

Molekulárně genetická vyšetření prováděná v Ústavu hematologie a krevní transfuze u pacientů s myelodysplastickým syndromem

Beličková M.¹, Votavová H.¹, Čermák J.¹ za pracovní skupinu pro MDS v ÚHKT

¹Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha

Transfuzie Hematol. dnes, 23, 2017, suplement 1, p. 20-24

SOUHRN

Myelodysplastický syndrom (MDS) představuje jedno z nejčastějších hematologických onemocnění ve věku nad 60 let. Jeho patogenese není doposud dostatečně objasněna, ale s rozvojem nových molekulárně genetických metod dochází k postupnému odhalování molekulárního pozadí choroby. Za první genetické vyšetření prováděné u MDS pacientů můžeme pokládat určení buněčné mono- či polyklonality. Další významné vyšetření bylo sledování hladiny metylace promotorových oblastí tumor-supresorových genů a změny telomero-telomerázového komplexu. Na začátku 21. století se do popředí molekulárních technologií dostaly mikročipové platformy, které umožnily sledovat expresi tisíce genů současně. Zároveň se intenzivně zkoumají role nekódujících RNA, jako jsou miRNA a lncRNA. V posledních letech se za revoluční technologii považuje masivní paralelní sekvenování, které umožňuje sekvenování celého lidského genomu za krátkou dobu. Výsledky z tohoto výzkumu, zaměřeného na studium mutací v různých genech, jsou již postupně zařazovány do rutinního molekulárního screeningu u MDS pacientů.

KLÍČOVÁ SLOVA

myelodysplastický syndrom – molekulárně genetická vyšetření

SUMMARY

Beličková M., Votavová H., Čermák J. as a working group of MDS in UHKT

Molecular genetic tests in patients with myelodysplastic syndrome performed at the Institute of Haematology and Blood Transfusion

Myelodysplastic syndrome (MDS) is one of the most common haematological diseases occurring after the age of 60 years. Its pathogenesis has not yet been fully elucidated, but with the development of new molecular genetic methods, the molecular background of the disease is being gradually revealed. Determination of cell mono- or poly-clonality may be considered as the first genetic test performed in MDS patients. Subsequent important methods include monitoring of the methylation level of promoter regions in tumour suppressor genes and determination of telomeric-telomerase complex changes. Microarray platforms were brought to the forefront of molecular technologies at the beginning of the 21st century and enabled detection of the expression of thousands of genes simultaneously. At the same time, the role of non-coding RNAs such as miRNA and lncRNA became the focus of great interest. In recent years, revolutionary technology represented by massive parallel sequencing enabling sequencing of the whole human genome in a short time has been introduced. The results of this research, focusing on the study of mutations in various genes, are already being gradually incorporated in the routine molecular screening of MDS patients.

KEY WORDS

myelodysplastic syndrome – molecular genetic methods

Myelodysplastický syndrom (MDS) je heterogenní skupina klonálních onemocnění hematopoetické kmenové buňky s neefektivní hematopoézou. Je charakterizován morfologickou dysplazií a periferní cypenií, postihující jednu či více vývojových linií, a zvýšeným rizikem transformace do akutní myeloidní leukemie (AML) [1]. Incidence MDS se přibližně pohybuje kolem 3-5 případů na 100 000 obyvatel, s přibývajícím věkem však jeho výskyt prudce stoupá.

Patogeneze MDS je intenzivně zkoumána, ale přesto není zcela objasněna. Předpokládá se, že stejně jako u ostatních nádorových onemocnění, se jedná o více-
stupňový proces, kdy dochází k postupnému hromadění genetických změn, které vedou k maligní transformaci buňky. Klonálním množením transformované buňky, která má růstovou výhodu, dochází ke vzniku nádorové populace buněk, která postupně obsadí celou kostní dřeň. Vedle genetických faktorů se při patogenezi onemocnění uplatňují i faktory epigenetické a imunopatologické, mikroprostředí HSC (hematopoetické kmenové buňky) a reparační mechanismy.

Pro klasifikaci MDS syndromů bylo vytvořeno několik klasifikačních systémů, které jsou založeny hlavně na hodnocení počtu a typu cypenií a procentu myeloblastů v kostní dřeni. Prvním systémem klasifikace byla francouzsko-americko-britská (FAB) klasifikace z roku 1982, která rozdělila MDS do pěti subtypů [2]. Nejnovější klasifikací, z roku 2016, je klasifikace Světové zdravotnické organizace (WHO), která MDS dělí na jedenáct podtypů [3]. Stejně tak existuje několik prognostických systémů pro zhodnocení prognózy a přežití pacientů. V roce 1997 byl sestaven IPSS (*International Prognostic Scoring System*), který byl v roce 2012 revidován na IPSS-R (*Revised International Prognostic Scoring System*), kdy byly přidány další prognostické hodnoty jako hladina hemoglobinu, počet krevních destiček, neutrofilů a detailnější analýza cytogenetických abnormalit a jejich prognostický význam [4]. IPSS-R zařazuje pacienty do pěti kategorií rizika (velmi nízké až po velmi vysoké) na základě prognózy vývoje onemocnění s rozdílnou dobou přežití pacientů a dobou progresse onemocnění do AML.

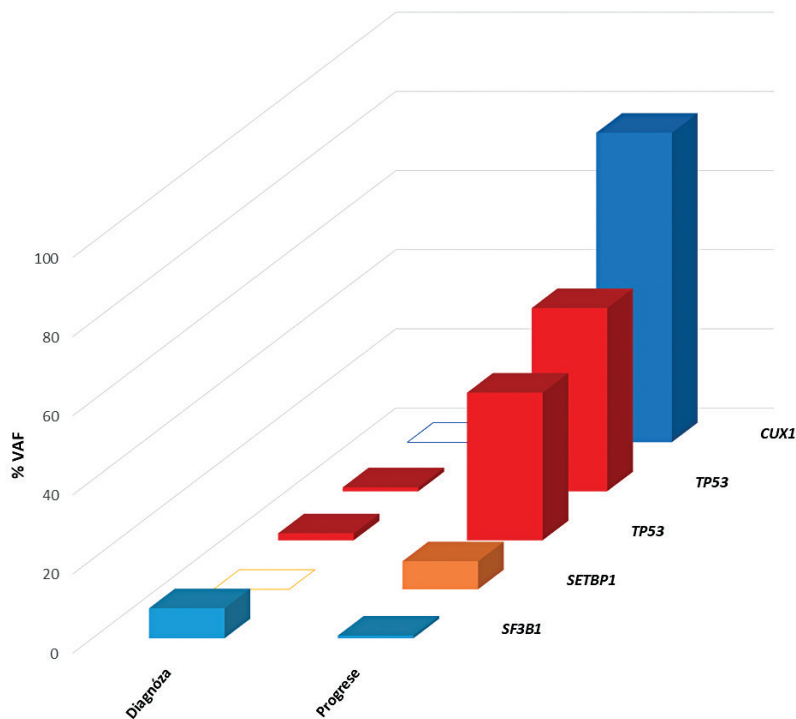
MDS lze také zjednodušeně rozdělit na dvě stadia – časné a pokročilé. Časné stadium lze zařadit mezi prekancerózy, kdy nalézáme v krvinech buňkách zvýšenou apoptózu, která nenasvědčuje o nádorové povaze buněk. Ale zároveň detekujeme již některé vlastnosti nádorových buněk, jako je poškozená diferenciace, chromozomové aberace a mutace genů. Raná stadia považujeme tedy za indolentní formy MDS oproti agresivním, proliferačním, pozdním formám MDS, které již mají plnou charakteristiku nádorových buněk, jako je zvýšená proliferace, snížená apoptóza,

poškozená diferenciace, další chromozomální abnormality (často komplexní karyotyp), následné mutace, zejména v tumor supresorových genech a protoonkogenech. Přibližně 1/3 všech diagnostikovaných pacientů přechází neoplastickou transformací v AML.

Léčba pacientů je individualizovaná a založena na rizikosti onemocnění. Léčebná strategie pro pacienty s nižším a středním rizikem spočívá v podpůrné, stimulační (podávání růstových faktorů krvinek), chelatační, imunosupresivní nebo imunomodulační terapii. Cílem je zlepšení kvality a prodloužení délky života. U pacientů s vysokým rizikem je terapie zaměřena na vymýcení patologického klonu a na prevenci transformace do AML, nejčastěji jsou indikovány tyto typy léčby: hypometylační léčba, intenzivní chemoterapie s následnou transplantací krvinek nebo bez ní. Jeden z perspektivních nových objevů v oblasti léčebných postupů je zapojení přirozeného imunitního systému do potlačení vývoje MDS. Bylo zjištěno, že myelodysplastické buňky vytvářejí zánět a v tomto prostředí se jim daří. Na tento konkrétní typ zánětu by bylo možné se zacílit pomocí léků, a tím by se MDS buňky staly zranitelnější. Tento přístup musí být důkladně testován klinicky, ale výzkum v této oblasti by mohl poskytnout široký soubor terapeutických cílů. Dále jsou například zkoumány apoptotické cesty či mutované sestříhové faktory, které také patří mezi slibné terapeutické cíle.

Pracoviště ÚHKT patří mezi Centra excellence ustanovené mezinárodní nadací MDS Foundation, která jsou specializovaná na péči o pacienty s diagnózou MDS. Probíhá zde těsná spolupráce mezi lékaři a vědeckými pracovníky s cílem dosáhnout nejlepší možné péče.

V oblasti molekulárně genetických vyšetření u MDS došlo v posledních letech k velkému pokroku a probíhá řada studií, které validují význam nálezů pro zpřesnění klasifikačních a prognostických systémů, a hlavně pro zavádění nových léčebných postupů. V ÚHKT se více než 20 let vědecktí pracovníci věnují intenzivnímu výzkumu molekulárních faktorů podílejících se na patogenezi MDS a jejich aplikací do klinické praxe. Detekce buněčné mono- či polyklonality hraje významnou roli při odlišení některých maligních neoplazií, které jsou v drtivé většině monoklonální, od polyklonálních reaktivních lézí. Vzhledem ke klonálnímu charakteru MDS, prvotním molekulárním testem v 90. letech bylo proto stanovení klonality pomocí metody HUMARA. Tato metoda byla založena na stanovení metylačního statutu chromozomů X v lokusu HUMARA u MDS pacientů ženského pohlaví. Klonalita byla určována u separovaných CD3 pozitivních buněk, T lymfocytů,



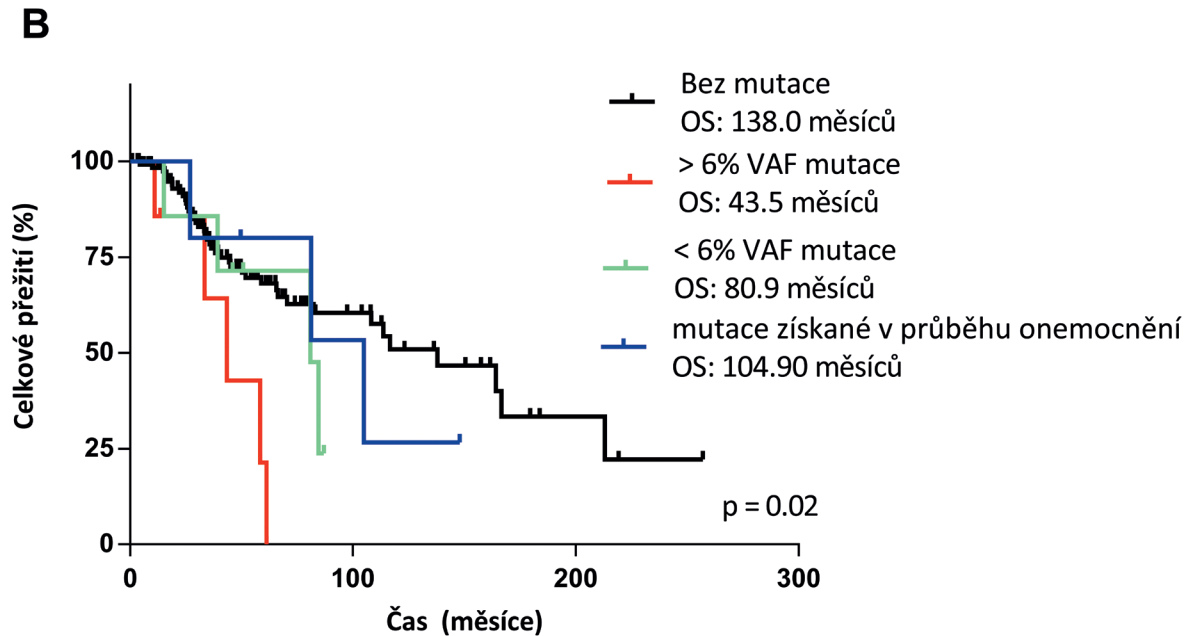
Obr. 1. Sledování mutační zátěže v jednotlivých genech v průběhu nemoci u pacienta s MDS s nízkým rizikem
 VAF – variantní alelická frekvence (mutační zátěž); Diagnosis – vyšetřeno v době diagnózy;
 Progression – vyšetřeno v době progresse

CD14 pozitivních monocytů a granulocytů periferní krve či kostní dřeně [5]. Stupeň klonality sloužil klinickým pracovníkům pro určení a zpřesnění diagnózy a stanovení prognózy. Další vědecké poznatky poukázaly na význam epigenetických modifikací genů v patogenezi MDS. V tomto kontextu bylo na našem pracovišti zavedeno sledování hladiny metylace promotorové oblasti genu CDKN2B (p15Ink4B). Metylace byla detekována metylově specifickou PCR po modifikaci DNA bisulfidem sodným a aberantní metylace genu p15Ink4B byla asociována s progresí onemocnění MDS. Původní metoda byla nahrazena vyšetřením pomocí metylačně specifické MLPA (*Multiplex Ligation Dependent Probe Amplification*), která umožňuje detekovat jak počet genových kopií, tak i metylační změny současně [6]. Od roku 2004 byly dále u pacientů s MDS sledovány změny telomero-telomerázového komplexu a genů, které ho ovlivňují, včetně expresních profilů *POT1*, *TEPI*, *TRFI*, *TNKS*, jež nebyly u pacientů s MDS z celosvětového hlediska zatím vůbec sledovány. Dynamika telomer byla studována pomocí metod TRF (Metoda Terminálního Repetičního Fragmentu pro délku telomer) a TRAP (pro stanovení aktivity telomerázy) a zvýšená telomerázová aktivita signifikantně souvisela se zkrácenými telomery a byla detekována u poloviny pacientů s MDS

[7]. V roce 2008 byl zaveden metodický postup pro sledování nejčastěji se objevujících bodových mutací v protoonkogenu N-Ras ve 12. a 13. kodonu prvního exonu a v 61. kodonu druhého exonu u MDS pomocí sekvenační analýzy. Frekvence výskytu zmíněných mutací významně narůstala s progresí MDS.

Na začátku 21. století se do popředí molekulárních technologií dostaly mikročipové platformy, které umožnily sledovat aktivitu (expresi) tisíce genů v rámci jednoho vzorku, a tak se vědcům otevřel nový pohled na globální regulační síť a interakce genů. Naše pracoviště bylo jedním z prvních v Česku, která začala tuto novou technologii používat pro molekulární charakterizaci hematologických malignit. V laboratoři byly optimalizovány protokoly pro mnoho různých mikročipových platform od firem Clontech, Ambion, Combimatrix, Luminex, Illumina. Poslední jmenovaná platforma Illumina již umožňovala celogenomové analýzy a pomocí ní byl získán velmi cenný a komplexní soubor dat o transkriptomu MDS. Jednak

byly stanoveny expresní profily specifické pro jednotlivé subtypy MDS [8] a geny vykazující signifikantní změny u pacientů byly dále validovány pomocí metody RT-PCR. V další fázi výzkumu jsme se zaměřili i na expresní změny asociované se specifickou léčbou. Konkrétně jsme studovali efekt lenalidomu na transkripční aktivitu MDS buněk a odhalili jsme deregulaci TNF signální dráhy u MDS pacientů léčených touto imunomodulační látkou [9]. Na validačních kohortách pacientů byl ověřen prognostický význam vybraných kandidátních genů, které se jeví jako klinicky relevantní pro hodnocení individuálního rizika MDS pacienta a pro rozhodnutí o optimální léčbě. Kromě protein-kódujících genů, na které byly zaměřeny počáteční projekty expresního profilování, jsme se v roce 2006 začali věnovat i studiu protein-nekódujících malých (miRNA) a dlouhých RNA (lncRNA). Tyto regulační RNA hrají významnou roli v regulaci genové exprese a díky specifickým vlastnostem se jeví jako spolehlivé a stabilní molekulární markery u MDS. Obdobně jako expresní profily mRNA také specifické profily miRNA byly asociovány se subtypy MDS [10] a při léčbě lenalidomem byla signifikantně ovlivněna exprese miRNA klastrovaných v oblasti 14q32 [11]. Od roku 2000 naše pracoviště publikovalo přes 20 článků v impaktovaných zahraničních časopisech, které byly



Obr. 2. Kaplanova-Meierova křivka celkového přežití (OS) pacientů s MDS s nízkým rizikem. Pacienti byli rozděleni podle přítomnosti mutace v genu *TP53*, její zátěže a doby první detekce do čtyř skupin. První skupinu s mediánem přežití 138 měsíců tvoří pacienti bez mutace (černá křivka), druhou skupinu se 43,5 měsíci OS tvoří pacienti s mutační zátěží > 6% VAF v době diagnózy (červená křivka), třetí skupinu s 80,9 měsíci OS tvoří pacienti s mutační zátěží < 6% VAF v době diagnózy (zelená křivka) a čtvrtou skupinu s 104,9 měsíci OS tvoří pacienti, u kterých byla mutace detekována až v průběhu nemoci (modrá křivka). VAF: variantní alelická frekvence. (Převzato: Belickova, *Oncotarget*, 2016)

věnovány využití mikročipových technik u hematologických malignit, a to především u MDS. V roce 2005 jsme získali „Cenu Časopisu lékařů českých za nejlepší publikaci roku“. V neposlední řadě se naše laboratoř stala školicím pracovištěm v oblasti mikročipových technologií. Získané praktické zkušenosti a odborné znalosti byly předávány studentům v rámci „Praktického kurzu biočipových technologií“ pořádaného na ÚHKT od roku 2002 po dobu 13 let.

V roce 2011 byl na našem pracovišti spuštěn provoz první platformy pro sekvenování nové generace (NGS). Tato revoluční technologie umožňuje masivní paralelní sekvenování celého lidského genomu za krátkou dobu. Za použití NGS provádíme u MDS pacientů mutační screening v době diagnózy a při progresi onemocnění (obr. 1). Prokázali jsme, že mutace v genu *TP53* jsou signifikantní rizikový faktor pro celkové přežití pacientů (obr. 2) [12]. Stejně výsledky byly již publikovány i v jiných studiích, a proto se uvažuje o zařazení mutačního stavu genu *TP53* do prognostického systému a o jeho rutinním vyšetřování u MDS. V nejbližší době lze očekávat zařazení vyšetření mutačního statusu dalších genů jako např. *NRAS* či *RUNX1*. Od roku 2016 jsou již mutace genu *SF3B1* používány jako pomocný diagnostický faktor v WHO klasifikaci.

Nové terapeutické přístupy u MDS zahrnují epigenetickou léčbu azacitidinem a imunomodulační terapii lenalidomidem (LEN). Tím vyvstala potřeba rozpoznat pacienty pozitivně reagující na tyto terapie. Zjistili jsme, že vysoké hladiny mRNA genu pro cereblon (CRBN) jsou důležité pro účinnost LEN a mohou predikovat léčebnou odpověď. Práce na toto téma, prezentovaná na konferenci Americké hematologické společnosti (ASH) v roce 2013, byla vybrána mezi nejvýznamnější příspěvky konference do tzv. „Highlights of ASH 2013“ [13].

V rámci výzkumné činnosti jsme řešili více jak 20 grantových projektů s tématem MDS a získali např. Čestné uznání ministra zdravotnictví MUDr. T. Julínka za mimořádně úspěšné řešení výzkumného projektu NR/7989-3. Ve spolupráci s Univerzitou Karlovou jsou do výzkumných projektů na našem pracovišti zapojovány pre- i postgraduální studenti.

LITERATURA

1. Nimer SD. Myelodysplastic syndromes. *Blood* 2008;111(10):4841-4851.
2. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) Co-operative Group. *Br J Haematol* 1976;33:451-458.

ZVLÁŠTNÍ VYDÁNÍ SUPLEMENTU K 65. VÝROČÍ ÚHKT

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

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

5. Krejčová H, Neuwirtová R, Cermák J, Belicková M, Brdická R. Cell clonality in myelodysplastic syndrome. *Sb Lek* 2002;103(3):339-348.

6. Cechova H, Lassuthova P, Novakova L, et al. Monitoring of methylation changes in 9p21 region in patients with myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. *Neoplasma* 2012;59(2):168-174.

7. Siegllová Z, Zilovcová S, Cermák J, et al. Dynamics of telomere erosion and its association with genome instability in myelodysplastic syndromes (MDS) and acute myelogenous leukemia arising from MDS: a marker of disease prognosis? *Leuk Res* 2004;28(10):1013-1021.

8. Vasikova A, Belickova M, Budinska E, Cermak J. A distinct expression of various gene subsets in CD34+ cells from patients with early and advanced myelodysplastic syndrome. *Leuk Res* 2010;34(12):1566-1572.

9. Belickova M, Cermak J, Dostalova Merkerova M, 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.

10. Dostalova Merkerova M, Krejčík Z, Votavova H, Belickova M, Vasikova A, Cermak J. Distinctive microRNA expression profiles in CD34+ bone marrow cells from patients with myelodysplastic syndrome. *Eur J Hum Genet* 2011;19(3):313-319.

11. Krejčík Z, Beličková M, Hruštinová A, et al. Aberrant expression of the microRNA cluster in 14q32 is associated with del(5q) myelo-

dysplastic syndrome and lenalidomide treatment. *Cancer Genet* 2015;208(4):156-161.

12. Belickova M, Vesela J, Jonasova A, et al. TP53 mutation variant allele frequency is a potential predictor for clinical outcome of patients with lower-risk myelodysplastic syndromes. *Oncotarget* 2016;7(24):36266-36279.

13. Jonasova A, Bokorova R, Polak J, et al. High level of full-length cereblon mRNA in lower risk myelodysplastic syndrome with isolated 5q deletion is implicated in the efficacy of lenalidomide. *Eur J Haematol* 2015;95(1):27-34.

Podíl autorů na přípravě rukopisu

MB – napsání a revize rukopisu

HV – napsání a revize rukopisu

JČ – připomínkování a schválení rukopisu

Čestné prohlášení autorů

Autoři práce prohlašují, že v souvislosti s tématem, vznikem a publikací tohoto článku nejsou ve střetu zájmů a vznik ani publikace článku nebyly podpořeny žádnou farmaceutickou firmou.

Mgr. Monika Beličková, Ph.D.

Oddělení genomiky
Ústav hematologie a krevní transfuze
U Nemocnice 1
128 20 Praha 2
e-mail: monika.belickova@uhkt.cz

Potvrzení kvality

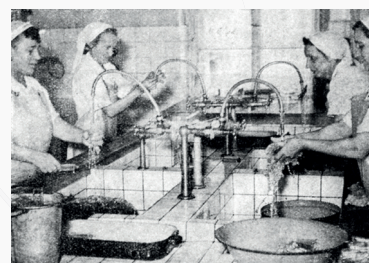
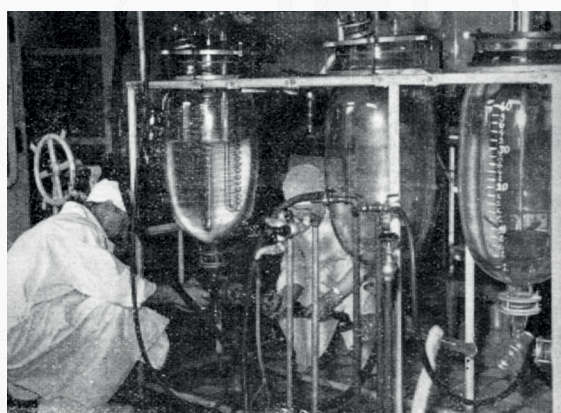
Motto: „Spojení laboratorní a klinické hematologie, transfuzního lékařství a výzkumných laboratoří umožňuje poskytovat nemocným vysoce specializovanou péči v oblasti hematologických onemocnění. Hlavním úkolem laboratoří Ústavu hematologie a krevní transfuze je zajistit kvalitu a dostupnost výsledků laboratorních vyšetření, poskytovat konzultační a školicí služby a spolupracovat na výzkumných projektech ÚHKT.“

- Dokladem je akreditace **Českého institutu pro akreditaci (ČIA)** pro tři subjekty ÚHKT:
- Komplement laboratoří ÚHKT – od roku 2009
- Národní referenční laboratoř pro DNA diagnostiku – již od roku 2002
- Kalibrační centrum ÚHKT – od roku 2009

 Více na www.uhkt.cz



Minulost ÚHKKT



1. ledna 1952

Založení Ústavu hematologie a krevní transfuze jako jednoho z resortních výzkumných ústavů ministerstva zdravotnictví. Výzkum a ostatní aktivity byly zaměřeny hlavně na transfuziologickou problematiku, přípravu náhražek krevní plazmy a protišokových roztoků. S tím souviselo zavádění biochemických, fyzikálně chemických a morfologických vyšetřovacích metod, studium plazmatických proteinů a počátky imunologických studií.

1976

Snaha zlepšit prostředí a péči o nemocné vedla k vybudování Jednotky intenzivní péče. Nejdříve byli moderními postupy léčeni pacienti s akutní leukémií.

1955

Otevření klinického oddělení - struktura ÚHKKT i hlavní směry výzkumu byly přizpůsobeny tak, aby směřovaly ke kvalitní diagnostice a terapii krevních chorob. Oddělení mělo 42 lůžek v šesti pokojích a nezbytné laboratorní zázemí.

1990

Následovaly převody autologních kryokonzervovaných kostních dřeví.

1986

Byla provedena první alogenní transplantace kostní dřevě.

1991

Už na nově vybudovaném transplantačním oddělení proběhla první transplantace kostní dřevě od nepříbuzného dárce v Československu.