

Univerzita Karlova

1. lékařská fakulta

Studijní program: Biomedicína

Studijní obor: Fyziologie a patofyziologie člověka



UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta

MUDr. Ľubomír Minařík

Role somatických mutací v patogenezi myelodysplastického syndromu

The role of somatic mutations in the pathogenesis of myelodysplastic syndrome

Disertační práce

Školitel: prof. MUDr. Tomáš Stopka, PhD.

Konzultant: doc. MUDr. Anna Jonášová, PhD.

Praha, 2023

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně dle připomínek školitele prof. MUDr. Tomáše Stopky, PhD. a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 29.9.2023

Ľubomír Minařík

Podpis

Identifikační záznam:

MINAŘÍK, Lubomír. *Role somatických mutací v patogenezi myelodysplastického syndromu. [The role of somatic mutations in the pathogenesis of myelodysplastic syndrome.]* Praha, 2023. 65 s., 6 příloh. Disertační práce. Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta, BIOCEV. Školitel Stopka, Tomáš.

Poděkování:

Chtěl bych poděkovat svému školiteli prof. MUDr. Tomášovi Stopkovi, PhD. za motivující přístup, vědecké nadšení a přínosné diskuze během celé doby studia. V jeho laboratoři jsem se setkal s příjemnou pracovní atmosférou. Za velmi přínosné rady vděčím všem kolegům přírodovědcům.

Stejnou mírou bych chtěl poděkovat prof. MUDr. Markovi Trněnému, CSc. a doc. MUDr. Anně Jonášové, PhD., pod kterých dohledem jsem pracoval jako lékař na I. interní klinice VFN v Praze. Velké poděkování patří všem kolegům lékařům, sestřám a dalším pracovníkům této skvělé kliniky.

V neposlední řadě děkuji rodičům, prarodičům, sourozencům a manželce Petronele za jejich podporu, lásku a trpělivost.

Děkuji taky všem pacientům a dárčům, bez kterých by žádný výzkum nebyl možný.

Disertační práce byla vytvořena s podílem grantové podpory:

GAČR: 22-20217K

AZV: NV19-08-00144

NU21-08-00312

NU22-05-00374

Studentské granty: Univerzita Karlova GAUK 1672119

SVV260521)

Institucionální: Univerzita Karlova UNCE/MED/016

Cooperation (Q26)

National Institute for Cancer Research (reg. No. LX22NPO5102) — Next Generation EU, Program EXCELES)

Práce byla vypracovaná v Centru BIOCEV – Biotechnology and Biomedicine Centre of the Academy of Sciences and Charles University (CZ.1.05/1.1.00/02.0109), jež byl financován z European Regional Development Fund.

Obsah:

Abstrakt (CZ)	7
Klíčová slova	8
Abstract (EN)	9
Keywords	10
Seznam zkratek	11
Literární přehled	15
1. Úvod	15
2. Epidemiologie myelodysplastického syndromu	16
3. Klinický obraz myelodysplastického syndromu	16
4. Etiopatogeneze myelodysplastického syndromu	19
5. Somatické mutace u myelodysplastického syndromu	21
6. Vysoce rizikový myelodysplastický syndrom a jeho terapie	29
Cíle disertační práce	31
Výsledky	32
Shrnutí výsledků	34
Diskuze	50
Závěr	56
Seznam použité literatury	58
Přílohy	65

Abstrakt:

Myelodysplastické syndromy (MDS) představují soubor závažných hematologických onemocnění charakterizovaných neefektivní klonální hematopoézou v kostní dřeni, vedoucí k cytopenii v periferní krvi, vznikem transfuzní závislosti a s vysokým rizikem progresu do akutní myeloidní leukemie (AML). Onemocnění je podmíněno genetickými a epigenetickými změnami vedoucími ke vzniku patologických kmenových buněk, jež nejsou schopny dostatečně vyzávat v kostní dřeni do krevních elementů. Tyto změny jsou mezi pacienty velmi rozličné, což se odráží v různé klinické manifestaci, dosažení odpovědi na léčbu, celkovém přežití a v neposlední řadě tato heterogenita představuje i jistou výzvu ke studiu tohoto onemocnění. Podstatou předkládané disertační práce je studium patofyziologických projevů a konsekvencí vybraných genetických změn, především somatických mutací klíčových genů a dalších funkčních jednotek genomu, ve vztahu ke klinickému průběhu MDS a transformace do AML. Terapie vysoce rizikového MDS je aktuálně založena na hypometylačních lécích včetně 5-azacytidinu (AZA). Léčba vede k prodloužení vývoje onemocnění do AML, tento osud je ale nezvratný u drtivé většiny pacientů, kterých prognóza se v tento okamžik stává beznadějnou. Výsledky genetické analýzy pomocí sekvenování nové generace (NGS) sériových vzorků před léčbou AZA a v jejím průběhu u 38 pacientů (dosahujících mediánu celkového přežití 24 měsíců s dosažením klinické odpovědi u 60 % pacientů) přinesla identifikaci 116 somatických patogenních variant s alelickou frekvencí (VAF) >5 %. Zjistili jsme, že téměř polovina variant byla stabilní, zatímco ostatní varianty byly velmi dynamické. Pacienti s výrazným poklesem alelické zátěže při léčbě AZA dosáhli klinické odpovědi. Podobná analýza proběhla v rámci akademické randomizované studie, která porovnávala efekt přidání granulocyty stimulujícího růstového faktoru (G-CSF) k standardní terapii AZA (EudraCT#: 2013-001639-38). Pozorovali jsme záchyt 140 patogenních mutací u 70 zařazených pacientů. Z detekovaných variant negativně ovlivňovalo celkové přežití mutace v genech *DNMT3A* ($p=0.0131$), *ETV6* ($p=0.0012$), *EZH2* ($p=0.0044$) a pozitivně *SF3B1* ($p=0.0005$). Pro lepší studium AZA rezistence jsme vyvinuli z buněčných linií odvozených od pacientů s AML, které předcházelo MDS model rezistence na AZA, jehož stabilita byla ověřena transplantací do imunokompromitovaných myší kmene NSGS. Při zkoumání exprese mRNA a variant DNA fenotypu rezistentního k AZA jsme pozorovali deregulaci několika drah souvisejících s onkogenezí včetně signalizace fosfatidylinositol-3 kinázy (PI3K). Dále jsme ukázali, že tyto dráhy lze modulovat specifickými inhibitory, které sice blokují proliferaci buněk rezistentních k AZA, ale nejsou schopny zvýšit jejich citlivost k

AZA. Data tyto práce odhalují soubor molekulárních mechanismů, které lze cílit specifickými inhibitory a rozšířit tak terapeutické možnosti během progresu léčby AZA.

Klíčová slova:

MDS, AML, AZA, NGS, terapeutická rezistence

Abstract:

Myelodysplastic syndromes (MDS) are a set of severe hematological diseases characterized by ineffective clonal hematopoiesis in the bone marrow, leading to cytopenia in the peripheral blood, the development of transfusion dependence and a high risk of progression to acute myeloid leukemia (AML). The disease is caused by genetic and epigenetic changes leading to the development of pathological stem cells that are unable to mature sufficiently in the bone marrow into blood elements. These changes vary widely between patients, which is reflected in different clinical manifestations, response to treatment, overall survival and, last but not least, this heterogeneity represents a challenge for the study of this disease. The present dissertation is aimed at studying the pathophysiological manifestations and consequences of selected genetic alterations, especially somatic mutations of key genes and other functional units of the genome, in relation to the clinical course of MDS and transformation to AML. Therapy of high-risk MDS is currently based on hypomethylating drugs including 5-azacytidine (AZA). Treatment leads to prolongation of disease progression to AML, but this fate is irreversible for the vast majority of patients whose prognosis becomes hopeless at this point. Results of genetic analysis by next-generation sequencing (NGS) of serial samples before and during AZA treatment in 38 patients (achieving a median overall survival of 24 months with 60% of patients achieving clinical response) yielded the identification of 116 somatic pathogenic variants with allelic frequency (VAF) >5%. We found that almost half of the variants were stable, while the remaining variants were highly dynamic. Patients with a significant decrease in allelic load on AZA treatment achieved clinical response. A similar analysis was performed in an academic randomized trial that compared the effect of adding granulocyte growth factor (G-CSF) to standard AZA therapy (EudraCT#: 2013-001639-38). We observed the capture of 140 pathogenic mutations in 70 enrolled patients. Of the variants detected, mutations in the DNMT3A (p=0.0131), ETV6 (p=0.0012), EH22 (p=0.0044) and SF3B1 (p=0.0005) genes negatively and positively affected overall survival, respectively. To better study AZA resistance, we developed an AZA resistance model from cell lines derived from AML patients that preceded MDS, the stability of which was verified by transplantation into immunocompromised NSGS mouse strain. By examining mRNA expression and DNA variants of the AZA-resistant phenotype, we observed deregulation of several pathways related to oncogenesis, including phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) signaling. We further showed that these pathways can be modulated by specific inhibitors that, while blocking the proliferation of AZA-resistant cells, are unable to increase their sensitivity to AZA. The data

from this work reveal a set of molecular mechanisms that can be targeted by specific inhibitors to expand therapeutic options during AZA treatment progression.

Keywords:

MDS, AML, AZA, NGS, therapeutic resistance

Seznam zkratek

5caC	5-karboxylcytosin
5fC	5-formylcytosin
5hmC	5-hydroxymetylcytosin
5mC	5-metylcytosin
AML	Akutní myeloidní leukemie
Arg	Arginin
ARCH	Aging-related clonal hematopoiesis (S věkem související klonální krvetvorba)
AZA	5-azacytidin
AZA-S	Klon buněk senzitivních k 5-azacytidinu
AZA-R	Klon buněk rezistentních k 5-azacytidinu
BCR	B-cell receptor (B-buněčný receptor)
BER	Base excision repair (odstranění abnormální nebo chemicky modifikované baze)
BSC	Best supportive care (nejlepší podpůrná léčba)
CADD	Combined Annotation-Dependent Depletion (deplece závislá na kombinované anotaci)
CCUS	Clonal cytopenia of undetermined potential (klonální cytopenie nejasného významu)
CDX	Cell line derived xenograft (xenograft vytvořený transplantací buněčné linie)
CGH	Comparative genomic hybridization (komparativní genomová hybridizace na čípech)
CLL	Chronická lymfocytární leukemie
CMML	Chronická myelomonocytární leukemie
CR	Complete remission (kompletní remise)
Cys	Cystein
dbSNP	Single Nucleotide Polymorphism Database (databáze genetických variant)
ddPCR	droplet digital PCR (digitální PCR)
DDX41	DEAD-box helicase 41

del	delece
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DNMTi	Inhibitor DNA transmetyláz
DSB	Double strand breaks (dvouvláknové zlomy DNA)
DAS	Dasatinib
EB-1, EB-2	Excess of blasts 2 (stadium vysoce rizikového MDS)
EPO	Erythropoetin
G-CSF	Faktor stimuluující kolonie granulocytů
GM-CSF	Faktor stimuluující kolonie granulocytů a makrofágů
GO	Gene ontology (databáze)
GOF	Gain of function (mutace aktivující cílový protein)
Gr	Grade (stupeň)
GRCh38	Referenční genom
GTP	Guanosintrifosfát
Hb	Hemoglobin
hIL-3	Lidský interleukin 3
HDAC	Histondeacetyláza
HI	Hematologic improvement (hematologické zlepšení)
HMA	Hypometylační agens
HSC	Haematopoietic stem cell (krvetvorná kmenová buňka)
HSCT	Hematopoietic stem cell transplantation (transplantace krvetvorných kmenových buněk)
CHIP	Clonal hematopoiesis of indeterminate potential (klonální hemopoeza nejasného významu)
IC50	Poloviční maximální inhibiční koncentrace
IPSS-R	International Prognostic Scoring System - Revised (mezinárodní revidovaný prognostický systém)
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (databáze)

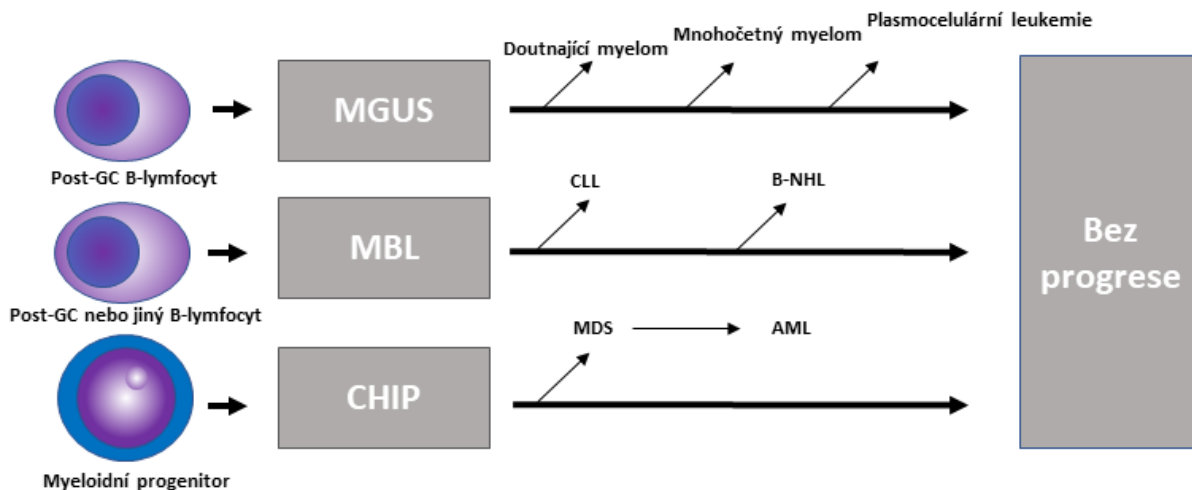
LEN	Lenalidomid
MBL	Monoclonal B-lymphocytosis (monoklonální b-lymfocytóza)
mCR	Marrow complete remission (dřeňová remise)
MCV	Mean cell volume (průměrný objem erytrocytů)
MDS	Myelodysplastický syndrom
mFISH	Vícebarevná fluorescenční in situ hybridizace
MGUS	Monoclonal gammopathy of undetermined potential (monoklonální gamapatie nejasného významu)
MLD	Multilineární dysplazie
mRNA	Messenger RNA
NGS	Next generation sequencing (sekvenování nové generace)
NSG-SGM3	Kmen imunodeficientních myší non-obese diabetic—Scid gamma
NSGS	Kmen imunodeficientních myší non-obese diabetic—Scid gamma
OS	Overall survival (celkové přežití)
ORR	Overall response rate (celkový počet terapeutických odpovědí)
PAN	Panobinostat
PCR	Polymerázová řetězová reakce
PD/PG	Progrese nemoci
PDX	Patient derived xenograft (xenograft vytvořený transplantací primárních patientských buněk)
PFS	Progression free survival (doba přežití bez progrese)
pK	Disociační konstanta
PLT	Platelets (destičky)
PRC	Polycomb repressive complex
PROVEAN	Protein Variation Effect Analyzer
RNA	Ribonukleová kyselina

RUX	Ruxolitinib
SCF	Stem cell factor
SD	Stable disease (stabilní odpověď na léčbu)
Ser	Serin
SIFT	Sorting Intolerant From Tolerant
SNP	Single nucleotide polymorphisms (jednonukleotidový polymorfismus)
SNV	Single nucleotide variant (jednonukleotidová varianta)
SOR	Sorafenib
TP53	Tumor protein 53
U1 snRNP	U1 spliceosomal small nuclear RNA
ÚZIS ČR	Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR
VAF	Variant allele frequency (variantní alelická frekvence)
VCF	Variant Call Format (výstupný formát NGS analýzy)
VEN	Venetoclax
WBC	White blood cells (počet leukocytů)
WES	Whole exome sequencing (celoexomové sekvenování)
WHO	World Health Organization (světová zdravotnická organizace)
WST-1	Water-soluble tetrazolium salts (kolorimetrická esej)

Literární přehled

1. Úvod

Myelodysplastické syndromy (MDS) představují soubor závažných hematologických onemocnění charakterizovaných neefektivní klonální hematopoézou v kostní dřeni, vedoucí k cytopenii v periferní krvi, vznikem transfuzní závislosti a s vysokým rizikem progresu do akutní myeloidní leukemie (AML). Výskyt MDS vzrůstá s věkem s nejvyšším výskytem v osmé dekádě, kdy dosahuje incidence až 20 nových případů na 100 000 obyvatel ročně (Sant, Allemani et al. 2010). Za vznik nemoci jsou odpovědné genetické změny včetně bodových somatických mutací vzniklých během života při dělení hematopoetických kmenových buněk (2011). Předpokládá se, že MDS vzniká postupně z klinické jednotky zvané klonální krvetvorba s neurčitým potenciálem (clonal hematopoiesis of indeterminate potential, CHIP) (Steensma, Bejar et al. 2015), a příbuzných jednotek jako idiopatická cytopenie neurčitého významu (clonal cytopenia of undetermined potential, CCUS) a s věkem asociovaná klonální hematopoeza (aging-related clonal hematopoiesis, ARCH), kdy jsou již detekovatelné mutace v myeloidní populaci buněk avšak bez přítomnosti dysplázie myeloidních progenitorů v kostní dřeni. Tato evoluce nemoci je paralelou ke monoklonální B-buněčné lymfocytóze (monoclonal B-lymphocytosis, MBL), která u jistého procenta pacientů předchází B-lymfoidní malignitě, nebo monoklonální gamapatií nejasného významu (monoclonal gammopathy of undetermined potential, MGUS) jako předchorebí mnohočetného myelomu. Přehled postupného vývoje vybraných hematologických malignit nabízí Obrázek č. 1. Myelodysplastický syndrom je u pacientů zachycen v různém stupni svého vývoje do AML, jednotlivé podjednotky jsou definovány podle aktuální WHO 2016 klasifikace hematologických malignit a zahrnuje i specificky definované podjednotky (Arber, Orazi et al. 2016) (podrobně viz Tabulka č. 1.).



Obrázek č. 1: Srovnání vzorců vývoje MGUS, MBL a CHIP. Hematopoetické progenitorové nebo kmenové buňky běžně získávají mutace v průběhu lidského života; některé z nich poskytují výhodu v přežití a umožňují klonální expanzi. Postupné získávání mutací v expandovaném klonu může vést k rozvoji nemoci (progrese MGUS do mnohočetného myelomu; progrese MBL do chronické lymfocytární leukemie (CLL) nebo do B-non Hodgkinského lymfomu(B-NHL)), které mohou pacienta usmrtit. CHIP může také progredovat do MDS nebo přímo do stadia AML, v málo případech i do jiného typu myeloproliferativní neoplazie nebo zřídka lymfoidní neoplazie. Stejně jako u MGUS a MBL se u většiny pacientů s CHIP nikdy nevyvine zjevný novotvar a pacienti nakonec zemřou z nesouvisejících příčin. *Převzato a upraveno dle Steensma et al., 2015.*

2. Epidemiologie myelodysplastického syndromu

Z dostupných dat Ústavu zdravotnických informací a statistiky ČR (ÚZIS ČR) za období 2014-2018 byla incidence MDS 344 nových případů na 100 000 obyvatel ročně. Predikce zdravotní zátěže ve střednědobém horizontu na rok 2025 předpokládá další setrvalý nárůst celkové incidence a prevalence hematologických onemocnění včetně MDS a AML přibližně o 10 % zejména vlivem stárnutí populace. Medián věku v době diagnózy je 74 let.

3. Klinický obraz myelodysplastického syndromu

Onemocnění se nejčastěji manifestuje v 7. dekádě s mediánem věku 74 let v době diagnózy. Manifestuje se obvykle jako nejasná anémie, trombocytopenie nebo leukopenie, často i jako pancytopenie v periferní krvi. U pokročilých forem může nabývat obecného obrazu

nádorového onemocnění spojeného s hubnutím, ztrátou chuti k jídlu nebo pocením. V tomto případě se indikuje trepanobiopsie kostní dřeně, kde histologický a cytomorfologický nález prokáže dysplazii hematopoetických buněk. Podle počtu cytopenií a dysplastických linií se nemoc klasifikuje podle aktuální WHO 2016 klasifikace (podrobně viz Tabulka č.1). Klinicky lze pozorovat konsekvence cytopenie v periferní krvi, anemický syndrom, známky krvácení nebo časté a obtížně léčitelné infekce. Častá je transfuzní dependence a hrozí přetížení železem.

Podtyp MDS	Zkratka	Počet dysplastických linií	Cytopenie (počet postižených linií)	Věnečkovité sideroblasty (% z erytroidních elementů)	% blastů v kostní dřeni a periferní krvi
MDS s unilineární dysplázií	MDS-SLD	1	1 nebo 2		
MDS s multilineární dysplázií	MDS-MLD	2 nebo 3	1-3		
MDS s věnečkovitými sideroblasty	MDS-RS			<15/<5 (SF3B1 ^{MUT})	KD<5; PK<1; bez Auerových tyčiček
MDS s věnečkovitými sideroblasty s unilineární dysplázií	MDS-RS-SLD	1	1 nebo 2		
MDS s věnečkovitými sideroblasty s multilineární dysplázií	MDS-RS-MLD	2 nebo 3	1-3		
MDS s izolovanou delecí 5q	del(5q)	1-3	1-2	0	
MDS s excesem blastů (MDS-EB)				0	
	MDS-EB-1	0-3	1-2	0	KD 5-9; PK 2-4; bez Auerových tyčiček
	MDS-EB-2	0-3	1-3	0	KD 10-19; PK 5-19 nebo Auerovy tyčičky
	MDS-U				
MDS, neklasifikovatelný					
s přítomností 1% blastů v periferní krvi		1-3	1-3	0	KD<5; PK<1; bez Auerových tyčiček
s unilineární dysplázií a pancytopenií		1	3	0	KD<5; PK<1; bez Auerových tyčiček
založen na specifické cytogenetické abnormalitě		0	1-3	<15	KD<5; PK<1; bez Auerových tyčiček
Refrakterní cytopenie v dětství		1-3	1-3	0	KD<5; PK<2

Tabulka č. 1: Klasifikace MDS podle WHO 2016, *Převzato dle Arber et al., 2016.*

4. Etiopatogeneze myelodysplastického syndromu

V patogenezi vzniku MDS předchází vícestupňový proces zahrnující zejména genetické a epigenetické aberace na úrovni pluripotentní kmenové buňky zahrnujících geny kódující proteiny nezbytné pro hematopoezu (Bincoletto, Saad et al. 1998, Parker, Mufti et al. 2000). Konsekvence deregulace specifických drah jsou například poruchy metylace DNA, poruchy v chromatin-remodelačních komplexech nebo porucha apoptózy (Parker, Mufti et al. 2000). Epigeneticky se na rozvoji MDS významně podílí hypermethylace v oblastech regulatorních elementů (CpG ostrůvků nebo enhancerů) která vede k utlumení exprese tumor supresorových genů a tím přispívají k rozvoji onemocnění do AML (Christiansen, Andersen et al. 2003, Guillaumot, Cimmino et al. 2016). Genetické změny zahrnují cytogenetické změny na úrovni chromozomů ve formě delecí, amplifikací, balancovaných translokací, nebo numerických odchylek specifických chromozomů (Smith, Le Beau et al. 2003). Může se jednat o změny na úrovni jednoho chromozomu, v této skupině onemocnění nejlíp definován tzv. 5q minus syndrom spojeného s dobrou prognózou (Lewis, Ocier D. et al. 1995), až po komplexní změny karyotypu s krátkým přežíváním pacientů, dokonce první zmínky o vlivu karyotypu na prognózu pacientů s MDS vznikly v Belgii již v roce 1984 . V kalkulaci rizika progresu onemocnění do AML a celkového přežití použitím stratifikačního indexu IPSS-R (podrobně uveden v Obrázku č. 2) má největší roli právě cytogenetické vyšetření leukemických buněk kostní dřeně (Greenberg, Tuechler et al. 2012). Pomocí konvenčního cytogenetického vyšetření studovaných buněk v metafázi lze zachytit aberace u přibližně 50 % nemocných s MDS. Se zavedením podrobnějších molekulárně genetických vyšetřovacích metod do klinické praxe jako detekce bodového polymorfizmu SNP, microarrays/CGH (komparativní genomová hybridizace) je možné detekovat genetické změny spojené s rozvojem onemocnění až u 80 % pacientů (Zahid, Malik et al. 2016). To znamená, že u přibližně 20 % pacientů by za použití výše zmíněných technik nebylo možné zachytit patogenetickou událost odpovědnou za vznik a rozvoj onemocnění.

Obrázek č. 2: Prognostický index IPSS-R, převzato a upraveno dle Greenberg et al. 2012

Prognostická skupina	Cytogenetická abnormalita
Velmi dobrá	-Y, del(11q)
Dobrá	Normal, del(5q), del(12p), del(20q), dvojitá aberace zahrnující del(5q)
Střední	del(7q), +8, +19, i(17q)
Špatná	-7, inv(3q)/t(3q), dvojitá aberace zahrnující -7/del(7q), komplexní aberace zahrnující 3 chromozomy
Velmi špatná	Komplexní aberace více než 3 chromozomů

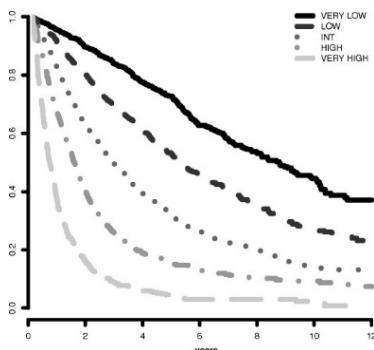
Obrázek č. 2A: Specifické cytogenetické abnormality, kterých přítomnost souvisí s rizikem transformace do AML a celkovým přežitím zahrnují inv(3)/t(3q)/del(3q), del(11q), del(12p), i(17q), +19, dvojitá anomálie včetně del(5q), dvojitá abnormality včetně del(7q) nebo monosomie 7, -Y, del(5q), del(20q).

Přemenná	0	0,5	1	1,5	2	3	4
Cytogenetika	Velmi dobrá	-	Dobrá	-	Střední	Špatná	Velmi špatná
% blastů v kostní dřeni	≤2	-	>2-<5	-	5-10	>10	-
Hemoglobin	≥10	-	8-<10	<8	-	-	-
Trombocyty	≥100	50-<100	<50	-	-	-	-
Absolutní počet neutrofilů	≥0,8	<0,8	-	-	-	-	-

Obrázek č. 2B: Statisticky signifikantní hodnoty přítomné cytopenie byly: hladina hemoglobinu < 8, 8-< 10 a ≥ 10 g/dl, trombocyty < 50, 50-100 a ≥ 100 × 10⁹/l a ANC < 0,8 versus ≥ 0,8 × 10⁹/l. Za každý parametr se skóruje příslušný počet bodů.

Riziková kategorie	Rizikové skóre
Velmi nízké	≤ 1.5
Nízké	> 1.5-3
Střední	> 3-4.5
Vysoké	> 4.5-6
Velmi vysoké	> 6

Obrázek č. 2C: Kategorie prognostického rizika IPSS-R byly stanoveny kombinací skóre výše uvedených parametrů (Obrázek č. 2A a 2B). Model umožňuje definovat pět dobře oddělených prognostických kategorií pro přežití i rozvoj AML.



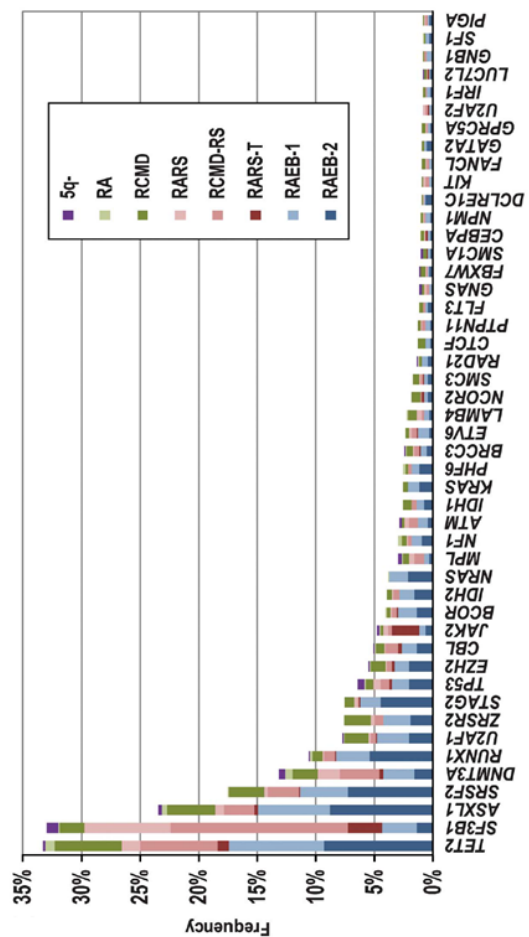
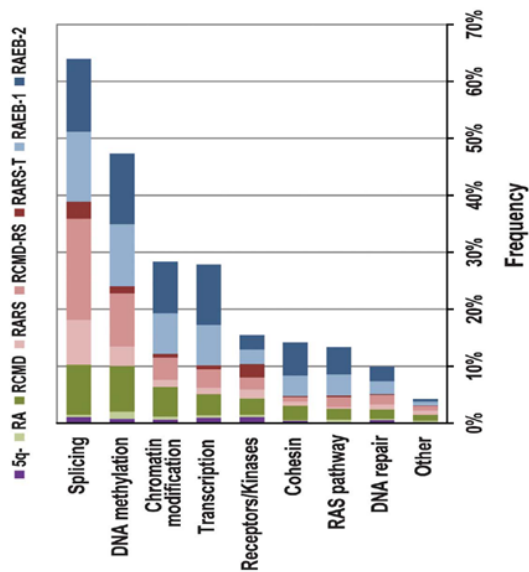
Obrázek č. 2D: Přežití na základě prognostických kategorií založených na prognostickém indexu IPSS-R u pacientů s MDS. (Kaplan-Meierovy křivky, N = 7012; P < 0.001).

5. Somatické mutace u myelodysplastického syndromu

Na etiopatogenezi myelodysplastického syndromu se kromě výše zmíněných genetických aberací podílejí somatické mutace, tzn. mutace vzniklé během života pacienta působením různých mutagenů v genech, které jsou vesměs odpovědné za normální krvetvorbu. První zmínky podílů mutací jednotlivých genů na rozvoji MDS lze v literatuře dohledat přibližně od roku 2001, příkladem lze uvést nález mutací v genech *TP53* (Christiansen 2001), *ATRX* (Steensma, Higgs et al. 2004), *RUNX1* (Harada, Harada et al. 2004, Steensma, Gibbons et al. 2005), *DNMT3A* (Hopfer, Komor et al. 2009), *TET2* (Delhommeau, Dupont et al. 2009), *EZH2* (Nikoloski, Langemeijer et al. 2010) nebo *SF3B1* (Papaemmanuil 2011). Za přelomovou lze považovat práci Rafaela Bejara z roku 2011, ve které byly nalezené mutace u výše uvedených genů asociovány s klinickými daty pacientů s MDS. Mutace v konkrétních genech byly spojené s výskytem cytopenie, s vyšší nádorovou náloží v kostní dřeni a s celkovým přežíváním pacientů (Bejar, Stevenson et al. 2011). Produkty postižených genů jsou součástí intracelulárních mašinerií esenciálních pro dělení a přežívání nádorových buněk, jako je RNA sestřihu (*SF3B1*, *SRSF2*, *ZRSR2*, *U2AF1*), přímo nebo nepřímo ovlivňující DNA metylaci (*TET2*, *DNMT3A*, *IDH1*, *IDH2*), chromatin remodelační komplexy (*ASXL1*, *EZH2*, *KDM6A*, *EED*), transkripční faktory (*RUNX1*, *BCOR*, *ETV6*, *CUX1*, *GATA2*), součástí koheziových komplexů (*STAG2*, *RAD21*, *SMC3*, *SMC1A*) nebo signálních drah (*JAK2*, *CBL*, *NRAS*, *KRAS*, *HRAS*, *FLT3*, *KIT*, *PTPN11*, *CSF3R*), podrobně i se schématem v Obrázku č. 3. Postupem času experimentálně vznikali různé panely genů, některé produkované i sériově (TruSight Myeloid Panel, Illumina), které zahrnovaly přibližně od 30 do 100 genů. Je předpoklad, že se vznikem IPSS-M a po jeho validaci se panel bude redukovat na následujících 31 genů: *TP53*, *MLL*, *FLT3*, *SF3B1*, *NPM1*, *RUNX1*, *NRAS*, *ETV6*, *IDH2*, *CBL*, *EZH2*, *U2AF1*, *SRSF2*, *DNMT3A*, *ASXL1*, *KRAS*, *BCOR*, *BCORL1*, *CEBPA*, *ETNK1*, *GATA2*, *GNB1*, *IDH1*, *NF1*, *PHF6*, *PPM1D*, *PRPF8*, *PTPN11*, *SETBP1*, *STAG2* a *WT1* (Bernard 2022).

S nástupem sekvenování nové generace (NGS) použitím masivního paralelního sekvenování se daří objasnit etiopatogenezi MDS téměř u všech nemocných a detekce somatických mutací se stává i v ČR rutinní klinickou praxí právě v době vzniku nového stratifikačního nástroje IPSS-M (Bernard 2022), který stratifikuje pacienty do rizikových kategorií na rozdíl od svého předchůdce IPSS-R i na základě přítomnosti bodových mutací v klíčových genech. V současnosti se za standard v detekci bodových mutací považuje sekvenování nové generace (next generation sequencing, NGS) na platformě Illumina.

Stran charakterů mutací se může jednat o jednoduché jednonukleotidové záměny (SNV), krátké inserce nebo delece (in-dels). Klinicky mají význam mutace mající zásadní vliv na strukturu finálního proteinu. Na hodnocení tohoto tzv. impaktu mutace existují různé skóre, např. PROVEAN (Choi and Chan 2015), SIFT (Vaser, Adusumalli et al. 2016) nebo CADD (Rentzsch, Schubach et al. 2021).



Obrázek č. 3: Přehled nejčastěji mutovaných genů u MDS (Haferlach, Nagata et al. 2014). Na horním grafu frekvence mutací v jednotlivých skupinách genů, v spodním grafu frekvence jednotlivých genů. Barevně odlišené podle frekvence u jednotlivých podtypů MDS, použita starší WHO 2009 klasifikace. *Převzato a upraveno dle Haferlach et al., 2014.*

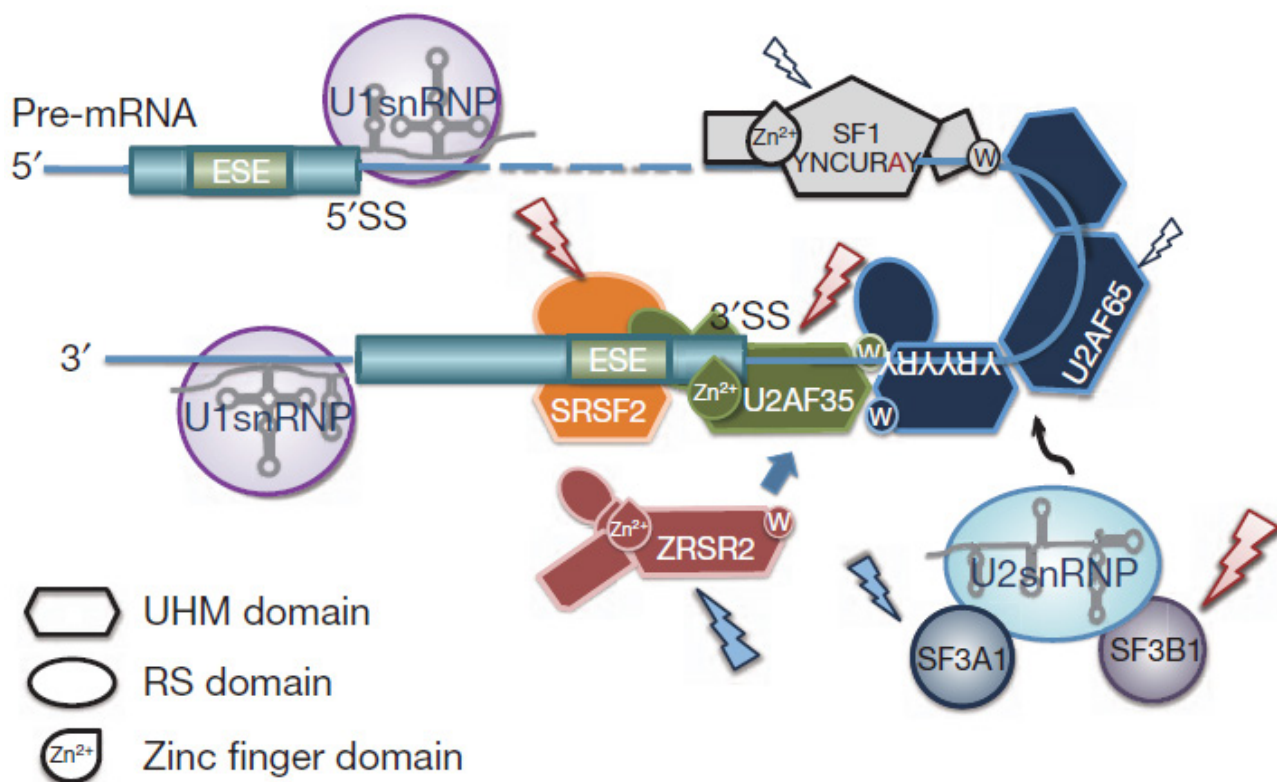
Mutace epigenetických regulátorů I: DNA metylace (*DNMT3A, TET2, IDH1/2*)

MDS je asociován s hypermethylací cytosinů CpG oblastech kterou přímo nebo nepřímo ovlivňují enzymaticky produkty genů *DNMT3A, TET2, IDH1* a *IDH2*. Mutace v genu *TET2* (ten-eleven translocation 2) je vůbec nejčastější u MDS i jiných myeloidních malignit (Haferlach, Nagata et al. 2014). Produkt genu *TET2* je α -ketoglutarát a Fe^{2+} dependentní dioxygenáza, která katalyzuje oxidaci 5-metylcytosinu (5mC) na 5-hydroxymetylcytosin (5hmC), 5-formylcytosin (5fC) a 5-karboxylcytosin (5caC) (Ito, D'Alessio et al. 2010). Tyto oxidované formy metylcytosinů zprostředkují DNA demethylaci přes jeden DNA opravných mechanismů, tzv. *base excision repair (BER)* (Guo, Su et al. 2011). Inaktivační mutace v *TET2* je odpovědná právě za hypermethylaci DNA a je asociována s progresivním MDS (Guillamot, Cimmino et al. 2016). Myší modely s delecí *Tet2* vedly k defektům v hematopoeze spojených se zvýšením sebeobnovy hematopoetických kmenových buněk (HSC) bez diferenciaci a expanzí myeloidní linie s rozvojem nemoci podobné chronické myelomonocytární leukémii (CMML) projevující se leukocytózou, monocytózou a splenomegalií (Moran-Crusio, Reavie et al. 2011) (Quivoron, Couronne et al. 2011). Náprava funkce enzymu *TET2* vitamínem C, který interaguje s jeho C-terminální katalytickou doménou (Yin, Mao et al. 2013) a jeho efektivitu potvrzují testy na PDX MDS/AML modelech (Cimmino, Dolgalev et al. 2017). Protichůdnou roli mají enzymy z rodiny DNA metyltransferáz (DNMTs). Jedná se o enzym *DNMT1* přenášející metylovou skupinu na nově syntetizované vlákno DNA během replikace a udržuje původní metylační vzor DNA (Valinluck and Sowers 2007) a *DNMT3A/B* odpovědné za *de novo* metylaci (Schermelleh, Haemmer et al. 2007). Mutace *DNMT3A* jsou přítomny u pacientů s MDS přibližně ve frekvenci 8 % (Walter, Ding et al. 2011). Nejčastěji se jedná o záměnu argininu za histidin v pozici 882 (*DNMT3A^{R882H}*) v katalytické doméně toho enzymu bránící tvorbě aktivního tetrameru (Russler-Germain, Spencer et al. 2014). *In vivo* myší model *DNMT3A^{R882H}* vede k rozvoji onemocnění podobného MDS (Xu, Wang et al. 2014). Další z hráčů, které nepřímo ovlivňují DNA metylaci přes *TET2* jsou enzymy, které jsou součástí Krebsova cyklu, konkrétně isocitrádehydrogenasa 1 a 2, tedy produkty genů *IDH1* a *IDH2*. U normálních buněk vedou ke konverzi isocitrátu na α -ketoglutarát, který je, jak je zmíněno výše, kofaktorem právě enzymu *TET2*. V tomto případě se jedná o dobře popsané *missense* mutace reziduí R132 u *IDH1* a R1410 a R172 u *IDH2* které vedou k tvorbě onkometabolitu 2-hydroxyglutarátu a tím ovlivnění *TET2* aktivity (Mardis, Ding et al. 2009). **Mutace epigenetických regulátorů II: histonové modifikátory (*EZH2, BCOR, BCORL1, ASXL1*)**

Enzymy odpovědné za rozvoj MDS ze skupiny histonových modifikátorů jsou součástí PRC1 a PRC2 komplexů (polycomb repressive complex) a zahrnují geny *EZH2*, *BCOR*, *BCORL1* a *ASXL1* a lze je detekovat u téměř 30 % pacientů s MDS (Haferlach, Nagata et al. 2014). Tyto komplexy jsou odpovědné za umlčení exprese klíčových regulátorů diference, co vede k jejímu bloku. PRC1 zahrnuje geny *BCOR* a *BCORL1*, jejich mutace je spojena se špatnou prognózou, kdy dochází k poruše funkce monoubikvitinace histonu H2AK119 (Grima, Chelot et al. 2004). PRC2 trimetyluje histon H3 na lysinu 27 (H3K27me3). *EZH2* kóduje katalytickou podjednotku PRC2 a je mutován přibližně u 5 % pacientů s MDS (Nikoloski, Langemeijer et al. 2010, Haferlach, Nagata et al. 2014). Myší modely se ztrátou *Ezh2* vyvíjí fenotyp MDS (Sashida, Harada et al. 2014). *ASXL1* truncační mutace jsou exkluzivní pro exon 11 a 12 a představují tzv. získovou čili ‚gain-of-function‘ mutaci, kdy dojde ke ztrátě inhibiční podjednotky, co vede snížení globální trimetylace H3K27 (Asada, Fujino et al. 2019, Asada and Kitamura 2019, Fujino and Kitamura 2020). Souhrnem, mutace ve výše zmíněných komplexech finálně působí deregulaci genů odpovědných za hematopoezu včetně homeobox A (HOXA) genového setu (Fujino and Kitamura 2020).

Mutace v pre-mRNA sestřihovém aparátu (*SF3B1*, *SRSF2*, *U2AF1*, *ZRSR2*)

Mutace postihující sestřih pre-mRNA (RNA splicing) patří obecně v onkogenezi mezi nejčastější (Lawrence, Stojanov et al. 2014). Mutace v genu *SF3B1*, *SRSF2*, *U2AF1* nebo *ZRSR2* je přítomná přibližně u 60 % pacientů s MDS (Yoshida, Sanada et al. 2011) (Seiler, Peng et al. 2018). Nejčastěji je mutován *SF3B1*, který je asociován s přítomností věnečkovitých sideroblastů v kostní dřeni a také se jedná o jediný gen, kterého aberace je spojena s dobrou prognózou (Bejar, Stevenson et al. 2011). Přehled mutací tzv. ‚spliceosomu‘ je zobrazen na Obrázku č. 4.



Obrázek č. 4: RNA sestřih je zahájen nábořem U1 snRNP do 5'SS. SF1 a větší podjednotka pomocného faktoru U2AF (U2AF65), se vážou na sekvenci bodu větvení (BPS), respektive na její navazující polypyrimidinový trakt. Menší podjednotka U2AF (U2AF35) se váže na AG dinukleotid 3'SS a interaguje jak s U2AF65, tak s proteinem SR, jako je SRSF2, prostřednictvím své domény UHM a RS, a tvoří tak nejranější sestřihový komplex (komplex E). ZRSR2 také interaguje s proteiny U2AF a SR a plní základní funkce při sestřihu RNA. Po rozpoznání 3'SS se U2 snRNP spolu s SF3A1 a SF3B1 rekrutuje do 3'SS a vytváří sestřihový komplex A. Mutované složky u MDS jsou označeny šipkami. *Převzato a upraveno dle Yoshida et al., 2011.*

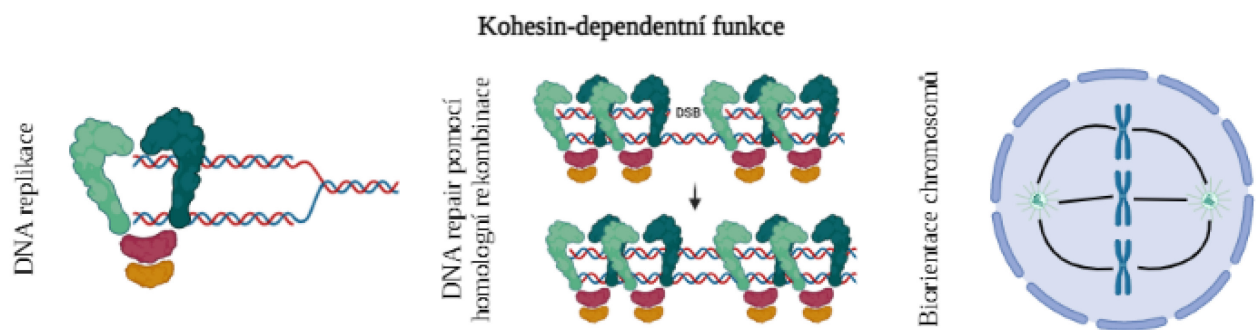
Mutace v kohesinovém komplexu (*STAG2*, *SMC3*, *SMC1A* a *RAD21*)

Mutace v genech tzv. kohesinového komplexu, nejčastěji *STAG2*, *SMC3*, *SMC1A* a *RAD21* lze detekovat u přibližně 10–15 % nemocných s MDS (Haferlach, Nagata et al. 2014) (Tothova, Valton et al. 2021). Mutace postihují nejčastěji jediný gen ze skupiny a považují se za loss-of-function mutace (Kon, Shih et al. 2013). Kohesinový aparát je multiproteinový komplex který formuje kruhovou strukturu kolem molekul DNA a hraje roli v prostorovém uspořádání eukaryotických genomů (Tothova, Valton et al. 2021). Jak napovídá název,

původně byl objeven pro svou funkci spojování sesterských chromatid, kromě toho se účastní i DNA loopingu a transkripční regulace (Losada 2014). Kohesinový komplex pozůstává ze 4 podjednotek uspořádaných do kruhové struktury, jedná se o proteiny SMC1 a SMC3, RAD21 a STAG. Zachování integrity kruhové struktury a její topografie je nezbytné k vazbě na chromatin, přičemž se nejedná o vazbu na specifickou DNA sekvenci (Losada 2014). V současnosti se má za to, že se na patogenezi MDS mutace v genech kohesinového komplexu podílejí hlavně z důvodu deregulace chromatinových interakcí vedoucích k změně genové exprese klíčových genů, než by měla přispívat k jeho rozvoji poškození replikace a porucha homologní rekombinace. Struktura kohesinového aparátu a jeho funkce jsou znázorněny v Obrázku č. 5.



Obrázek č. 5A: Frekvence mutací kohezinu u AML. Kohezin je multiproteinový komplex, který se podílí na párování chromozomů, opravě DNA a na regulaci transkripce. Mutace v rámci jednotlivých proteinových složek kohezinu (SMC1A, SMC3, STAG1/2 a RAD21) se vyskytují ve značném množství u myeloidních malignit včetně MDS a AML. *Převzato a upraveno dle Leeke, et al., 2014.*



Obrázek č. 5B: Funkce kohezinu závislé na kohezi DNA. V interfázi je kohezin důležitý pro stabilizaci zastavených replikačních vidlic DNA a podporu jejich opětovného spuštění. To je důležité zejména pro oblasti, které se obtížně replikují, jako jsou telomery. Kohezin také usnadňuje použití sesterské chromatidy jako šablony pro opravu dvouřetězcových zlomů (DSB) prostřednictvím homologní rekombinace, čímž zabraňuje nepřesné opravě i rekombinaci mezi chromatidami homologních chromozomů, které by vedly ke ztrátě heterozygotnosti. V mitóze zajišťuje koheze správnou segregaci chromozomů. Podporuje

orientaci sesterských kinetochorů zády k sobě, aby usnadnila jejich připojení k mikrotubulům z opačných pólů vřeténka a zabraňuje oddělení sesterských chromatid, dokud všechny chromozomy nedosáhnou bipolárního připojení (známé také jako biorientace). *Převzato a upraveno dle Losada et al., 2014.*

Mutace transkripčních faktorů (*RUNX1*, *GATA2*, *ETV6*, *WT1*, *PHF6*)

Mutace v transkripčních faktorů postihují početně jen malé množství genů, konkrétně *RUNX1*, *GATA2*, *ETV6*, *WT1* a *PHF6*. V případě *GATA2* se může jednat i o germinální loss-of-function varianty asociované s vrozeným selháním kostní dřeně, které se mohou vyvíjet do MDS nebo sekundární AML. *RUNX1* patří mezi nejčastěji mutovaný gen v této skupině, může být zachycen u víc než 10 % pacientů s MDS (Haferlach, Nagata et al. 2014). Záchyt mutace v tomto genu bývá obvykle nalezen u pokročilejší nemoci, je asociován s těžkou trombocytopenií, a se špatnou prognózou (Bejar, Stevenson et al. 2011) (Haferlach, Nagata et al. 2014). Mutace v genu *ETV6*, také patří mezi nezávislý prediktor kratšího přežívání a je rovněž spojena s výskytem trombocytopenie (Bejar, Stevenson et al. 2011) (Hock and Shimamura 2017), i s familiárním výskytem v případě vrozených variant, co potvrzují i myší modely, kdy narušení genu *ETV6* po HSC komitmentu do megakaryocytické/erytroidní linie pomocí Gata1-Cre vedlo k výraznému snížení počtu trombocytů kompenzovaného zvýšenou tvorbou megakaryocytárních kolonií v kostní dřeni (Hock, Meade et al. 2004).

Role *TP53* a příbuzných genů v MDS

TP53 patří mezi nejčastěji mutované geny u MDS a je spojen se špatnou prognózou, trombocytopenií a se záchytem vyššího množství myeloblastů v kostní dřeni (Bejar, Stevenson et al. 2011). Nejznámější hráč v patogenezi jakéhokoli onkologického onemocnění se v patogenezi MDS podílí také ztrátou své tumor supresorové role. Heterozygoti s vrozenou ztrátou jedné alely *TP53* (Li-Fraumeni syndrom) jsou ohroženi zvýšeným rizikem jak některých typů solidních tumorů, tak i rozvojem MDS nebo AML. Somatické mutace *TP53* se vyskytují u pacientů s MDS ve frekvenci mezi 5–15 %, častěji se vyskytují u sekundárního MDS po expozici alkylačním činidlům nebo radioterapii (Rafael Bejar 2010, Bejar, Stevenson et al. 2011, Haferlach, Nagata et al. 2014). Missense inaktivační mutace *TP53* jsou asociovány s vyšší nádorovou náloží, komplexním karyotypem a rezistencí k terapii (Kaneko, Misawa et al. 1995, Bejar, Stevenson et al. 2011). Intaktní produkt genu, protein p52,

zprostředkovává odpověď na stresové stimuly jako je poškození DNA zvýšením exprese genů odpovědných za apoptózu a zástavu buněčného cyklu. Ztráta *TP53* vede k ztrátě toho kontrolního checkpointu, buňka postupuje do buněčného cyklu před opravou poškozené DNA, co vede v subklonech k další akumulaci genetických změn a k chromozomální instabilitě. U *TP53* je nutné zmínit i trunkační mutace v genu *PPM1D*, stabilizující protein PPM1D. Výskyt mutace je pozorován také u sekundárního MDS po expozici cytostatikům (cisplatina, etoposid) (Hsu, Dayaram et al. 2018). Tato fosfatáza negativně reguluje proapoptické proteiny, čím se subklony nesoucí tyto mutace stávají rezistentnější k chemoterapii včetně antracyklinů, někdy využívaných k léčbě i sekundární AML v režimu 3+7 (Hsu, Dayaram et al. 2018). Konsekvence předchozí léčby malignit cytostatiky ve smyslu vzniku klonální hematopoezy nesoucí mutace v genech *TP53* a *PPM1D* a z toho plynoucí vyšší riziko sekundárních myeloidních malignit by mohl budít zvýšený zájem monitorovat tento druh mutací u rizikových pacientů stran časného zachytu sekundární malignity.

Mutace genů signálních drah

Mutace v této skupině genů nejsou tak časté, jako u jiných myeloidních neoplázií, u MDS se vyskytují spolu ve frekvenci přibližně 10–15 % (Bejar, Stevenson et al. 2011, Haferlach, Nagata et al. 2014). Seřazeno dle frekvence výskytu se jedná o geny: *NRAS* (3,6 %), *JAK2* (3 %), *CBL* (2,3 %), dále mohou být přítomny i mutace v genech s výskytem pod 1 % *KRAS*, *GNAS*, *PTPN11*, *BRAF*, *NF1*, *FLT3*, *MPL* a *KIT*. Abnormality v buněčné signalizaci se fenotypově projevují spíše proliferativním chováním onemocnění, nebo jsou zachyceny ve stadiu progresu nemoci do sekundární AML. Charakteristické jsou mutace vedoucí ke konstitutivní aktivaci té, které dráhy.

6. Vysoce rizikový myelodysplastický syndrom a jeho terapie

Medián věku 74 let v době diagnózy a přítomné komorbidity významně ovlivňují terapeutické možnosti. Ty zahrnují komplexní přístupy od nejzákladnější péči o pacienty neúnosné specifickou léčbu, tzv. nejlepší podpůrnou péči (best supportive care, BSC), kdy se jedná o hemosubstituci, antibiotickou terapii a léčbu bolesti, přes léta zavedenou hypometylační terapii (hypomethylating agents, HMA), recentně v klinických studiích testované cílené léky jako je eprenetapopt (Sallman, DeZern et al. 2021), venetoclax (Zeidan, Garcia et al. 2021), magrolimab (Garcia-Manero, Daver et al. 2021) a jiné. Lze ale říct, že drtivá většina pacientů

i po dosažení remise onemocnění terapeutickou odpověď ztrácí a progreduje do AML, nebo umírá v terénu pancytopenie z důvodu refrakterních infekcí nebo krvácivých komplikací. Jediným kurativním postupem zůstává i současnosti alogenní transplantace krvetvorných kmenových buněk (hematopoietic stem cell transplantation, HSCT).

První zmínky v literatuře o použití hypometylačních látek v terapii vysoce rizikového MDS, jako je 5-azacytidin (AZA) nebo decitabin, se vyskytují přibližně od přelomu milénia (Wijermans, Lubbert et al. 2000) (Silverman 2001). V roce 2009 byly publikovány výsledky registrační studie AZA-001, která prokázala superioritu AZA nad běžnou dosavadní léčbou stran prodloužení celkového přežití (OS) pacientů (Fenaux, Mufti et al. 2009). Do dnešních dnů se neprokázala lepší efektivita monoterapií jinými preparáty nebo kombinace specifických inhibitorů a HMA, ku příkladu lenalidomid (Kenealy, Hertzberg et al. 2019), monoklonální protilátky, jako darvalumab (Zeidan, Boss et al. 2022) nebo pembrolizumab (Chien, Kim et al. 2021). AZA představuje pyrimidinový nukleosidový analog cytidinu který působí antineoplasticky díky DNA hypometylační aktivitě a cytotoxickému efektu proti abnormálním leukemickým buňkám v kostní dřeni inkorporací do RNA a tím působící interferenci syntézy nukleových kyselin a proteinů. Menší část AZA se inkorporuje přímo do DNA a působí cytotoxicky (Keating 2009). Epigenetický efekt ve formě hypometylace spočívá v inhibici DNA-metyltransferáz DNMT1, DNMT3A a DNMT3B (Wong, Lawrie et al. 2019). Mechanismus vzniku terapeutické rezistence na AZA nebyl doposud detailně popsán.

Cíle disertační práce:

- 1) Zjistit mechanismus rezistence vysoce rizikového myelodysplastického syndromu na terapii 5-azacytidinem *in vitro* vytvořením rezistentních klonů, *in vivo* vytvořením tzv. ‚cell line derived xenograft‘ (CDX) myších modelů.**

- 2) Zjistit genetický profil metodou sekvenování výše uvedených buněčných modelů a primárních vzorků za pomoci NGS (panelové sekvenování vybraných genů, celo-exomové sekvenování, transkriptomové sekvenování). Definovat vztah výše zmíněných změn na základě *in silico* analýzy nalezených mutací nebo aberantních expresí, společně vedoucích k aktivaci specifických signálních drah ovlivnitelných specifickými inhibitory a dále podstoupit jejich validace *in vitro*.**

- 3) Zjistit dynamiku změny frekvence somatických mutací u pacientů s vysoce rizikovým myelodysplastickým syndromem během terapie 5-azacytidinem.**

Výsledky:

Disertační práce se vztahuje k výsledkům následujících 4 publikací. Plné texty uvedených publikací jsou přiloženy v samotném závěru práce.

- (1. publikace) **Minarik L**, Pimkova K, Kokavec J, Schaffartzikova A, Vellieux F, Kulvait V, Daumova L, Dusilkova N, Jonasova A, Vargova KS, Kralova Viziova P, Sedlacek R, Zemanova Z, Stopka T. **Analysis of 5-Azacytidine Resistance Models Reveals a Set of Targetable Pathways.** *Cells* (2022) 11: 223.
- (2. publikace) Stopka T[#], **Minarik L[#]**, Dusilkova N, Pesta M, Kulvait V, Spacek M, Zemanova Z, Kalousova M, Jonasova A. **G-CSF plus azacitidine versus azacitidine alone for patients with high-risk myelodysplastic syndrome: academic, open label, randomized trial.** *Blood Cancer J* (2022) 12(7): 105.
- (3. publikace) Polgarova K, Vargova K, Kulvait V, Dusilkova N, **Minarik L**, Zemanova Z, Pesta M, Jonasova A, Stopka T. **Somatic mutation dynamics in MDS patients treated with azacitidine indicate clonal selection in patients-responders.** *Oncotarget* (2017) 8(67): 111966-111978.
- (4. publikace) **Minarik L**, Zemanova Z, Kulvait V, Dluhosova M, Jonasova A, Stopka T. **Azacitidine Switch to Lenalidomide Eradicated the *TP53/CDKN2A* Co-Mutated Clone and Induced Long-Term Erythroid Response in Del(5q) MDS.** *Ann Hematol Oncol* (2019) 6(1): 0000.

Další publikované články ve vztahu k disertační práci (plné texty uvedených publikací jsou rovněž přiloženy v samotném závěru práce):

- (5. publikace) Moudra A, **Minarik L**, Vancurova M, Bartek J, Hodny Z, Jonasova A. **NQO1*2 polymorphism predicts overall survival in MDS patients.** *Br J Haematol* (2019) 184: 305-308.
- (6. publikace) Jonasova A, Neuwirtova R, Polackova H, Siskova M, Stopka T, Cmunt E, Belickova M, Moudra A, **Minarik L**, Fuchs O, Michalova K, Zemanova Z.

Lenalidomide treatment in lower risk myelodysplastic syndromes—The experience of a Czech hematology center. (Positive effect of erythropoietin ± prednisone addition to lenalidomide in refractory or relapsed patients). *Leukemia Research* (2018) 69: 12-17

Publikované články bez vztahu k disertační práci:

- (7. publikace) **Minarik L**, Vargova K, Dusilkova N, Kulvait V, Jonasova A, Kodet O, Stopka T. **Hereditary Haemorrhagic Telangiectasia (HHT) Marked by ACVRL1C1120T Variant Displays Hypopigmented Naevi and Frequent Bleeding Episodes if CYP2C9 Co-Mutated: Clinical Notes & Rationale of Patient Registry.** *Folia Biologica* (2020) 66(1): 1-6
- (8. publikace) Vargova K, Pesta M, Obrtlíkova P, Dusilkova 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) 7(7): e585.
- (9. publikace) Basova P, Paszekova H, **Minarik L**, Dluhosová M, Burda P, Stopka T. **Combined Approach to Leukemic Differentiation Using Transcription Factor PU.1-Enhancing Agents.** *Int J Mol Sci* (2022) 23(12): 6729.

Shrnutí výsledků:

(1. publikace) Analysis of 5-Azacytidine Resistance Models Reveals a Set of Targetable Pathways.

Mechanismy, kterými buňky MDS odolávají účinkům hypometylačních látek (HMA), jako je AZA jsou v současnosti předmětem intenzivního výzkumu. Pro lepší pochopení mechanismů, kterými se buňka MDS stává rezistentní k AZA a přechází do AML, vyžaduje vývoj nových buněčných modelů. V této práci se věnuji tématu vzniku terapeutické rezistence na AZA vytvořením buněčného modelu rezistence z buněk buněčné linie OCI-M2 (zakoupeno z DSMZ, #ACC 619) původně citlivých na AZA (AZA-S), která vznikla odběrem periferní krve 56letého pacienta s MDS-EB-2 v přechodu do AML. Validace citlivosti na AZA byla provedena pomocí proliferační eseje WST-1. Vytvoření rezistentního modelu probíhalo kultivací AZA-S buněk v koncentraci 10 000/jamku ve třech 96jamkových destičkách po dobu 48 hodin v IMDM médiu + 20 % fetálního hovězího séra +1 % penicilinu/streptomycinu (150 µl média/jamku). Následně byla obden přidáván AZA v postupně vzrůstajících koncentracích (0,1, 1, 5, 8 a 10 µM). Takto byly získány individuálně rostoucí klony rezistentních buněk (AZA-R). Vznik rezistentního fenotypu jsme rovněž validovali pomocí eseje WST-1 k stanovení hodnoty IC50 (koncentrace léčiva potřebná pro 50% inhibici). V následném kroku bylo nutné validovat model rezistence *in vivo* vytvořením CDX (cell line derived xenograft) modelu použitím transgenního myšího kmene NSG-SGM3 (non-obese diabetic—Scid gamma; NSGS) exprimující lidský interleukin-3 (hIL-3), faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů (GM-CSF) a stem cell faktor (SFC). Xenotransplantace AZA-S a AZA-R buněk myším probíhala ortotopicky intraoseálně do dutiny femorální kosti, jak popsáno v předchozích pracích (Medyouf, Mossner et al. 2014). Před samotnou xenotransplantací proběhla transdukce cílových buněk lentivirem s expresí luciferázy k týdennímu sledování expanze nádorových buněk v celkové anestezii izofluranem měřením luminiscence zobrazovacím systémem Spectral Lago X (Ebinger, Ozdemir et al. 2016). Úspěšné přihojení jsme také validovali použitím průtokové cytometrie buněk explantovaného tumoru expresi povrchového antigenu CD45 specifického pro člověka. Terapie AZA u myši sestávala z dvanácti intraperitoneálních (i.p.) injekcí v průběhu jednoho měsíce v dávce 150 µg na myš. Dávka byla vypočtena tak, aby odpovídala měsíční dávce pro pacienty léčených s MDS. Terapie CDX myši s AZA vedla k prodloužení přežití v modelu AZA-S, zatímco AZA-R a kontrolní CDX myši měly výrazně kratší přežití.

Genetická analýza buněk AZA-S a třech klonů AZA-R (klon #1, #20, #33) zahrnovala celoexomové sekvenování. Příprava sekvenačních knihoven proběhla pomocí Roche NimbleGen SeqCap Kit (Roche, Indianapolis, IN) který zahrnuje 47 Mb všech významných genů. Samotné sekvenování proběhlo pomocí platformy Illumina NextSeq 500 (Illumina, San Diego, CA, USA) (Rabbani, Tekin et al. 2014), přičemž bylo dosaženo průměrné hloubky čtení 50×. Data byla následně analyzována pomocí standardních nástrojů pro kontrolu kvality (FastQC, FastQ screen, multiQC), mapování na genom (GRCh38) se zarovnáním (BWA MEM) a odstraněním nadbytečných sekvencí za účelem vytvoření souborů SAM/BAM. Mapovaná data ve formě souborů VCF byla anotována prostřednictvím veřejně přístupných databází (dbSNP, ClinVar). Zaměřili jsme se na data s hloubkou čtení >10 a frekvencí variantních alel >5 %. V úvahu byly brány pouze varianty s vysokým (skóre 4/5) a velmi vysokým (skóre 5/5) dopadem na strukturu proteinu, mimo jiné také mutace vedoucí k posunu čtecího rámce (frameshift), dále mutace se vznikem stop kodonu (stop-gain) nebo rozsáhlejší strukturální změny. Stran cytogenetického vyšetření byly provedeny chromozomální nátěry podle standardních cytogenetických metod za použití kolcemidu, hypotonického ošetření a fixace v metanolu/ kyselině octové. Karyotypy byly analyzovány metodou mFISH pomocí kitu 24XCyte a počítačového analytického systému ISIS (Meta-Systems, Altlußheim, Německo) podle protokolů výrobce.

Izolace RNA z buněk AZA-S a AZA-R proběhlo po inkubaci 1 μ M AZA po dobu 24 h a kontrolní skupiny na základě dřívějšího postupu (Curik, Burda et al. 2012). mRNA byla obohacena použitím Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module (NEBNext, New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) z 1 μ g celkové RNA po depleci zbytkové DNA pomocí DNA-free Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Sekvenační knihovny byly připraveny pomocí NEBNext Ultra II Directional RNA Library Kit s multiplexovanými indexovými oligonukleotidy NEBNext pro Illumina (Dual Index Primers Set 1). Připravené byly biologické duplikáty, takže pro každý uvedený vzorek jsme vytvořili dvě samostatné knihovny. Knihovny byly sekvenovány na přístroji Illumina NextSeq500 s párovým čtením o délce 150 bp na vzorek. Sekvenční data byla namapována pomocí programu STAR aligner (2.7.3a) k lidskému referenčnímu genomu GRCh38.p13 (Ensembl 103). Diferenciálně exprimované geny (z 24 855 mRNA) byly identifikovány pomocí DESeq2 jako ty, jejichž diferenciální exprese byla větší než 2násobná (nahoru/dolů) s Benjamini-Hochbergem korigovanou p-hodnotou. K získání klasifikace genů byl použit klasifikační systém PANTHER (Mi, Muruganujan et al. 2019).

Data získané v předchozích krocích byly integrovány pomocí nástroje DAVID Functional annotation clustering tool, která používá statistické skóre Kappa k měření vztahů mezi anotačními termíny genové ontologie (gene ontology; GO). Analýza obohacení byla použita ke zvýraznění nejvýznamnějších termínů GO spojených s danými seznamy genů (Sherman, Huang da et al. 2007). Termíny GO s p-hodnotou $< 0,05$ byly považovány za významně obohacené (Huang, Sherman et al. 2009). Byly provedeny analýzy GAD, KEGG, GOTERM, BIOKARTA a INTERPRO. Pro vizualizaci dat byly použity programy GraphPad Prism a R. Pomocí WES se zaměřením pouze na mutace nalezené u AZA-R buněk a v patientských vzorcích z progresse onemocnění jsme odhalili, že mezi 482 geny nesoucími unikátní mutace asociovány s AZA-R fenotypem byly geny dříve spojované s progresí rakoviny (*AKT1*, *HDAC6*, *HDAC2*, *MARCKS*, *SMARCA2*, *BRCA2*, *FANCD2*, *FANCI*, *ERCCI*). Abychom získali celkový přehled o mutanomu AZA-R, použili jsme zdroj DAVID a studovali jsme asociaci souboru genů s jejich biologickou funkcí, strukturou a jejich zapojením do různých biologických drah (Sherman, Huang da et al. 2007). Abychom tyto výsledky dále prozkoumali, museli jsme zjistit, zda jsou mutované molekulární dráhy v buňkách AZA-R ovlivněny také na úrovni mRNA pomocí výše popsané metodiky. Transkriptomická analýza pomocí odhalila 2865 rozdílně exprimovaných mRNA mezi AZA-S a AZA-R, které byly obohaceny o několik klíčových biologických procesů souvisejících s apoptózou, chemokinovou signalizací, PI3K/AKT, RAP1, TNF, TGF a rakovinou. Zatímco buňky AZA-S reagovaly na léčbu AZA rozdílnou expresí 939 genů, buňky AZA-R změnily po léčbě AZA expresí 191 genů, což potvrzuje, že jejich citlivost k AZA je výrazně nižší. Zaměřili jsme se na ty mRNA, jejichž exprese mRNA se mezi buňkami AZA-S a AZA-R významně lišila (nejméně dvojnásobně). Soubor AZA-R obsahoval celkem 602 diferenciálně exprimovaných (Entrez ID: n=563) mRNA, zatímco 298 mRNA bylo v buňkách AZA-R zvýšeno a 304 mRNA sníženo. Opět jsme použili zdroj DAVID, abychom získali celkový přehled o vzorci AZA-R. Analýza KEGG odhalila, že profily AZA-R jsou spojeny s regulací fosforylace specifických signálních drah, jako jsou dráhy chemokinů, PI3K/AKT, TGF β a RAS, které zasahují do regulace buněčného cyklu a přežití také prostřednictvím regulace aktivity GTPáz (GOTERM_BP, GOTERM_MF). Analýza INTERPRO odhalila zapojení Pleckstrinovy domény, o níž je známo, že zprostředkovává intracelulární signalizaci prostřednictvím fosfatidylinositolu. Na základě kombinovaného přístupu, tj. analýzy překrývajících se výsledků AZA-R z WES a RNAseq, jsme dále rozšířili spektrum narušených specifických drah a potvrdili roli PI3K/AKT, chemokinové, RAP1 a RAS signalizace ve fenotypu AZA-R. Kromě toho jsme také zaznamenali silné asociace GTPázové a proteinkinázové/fosfatázové aktivity a

role Pleckstrinových, Src Homology 2 a proteinkinázových domén. Naším dalším krokem bylo ověřit tyto údaje pomocí vybraných inhibitorů, která přímo nebo nepřímo moduluji výše zmíněné dysregulované dráhy AZA-R.

Mezi varianty AZA-R fenotypu patří také mutace *AKT1* c.430C>T (p.Arg144Cys). Na základě 3D struktury se hlavní signální zbytek Ser473, který je fosforylován PI3K stabilizuje sousedním postranním řetězcem Arg144, který s ním tvoří solný můstek. Přístupnost postranního řetězce Ser473 by tedy byla snížena přítomností postranního řetězce Arg144. Přítomnost postranního řetězce argininu je však považována za stabilizační faktor, jakmile dojde k fosforylaci. Mutace R144C poskytuje mnohem kratší postranní řetězec, a proto činí postranní řetězec Ser473 přístupnějším pro fosforylaci intervenující kinázou, jak lze pochopit z modelovacích studií (pomocí softwaru Coot): postranní řetězec Arg144 byl mutován na Cys144, aby se ukázalo, že postranní řetězec Cys může být schopen vytvořit stabilizační interakci s hydroxylovou skupinou Serinu nebo fosfátovou skupinou P-Ser473. Je třeba poznamenat, že pK postranního řetězce Cysteinu (~8,3) je sice nižší než pK Argininu (~13,5), ale zachovává si mírně bazický charakter. Model předpovídá, že R144C je mutace GOF (gain of function) pozitivně regulující množství fosforylace Ser473. Zvýšenou fosforylaci jsme potvrdili u všech testovaných subklonů AZA-R. Mutace *AKT1* byla zjištěna ve všech subklonech AZA-R s vysokou frekvencí. Inhibice AKT1 pomocí MK2206 byla u buněk AZA-R velmi účinná (IC₅₀ ~ 0,3 μM) a dosáhla účinnosti pozorované u buněk AZA-S. Zajímavé je, že jak buňky AZA-S, tak AZA-R byly rezistentní vůči inhibici PI3K (upstream AKT1) (IC₅₀~10,2 vs. 12,8 μM) pomocí inhibitoru kinázy idelalisib, který se zaměřuje na izoformu PI3K p110 δ s vysokou účinností a selektivitou. Data z transkriptomového sekvenování navíc odhalila také upregulaci *AKT2*, *AKT3* a *MTOR* v buňkách AZA-R, což potvrzuje nadměrnou aktivaci dráhy PI3K/AKT. Autonomní hyperfosforylace a aktivace AKT1 může mít řadu následných účinků včetně aktivace mTOR. Proto jsme testovali citlivost modelu AZA-R na inhibitor mTOR rapamycin, který se ukázal jako mimořádně potentní, což potvrdilo význam hyperaktivace dráhy AKT1 v tomto modelu buněk AZA-R.

Dále jsme testovali roli dalších tyrozinkináz, které se podílejí na fenotypu AZA-R, pomocí screeningu léčiv. Dasatinib (DAS) je perorální duální inhibitor tyrozinkináz rodiny BCR/ABL a SRC, což jsou nереceptorové proteinové tyrozinkinázy, které se podílejí na řízení řady buněčných procesů včetně proliferace, diferenciace, motility a adheze. DAS má mírný, konzistentní a velmi podobný účinek na inhibici buněk AZA-S a AZA-R v testu WST-1 (IC₅₀ ~8 μM). Další inhibitor kináz, sorafenib (SOR), působí inhibicí několika různých kináz (RAF-1, VEGF, c-KIT, PDGFR, ERK a FLT3), které se podílejí na proliferaci nádorových

buněk a angiogenezi. SOR inhibuje proliferaci blokováním kinázové aktivity C-RAF/B-RAF a fosforylace MEK a ERK. SOR má však mírný účinek na inhibici buněk AZA-S (IC₅₀ 4 μM) a AZA-R (IC₅₀ 8 μM). Další inhibitor, Ruxolitinib (RUX), působí tak, že inhibuje signalizaci cytokinů a jejich receptorů, které využívají kinázový mechanismus proteinů JAK1 nebo JAK2 pro signalizaci, která zahrnuje transkripční aktivátory (STAT), které přenášejí signály do jádra a indukují transkripci genů. Dráha JAK/STAT je u některých klonů AZA-R více aktivována, jak je patrné z detekce fosforylovaného STAT3 na Tyr705. Ve srovnání s DAS nebo SOR má však RUX mírnější účinek na inhibici buněk AZA-S a AZA-R (IC₅₀ 13 vs. 15 μM). Naše údaje ukazují, že blokování určité kinázové aktivity u AZA-R pomocí DAS, SOR nebo RUX je relativně neúčinné.

Jak naznačují data transkriptomového sekvenování, dysregulovaná exprese *ERG*, *FLII*, *HOXA9*, *HOXA10* naznačuje zapojení chromatinového regulátoru BRD4 (bromodomain-containing protein 4). Nedávno bylo prokázáno, že inhibice BRD4 potlačuje progresi leukémie (Pericole, Lazarini et al. 2019). Proto jsme použili JQ1, inhibitor proteinů s BET doménou s dosažením značného efektu (IC₅₀ ~ 0,1 μM) u buněk s fenotypem AZA-R i AZA-S. Údaje z WES, které identifikovaly několik variant histondeacetyláz *HDAC2* a *HDAC6* spolu s dysregulací *HDAC9*, nás vedly k testování účinnosti inhibice HDAC u buněk AZA-R. Použili jsme panabinostat (PAN), což je neselektivní inhibitor HDAC třídy I (HDAC 1, 2, 3, 8), třídy II (HDAC 4, 5, 6, 7, 9, 10) a třídy IV (HDAC 11). IC₅₀ pro PAN byla ve srovnání s AZA u subklonů AZA-R o čtyři řády nižší ve srovnání s AZA-S. Souhrnem lze říct, že blokování domén BET a HDAC se tedy zdá být velmi účinné vůči buňkám AZA-R in vitro.

Další data z transkriptomového sekvenování také naznačila, že v rezistenci k AZA může hrát roli vztah mezi přežíváním buněk a indukcí apoptózy. Zaměřili jsme se na homology BCL2 a jejich vliv na dráhu přežívání buněk a použili jsme specifické inhibitory včetně VEN, ABT-737 a S63845. VEN inhibuje protein BCL2, což vede k apoptóze maligních kmenových buněk. O přípravku ABT-737 je známo, že inhibuje BCL-2, BCL-XL a BCL-W, ale nikoli MCL1 v závislosti na přítomnosti BAK nebo BAX. S63845 je selektivní inhibitor MCL1. Protože BCL2, MCL1 a BCL-XL se mohou navzájem částečně kompenzovat, provedli jsme jejich expresi pomocí Western blotu a ukázali, že buňky AZA-R zvýšily (2-2,5x) expresi MCL1, zatímco exprese BCL-XL a BCL2 byla snížena. Rozdílná buněčná exprese proteinů BCL2, MCL1 a BCL-xL v buňkách AZA-R vs. AZA-S může souviset s rozdíly v terapeutické účinnosti těchto inhibitorů. V monoterapii tak mají VEN, ABT-737 a S63845 zcela rozdílné účinky vůči AZA-R, přičemž S63845 (IC₅₀ ~ 0,1-0,4 μM) je nejsilnějším inhibitorem AZA-R a VEN je nejslabší (IC₅₀ ~ 10-14 μM).

Naše práce přináší nové poznatky o mechanismech fenotypu rezistence k AZA, kde dochází k deregulaci specifických drah, které jsou ovlivnitelné cílenou inhibicí. Konkrétně jsme zjistili, že fenotyp AZA-R je asociován kromě jiných aberací s deregulací signalizace v PI3K/AKT dráze, dochází také k deregulaci histondeacetyláz a v dráze pro apoptózu. Předpokládáme, že použití buněčného modelu rezistence a párových vzorků pacientů s MDS, u nichž se vyvinula rezistence, může pomoci nalézt cílové dráhy, které lze dále zkoumat na myších modelech *in vivo* s cílem nalézt nové terapeutické strategie pro rezistenci na AZA.

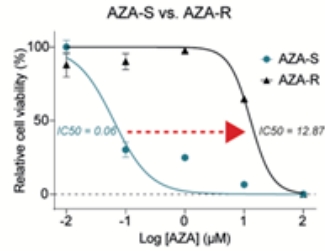
Autorův podíl na publikaci: 1. autor, generování buněk AZA-R, buněčné kultury, izolace DNA/RNA, tvorba knihovny NGS, testování inhibitorů, anotace pacientů, imunoblotting

Legenda: Grafický abstrakt (Publikace 1): Analýza modelu rezistence AZA. (A): Stanovení IC₅₀ pro AZA pomocí WST1 eseje u buněk citlivých na AZA (AZA-S) vs. buněk rezistentních na AZA (AZA-R, klon č. 1). **(B-D):** Následně byly buňky AZA-S a AZA-R xenotransplantovány myším kmene NSGS a léčeny AZA nebo vehikulem (Ctrl). Terapie 150 µg AZA/myš byla aplikována i.p. třikrát týdně. Bylo sledováno celkové přežití (na ose X uvedené dny; 4 nebo 5 myši v každé skupině). Výsledky: koreluje s *in vitro* modelem rezistence, léčené myši s transplantovanými buňkami AZA-S přežívaly déle než myši AZA-R (AZA-S vs. AZA-R; $p = 0,004$), a jako kontroly (AZA-S vs. Ctrl; $p = 0,0014$), naopak přežívání myši AZA-R vs. Ctrl nebylo statisticky signifikantní ($p = 0,0953$). **(C, D):** Detekce luminiscence pomocí *in vivo* bioimagingu (osa Y; Mean Rad). Během léčby AZA dochází u od 6. týdne ke zpomalení proliferace xenotransplantovaných buněk u léčených myši ve skupině AZA-S (vlevo) v porovnání s kontrolní skupinou. Naopak, myši, které nesou xenografty AZA-R (vpravo) vykazují stejné hodnoty luminiscence jako kontrolní skupina. Při analýze byl použit nepárový Mannův-Whitneyho t-test. (* = p -hodnota < 0,05, ns = není statisticky signifikantní). **E:** Transkriptomická analýza odhalila 2865 diferenciálně exprimovaných mRNA mezi AZA-S a AZA-R, zobrazen Volcano graf diferenciální genové exprese; významnost označena upraveným $p < 0,05$; červeně je označena \log_2FC exprese > 1. Vybrané mRNA jsou zobrazeny symbolem HGNC. Heatmapy zobrazují expresi mRNA $\log_2(AZA-R/AZA-S)$ ve dvou replikátech, jak bylo zjištěno analýzou drah KEGG a zahrnují několik klíčových biologických procesů souvisejících s apoptózou, chemokinovou signalizací, rakovinou, dále zahrnují dráhy signalizace PI3K/AKT, RAP1, TNF a TGF. **F:** Validace drah spojených s fenotypem AZA-R. Použití WST-1 eseje dokazuje efekt specifických inhibitorů

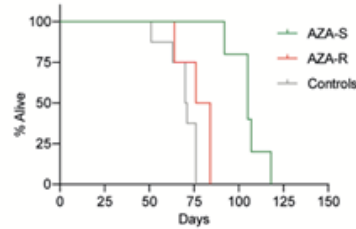
deregulovaných drah jako je JQ1 nebo panabinostat (PAN).

Grafický abstrakt (Publikace 1)

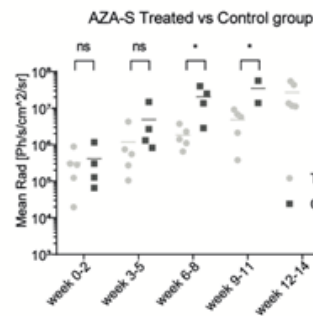
A



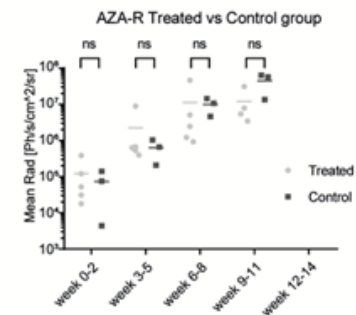
B



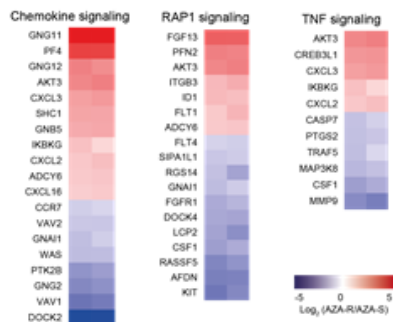
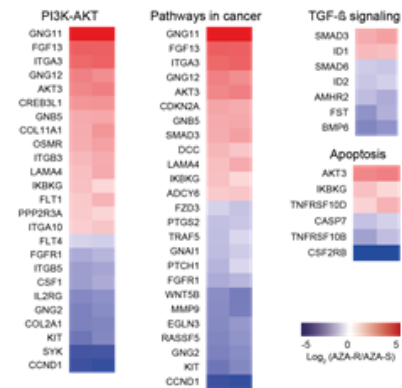
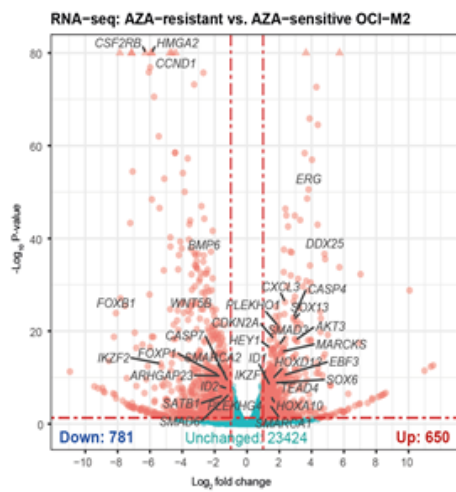
C



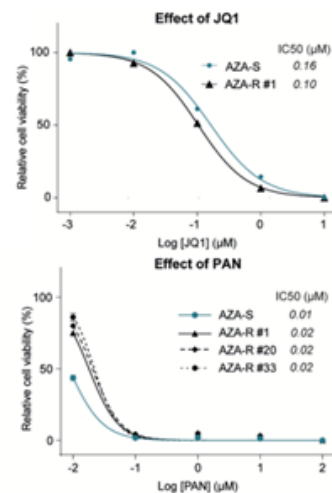
D



E



F



(2. publikace) G-CSF plus azacitidine versus azacitidine alone for patients with high-risk myelodysplastic syndrome: academic, open label, randomized trial.

G-CSF (faktor stimulujiící kolonie granulocytů) aktivuje transkripci myeloidních genů v kmenových buňkách, pokud je přidán před HMA (Hu, Negrotto et al. 2010) (Curik, Burda et al. 2012). G-CSF se používá u MDS pro neutropenické komplikace. Naše klinická retrospektivní data 162 pacientů s HR-MDS léčených AZA vyšší spotřeba G-CSF (N = 35) byla spojena s nižším výskytem neutropenie 4. stupně (Gr) a následně s delším celkovým přežitím (OS, medián 27,4 vs 18 Mo, $p = 0,017$). Vliv G-CSF na účinnost AZA jsme zkoumali v této akademické prospektivní randomizované studii. Celkem 76 pacientů s high-risk MDS nebo MDS/AML do 30% myeloblastů nevhodných k transplantaci. Pacienti byli randomizováni do ramene A (monoterapie AZA) a ramene GA (GCSF + AZA). Cíle studie zahrnovaly míru odpovědi, OS, přežití bez progresu (progression free survival; PFS), trvání odpovědi a bezpečnost. Tři pacienti zemřeli předčasně a nebyli randomizováni ani u nich nebyla zahájena léčba a u třech pacientů došlo k úmrtí během zahájení 1. cyklu, bylo tedy analyzováno celkem 70 pacientů, v ramenech GA (N = 39) a A (N = 31). Průměrný věk a poměr mužů a žen v rameni GA byl 73 let a 23:16 (59 % mužů) oproti 74 letům a 15:16 (48 %) v rameni A. Pacienti v obou ramenech měli přibližně srovnatelné hematologické nálezy, ale nebyly dokonale vyvážené; například pacienti v ramenu A mělo více myeloblastů v kostní dřeni a rameno GA mělo vyšší podíl pacientů s t-MDS. Pacienti s EB-2 a MDS/AML měli mírně vyšší mutační zátěž ve srovnání s ostatními vysoce rizikovými pacienty s EB-1. AZA byl podáván standardně 7 dní (75 mg/m²), G-CSF byl podáván 2 dny před 1. dávkou AZA a 2 dny před 6. dávkou AZA v dávce 5 µg/kg tělesné hmotnosti. Medián podaných počtu cyklů AZA byl 8 (rozmezí 1-40). Odpověď na léčbu byla hodnocena podle kritérií IWG (Cheson, Greenberg et al. 2006). Celková míra odpovědi (overall response rate; ORR, GA vs A) byla 77 % vs 61 % ($p = 0,000899$), CR 31 % vs 23 % ($p = 0,575$), PR 23 % vs 23 % ($p = 0,554$), SD s HI 18 % vs 0 % ($p = 0,473$), SD bez HI 8 % vs 13 % ($p = 0,739$). Přežití bez progresu (PFS, GA vs A) bylo 9,7 vs 6,1 měsíce (95% CI: [254,831], resp. [64,208] dní) ($p = 0,09$, Cochran-Mantel-Haenszelův logrank test). Při prvních čtyřech cyklech AZA odpovědělo CR/PR/HI mnoho pacientů patřících do ramene GA (N = 28; 72 %), zatímco v rameni A dvakrát méně (N = 14; 45 %). To je důležité zejména pro ty pacienty, u nichž je během prvních cyklů AZA zvýšené riziko infekčních a jiných komplikací spojených s cytopenií; na druhou stranu dosažení lepší odpovědi dává šanci na delší OS. Hemoglobin (HB) a trombocyty (PLT) mají pozitivní očekávaný vliv na léčebnou odpověď ($p < 0,0001$ pro každý z nich), zatímco MB z

periferní krve mají negativní očekávaný vliv ($p = 0,0007$). Jedním z velmi důležitých parametrů této studie byla míra progresse AML během léčby v závislosti na podávání G-CSF. Progrese do AML byla srovnatelná, jak bylo pozorováno u 20 pacientů v rameni GA (52 %) oproti 21 pacientům v rameni A (68 %) ($p = 0,968$). Doba do progresse do AML byla rovněž srovnatelná: V rameni GA bylo 9,8 měsíce vs. 8,9 měsíce v rameni A ($p = 0,450$). Tato skutečnost byla srovnatelně pozorována v obou ramenech při každém restagingu. Nezjistili jsme tedy žádný vliv přidání G-CSF na progresi do AML po celou dobu léčby HMA. Díky NGS analýze jsme mohli pozorovat vliv mutací na celkové přežití: negativními prediktory jsou mutace *DNMT3A* ($p = 0,0131$), *ETV6* ($p = 0,0012$), *EZH2* ($p = 0,0044$), pozitivními: *SF3B1* ($p = 0,0005$). Pacienti mužského pohlaví mají tendenci k delšímu OS ($p = 0,0041$), zatímco neutropenie Gr. 4 znamená kratší OS ($p = 0,0229$). Shrnutím výsledků studie se potvrdil náš primární cíl zvýšit odpověď na léčbu a přežití v rameni GA versus A, zejména u pacientů s počáteční neutropenií v prvním roce léčby AZA. Nezjistili jsme vliv G-CSF na progresi do AML, což je rovněž významné. Podávání G-CSF před AZA tedy představuje zlepšení oproti standardnímu režimu AZA u pacientů s vysoce rizikovým MDS a oligoblastickou AML.

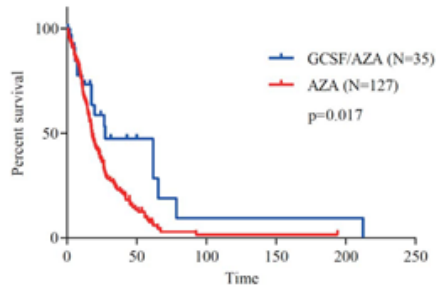
Autorův podíl na publikaci: biobanking, příprava vzorků k NGS analýze, NGS analýza, péče o pacienty a sběr klinických dat, validace klinických dat

Legenda: Grafický abstrakt (Publikace 2): **A:** Na základě retrospektivní analýzy 162 pacientů léčených AZA pro HR-MDS ve Všeobecné fakultní nemocnici v Praze jsme zjistili, že pacienti léčení AZA s použitím G-CSF ($N=35$; medián 3 injekce na cyklus) měli významně delší OS (Log-rank test, medián 27,4 vs 18 měsíců, $p=0,017$, HR 0,5922, 95CI 0,3849-0,9112). **B:** Toto vedlo k návrhu protokolu GA, zobrazena sekvence dávkování AZA a G-CSF. Dávkování AZA bylo standardní, 75 mg/m² po dobu sedmi dnů (režim 5+2+2) podáváno subkutánně v rámci 28denního cyklu. G-CSF byl podáván subkutánně v den -2 (2 dny před 1. dávkou AZA) a v den +6 (den následující po 5. dávce AZA) v dávce 30 MIU u pacientů s tělesnou hmotností nižší než 80 kg nebo 48 MIU u pacientů s hmotností nad 80 kg. **C:** Popis studijní kohorty. Parametry představují počet pacientů (N), věk, poměr mužů a žen a podtyp MDS pro rameno GA vs A. Níže popis sledovaných parametrů krevního obrazu, biochemie, cytogenetiky, nálezu v kostní dřeni a rizikového skóre IPSS-R. N uvádí pro počet pacientů, % procenta. **D:** Přehled mutací v genech souvisejících s patogenezí MDS v diagnostických vzorcích kostní dřene pro každé rameno. Nejčastěji mutovaným genem je

nepřekvapivě TET2 (nahore). **E:** Pravděpodobnost přežití v závislosti na čase (osa X, ve dnech) pro obě léčebná ramena (GA – modrá křivka vs. A – červená křivka) klinické studie. Přestože se nepotvrdila statistická signifikance celkového přežití v prospěch ramene GA, jak ukazuje Kaplan-Meierův graf, klinické testování léčby G-CSF ukázalo, že podání G-CSF předcházející AZA je užitečný ve velmi časných fázích terapie tím, že vyvolává trvalejší odpovědi a umožňuje podávání AZA v plné dávce a bez prodlužování intervalů mezi léčbami, což je často způsobeno infekčními komplikacemi.

Grafický abstrakt (Publikace 2)

A



B



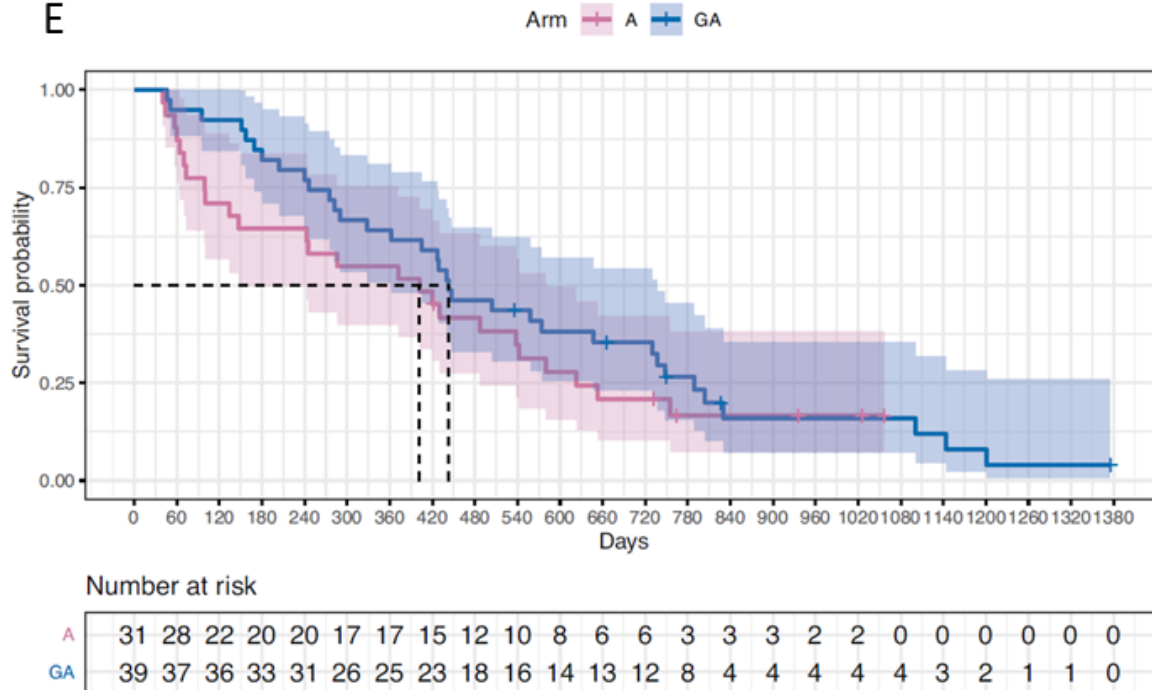
C

GA-MDS/2013 Cohort Description	GA	A	Overall
Patients (N)	39	31	70
Age (Median, years)	73	74	73
M:F ratio	23:16	15:16	38:32
MLD (N)	2	3	5
EB-1 (N)	14	3	17
EB-2 (N)	15	14	29
AML (N)	7	9	16
CMML-1/2 (N)	1	2	1
Therapy related MDS (N)	10	4	14
WBC (x10E9/l)	3.9	6.2	4.7
Hemoglobin (g/l)	91.6	94.9	93.2
Platelets (x10E9/l)	103.2	75.1	90.1
Abstolut neutrophil count	1.9	2.5	2.1
Lactate dehydrogenase (µkat/l)	4.9	4.3	4.4
Ferritin (µg/l)	1343.9	1017.6	1199.5
Peripheral blood myeloblasts (%)	4.5	6.2	5.2
Bone marrow myeloblasts (%)	11.4	16.1	13.5
Bone marrow fibrosis (Grade)	1.3	1.2	1.2
Transfusion dependent (N)	18	30	48
IPSS-R (Median)	6.5	5.5	6
IPSS-R Cytogenetic Score (Median)	3	1.5	2

D

	GA	A	Overall
TOTAL	85	55	140
<i>TET2</i>	13	7	20
<i>RUNX1</i>	10	6	16
<i>ASXL1</i>	4	7	11
<i>DNMT3A</i>	5	3	8
<i>STAG2</i>	4	4	8
<i>TP53</i>	6	2	8
<i>SRSF2</i>	4	3	7
<i>SF3B1</i>	3	4	7
<i>IDH2</i>	2	4	6
<i>CEBPA</i>	2	4	6
<i>IDH1</i>	4	1	5
<i>BCOR</i>	5	0	5
<i>EZH2</i>	2	2	4
<i>JAK2</i>	1	3	4
<i>KMT2A</i>	4	0	4
<i>BCORL1</i>	3	0	3
<i>CUX1</i>	2	1	3
<i>KDM6A</i>	2	1	3
<i>CSF3R</i>	2	1	3
<i>RAD21</i>	0	2	2
<i>NPM1</i>	2	0	2
<i>CBL</i>	2	0	2
<i>ETV6</i>	2	0	2
<i>CDKN2A</i>	1	0	1

E



(3. publikace) Somatic mutation dynamics in MDS patients treated with azacitidine indicate clonal selection in patients-responders.

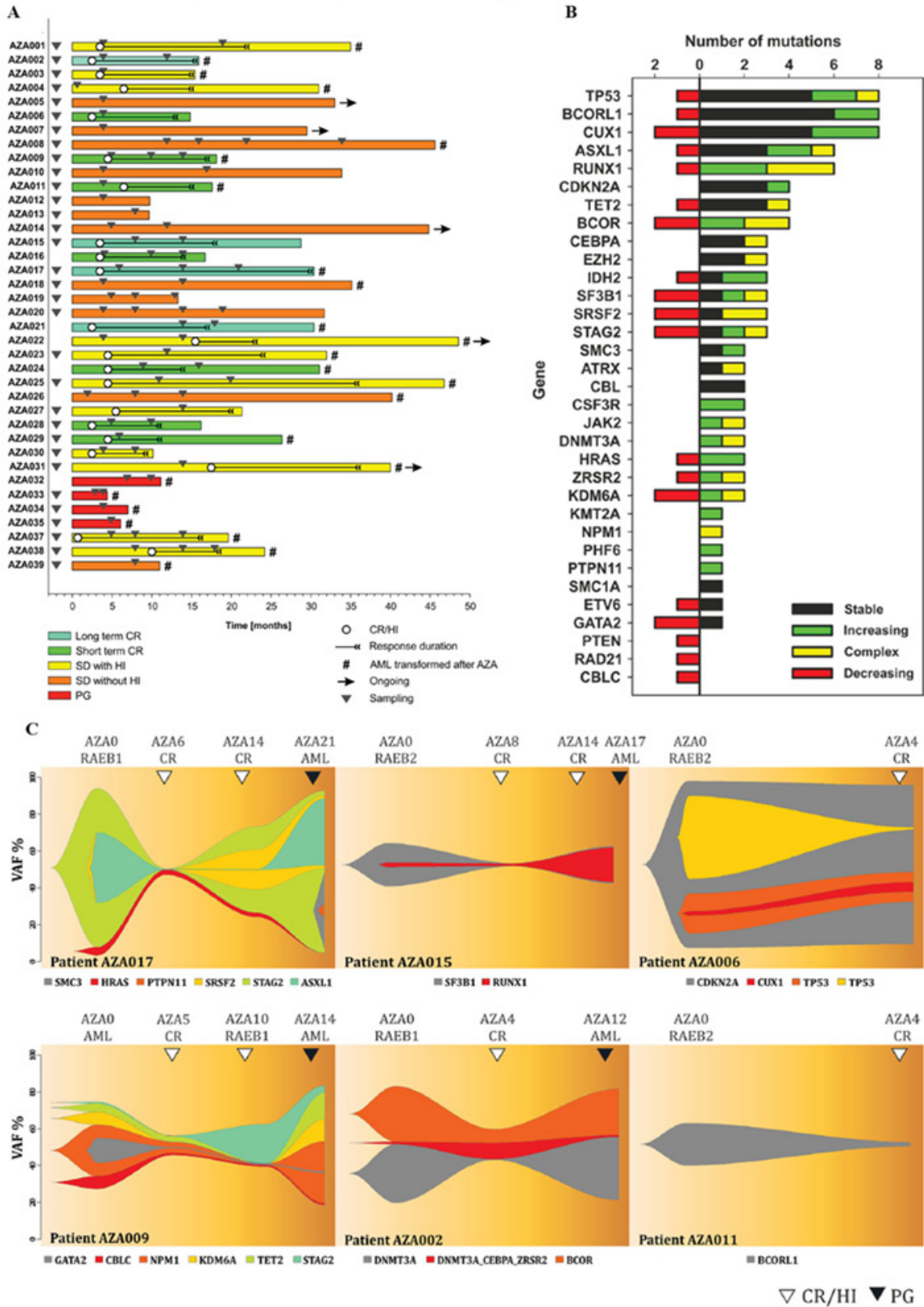
Jedná se o studii srovnávající změny alelických frekvencí mutovaných genů u high-risk MDS pacientů léčených AZA pomocí masivního paralelního sekvenování panelem obsahující 54 genů. Práce zahrnuje sériové odběry vzorků před léčbou AZA a během u 38 pacientů dosahujících mediánu celkového přežití (OS) 24 měsíců s dosažením ORR 60 %. Spolu bylo identifikováno 116 somatických patogenních variant s variantní alelickou frekvencí (variant allele frequency; VAF) přesahující 5 %. Vysoké přesnosti dat přispěla duplikace sekvenačních knihoven z myeloidních buněk a sekvenování kontrolních T-lymfocytů. Pozorovali jsme, že téměř polovina variant měla stabilní dynamiku, zatímco ostatní varianty byly vysoce volatilní. U pacientů s výrazným poklesem VAF během léčby AZA docházelo i ke klinické odpovědi. Naproti tomu pacienti časně progredující na AZA terapii vykazovali minimální změny mutačního vzorce. Modelovali jsme dynamiku VAF při léčbě AZA a využili jsme společný model pro celkovou přežití a délky trvání odpovědi. Zatímco přítomnost určitých variant s popsáním klinickým dopadem, jako jsou mutace *CDKN2A*, byly i v naší studii nepříznivými prediktory. Analýza také naznačovala, že alelická volatilita představuje další důležitou prognostickou proměnnou. Kromě toho jsme zjistili, že předcházející 5q- syndrom představuje silný pozitivní prediktor delšího celkového přežití a délky trvání odpovědi u pacientů s MDS s vysokým rizikem léčených AZA. Závěrem lze říci, že dynamika variant zjištěná prostřednictvím sériového vzorkování představuje další parametr, který je třeba vzít v úvahu při hodnocení účinnosti AZA a predikci výsledků.

Autorův podíl na publikaci: příprava vzorků k NGS analýze, NGS analýza, péče o pacienty, sběr klinických dat, validace klinických dat

Grafický abstrakt (Publikace 3)

Grafický abstrakt (Publikace 3) Legenda: **A:** Swimmers ploty 38 pacientů léčených AZA zobrazují průběh onemocnění v čase, osa X označuje měsíce sledování. Pro každého pacienta jsou vyznačeny odpovědi (v různých barvách: CR, SD, HI nebo PG), jejich trvání (v měsících), odběr vzorků (trojúhelníky) a transformace AML (#). **B:** Počet mutací (vodorovná osa) v genech uvedených na svislé ose. Jednotlivé barvy označují dynamiku mutací sledovanou pomocí změny VAF v sériových odběrech u jednotlivých pacientů: černá barva označuje mutace s nízkou změnou VAF, zelená označuje varianty, u kterých docházelo k vzestupu VAF, červená označuje pokles VAF a žlutá označuje mutace, kterých VAF nefluktuoval konstantním trendem mezi sériovými odběry. **C:** Fish ploty somatických mutací zjištěných u pacientů, kteří dosáhli kompletní remise. Šipky označují CR (prázdná) a transformaci do AML (PG, tmavá). Osa Y představuje VAF (%) a osa X čas v týdnech. V době morfologické remise onemocnění dochází k redukcí VAF u vybraných mutací, naopak jejich zvýšení i během dalšího sledování může předpovědět klinickou progresi (kasuistiky pacientů AZA017, AZA015).

Grafický abstrakt (Publikace 3)

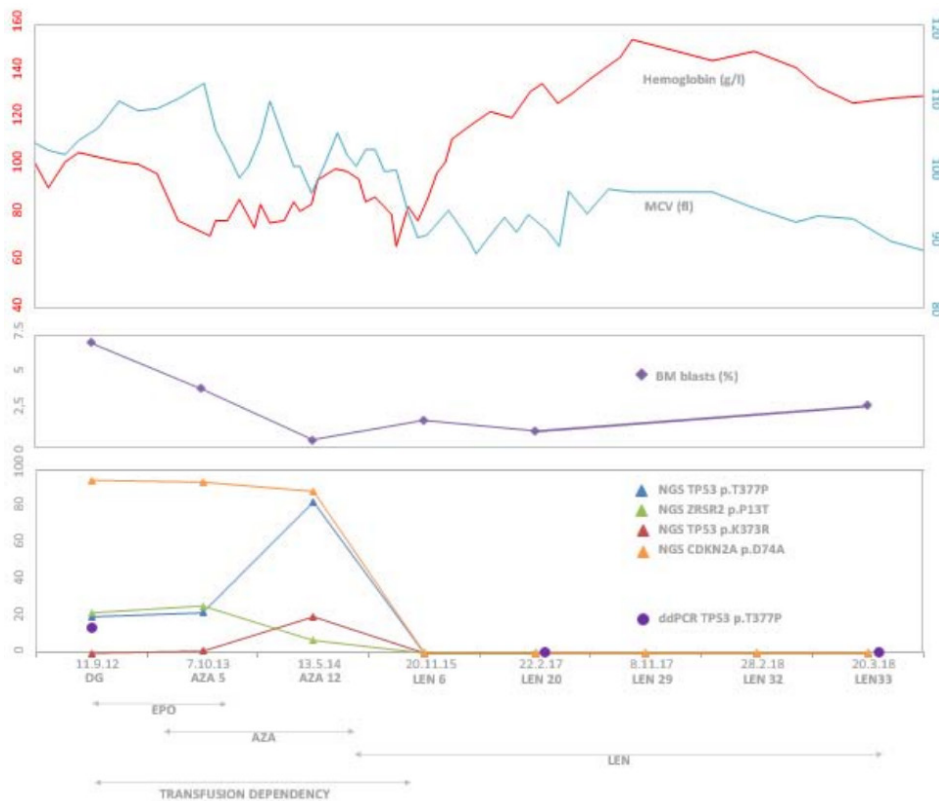


(4. publikace) Azacitidine Switch to Lenalidomide Eradicated the *TP53/CDKN2A* Co-Mutated Clone and Induced Long-Term Erythroid Response in Del(5q) MDS.

V této publikaci se věnujeme zajímavému případu 68letého pacienta s letitou anamnézou MDS s izolovanou delecí pátého chromozomu (del(5q)), u kterého bylo možné korelovat klonální vývoj onemocnění s klinickým průběhem díky NGS a droplet digital PCR (ddPCR). U pacienta byl jako první linie léčby nasazen erythropoietin (EPO), který byl bohužel bez efektu, naopak s rozvojem transfuzní dependence a v kontrolním vyšetření kostní dřeně byla navíc pozorována progresse onemocnění do stadia MDS-EB-1. Standardní terapie lenalidomidem (LEN) pro pacienty s del(5q) v tomto momentu nebyla vhodná z důvodu neefektivity léčby u vyššího stadia MDS. Díky vyššímu IPSS-R skóre byl indikován k podání 5-azacytidinu (AZA), kterého nasazení vedlo ke snížení počtu myeloblastů v kostní dřeni během kontrolních vyšetření a tím snížila risk rozvoje akutní myeloidní leukemie (AML), terapie ale nevedla k znatelnému zlepšení v hladině hemoglobinu a přetrvávala transfuzní dependence. Na molekulární úrovni se navíc během terapie AZA zvýšila alelická frekvence mutací v genech *CDKN2A*^{D74A}, *TP53*^{K373R+T377P} a *ZRSR2*^{P13T}. Na základě této skutečnosti, i přes dosažení dřevové odpovědi (mCR; marrow complete remission) během léčby AZA, nicméně s trvajícím rizikem progresse onemocnění do AML díky zvýšení alelických frekvencí mutací ve vysoce rizikových genech jsme se rozhodli změnit léčbu na LEN. Tato terapie nejenom snížila variantní alelická frekvence (VAF) mutovaných genů, navíc plně normalizovala krevní obraz a pacient dosáhl transfuzní nezávislosti. Souhrnně lze případ popsat jako úspěšnou terapii MDS vysokého rizika pomocí AZA s dosažením dřevové remise ale s trvajícím transfuzní dependencí navíc s nárůstem alelických frekvencí mutací v rizikových genech, kdy došlo po změně terapie na LEN k úpravě krevního obrazu a vymizení vysoce rizikových subklonů s trvajícím klinickou odpovědí.

Autorův podíl na publikaci: NGS analýza, validace klinických dat

Grafický abstrakt (Publikace 4)



Grafický abstrakt (Publikace 4) Legenda: Časová osa sledující průběh onemocnění pacienta. Krátce po stanovení diagnózy del(5q) MDS došlo k rozvoji transfuzní závislosti, pacient zahájil léčbu EPO, avšak bez efektu. Kontrolní vyšetření kostní dřeně ukázalo progresi do stadia MDS-EB-1 a pacient zahájil léčbu AZA. Bylo podáno 17 cyklů, která vedly k poklesu blastů v kostní dřeni (dosažení mCR), ale současně se zvýšila alelická frekvence somatických mutací. Pro protrvávání transfuzní dependence byla proto léčba byla změněna na LEN, která vedla k dosažení kompletní remise včetně dosažení transfuzní nezávislosti (hladina hemoglobinu (HB) a střední korpuskulární objem (MCV) jsou uvedeny v horní části). Prostřední panel ukazuje dynamiku počtu myeloblastů v kostní dřeni a VAF (v %) somatických mutací v průběhu terapie. Kromě přetrvávající cytogenetické aberace del(5q) jsme u pacienta zachytili i somatické mutace v *CDKN2A*^{D74A}, *TP53*^{K373R+T377P} a *ZRSR2*^{P13T}; tyto klon/klony byly eradikovány terapií LEN.

Diskuze:

Naším cílem bylo vytvořit in vitro model MDS/AML buněčných linií rezistentních na 5-azacytidin (AZA-R), co bylo provedeno dlouhodobou inkubací s AZA, co by napodobovalo vznik rezistence na AZA u pacientů s tímto onemocněním. Právě analýzou buněk s AZA-R fenotypem ve srovnání s primárními vzorkami kostních dřeví pacientů kteří vytvořili rezistenci na AZA jsme identifikovali dysregulované dráhy u AZA-R fenotypu. Důležitým výsledkem této práce je zapojení dráhy PI3K/AKT v rámci rezistence na AZA. Aktivace PI3K je za normálních podmínek iniciována působením růstových faktorů a cytokinů na povrchu buňky prostřednictvím receptorové tyrozinkinázy, která rekrutuje adaptorovou podjednotku p85 PI3K, která je aktivována receptory spřaženými s G proteinem nebo malými Ras GTPázy, které se vážou na PI3K přímo. Soubor fosforylovaných druhých posílů (PIP2, PIP3, PDK1) je vystupňován fosforylací AKT1 na Ser473 komplexem mTOR, který je považován za indikátore aktivace této dráhy. Tato dráha byla významně zapojena do AZA-R fenotypu jak z analýz celoxomového sekvenování (whole exome sequencing; WES) (grafická příloha), tak z analýz transkriptomového sekvenování (RNAseq) (grafická příloha). V subklonech AZA-R buněk jsme zaznamenali mutaci v genu AKT1 na pozici c.430C>T (p.Arg144Cys), která je typu gain-of function (GOF), jak naznačují strukturní analýzy, která vede k hyperfosforylaci AKT1, co bylo potvrzeno pomocí Western blotu. Kromě toho jsme pomocí RNAseq pozorovali zvýšenou regulaci AKT2, AKT3 a mTOR v buňkách AZA-R, což naznačuje nadměrnou aktivaci dráhy PI3K/AKT. Pomocí specifických inhibitorů jsme následně ukázali, že blokování AKT (MK2206) nebo mTOR (rapamycin), ale nikoli PI3K (idelalisib) může inhibovat přežití buněk AZA-R použitím WST-1 proliferační eseje. Tyto údaje jsou v souladu s řadou předchozích referencí v literatuře a navazují na rozsáhlé práce týkající se PI3K/AKT/mTOR u AML, zatímco je málo známo o PI3K/AKT/mTOR u MDS progredujícího na léčbě AZA do stadia AML. Například hodnocená odpověď 80 vzorků buněk získaných od pacientů s AML léčených selektivní inhibicí PI3K/AKT/mTOR potvrdila, že přibližně 60 % z nich vykazuje hyperaktivaci dráhy, co je rovněž spojeno se zkráceným celkovým přežitím (overall survival, OS) (Bertacchini, Guida et al. 2014). Hyperaktivace dráhy PI3K/AKT/mTOR, včetně hyperfosforylace AKT1-Ser473, kterou jsme potvrdili také u subklonů AZA-R, lze typicky nalézt u pacientů s chemorezistentní AML, což pravděpodobně souvisí s mechanismem, který umožňuje leukemickým kmenovým buňkám přežít (Bertacchini 2018). Zajímavé je, že aktivace dráhy PI3K/AKT/mTOR souvisí také s dalšími drahami deregulovaných u AML, konkrétně s mutacemi FLT3-ITD nebo s mechanismy

procesu apoptózy buněk, včetně BCL2, z čehož vyplývá, že použití PI3K/AKT/mTOR v monoterapii je značně omezené. Kromě toho existuje spojení s další signální dráhou RAS/RAF/MEK/ERK prostřednictvím vzájemné regulace a sdílení efektorů, přičemž tyto dráhy ovlivňují řadu klíčových buněčných funkcí (Darici, Alkhaldi et al. 2020). Ačkoli MK2206 účinně potlačuje fosforylaci AKT, nevykazoval efekt v monoterapii (podobně jako PI3Ki), ale jeho dobrá snášenlivost otevírá možnost jeho zařazení do kombinačních strategií pro pacienty s MDS progredujícími na terapii AZA. To podporuje práce, které tvrdí, že AKT-Ser473 je hyperfosforylován u 90 % pacientů s vysoce rizikovým MDS ve srovnání s pacienty s nízkou rizikovým MDS nebo ve srovnání s kontrolou. Stejně tak hladina izoformy PI3K p110 sledovala stejný vzorec v myeloblastech u pacientů s progredujícím MDS (Nyakern, Tazzari et al. 2006). Další práce nedávno ukázala, že mutace v genu ASXL1, které jsou často spojeny s nižší hladinou PTEN vykazují významně vyšší citlivost k inhibitoru AKT1 MK2206, což je v souladu s faktem, že nadměrná aktivace PI3K/AKT/mTOR může být přímým důsledkem hypometylačních látek zaměřených na obecný mechanismus transkripční represe (a tedy ochrany chromatinové struktury), jakož i přežití buněk AML (Cao, Xia et al. 2020). Mezi další signální dráhy studované u buněk AZA-R patří RAS/RAF/MEK/ERK a SRC. Dráha RAS/RAF/MEK/ERK, která se skládá z kaskády kináz, jež je regulována fosforylací a defosforylací specifickými kinázami, fosfatázami a rovněž výměnou GTP/GDP a dalšími proteiny, byla již dříve popsána jako marker citlivosti a rezistence na antileukemickou léčbu. Klíčová je fosforylace ERK1 (MAPK3) na Thr202/Tyr204, která je významně snížena u všech AZA-R subklonech, a proto má multikinázový inhibitor sorafenib (SOR), který blokuje kinázu RAF a fosforylaci MEK a ERK na buňky AZA-R poměrně malý účinek změřením IC50. Tato signální dráha je často deregulována u buněk rezistentních k antileukemické léčbě (Steelman, Franklin et al. 2011). Použití SOR u pacientů s AML je však poměrně účinné, zejména u pacientů s mutací FLT3-ITD což vede k prodloužení celkového přežití (Bazarbachi, Labopin et al. 2019), což opět posiluje význam signální dráhy RAS/RAF/MEK/ERK. Pokud jde o signalizaci prostřednictvím rodiny různých kináz Src (včetně LYN a SRC), tyto jsou exprimovány u AML a jejich fosforylace reguluje proliferaci a přežívání leukemických buněk (prostřednictvím LYN zprostředkovávající aktivaci mTOR) (Voisset, Brenet et al. 2020). Efekt použití monoterapie SOR nebo dasatinibu (DAS) u AZA-R buněk nebyl pozorován, co dokazují naše data, kde se fosforylace SRC-Tyr416 nelišila od fosforylace SRC-Tyr416 v případě porovnání AZA-R a AZA-S buněk, nebyl pozorován ani synergismus kombinace SOR/AZA nebo DAS/AZA. Studovali jsme také některé jaderné procesy spojené s AZA-R fenotypem. Data z WES poukázaly na zapojení kohezivního

komplexu a regulátorů transkripce, což bylo podpořeno výsledky *in silico* analýzy, která ukázala zapojení enzymů remodelujících chromatin. Zaznamenali jsme také roli HDAC a souboru genů ERG, HOXA10 a KIT, což naznačuje, že zapojení superenhancerů, které mají velikost >20 kb s afinitou k transkripčním koaktivátorům z rodiny proteinů BET BRD4, které rozpoznávají různé modifikace histonů. Buňky AZA-R jsou skutečně vysoce citlivé na PAN nebo JQ1, které inhibují MYC prostřednictvím suprese BRD4. To podporují i studie *in vivo* u pacientů s MDS, CMML nebo AML s vysokým rizikem IPSS-R, kteří jsou nevhodní kandidáti alogenní transplantace, u nichž kombinace panobinostatu (PAN) + AZA zdvojnásobila četnost kompozitních remisí ve srovnání s AZA ramenem; míra celkové odpovědi a míra jednoletého přežití však byly v obou ramenech podobné (Garcia-Manero, Sekeres et al. 2017), takže je zapotřebí dalšího výzkumu v tomto směru. Podobně jako u PAN, inhibice BRD4 *in vitro* pomocí JQ1 (ale také pomocí BRD4 shRNA) vedla k apoptóze vybraných leukemických linií, a dále byl účinek současně zesílen v přítomnosti AZA (Pericole, Lazarini et al. 2019). Kromě toho byly inhibitory BET nedávno prokázány jako vysoce účinné *in vivo* pomocí xenograftů AML modelů (Zhang, Cai et al. 2021). Tyto výsledky spojily transkripční program závislý na BRD4 z patogeneze MDS a AML a dále podpořily spolupráci s účinkem HMA. Je pravděpodobné, že narušení acetylace histonů (pomocí PAN) nebo inhibice BRD4, a tím i superenhancerů pomocí JQ1 může vést k dalším účinkům na úrovni chromatinu buněk AZA-R, například ovlivnění helikáz SWI/SNF nebo ovlivnění jiných jaderných procesů. související s metylací DNA (Shorstova 2021).

V další publikaci je prezentováno klinické testování léčby G-CSF v kombinaci s AZA, který představuje standardní léčbu vysoce rizikového MDS. Dizajn této randomizované akademické studie, která probíhala na I. interní klinice Všeobecné fakultní nemocnice v Praze od 2017 do 2022 byl inspirován preklinickými testy [9, 10] a analýzou retrospektivních dat, zahrnujících 162 pacientů s vysoce rizikovým MDS, u kterých bylo přidání G-CSF k AZA (N = 35) asociováno s nižším výskytem neutropenie 4. stupně a následně delším celkovým přežitím (OS, medián 27,4 vs 18 měsíců, p = 0,017). Data ze studie prokazovaly, že aplikace G-CSF předcházející podání AZA je spojeno s časných cyklech terapie s trvalejší odpovědi, přináší méně komplikací spojených s neutropenií, co v konečném důsledku znamená, že umožňuje podávání plných dávek AZA bez prodlužování intervalů mezi léčbami, což je často znemožněno právě těžkou neutropenií a infekčními komplikacemi z důvodu toxicity léčby. Odborné výsledky relativně nedávno přinesly data z dlouhodobého sledování pacientů v studii VIALE-A, kdy použití G-CSF mělo na pacienty podobně pozitivní efekt (DiNardo,

Pratz et al. 2022). Obě ramena zaznamenala terapeutické selhání AZA v pozdějších časových bodech srovnatelně, z čeho vyplývá, že použití G-CSF není schopno samo o sobě zabránit terapeutickému selhání AZA. Zajímavé je, že odpovědi v GA rameni se objevily relativně brzy v prvních čtyřech cyklech AZA (31 v. GA vs 18 v A; Fisherův test $p = 0,0260$), což nebylo pozorováno v rameni A, kde došlo k signifikantní část pacientů zemřela v důsledku infekčních komplikací. Kromě toho je doba do dosažení odpovědi významně kratší v rameni GA ve srovnání s ramenem A ($p = 0,00184$). Kromě toho pozitivní účinek G-CSF je umocněn skutečností, že v rameni G-CSF se přítomnost neutropenie Gr4 je spojena se signifikantně kratším OS. Naším primárním cílem bylo zvýšení léčebné odpovědi a přežití v rameni GA oproti rameni A se potvrdil, a to zejména v případě u pacientů s počáteční neutropenií v prvním roce léčby HMA. Nejistili jsme vliv G-CSF na progresi do AML, což je rovněž významné. Podávání G-CSF v kombinaci s AZA představuje terapeutický benefit oproti standardnímu režimu AZA u pacientů s vysoce rizikovým MDS a oligoblastickou AML.

V další studii představujeme vysoce přesnou detekci patogenních variant MDS využitím NGS prostřednictvím sériového odběru vzorků a jejich sekvenování od 38 pacientů s vysoce rizikovým MDS léčených AZA. Z analýzy vyplývá skutečnost, že k výraznému poklesu VAF při léčbě AZA došlo u pacientů, kteří dosáhli CR, zatímco menší změny VAF asociovaly s minimální odpovědí na léčbu často spojenou pouze se stabilním onemocněním (SD; stable disease), nebo u pacientů bez odpovědi na léčbu (PD, progressive disease). Ačkoli naše studie naznačuje, že AZA ovlivňuje celkovou dynamiku variant, naopak, dynamika pouze některých jednotlivých mutací během AZA má významný vliv na klinický výsledek. Zatímco několik studií naznačovalo, že pacienti s MDS v progresi mohou vyvinout nové mutace a ztratit některé zjištěné v ranních stádiích onemocnění (Pellagatti, Roy et al. 2016), my se domníváme, že progresi při léčbě AZA je spíše spojena s proliferací původních klonů s detekovanými variantami krátce před léčbou. Toto tvrzení podporuje i jiná studie, která naznačuje, že respondéři na hypometylační látky nesou určité genové mutace, které jsou spojeny k toleranci AZA (Bejar, Lord et al. 2014). Kromě genetických faktorů nelze vyloučit ani také epigenetické faktory, které zprostředkovávají toleranci k AZA (z původního klonu), které jsou zodpovědné za klinický relaps případně zahrnující i další proměnné, jako je globální vliv metylace DNA (Qin, Castoro et al. 2011), nebo exprese specifických nekódujících RNA (Butrym, Rybka et al. 2016), které mohou přispět ke komplexnosti AZA rezistence. Pro zjišťování dynamiky somatických mutací jsem použily kit TruSight Myeloid Panel, který obsahuje 54 genových oblastí s dříve zdokumentovanými rekurentními mutacemi

u 439 pacientů s myeloidními hematologickými poruchami včetně MDS a AML, a byl navržen konsorciem uznávaných odborníků (Bejar, Stevenson et al. 2011). Mnohé ze sledovaných mutací byly skutečně dříve spojeny s klinickým výsledkem včetně *TP53*, *RUNX1*, *ASXL1*, *EZH2* (Bejar, Stevenson et al. 2014) nebo *TET2* a *ASXL1* (Bejar, Lord et al. 2014). Nicméně důležitá je nejenom přítomnost či nepřítomnost mutace (nad arbitrárně stanovenou hranicí 5 % VAF) ale může také záležet i na dynamice VAF konkrétní varianty. Dynamika VAF pozorovaná v naší studii skutečně souvisí s hlavními klinickými ukazateli: délkou trvání odpovědi (PFS; progression-free survival) a celkovým přežitím (OS; overall survival). I když existují varianty genů, které jsou AZA zcela nevyhladí, existují varianty, které vymizí zejména po dosažení CR. Je zajímavé, že u pacientů se zvyšující se VAF mutace *TP53* při léčbě AZA byla doba odpovědi na terapii relativně krátká, vyznačovali se však výrazně prodlouženým celkovým přežitím, což naznačuje určitý terapeutický potenciál AZA v kontrole růstu onemocnění u subklonů nesoucí *TP53* mutaci. Nedávno se ukázalo, že mutace *TP53* jsou jedinými molekulárním podpisem předpovídajícím CR při léčbě jiným DNMTi, decitabinem (Chang, Zhao et al. 2017). Je však možné, že tyto *TP53*-mutované klony mohou nést méně agresivní varianty. Lze si představit, že AZA ve standardní dávce není schopen kontrolovat klony s mutací *TP53* po neomezenou dobu a v průběhu času a jejich alelická zátěž kumuluje. Relativně pomalá rychlost progresu u pacientů s mutací *TP53* během terapie AZA může být stále relativně dobře tolerována pacienty a tím zaručit přínos pro přežití. Důležité se také zdá, že mutace působí spolu s dalšími mutacemi ve vzájemné shodě, a proto vyšší výskyt předcházející 5q aberace mohl během klonální evoluce přispět k selekci odlišných mutací *TP53* (pozorovaných u 31 % pacientů s 5q-) (Stengel A 2016), které nejsou tak agresivní a přesto mohou poskytovat určitou výhodu pro přežití buněk při zrání krevních elementů k udržení reziduální krve tvorby, zatímco brání rychlé progresi do sekundární AML. Kromě toho pacienti s vysoce rizikovým MDS podle IPSS jsou však již nyní vystaveni velmi vysokému riziku úmrtí, takže mutace v *TP53* nemusí představovat nejkritičtější rizikový faktor, což podporuje potenciální roli jiných faktorů prediktivních faktorů odpovědi na AZA, jako jsou mutace v *CDKN2A* a *KDM6A*, které byly pozorovány v naší studii. Je zajímavé, že zatímco varianty *EZH2* byly dříve asociované s nepříznivým průběhem MDS (Nikoloski, Langemeijer et al. 2010) a v naší studii byly také prediktivní pro nepříznivou odpověď na léčbu na AZA, nepříznivý efekt mutací v *CDKN2A* dosud nebyl dříve popsán. Nicméně pravděpodobně existují další genové oblasti (zde nestudované), jejichž mutace mohou vést k progresi onemocnění do sekundární AML a jejichž analýza bude vyžadovat globální přístupy. Závěrem lze říci, že využití sériové NGS analýzy během sledování nemoci

představuje systematický přístup k analýze molekulární odpovědi na léčbu AZA pomocí sledování dynamiky VAF konkrétních mutací, a navíc poskytuje nově dosud nezohledněné prediktivní markery odpovědi na terapii.

Závěr:

- 1) Zjistit mechanismus rezistence vysoce rizikového myelodysplastického syndromu na terapii 5-azacytidinem *in vitro* vytvořením rezistentních klonů, *in vivo* vytvořením tzv. ‚cell line derived xenograft‘ (CDX) myších modelů.**

K vytvoření subklonů buněk rezistentních k AZA pomocí postupně se zvyšující koncentrace AZA v kultivačním mediu jsme použili buněčnou linii OCI-M2, která představuje terminální progresi MDS do sekundární AML. K porovnání senzitivity na AZA jsme použili WST-1 esej s průkazem vyšší hodnoty IC50 pro buňky AZA-R. K ověření rezistence na AZA v klinicky relevantnějším prostředí byl tento *in vitro* model validován také *in vivo* vytvořením CDX (cell line derived xenograft) modelu použitím transgenního myšího kmene NSG-SGM3 exprimující lidský interleukin-3 (hIL-3), faktor stimuluje kolonie granulocytů a makrofágů (GM-CSF) a stem cell faktor (SFC). Xenotransplantace AZA-S a AZA-R buněk myším probíhala ortotopicky intraoseálně do dutiny femorální kosti po transdukcii cílových buněk lentivirem s expresí luciferázy k týdennímu sledování expanze nádorových buněk pomocí bioimagingu. Úspěšné přihojení jsme také validovali použitím průtokové cytometrie buněk explantovaného tumoru detekcí exprese povrchového antigenu CD45 specifického pro člověka. Terapie CDX myši s AZA vedla k prodloužení přežití v modelu AZA-S, zatímco AZA-R a kontrolní CDX myši měly výrazně kratší přežití.

- 2) Zjistit genetický profil metodou sekvenování výše uvedených buněčných modelů a primárních vzorků za pomoci NGS (panelové sekvenování vybraných genů, celo-exomové sekvenování, transkriptomové sekvenování). Definovat vztah výše zmíněných změn na základě *in silico* analýzy nalezených mutací nebo aberantních expresí, společně vedoucích k aktivaci specifických signálních drah ovlivnitelných specifickými inhibitory a dále podstoupit jejich validace *in vitro*.**

Naše práce přináší nové poznatky o mechanismech fenotypu rezistence k AZA, kde dochází k deregulaci specifických drah ovlivnitelných konkrétními inhibitory. Genetická analýza subklonů rezistentních k AZA odhalila různé mutace v genech souvisejících s patogenezí MDS. Celoexomové sekvenování (WES) identifikovalo značný počet patogenních variant specifických pro buňky rezistentní k AZA, což

umožnilo nahlédnout do genomických změn spojených s rezistencí. Následná transkriptomová analýza odhalila významné rozdíly v expresi mRNA mezi buňkami citlivými na AZA a buňkami rezistentními na AZA v drahách pro apoptózu, chemokinovou signalizaci, v drahách PI3K/AKT, RAP1, TNF, TGF a RAS/RAF/MEK/ERK, což naznačuje jejich zapojení do fenotypu rezistentního k AZA. Z drah, kterých ovlivnění vedlo ke zvrácení AZA-R fenotypu použitím kontrétních inhibitorů lze zmínit apoptózu (byl pozorován rozličný efekt BH3 mimetik podle rozdílné exprese jednotlivých antiapoptotických proteinů), dále inhibici histondeacetyláz (pozorovaný efekt panabinostatu – neselektivní inhibitor HDAC). Pomocí celoexomového sekvenování jsme identifikovali významnou mutaci AKT1 c.430C>T (p.Arg144Cys) specifickou pro AZA-R subklony. Modelování odhalilo, že tato mutace stabilizuje fosforylaci hlavního signálního zbytku Ser473 vytvořením solného můstku s Arg144, čímž snižuje jeho přístupnost. Kratší postranní řetězec v mutaci R144C zvyšuje fosforylaci Ser473 (co bylo potvrzené pomocí Western blotu) a inhibice AKT1 použitím MK2206 vedla ke zvrácení AZA-R fenotypu.

3) Zjistit dynamiku změny frekvence somatických mutací u pacientů s vysoce rizikovým myelodysplastickým syndromem během terapie 5-azacytidinem.

Využití sériové NGS analýzy se sledováním dynamiky VAF konkrétních patogenních mutací během sledování nemoci u pacientů s vysoce rizikovým MDS představuje systematický přístup k analýze molekulární odpovědi na léčbu AZA a může sloužit jako nový prediktivní biomarker odpovědi na léčbu. Pozorovali jsme, že léčba AZA vedla k výraznému poklesu variantní alelické frekvence v době kompletní remise onemocnění. V průběhu času se tyto mutace v pozdějších časových bodech po další léčbě AZA znovu objevily (a předcházely klinické progresi), což naznačuje, že tyto subklony dál nemohly být kontrolovány AZA a vedly k návratu onemocnění s infaustní prognózou. Toto možno potencionálně do budoucna využít hlavně v nadcházející éře kombinačních léčebných protokolů, které základem je nadále hypometylační látka s přidáním nových cílených léků jako je například venetoclax, který vede k dosažení hlubokých terapeutických odpovědí u *de novo* AML.

Přehled použité literatury:

- Arber, D., A. Orazi, R. Hasserjian, J. Thiele, M. Borowitz, M. Le Beau, C. Bloomfield, M. Cazzola and J. Vardiman (2016). "The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia." *Blood* **127**(20): 2391-2405.
- Asada, S., T. Fujino, S. Goyama and T. Kitamura (2019). "The role of ASXL1 in hematopoiesis and myeloid malignancies." *Cell Mol Life Sci* **76**(13): 2511-2523.
- Asada, S. and T. Kitamura (2019). "Aberrant histone modifications induced by mutant ASXL1 in myeloid neoplasms." *Int J Hematol* **110**(2): 179-186.
- Bazarbachi, A., M. Labopin, G. Battipaglia, A. Djabali, J. Passweg, G. Socie, E. Forcade, D. Blaise, P. Chevallier, C. Orvain, J. J. Cornelissen, W. Arcese, S. Chantepie, K. Hashaishi, J. El Cheikh, M. Medinger, J. Esteve, A. Nagler and M. Mohty (2019). "Sorafenib improves survival of FLT3-mutated acute myeloid leukemia in relapse after allogeneic stem cell transplantation: a report of the EBMT Acute Leukemia Working Party." *Haematologica* **104**(9): e398-e401.
- Bejar, R., A. Lord, K. Stevenson, M. Bar-Natan, A. Perez-Ladaga, J. Zaneveld, H. Wang, B. Caughey, P. Stojanov, G. Getz, G. Garcia-Manero, H. Kantarjian, R. Chen, R. M. Stone, D. Neuberg, D. P. Steensma and B. L. Ebert (2014). "TET2 mutations predict response to hypomethylating agents in myelodysplastic syndrome patients." *Blood* **124**(17): 2705-2712.
- Bejar, R., K. Stevenson, O. Abdel-Wahab, N. Galili, B. Nilsson, G. Garcia-Manero, H. Kantarjian, A. Raza, R. Levine, D. Neuberg and B. Ebert (2011). "Clinical Effect of Point Mutations in Myelodysplastic Syndromes." *N Engl J Med* **364**: 2496-2506.
- Bejar, R., K. Stevenson, O. Abdel-Wahab, N. Galili, B. Nilsson, G. Garcia-Manero, H. Kantarjian, A. Raza, R. L. Levine, D. Neuberg and B. L. Ebert (2011). "Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes." *N Engl J Med* **364**(26): 2496-2506.
- Bejar, R., K. E. Stevenson, B. Caughey, R. C. Lindsley, B. G. Mar, P. Stojanov, G. Getz, D. P. Steensma, J. Ritz, R. Soiffer, J. H. Antin, E. Alyea, P. Armand, V. Ho, J. Koreth, D. Neuberg, C. S. Cutler and B. L. Ebert (2014). "Somatic mutations predict poor outcome in patients with myelodysplastic syndrome after hematopoietic stem-cell transplantation." *J Clin Oncol* **32**(25): 2691-2698.
- Bernard, E. (2022). "Molecular International Prognostic Scoring System for Myelodysplastic Syndromes." *NEJM Evid* **1**(7).
- Bertacchini, J., M. Guida, B. Accordi, L. Mediani, A. M. Martelli, P. Barozzi, E. Petricoin, 3rd, L. Liotta, G. Milani, M. Giordan, M. Luppi, F. Forghieri, A. De Pol, L. Cocco, G. Basso and S. Marmiroli (2014). "Feedbacks and adaptive capabilities of the PI3K/Akt/mTOR axis in acute myeloid leukemia revealed by pathway selective inhibition and phosphoproteome analysis." *Leukemia* **28**(11): 2197-2205.
- Bertacchini, J. F., C.; Chiarini, F.; D'Avella, D.; Accordi, B.; Anselmi, L.; Barozzi, P.; Forghieri, F.; Luppi, M.; Martelli, A.M.; et al. (2018). "Dual inhibition of PI3K/mTOR signaling in chemoresistant AML primary cells. *Adv. Biol. Regul.* 2018, 68,." *Adv. Biol. Regul.* **68**.
- Bincoletto, C., S. Saad, E. Soares da Silva and M. Queiroz (1998). "Autonomous proliferation and bcl-2 expression involving haematopoietic cells in patients with myelodysplastic syndrome." *British Journal of Cancer* **78**(5): 621-624.
- Butrym, A., J. Rybka, D. Baczyńska, R. Poreba, K. Kuliczowski and G. Mazur (2016). "Clinical response to azacitidine therapy depends on microRNA-29c (miR-29c) expression in older acute myeloid leukemia (AML) patients." *Oncotarget* **7**(21): 30250-30257.
- Cao, L., X. Xia, Y. Kong, F. Jia, B. Yuan, R. Li, Q. Li, Y. Wang, M. Cui, Z. Dai, H. Zheng, J. Christensen, Y. Zhou and X. Wu (2020). "Deregulation of tumor suppressive ASXL1-PTEN/AKT axis in myeloid malignancies." *J Mol Cell Biol* **12**(9): 688-699.
- Cao, R. (2002). "Role of Histone H3 Lysine 27 Methylation in Polycomb-Group Silencing." *Science* **298**: 1039-1043.
- Cimmino, L., I. Dolgalev, Y. Wang, A. Yoshimi, G. H. Martin, J. Wang, V. Ng, B. Xia, M. T. Witkowski, M. Mitchell-Flack, I. Grillo, S. Bakogianni, D. Ndiaye-Lobry, M. T. Martin, M. Guillaumot, R. S. Banh, M. Xu, M. E. Figueroa, R. A. Dickins, O. Abdel-Wahab, C. Y. Park, A. Tsigirgos, B. G. Neel and I. Aifantis (2017).

"Restoration of TET2 Function Blocks Aberrant Self-Renewal and Leukemia Progression." *Cell* **170**(6): 1079-1095 e1020.

Curik, N., P. Burda, K. Vargova, V. Pospisil, M. Belickova, P. Vlckova, F. Savvulidi, E. Necas, H. Hajkova, C. Haskovec, J. Cermak, M. Krivjanska, M. Trneny, P. Laslo, A. Jonasova and T. Stopka (2012). "5-Azacitidine in aggressive myelodysplastic syndromes regulates chromatin structure at PU.1 gene and cell differentiation capacity." *Leukemia* **26**(8): 1804-1811.

Darici, S., H. Alkhaldi, G. Horne, H. G. Jorgensen, S. Marmioli and X. Huang (2020). "Targeting PI3K/Akt/mTOR in AML: Rationale and Clinical Evidence." *J Clin Med* **9**(9): 2934.

Delhommeau, F., S. Dupont, V. Della Valle, C. James, S. Trannoy, A. Massé, O. Kosmider, J. Le Couedic, F. Robert, A. Alberdi, Y. Lécluse, I. Plo, F. Dreyfus, C. Marzac, N. Casadevall, C. Lacombe, S. Romana, P. Dessen, J. Soulier, F. Viguié, M. Fontenay, W. Vainchenker and O. Bernard (2009). "Mutation in TET2 in Myeloid Cancers." *New England Journal of Medicine* **360**(22): 2289-2301.

DiNardo, C., K. Pratz, P. Panayiotidis, X. Wei, V. Vorobyev, À. Illés, I. Kim, V. Ivanov, G. Ku, C. Miller, M. Zhang, F. Tatsch, J. Potluri, X. Schmidt and C. Recher (2022). "AML-119 The Impact of Post-Remission Granulocyte Colony-Stimulating Factor (G-CSF) Use (G-CSFu) in the Phase 3 Studies of Venetoclax (Ven) Combination Treatments in Patients (Pts) With Newly Diagnosed Acute Myeloid Leukemia (AML)." *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia* **22**: S214.

Ebinger, S., E. Z. Ozdemir, C. Ziegenhain, S. Tiedt, C. Castro Alves, M. Grunert, M. Dworzak, C. Lutz, V. A. Turati, T. Enver, H. P. Horny, K. Sotlar, S. Parekh, K. Spiekermann, W. Hiddemann, A. Schepers, B. Polzer, S. Kirsch, M. Hoffmann, B. Knapp, J. Hasenauer, H. Pfeifer, R. Panzer-Grumayer, W. Enard, O. Gires and I. Jeremias (2016). "Characterization of Rare, Dormant, and Therapy-Resistant Cells in Acute Lymphoblastic Leukemia." *Cancer Cell* **30**(6): 849-862.

Fenaux, P., G. J. Mufti, E. Hellstrom-Lindberg, V. Santini, C. Finelli, A. Giagounidis, R. Schoch, N. Gattermann, G. Sanz, A. List, S. D. Gore, J. F. Seymour, J. M. Bennett, J. Byrd, J. Backstrom, L. Zimmerman, D. McKenzie, C. L. Beach and L. R. Silverman (2009). "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." *The Lancet Oncology* **10**(3): 223-232.

Fujino, T. and T. Kitamura (2020). "ASXL1 mutation in clonal hematopoiesis." *Exp Hematol* **83**: 74-84.

Garcia-Manero, G., N. G. Daver, J. Xu, M. Chao, T. Chung, A. Tan, V. Wang, A. Wei, P. Vyas and D. A. Sallman (2021). "Magrolimab + azacitidine versus azacitidine + placebo in untreated higher risk (HR) myelodysplastic syndrome (MDS): The phase 3, randomized, ENHANCE study." *Journal of clinical Oncology* **39**.

Garcia-Manero, G., M. A. Sekeres, M. Egyed, M. Breccia, C. Graux, J. D. Cavenagh, H. Salman, A. Illes, P. Fenaux, D. J. DeAngelo, R. Stauder, K. Yee, N. Zhu, J. H. Lee, D. Valcarcel, A. MacWhannell, Z. Borbenyi, L. Gazi, S. Acharyya, S. Ide, M. Marker and O. G. Ottmann (2017). "A phase 1b/2b multicenter study of oral panobinostat plus azacitidine in adults with MDS, CMML or AML with $\leq 30\%$ blasts." *Leukemia* **31**(12): 2799-2806.

Greenberg, P. L., H. Tuechler, J. Schanz, G. Sanz, G. Garcia-Manero, F. Sole, J. M. Bennett, D. Bowen, P. Fenaux, F. Dreyfus, H. Kantarjian, A. Kuendgen, A. Levis, L. Malcovati, M. Cazzola, J. Cermak, C. Fonatsch, M. M. Le Beau, M. L. Slovak, O. Krieger, M. Luebbert, J. Maciejewski, S. M. Magalhaes, Y. Miyazaki, M. Pfeilstocker, M. Sekeres, W. R. Sperr, R. Stauder, S. Tauro, P. Valent, T. Vallespi, A. A. van de Loosdrecht, U. Germing and D. Haase (2012). "Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes." *Blood* **120**(12): 2454-2465.

Grima, B., E. Chelot, R. Xia and F. Rouyer (2004). "Morning and evening peaks of activity rely on different clock neurons of the Drosophila brain." *Nature* **431**(7010): 869-873.

Guillamot, M., L. Cimmino and I. Aifantis (2016). "The Impact of DNA Methylation in Hematopoietic Malignancies." *Trends Cancer* **2**(2): 70-83.

Guo, J. U., Y. Su, C. Zhong, G. L. Ming and H. Song (2011). "Hydroxylation of 5-methylcytosine by TET1 promotes active DNA demethylation in the adult brain." *Cell* **145**(3): 423-434.

Haferlach, T., Y. Nagata, V. Grossmann, Y. Okuno, U. Bacher, G. Nagae, S. Schnittger, M. Sanada, A. Kon, T. Alpermann, K. Yoshida, A. Roller, N. Nadarajah, Y. Shiraiishi, Y. Shiozawa, K. Chiba, H. Tanaka, H. P. Koeffler, H. U. Klein, M. Dugas, H. Aburatani, A. Kohlmann, S. Miyano, C. Haferlach, W. Kern and

S. Ogawa (2014). "Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes." Leukemia **28**(2): 241-247.

Harada, H., Y. Harada, H. Niimi, T. Kyo, A. Kimura and T. Inaba (2004). "High incidence of somatic mutations in the AML1/RUNX1 gene in myelodysplastic syndrome and low blast percentage myeloid leukemia with myelodysplasia." Blood **103**(6): 2316-2324.

Hock, H., E. Meade, S. Medeiros, J. W. Schindler, P. J. Valk, Y. Fujiwara and S. H. Orkin (2004). "Tel/Etv6 is an essential and selective regulator of adult hematopoietic stem cell survival." Genes Dev **18**(19): 2336-2341.

Hock, H. and A. Shimamura (2017). "ETV6 in hematopoiesis and leukemia predisposition." Semin Hematol **54**(2): 98-104.

Hopfer, O., M. Komor, I. Koehler, C. Freitag, M. Schulze, D. Hoelzer, E. Thiel and W. Hofmann (2009). "Aberrant promotor methylation in MDS hematopoietic cells during in vitro lineage specific differentiation is differently associated with DNMT isoforms." Leukemia Research **33**: 434-442.

Hsu, J. I., T. Dayaram, A. Tovy, E. De Braekeleer, M. Jeong, F. Wang, J. Zhang, T. P. Heffernan, S. Gera, J. J. Kovacs, J. R. Marszalek, C. Bristow, Y. Yan, G. Garcia-Manero, H. Kantarjian, G. Vassiliou, P. A. Futreal, L. A. Donehower, K. Takahashi and M. A. Goodell (2018). "PPM1D Mutations Drive Clonal Hematopoiesis in Response to Cytotoxic Chemotherapy." Cell Stem Cell **23**(5): 700-713.

Hu, Z., S. Negrotto, X. Gu, R. Mahfouz, K. P. Ng, Q. Ebrahim, E. Copelan, H. Singh, J. P. Maciejewski and Y. Sauntharajah (2010). "Decitabine maintains hematopoietic precursor self-renewal by preventing repression of stem cell genes by a differentiation-inducing stimulus." Mol Cancer Ther **9**(6): 1536-1543.

Huang, D. W., B. T. Sherman and R. A. Lempicki (2009). "Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources." Nature Protocols **4**(1): 44-57.

Chang, C. K., Y. S. Zhao, F. Xu, J. Guo, Z. Zhang, Q. He, D. Wu, L. Y. Wu, J. Y. Su, L. X. Song, C. Xiao and X. Li (2017). "TP53 mutations predict decitabine-induced complete responses in patients with myelodysplastic syndromes." Br J Haematol **176**(4): 600-608.

Cheson, B. D., P. L. Greenberg, J. M. Bennett, B. Lowenberg, P. W. Wijermans, S. D. Nimer, A. Pinto, M. Beran, T. M. de Witte, R. M. Stone, M. Mittelman, G. F. Sanz, S. D. Gore, C. A. Schiffer and H. Kantarjian (2006). "Clinical application and proposal for modification of the International Working Group (IWG) response criteria in myelodysplasia." Blood **108**(2): 419-425.

Chien, K., K. Kim, G. Noguerras-Gonzalez, G. Borthakur, K. Naqvi, N. Daver, G. Montalban-Bravo, J. Cortes, C. DiNardo, E. Jabbour, Y. Alvarado, M. Andreeff, P. Bose, N. Jain, T. Kadia, X. Huang, K. Sheppard, C. Klingner-Winton, S. Pierce, X. Dong, K. Soltysiak, H. Kantarjian and G. Garcia-Manero (2021). "Phase II study of azacitidine with pembrolizumab in patients with intermediate-1 or higher-risk myelodysplastic syndrome." Br J Haematol **195**(3): 378-387.

Choi, Y. and A. Chan (2015). "PROVEAN web server: a tool to predict the functional effect of amino acid substitutions and indels." Bioinformatics **31**(16): 2745-2747.

Christiansen, D. H. (2001). "Mutations With Loss of Heterozygosity of p53 Are Common in Therapy-Related Myelodysplasia and Acute Myeloid Leukemia After Exposure to Alkylating Agents and Significantly Associated With Deletion or Loss of 5q, a Complex Karyotype, and a Poor Prognosis." Journal of Clinical Oncology **19**: 1405-1413.

Christiansen, D. H., M. K. Andersen and J. Pedersen-Bjergaard (2003). "Methylation of p15INK4B is common, is associated with deletion of genes on chromosome arm 7q and predicts a poor prognosis in therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia." Leukemia **17**(9): 1813-1819.

Ito, S. (2011). "Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine." Science **333**(6047): 1300-1303.

Ito, S., A. C. D'Alessio, O. V. Taranova, K. Hong, L. C. Sowers and Y. Zhang (2010). "Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification." Nature **466**(7310): 1129-1133.

Kaneko, H., S. Misawa, S. Horiike, H. Nakai and K. Kashima (1995). "TP53 Mutations Emerge at Early Phase of Myelodysplastic Syndrome and Are Associated With Complex Chromosomal Abnormalities." Blood **85**(8): 2189-2193.

Keating, G. (2009). "Azacitidine. A Review of its Use in Higher-Risk Myelodysplastic Syndromes/Acute Myeloid Leukaemia." *Drugs* **69**(17): 2501-2518.

Kenealy, M., M. Hertzberg, W. Benson, K. Taylor, I. Cunningham, W. Stevenson, D. Hiwase, R. Eek, D. Zantomio, S. Jong, M. Wall, P. Blombery, T. Gerber, M. Debrincat, D. Zannino and J. F. Seymour (2019). "Azacitidine with or without lenalidomide in higher risk myelodysplastic syndrome & low blast acute myeloid leukemia." *Haematologica* **104**(4): 700-709.

Kon, A., L. Y. Shih, M. Minamino, M. Sanada, Y. Shiraishi, Y. Nagata, K. Yoshida, Y. Okuno, M. Bando, R. Nakato, S. Ishikawa, A. Sato-Otsubo, G. Nagae, A. Nishimoto, C. Haferlach, D. Nowak, Y. Sato, T. Alpermann, M. Nagasaki, T. Shimamura, H. Tanaka, K. Chiba, R. Yamamoto, T. Yamaguchi, M. Otsu, N. Obara, M. Sakata-Yanagimoto, T. Nakamaki, K. Ishiyama, F. Nolte, W. K. Hofmann, S. Miyawaki, S. Chiba, H. Mori, H. Nakauchi, H. P. Koeffler, H. Aburatani, T. Haferlach, K. Shirahige, S. Miyano and S. Ogawa (2013). "Recurrent mutations in multiple components of the cohesin complex in myeloid neoplasms." *Nat Genet* **45**(10): 1232-1237.

Lawrence, M. S., P. Stojanov, C. H. Mermel, J. T. Robinson, L. A. Garraway, T. R. Golub, M. Meyerson, S. B. Gabriel, E. S. Lander and G. Getz (2014). "Discovery and saturation analysis of cancer genes across 21 tumour types." *Nature* **505**(7484): 495-501.

Leeke, B., J. Marsman, J. O'Sullivan and J. Horsfield (2014). "Cohesin mutations in myeloid malignancies: underlying mechanisms." *Experimental Hematology & Oncology* **3**(13): 1-8.

Lei, H. (1996). "De novo DNA cytosine methyltransferase activities in mouse embryonic stem cells." *Development* **122**: 3195-3205.

Lewis, S., Ocier D., J. Boulwood, F. Ross, M. Fitchett, K. Rack, G. Abrahamson, V. Buckle and J. Wainscoat (1995). "Hematological features of patients with myelodysplastic syndromes associated with a chromosome 5q deletion." *Am J Hematol* **49**: 194-200.

Losada, A. (2014). "Cohesin in cancer: chromosome segregation and beyond." *Nat Rev Cancer* **14**(6): 389-393.

Lowe, S., E. Cepero and G. Evan (2004). "Intrinsic tumour suppression." *Nature* **432**: 307-315.

Malcovati, L., K. Stevenson, E. Papaemmanuil, D. Neuberg, R. Bejar, P. Campbell, B. Ebert, P. Fenaux, T. Haferlach, J. Maciejewski, M. Meggendorfer, M. Walter, A. Pellagatti, M. Fontenay, D. Sallman, M. Savona, F. Thol, P. Vyas, A. Van de Loosdrecht, D. Haase, E. Hellstrom-Lindberg and M. Cazzola (2020). "SF3B1-mutant MDS as a distinct disease subtype: a proposal from the International Working Group for the Prognosis of MDS." *Blood* **136**(2): 157-170.

Mardis, E. R., L. Ding, D. J. Dooling, D. E. Larson, M. D. McLellan, K. Chen, D. C. Koboldt, R. S. Fulton, K. D. Delehaunty, S. D. McGrath, L. A. Fulton, D. P. Locke, V. J. Magrini, R. M. Abbott, T. L. Vickery, J. S. Reed, J. S. Robinson, T. Wylie, S. M. Smith, L. Carmichael, J. M. Eldred, C. C. Harris, J. Walker, J. B. Peck, F. Du, A. F. Dukes, G. E. Sanderson, A. M. Brummett, E. Clark, J. F. McMichael, R. J. Meyer, J. K. Schindler, C. S. Pohl, J. W. Wallis, X. Shi, L. Lin, H. Schmidt, Y. Tang, C. Haipek, M. E. Wiechert, J. V. Ivy, J. Kalicki, G. Elliott, R. E. Ries, J. E. Payton, P. Westervelt, M. H. Tomasson, M. A. Watson, J. Baty, S. Heath, W. D. Shannon, R. Nagarajan, D. C. Link, M. J. Walter, T. A. Graubert, J. F. DiPersio, R. K. Wilson and T. J. Ley (2009). "Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome." *N Engl J Med* **361**(11): 1058-1066.

Medyouf, H., M. Mossner, J. C. Jann, F. Nolte, S. Raffel, C. Herrmann, A. Lier, C. Eisen, V. Nowak, B. Zens, K. Mudder, C. Klein, J. Oblander, S. Fey, J. Vogler, A. Fabarius, E. Riedl, H. Roehl, A. Kohlmann, M. Staller, C. Haferlach, N. Muller, T. John, U. Platzbecker, G. Metzgeroth, W. K. Hofmann, A. Trumpp and D. Nowak (2014). "Myelodysplastic cells in patients reprogram mesenchymal stromal cells to establish a transplantable stem cell niche disease unit." *Cell Stem Cell* **14**(6): 824-837.

Mi, H., A. Muruganujan, X. Huang, D. Ebert, C. Mills, X. Guo and P. D. Thomas (2019). "Protocol Update for large-scale genome and gene function analysis with the PANTHER classification system (v.14.0)." *Nat Protoc* **14**(3): 703-721.

Moran-Crusio, K., L. Reavie, A. Shih, O. Abdel-Wahab, D. Ndiaye-Lobry, C. Lobry, M. E. Figueroa, A. Vasanthakumar, J. Patel, X. Zhao, F. Perna, S. Pandey, J. Madzo, C. Song, Q. Dai, C. He, S. Ibrahim, M. Beran, J. Zavadil, S. D. Nimer, A. Melnick, L. A. Godley, I. Aifantis and R. L. Levine (2011). "Tet2 loss

leads to increased hematopoietic stem cell self-renewal and myeloid transformation." Cancer Cell **20**(1): 11-24.

Nikoloski, G., S. Langemeijer, R. Kuiper, R. Knops, M. Massop, E. Tönnissen, A. Van der Heijden, T. Scheele, V. Vandenberghe, T. De Witte, B. Van der Reijden and J. Jansen (2010). "Somatic mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myelodysplastic syndromes." Nature Genetics **42**(8): 665-667.

Nikoloski, G., S. M. Langemeijer, R. P. Kuiper, R. Knops, M. Massop, E. R. Tönnissen, A. van der Heijden, T. N. Scheele, P. Vandenberghe, T. de Witte, B. A. van der Reijden and J. H. Jansen (2010). "Somatic mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myelodysplastic syndromes." Nat Genet **42**(8): 665-667.

Nyakern, M., P. L. Tazzari, C. Finelli, C. Bosi, M. Y. Follo, T. Grafone, P. P. Piccaluga, G. Martinelli, L. Cocco and A. M. Martelli (2006). "Frequent elevation of Akt kinase phosphorylation in blood marrow and peripheral blood mononuclear cells from high-risk myelodysplastic syndrome patients." Leukemia **20**(2): 230-238.

Papaemmanuil, E. (2011). "Somatic SF3B1 Mutation in Myelodysplasia with Ring Sideroblasts." New England Journal of Medicine **365**: 1384-1395.

Parker, J. E., G. J. Mufti, F. Rasool, A. Mijovic, S. Devereux and A. Pagliuca (2000). "The role of apoptosis, proliferation, and the Bcl-2-related proteins in the myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia secondary to MDS." Blood **96**(12): 3932-3938.

Pellagatti, A., S. Roy, C. Di Genua, A. Burns, K. McGraw, S. Valletta, M. J. Larrayoz, M. Fernandez-Mercado, J. Mason, S. Killick, C. Mecucci, M. J. Calasanz, A. List, A. Schuh and J. Boulton (2016). "Targeted resequencing analysis of 31 genes commonly mutated in myeloid disorders in serial samples from myelodysplastic syndrome patients showing disease progression." Leukemia **30**(1): 247-250.

Pericole, F. V., M. Lazarini, L. B. de Paiva, A. Duarte, K. P. Vieira Ferro, F. S. Niemann, F. M. Roversi and S. T. Olalla Saad (2019). "BRD4 Inhibition Enhances Azacitidine Efficacy in Acute Myeloid Leukemia and Myelodysplastic Syndromes." Front Oncol **9**(16): 16.

Pericole, F. V., M. Lazarini, L. B. de Paiva, A. Duarte, K. P. Vieira Ferro, F. S. Niemann, F. M. Roversi and S. T. Olalla Saad (2019). "BRD4 Inhibition Enhances Azacitidine Efficacy in Acute Myeloid Leukemia and Myelodysplastic Syndromes." Front Oncol **9**: 16.

Qin, T., R. Castoro, S. El Ahdab, J. Jelinek, X. Wang, J. Si, J. Shu, R. He, N. Zhang, W. Chung, H. M. Kantarjian and J. P. Issa (2011). "Mechanisms of resistance to decitabine in the myelodysplastic syndrome." PLoS One **6**(8): e23372.

Quivoron, C., L. Couronne, V. Della Valle, C. K. Lopez, I. Plo, O. Wagner-Ballon, M. Do Cruzeiro, F. Delhommeau, B. Arnulf, M. H. Stern, L. Godley, P. Opolon, H. Tilly, E. Solary, Y. Duffourd, P. Dessen, H. Merle-Beral, F. Nguyen-Khac, M. Fontenay, W. Vainchenker, C. Bastard, T. Mercher and O. A. Bernard (2011). "TET2 inactivation results in pleiotropic hematopoietic abnormalities in mouse and is a recurrent event during human lymphomagenesis." Cancer Cell **20**(1): 25-38.

Rabbani, B., M. Tekin and N. Mahdieh (2014). "The promise of whole-exome sequencing in medical genetics." J Hum Genet **59**(1): 5-15.

Rafael Bejar, B. L. E. (2010). "The Genetic Basis of Myelodysplastic Syndromes." Hematol Oncol Clin N Am **24**: 295-315.

Rentzsch, P., M. Schubach, J. Shendure and M. Kircher (2021). "CADD-Splice-improving genome-wide variant effect prediction using deep learning-derived splice scores." Genome Med **13**(1): 31.

Russler-Germain, D. A., D. H. Spencer, M. A. Young, T. L. Lamprecht, C. A. Miller, R. Fulton, M. R. Meyer, P. Erdmann-Gilmore, R. R. Townsend, R. K. Wilson and T. J. Ley (2014). "The R882H DNMT3A mutation associated with AML dominantly inhibits wild-type DNMT3A by blocking its ability to form active tetramers." Cancer Cell **25**(4): 442-454.

Sallman, D., A. DeZern, M. Sekeres, J. Puskas, G. Korb, A. List, L. Zhang, A. Attar, G. Garcia-Manero, Q. Mo, H. Kantarjian, R. Komrokji, T. Cluzeau, K. Sweet, J. Yao, D. Steensma, A. McLemore, L. Nardelli, J. Lancet, G. Roboz, N. Al Ali, P. Fenaux, K. McGraw and E. Padron (2021). "Eprenetapopt (APR-246)

and Azacitidine in TP53-Mutant Myelodysplastic Syndromes." *Journal of Clinical Oncology* **39**(14): 1584-1595.

Sant, M., C. Allemani, C. Tereanu, R. De Angelis, R. Capocaccia, O. Visser, R. Marcos-Gragera, M. Maynadie, A. Simonetti, J. Lutz and F. Berrino (2010). "Incidence of hematologic malignancies in Europe by morphologic subtype: results of the HAEMACARE project." *Blood* **116**(19): 3724-3734.

Sashida, G., H. Harada, H. Matsui, M. Oshima, M. Yui, Y. Harada, S. Tanaka, M. Mochizuki-Kashio, C. Wang, A. Saraya, T. Muto, Y. Hayashi, K. Suzuki, H. Nakajima, T. Inaba, H. Koseki, G. Huang, T. Kitamura and A. Iwama (2014). "Ezh2 loss promotes development of myelodysplastic syndrome but attenuates its predisposition to leukaemic transformation." *Nat Commun* **5**: 4177.

Seiler, M., S. Peng, A. A. Agrawal, J. Palacino, T. Teng, P. Zhu, P. G. Smith, N. Cancer Genome Atlas Research, S. Buonamici and L. Yu (2018). "Somatic Mutational Landscape of Splicing Factor Genes and Their Functional Consequences across 33 Cancer Types." *Cell Rep* **23**(1): 282-296.

Sherman, B. T., W. Huang da, Q. Tan, Y. Guo, S. Bour, D. Liu, R. Stephens, M. W. Baseler, H. C. Lane and R. A. Lempicki (2007). "DAVID Knowledgebase: a gene-centered database integrating heterogeneous gene annotation resources to facilitate high-throughput gene functional analysis." *BMC Bioinformatics* **8**: 426.

Sherman, B. T., W. Huang da, Q. Tan, Y. Guo, S. Bour, D. Liu, R. Stephens, M. W. Baseler, H. C. Lane and R. A. Lempicki (2007). "DAVID Knowledgebase: a gene-centered database integrating heterogeneous gene annotation resources to facilitate high-throughput gene functional analysis." *BMC Bioinformatics* **8**(426): 426.

Shorstova, T. F., W.D.; Witcher, M. (2021). "Achieving clinical success with BET inhibitors as anti-cancer agents." *Br. J. Cancer* **124**: 1478–1490.

Schermelleh, L., A. Haemmer, F. Spada, N. Rosing, D. Meilinger, U. Rothbauer, M. C. Cardoso and H. Leonhardt (2007). "Dynamics of Dnmt1 interaction with the replication machinery and its role in postreplicative maintenance of DNA methylation." *Nucleic Acids Res* **35**(13): 4301-4312.

Silverman, L. R. (2001). "Targeting hypomethylation of DNA to achieve cellular differentiation in myelodysplastic syndromes (MDS)." *Oncologist* **6**(14): 8-14.

Smith, S. M., M. M. Le Beau, D. Huo, T. Karrison, R. M. Sobecks, J. Anastasi, J. W. Vardiman, J. D. Rowley and R. A. Larson (2003). "Clinical-cytogenetic associations in 306 patients with therapy-related myelodysplasia and myeloid leukemia: the University of Chicago series." *Blood* **102**(1): 43-52.

Steelman, L. S., R. A. Franklin, S. L. Abrams, W. Chappell, C. R. Kempf, J. Basecke, F. Stivala, M. Donia, P. Fagone, F. Nicoletti, M. Libra, P. Ruvolo, V. Ruvolo, C. Evangelisti, A. M. Martelli and J. A. McCubrey (2011). "Roles of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway in leukemia therapy." *Leukemia* **25**(7): 1080-1094.

Steensma, D., R. Gibbons, R. Mesa, A. Tefferi and D. Higgs (2005). "Somatic point mutations in RUNX1/CBFA2/AML1 are common in high-risk myelodysplastic syndrome, but not in myelofibrosis with myeloid metaplasia." *Eur J Haematol* **74**: 47–53.

Steensma, D., D. Higgs, C. Fisher and R. Gibbons (2004). "Acquired somatic ATRX mutations in myelodysplastic syndrome associated with beta thalassemia (ATMDS) convey a more severe hematologic phenotype than germline ATRX mutations." *Blood* **103**(6): 2019-2026.

Steensma, D. P., R. Bejar, S. Jaiswal, R. C. Lindsley, M. A. Sekeres, R. P. Hasserjian and B. L. Ebert (2015). "Clonal hematopoiesis of indeterminate potential and its distinction from myelodysplastic syndromes." *Blood* **126**(1): 9-16.

Stengel A, K. W., Haferlach T, Meggendorfer M, Haferlach C. (2016). "The 5q deletion size in myeloid malignancies is correlated to additional chromosomal aberrations and to TP53 mutations." *Genes Chromosomes Cancer* **55**: 777–785.

Tothova, Z., A. L. Valton, R. A. Gorelov, M. Vallurupalli, J. M. Krill-Burger, A. Holmes, C. C. Landers, J. E. Haydu, E. Malolepsza, C. Hartigan, M. Donahue, K. D. Popova, S. Koochaki, S. V. Venev, J. Rivera, E. Chen, K. Lage, M. Schenone, A. D. D'Andrea, S. A. Carr, E. A. Morgan, J. Dekker and B. L. Ebert (2021). "Cohesin mutations alter DNA damage repair and chromatin structure and create therapeutic vulnerabilities in MDS/AML." *JCI Insight* **6**(3): 1-16.

Tricot, G., R. Vlietinck, M. Boogaerts, B. Hendrickx, C. De Wolf-Peeters, H. Van Den Berghe and R. Verwilghen (1985). "Prognostic factors in the myelodysplastic syndromes: importance of initial data

on peripheral blood counts, bone marrow cytology, trephine biopsy and chromosomal analysis." British Journal of Haematology **60**: 19-32.

Valinluck, V. and L. C. Sowers (2007). "Endogenous cytosine damage products alter the site selectivity of human DNA maintenance methyltransferase DNMT1." Cancer Res **67**(3): 946-950.

Vaser, R., S. Adusumalli, S. N. Leng, M. Sikic and P. C. Ng (2016). "SIFT missense predictions for genomes." Nat Protoc **11**(1): 1-9.

Voisset, E., F. Brenet, S. Lopez and P. de Sepulveda (2020). "SRC-Family Kinases in Acute Myeloid Leukaemia and Mastocytosis." Cancers (Basel) **12**(7): 1996.

Walter, M. J., L. Ding, D. Shen, J. Shao, M. Grillot, M. McLellan, R. Fulton, H. Schmidt, J. Kalicki-Veizer, M. O'Laughlin, C. Kandoth, J. Baty, P. Westervelt, J. F. DiPersio, E. R. Mardis, R. K. Wilson, T. J. Ley and T. A. Graubert (2011). "Recurrent DNMT3A mutations in patients with myelodysplastic syndromes." Leukemia **25**(7): 1153-1158.

Wijermans, P., M. Lubbert, G. Verhoef, A. Bosly, C. Ravoet, M. Andre and A. Ferrant (2000). "Low-Dose 5-Aza-2-Deoxycytidine, a DNA Hypomethylating Agent, for the Treatment of High-Risk Myelodysplastic Syndrome: A Multicenter Phase II Study in Elderly Patients." J Clin Oncol **18**: 956-962.

Wong, K., C. Lawrie and T. Green (2019). "Oncogenic Roles and Inhibitors of DNMT1, DNMT3A, and DNMT3B in Acute Myeloid Leukaemia." Biomark Insights **14**: 1-12.

Xu, J., Y. Y. Wang, Y. J. Dai, W. Zhang, W. N. Zhang, S. M. Xiong, Z. H. Gu, K. K. Wang, R. Zeng, Z. Chen and S. J. Chen (2014). "DNMT3A Arg882 mutation drives chronic myelomonocytic leukemia through disturbing gene expression/DNA methylation in hematopoietic cells." Proc Natl Acad Sci U S A **111**(7): 2620-2625.

Yin, R., S. Q. Mao, B. Zhao, Z. Chong, Y. Yang, C. Zhao, D. Zhang, H. Huang, J. Gao, Z. Li, Y. Jiao, C. Li, S. Liu, D. Wu, W. Gu, Y. G. Yang, G. L. Xu and H. Wang (2013). "Ascorbic acid enhances Tet-mediated 5-methylcytosine oxidation and promotes DNA demethylation in mammals." J Am Chem Soc **135**(28): 10396-10403.

Yoshida, K., M. Sanada, Y. Shiraishi, D. Nowak, Y. Nagata, R. Yamamoto, Y. Sato, A. Sato-Otsubo, A. Kon, M. Nagasaki, G. Chalkidis, Y. Suzuki, M. Shiosaka, R. Kawahata, T. Yamaguchi, M. Otsu, N. Obara, M. Sakata-Yanagimoto, K. Ishiyama, H. Mori, F. Nolte, W. K. Hofmann, S. Miyawaki, S. Sugano, C. Haferlach, H. P. Koefler, L. Y. Shih, T. Haferlach, S. Chiba, H. Nakauchi, S. Miyano and S. Ogawa (2011). "Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia." Nature **478**(7367): 64-69.

Zahid, M., U. Malik, M. Sohail, I. Hassan, S. Ali and S. MHS. (2016). "Cytogenetic Abnormalities in Myelodysplastic Syndromes: An Overview." International Journal of Hematology-Oncology and Stem Cell Research **11**: 231-239.

Zeidan, A. M., I. Boss, C. L. Beach, W. B. Copeland, E. Thompson, B. A. Fox, V. E. Hasle, K. Ogasawara, J. Cavenagh, L. R. Silverman, M. T. Voso, A. Hellmann, M. Tormo, T. O'Connor, A. Previtalli, S. Rose and G. Garcia-Manero (2022). "A randomized phase 2 trial of azacitidine with or without durvalumab as first-line therapy for higher-risk myelodysplastic syndromes." Blood Adv **6**(7): 2207-2218.

Zeidan, A. M., J. S. Garcia, P. Fenaux, U. Platzbecker, Y. Miyazaki, Z. J. Xiao, Y. Zhou, K. Naqvi, S. Kye and G. Garcia-Manero (2021). "Phase 3 VERONA study of venetoclax with azacitidine to assess change in complete remission and overall survival in treatment-naïve higher-risk myelodysplastic syndromes." Journal of Clinical Oncology **39**.

Zhang, L., T. Cai, X. Lin, X. Huang, M. H. Bui, J. P. Plotnik, R. J. Bellin, E. J. Faivre, V. M. Kuruvilla, L. T. Lam, X. Lu, Z. Zha, W. Feng, P. Hessler, T. Uziel, Q. Zhang, A. Cavazos, L. Han, D. C. Ferguson, G. Mehta, S. S. Shanmugavelandy, T. J. Magoc, J. Rowe, N. C. Goodwin, K. A. Dorritie, M. Boyiadzis, D. H. Albert, K. F. McDaniel, W. M. Kati, M. Konopleva and Y. Shen (2021). "Selective Inhibition of the Second Bromodomain of BET Family Proteins Results in Robust Antitumor Activity in Preclinical Models of Acute Myeloid Leukemia." Mol Cancer Ther **20**(10): 1809-1819.

Přílohy:

- (1. publikace) **Minarik L**, Pimkova K, Kokavec J, Schaffartzikova A, Vellieux F, Kulvait V, Daumova L, Dusilkova N, Jonasova A, Vargova KS, Kralova Viziova P, Sedlacek R, Zemanova Z, Stopka T. **Analysis of 5-Azacytidine Resistance Models Reveals a Set of Targetable Pathways.** *Cells* (2022) 11: 223.
- (2. publikace) Stopka T, **Minarik L**, Dusilkova N, Pesta M, Kulvait V, Spacek M, Zemanova Z, Kalousova M, Jonasova A. **G-CSF plus azacitidine versus azacitidine alone for patients with high-risk myelodysplastic syndrome: academic, open label, randomized trial.** *Blood Cancer J* (2022) 12(7):105.
- (3. publikace) Polgarova K, Vargova K, Kulvait V, Dusilkova N, **Minarik L**, Zemanova Z, Pesta M, Jonasova A, Stopka T. **Somatic mutation dynamics in MDS patients treated with azacitidine indicate clonal selection in patients-responders.** *Oncotarget* (2017) 8(67):111966-111978.
- (4. publikace) **Minarik L**, Zemanova Z, Kulvait V, Dluhosova M, Jonasova A, Stopka T. **Azacitidine Switch to Lenalidomide Eradicated the *TP53/CDKN2A* Co-Mutated Clone and Induced Long-Term Erythroid Response in Del(5q) MDS.** *Ann Hematol Oncol* (2019) 6(1): 0000.
- (5. publikace) Moudra A, **Minarik L**, Vancurova M, Bartek J, Hodny Z. Jonasova A. **NQO1*2 polymorphism predicts overall survival in MDS patients.** *Br J Haematol* (2019) 184: 305-308.
- (6. publikace) Jonasova A, Neuwirtova R, Polackova H, Siskova M, Stopka T, Cmunt E, Belickova M, Moudra A, **Minarik L**, Fuchs O, Michalova K, Zemanova Z. **Lenalidomide treatment in lower risk myelodysplastic syndromes—The experience of a Czech hematology center. (Positive effect of erythropoietin ± prednisone addition to lenalidomide in refractory or relapsed patients).** *Leukemia Research* (2018) 69: 12-17