

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta



**PATOFYZIOLOGICKÉ ASPEKTY
MYELOYDYSPLASTICKÉHO SYNDROMU
VE VZTAHU K EFEKTU CÍLENÉ
IMUNOMODULAČNÍ A DEMETYLAČNÍ
TERAPIE**

AUTOREFERÁT

MUDr. Anna Jonášová

I. interní klinika - klinika hematologie

1. lékařská fakulta, Univerzita Karlova v Praze a Všeobecná fakultní
nemocnice v Praze

Praha 2014

Doktorské studijní programy v biomedicině

Universita Karlova v Praze a Akademie věd české republiky

Obor:

Fyziologie a patofyziologie člověka

Předseda oborové rady:

Prof. MUDr. Jaroslav Pokorný, DrSc.

Školící pracoviště:

Ústav patologické fyziologie a

I. interní klinika VFN a 1. LF UK

Autor: MUDr. Anna Jonášová

Školitel: Doc. MUDr. Tomáš Stopka, PhD

Obsah

Stránka

Obsah	3
Abstrakt: česká verze	4
Abstrakt: anglická verze	5
1. Úvod	6
1.1 Všeobecný úvod k MDS	6
1.2. Podrobný úvod k imunomodulační terapii a vztahu k patogenezi	9
1.3. Podrobný úvod k epigenetické/demetylační terapii a vztahu k patogenezi	10
2. Hypotéza disertační práce	11
<i>2.A. Hypotéza k problematice imunomodulační terapie a patogeneze MDS</i>	11
<i>2.B. Hypotéza k problematice epigenetické terapie a patogeneze MDS</i>	12
3. Cíle disertační práce	12
4. Metody a výsledky	13
4.1. Klinický soubor	13
4.2 Jednotlivé projekty (metody, výsledky a závěr)	14
4.2.A. Imunomodulační terapie a vztah k patogeneti	14
<i>A.1 Analýza změn exprese genů transkripčních faktorů Fli 1 a EKLF</i>	14
<i>A.2 Analýza exprese cereblonu (CRBN) u nízké rizikových nemocných s MDS s 5q- a vztah exprese cereblonu k efektivitě lenalidomidu</i>	15
<i>A.3 Změny exprese genů v průběhu léčby lenalidomidem, expresní genový profil před terapií a v době odpovědi</i>	16
<i>A.4 Expresní profil miRNA u nemocných s myelodysplastickým syndromem a 5q- aberací léčených lenalidomidem</i>	17
Imunosupresivní terapii, souvislost s imunomodulační léčbou	18
4.2.B Epigenetická/demetylační terapie a vztah k patogenezi	19
<i>B.1 Analýza dat nemocných léčených azacitidinem na I. interní klinice, vztah výsledků terapie ke změnám transkripčního faktoru (PU 1)</i>	19
5. Diskuse (diskuse k jednotlivým studiím)	20
6. Souhrn a závěry	26
Literatura	27
Publikace autora k disertační práci	38

Abstrakt (česká verze)

Klíčová slova: myelodysplastický syndrom, imunomodulační terapie, demetylační terapie, cereblon, imunosuprese, cytokiny, diferenciaci

Myelodysplastický syndrom (MDS) představuje heterogenní skupinu klonálních chorob hemopoetické kmenové buňky charakterizovaných inefektivní hemopoézou, periferní cytopenií, morfologickou dysplazií a nebezpečím transformace do akutní myeloidní leukemie (AML). Terapie myelodysplastického syndromu je dosud relativně svízelná. Mimo transplantaci periferních kmenových buněk, která je možná pouze u velmi máho procenta nemocných, není v současné době k dispozici léčba vedoucí ke kompletní dlouhodobé remisi onemocnění. Intenzivní hledání nových terapeutických možností je proto vysoce žádoucí. Do zcela recentního zavedení dvou nových terapeutických modalit byla situace v léčbě nemocných s myelodysplastickým syndromem frustrující. Nové terapeutické přístupy jsou představovány imunomodulační léčbou reprezentovanou preparátem lenalidomidem a epigenetickou terapií neboli demetylační léčbou reprezentovanou preparátem 5- azacitidinem (azacitidin). Mechanismus jejich účinku však není ještě zcela objasněn. Proto jsme se rozhodli při zavádění této léčby u nás, navázat na terapii i několik výzkumných záměrů. Cílem těchto záměrů bylo sledovat změny určitých procesů a faktorů před terapií a v průběhu terapie, které by mohly pomoci v odpovědi na otázky týkající se mechanismu účinku výše uvedených preparátů ve vztahu k patogenezi onemocnění. U imunomodulační terapie jsme studovali změny exprese důležitých transkripčních faktorů účastnících se hemopoézy, změny exprese určitých cytokinů a dalších faktorů, které mohou hrát roli v patogenezi onemocnění a jejichž změny mohou být způsobené terapií. Dále jsme analyzovali jako první expresní genové profily mikroRNA (miRNA) před a v průběhu terapie lenalidomidem. Potvrdili jsme významnou roli cereblonu v citlivosti MDS pacientů s delecí dlouhého raménka 5. chromosomu na lenalidomid. Stanovení hladiny mRNA cereblonu může sloužit k lepší identifikaci respondentů. U epigenetické terapie jsme sledovali vliv azacitidinu na expresi stěžejního diferenciačního faktoru myeloidní řady PU.1 a vliv terapie na diferenciaci buněk. PU.1 patří mezi geny, jehož exprese je u významné části pacientů s MDS s vyšším rizikem potlačena vlivem metylace DNA v jeho regulační oblasti URE. Zjistili jsme, že hladina PU.1 v progenitorech pacientů s MDS významně souvisí s odpovědí těchto pacientů

na léčbu azacitidinem. Azacitidin je schopen účinně demetylovat DNA v oblasti URE a iniciovat další epigenetické procesy na úrovni chromatinu. Tyto procesy ve svém souhrnu vedou ke zvýšení exprese PU.1 a k projevům iniciace myeloidní diferenciace. Zabýváme se též možnou kooperací azacitidinu s růstovými faktory myeloidní řady v terapii porušené myeloidní diferenciace u nemocných s MDS.

Abstract (in English)

Key words: myelodysplastic syndromes, immunomodulation therapy, demethylation therapy, immunosuppression, cereblon, cytokines, differentiation

Myelodysplastic syndromes represent a group of clonal stem cell disorders characterized by ineffective hematopoiesis, peripheral cytopenia, morphological dysplasia and the risk of transformation to acute myeloid leukemia (AML). Appropriate therapy of MDS remains challenging. There is no curative approach besides peripheral stem cells transplantation, which is regrettably appropriate only for a small group of patients due to a higher median age of the MDS population. This is why the search for therapeutic alternatives remains paramount. MDS treatment was rather frustrating until the recent introduction of two new therapeutic approaches: immunomodulation therapy with lenalidomide and epigenetic or demethylating therapy with 5-azacytidine. Both new drugs have significantly higher effect than standard therapy. However, the precise mechanism of this effect remains unknown. As a result, we decided to initiate several research projects while introducing this promising treatment to our patients.

Our aim is to investigate the mechanism of both agents in relation to disease pathogenesis by examining changes of certain occurrences and factors prior to and during the course of therapy. In immunomodulating therapy we study the expression of several transcription factors important in hematopoiesis, changes in expression of specific cytokines, and other factors with a possible role in pathogenesis of MDS that could be influenced by treatment. Using gene expression profiling, we analyze changes in microRNAs before and during treatment. A separate goal is to study and confirm the central role of cereblon in lenalidomide sensitivity in patients with MDS and 5q deletion. In epigenetic therapy, the main goal is to study the potential differentiation effect of azacitidine. We analyze expression of crucial differentiation factor for myeloid lineage PU.1. We found that significant subset of high risk MDS patients express low level of PU.1 due to DNA hypermethylation of PU.1

upstream regulatory element (URE). We also found significant relationship between levels of PU.1 expression and response of patients to AZA treatment. Effects of AZA on PU.1 expression and myeloid differentiation can be modified, enhanced by pre stimulation with the cytokines including granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF)

1. Úvod

1.1. *Všeobecný úvod k myelodysplastickému syndromu, patogenezi a terapii*

Myelodysplastický syndrom (MDS) představuje heterogenní skupinu klonálních chorob hemopoetické kmenové buňky charakterizovaných inefektivní hemopoézou, periferní cytopenií, morfológickou dysplazií a nebezpečím transformace do akutní myeloidní leukemie (AML). MDS, zvláště v raných fázích je vlastně premaligním (preleukemickým) onemocněním. **Incidence**, která se obecně pohybuje kolem 3,5–4/100 000 za rok, s věkem významně stoupá. U osob nad 60 let je pak 30/100 000, což činí MDS jednu z nejčastějších hematologických malignit v této věkové kategorii. MDS se s malou převahou vyskytuje častěji u mužů. **Klasifikace**. Celou skupinu MDS syndromů dělíme do 5 či 8 podskupin podle klasifikačních systémů, které jsou založeny na hodnocení počtu a typu cytopenií a dále procenta myeloblastů v kostní dřeni (Bennett et al., 1982, Harris et al., 1999, Vardiman et al., 2009). Jednotlivé podskupiny se liší svojí klinikou, prognózou, celkovým přežíváním a četností transformací do AML. Co se týče rizika progresu a přežívání, je onemocnění stratifikováno do několika skupin podle IPSS (International Prognostic Scoring System) (Greenberg et al., 1997). Vedle určení prognózy nemocného je tento skórovací systém stěžejní pro rozhodování o volbě terapie nemocných s MDS. Zásadní pro pochopení dalšího textu je, že s pomocí skórovacího systému, který odráží i základní heterogenitu nemocných stran prognózy a charakteru onemocnění dělíme nemocné na MDS s nižším a vyšším rizikem. Onemocnění s nižším rizikem má charakter spíše leta trvajícího chronického onemocnění zatěžujícího nemocné hloubkou cytopenie, kdežto nemocní s vyšším rizikem mají chorobu agresivní s prognózou přežívání i jen několika měsíců. Navzdory intenzivnímu výzkumu není **etiologie** onemocnění dosud objasněna. To se týká asi 80% nemocných s primárním MDS. U části nemocných je známá expozice toxickým látkám z prostředí (benzen, organická rozpouštědla), popřípadě onemocnění vzniká po předchozí chemo- či radioterapii pro jinou primární malignitu (Rothman et al., 1995, Pedersen-Bjergaard et al., 2002, Aul

et al., 1998). Tuto skupinu nazýváme sekundárním MDS. Ačkoli MDS je závažné onemocnění známé několik dekád jeho molekulární **patogeneze** a otázka proč dochází k vývoji do AML zůstávají neznámé. V patogenезi MDS nejspíše hrají roli genetické faktory, epigenetické a imunopatologické mechanismy (Aul et al., 1998, Will et al., 2012, Cazola et al., 2013, Itzykson at Fenaux, 2014, Kulaserkararaj et al., 2013). Globálně zmíněné poruchy vedou k dysplastické krvetvorbě. Protože jsou v podstatě nádorového charakteru, dávají patologickému klonu růstovou výhodu, takže postupně patologická krvetvorba nahradí normální polyklonální hemopoézu. U níže rizikových skupin (rané fáze choroby) je periferní cytopenie pravděpodobně následek akcelerované apoptózy dřevných prekursorů. Imunitní disregulace, vliv prozánětlivých cytokinů, porucha mikroprostředí a také například abnormální biogenese ribosomálních proteinů v této fázi hraje pravděpodobně též důležitou roli v narušení integrity hemopoézy a možnosti vzniku patologického klonu (Sawanobori et al., 2003, Mundle et al., 1999). K jeho plné malignizaci a vzniku leukemické populace buněk, ale nejspíše přispívají ještě další faktory. Nebyla prokázána žádná jednotlivá genetická léze, která by mohla vést k vzniku onemocnění. Mezi genetickými defekty, které jsou významné v patogenезi MDS, patří zvláště důležité nebalancované ztráty genetického materiálu (méně často reciproké translokace). Charakteristické chromosomální abnormality zahrnují aberace chromosomů 3, 5,7,8, 11, 17, 20 a Y nebo komplexní změny karyotypu zahrnující četné abnormality v rámci jednoho klonu (Haase et al., 2007). Klonální cytogenetické aberace se nacházejí asi u 30-60% nemocných s primárními MDS a u více než 80% nemocných se sekundárními MDS a jsou stále nejdůležitějším používaným prognostickým faktorem u nemocných (Greenberg et al., 2012, Schanz et al., 2012). Analýzou cytogenetických dat jakožto prognostických faktorů se též zabývá řada našich prací (Zemanová et al., 2014, Dvořák et al., 2013, Březinová et al. 2012, Bystřická et al., 2012, Neuwirtová at al., 2014). Vedle genových ztrát jsou jistě v patogenезi onemocnění důležité též mutace. Klonální vývoj u MDS je charakterizován vývojem somatických mutací, jež postupně probíhají v kmenových buňkách a jejich dceřiných populacích. Sekvenování nové generace“ s vysokou citlivostí pod 0,1% v posledních pěti letech odhalilo sadu nových doposud neznámých mutací (Papaemmanuil et al., 2013, Haferlach et al., 2014, Xu et al., 2012, Padua et al., 1998). Zajímavé právě u MDS je, že mnoho často mutovaných genů u MDS kóduje proteiny, které jsou důležité v epigenetických mechanismech, což naznačuje specifický vztah genetických a epigenetických změn. Poslední práce dokládají, že u MDS nalezneme minimálně jednu z mnoha známých onkogenních mutací u zhruba

70-90% nemocných (Papaemmanuil et al., 2013, Haferlach et al., 2014, Bejar et al., 2012, Bejar et al., 2011).

Jak jsem již uvedla, vedle genetických změn se v patogenezi pravděpodobně též účastní i abnormální epigenetická modifikace, jde především o metylaci genů a acetylaci histonů. Právě hypermetylace některých genů může vést k narušení jejich transkripce a tím k jejich utlumování „gene silencing“. Pakliže jde o ovlivnění tumor supresorických genů může tento proces napomáhat vzniku maligního klonu a jeho růstu. Následky genetických změn a narušené epigenetické regulace většinou výsledně porušují správný proces proliferace a diferenciacie hemopoetických prekursorů. Jejich akumulace u pokročilých forem MDS podporuje pak expanzi nezralých prekurzorů, myeloblastů s následnou transformací do AML (Jiang et al., 2009, Figueroa et al., 2009). U části MDS, zvláště hypoplastických forem, se uvažuje v etiopatogenezi o podobném mechanismu jako u aplastické anemie. To je o vlivu možného autoimunního poškození hemopoetických prekursorů nejspíše vedené autoagresivními T-lymfocyty, čemuž odpovídá i dobrý efekt imunosupresivní terapie u určité skupiny nemocných s MDS (Jonášová et al., 1998, Molldrem et al., 1998).

Obecné poznámky k terapii MDS. I přes stálý intenzivní výzkum je MDS jednou z nejobtížněji řešitelných hematologických malignit. Prognóza asi poloviny nemocných s primárním a většiny nemocných se sekundárním MDS je relativně špatná. U nízké rizikových nemocných, u kterých dominuje, jako největší problém anemie donedávna nebyla jiná končená volba než trvalá, často velice frekventovaná transfuzní léčba. Nemocní s vyšším rizikem byli léčeni různými kombinacemi cytostatik více či méně obdobnými jako u terapie AML, či dle možností transplantací kostní dřeně. Bohužel MDS na rozdíl od jiných hematologických malignit je překvapivě rezistentní vůči standardní chemoterapii. Zatím jedinou kauzální terapií zůstává stále vysoce riziková allogenní transplantace periferních krvetvorných kmenových buněk, kterou vzhledem k věku toleruje jen malé procento nemocných. Čtyřletý odhad celkového přežívání po transplantaci u dospělé populace je zhruba 30%. Tato statistická data podtrhují nezbytnost porozumění biologie MDS a rozšíření tak repertoáru „individualizované“ cílené biologické léčby.

V posledních letech se objevily pro obě skupiny jak nemocné s nízkým tak vysokým rizikem nové terapeutické možnosti v podobě imunomodulační terapie a epigenetické-demetylační terapie. Obě tyto nové skupiny léků znamenaly pro MDS doslova revoluci a to nejen stran šancí pro nemocné, ale i zájmem o tuto chorobu. Hrály proto i roli v intenzivnějším výzkumu patogeneze onemocnění.

1.2. Podrobný úvod do problematiky patogeneze MDS s 5q- aberací specificky 5q- syndromu, současné představy o mechanismu lenalidomidu a základní klinická data.

Nejčastější cytogenetickou abnormalitou je delece dlouhého raménka 5 chromozomu (5q-) s výskytem asi u 20% nemocných s MDS. Skupina nemocných nesoucí tuto aberaci je relativně heterogenní stran klinických projevů v závislosti na dalších faktorech jako je počet myeloblastů ve dřeni, další cytogenetické aberace, přítomnost mutací a dalších cytopenií (Mallo et al., 2011, Jonasova et al., 2012, Březinová et al. 2012, Neuwirtová et al., 2009). Speciální místo zaujímá 5q- syndrom (Van den Berghe, 1986). Bohužel u většiny těchto nemocných se během let vyvine těžká transfuzní dependence. Preparát lenalidomid patří mezi imunomodulační léky s významným efektem specificky u nemocných s 5q- aberací. Vede jednak k normalizaci hodnot krevního obrazu a především transfuzní nezávislosti, jednak u některých nemocných k vymizení patologického klonu s 5q- aberací. Na terapii lenalidomidem odpovídá zhruba 70% nemocných s aberací 5q- a asi 90% nemocných s 5q- syndromem jak ukazují i naše vlastní zkušenosti (abstrakt OHD 2013) a výsledky velkých studií MDS 003 a MDS 004 (List et al., 2006, Fenaux et al, 2011). Jak ukázala studie MDS-002, nemocní bez 5q- dosahují odpovědi pouze asi v 25% (Raza et al., 2008).

Lenalidomid má pravděpodobně efekt anti-angiogenní, anti-apoptotický, inhibuje TNF-alfa (tumor necrosis factor alfa), stimuluje T a NK buňky, produkci interleukinu 2 (IL2), navíc nejspíše zvyšuje senzitivitu erytroidních progenitorů k erythropoetinu a možný je též přímý cytotoxický efekt na buňky 5q- klonu (Ramsay et al., 2012, Corral et al., 1999, Ximeri et al., 2010). V posledních letech se objevují práce, které vztahují efekt lenalidomidu k aberantní expresi genů na deletovaném úseku 5q, u kterých byla popsána haploinsuficience (*SPARC*, *RPS 14*, *CDc25C* a *PP2A*) (Wei et al., 2009, Wei et al., 2012). Haploinsuficience určitých genů hraje roli v patogenezi onemocnění či vzniku specifického fenotypu 5q- syndromu s insuficientní erythropoézou s naopak zachovalou či zvýšenou tvorbou trombocytů (Boulwood et al., Boulwood et al., 2002, 2010, Ebert et al., 2008, Barlow et al, 2010). V experimentálních modelech bylo zjištěno, že haploinsuficience genu pro malou ribosomální podjednotku *RPS14* s následným ribosomálním stresem vede k nadprodukci p53, proteinu, který způsobuje akceleraci apoptózy erytroidních buněk a specificky u 5q- způsobuje obraz hypoplastické anemie (Dutt et al., 2011, Pellagati et al., 2010). V erytroidních progenitorech se akumulují volné ribosomální proteiny, které blokují navázání p53 na MDM2 (human homolog of murine double minute 2) ubiquitin ligázu a tím

degradaci (ubiquitinizaci) p53 v proteasomu (Dutt et al., 2011, Narla et al., 2010). Další znak 5q- syndromu s anemií kontrastující trombocytémie se parciálně vysvětluje haploinsuficiencí dalších genů a to genů pro miRNA: miR-145, miR-146, které jsou lokalizované na, nebo blízko CDR (Starczynowski et al., 2010, Kumar et al., 2011). MiR-145 a miR-146 vede v elevaci IL-6 (interleukin 6), která je též detekována u nemocných s 5q-. D. Starczinowski identifikoval cílové proteiny těchto miRNA, jsou to pro miR-145 TIRAP a pro miR-146 TRAF6, které mimo jiná mají roli v primární přirozené imunitě. Dalším významným cílem pro miR145- je Fli-1 (Truong et al., 2005). Jak zasahuje lenalidomid do těchto dějů však není jasné.

Lenalidomid je vysoce účinný preparát pro nemocné specificky s aberací 5q- nicméně jaký je skutečný mechanismus účinku a co tkví za tak vysokou citlivostí nemocných s 5q- aberací není ještě objasněno.

1.3. Úvod do problematiky významu epigenetických změn u MDS a zavedení epigenetické terapie

Epigenetická terapie representována v současné době především demetylačními preparáty znamená velký pokrok v léčbě nemocných s myelodysplastickým syndromem. V první řadě jde o nemocné s vyšším rizikem onemocnění, kde dosud používaná běžná chemoterapie nevedla ve valné většině případů k významným efektům a prodlužovala přežívání nemocných jen většinou o několik měsíců. Hypometylační terapie používaná v současné době v léčbě nemocných s MDS má dnes již mnoha studii podložené pevné místo v terapii nemocných s vyšším rizikem (Jonášová et al., 2013, Fenaux et al., 2009, Silverman et al., 2002, Itzykson et al., 2011). Nicméně co je skryto za relativně vysokou efektivitou této terapie a jaký je mechanismus účinku demetylačních preparátů nebylo dosud plně objasněno. Metylace DNA je jedna z nejčastějších a nejvíce studovaných epigenetických změn u MDS. Pakliže dochází k metylaci CpG bohatých oblastí tzv. CpG ostrůvků v promotorech genů může dojít k zabránění transkripce těchto genů („gene silencing“) (Herman et al., 2003). Inhibována může být exprese genů nezbytných pro normální regulaci proliferace, diferenciaci a buněčné apoptózy (Curik et al., 2012, Hofmann et al., 2006, Christiansen et al., 2003). Tento proces umožňuje vznik maligního klonu a jeho růstu (Jones et Baylin, 2007, Kautiainen et Jones, 1986). U MDS je vedle inhibice jednotlivých důležitých genů prokázána aberantní významná metylace celého genomu a jsou též studie demonstrující skutečně progresivní hypermetylací genomu s progresí onemocnění (Jiang et al., 2009, Figueroa et al., 2009, del Rey et al., 2013, Hopfer et al., 2009). Metylací zprostředkovává hlavně DNMT1 (DNA

metyltransferáza 1). Hypermetylací DNA zabraňují dva inhibitory metyltransferázy, 5-azacitidin a 5-aza-2'-deoxycitidin (decitabin). U nás je povolen azacitidin. Dnes se s výzkumem funkce demetylačních preparátů objevují i jiné nové efekty těchto účinných léků, které pravděpodobně ovlivňují apoptózu, diferenciaci, diskutuje se i imunomodulační efekt (Shin et al., 2012, Aimiwu et al., 2012). Cytostatický efekt azacitidinu byl již popsán v 60 letech minulého století a to prvním našim vědcem Františkem Šormem (tehdy prezidentem Akademie věd a ředitelem Ústavu organické chemie a biochemie), který azacitidin syntetizoval. Četné studie včetně výsledku analýzy terapie azacitidinem v České republice ukazují významný terapeutický efekt tohoto preparátu u všech skupin MDS nemocných (Jonášová et al., 2013, Fenaux et al., 2009). Studie AZA- 001 potvrdila pozitivní efekt azacitidinu a to nezávisle na věku, pohlaví a stupni rizika dle IPSS. Stěžejním výsledkem studie bylo dosažení významně delšího OS (24 versus 15 měsíců) v rameni s azacitidinem oproti dosud používané klasické terapii (podpůrná léčba, nízké dávky cytosin arabinosidu, intenzivní chemoterapie-3+7 režim).

V naší práci nejde jen o objasnění mechanismu demetylačních preparátů, důležité je též s pokroky v molekulární genetice identifikovat i správné a validní biomarkery sloužící k predikci efektu léčby a správnému výběru nemocných.

2. Hypotéza práce

2.A. Imunomodulační terapie - vztah k patogenezi MDS

Imunomodulační terapie je vysoce efektivní terapie u nemocných s MDS specificky s 5q- aberací. Její mechanismus a děje vedoucí k tak významnému efektu nejsou objasněny. V patogenezi onemocnění, která je pravděpodobně velmi komplexní, hraje roli disregulace určitých, většinou prozánětlivých a pro-apoptotických cytokinů a dalších faktorů. Na defektu erytropoézy a specifickém fenotypu onemocnění se podílí porušená koordinace a exprese transkripčních faktorů důležitých pro diferenciaci a proliferaci červené řady.

Předpokládáme, že:

1. imunomodulační terapie má vliv na hladiny transkripčních faktorů důležitých v diferenciaci červené řady.
2. ovlivňuje hladiny cytokinů a pro-apoptotických faktorů hrajících roli v porušené erytropoéze
3. změněné hladiny specifických mikro RNA se podílí na patogenezi onemocnění

- účinek imunomodulační terapie u MDS je zprostředkován vazbou na cereblon (CRBN) a tento efekt je závislý na míře jeho exprese (jak bylo ukázáno u maligního myelomu).
- existuje významný počet respondentů imunomodulační terapie, které je možno identifikovat s přispěním specifických molekulárně genetických vyšetření.

2.B. Epigenetická (demetylační) terapie - vztah k patogenezi MDS

Porucha diferenciací, která je typická pro MDS, je způsobena sníženou expresí transkripčního faktoru PU.1 v progenitorových buňkách. Hlavní regulační oblast pro PU.1 URE je aberantně metylována. Demetylační léčba, vede k odblokování diferenciačního bloku, typického pro nemocné s MDS s vyšším rizikem transformace do AML. Odblokování diferenciačního bloku je zřejmé dle klinické odpovědi a specifických klinických parametrů jen u části nemocných Předpokládáme že:

- existuje definovaná podskupina MDS respondentů na demetylační terapii k jejíž identifikaci vede i stanovení míry exprese PU.1.
- míra exprese PU.1 reflektuje schopnost odpovědět na demetylační terapii
- diferenciační efekt demetylační terapie může být potencován růstovým faktorem myeloidní řady G-CSF.

3. Cíle práce

V naší práci jsme se zaměřili na spojitost mezi možnými patogenetickými mechanismy vzniku myelodysplastických syndromů a efektu a mechanismu nově používaných terapeutických postupů. Orientovali jsme se na dva zásadní terapeutické okruhy:

Imunomodulační terapii reprezentovanou preparátem lenalidomidem .

V této části se věnujeme patogenezi specifické podjednotky MDS 5q-syndromu a mechanismu lenalidomidu.

Cíle:

- Analýza změn exprese genů transkripčních faktorů Fli 1 a EKLF (Friend leukemia virus integration 1 a erythroid Krüppel-like factor) analýza změn hladin faktorů účastnících se na akcelerované apoptóze erytroidní řady: MDM2, IL6, p53.

2. Analýza exprese cereblonu (CRBN) u nízké rizikových nemocných s MDS a vztah exprese cereblonu k efektivitě lenalidomidu.
3. Expresní genový profil u nemocných s MDS s 5q- aberací, změny v průběhu léčby lenalidomidem, expresní genový profil před terapií a v době odpovědi
4. Expresní profil miRNA u nemocných s MDS a 5q- aberací léčených lenalidomidem před terapií a změny v průběhu léčby
5. Na základě výsledků výše uvedených studií následná identifikace respondentů na léčbu

Epigenetickou terapii reprezentovanou preparátem azacitidinem. V této části naší práce se věnujeme demetylační terapii a jejímu vztahu k patogenezi rizikovějších skupin MDS tj. MDS s IPSS středním II a vysokým stupněm. Jde tedy o skupiny MDS, kde již dochází k poruše diferenciaci a proliferaci a které již mají charakter nádorového onemocnění. Sledovali jsme možný diferenciací efekt léku.

Cíle:

1. Analýza nemocných léčených azacitidinem
2. Sledovat změny exprese PU.1 u nemocných s MDS s vyšším rizikem a AML
3. Vliv exprese PU.1 před terapií na odpověď nemocných na demetylační léčbu Identifikace potencionálních respondentů
4. Sledovat možnou potenciaci diferenciací efektu azacitidinu pomocí kombinace s růstovým faktorem G-CSF. Příprava pro realizaci klinické studie kombinace azacitidinu a G-CSF.

4. Metody a výsledky

4.1. Klinický soubor

Do obou našich výzkumných okruhů byli zařazeni nemocní, kteří byli léčeni na I. interní klinice Všeobecné fakultní nemocnice (VFN) v Praze od roku 2008 do současnosti. Součástí naší práce je tedy značně náročný, ale pro celý projekt nepostradatelný sběr klinických a experimentálních dat, týkajících se základních diagnostických, většinou klinických parametrů dále hodnocení výsledků terapie, sledování specifických molekulárních, genetických faktorů a ve výsledku komplexní analýza všech našich dat a jejich vzájemné porovnávání. Četná klinická a laboratorní data nemocných jsou ukládána do takzvané lenalidomidové a azacitidinové lišty, které jsou součástí našeho

registru, a které slouží jako ucelený zdroj klinických informací nejen na začátku onemocnění ale i v průběhu léčby. Ročně je na I. interní klinice zařazeno do registru zhruba 70 nových nemocných s diagnózou MDS z toho asi 40-50% tvoří kandidáti imunomodulační a demetylační terapie a jejich počty každoročně jeví lehkou vzestupnou tendenci.

Terapie lenalidomidem nemocných s většinou izolovanou delecí dlouhého raménka 5. chromosomu (5q-) byla na naší klinice zahájena v roce 2008.

Dosud bylo léčeno na I. interní klinice 24 nemocných. Stran klinických dat je důležité poznamenat, že 89% našich nemocných odpovědělo na terapii s dosažením kompletní transfuzní nezávislosti. Terapie azacitidinem byla zahájena v roce 2008. Do současné doby bylo na I. interní klinice VFN léčeno 115 nemocných. Zpracování materiálu se provádí ve spolupráci s Ústavem patologické fyziologie (kde také je naše biobanka) a Ústavem hematologie a krevní transfuze. Dílčí metodika bude probrána níže u jednotlivých uvedených výzkumných úkolů.

4.2. Jednotlivé projekty (metodika, výsledky)

4.2.A Imunomodulační terapie - vztah k patogenezi MDS

A.1. Analýza exprese genů transkripčních faktorů Fli 1 a EKLF a dalších transkripčních faktorů u nemocných s 5q- aberací a jejich změny při terapii lenalidomidem.

K tomuto tématu se vztahují práce (Neuwirtova et al. Annals of Hematology 2013, Jonášová et al. Leuk. Res., 2012, Neuwirtová, Jonášová et al, 2009), výsledky byly prezentovány na 12. a 13. Světových kongresech MDS (Edinburgh 2012, Berlín 2013), na OHD (Olomouckých hematologických dnech), dále na konferenci České hematologické společnosti 2013 a konferenci České MDS skupiny 2013. Další publikace se připravuje.

Naše práce předpokládá antagonismus dvou transkripčních faktorů, EKLF a Fli 1, v patogenezi 5q- syndromu. Tento antagonismus může být klíčovým faktorem v klinické manifestaci anemie s hypoplastickou erytropoézou a trombocytémií, které jsou typické pro 5q- syndrom. Domníváme se, že by u 5q- syndromu za předpokládané přítomnosti Fli1v megakaryocytech mohl být p53 degradován i při ribosomálním stresu, což by mělo umožnit efektivní megakaryopoézu. Sledujeme vliv lenalidomidu na změny uvedených faktorů a s jejich funkcí souvisejících dalších faktorů a genů u 5q- MDS nemocných léčených lenalidomidem.

Metody a výsledky. V první fázi jsme porovnávali exprese *FLi1* a *EKLF* genů pomocí hladin mRNA v mononukleárních buňkách periferní krve a kostní dřeně u 34 nemocných s 5q- syndromem, 28 nemocných s MDS bez 5q- aberace a 7 nemocných s Diamond-Backfan anemií (DBA). DBA s kongenitálními mutacemi genů pro různé ribosomální proteiny patří spolu s MDS s 5q- k tzv. ribosomopatiím. Výsledné analýzy expresí genů u jednotlivých skupin byly porovnány s výsledky zdravých kontrol. Expres obou transkripčních faktorů (*EKLF* a *FLi1*) vykazovaly jednoznačně největší rozdíly zvláště v mononukleárních buňkách kostní dřeně u nemocných s 5q- aberací, kde jsme prokázali u nemocných zvýšené hladiny mRNA *FLi1* a naopak nízké hladiny mRNA *EKLF*. Hlavními rysy 5q- syndromu v krevním obraze je anemie a normální či spíše vyšší hodnoty trombocytů. Lenalidomid je lék, který rychle vede k zvratu tohoto klinického obrazu. Položili jsme si tedy další otázku, zda a k jakým změnám exprese *EKLF* a *FLi1* a dalších důležitých faktorů (MDM2, PU.1 a p53, IL-6) vede terapie lenalidomidem. Prezентujeme výsledky 12 prvních nemocných s MDS s 5q- syndromem (9 žen, 3 mužů), medián věku byl 68 let (rozmezí 55-76 let). Medián podaných cyklů byl 8 (rozmezí 3-13). Všichni nemocní měli významnou anemii a byli závislí na transfusích. Na terapii odpovědělo 11 nemocných.

Podle našeho předpokladu došlo k u většiny nemocných k relativně prudkému navýšení hladin mRNA *EKLF* a poklesu *FLi1*. Z ostatních faktorů byly nejmarkantnější změny p53, u něhož zvláště ze vzorků kostní dřeně docházelo k postupnému snížení hladiny. Práce stále pokračuje ve snaze rozšířit klinický soubor. V současné době se snažíme prokázat změny hladin *EKLF*, *FLi1* a p53 na úrovni proteinů v jednotlivých buněčných řadách (erytrocytární a megakaryocytární) imunohistochemicky na histologických preparátech dřeně.

A.2. Analýza exprese cereblonu u nízké rizikových nemocných s MDS s 5q- a vztah exprese cereblonu k efektivitě lenalidomidu

Výsledky této práce jsou v současné době v recenzním řízení European Journal of Hematology, byly presentovány na ASH (American society of hematology meeting) 2013 a práce byla vybrána do „highlights of ASH 2013“. Významným předělem stran jasnější představy o mechanismu lenalidomidu je objevení vazebného místa v buňce pro lenalidomid CRBN. Naše práce je prvním dokladem, že u MDS je CRBN nezbytným vazebným místem pro lenalidomid a jeho vyšší exprese je vázaná či nezbytná pro následný efekt léku.

Metody a výsledky. Pracovali jsme s mononukleárními buňkami, které jsme izolovali ze dřeně a periferní krve. Zde pro zkrácení uvádím výsledky ze

dřeně. Dřeně byly k dispozici od 23 nemocných s nízké rizikovým MDS s 5q-, 37 nemocných s nízké rizikovými MDS bez 5q- aberace a 24 zdravých kontrol. K zjištění exprese genů bylo použito TaqMan- kvantitativní „real-time“ PCR. Medián CRBN mRNA hladin v celkové RNA z izolovaných mononukleárních buněk ze dřeně byl (3,3 u 5q- MDS, 2,2 u nemocných bez 5q- aberace a 1,3 u zdravých dárců). Rozdíly mezi těmito třemi skupinami byly statisticky významné ($p < 0.05$, Mann-Whitney test). Velice podobné výsledky jsme získali při analýze DDB1 a IRF4, tyto výsledky pak korelovaly s CRBN hladinami. Dále jsme provedli analýzu ve vztahu k terapii lenalidomidem. Zjišťovali jsme hladiny mRNA CRBN u 6 nemocných před a v průběhu terapie. U všech nemocných (4 nemocní), kteří byli trvale dobří respondenti, jsme našli vysoké hladiny CRBN mRNA jak před terapií, tak v průběhu léčby při trvalé odpovědi. U 2 nemocných, kteří v začátku léčby odpověděli, ale v průběhu terapie u nich došlo k selhání odpovědi a také progresi onemocnění do vyšších rizikových skupin MDS jsme zjistili, že z počáteční vyšší hodnoty hladiny CRBN mRNA došlo náhle v době selhání a progresu k prudkému poklesu hladin CRBN. V současnosti je nedostatek ve standardizaci testů pro analýzu CRBN genové exprese. Analýzy a jejich standardizace jsou komplikované pro velké množství alternativních sestřihových „splicingových“ variant. Zjistili jsme, že nejlepší je TaqMan assay Hs00372271_m1 pro exon 8-10, kde je vazebné místo CRBN pro lenalidomid.

A.3. Změny exprese genů v průběhu léčby lenalidomidem, expresní genový profil před terapií a v době odpovědi

Výsledky práce byly publikovány v Clin. Lymphoma myeloma and leukemia (Belickova et al. 2012), Presentovány na ASH 2011 (annual meeting of American society of hematology), EHA (European hematology association meeting) 2012, MDS světový kongres Edinburgh 2011.

Pomocí změn exprese genů účastníků se imunomodulačních procesů a apoptózy v průběhu terapie lenalidomidem jsme se snažili identifikovat děje, které by pomohly přispět k našim znalostem o nejen o mechanismu lenalidomidu ale i patogenetických mechanismech MDS s 5q- aberací.

Metody a výsledky. Studovali jsme 7 nemocných (4 ženy, 3 muže, medián věku 68 let). Všichni nemocní byli léčeni lenalidomidem a měli diagnosu MDS s nízkým rizikem a 5q- delecí. Odebírali jsme a testovali monocytu CD14+ z periferní krve před terapií, v době první erytrocytární odpovědi (dosažení transfuzní nezávislosti) a v průběhu léčby. Zvolili jsme monocytu pro jejich produkci prozánětlivých cytokinů (například TNF a IL1) a

inhibitorů erythropoézy. Většina nemocných v době hodnocení nedosáhla ještě cytogenetické odpovědi. Testováno bylo též 10 zdravých kontrol. K analýze exprese genů jsme použili HumanRef-8 v3 ExpressionBeadChips (Illumina Inc, San Diego, CA). Následně jsme analyzovali a porovnávali expresi vybraných genů (*TNF*, *IL-1*, a *JUN*) pomocí kvantitativního „real-time“ PCR. První uvádíme změny v době diagnózy před terapií lenalidomidem. Nalezli jsme změněné exprese u 558 genů u nemocných s 5q- delecí v porovnání s kontrolními vzorky. Seznam nejvíce deregulovaných 110 genů byl porovnán v databázi „DAVID gene ontology“. Bylo tak identifikováno 6 skupin či určitých patogenetických drah se signifikantně změněnou expresí genů s pravděpodobnou účastí v patogenezi onemocnění. Patří sem: geny „NOD-like receptor“ signální dráhy, geny lupus erythematoses, cytokin-cytokin receptorové interakce, geny chemokinových signálních drah, geny patřící k typu I diabetes mellitus I, geny hematopoézy. Dále byla provedena analýza porovnávající změny exprese genů před a v průběhu terapie tedy při první odpovědi na lenalidomid. Statisticky významné změny exprese byly u 97 genů. Opět „DAVID gene ontology“ database byla použita k identifikaci funkčních okruhů těchto genů a jejich skupin. Byly identifikovány změny genů v drahách: imunitní odpověď, zánětlivá odpověď, odpověď při bakteriální infekci, anti-apoptická aktivita, regulace aktivity mitogen-aktivované protein kinázy (MAPK), kyslíkový transport, a geny regulace proliferace. U nemocných s 5q- delecí jsme zjistili aberantní expresi řady cytokinů (například *CCL3L1*, *TNF*, *IL-8*, *IL-1*, *CXCL2*, a *TNFAIP3*), které mohou hrát roli ve vývoji onemocnění. Celkem velký počet genů se změněnou expresí byly geny *TNF* signální dráhy (jako jsou například *TNF*, *TNFAIP3*, *SLC35B2*, *FOSB*, *JUN*, *IER3* a *DUSP2*). Kvantitativním PCR jsme měřili relativní hladiny vybraných transkriptů *TNF*, *IL-1* a *JUN* genů opět před a v průběhu terapie lenalidomidem. Nalezli jsme vyšší expresi *TNF*, *IL1* a *JUN* před lenalidomidem a její pokles u většiny nemocných v průběhu odpovědi a v dalším průběhu léčení.

A.4. Expresní profil miRNA u nemocných s myelodysplastickým syndromem a 5q- aberací léčených lenalidomidem

Výsledky této práce jsou nyní odeslány k publikaci do European Journal of Hematology, kde jsou v recenzním řízení. Presentovány byly na světových MDS meetingech Edinburgh 2011 a Berlín 2013 a Českých hematologických dnech v Olomouci 2012.

Vedle změněné exprese genů, které kódují specifické proteiny se zdá, že do patogeneze onemocnění zasahují i miRNA (malé nekódující RNA), které

regulují expresi genů na post translační úrovni, čímž mohou zasahovat do důležitých buněčných mechanismů, regulujících apoptózu, proliferaci a diferenciaci buněk. Rozhodli jsme se provést analýzu změn exprese miRNA u nemocných s 5q- aberací a zavinlost těchto změn na terapii lenalidomidem.

Metody a výsledky. Vyšetřovali jsme miRNA expresní profil u CD34 + buněk kostní dřeně a monocytů z periferní krve nemocných léčených lenalidomidem. Vyšetřeno bylo 12 nemocných ve věku od 55 do 78 let. Vzorky byly opět sbírány a hodnoceny těsně před terapií a v době první hematologické tedy erytrocytární odpovědi (dosažením transfuzní nezávislosti). Výsledky byly porovnávány s výsledky zdravých kontrol. Expresce byly měřeny za použití "Human v2 MicroRNA expression profiling kit (Illumina). Změřeny byly exprese 1145 miRNA. Měřeny byly také exprese vybraných miRNA pomocí kvantitativního reverzního PCR. V porovnání vzorků před terapií se zdravými kontrolami jsme našli statisticky významně deregulovaných 51 miRNA (9 vyšší, 42 nižší exprese). V porovnání vzorků před léčbou a v době odpovědi jsme statisticky významné změny zaznamenali u 28 miRNA (14 vyšší a 14 nižší exprese). Podrobný výpis je v naší publikaci.

K validaci výsledků mikroarraye jsme měřili hladiny 4 vybraných miRNA (miR-34a, miR-127-3p, miR-154, a miR-451), které mají možný vliv na hemopoézu a které vykazovaly významné rozdíly před a po terapii. Použili jsme kvantitativní "real-time" PCR

Vedle toho jsme měřili specificky exprese určitých miRNA kódovaných v CDR (miR-145,146,143, 378, 378*). Zajímavým nálezem bylo výrazné zvýšení exprese 40 miRNA, které se shlukují v lokusu 14q32. Některé z těchto miRNA hrají roli v hematopoéze.

Imunosupresivní terapii, souvislost s imunomodulační léčbou (zvláště ve vztahu k orientaci našeho zájmu o imunomodulační děje)

K zavedení imunomodulační terapie u MDS přispěly původní klinické a výzkumné studie týkající se imunosupresivní terapie. Obě formy terapií vycházejí ze základního předpokladu účasti aberantních imunitních dějů v patogenezi onemocnění. Jedna ze zcela prvních klinických studií využívajících imunosupresivní terapii, a potvrzující její efekt u části MDS nemocných byla naše práce v British Journal of Hematology (Jonášová et al., 1998). Podobnost některých hypoplastických forem MDS s aplastickou anemií vedla naši úvahu, že imunosupresivní terapie by mohla být úspěšná též u MDS. Tato práce byla jakýmsi úvodem do studia autoimunních a

imunomodulačních mechanismů v selhání dřene u MDS pacientů. Byť naše práce byla publikována před zahájením doktorské práce, patří svým významem a podílem na naší orientaci v klinickém výzkumu k tématu této disertace.

4.2.B Epigenetická terapie – vztah k patogenezi

B.1. Analýza dat nemocných léčených azacitidinem na I. Interní klinice, vztah výsledků terapie ke změnám transkripčního faktoru (PU 1)

Výsledky této práce jsou součástí publikací: Curik et al., Leukemia 2012, Jonášová et al., Transfuse a Hematologie dnes 2013, byly presentovány na světovém MDS kongresu Edinburgh 2011, kongresu Americké hematologické společnosti ASH 2011, kongresu České hematologické společnosti OHD 2014, 2011, Československém hematologickém sjezdu 2012, Bratislavských hematologických dnech 2013.

Dysplazie a porucha diferenciacie s kumulací nezralých dysplastických prekursorů bílé řady u nemocných s MDS s vyšším rizikem může být způsobena nedostatečnou exprese transkripčního faktoru PU.1. V potlačení transkripce *PU.1* v MDS může hrát roli aberantní zvýšená metylace DNA v oblasti URE. Cílem této práce bylo sledovat hladiny PU.1 u nemocných léčených azacitidinem na I. Interní klinice před a v průběhu terapie. Sledovali jsme, zda a jak hladiny PU.1 korelují s odpovědí na demetylační terapii, jakou mají predikční hodnotu nejen stran odpovědi ale i přežívání nemocných, a zda je azacitidin schopen zvýšit eventuální nižší expresi *PU.1* a má-li tak zprostředkovaně efekt diferenciacní. Naše další otázka byla, zda tento diferenciacní efekt může být ještě potencován kombinací s růstovými faktory, konkrétně s GCS-F (granulocytární kolonie stimulující faktor), což by umožnilo zahájení klinické studie používající azacitidin v kombinaci s růstovým faktorem k potenciaci diferenciacie myeloidní řady a zvýšení efektu azacitidinu u nemocných s MDS s vyšším rizikem.

Metody a výsledky. PU.1 byl analyzován v progenitorech pacientů s MDS se středním-2 nebo vysokým rizikem (IPSS) a v modelových buněčných liniích pro MDS.

Od roku 2006 jsme shromáždili kostní dřene (a periferní krve) od 44 nemocných v 54 nezávislých vzorcích. Jde o pacienty s MDS vyšším rizikem (střední-2 a vysoké riziko podle IPSS) a AML. Soubor pacientů se skládá ze 32 mužů a 12 žen. Medián věku pacientů je 67 let (v rozmezí od 57 do 83 let). Všechny patientské vzorky byly odebrány v době diagnózy onemocnění a před započítím léčby AZA. U pacientů jsme sbírali řadu klinických údajů,

charakteristik nemocných, údajů o terapii, typů a trvání odpovědi a dále v neposlední řadě, což je pro terapii inhibitory metyltransferáz nejdůležitější, v hodnocení odpovědi, délku přežívání. K analýzám dat byla použita též data z azacitidinové lišty MDS skupiny. Jako kontroly bylo použito pět komerčně připravených a dodaných vzorků CD34+ progenitorů z normální lidské kostní dřeně od společnosti Lonza (kat.číslo 2M-101C). Podrobné popisy laboratorních prací přesahují rámec tohoto sdělení, jsou součástí práce Curik et al., Leukemia 2012. Expresí *PU.1* byla měřena v CD34 pozitivních buňkách nemocných s MDS na úrovni mRNA a byla srovnávána se zdravými kontrolami. Expresí *PU.1* v progenitorech získaných od pacientů s MDS se středním-2 nebo vysokým rizikem (IPSS) byla oproti zdravým kontrolám mnohem více heterogenní. V našem souboru byly skupiny pacientů s vysokou i nízkou expresí *PU.1* oproti zdravým kontrolám, které většinou měly expresi konstantní. Zjistili jsme, že pacienti s nízkou expresí *PU.1* mají významně horší prognózu (při léčbě azacitidinem) pokud jde o dobu celkového přežití, než pacienti se střední a vysokou expresí *PU.1*. Dále uvádím ve zkratce výsledky studie metylace oblasti URE. Oblast URE byla dle analýz této studie v buněčné linii OCIM2 a v progenitorech z pacientů s MDS aberantně zvýšeně metylována. Mezi mírou metylace na CpG ostrůvčích při vazebných místech *PU.1* a *AML-1* v oblasti URE a mezi hladinou exprese *PU.1* v progenitorech pacientů s MDS byl nalezen zřetelný trend nepřímé korelace. Působení azacitidinu na MDS buňky OCI-M2 vedlo k výraznému potlačení metylace v oblasti URE. Azacitidin vedl ke zvýšení exprese *PU.1* a navození diferenciace buněk (z modelových MDS linií), což bylo navíc pozitivně ovlivněno cytokiny podporujícími růst myeloidních kolonií. Stimulace buněk OCIM2 ovlivněných azacitidinem cytokiny M-CSF a GM-CSF dále zvyšovala expresi *PU.1* a jeho cílových genů. V současné době v návaznosti na tuto práci pokračujeme v testech s použitím myších modelů

5. Diskuse

Diskuse k A.1

Megakaryocyty a červená řada vycházejí ze společné progenitorové buňky (MEP – megakaryocytární a erytroidní progenitor). Na směr diferenciace této progenitorové buňky mají vliv vedle dalších transkripčních faktorů, cytokinů a cytokinových receptorů též *FLi-1* a *EKLF*. *EKLF* je důležitý transkripční faktor pro erytropoézu. *FLi-1* je důležitý transkripční faktor megakaryopoézy a potencionální onkogen (Eisbacher et al., 2003, Fuhrken et al., 2008). *FLi-1* promotor je aktivován (lépe „upregulován“) samotným *Fli-1*, *IL-6* přes *STAT 3* a také *PU.1* pozitivně reguluje expresi *FLi.1* (Hodge et al., 2002, Starck et

al., 1999). Fli-1 v megakaryocytech reguluje pravděpodobně p53 přes ubiquitin-ligázu MDM2 a vede tak k degradaci p53 v proteasomu (Truong et al., 2005). Naše práce potvrdila náš předpoklad antagonismu EKLF a Fli 1 u nemocných s MDS a 5q- aberací. To bylo doloženo průkazem vysokých hladin mRNA Fli 1 a nízkými hladinami mRNA EKLF v mononukleárních buňkách kostní dřeně a periferní krve u nemocných s izolovanou delecí 5q- na rozdíl od ostatních nemocných s MDS. Tento antagonismus, jak výše uvádíme, může být klíčovým faktorem v klinické manifestaci anemie s hypoplastickou erytropoézou a trombocytémií, typické pro 5q- syndrom (Van den Berghe et al., 1986).

Terapie lenalidomidem, vede k reverzi v krevním obraze. U všech respondentů dochází k navýšení hemoglobinu, ale prakticky vždy terapie lenalidomidem vede k poklesu trombocytů (List et al., 2006, Fenaux et al., 2011, Sekeres et al., 2008). Oba základní transkripční faktory pro erytropoézu a trombopoézu (EKLF a Fli 1) v souladu s tímto klinickým obrazem vykazovaly relativně významné změny hladin mRNA Fli1 a EKLF po terapii lenalidomidem. Otázkou je zasahuje-li lenalidomid přímo do dějů vedoucích k zvýšené expresi *EKLF a Fli 1*, což by pak vysvětlovalo změny v krevním obraze. Analýzy dalších faktorů (MDM2, PU-1, IL-6, p53), které výše uvádíme, a které se velmi pravděpodobně zúčastňují etiopatogeneze onemocnění je nutné ověřit na větším množství vzorků z kostních dření. Z dostupných vyšetření kostní dřeně jsou konsistentní s literárními údaji a našim předpokladem výsledky hladin p53, které mají sestupnou tendenci (Wei et al. 2012). Dokládají možný efekt lenalidomidu na p53, jeho snížení a tím vysvětlení menší erytroidní apoptózy. Otázkou ovšem je, nevede-li snížení p53 vedle kýžené menší apoptózy červené řady k ohrožení nemocného možnou progresí onemocnění.

Na základě naší dosavadní analýzy v souladu s našim předpokladem můžeme říci, že největší změny, ke kterým dochází po terapii lenalidomidem, jsou v expresi dvou důležitých transkripčních faktorů EKLF a Fli-1, což podporuje i předpoklad jejich funkčního „cross-antagonismu“.

Diskuse k A.2

CRBN je protein, který je pojmenován pro svou pravděpodobnou roli v cerebrálním vývoji, zvláště ve vývoji paměti a učení. Gen pro CRBN leží na krátkém raménku 3 chromosomu v pozici p26.3 a jeho mutace vede k rozvoji mírné mentální retardace. CRBN je součástí komplexu ubiquitin E3 ligázy společně s DDB1 (damage DNA binding protein, CUL4A (cullin -4A) a regulátorem cullinu 1 (ROC1 cullin-1 regulator). Tento komplex reguluje

DNA „repair“ (opravy) replikaci a transkripci (Ito et al., 2010). Nedávno T. Ito a spol. identifikovali CRBN jako primární cíl (vazebné místo) talidomidu a též jako efektor teratogenity talidomidu (Ito et al., 2010). Následně se několik prací zabývalo expresí *CRBN* a jeho vlivu na efekt imunomodulačních látek v terapii myelomů (Lopez-Girona et al., 2012, Zhu et al., 2013, Broyl et al., 2013, Heinetl et al., 2013). Bylo zjištěno že, snížená exprese *CRBN* je spojena u myelomu s rezistencí na imunomodulační preparáty (Broyl et al., 2013, Heinetl et al., 2013). Vazba lenalidomidu na CRBN pravděpodobně vede k inhibici CRBN, což způsobuje u myelomových buněk indukci zástavy buněčného cyklu pomocí „upregulace“ inhibitoru cyklin-dependentní kinázy p21 (Schuster et al., 2014, Katsoulidis et al., 2005). Přesné následné děje na molekulární úrovni po vazbě CRBN s lenalidomidem ale nejsou zatím identifikovány. Naše otázka tedy byla, hraje-li CRBN též nějakou roli v efektu a aktivitě lenalidomidu u nemocných s 5q- syndromem, kde vykazuje lenalidomid tak vysokou klinickou aktivitu. V naší práci jako první presentujeme vztah CRBN a aktivity imunomodulační terapie reprezentované v tomto případě lenalidomidem u MDS. Role CRBN jakožto vazebného místa pro lenalidomid a jeho předchůdce talidomid u mnohočetného myelomu byla potvrzena již několika pracemi (Ito et al., 2010, Lopez-Girona et al., 2012, Zhu et al., 2013, Broyl et al., 2013, Heinetl et al., 2013). Dosud ale nebyli analyzováni nemocní specificky s 5q- aberací, kteří jsou vynikajícími respondenty na tuto terapii (List et al, 2006, Fenaux et al, 2011). Našli jsme relativně vysoké hladiny CRBN mRNA jak ve dřeni tak periferní krvi nemocných s 5q- syndromem. Nemocní bez delece 5q, kteří jsou jen výjimečnými respondenty na lenalidomid (Raza et al., 2008) nevykazovali až na jednotlivé výjimky zvýšené hladiny. Zajímavé ale bylo že, někteří nemocní dosahovali úrovně hladin nemocných s 5q-. Lenalidomid není pro tuto skupinu nemocných u nás povolen, proto nebyli tito pacienti léčeni. Je však možné, že právě oni by představovali skupinu vybraných nemocných bez delece 5q, kteří by mohli odpovídat na terapii. Pak by vyšetření hladin mRNA CRBN mohlo sloužit k identifikaci respondentů. Vysoké hladiny mRNA CRBN u nemocných s 5q- korelovaly s odpovědí na lenalidomid, navíc jsme zjistili, že u nemocných, kteří přestali na terapii odpovídat, došlo k prudkému poklesu hladiny CRBN mRNA. **Velmi podobně tedy jako u mnohočetného myelomu se domníváme, že u 5q- syndromu vyšší hladiny CRBN mRNA reflektující vyšší expresi *CRNB* genu, jsou nezbytné k účinku lenalidomidu.** V současné době naše práce pokračuje a jejím dalším cílem je identifikace následných dějů po inhibici CRBN lenalidomidem.

Diskuse k A.3

Patogeneze MDS se pravděpodobně účastní akcelerovaná předčasná apoptóza, imunitní deregulace a aktivace či disregulace určitých cytokinů (Katsoulidis et al., 2005, Breccia et Alimena, 2010, Kornblau et al., 2010). Specificky u 5q- byly popsány disregulace genů hrajících roli v aktivaci p53 dráhy s následnou akcelerací apoptózy erytroidní řady (Barlow et al., 2010, Pellagati et al., 2010). Lenalidomid jakožto imunomodulační preparát pravděpodobně inhibuje TNF- α , interleukin 6 a naopak stimuluje IL-2 (interleukin 2) a interferon γ a následně vede k aktivaci T buněk a NK buněk (Sokol et List, 2007). Většina účinků tohoto vysoce účinného léku ale zůstává zatím neobjasněna. V naší práci jsme pomocí změn genové exprese v průběhu terapie lenalidomidem identifikovali změny, které by pomohly přispět k našim znalostem o patogenetických mechanismech samotného onemocnění a efektů lenalidomidu. Vycházeli jsme z poznatků a zkušeností z předchozí práce laboratoře Mgr. Beličkové (Vasikova et al, 2010). Aberantní exprese určitých prozánětlivých cytokinů a faktorů TNF dráhy se velmi pravděpodobně zúčastňují patogeneze MDS a akcelerace apoptózy (Kitagawa et al., 1997, Sawanobori et al., 2003, Rusten et al., 1995). Jedním z hlavních hráčů je TNF a jeho dráha (Kitagawa et al., 1997, Sawanobori et al., 2003). Stejně jako u jiných skupin MDS i my jsme u 5q- syndromu potvrdili vysokou expresi genů TNF dráhy před terapií. TNF se účastní mnoha rozličných procesů, jako jsou modulace imunitních dějů, zánětlivé reakce, apoptóza, proliferace buněk a popsána byla i jeho přímá suprese erythropoézy (Rusten et al., 1995). V naší studii jsme u většiny nemocných našli signifikantní „downregulaci“ TNF a genů TNF dráhy po terapii lenalidomidem. Vedle toho jsme našli změny expresí prozánětlivých cytokinů, které by mohly hrát roli v etiopatogenezi onemocnění, a jejichž změny by mohly vysvětlovat efekt imunomodulační terapie. Z dalších zajímavých genů, které jsou důležité pro normální hemopoézu a specificky „homing“ kmenových buněk, a které vykazovaly významně sníženou expresi před terapií a byly pozitivně ovlivněné (zvýšení exprese) lenalidomidem jsou 2 geny (*CXCR4* a *CD7*). Oba tyto geny funkčně kooperují. Změněné exprese před a po terapii vykazovaly geny účastnící se progresu buněčného cyklu *CDKN1A/p21*, dráhy p53 a pro-apoptotických procesů.

Závěrem lze konstatovat, že jsme doložili vliv lenalidomidu na změny expresí genů, pravděpodobně hrajících roli v apoptóze, imunitních dějích a hemopoéze a identifikovali vedle již známých další specifické cytokiny a

geny, které se mohou účastnit vzniku a projevů onemocnění, a které by mohli být důležité v odpovědi na léčbu.

Diskuse k A.4

U 5q- syndromu byly popsány role některých miRNA, jejichž geny leží na CDR, což vede k jejich haploinsuficienci. Jde o miR-143, miR-145 a miR-146 (Starczynowski et al., 2010, Kumar et al., 2011). Jejich význam popisujeme výše. U všech těchto miRNA dochází k normalizaci exprese po terapii lenalidomidem (Venner et al., 2013). Vzhledem k tomu, že celá patogeneze onemocnění je samozřejmě komplexnější rozhodli jsme se navázat na práci Dostálové-Merkerové a Votavové a zaměřit se na vliv lenalidomidu na globální expresní miRNA profil u nemocných s 5q- (Votavova et al., 2011, Dostalova et al., 2011). Našli jsme změny řady miRNA, podrobný výpis je v naší publikaci. Stran jednotlivých miRNA při porovnání expresí před a po lenalidomidu jsme našli například významné změny v miR-34, miR-133, které byly výrazně zvýšené před, a klesaly po terapii, a které jsou obě výrazně proapoptotické (Nohata et al., 2012). Pokles hladin miR-34, která je přímým proapoptotickým cílem p53, po terapii lenalidomidem reflektuje, nebo může vysvětlovat pozitivní vliv léku na snížení apoptózy zvláště erytroidních buněk. MiR-133 je tumor supresorická miRNA, je proto otazné, je-li její “downregulace” pro nemocné prospěšná. Dle literárních zdrojů též inhibuje DNA metyltransferázy, což v případě MDS, kde je přítomná aberantní metylace, může hrát též důležitou roli (Chavali et al., 2012). Významně “upregulována” před terapií, a snížená po terapii byla miR-451, která se účastní erytroidní diferenciaci (Bruchova et al., 2007). Analyzovali jsme též relativní hladiny mRNA miRNA, které jsou lokalizované na CDR a kde předpokládáme jejich haploinsuficienci. U většiny až na miR-146 jsme našli sníženou expresi a její zvýšení po terapii. Zajímavým nálezem bylo výrazné zvýšení exprese po terapii některých miRNA, které se shlukují v lokusu 14q32 a u nichž byl popsána důležitá role v hematopoéze (Dixon-McIver et al., 2008, Choong et al., 2007). **V souhrnu lze říci, že naše práce poprvé v literatuře přinesla souhrnnější expresní profil miRNA u nemocných s MDS a 5q- aberací a to v závislosti na terapii lenalidomidem.** Naše výsledky je nutno rozšířit na větší vzorek nemocných, tak aby bylo možno identifikovat specifické vzory změn korelující s odpovědí a přinašející eventuální predikci na odpověď a najít jejich bližší patofyziologický význam.

Diskuse k B.1

Inhibitor DNA metyltransferázy DNMT1 azacitidin je klinicky velice úspěšným lékem (Fenaux et al. 2009, Silveraman et al., 2002, Jonášová et al.,

2013). Mechanismus účinku však není ještě detailně objasněn. Azacitidin je v současné době standardní terapií nemocných s vyšším rizikem dle IPSS. Použití inhibitorů metyltransferáz vychází z dnes již potvrzené domněnky, že se na etiopatogenezi MDS zúčastňují též deregulované epigenetické mechanismy. Obecně platí, že zvláště u nemocných s MDS s vyšším rizikem nacházíme vyšší stupeň metylace. Jak prokázala Jiang et al. aberantní metylace je dokonce častějším úkazem u MDS nemocných než jsou cytogenetické aberace (Jiang et al., 2009). Co je vše ale následkem aberantní metylace ještě není jasné. Hypermetylace vede k utlumení tumor supresorických genů (Jones et Baylin, 2007, Kautiainen et Jones, 1986). Inhibována ale může být řada dalších genů, které se zúčastňují buněčné diferenciaci, apoptózy a proliferace (Hofmann et al., 2006, Christiansen et al., 2003). Na tomto předpokladu byla založena naše práce. Navázali jsme na letité zkušenosti Doc. Stopky z Ústavu patologické fyziologie 1LF UK se studiem jednoho z nejdůležitějších transkripčních faktorů v myeloidní diferenciaci

PU 1. Transkripční faktor PU.1 je klíčovou molekulou řídící proces krvetvorby, zvláště proces myeloidní diferenciaci pluripotentní krevní kmenové buňky (Laslo et al., 2006, Scott et al., 1994, Mueller et al. 2002). Ztráta jeho funkce má za následek různé stupně poruchy diferenciaci prakticky všech krevních buněčných linií. Expresí genu *PU.1* je řízena z několika regulačních oblastí. Mezi nimi zaujímá přední postavení oblast URE (Okuno et al., 2005). Delece či mutace oblasti URE má za následek snížení exprese *PU.1* o 80% a rozvoj akutní myeloidní leukémie (AML) (Rosenbauer et al., 2004, Mueller et al., 2002, Steidel et al., 2007). V mnohočetném myelomu je hladina PU.1 snížena v důsledku aberantní zvýšené metylace DNA v oblastech URE a promotoru (Tatetsu et al., 2007). Bylo prokázáno, že azacitidin je schopen snížit metylaci řady genů pacientů s MDS, přičemž snížení metylace pozitivně koreluje s dobrou klinickou odpovědí na azacitidin a naopak přetrvávání zvýšené metylace těchto genů je spojeno se špatnou prognózou (Tran et al., 2011).

Porucha diferenciaci myeloidní řady je typickým rysem nemocných s pokročilými formami MDS a vede k akumulaci nezralých buněk včetně blastů a následně hrozbě přechodu do akutní leukémie. Roli PU.1 u MDS potvrzují i výsledky této práce. Analýza byla umožněna celkem již velkým souborem nemocných s MDS s vyšším rizikem, léčených azacitidinem na I. interní klinice (Jonášová et al, 2013). Byť exprese *PU.1* v celé skupině vykazovala značnou variabilitu, což nejspíše i dobře reflektuje heterogenitu onemocnění i v rámci jednotlivých IPSS skupin, celkem lze uzavřít, že nízká exprese *PU.1* byla jasně vztažena k agresivnějším formám MDS. Nemocní

s nízkou expresí *PU.1* před zahájením terapie měli výsledně kratší celkové přežívání a byli horšími respondenty na terapii. Expresí *PU.1* má tedy prognostický význam pro nemocné s MDS. Samotná exprese *PU.1* je mimo jiné řízena z regulační oblasti URE (Okuno et al., 2005). V této práci bylo potvrzeno, že tak jako u mnohočetného myelomu je oblast URE hypermetylována a exprese/ hladina *PU.1* v progenitorech nemocných s MDS koreluje s úrovní metylace URE. Na buněčných liniích bylo prokázáno, že azacitidin je schopen hypermetylované úseky URE účinně demetylovat. Terapie azacitidinem pak následně vede k potřebnému zvýšení exprese *PU.1* a k projevům iniciace myeloidní diferenciací. Účinek azacitidinu na expresi *PU.1* a navození myeloidní diferenciací lze dále zesilovat použitím růstových faktorů včetně G-CSF. V návaznosti na výsledky této práce pokračujeme nyní v pokusech na myších modelech, kdy používáme kombinaci azacitidinu s G-SCF a plánujeme klinickou studii s využitím těchto dvou preparátů.

6. Souhrn a závěry práce

Navzdory všem výše uvedeným pokrokům ve znalosti genetických a epigenetických změn a průkazu různých faktorů, účastnících se buněčného cyklu a metabolismu buňky u MDS detailnější patogeneze tohoto heterogenního onemocnění zůstává stále nejasná. K velké pozornosti výzkumu týkajícího se patogeneze MDS přispěly pokroky v terapii. Toto se týká zavedení velice efektivní imunomodulační léčby, která je reprezentována v současné době preparátem lenalidomidem. Druhý typ terapie, která po dlouhých letech mizivých výsledků chemoterapie u vysoce rizikových MDS přispěla k významnému pokroku v léčbě těchto nemocných je epigenetická léčba představovaná demetylačními léky.

Na základě výše uvedených dat a výsledků se domnívám, že nové formy terapie představované imunomodulačními a demetylačními preparáty specificky jako jedny z prvních léčebných modalit ovlivňují molekulární a buněčné charakteristiky nemocných s MDS a zasahují do patogenetických dějů vzniku onemocnění. Mechanismus obou těchto terapií zůstává v mnohém stále neobjasněn. Naše práce proto přináší další zajímavá data napomáhající k rozuzlení spletených patogenetických dějů a eventuálně i mechanismu účinku lenalidomidu a azacitidinu v terapii MDS.

Závěry:

1. Lenalidomid vede k změnám exprese důležitých transkripčních faktorů (EKLF, Fli1) účastnících se diferenciaci společné progenitorové buňky do erytroidní či megakaryocytární řady, především u případů MDS s 5q- aberací. Naše práce potvrzuje funkční antagonismus těchto faktorů. Vedle toho identifikujeme změny dalších faktorů včetně p53, které hrají roli v patogenezi onemocnění a které jsou ovlivněny léčbou lenalidomidem.
2. Prokázali jsme významnou roli CRBN v mechanismu účinku lenalidomidu specificky u nemocných s 5q- aberací. Velmi podobně tedy jako u mnohočetného myelomu se domníváme, že u 5q- syndromu vyšší hladiny CRBN mRNA reflektující vyšší expresi *CRNB* genu, jsou nezbytné k účinku lenalidomidu. Hladiny CRBN mohou sloužit jako biomarker odpovědi na lenalidomid.
3. Analýza expresního genového profilu identifikovala disregulaci specifických patogenetických drah u 5q- syndromu. Doložili jsme vliv lenalidomidu na změny exprese důležitých genů, hrajících roli v apoptóze, imunitních dějích a hemopoéze a identifikovali vedle již známých další specifické cytokiny a geny, které se mohou účastnit vzniku a projevů onemocnění, a které jsou důležité v odpovědi na léčbu.
4. Naše práce poprvé v literatuře přinesla souhrnnější expresní profil miRNA u nemocných s MDS a 5q- aberací a to v závislosti na terapii lenalidomidem.
5. Potvrdili jsme význam hladiny exprese důležitého transkripčního faktoru hemopoézy PU.1 jakožto prognostického faktoru pro přežívání nemocných s MDS s vyšším rizikem. Nemocní s velmi nízkou hladinou jsou též horší respondenti terapie azacitidinem. *PU.1* gen je aberantně exprimován nejspíše jako následek hypermetylace jeho regulační oblasti URE. Azacitidin vede k demetylacii URE. Azacitidin pravděpodobně vede k obnovení diferenciaci myeloidních prekursorů nemocných s MDS, tento účinek může být potencován růstovými faktory myeloidní řady.

Literatura

Aimiwu J, Wang H, Chen P, et al. RNA-dependent inhibition of ribonucleotide reductase is a major pathway for 5-azacytidine activity in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2012 May 31; 119(22): 5229-5238.

- Aul, C.;Bowen, D. T. Yoshida, Y. Pathogenesis, etiology and epidemiology of myelodysplastic syndromes. *Haematologica* 1998, 83(1): 71-86.
- Barlow JL, Drynan LF, Hewett DR, et al. A p53-dependent mechanism underlies macrocytic anemia in a mouse model of human 5q- syndrome. *Nat Med*. 2010, 16: 59–66.
- Bejar R, Stevenson KE, Caughey BA, et al. Validation of a prognostic model and the impact of mutations in patients with lower-risk myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol*. 2012; 30(27): 3376–3382.
- Bejar R, Stevenson K, Ebert BL, et al. Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes. *N Engl J Med*. 2011, 364(26): 2496–2506.
- Belickova M, Cermak J, Jonasova A, et al. Changes associated with lenalidomide treatment in the gene expression profiles of patients with del(5q). *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2012, 12(5): 375-383.
- Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol*. 1982, 51: 189–199.
- Boultonwood J, Fidler C, Wainscoat JS, et al. Narrowing and genomic annotation of the commonly deleted region of the 5q- syndrome. *Blood*. 2002 Jun 15, 99(12): 4638-4641.
- Boultonwood J, Pellagatti A, McKenzie AN, et al. Advances in the 5q- syndrome. *Blood*. 2010, 116: 5803–5811.
- Breccia M, Alimena G. NF- κ B as a potential therapeutic target in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. *Expert Opin Ther Targets* 2010, 14: 1157-1176.
- Brezinova J, Zemanova Z, Jonasova A, Michalova K, et al. Deletion of the long arm but not the 5q31 region of chromosome 5 in myeloid malignancies. *Leuk Res*. 2012;36: 43-45
- Broyl A, Kuiper R, van Duin M, et al. High cereblon expression is associated with better survival in patients with newly diagnosed multiple myeloma treated with thalidomide maintenance. *Blood*. 2013, 121: 624-627.
- Bruchova H, Yoon D, Prchal JT, et al. Regulated expression of microRNAs in normal and polycythemia vera erythropoiesis. *Exp Hematol*. 2007, 35(11): 1657-1667.
- Cazola M, DellaPorta MG, Malcovati L. The genetic basis of myelodysplasia its clinical relevance. *Blood*. 2013 Dec 12, 122(25): 4021-4034.
- Chavali V, Tyagi SC, Mishra PK. MicroRNA-133a regulates DNA methylation in diabetic cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012, 425(3): 668-672.
- Choong ML, Yang HH, McNiece I. MicroRNA expression profiling during human cord blood-derived CD34 cell erythropoiesis. *Exp Hematol*. 2007, 35(4): 551-564.

Christiansen DH, Andersen MK, Pedersen-Bjergaard J. 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*. 2003 Sep, 17(9): 1813-1819.

Corral LG, Haslett PA, Muller GW, et al. Differential cytokine modulation and T cell activation by two distinct classes of thalidomide analogues that are potent inhibitors of TNF-alpha. *J Immunol*. 1999, 163: 380–386.

Curik N, Burda P, Stopka T, et al. 5-azacitidine in aggressive myelodysplastic syndromes regulates chromatin structure at PU.1 gene and cell differentiation capacity. *Leukemia*. 2012 Aug, 26(8): 1804-1811.

Dixon-McIver A, East P, Mein CA et al., Distinctive patterns of microRNA expression associated with karyotype in acute myeloid leukaemia. *PLoS One* 2008, 3(5): 2141.

Doré LC, Crispino JD. Transcription factor in erythroid cell and megakaryocyte development. *Blood* 2011, 118: 231–239.

Dostalova Merkerova M, Krejcik Z, Votavova H, et al. Distinctive microRNA expression profiles in CD34+ bone marrow cells from patients with myelodysplastic syndrome. *Eur J Hum Genet* 2011, 19(3): 313-319.

Dutt S, Narla A, Lin K, et al. Haploinsufficiency for ribosomal protein genes causes selective activation of p53 in human erythroid progenitor cells. *Blood*. 2011, 117: 2567–2576.

Dvorak P, Lysak D, Vokurka S, Jonasova A, Subrt I et al., The translocation t(2;11)(p21;q23) without MLL gene rearrangement-a possible marker of good prognosis in myelodysplastic syndrome patients. *Hematol Oncol*. 2013;16;32(2):82-86

Ebert BL, Pretz J, Golub TR. et al. Identification of RPS14 as a 5q- syndrome gene by RNA interference screen. *Nature*. 2008 Jan 17, 451(7176): 335-339.

Eisbacher M, Holmes ML, Crossley M et al. Protein-protein interaction between Fli-1 and GATA-1 mediates synergistic expression of megakaryocytespecific genes through cooperative DNA binding. *Mol Cell Biol*. 2003, 23: 3427–3441.

Fenaux P, Giagounidis A, Mufti G, Hellström-Lindberg E, et al. MDS-004 Lenalidomide del5q Study Group. A randomized phase 3 study of lenalidomide versus placebo in RBC transfusion-dependent patients with Low-/Intermediate-1-risk myelodysplastic syndromes with del5q. *Blood*. 2011 Oct 6, 118(14): 3765-3776.

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

Figuroa ME, Skrabanek L, Li Y, et al. MDS and secondary AML display unique patterns and abundance of aberrant DNA methylation. *Blood*. 2009, 114(16): 3448–3458.

- Figuroa ME, Wouters BJ, Skrabanek L, et al. Genome-wide epigenetic analysis delineates a biologically distinct immature acute leukemia with myeloid/T-lymphoid features. *Blood*. 2009, 113(12): 2795–2804.
- Fuhrken PG, Chen C, Apostolidis PA, et al. Gene ontology-driven transcriptional analysis of CD34+ cell-initiated megakaryocytic cultures identifies new transcriptional regulators of megakaryopoiesis. *Physiol Genomics* 2008, 33: 159–169.
- Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 1997, 89: 2079–2088 (erratum, *Blood* 1998, 91: 1100).
- Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, et al. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2012 Sep 20, 120(12): 2454–2465.
- Haase D, Germing U, Schanz J, et al. New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: evidence from a core dataset of 2124 patients. *Blood*. 2007, 110: 4385–4395.
- Haferlach T, Nagata Y, Grsmann V, et al. Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 2014 Feb, 28(2): 241–247.
- Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, et al. World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting–Airlie House, Virginia, November 1997. *J Clin Oncol*. 1999, 17: 3835–3849.
- Heintel D, Rocci A, Ludwig H, et al. High expression of cereblon (CRBN) is associated with improved clinical response in patients with multiple myeloma treated with lenalidomide and dexamethasone. *Br J Haematol*. 2013, 161: 748–751.
- Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med*. 2003, 349: 2042–2054.
- Hodge DR, Li D, Qi SM, et al. IL-6 induces expression of the Fli-1 proto-oncogene via STAT3. *Biochem Biophys Res Commun* 2002, 292: 287–291.
- Hofmann WK, Takeuchi S, Takeuchi N, et al. Comparative analysis of hypermethylation of cell cycle control and DNA-mismatch repair genes in low-density and CD34+ bone marrow cells from patients with myelodysplastic syndrome. *Leuk Res*. 2006 Nov, 30(11): 1347–1353.
- Hopfer O, Komor M, Koehler IS, et al. Aberrant promoter methylation in MDS hematopoietic cells during in vitro lineage specific differentiation is differently associated with DNMT isoforms. *Leuk Res*. 2009, 33(3): 434–442.
- Ito T, Ando H, Suzuki T, et al. Identification of a primary target of thalidomide teratogenicity. *Science*. 2010, 327: 1345–1350.
- Itzykson R, Fenaux P. Epigenetics of myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 2014 Mar, 28(3): 497–506.

- Itzykson R, Thépot S, Quesnel B, et al. Groupe Francophone des Myelodysplasies(GFM). Prognostic factors for response and overall survival in 282 patients with higher-risk myelodysplastic syndromes treated with azacitidine. *Blood*. 2011 Jan 13, 117(2): 403-411.
- Jiang Y, Dunbar A, Maciejewski JP, et al. Aberrant DNA methylation is a dominant mechanism in MDS progression to AML. *Blood*. 2009 Feb 5, 113(6): 1315-1325.
- Jonášova A, Neuwirtová R, Cermák J, et al. Cyclosporin A therapy in hypoplastic MDS patients and certain refractory anaemias without hypoplastic bone marrow. *Br J Haematol*. 1998 Feb, 100(2): 304-309.
- Jonasova A, Cermak J, Neuwirtova R, et al. Thrombocytopenia at diagnosis as an important negative prognostic marker in isolated 5q- MDS (IPSS low and intermediate-1). *Leuk Res*. 2012 Dec, 36(12): 222-224.
- Jonášova A, Čermák J, Červínek L, et al. První zkušenosti České MDS skupiny s terapií 5-azacytidinem u nemocných s myelodysplastickým syndromem s vyšším rizikem (IPSS střední 2 a vysoké riziko), akutní myeloidní leukemií do 30 % myeloblastů a chronickou myelomonocytární leukemií II. Jonášová A. a kolektiv, *Tranfuse hematologie dnes*, 2013, 19: 125-133.
- Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer. *Cell*. 2007, 128(4): 683–692.
- Katsoulidis E, Li Y, Yoon P, et al. Role of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in cytokine-mediated hematopoietic suppression in myelodysplastic syndromes. *Cancer Res*. 2005, 65: 9029-9037.
- Kautiainen TL, Jones PA. DNA methyltransferase levels in tumorigenic and nontumorigenic cells in culture. *J Biol Chem*. 1986, 261(4): 1594–1598.
- Kitagawa M, Saito I, Kuwata T, et al. Overexpression of tumor necrosis factor (TNF)-alpha and interferon (IFN)-gamma by bone marrow cells from patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 1997, 11: 2049-2054.
- Kornblau SM, McCue D, Singh N, et al. Recurrent expression signatures of cytokines and chemokines are present and are independently prognostic in acute myelogenous leukemia and myelodysplasia. *Blood*. 2010, 116: 4251-4261.
- Kulasekararaj AG, Smith AE, Mufti GJ, et al., TP53 mutations in myelodysplastic syndrome are strongly correlated with aberrations of chromosom 5, and correlate with adverse prognosis. *Br J Haematol*. 2013, 160: 660-672.
- Kulasekararaj AG, Mohamedali AM, Mufti GJ. Recent advances in understanding the molecular pathogenesis of myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol*. 2013 Sep, 162(5): 587-605.
- Kumar MS, Narla A, Ebert BL, et al. Coordinate loss of a microRNA and protein-coding gene cooperate in the pathogenesis of 5q- syndrome. *Blood*. 2011 Oct 27, 118(17): 4666-4673.

- Laslo P, Laslo P, Spooner CJ, et al. Multilineage transcriptional priming and determination of alternate hematopoietic cell fates. *Cell*. 2006, 126: 755-766.
- List A, Dewald G, Bennett J, Giagounidis A, Raza A, et al. Myelodysplastic Syndrome-003 Study Investigators. Lenalidomide in the myelodysplastic syndrome with chromosome 5q deletion. *N Engl J Med*. 2006 Oct 5, 355(14): 1456-1465.
- Lopez-Girona A, Mendy D, Ito T, et al. Cereblon is a direct protein target for immunomodulatory and antiproliferative activities of lenalidomide and pomalidomide. *Leukemia*. 2012, 26: 2326-2335.
- Mallo M, Cervera J, Schanz J et al. Impact of adjunct cytogenetic abnormalities for prognostic stratification in patients with myelodysplastic syndrome and deletion 5q. *Leukemia*. 2011, 25: 110-120.
- Molldrem JJ, Jiang YZ, Barrett AJ, et al. Haematological response of patients with myelodysplastic syndrome to antithymocyte globulin is associated with a loss of lymphocyte-mediated inhibition of CFU-GM and alterations in T-cell receptor Vbeta profiles. *Br J Haematol*. 1998 Sep, 102(5): 1314-1322.
- Mueller B U, Pabst T, Osato M at al. Heterozygous PU.1 mutations are associated with acute myeloid leukemia. *Blood* 2002, 100: 998-1007.
- Mundle SD, Ali A, Raza A et al. Evidence for involvement of tumor necrosis factor-alpha in apoptotic death of bone marrow cells in myelodysplastic syndromes. *Am J Hematol*. 1999 Jan, 60(1): 36-47.
- Narla A, Ebert BL. Ribosomopathies: human disorders of ribosome dysfunction. *Blood*. 2010, 115: 3196-3205.
- Neuwirtová R, Jonášová A, Čermák J et al. Analýza nemocných s myelodysplastickým syndromem s delecí dlouhého ramene 5. chromosomu sledovacích Českou MDS pracovní skupinou. Význam pro diagnostické zařazení a určení prognózy. *Transfuze a hematologie dnes* 2009;15:204-20
- Neuwirtova R, Fuchs O, Vostry M, Jonasova A et al. Transcription factors Fli1 and EKLF in the differentiation of megakaryocytic and erythroid progenitor in 5q- syndrome and in Diamond-Blackfan anemia. *Ann Hematol*. 2013 Jan, 92(1): 11-18.
- Nohata N, Hanazawa T, Enokida H, Seki N. microRNA-1/133a and microRNA-206/133b clusters: dysregulation and functional roles in human cancers. *Oncotarget* 2012, 3(1): 9-21.
- Okuno Y, Huang G, Rosenbauer F, et al. Potential autoregulation of transcription factor PU.1 by an upstream regulatory element. *Mol Cell Biol*. 2005, 25: 2832-2845.
- Padua RA, Guinn BA, Al-Sabah AI, et al. RAS, FMS and p53 mutations and poor clinical outcome in myelodysplasias: a 10-year follow-up. *Leukemia*. 1998 Jun, 12(6): 887-892
- Papaemmanuil E, Gerstung M, Malcovati L, et al. Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2013 Sep 12, (122): 3616-3627.

- Pedersen-Bjergaard, J.; Andersen, M. K.; Christiansen, D. H.; Nerlov, C. Genetic pathways in therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia. *Blood*. 2002, 99(6): 1909-1912.
- Pellagatti A, Marafioti T, Paterson JC, et al. Induction of p53 and up-regulation of the p53 pathway in the human 5q- syndrome. *Blood*. 2010, 115: 2721–2723.
- Pellagatti A, Cazzola M, Giagounidis A, et al. Deregulated gene expression pathways in myelodysplastic syndrome hematopoietic stem cells. *Leukemia*. 2010, 24: 756-764.
- Ramsay AG, Clear AJ, Fatah R, Gribben JG. Multiple inhibitory ligands induce impaired T cell immunological synapse function in chronic lymphocytic leukemia that can be blocked with lenalidomide. *Blood*. 2012, 120(7): 1412–1421.
- Raza A, Reeves JA, List AF, et al. Phase 2 study of lenalidomide in transfusion-dependent, low-risk, and intermediate-1 risk myelodysplastic syndromes with karyotypes other than deletion 5q. *Blood*. 2008 Jan 1, 111(1): 86-93.
- del Rey M, O'Hagan K, Dellett M, et al. Genome-wide profiling of methylation identifies novel targets with aberrant hypermethylation and reduced expression in low-risk myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 2013 Mar, 27(3): 610-618.
- Rosenbauer F, Wagner K, Kutok J L et al. Acute myeloid leukemia induced by graded reduction of a lineage-specific transcription factor, PU.1. *Nat Genet*. 2004, 36: 624-630.
- Rothman, N. Haas, R. Hayes, R. B et al. Benzene induces gene-duplicating but not gene-inactivating mutations at the glycophorin A locus in exposed humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995, 92(9): 4069-4073.
- Rusten LS, Jacobsen SE. Tumor necrosis factor (TNF) directly inhibits human erythropoiesis in vitro: role of p55 and p75 TNF receptors. *Blood*. 1995, 85: 989-996.
- Sawanobori M, Yamaguchi S, Hasegawa M, et al. Expression of TNF receptors and related signaling molecules in the bone marrow from patients with myelodysplastic syndromes. *Leuk Res*. 2003 Jul, 27(7): 583-591.
- Schanz J, Tüchler H, Solé F, et al. New comprehensive cytogenetic scoring system for primary myelodysplastic syndromes (MDS) and oligoblastic acute myeloid leukemia after MDS derived from an international database merge. *J Clin Oncol*. 2012 Mar 10, 30(8): 820-829.
- Schuster SR, Kortuem MK, Yhu XY, et al. The clinical significance of cereblon expression in multiple myeloma. *Leuk Res*. 2014, 38(1): 23-28.
- Scott E W, Simon M C, Anastasi J, and Singh H. Requirement of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineages. *Science*. 1994, 265: 1573-1577.
- Sekeres MA., Myciejewski JP, Giagounidis AA, et al., Relationship of treatment-retated cytopenias and response to lenalidomide in patients with lower-risk myelodysplastic syndromes. *J. Clin Oncol*. 2008, Dec 20, 26(36): 5943-5949.

- Shin DY, Park YS, Yang K, et al. Decitabine, a DNA methyltransferase inhibitor, induces apoptosis in human leukemia cells through intracellular reactive oxygen species generation. *Int J Oncol.* 2012 Sep, 41(3): 910-918.
- Silverman LR, Demakos EP, Peterson BL, et al. Randomized controlled trial of azacitidine in patients with the myelodysplastic syndrome: a study of the cancer and leukemia group B. *J Clin Oncol.* 2002, May 15, 20(10): 2429-2440.
- Sokol L., List A. Immunomodulatory therapy for myelodysplastic syndromes. *Int J Hematol.* 2007, 86: 301-305.
- Starck J, Doubeikovski A, Sarrazin S, et al. Spi-1/PU.1 is a positive regulator of the Fli-1 gene involved in inhibition of erythroid differentiation Friend erythroleukemic cell lines. *Mol Cell Biol.* 1999, 19: 121-135.
- Starczynowski DT, Kuchenbauer F, Karsan A, et al. Identification of miR-145 and miR-146a as mediators of the 5q- syndrome phenotype. *Nat Med.* 2010 Jan, 16(1): 49-58.
- Steidl U, Steidl C, Tenen D G et al. A distal single nucleotide polymorphism alters long-range regulation of the PU.1 gene in acute myeloid leukemia. *J Clin Invest.* 2007, 117: 2611-2620.
- Tatetsu H, Ueno S, Hata H et al. Down-regulation of PU.1 by methylation of distal regulatory elements and the promoter is required for myeloma cell growth. *Cancer Res.* 2007, 67: 5328-5336.
- Tran H T, Kim H N, Lee I, et al. DNA methylation changes following 5-azacitidine treatment in patients with myelodysplastic syndrome. *Oncology & Hematology* 2011, 26: 207-213.
- Truong AH, Cervi D, Lee J, Ben-David Y. Direct transcriptional regulation of MDM2 by Fli-1. *Oncogene.* 2005 Feb 3, 24(6): 962-969.
- Van den Berghe H. The 5q- syndrome. *Scand J Haematol Suppl.* 1986, 45: 78-81.
- Vasikova A, Belickova M, Budinska E, Cermak J. A distinct expression of various gene subsets in CD34+ cells from patients with early and advanced myelodysplastic syndrome. *Leuk Res.* 2010 Dec, 34(12): 1566-1572.
- Venner CP, Woltosz JW, Karsan A, et al. Correlation of clinical response and response duration with miR-145 induction by lenalidomide in CD34(+) cells from patients with del(5q) myelodysplastic syndrome. *Haematologica.* 2013, 98(3): 409-413.
- Votavova H, Grmanova M, Dostalova Merkerova M, et al. Differential expression of microRNAs in CD34+ cells of 5q- syndrome. *J Hematol Oncol.* 2011, 4:1-8722-4-1.
- Will B, Zhou L, Vogler TO, et al. Stem and progenitor cells in myelodysplastic syndromes show aberrant stage-specific expansion and harbor genetic and epigenetic alterations. *Blood.* 2012 Sep 6, 120(10): 2076-2086.

Wei S, Chen X, Rocha K, et al. A critical role for phosphatase haplodeficiency in the selective suppression of deletion 5q MDS by lenalidomide. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009, 106: 12974–12979.

Wei S, Chen X, McGraw K, et al. Lenalidomide promotes p53 degradation by inhibiting MDM2 auto-ubiquitination in myelodysplastic syndrome with chromosome 5q deletion. *Oncogene*. 2012, 32(9):1110–1120. (doi: 10.1038/onc.2012.139).

Ximeri M, Galanopoulos A, Klaus M, et al. Effect of lenalidomide therapy on hematopoiesis of patients with myelodysplastic syndrome associated with chromosome 5q deletion. *Haematologica*. 2010 Mar, 95(3): 406-414.

Zemanova Z, Michalova K, Jonasova A, Cermak J et al.. Involvement of deleted chromosome 5 in complex chromosomal aberrations in newly diagnosed myelodysplastic syndromes (MDS) is correlated with extremely adverse prognosis. *Leuk Res*. 2014 May;38(5):537-44

Zhu YX, Kortuem KM, Stewart AK. Molecular mechanism of action of immune –modulatory drugs thalidomide, lenalidomide and pomalidomide in multiple myeloma. *Leuk. Lymphoma* 2013, 54: 683-687.

Seznam publikací autora

Publikované práce související s disertační prací s IF:

Neuwirtova R, Fuchs O, Holicka M, Vostry M, Kostecka A, Hajkova H, **Jonasova A**, Cermak J, Cmejla R, Pospisilova D, Belickova M, Siskova M, Hochova I, Vondrakova J, Sponerova D, Kadlckova E, Novakova L, Brezinova J, Michalova K. Transcription factors Fli1 and EKLF in the differentiation of megakaryocytic and erythroid progenitor in 5q- syndrome and in Diamond-Blackfan anemia. *Ann Hematol*. 2013; 92:11-18 **IF: 2,86**

Belickova M, Cermak J, Dostalova Merkerova M, Vesela J, Krejcik Z, Cechova E, Zemanova Z, Michalova K, Votavova H, Caniga M, Neuwirtova R, **Jonasova A**. Changes associated with lenalidomide treatment in the gene expression profiles of patients with del(5q). *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2012;12:375-383 **IF: 1,66**

Curik N, Burda P, Vargova K, Pospisil V, Belickova M, Vlckova P, Savvulidi F, Necas E, Hajkova H, Haskovec C, Cermak J, Krivjanska M, Trneny M, Laslo P, **Jonasova A** and Stopka T 5-azacitidine in aggressive

myelodysplastic syndromes regulates chromatin structure at PU.1 gene and cell differentiation capacity. *Leukemia*. 2012;26:1804-1811. **IF: 8,99**

Jonášova A, Neuwirtová R, Cermák J, Vozobulová V, Mociková K, Sisková M, Hochová I. Cyclosporin A therapy in hypoplastic MDS patients and certain refractory anaemias without hypoplastic bone marrow. *Br J Haematol*. 1998;100:304-309. **IF: 4,9**

Jonasova A, Cermak J, Vondrakova J, Siskova M, Hochova I, Kadlckova E, Cerna O, Sykora M, Vozobulova V, Seifertova N, Michalova K, Zemanova Z, Brezinova J, Belohlavkova P, Kostecka A, Neuwirtova R. Thrombocytopenia at diagnosis as an important negative prognostic marker in isolated 5q- MDS (IPSS low and intermediate-1). *Leuk Res*. 2012;36:222-224. **IF: 2,58** (Nejde o in extenso práci, ale souvisí s tématem disertace)

Práce související s disertační prací, odeslané k publikaci, nyní v recenzním řízení v časopisech s IF :

Jonášová A, Bokorová R, Polak J, Vostrý M, Kostečka A, Hájková H, Neuwirtová R, Siskova M, Sponerova D, Cermak J, Mikulenkova D, Cervinek L, Brezinova J, Michalova K, Fuchs O. High level of full length celebron mRNA in lower risk myelodysplastic syndromes with isolated 5q deletion is connected with the efficacy of lenalidomide.

European Journal of Hematology – 9/2014 **přijato k publikaci**

Michaela Dostalova Merkerova and Zdenek Krejcik, Monika Belickova, Andrea Mrhalkova, Jiri Klema, Eliška Stara, Zuzana Zemanova, Kyra Michalova, Jaroslav Cermak, **Anna Jonasova**. Microarray-based miRNA expression profiling in patients with myelodysplastic syndrome with deletion of chromosome 5q treated with lenalidomide

V recenzním řízení *European Journal of Hematology*

Práce související s disertační prací bez IF:

Jonášová A a kolektiv. První zkušenosti České MDS skupiny s terapií 5-azacytidinem u nemocných s myelodysplastickým syndromem s vyšším rizikem (IPSS střední 2 a vysoké riziko), akutní myeloidní leukémií do 30% myeloblastů a chronickou monocytární leukémií II. *Transfúze a Hematologie dnes* 2013;19:125-133.

Práce, které úzce navazují na disertační práci s IF:

Dluhosova M, Curik N, Vargova J, **Jonasova A**, Zikmund T, Stopka T. Epigenetic Control of SP11 Gene by CTCF and ISWI ATPase SMARCA5, *PLoS One*. 2014;9(2):e87448 **IF: 3,73**

Pospisil V, Vargova K, Kokavec J, Rybarova J, Savvulidi F, **Jonasova A**, Necas E, Zavadil J, Laslo P, Stopka T. Epigenetic silencing of the oncogenic miR-17-92 cluster during PU.1-directed macrophage differentiation. *EMBO J*. 2011;30:4450-4464. **IF: 9,8**

Zemanova Z, Michalova K, Buryova H, Brezinova J, Kostylkova K, Bystricka D, Novakova M, Sarova I, Izakova S, Lizcova L, Ransdorfova S, Krejcik Z, Merkerova MD, Dohnalova A, Siskova M, **Jonasova A**, Neuwirtova R, Cermak J. Involvement of deleted chromosome 5 in complex chromosomal aberrations in newly diagnosed myelodysplastic syndromes (MDS) is correlated with extremely adverse prognosis. *Leuk Res*. 2014 Feb 3. **IF: 2,7**

Brezinova J, Zemanova Z, Bystricka D, Sarova I, Lizcova L, Malinova E, Izakova S, Sajdova J, Sponerova D, **Jonasova A**, Cermak J, Michalova K. Deletion of the long arm but not the 5q31 region of chromosome 5 in myeloid malignancies. *Leuk Res*. 2012;36: 43-45. **IF: 2,58**

Bystricka D, Sarova I, Zemanova Z, Brezinova J, Lizcova L, Izakova S, Dostalova Merkerova M, Krejcik Z, Siskova M, **Jonasova A**, Neuwirtova R, Cerna O, Cermak J, Michalova K. Recurrent chromosomal breakpoints in patients with myelodysplastic syndromes and complex karyotype versus fragile sites. *Leuk Res*. 2012;36:125-127. **IF: 2,58**

Dvorak P, Lysak D, Vokurka S, Michalova K, Sarova I, **Jonasova A**, Hruha M, Rykovska A, Subrt I. The translocation t(2;11)(p21;q23) without MLL gene rearrangement-a possible marker of good prognosis in myelodysplastic syndrome patients. *Hematol Oncol*. 2013;16 **IF: 2,01**

Cukrová V, Neuwirtová R, Dolezalová L, Belická M, Bartůnková J, **Jonášová A**, Cermák J, Homolková H, Malíková I. Defective cytotoxicity of T lymphocytes in myelodysplastic syndrome. *Exp Hematol*. 2009;37:386-39

Belickova M, Merkerova MD, Stara E, Vesela J, Sponerova D, Mikulenkova D, Brdicka R, Neuwirtova R, **Jonasova A**, Cermak J. DNA repair gene variants are associated with an increased risk of myelodysplastic syndromes in a Czech population. *J Hematol Oncol.* 2013;22:6-9

Práce, které úzce navazují na disertační práci v časopisech bez IF:

Jonášová A. Myelodysplastické syndromy – pokroky v terapii v posledních dvou desetiletích. *Vnitr Lek.* 2013;59:635-640.

Neuwirtová R, **Jonášová A**, Čermák J et al. Analýza nemocných s myelodysplastickým syndromem s delecí dlouhého ramene 5. chromosomu sledovancých Českou MDS pracovní skupinou. Význam pro diagnostické zařazení a určení prognózy. *Transfuze a hematologie dnes* 2009;15:204-20

Jonášová A Myelodysplastický syndrom. *Postgraduální medicína* 2013;15:498-504

Stopka T, **Jonášová A.** Poznámky k patofyziologii myelodysplastického syndromu, demetylační terapii a roli cytokiny-indukované diferenciaci. *Myelodysplastic syndrome News*, 2013;1(2):10-13

Jonášová A. Imunomodulační terapie–lenalidomid v léčbě myelodysplastického syndromu níže rizikových skupin s delecí dlouhého raménka 5. chromosomu. *Farmakoterapie* 2013;9:460-463

Jonášová A. Imunomodulační terapie (úspěch lenalidomidu) *Myelodysplastic syndrome News*, 2013;1(1):6-10

Jonášová A. TP53 mutace u myelodysplastického syndromu je významně korelována s delecí dlouhého raménka 5. chromosomu (5q-) a má většinou negativní prognostický význam (význam vyšetření TP53 v éře lenalidomidu.). *Myelodysplastic syndrome News*, 2013;1(2):4-6.