al., 2007). Domníváme se, že poškození DNA způsobené neúčinnou detoxikací nebo defekty při opravě DNA mohou vést k chromozomální nestabilitě, která může být spojena s tvorbou nádorů či progresí. Tak se mohou genetické varianty podílet na vzniku MDS.

Další SNP detekovaný v této studii, s nímž MDS asociuje je rs732417 ($p = 7,76E-05$), který je umístěn v genu *STK6/AURKA*. *AURKA*, serin/threonin kináza, reguluje kontrolní body buněčného cyklu a udržuje genomickou integritu. Zjistili jsme spojení mezi heterozygotním C/G genotypem a rizikem vzniku MDS (OR 2,43, 95% CI 1,60 až 3,70). Určité alelické varianty tohoto genu jsou spojeny se změnami v expresi a zvýšeným rizikem vzniku rakoviny (Ewart-Toland et al., 2005; Matarasso et al., 2007). Stejně tak, jedinci s určitými polymorfismy v genu *AURKA* jsou významně náchylnější k rakovině močového měchýře (Andrew et al., 2009).

Výsledky získané z „čipové“ platformy byly validovány pomocí jiné genotypovací metody – SNPsTaqMan Assays. Korelační koeficient 0,99 mezi oběma platformami ukázal na dobrou korelaci dat. U vybraných polymorfismů (genů *LIG1*, *RAD52*, *GPX3*) byl navíc stanoven genotyp v CD3+ T lymfocytech a zároveň CD14+ monocytech pro potvrzení zárodečného původu polymorfismů.

V této studii jsme identifikovali několik genetických variant, které se mohou podílet na patogenezi MDS. Do vyšetřovaného souboru byli zařazeni striktně jen pacienti s primární formou MDS, protože zařazení pacientů se sekundární formou MDS by mohlo dezinterpretovat výsledky. Tento typ MDS vzniká následně po podané léčbě jiného typu rakoviny a mohli bychom tak detekovat SNPs související s odlišnou formou nádoru.

5. SOUHRN

I když je MDS desítky let v zájmu vědců, a je intenzivně zkoumán nově vyvinutými metodami, přesná patogeneze tohoto heterogenního onemocnění nebyla stále objasněna. V současné době jsou usilovně zkoumány genetické i epigenetické změny hematopoetických kmenových buněk, které dokazují klonální vícestupňový proces onemocnění. U části pacientů, kteří transformují od časných/premaligních forem po stavy pokročilé, které již plně odpovídají nádorovému onemocnění, můžeme pozorovat vlastně *in vivo* model vzniku leukemie.

Stejně jako u ostatních nádorových onemocnění bývá MDS diagnostikováno v pokročilejším věku a souvisí s procesem stárnutí, kdy dochází k akumulaci genetických změn a klesá schopnost oprav DNA. Předpokládáme, že na základě určitých genetických predispozic a schopností reagovat na endogenní a exogenní podněty, se u části starší populace rozvine MDS. U pacientů se sekundárním MDS, i když mají podobné klinické projevy jako pacienti s primárním MDS, se jedná o jinou iniciaci onemocnění, kde jejich genom je poškozen léčbou předchozího nádorového onemocnění.

Cílem práce bylo zkoumat procesy podílející se na vzniku a rozvoji MDS. Konkrétně byla řešena tři témata s následujícími závěry:

I. U MDS pacientů s nízkým rizikem a del(5q) je mutace v genu *TP53* častější (23,6%) než u pacientů bez delece (3,8%). Detekovaná mutace slouží jako nejsilnější nepříznivý prognostický marker pro OS i PFS. Malé *TP53* mutované subklony nemají stejný nepříznivý prognostický dopad jako klony s velkou mutační zátěží. Mutace byly zachyceny v PK i KD se stejnou frekvencí. Na základě zjištěných skutečností se domníváme, že by mělo být určování mutací v genu *TP53* u pacientů s nízkým rizikem MDS prováděno rutinně v době stanovení diagnózy, v průběhu choroby, a před zahájením léčby.

II. Identifikovali jsme zvýšenou expresi několika ribozomálních genů u pacientů bez odpovědi před zahájenou léčbou AZA, což pravděpodobně odráželo intenzivní proteosyntézu v buňkách se zvýšenou proliferací. Předpokládáme, že selhání léčby je výsledkem vysoké míry proliferace a pokročilého stavu onemocnění, který nelze demetylační léčbou zvrátit. Dále jsme identifikovali několik genů, jejichž exprese se po podání AZA změnila výhradně u reagujících pacientů, a mohly by sloužit jako markery pro sledování úspěšné terapie.

III. Nalezli jsme devět bodových polymorfismů, které byly asociovány s MDS fenotypem. Z toho tři SNPs se nacházejí v DNA reparačních genech (*LIG1*, *RAD52*, *MSH3*) a jeden SNP v genu, který chrání buňky před oxidačním poškozením (*GPX3*). Tyto geny by mohly být zapojeny do vzniku MDS. Dále byly identifikovány dva SNPs (*ROS1*, *STK6*), jejichž genotyp byl asociován s celkovým přežitím pacientů.

6. LITERATURA

Andrew AS, Gui J, Sanderson AC, et al. Bladder cancer SNP panel predicts susceptibility and survival. *Hum Genet* 2009, 125:527–539.

Arber DA, Orazi A., Hasserjian R et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*, 2016; 127(20), 2391–2406.

Barlow JL, Drynan LF, Trim NL, et al. New insights into 5q- syndrome as a ribosomopathy. *Cell Cycle*.2010;9:4286-93.

Beesley J, Jordan SJ, Spurdle AB, et al. Association between single-nucleotide polymorphisms in hormone metabolism and DNA repair genes and epithelial ovarian cancer: results from two Australian studies and an additional validation set. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007, 16:2557–2565.

Boon K, Caron HN, van Asperen R, et al. N-myc enhances the expression of a large set of genes functioning in ribosome biogenesis and protein synthesis. *EMBO J*. 2001; 20, 383–93.

Colo GP, Rosato RR, Grant S, Costas MA. RAC3 down-regulation sensitizes human chronic myeloid leukemia cells to TRAIL-induced apoptosis. *FEBS Lett*. 2007;581:5075-81.

De Keersmaecker K, Sulima SO, Dinman JD. Ribosomopathies and the paradox of cellular hypo- to hyperproliferation. *Blood*. 2015;125:1377-82.

Delgado MD, León J. Myc roles in hematopoiesis and leukemia. *Genes Cancer*. 2010;1:605-16.

Devillier R, Mansat-De Mas V, Gelsi-Boyer V, et al. Role of ASXL1 and TP53 mutations in the molecular classification and prognosis of acute myeloid leukemias with myelodysplasia-related changes. *Oncotarget*. 2015; 6: 8388-8396.

Diesch J, Zwick A, Garz AK, et al. A clinical-molecular update on azanucleoside-based therapy for the treatment of hematologic cancers. *Clin Epigenetics*. 2016 Jun 21;8:71.

Donati G, Montanaro L, Derenzini M. Ribosome biogenesis and control of cell proliferation: p53 is not alone. *Cancer Res*. 2012;72(7):1602-7.

Ewart-Toland A, Dai Q, Gao YT, et al. Aurora-A/STK15 T + 91A is a general low penetrance cancer susceptibility gene: a meta-analysis of multiple cancer types. *Carcinogenesis* 2005, 26:1368–1373.

Fenaux P, Giagounidis A, Selleslag D, et al. A randomized phase 3 study of lenalidomide versus placebo in RBC transfusion-dependent patients with Low-/Intermediate-1-risk myelodysplastic syndromes with del5q. *Blood*. 2011 Oct 6;118(14):3765-76.

Fenaux P, Mufti GJ, Hellstrom-Lindberg E, et al. International Vidaza High-Risk MDS Survival Study Group. Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomised, open-label, phase III study. *Lancet Oncol*. 2009, 10(3): 223–232.

Fidler C, Watkins F, Bowen DT, et al., NRAS J. FLT3 and TP53 mutations in patients with myelodysplastic syndrome and a del(5q). *Haematologica*. 2004;89(7):865-866.

Gagnon-Kugler T, Langlois F, Stefanovsky V, et al. Loss of human ribosomal gene CpG methylation enhances cryptic RNA polymerase II transcription and disrupts ribosomal RNA processing. *Mol Cell*. 2009 Aug 28;35(4):414-25.

Garcia-Manero G, Shan J, Faderl S, et al. A prognostic score for patients with lower risk myelodysplastic syndrome. *Leukemia*. 2008; 22: 538-543

Glover AB, Leyland-Jones B. Biochemistry of azacitidine: a review. *Cancer Treat Rep*. 1987; 71:959-64.

Gondek LP, Tiu R, O'Keefe CL, et al. Chromosomal lesions and uniparental disomy detected by SNP arrays in MDS, MDS/MPD, and MDS-derived AML. *Blood*. 2008 Feb 1;111(3):1534-42.

Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, et al. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood*, 2012; 120(12), 2454–2465.

Haase D, Germing U, Schanz J, et al. New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: evidence from a core dataset of 2124 patients. *Blood*. 2007; 110:4385-4395.

Itzykson R, Thépot S, Quesnel B, et al. Groupe Francophone des Myelodysplasies(GFM). Prognostic factors for response and overall survival in 282 patients with higher-risk myelodysplastic syndromes treated with azacitidine. *Blood* 2011 Jan 13, 117(2): 403-411.

Jädersten M, Saft L, Smith A, et al. TP53 mutations in low-risk myelodysplastic syndromes with del(5q) predict disease progression. *J Clin Oncol*. 2011;29(15):1971-1979.

Jonasova A, Cermak J, Vondrakova J, et al. Thrombocytopenia at diagnosis as an important negative prognostic marker in isolated 5q- MDS (IPSS low and intermediate-1). *Leuk Res*. 2012; 36: e222-224.

Kern W, Haferlach C, Schnittger S, et al. Clinical utility of multiparameter flow cytometry in the diagnosis of 1013 patients with suspected myelodysplastic syndrome: correlation to cytomorphology, cytogenetics, and clinical data. *Cancer*. 2010 Oct 1;116(19):4549-63.

Kulasekararaj AG, Smith AE, Mian SA, et al. TP53 mutations in myelodysplastic syndrome are strongly correlated with aberrations of chromosome 5, and correlate with adverse prognosis. *Br J Haematol*. 2013;160(5):660-672.

Landau DA, Carter SL, Stojanov P, et al. Evolution and impact of subclonal mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Cell*. 2013; 152: 714-726.

Largaespada DA, Shaughnessy Jr JD, Jenkins NA, et al. Retroviral integration at the Evi-2 locus in BXH-2 myeloid leukemia cell lines disrupts Nfl expression without changes in steady-state Ras-GTP levels. *J Virol* 1995; 69: 5095–102.

Lee YC, Morgenstern H, Greenland S, et al. A case-control study of the association of the polymorphisms and haplotypes of DNA ligase I with lung and upper-aerodigestive-tract cancers. *Int J Cancer* 2008, 122:1630–1638.

Lin CC, Chiu YC, Hou HS, et al. Clinical and Prognostic Relevance of Expression of Homeodomain-Only Protein Homeobox (HOPX) in Acute Myeloid Leukemia. 2013; *Blood*: 122.Abstract .

Malcovati L, Porta MG, Pascutto C. Prognostic factors and life expectancy in Myelodysplastic syndromes classified according to WHO criteria: A basis for clinical decision making. *J Clin Oncol*. 2005; 23: 7594-7603

Matarasso N, Bar-Shira A, Rozovski U, et al. Functional analysis of the Aurora Kinase A Ile31 allelic variant in human prostate. *Neoplasia* 2007, 9:707–715.

Meldi K, Qin T, Buchi F, et al. Specific molecular signatures predict decitabine response in chronic myelomonocytic leukemia. *J Clin Invest*. 2015;125:1857-72.

Moss T. DNA methyltransferase inhibition may limit cancer cell growth by disrupting ribosome biogenesis. *Epigenetics*. 2011 Feb;6(2):128-33.

Nimer SD. Myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2008;111(10):4841-4851.

Nösslinger T, Tüchler H, Germing U, et al. Prognostic impact of age and gender in 897 untreated patients with primary myelodysplastic syndromes. *Ann Oncol*. 2010; 21: 120-125.

Papaemmanuil E, Gerstung M, Malcovati L, et al, Chronic Myeloid Disorders Working Group of the International Cancer Genome Consortium. Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2013 Nov 21;122(22):3616-27.

Rao DN, Anuradha C, Vishnupriya S, et al. Association of an MDR1 gene (C3435T) polymorphism with acute leukemia in India. *Asian Pac J Cancer Prev* 2010, 11:1063–1066.

Recher C, Ysebaert L, Beyne-Rauzy O, et al. Expression of focal adhesion kinase in acute myeloid leukemia is associated with enhanced blast migration, increased cellularity, and poor prognosis. *Cancer Res*. 2004;64:3191-7.

Rivlin N, Brosh R, Oren M, et al. Mutations in the p53 tumor suppressor Gene important milestones at the various steps of tumorigenesis. *Genes Cancer*. 2011; 2: 466-474. Rossi D, Khiabani H, Spina V, et al. Clinical impact of small TP53 mutated subclones in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2014; 123: 2139-2147.

Rücker FG, Sander S, Döhner K, et al. Molecular profiling reveals myeloid leukemia cell lines to be faithful model systems characterized by distinct genomic aberrations. *Leukemia*. 2006;20:994-1001.

Ruggero D, Pandolfi PP. Does the ribosome translate cancer? *Nat Rev Cancer*. 2003; 3:179-92.

Saft L, Karimi M, Ghaderi M, et al. p53 protein expression independently predicts outcome in patients with lower-risk myelodysplastic syndromes with del(5q). *Haematologica*. 2014 Jun;99(6):1041-9.

- Sallman DA, Komrokji R, List A, et al. 'TP53 mutation allele-burden and disease outcome in MDS/AML'. *Leukemia*. 2017 Mar;31(3):767-768.
- Sebaa A, Ades L, Baran-Marzack F, et al. Incidence of 17p deletions and TP53 mutation in myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia with 5q deletion. *Genes Chromosomes Cancer*. 2012;51(12):1086-1092.
- Shin A, Lee KM, Ahn B, et al. Genotype-phenotype relationship between DNA repair gene genetic polymorphisms and DNA repair capacity. *Asian Pac J Cancer Prev* 2008, 9:501–505.
- Silverman LR, Demakos EP, Peterson BL, et al. Randomized controlled trial of azacitidine in patients with the myelodysplastic syndrome: a study of the cancer and leukemia group B. *J Clin Oncol*. 2002; 20:2429-40.
- Sridhar K, Ross DT, Tibshirani R, et al. Relationship of differential gene expression profiles in CD34⁺ myelodysplastic syndrome marrow cells to disease subtype and progression. *Blood*. 2009;114(23):4847-4858.
- Volkert S, Kohlmann A, Schnittger S, et al. Association of the type of 5q loss with complex karyotype, clonal evolution, TP53 mutation status, and prognosis in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *Genes Chromosomes Cancer*. 2014; 53: 402-410.
- Wong TN, Ramsingh G, Young AL, et al. The role of TP53 mutations in the origin and evolution of therapy-related AML. *Nature*. 2015; 518: 552-555.
- Zeidan AM, Sekeres MA, Garcia-Manero G, et al. Comparison of risk stratification tools in predicting outcomes of patients with higher-risk myelodysplastic syndromes treated with azanucleosides. *Leukemia*. 2016; 30: 649-57.
- Zemanova Z, Michalova K, Jonasova A, et al. Involvement of deleted chromosome 5 in complex chromosomal aberrations in newly diagnosed myelodysplastic syndromes (MDS) is correlated with extremely adverse prognosis. *Leuk Res*. 2014 May;38(5):537-44.

PUBLIKACE AUTORA K TÉMATU DISERTACE

Publikace, které jsou podkladem disertace

Belickova M, Vesela J, Jonasova A, Vesela J, Votavova H, Merkerova MD, Zemanova Z, Brezinova J, Mikulenkova D, Lauermannova M, Valka J, Michalova K, Neuwirtova R, Cermak J. *TP53* mutation variant allele frequency is a potential predictor for clinical outcome of patients with lower-risk myelodysplastic syndromes. *Oncotarget*. 2016 Jun 14;7(24):36266-36279. **IF=5.168**

Belickova M, Merkerova MD, Stara E, Vesela J, Sponerova D, Mikulenkova D, Brdicka R, Neuwirtova R, Jonasova A, Cermak J. DNA repair gene variants are associated with an increased risk of myelodysplastic syndromes in a Czech population. *J Hematol Oncol*. 2013; 6:9. **IF=6.350**

Belickova M, Merkerova MD, Votavova H, Valka J, Vesela J, Vesela J, Hajkova H, Klema J, Cermak J, Jonasova A. Up-regulation of ribosomal genes is associated with a poor response to azacitidine in myelodysplasia and related neoplasms. *Int J Hematol*. 2016 Nov;104(5):566-573. **IF=1.610**

Ostatní publikace za dobu studia

Valka J, Vesela J, Votavova H, Dostalova-Merkerova M, Horakova Z, Campr V, Brezinova J, Zemanova Z, Jonasova A, Cermak J and **Belickova M**. Differential expression of homologous recombination DNA repair genes in the early and advanced stages of myelodysplastic syndrome. *European Journal of Haematology*. „Under Review“ **IF=2.653**

Krejčík Z, **Belickova M**, Hrustincova A, Votavova H, Cermak J, Jonasova A, and Dostalova Merkerova M. MicroRNA profiles as predictive markers of response to azacitidine therapy in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. *Disease Markers*. „Under Review“ **IF=2.348**

Dostalova Merkerova M, Hrustincova A, Krejčík Z, Votavova H, Ratajova E, Cermak J, **Belickova M**. Microarray profiling defines circulating microRNAs associated with myelodysplastic syndromes. *Neoplasma*. 2017 May 9;64. **IF=1.871**

Svobodova K, Zemanova Z, Lhotska H, Novakova M, Podskalska L, **Belickova M**, Brezinova J, Sarova I, Izakova S, Lizcova L, Berkova A, Siskova M, Jonasova A, Cermak J, Michalova K. Copy number neutral loss of heterozygosity at 17p and homozygous mutations of TP53 are associated with complex chromosomal aberrations in patients newly diagnosed with myelodysplastic syndromes. *Leuk Res*. 2016;42:7-12. **IF=2.501**

Krejčík Z, **Beličková M**, Hruštinová A, Kléma J, Zemanová Z, Michalová K, Čermák J, Jonášová A, Dostálová Merkerová M. Aberrant expression of the microRNA cluster in 14q32

is associated with del(5q) myelodysplastic syndrome and lenalidomide treatment. *Cancer Genetics*. 2015;208(4):156-61. **IF=1.930**

Merkerova MD, Krejcik Z, **Belickova** M, Hrustincova A, Klema J, Stara E, Zemanova Z, Michalova K, Cermak J, Jonasova A. Genome-wide miRNA profiling in myelodysplastic syndrome with del(5q) treated with lenalidomide. *Eur J Haematol*. 2015 Jul;95(1):35-43. **IF=2.653**

Neuwirtova R, Fuchs O, Holicka M, Vostry M, Kostecka A, Hajkova H, Jonasova A, Cermak J, Cmejla R, Pospisilova D, **Belickova** M, Siskova M, Hochova I, Vondrakova J, Sponerova D, Kadlcikova E, Novakova L, Brezinova J, Michalova K. Transcription factors Fli1 and EKLF in the differentiation of megakaryocytic and erythroid progenitor in 5q- syndrome and in Diamond-Blackfan anemia. *Ann Hematol*. 2013;92(1):11-8. **IF=2.919**

Belickova M, Cermak J, Dostalova Merkerova M, Vesela J, Krejcik Z, Cechova E, Zemanova Z, Michalova K, Votavova H, Caniga M, Neuwirtova R, Jonasova A. Changes Associated With Lenalidomide Treatment in the Gene Expression Profiles of Patients With Del(5q). *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2012;12(5):375-83. **IF=2.494**

Curik N, Burda P, Vargova K, Pospisil V, **Belickova** M, Vlckova P, Savvulidi F, Necas E, Hajkova H, Haskovec C, Cermak J, Krivjanska M, Trneny M, Laslo P, Jonasova A, Stopka T. 5-Azacitidine in aggressive myelodysplastic syndromes regulates chromatin structure at PU.1 gene and cell differentiation capacity. *Leukemia*. 2012;26(8):1804-11. **IF=11.702**

Merkerova MD, Bystricka D, **Belickova** M, Krejcik Z, Zemanova Z, Polak J, Hajkova H, Brezinova J, Michalova K, Cermak J. From cryptic chromosomal lesions to pathologically relevant genes: integration of SNP-array with gene expression profiling in myelodysplastic syndrome with normal karyotype. *Genes Chromosomes Cancer*. 2012;51(5):419-28. **IF=3.696**

Cechova H, Lassuthova P, Novakova L, **Belickova** M, Stemberkova R, Jencik J, Stankova M, Hrabakova P, Pegova K, Zizkova H, Cermak J. Monitoring of methylation changes in 9p21 region in patients with myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. *Neoplasma*. 2012;59(2):168-74. **IF=1.871**

Votavova H, Grmanova M, Dostalova Merkerova M, **Belickova** M, Vasikova A, Neuwirtova R, Cermak J. Differential expression of microRNAs in CD34+ cells of 5q- syndrome. *J Hematol Oncol*. 2011; 6;4:1. **IF=6.350**

Dostalova Merkerova M, Krejcik Z, Votavova H, **Belickova** M, Vasikova A, Cermak J. Distinctive microRNA expression profiles in CD34+ bone marrow cells from patients with myelodysplastic syndrome. *Eur J Hum Genet*. 2011 Mar;19(3):313-9. **IF=4.287**

Vasikova A, **Belickova** M, Budinska E, Cermak J. A distinct expression of various gene subsets in CD34+ cells from patients with early and advanced myelodysplastic syndrome. *Leuk Res*. 2010;34(12):1566-72. **IF=2.501**

Vasikova A, Budinska E, **Belickova** M, Cermak J, Bruchova H. Differential gene expression of bone marrow CD34+ cells in early and advanced myelodysplastic syndrome. *Neoplasma*. 2009;56(4):335-42. **IF=1.871**

Merkerova M, Vasikova A, **Belickova** M, Bruchova H. MicroRNA expression profiles in umbilical cord blood cell lineages. *Stem Cells Dev*. 2010 Jan;19(1):17-26. **IF=3.562**

Merkerova M, **Belickova** M, Bruchova. Differential expression of microRNAs in hematopoietic cell lineages. *H. Eur J Haematol*. 2008;81(4):304-10. **IF=2.598**

Veselovska J, Pospisilova D, Pekova S, Horvathova M, Solna R, Cmejlova J, Cmejla R, **Belickova** M, Mihal V, Stary J, Divoky. Most pediatric patients with essential thrombocythemia show hypersensitivity to erythropoietin in vitro, with rare JAK2 V617F-positive erythroid colonies. *V. Leuk Res*. 2008;32(3):369-77. **IF=2.501**

Cukrová V, Neuwirtová R, Dolezalová L, **Belicková** M, Bartůnková J, Jonášová A, Cermák J, Homolková H, Malíková I. Defective cytotoxicity of T lymphocytes in myelodysplastic syndrome. *Exp Hematol*. 2009 Mar;37(3):386-94. **IF=2.820**

Jonášová A, Červinek L, Bělohávková P, Čermák J, **Beličková** M, Rohoň P, Černá O, Hochová I, Šišková M, Kačmářová K, Janoušová E. Lenalidomide treatment in myelodysplastic syndrome with 5q deletion--Czech MDS group experience. *Vnitr Lek*. 2015 Dec;61(12):1028-33.

Hodnota IF byla určena ke 26.06.2017.