

**Univerzita Karlova v Praze**

**1. lékařská fakulta**

studijní program: Biomedicína

studijní obor: Fyziologie a patofyziologie člověka



**MUDr. Anna Jonášová**

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

**PATHOPHYSIOLOGIC ASPECTS OF MYELOYDYSPLASTIC SYNDROMES  
IN RELATION TO THE EFFECT OF  
TARGETED IMUNOMODULATION AND DEMETHYLATION THERAPY**

Dizertační práce

Školitel Doc. MUDr. Tomáš Stopka, Ph.D.

**Praha 2014**

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem dizertační práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Všechny vědecké výsledky použité v této práci byly publikovány ve vědecko-medicínských periodících a je nutné podotknout, že vždy jsou výsledkem práce kolektivu autorů. V této disertační práci prezentuji pouze ty výsledky, které jsem iniciovala a na nichž jsem se podílela významnou měrou a jež by nebyly bez mého přínosu realizovatelné. Současně prohlašuji, že tato 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, 02.08.2013

MUDr. Anna Jonášová

**Identifikační záznam:**

JONÁŠOVÁ, Anna. *Patofyziologické aspekty myelodysplastického syndromu ve vztahu k efektu cílené imunomodulační a demetylační terapie.*[PATHOPHYSIOLOGIC ASPECTS OF MYELOYDYSPLASTIC SYNDROMES IN RELATION TO THE EFFECT OF TARGETED IMMUNOMODULATION AND DEMETHYLATION THERAPY]. Praha, 2014, 84 s., 2 přílohy, Dizertační práce (Ph.D.), Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, 1. Interní klinika. Školitel: Doc. MUDr. Tomáš Stopka, Ph.D.

## **Poděkování:**

**Tato práce je věnována mé matce Doc. MUDr. Radaně Neuwirtové, CSc.**

Děkuji svému školiteli, Doc. MUDr. Tomáši Stopkovi, Ph.D. za pomoc s formulováním cílů a hypotéz práce, a za veškerou podporu, inspirativní diskusi a spolupráci, které se mi od něj po celou dobu doktorského studia dostávalo.

Ráda bych velice poděkovala přednostovi I. interní kliniky Všeobecné fakultní nemocnice a 1. lékařské fakulty UK v Praze Prof. MUDr. Marku Trněnému, CSc. za jeho trvalou podporu, cenné rady a zájem o moji práci.

Dále velice děkuji všem kolegům a kolegyním především z Ústavu hematologie a krevní transfuze a Ústavu patologické fyziologie 1. lékařské fakulty za podstatnou spolupráci na této disertaci, formulování úkolů, práci na laboratorní části disertace a stimulující vědeckou diskusi. Jmenovitě bych ráda poděkovala: Mgr. Monice Belíčkové, Ing. Otě Fuchsovi CSc., Ing. Zdeňku Krejčíkovi Ph.D., Ing. Michaele Dostálové Merkerové Ph.D., Mgr. Nikolovi Čuříkovi Ph.D.

V neposlední řadě moje velké díky a omluva patří mému muži a mým 3 dětem. Poděkování za jejich trpělivost, podporu a schovívavost a omluva za čas, který jsem jim nevěnovala.

*Disertační práce byla vytvořena za podpory následujících projektů:*

*IGA MZ NT/14174-3/2013 z Ministerstva zdravotnictví ČR*

*IGA MZ NT/13836-4/2012 z Ministerstva zdravotnictví ČR*

*PRVOUK-P24/LF1/3, PRVOUK-P27/LF1/1 z University Karlovy V Praze*

<b>Obsah</b>	<b>Stránka</b>
<b>Prohlášení</b>	<b>2</b>
<b>Identifikační záznam</b>	<b>3</b>
<b>Poděkování</b>	<b>4</b>
<b>Obsah</b>	<b>5</b>
<b>Seznam použitých zkratk</b>	<b>7</b>
<b>Abstrakt: česká verze</b>	<b>9</b>
<b>Abstrakt: anglická verze</b>	<b>11</b>
<b>1. Úvod</b>	<b>13</b>
<b>1.1. Všeobecný úvod k myelodysplastickému syndromu</b>	<b>13</b>
<b>1.1.1 Incidence</b>	<b>13</b>
<b>1.1.2 Klasifikace</b>	<b>13</b>
<b>1.1.3 Základní charakteristiky onemocnění</b>	<b>15</b>
<b>1.1.4 Etiologie</b>	<b>16</b>
<b>1.1.5 Patogeneze</b>	<b>16</b>
<b>1.1.6 Obecné poznámky k terapii</b>	<b>19</b>
<b>1.2. Podrobný úvod k problematice patogeneze 5q- MDS, současné představy mechanismu imunomodulační terapie, klinická data</b>	<b>21</b>
<b>1.3. Podrobný úvod k problematice významu epigenetických změn u MDS a k zavedení epigenetické/demetylační terapie</b>	<b>24</b>
<b>2. Hypotéza</b>	<b>30</b>
<b>2.A. Imunomodulační terapie - vztah k patogenezi</b>	<b>30</b>
<b>2.B. Epigenetická, demetylační terapie - vztah k potogenezi</b>	<b>30</b>
<b>3. Cíle práce</b>	<b>31</b>
<b>4. Metody a výsledky</b>	<b>33</b>
<b>4.1. Klinický soubor</b>	<b>33</b>
<b>4.2. Metody a výsledky jednotlivých studií</b>	<b>35</b>
<b>4.2.A Studie k tématu imunomodulační terapie - vztah k patogenezi</b>	<b>35</b>
<b>A1. Analýza exprese genů transkripčních faktorů FLi 1 a EKLf (Friend leukemia virus integration 1 a erythroid Krüppel-like factor) a dalších transkripčních faktorů u nemocných s 5q- aberací a jejich změny při terapii lenalidomidem.</b>	<b>35</b>

<b>A.2. Analýza exprese cereblonu (CRBN) u níže rizikových nemocných s MDS s 5q- a vztah exprese cereblonu k efektu lenalidomidu</b>	<b>41</b>
<b>A.3. Změny exprese genů v průběhu léčby lenalidomidem, expresní genový profil před terapií a v době odpovědi</b>	<b>44</b>
<b>A.4. Expresní profil miRNA u nemocných s myelodysplastickým syndromem a 5q- aberací léčených lenalidomidem</b>	<b>47</b>
<b>Imunosupresivní terapie, vztah k imunomodulačním lékům</b>	<b>49</b>
<b>4.2.B. Epigenetická terapie - vztah k patogenezi onemocnění</b>	<b>50</b>
<b>B.1. Analýza dat nemocných léčených na I. interní klinice ve vztahu k změnám transkripčního faktoru PU.1</b>	<b>50</b>
<b>5. Diskuse</b>	<b>55</b>
<b>6. Souhrn a závěry</b>	<b>65</b>
<b>Literatura</b>	<b>67</b>
<b>Publikace autora k tématu disertace</b>	<b>82</b>
<b>Příloha 1</b>	
<b>Příloha 2</b>	

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK:

AML	Akutní myeloidní leukémie
AMPK	5' - adenosine monofosfát-aktivovanou protein kinázu
ASH	American society of hematology
ATG	Antithymocytární globulin
AZA	5-azacytidin
BMT	Transplantace kostní dřeně
CDR	Společná deletovaná oblast
CRBN	Cereblon
CMML	Chronická myelomonocytární leukémie
CR	Kompletní odpověď (remise)
CRi	Kompletní odpověď (ne ve všech parametrech)
CUL4A	Cullin -4A
CYA	Cyklosporin A
DBA	Diamond-Blackfan anemie
DDB1	Damage DNA binding protein
DMT	DNA metyltransferáza
DNMT1	DNA metyltransferáza 1
EKLF	Erythroid Krüppel-like factor
FAB	Francouzsko-americko-britský systém
FACS	Fluorescenčně-aktivované třídění buněk
Fli-1	Friend leukemia virus integration 1
G-CSF	Faktor stimulující růst granulocytárních kolonií
GM-CSF	Faktor stimulující růst gran. a makr. kolonií
HI	Hematologické zlepšení
IL2	Interleukin 2
IL6	Interleukin 6
IPSS	Mezinárodní skórovací systém prognózy (MDS)
M-CSF	Makrofágy stimulující faktor
MDM2/HDM2	Human homolog of murine double minute (ubiquitin ligáza)
MdmX	Murine double minute X-jinak též MDM4

MDS	Myelodysplastický syndrom
miRNA	mikro RNA
mTOR	Mammalian target of rapamycin
RPS14	Ribosomální protein malé podjednotky
NK	Přirození zabíječi
OS	Celkové přežití (Overall Survival)
PBSC	Periferní kmenové buňky
PCR	Polymerázová řetězová reakce
qPCR	Kvantitativní polymerázová řetězová reakce
PR	Částečná odpověď (remise)
RA	Refrakterní anemie
RAEB	Refrakterní anémie s nadbytkem blastů
RARS	Refrakterní anemie s prstenčitými sideroblasty
RCMD	Refrakterní anemie s multilineární dysplasií
R-IPSS	Revidovaný mezinárodní skórovací systém
ROC1	Cullin-1 regulator
TGF beta	Transforming growth factor beta
TIRAP	Toll-interleukin-1 receptor domain containing adaptor protein
TNF alfa	Tumor necrosis factor alfa
TRAF-6	TNF receptor-associated factor-6
URE	Upstream regulatory element (5'-reg. oblast)
WHO	Světová zdravotnická organizace
WPSS	Bodovací systém prognózy na bázi WHO-klasif.



## Abstrakt

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

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). Jde o jedno z nejčastějších hematologických závažných onemocnění u nemocných starších 60 let. Jeho incidence stále stoupá. Terapie myelodysplastického syndromu je dosud relativně svízelná. Mimo transplantaci periferních kmenových buněk není v současné době k dispozici léčba vedoucí ke kompletní dlouhodobé remisi onemocnění. Transplantace ale pro většinou vyšší věk nemocných může být nabídnuta jen velmi malému procentu nemocných. Proto hledání nových terapeutických možností je zásadní. Do recentního zavedení dvou nových terapeutických modalit byla situace v léčbě nemocných s myelodysplastickým syndromem frustrující. Nové terapeutické přístupy jsou představovány imunomodulační léčbou representovanou preparátem lenalidomidem a epigenetickou terapií neboli demetylační léčbou representovanou preparátem 5- azacitidinem (azacitidin). Oba tyto nové léky mají významně vyšší efekt než dosud používaná léčba. Mechanismus jejich účinku však není ještě zcela objasněn. Proto jsem se rozhodla při zavádění této léčby u nás iniciovat 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. Dále jsme analyzovali expresní genové profily a změny některých mikroRNA před a v průběhu terapie. Identifikovali jsme tak možné hráče v patogenezi onemocnění a citlivosti na léčbu. Potvrdili jsme kruciální roli cereblonu v citlivosti pacientů s MDS s delecí dlouhého raménka 5. chromosomu na lenalidomid. U epigenetické terapie jsme nejdříve analyzovali odpověď na terapii na větším souboru nemocných. Sledovali jsme vliv azacitidinu na expresi stěžejního diferenciačního faktoru myeloidní řady PU.1. Zjistili jsme, že *PU.1* patří mezi geny, jehož exprese je u významné části pacientů s MDS s vyšším rizikem potlačena pravděpodobně vlivem metylace DNA v jeho regulační oblasti URE. Hladina PU.1 v progenitorech pacientů s MDS významně souvisí

s odpovědí těchto pacientů na léčbu azacitidinem. Azacitidin je schopen demetylovat DNA v oblasti URE. Tyto procesy 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

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

Myelodysplastic syndromes (MDS) 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). MDS belongs to one of the most common hematological diseases in patients over 60 years old. MDS incidence is still increasing. 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. First we analyze clinical data from high risk MDS patients treated by azacitidine in our department and Czech Republic. 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 azacitidine 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. Obecný úvod k myelodysplastickému syndromu

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). MDS, zvláště v raných fázích je vlastně premaligním (preleukemickým) onemocněním.

### 1.1.1. Incidence

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.

### 1.1.2. 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. První FAB (French, American, British) klasifikace byla vytvořena skupinou odborníků v roce 1982 a dala vznik dnešní moderní podobě dělení MDS (Bennett et al., 1982). S vývojem znalostí a kumulací dat o tomto onemocnění vznikaly novější systémy WHO (World Health Organization) klasifikace 1999 a 2008 dělící onemocnění do více podskupin (Harris et al., 1999, Vardiman et al., 2009). Základní rozlišení obou klasifikací ukazuje Tabulka 1. Jednotlivé podskupiny se liší svojí klinikou, prognózou, celkovým přežíváním a četností transformací do AML.

#### Tabulka 1. Srovnání klasifikačních systémů MDS – FAB a WHO

s uvedením názvů podskupin onemocnění a definujícím procentem blastů v kostní dřeni (Bennett et al., 1982, Harris et al., 1999) (z Čermák et Jonášová 2010)

FAB klasifikace	WHO klasifikace
Refrakterní anémie (RA) < 5 % blastů	Refrakterní anémie (RA) Refrakterní cytopenie s multilineární dysplazií (RCMD) MDS-neklasifikovatelný (MDS-U) MDS s izolovanou del(5q)
Refrakterní anémie s prsténčitými sideroblasty (RARS) < 5 % blastů + > 15 % prsténčitých sideroblastů	Refrakterní anémie s prsténčitými sideroblasty (RARS) Refrakterní cytopenie s multilineární dysplazií a prsténčitými sideroblasty (RCMD-RS)
Refrakterní anémie s nadbytkem blastů (RAEB) 5–20 % blastů	Refrakterní anémie s nadbytkem blastů I. (RAEB I.) 5–9 % blastů Refrakterní anémie s nadbytkem blastů II. (RAEB II.) 10–19 % blastů
RAEB v transformaci (RAEB-t) 21–30 % blastů	Akutní myeloidní leukemie (AML) > 20 % blastů

Vedle klasických forem MDS se ale relativně často setkáváme s nemocnými obtížně zařaditelnými do jednotlivých podskupin, kteří mají například rysy myeloproliferativního onemocnění, nebo naopak jako je tomu u hypoplastického MDS charakter spíše aplastické anemie. Tito nemocní patří mezi „overlap“ syndromy poprvé popsané R. Neuwirtovou (Neuwirtova et al 1996).

Co se týče rizika progresu a přežívání, je onemocnění stratifikováno do několika skupin podle IPSS (International Prognostic Scoring System) (tabulka 2 a 3) (Greenberg et al., 1997)

**Tab. 2. Mezinárodní bodovací systém pro hodnocení prognózy MDS (IPSS) s uvedením kategorií MDS dle hodnoty „rizikového skóre“, jejich mediány přežití a mediány transformace onemocnění do AML (z Čermák et Jonášová 2010)**

riziko	skóre	medián přežití roky	AML transformace roky
nízké	0	5,7	9,4
střední I	0,5–1,0	3,5	3,3
střední II	1,5–2,0	1,2	1,1
vysoké	≥ 2,5	0,4	0,2

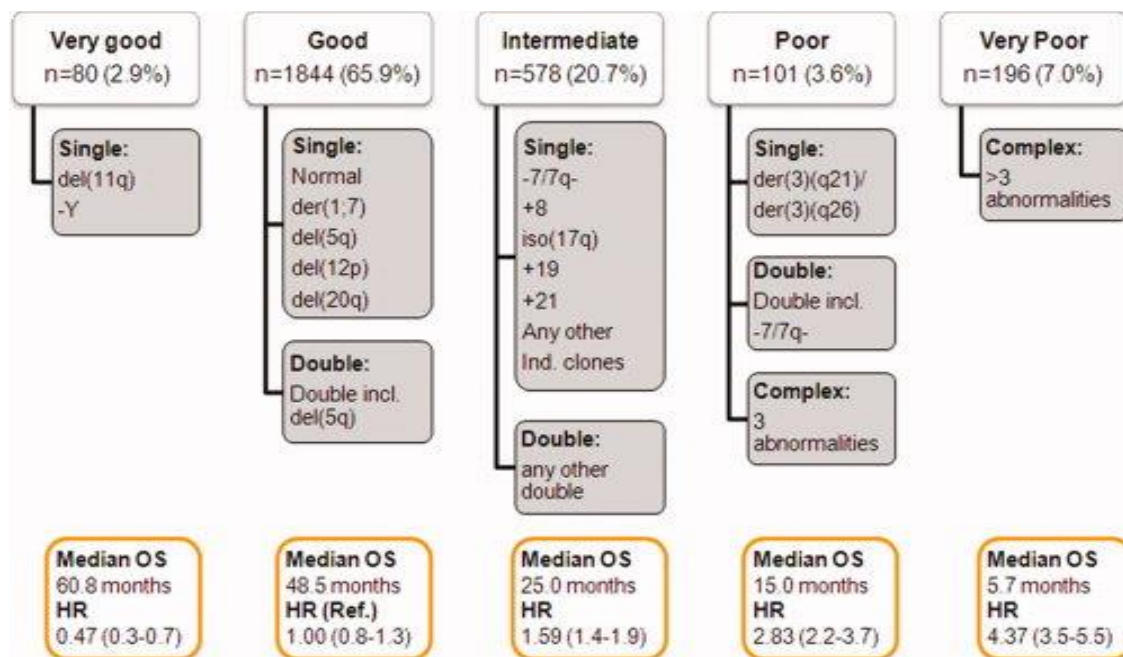
**Tab. 3. Mezinárodní bodovací systém pro hodnocení prognózy MDS (IPSS) s uvedením způsobu bodování prognostických faktorů „rizika“ na základě procenta blastů v kostní dřeni pacientů, počtu cytopenií zasahujících jednotlivé krevní řady a cytogenetického nálezu. Za příznivý karyotyp se považuje delece dlouhých ramének chromosomu 5, delece dlouhých ramének chromosomu 20 a nepřítomnost abnormalit za současné nepřítomnosti chromozómu Y. Za nepříznivý karyotyp se považuje současná přítomnost více než tří cytogenetických abnormalit, nebo abnormality chromozómu 7. Ostatní cytogenetický nálezy se považuje za intermediární z hlediska rizika (z Čermák et Jonášová, 2010).**

Body	0	0,5	1	1,5	2
% blastů ve dřeni	<5	5–10	-	11–20	21–30
Počet cytopenií	0/1	2/3			
Karyotyp	příznivý	intermediární	nepříznivý		

IPSS, klasifikuje MDS pacienty do čtyř skupin na základě vypočteného „rizika“ prognózy vývoje onemocnění s rozdílnou dobou mediánu celkového přežití pacientů a dobou progresu onemocnění do AML (tabulka 2). „Riziko“ je vypočítáno jako kombinace hodnot třech podstatných rizikových faktorů, mezi které patří cytogeneticky aberantní nálezy v buňkách kostní dřene, procento blastů v kostní dřeni a počet cytopenií (tabulka 3). 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 trvajících chronického onemocnění zatěžujícího nemocné hloubkou cytopenie, kdežto nemocní s vyšším rizikem mají chorobu agresivní s prognózou přežívání i jen několika měsíců a ve většině případů s vývojem do AML.

Posledním skórovacím systémem, který zatím není zcela vžitý a obecně používaný je R-IPSS (revised IPSS) (Greenberg et al., 2012). Tento nový skórovací systém využívá však velice užitečnou detailnější analýzu cytogenetických aberací a jejich prognostického významu (Schanz et al., 2012) (obrázek 1).



Obr. 1. Definuje nové základní cytogenetické údaje jako hlavní prognostické faktory celkového přežívání MDS nemocných (podle Schanz et al 2012, z Jonášová 2013)

V dnešní době se stále více obrací pozornost k výsledkům molekulární genetiky a nálezů mutací specifických genů, které mají, jak se zdá také nezanedbatelný prognostický význam (Papaemmanuil et al., 2013, Haferlach et al., 2014, Bejar et al., 2012, Bejar et al., 2011). Klíčovou stranou prognózy je například mutace tumor supresorického genu *TP53* (Kulasekararaj et al., 2013).

### 1.1.3. Základní charakteristiky MDS

Nemocní s MDS mají různě postižené složky krvetvorby vedoucí k jejich numerickým deficitům - cytopeniím, ev. jejich kombinacím a z nich plynoucích klinických komplikací.

Přes 90% nemocných, trpí anemií, část nemocných má trombocytopenii s projevy krvácení, část neutropenií s možným rozvojem nejčastěji bakteriálních a mykotických infekcí. Nemocní s MDS s vyšším rizikem a progresí onemocnění, kteří již mají zcela porušenou diferenciaci buněk a proliferaci nezralých blastických elementů ve dřeni, mají vedle projevů cytopenií i obecné příznaky nádorových onemocnění.

Hlavním znakem MDS je dysplastická, většinou bohatá dřeň, která je v kontrastu s periferní cytopenií. Častý je výskyt početních chromosomálních aberací.

#### **1.1.4. Etiologie**

Navzdory intenzivnímu výzkumu není etiologie onemocnění dosud objasněna. To se týká asi 80% nemocných a onemocnění pak nazýváme primární 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 (Smith 1996, Rothman et al., 1995, Pedersen-Bjergaard et al., 2002, Aul et al., 1998). Tuto skupinu nazýváme sekundárním MDS. Sekundární MDS pak mohou mít v závislosti na tom, po jakých režimech vznikaly, různé charakteristiky. Sekundární MDS po expozici inhibitorům topoisomerazy II a antracyklinům mají většinou časný vznik a zahrnují aberace v místě 11q23 s mutací MLL genu (mixed lineage leukemia gene). Sekundární MDS po alkylačních látkách a podobně MDS po předchozí radioterapii mají spíše pozdní vznik (5-10 let) a aberace chromozomů 5 a 7. Sekundární MDS jsou tedy většinou následkem přímého poškození DNA chemoterapií či radiací, tomu odpovídá i vysoké procento většinou prognosticky nepříznivých genetických aberací. U primárních MDS, kde etiologie je, jak jsme uváděli, zatím neznámá je patogeneze onemocnění komplikovanější.

#### **1.1.5. Patogeneze**

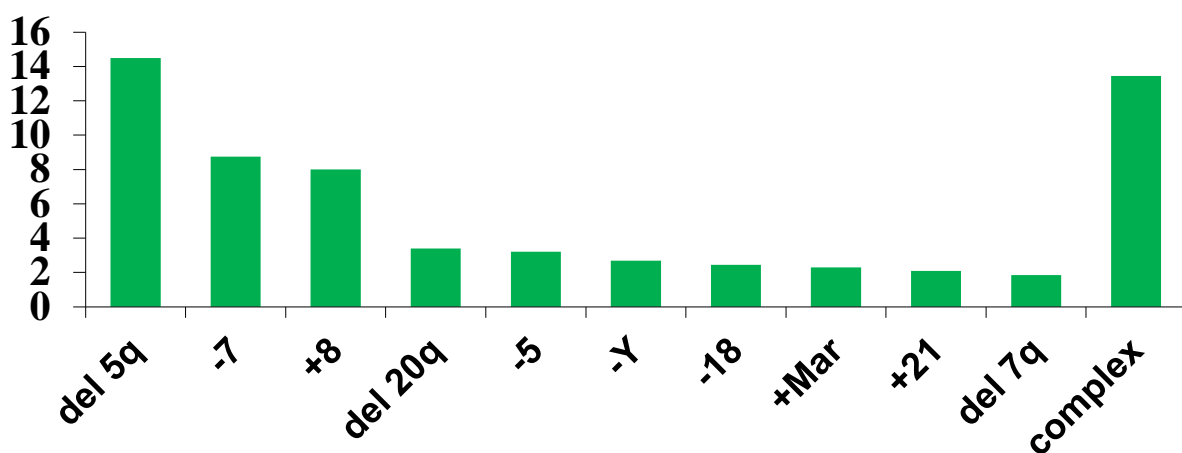
Ačkoli MDS je závažné onemocnění známé několik dekad jeho molekulární patogeneze a otázka proč dochází k vývoji do AML zůstávají neznámé. V patogenezi MDS nejspíše hrají roli genetické faktory, epigenetické a imunopatologické mechanismy (Aul et al., 1998, Will et al., 2012, Cazola et al., 2013, Itzykson 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), kde je periferní cytopenie pravděpodobně následek akcelerované



apoptózy dřeňových prekursorů, byly v některých studiích nalezeny zvýšené hladiny proapoptotických cytokinů jako je TNF alfa (tumor necrosis factor alfa), IL6 (interleukin 6), TGF beta (transforming growth factor beta), interferon gama, a Fas ligand (Sawanobori et al., 2003, Mundle et al., 1999). 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. K jeho plné malignizaci a vzniku leukemické populace buněk nejspíše přispívají ještě další faktory. Relativně časté zvláště u nemocných s vyšším rizikem jsou někdy i četné chromozomální aberace. Nebyla však prokázána žádná jednotlivá genetická léze, která by mohla vést k vzniku onemocnění.

Mezi genetickými defekty, které pravděpodobně hrají roli v patogenezi MDS, patří zvláště důležité nebalancované ztráty genetického materiálu (méně často reciproké translokace). Charakteristické chromozomální abnormality zahrnují aberace chromosomů 3, 5,7,8, 11, 17, 20 a Y nebo komplexní změny karyotypu zahrnující četné abnormality v rámci jednoho klonu (obrázek č. 2) (Haase et al., 2007).



Obr. č. 2. Nejčastější chromozomální aberace, které se vyskytují u MDS. Obrázek uvádí jejich procentuální zastoupení. Nejčastější je 5q- aberace, izolovaná, nebo v kombinacích s jinými aberacemi. Complex: znamená komplexní aberace tj. kombinace více než 3 cytogenetických aberací.

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 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 et al., 2009, viz příloha 2). Ve vztahu k disertační práci jsou významné zvláště

studie týkající se aberací 5. chromosomu a komplexní rozsáhlé změny. V obou případech hledáme korelace jednotlivých aberací s odpovědí na terapii (Zemanová et al., 2014, Březinová et al. 2012, Bystřická et al., 2012, Neuwirtová et al., 2014). Vedle genových ztrát jsou jistě v patogenezi 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). Bude jistě velmi náročné prokázat, jak a zda tyto mutace vedly k vzniku MDS a jak přesně posloupnost mutací ovlivňuje projevy MDS a zda by se eventuálně tyto znalosti daly použít pro zlepšení přežívání pacientů. Většina mutovaných genů ovlivňuje nastavení genetického programu umožňující diferenciaci krevních buněk, dále jde o mutace genů, které mají význam jako tumor supresorické geny, geny signálních soustav, geny s rolí v epigenetických procesech, geny pro apoptotické a anti-apoptotické faktory, geny s rolí v reparaci DNA, geny pro ribosomální proteiny a další (Papaemmanuil et al., 2013, Haferlach et al., 2014). Řada mutovaných proteinů v MDS jsou známé regulátory genové transkripce myelopoézy; buď jsou přímo transkripční faktory (RUNX1, p53, CEBPA, WT1, GATA 2, EVI 1) či epigenetické regulátory. 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. Do této skupiny patří například enzymy se schopností vázat a ovlivňovat strukturu chromatinu (ASXL1, EZH2), dále jsou to geny ovlivňující metylaci DNA (TET2, IDH1,2), jež bude probrána zvlášť níže. Existuje již asociace vybraných mutací s podtypem MDS či rizikovou skupinou, což napovídá o vztahu vybraných genových dysfunkcí k patofyziologii MDS. 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). Zdá se, že důležitý je i počet mutací, se vzrůstajícím počtem mutací velmi pravděpodobně též souvisí prognóza onemocnění. 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. Podrobněji bude tato problematika probrána v kapitole epigenetické terapie. Následky genetických změn a narušené epigenetické regulace většinou výsledně porušují správný proces proliferace a diferenciaci

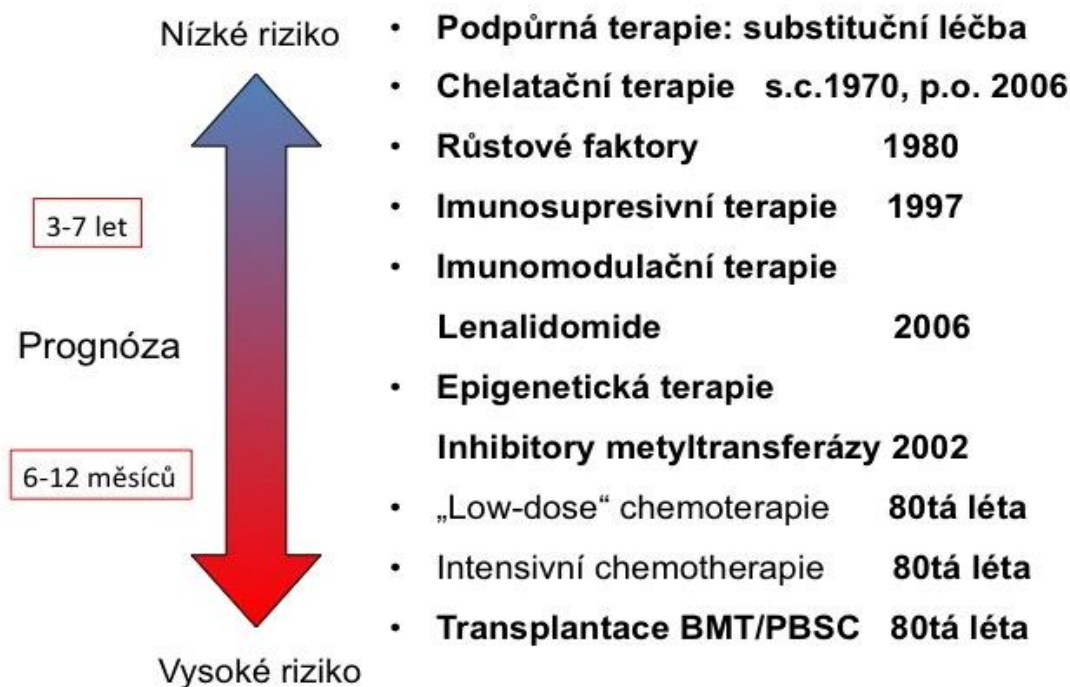
hemopoetických prekursorů. Jejich akumulace u pokročilých forem MDS podporuje expanzi nezralých prekurzorů, myeloblastů s následnou transformací do AML (Jiang et al., 2009, Figueroa et al., 2009).

U části MDS, zvláště hypoplastických forem, se uvažuje v etiopatogenesi 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 viz příloha 1, Molldrem et al., 1998). Právě studie týkající se imunosupresivní terapie a s tím související hypotézy o disregulaci faktorů účastnících se imunitních procesů u MDS vedly k prvním pokusům použití imunomodulační terapie.

Ve středu pozornosti stran patogeneze onemocnění v současné době stojí samostatná podskupina MDS, což jsou nemocní s 5q- aberací (delece dlouhého raménka 5. chromosomu), zvláště 5q- syndrom (starší ženy s makrocytární anemií, častou trombocytémií s typickými dysplasiemi megakaryocytů a nepřítomností zvýšeného počtu blastů ve dřeni). J. Boulwood popsala malý, u většiny nemocných, deletovaný úsek na dlouhém raménku 5. chromosomu (CDR – common deleted region) v lokalitě 5q31-32 o velikosti 1,5Mb (Boulwood et al., 2002). CDR zahrnuje asi 44 genů. U některých kandidátních genů z CDR již byl popsán jejich vztah k vzniku malignit. Mezi tyto geny patří například *SPARC* (secreted protein acidic and rich in cysteine), jež je tumor supresorickým genem. Nebyla však identifikována žádná mutace těchto genů a jako hlavní patogenetický mechanismus vedoucí k snížené expresi genů se dnes považuje jejich haploinsuficience (Pellagatti et al., 2008). V roce 2008 B. Ebert dokázal, že haploinsuficience genu kódujícího ribosomální protein RPS14 způsobuje specifický blok maturace červené řady (Ebert et al., 2008). Další známá data v patogenezi 5q- MDS budou probrána níže.

### **1.1.6. 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 zvláště u starších pacientů. S ohledem k volbě terapie nemocné s MDS dělíme na nižší a vyšší rizikovou skupinu, pomáhá nám při tom skórovací systém IPSS (Tabulky 2. a 3.). Jednotlivé léčebné postupy u obou základních skupin nemocných ukazuje obrázek č. 3



Obr. č. 3. Současná terapie MDS podle rizikových skupin. Významným předělem bylo zavedení imunomodulační a demetylační léčby. (z Jonášová et al., Vnitřní lékařství 2013, příloha 2)

Hlavním cílem terapie nízké rizikových nemocných, tj. nemocných s předpokládaným delším přežitím, lepší prognózou a menším rizikem transformace do AML, je zlepšení kvality život a prodloužení délky života. Zásadním problémem nízké rizikových nemocných je různě pokročilá cytopenie jedné či více hemopoetických řad a z ní plynoucí komplikace. Tímto směrem je též orientovaná léčba nízké rizikových nemocných.

Vysoce rizikovní nemocní jsou ti, u kterých se objevila leukemická populace blastů, představující hrozbu v přechod do AML. Terapie je proto vedle léčby cytopenií cílená na eradikaci patologického klonu a prevenci transformace do AML. Nemocní donedávna byli léčeni různými kombinacemi cytostatik více či méně obdobnými jako u terapie akutní myeloidní leukemie, 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 kostní dřeně či dnes především 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.

Jak výše uvádím, v posledních letech se objevily pro obě skupiny, jak nemocné s nízkým tak vysokým rizikem, nové terapeutické možnosti v podobě imunomodulační terapie a epigenetické terapie reprezentované inhibitory metyltransferázy. Obě tyto nové skupiny léků znamenaly pro MDS doslova revoluci a to nejen stran léčebných šancí pro nemocné, ale i ve zvýšení výzkumného zájmu o tuto chorobu.

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

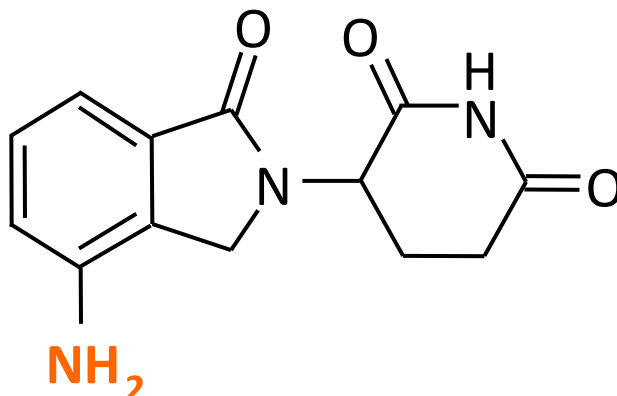
Nejčastější cytogenetickou abnormalitou MDS je delece dlouhého raménka 5 chromozomu (5q-) s výskytem asi u 20% MDS nemocných. Skupina nemocných nesoucí tuto aberaci je relativně heterogenní stran klinických projevů v závislosti na dalších faktorech jako je počet myeloblastů ve dřeni, další cytogenetické aberace, přítomnost mutací a dalších cytopenií (Mallo et al., 2011, Jonasova et al., 2012 viz příloha 1, Březinová et al. 2012 viz příloha 2, Neuwirtová et al. 2014). Speciální místo zaujímá izolovaná delece 5q- bez zmnožení blastů, která tvoří samostatnou jednotku podle WHO klasifikace. Převážně jde v této skupině o nemocné s 5q- syndromem, který je stran přežívání jeden z prognosticky nejpriznivějších syndromů MDS (Van den Berghe, 1986). Bohužel u většiny těchto nemocných se během let vyvine těžká transfuzní dependence se všemi neblahými následky, jako je významné zhoršení kvality života, ale i zhoršení morbidit a celkového přežívání. Cílem terapie těchto nemocných je především dosažení normalizace krevního obrazu a odstranění transfuzní závislosti. Preparát lenalidomid patří mezi imunomodulační léky s významným efektem specificky u nemocných s 5q- aberací. Vede jednak k normalizaci hodnot krevního obrazu, 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).

Lenalidomid je již několik let schválen v USA k terapii nemocných s 5q- s významnou anemií. Recentní závěry analýzy nemocných dlouhodobě léčených ze studií MDS 003 a MDS 004 ukazují, že respondenti mají i prodloužené celkové přežívání oproti nemocným neodpovídajícím na terapii (Hellstrom-Lindberg et al., 2012). Opatrnosti je třeba u nemocných s dalšími cytogenetickými aberacemi, zvýšeným počtem blastů, mutací *TP53* a trombocytopenií; to jsou nemocní se zvýšeným rizikem časnější progresy choroby a proto je u

nich třeba zvážit agresivnější terapii (Jadersten et al., 2011, Jonášová et al., 2012 viz příloha 1). K zvýšení rizika transformace do AML terapie lenalidomidem nevede (Kuendgen et al., 2012, Germing et al., 2012). Jak ukázala studie MDS-002, nemocní bez 5q- dosahují odpovědi pouze asi v 25% (Raza et al., 2008).

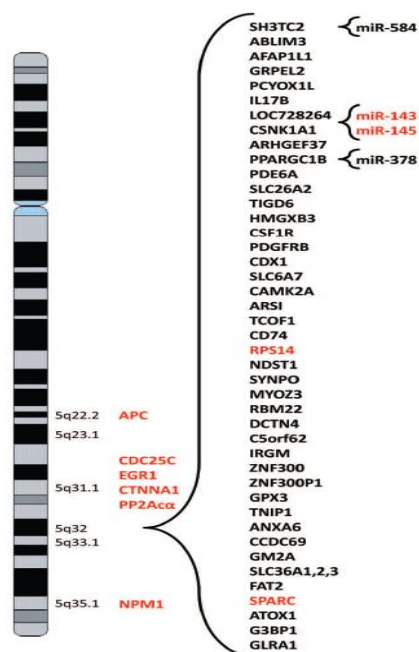
Původní práce popisují efekt lenalidomidu podobně jako u jeho předchůdce talidomidu (Heise et al., 2010). Chemickou strukturu lenalidomidu jakožto derivátu talidomidu reprezentuje obrázek č. 4

Lenalidomide



Obr. č. 4. Lenalidomid je chemickým derivátem relativně jednoduché molekuly talidomidu, který byl v 60 letech používán pro těhotenské nauzey a bolesti hlavy a vedl k známému vývoji těžkých vrozených defektů především s obrazem chybění končetin. Až po letech bylo zjištěno, že k rozvoji vrozených defektů vedl, vedle zřejmě ještě dalších dosud ne zcela jasných efektů, anti-angiogenní potenciál talidomidu, dále pak využívaný v protinádorové terapii. Především úspěch talidomidu v terapii mnohočetného myelomu přispěl k rychlému vývoji nových potentnějších derivátů s menším množstvím nežádoucích účinků. V řadě těchto derivátů je zatím nejpoužívanější a z našeho pohledu terapie MDS nejzajímavější právě lenalidomid.

Lenalidomid má pravděpodobně efekt anti-angiogenní, anti-apoptotický, inhibuje TNF-alfa, stimuluje T a NK buňky, produkci interleukinu 2 (IL2) (Busche et al., 2005, Dredge et al., 2002). U MDS s 5q- aberací zvyšuje senzitivitu erytroidních progenitorů k erytropoetinu a možný je též přímý cytotoxický efekt na buňky 5q- klonu (Ramsaz 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*, *RPS14*, *CDc25C* a *PP2A*) (Wei et al., 2009, Wei et al., 2012). Roli určitých genů na CDR se věnuje i naše práce. CDR a vybrané důležité geny jsou znázorněny na obrázku č. 5



Obr. č. 5. Obrázek znázorňuje dnes již identifikované geny na CDR a důležité geny blízce lokalizované deletované oblasti. Červeně znázorněné jsou geny, kterým je dnes věnována největší pozornost stran patogeneze MDS. (Z Boutwood et al., Blood 2010)

Velmi pravděpodobně haploinsuficience určitých genů hraje roli v patogenezi onemocnění či vzniku specifického fenotypu 5q- syndromu s insuficientní erytropoézou a s naopak zachovalou či zvýšenou tvorbou trombocytů (Boutwood et al., 2010, Ebert et al., 2008). Největším přínosem byla již zmiňovaná práce B. Eberta v časopise Nature identifikující haploinsuficenci genu pro malou ribosomální podjednotku RPS14 (gen je lokalizován na CDR), jako podstatu pro fenotyp 5q- syndromu (Ebert et al., 2008). Malá ribosomální podjednotka je nezbytná k normální tvorbě ribosomálního komplexu. B. Ebert prokázal ve své práci, pomocí inhibice exprese „knockdown“ genů na CDR u normálních CD34 buněk, že právě gen pro ribosomální protein RPS14 je zodpovědný za porušenou erytropoézu při zachovalé trombopoéze. Tento fakt byl později potvrzen J. Barlowovou na myším modelu (Barlow et al., 2010). Haploinsuficience *RPS14* vedla u myši k téměř typickému obrazu „5q- syndromu“ s poruchou erytropoézy a monolobulizovanými megakaryocyty ve dřeni, což patří k diagnostickým znakům 5q- syndromu (Dutt et al., 2011). Otázkou bylo, jak vede haploinsuficience *RPS14* k porušené erytropoéze. V experimentálních modelech bylo zjištěno, že haploinsuficience *RPS14* s následným ribosomálním stresem vede k nadprodukci p53, proteinu, který způsobuje akceleraci apoptózy erytroidních buněk specificky u 5q- a způsobuje obraz hypoplastické anemie (Dutt et al., 2011, Pellagati et al., 2010).

V erytroidních progenitorech se akumulují volné ribosomální proteiny, které blokuji 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). J. Barlowová potvrdila roli nadprodukce p53 na myším modelu, kdy u p53 „knockout“ myši nedošlo k rozvoji 5q- fenotypu. J.Barlowová a B. Ebert ve svých pracích vysvětlují poruchu erythropoézy a mechanismus vzniku anemie, co se však děje v megakaryocytech, které zcela naopak proliferují, a dochází k zvýšené tvorbě destiček, není zcela jasné. Na tento klinický obraz částečně odpovídá další práce týkající se haploinsuficience dalších genů a to genů pro mikroRNA (miRNA): miRNA-145, miRNA-146, které jsou lokalizované na nebo blízko CDR (Starczynowski et al., 2010, Kumar et al., 2011). Při inhibici exprese pomocí „knockdown“ těchto genů na myším modelu dochází k typickým změnám megakaryocytů, trombocytémii a neutropenií. Cílovým genem miRNA-146 je *TRAF-6* (TNF receptor-associated factor-6), cílovým genem miRNA-145 je *TIRAP* (toll-interleukin-1 receptor domain containing adaptor protein). Oba tyto cílové geny mají vyšší expresi u 5q- syndromu. *TIRAP* a *TRAF-6* se účastní přirozené imunity. Inhibice (lépe „downregulace“) miRNA-145 a miRNA-146 vede v elevaci IL-6, která je též detekována u nemocných s 5q-. Jaká je ale role tohoto cytokinu u MDS není jasné. Pacienti s 5q- mají sníženou expresi miRNA-145 a zvýšenou expresi *Fli-1* genu, který je cílovým genem miRNA-145. *Fli-1* je důležitý transkripční faktor hrající roli v aktivaci megakaryopoézy (Neuwirtova et al., 2013). Právě tomuto faktoru je věnována část naší práce.

**Je tedy zřejmé, že lenalidomid je vysoce účinný preparát specificky pro nemocné s aberací 5q- nicméně jaký je skutečný mechanismus účinku a co tkví za tak vysokou citlivostí nemocných s 5q- syndromem není ještě objasněno.**

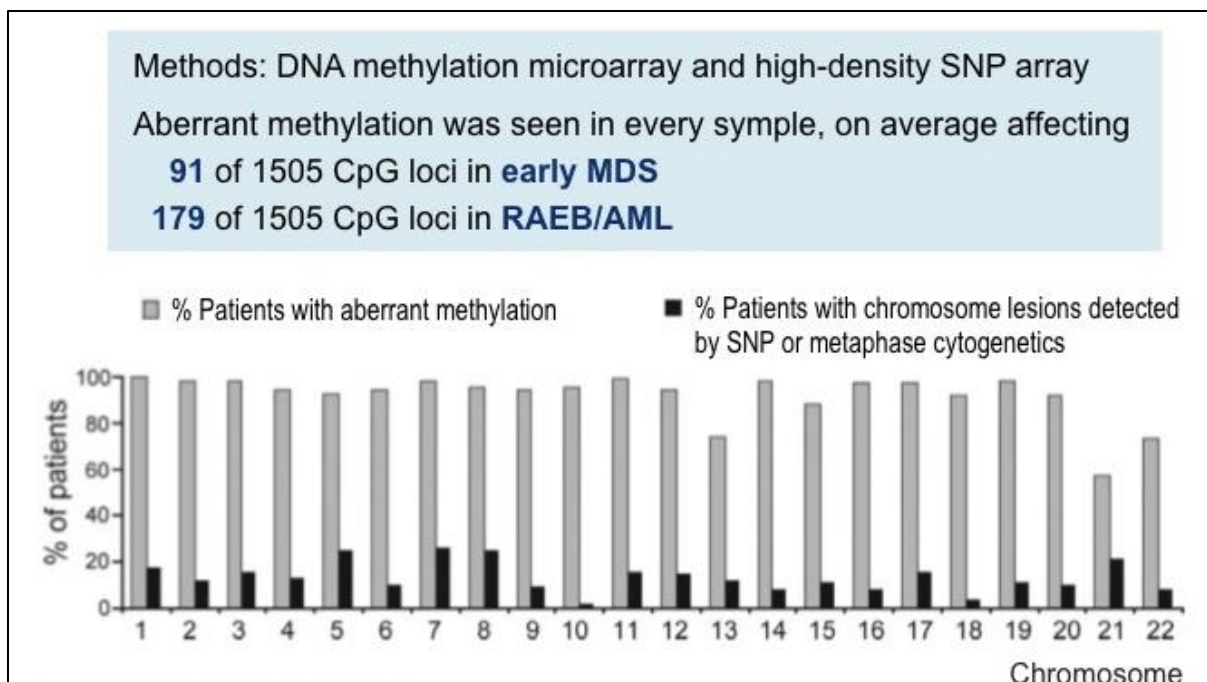
### **1.3. Podrobný úvod k problematice významu epigenetických změn u MDS a k zavedení epigenetické/demetylační terapie.**

Epigenetická terapie reprezentována 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 studiemi podložené pevné místo v terapii nemocných s vyšším rizikem (Jonášová et al., 2013 THD – příloha 1, 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. Navíc se ukazuje, že pravděpodobně působení těchto léků na buněčné úrovni přesahuje hranice pouze epigenetických změn. V naší práci nejde jen o objasnění mechanismu demetylačních preparátů, důležité je též s pokroky v molekulární genetice identifikovat i validní biomarkery sloužící k predikci efektu léčby a správnému výběru nemocných.

Vedle genetických změn se v patogenezi MDS pravděpodobně účastní i abnormální epigenetická modifikace. Jde především o metylaci genů a acetylaci histonů. Epigenetické změny jsou dnes považovány za jedny z hlavních faktorů vzniku maligního fenotypu (Jones et Baylin, 2007). DNA metylace, modifikace histonů (například dezacetylace, fosforylace atd.), a regulace nekódujícími RNA jsou hlavní typy epigenetické alterace, které vidíme u nádorových onemocnění. Methylace je jedna z nejčastějších a nejvíce studovaných epigenetických změn u MDS. DNA metylace je modifikace cytosinů, představovaná přidáním metylové skupiny k cytosinovým reziduíům enzymem DNA metyltransferázou (DNMT) (Herman et al., 2003). Pakliže dochází k metylaci tzv. CpG ostrůvků v promotorech genů může dojít k zabránění transkripce těchto genů („gene silencing“). Zcela recentní studie ukazují, že u tumorů často vidíme metylaci cytosinů i mimo CpG ostrůvky a i to může ovlivňovat genovou transkripci a vést k „gene silencing“ (Figuroa et al., 2009, Irizarry et al., 2009, Zhou et al., 2011). Změněná exprese genů je přenášena v průběhu mitózy a dává tak vznik klonální změně v buněčné populaci (Bird et al., 2002). Ovlivnění tumor supresorických genů vede k vzniku maligního klonu a jeho růstu (Jones et Baylin, 2007, Kautiainen et Jones, 1986, Tessema et al., 2003, Brakensiek et al., 2005). Inhibována hypermethylací může být ovšem exprese řady genů nezbytných pro normální regulaci proliferace, diferenciace a buněčné apoptózy (Curik et al., 2012, Hofmann et al., 2006, Christiansen et al., 2003). U MDS je vedle inhibice jednotlivých důležitých genů prokázána aberantní metylace celého genomu a jsou též studie demonstrující skutečně progresivní hypermethylaci genomu s progresí onemocnění (Jiang et al., 2009, Figuroa et al., 2009, del Rey et al., 2013, Hopfer et al., 2009) (obrázek č. 6)

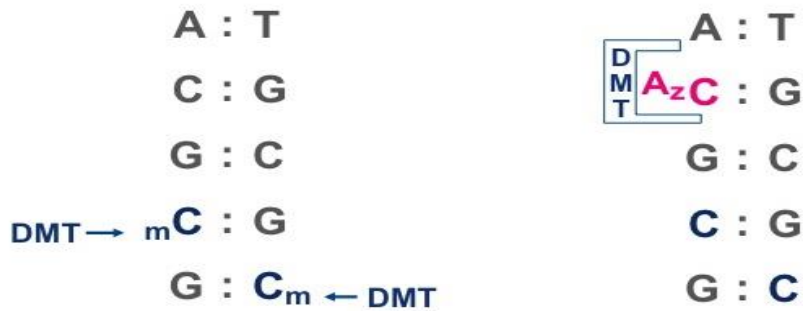


Obr. č. 6 Porovnání výskytu hypermetylace DNA s chromozomálními aberacemi u nemocných s MDS (Jiang et al. 2009). Četnost hypermetylace DNA je významně vyšší než výskyt chromozomálních změn a stoupá s progresí onemocnění.

U MDS s vyšším rizikem, kde jsou časté chromozomální ztráty, se ukazuje, že aberantní metylace může kooperovat s chromozomálními delecemi v „gene silencing“ mechanismu. To ukazuje například práce kdy u MDS nemocných s delecí 7q, kde je tumor supresorický gen *FZD9*, byla zjištěna aberantní metylace zbylé alely genu *FZD9*, což navíc je spojeno s výrazně horší prognózou nemocných (Jiang et al., 2009). Deregulace metylace není zmiňována ale u nádorů jen ve smyslu plus, ale i minus. Byla popisována i ztráta metylace jako možný faktor kancerogeneze. V původních studiích byla globální hypometylace zjišťována u mnoha solidních tumorů. Je možné, že globální hypometylace vede ke genové instabilitě. Jde o to, že hypometylace genů samozřejmě může též vést k aktivaci onkogenů (Eden et al 2003, Pogribny et al. 2009).

Metylaci zprostředkovává hlavně DNMT1 (DNA metyltransferáza 1). Bylo prokázáno, že inhibice metyltransferáz může inhibovat růst maligních buněk (Rhee et al., 2002).

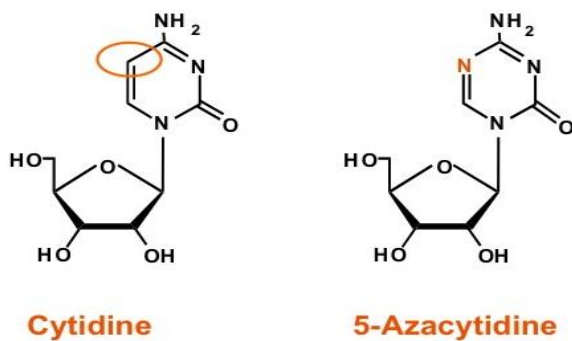
Hypermetylaci DNA zabraňují dva inhibitory metyltransferázy, 5-azacitidin a 5-aza-2'-deoxycitidin (decitabin). Obrázek č. 7 shrnuje hypometylační aktivitu azacitidinu.



- Azacitidine se inkorporuje do RNA a DNA, zabraňuje DMT (DNA metyltransferáze) umožnit metylaci cytosinu. V následném cyklu pak je syntetizována hypometylovaná DNA, což umožňuje reexpresi genů

Obr. č. 7 Popisuje účinek metyltransferáz, mechanismus demethylace azacitidinem a jeho následky.

U nás je povolen azacitidin jehož chemickou strukturu uvádí obrázek č. 8.

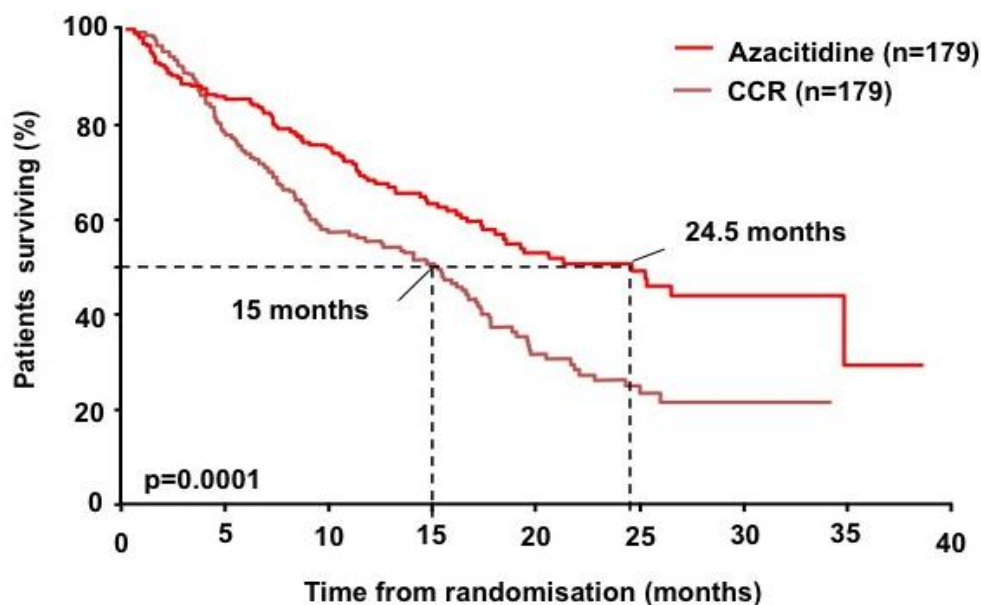


Obr. 8. Chemická struktura azacitidinu.

Zavedení tohoto preparátu do terapie MDS znamená relativně velký posun nejen v samotné terapii, ale i v poodhalování záhad samotné patogeneze MDS. Dnes se s výzkumem funkce demethylačních preparátů objevují i jiné nové efekty těchto účinných léků, které pravděpodobně ovlivňují apoptózu, diferenciaci, diskutuje se i imunomodulační efekt azacitidinu (Shin et al., 2012, Aimiwu et al., 2012). Cytostatický efekt azacitidinu byl již popsán v 60 letech minulého století a to jako prvním našim vědcem Františkem Šormem (tehdy prezidentem Akademie věd a ředitelem Ústavu organické chemie a biochemie), který azacitidin syntetizoval. 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). V průběhu terapie azacitidinem dochází nejen k hypometylaci jednotlivých genů

ale i k celkovému snížení metylace genomu (Gröwdal et al., 2014). Studie M. Gröwdala sleduje také hladiny exprese vybraných genů, které jsou sniženy proti zdravým kontrolám, a dokládá, že azacitidin je schopen tyto hladiny po 3-5 cyklech působení zvýšit. To nejspíše reflektuje typický pomalý účinek azacitidinu. Procento odpovědí stoupá s prodloužením terapie a efekt můžeme vidět i až po 8 a více cyklech (Silverman et al., 2011).

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). V největší studii AZA-001 bylo randomizováno 358 nemocných se středním 2 a vysokým IPSS rizikem do ramene s azacitidinem oproti běžné terapii (podpůrná léčba, malé dávky Ara-C či standardní chemoterapie jako u AML) (Fenaux et al., 2009). Studie 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) (obrázek č. 9).

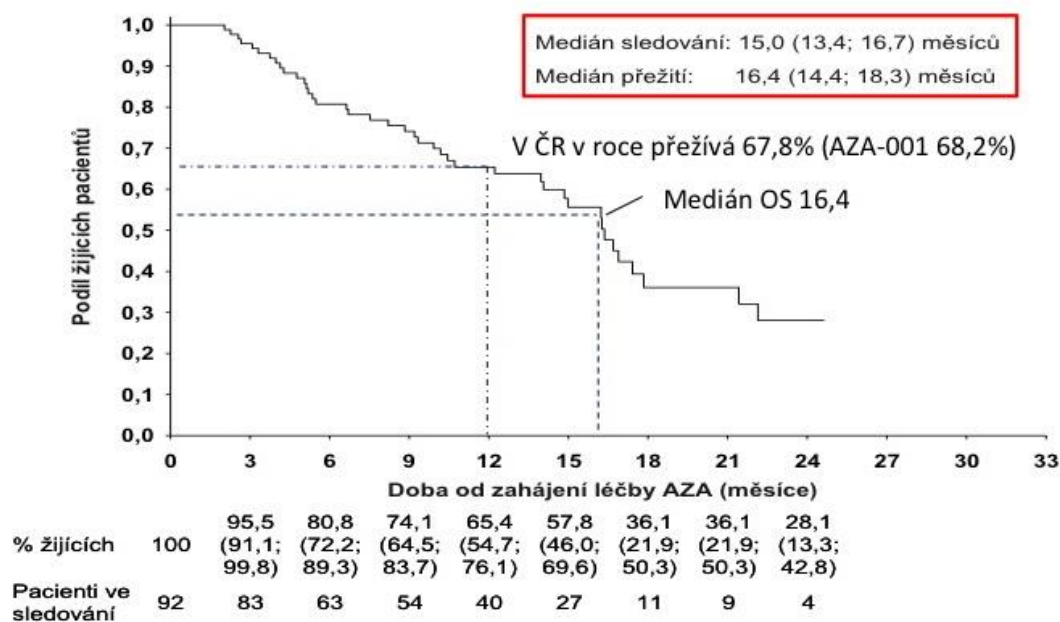


Obr. č. 9. Výsledky studie AZA- 001 (Fenaux et al., 2009). Randomizovaná studie, ve které byly porovnány výsledky terapie azacitidinem proti větvi nemocných léčených standardní terapií (nejlepší podpůrná léčba, klasická chemoterapie v režimu „3+7“ či nízké dávky cytosinarabinosidu).

Nemocní léčení azacitidinem měli významně delší medián celkového přežívání v porovnání se standardně léčenými nemocnými s MDS s vyšším rizikem.

Stejného výsledku pak bylo dosaženo i u výrazně rizikové podskupiny nemocných s RAEB – T dle FAB klasifikace tj. AML do 30% myeloblastů ve dřeni dle WHO (Fenaux et al., 2010).

Výsledky terapie azacitidinem nemocných léčených v České republice, jak ukazuje obrázek č.10, odrážejí reálnou praxi a jsou ve velmi dobré shodě s výsledky jiných světových studií



Obr. č.10. V nerandomizované a nestudijní populaci, nemocných z reálné praxe v České republice, dosahuje azacitidin mediánu přežívání u neselektovaných nemocných 16,4 měsíců, to koreluje s výsledky jiných světových studií včetně největší Francouzské studie (Itzykson et al., 2011) Analýza historických dat nestudiových nemocných léčenými standardní terapií (klasická chemoterapie jako u AML, nízké dávky cytosinarabinosidu a podpůrná terapie) ukázala medián přežívání 8 měsíců v této skupině (Jonášová et al, Transfuse a hematologie dnes 2013).

Azacitidin je používán též v udržování kompletních remisí po standardní chemoterapii či allogenní transplantaci a v přípravách na transplantaci (Grövdal et al, 2010, Damaj et al., 2012). Azacitidin je v současné době standardní terapií nemocných s vyšším rizikem dle IPSS. Zvláště pro nemocné nad 65 let, kdy již transplantace může být diskutabilní a kdy velmi často pro současné komorbidity není možno podat standardní chemoterapii, která navíc měla u nemocných s vysokým rizikem (dle IPSS) stejně malé procento odpovědí.

Na I. interní klinice VFN a 1.LFUK v Praze se již leta věnujeme MDS. Mezi průkopníky nesporně patří Doc. R. Neuwirtová, která se významně zasloužila o rozšíření obecného povědomí o této problematice hematologické chorobě, iniciovala sama řadu klinických studií a založila českou kooperativní MDS skupinu. Na její práci jsem navázala a rozšířila jak klinické tak i výzkumné centrum pro MDS. Výsledky vědecké práce mi umožnily mimo jiné zavedení imunomodulační a epigenetické terapie MDS v České republice a uskutečnění specializovaných výzkumných programů, které jsou podkladem této disertační práce.

## 2. Hypotéza práce

### 2.A. Imunomodulační terapie - vztah k patogenezi MDS

Imunomodulační terapie je vysoce efektivní terapie u nemocných s MDS specificky s 5q-  
aberrací. 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
4. 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).
5. 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 diferenciace, 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:

1. existuje definovaná podskupina MDS respondentů na demetylační terapii k jejíž  
identifikaci vede i stanovení míry exprese PU.1.
2. míra exprese PU.1 reflektuje schopnost odpovědět na demetylační terapii

3. 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. Vytyčili jsme si několik otázek týkajících se určitých možných mechanismů imunomodulační terapie. Na tyto jsme se pak snažili odpovědět sledováním specifických změn před a v průběhu terapie lenalidomidem.

Cíle:

1. 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 níže 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** representovanou preparátem azacitidinem. V této části naší práce se věnujeme 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 diferenciace a proliferace a které již mají charakter nádorového onemocnění. Sledovali jsme především možný diferenciační 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 diferenciačního 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

V obou našich výzkumných okruzích byli zařazeni nemocní, kteří byli léčeni na I. interní klinice Všeobecné fakultní nemocnice v Praze od roku 2008 do současnosti. Analýza terapie azacitidinem se zabývá též daty nemocných léčených v České republice.

Součástí naší práce je tedy náročný, ale pro celý projekt nepostradatelný sběr klinických a experimentálních dat, týkajících se základních diagnostických 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 MDS registru, a které slouží jako ucelený zdroj klinických informací nejen na začátku onemocnění ale i v průběhu léčby. Analýza klinických dat azacitidinové lišty je součástí této práce. 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 MDS nemocných s většinou izolovanou delecí dlouhého raménka 5. chromosomu (5q-) byla na naší klinice zahájena v roce 2008 v rámci compassionate use program (CUP), do kterého vstupně bylo zahrnuto 10 nemocných s MDS s nízkým rizikem. Byli to první nemocní léčeni lenalidomidem v České republice. Následně pak byli zařazováni další nemocní. Dosud bylo léčeno na I. interní klinice 24 nemocných. U všech těchto nemocných provádíme po získání informovaného souhlasu vstupní odběry periferní krve a kostní dřeně k účelům diagnostickým a výzkumným v rámci jednotlivých projektů. (podrobněji sběr materiálu, izolace buněk a uchování materiálu viz dílčí projekty). Naše klinická data byla prezentována na Olomouckých hematologických dnech, České hematologické společnosti 2013 a na MDS symposiu České MDS skupiny 2013 a 2014. Stran klinických dat je důležité poznamenat, že 89% našich nemocných odpovědělo na terapii s dosažením kompletní transfuzní nezávislosti. Pouze 2 nemocní dosáhli kompletní cytogenetické odpovědi.

Lenalidomid je perorální preparát, terapeutická dávka u MDS je 5-10 mg, nemocní jsou léčeni trvale v případě, že nedosáhnou kompletní cytogenetické odpovědi. Většina našich nemocných je již léčena několik let, což nám umožňuje sledovat změny v průběhu terapie. Medián trvání léčby je 9,5 měsíců s rozsahem 1-38 měsíců.

Odběry nemocných se provádějí v době diagnózy, dále těsně před zahájením terapie a posléze v případě periferní krve v pravidelných cca měsíčních intervalech v prvním ½ roce a dále po ½ roce. Odběry dřeně provádíme v prvním roce terapie po 6 měsících a posléze v jednorozhodných intervalech. Součástí uchovávání materiálu v korelaci s klinickými daty je biobanking.

Stejně tak terapie azacitidinem byla zahájena v roce 2008. Do současné doby jsme léčili 110 nemocných. Stejně jako v případě lenalidomidu nemocní po podpisu informovaného souhlasu se podrobí odběrům periferní krve a kostní dřeně, které slouží jak k diagnostickým tak výzkumným účelům a část je uchována v naší biobance. Odběry u azacitidinu se provádějí po 4. cyklu terapie, a dále kdykoli v případě progresu onemocnění, pravidelně pak po 14. cyklu léčby a následně á 3 měsíce. Veškerá klinická data jsou zaznamenávána v registru nemocných s MDS, specificky v azacitidinové liště. Výstupy těchto dat a výsledky terapie jsem opakovaně prezentovala na Olomouckých hematologických dnech, České hematologické společnosti 2012 a 2014, dále na sjezdu České MDS skupiny 2013, 2014 a jsou součástí publikace (Jonášová et al., 2013, příloha 1). Azacitidin se aplikuje podkožně v 7 denních režimech, které se opakují po 28 dnech. Terapie koresponduje s délkou trvání odpovědi. Typické na rozdíl od chemoterapie je velmi pozvolný nástup účinku léku, který často vidáme až po 4, 6 či 8 cyklu léčby. Jde pravděpodobně o klinický korelát k mechanismu léku, který se liší od klasické chemoterapie a při kterém epigenetické změny v tomto případě demethylace DNA se násobí s dalšími buněčnými cykly.

Zpracování materiálu se provádí ve spolupráci s Ústavem patologické fyziologie (kde také je naše biobanka) a Ústavem hematologie a krevní transfuze.

## 4.2. Metody a výsledky jednotlivých studií

### A. Studie k tématu imunomodulační terapie – vztah k patogenezi MDS

#### A.1. *Analýza exprese genů transkripčních faktorů Fli 1 a EKLf (Friend leukemia virus integration 1 a erythroid Krüppel-like factor) a dalších transkripčních faktorů u nemocných s 5q- aberací a jejich změny při terapii lenalidomidem.*

Analýza vychází z naší práce Neuwirtové et al., 2013, *Annals of Hematology* 2013. Tato práce je součástí disertační práce (příloha 1). Data týkající se změn EKLf, Fli 1 a dalších transkripčních a pro-apoptotických faktorů u nemocných léčených lenalidomidem byla prezentována na 12. a 13. světovém sjezdu MDS (Edinburgh 2012, Berlín 2013) dále na OHD (Olomouckých hematologických dnech), konferenci České hematologické společnosti 2013 a konferenci České MDS skupiny 2012, 2013. Souhrnná data na větším vzorku nemocných jsou připravována k publikaci. **K tomuto tématu se též vztahuje práce Jonášová et al, *Leukemia Research* 2012 (příloha 1).**

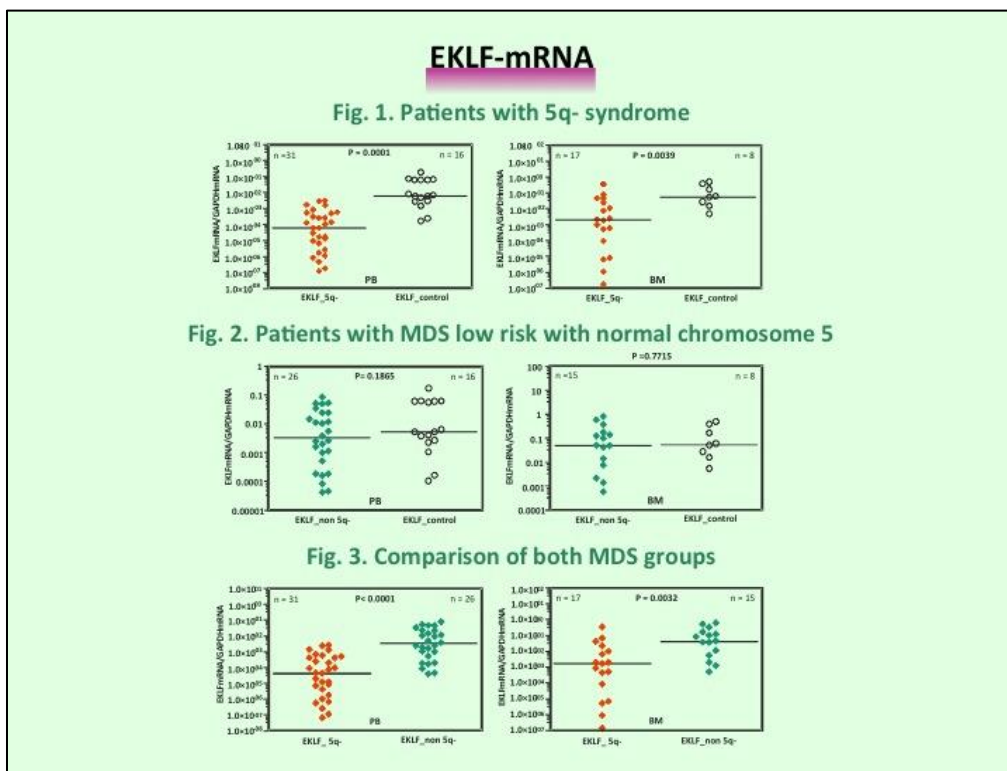
Hlavní témata této studie jsou:

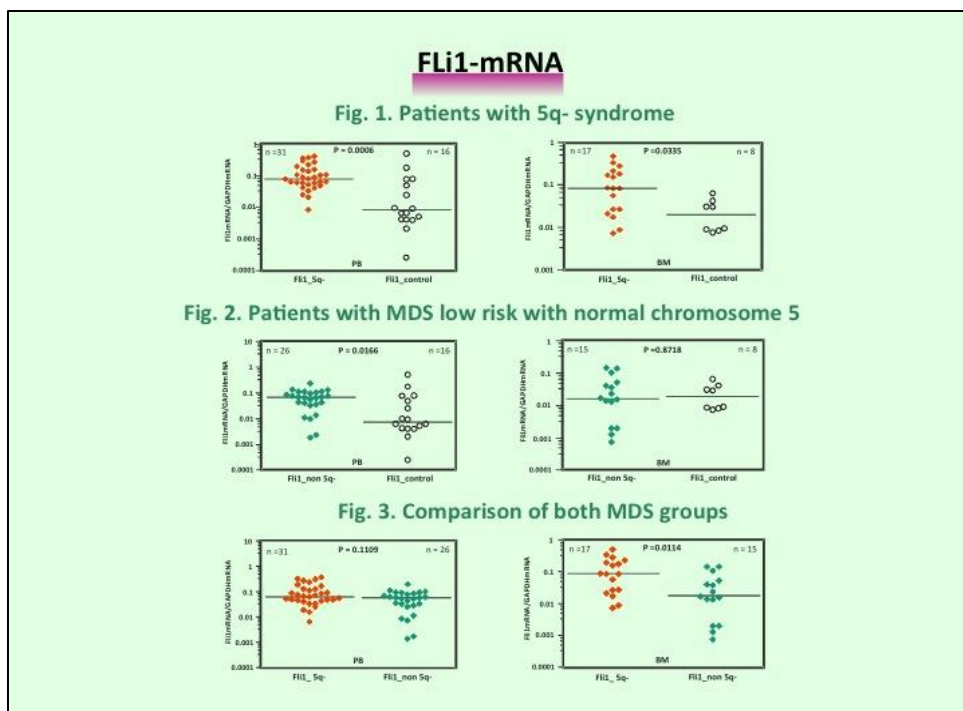
1. antagonismus dvou transkripčních faktorů, EKLf a Fli 1, v patogenezi 5q- syndromu. Tento antagonismus může být klíčovým faktorem v klinické manifestaci anemie s hypoplastickou erytropoézou a trombocytémií, které jsou typické pro 5q- syndrom. Domníváme se, že by u 5q- syndromu za předpokládané přítomnosti Fli1v megakaryocytech mohl být p53 degradován i při ribosomálním stresu, což by mělo umožnit efektivní megakaryopoézu.
2. Vliv lenalidomidu na (EKLf, Fli1, p53, PU.1, IL-6, MDM2) u 5q- MDS nemocných.

**Metody a výsledky** (podrobně viz Neuwirtova et al., 2013, příloha 1).

Porovnávali jsme 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

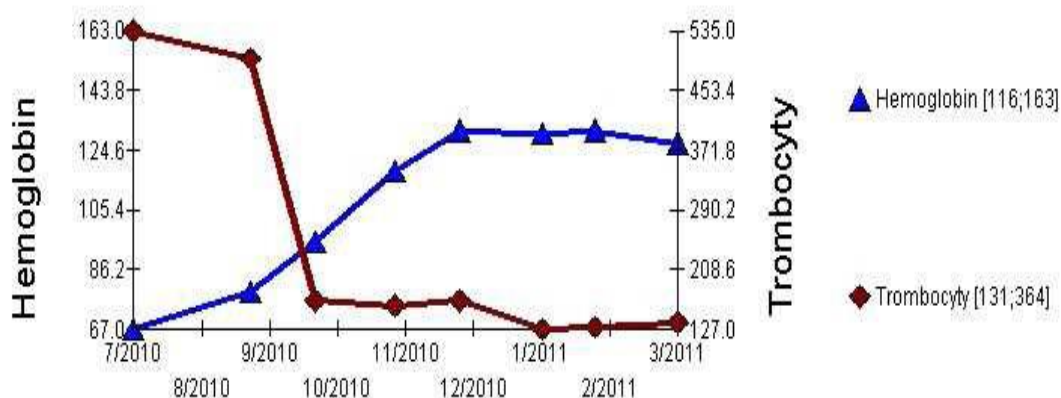
s kongenitálními mutacemi genů pro různé ribosomální proteiny patří spolu s MDS s 5q- k tzv. ribosomopatiím. Fli1 a EKLF mRNA hladiny v mononukleárních buňkách byly analyzovány pomocí TaqMan- based kvantitativního „real-time“ PCR. Výsledné analýzy expresí genů u jednotlivých skupin byly porovnány s výsledky zdravých kontrol. Podrobná data nemocných a metodiky molekulárně genetických analýz jsou popsány v příloženém článku (Neuwirtova et al., 2013). Expresí 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 (viz příložený obrázek č. 11. :soubor grafů). Nemocní bez 5q- aberace, přes to že je u nich taktéž postižena erytropoéza a přítomna často hluboká anemie zdaleka nevykazovali tak nízké hladiny EKLF.





Obr. č. 11. Soubor grafů reprezentující relativní hladiny mRNA EKLf a Fli1 z mononukleárních buněk periferní krve a dřeně u nemocných s 5q-MDS, MDS nemocných s nízkým rizikem bez 5q- (non-5q-), vždy v jednotlivých grafech porovnání hladin mRNA nemocných s normály. Poslední grafy v obou případech ukazují porovnání obou skupin 5q- proti non-5q- MDS skupině.

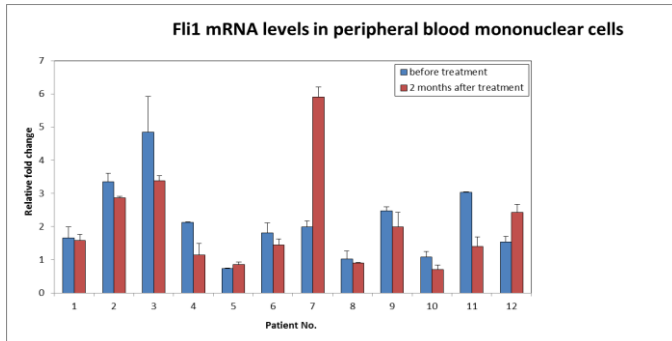
Hlavními rysy 5q- syndromu v krevním obraze je anemie a normální či spíše vyšší hodnoty trombocytů. Lenalidomid je lék, který rychle vede k zvratu tohoto klinického obrazu, jak prezentuje graf jedné naší nemocné (obrázek č. 12).



Obr. č. 12. Tento graf znázorňuje vývoj hodnot hemoglobinu (modrá křivka) a trombocytů (hnědá křivka) 70leté nemocné s MDS s 5q- syndromem od zahájení terapie lenalidomidem. Nemocná je léčená dosud s velmi dobrým efektem. Během několika týdnů při terapii lenalidomidem jsme detekovali nárůst hemoglobinu a naopak pokles trombocytů.

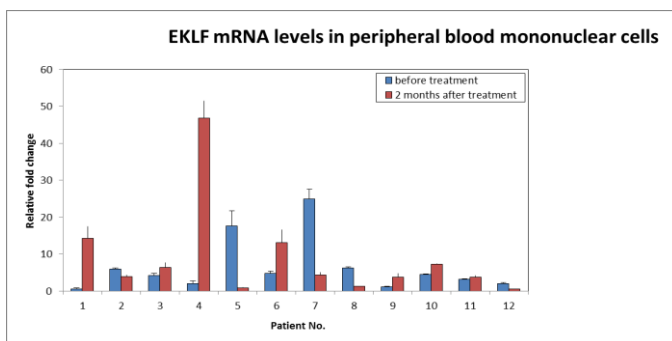
Položili jsme si tedy další otázku, zda a k jakým změnám exprese *EKLF* a *FLi1* vede terapie lenalidomidem. Sledujeme změny exprese těchto genů u nemocných léčených lenalidomidem v porovnání s odpovědí na terapii. Analyzujeme též efekt léčby i na další důležité proteiny a transkripční faktory, které jak výše uvádíme, velmi pravděpodobně hrají roli v patogenezi 5q-syndromu: *MDM2*, *PU.1* a *p53*, *IL-6*. Práce stále pokračuje ve snaze rozšířit klinický soubor. Hodnocena je exprese *Fli-1*, *EKLF*, *TP53*, *PU.1*, *MDM2* a *IL-6* genů před a v průběhu terapie lenalidomidem v mononukleárních buňkách izolovaných z periferní krve a kostní dřeně. Zde prezentujeme výsledky 12 prvních vyšetřených nemocných s MDS s 5q-syndromem, léčených lenalidomidem (9 žen, 3 mužů), medián věku 68 let (rozmezí 55-76 let). Medián podaných cyklů v době analýzy byl 8 (rozmezí 3-13). Všichni nemocní měli vstupně významnou anemii a byli dependentní na transfusích. Na terapii odpovědělo 11 nemocných. Medián dosažení odpovědi byl 2 cykly (2 měsíce). Hladiny specifických mRNA byly stanoveny pomocí kvantitativního „real time“ PCR v celkové RNA izolované z krve či kostní dřeně. Změny hladin mRNA z mononukleárů periferní krve před terapií a v době první odpovědi, ve 2 měsících terapie reprezentují grafy 1-6 (obrázek č. 13).

Graf č. 1.

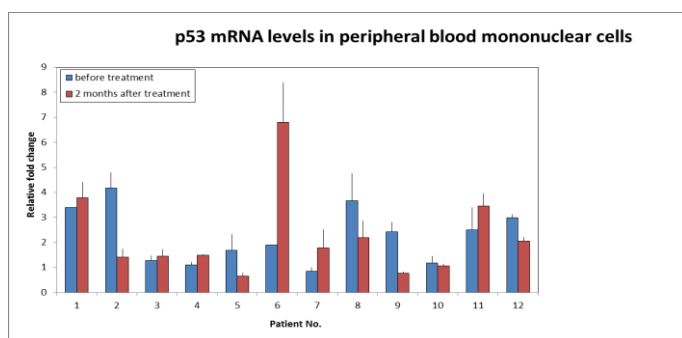


Obr. č. 13: Grafy 1-6. Hodnoty *Fli1*, *EKLF*, *p53*, *MDM2* a *PU1*, *IL-6* v mononukleárních buňkách periferní krve. Grafy představují výsledky exprese (relativní hladiny mRNA) před zahájením terapie lenalidomidem a v době první odpovědi na lenalidomid (2 měsíce). Nemocný č. 2 nebyl dobrým respondentem na terapii.

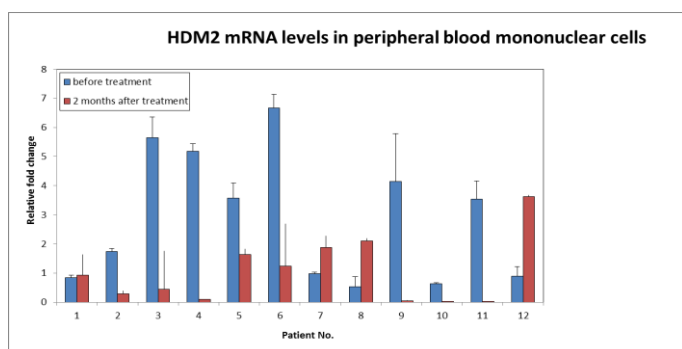
Graf č.2



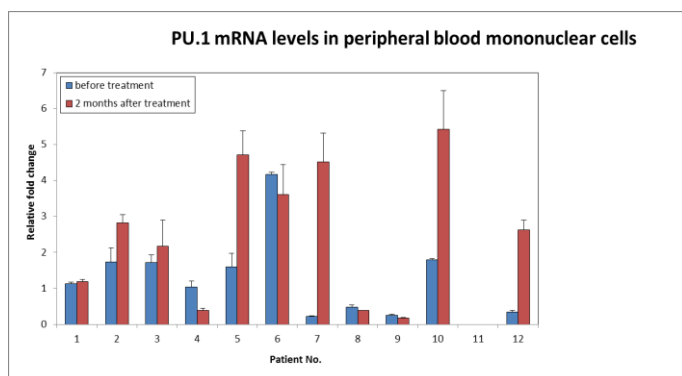
Graf č.3



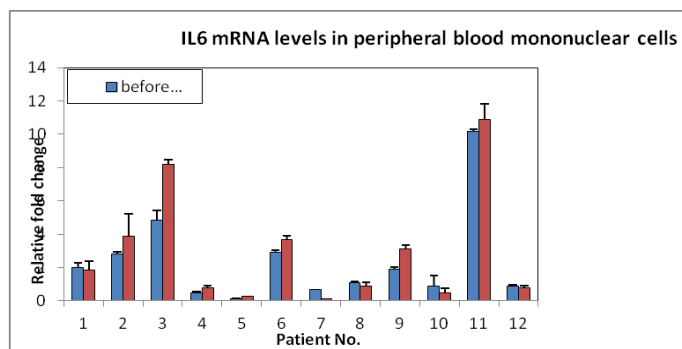
Graf č.4



Graf č.5

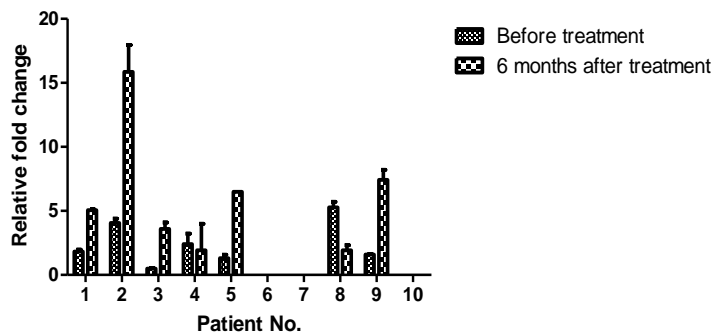


Graf č.6

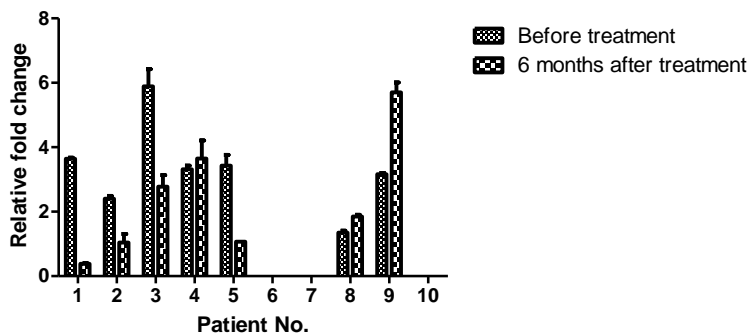


Navýšení EKLF (patrně lépe z analýzy dřene) bylo zvláště na začátku terapie a nastartování akcelerace erythropoézy (což bylo provázeno navýšením erythropoézy ve dřeni a samozřejmě normalizací či významným vzestupem hemoglobinu). V průběhu terapie hladiny EKLF i při trvající odpovědi lehce klesaly či pouze oscilovaly. Hladiny Fli-1 taktéž po vstupním snížení nadále jen oscilovaly. Hladiny PU1, IL-6 mRNA se u většiny nemocných v průběhu terapie spíše zvyšoval, což bychom u IL-6 neočekávali. MDM2 mRNA po terapii lenalidomidem mělo tendenci ke snížení. U p53 z periferní krve se překvapivě mRNA hladiny nikterak v průběhu terapie lenalidomidem neměnily. Výsledky jsou ale pravděpodobně modifikovány analýzou zatím pouze vzorků z periferní krve. Vyšetření ze vzorků kostní dřene jsou dosud vyhodnocena jen u omezeného počtu nemocných nicméně, jak ukazuje obrázek č. 10, změny v kostní dřeni jsou jednoznačně zřetelnější než v periferní krvi (obrázek č. 14: grafy 1-3)

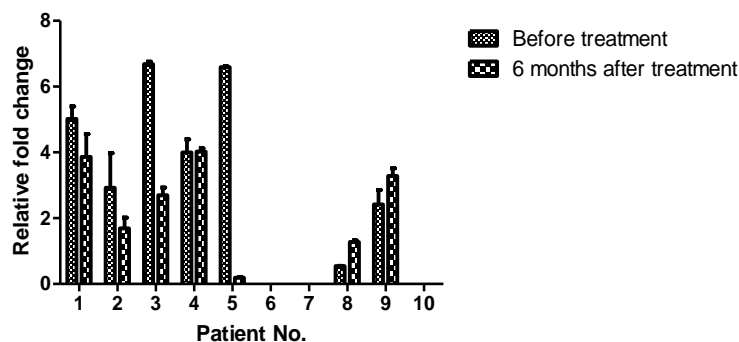
**EKLF mRNA levels in bone marrow mononuclear cells**



**Fli1 mRNA levels in bone marrow mononuclear cells**



**p53 mRNA levels in bone marrow mononuclear cells**



Obr. č. 14.: grafy 1-3. Vývoj změn EKLF, FLi1 a P53 u nemocných léčených lenalidomidem před terapií a v 6 měsíci léčby z mononukleárních buněk kostní dřene. U většiny nemocných převažuje právě výše uvedený antagonismus se vzestupem EKLF a poklesem FLi1 po terapii. Nemocný č. 8 nebyl dobrým respondentem a nemocný č. 9 měl jen částečnou a opožděnou odpověď.

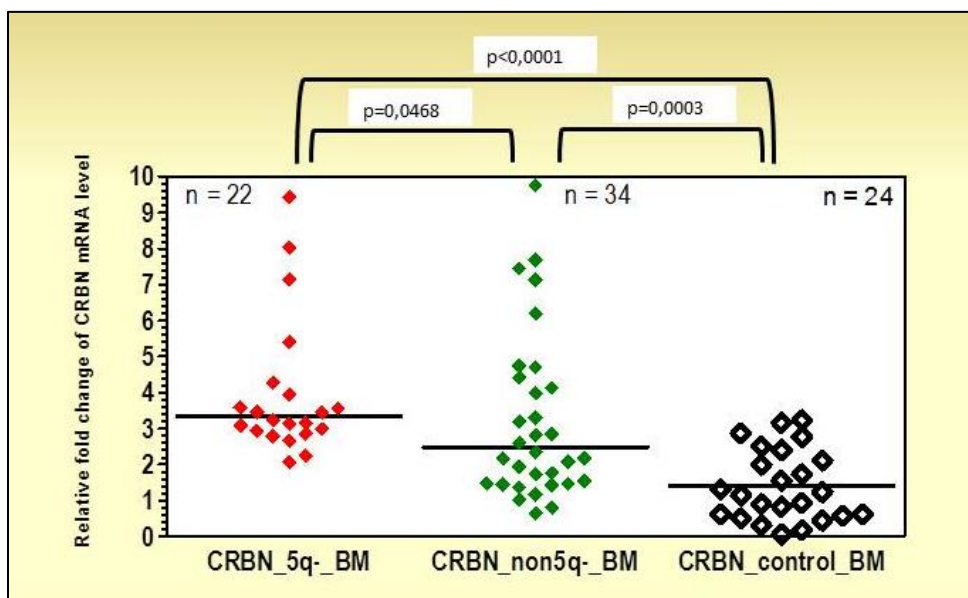
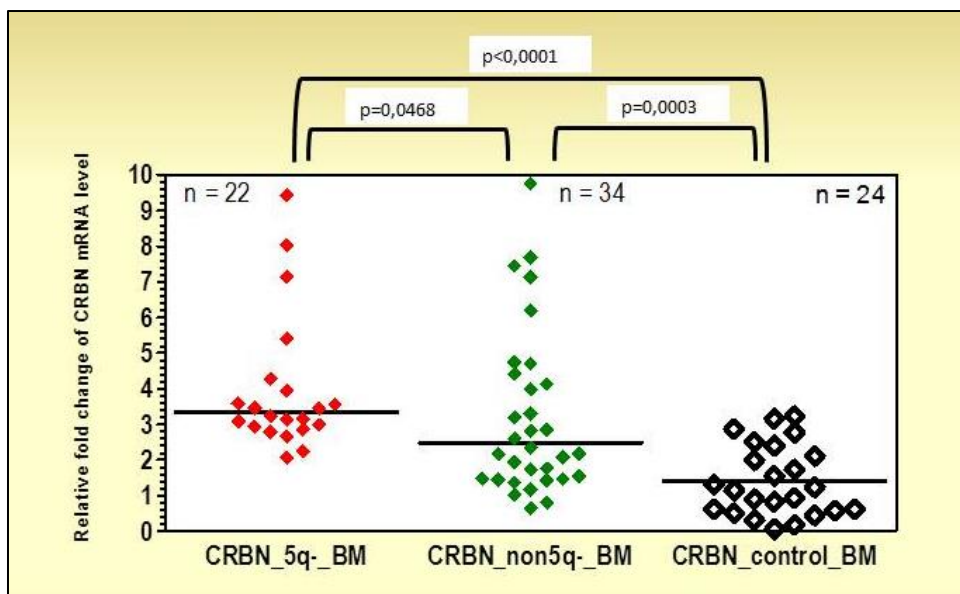


## ***A.2. Analýza exprese cereblonu (CRBN) u nízké rizikových nemocných s MDS s 5q- a vztah exprese cereblonu k efektivitě lenalidomidu***

Významným předělem stran jasnější představy o mechanismu lenalidomidu je objevení vazebného místa pro imunomodulační léky cereblonu (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.

**Práce odeslána k publikaci v *European Journal of Hematology* (příloha 1).** Výsledky byly presentovány na ASH (American Society of Hematology meeting) 2013 a práce byla vybrána do „highlights of ASH 2013“.

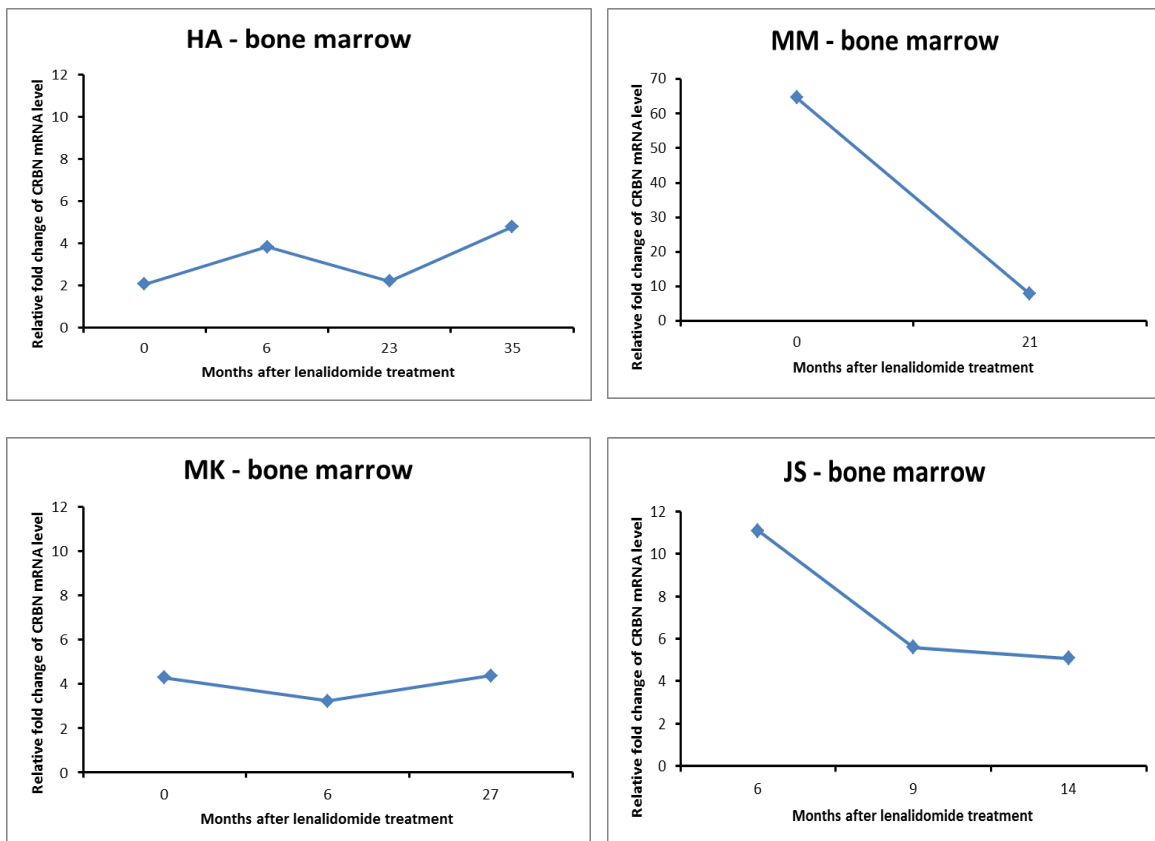
**Metody a výsledky.** Podrobný popis metodiky je v příložené práci Jonášová et al., příloha 1. Pracovali jsme s mononukleárními buňkami, které jsme izolovali ze dřeně a periferní krve. Dřeně byly k dispozici od 22 nemocných s nízké rizikovým MDS s 5q-, 37 nemocných s nízké rizikovými MDS bez 5q- aberace a 24 zdravých kontrol. Periferní krev byla zpracována u 38 nemocných s 5q-, 52 bez 5q- aberace (obě skupiny nízké rizikové nemocní) a 24 zdravých kontrol. K zjištění exprese genů bylo použito TaqMan- kvantitativní „real-time“ PCR. U všech nemocných i zdravých kontrol byl obdržen informovaný souhlas s odběry a zpracování materiálu ze dřeně a periferní krve. Medián CRBN mRNA hladin v celkové RNA izolované z periferních mononukleárních buněk byl nejvyšší (3,6) u nemocných s delecí 5q-, nižší u nemocných bez 5q- aberace (1,5) a nejnižší u zdravých dárců (1,2). Velmi podobné výsledky byly u CRBN mRNA z izolovaných mononukleárních buněk ze dřeně (3,3 u 5q- MDS, 2,2 u nemocných bez 5q- aberace a 1,3 u zdravých dárců) (obrázek č. 15).



Obr. č.15. Hladiny CRBN mRNA v mononukleárních buňkách kostní dřeně. Porovnány jsou hladiny u skupiny MDS 5q-, MDS bez 5q- a normálních kostních dření.

Rozdíly v obou případech mezi těmito třemi skupinami byly statisticky významné ( $p < 0.05$ , Mann-Whitney test) s jedinou výjimkou rozdílu CRBN mRNA hladin u buněk z periferní krve u zdravých dárců a nemocných s nízkým rizikem bez 5q- aberace. 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. A položili jsme si stejnou otázku, jako u myelomů, je-li odpověď vztažená k určité míře exprese *CRBN*. Zjišťovali jsme hladiny mRNA CRBN u 6 nemocných před a v průběhu terapie. U všech

nemocných (4 nemocní), kteří byli dobří respondenti, jsme našli vysoké hladiny CRBN mRNA jak před terapií, tak v průběhu léčby při trvající 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. Obrázek č. 16 demonstruje vývoj hladin CRBN v průběhu terapie.



Obr. č. 16. Vývoj změn relativních hladin CRBN mRNA v mononukleárních buňkách kostní dřeně u nemocných, kteří odpověděli na terapii a jejichž odpověď trvá (AH a MK) a u nemocných, kteří byli respondenti, ale u nichž terapie selhala (MM a JS), v době ztráty odpovědi došlo k prudkému snížení hodnot CRBN mRNA. U obou nemocných (MM a JS) došlo též k progresi onemocnění v době poklesu hladin CRBN mRNA.

V současnosti je nedostatek ve standardizaci testů pro analýzu *CRBN* genové exprese, proto jsme se orientovali i tímto směrem. 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. Analyzovali jsme „splicingové“ varianty CRBN mRNA u 5q- MDS nemocných a zdravých kontrol. Našli jsme velmi málo variant s vystřiženým 8 nebo 10

exonem a velké množství variant, kde je ztráta obou exonů. Všechny varianty bez 10 exonu nevážou lenalidomid.

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

**Publikace týkající se tohoto tématu, která je součástí disertační práce je Belickova et al., Clin Lymphoma Myeloma Leuk, 2012 (příloha 1).**

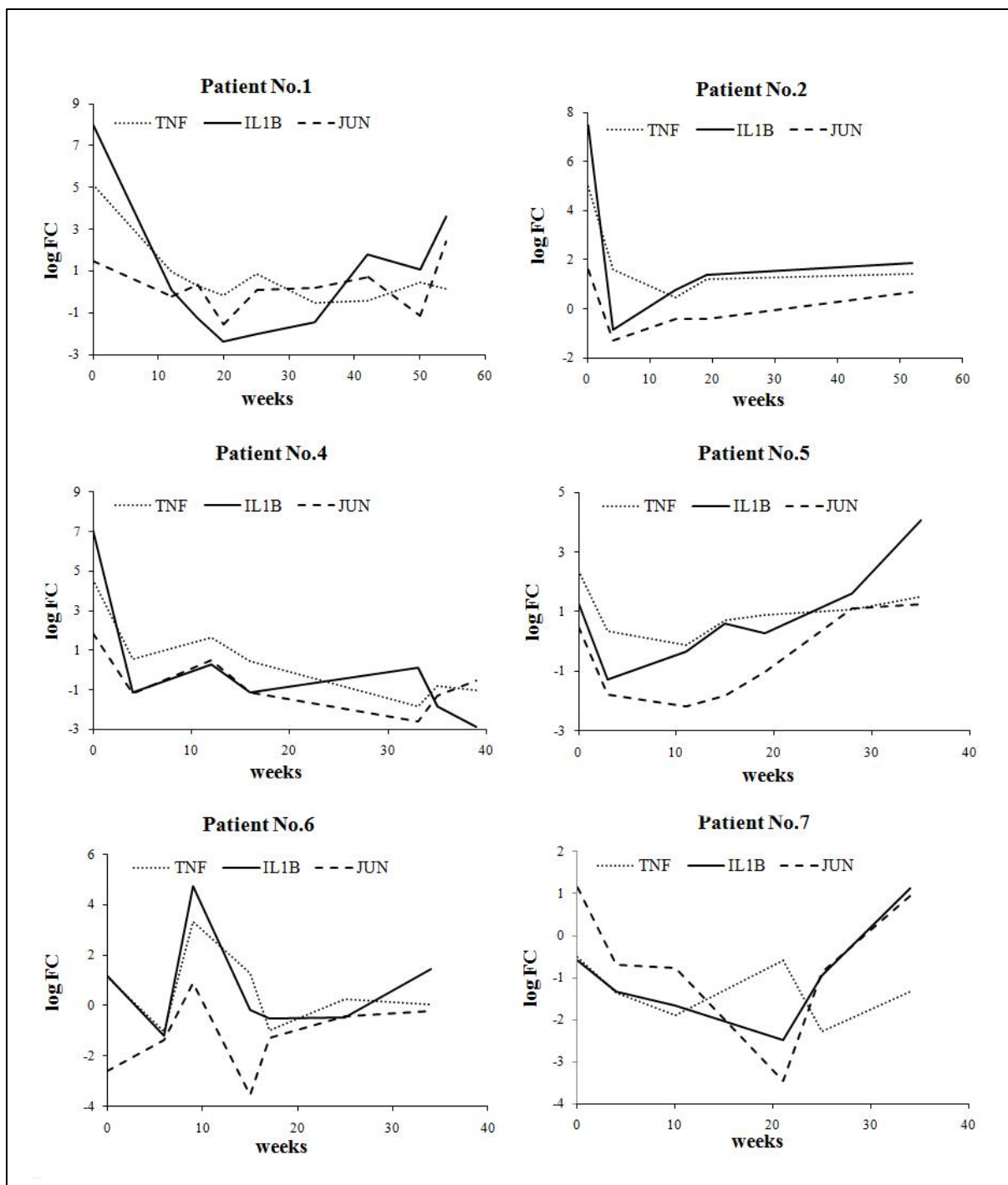
Položili jsme si otázku, k jakým změnám exprese genů účastníků předčasné apoptózy, imunitní disregulace a aktivace či disregulace určitých cytokinů dochází vlivem terapie lenalidomidem u nemocných s 5q- syndromem. K odpovědi jsme použili změny expresního profilu genů před terapií a v průběhu terapie.

**Metody a výsledky.** Podrobný popis metod je v práci Beličková et al.2012, příloha 1. 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 monocyty CD14+ z periferní krve před terapií, v době první erytrocytární odpovědi (představováno normalizací hemoglobin nebo dosažením transfuzní nezávislosti) a v průběhu léčby. Zvolili jsme monocyty pro jejich produkci prozánětlivých cytokinů (například TNF a IL1) a inhibitorů erythropoézy a dále protože v této buněčné populaci, a to bylo především důležité, bylo stejné zastoupení buněk 5q- pozitivních (ověřeno FISH – fluorescent in situ hybridizací) jako v kostní dřeni. Většina nemocných v době hodnocení nedosáhla ještě cytogenetické odpovědi. To znamená, že hodnoceni byli nemocní s ještě stále přítomným patologickým klonem. Což je důležité, neboť efekt lenalidomidu (eliminace anemie) vidíme i u nemocných s ještě stále podstatnou presencí patologického klonu.

K dispozici jsme měli též vzorky periferní krve od 10 zdravých kontrol. Všichni nemocní před odběry podepsali informované souhlasy. K analýze exprese genů jsme použili HumanRef-8 v3 ExpressionBeadChips (Illumina Inc, San Diego, CA). Následně jsme analyzovali a porovnávali expresi vybraných genů pomocí kvantitativního „real-time“ PCR (Taqman Real-Time PCR). Selektovali jsme geny *TNF*, *IL-1*, a *JUN*.

Jako první uvádíme změny před terapií lenalidomidem. Nalezli jsme změněné exprese u 558 genů u nemocných s 5q- delecí v porovnání s kontrolními vzorky. Z těchto 558 genů mělo nižší expresi 326 a vyšší expresi 232 genů. Nejčastější geny se sníženou expresí

v monocytech nemocných byly *HLA-DRB4*, *VNN2*, *CRTAP*, *NCF1*, *CXCR4*, *CLECI2A*, *EEFIG*, *DUSP6*, *H2AFY*, *GIMAP8*, *ALDOA* a *CD7*. A naopak geny se zvýšenou expresí byly *HBB*, *HBA*, *HBG2*, *HBG1*, *CCL3L1*, *IL-1*, *IL-8*, *TNF*, *CD83*, *IER3*, *TNFAIP3*, *CXCL2*, *CDKN1A* a *C13ORF15*. Seznam 110 genů s nižší expresí „down- regulovaných“ byl porovnán v databasi „DAVID gene ontology“. Bylo tak identifikováno 6 skupin či určitých patogenetických drah se signifikantně změněnou expresí genů. Tyto skupiny jsou: geny „NOD-like receptor“ signální dráhy (6 genů), geny lupus erythematoses (7 genů), cytokin-cytokin receptorové interakce (10 genů), geny chemokinových signálních drah (8 genů), geny patřící k typu I diabetes mellitus I (4 geny), geny hematopoézy (4 geny). Dále byla provedena analýza změny exprese genů před a v průběhu terapie tedy při první odpovědi na lenalidomid, která byla identifikována jako erytrocytární odpověď (dosažení transfusní nezávislosti či normalizace hemoglobinu). Statisticky významné změny exprese byly u 97 genů. Nejčastější geny se níženou expresí v době odpovědi na lenalidomid byly geny *TNF*, *CCL3L1*, *CCL3*, *IL-1*, *IER3*, *CD83*, *TNFAIP3*, *JUN*, *CXCL2* a *DUSP2*. Expese těchto genů se snížily tak, že se rovnaly po léčbě úrovni exprese nalezené u zdravých kontrol. Nejčastější geny, u nichž jsme zaznamenali signifikantně vyšší expresi, byly: *ARPC1B*, *RN28S1*, *ERP29*, *NCF1*, *VNN2*, *CRTAP*, *HIST1H2AC*, *ALDOA*, *CXCR4* a *EEFIG*. Opět „DAVID gene ontology“ database byla použita k identifikaci funkčních okruhů těchto genů a jejich skupin. Byly identifikovány následné okruhy: imunitní odpověď (16 genů), zánětlivá odpověď (11 genů), odpověď při bakteriální infekci (8 genů), anti-apoptotická aktivita (7 genů), regulace aktivity mitogen-aktivované protein kinázy (MAPK) (5 genů), kyslíkový transport (4 geny), a geny regulace proliferace (11 genů). 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 (obrázek č. 17: grafy 1-6)



Obr. č. 17. Vývoje relativních hladin mRNA TNF, IL-1B, JUN u nemocných s 5q- delecí a MDS s nízkým rizikem léčených lenalidomidem v průběhů týdnů na terapii. Nemocný číslo 6 dostával v začátcích léčby acetylsalicylovou kyselinu, po jejím vysazení hladiny přechodně stouply, ale dále s terapií lenalidomidem opět jako u ostatních nemocných hladiny klesaly.

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. Našli jsme významně změněnou expresi genů důležitých v imunitní odpovědi (Aggrawal et al.,

2011). Celkem velký počet genů se změněnou expresí byly geny TNF signální dráhy (jako jsou například *TNF*, *TNFAIP3*, *SLC35B2*, *FOSB*, *JUN*, *IER3* a *DUSP2*).

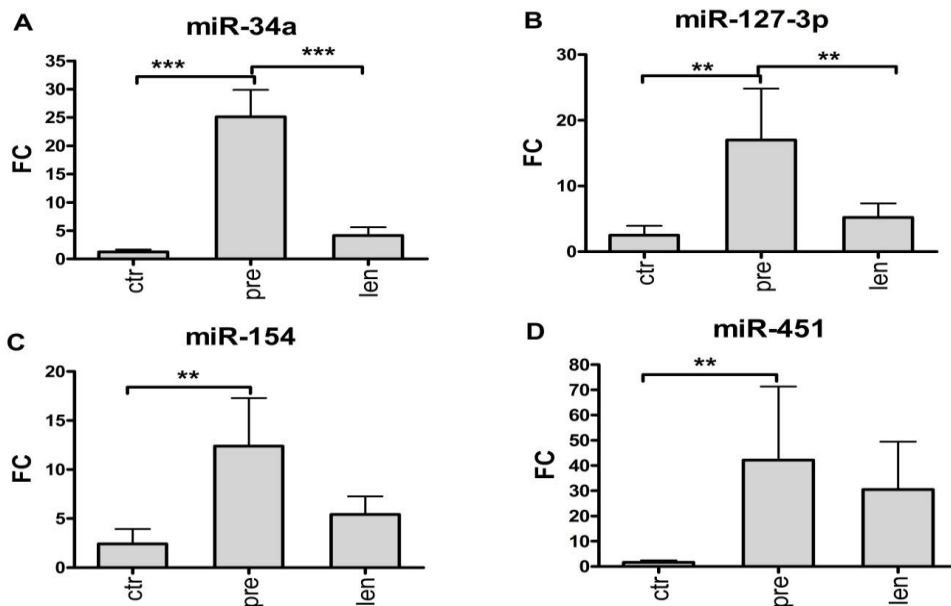
#### ***A.4. Expresní profil miRNA u nemocných s myelodysplastickým syndromem a 5q- aberací léčených lenalidomidem***

**Práce týkající se tohoto tématu byla odeslána k publikaci do European Journal of Hematology a je nyní v recenzním řízení (příloha 1).**

Vedle změněné exprese genů, které kódují specifické proteiny se zdá, že do patogeneze onemocnění zasahují i mikroRNA (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 závislost těchto změn na terapii lenalidomidem.

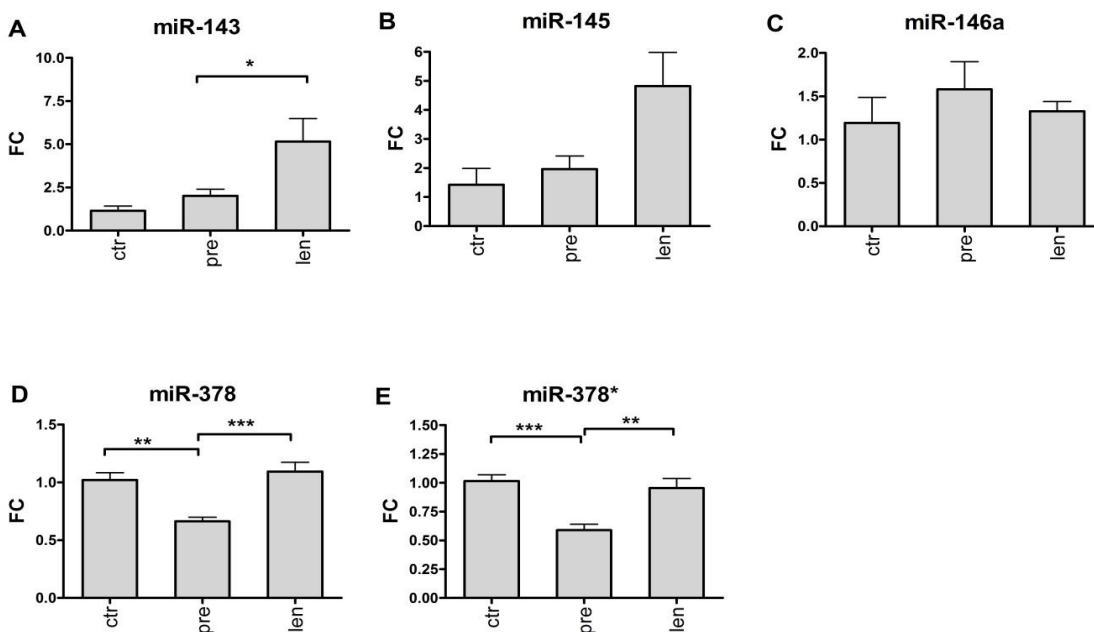
**Metody a výsledky.** Podrobný popis metod je v článku Dostálová Merkerová et al. viz příloha 1. Vyšetřovali jsme miRNA expresní profil u CD34 + buněk kostní dřeně a monocytů z periferní krve nemocných léčených lenalidomidem. Vyšetřeno bylo 12 nemocných ve věku od 55 do 78 let. Vzorky byly opět sbírány a hodnoceny těsně před terapií a v době první hematologické tedy erytrocytární odpovědi (dosažením transfuzní nezávislosti či normalizace hemoglobinu). Většina nemocných v době hodnocení nedosáhla ale ještě cytogenetické odpovědi. To znamená, že hodnoceni byli nemocní s ještě stále přítomným patologickým klonem. 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 (obrázek č. 18)



Obr. č. 18. Průměrné hladiny vybraných deregulovaných miRNA, s možným významem pro hemopoézu, jejich porovnání před terapií a v průběhu terapie v době odpovědi (2. měsíc) Jde o analýzu z mononukleárních buněk periferní krve. "

Vedle toho jsme měřili specificky exprese určitých miRNA kódovaných v CDR (miR-145,146,143, 378, 378\*) (obrázek č. 19).



Obr. č. 19. Změny průměrných relativních hladin miRNA, jejichž geny jsou lokalizované na CDR a u nichž předpokládáme haploinsuficienci. Jde o hodnoty před a v průběhu terapie lenalidomidem. Podle předpokladu jsme detekovali nízké relativní hladiny miRNA před terapií s výjimkou miRNA-146a. Analýza byla provedena na mononukleárních buňkách periferní krve nemocných s 5q- aberací a MDS s nízkým rizikem.



Zajímavým nálezem bylo výrazné zvýšení exprese 40 miRNA, které se shlukují v lokusu 14q32. Některé z těchto miRNA hrají roli v hematopoéze. Podrobný výčet změn exprese miRNA před a po terapii lenalidomidem u nemocných s 5q- syndromem je v textu přiloženého článku Dostálová Merkerová et al. příloha 1.

## **Imunosupresivní terapie, vztah k imunomodulační léčbě**

**K tomuto tématu se vztahuje publikace Jonášová et al., British Journal of Haematology, 1998 (příloha1).**

K imunomodulační terapii patří též zmínka o úspěších imunosupresivní terapie.

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 z roku 1998 (Jonášová et al., British Journal of Haematology, 1998, příloha 1). Naše práce byla první, která demonstrovala efekt této terapie u nízké rizikových MDS nemocných a byla jakýmsi úvodem do studia autoimunních a imunomodulačních mechanismů v selhání dřeně u MDS pacientů. Byť byla publikována před zahájením práce na tématech disertace patří svým významem a podílem na naší orientaci v klinickém výzkumu k tématu této dizertace.

Byla to podobnost některých forem hypoplastických forem MDS s aplastickou anémií, která vedla naši úvahu k tomu, že imunosupresivní terapie by mohla být úspěšná též u MDS. Od naší publikace 1998 má imunosupresivní terapie své místo v léčbě zvláště nízké rizikových nemocných. Pravděpodobně u určité skupiny nemocných s MDS autoimunní mechanismus iniciovaný autoagresivními T buňkami, obdobně jako je tomu u aplastické anemie, může způsobit selhání hematopoézy či její poruchu (Molldrem et al., 1998, Sloan et al., 2005). Ve většině klinických studií (antithymocytární globulin ATG s cyklosporinem (CyA) nebo CyA či ATG samostatně) je dosahováno odpovědi asi u 15-20% pacientů (Jonášová et al., 1998, Killik et al., 2003, Shimamoto et al., 2003). Podrobnější popis naší klinické studie a jejích výsledků je v příloze 1 Jonášová et al. 1998.

## **B. Studie k tématu epigenetická terapie - vztah k patogenezi onemocnění**

### ***B.1. Analýza dat nemocných léčených na I. interní klinice ve vztahu k změnám transkripčního faktoru PU.1 (úvod, metodika, výsledky, diskuse)***

**Výsledky této práce jsou součástí publikací: Curik et al., Leukemia 2012**

**Jonášová et al Transfuse a Hematologie dnes 2013 (příloha 1)**, byly presentovány na světovém MDS kongresu Edinburgh 2011, kongresu Americké hematologické společnosti ASH 2011, na kongresu České hematologické společnosti OHD 2014, 2011, Československém hematologickém sjezdu 2012 a na Bratislavských hematologických dnech 2013.

Předpokládáme, že porucha diferenciaci a kumulace nezralých dysplastických prekursorů bílé řady u nemocných s MDS s vyšším rizikem je způsobena sníženou expresí transkripčního faktoru PU.1 v progenitorových buňkách. Míra exprese *PU.1* může reflektovat hloubku poruchy diferenciaci a mít vliv na charakter onemocnění a jeho agresivitu, může též ovlivňovat efekt terapie demetylačními látkami. Exprese *PU.1* tedy může být prognostickým faktorem efektivity léčby a prognosy nemocného. V potlačení transkripce *PU.1* v MDS by mohla hrát roli aberantní zvýšená metylace DNA v oblasti URE, jež je významnou regulační oblastí pro expresi *PU.1*. Cílem této práce bylo analyzovat výsledky nemocných léčených azacitidinem na I. interní klinice a posléze korelovat naše klinická data s výsledky analýzy exprese *PU.1*, zjistit zda a jak hladiny PU.1 korelují s klinickou odpovědí na demetylační terapii a zda terapie azacitidinem vede k normalizaci snížené exprese *PU.1*. V případě, že tomu tak je, je zřejmé, že azacitidin může mít též zprostředkovaně efekt diferenciaci. Naše další otázka byla, zda tento diferenciaci 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 diferenciaci myeloidní řady a zvýšení efektu azacitidinu u nemocných s MDS s vyšším rizikem.

**Metody a výsledky.** Podrobná data jsou uvedena v práci Čuřík et al 2012, příloha 1.

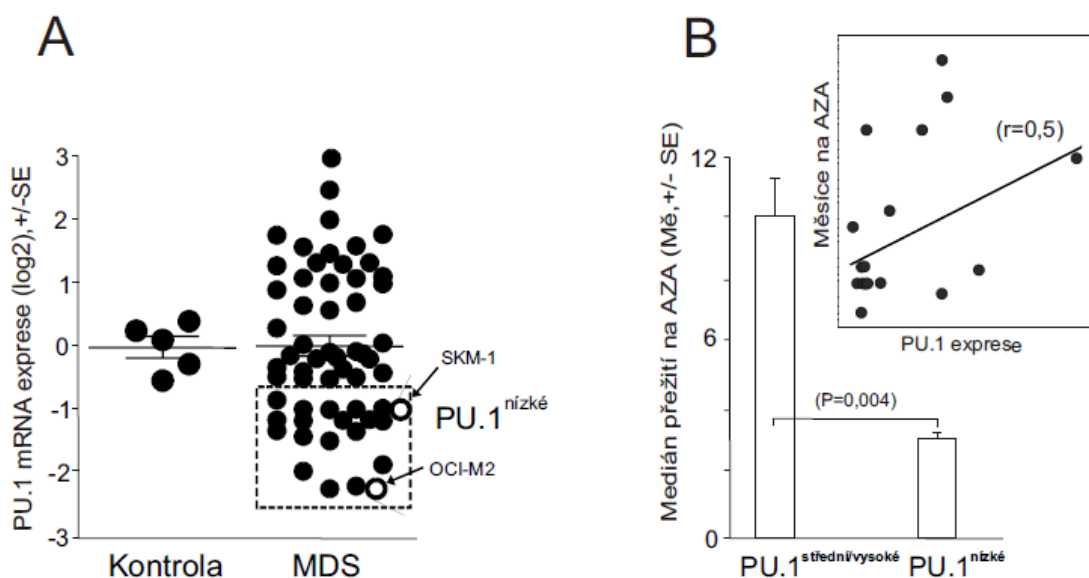
PU.1 byl analyzován v progenitorech pacientů s MDS se středním-II nebo vysokým rizikem (IPSS) a v modelových buněčných liniích pro MDS.

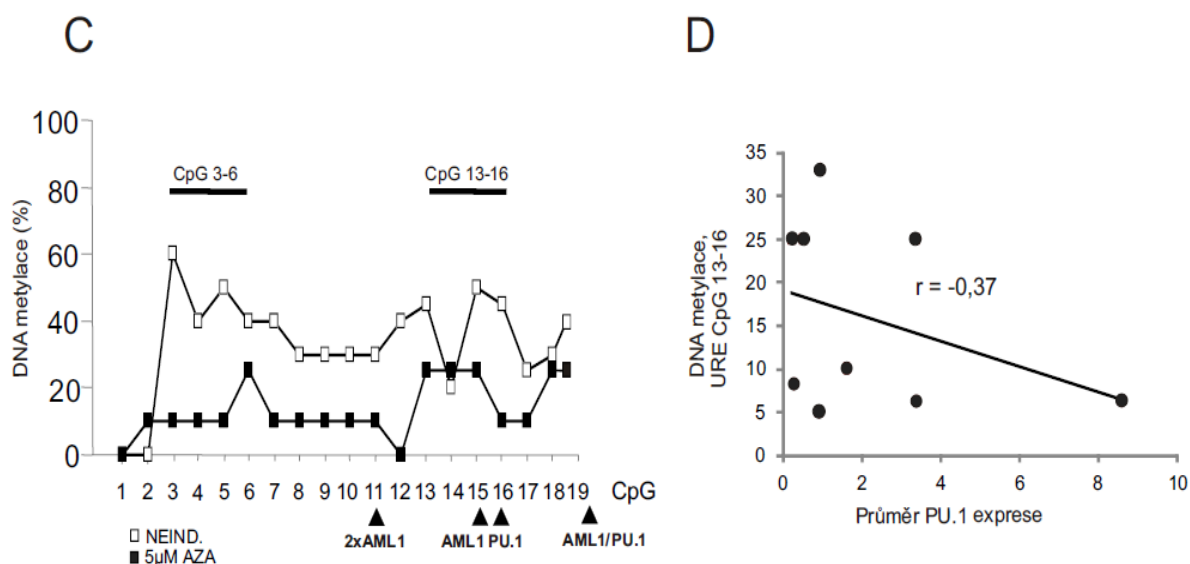
Od roku 2006 jsme shromáždili kostní dřeně (a periferní krve) od 44 nemocných v 54 nezávislých vzorcích. Odběry kostní dřeně se prováděly po získání informovaného souhlasu. Jde o pacienty s MDS vyšším rizikem (střední-2 a vysoké riziko podle IPSS) a AML. Soubor pacientů se skládá ze 32 mužů a 12 žen. Medián věku pacientů je 67 let (v rozmezí od 57 do 83 let). Diagnostické a prognostické zhodnocení bylo provedeno v souladu s postupem WHO: RAEB 1 (5 pacientů), RAEB 2 (17 pacientů), AML (s dysplazií ve třech liniích) s 20-30% blastů v kostní dřeni (12 pacientů), AML s dysplazií ve třech liniích a více než 30% blastů v kostní dřeni (9 pacientů) a erytroleukemií (1 pacient). 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 (viz příložená presentace Jonášová et al., 2013, příloha „Publikace k jednotlivým projektům“). Klinická data nemocných prezentuje tabulka č. 4

Tab. č 4. Klinické údaje 44 pacientů s vyšším rizikem MDS a MDS/AML pro všech (v 54 nezávislých vzorcích). V tabulce jsou uvedeny parametry: datum diagnózy, datum prvního cyklu azacitidinu, kódové označení vzorku, hladina PU.1 mRNA exprese v CD34+, věk pacienta, léčba azacitidinem (ANO/NE), diagnóza, prognóza onemocnění vycházející z cytogenetického nálezu, počet cyklů, teraspeutická odpověď (PD – progredující onemocnění; PR – částečná remise; HI – hematologické zlepšení; Cri – inkompletní remise (ne ve všech parametrech); SD – stabilní nemoc; NA – odpověď neznáma), status pacienta (žije/zemřel); doba celkového přežití (OS) na azacitidinu a OS od data diagnózy (měsíce).

Všichni pacienti													
Datum diagnózy	Datum 1.AZA	Označení	PU.1 mRNA	Věk	AZA	Vzorek	Diagnóza	Cytogenetika	#AZA cyklů	Odpověď	OS	OS na AZA (měsíce)	OS/Dg (měsíce)
29.7.2010	28.8.2010	V394	5,50	75	Ano	po 4.cyklu/PR	RAEB 2	špatná	7	PR	zemřel	10	11
27.4.2010	4.6.2010	V286	3,36	64	Ano	před AZA	RAEB 1	špatná	2	NA	zemřel	3	4
11.3.2010	28.4.2010	V259	2,94	82	Ano	před AZA	AML/MDS<30%	špatná	2	NA	zemřel	2	2
11.3.2010	28.4.2010	V259	2,48	82	Ano	před AZA	AML/MDS<30%	špatná	2	NA	zemřel	2	2
4.8.2005	11.5.2009	V210	2,47	60	Ano	před AZA	RAEB 1	dobrá	11	Cri	zemřel	11	60
18.10.2010		V367	2,43	69	Ano	před AZA	RAEB 2	špatná	NA	NA	NA	NA	NA
14.10.2009	18.12.2008	V186	2,39	62	Ano	po 4.cyklu/Cri	RAEB 2	špatná	13	CRI	zemřel	13	17
27.7.2010	23.11.2010	V333	1,97	58	Ano		AML/MDS		2		zemřel	2	4
19.4.2010	26.4.2010	V282	1,83	62	Ano	před AZA	AML/MDS<30%	špatná	1	PD	zemřel	10	11
14.10.2009	18.12.2008	V216	1,21	62	Ano	v relapsu	RAEB 2	špatná	13	CRI	zemřel	13	17
2002,7.6.2007 alloSCT	17.12.2008	V021	1,00	59	Ano	před AZA	RAEB 2	špatná	1	NA	zemřel	NA	84
2.12.2008	12.1.2009	V147	0,93	69	Ano		AML po terapii		1		zemřel	1	6
4.6.2008	26.5.2010	V249	0,92	75	Ano	před AZA	RAEB 2/NHL	dobrá	3	HI	zemřel	6	27
12.3.2009	11.5.2009	V170	0,70	78	Ano		RAEB-2	46 XY, IPSS 2,0.	9		zemřel	10	12
16.9.2010	22.3.2011	V332	0,70	69	Ano	před AZA	MPD/AML	špatná	3	PD	zemřel	3	6
4.8.2005	11.5.2009	V210	0,55	61	Ano	před AZA	RAEB I	dobrá	11	Cri	zemřel	4	60
2004 MDS del5q	5.11.2010	V344	0,49	65	Ano		progradovalo do MDS-RAEB 2		3		zemřel	3	84
31.05.11	6.6.2011	V469	0,49	73	Ano	před AZA	T-AML/MDS < 30%		1	NA	zemřel	1	1
6.5.2010	18.5.2010	V291	0,44	78	Ano	před AZA	RAEB 2		2	HI	zemřel	3	3
20.10.2010	21.2.2011	V371	0,44	59	Ano		RAEB 2		2		zemřel	4	8
4.4.2008	15.6.2009	V172	0,39	82	Ano	před AZA	RAEB 2	dobrá	2	NA	zemřel	3	16
14.10.2009	18.12.2008	V010	0,37	60	Ano	před AZA	RAEB 2	dobrá	4	NA	zemřel	4	4
29.5.2009	17.6.2009	V197	0,35	78	Ano		RAEB 2		3		zemřel	3	4
27.11.2008	16.8.2010	V140	0,21	65	Ano		RAEB 1-2		5		zemřel	5	26
18.3.2010	12.4.2010	V265	0,27	83	Ano	před AZA	RAEB2 /NHL		13	PR	žije	20	21
27.7.2010	28.6.2010	V285	2,99	67	Ano	před AZA	RAEB 1	střední	14	HI	žije	17	17
5.8.2010	16.9.2010	V335	0,39	67	Ano		AML M6		15		žije	15	16
11.1.2009	26.8.2010	V339	1,60	65	Ano	před AZA	AML/MDS<30%	střední	12	PR	žije	16	36
11.10.2010	8.11.2010	V361	3,37	69	Ano	před AZA	AML/MDS<30%	dobrá	9	PR	žije	13	14
27.7.2010	28.6.2010	P302	2,09	67	Ano	před AZA	RAEB 1	dobrá	14	HI	žije	17	17
21.12.2010	7.3.2011	V397	8,59	67	Ano	před AZA	AML/MDS<30%	špatná	10	Cri	žije	9	12
20.8.2010	1.2.2011	V406	3,96	66	Ano	před AZA	RAEB 2	střední	10	Cri	žije	10	16
31.1.2011	14.3.2011	V413	0,25	77	Ano	před AZA	MDS/AML do 30% MB		9	SO/HI	žije	9	11
20.1.2011	3.3.2011	V465	0,86	66	Ano		RAEB1 - RAEB II	střední	11		žije	9	11
12.7.2006		V002	2,08	66	NE	v diagnóze	AML/MLD	střední	NA	NA	zemřel	NA	1
26.5.2006		V003	0,69	65	NE	v diagnóze	RAEB 1	střední	NA	NA	zemřel	NA	27
5.6.2006		V005	1,99	57	NE	v diagnóze	RAEB 2	špatná	NA	NA	zemřel	NA	3
12.4.2007		V029	0,77	61	NE	v diagnóze	RAEB 2	dobrá	NA	NA	zemřel	NA	17
3.4.2007		V048	0,74	68	NE	v diagnóze	RAEB 2	dobrá	NA	NA	zemřel	NA	49
23.8.2007		V051	1,54	63	NE	v diagnóze	RAEB 2	střední	NA	NA	zemřel	NA	9
7.6.2007		V052	0,75	67	NE	v diagnóze	RAEB 2	špatná	NA	NA	zemřel	NA	9
2.10.2007		V053	0,43	59	NE	v diagnóze	RAEB 2	špatná	NA	NA	zemřel	NA	2
14.9.2007		V069	0,44	70	NE	v diagnóze	AML/MLD	dobrá	NA	NA	zemřel	NA	33
21.6.2006		V118	0,44	57	NE	v diagnóze	AML/MDS<30%	dobrá	NA	NA	zemřel	NA	30
15.11.2010		V133	0,69	71	NE	bez AZA	MDS RAEB I			NA	zemřel	NA	NA
8.8.2008		V158	1,47	68	NE	v diagnóze	AML/MLD	dobrá	NA	NA	zemřel	NA	9
12.3.2010		V171	0,89	79	NE	v diagnóze	AML/MDS<30%	špatná	NA	NA	zemřel	NA	NA
19.3.2009		V174	0,85	71	NE	v diagnóze	AML/MLD	střední	NA	NA	zemřel	NA	12
1.7.2008	2009 aloSCT	V182	2,74	60	NE	v diagnóze	AML/MLD	dobrá	NA	NA	žije	NA	41
31.5.2006		V183	0,87	72	NE		AML s MLD				zemřel		50
18.10.2010		P301	2,13	69	NE	v diagnóze	RAEB 2	špatná	NA	NA	NA	NA	2
18.10.2010		V367	2,43	69	NE	v diagnóze	RAEB 2	špatná	NA	NA	NA	NA	NA
18.10.2010		P301	2,13	69	NE	před AZA	RAEB 2	špatná	NA	NA	NA	NA	NA
7.6.2011		V476	0,50	65	NE	bez AZA	RAEB II	špatná		NA	žije	NA	NA

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 (příloha 1). Expres *PU.1* byla měřena v CD34 pozitivních buňkách nemocných s MDS na úrovni mRNA a byla srovnávána se zdravými kontrolami. Expres *PU.1* v progenitorech získaných od pacientů s MDS se středním-2 nebo vysokým rizikem (IPSS) je 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 hladinou exprese *PU.1* mají významně horší prognózu (při léčbě azacitidinem) pokud jde o dobu celkového přežití, než pacienti se střední a vysokou expresí *PU.1* (obrázek č. 20)





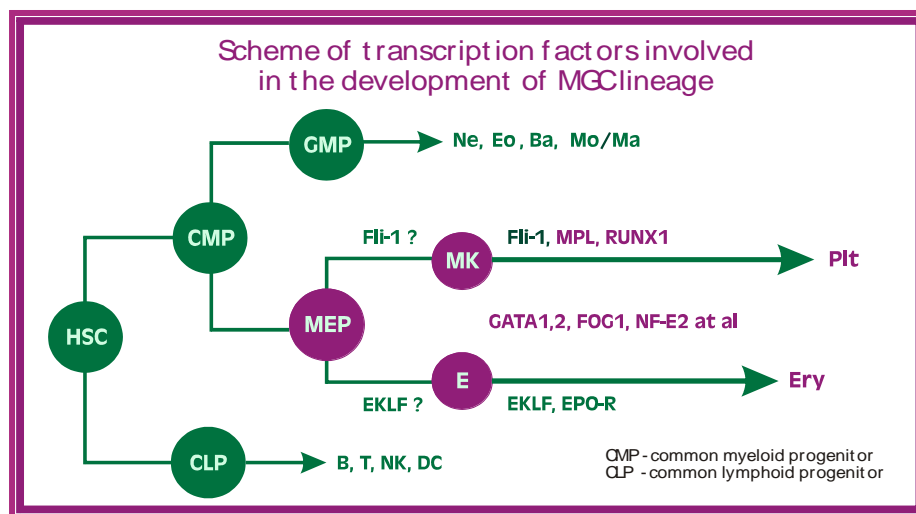
Obr. č. 20. (A) Expresse mRNA *PU.1* v  $CD34^+$  progenitorech ze vzorků pacientů s MDS. Hodnoty *PU.1* exprese v buňkách zdravých dárců (kontroly) - vpravo, a pacientů s vyšším rizikem - vlevo. Údaje jsou normalizovány na průměr exprese genů *HPRT1* a *GAPDH* a vztaheny k průměru exprese v buňkách kontrol. Šipky ukazují na bílá kolečka označující expresi *PU.1* v modelových buněčných liniích pro MDS – *OCI-M2* a *SKM-1*. Vzorky pacientů s nízkou hladinou *PU.1* jsou zahrnuty do rámečku z přerušovaných čar. (B) Medián přežití pacientů s MDS (v měsících) na léčbě azacitidinem. Dvě skupiny pacientů: se střední/vysokou expresí *PU.1* (N=8) a s nízkou expresí *PU.1* (N=9). V rámečku je zobrazen vztah mezi délkou přežití pacienta při léčbě azacitidinem a hladinou *PU.1* exprese. (C) Analýza DNA metylace v regulační oblasti URE genu *PU.1* v buňkách *OCI-M2*. Analýza zachycuje stav metylace na 19 CpG ostrůvcích před (bílé čtverce) a po působení azacitidinu ( $5 \mu\text{M}$  po 72 hodin, tmavé čtverce). Trojúhelníky pod osou X jsou vazebná místa transkripčních faktorů *PU.1* a *AML1*. Zvýrazněny jsou CpG ostrůvky 3-6 a 13-16, kde byla původní úroveň DNA metylace nejvyšší. (D) Korelační analýza mezi průměrnou DNA metylací na CpG ostrůvcích 13-16 v oblasti URE a průměrnou expresí *PU.1* v souboru pacientů s MDS s vyšším rizikem (N=9). (další eventální detaily lze dohledat v publikaci Čuřík et al., 2012, příloha 1)

Výsledky studie DNA metylace oblasti URE (Čuřík et al., 2012, příloha 1) ukazují, že 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 ostrůvcích 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. Dále jsme sledovali účinek azacitidinu na zvýšení exprese *PU.1* a navození myeloidní diferenciace v modelových buněčných liniích pro MDS a zjistili jsme, že azacitidin vede ke zvýšení exprese *PU.1* a navození diferenciace buněk, které navíc pravděpodobně lze ovlivňovat cytokiny podporujícími růst myeloidních kolonií. Předchozí 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 na myších.

## 5. Diskuse

### 5.1. Diskuse k tématu A.1. Analýza exprese genů transkripčních faktorů *Fli 1* a *EKLF* (*Friend leukemia virus integration 1* a *erythroid Krüppel-like factor*) a dalších transkripčních faktorů u nemocných s 5q- aberací a jejich změny při terapii lenalidomidem.

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* (obrázek č. 21)



Obr. č. 21. Vývoj hemopoézy, diferenciace do jednotlivých řad, role transkripčních faktorů *Fli 1* a *EKLF* v diferenciaci společné progenitorové buňky (MEP : megakaryocytární a erytroidní progenitor)

*EKLF* je důležitý transkripční faktor pro erytropoézu. Je exprimován v erytroidních buňkách a makrofázích, je důležitým faktorem v erytroidní diferenciaci, ale též ve změně produkce  $\gamma$  globinu v  $\beta$  globin (Luo et al., 2004, Donze et al., 1995, Tallac et al., 2010). *Fli-1* je důležitý transkripční faktor megakaryopoézy a potencionální onkogen (Eisbacher et al., 2003, Fuhrken et al., 2008). Myši s inaktivací – “knockout“ *Fli-1* produkují malé nediferencované megakaryocyty (Starck et al., 2010, Kawada et al., 2001). *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 reguluje pravděpodobně hladinu p53 přes ubiquitin-ligázu MDM2 a vede tak k degradaci p53 v proteasomu (Truong et al., 2005). Tento fakt by mohl vysvětlovat proliferaci megakaryocytární řady s naprodukcí trombocytů, což patří k typickému obrazu 5q- syndromu. Sledování exprese p53 v různých buněčných liniích ve dřeni je součástí našeho dalšího výzkumu. V naší studii jsme tedy potvrdili náš předpoklad antagonismu dvou důležitých transkripčních faktorů pro erytropoézu a megakaryopoézu, EKLF a Fli 1, pro skupinu 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). Zajímavé je, že nemocní s tímto klinickým obrazem tedy specificky s 5q- delecí, anemií a trombocytémií, jsou nemocní, kteří mají jednoznačně z celé skupiny MDS nejlepší prognózu. Je tedy otázkou jakou roli výše uvedené faktory mají i z tohoto hlediska, tedy vlivu na nízký potenciál malignizace v této skupině MDS. Tato otázka je předmětem našich budoucích studií. Zatím jsme v naší práci prokázali, že nemocní s 5q- aberací a trombocytopenií se významně liší od klasického 5q- syndromu byť nemají další negativní prognostické faktory (Jonášová et al., 2012, příloha 1). U těchto nemocných představuje právě trombocytopenie zřetelně negativní prognostický faktor. Jak je tento klinický obraz vázán na změny uvedených faktorů je opět předmětem dalšího výzkumu.

Terapie lenalidomidem, jak uvádíme na příkladu průběhu krevního obrazu naší nemocné viz výše, vede k reverzi v krevním obraze. U všech respondentů dochází k navýšení hemoglobinu, což odráží odpověď nemocného, ale prakticky vždy terapie lenalidomidem vede k poklesu trombocytů (List et al., 2006, Fenaux et al., 2011, Sekeres et al., 2008). Sledovali jsme proto změny Fli1 a EKLF v návaznosti na terapii lenalidomidem. Oba faktory vykazovaly relativně významné změny hladin mRNA po terapii lenalidomidem. Analýzy dalších faktorů (MDM2, PU-1, IL-6), které výše uvádíme, a které se velmi pravděpodobně zúčastňují etiopatogeneze onemocnění a úzce spouvisí s aktivitou jak EKLF tak Fli1, je nutné ověřit na větším množství vzorků z kostních dření (Hodge et al., 2002, Starck et al., 1999). 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 aktivitu p53, její snížení a tím vysvětlení menší



erytroidní apoptózy. Naším dalším krokem je sledování hladin p53, Fli1 a EKLF na úrovni proteinů specificky v červené a megakaryocytární linii. Otázkou ovšem také je, nevede-li snížení p53 vedle kýžené menší apoptózy červené řady k ohrožení nemocného možnou progresí onemocnění.

Lenalidomid byl povolen v Evropě v indikaci 5q- syndromu koncem roku 2013, proto až nyní budeme moci analyzovat větší množství nemocných.

**Na základě naší dosavadní analýzy v souladu s naším 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 „cross-antagonismu“.**

## ***5.2 Diskuse k tématu A.2. Analýza exprese cereblonu (CRBN) u nízké rizikových nemocných s MDS s 5q- a vztah exprese cereblonu k efektivitě lenalidomidu***

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 primárně 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). Z těchto prací vyplývá, že určitá úroveň exprese CRBN je nutná k aktivitě lenalidomidu a dalších imunomodulačních preparátů a CRBN byl identifikován jako vazebné místo pro imunomodulační léky. 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). Vazbou lenalidomidu na CRBN dochází k též k inhibici IRF4

(interferon regulatory factor 4), který je důležitý v proliferaci myelomových buněk (Schuster et al., 2014). Výše uvedená data vztahují vazbu imunomodulačních preparátů, v našem případě lenalidomidu, na CRNB k jejich efektu a předpokládanému cytotoxickému účinku u mnohočetného myelomu. 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 prezentujeme vztah CRBN a aktivity imunomodulační terapie representované lenalidomidem u MDS, specificky nemocných 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, jak je patrné z našeho grafu někteří nemocní dosahovali úrovně hladin nemocných s 5q-. Samozřejmě, neboť lenalidomid není pro tuto skupinu nemocných u nás povolen, 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. **Domníváme se, že velmi podobně jako u mnohočetného myelomu i u 5q- syndromu vyšší hladiny CRBN mRNA reflektující vyšší expresi *CRNB* genu, jsou nezbytné k účinku lenalidomidu.**

Otázkou je k jakým dějům dochází po vazbě lenalidomidu na CRBN. V současné době naše práce pokračuje a jejím dalším cílem je identifikace následných dějů po inhibici CRBN lenalidomidem. Naše další hypotéza je založena na předpokladu že CRBN může inhibovat AMPK (5'- adenosine monofosfát-aktivovanou protein kinázu). Inhibice AMPK pak vede k aktivaci MDMX (murine double minute X-jinak též MDM4) a mTOR (mammalian target of rapamycin) "pathway", což může být spojeno s redukcí aktivity p53 a následně pak menší apoptózou erytroidní linie a navýšením hemoglobinu.

## ***5.2. Diskuse k tématu A.3. Změny exprese genů v průběhu léčby lenalidomidem, expresní genový profil před terapií a v době odpovědi***

V patogenezi MDS se účastní akcelerovaná předčasná apoptóza, imunitní disregulace a aktivace či disregulace určitých cytokinů (Katsoulidis et al., 2005, Breccia et Alimena, 2010, Kornblau et al., 2010). Předpokládá se, že jak aberantní exprese určitých prozánětlivých cytokinů tak faktorů TNF dráhy se velmi pravděpodobně zúčastňují patogeneze MDS a akcelerace apoptózy (Kitagawa et al., 1997, Sawanobori et al., 2003, Rusten et al., 1995). Specificky u 5q- byly popsány změny exprese 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- $\alpha$ , interleukin 6 a naopak stimuluje IL-2 a interferon  $\gamma$  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 se snažili pomocí změn genové exprese v průběhu terapie lenalidomidem identifikovat změny, které by pomohly přispět k našim znalostem o patogenetických mechanismech samotného onemocnění a efektů lenalidomidu. Navázali jsme na předchozí práce, které se zabývaly expresním genovým profilem pomocí celogenomové analýzy k identifikaci určitých genů či skupin genů, které mohou hrát roli v patogenezi MDS (Vasikova et al., 2010, Pellagati et al., 2010, Boutwood et al., 2007).

Většina prací se ale zabývala změnami genové exprese u celé skupiny MDS, která je značně heterogenní a diferencované jsou i odpovědi nemocných na stávající terapii. MDS s izolovanou delecí 5q- reprezentuje zvláštní podskupinu MDS se svou specifickou klinikou a především, což nás zvláště zajímá, svou výjimečnou odpovědí na imunomodulační preparát, lenalidomid. My jsme se proto na rozdíl od předchozích autorů orientovali a snažili popsat změny genové exprese u 5q- a navíc v reakci na terapii. Před terapií jsme našli významně změněné hodnoty prozánětlivých cytokinů jako jsou TNF alfa, IL-6, IL-8, IL-1 beta, CXCL2 a TNF AIP3. Vedle toho jsme podobně jako Pellagati et al. též identifikovali deregulaci určitých drah a překvapivě spíše „downregulaci“ genů, které jsou důležité v imunitních dějích obecně (Pellagati et al., 2010, Aggraval et al., 2011). 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 modulační imunitních dějů, zánětlivé reakce, apoptóza, proliferace buněk a popsána byla i jeho přímá suprese erythropoézy (Rusten et al., 1995). V naší studii u většiny nemocných jsme našli signifikantní „downregulaci“ TNF a genů TNF dráhy po terapii lenalidomidem. 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 účastníci se progresu buněčného cyklu *CDKN1A/p21*, dráhy p53 a pro-apoptotických procesů.

U každého nového preparátu a zvláště u léku, které zasahuje do imunitních dějů je vždy otázkou, zda je jeho podávání zcela bezpečné stran ovlivnění procesů, které by následně mohly vést k progresi choroby. I v naší studii jsme zaznamenali výrazně zvýšenou expresi genu *ARPC1B*, který je aktivátorem a substrátem Aurory A, jež má vliv na buněčné dělení a její vyšší exprese vede k chromosomální nestabilitě a polyploidii. Zatím se z dosavadních klinických výsledků jeví lenalidomid jako bezpečný preparát (Germinig et al., 2012, Kuendgen et al., 2012)

**Závěrem lze konstatovat, že jsme doložili vliv lenalidomidu na změny expresí 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 projevu onemocnění, a které jsou důležité v odpovědi na léčbu.**

#### ***5.4. Diskuse týkající se A.4. Expresní profil miRNA u nemocných s myelodysplastickým syndromem a 5q- aberací léčených lenalidomidem***

U nemocných s aberací 5. chromosomu jsou známé haploinsuficience genů ležících na deletovaném úseku. Nejvýznamnější se z hlediska patogeneze onemocnění zdají haploinsuficience genů pro malou ribosomální podjednotku 14 (*RPS14*) a *SPARC* genu (Pellgati et al., 2008, Oliva et al., 2010). U obou genů též byl popsán návrat normálních hodnot exprese po terapii lenalidomidem. Jak uvádíme v naší předchozí práci i další geny a jejich změněné exprese se zúčastňují patogenetických mechanismů vzniku onemocnění či alespoň jeho fenotypu. Jsou to geny TNF dráhy, dále geny většinou prozánětlivých cytokinů

(Belickova et al., 2012). Vedle změněné exprese genů, které kódují specifické proteiny se zdá, že do patogeneze onemocnění zasahují i mikroRNA (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. 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). D. Starczynowski identifikoval cílové proteiny těchto miRNA, jsou to pro miR-145 TIRAP a pro miR-146 TRAF6. Dalším významným cílem pro miR-145 je Fli-1 (Truong et al., 2005). 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 velmi pravděpodobně složitější a nelze vysvětlit pouze na úrovni snížené exprese jen několika miRNA 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). Z podrobnější diskuse článku vybírám zde jednotlivá zajímavá fakta. 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 pro-apoptotické (Nohata et al., 2012). Pokles hladin miR-34, která je přímým pro-apoptotickým 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 diferenciace (Bruchova et al., 2007). Analyzovali jsme též relativní hladiny mRNA miRNA, které jsou lokalizované na CDR a kde předpokládáme jejich haploinsuficienci. Jak ukazuje obrázek č. 14 u většiny až na miR-146 jsme našli sníženou expresi a její zvýšení po terapii. Přes to je překvapující, že exprese před terapií byly opravdu nízké a odpovídaly předpokládané haploinsuficienci pouze u miR-378. Erdogan et al. označil deregulaci miR-378 a její sníženou expresi jako diskriminační znak diagnózy MDS (Erdogan et al., 2011). 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 přinášející eventuální predikci na odpověď terapie lenalidomidem a najít jejich bližší patofyziologický význam. Nicméně i tak naše práce přináší další zajímavá data napomáhající k rozuzlení spleťtých patogenetických dějů a eventuálně i mechanismu lenalidomidu u 5q- MDS.

## ***5.5. Diskuse ke studii B1 Analýza dat nemocných léčených na I. interní klinice ve vztahu k změnám transkripčního faktoru PU.1 (úvod, metodika, výsledky, diskuse)***

Inhibitor DNA metyltransferázy DNMT1 azacitidin je klinicky velice úspěšným lékem (Fenaux et al. 2009, Silverman et al., 2002). Mechanismus účinku však není ještě detailně objasněn. 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. Analýza byla umožněna celkem již velkým souborem nemocných s MDS s vysokým rizikem, léčených AZA na I. Interní klinice, kde byla též terapie AZA v České republice iniciována (Jonášová et al, THD, 2013). Transkripční faktor PU.1 je klíčovou molekulou řídící proces krvetvorby. Ztráta jeho funkce má za následek různé stupně poruchy diferenciaci prakticky všech krevních buněčných linií. Zvláště proces myeloidní diferenciaci pluripotentní krevní kmenové buňky je iniciován PU.1. (Laslo et al., 2006, Scott et al., 1994). PU.1 řídí liniovou determinaci v závislosti na hladině svojí exprese v buňkách (De Koter et al., 2008, Okuno et al 2005). Expresse genu *PU.1* je řízena z několika regulačních oblastí. Mezi nimi zaujímá přední postavení oblast URE, která obsahuje řadu vazebných míst pro různé transkripční faktory včetně PU.1 samotného (Okuno et al., 2005). Delece oblasti URE má za následek

snížení exprese *PU.1* o 80% a rozvoj AML (Rosenbauer et al., 2004). Mutace v oblasti URE je u člověka spojována s agresivními formami AML (Mueller et al., 2002, Steidel et al., 2007). U mnohočetného myelomu bylo popsáno snížení hladiny *PU.1* v důsledku aberantní zvýšené metylace DNA v oblastech URE a promotoru genu (Tatetsu et al., 2007). Hematologické malignity mohou souviset nejen s mutacemi, ale také s epigenetickým utlumením exprese *PU.1*. U MDS jistě dochází k poruše myeloidní diferenciaci krvetvorných progenitorů. Předpokládali jsme tedy, že porucha diferenciaci a kumulace nezralých dysplastických prekursorů bílé řady u nemocných s MDS s vyšším rizikem je způsobena sníženou expresí transkripčního faktoru *PU.1* v progenitorových buňkách. Míra exprese *PU.1* může reflektovat hloubku poruchy diferenciaci a mít vliv na charakter onemocnění a jeho agresivitu, může též ovlivňovat efekt terapie demetylačními látkami. Exprese *PU.1* tedy může být prognostickým faktorem efektivity léčby a prognosy nemocného. V potlačení transkripce *PU.1* v MDS by mohla hrát roli aberantní zvýšená metylace DNA v oblasti URE, jež je významnou regulační oblastí pro expresi *PU.1*.

Roli *PU.1* u MDS potvrzují i výsledky této práce. 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 celkem jasně vztažena k charakteru onemocnění, tj. k agresivnějším formám. Nemocní s nízkou expresí *PU.1* před zahájením terapie měli výsledně kratší celkové přežívání. Exprese *PU.1* tedy v podstatě může představovat prognostický faktor 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* z progenitorech nemocných s MDS koreluje s úrovní její metylace. 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 diferenciaci. Účinek azacitidinu na expresi *PU.1* a navození myeloidní diferenciaci 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.

Problémem současné epigenetické-demetylační terapie je její omezené trvání. Výsledky jsou sice mnohem pozitivnější než u do nedávna používané chemoterapie a očekávaná doba přežívání je delší, ale i tak u naprosté většiny nemocných celkové přežívání nepřesahuje 20-24 měsíců a to i u nemocných, kteří dosáhli kompletní remise. Co se skrývá za postupným

selháváním efektu léku není jasné. Na tuto otázku se snažila najít ve spolupráci s námi analýzou i našich nemocných M. Dluhošová z výzkumné skupiny Doc. Stopky (Dluhošová et al., 2014, příloha 2). I v tomto případě plánujeme další studie. V současné době probíhá rozsáhlá analýza vývoje nejčastěji se vyskytujících mutací u MDS. Nejde jen o analýzu samotných mutací a identifikaci jejich významu stran patogeneze onemocnění, ale co je důležité k určení jejich prognostického významu a vztahu k odpovědi na terapii. Sledován bude vývoj mutací v průběhu léčby. Předpokládáme, že tak budeme moci sledovat eventuální vznik dalších rezistentních klonů a pomoci odpovědět právě na výše uvedené selhávání terapie.



## 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 deregulaci 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 demethylaci URE.**  
**Azacitidin pravděpodobně vede k obnovení diferenciace myeloidních prekursorů nemocných s MDS, tento účinek může být potencován růstovými faktory myeloidní řady.**

## Literatura

1. Aggarwal S, van de Loosdrecht AA, Alhan C, et al. Role of immune responses in the pathogenesis of low-risk MDS and high-risk MDS: implications for immunotherapy. *Br J Haematol* 2011, 153(5): 568-581.
2. 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.
3. Aul C, Bowen D, Yoshida TY. Pathogenesis, etiology and epidemiology of myelodysplastic syndromes. *Haematologica* 1998, 83(1): 71-86.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol.* 1982, 51: 189–199.
9. Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* 2002, 16(1): 6–21.
10. 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.

11. Boultonwood J, Pellagatti A, McKenzie AN, et al. Advances in the 5q- syndrome. *Blood* 2010, 116: 5803–5811.
12. Boultonwood J, Pellagatti A, Cattani H, et al. Gene expression profiling of CD34+ cells in patients with the 5q- syndrome. *Br J Haematol.* 2007, 139(4): 578-589.
13. Brakensiek K, Länger F, Schlegelberger B, et al. Hypermethylation of the suppressor of cytokine signalling-1 (SOCS-1) in myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol.* 2005, 130: 209-217.
14. Breccia M, Alimena G. NF- $\kappa$ B as a potential therapeutic target in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. *Expert Opin Ther Targets* 2010, 14: 1157-1176.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. Buesche G, Dieck S, Giagounidis A. Anti-angiogenic in vivo effect of lenalidomide (CC-5013) in myelodysplastic syndrome with del(5q) chromosome abnormality and its relation to the course of disease. *Blood* 2005, 106: Abstract 372.
19. 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.

20. Cazola M, DellaPorta MG, Malcovati L. The genetic basis of myelodysplasia its clinical relevance. *Blood* 2013 Dec 12, 122(25): 4021-4034.
21. Cermák J, Jonášová A. *Transfuze Hematol. Dnes* 2010, 16: 38-44.
22. Chavali V, Tyagi SC, Mishra PK. MicroRNA-133a regulates DNA methylation in diabetic cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012, 425(3): 668-672.
23. Choong ML, Yang HH, McNiece I. MicroRNA expression profiling during human cord blood-derived CD34 cell erythropoiesis. *Exp Hematol.* 2007, 35(4): 551-564.
24. 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.
25. Cook W D, McCaw B J, Herring C, et al. PU.1 is a suppressor of myeloid leukemia, inactivated in mice by gene deletion and mutation of its DNA binding domain. *Blood* 2004, 104: 3437-3444.
26. 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.
27. 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 Aug, 26(8): 1804-1811.
28. Damaj G, Duhamel A, Robin M, et al. Impact of Azacitidine Before Allogeneic Stem-Cell Transplantation for Myelodysplastic Syndromes: A Study by the Societe Francaise de Greffe de Moelle et de Therapie-Cellulaire and the Groupe-Francophone des Myelodysplasies. *J Clin Oncol.* 2012 Dec 20, 30(36): 4533-4540.

29. DeKoter R P, Singh H. Regulation of B lymphocyte and macrophage development by graded expression of PU.1. *Science* 2000, 288: 1439-1441.
- 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.
30. Donze D, Townes TM, Bieker JJ. Role of erythroid Krüppel-like factor in human gamma-to beta-globin gene switching. *J Biol Chem.* 1995, 270: 1955–1959.
31. Doré LC, Crispino JD. Transcription factor in erythroid cell and megakaryocyte development. *Blood* 2011, 118: 231–239.
32. 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.
33. Dredge K, Marriott JB, Macdonald CD, et al. Novel thalidomide analogues display anti-angiogenic activity independently of immunomodulatory effects. *Br J Cancer.* 2002, 87: 1166–1172.
34. 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.
35. 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.
36. Eden A, Gaudet F, Waghmare A, Jaenisch R. Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation. *Science* 2003; 300(5618): 455.
37. 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.
38. Erdogan B, Facey C, Qualtieri J, et al.: Diagnostic microRNAs in myelodysplastic syndrome. *Exp Hematol.* 2011, 39(9): 915-926.

39. 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.
40. 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.
41. Fenaux P, Mufti GJ, Hellström-Lindberg E, et al. Azacitidine prolongs overall survival compared with conventional care regimens in elderly patients with low bone marrow blast count acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol.* 2010 Feb 1, 28(4): 562-569.
42. Figueroa 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.
43. Figueroa 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.
44. 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.
45. Germing U, Lauseker M, Hildebrandt B, et al. Survival, prognostic factors and rates of leukemic transformation in 381 untreated patients with MDS and del(5q): a multi-center study. *Leukemia* 2012, 26: 1286–1292.
46. Graves B J and Petersen J M. Specificity within the ets family of transcription factors. *Adv. Cancer Res.* 1998, 75: 1–55.
47. 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).
48. Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, et al. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood* 2012 Sep 20, 120(12): 2454-2465.

49. Grövdal M, Khan R, Aggerholm A, et al. Maintenance treatment with azacitidine for patients with high risk myelodysplastic syndromes or acute myeloid leukaemia in complete remission after intensive chemotherapy. *Br J Haematol.* 2010 Aug, 150(3): 293-302.
50. Grövdal M, Karimi M, Hellström-Lindberg E, et al. Azacitidine induces profound genome-wide hypomethylation in primary myelodysplastic bone marrow cultures but may also reduce histone acetylation. *Leukemia* 2014 Feb, 28(2): 411-413.
51. 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.
52. 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.
53. 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.
54. 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.
55. Heise C, Carter T, Schafer P, Chopra R. Pleiotropic mechanisms of action of lenalidomide efficacy in del(5q) myelodysplastic syndromes. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2010, 10: 1663–1672.
56. Hellstrom-Lindberg E, Giagounidis A, Fenaux P, et al. Update on the safety and long-term outcomes in lenalidomide-treated patients with red blood cell transfusion-dependent low-/intermediate-risk myelodysplastic syndromes and del(5q). *Haematologica* 2012, 97(Suppl 1): 358–359.
57. Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med.* 2003, 349: 2042–2054.
58. 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.



59. 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.
60. Hopfer O, Komor M, Koehler IS et al. Aberrant promotor methylation in MDS hematopoietic cells during in vitro lineage specific differentiation is differently associated with DNMT isoforms. *Leuk Res.* 2009, 33(3): 434–442.
61. Irizarry RA, Ladd-Acosta C, Wen B, et al. The human colon cancer methylome shows similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores. *Nat Genet.* 2009, 41(2): 178–186.
62. Ito T, Ando H, Suzuki T, et al. Identification of a primary target of thalidomide teratogenicity. *Science* 2010, 327: 1345-1350.
63. Itzykson R, Fenaux P. Epigenetics of myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 2014 Mar, 28(3): 497-506.
64. 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.
65. Jädersten M, Saft L, Mufti GJ, et al. TP53 mutations in low-risk myelodysplastic syndromes with del(5q) predict disease progression. *J Clin Oncol.* 2011 May 20, 29(15): 1971-1979.
66. 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.
67. 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.
68. 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.

69. Jonášová A, Myelodysplastické syndromy – pokroky v terapii v posledních dvou desetiletích. *Vnitr Lek.* 2013;59:635-640.
70. Jonášová 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. *Tranfuse hematologie dnes* 2013, 19: 125-133.
71. Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer. *Cell* 2007, 128(4): 683–692.
72. Kamath M B, Houston I B, Janovski A J, et al. Dose-dependent repression of T-cell and natural killer cell genes by PU.1 enforces myeloid and B-cell identity. *Leukemia* 2008, 22: 1214-1225.
73. 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.
74. Kautiainen TL, Jones PA . Dna methyltransferase levels in tumorigenic and nontumorigenic cells in culture. *J Biol Chem.* 1986, 261(4): 1594–1598.
75. Kawada H, Ito T, Pharr PN, et al. Defective megakaryopoiesis and abnormal erythroid development in Fli-1 gene-targeted mice. *Int J Hematol.* 2001, 73: 463–468.
76. Killick SB, Mufti G, Cavenagh JD, et al. A pilot study of antithymocyte globulin (ATG) in the treatment of patients with ‘low-risk’ myelodysplasia. *Br J Haematol.* 2003 Feb, 120(4): 679-684.
77. 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.
78. 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.
79. Kuendgen A, Lauseker M, List AF, et al. Lenalidomide does not increase AML progression risk in RBC transfusion-dependent patients with Low- or Intermediate-1-risk MDS with del(5q): a comparative analysis. *Leukemia* 2012, 27(5): 1072–1079.

80. Kulasekararaj AG, Smith AE, Mufti GJ, et al. TP53 mutations in myelodysplastic syndrome are strongly correlated with aberrations of chromosome 5, and correlate with adverse prognosis. *Br J Haematol.* 2013, 160: 660-672.
81. 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.
82. 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.
83. Laslo P, Laslo P, Spooner C J, et al. Multilineage transcriptional priming and determination of alternate hematopoietic cell fates. *Cell* 2006, 126: 755-766.
84. 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.
85. Lodé L, Amiot M, Maiga S, et al. Cereblon expression in multiple myeloma: not ready for prime time. *Br J Haematol.* 2013, 163: 282-284.
86. 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.
87. Luo Q, Ma X, Wahl SM, et al. Activation and repression of interleukin-12 p40 transcription by erythroid Krüppel-like factor in macrophages. *J Biol Chem.* 2004, 279: 18451-18456.
88. 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.
89. 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.

90. Mueller B U, Pabst T, Osato M, et al. Heterozygous PU.1 mutations are associated with acute myeloid leukemia. *Blood* 2002, 100: 998-1007.
91. 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.
92. Narla A, Ebert BL. Ribosomopathies: human disorders of ribosome dysfunction. *Blood* 2010, 115: 3196–3205.
93. Neuwirtová R, Mociková K, Musilová J, et al. Mixed myelodysplastic and myeloproliferative syndromes. *Leuk Res.* 1996 Sep, 20(9): 717-726.
94. 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.
95. Neuwirtová R, Zemanová Z, Březinová J, et al. Jsme oprávněni zařadit nemocné s dvěma samostatnými buněčnými klony a to delecí 5q a trizomií 8 jako podskupinu myelodysplastického syndromu? *Transfuze a hematologie dnes* 2014, 20: 25-31.
96. 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.
97. 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.
98. Oliva EN, Cuzzola M, Nobile F, et al. Changes in RPS14 expression levels during lenalidomide treatment in Low- and Intermediate-1-risk myelodysplastic syndromes with chromosome 5q deletion. *Eur J Haematol.* 2010, 85(3): 231-235.
99. 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
100. 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.
101. Pedersen-Bjergaard J, Andersen MK, Christiansen DH, Nerlov C. Genetic pathways in therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia. *Blood* 2002, 99(6): 1909-1912.

102. Pellagatti A, Hellström-Lindberg E, Boulwood J, et al. Haploinsufficiency of RPS14 in 5q- syndrome is associated with deregulation of ribosomal- and translation-related genes. *Br J Haematol.* 2008 Jul, 142(1): 57-64.
103. 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.
104. Pellagatti A, Cazzola M, Giagounidis A, et al. Deregulated gene expression pathways in myelodysplastic syndrome hematopoietic stem cells. *Leukemia* 2010, 24: 756-764.
105. Pogribny I, Beland FA. DNA hypomethylation in the origin and pathogenesis of human diseases. *Cell Mol Life Sci.* 2009, 66: 2249–2261.
106. 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.
107. 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.
109. 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.
110. Rhee I, Bachman KE, Park BH, et al. DNMT1 and DNMT3b cooperate to silence genes in human cancer cells. *Nature* 2002, 416(6880): 552–556.
111. 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.
112. 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.
113. Rountree M R, Bachman K E, Baylin S B. DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication foci. *Nat Genet.* 2000, 25: 269-277.

114. 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.
115. 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.
116. 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.
117. Schuster SR, Kortuem MK, Yhu XY, et al. The clinical significance of cereblon expression in multiple myeloma. *Leuk Res.* 2014, 38(1): 23-28.
118. 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.
119. Sekeres MA., Myciejewski JP, Giagounidis AA, et al., Relationship of treatment-related cytopenias and response to lenalidomide in patients with lower-risk myelodysplastic syndromes. *J. Clin Oncol.* 2008, Dec 20, 26(36): 5943-5949.
120. Shimamoto T, Tohyama K, Okamoto T, et al. Cyclosporin A therapy for patients with myelodysplastic syndrome: multicenter pilot studies in Japan. *Leuk Res.* 2003 Sep, 27(9): 783-788.
121. 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.
122. Siatecka M, Bieker JJ. The multifunctional role of EKLF/KLF1 during erythropoiesis. *Blood* 2011, 18: 2044–2054.
123. 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.

124. Silverman LR, Fenaux P, Mufti GJ, et al. Continued azacitidine therapy beyond time of first response improves quality of response in patients with higher-risk myelodysplastic syndromes. *Cancer* 2011, Jun 15, 117(12): 2697-2670.
125. Sloand EM, Mainwaring L, Barrett AJ, et al. Preferential suppression of trisomy 8 compared with normal hematopoietic cell growth by autologous lymphocytes in patients with trisomy 8 myelodysplastic syndrome. *Blood* 2005 Aug 1, 106(3): 841-851.
126. Smallwood A, Esteve P O, Pradhan S, et al. Functional cooperation between HP1 and DNMT1 mediates gene silencing. *Genes Dev* 2007, 21: 1169-1178.
127. Smith, M. T. The mechanism of benzene-induced leukemia: a hypothesis and speculations on the causes of leukemia. *Environ. Health Perspect.* 1996, 104(Suppl. 6): 1219-1225.
128. Sokol L., List A. Immunomodulatory therapy for myelodysplastic syndromes. *Int J Hematol.* 2007, 86: 301-305.
129. Starck J, Weiss-Gayet M, Gonnet C, et al. Inducible Fli-1 gene deletion in adult mice modifies several myeloid lineage commitment decisions and accelerates proliferation arrest and terminal erythrocytic differentiation. *Blood* 2010, 116: 4795–4805.
130. 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.
131. 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.
132. 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.
133. Tallack MR, Whittington T, Gardiner BB, et al. A global role for KLF1 in erythropoiesis revealed by ChIP-seq in primary erythroid cells. *Genome Res.* 2010, 20: 1052–1063.
134. 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.

135. Tessema M, Länger F, Dingemann J, et al. Aberrant methylation and impaired expression of the p15 (INK4b) cell cycle regulatory gene in chronic myelomonocytic leukemia (CMML). *Leukemia* 2003, 17: 910-918.
136. 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.
137. 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.
138. Van den Berghe H. The 5q- syndrome. *Scand J Haematol Suppl.* 1986, 45: 78-81.
139. 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.
140. 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.
141. 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.
142. 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.
143. 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.
144. 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).
145. 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.



146. Xu H, Menendez S, Nimer SD, et al. Loss of p53 accelerates the complications of myelodysplastic syndrome in a NUP98-HOXD13-driven mouse model. *Blood* 2012 Oct 11, 120(15): 3089-3097.
147. Yamamoto H, Kihara-Negishi F, Yamada T, et al. Physical and functional interactions between the transcription factor PU.1 and the coactivator CBP. *Oncogene* 1999, 18: 1495-1501.
148. 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
149. Zhou L, Opalinska J, Sohal D, et al. Aberrant epigenetic and genetic marks are seen in myelodysplastic leukocytes and reveal Dock4 as a candidate pathogenic gene on chromosome 7q. *J Biol Chem.* 2011, 286(28): 25211–25223.
150. 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 k tématu dizertace

### Publikované práce související s dizertační prací s IF (příloha 1):

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**

**Jonásova 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 disertační práce)

### Práce související s dizertační prací, odeslané k publikaci, obě práce byly přijaty k publikaci v časopisu s IF (příloha 1):

**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* – přijato k publikaci 9/2014 (**IF: 2,5**)

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  
*European Journal of Hematology* - přijato k publikaci 10/2014 (**IF: 2,5**)

### **Práce související s dizertační prací bez IF (příloha 1):**

**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 dizertační práci s IF (příloha 2):**

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**, Hrubá M, Rykovská 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, Belicková M, Bartůnková J, **Jonášová A**, Cermák J, Homolková H, Malíková I. Defective cytotoxicity of T lymphocytes in myelodysplastic syndrome. *Exp Hematol*. 2009;37:386-394

Belickova M, Merkerova MD, Stara E, Vesela J, Sponerova D, Mikulenková 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 dizertační práci v časopisech bez IF:**

**Jonášová A.** Myelodysplastické syndromy – pokroky v terapii v posledních dvou desetiletích. *Vnitř Lek.* 2013;59:635-640. **(příloha 2)**

**Jonášová A** Myelodysplastický syndrom. *Postgraduální medicína* 2013;15:498-504 **(příloha 2)**

Neuwirtová R, **Jonášová A**, Čermák J et al. Analýza nemocných s myelodysplastickým syndromem s delecí dlouhého ramene 5. chromosomu sledovaných Českou MDS pracovní skupinou. Význam pro diagnostické zařazení a určení prognózy. *Transfúze a hematologie dnes* 2009;15:204-20 **(příloha 2)**

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

**Jonášová A.** Imunomodulační terapie–lenalidomid v léčbě myelodysplastického syndromu nízké 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.