

Univerzita Karlova
1. lékařská fakulta

Studijní program: Biomedicína
Studijní obor: Fyziologie a patofyziologie člověka



UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta

MUDr. Nina Dusílková

Studium regulačních vlastností onkogenních mikroRNA za normálních a patologicky změněných podmínek s cílem využít znalosti k odhalení nových tumorů.

Study of the regulatory properties of oncogenic microRNAs under normal and pathologically altered conditions in order to detect new tumors.

Disertační práce

Ph.D. Thesis

Školitel: Prof. MUDr. Tomáš Stopka, Ph.D.

Praha, 2021

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Výsledky výzkumů prezentované v této disertaci jsou úspěchy práce celého kolektivu autorů, ale bez mého přínosu by nemohly být realizované v plné míře. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

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

V Praze 30. června 2021

MUDr. Nina Dusílková

Podpis

Identifikační záznam:

DUSÍLKOVÁ, Nina. Studium regulačních vlastností onkogenních mikroRNA za normálních a patologicky změněných podmínek s cílem využít znalosti k odhalení nových tumorů. [*Study of the regulatory properties of oncogenic microRNAs under normal and pathologically altered conditions in order to detect new tumors*]. Praha, 2021. /114 stránek, 4 přílohy. Disertační práce (PhD). Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta, Ústav patologické fyziologie. Vedoucí práce prof. MUDr. Tomáš Stopka, Ph.D.

...for my Family and Lab.

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli prof. MUDr. Tomáši Stopkovi, Ph.D., za péči a veškerou pomoc, které se mi po celou dobu doktorského studia dostávalo.

Ráda bych také poděkovala prof. MUDr. Martinu Vokurkovi Ph.D., za vytvoření přátelského a podnětného pracovního prostředí na Ústavu Patologické fyziologii 1. LF.

Rovněž děkuji přednostovi 1. interní kliniky VFN, prof. MUDr. Marku Trněnému, DrSc., a doc. Anně Jonášové, PhD., za podporu výzkumu na klinice po celou dobu mého PhD studia. Děkuji též MUDr. Jindřichovi Polívkovi za poskytnuté vzorky od pacientů a pomoc, zvláště v počátečních fázích projektu.

Dále děkuji všem mým současným a bývalým kolegům za podporu, pochopení a pomoc. Děkuji všem dobrovolným dárcům, bez nichž by nebylo možno výzkum provádět.

V neposlední řadě bych ráda poděkovala své rodině za podporu, shovívavost a vydrž v průběhu celého mého postgraduálního studia.

Disertační práce byla vytvořena za podpory projektů: UNCE/MED/016, Progres Q26 a SVV260521

Obsah

Abstrakt:	7
Použité zkratky:	8
1. Úvod	13
1.1. mikroRNA	16
1.1.1. Vznik a mechanismus účinku mikroRNA	16
1.1.2. Mechanismus deregulace exprese mikroRNA	19
1.1.3. mikroRNA a hematologické malignity	23
1.2. Kožní lymfomy	34
1.2.1. Mycosis Fungoides a Sézary syndrom	35
1.2.2. Etiologie a patogeneze	36
1.2.3. Dělení a klasifikace CTCL	44
1.2.4. Klinické symptomy CTCL	45
1.2.5. Diagnostika a prognostické markéry CTCL	46
1.2.6. Léčebné postupy	48
2. Podklady pro formulování hypotézy	51
3. Hypotéza a cíle disertační práce	56
3.1. Hypotéza	57
3.2. Konkrétní cíle navazující na hypotézu	57
4. Pacienti a metody	57
4.1. Soubor pacientů a zdravých kontrol	57
4.2. Zpracování vzorků, extrakce a kvantifikace mikroRNA	60
5. Hlavní výsledky	60
5.1. Expresní změny vybraných mikroRNA a jejich význam v diagnostice CTCL	60
5.2. Jednotlivé mikroRNA v prognostice CTCL	68
5.3. Exprese onkogenních mikroRNA v plasmě každého pacienta v průběhu sledování	73
6. Vedlejší výsledky	82

6.1. Studie genové exprese: Onkogenní mikroRNA-155 a PU.1 v nejčastějších lymfoidních malignitách	83
6.2. Model vzájemné regulace onkogenní a tumorsupresorové mikroRNA	87
6.3. Studie genové exprese v průběhu onemocnění karcinom prsu pomocí sady cirkulujících miRNA	92
7. Diskuse.....	96
8. Shrnutí závěrů disertační práce.....	102
9. Publikace autora.....	104
10. Reference.....	105
11. Přílohy	117

Abstrakt:

Onkogenní mikroRNA (miRNA) jsou malé molekuly RNA, které inhibují posttranslační regulační mechanismy na epigenetické úrovni. miRNA jsou často deregulovány u malignit a díky své stabilitě jsou detekovatelné v nebuněčných frakcích periferní krve. V naší laboratoři jsme provedli několik studií, které zkoumaly a využívaly miRNA jako biomarkery pro různé hematologické nádory (např. chronická lymfocytární leukémie, Hodgkinův lymfom) a solidní nádory (např. karcinom prsu). Cílem těchto studií bylo zjistit souvislost miRNA s patofyziologickými a klinickými aspekty jednotlivých onemocnění. Zde jsme potvrdili význam konkrétních miRNA nebo jejich komplexů při sledování onemocnění. Kombinací klinických, molekulárně biologických a statistických analýz se nám podařilo najít soubory miRNA, které nad očekávání plnily nejen diagnostickou, ale i prognostickou roli.

Tato práce se zaměřuje na výzkum mikroRNA v diagnostice hematologické malignity - primárního kožního T-buněčného lymfomu (CTCL). V tomto onemocnění byla prokázána nádorová specifita některých miRNA. Jejich aberantní exprese ve vzorcích tkání pacientů s CTCL získaných z kožních biopsií správně odlišila maligní onemocnění od kontrolních vzorků nezhoubných kožních lézí. Zde jsme si položili otázku, zda by tyto miRNA mohly být použity jako plazmatické biomarkery pro klinické sledování CTCL. Z opakovaných vzorků periferní krve pacientů s CTCL a kontrolních vzorků s benigním kožním onemocněním jsme detekovali miRNA pomocí specificky aktivované RT-PCR. Výsledkem bylo stanovení modelu založeného na upregulaci miR-155 a downregulaci miR-203 a miR-205 se 100% specificitou a 94% senzitivitou ze vzorků plazmy pacientů s CTCL. Model 3 miRNA v po sobě jdoucích vzorcích byl v souladu s klinickým stavem pacientů, s léčebnou odpovědí a se změnou velikosti nádoru. Kvantifikace vybraných mikroRNA v plazmě představuje specifickou metodu hodnocení CTCL, která je cenným nástrojem pro diagnostiku CTCL a sledování odpovědi na léčbu.

Klíčová slova: mikroRNA; mycosis fungoides; Sézarého syndrom; kožní T-buněčné lymfomy (CTCL); atopická dermatitida.

Abstract:

Oncogenic microRNAs (miRNAs) are small RNA molecules that inhibit post-translational regulatory mechanisms at the epigenetic level. miRNAs are often deregulated in malignancies and due to their stability are detectable in non-cellular fractions of peripheral blood. In our laboratory, we have performed several studies that have investigated and utilized miRNAs as biomarkers for various hematological tumors (e.g., chronic lymphocytic leukemia, Hodgkin`s lymphoma) and solid tumors (e.g., breast cancer). The aim of these studies was to find the association of miRNAs with pathophysiological and clinical aspects of each disease. Here, we confirmed the importance of particular miRNA or its complex during disease monitoring. Combining clinical, molecular biological and statistical analyses, we were able to find miRNA sets that fulfilled not only a diagnostic role but also a prognostic role beyond expectations.

The main focus of this thesis is on the investigation of microRNAs in the diagnosis of a hematological malignancy - primary cutaneous T-cell lymphoma (CTCL). Tumor specificity of some miRNAs has been demonstrated. Their aberrant expression in tissue samples of CTCL patients obtained from skin biopsies, correctly distinguished malignant disease from control samples of benign skin lesions. Here, we asked whether these miRNAs could be used as plasma biomarkers for clinical monitoring of CTCL. From repeated peripheral blood samples from CTCL patients and controls with benign skin disease, we detected miRNAs using specifically activated RT-PCR. As a result, was established a model based on upregulation of miR-155 and downregulation of miR-203 and miR-205 with 100% specificity and 94% sensitivity from plasma samples of CTCL patients. The model of 3 miRNAs in consecutive samples was consistent with the clinical status of patients, with therapeutic response, and with change in tumor size. Quantification of selected microRNAs in plasma is a specific method to evaluate CTCL, which is a valuable tool for diagnosing CTCL and monitoring response to therapy.

Keywords: microRNA; mycosis fungoides; Sézary syndrome; cutaneous T-cell lymphomas (CTCL); atopic dermatitis.

Použité zkratky:

Zkratka	Anglický název	Český název
5-Aza-CdR	5-Aza2'-deoxycytidine	Decitabin
Ago	Argonaute	vázací protein rodiny Argonaute
AICD	activation induced cell death	aktivace indukované buněčné smrti
AKT	Protein kinase B	protein kináza B
ALCL	Anaplastic large cell lymphoma	anaplastický velkobuněčný lymfom
ALL	Acute lymphoblastic leukemia	akutní lymfoblastická leukemie
AML	Acute myeloid leukemia	akutní myeloidní leukemie
BCL2	B-cell lymphoma 2	B-buněčný lymfom
BKL		benigní kožní léze
BL	Burkitt lymphoma	Burkittův lymfom
cALL	childhood Acute lymphoblastic leukemia	akutní lymfoblastická leukemie dětského věku
CBCL	cutaneous B-cell lymphoma	kožní B-buněčný lymfom
CDKN1B	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B	inhibitor cyklin dependentní kinázy 1B
CLA	Cutaneous lymphocyte-associated antigen	kožní lymfocytární antigen
CLIPi	Cutaneous Lymphoma International Prognostic Index	mezinárodní prognostický index pro kožní lymfomy
CLL	Chronic lymphocytic leukemia	chronická lymfatická leukemie
CML	Chronic myeloid leukemia	chronická myeloidní leukemie
CRE	Cis-regulatory element	Cis regulační element
CTCL	cutaneous T-cell lymphoma	kožní T-buněčný lymfom
DFS	Disease free survival	přežívání bez onemocnění
DLBCL	Difuse large B-cell lymphoma	difuzní velkobuněčný B-cell lymfom
DS	Dendritic cell	dendritická buňka
dsRNA	double stranded RNA	dvouvláknová RNA
E2F1	E2F Transcription Factor 1	E2F transkripční faktor 1
EBC	Early Breast cancer	časná rakovina prsu

EBV	Epstein–Barr virus	Epstein–Barr virus
ECP	External Counterpulsation	extrakorporální fotoferéza
EFS	event-free survival	celkové přežití do událostí
EMT	epithelial–mesenchymal transition	epiteliálně-mezenchymální přechod
EORTC	European Organization for Research and Treatment of Cancer	evropská organizace pro výzkum a léčbu nádorů
ER	Estrogen receptor	estrogenový receptor
Era	Estrogen receptor α	estrogenový receptor α
ETS	Erythroblast Transformation Specific /E26 transcription factor	Transkripční faktor specifický pro Erythroblast
FL	Follicular lymphoma	Folikulární lymfom
FOXP3	Forkhead box P3 (scurlin)	skurlin protein
GC	Glucocorticoid	glukokortikoid
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony stimulating factor	Rustový faktor stimulující granulocytární-makrofagální řadu
HER2	human epidermal growth factor receptor 2	receptor 2 lidského epidermálního růstového faktoru
HL	Hodgkin lymphoma	Hodgkinův lymfom
HSV	Herpes simplex virus	herpes simplex virus
HTLV-1	Human T-lymphotropic virus	lidský T-lymfotropný virus
IMP-1	imipenemase - 1	metalo-beta laktamáza
ISCL	International Society for Cutaneous Lymphoma	Mezinárodní společnost pro kožní lymfom
LNA	locked nucleic acids	uzamčené nukleové kyseliny, modifikovaný oligonukleotid
LPD	Lymphoproliferative disease	lymfoproliferativní onemocnění
MBL	Monocyte B-cell lymphoma	monocytární B-lymfocytární lymfom
MCL	Mantle cell lymphoma	lymfom plášťových buněk
MF	Mycosis fungoides	mycosis fungoides
MHC	major histocompatibility complex	komplex histokompatibility
miR, miRNA,	microRNA	mikroRNA, miRNA, miR

miRISC	microRNA-induced silencing complex	miRNA-indukovaný tlumící komplex
MLL	mixed-lineage leukemia	leukémie nejasné/smíšené linie
mRNA	messenger RNA	mediátorová RNA
Myc	myelocytomatosis onkogene	transkripční faktor, myelocytomatozní onkogen
MZL	Marginal zone lymphoma	lymfom marginální zóny
NF-κB	Nuclear factor kappa B	nukleární faktor κB
OS	Overall Survival	celkové přežívání
p53	tumor protein 53	nádorový protein 53 (strážce genomu)
PARP1	Poly [ADP-ribose] polymerase 1	Poly [ADP-ribóza] polymeráza 1
PCA	Principal component analysis	analýza hlavních komponent
PCL	Primary cutaneous lymphoma	primární kožní lymfom
PCR	Polymerase Chain Reaction	polymerázová řetězová reakce
PD-1	Programmed cell death protein 1	protein programované smrti buněk 1
PFS	Progress-Free Survival	přežívání bez progresu
PgR	Progesteron Receptor	receptor progesteronu
PI3K	Phosphoinositide -3 kinases	fosfoinozimid-3 kináza
PRED	Prednison	prednison
PREDS	Prednisolon	prednizolon
pre-miRNA	precursor miRNA	prekurzor miRNA
pri-miRNA	primary miRNA	primární transkript miRNA
PTEN	phosphatase and tensin homolog	Homolog fosfatázy a tenzinu
RAS	Rat sarcoma signal transduction protein	RAS transdukční protein
RFS	Relapse-Free Survival	přežívání bez relapsu
RNAi	RNA interference	interference (překrývání, křížení) RNA
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction	
SDF	Stromal cell-derived factor	faktor stromálních buněk
SE	Stafilococcus enterotoxin	stafylokokový enterotoxin
SEM	standard error of the mean	standardní chyba střední hodnoty

SNP	Single-nucleotide polymorphism	jednonukleotidový polymorfismus
SOCS1	Suppressor of cytokine signaling 1	supresor cytokinové signalizace-1
SS	Sézary syndrom	Sézary syndrom
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3	převodník signálu a aktivátor transkripce-3
TCM	central memory cells	stromální paměťové buňky
TGFBR2	Transforming growth factor beta receptor 2	receptor transformující růstový faktor beta 2
TGFp	Tumor growth factor protein	protein nádorový růstový faktor
TKI	Tyrosin kinase inhibitor	inhibitor tyrozinkinázy
T-LBL	T-cell Lymphoblastic lymphoma	T-buněčný lymfoblastický Lymfom
TNFα	Tumor necrosis factor alpha	faktor nekrózy tumoru alfa
TP53	Tumor protein 53	protein 53 potlačující nádor
Tregs	Regulatory T-cell	T-buňka regulatorní
TRM	Tissue resident memory cells	tkáňové paměťové buňky
TSEB	Total skin electronic beam therapy	celokožní léčba elektronovým paprskem
TSST-1	Toxic shock syndrome toxin	toxin syndromu toxického šoku-1
WHO	World Health Organization	Světová zdravotnická organizace

1. Úvod

Hematologické malignity jsou jednou z nejčastějších skupin rakoviny, tvoří 6,5% ze všech druhů malignit na celém světě, z toho přibližně 9,0% ve Spojených státech a Evropě (Tietsche de Moraes Hungria, Chiattonne et al. 2019). Jsou to klonální choroby původem z hematopoetických buněk buď zcela nezralých, nebo z buněk na určitém stupni vývoje. Během klonálního vývoje v jedné buňce vznikne změna genetické výbavy, která představuje pro tuto buňku růstovou výhodu. Při následné proliferaci se tato odchylka opakuje se vznikem celé populace nádorových elementů (klonů). Následný biologický vývoj a chování různých typů hematologických nádorů je velmi heterogenní. V závislosti na lokalizaci nádoru, buněčném prostředí a souboru genetických mutací, může být stupeň zdravotního rizika pro pacienta rozdílný, sahající od léčitelných malignit nízkého rizika až do vysoce agresivních forem. I přes obecnou heterogenitu maligních onemocnění vykazují nádorové buňky určité společné rysy, které jsou shrnuty do aktuálně akceptovaného modelu tzv. „Hallmarks of cancer“. Model obsahuje základní vlastnosti podporující vznik a přežití nádorové buňky či tkáně, jako jsou schopnost neomezené replikace a úniku před růst-potlačující faktory, aktivace angiogeneze a invazivity, odolnost vůči buněčné smrti, a schopnost tvořit metastázy (Hanahan and Weinberg 2011). Základem těchto charakteristických vlastností je nestabilita genomu, která vytváří genetickou rozmanitost maligních buněk a schopnost mikroprostředí nádoru podporovat onkogenezi spolu se zánětem. Genomické a epigenetické změny jsou v současné době identifikovatelné dostupnými, ale zatím ne vždy rutinními vyšetřovacími metodami. U nádorových onemocnění, u kterých často není objasněná patofyziologie maligního procesu, také chybí prognostické markery, které by zhodnotily a předpověděly jak možný scénář dalšího vývoje onemocnění, tak i odpověď na určitou terapii nebo možnou rezistenci. Identifikace markerů, které by umožnily efektivně stanovit diagnózu, rizikové skóre, predikovat prognózu a přispět k vývoji nových diagnostických a terapeutických nástrojů, je předmětem zvýšeného zájmu základního biomedicínského výzkumu.

V lidském a v jiných organizmech byla objevena početná skupina buněčných modulátorů zvaných mikroRNA (miRNA), které významně zasahují do biologických procesů cestou regulace genové exprese. miRNA působí tak, že se váží na principu komplementarity k homologním úsekům různých messenger RNA (mRNA). Výsledkem je narušená stabilita exprese mRNA, která vede hlavně k inhibici translace nebo k degradaci mRNA. Tím dochází k patologické regulaci genové exprese, což může vést k různým patologickým dysfunkcím včetně maligních zvrátů (Mitchell, Parkin et al. 2008).

Obecně miRNA hrají důležitou roli v patogenezi maligní transformace tím, že působí jako činitel nadprodukovaný a synergický s nádorovou transformací, miRNA s touto funkcí jsou označovány jako onkogenní či onko-miR. Nedostatečně produkované miRNA a současně potlačující růst nádoru jsou označovány jako tumor-supresor. Procesy pod regulačním vlivem takto odlišných miRNA často souvisí s kancerogenezi a v souladu s modelem „Hallmarks of cancer“ ovlivňují deregulaci apoptózy, proliferaci buněk, angiogenezi, metastazování a rezistenci na léčiva. Je zajímavé, že některé miRNA mohou mít dvojí roli v závislosti na tkáni, kde jsou exprimovány. Například mikroRNA let-7 downreguluje estrogenový receptor α (ER α), což vede k větší senzitivě buněk karcinomu prsu na tamoxifen, ale v buňkách karcinomu ovarií způsobuje rezistenci na léčiva prostřednictvím stabilizace enzymu IMP-1, který ovlivňuje diferenciaci a adhezi maligních buněk (Zhao, Deng et al. 2011), (Boyerinas, Park et al. 2012). Navíc množství a spektrum miRNA se liší podle typu tkáně a patofyziologického stavu organismu. Celogenomové profilování ukázalo, že specifický soubor expresí miRNA (miRnom) umožňuje s vysokou přesností odlišit různé typy rakoviny a identifikovat původ tkáně dokonce i u ne-diferencovaných nádorů, které jsou jinak obtížně diagnostikovatelné např. při metastazování (Iorio and Croce 2017). To svědčí o tom, že nádorová tkán zachovává jedinečný expresní profil tkáňově specifických miRNA. Například studie (Rosenfeld, Aharonov et al. 2008) navrhla tzv. klasifikátor, tj. model expresí 48 miRNA, který byl vyvinut z 336 vzorků různých typů primárních a metastatických nádorů. Klasifikátor umožnil s vysokou přesností rozpoznat původ tkáně nádorů, včetně metastatických (86% správně identifikovaných typů nádorů z celé testovací sady vzorků). Vzhledem k tomu, že rakoviny nedefinovaného původu tvoří přibližně 4% všech malignit, vývoj miRNA klasifikátorů má velký potenciál pro zlepšení klinické diagnostiky a následné léčby.

Četné studie se proto zaměřily na profilování miRNA s cílem identifikovat nové miRNA nebo jejich soubory, které by posloužily jako specifické biomarkery pro diagnostiku a klasifikaci onemocnění, sledování stavu progresu. Ukázalo se, že miRNA mohou být transportovány z chorobou postižené tkáně do krevního oběhu. Měření hladin cirkulujících miRNA v krvi může být úspěšně aplikováno v diagnostice, zejména v případech, kdy je žádoucí použití šetrných méně invazivních metod. Pravděpodobně největší vědecké úsilí bylo věnováno vývoji testů detekujících cirkulující miRNA v krevním séru a plasmě, které jsou specifické pro různé typy lidských malignit. První studie o extracelulárních miRNA byla publikována v roce 2007 (Valadi, Ekstrom et al. 2007). *In vitro* byly detekovány extracelulární miRNA v exozomech, které byly následně exportovány do buněk příjemce. Další studie, která detekovala miRNA v tělesných tekutinách, byla vydána v roce 2008 a popisovala placentární miRNA cirkulující

v mateřské krvi (Chim, Shing et al. 2008). Následovaly studie, které poskytly první indikace, že cirkulující miRNA mohou sloužit i jako biomarkery maligních procesů. Například Lawrie (2008) našel zvýšení miRNA-21, miRNA-155 a miRNA-210 v séru difuzního velkobuněčného B-buněčného lymfomu (DLBCL) (Lawrie, Shilling et al. 2009). Tewariho skupina prokázala zvýšení sérové miR-141 u rakovinou prostaty (Mitchell, Parkin et al. 2008). Zvýšení miRNA-25 a miRNA-223 bylo detekováno v séru pacientů s karcinomem plic (Chen, Ba et al. 2008). Přesvědčivé výsledky těchto a dalších studií doprovázelo primární nadšení, že „tekutá biopsie“ může vyloučit potřebu invazivnějšího testování a má potenciál pro včasné varování před onkogenezi.

V současné době jsou miRNA hlavním tématem tisíců publikací vycházejících každý rok, ale přesné mechanismy mnoha miRNA nejsou dosud známy a jejich úloha v patologických a fyziologických stavech zatím není zcela objasněna. Použití miRNA v klinické praxi je tedy prozatím omezené. Některé panely miRNA, jako například pro diagnostiku rakoviny štítné žlázy a pankreatu (Interpace Diagnostic) jsou komerčně dostupné a v klinické praxi využívány. Ve srovnání s tím, ale terapeutické možnosti využití miRNA, které jsou založeny hlavně na produktech napodobujících miRNA a antagonisty specifických miRNA, jsou méně dostupné. Výjimkou jsou léky Miravirsin od výrobce Roche a RG-101 od Regulus Therapeutics, určené k léčbě hepatitidy C, jsou považovány za stěžejní produkty této třídy léčiv. Ale většina léků na bázi miRNA jsou zatím ve fázi klinických studií a nedosáhlo klinického použití (Bonneau, Neveu et al. 2019).

Na základě dostupných znalostí o miRNA, o jejich regulačních vlastnostech, schopnostech zasahovat do základních patogenetických mechanismů, si tato práce klade za cíl odhalení malignizačních procesů v lidském organismu právě pomocí detekce miRNA. Můj výzkum se věnuje vývoji a potvrzení metody, která by umožnila diagnostikovat s poměrně vysokou mírou jistoty maligní hematologické onemocnění kožní T-buněčný lymfom a dále rozlišit jednotlivé typy a stádia tohoto onemocnění (Dusilkova, Basova et al. 2017). (Výsledky výzkumu jsou popsány v kapitole „Hlavní výsledky“. Článek je připojen na konci této práce v přílohách). Metoda spočívá ve stanovení molekul specifických miRNA v krevním séru pacienta v průběhu onemocnění. Práce ukazuje, že plazmatické hladiny specifických miRNA jsou spojeny s patognomickými rysy studovaného maligního onemocnění. Detekce specifických miRNA může přidávat informace nad rámec aktuálně používaných skórovacích systémů.

1.1. mikroRNA

MikroRNA představují početnou skupinu buněčných modulátorů, které významně zasahují do procesů regulace genové exprese. Původně byly identifikovány dvě miRNA lin-4 a let-7 v haďátku *Caenorhabditis elegans*, které se účastní regulačních procesů vývoje. miRNA byly dále nalezeny v genomech téměř všech organismů, včetně červů, hmyzu, rostlin a savců. miRNA mají různé vzorce exprese v závislosti na tkáni, mohou regulovat různé vývojové, fyziologické a patologické procesy. Každá miRNA ovlivňuje velké množství potenciálních cílových genů a obecně se předpokládá, že miRNA regulují více než 30 procent protein kódujících genů v lidském genomu (Lewis, Burge et al. 2005).

1.1.1. Vznik a mechanismus účinku mikroRNA

V roce 2006 získali Nobelovu cenu za fyziologii a lékařství Andrew Fire a Craig Mello Tito vedcí objevili a vysvětlili fenomén interference RNA (RNAi). Již v roce 1986 Fire A. pozoroval, že uměle vnesená dvouvláknová RNA (dsRNA) do *C. elegans* způsobuje vývojové defekty typické spíše pro odstranění genů odpovídajících svou sekvencí dotyčné dsRNA. Ukázalo se, že dsRNA hraje úlohu v blokaci genů, ke kterému je svou sekvencí kompatibilní, až v posttranskripčním stadiu tj. po přepisu do mRNA. To znamenalo, že pomocí procesu RNAi, jen na základě přesně určené sekvence genu, lze v živém organismu tento libovolný gen umlčet a tím také nalézt fenotypické změny jeho funkce (Fire, Xu et al. 1998).

Kromě *C. elegans* funguje RNAi u dalších organismů, včetně lidských buněk. Mezi principy umlčování genů patří kosuprese transgenní DNA nebo blok translace s využitím antisense nukleotidových sekvencí RNA.

Následně se ukázalo, že buňky většiny organismů, včetně lidského, obsahují malé molekuly RNA s nejasným významem. Teprve v říjnu 2001 navrhly tři nezávislé skupiny termín microRNA pro odlišnou třídu malých RNA, které nekódují bílkoviny, ale zasahují do procesu řízení aktivity genů procesem RNAi zapojených do post-transkripčních regulačních mechanismů (Lagos-Quintana, Rauhut et al. 2001), (Lau, Lim et al. 2001), (Lee and Ambros 2001). Objev miRNA se přičítá vědcům z Ambrosovy laboratoře (Lee, Feinbaum et al. 1993), kde byla objevena miRNA lin-4, což je protein-nekódující RNA, která se podílí na regulaci exprese transgenů v haďátku *C. elegans*. Další, také v *C. elegans*, objevená miRNA let-7, která se podílí na regulaci larválního vývoje, posílila význam těchto malých molekul o délce cca 21-

nukleotidů (Reinhart, Slack et al. 2000). Brzy byly detekovány stovky těchto krátkých molekul RNA i u dalších živočichů a lidí, které pro svou velikost dostaly název mikroRNA. miRNA představují početnou skupinu krátkých (18-25 nukleotidů) endogenních nekódujících molekul RNA, které hrají zásadní roli při regulaci exprese genů zejména na post-transkripční úrovni.

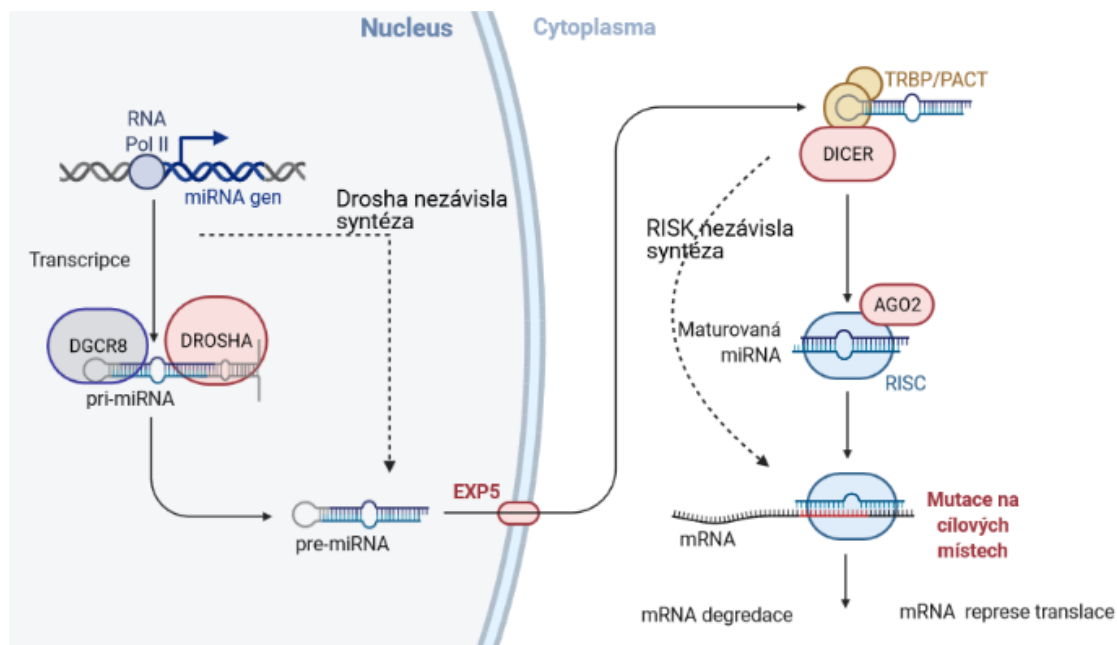
Biogeneze miRNA je vícestupňový proces, který probíhá jak v jádře, tak v cytoplazmě. Geny kódující miRNA jsou transkribovány z genomové DNA s využitím komplexů RNA polymerázy II, což vede ke vzniku transkriptů tzv. pri-miRNA, které mohou kódovat sekvence pro několik miRNA (tzv. rodiny). V jádře jsou transkripty pri-miRNA následně štěpeny pomocí RNázy III typu - endonukleázou Drosha a vazebného proteinu DGCR8 se vznikem vláken prekurzorů (70-90 nukleotidů dlouhých) zvané pre-miRNA. Pre-miRNA jsou transportovány pomocí proteinového komplexu Exportin-5/Ran-GTP do cytoplazmy. V cytoplazmě tvoří tyto „vlásečkové“ prekurzory komplex s vazebným proteinem TRBP/PACT, což dále umožňuje navázání RNázy III typu (Dicer), která následně štěpí tyto prekurzory za vzniku duplexu dsRNA (miRNA-miRNA*). Duplex dsRNA obsahuje jak zralý miRNA řetězec (miRNA), tak jeho komplementární vlákno (miRNA*). Dvouvláknová miRNA se dále váže na proteiny rodiny Ago (Argonaute), čímž dochází k rozpletení obou komplementárních jednovláken miRNA.

Zralá jednovláknová miRNA (označovaná též jako vodítko) je přednostně vložena do komplexu tlumící RNA (RISC), se vznikem miRNA-indukovaného komplexu miRISC, přičemž komplementární vlákno miRNA* je degradováno. Komplex miRISC zprostředkovává post-transkripční regulaci genové exprese, ve kterém miRNA představuje část rozpoznávající cílovou mRNA. miRNA se váže na 3'-nepřekládané oblasti (UTR) cílové mRNA a tak inhibuje její translaci. miRNA se komplementárně váže na cílovou mRNA a tím zajišťuje specifickou interakci komplexu miRISC. Daný typ represe se opírá o stupeň komplementarity sekvence mezi miRNA (tzv. „seed“ sekvence, která se nachází na 5' konci) a cílovou mRNA. Částečná komplementarita indukuje inhibici translace, dokonalá komplementarita zapříčiňuje rozpad mRNA. Parciální nebo neúplná komplementarita některých miRNA způsobuje to, že jednotlivé miRNA mohou v důsledku regulovat expresi až stovek cílových genů na rozličné úrovni, některé silněji jiné slaběji, čímž vzniká velmi různorodý a kontextuálně-závislý model regulace genové exprese (He and Hannon 2004). Deregulace klíčových miRNA může mít globální efekt v genové expresi a molekulárních procesech buňky. Z druhé strany, reparace aktivity miRNA může mít efekt ve zvratu patologických procesů a návratu k fyziologickému stavu.

Existují výzkumy, které ukazují, že tato klasická cesta biogeneze miRNA má některé výjimky. Například syntéza pre-miRNA může probíhat způsobem nezávislým na Drosha s výsledným vznikem tzv. miRtronů, které obsahují extra-nukleotidy na 3' nebo na 5' konci. V kroku maturace a navázání na Ago mohou být obě vlákna náhodně integrována do RISC, nebo se mohou vázat na mRNA způsobem nezávislým na RISC. V dalším kroku se některé miRISC komplexy mohou vázat na 5'-UTR mRNA, což vede dokonce k upregulaci jejich translace (Si, Shen et al. 2019).

Není zcela jasné, jestli tyto odchylky od klasické biosyntézy mohou vést k deregulaci výsledných miRNA. Evolučně miRtronový mechanismus biogeneze mohl poskytnout cestu pro vznik miRNA v nižších organizmech jako jsou *C. elegans* nebo *Drosophila melanogaster* ještě před vznikem Droshy. Ve vyšších organizmech tento typ bypassů zajišťuje sekundární mechanismus syntézy miRNA.

Obrázek 1. Schéma mechanismu nukleární a cytoplazmatické biogeneze mikroRNA.



Obrázek 1. V jádře se dlouhé molekuly pri-miRNA štěpí pomocí endonukleázy Drosha, za vzniku pre-miRNA, které jsou dále exportovány do cytoplasmy pomocí komplexů proteinů Exp5/RAN-GTP. V cytoplasmě se prekurzory miRNA štěpí pomocí endonukleázy Dicer. Duplexní RNA se odvíjí a opouští anti-sense vlákno, aby se začlenilo do komplexu s tlumícími multiproteiny RNA (RISC) a vedlo RISC ke komplementární mRNA. Šipky označují klasický mechanismus syntézy miRNA, přerušované čáry prezentují možné odchylky v biogenezi miRNA. (Obrázek vytvořen N.Dusílková pomocí BioRender Software).

Je obecné známo, že miRNA primárně zprostředkují posttranskripční downregulaci exprese, translační represi a rozpad mRNA závislý na komplementaritě miRNA k nepřekládaným oblastem mRNA. Avšak ve studii (Vasudevan, Tong et al. 2007) bylo prokázáno, že miRNA a jejich přidružené proteinové komplexy mohou posttranskripčně stimulovat genovou expresi přímými a nepřímými mechanismy. miRNA let-7 a syntetická miRcxcr4 přímo indukují upregulaci translace svých cílových mRNA při podmínce zástavy buněčného cyklu, a naopak klasicky snižují translaci cílové mRNA v dělicích se buňkách. miRNA-369-3 při zástavě buněčného cyklu nepřímo aktivuje genovou expresi pomocí faktoru TNF α a Ago2 proteinu. Výsledkem studie bylo zjištění, že aktivace je běžnou funkcí miRNA při zastavení buněčného cyklu. Celkovým závěrem bylo tvrzení, že funkce miRNA se mění mezi represí a aktivací během změn buněčného cyklu.

1.1.2. Mechanismus deregulace exprese mikroRNA

Biogeneze miRNA je složitý a přísně řízený proces vyžadující řadu klíčových enzymů a proteinů, včetně dvou endonukleáz RNA III. typu (Drosha a Dicer), kofaktorů DGCR8 a TRBP2, transportéru EXP5 a proteinů Ago. Deregulace tohoto procesu může vést k abnormální expresi miRNA. Během syntézy miRNA jsou tyto proteiny regulovány a jejich deregulace může vést k abnormální expresi miRNA. Byly publikovány studie, které prokazují, že za vznikem patologických změn stojí zvýšení nebo snížení exprese klíčových faktorů biogeneze miRNA. V případě Drosha a Dicer, jejich downregulace byla spojována se vznikem karcinomu ovarii a byla signifikantní u pokročilejších stadií nádorů. Oproti tomu vzorky tkání z nádorů ovarii vyznačující relativně vyšší expresi Dicer a Drosha byly asociovány s prodloužením celkového přežití pacientek (Merritt, Lin et al. 2008).

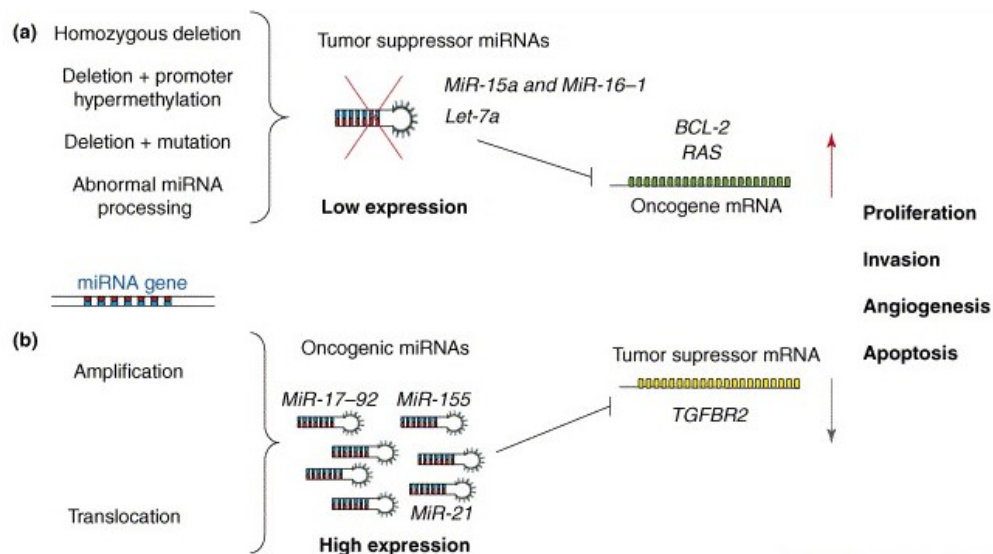
Hlavní mechanismy deregulace miRNA zahrnují procesy změn na genetické úrovni, jako amplifikace nebo delece genů miRNA, dále na úrovni epigenetické regulace a změny transkripčních faktorů. Velká část genů miRNA je umístěna ve fragilních oblastech genomu nebo na místech asociovaných s rakovinou, jako jsou například minimálně deletované oblasti a hraniční body translokace. Geny nacházející se v těchto oblastech jsou obvykle náchylnější k delecí, translokaci nebo amplifikaci.

Genová delece a amplifikace

miRNA, která za normálních podmínek snižují hladinu onkogenu, funguje tedy jako tumor supresor. Mutace nebo delece genu kódujícího tumorsupresorové miRNA nebo jiné

abnormality v biogenezi těchto miRNA mohou vést ke změně exprese cílového onkogenu, což následně přispívá k tvorbě nádoru. Například u chronické lymfocytární leukemie (CLL) je často pozorována delece v regionu chromosomu 13q14, kde se nachází geny pro miRNA-15a a miRNA-16-1. U více než poloviny případů pacientů CLL jejich exprese je snížena nebo zcela chybí (Calin, Dumitru et al. 2002). Snížená exprese miR-15a, miR-16-1 tedy hraje zásadní roli v patogenezi CLL. V následující studii stejného kolektivu autorů bylo prokázáno, že deprese onkogenu *BCL2* je zprostředkována právě pomocí miRNA-16-1 a miRNA-15a. Delece úseku 13q14, kde jsou tyto miRNA kódovány, vede ke snížení nebo dokonce k absenci deprese onkogenu *BCL2*, což souvisí s vyšším rizikem vývoje maligního onemocnění CLL (Cimmino, Calin et al. 2005). (Obr.2a) Opačným příkladem je rodina miRNA-17-92, která se nachází v oblasti 13q31-q32. V různých typech nádorů je tato oblast často amplifikována, což má za následek zvýšení množství zralých miRNA tohoto klastru. (Obr.2b) Rodina miRNA-17-92, která má širokou škálu onkogenních funkcí, je vysoce exprimována například u rakoviny žaludku, prsu, prostaty, kolorektálního karcinomu, malobuněčného karcinomu plic, mnohočetného myelomu a neHodgkinského lymfomu (He, Thomson et al. 2005).

Obrázek 2. mikroRNA jako nádorové supresory a onkogeny.



Obrázek 2. (a) Aberace genů pro tumor supresorové miRNA způsobí jejich sníženou expresi a tím i nedostatečnou potlačující funkci vůči onkogenní mRNA. (b) Nadměrná exprese onkogenních miRNA zvýšeně potlačuje tumor supresorové mRNA, přispívá tak k tvorbě tumoru stimulací proliferace, angiogeneze a invaze. BCL-2 (B-cell lymphoma 2) anti-apoptotický regulační protein. RAS (Rat Sarcoma) protoonkogen buněčné signalizace. TGFB2 (Transforming growth factor, beta receptor II) tumor supresor (převzato z Garzon, Fabbri et al. 2006).

Zajímavé výsledky přinesla studie, která se zabývala vztahem mezi deregulací dvou miRNA (miRNA-219-2 a miRNA-199b) a účinností léčby imatinibem pacientů s CML. Přibližně 15% CML pacientů vykazuje delecí genů kolem hraničních bodů translokace při tvorbě filadelfského (Ph-) chromozomu. Tento typ delecce (9q) se ukázal být relevantní k expresi fúzního genu *BCR-ABL*. Geny kódující miRNA 219-2 a miRNA-199b se nacházejí centromericky ke genu *ABL* (v chromozomální oblasti v 9q34) a v případě delecce 9q je gen *ABL* často ztracen. Proto může být významné snížení exprese miRNA-199b a miRNA-219-2 markerem právě absence *ABL* genu. Autoři ukazují, že snížená exprese miR-199b je asociována s rezistencí na imatinib (u 44.11% pacientů). Je tedy na místě se domnívat, že určité delecce v oblasti genu *ABL* mohou hrát významnou roli v patogenezi CML a že zmíněné miRNA mohou nabídnout nové diagnostické a terapeutické strategie (Joshi, Chandrakala et al. 2014).

Metylace a histonová modifikace genů mikroRNA

Metylace DNA a modifikace histonů mohou změnit genovou expresi beze změny sekvence DNA. Posttranslační modifikace, jako metylace, acetylace a fosforylace, jsou silně asociovány s aktivitou genové transkripce nebo transkripční represe, a výsledně mohou vést například k umlčení tumor-supresorových miRNA. Je známo, že miRNA-34a je tumor supresor, který je downregulován u mnoha druhů nádorových buněk a má značný efekt na citlivost nádorových buněk k chemoterapeutickým lékům. Ve studii Lodygin (2008) bylo prokázáno, že ztráta exprese miRNA-34a v důsledku metylace jejího promotoru byla přítomna u většiny (79,1%) vzorků primárního karcinomu prostaty. Methylace promotoru miRNA-34a byly nalezeny dále v primárních vzorcích buněčných linií melanomu, plic, prsu, ledviny a tlustého střeva (Lodygin, Tarasov et al. 2008).

Ve studii Yang (2012) byla zjištěna downregulace tumor-supresorové miRNA-130b v multirezistentních buňkách rakoviny vaječníků. Úroveň metylace miR-130b negativně korelovala s expresí této miRNA a predikovala jak horší histologický typ nádoru, tak i horší klinický staging. Demethylace pomocí decitabinu (5-Aza-CdR) vedla k reaktivaci exprese miRNA-130b v buněčných liniích, čímž se zvýšila citlivost buněk na cisplatinu a taxol (Yang, Cai et al. 2012). Taktéž upregulace miRNA-21 v různých tkáních může podporovat vznik a vývoj nádorů a rezistenci k cytostatikům. V práci Song (2013) bylo retrospektivně shromážděno 41 případů pacientů s pokročilým karcinomem pankreatu, kteří byli léčeni gemcitabinem. V séru těchto pacientů byly stanoveny hladiny cirkulující miRNA-21 a bylo

prokázáno, že upregulace miRNA-21 v rakovinných buňkách pankreatu přímo korelovala s horší odpovědí pacientů na léčbu. Indukce miR-21 byla zapříčiněna acetylací histonů v promotorové zóně a byla asociovaná s chemorezistencí na gemcitabin (Song, Wang et al. 2013).

Abnormality transkripčních faktorů

Transkripční faktory jsou proteiny, které se mohou specificky vázat na Cis-regulační elementy (CRE) v promotorové oblasti eukaryotického genu, aktivovat nebo inhibovat transkripci genu přímo nebo pomocí jiných proteinů. Nejznámějším transkripčním faktorem v regulaci miRNA je Tp53. Tp53 může fungovat jako tumor supresor a jeho exprese se zvyšuje při poškození DNA (Hermeking 2007). Bylo prokázáno, že se Tp53 podílí na transkripci genů kódujících rodinu miRNA-34 a může tak jejich transkripci významně upregulovat. Výsledně, miRNA-34a, která je obecně považována za tumor supresorovou, zvyšuje citlivost nádorových buněk na chemoterapii (He, He et al. 2007).

Dva transkripční faktory, spojené s Tp53, jsou p63 a p73 projevují odlišné funkce. P73 zprostředkovává chemosenzitivitu, zatímco p63 podporuje buněčnou proliferaci a přežití. A oba tyto transkripční faktory mohou vzájemně regulovat expresi miRNA-193a-5p. Uvedená miRNA má výraznou tumor supresorovou aktivitu, omezuje proliferaci rakovinných buněk a zpomaluje přechod z fáze buněčného cyklu G1 do fáze S. Transkripční faktor p63 potlačuje exprese miRNA-193a-5p, a naopak pro-apoptická izoforma p73 aktivuje expresi miRNA jak v normálních, tak v nádorových buňkách. Důležité je, že při terapeutické inhibici miRNA-193a-5p cysplatinou byla přerušena zpětná vazba indukovaná transkripčními faktory p63/p73 a tím se potlačila životaschopnost nádorových buněk a vyvolalo zvýšení chemosenzitivity jak *in vitro*, tak *in vivo* (Ory, Ramsey et al. 2011).

Další studie autorů Tran M. a Choi M. (2013) uvádí, že Tp53 a izoforma p63 regulují transkripci miRNA-205 a podílejí se tak na kontrole procesu epiteliálně-mezenchymálního přechodu (EMT), při kterém epiteliální buňky ztrácejí svoji polaritu a adhezi a získávají migrační a invazivní vlastnosti. EMT je nezbytný pro řadu vývojových procesů, vyskytuje se při hojení ran, při fibróze orgánů, při zahájení metastáz a při progresi rakoviny. V experimentu, kde byl gen pro p63 vyřazen z funkce, došlo k redukci exprese primárních a zralých forem miRNA-205. Knockdown genu pro p63 vedl ke snížení vazby RNA polymerázy II na promotor *miRNA-205HG* genu, s výslednou inhibicí jeho transkripce (Tran, Choi et al. 2013).

miRNA jsou mikromolekuly, které jsou zásadní pro normální vývoj organismů a účastní se různých biologických procesů. Jejich deregulace může být výsledkem změn mimo jiné jak na genetické, tak i na epigenetické úrovni. Abnormality v procesu biogeneze miRNA často vedou k poruše biologických mechanismů v různých systémech, orgánech a tkáních. Proto miRNA jsou široce zkoumány jako potenciální biomarkery pro řadu fyziologických a patologických stavů.

1.1.3. mikroRNA a hematologické malignity

Molekulárně-biologická a genetická charakterizace je zásadní při klinickém hodnocení téměř každé formy hematologické malignity. Na jejím základě se často rozhoduje o diagnóze, prognóze a možnosti terapeutického zásahu. Deregulace exprese genů kódujících miRNA u hemato-onkologických pacientů byla poprvé popsána v roce 2002, kdy v buňkách CLL byla zjištěna snížená exprese miRNA-15 a miRNA-16. Bylo prokázáno, že tyto miRNA mají díky své aktivitě schopnost potlačovat nádory tím, že mají inhibiční aktivitu na onkogen *BCL2*, který kóduje protein důležitý pro přežití rakovinotvorných buněk (Cimmino, Calin et al. 2005). Na druhou stranu byla v buňkách CLL zvýšena hladina exprese miR-155, což u tohoto onemocnění je spojeno se změnami cílového transkripčního faktoru MYB. MYB je protoonkogen, který hraje roli v regulaci buněčného cyklu, a přestavba jeho genu zvyšuje riziko karcinogeneze. Tyto výzkumy ukázaly, jak důležitou roli hrají miRNA v patogenezi maligní transformace hematopoetických buněk.

mikroRNA a leukemie

Leukemie jsou skupinou život-ohrožujících maligních onemocnění krve a kostní dřeně, které jsou charakterizovány klonálním vývojem hematopoetické buňky s poruchou vyžívání vznikající na podkladě mutačních změn. Leukemie se rozlišují podle rizika progresu onemocnění na akutní a chronické, dle linií proliferujícího klonu na myeloidní a lymfoidní, dle stupně diferenciaci hematologického progenitoru, ve kterém vznikají primární genetické změny, na jednotlivé subtypy. Akutní lymfoblastová leukemie (ALL) je hematologická neoplazie nejčastěji pozorovaná u pediatrické populace, zatímco u dospělých je méně častá než akutní myeloidní leukemie (AML). S přibývajícím se věkem, faktory spojené s agresivnější biologii leukemických onemocnění mají tendenci se zvyšovat, zatímco odpověď na léčbu s věkem pacientů klesá (Juliussen and Hough 2016).

Akutní lymfoblastová leukemie (ALL)

Přibližně v 75% případů ALL se objevuje jedna nebo více chromozomálních aberací. ALL mohou zahrnovat klonalitu B- nebo T-linii, mohou mít blokaci v různých stádiích vyžívání, mohou mít různé buněčné imunofenotypy s různými profily exprese miRNA. Ve studii publikované v roce 2007 bylo ukázáno, že ALL lze odlišit od AML na základě exprese některých miRNA (Mi, Lu et al. 2007). Při profilování exprese miRNA bylo mezi vzorky ALL a AML nalezeno 27 různě exprimovaných miRNA. S přesností více než 95% bylo možno odlišit vzorky AML, kde byla nejvíce exprimována *let-7b* a *miRNA-223*; a vzorky ALL, kde byla zvýšeně exprimována *miRNA-128a* a *miRNA-128b*. Toto zjištění vedlo k zintenzivnění výzkumů se snahou o zdokonalování diagnostických markerů pro ALL.

V roce 2013 byl identifikován specifický profil exprese miRNA pro ALL. De Leeuw ve své práci uvedl pět miRNA: *miRNA-23a*, *miRNA-27a*, *miRNA-199b*, *miRNA-221* a *miRNA-223*, které dokázaly rozlišit nejasnou akutní leukémii jako ALL (de Leeuw, van den Ancker et al. 2013).

Ve srovnání s normálními vzorky kostní dřeně od zdravých dárců, ve vzorcích ALL byly méně exprimovány *miRNA-100*, *miRNA-196b* a *let-7e*, zatímco *miRNA-128a* a *miRNA-181b* byly exprimovány více. Kromě toho bylo také zjištěno, že aberantní exprese *miRNA-100* souvisela s translokací(12;21) (de Oliveira, Brassesco et al. 2012).

T- a B-linie ALL lze navzájem odlišit na základě exprese *miRNA-148*, *miRNA-151* a *miRNA-424*. Kromě toho lze podskupiny B-linie, rozdělené dle molekulárně genetických abnormalit jako: *BCR/ABL*, *MLL/AF4*, *E2A/PBX1* a B-ALL bez známých aberací, odlišit sadou šesti miRNA: *miRNA-425-5p*, *miRNA-191*, *miRNA-146b*, *miRNA-128*, *miRNA-629* a *miRNA-126* (Fulci, Colombo et al. 2009).

Ve studii Gutierrez-Camino (2014) bylo analyzováno 118 vzorků jednonukleotidových polymorfismů (SNP, single nucleotide polymorfismus) přítomných v genech kódujících miRNA. Byly detekovány tři SNP přítomné v genech *miRNA-612*, *miRNA-499* a *miRNA-449b*, a osm SNP přítomných v genech kódujících proteiny, které jsou nezbytné pro biogenezi miRNA (*TNRC6B*, *DROSHA*, *DGCR8*, *EIF2C1*, *CNOT1* a *CNOT6*). Genetické abnormality ve výše uvedených genech byly signifikantně spojené s ALL výskytem. (Gutierrez-Camino, Lopez-Lopez et al. 2014). Tím se zdůraznil klinický význam miRNA pro riziko vývoje hematologických malignit, včetně ALL.

Význam miRNA byl také ověřen a popsán v asociaci s léčebnou strategií ALL a rezistencí na několik běžně používaných léčiv. Glukokortikoidy (GC) indukují apoptózu v buňkách lymfoidní linie, a proto se používají při léčbě ALL a souvisejících malignit. Zhang (Zhang, Yang et al. 2009) popsal soubor miRNA (miR-18a, miR-532, miR-218, miR-625, miR-193a, miR-638, miR-550 a miR-633), pomocí kterého lze předikovat rezistenci na glukokortikoid prednison (PRED) u ALL pacientů. Později, v samostatné studii zahrnující vzorky ALL pacientů dětského věku (cALL), se ukázalo, že expresní profily stejné skupiny miRNA lze podobně použít i k predikci časné odpovědi na tento glukokortikoid (Xu, Guo et al. 2015). Navíc se ukázalo, že PRED také významně zvýšil expresi miR-16-1 a miR-15a, čímž posílil jejich tumor-supresorovou aktivitu (Azimi, Hagh et al. 2016).

V tabl. 1. jsou uvedeny klíčové miRNA, účastníci se patogenetických změn při vzniku ALL, které mohou být použity při diferenciální diagnostice.

Tabulka 1. mikroRNA při diagnostice a diferenciální diagnostice ALL. Převzato z (Luan, Yang et al. 2015).

miRNA (gen. lokus)	cílový gen	hlavní účinek cílového genu	diferenciální diagnostika ALL
Let-7b (22q13)	<i>HMGA</i>	onkogen	Downregulovaný v ALL v porovnání s AML
miRNA-23a (19p13.13)	<i>HOXB4</i> , <i>BCR/ABL</i> , <i>CXCL12</i>	<i>HOXB4</i> je onkogen; <i>BCR/ABL</i> je onkogen, <i>CXCL12</i> reguluje interakci mezi hematopoet. progenitory a stromálními buňkami	Vyšší exprese v AML ve srovnání s ALL
miRNA-27a (19p13.13)	<i>4-3-3θ</i>	<i>4-3-3θ</i> antiapoptotický gen	Vyšší v AML ve srovnání s ALL
miRNA-125b-1 (11q24)	<i>Trp53inp1</i>	proapoptotický gen	Upregulován v B-ALL s chromozomální translokací t(11; 14) (q24; q32)
miRNA-128-3p	<i>PHF6</i>	tumorsupresor	Významně vyšší ve všech vzorcích v AML než v normálních vzorcích
miRNA-128a (2q21)	<i>BMI-1</i>	Gen reguluje samoobnovení leukemických buněk	Upregulován v ALL ve srovnání s AML, vysoce vyjádřen v E2A/PBX1+

miRNA-148a (7p15.2)	<i>BIM, PTEN</i>	<i>BIM</i> a <i>PTEN</i> jsou proapoptické geny	Vysoce exprimovány v T-ALL
miRNA-151 (chr.8)	<i>ITK, ZAP-7060</i>	<i>ITK</i> asociuje s autoimunitními onemocněními a T-buněčnými malignitami;	Downregulován v T-ALL
miRNA-196a (17q21-22)	<i>HOXB8, ERG</i>	<i>HOXB8</i> a <i>ERG</i> zvyšují přežití buněk a proliferaci progenitorů	Downregulovaný v T-ALL ve srovnání s AML; vysoká exprese miRNA-196a spojena s imunofenotypem T-ALL
miRNA-196b (7p15)	<i>c-MYC, ERG</i>	<i>ERG</i> a <i>c-myc</i> zvyšují přežití buněk a proliferaci progenitorů	Downregulovaný v B-ALL; upregulován v MLL-rearranged a dalších ALL
miRNA-221 (Xp11.3)	<i>p27</i>	<i>p27</i> brání progresi buněčného cyklu z G1 do fáze S	Vyšší exprese v AML ve srovnání s ALL
miRNA-223 (Xq12)	<i>FOXO, LMO2</i>	<i>FOXO</i> potlačuje tumor supresorové geny, <i>LMO2</i> je pro-onkogen v T-buňkách	Upregulace v T-ALL s myeloidními rysy; downregulovaných v ALL ve srovnání s AML
miRNA-424 (Xq26.3)	<i>NFI-A, VEGFR2</i>	<i>NFI-A</i> moduluje diferenciaci hematopoet. progenitorů, <i>VEGF</i> inhibuje invazi nádorových buněk	Vysoce exprimované u pacientů s T-ALL

Pro ALL s fúzním genem *BCR-ABL* může mít aplikace inhibitorů tyrozinkinázy jako je imatinib zásadní terapeutický význam. Ale u akutních leukémií s přestavbou *BCR-ABL1* není léčba imatinibem v mnoha případech dostačující. *BCR-ABL1* a *ABL1* jsou přímými cíli miRNA-203, která je často umlčována epigenetickými mechanismy jako hypermetylací promotoru. Obnovení exprese miRNA-203 pomocí demetylační léčby 5-azacitidinem snižuje hladiny exprese *ABL1* a *BCR-ABL1* a inhibuje buněčnou proliferaci (Faber, Gregory et al. 2008). U cALL typu MLL-AF4 s horší prognózou je miRNA-143 epigeneticky potlačována promotorovou hypermetylací v MLL-AF4-positivních primárních blastech a v buněčných liniích. miRNA-143 byla identifikována jako regulátor exprese fúzního genu *MLL-AF4* a její obnovení by mohlo vyvolat žádoucí apoptózu. Upregulace exprese miRNA-143 má proto terapeutický příslib pro ALL MLL-AF4 (Dou, Zheng et al. 2012).

Akutní myeloidní leukemie (AML)

AML je hematologická malignita charakterizovaná nekontrolovaným růstem myeloidních progenitorů, je výsledkem řady chromozomálních aberací a genetických abnormalit. Postiženy mohou být i geny, které kódují miRNA. První studie charakterizující úlohu miRNA v AML byly zaměřené na identifikaci AML-specifických miRNA. Ve studii publikované skupinou Dr. Pigazziho byly detekované nízké hladiny miR-34b ve vzorcích pacientů s AML. Exogenní exprese miRNA-34b *in vitro* způsobila abnormality buněčného cyklu a došlo ke změně exprese a metylace cílového *CREB* genu (cAMP-CRE response element-binding protein)(Pigazzi M., 2013). Nízké hladiny exprese miRNA-9 a miRNA-582 byly pozorovány u pacientů s AML s chromozomální aberací t(8;21), která je spojena s horší prognózou (Emmrich S., 2014). Následně, ve studii publikované v roce 2017 (Obulkasim A., 2017) byl identifikován specifický profil 47 miRNA pro rozlišení různých podtypů AML. Nejvíce exprimována miRNA-155 byla navržena jako potenciální diagnostický biomarker pro všechny AML a miRNA-196b jako specifický biomarker pro podskupiny AML M4 – M5. Vysoká exprese miR-155 je také nepříznivým prognostickým faktorem u dětských NK-AML, je spojena s horším celkovým přežitím (OS) a přežitím do manifestace onemocnění (EFS, event free survival) (Ramamurthy R., 2016).

Vzhledem k tomu, že seznam miRNA a jejich cílových mRNA, které jsou relevantní pro onemocnění AML stále roste, rozšiřuje se i představa o terapeutické manipulaci s těmito miRNA. Jedná se například o podání oligonukleotidových inhibitorů LNA (locked nucleic acid) pro zacílení známých onkomiRů, které mohou způsobit vznik AML. Nebo podání syntetických miRNA, které by působily jako tumor supresory. Cílené podání miR-29b prostřednictvím lipidových nanočástic konjugovaných s transferinem, je dobrým příkladem účinnosti terapeutika založeného na miRNA. Podání miRNA-29b vedlo ke snížení růstu leukemických buněk a k prodloužení celkového přežití myších AML modelů spolu s down-regulací exprese genů: *CDK6*, *SPI1*, *FLT3*, *DNMT* a *KIT*, které ovlivňují celou řadu buněčných procesů v AML. Tato studie potvrzuje možnost léčby AML pomocí jediné miRNA, která současně cílí na mnoho drah buněčné signalizace (Huang, Schwind et al. 2013).

miRNA ovlivňují leukemický vývoj a progresi prostřednictvím deregulace onkogenů nebo tumor supresorů a to buď přímým účinkem na mRNA, nebo nepřímo na úrovni proteinů. Pro ilustraci těchto konceptů v tabulce 2 jsou uvedeny některé miRNA, které hrají roli v patogenezi AML. (Tabl. 2.)

Tabulka 2. mikroRNA v patogenezi AML. Převzato z (Wallace and O'Connell 2017).

miRNA	Cílové geny	Mechanismus deregulace	Výsledný efekt	
			OncomiR	Tumor suppressor
miR-17-92 klaster	<i>P21</i>	aktivace MYC; epigenetická aktivace cestou MLL-fuzního proteinu; amplifikace v MLL-AML	↑ proliferace, ↑ přežití, ↓ diferenciace, ↑ leukemogeneze	
miR-22	<i>TET2, CRTCI, FLT3, MYCBP</i>	Downregulace pomocí TET1/GFI1/EZH2/SIN3A; a při ↓ PU.1	↑ proliferace, ↑ přežití, ↓ diferenciace, ↑ sebeobnova	↓ AML růst blastů, ↑ diferenciace, ↓ leukemická progresse (<i>de novo</i> AML)
miR-29b	<i>MCL-1, CXXC6, CDK6, AKT2, CCND2, SPI1, DNMT3A, DNMT3B</i>	Downregulace při ztrátě <i>CEBPA</i> ; při del7q; represe MYC; represe NF-kB		↓ buněčný růst, ↑ apoptoza, ↓ leukemická progresse, prevence DNA hypermetylace
miR-125b	<i>LIN28A, IRF4</i>	zvýšení při t(2;11)(p21;q23)	↑ proliferace, ↑ produkce myeloid progenitorů, ↑ sebeobnova	
miR-146a	<i>TRAF6, IRAK1, TIRAP</i>	Delece del(5q) MDS-AML		↓ proliferace, ↓ přežití, ↓ NF-kB aktivace
miR-155	<i>CEBPB, SHIP1, PU.1</i>	Target via STAT5 a NF-kB při FLT3-ITD+ AML; upregulace <i>MLL</i> -fuzního genu <i>MEIS1</i>	↑ proliferace, ↑ přežití, negativní prognóza pro CN-AML	

miR-193a	<i>AML1/ETO, DNMT3 A, HDAC3, KIT, CCN D1, MDM2</i>			↓ buněčný růst, ↑apoptoza, ↑diferenciace
miR-223	E2F1, MEF2C, FBX W7	represe E2F1; epigeneticky umlčen AML1/ETO		↓proliferace, ↑apoptoza, ↑diferenciace

Myelodysplastický syndrom (MDS)

Je dále vhodné zmínit klonální onemocnění, označované jako pre-leukemie, myelodysplastický syndrom, který je častým onkohematologickým onemocněním pacientů staršího věku s vysokým stupněm rizika transformace do AML. Ve studii výzkumného týmu ÚHKT bylo prokázáno, že spektrum cirkulujících miRNA v plazmě pacientů s MDS se liší v souvislosti se stupněm rizika tohoto onemocnění. Hladiny exprese miRNA-27a-3p, miRNA-150-5p, miRNA-199a-5p, miRNA-223-3p a miRNA-451a byly sniženy u pacientů MDS s vyšším rizikem transformace do AML. Hladina exprese miRNA-451a byla pomocí multivariální analýzy identifikována jako nezávislý prediktor doby do progresu (PFS). Byla prokázána významná souvislost hladiny miR-223-3p s celkovým přežitím (Dostálová M., 2017). Tato data naznačují, že plazmatické hladiny specifických miRNA jsou spojeny s daným onemocněním, jsou často v asociaci s klinickými příznaky a mohou přidávat informace nad rámec aktuálně používaných skórovacích systémů.

Chronická lymfocytární leukemie (CLL)

CLL je onemocnění zralých B-buněk a je jednou z nejčastějších leukémií ve světě. U některých CLL pacientů onemocnění progreduje velmi pomalu, u jiných je nástup onemocnění rychlejší a vyžaduje včasnou léčbu.

CLL je charakterizován klonální proliferací a akumulací zralých B-buněk v krvi, kostní dřeni, slezině a lymfatických uzlinách. CLL je klinicky heterogenní malignita s velkou molekulární inter-individualitou, která je zásadně ovlivněna rozdíly v genetických změnách. Byla identifikována řada potenciálních biomarkerů pro prognózu a odpověď na terapii, mezi které patří časté chromozomální aberace: del(13q14), del(11q22.3), del(17p), trizomie 12, amp(8q24.21), amp(3q26.32) a del(8p) (Landau and Wu 2013). Mutace genů, které jsou předpokládány kauzality ve vývoji CLL: *TP53*, *SF3B1*, *NOTCH1*, *MYD88*, *ATM*,

SAMHD1, *NRAS* a *BIRC3*, vykazují výraznou asociaci s prognózou tohoto onemocnění (Puiggros, Blanco et al. 2014).

Doposud se v diagnostice a prognostice pacientů s CLL osvědčilo několik markerů, mezi které patří: mutační stav genu pro variabilní oblast těžkého řetězce imunoglobulinu (*IGHV*), stanovení hladiny exprese 70 kDa Zeta-asociovaného proteinu (*ZAP-70*) a *CD38*. Nemutovaný gen *IGHV* a vysoká exprese *ZAP-70* nebo *CD38* jsou obvykle spojeny s agresivním průběhem, zatímco pacienti s mutovanými klony *IGHV* a nízkou expresí *ZAP-70* nebo *CD38* mají indolentní průběh onemocnění (Kaur, Ruhela et al. 2020). Ve studii Dr. Calina z roku 2002 byla u pacientů s CLL ve vysokém riziku tj. s vysokou expresí proteinové kinázy *ZAP70* a nemutovaným stavem genu *IGHV* detekována aberantní exprese 13-ti miRNA. Abnormální exprese těchto miRNA, včetně miR-15a, miR-16, miR-29a/b/c, miR-223 a miR-150, souvisela s rizikem progresu CLL a lze ji použít jako další prognostický marker. U pacientů s CLL se běžně vyskytuje delece úseku 13q14, kde se nachází geny kódující tumor supresorové miRNA (miRNA-15a, miRNA-16-1). Tyto miRNA regulují expresi onkogenu *BCL2*, což je významný regulátor buněčného cyklu a apoptózy. Delece úseku DNA, kde se nacházejí právě tyto miRNA, vede k nepříznivým následkům jako je snížení nebo absence deprese onkogenu *BCL2*, což s sebou nese zvýšené riziko vzniku maligního onemocnění CLL (Cimmino, Calin et al. 2005). Kromě toho je častá delece dlouhého ramene chromozomu 11 del(11q), která se nachází u 10–20% z celkového počtu případů CLL, je spojená s mutací genu *ATM*, která interferuje s procesem opravy DNA během apoptózy vyvolanou genem *TP53*. V této deletované oblasti jsou zastoupeny členy rodiny miR-34: miR-34b a miR-34c, u nichž se ukázalo, že jsou transkripčně regulovány *TP53*. V Tabl. 3 jsou uvedeny příklady nejčastějších mikroRNA, účastníci se patogeneze CLL, označované jako diagnostické a prognostické markery.

Tabulka 3. Exprese miRNA v CLL a jejich implikace jako diagnostické a prognostické markery. Převzato z (Giza, Calin et al. 2015).

miRNA (gen. lokus)	Exprese v CLL	Cílové geny	Diagnostické a prognostické markery
Let-7 rodina	snížená exprese	<i>CCND1</i> , <i>CDC25a</i> , <i>CDK6</i> , <i>HOXA9</i> , <i>IMP-1</i> , <i>MYC</i> , <i>RAS</i>	markerem odpovědi na chemoterapii
miR-16-1/miR-15a klast (13q14.3 intron)	snížená exprese	<i>BCL2</i> , <i>CARD10</i> , <i>CCND1</i> , <i>CDK6</i> , <i>CDC27</i> , <i>DMTF1</i> , <i>MCL1</i> , <i>NGN2</i> , <i>VEGF</i>	<i>de novo</i> agresivní CLL
miR-21(17q23.1, 3' UTR TMEM49)	zvýšená exprese	<i>BCL2</i> , <i>MASPIN</i> , <i>PDCD4</i> , <i>PTEN</i> , <i>TPM1</i> , <i>MCL1</i>	<i>de novo</i> DLBCL, odpověď na chemoterapii
miR-29 rodina	snížená exprese	<i>DNMT3A</i> , <i>DNMT3B</i>	zkrácení intervalu mezi Dg a terapií

miR-34 rodina (1p36.23 a 11q23.1)	snížená exprese	<i>BLC2, CCDN1, CCNE2, CDK4/6, DLL1, E23, Notch 1, MYCN, MET</i>	zhoršení odpovědi na poškození DNA a fludarabin-refrakterní CLL
miR-143/145 klastr	snížená exprese	<i>ERK5, HOXA9, PARP8</i>	
miR-155 (21q21.3)	zvýšená exprese	<i>BIC, PU.1, SOCS</i>	horší prognóza
miR-181 rodina	zvýšená exprese	<i>HOXA11, TLC1</i>	zkrácení intervalu mezi Dg a terapií

MiRNA-155 je nejvíce studovanou mikroRNA, a proto je jednou z mála, u které byl relativně dostatečně popsán mechanismus regulace. Ve studii (Vargova, Curik et al. 2011) autoři prokázali, že exprese miRNA-155 je spojená s proteinem MYB, který se váže do promotorové oblasti genu *MIR155HG* (kóduje maturovanou miR-155, zvaný také *BIC* - B-Cell Receptor Inducible) a tím ho transkripčně aktivuje. Přímý důkaz, že se MYB fyzicky váže do vazebního místa promotoru *MIR155HG* byl prokázán luciferázovou esejí jak na buněčných kulturách, tak i na buňkách z patientských vzorků. Navíc, byly popsány další zajímavé cíle pro gen *MYB*: *BCL2*, *CD5*; a pro *MIR155HG* jsou: *PU.1*, *SHIP1*, *SATB1*, *CHD6*. Výsledky této práce ukazují na důležitost regulační dráhy u CLL, kde protein MYB stimuluje expresi genu *MIR155HG*, který následně prokazatelně inhibuje expresi hematopoetického faktoru *PU.1*. (klasická negativní regulace miRNA a jeho cílů), a zvýšená exprese miR-155 vede k progresi prekancerózní monoklonální B-lymfocytózy do rozvinutého CLL (Ferrajoli, Shanafelt et al. 2013). V další naší práci (Vargova, Pesta et al. 2017) za využití multivariantní analýzy byl popsán pozitivní vztah mezi expresí miR-150/miR-155 a expresí rutinních prognostických parametrů CLL. Výsledky potvrzují pozitivní korelaci exprese miR-155 s progresí CLL (práce je zařazena do vedlejších výsledků předložené disertaci v kap. 6.2.)

microRNA a lymfomy

Lymfomy jsou heterogenní skupinou rakovin, odvozených z lymfocytů. Manifestují se různými klinickými projevy, dlouhodobou prognózou a patogenezí. Představují jeden z nejběžnějších typů rakoviny na celém světě a postihují mnoho pacientů. Podle klasifikace Světové zdravotnické organizace (Chooi, Stalker et al.) existuje přibližně 100 různých typů lymfomů. Dvě hlavní kategorie lymfomů jsou non-Hodgkinův lymfom (NHL), který tvoří 9 z 10 všech případů lymfomu, a Hodgkinův lymfom (HL). Dále lze NHL rozdělit na B- a T-buněčný

lymfom. B-buněčný lymfom tvoří přibližně 90% NHL a T-buněčný lymfom 10% NHL. Podle jednotlivých typů onemocnění se u lymfomů liší i exprese miRNA.

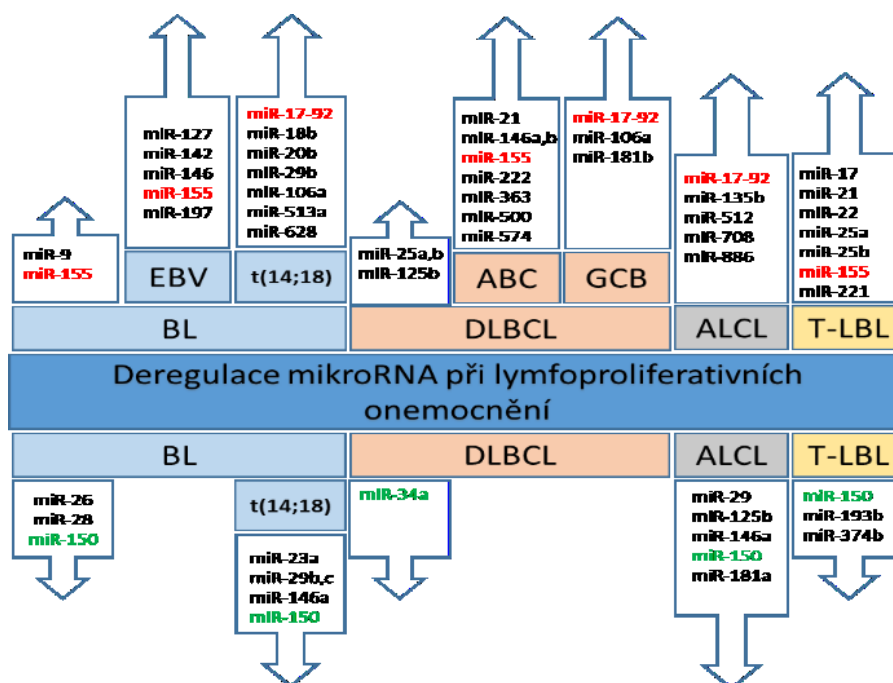
První miRNA, která byla popsána u lymfomu byla miRNA-155 a její deregulace v Burkittovém lymfomu (Metzler, Wilda et al. 2004). Nadměrná exprese genu pro miRNA-155 BIC/HC155MIR způsobila zvýšený výskyt leukémie a výraznost projevů lymfomu u zvířecích modelů se zvýšenými hladinami MYC. Bylo prokázáno, že nadměrná exprese miRNA-155 v myších B buňkách (E μ -miR-155) způsobuje lymfom a/nebo B-buněčnou leukémii. Trvalá exprese miRNA-155 v progenitorech kmenových buněk navíc vyvolala u transplantovaných myší myeloproliferativní onemocnění. Výsledkem studie bylo zjištění, že exprese miRNA-155 vede ke zvýšení polyklonální expanze v B-buňkách pomocí MYC, který podporuje výskyt sekundárních mutací a zvýšení rizika dalších nádorových transformací (Costinean, Sandhu et al. 2009).

V roce 2004 bylo ukázáno, že se miRNA výrazně podílejí na vývoji lymfocytů. V práci (Chen, Li et al. 2004) v B-lymfoidních buňkách byly vysoce exprimovány miRNA-223, miRNA-181 a miRNA-142. Jedna z těchto miRNA, miR-181, vedla ke zvýšení podílu B-buněk v lymfoidních liniích. miRNA-181 přispívá k regulaci posttranskripční exprese CD69, BCL2 a TCR během vývoje T-buněk. Kromě toho miRNA-155 a miR-181 hrají klíčovou roli v regulaci diferenciaci B-buněk germinálního centra (Coffre and Koralov 2017). miRNA se tedy významně podílí na diferenciaci lymfocytů, a proto jejich deregulace může vést ke vzniku lymfomu. Například, v difuzním velkobuněčném B-lymfomu lze pomocí miRNA odlišit subtyp GCB (Germinal Center B-cell). V laboratoři prof. Lenze (Lenz, Wright et al. 2008) se ukázalo, že amplifikace úseku 13q31, která je častá v subtypu GCB, je spojená se signifikantní hyperexpresí miRNA-17-92 a *MYC*. U stejného typu GCB se vyskytuje i další častá aberace del10q23. Obě tyto chromozomální změny mohou down-regulovat PTEN (Phosphatase and tensin homolog) a tím vyvolávat změny v signální dráze AKT-mTOR. To ukazuje, že osa PTEN-AKT-mTOR může být důležitou součástí patogeneze GCB DLBCL. Navíc, změny exprese protoonkogenu *MYC* jsou jednou z nejčastějších abnormalit u lidských malignit. Zvýšená exprese *MYC* podporuje expresi klastru miR-17-92, který hraje důležitou roli v lymfomogenezi tím, že inhibuje proapoptotické proteiny a regulátory buněčného cyklu (Jin, Oda et al. 2013).

Na obrázku 3 jsou uvedeny příklady nejčastějších miRNA, účastníci se v patogenezi lymfomů, používané jako diagnostické a prognostické markéry; na základě (Carvalho de Oliveira, Molinari Roberto et al. 2018).

Využití významu změn exprese miRNA-155 může být určující při diferenciální diagnostice různých typů malignit. Ve studii (Vargova, Vargova et al. 2016), která se zabývala výzkumem odlišení nejasných případů lymfomu pláštěvých buněk (MCL) a CLL, se ukázalo možné praktické využití miRNA-155. Překrývající se rysy specifické pro každou z těchto chorob nebyly signifikantně spolehlivé pro jejich vzájemné rozlišení, což vyžadovalo identifikaci dalších biomarkerů. Ve výše zmíněné studii byl identifikován soubor několika odlišně exprimovaných biomarkerů pro MCL a CLL, mezi nimi i onkogenní mikroRNA miRNA-155.

Obrázek 3. Deregulace mikroRNA u lymfomů. Převzato z (Carvalho de Oliveira, Molinari Roberto et al. 2018).



Obrázek 3. Deregulace miRNA u lymfomů. Šipky vzhůru a dolů označují zvýšenou nebo sníženou expresi miRNA; Burkittův lymfom (BL) včetně etiologie viru Epstein-Bar (EBV) a t(14; 18), difuzní velký B-buněčný lymfom (DLBCL) včetně ABC a GCB subtypů, anaplastický velkobuněčný lymfom (ALCL), T-lymfoblastický lymfom (T-LBL).

Jak již bylo zmíněno, miRNA-155 a její cílový myelo-lymfoidní regulační transkripční faktor PU.1 jsou důležitými regulátory diferenciacie B-buněk. Ve studii (Huskova, Korecka et al. 2015) byla stanovená exprese miRNA-155 a PU.1 v šesti nejčastějších lidských lymfomech B-

buněk: v agresivních (DLBCL, HL, MCL) a indolentních (B-CLL/SLL, MZL, FL). Hladiny miRNA-155 a PU.1 inverzně korelovaly v nádorových tkáních DLBCL, B-CLL / SLL a FL. V tkáních Hodgkinova lymfomu (HL) s nepříznivými odpověďmi na terapii byla nalezena mimořádně vysoká hladina miRNA-155. Nízká exprese PU.1 byla zaznamenána ve vzorcích B-CLL/SLL vykazující nepříznivé prognostické markery CD38 a ZAP-70. Prokázalo se, že nadprodukce miRNA-155 a snížená exprese PU.1 jsou nedílnými aspekty biologie lymfomu, které by mohly ovlivňovat agresivní chování některých jejích typů (práce je zařazena do vedlejších výsledků předložené disertaci v kap. 6.1.)

Navzdory úsilí ze strany výzkumníků, miRNA nejsou ve zdravotnických zařízeních prozatím součástí rutinních hematologických diagnostických vyšetření ani prognostických indexů pro ALL/AML a v běžné praxi se nepoužívají.

1.2. Kožní lymfomy

Kožní lymfomy představují různorodou skupinu lymfoproliferativních onemocnění, která je charakterizovaná přítomností maligních B- či T-lymfocytů v kůži, patří do skupiny mimouzlinových non-Hodgkinských lymfomů. Primární kožní lymfomy (PCL, primary cutaneous lymphoma) postihují výhradně kůži a v době diagnózy obvykle není prokázáno mimokožní postižení. Celosvětově PCL představují 2 % všech lymfomů s odhadovanou roční incidencí 0,3 – 1:100 000. Současná klasifikace Světové Zdravotnické organizace a Evropské organizace pro výzkum a léčbu rakoviny WHO-EORTC (World Health Organization, European Organization for Research and Treatment of Cancer) rozděluje primární kožní lymfomy na dvě samostatné skupiny: primární kožní T-buněčné lymfomy (CTCL, cutaneous T-cell lymphoma) a primární kožní B-buněčné lymfomy (CBCL, cutaneous B-cell lymphoma). Kožní T-buněčné lymfomy zastupují 75-80 % všech PCL. Onemocnění se vyskytuje v poměrně mladém věku s prevalencí u mužů, nejčastěji však ve 4. až 6. dekádě života (Elenitoba-Johnson and Wilcox 2017). Patří sem skupina klasických kožních lymfomů jako: Mycosis fungoides (72 % z CTCL, 44% ze všech PCL) a Sézarého syndrom (2,5 % z CTCL, 1% ze všech PCL), skupina primárních CD30+ lymfoproliferativních onemocnění a skupina velmi vzácných agresivních primárních kožních T- lymfomů (Tabl. 4).

Tabulka 4. Klasifikace primárních kožních lymfomů s relativní četností a 5-ti letým přežíváním (% z PCL) dle WHO/EORTC (Willemze, Jaffe et al. 2005).

WHO/EORTC klasifikace	Frekvence (%)	5-ti leté přežívání (%)
Kožní T-buněčný and NK-buněčný lymfom		
Indolentní		
Mycosis fungoides	44	88
Folikulotropní mycosis fungoides	4	80
Pagetóidní retikulóza	<1	100
Granulomatózní ochablá kůže	<1	100
CD30+ lymfoproliferativní onemocnění		
Primární kožní anaplastický velkobuněčný lymfom	8	95
Lymfomatoidní papulóza	12	100
T-buněčný lymfom typu subkutánní panikulitidy	1	82
Primární kožní lymfom s CD4+ malými/středně velkými pleomorfními T buňkami	2	72
Agresivní		
Sézaryho syndrom	3	24
Kožní periferní T-buněčný lymfom, nespecifikovaný	2	16
Kožní agresivní CD8+ T-buněčný lymfom	<1	18
Kožní gama/delta T- buněčný lymfom	<1	-
Kožní NK/T- buněčný lymfom, nosní typ	<1	-

Mycosis fungoides a Sézary syndrom představují nevyléčitelné primární extra-uzlinové T-lymfomy s vysokým rizikem systémového šíření. Obecně se předpokládá, že etiologie onemocnění je asociována s dlouhodobou stimulací antigenem, prostřednictvím klíčových cytokinových signálních drah, které mohou vést k projevům zánětlivé odpovědi s proliferací T-buněk.

1.2.1. Mycosis Fungoides a Sézary syndrom

Mycosis fungoides (MF) je nejčastějším typem CTCL. MF se může vyskytovat v mnoha variantách napodobující benigní kožní onemocnění. MF je charakterizován typickým pomalým vývojem, začínající od rozptýlených epidermotropních lymfocytárních infiltrátů, které se projevují jako jednotlivé skvrny nebo plaky šupinatého erytému, pokračující k rozšířenějšímu epidermálnímu postižení, které dále vede ke vzniku splývajících se skvrn, plaků nebo erythrodermie. U některých pacientů se lymfoidní infiltráty zvětšují na pandermální a subkutánní

tumory, zřídka se šířící do regionálních nebo vzdálených lymfatických uzlin, kostní dřeně a dalších orgánů. Sézaryho syndrom (SS) představuje 3 % ze všech primárních kožních lymfomů, projevuje se exfoliativní erythrodermií s dalšími projevy jako jsou pruritus, alopecie, palmoplantární keratodermie a ektropion. Postižení periferní krve se může vyskytovat v různé míře a má vliv na prognózu a léčbu. Pozdní progresse onemocnění je často charakterizována doprovodným poklesem funkční imunity pacienta s náchylností k rozsáhlým infekcím. Doba od prvních projevů onemocnění do stanovení diagnózy CTCL bývá velmi dlouhá, několik měsíců až roků. Hlavním důvodem obtížného stanovení diagnózy je častá absence charakteristických klinických znaků a rysů, které se projevují až v pokročilých stadiích onemocnění anebo se neprojevují vůbec, jsou často shodné s jinými benigními kožními lézemi, např. atopickým ekzémem, akné, psoriázou, dermatitidou. Přičemž časný záchyt tohoto onemocnění a zahájení léčby může mít vliv na přežití a kvalitu života pacientů (Mirvish, Pomerantz et al. 2013).

1.2.2. Etiologie a patogeneze

Etiologie primárních kožních lymfomů není dosud zcela známá. Předpokládá se, že rozvoj CTCL může být výsledkem jak chronické antigenní stimulace, která vede k nekontrolované klonální expanzi a akumulaci paměťových T-buněk v epidermis a dermis (Girardi, Heald et al. 2004) a/nebo je výsledkem „genotraumatické T-buňky“ s tendencí vzniku klonálních chromozomálních aberací, které vedou k deregulaci buněčného cyklu, poruše apoptózy a následné proliferaci klonálních T-buněk (Zhang, Kamarashev et al. 2003), (Karenko, Sarna et al. 2003)

Mycosis fungoides a Sézary syndrom patří do společné skupiny kožních T-lymfomu s indolentním a agresivním průběhem. I přes mnoho společných rysů, jako je převládající fenotyp CD4+CLA+CD26- s tvorbou cytokinů, jež charakterizují fenotyp TH2 buněk (T helpery 2. typu), mají MF a SS odlišné molekulární znaky. V mycosis fungoides atypické T-lymfocyty odpovídají svým původem podtypu efektorových paměťových T-buněk (TRM, tissue resident memory cells) a proto jeden z projevů MF je kumulace klonálních T-lymfocytů v kůži, nikoliv jejich cirkulace v periferní krvi. V případě Sézary syndromu původ T-lymfocytů se předpokládá z centrálních paměťových T-buněk (TCM, central memory cells), což určuje jejich schopnost jak kumulací v kůži a lymfatických uzlinách, tak i cirkulací v periferní krvi (Campbell, Clark et al. 2010).

Rizikové faktory, které mohou predisponovat k vývoji CTCL jsou poměrně dobře definovány. Například genetické faktory, jako je typ lidského leukocytárního antigenu (HLA), může předurčovat některé jedince k rozvoji CTCL tím, že napomáhají aberantní aktivaci a akumulaci T-buněk v epidermis a dermis. Mechanismy prostředí, které mohou deregulovat nádorové supresory nebo proonkogenní cesty, zahrnují virové nebo jiné mikrobiální patogeny (HTLV-1, EBV, HSV, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium leprae*, *Chlamydia pneumoniae*). Regionální rozdíly ve výskytu nemocí, geografický nebo rodinný výskyt (např. manželské páry), farmakoterapie (antihistaminika, antiepileptika, antihypertenziva) a profesní nebo výživové asociace, včetně expozice aromatickým uhlovodíkům nebo nedostatku vitamínu D, podporují roli prostředí ve vývoji CTCL (Pulitzer 2017).

Definice maligní buňky CTCL (vznik nádoru)

Nádorové buňky v CTCL jsou morfologicky označovány jako „atypické“ CD4+ lymfocyty se spleťovitými cerebriformními jádry, které tvoří lymfoidní infiltrát v horní třetině dermis a seskupení atypických lymfocytů v epidermis v okolí Langerhansových buněk se vznikem tzv. Pautrierových mikroabscesů (Olsen, Rook et al. 2011). Klonální T-buňky často postrádají normální T-antigeny, jako jsou CD2, CD3, CD5 nebo CD7. Pro časná stadia onemocnění je charakteristická ztráta markéru CD7, pro pozdější stadia – ztráta pan-T-buněčných antigenů: CD2, CD3 a CD5 (Jones, Dang et al. 2001).

Jednou z hypotéz etiopatogeneze mycosis fungoides je koncept „genotraumatické T buňky“, u které je tendence ke vzniku klonálních chromozomálních aberací, jenž vedou k deregulaci buněčného cyklu a poruše apoptózy s následnou proliferací klonálních T-buněk. Cytogenetické abnormality jako komplexní karyotyp se strukturálními a numerickými abnormalitami, o nichž se předpokládá, že odráží hrubou chromozomální nestabilitu, často zahrnují chromozom 10 a 6, jakož i 1, 3, 8, 11, 12, 17, a jsou pro CTCL prognosticky nepříznivé. U transformovaných MF je nejčastější (ale nespecifický) nálezní delecí 9p21 se získáním 1p, 1q, 7q nebo 8q (Pulitzer, Horna et al. 2021).

Svoji roli v etiopatogenezi může hrát přetrvávající antigenní stimulace vedoucí k mutacím onkogenů, tumor supresorových genů a signál-transdukčních genů. Sekvenování celého exomu CTCL buněk identifikovalo geny s běžnými mutacemi a změnami v počtu kopií. U vzorků Sézarého syndromu byl zjištěn velký počet mutací, s mediánem 21 genetických změn na 1 vzorek. A v případě neleukemického mycosis fungoides vykazovaly vzorky nižší počet změn, s mediánem 1 genetické abnormality na 1 vzorek. Tyto analýzy identifikovaly charakteristické

změny včetně vysoce rozšířených chromozomálních delecí nádorových supresorů: *Tp53* v lokusu 17p13.1, *RBI* v 13q14.2, *PTEN* v 10q23,3 a *CDKN1B* v 12p13,1. Velice často byla pozorována delece chromozomu 2p23.3 zahrnující *DNMT3A*, tato delece byla přítomná u pětiny všech pacientů se Sézary syndromem. Mutační analýza identifikovala široké spektrum somatických mutací v klíčových genech zapojených do epigenetické regulace: *TET2*, *CREBBP*, *KMT2D*, *MLL2*, *KMT2C*, *BRD9*, *SMARCA4* a *CHD3*; a signalizace: *MAPK1*, *BRAF*, *CARD11* a *PRKG1* (da Silva Almeida, Abate et al. 2015).

Společným charakteristickým znakem buněk MF a SS je fenotyp TH2. Lymfocyty T helpery 2. typu jsou linií efektorových T-buněk CD4 +, které secernují IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 a IL-17E/IL-25. Tyto buňky ve zdravé tkáni jsou nezbytné pro humorální imunitu a hrají důležitou roli při koordinaci imunitní odpovědi na extracelulární patogeny. Hlavními transkripčními faktory, které určují fenotyp TH1 a TH2, jsou T-bet a GATA3. A většina signálních drah určujících typ TH, směřují na tyto transkripční faktory. Například cytokiny IL-4 a IL-13 stimulují prostřednictvím JAK-asociovaných receptorů aktivaci STAT6, což následně zvyšuje transkripci GATA3. Aktivace transkripčního faktoru STAT6 je často spojená se ztrátou exprese faktoru STAT4, který by směřoval diferenciaci lymfocytů na TH1 fenotyp. Tyto změny jsou způsobeny aberantní histonovou acetylací STAT4 a/nebo zvýšenou expresí onkogenní miRNA-155 (Litvinov, Cordeiro et al. 2014). Je pozoruhodné, že blokování STAT3 v liniích nádorových buněk MF a SS ruší expresi IL-5 a IL-13 a tím podporuje apoptózu. V časných i pokročilých stádiích onemocnění je pozorována konstitutivní aktivita STAT3 a STAT5. V raných stádiích MF to může být způsobeno cytokinovou signalizací z mikroprostředí nádoru, zatímco v pokročilých stádiích se tyto transkripční faktory mohou stát nezávislými na cytokinech a poháněny aktivní signalizací JAK (Zhu 2010). Dalším společným znakem maligních T-buněk CTCL je klonální rearrangement genů pro γ - a β -řetězec T-buněčného receptoru (TCR). Proces rearrangementu neboli přeskupení genů probíhá během diferenciaci kmenových buněk na T-buňky, kdy se non-transkripční genové fragmenty přeskupují do úplného genu. Nový gen získává transkripční aktivitu a exprimuje antigen specifický receptor. Naproti tomu, pokud proces přeskupení genů selže, buňky podstoupí apoptózu. V případě buněk MF bylo zjištěno, že jsou dobře odlišitelné od benigních dermatóz pomocí diagnostiky TCR rearrangementu. Přeskupení genu pro γ -řetězec je charakteristické pro časná stadia MF a výskyt rearrangementu u obou γ - a β -řetězců je typický pro rozvinutý MF, přičemž žádní pacienti s benigní dermatózou nemají toto klonální přeskupení genu *TCR* (Xu, Wan et al. 2011).

Model „Hallmarks of cancer“ popisuje základní podmínky pro vznik a přežití nádorové buňky jako jsou: schopnost neomezené replikace, únik před faktory potlačující růst, zvýšená odolnost vůči buněčné smrti. V případě maligních buněk CTCL model je představen několika mechanizmy: únik před apoptózou, inhibice imunitního systému s omezením fagocytózy a aktivace mechanismů invazivity.

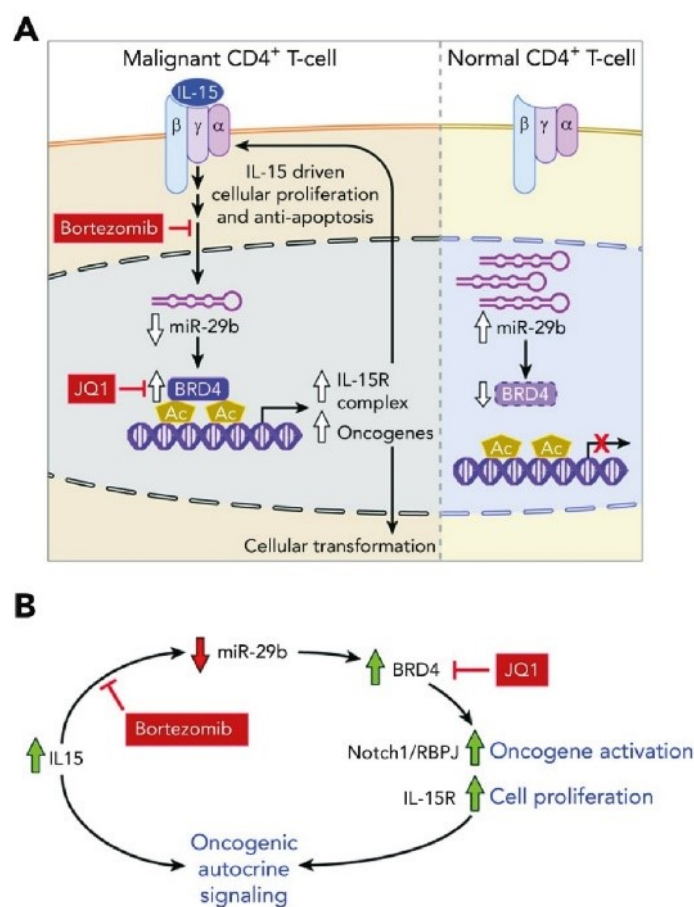
Rezistence na apoptózu je základním rysem maligních buněk, kterou v případě CTCL indukuje kombinace několika patologických mechanismů. V případě zdravé tkáně, benigní lymfocyty po opakované stimulaci TCR obvykle procházejí cestou zprostředkovanou spojením Fas-ligandu (FasL) s Fas-receptorem, v důsledku čehož podstupují apoptózu. Tento proces, označovaný také jako aktivace indukované buněčné smrti (AICD), je důležitý k udržení homeostázy během klonální expanze aktivovaných lymfocytů. V případě buněčných linií a nádorových buněk odvozených od pacienta CTCL, lymfocyty vykazují opožděnou expresi FasL po aktivaci. Studie navíc identifikovaly inaktivující sestřihové varianty a další mutace v genu *Fas*, stejně jako sníženou TCR-signalizaci, která potlačuje aktivitu AICD (Klemke, Brenner et al. 2009). Mezi další cesty zapojené do rezistence na apoptózu patří NF- κ B signalizace, nadměrná exprese STAT3, signalizace mTOR a interakce IL-7, IL-9 a IL-15 (Sommer, Clemmensen et al. 2004).

Za aktivaci mechanismů invazivity jsou zodpovědné chemokinové receptory CCR4 a CCR7, které usnadňují navádění T-buněk do kůže, respektive do lymfatických uzlin. CCR4 usnadňuje kožní tropismus a je v buňkách CTCL upregulován, ale jen za podmínky absence CD26, který normálně degraduje ligand CCR4. Receptor CCR7 je nadměrně exprimován hlavně na leukemických buňkách SS spolu s dalšími přidruženými biomarkery Sézaryho buněk, jako například sialomucinový jadrový protein CD164, Fc-receptor (FCRL3), syndekan-4 (SD-4) a vimentin. Poslední dva jsou přítomny na všech aktivovaných SS buňkách a mohou odrážet základní fenotyp Sézary syndromu (Huet, Bagot et al. 2006). Tyto antigeny asociované s nádorem mohou být účinnými cíli pro léčbu, jak dokazují dobré výsledky použití anti-CCR4 (mogamulizumab) v léčbě CTCL (Dai, Almazan et al. 2018).

V práci (Kohnken, Wen et al. 2018) autoři popsali novou onkogenní dráhu možného vývoje CTCL s účastí IL-15, miR-29B a BRD4. V patientských vzorcích CTCL byl odhalen inverzní vztah mezi miR-29b a BRD4. Protein BRD4 je nadměrně exprimován na buňkách CTCL a je často asociován s expresí *MYC* a dalších onkogenů v agresivních hematologických malignitách. Výsledkem vazby BRD4 na acetylované histony je zvýšení exprese genů asociovaných s nádorem, jako jsou *NOTCH1*, *RBPJ* a aktivace komplexu receptoru IL-15R, který zesiluje

autokrinní signalizaci IL-15. Funkčnost této dráhy byla doložena tím, že obnovení hladin miR-29b pomocí léčby bortezomibem nebo přímou inhibicí vazby BRD4 prostřednictvím JQ1, zabránilo vývoji progresi CTCL. Nová onkogenní cesta představující IL-15, miR-29b a BRD4 v CTCL navrhuje terapeutické cílení na tyto komponenty jako efektivní léčbu pacientů s CTCL. (Obr. 4.)

Obrázek 4. Model patogeneze maligních T-buněk v CTCL



Obrázek 4. (A) Signalizace ILR-15R receptoru v maligních T-buňkách (vlevo) a v normálních CD4⁺ T-buňkách (vpravo). Cytokin IL-15 se váže na svůj receptorový komplex α - β - γ řetězců pro zajištění intracelulární signalizace, která snižuje hladiny miR-29b v buňkách. Snižovaný miR-29b není schopen negativně ovlivnit regulaci BRD4. Následně se faktor BRD4 váže na chromatin a aktivuje proces genové exprese. Upregulované onkogeny *Notch1/RBPJ* a složky komplexu receptoru IL-15R řídí buněčnou proliferaci a odolnost vůči apoptóze. Bortezomib inhibuje dráhy, které vedou ke snížení exprese miR-29b, zatímco JQ1 blokuje vazbu BRD4 na

chromatin. Obě tyto terapeutické strategie snižují expresi onkogenu a IL-15R receptorového komplexu. V nemaligních CD4+ T buňkách jsou bazální hladiny miR-29b vyšší a vazba BRD4 je relativně nízká. (B) Autokrinní signalizační smyčka IL-15/miR-29/BRD4. Regulační cesta usnadňuje tvorbu smyčky, která řídí aktivaci onkogenů a buněčnou proliferaci (Kohnken, Wen et al. 2018).

Imunitní dysfunkce v CTCL

Povaha maligní buňky v MF a SS, která spočívá ve zralé CD4+ T-buňce s fenotypem TH2 vysvětluje defekty imunity v TH1 fenotypu a produkce specifických cytokinů u pacientů s CTCL.

V „patch“ stadiu, což odpovídá indolentnímu průběhu u pacientů s mírnými klinickými příznaky, je častá přítomnost reaktivního CD8+ cytotoxického infiltrátu T-buněk, která je spojena s příznivější prognózou. V periferní krvi cirkulující CD8+ T buňky vykazují zvýšené aktivační markéry a mají lytickou aktivitu proti autologním maligním buňkám (Vermeer, van Doorn et al. 2001). CD4+ T-buňky v raném stadiu MF mají tendenci vykazovat fenotyp TH1, který podporuje buněčně zprostředkovanou cytotoxicitu. Tyto TH1 buňky svým původem jsou buď reaktivní benigní T-buňky, nebo maligní buňky, které doposud nezískaly dominantní znaky TH2. Benigní T-buňky jsou zodpovědné za lokální imunitní odpověď, která je často viditelná ve formě zánětu v tkáni postižené MF (Vieyra-Garcia, Crouch et al. 2019).

U progresivních MF a SS je však buněčná imunitní odpověď výrazně snížena. Se zvyšující se nádorovou zátěží dochází ke snížení infiltrátu CD8+ v kožních lézích a k posunu produkce cytokinů směrem k profilu TH2. Cytokiny TH2 vylučované maligními buňkami IL-4, IL-5 a IL-10 potlačují imunitu TH1 a prosazují globální změnu fenotypu na TH2. Se sníženou funkcí TH1 je hostitel v podstatě zbaven buněčné imunity a má narušenou imunologickou paměť na antigeny prezentované MHC (komplex histokompatibility) (Nishimura, Nakui et al. 2000). Chronická produkce cytokinů TH2 buněk pravděpodobně představuje jeden z mechanismů, jak nádorové buňky obcházejí protinádorovou imunitní odpověď.

V případě MF a SS, jak benigní buňky prostředí, tak maligní CD4+ T buňky (získané z kožních biopsií) vykazují zvýšení exprese proteinu PD-1 (protein programované buněčné smrti-1), který hraje důležitou roli v regulaci odpovědi imunitního systému tím, že snižuje jeho aktivitu,

potlačuje zánětlivou aktivitu T-buněk a podporuje toleranci vlastní buňky, na které je exprimován. Komplex PD-1 s ligandem PD-L1 inhibuje reaktivní imunitní T-buňky, podporují indukcí FOXP3 a TH2. FOXP3 funguje jako hlavní regulátor dráhy vývoje regulačních T-buněk (Tregs), které obecně snižují imunitní odpověď. Blokáda PD-1 může obnovit produkci cytokinů TH1. A s eliminací maligního klonu se může exprese PD-1 postupně normalizovat. (Wilcox, Feldman et al. 2009). Protilátky anti PD-L1 atezolizumab a avelumab jsou v současné době zkoumány pro léčbu rozvinutých malignit T-buněk včetně CTCL (NCT03905135 a NCT03357224) (Saulite, Ignatova et al. 2020).

Receptor CD47 (specifický povrchový markér, který díky své schopnosti zneviditelnit buňku pro imunitní systém, nazýván „don't eat me“) inhibuje makrofágy zprostředkovanou fagocytózu nádorových buněk, je zvýšen na Sézarého buňkách vlivem cytokinů TH2 a jeho exprese koreluje s horším celkovým přežitím (Johnson, Banerjee et al. 2019).

U CTCL existují další imunitní defekty např. v dendritických buňkách DC a polymorfonukleárních granulocytech (PMN). U SS dochází k poklesu počtu cirkulujících DC v krvi. V reakci na napadení virem chřipky mononukleární buňky periferní krve od pacientů s SS produkují významně méně IFN- α . Dále PMN u pacientů s SS mají sníženou fagocytickou aktivitu proti patogenům, jako *K. pneumonia* (Fierro, Banche et al. 2012). Tyto defekty v buňkách prezentujících antigen (APC) podporují rozvoj infekcí u pacientů CTCL.

Jednou z dalších hypotéz je, že mikrobiální produkty mohou stimulovat progresi onemocnění. U erythrodermického CTCL je vysoký výskyt kolonizace kmeny *Staphylococcus aureus* produkující antigenní stafylokokové enterotoxiny (SE) nebo toxin syndromu toxického šoku-1 (TSST-1) (Jackow, Cather et al. 1997). Jak bakteriální izoláty od pacientů, tak i rekombinantní SE podporují aktivitu STAT3, STAT5 (faktory, které jsou klíčové pro dominanci fenotypu TH2) (Willerslev-Olsen, Buus et al. 2020).

Je zajímavé, že onkogenní miRNA-155 je závislá na STAT5 a navíc SE přispívají k vysoké expresi této molekuly v buňkách CTCL. Zvýšením aktivity miR-155 dochází ke ztrátě expresi faktoru STAT4, který by směřoval diferenciaci lymfocytů na TH1 fenotyp (Kopp, Ralfkiaer et al. 2013).

Byly provedeny dvě studie, které zkoumaly používání antibiotik v CTCL a obě zjistily, že baktericidní léčba vedla nejen k vymizení kolonizace *S. aureus*, ale i ke zlepšení klinických příznaků CTCL (Lindahl, Willerslev-Olsen et al. 2019). Antibiotika mohou mít účinky i na

metabolické procesy relevantní pro CTCL, např. léčba doxycyklinem indukuje apoptózu T-buněk a inhibuje NF- κ B (Alexander-Savino, Hayden et al. 2016).

CTCL se zdá být častější a někdy agresivnější s určitými komorbiditami. Populační průzkum ukázal, že CTCL může být častější v oblastech s vyšší prevalencí HIV, což je nález, který je v souladu se známým 15krát vyšším výskytem T-buněčných lymfomů u pacientů s AIDS (Mirvish, Pomerantz et al. 2011). Snížená exprese TCR v pokročilých stádiích CTCL je podobná jako u AIDS, což ilustruje narušený růst normálních T-buněk u obou onemocnění. U pacientů po transplantaci může mít CTCL obzvláště agresivní průběh. Je zřejmé, že léky, které inhibují funkci T-buněk, jako jsou anti-TNF a cyklosporin, mohou řídit náhlu progresi v nedagnostikovaném CTCL (Martinez-Escala, Posligua et al. 2018). Dupilumab, protilátka proti receptoru IL-4, může také urychlit progresi CTCL neznámými mechanismy, předpokládá se, že cestou vyčerpání benigních reaktivních lymfocytů (Espinosa, Nguyen et al. 2020). Tyto asociace společně posilují roli imunitní funkce T-buněk při řízení progresu onemocnění.

Vliv mikroprostředí

Aberantní interakce cytokinů, chemokinů a stromatu CTCL přispívají k tumorigenezi. Ve studiích in vitro cytokiny: IL-2, IL-4, IL-7, IL-13 a IL-15, všechny byly označeny za faktory růstu lymfomu. Cytokin IL-31 se asociuje s klinickým projevem svědění, je produkován zejména aktivovanými TH2 buňkami a také žírnými buňkami, makrofágy a dendritickými buňkami (Ohmatsu, Sugaya et al. 2012). Tato představa je však stále kontroverzní, protože jiné studie nepozorovaly souvislost mezi IL-31 a závažným svěděním u pacientů s CTCL (Malek, Glen et al. 2015). Nedávno v práci Han a kol. (2018) prokázali, že miR-711, který je vysoce exprimován v CTCL, podporuje svědění extracelulárním navázáním na iontový kanál TRPA1 (tranzientní potenciálový receptor A1) na senzoryckých neuronech (Han, Liu et al. 2018).

Vliv deregulovaných nebo nezralých buněk APC může vysvětlit určité aspekty progresu nádoru i terapeutické odpovědi. Přímý kontakt T-buněk s nezralými DC podporuje jejich proliferaci v CTCL a produkci cytokinů regulačními buňkami Treg, což je účinek, který je současně podporován CD40+ nebo klonálním TCR. A naopak CTCL buňky neproliferují při setkání se zralými DC (Thumann, Luftl et al. 2003). Cytokinový IFN- γ z buněk TH1 stimuluje zránění dendritických buněk. Bylo pozorováno, že apoptotické CTCL buňky mohou indukovat APC maturaci, tím se podporuje ten fakt, že terapie jako TSEB (celkové ozáření elektronovým paprskem) a ECP (External Counterpulsation), které indukují masivní apoptózu maligních buněk, jsou účinným doplňkem mnoha multimodálních režimů.

Shrnutím známých patogenetických mechanismů pro CTCL lze definovat celkový model interakce buněčného mikroprostředí a maligních T-buněk následovně: v ranních stádiích onemocnění (skvrn a plaků) se zvyšuje počet maligních CD4+ T-buněk v epidermis, které se shromažďují kolem Langerhansových buněk se vznikem mikroabscesů. Maligní T-buňky ztrácí fenotyp TH1, ve větší míře nabývají TH2 fenotyp a syntezují cytokiny IL-4, IL-5, IL-10, které napomáhají ke snížení počtu cytotoxických CD8+ T-buněk, čímž hostitel přichází o důležitou imunitní protinádorovou obranu. V rozvinutém MF je charakteristický nálezní infiltrací maligních TH2-buněk v dermis, snížený počet CD8+ buněk spolu s rozsáhlými kožními změnami jako jsou tumory a ulcerace. Leukemická fáze erythrodermického MF a SS charakterizována detekovatelným množstvím maligních T-buněk v krvi a generalizovanými změnami na kůži.

1.2.3. Dělení a klasifikace CTCL

MF / SS má systém klasifikace TNMB „tumor – lymfatické uzliny – metastázy – postižení krve“, který byl původně navržen Národním Onkologickým Institutem (NIH, National Cancer Institute) v roce 1978 s úpravami Mezinárodní společnosti pro kožní lymfomy (Vonderheid, Bernengo et al.). V roce 2002 klasifikace B (blood, postižení periferní krve) byla rozšířena o morfologické a cytogenetické hodnocení, kde byly definovány stupně postižení periferní krve: B0 (žádné klinicky významné postižení krve), B1 (klinicky významné neleukemické postižení, se Sézarého buňkami $<1,0 \cdot 10^3/\mu\text{l}$) a B2 ([a] se Sézarého buňkami $\geq 1,0 \cdot 10^3/\mu\text{l}$; [b] poměr $\text{CD4}/\text{CD8} > 10$, $\text{CD4} + \text{CD7} > 40\%$ nebo $\text{CD4} + \text{CD26} > 30\%$; [c] lymfocytóza s molekulárně genetickým důkazem klonu T-buněk; nebo [d] průkazný chromozomálně aberantní klon T-buněk) (Vonderheid, Bernengo et al. 2002). (Tabl. 5.)

Tabulka 5. Klinická stadia a TNMB klasifikace kožních T-lymfomů

Klinické stadium	T (kůže)	N (lymfatické uzliny)	M (viscerální postižení, metastázy)	B (Krev)
IA (ohraničené kožní postižení)	T1 (patch, papuly, plaque $< 10\%$ celkového kožního povrchu)	N0	M0	B0-1
IB (pouze kožní postižení)	T2 (patch, papuly, plaque $\geq 10\%$ celkového kožního povrchu)	N0	M0	B0-1
IIA	T1-2	N1-2	M0	B0-1
IIB (tumor)	T3 (≥ 1 tumory $[\geq 1 \text{ cm}]$)	N0-2	M0	B0-1
IIIA (erythrodermie)	T4 (splývající erytém) $\geq 80\%$ celkového kožního povrchu)	N0-2	M0	B0

IIIB (erythrodermie)	T4	N0-2	M0	B1
IVA1	T1-4	N0-2	M0	B2
IVA2	T1-4	N3	M0	B0-2
IVB	T1-4	N0-3	M1	B0-2

Vysvětlení některých pojmů klasifikace: Patch – (skvrna) kožní léze jakékoli velikosti bez významné klinické změny; může vykazovat změny pigmentu, šupinatění, zvrásnění.

Plaque - (plak) jakákoli velikost kožní léze, která je klinicky významná; může vykazovat změny pigmentu, šupinatění, krustování nebo folikulární změny.

Tumor - solidní nebo nodulární léze více než 1 cm nebo ulcerovaný plak se známkami prohloubení a vertikálního růstu.

Erythrodermie - splývající erytematózní léze pokrývající více než 80% povrchu těla.

1.2.4. Klinické symptomy CTCL

Klinické projevy u klasické varianty MF se rozvíjí pomalu, v průběhu až několika let. Pacienti mají kožní projevy, které se obvykle lokalizují na tzv. „plavkových oblastech“ tj. neosluněných částech těla. Mohou být ale postiženy i dlaně, plosky a kštice. Neurčené klinické projevy trvají dlouhou dobu, připomínají atopický ekzém či psoriázu, které jsou provázeny úporným svěděním různé intenzity a necharakteristickým histopatologickým nálezem. Průměrná doba od počátku projevů do doby stanovení správné klinické diagnózy trvá v průměru 5 let.

Klinické varianty MF

Pacienti s klasickou formou MF, kterou před 2 stoletími popsali francouzští dermatologové Alibert a Bazin, mají růžové nebo erytematózní šupinaté skvrny a plaky, které se obvykle objevují na před sluncem chráněných oblastech kůže, jako jsou proximální části končetin, trup a hýždě. Termín mycosis fungoides původně označoval houbovitě uzlíky pozorované v nádorovém stadiu onemocnění. Od té doby bylo poznamenáno, že MF má ve skutečnosti heterogenní klinické a histopatologické projevy a mnoho variant (Kim, Hess et al. 2005).

Klasický MF. U této formy MF pacienti často nemívají typické klinické projevy, ale ve vzorcích tkáně může být nález atypických lymfocytů a intersticiálních granulomů. Časný MF je charakterizován různě velkými lehce atrofickými skvrnami různé velikostí červené, červenohnědé barvy, se známkami šupinatění a s různou intenzitou svědění (*ekzémové*

stádium). Dále, při progresi onemocnění, se na místě původních ekzematoidních projevů vytváří infiltrované plaky, které postihují i další části trupu, např. hlava a krk. Ložiska jsou různé velikosti, ostře ohraničená často charakteristického „podkovovitého“ tvaru se známkami šupinatění, intenzivnějším svěděním a bakteriální superinfekci (*stadium infiltrovaných plaků*). Následná progresse vede k vzniku nodulů červenofialové barvy a tumorů různé velikosti, které ulcerují a krvácejí (*tumorózní stádium*). Kvalita života v tomto stadiu je výrazně zhoršena (Olsen, Vonderheid et al. 2007)

Folikulotropní MF. Jedná se o variantu, která je charakterizována výskytem infiltrátů, které jsou vázány na folikuly. Infiltrát proniká perivaskulárně a perianexálně, což vede k folikulární mucinózní degeneraci. Typické je přítomnost mucinu ve vlasových folikulech. Lokalizace této formy MF je častá na hlavě a také na krku, což doprovází známky alopecie a infiltráty na obočí se známkami šupinatění a bakteriální superinfekci. I když cytomorfologické znaky jsou identické jako u klasické MF, ale prognóza této formy MF je horší než u typického MF a 5-ti leté OS přežívá pouze 75% pacientů. V léčbě je nutno uplatňovat intenzivnější terapie, než u klasické formy MF (Machovcova, 2007).

Pagetoidní retikulóza. Projevy této formy MF jsou pomalu rostoucí psoriaziformní či hyperkeratózní ložiska, většinou lokalizovaných na končetinách. Při histologickém vyšetření postižené tkáně je výrazný epidermotropismus atypických pagetoidních buněk s fenotypem CD3+ CD4+ CD8-.

Granulomatózní ochablá kůže. Varianta MF, která se vyskytuje vzácně, doprovázená tvorbou záhybů kůže v axilách, podbřišku a tříselech. Vyklenutí ochablé kůže se asociuje s destrukcí elastických vláken a vytvářením granulomů s blastickými formami buněk. Imunofenotyp je shodný s klasickou MF (Machovcova, 2007).

1.2.5. Diagnostika a prognostické markéry CTCL

Důležité klinické diagnosticko-prognostické ukazatele v MF / SS jsou: TNMB klasifikace, klinické stádium, přítomnost extrakutánního onemocnění a věk pacienta. Hodnocení klinického stadia pacientů s MF/SS zahrnuje komplexní kožní a fyzikální vyšetření; krevní obraz a kvantifikaci atypických cirkulujících T-lymfocytů; komplexní biochemické vyšetření a v případě významné klinické lymfadenopatie (> 1,5 cm) nebo erythrodermie ve stadiu T3/T4 vyžaduje počítačové tomografické (CT) skenování hrudníku, břicha a pánevní oblasti s kontrastem a/nebo skenování celého těla pozitronovou emisní tomografií (PET).

Histologický nález, který je viditelný na vzorku z biopsie kůže (provedený průbojníkovou biopsií nebo excizi) tvořen v časných stádiích MF lymfoidním infiltrátem z CD4+ T-lymfocytů, které jsou omezeny na horní třetinu dermis s Pautrierovými mikroabscesy. Nádorové buňky bývají s fenotypem CD3+, CD4+, CD45RO+, CD8- a CD7-, nebo často převládající fenotyp CD4+CLA+CD26-. Vzácně se objevuje fenotyp CD3+CD4-CD8+ a v tomto případě v klinickém obraze převládá hyperpigmentace. V pozdních tumorózních stádiích MF infiltrát postihuje celou dermis s přítomností blastických buněk, které vykazují tzv. null-cell fenotyp, tj. ztrátu povrchových antigenů nebo vykazují fenotyp CD30+. Přítomnost velkého počtu atypických buněk CD30+ jsou známkou transformaci nádoru a přítomnost folikulární formy MF a/nebo granulomatózních změn ukazují na horší prognózu pro pacienta. Zatímco přítomnost CD8+lymfocytů infiltrujících nádor ukazuje na příznivou prognózu (Machovcova, 2007).

Cytogenetické abnormality jako komplexní karyotyp se strukturálními a numerickými abnormalitami, zahrnující chromozom 1, 3, 6, 8, 10, 11, 12, 17, jsou pro CTCL prognosticky nepříznivé. U transformovaných MF je častý nález delecí 9p21 se ziskem 1p, 1q, 7q a 8q (Pulitzer, Horna et al. 2021). Chromozomální delece charakteristické pro MF: del(17p13.1), del(13q14.2), del(10q23,3) a del(12p13,1). Delece chromozomu (2p23.3) je často pozorována u pacientů se Sézary syndromem. Mutační analýza identifikovala široké spektrum somatických mutací v klíčových genech zapojených do epigenetické regulace: TET2, CREBBP, KMT2D, MLL2, KMT2C, BRD9, SMARCA4 a CHD3 a signalizace, včetně mutací genů MAPK1, BRAF, CARD11 a PRKG1 (da Silva Almeida, Abate et al. 2015).

Prognostická skóre pro primární kožní lymfomy

Mezinárodní prognostický index (CLIPi - Cutaneous Lymphoma International Prognostic Index) ukazuje riziko a délku přežití pacientů CTCL v časném klinickém stádiu IA–IIA a v pozdním klinickém stádiu IIB–IVB . Prediktivní význam pro 5-ti a 10-ti leté PFS a OS je znázorněn v tabl. 6A, B.

Faktory, které byly statisticky vyhodnoceny jako významné pro časná klinická stadia MF/SS, jsou: mužské pohlaví, věk pacienta nad 60 let, dále přítomnost plaků a folikulotropní varianty. Riziková skóre jsou vypočítána sečtením nepříznivých prognostických faktorů přítomných u každého pacienta.

Tabulka. 6 A. CLIPi pro časná klinická stádia (IA–IIA) MF/SS (Benton, Crichton et al. 2013)

Skóre	Riziko	5-ti leté OS	5-ti leté PFS	10-ti leté OS	10-ti leté PFS
0	Nízké	96%	93%	90%	85%
1	Střední	87%	82%	76%	69%
2 - 3	Vysoké	74%	74%	49%	55%

Rizikové faktory, které byly vyhodnoceny jako významné pro pozdní klinická stádia MF/SS, jsou: mužské pohlaví, věk nad 60 let, klinické stádium B1/B2, stádium postižení lymfatických uzlin N2/N3, přítomnost viscerálních postižení/ metastázy (M1).

Tabulka. 6 B. CLIPi pro pozdní klinická stádia (IIB–IVB) MF/SS (Benton, Crichton et al. 2013)

Skóre	Riziko	5-ti leté OS	5-ti leté PFS	10-ti leté OS	10-ti leté PFS
0	Nízké	63%	58%	53%	49%
1	Střední	38%	43%	20%	25%
2 - 3	Vysoké	22%	27%	15%	21%

1.2.6. Léčebné postupy

MF/SS je chronické maligní onemocnění, v průběhu kterého se střídají období recidiv a remise po řadu let. Kausální léčba CTCL zatím neexistuje a proto cílem terapie je dosažení remise onemocnění s co nejdelším trváním, snaha o udržení kvality života pacientů a prodloužení tzv. „disease free“ období. Aktuální léčebné strategie se dělí na tzv. léčbu cílenou na kůži (STD, skin directed therapy) a na celkovou léčbu. Výběr z arsenálu dostupných léčiv závisí na stadiu a formě CTCL.

Léčba je zacílená na snížení zátěže maligních T-buněk v CTCL pomocí imunoterapie, která může vést k obnovení normálnější imunitní funkce. Soubor nemaligních T-buněk, který je ztracen u pokročilého stadia onemocnění, může být v časných stádiích obnoven po eliminaci maligního klonu. Bylo prokázáno, že léčba interferonem, ECP a TSEB obnovuje určitou rovnováhu mezi TH1 a TH2 typy buněk, spolu s obnovou populací dendritických a NK buněk. Je důležité se obávat, že tradiční chemoterapeutické režimy, které jsou imunologické, mohou oddálit imunitní rekonstituci ve srovnání s léčbou stimulující imunitu. Nový typ léčby

s využitím strategii multimodality pro zvýšení protinádorové odpovědi pomocí imunoterapeutik je používán pro léčbu všech stadií CTCL. Multimodální přístup zahrnuje aktivaci více ramen imunitní odpovědi prostřednictvím použití činidel k aktivaci DC, CD8+ a NK-buněk (CD56+). Růstový faktor pro granulocytární řadu GM-CSF (granulocyte-macrophage colony stimulating factor) může zvýšit počet dendritických buněk, zatímco látky, které zvyšují expresi a aktivaci CD40 (IFN- γ , CD40 ligand, anti-CD40 protilátka) a TLR ligandy (CpG-ODN; imidazochinoliny), vedou k produkci DC cytokinů a ke zvýšení jejich aktivity proti maligním T-buňkám. Cytokiny produkované DC a také exogenně podávané cytokiny zvyšují proliferaci CD8+ T-buněk a případně i NK-buněčnou cytolytickou aktivitu proti nádorovým buňkám. Proapoptotika, včetně bexarotenu, retinoidy, PUVA, fotoferéza, lokální chemoterapie, celkové ozáření elektronovým paprskem kůže (TSEB) a denileukin diftotox, mohou pomoci při vývoji protinádorové imunitní odpovědi, tím že sníží celkovou zátěž nádorových buněk a nádorových antigenů (Kim and Krueger 2015).

Léčebné režimy počáteční fáze onemocnění

Pacienti se skvrnami nebo plaky omezenými na méně než 10% povrchu kůže (onemocnění T1) mají tendenci vykazovat normální buněčnou imunitní odpověď. Zde používaná terapie zaměřená na kůži, jako superpotentní topické kortikosteroidy, lokální chemoterapie, lokální aplikace retinoidů, psoralen spolu s fototerapií ultrafialovým zářením (PUVA), nebo radiační terapie elektronovým paprskem, které cílí na většinu nádorové zátěže v kůži přímou indukci apoptózy maligních T-buněk. Tyto režimy jsou často dostačující pro vymizení nemoci. Topické kortikosteroidy a PUVA snižují počet rezidentních epidermálních Langerhansových buněk, které stimulují maligní T-buňky. V této fázi je systémová imunitní odpověď neporušená a spolu s dalšími faktory může přispívat k omezení vývoje nemoci tak, aby nepřesahovala kůži. Přidání systémového imunomodulátoru, jako je rekombinantní IFN- α nebo retinoid bexaroten (Targretin), obvykle vede k lepší klinické odpovědi (Zhang and Duvic 2003), (McGinnis, Shapiro et al. 2003).

U pacientů, u nichž dosud nebylo detekováno postižení periferní krve, ale kteří vykazují rozsáhlé infiltrované kožní plaky, vedou kombinované terapeutické přístupy k lepším výsledkům. IFN- α je produktem vrozené imunitní odpovědi DC buněk a jeví se jako jeden z nejaktivnějších biologických látek používaných při léčbě MF/SS. Jak je uvedeno výše, léčba PUVA v kombinaci s podáváním IFN- α může vést k lepší klinické odpovědi než použití samotného PUVA. Několik studií ukázalo, že kombinace IFN- α s perorálními retinoidy, včetně

bexarotenu nebo kyseliny retinové, může vyvolat rychlejší odpověď u pacientů s rozsáhlými kožními lézemi (Knobler, Trautinger et al. 1991).

IFN- α indukuje řadu imunologických účinků, které mohou vést k vymizení nemoci. IFN- α přímo zvyšuje buněčně zprostředkovanou cytotoxicitu jak CD8+ T-buněk, tak NK-buněk. IFN- α také potlačuje produkci cytokinů maligními TH2 buňkami, což může vést ke zvýšení protinádorové imunitní odpovědi (Wysocka, Benoit et al. 2004).

Bexaroten, sloučenina specifická pro retinoidní receptor X (RXR), má cenné imunomodulační účinky, které jsou aplikovatelné při léčbě MF/SS. Bexaroten má schopnost indukovat apoptózu v populaci maligních T-buněk. Při vysokých dávkách perorálního bexarotenu v monoterapii byla míra léčebných odpovědí u pacientů s MF / SS téměř 50%. Budgin (2005) ve své práci prokázal, že i když maligní buňky u většiny pacientů SS jsou citlivé na apoptotické účinky bexarotenu, přibližně jedna třetina pacientů vykazuje významnou rezistenci na apoptózu a na tento léčebný režim (Budgin, Richardson et al. 2005). Bexaroten má schopnost inhibovat produkci IL-4 a případně i jiných TH2 cytokinů u pacientů s SS. Na rozdíl od bexarotenu mohou mít retinoidy specifické pro receptor retinové kyseliny (RAR) potenciační účinky na imunitu. Látky jako jsou kyselina all- *trans*- retinová a kyselina 13- *cis*- retinová vykazuje schopnost indukovat produkci IFN- γ a jejich účinek se zvyšuje po přidání nízké koncentrace IL-2 (Kim, Hess et al. 2005).

Léčba pokročilých stadií

Ve výrazném kontrastu v porovnání s pacienty v časných MF se u pacientů s pokročilým MF / SS projevují abnormality prakticky v každé složce protinádorové imunitní odpovědi (CD8+ T-buňky, NK- buňky a DC). V pozdějších stadiích MF / SS je proto zapotřebí agresivnější terapie, aby se adekvátně nastolila reakce hostitele. Objevují se důkazy, že u pokročilého onemocnění multimodální imunoterapie s použitím biologických látek může vyvolat klinickou odpověď, která je trvalá a dostatečná k eradikaci maligního klonu. Hlavní složkou strategie eliminace populace maligních T-buněk je zde použití látek, které mohou indukovat apoptózu těchto buněk a současně zvyšovat schopnost hostitele generovat silnou cytotoxickou odpověď. U pacientů s cirkulujícími maligními T-buňkami může extrakorporální fotoferéza (ECP) a modifikace ECP, zvaná transimunizace, vést k masivní apoptóze buněk v periferní krvi a indukci diferenciaci monocytů na DC, které jsou schopné fagocytovat a zpracovávat antigeny apoptotických nádorových buněk. Opakované cykly ECP po dobu 2 po sobě jdoucích dnů, každé 3 až 4 týdny,

mohou být dostatečné k vyvolání kompletní klinické odpovědi u SS (Girardi, Schechner et al. 2002).

Dobré výsledky byly prokázány při kombinaci ECP s podáváním imunitních adjuvans jako IFN- α a bexaroten. Také podávání GM-CSF po každém ošetření ECP zlepšilo funkci APC. Podání 125 μ g GM-CSF ve 2 po sobě jdoucích dnech vedlo k významnému zvýšení počtu cirkulujících DC ve srovnání s počty DC u pacientů s SS léčených pouze ECP. (Wysocka, Zaki et al. 2002).

Kromě IFN- α se používají další postupy ke zvýšení efektorové protinádorové imunity. Například, rekombinantní IFN- γ má významný potenciál pro léčbu MF/SS a je lépe snášen než IFN- α , zejména u starších osob, které při IFN- α terapii mají časté kognitivní dysfunkce a výraznou únavou. Kromě aktivace cytotoxických lymfocytů a DC s produkcí IL-12, potlačuje IFN- γ u pacientů s MF / SS nadměrnou produkci TH2 lymfocytů a zvyšuje expresi CD40. V několika případech přidání IFN- γ k multimodálnímu režimu, který zahrnoval fotoferézu a bexaroten, vedlo k trvalé kompletní klinické remisi (Shapiro, Rook et al. 2002).

Stanovení diagnózy CTCL, stadia nemoci, stratifikaci rizika a výběr vhodné terapie vyžaduje multidisciplinární přístup. I když lze dosáhnout vysoké míry terapeutické odpovědi pomocí systémové chemoterapií, tyto odpovědi jsou často krátkodobé a jsou spojeny se značnou toxicitou. Jelikož léčba pokročilého stadia MF/SS je do značné míry paliativní, je upřednostňován léčebný přístup, který využívá agresivnějších terapií eskalovaným způsobem. Účast pacientů v klinických studiích je celkem vhodná, protože zavádění nových léčebných látek bude rozšiřovat terapeutické možnosti při léčbě CTCL (Wilcox 2016).

2. Podklady pro formulování hypotézy

Kožní T-buněčný lymfom představuje heterogenní skupinu potenciálně devastujících kožních malignit. Přes desetiletí intenzivního výzkumu není patogeneze stále úplně objasněna. V raných stádiích je klinická i histopatologická diagnóza často obtížná kvůli schopnosti CTCL se „maskovat“ za benigní kožní zánětlivé dermatózy. Vzhledem k nedostatku spolehlivých biomarkerů je také obtížné předvídat průběh choroby, odpověď na terapii nebo stupeň progresu. Potenciál využití miRNA v roli diagnostických a prognostických biomarkerů se jeví

jako velice slibný. Profily miRNA v CTCL byly rozsáhle studovány a velké množství studií uvádělo jejich deregulovanou expresi.

Ve studii nizozemské skupiny (van Kester, Ballabio et al. 2011) byl určen kompletní spektrum exprese miRNA tzv. miRnom pro mycosis fungoides z kožních biopsií od 19 pacientů v nádorovém stádiu MF a 12 pacientů s benigními zánětlivými dermatózami (ekzém a psoriáza). Bylo identifikováno 49 miRNA, které byly odlišně exprimovány, nejvýznamnější diferenciálně up-regulované miRNA byly: miRNA-92a, miRNA-93 a miRNA-155. Tato zpráva byla první, která popisovala profil miRNA nádorového stadia MF.

Hned na to skupina dánských imunologů (Ralfkiaer, Hagedorn et al. 2011) zveřejnila výsledky práce, kde autoři studovali hladiny exprese miRNA u 198 pacientů s CTCL, periferním T-buněčným lymfomem (PTL) a benigními kožními onemocněními (psoriáza a dermatitida). Výsledkem práce byla definice modelu tzv. klasifikátoru, který byl založen na hladinách exprese miR-155, miR-203 a miR-205 diagnostických vzorků MF z kožních biopsií a odlišoval CTCL od benigních kožních onemocnění s vysokou specificitou a citlivostí.

Výzkum dánských imunologů pokračoval (Ralfkiaer, Lindahl et al. 2014) ve studiu expresi mikroRNA u pacientů s časnou a pokročilejší MF ve vztahu k benigním dermatózám. miRNA, které odlišovaly časnou MF od benigních lézí, zahrnovaly jak již dříve zkoumané (ve studii z roku 2011) down-regulované miR-203, miR-205, tak i nově zjištěné up-regulované miR-146a, 146b-5p, let-7 a miR-342-3p. Při porovnání časných MF s pokročilejšími CTCL byly významně nadprodukované miRNA, které jsou součástí onkogenních klastrů miR-17-92, 106b-25 a 106-363. U 16 pacientů s progresivním onemocněním bylo nalezeno celkem 72 miRNA, které byly odlišně exprimované, například některé z nich: miR-16, miR-21, miR-92a, miR-93, miR-142-3p a miR-106a. Následně se ukázalo, že časná MF a reaktivní dermatózy vykazují velmi odlišné miRNA profily i přes jejich klinické, histologické a imunologické podobnosti.

Ve studii ze Španělska (Manso, Martinez-Magunacelaya et al. 2018) výzkumníci rozlišili časný mycosis fungoides od zánětlivé dermatitidy. Bylo ukázáno, že mezi těmito onemocněními bylo deregulováno celkem 114 miRNA. Nejvíce odlišně exprimovány mezi nádorovými a zánětlivými stavy byly miRNA-26a, miRNA-222, miRNA-181a, -146a. Dvě z těchto miRNA (miRNA-181a a miRNA-146a) byly významně deregulovány mezi časnými a pokročilými stádii MF. Bioinformatická analýza ukázala, že oběma těmito miRNA je regulována exprese FOXP3, transkripční faktor, který zásadně ovlivňuje patogenezi MF a přispívá ke snížení imunitní odpovědi na kancerogenezi. V následném experimentu bylo potvrzeno, že při nadměrné expresi obou miRNA v buňkách CTCL se snížila exprese FOXP3. Data uvedená ve

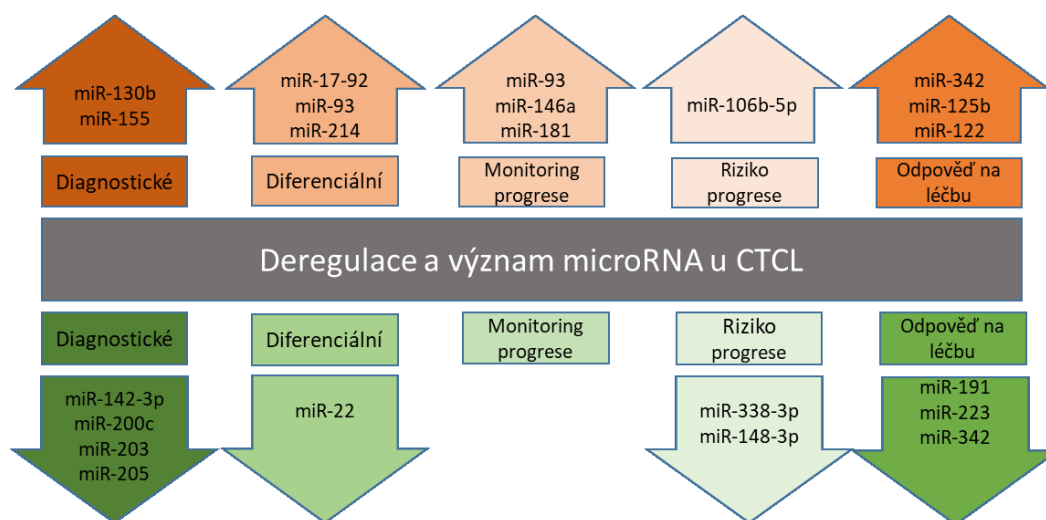
studii ukazují, že analýza exprese souboru miRNA (miRNA-26a, miRNA-222, miRNA-181a a miRNA-146a) by mohla být dostatečná k rozlišení nádorů od reaktivních zánětů.

Kromě použití miRNA jako diagnostického nástroje v CTCL, miRNA mohou být potenciálně využívány i jako markery prognostické. To má klíčový klinický význam, protože je obtížné předvídat, u kterých pacientů CTCL je větší riziko progresu onemocnění s nutností aplikovat agresivnější terapie. Ve studii Lindahl (2018), byla zkoumána velká skupina pacientů s MF s cílem identifikovat prognostický model založený na miRNA. Tento model, který se skládá z miR-106b-5p, miR-148a-3p a miR-338-3p, již v době diagnózy úspěšně určil pacienty s vysokým rizikem onemocnění a se zkrácením doby celkového přežití. (Lindahl, Besenbacher et al. 2018). Navíc, mohou profily určitých miRNA předem predikovat odpověď na terapii. Studie McGirt (2015) uvádí, že u pacientů s MF, u kterých došlo po extrakorporální fotoferéze ke zvýšení hladin miR-223, miR-191 a miR-342, byla po dobu 6–12 měsíců od proběhlé terapie příznivá klinická odpověď (McGirt, Baerenwald et al. 2015). Také se ukázalo se, že signální dráha MYC–mirR-125b reguluje citlivost nádorových buněk CTCL. Vysoká exprese miR-125b zvýšila buněčnou rezistenci na léčivo a tím urychlila růst nádoru (Manfe, Biskup et al. 2013). Na obrázku 5. ukázány miRNA, které mohou být využité jako diagnostické a prognostické markery pro CTCL.

Výběr modelu miRNA pro diagnostiku CTCL

Bylo provedeno mnoho studií s miRNA ve snaze nalézt optimální diagnostický nástroj pro CTCL, jejich výsledky jsou však heterogenní a každá z nich označuje jiné soubory miRNA. Rozhodli jsme se věnovat výzkumu souboru miRNA, který by byl vhodný pro diagnostiku a predikci rizika CTCL. Ze všech dostupných studií o miRNA jsme vybrali výzkum dánské skupiny (Ralfkiaer, Hagedorn et al. 2011). V dané studii autoři na velkém souboru vzorků kožních biopsií od pacientů s MF, SS a benigních dermatóz zkoumali aberantní expresi celkem 668 miRNA. Ve výsledku studii byl vypracován klasifikátor miRNA, který s velkou jistotou odlišil maligní kožní onemocnění od benigní dermatózy.

Obrázek 5. Deregulace miRNA u CTCL. Prezváto z (Gluud, Willerslev-Olsen et al. 2020).



Na obrázku 5 v šípkách směřující nahoru jsou uvedeny up-regulované miRNA, které mohou být využité v diagnostice (jako diagnostické miRNA); jako diferenciální pro rozlišení mezi různými varianty CTCL; miRNA pro monitoraci a odhad rizika progresu; miRNA pro monitoraci odpovědi na terapii. Šipky směřující dolu označují miRNA se sníženou expresí, které mohou být použité ve stejných diagnostických a prognostických modelech.

V naší studii jsme použili model stejných miRNA (tj. miRNA-155, miRNA-203, miRNA-205), který navíc byl rozšířen o doplňující miRNA, nápomocné v diferenciální diagnostice a predikci rizika. Ze všech nabízených v rešeršní práci miRNA jsme se rozhodli o přidání k modelu miRNA-223 a miRNA-22.

Velkým přínosem výzkumu měla být použitelnost modelu expresi miRNA na vzorcích periferní krve. Zde jsme předpokládali, že získání expresních profilů miRNA z častějších odběrů periferní krve bude mít pro pacienta s kožním lymfomem menší zátěž a větší diagnostickou hodnotu.

Role vybraných miRNA-155, miRNA-203, miRNA-205, miRNA-223 a miRNA-22 v patogenezi CTCL

miR-155 je důležitý pro podporu proliferace a progresu nádoru. Bylo prokázáno, že miR-155 je významně upregulován v T-buňkách v pozdějších stádiích CTCL ve srovnání s lymfocyty v raných stádiích onemocnění (Moyal, Barzilai et al. 2013). Funkčně miR-155 cílí na organizaci chromatinu a na transkripční faktor SATB1 (speciální AT-vážeč protein 1), jehož inhibice podporuje proliferaci maligních T-buněk, indukuje expresi TH2 cytokinů IL-5 a IL-9, které se podílejí na patogenezi CTCL jako růstové a zánětlivé faktory (Fredholm, Willerslev-Olsen et al. 2018). V maligních T-buňkách je zvýšená aberantní aktivace STAT5, která zvyšuje expresi genu *BIC* pro miRNA-155, což výsledně usnadňuje proliferaci v maligních T-buňkách (Kopp, Ralfkiaer et al. 2013). Na rozdíl od toho transkripční faktor STAT4, kritický pro diferenciaci

na fenotyp TH1, je v CTCL downregulován (Litvinov, Cordeiro et al. 2014). Ztráta STAT4 je spojena s přechodem na převládající TH2 fenotyp T-buněk s indukci zánětlivých cytokinů a následnou podporou zánětlivého mikroprostředí podporujícího nádor. Knockdown miR-155 v myším modelu zvýšil expresi STAT4 maligních T-buněk, což ukazuje, že exprese STAT4 je alespoň částečně řízena miR-155 (Netchiporouk, Litvinov et al. 2014). miRNA-155 tedy může hrát klíčovou roli při přechodu z TH1 do TH2-dominantního prostředí často pozorovaného u MF během progresu onemocnění. Kromě potlačování SATB1 a STAT4 v CTCL, miR-155 reguluje více signálních drah potenciálně důležitých pro maligní transformaci. miR-155 se zaměřuje na několik genů kódujících nádorové supresory a induktory apoptózy jako jsou *PDCD4*, *JARID2*, *ARID2*, *ZNF652* a *SMAD5* (Wu, Duan et al. 2020).

Tp53 a izoforma p63 regulují transkripci miRNA-205, čímž se podílejí na kontrole procesu epiteliálně-mezenchymálního přechodu (EMT), při kterém epiteliální buňky ztrácejí svoji polaritu a adhezi, a získávají migrační a invazivní vlastnosti (Tran, Choi et al. 2013). Snížení exprese miRNA-205 v CTCL tkáních je možnou známkou aktivity maligního procesu, zvýšení jeho invazivity a tedy celkové progresu onemocnění.

Cílem miRNA-203 je supresor cytokinové signalizace 3 (SOCS-3), který se účastní zánětlivých odpovědí a funkcí keratinocytů. Tato miRNA je často aberantně exprimována jak u benigních zánětlivých dermatóz, tak i maligních změn na kůži (Sonkoly, Wei et al. 2007), (Ralfkiaer, Hagedorn et al. 2011). Exprese této tkáňově specifické miRNA je v CTCL snižena a je možným markerem poruchy normální funkce epidermálních buněk s podporou zánětlivých a maligních kožních změn.

Kromě toho v CTCL mohou hrát roli další miRNA, včetně miRNA-22 a miRNA-223, jejich inhibice umožňuje vysokou expresi kritických transkripčních faktorů včetně GATA3 a protoonkogenů, jako je *E2F1* (E2F Transcription Factor 1) a *MYC*, společně přispívajících k patogenezi a progresu CTCL (McGirt, Adams et al. 2014). Exprese miRNA-22 u CTCL snižena přes STAT signální dráhu, její úloha v patogenezi onemocnění tkví v absenci potlačovací aktivity na *MYC* (Sibbesen, Kopp et al. 2015).

Role cirkulujících miRNA

Na rozdíl od popsané funkce buněčné miRNA, funkce miRNA v extracelulárním prostředí zůstává poněkud nejasná. Předpokládá se, že aktivní výměna miRNA mezi buňkami přes exozomy může mít významnou funkci v komunikaci na dlouhou vzdálenost. První zpráva popisující tuto roli cirkulujících miRNA ukázala, že mikrovezikuly embryonálních kmenových

buněk mohou přenášet některé miRNA do myších embryonálních fibroblastů in vitro (Yuan, Farber et al. 2009). Od té doby přineslo několik studií důkazy o transportu miRNA mezi různými typy buněk. Například (Umez, Ohyashiki et al. 2013) ukázal exozomální přenos miR-92a získaného z leukemické buněčné linie K562 na endoteliální lidské buňky (HUVEC), což vedlo k významnému potlačování exprese *ITGA5* (gen pro integrin $\alpha 5$), který je cílovým genem pro miR-92a.

Většina extracelulárních miRNA je pravděpodobně vázaná v komplexech Ago2-miRNA, které mohou být vedlejší produkty buněk, jenž zůstávají v extracelulárním prostoru kvůli vysoké stabilitě proteinu Ago2 a komplexu Ago2-miRNA (Turchinovich, Weiz et al. 2011).

V poslední době se četné studie zaměřily na profilování cirkulujících miRNA při různých patologických stavech (Chen, Ba et al. 2008), (Lawrie, Shilling et al. 2009). Zaměřili se na identifikaci nových biomarkerů pro diagnostiku a klasifikaci onemocnění a sledování stavu progresu. Předpokládalo se, že specifické biomarkery související s onemocněními, včetně miRNA, mohou být transportovány z chorobou postižené tkáně do krevního oběhu. Měření hladiny cirkulujících miRNA v krvi by mohlo být úspěšně aplikované v diagnostice, zejména v případech, kdy je žádoucí použití méně-invazivních metod.

3. Hypotéza a cíle disertační práce

MikroRNA jsou specifické molekuly RNA, které významně zasahují do procesů regulace, vedoucích k narušení diferenciačních a proliferačních buněčných pochodů a mohou iniciovat vznik nádorů. Pro diagnostiku CTCL je používána dosud nejrozšířenější metoda průbojníkové biopsie kůže, klínovitá incise nebo excize kožního postižení. Výše uvedené studie, které se zabývaly výzkumem miRNA v CTCL s definicí různých modelů pro diagnostiku a predikci rizika tohoto onemocnění, využívaly vzorky kožních biopsií.

Je známo, že miRNA jsou velmi stabilní v různých typech tkání a jejich detekce je možná nejenom v chorobou postižené tkáni, ale i krevním oběhu a to zejména proto, že miRNA zachovává prostorovou strukturu neumožňující štěpení RNázami. Předpokládáme, že existuje účinný nástroj pro detekci onemocnění CTCL s využitím cirkulujících miRNA v krevním vzorku pacienta. Stanovení expresních hladin miRNA v kombinaci s klinickými daty od pacientů CTCL včetně rizikové skupiny a léčebné strategie, může nejen odlišit maligní vzorky od kontrolních, ale i být nápomocné v objasnění patofyziologického mechanismu tohoto onemocnění.

3.1. Hypotéza

Budeme ověřovat hypotézu, že v **periferní krvi pacientů s CTCL cirkulují specifické miRNA, jejich aberantní exprese v porovnání s kontrolními vzorky, odliší maligní lymfom od benigních diagnóz.**

Předpokládáme, že na rozdíl od dosavadních proběhlých studií, které využívaly vzorky kožních biopsií, cirkulující miRNA v periferní krvi pacientů CTCL mají stejnou eventuelně významnější diagnostickou a prognostickou hodnotu.

3.2. Konkrétní cíle navazující na hypotézu

1. Identifikace miRNA účastnicích se lymfo-kancerogenezi v oblasti kůže.
2. Stanovení hladin exprese vybraných miRNA ve vzorcích periferní krve pacientů s CTCL, benigními dermatózami a kontrolních vzorků od zdravých dárců.
3. Studium vzájemné interakce klinických znaků CTCL a hladin exprese vybraných miRNA v závislosti na stadiu onemocnění.
4. Statistické ověření modelu exprese miRNA ve vzorcích CTCL.

4. Pacienti a metody

4.1. Soubor pacientů a zdravých kontrol

V předkládaném projektu byly využity vzorky periferní krve (N=47) od kohorty pacientů s mycosis fungoides a Sézarého syndromem (diagnóza byla stanovena dle WHO/EORTC 2008) a od pacientů s benigním onemocněním kůže (psoriáza, atopická dermatitida) ve spolupráci s 1. interní klinikou – hematologie a Dermatovenerologickou klinikou Všeobecné fakultní nemocnice (VFN) během období 2012 – 2016. Vzorky byly zpracovány a skladovány formou kryoprezervace na Ústavu patologické fyziologie 1. LF UK.

Odběry vzorků od pacientů byly provedeny po podepsání informovaného souhlasu v souladu s Helsinskou deklarací a Etickou komisí VFN. Pro projekt byly vybrány vzorky od 10 pacientů MF/SS (7x MF a 3x SS), muži : ženy 5:5, s věkovým průměrem 68 let. Vzorky od každého pacienta MF/SS byly odebrány 3-krát v průběhu sledování a léčby, s průměrným intervalem mezi vzorky 5 měsíců (od 2 do 14 měsíců).

Kontrolní skupinu tvořily opakované odběry vzorků krve od 6 pacientů s benigním onemocněním kůže (atopický ekzém a psoriáza), muži : ženy 4:2, s věkovým průměrem 57 let a 5 vzorků od zdravých dobrovolníků (bez kožního postižení) s věkovým průměrem 51 let. K dokumentaci rozsahu lézí MF jsou poskytnuty fotografie (Obr. 6) se svolením každého pacienta.

Obrázek 6. Fotografie kožních lézí u pacientů s mycosis fungoides ve studii.



Kožní léze u pacientů s MF, lokalizace a velikost ložiska (ID pacienta je uvedeno nahoře každé sady foto MF1 - MF7. Klinické stadium IA (pacient MF7) je charakterizováno ohraničeným kožním postižením (skvrny) v oblasti podbříšku a horní třetiny přední stany stehna. Klinický stadium IB (pacienti MF1, MF2, MF3 a MF5) je charakterizováno různými typy kožních postižení: skvrny, plaky na více než 10% celkového kožního povrchu se změnou pigmentu, šupinatěním a krustováním. Klinické stadium IIB (pacienti MF4 a MF6) je charakterizováno tumory velikostí více než 1 cm a různými typy dalších kožních postižení jako skvrny a plaky, navíc možné postižení lymfatických uzlin a krve.

V tabulce klinických charakteristik pacientů s CTCL (Tabl. 7) jsou uvedeny následující parametry: číslo pacienta včetně označení diagnózy (MF, SS), doba přežití, typy proběhlé terapie, odpověď na léčbu a klinické stadium. ISCL/EORTC 2007 (International Society for Cutaneous Lymphoma) rozděluje klinická stadia podle celkového přežívání na onemocnění s nízkým rizikem: stadia IA –II A včetně (10-léte přežívání do 52%) a vysokým rizikem IIB – IVB (10-léte přežívání do 15%).

Tabulka 7. Klinické údaje o kohortě pacientů ve studii s T-buněčnými lymfomy.

No	Věk	Pohlaví	DG	Klin. stadium	OS (měs)	Terapie	Odpověď na léčbu
MF1	61	M	MF	IB	58	IFN α / LD MTX	CR
MF2	74	F	MF	IB	92	IFN α	SD
MF3	66	F	MF	IB	179	IFN α / LD MTX	PR
MF4	82	M	MF	IIB	68	IFN α / CLB / MTX / PRD	SD
MF5	62	M	MF	IB	28	IFN α / LD MTX / CLB	CR
MF6	61	M	MF	IIB	57	IFN α / LD MTX / CLB	PR
MF7	70	F	MF	IA	23	lokální terapie / UVB	CR
SS1	72	F	SS	IIIA	94	IFN α / BEXA / ECP	PR
SS2	71	F	SS	IIA	40	IFN α / BEXA	SD

SS3	60	M	SS	IIA	44	IFN α / ECP	CR
-----	----	---	----	-----	----	--------------------	----

MF: Mycosis fungoides, SS: Sézary syndrom, IFN α : interferon alfa, LD MTX: nízká dávka methotrexatu, CLB: chlorambucil, MTX: methotrexat, PRD: prednizon, ECP: extrakorporální fotoferéza, BEXA: bexaroten, UVB: fototerapie, PR / CR: částečná nebo kompletní remise, SD: stabilní onemocnění, OS: celkové přežití (v měsících) vypočtené od data diagnózy.

Metoda diferenciální diagnostiky spočívá ve stanovení exprese vybraných miRNA v krevním vzorku pacienta pomocí qRT-PCR, která dle předpokladu, je novým účinným nástrojem pro odlišení CTCL od benigních onemocnění kůže.

4.2. Zpracování vzorků, extrakce a kvantifikace mikroRNA

Z každého vzorku plasmy byla izolována RNA za použití miRNeasy® Mini Kit (Qiagen, Hilden, Německo). Reverzní transkripce byla prováděna pomocí vysokokapacitní cDNA reverzní transkripční soupravy doplněné o miR-specifické primery (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Amplifikace byla provedena softwarem LightCycler verze 1.5.0.SP3 480 real-time PCR systém (Roche, Basel, Švýcarsko) na 384jamkových destičkách. Kvantitativní polymerázová řetězová reakce probíhala 45 cyklů při 95°C po dobu 15 s a 60°C po dobu 1 minuty. Relativní exprese byla vypočítána z hodnot *C_p* miRNA (miR-155, miR-203, miR-205, miR-223, miR-22) ve srovnání s kontrolními miR-103 a miR-423-5p, které jsou stabilně exprimovány a proto byly použity jako normalizační faktor. Výsledky byly porovnány s expresí stejných miRNA ze vzorků plazmy zdravých dárců.

5. Hlavní výsledky

5.1. Expresní změny vybraných mikroRNA a jejich význam v diagnostice CTCL

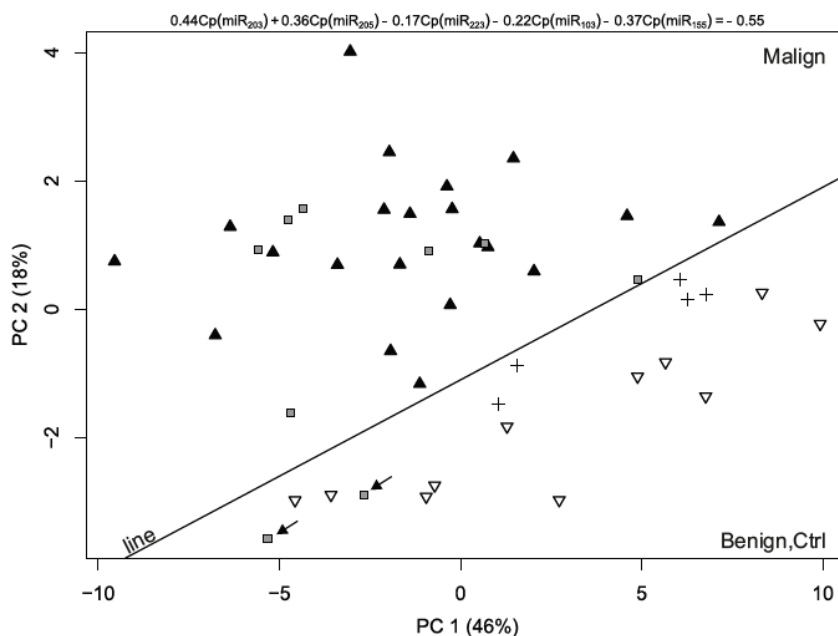
Jako první krok sledování jsme pomocí qPCR určili expresní hladiny miRNA-155, miRNA-203, miRNA-205, miRNA-223 a miRNA-22 (společně s referenčními miRNA-103, miRNA-423-5p) ve vzorcích plazmy pacientů s CTCL, pacientů s benigními kožními lézemi (BKL) a zdravých kontrol. Výsledná data expresních hladin jsme hodnotili pomocí analýzy hlavních

komponent (PCA principal component analysis). Hlavní komponenty jsou vzájemně ortogonální vektory, které popisují maximální variaci v datové sadě týkající se exprese miRNA. Pozorovali jsme, že vzorky CTCL se oddělily od BKL a zdravých kontrol. Na základě analýzy PCA jsme popsali linii, která odděluje vzorky CTCL od vzorků BKL a kontrol. (Obr. 7.). Vzorec pro tuto linii je následující:

$$0,44 \text{ Cp (miR - 203)} + 0,36 \text{ Cp (miR - 205)} - 0,17 \text{ Cp (miR - 223)} - 0,22 \text{ Cp (miR - 103)} + \\ + 0,37 \text{ Cp (miR - 155)} = -0,55$$

Analýza PCA ukázala, že BKL jsou ve srovnání se zdravými kontrolami vzdálenější od CTCL, což lze připsat skutečnosti, že BKL vykazovaly výrazně sníženou expresi miR-155. Kromě toho dva vzorky SS označené šipkami byly velmi blízko ke skupině BKL. Při detailní kontrole dat bylo zjištěno, že tyto dva vzorky od pacienta SS3 byly odebrány v době kompletní remise, kdy laboratorní a klinické příznaky onemocnění nejvíce odpovídaly BKL (viz také Obrázek 17, pacient SS3).

Obrázek 7. PCA analýza expresního profilu miRNA u pacientů s maligním onemocněním kůže, benigními dermatózami a zdravých kontrol.



Analýza hlavních komponent (PCA) pomocí údajů o expresi miR-155, miR-203, miR-205, miR-22, miR-223, miR-103 a miR423-5p u skupiny pacientů s maligním onemocněním kůže (Malign) a skupiny pacientů s benigními dermatózami a zdravých kontrol (Benign, Ctrl). Vzorec pro linii oddělující maligní vzorky od benigních je ukázán v horní části obrázku. Vzorky

MF jsou označeny jako tmavý trojúhelník, vzorky SS jsou označeny jako šedý obdélník, vzorky BKL jsou označeny jako prázdný trojúhelník, kontrolní vzorky jsou označeny křížkem. Šipky označují dva vzorky pacienta SS3 v kompletní remisi.

Pomocí expresních profilů vybraných 5-miRNA bylo 11 z 11 vzorků od pacientů s BKL klasifikováno jako benigní, zatímco 34 z 36 vzorků od pacientů v různých stadiích onemocnění CTCL bylo klasifikováno jako maligní. Specifita detekce CTCL vs. BKL pomocí miRNA v plazmě byla 100% (interval spolehlivosti 71–100%, $p=0,001$ s použitím přesného binomického testu) a senzitivita byla 94% (interval spolehlivosti 81–99%, $p = 1,941 \times 10^{-8}$).

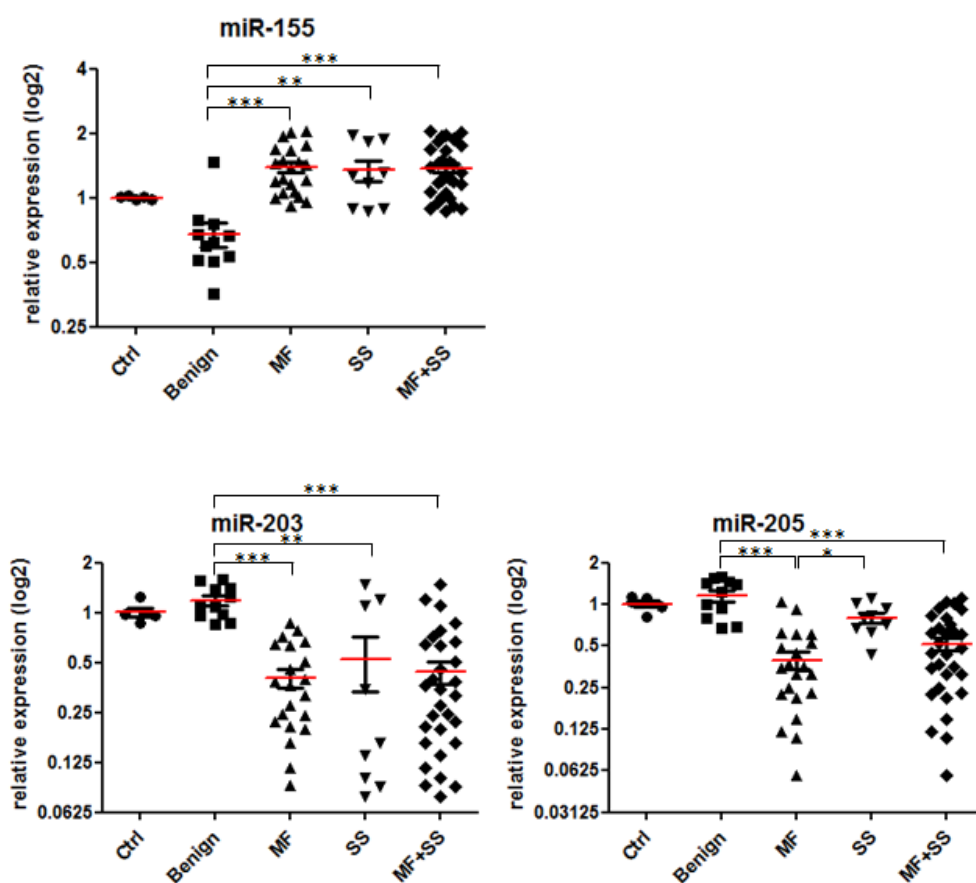
Pro další pochopení toho, které miRNA jsou více signifikantní pro diferenciální diagnostiku pacientů s CTCL, jsme hodnotili expresi každé miRNA samostatně. (Obrázek 8).

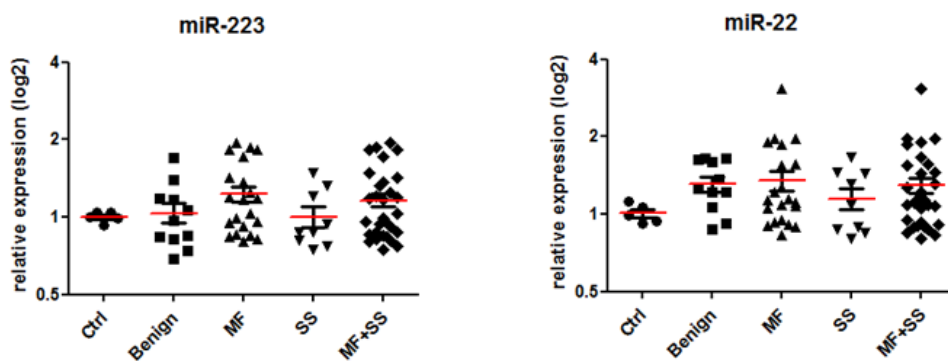
Data ukazují, že průměrné hladiny miRNA-155 byly významně upregulovány jak u pacientů s MF, tak i u SS ve srovnání s BKL a kontrolními vzorky. Odpovídajícím způsobem byly průměrné hladiny miRNA-203 a miRNA-205 významně sníženy.

V případě hladiny miR-223 nebyl zjištěn signifikantní rozdíl mezi pacienty MF/SS a benigními kožními onemocněními nebo zdravými dobrovolníky. U miRNA-22, která by mohla hrát klíčovou roli v maligní transformaci kožních T-buněčných lymfomů, a její účast ve změnách expresi celého modelu se očekávala, tak se zde také neukázaly signifikantní rozdíly mezi hladinami u vzorků benigních a maligních onemocnění.

V uvedených výsledcích se potvrdila klíčová role onkogenní miRNA-155 v diagnostice CTCL. Její vzájemné hodnocení s tumorsupresorovými miRNA-203 a miRNA-205 v plazmě pacientů dovolilo oddělit maligní diagnózy od benigních. Tyto výsledky přinesly očekávané závěry, že stanovení hladin exprese výše uvedených miRNA z plazmy pacientů CTCL je přesným nástrojem pro diagnostiku MF a SS.

Obrázek 8. Exprese mikroRNA (miR-155, miR-203, miR-205, miR-223 a miR-22) v plasmě pacientů MF/ SS a pacientů s benigním kožním onemocněním a zdravých dobrovolníků.





Expresní hladiny miR-155, miR-203, miR-205, miR-223, miR-22 ve vzorcích plazmy pacientů s BKL (Benign N=11), MF (N=21), SS (N=9), Ctrl (N=6) v log₂ měřítku. Průměr p -hodnot \pm standardní odchylka (Kruskal-Wallis, * $p = 0,05$, ** $p = 0,01$, *** $p = 0,001$).

V dalším kroku hodnocení jsme zkoumali úroveň exprese miRNA ve vztahu s klinickým stadiem onemocnění podle ISCL / EORTC pro MF a SS. (Obrázek 9). Trendy zvyšování exprese miR-155 a vzájemné snižování exprese miR-203 a miR-205 jsou pozorovatelné ve vyšších stadiích onemocnění. To je zvláště patrné mezi stadiem nízkého rizika IA (papuly a plaky) a vyššího rizika IIB (tumor >1 cm a postižení lymfatických uzlin, periferní krve).

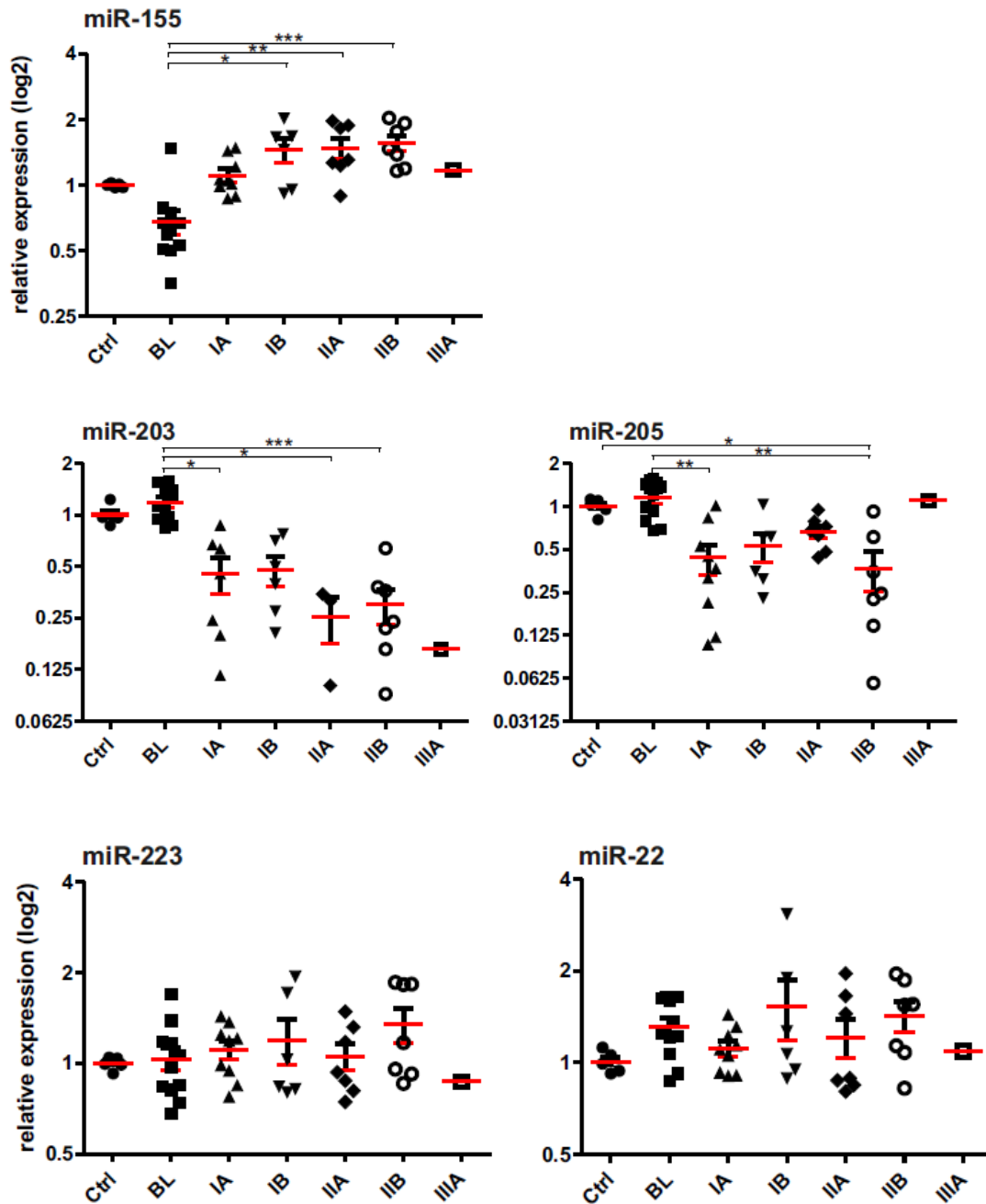
Hladiny miR-223 a miR-22 nebyly ve srovnání s kontrolami a BL výrazně změněny a distribuce jejich dat byla o něco heterogennější.

Dále jsme rozdělili vzorky pacientů podle terapeutické odpovědi. (Obr. 10). V případě odpovědi na léčbu s dosažením parciální (PR partial remission) nebo kompletní remise (CR complet remission) pro každou diagnózu MF a SS. V případě nepříznivé odpovědi na léčbu s progresí onemocnění (PD progress disease) nebo beze změny v klinickém stavu pacienta po léčbě (SD stable disease). Zde jsme sledovali trend ve snížení exprese miR-155 ve vzorcích s terapeutickou odpovědí na léčbu s dosažením CR/PR jak u MF, tak i u SS. Silné signifikantní rozdíly v expresi byly zjištěny u vzorků mycosis fungoides a Sézarého syndromu s terapeutickou ne-odpovědí (tj. SD/PD) ve vztahu k benigním kožním lézím (BL). Stejně sledování v případě hladin exprese bylo viditelné u miR-203 a -205. Signifikantní rozdíly byly zjištěny ve vztahu mezi vzorky s benigními kožními lézemi a vzorky s MF a SS. U vzorků s terapeutickou odpovědí (PR/CR) byly hodnoty exprese o něco vyšší, tj. blížily se k hodnotám benigních vzorků nebo zdravých kontrol. Opět nebyly zaznamenány žádné trendy a signifikantní rozdíly pro miR-223 a miR-22. (Obrázek 10)

Expresní hladiny miRNA oddělily pacienty s CTCL ve srovnání s kontrolami a BKL a ukázalo se, že pacienti se zvýšenou nádorovou zátěží mají vyšší hladiny miR-155 a nižší hladiny miR-

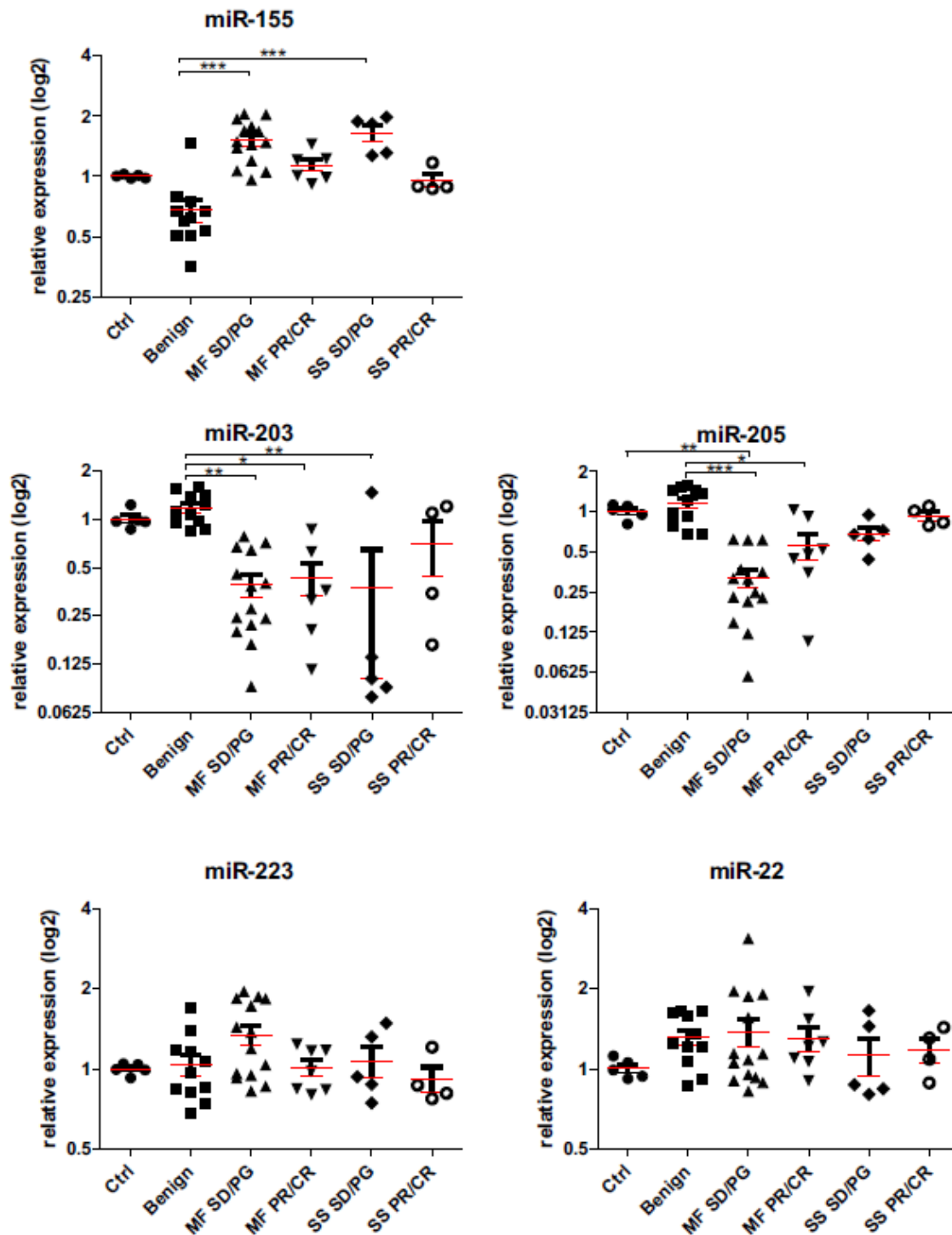
203 a miR-205. Při odpovědi na terapii mají hladiny miR-155, miR-203 a miR-205 tendenci se normalizovat, což se stalo předmětem našich dalších analýz.

Obrázek 9. Relativní exprese miRNA ve vzorcích MF, SS ve vztahu ke klinickému stadiu onemocnění (IA - IIIA).



Expresní hladiny miRNA miR-155, miR-203, miR-205, miR-223, miR-22 mRNA v plazmě (v log2 měřítku) uvedené s ohledem na klinická stádia. Zkratky: Ctrl, BL, MF, SS, SD, CR, PR, PG jsou popsány v textu. Průměr ± standardní odchylka při použití jednosměrného testu ANOVA Kruskal-Wallis. * $p = 0,05$, ** $p = 0,01$, *** $p = 0,001$.

Obrázek 10. Relativní exprese miRNA ve vzorcích MF, SS ve vztahu k terapeutické odpovědi na léčbu.



Hladiny miRNA v plazmě a klinický stav pacientů CTCL. Hladiny miRNA (v log₂ měřítku) uvedené s ohledem na terapeutickou odpověď; Ctrl: zdravá kontrola, zkratky: BL, MF, SS, SD, CR, PR nebo PG jsou popsány v textu. Průměr ± standartní odchylka při použití jednosměrného testu ANOVA Kruskal-Wallis. * $p = 0,05$, ** $p = 0,01$, *** $p = 0,001$.

5.2. Jednotlivé mikroRNA v prognostice CTCL

Pomocí multivariační ordinální logistické regresní analýzy jsme vyhodnotili hladiny miRNA v plazmě CTCL ve vztahu k přínosu léčby. Hodnocení zahrnovalo pořadí stupně terapeutické odpovědi od úplné remise CR, přes částečnou remisi PR, stabilní onemocnění SD a nakonec k progresi PD (CR < PR < SD < PG), náležitost ke klinickému stadiu od nízkého rizika k vyššímu (IA < IB < IIA < IIB < IIIA), velikost nádoru dle TNMB klasifikace (T1 < T2 < T3 < T4) a diferenciální diagnostika mezi zdravými kontrolami, benigními lézemi BL a CTCL (Ctrl < BL < CTCL). Výsledky *p*-hodnoty shrnuté v tabulce 8 ukazují, že miR-155 a miR-203 významně ovlivňují příslušnost ke každému ze čtyř hodnocení, zatímco miR-205 je signifikantně asociovaná pouze s terapeutickou odpovědí. Ostatní miRNA (miR-223, miR-22) nebo jiné rutinně stanovené parametry v plazmě (LDH, p2-mikroglobulin, *není ukázáno*) neměly vliv na příslušnost k žádnému z hodnocení.

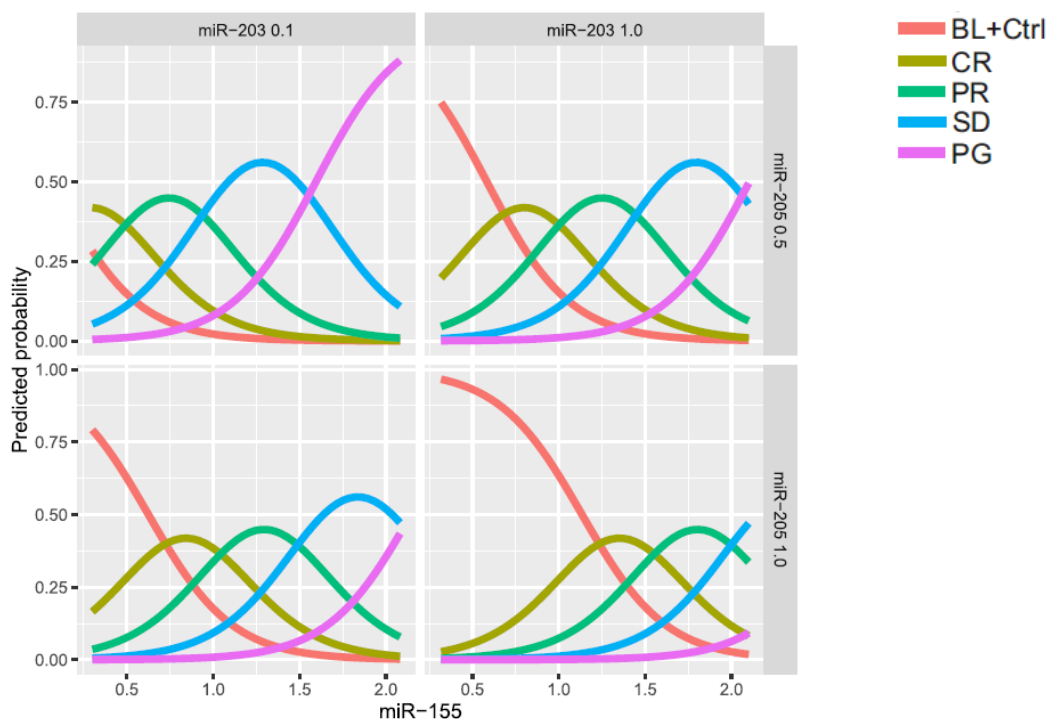
Tabulka 8. *p*-hodnoty, vliv úrovně exprese miRNA na pravděpodobnost progresu CTCL

Klinický parametr	miR-155	miR-203	miR-205	miR-223	miR-22
Odpověď na léčbu	0,00022	0,01758	0,00070	0,12323	0,08071
Klinická stadia	0,00404	0,00029	0,5580	0,5714	0,4340
Tumor	0,0042	0,0004	0,7792	0,2813	0,8939
Diagnóza	0,0332	0,0034	0,234	0,684	0,071

p-hodnoty stanovené pomocí testu poměru pravděpodobnosti z multivariační ordinální logistické regrese mezi hladinami miR a čtyřmi různými pořadími hodnocení (odpověď na léčbu, náležitost ke klinickému stadiu, velikost tumoru a diagnóza).

Data jsou také graficky uvedena na obrázku 11, kde současné zvýšení hladiny miR-155 a snížení hladiny miR-203 a miR-205 zvyšují pravděpodobnost, že vzorek patří do kategorie ne-odpovědi na léčbu (tj. SD a PD). Lze tedy říci, že zatímco nárůst miR-155 naznačuje vyšší pravděpodobnost progresu onemocnění, zvýšení exprese miR-203 nebo miR-205 tuto pravděpodobnost snižují.

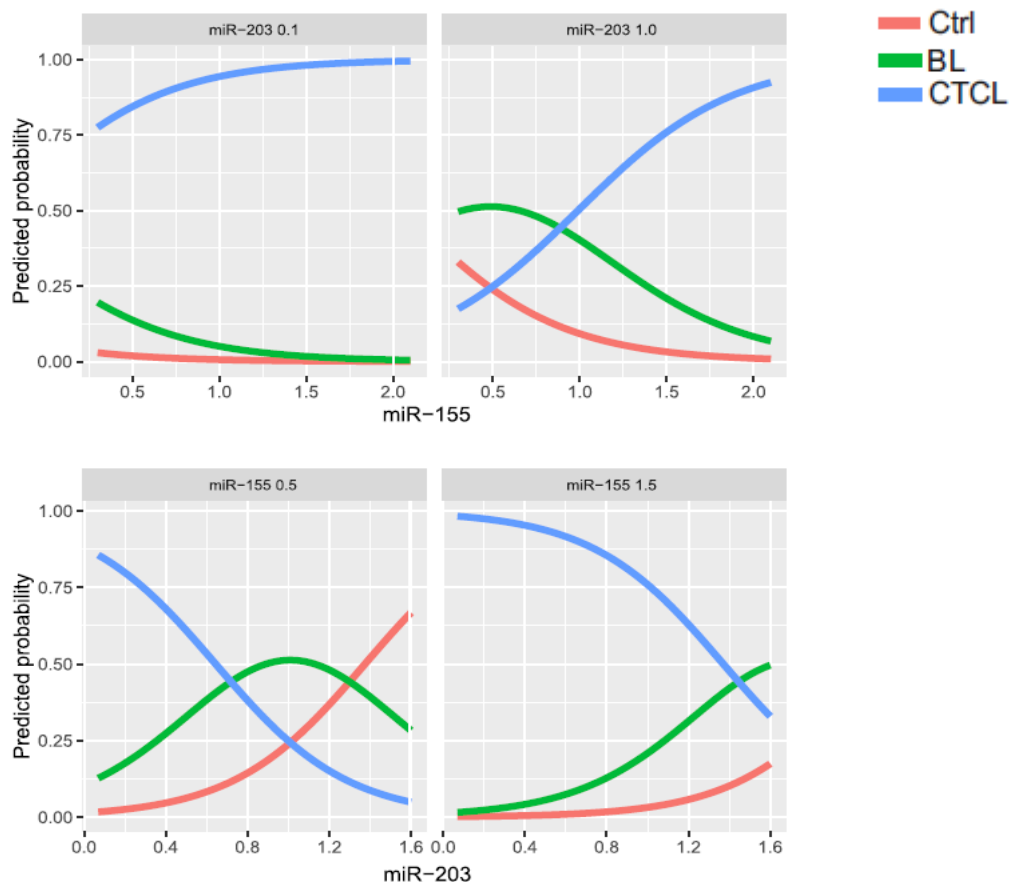
Obrázek 11. Předpoklad pravděpodobnosti určité terapeutické odpovědi na základě úrovně exprese vybraných miRNA



Na obrázku 11 je graficky vyjádřena předpokládaná pravděpodobnost, že pacient/vzorek bude mít konkrétní terapeutickou odpověď (CR, PR, SD, PG) nebo patřit k BL a zdravé kontrole. Regresní model obsahuje změny tří miRNA: miR-155, miR-203 a miR-205, které byly významné s ohledem na *p*-hodnoty. Na ose X jsou znázorněny zvyšující se logaritmované (\log_2) hladiny relativní exprese miR-155. Na ose Y (vlevo) je označena úroveň pravděpodobnosti (od 0 do 1,0). Každý graf je označen určitou expresní hodnotou pro miR-203 (0,1 vs. 1,0) a miR-205 (0,5 vs. 1,0). Při zvýšené hladině miR-203 (1,0) a miR-205 (1,0) – graf dole vpravo, je největší pravděpodobnost, že vzorek bude patřit ke kohortě BL+Contr, za podmínky že hladina miR-155 bude od 0 do 1,0. Další zvýšení hladiny miR-155 od 1,0 přes 1,5 do 2,0 predikuje pravděpodobnost, že vzorek bude náležet k CTCL kohortě se snižující se odpovědí na terapii: od CR, přes PR, SD k PD.

Stejná grafická analýza s ohledem na *p*-hodnoty, byla provedena pro pravděpodobnost náležitosti k určité diagnóze, znázorněna na obrázku 12. Kde vysoké hladiny miR-155 a nižší hladiny miR-203 predikují, že vzorek patří do skupiny maligních kožních onemocnění.

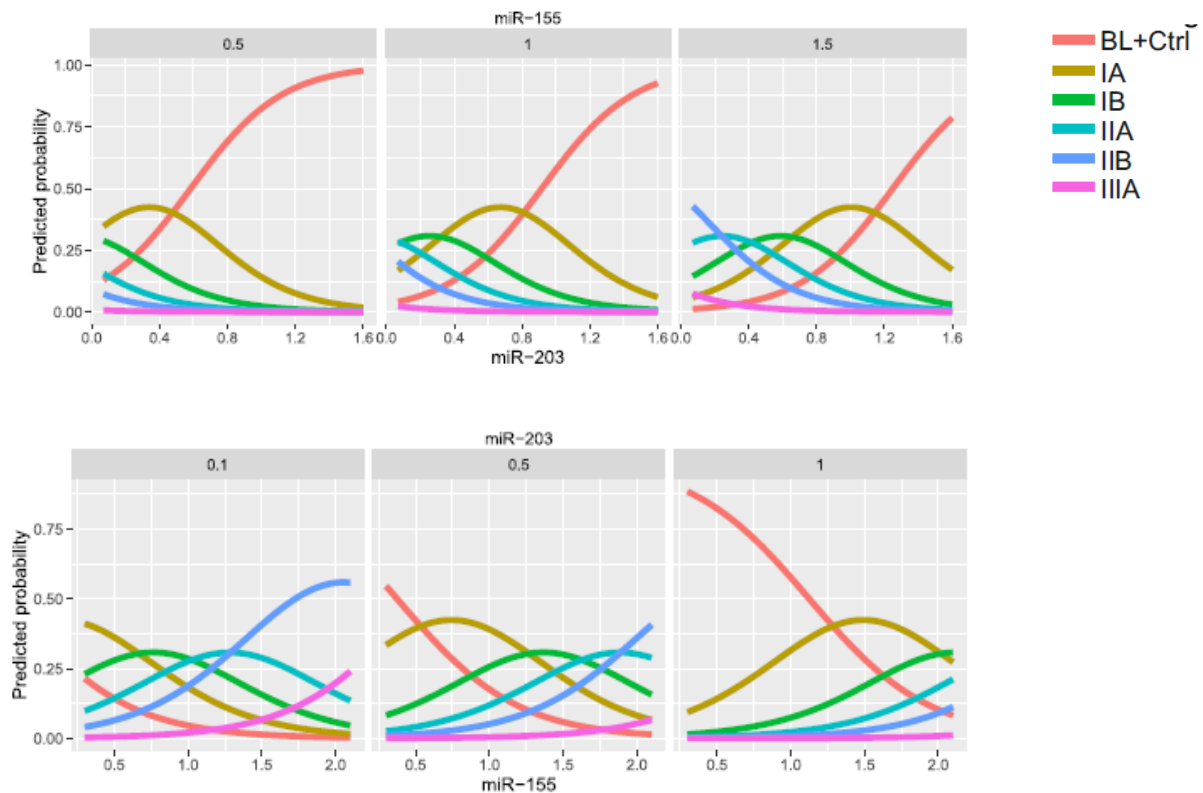
Obrázek 12. Předpokládaná pravděpodobnost příslušnosti k určité diagnóze na základě úrovně exprese miRNA



Na obrázku 12 je graficky znázorněná předpokládaná pravděpodobnost, že pacient je zdravý, nebo patří do skupiny benigních nebo maligních kožních onemocnění na základě logistického regresního modelu, který ukazuje změny hladin miRNA: miR-155 a miR-203 s ohledem na p -hodnoty. Na ose X jsou znázorněny zvyšující se logaritmované (\log_2) hladiny relativní exprese pro miR-155 (grafy nahoře) a pro miR-203 (grafy dole). Na ose Y je označena úroveň pravděpodobnosti (od 0 do 1,0). Každý graf je označen určitou expresní hodnotou pro miR-203 (0,1 vs. 1,0) a miR-155 (0,5 vs. 1,5).

V horním panelu grafů zvýšení miR-155 na ose X zvyšuje pravděpodobnost, že vzorek patří do kategorie CTCL, pozorované na dvou úrovních pro miR-203 (0,1 vs. 1,0). Spodní panel: odpovídajícím způsobem při zvýšení expresních hladin pro miR-203 na ose X, se snižuje pravděpodobnost příslušnosti k diagnóze CTCL, pozorované na dvou úrovních hladin pro miR-155 (0,5 vs. 1,5).

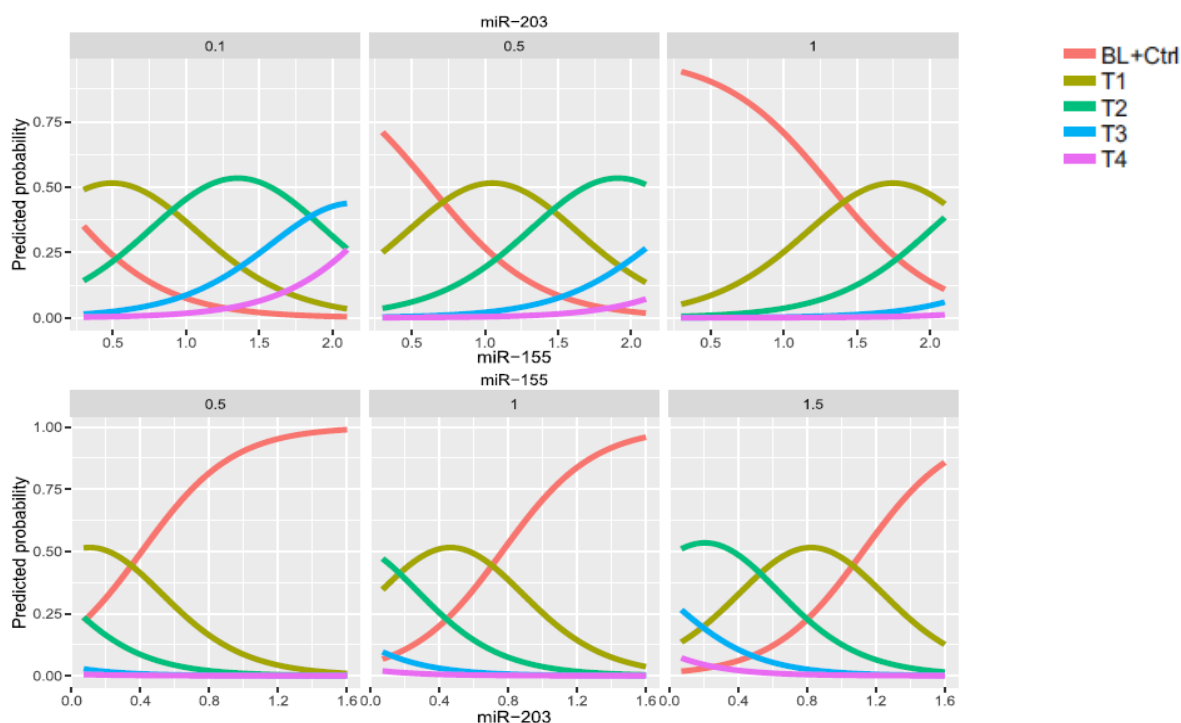
Obrázek 13. Předpoklad pravděpodobnosti určitého klinického stadia CTCL na základě exprese miR-155 a miR-203



Na obrázku 13 je graficky znázorněná předpokládaná pravděpodobnost, že pacient je zdravý a/nebo náleží ke skupině s benigním onemocněním; nebo náleží k jednomu z klinických stadií maligního onemocnění (IA – IIIA dle klinické klasifikace, viz tabl. 5). Na základě logistického regresního modelu jsou ukázány změny hladin 2 miRNA: miR-155 a miR-203 s ohledem na p -hodnoty. Na ose X jsou znázorněny zvyšující se logaritmované (\log_2) hladiny relativní exprese pro miR-203 (grafy nahoře) a pro miR-155 (grafy dole). Na ose Y je označena úroveň pravděpodobnosti (od 0 do 1,0).

V horním panelu grafů pro různé hladiny miR-155 (0.5 vs. 1.0 vs. 1.5) při zvýšení miR-203 na ose X, se zvyšuje pravděpodobnost, že vzorek patří do kategorie BL+Ctrl. Spodní panel: odpovídajícím způsobem při zvýšení hladin pro miR-155 na ose X se snižuje pravděpodobnost příslušnosti ke kohortě zdravých kontrol a benigních lézi.

Obrázek 14. Předpoklad pravděpodobnosti rozsahu tumoru na základě úrovně exprese miR-155 a miR-203



Předpokládaná pravděpodobnost rozsahu tumoru dle TNMB klasifikace pro CTCL na základě logistického regresního modelu, který ukazuje změny hladin 2 miRNA: miR-155 a miR-203 s ohledem na výsledné *p*-hodnoty. Na ose X jsou znázorněny zvyšující se logaritmované (\log_2) hladiny relativní exprese pro miR-155 (grafy nahoře) a pro miR-203 (grafy dole). Na ose Y je označena úroveň pravděpodobnosti (od 0 do 1,0).

V horním panelu grafů zvýšení miR-155 na ose X při různých hladinách miR-203 (0.1 vs. 0.5 vs. 1.0), snižuje se pravděpodobnost, že vzorek bude patřit ke kohortě zdravých kontrol nebo benigních kožních lézí, a tedy se zvyšuje pravděpodobnost, že vzorek bude patřit k horší kategorii rozsahu tumoru. Spodní panel: odpovídajícím způsobem při zvýšení hladin pro miR-203 na ose X zvyšuje pravděpodobnost příslušnosti ke kohortě zdravých kontrol a benigních lézí.

Regresní analýza ukázala vedoucí role miR-155 a její patofyziologický význam jako onkogenního činitele. Zvýšená exprese miR-155 v sadě patientských vzorků vždy asociovala s maligní diagnózou, horším klinickým stadiem, horší prognózou v odpovědi na léčbu a větší nádorovou zátěží. Je zajímavé, že se také potvrdila role jak miR-203, tak miR-205 jako tumorsupresorových miRNA. miRNA-203 je tkáň-specifická a snížení exprese této miRNA je známkou zhoršujícího klinického stavu pacientů s kožním onemocněním. Patofyziologický

mechanismus miRNA-205 je spojen s procesem kontroly EMT, kde snížení exprese miRNA-205 ukazuje na aktivaci procesu invazivity a tím i progresi CTCL. Proto v regresní analýze hladiny exprese miRNA-205 byly signifikantní jen v případě hodnocení progresi a odpovědi na léčbu.

5.3. Expresse onkogenních mikroRNA v plasmě každého pacienta v průběhu sledování

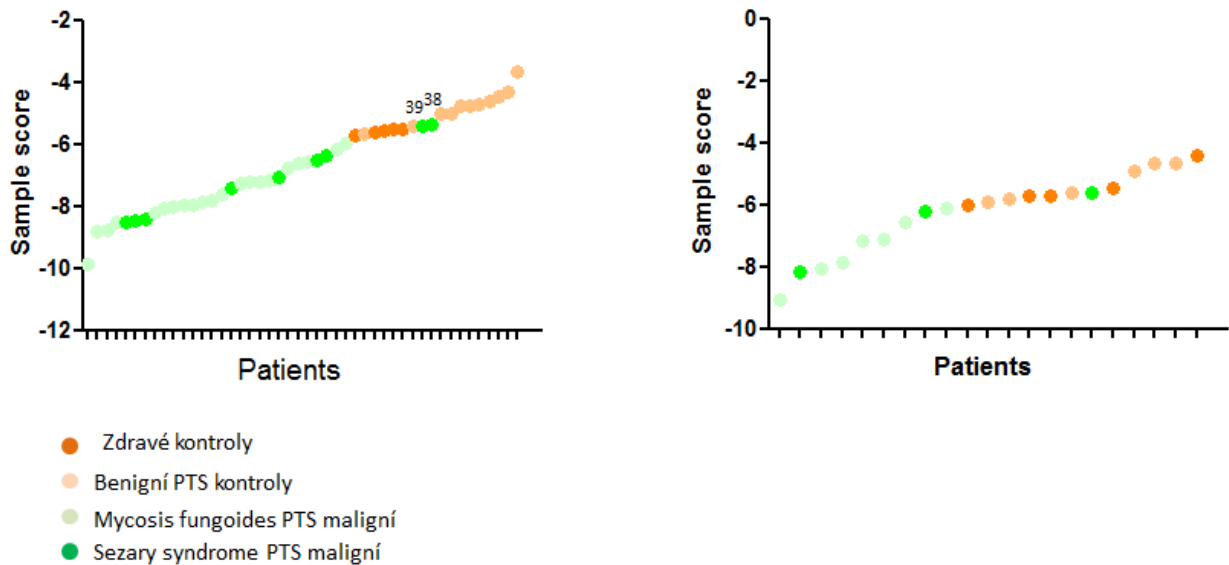
Z předchozích analýz vyplynulo, že významnou roli v diagnostice a prognostice onemocnění CTCL z vybraných miRNA hrají jen miRNA-155, miRNA-203 a miRNA-205. Proto jsme využili vzorec na výpočet „Sample skóre“ od autorů Ralfkiaer a kol., kteří se ve svém článku z roku 2011 zabývali stejnou otázkou, ale na vzorcích tkáně od pacientů MF a SS získaných průbojníkovou biopsií, který s 95% specifitou odlišil benigní od maligních onemocnění (Ralfkiaer, Hagedorn et al. 2011)

$$S = Cp_{mir155} - Cp \frac{mir203}{2} - Cp \frac{mir205}{2}$$

Vzorec porovnává korelaci mezi expresí onkomiRu-155 a supresorových miR-203 a miR-205. „Sample skóre“ (hodnota S ve vzorci) vypočítaný pro každý vzorek plasmu z naší sady pacientů CTCL (N=30), od BKL a kontrol (N=17) ukázal, že distribuce hodnoty S rozdělila vzorky na dvě skupiny (Obr. 15), kde jedna skupina obsahovala vzorky pacientů MF/SS a druhá skupina - vzorky pacientů s benigním kožním onemocněním a se zdravými kontrolními vzorky. Oddělovací hranice na základě sample skóre byla rovna -6 („cut-off“). „Sample skóre“ pro medián hodnot exprese mikroRNA ze všech tří vzorků od každého pacienta ukázal stejný trend rozdělení pacientů s maligním a benigním onemocněním.

Vzhledem k tomu, že u nemocných MF/SS exprese miR-203 a miR-205 je signifikantně snížena (Obr. 8) a exprese miR-155 je u těchto nemocných zvýšena, „Sample skóre“ (které se počítá z výsledných Cp hodnot qPCR reakce) u pacientů s maligním onemocněním bylo více negativní v porovnání se „Sample skóre“ benigních kožních onemocnění. V kohortě 46 vzorků od pacientů MF/SS a kontrolní skupiny, byl zjištěn nástroj na bázi expresních hodnot qRT-PCR miRNA analýzy (miR-155, miR-203 a miR-205), který odlišuje benigní kožní léze od maligního onemocnění CTCL. Důležité je, že skoro všichni pacienti MF byli klasifikováni jako maligní nezávisle na stupni onemocnění. Pouze jeden pacient s diagnózou SS3, jak už i bylo dříve ukázáno, se v případě dvou ze třech vzorků (vzorky 38 a 39) a také v případě mediánu hodnot dostal nad referenční hranici („cut-off“) do kontrolní skupiny. (Obr. 15)

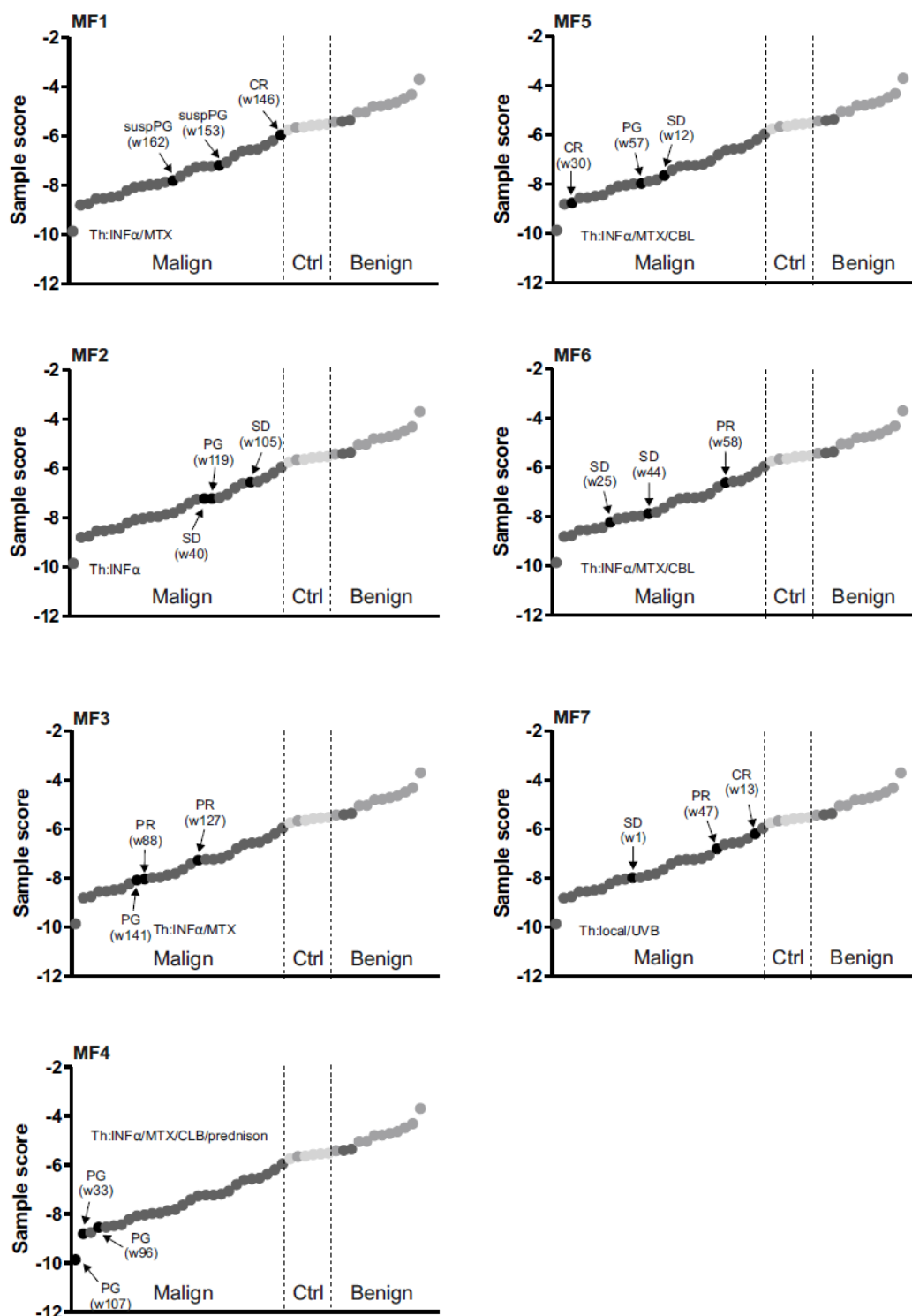
Obrázek 15. „Sample skóre“ plazmatických vzorků od pacientů s benigním a maligním kožním onemocněním



Grafické zobrazení hodnoty S zvláště pro každý vzorek od pacientů CTCL, BKL a kontrol (vlevo) a medián hodnot expresí mikroRNA ze všech tři vzorků od každého pacienta (vpravo). Označení vzorků: oranžový kruh - zdravá kontrola, růžový kruh - BKL, světlé zelený kruh – MF, tmavě zelený kruh – SS.

Abychom mohli dále studovat roli hladin miRNA významných pro CTCL tj. miR-155, miR-203 a miR-205, zjišťovali jsme, jak odráží změny expresních hladin klinický kontext CTCL. Jak již naznačily analýzy PCA, některé vzorky mají tendenci zůstat blíže BKL a uvedli jsme, že tyto vzorky byly získané od pacientů, reagujících na léčbu s dosažením kompletní remise. Proto jsme dále analyzovali 3 miRNA skóre pacientů s MF ve třech po sobě jdoucích vzorcích s ohledem na klinický stav pacienta v době odběru vzorku (Obrázek 16). Pacienti, kteří dosáhli buď CR, nebo PR, výrazně zvýšili hodnotu 3 miRNA-skóre na úroveň nalezenou u kontrol a BKL. Mezi příklady dobré klinické odpovědi patří pacienti MF1, MF6 a MF7. Naopak, při progresi onemocnění (PG) se u čtyř MF pacientů (MF1, MF2, MF3, MF4) úroveň 3 miR-skóre výrazně snížila.

Obrázek 16. „Sample skóre“ vzorků pacientů s MF

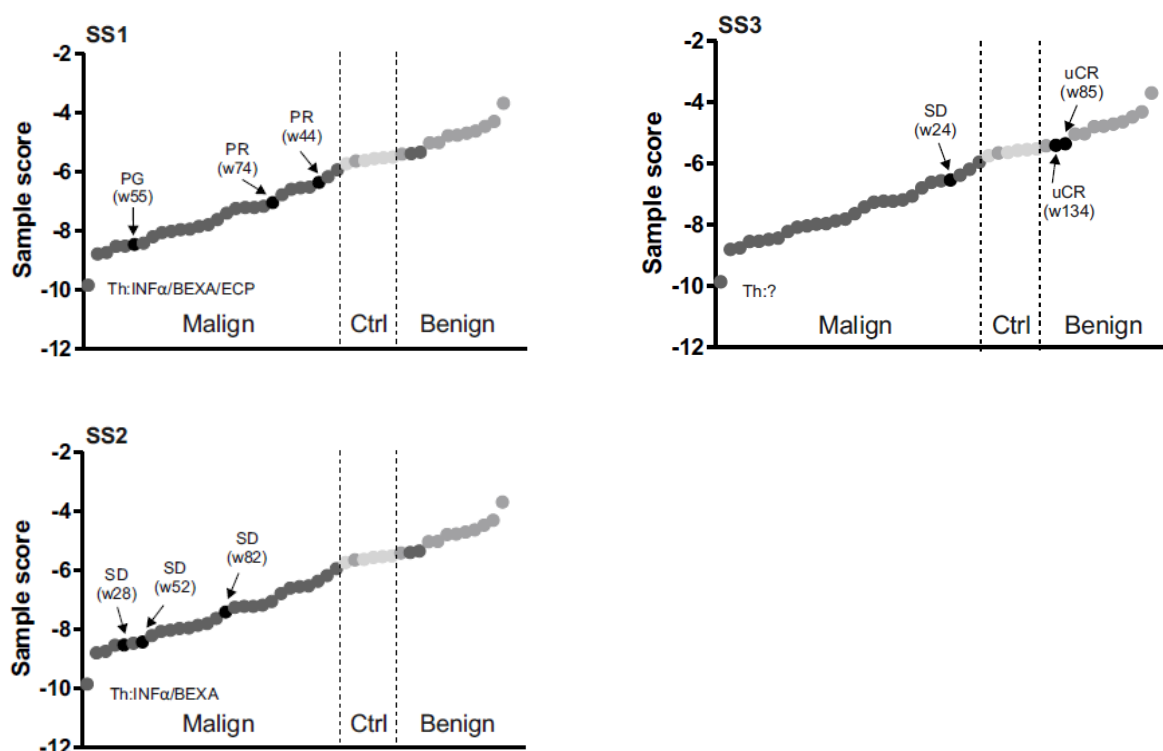


Plazmové skóre 3 miR u pacientů s MF. Uvedena klinická data pro pacienty MF1 - MF7, včetně terapie (Th) a odpovědi (viz také Tabl. 7). Pro každý vzorek je počítán čas od diagnózy do odběru vzorku v týdnech (w, week). Označení vzorků: prázdný kruh - zdravá kontrola, šedý kruh - BKL, tmavý kruh – CTCL, černý kruh – vzorek daného pacienta. Přerušované čáry

oddělují diagnostické podskupiny. Šipky označují po sobě jdoucí vzorky pacienta, jehož ID je umístěno nahoře.

Výsledky „Sample skóre“ pacientů s SS znovu analyzovaných ve třech po sobě jdoucích vzorcích ukázaly, že dva SS pacienti (SS1, SS3) zvýšili hodnotu 3 miR-skóre při dosažení PR / uCR (nejistá CR, uncertain), zatímco při progresi, která byla pozorovaná u pacienta SS1 v 55. týdnu, byl zjištěn výrazný pokles 3-miR- skóre.

Obrázek 17. „Sample skóre“ každého vzorků pacientů s SS



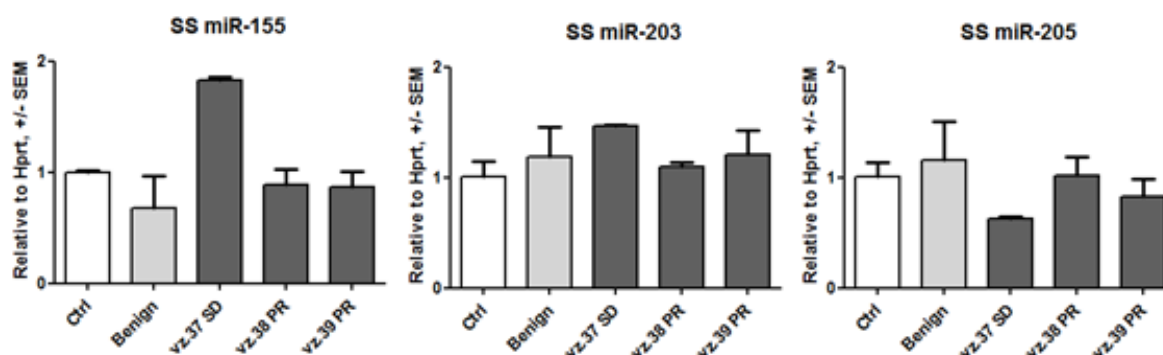
Plazmové skóre 3 miR u pacientů s SS. Uvedena klinická data (SS1-3), včetně terapie (Th) a odpovědi na léčbu CR, PR, SD, PD (viz Tabulka 7). Pro každý vzorek je počítán čas od diagnózy do odběru vzorku v týdnech (w, week). Označení vzorků: prázdný - zdravá kontrola, šedý kruh - BKL, tmavý kruh – CTCL, černý kruh – vzorek daného pacienta. Přerušované čáry oddělují diagnostické podskupiny. Šipky označují po sobě jdoucí vzorky pacienta, jehož ID je umístěno nahoře.

V případě vzorku číslo 38 a 39, které jsou od pacienta SS3 (muž 60 let, celkové přežití 40 měsíců), je vidět, že expresní hladiny všech hodnocených mikroRNA jsou na úrovni hladin

zdravých kontrol nebo benigních kožních lézí. Proto se tyto vzorky po výpočtu hodnoty S ocitly nad referenční hranicí v kontrolní skupině (Obr. 18).

V daném případě vzorky pocházely z období (85. a 134. týdne kombinované terapie Interferon- α a Extrakorporální fotoferézy ECP), kdy pacient byl ve stadiu IB- IIA, parciální až kompletní remise (PR/CR) bez známek erythrodermie a šupinatění. V tomto stadiu se pacient nacházel dalších 5 měsíců. Celkem období remise onemocnění (PFS) trvalo 14 měsíců. (Obr. 18).

Obrázek 18. Expresse miR-155, miR-203, miR-205 v plazmě jednoho pacienta SS3 s Sézary syndromem průběhu léčby



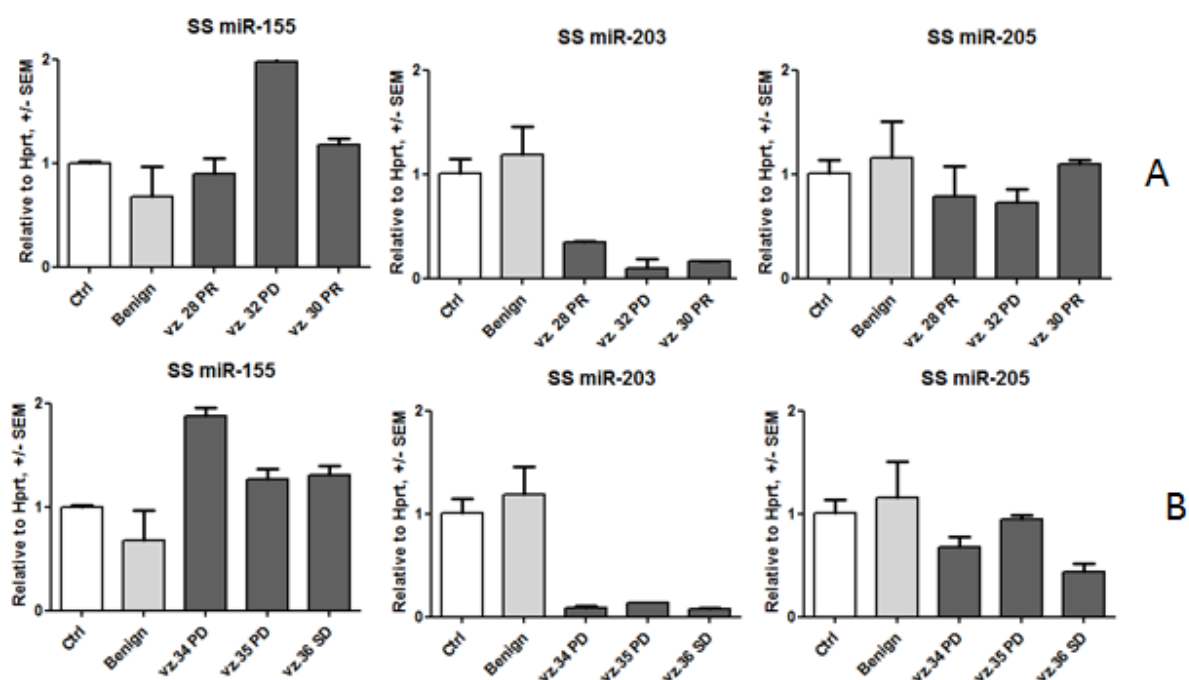
Na obrázku 18 pomoci sloupcového grafu znázorněny průměrné expresní hladiny jednotlivých miRNA. Na ose X jsou označeny kontrolní a benigní vzorky (světlé sloupce), a jednotlivé odběry pacienta s uvedením čísla vzorků (vz, vzorek) a stupně odpovědi na terapii (SD, PR). Na ose Y jsou uvedeny hladiny relativní exprese se standardní chybou střední hodnoty pro každý z hodnocených miRů.

Na rozdíl od toho předchozí vzorek číslo 37 pochází z období 24. týdne stejné kombinace terapii, kdy pacient byl ještě ve stadiu IIIB, bez odpovědi na léčbu (SD) s klinickými symptomy jako intenzivní pruritus až bolest kůže dolních končetin, pocit chladu, zimnice a šupinatění. Výrazně zvýšená exprese hladiny miR-155 tohoto vzorku spolu s inverzní hladinou miR-205 podporuje zhoršený klinický stav pacienta. Je zde disonance s expresní hladinou tkáň-specifické miR-203, která je vyšší než průměr hladin kontrolní skupiny, což je spíše více charakteristické pro benigní kožní onemocnění.

Další pacient (Obrázek 19 A) s diagnózou SS2 (žena 72 let), kde klinický vývoj onemocnění plně odpovídá změnám expresních hladin mikroRNA. První vzorek (vz.28) byl odebrán v 44. týdnu kombinace terapií (Interferon- α a Bexaroten), v klinickém stadiu IIIA, s odpovědí na léčbu – parciální remise (PR) s klinickými symptomy, jako jsou trvalé svědění, ložisková

erythrodermie, regresní změny na kůži. Tomuto stavu odpovídá snížená exprese miR-155 do limitu normálních hodnot (což předpokládáme, poukazuje na aktuální sníženou aktivitu maligního procesu). Druhý vzorek (vz.32) byl odebrán v 55. týdnu, kdy došlo k progresi onemocnění (PD) a následně ke změně terapie (kombinace Bexaroten a ECP), kde je vidět nejvíce zvýšenou hladinu miR-155 a inverzně snížené hladiny obou tumorsupresorových miR-203 a miR-205. Další stadium vývoje onemocnění (vz. 30) – parciální remise jako odpověď na další změnu terapie (Interferon- α + Bexakaroten + ECP) s klinickým zlepšením lokálního nálezu s pouze ložiskovými změnami na kůži. To podporuje nález hladin miR-155 – návrat k limitním hladinám zdravých kontrol a patrné zvýšení exprese miR-203 a miR-205.

Obrázek 19. Expresní hladiny miR-155, miR-203, miR-205 v plazmě pacientů SS v průběhu léčby



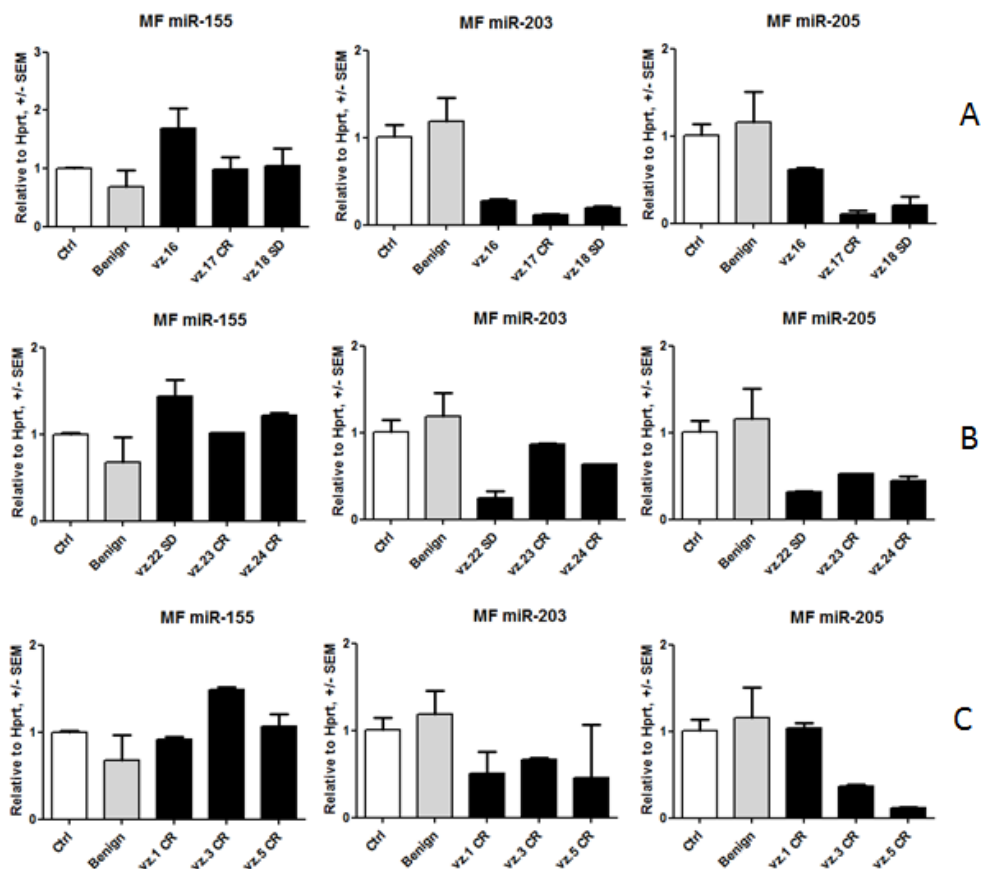
Sloupcový graf průměrných expresních hladin jednotlivých miRNA. Na ose X jsou označeny kontrolní a benigní vzorky (světlé sloupce), a jednotlivé odběry pacienta s uvedením čísla vzorků (vz, vzorek) a stupně odpovědi na terapii (PD, SD, PR). Na ose Y jsou uvedeny hladiny relativní exprese se standardní chybou střední hodnoty pro každý z hodnocených miRů.

Pacientka (Obrázek 19 B) s diagnózou SS (žena 71 let), s klinickým průběhem od progresse onemocnění (vz.34, 28. týden léčby - PD), přes mírné zlepšení stav pacientky zůstává v klinickém hodnocení progresse (vz.35, 52. týden léčby - PD), ke stabilizaci onemocnění bez dalších změn (vz.36, 82. týden léčby - SD). Klinický průběh odpovídá dynamice změn hladin

miRů. Zde je vidět mírná diskrepance s klinickým posouzením stavu pacienta ve druhém vzorku, kde hladiny všech miRů jsou stejné jako v případě následujícího vzorku ve stavu SD. Zde je možno předpokládat, že hladiny miRů jsou citlivější k vývoji onemocnění a odpovědi na léčbu a předchází viditelným klinickým změnám. V případě onemocnění Sézary syndrom je možné říci, že dynamika onemocnění je shodná se změnami hladin expresí mikroRNA (tj. zvýšení hladiny miR-155 a inverzní snížení miR-203 a miR-205 při zhoršení klinického stavu pacienta).

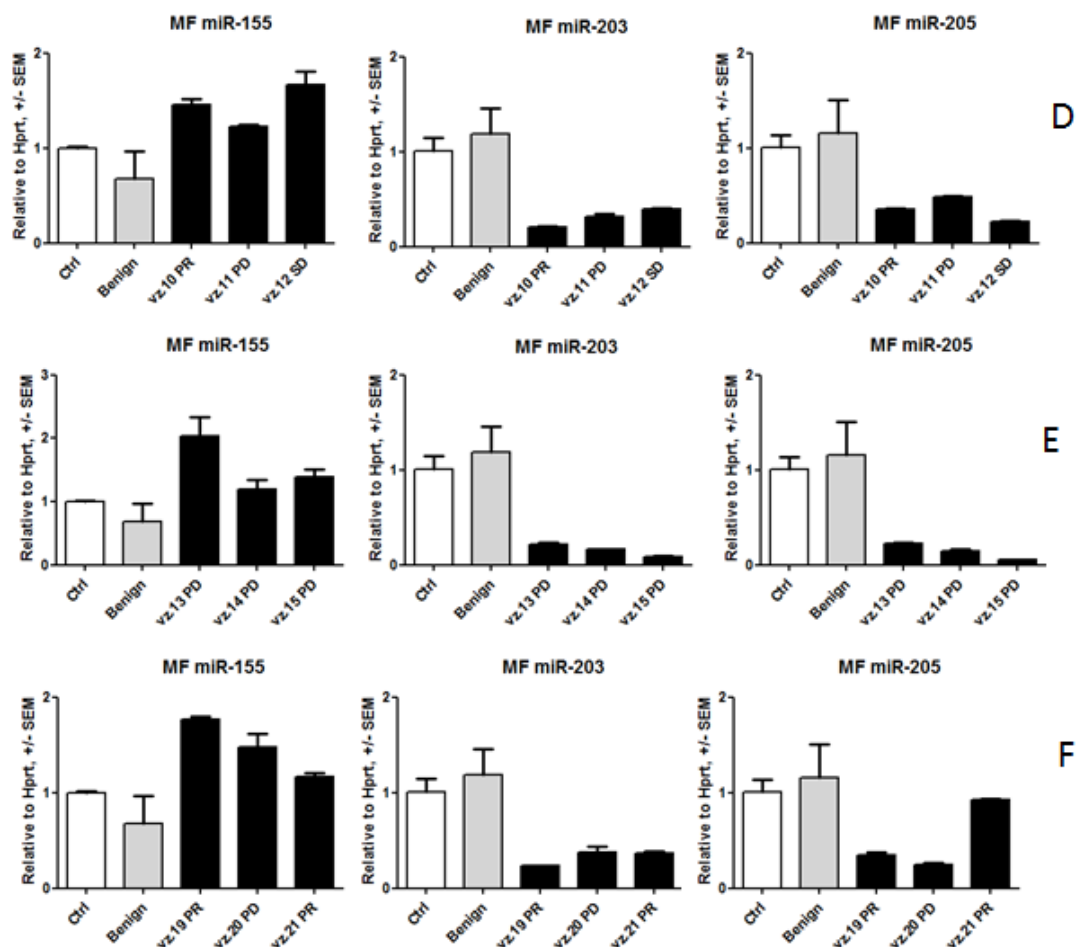
Stejný trend bylo možné pozorovat v případě pacientů s mycosis fungoides. Data od těchto pacientů jsou rozdělena na dvě skupiny podle klinického rizika na nízké a vyšší riziko CTCL.

Obrázek 20. Expresní hladiny miR-155, miR-203, miR-205 v plazmě pacientů MF s nízkým rizikem



Sloupcový graf průměrných expresních hladin jednotlivých miRNA. Na ose X jsou označeny kontrolní a benigní vzorky (světlé sloupce), a jednotlivé odběry pacienta s uvedením čísla vzorků (vz, vzorek) a stupně odpovědi na terapii (CR, SD, PR). Na ose Y jsou uvedeny hladiny relativní exprese se standardní chybou střední hodnoty pro každý z hodnocených miRů.

Obrázek 21. Expresní hladiny miR-155, miR-203, miR-205 v plazmě pacientů MF s vysokým rizikem v průběhu léčby



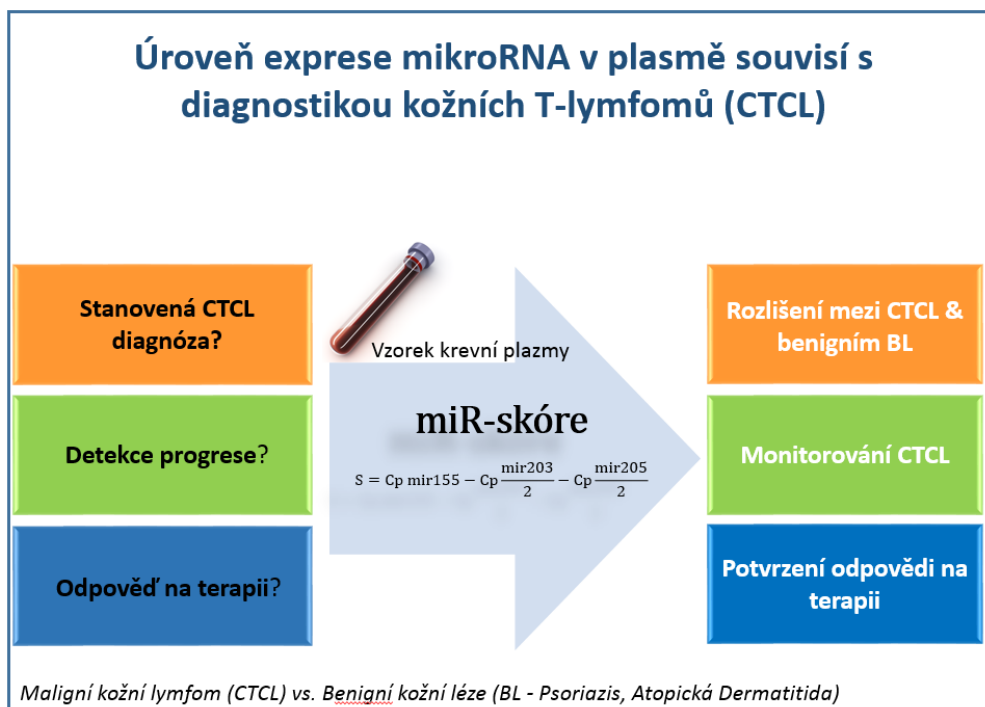
Sloupcový graf průměrných expresních hladin jednotlivých miRNA. Na ose X jsou označeny kontrolní a benigní vzorky (světlé sloupce), a jednotlivé odběry pacienta s uvedením čísla vzorků (vz, vzorek) a stupně odpovědi na terapii (PD, SD, PR). Na ose Y jsou uvedeny hladiny relativní exprese se standardní chybou střední hodnoty pro každý z hodnocených miRů.

Při porovnání expresních hladin miRů u pacientů s vysokým a nízkým rizikem, je zde patrná vyšší hladina miR-155 u vyššího rizika. To podporuje výsledky předchozích výzkumů (Chim, Wong et al. 2011), (Vargova, Curik et al. 2011), že miR-155 může být markerem progresu maligních onemocnění nejen v případě CTCL.

Stanovení plazmatických hladin onkogenních mikroRNA miR-155 a dvou supresorových miR-203 a miR-205 představuje velmi užitečný nástroj, jak pro diagnostické rozlišení od benigních kožních lézí, tak pro monitorování pacientů s CTCL s využitím vzorků plazmy periferní krve.

Cílem této studie bylo pomocí expresního profilu vybraných miRNA najít nástroj pro přesnější potvrzení diagnózy pacientů s mycosis fungoides a Sézarého syndromem. Dle výše uvedených analýz se potvrdil signifikantní význam souborů miRNA-155, miRNA-203 a miRNA-205 nejen pro diagnostiku CTCL a přesné odlišení od benigních kožních lézí, ale zde uvádíme i model predikcí pro odpověď na léčbu pacientů CTCL, rozsah tumorů a náležitost ke klinickému stádiu. Toto 3 miR-skóre vzorků plazmy pacientů CTCL je využitelné při hodnocení klinických odpovědí na CTCL a může být použito při zavádění nových terapií k vyhodnocení jejich účinnosti a hodnocení zbývajících nádorové zátěže. Význam miRNA-223 a miRNA-22 se ve výzkumu nepotvrdil.

Obrázek 22. Grafický abstrakt. Role miR-skóre v diagnostice a prognostice CTCL



6. Vedlejší výsledky

I přes to, že miR-155 je jeden z dobře prostudovaných onkogenů, jeho role zůstává poněkud hypotetická. Tato miRNA je kódována genem *BIC* a její nadměrná exprese v hematopoetických buňkách vede k tvorbě agresivních lymfoproliferativních poruch (Costinean, Zanesi et al. 2006).

Vysoké hladiny miR-155 (desetinásobek hladiny oproti kontrolním buňkám) byly hlášeny v klinických vzorcích Hodgkinova lymfomu (HL), difuzního velkého B-buněčného lymfomu (DLBCL), folikulárního lymfomu (FL) a B-buněčných chronických lymfocytárních leukémií (Eis, Tam et al. 2005). Onkogenní účinky miR-155 jsou zprostředkovány prostřednictvím jeho cílových mRNA, mezi které patří nádorové supresory, jako jsou fosfatázy PTEN a SHIP-1, které regulují aktivitu onkogenní dráhy PI3K / PKB (Bolland, Pearse et al. 1998). Dalším klíčovým cílem miR-155 je PU.1, transkripční faktor rodiny ETS (Erythroblast Transformation Specific /E26 transkripční faktor), který je zásadní pro buněčnou diferenciaci (Dahl and Simon 2003). V B-buňkách je důležitá rovnováha mezi expresí miR-155 a PU.1, zvláště pro dokončení buněčné diferenciace (Lu, Nakagawa et al. 2014). Nadměrná i nedostatečná exprese PU.1 narušuje diferenciaci a zrání B-buněk: nízké hladiny PU.1 zabraňují tvorbě a proliferaci, zatímco vysoké hladiny PU.1 vedou k bloku diferenciace směrem k buňkám plazmatickým (Polli, Dakic et al. 2005). miR-155 je schopen downregulovat expresi PU.1 v primárních maligních krevních buňkách na úrovni RNA i proteinů (Vigorito, Perks et al. 2007).

Několik studií se zabývalo úlohou exprese PU.1 v různých lymfoproliferativních onemocněních. Exprese PU.1 je umlčena v HL nádorových buňkách, zatímco při upregulaci PU.1 bylo pozorováno, že podporuje zastavení růstu a apoptózu (Yuki, Ueno et al. 2013). Vyšší hladiny PU.1 jsou také spojeny s delším celkovým přežitím a dobou přežití bez progresu u pacientů s FL (Torlakovic, Bilalovic et al. 2006). Podobně se uvádí, že v DLBCL se koncentrace PU.1 proteinu liší mezi různými DLBCL podtypy, tj. nižší koncentrace byla detekována v agresivnějším podtypu ABC (Deeb, D'Souza et al. 2012). Výše popsání zjištění naznačují, že exprese miR-155 a jeho cílový produkt PU.1 potenciálně souvisí s biologii LPD a že jejich hladiny pravděpodobně souvisejí s projevy lymfoproliferaci.

6.1. Studie genové exprese: Onkogenní mikroRNA-155 a PU.1 v nejčastějších lymfoidních malignitách (Huskova, Korecka et al. 2015)

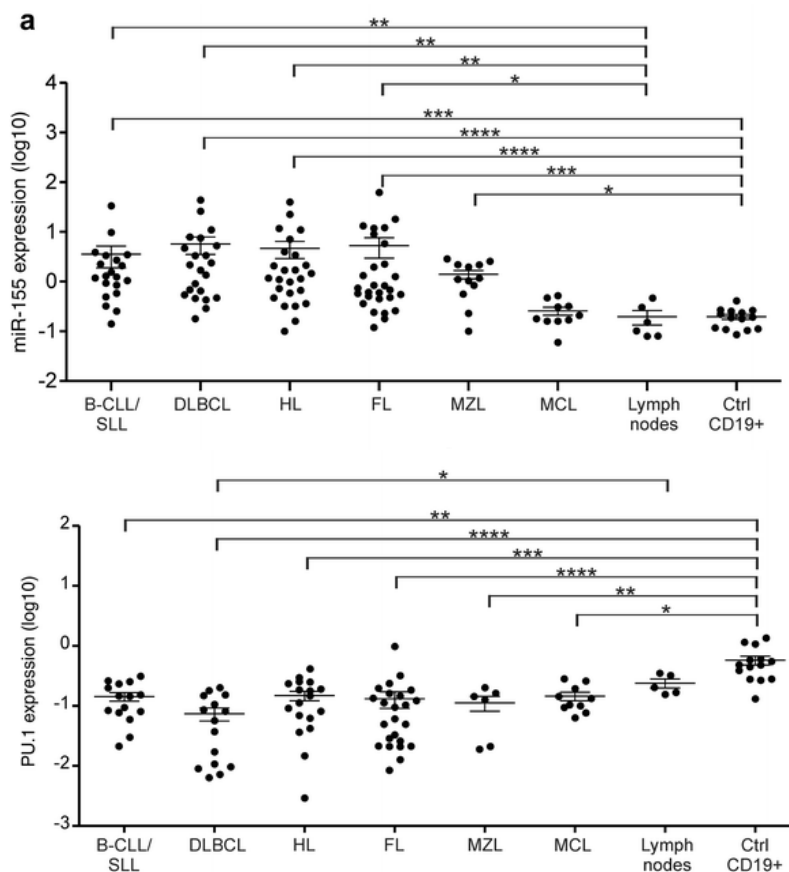
Abychom odpověděli na otázku, zda a jak exprese miR-155 a transkripčního faktoru PU.1 zasahuje do patofyziologie lymfoproliferace jsme vypracovali návrh výzkumu, cílem kterého bylo potvrdit vliv miR-155 na její cílový produkt PU.1 a poukázat na rozdíly v biologii různých typů lymfomů. Proto ve studii, která probíhala v roce 2013-2015 v laboratoři prof. T. Stopky (Huskova, Korecka et al. 2015), jsme použili kvantitativní specificky aktivovanou reverzní transkripční PCR ke zkoumání exprese miR-155 a PU.1 v nodálních a také extranodálních vzorcích šesti nejčastějších lymfoproliferativních onemocnění: DLBCL, B-CLL / SLL, HL, FL, MZL a MCL a testovali jsme asociaci mezi hladinami miR-155 a PU.1 a klinickými rysy souvisejícími s přežíváním a prognózou jednotlivých typů onemocnění.

Ve studii byla měřena exprese miR-155 a PU.1 v lymfatických uzlinách a v některých extranodálních tkáních infiltrovaných maligním lymfomem (lyzáty získané biopsií lymfatických uzlin od 131 pacientů), v tkáni normálních lymfatických uzlin (byly použity lyzáty biopsií nenádorově zvětšených/reaktivních lymfatických uzlin od 6 dárců), a v mononukleárních buňkách CD19⁺ periferní krve zdravých dárců (N = 22). Exprese PU.1 se porovnávaly s hodnotami referenčního genu *GAPDH*; miR-155 s referenčním genem *RNU44*. Hodnoty exprese byly vypočítány algoritmem $\Delta\Delta CT$.

Výsledná data byla zpracována pro podtypy onemocnění, typ diagnózy (nově diagnostikovaná, relaps, progres, transformace), lokalizace tumoru (nodální nebo extranodální), odpověď na terapii (remise, částečná remise nebo relaps) a doba přežívání pacientů. U pacientů s B-CLL / SLL byla zahrnuta řada prognostických kritérií jako exprese ZAP-70 a CD38, stav mutace IgVH a cytogenetika (delece 13q14, 17p a 11q, a trizomie chromozomu 12).

Údaje souhrnně ukázaly, že úroveň exprese miR-155 v tkáni infiltrované lymfomy je významně vyšší než v normálních B-buňkách a v nenádorových reaktivních lymfatických uzlinách, zatímco exprese PU.1 byla značně downregulována. Předpokládá se, že tato rozdílná exprese může poukazovat na rozdíly v biologii studovaných typů lymfoproliferací.

Obrázek 23 (a). Expresse miR-155 a PU.1 v lymfomech.



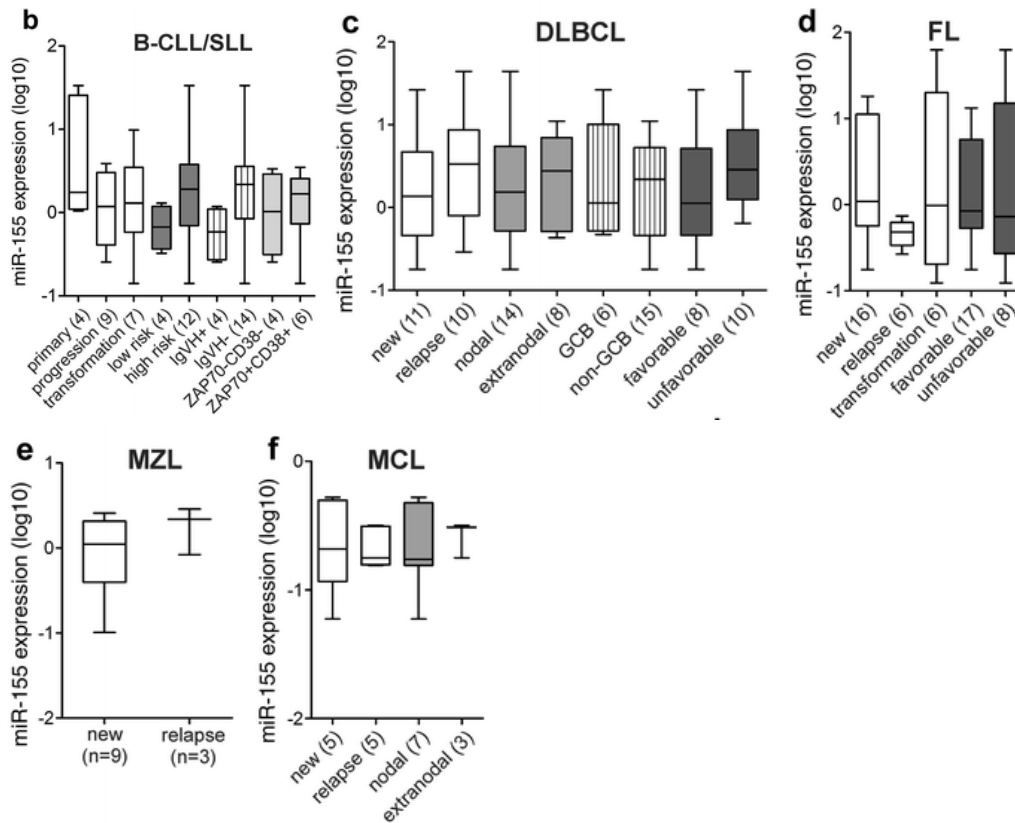
Obrázek 23 (a) Expresse miR-155 (graf nahoře) a PU.1 (graf dole) v lymfoproliferativních onemocněních ve srovnání s CD19+ B-buňkami periferní krve zdravých dárců a reaktivních lymfatických uzlin. Jsou zobrazeny výsledky statistických testů (Tukeyho HSD-test a Studentův t-test). Hladiny významnosti: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. (Huskova, Korecka et al. 2015).

Následně jsme se zaměřili na možné variace expresí pro miR-155 a PU.1 u rozličných typů vzorků zvláště. Konkrétně jsme zkoumali rozdíly expresi ve vztahu k podtypům lymfomů, tj. rozdělení vzorků dle typu onemocnění (primární nádor, progrese, relaps nebo transformace), lokalizace nádoru (nodální nebo extranodální) a odpovědi na terapii (obr. 23b – f).

Pro B-CLL / SLL byla použita řada molekulárně prognostických markerů: exprese ZAP-70, CD38 a IgVH; del(3q14), del(17p) a del(11q) a tri12. Pacienti, kteří byli ZAP70+CD38+ (vysoké riziko), byli srovnáváni s pacienty, kteří byli ZAP70-CD38- (nízké riziko). Pacienti, kteří byli pozitivní v případě del(17p) nebo del(11q) (vysoké riziko), byli srovnáváni s pacienty bez této detekovatelné chromozomální aberace (nízké riziko), pacienti s nemutovaným IgVH

(vysoké riziko) byli srovnáváni s pacienty s mutovaným IgVH (nízké riziko). (Obr. 23b-f). Ve většině studovaných parametrů jsme nenašli žádné signifikantní rozdíly expresi miR-155. Je pozoruhodné, že dříve publikované významné rozdíly v expresi miR-155 mezi agresivnějšími non-GC a méně agresivními podtypy GCB-DLBCL (Lawrie, Soneji et al. 2007) (Deeb, D'Souza et al. 2012) nebyly v našem datovém souboru opakovány (Obr. 23c).

Obrázek 23 (b-f). Exprese miR-155 v non-Hodgkinských lymfomech



Obrázek 23 (b) Exprese miR-155 ve vzorcích B-CLL/SLL, rozdělení dle typu diagnózy (primární, progrese, transformace), cytogenetické riziko (nízké, vysoké), exprese IgVH (+/-), kombinovaná exprese ZAP-70 a CD38; (c) DLBCL dle typu diagnózy (nová, relaps), lokalizace tumoru (nodální, extranodální), subtyp tumoru (GCB, non-GCB), odpověď na terapii (příznivá, nepříznivá); (d) FL dle typu diagnózy (nová, relaps, transformace), odpověď na terapii (příznivá, nepříznivá); (e) MZL dle typu diagnózy (nová, relaps); (f) MCL dle typu diagnózy (nová, relaps), lokalizace tumoru (nodální, extranodální). Sloupce stejné barvy a vzoru v každém grafu představují data rozdělená podle jednoho z parametrů. V závorkách je uveden počet testovaných vzorků.

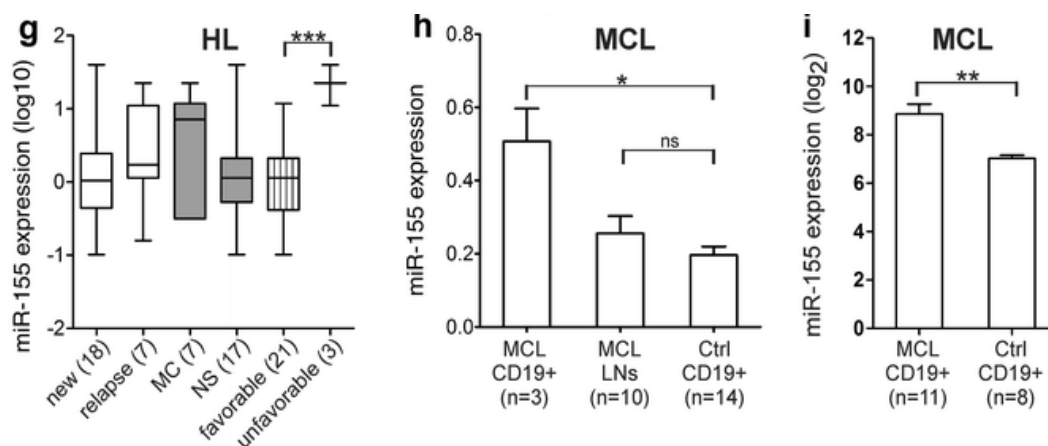
Souhrnně lze konstatovat, že rozdíly hladin expresí miR-155 v nonHodgkinských lymfomech v porovnání s kontrolními vzorky, které byly signifikantní v případě analýzy celého souboru vzorků (Obr. 23a), mohou znamenat jinou kauzalitu aktivaci tohoto onkomiRu, než přítomnost doposud zjištěných molekulárně-biologických rizikových faktorů. Tito zjištěné ne zcela pochopené biologických rozdíly lymfoproliferaci vyžadují další důkladný výzkum.

Dále jsme provedli podobné analýzy exprese miR-155 ve vzorcích HL, stejně jak u nonHodgkinských lymfomů. (Obr. 23g-i). Specificky jsme zkoumali podtyp nádoru (nodulární skleróza vs. smíšená buněčnost), typ onemocnění (primární vs. relaps) a odpověď na terapii (příznivá, nepříznivá). Významný rozdíl byl nalezen v expresi miR-155 ve vzorcích HL rozdělených podle odpovědi na terapii. Pacienti s HL byli přiřazeni k vhodné terapii na základě mnoha kritérií, včetně klinického hodnocení a biopsie. Většina pacientů reagovala na léčbu dobře a dosáhla úplné remise. Některé pacienti, označované jako refrakterní HL, na léčbu nereagovaly nebo došlo k časnému relapsu (do 1 roku po remisi). Konkrétně, ve zkoumaném souboru dat byly tři případy refrakterní HL, které vykazovaly konzistentně a významně vysoké hladiny miR-155 ve srovnání s tumory, které dosáhly dlouhodobé remise ($p = 0,0002$, obr. 23g). Důležité je, že tyto pacienti v době diagnózy nevykazovali žádné známky toho, že jejich nemoc mohla být na léčbu refrakterní. Naše práce proto navrhla stanovení miR-155 pro odhalování prognostiky HL, které by mohlo být použito k identifikaci pacientů, které by s velkou pravděpodobností byly náchylné k horší odpovědi na terapii.

MCL je podtyp lymfomu, který se obvykle nachází v lymfatických uzlinách, navíc uvolňuje nádorové buňky do periferního řečiště a infiltrují další orgány. Hladiny miR-155 v naší sadě nodálních vzorků MCL se nelišily od hladin nalezených v normální tkáni lymfatických uzlin a B-buňkách (obr. 23a). Již dříve však bylo popsáno, že exprese miR-155 je zvýšená v cirkulujících buňkách MCL (Zhao, Lin et al. 2010). Proto jsme shromáždili dalších 14 případů MCL s postižením periferní krve a stanovili jsme expresi primárního transkriptu miR-155 (BIC1) v cirkulujících buňkách CD19+ pomocí mikročipů ($N = 11$) a hladiny zralého miR-155 pomocí RT-qPCR ($N = 3$). Pozorovali jsme významnou upregulaci miR-155 ve srovnání s expresí v buňkách CD19+ od zdravých dárců ($p < 0,05$ a $p < 0,01$) (obr. 22 h, i).

Naše data potvrdila dříve publikované zjištění, že miR-155 je upregulován v MCL nádorových buňkách cirkulujících v periferní krvi. Podobnost hladiny exprese miR-155 v lymfatické uzlině s nenádorovou tkání však naznačuje, že primární pevné tumory MCL mají odlišný biologický význam.

Obrázek 23 (g-i). Expres miR-155 u Hodgkinských lymfomů



Obrázek 23 (g-i) Expres miR-155 ve vzorcích HL a MCL; (g) HL, rozdělení vzorků dle typu diagnózy (nová, relaps), lokalizace tumoru (nodální, extranodální), subtyp tumoru (GCB, non-GCB), odpověď na terapii (příznivá, nepříznivá); (h) MCL rozdělení vzorků dle lokalizace (LNs nodální, CD19+ extranodální), (i) MCL porovnání jen extranodálních vzorku vs. kontrolní. Sloupce stejné barvy a vzoru v každém grafu představují data rozdělená podle jednoho parametru. V závorkách je uveden počet testovaných vzorků.

Dle zjištění několika výzkumů, miR-155 a PU.1 jsou spojeny s klinickým chováním výše identifikovaných LPD (Lawrie, Soneji et al. 2007), (Vargova, Curik et al. 2011), (Torlakovic, Bilalovic et al. 2006). Abychom zjistili, zda existuje souvislost mezi hladinami miR-155 a/nebo PU.1 a celkovým přežitím pacientů LPD, využili jsme Coxovy modely proporcionálních rizik pro každý typ LPD pomocí expresních hladin miR-155 a PU.1. Pouze u Hodgkinova lymfomu tento model odhalil poměr rizika s hraniční významností (0,059). Tento výsledek znamená, že v našem souboru dat mají pacienti HL s vyšší expresí miR-155 kratší přežití. Pokud by data byla validována na větším souboru dat, to by podporovalo začlenění stanovení hladin miR-155 do rutinního zkoumání a do prognostických modelů pro HL.

6.2. Model regulace progresu chronické lymfocytární leukemii pomocí miR-155/miR-150

Následujícím krokem, na základě již dřívějších výsledků s miRNA, byla další studie laboratoře prof. T. Stopky, kde byl zkoumán vzájemný mechanismus působení miRNA-155 a miRNA-

150 v průběhu onemocnění chronické lymfocytární leukemii. Tato práce (Vargova, Pesta et al. 2017) hodnotila mimo jiné i změny klinického stavu pacienta a vliv známých rizikových faktorů ve spojení se změnami exprese vybraných miRNA.

Chronická lymfocytární leukémie (CLL) je pomalu vyvíjecí se klonálně proliferativní onemocnění B-buněk náchylné k progresi. MikroRNA miR-155 a miR-150 jsou inhibitory genové exprese v B-buňkách, které byly již dříve spojené s patogenezí CLL. Agresivita CLL a progresse monoklonální lymfocytózy B-buněk byla připisována účasti miR-155 (Ferrajoli, Shanafelt et al. 2013). Jak již bylo uvedeno výše, nadměrná exprese miR-155 vedla k downregulaci transkripčního faktoru PU.1, a jak dle našich výsledků (Vargova, Curik et al. 2011), tak i jiných výzkumných práci (Cui, 2014, 2014) shodovala se s agresivitou CLL a vývojem klinického stavu pacienta. Již dříve naše skupina navrhla, že transkripční upregulace hostitelského genu pro miR-155 (*MIR155HG*) může být molekulární cestou agresivity CLL a asociuje se se zvýšenou expresí MYB.

Další mikroRNA zapojená do diferenciaci B-buněk je miR-150, který interferuje s BCR pomocí mechanismů zahrnující GAB1 a FOXP1, a také i prostřednictvím MYB (Mraz, Chen et al. 2014). Důležité je, že zatímco některé cíle miR-155 a miR-150 jako například MYB jsou negativní prediktory CLL a způsobují vývoj a progresi maligního onemocnění, tak na druhé straně další cíle těchto miRNA jako jsou SHIP1 a PU.1 mohou být považovány za pozitivní prediktory a svou aktivací mohou potlačit onkogenní proces.

V klinickém hodnocení (Vargova, Pesta et al. 2017) jsme vyhodnotili vzájemný vztah miR-155 a miR-150 s klinickými a rutinními laboratorními parametry kohorty 127 pacientů CLL pomocí multivariantní analýzy a zjistili jeho souvislost s celkovým přežíváním a progresi. Úrovně exprese mikroRNA a jejich cílové mRNA byly stanoveny v CD19+ buňkách periferní krve.

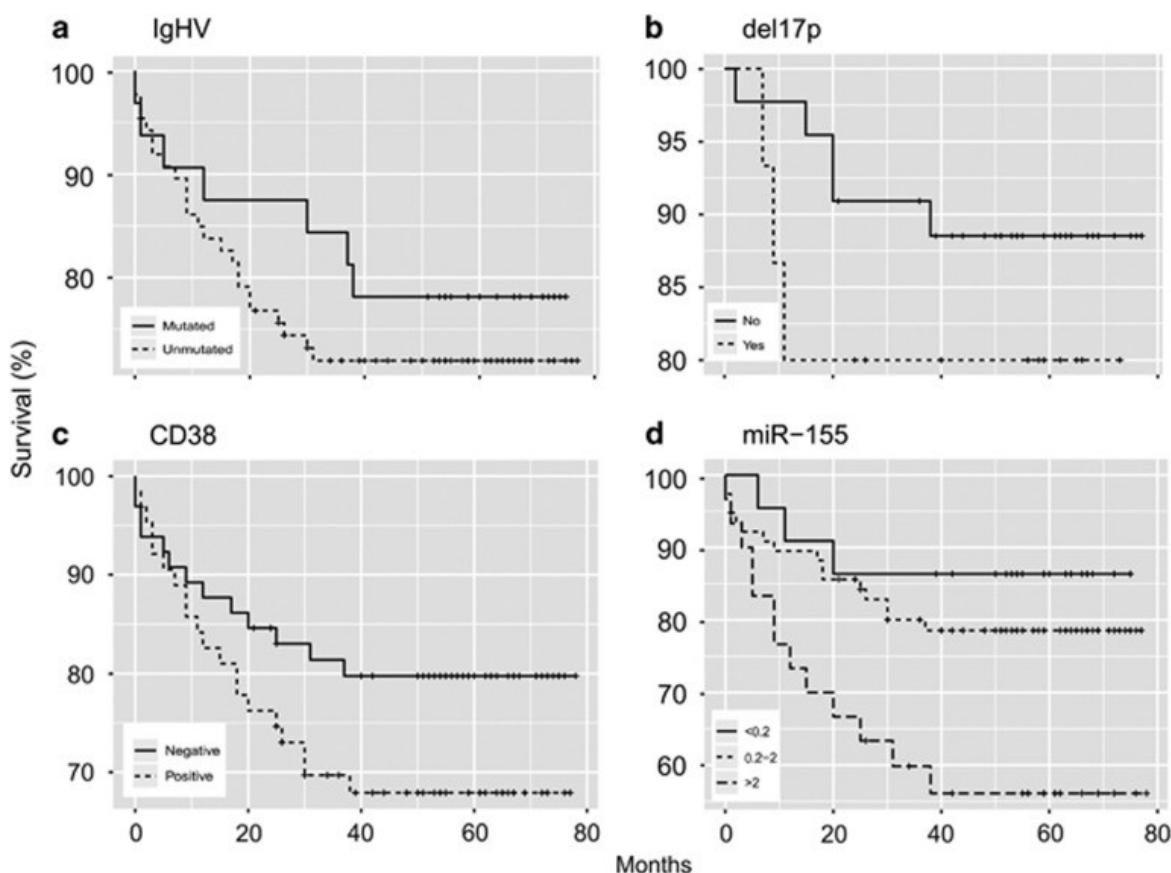
Statisticky byly vyhodnoceny následující parametry: absolutní počet leukocytů periferní krve (WBC) a lymfocytů, % monoklonálních lymfocytů, trombocyty, IgVH, CD38, ZAP-70, Richterova transformace, cytogenetické aberace: del(17)(p13), del(11)(22.3), tri(12), del(13)(q14) a nakonec úrovně studovaných miR-155 / miR-150, a PU.1/ MYB.

Dle Kaplan – Meier grafu celkového přežívání pacientů s CLL se ukázalo, že aberantní stav parametrů: IgVH, exprese CD38 a del17p, byl detekován u pacientů s nižším OS na rozdíl od těch, které tyto patologické změny neměli (Obrázek 24 a-c).

Dále hladiny miR-155 byly rozděleny do tří expresních intervalů a jejich přidružení k OS jsou prezentovány v grafu (Obrázek 24. d). V závislosti na expresní úrovni miR-155 OS dosáhl plató

na 86% pro nízkou hladinu miR-155 (relativní exprese méně než 0,2), na 79% pro střední úroveň exprese (0,2 – 2) a 56% pro úroveň vysokého miR-155 (s relativní expresí nad 2). Tyto výsledky potvrzují již dříve diskutovanou hypotézu, že miR-155 podporuje progresi maligních onemocnění a vyšší hladiny exprese miR-155 se asociují s nižším OS.

Obrázek 24. Graf celkového přežívání pacientů CLL ve vztahu k rizikovým faktorům.

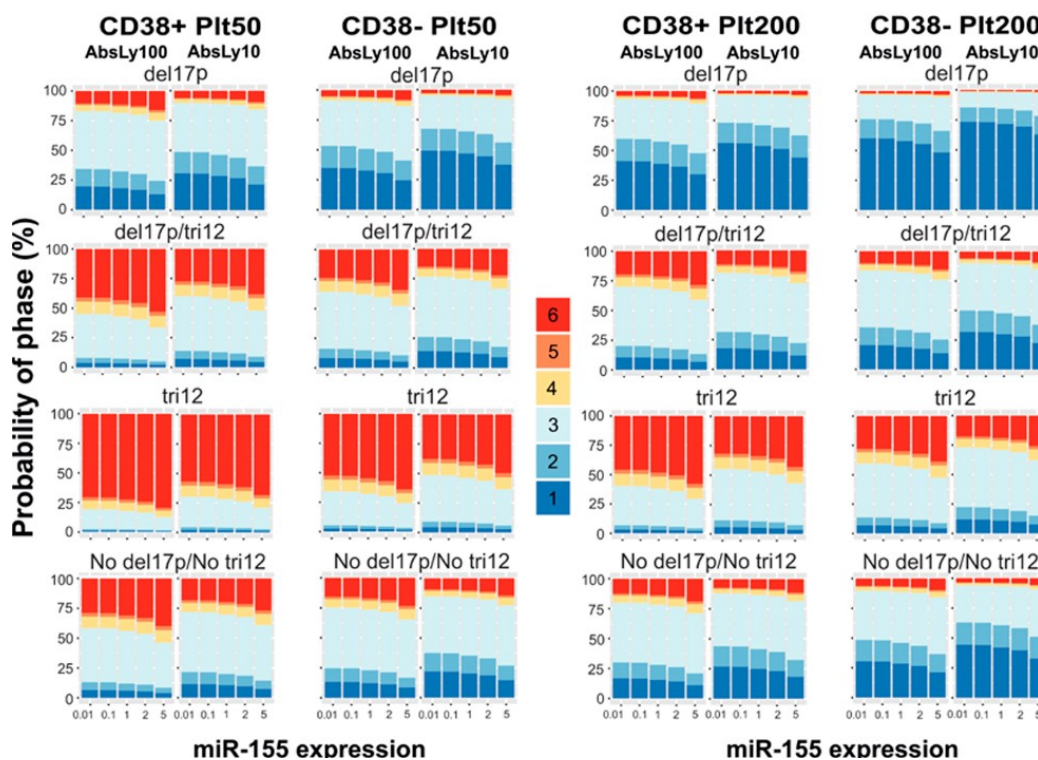


Obrázek 24 (a-d). Kaplan – Meier graf celkového přežívání pacientů s CLL (% , osa Y), v čase (měsíce, osa X) ve vztahu k: (a) stav IgVH (mutovaný, nemutovaný); (b) stav del17p (ano, ne); (c) exprese CD38 (pozitivní, negativní); (d) úrovně exprese miR -155 (méně než 0,2; od 0,2 do 2; nad 2).

Bylo nutné vyhodnotit propojení miR-155 /miR-150 u pacientů, kteří se nachází v různých rizikových skupinách, tj. CD38-pozitivní oproti těm, které jsou CD38 negativní, protože pacienti s CD38 pozitivní obecně mají 170-krát vyšší riziko progresu, než CD38 negativní a přítomnost del(17)(p13) způsobuje 89-krát vyšší riziko úmrtí. Proto byl použit vícerozměrný Coxův model proporcionálních rizik pro vymezení rolí každého faktoru: miR-150/ miR-155/ MYB/ PU.1 v porovnání se standardními parametry, jako základní laboratorní parametry (počet destiček a lymfocytů), včetně IgVH, CD38 a del17p.

Rozdělili jsme expresní hladiny vzorků do 4 skupin (Obr. 25) na základě exprese CD38 (pozitivní a negativní) a počtu krevních destiček: snížené hodnoty (Plt 50) a normální hodnoty (Plt 200). Tyto skupiny jsme dále rozdělili na základě absolutního počtu lymfocytů v periferní krvi pacientů s CLL: zvýšená leukocytóza (AbsLy100) a normální hodnoty lymfocytů (AbsLy10). Dále rozlišujeme v každé skupině přítomnost nebo absenci následujících parametrů: del(117p), tri12. Je zajímavé, že dle výše uvedených hodnot se dalo predikovat náležitost vzorků k jedné z klinických fází onemocnění CLL. Fáze 1-6, které označují stav sledování bez zahájení léčby (fáze 1 až 3 „check and wait“) a stavu indikované terapie (fáze 4 až 6), jsou označeny vícebarevnou stupnicí uprostřed obrázku.

Obrázek 25. Pravděpodobnost přidružení vzorku ke klinické fázi CLL (1 – 6).



Obrázek graficky znázorňuje pravděpodobnost, že pacient patří do konkrétní fáze onemocnění na základě kumulativního logitového modelu. Osa X představuje relativní expresi miR-155 od 0,001 do 5. Osa Y ukazuje pravděpodobnost, že pacient bude v jedné z fází nemoci 1-6 (v %). Tyto fáze odrážejí stabilitu CLL, její progresi a požadavky na léčbu. Fáze 1 – stabilní onemocnění bez indikované léčby; fáze 2 – progresi onemocnění; fáze 3 – indikace k terapii,

fáze 4 – stabilní onemocnění po předchozí terapii, fáze 5 - progresse po předchozí terapii, fáze 6 – indikace k další linii terapie (Vargova, Pesta et al. 2017).

Úroveň exprese miR-150, který inhibuje MYB byl spojený s prodlouženým OS ($p = 0,0307$) v CLL. Úroveň PU.1, který je ověřeným cílem miR-155, byly na hranici významnosti. Regulace miR-155 významně ovlivňuje OS pacientů s CLL, což vede k závěru, že vysoké hladiny onkogenního miR-155 a jeho regulátoru onkogenu MYB se interagují s nízkými hladinami nádorových supresorů: miR-150 a PU.1.

Z celkem 19 charakteristik onemocnění pouze pozitivita CD38 (p -hodnota 0,033), lymfocytóza (p -hodnota 0,006), Trisomie12 (p -hodnota 0,010), delece 17p (p -hodnota 0,035), nízké krevní destičky (p -hodnota 0,009) a miR-155 (p -hodnota 0,014) měl statisticky významný vliv na postupující fázemi CLL. miR-155 jediným parametrem ($p = 0,014$), který má významný dopad na příslušnost k riziku progresi do více pokročilé fázi onemocnění (Tabl. 9).

Tabulka 9. Odhady parametrů proporcionálního modelu pravděpodobnosti

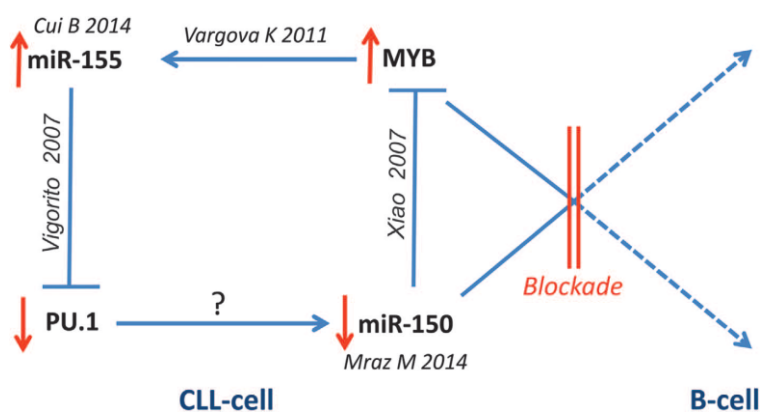
<i>Charakteristika</i>	<i>Odhad</i>	<i>Standartní odchyška</i>	<i>p-value</i>
1 2	-1.5490	0.5735	-
2 3	-0.7936	0.5636	-
3 4	1.4345	0.5766	-
4 5	1.8517	0.5838	-
5 6	1.9890	0.5868	-
<i>CD38</i>	0.778301	0.365677	0.03331
<i>Lymfo</i>	0.006626	0.002413	0.00603
<i>Trisomie12</i>	-1.241926	0.484354	0.01034
<i>Delece17p</i>	1.771679	0.841845	0.03533
<i>miR-155</i>	0.097996	0.039816	0.01385
<i>Plt</i>	-0.006964	0.002657	0.00877

Zde poskytujeme důkazy o asociaci miR-155 a jeho vzájemným spojením s klinickými výsledky kohorty CLL pacientů v průběhu 54měsíčního sledování. Jak se dalo očekávat, role některých aktuálně známých prediktivních faktorů (delece 17p a CD38) byly potvrzeny. Pomocí Coxova modelu proporcionálních rizik jsme nově přidružili úroveň komponent miR-

155 / miR-150 k OS pacienta. Ve výsledku, miR-155 představuje nepříznivý faktor a miR-150 byl navržen jako pozitivní prospěšný faktor v patogenezi CLL. Význam miR-150 společně s miR-155 silně podporuje současný pohled na význam signalizace BCR v patogenezi CLL spolu s tvrzením o roli CD38 a del(17) jako negativních parametrů pro přežití pacientů CLL.

Navrhujeme aktualizovaný model patogeneze CLL, který zahrnuje miR-155 / miR-150. Jak je shrnuto na obr. 26. Downregulace miR-150 se jeví jako počáteční událost v průběhu diferenciaci B-buněk, vedoucí k blokaci inhibičního účinku na MYB. Aberantní úroveň MYB transkripčně upreguluje miR-155. MiR-155 blokuje expresi PU.1, který hraje významnou úlohu jako regulátor diferenciaci B-buněk.

Obrázek 26. Model patogeneze CLL s účastí miR 155 a miR-150.



Obrázek 26. Blokáda diferenciaci B-buněk v patogenezi CLL zahrnuje rámec vzájemného působení miR-155 / miR-150, včetně jejich cílů MYB a PU.1. Citace základních výzkumů jsou uvedeny u konkrétních molekul. Červené šipky označují snížení nebo zvýšení exprese. Modré šipky ukazují aktivační nebo inhibiční působení.

6.3. Onkogenní mikroRNA: miR-155, miR-19a, miR-181b a miR-24 umožňují sledování časného karcinomu prsu v séru

Jednou z nejčastějších malignit s vysokou letalitou zůstává karcinom prsu (Bahloul, Rekik et al.). Pokud se neléčí rakovina prsu již v raném stadiu (EBC early breast cancer), onemocnění časně metastazuje a proto je nanejvýš důležité její včasné odhalení. Kromě mutací BRCA, které se vyskytují v relativně malé kohortě pacientů, existují další rizikové faktory patologie, jako jsou hormonální receptory, HER2 (receptor lidského epidermálního růstového faktoru), Ki-67 (marker proliferační aktivity tkáně) a histologie, které pomáhají při určování potenciálního

rizika progresu onemocnění nebo relapsu. mikroRNA jsou další faktory, které souvisejí s růstem nádoru a jsou detekovatelné ve vzorku pacienta (Schwarzenbach 2013).

V práci Iorio (2005), zahrnující 76 vzorků BC a 10 kontrolních tkání, využívající techniku microarray bylo prokázáno, že miR jsou v BC deregulovány s určitým profilem; snížená exprese miR-10b, miR-125b, miR-145 a zvýšená u miR-21 a miR-155 (Iorio, Ferracin et al. 2005). Na základě další studie, která využívala NGS sekvenaci vzorků vysoce invazivního mikropapilárního karcinomu prsu, bylo definováno několik onkomiRů, které se potenciálně podílí na agresivitě BC, včetně let-7b, miR-30c, miR-148a, miR-181a, miR-181a a miR-181b (Li, Yang et al. 2012). Zatímco jedni miR jsou opakovaně deregulováni, jiné jsou stabilní a vykazují velmi malou variabilitu v séru, jako jsou: let-7a, miR-16, miR-93, miR-103, miR-192 a miR-451, jak se ukázalo ve studii pacientů se solidními nádory prsů (Song, Bai et al. 2012), nebo: let-7a a miR-195 v plazmě pacientů s BC ve srovnání s normálními kontrolami (Zhao, Shen et al. 2010). Hladiny let-7a jsou pravděpodobně stabilní, protože jsou široce exprimovány v somatických buňkách, zatímco jsou méně exprimovány ve vzácných kmenových buňkách a nediferencovaných prekurzorech (Newman, Thomson et al. 2008).

Na základě výše uvedených údajů představují miRNA velmi dobré kandidáty pro sledování růstu nádoru u pacientů s BC jako sérových molekulárních biomarkerů. Přímou roli onkomiRu v patogenezi BC podporují i jiné studie. Například onkomiRu miR-155 je nadměrně exprimován v BC a funguje tak, že downreguluje supresor cytokinové signalizace-1 (SOCS1), což vede k perzistentní aktivaci převaděče signálu a aktivátoru transkripce 3 (STAT3) (Jiang, Zhang et al. 2010). Upregulace miR-155 při diagnóze BC a pokles jeho hladin po terapii byly skutečně dříve pozorovány. Je zajímavé, že pokles hladin miR-155 v séru po terapii byl pozorován mnohem dříve než u jiných biomarkerů tumoru (Sun, Wang et al. 2012).

Dále miR-19a, který je členem klastru miR-17-92, a ovlivňuje patogenezi BC více mechanismy, včetně inhibice tumorového supresoru PTEN (Farazi, Horlings et al. 2011). Zapojení miR-181b se navrhuje u agresivního BC kvůli jeho roli v odezvě na poškození DNA, tím že snižuje regulaci ATM a účinnost signálu inhibitorů PARP1 při léčbě BC (Bisso, Faleschini et al. 2013). Výzkum expresí miR-19a a miR-181b byl zapojen do studií, které ukázaly, že miR-19a zprostředkovaná inhibicí SOCS1 aktivuje expresi miR-181b (prostřednictvím STAT3) (Iliopoulos, Jaeger et al. 2010).

V BC patogenezi byla opakovaně navrhována role TGF β -zprostředkovaného epiteliálně-mezenchymálního přechodu se zaměřením na roli miR-24 v tomto procesu (Papadimitriou,

Vasilaki et al. 2012). Dohromady tyto mikroRNA byly vybrány pro naši studii, zdají se být patofyziologicky klíčové molekuly podílející se na růstu nádoru a agresivitě BC.

V této studii laboratoře prof. T. Stopky (Sochor, Basova et al. 2014) jsme studovali expresi miR-155, miR-19a, miR-181b a miR-24 v séru 63 pacientů s EBC a hodnotili statistický význam jejich exprese během léčby ve vztahu rizikovým parametrům. Naše práce ukazuje, že exprese sérových onkomiRů se asociuje s diagnostickými kritérii EBC, zejména u pacientů s vyšším rizikem, a může být užitečná pro monitoring průběhu tohoto onemocnění.

Séra pacientů byla odebrána v letech 2010–2013 z EBC (N = 63, medián věku 58). EBC byl definován jako BC, který se nerozšířil mimo prsní tkáň nebo do axilární lymfatické uzliny (to zahrnuje duktální karcinom *in situ* a invazivní BC fáze I, IIA, IIB a IIIA).

Pro potřeby studii byly definovány časové body pro jednotlivé odběry každého pacienta:

- jeden den před chirurgickou operací pro BC (časový bod I),
- 14–28 dní po operaci před jakoukoli nechirurgickou léčbou BC (časový bod II),
- 14–28 dnů po první linii léčby: chemoterapie nebo radioterapie (časový bod III),
- po relapsu onemocnění, který byl pozorován u 3 pacientek ve studii (časový bod IV).

Operace zahrnovala u všech pacientů odstranění nádoru spolu s odstraněním okolní nenádorové tkáně. Střední doba sledování byla 27 měsíců (rozmezí 9,5-36,3). Po klinickém relapsu pacientce (N = 3) byl odebrán další vzorek séra. Diagnóza a rozhodnutí o terapii byla prováděna pomocí standardních kritérií.

Mezi klinické parametry pro hodnocení pacientů s EBC patří věk, menopauzální stav, osobní anamnéza a vývoj onemocnění, histologická diagnóza, klinické a chirurgické stádium, typ nádoru, stupeň nádoru, stav hormonálních receptorů, exprese Ki-67 a HER2.

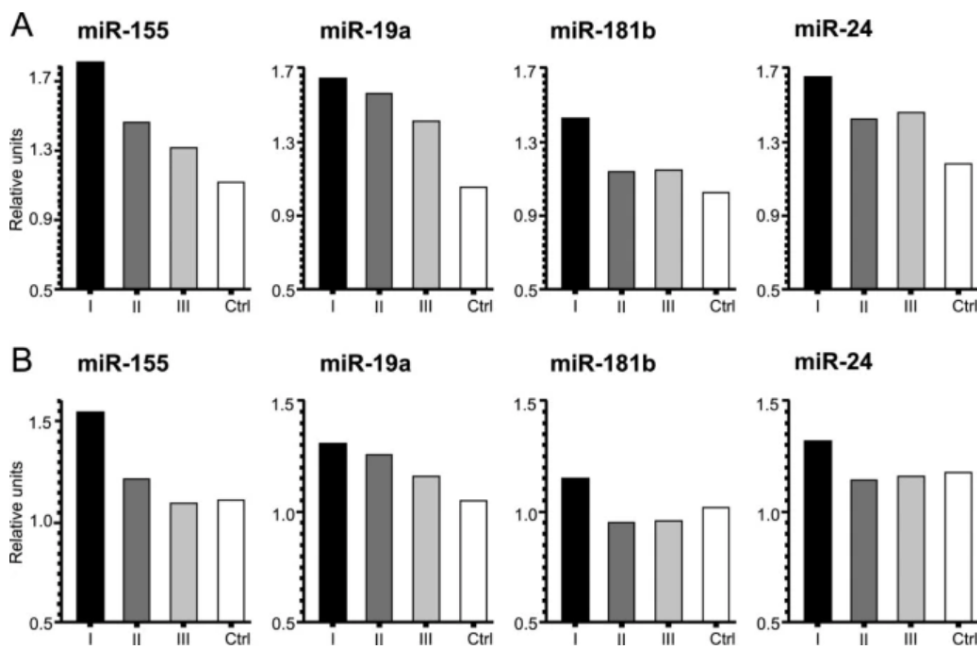
Relativní exprese miRNA byla vypočtena z CT onkomiRů (miR-155, miR-19a, miR-181b, miR-24) ve vztahu k expresi referenční miRNA let-7a v EBC a porovnána s expresi stejných miRNA zdravých kontrol s použitím $2^{-\Delta CT}$ rovnice. Během všech měření referenční mikroRNA let-7a vykazovala stabilně vyjádřenou expresi jak ve vzorcích pacientů v každém čase odběru (I-III), tak i v kontrolních vzorcích.

Pomocí analýzy podélných vícerozměrných dat jsme zjišťovali, zda jsou úrovně onkomiRů odlišné mezi časovým bodem I a jinými časovými body nebo kontrolami. Nejprve jsme určili, zda chirurgické odstranění nádoru mělo vliv na hladiny onkomiRu v séru. Mezi časovými body I a II sérové hladiny miR-155, miR-181b a miR-24 významně poklesly (p -hodnoty $<0,05$ u

všech pacientů s EBC (s nízkým a vysokým rizikem). Na rozdíl od těchto tří onkomiRů se sérové hladiny miR-19a po operaci nezměnily, což naznačuje, že miR-19a je buď stabilnější, nebo že jeho produkce neodráží ztrátu nádorové tkáně. Byl však zaznamenán významný pokles sérové hladiny každého miR (včetně miR-19a) po terapii v časovém bodě III ve srovnání s časovým bodem I při diagnóze (p -hodnoty $<0,05$, tj. miR-155: 0,000132; miR-19a: 0,00869; miR-181b: 0,0008 a miR-24: 0,02343). Je tedy pravděpodobnější, že absence změny v hladinách miR-19a v séru po chirurgickém zákroku je způsobena spíše otázkou stability než produkcí miR-19a v nádorové tkáni.

Zeptali jsme se, zda vysoce riziková pacientka má odlišné hladiny onkomiRů v séru ve srovnání s nízkorizikovými EBC pacienty. Vysoce riziková pacientka s EBC měla vyšší sérové hladiny onkomiRů (miR-155, miR-19a, miR-181b a miR-24) než zdravé ženy, zatímco pacientka s nízkým rizikem měla tendenci k nižším hodnotám onkomiRů než pacientka s vysokým rizikem. (Obr. 27).

Obrázek 27. Sérové hladiny miR-155, miR-19a, miR-181b a miR-24 u pacientů s nádorem prsu (vysoce riziková pacientka a nízkoriziková pacientka).



Relativní exprese miRNA (miR-155, miR-19a, miR-181b, miR-24) ve vzorcích séra pacientů s karcinomem prsu (A) s vysokým rizikem onemocnění, (B) s nízkým rizikem onemocnění.

Další otázkou bylo, jak úrovně onkomiR reagují na léčbu podle stratifikace rizika. Sérová hladina pro každý miR v případě vysoce rizikových pacientů (Obr. 26A) ukazuje klesající trend během sledování. Jedinou výjimkou jsou sérové hladiny miR-24, které byly trvale nízké před a

po terapii (mezi časovými body II a III). Na druhé straně onkomiR pacientů s nízkým rizikem (Obr. 26B) po chirurgické resekci klesají a v důsledku toho zůstávají během léčby téměř konstantní s přibližně stejnou úrovní jako v případě kontrol.

Závěrem lze říci, že hladiny onkomiRů u vysoce rizikových pacientů klesají méně rychle než u nízkorizikových pacientů. Navíc vysoce riziková pacienta nedosahují normálních hladin onkomiR jako pacienti s nízkým rizikem.

Zde předkládáme důkazy, že hladiny onkomiR se významně liší při počáteční diagnóze EBC ve srovnání s časovými body následujícími po specifické léčbě (po operaci a po adjuvantní terapii). Naše výsledky naznačují, že chirurgický zákrok měl obrovský dopad na tři hladiny onkomiRů v séru, zatímco adjuvantní léčba významně snížila všechny čtyři studované onkomiRy. To naznačuje, že existuje vztah mezi eliminací EBC během terapie a hladinami onkomiRů v séru.

7. Diskuse

miRNA jsou velmi stabilní epigenetické modifikátory posttranskripční exprese, často zapojené do tumorigenezi. Jejich hladiny jsou detekovatelné jak v pevných tkáních, tak i v periferní krvi, a proto se nabízejí jako biomarkery pro diagnostický a prognostický screening u pacientů s různými typy onemocnění, včetně rakoviny. Ve výzkumných pracích, které probíhaly v naší laboratoři (laboratoř prof. MUDr. Tomáše Stopky, PhD.) v letech 2013 – 2018 jsme hodnotili expresi miR-onkomarkerů různých malignit ve vztahu ke klinickým charakteristikám onemocnění, standartním laboratorním markerům a vybraným statistickým hodnotám.

Prvotní práce se věnovaly výzkumu jedné z nejsledovanější miRNA miR-155. Výsledná data poskytly nepřímý důkaz, že aktivita miR-155 je spojená s maligní proliferací v lymfoidních malignitách. Vzhledem k dříve publikovaným zjištěním o vlivu miR-155 na diferenciaci B-buněk (Dahl and Simon 2003), (Lu, Nakagawa et al. 2014), tato data společně podpořila role miR-155 a jejího cílového produktu PU.1 v patofyziologii LPD. Analýza expresi miR-155 a PU.1 ve vztahu ke klinickým a molekulárním charakteristikám pacientů přinesla několik klinicky použitelných pozorování, které následně (Vargova, Pesta et al. 2017) poskytly důkaz o přímé účasti miR-155 v progresi onemocnění CLL.

Jiná studie, provedena na vzorcích séra pacientek s BC také potvrdila přímou účast těchto malých RNA molekul v procesech spojených s kancerogenezi. Byl předložen výsledek práce, kde nádorová tkáň, skutečně produkovala onkomiRy, a že jejich zvýšené hladiny v séru odrážely charakter a aktuální stav tohoto onemocnění. Proto detekce onkomiRů může být navíc užitečná pro detekci relapsu, je však zapotřebí mnohem delšího sledování.

Plazmatické miR-155, miR-203 a miR-205 jsou biomarkery pro monitorování primárních T-buněčných kožních lymfomů (Dusilkova, Basova, 2017)

V případě výzkumu CTCL jsme použili hodnocení expresí vybraných miRNA na vzorcích plazmy pacientů s MF a SS v několika časových bodech onemocnění, což nám umožnilo porovnat dynamické změny v úrovni miR souvisejí s biologií CTCL s klinickými výsledky. miR-155, miR-203 a miR-205 byly skutečně odlišně regulovány v CTCL ve srovnání s kontrolními vzorky od pacientů s BKL nebo kontrolními vzorky. Navíc prediktivní 3-miR-skóre dříve generované pro nádorové tkáně (Ralfkiaer, Hagedorn et al. 2011) a validované na kohortě nezávislých pacientů (Marstrand, Ahler et al. 2014) úspěšně oddělil CTCL od kontrol a BKL při implementaci dat získaných z plazmy (Obr. 7 a Obr. 15). Velikost efektu separace vzorků pomocí PCA však byla relativně menší ve srovnání s daty generovanými z větších datových souborů pomocí microarray. Studované miR jsou v CTCL biologii velmi jedinečné. Zatímco miR-155 působí jako onkogen v mnoha různých typech nádorových buněk, miR-203 a miR-205 jsou supresory nádoru exprimované v keratinocytech. Další práce ukazuje, že downregulace miR-203 a miR-205 narušuje epidermální diferenciaci a zvyšuje invazivitu (Ning and Andl 2015) a urychluje buněčnou proliferaci (Chim, Wong et al. 2011). MiR-155 je zase epigeneticky aktivován prostřednictvím onkogenu *MYB*, který se váže a aktivuje strukturu chromatinu v blízkosti hostitelského genu pro miR-155 (Vargova, Curik, 2017). Výsledkem je, že upregulace miR-155 blokuje normální imunitní funkci při lymfoidních malignitách zaměřením na důležité transkripční a signální faktory, jako jsou PU.1 nebo SHIP1-PIP3-AKT (Huskova, Korecka, 2015). Další studie naznačila, že dráha STAT5-BIC-miR-155 může být zodpovědná za řízení buněčné proliferace během maligní transformace T-buněk (Kopp, Ralfkiaer et al. 2013). Tato představa je také podporována myším modelem s nadprodukcí miR-155 (Costinean, Zanesi et al. 2006), která vede k lymfomům. Je zajímavé, že jak maligní, tak benigní T-buňky v biopsiích tumoru CTCL / MF byly barveny pozitivně na miR-155 pomocí hybridizační techniky *in situ* (Kopp, Ralfkiaer et al. 2013). Soubor tří miRNA může potenciálně

zprostředkovat mechanismy odpovědné za změnu mikroprostředí a maligní transformací, jak je uvedeno v jiných studiích (Krejsgaard, Lindahl, 2017).

Je velmi důležité správně diagnostikovat a odlišit CTCL od benigních lézí, s přesností předpovědět možnost potenciálního relapsu CTCL. Naše práce naznačuje, že toho lze dosáhnout pomocí specifické detekce mikroRNA v plazmě. Jak je uvedeno na Obr. 16 a Obr. 17 klinické výsledky byly často předpokládány změnami miRNA „Sample skóre“. Hladiny tří nejdůležitějších miRNA (miR-155, miR-203, miR-205) měly skutečně významné účinky na terapeutickou odpověď (Obr. 11), zatímco miR-155 a miR-203 měly navíc významné účinky na příslušnost ke klinickému stadiu a na velikosti nádoru (Obr. 13 a Obr. 14). Výhodou naší práce ve srovnání s předchozími výzkumy využívající biopsií kůže je to, že umožňuje využití plazmy periferní krve, která je relativně snadno získatelná při rutinních návštěvách pacientů.

Výsledkem je, že data miRNA jsou kvantitativní a vysoce reprodukovatelná. Význam prediktivního skóre je částečně způsoben skutečností, že miR-155 je přímo zapojen do biologie progresu MF, což je podporováno i jinými pracemi (Moyal, Barzilai et al. 2013). Je zajímavé, že upregulace samotného miR-155 není schopna úplně rozlišit mezi časnou MF a zánětlivou dermatózou a oddělit pacienty a kontroly, dále podporuje použití klasifikátoru několika miRNA. Skóre ve skutečnosti mělo původně obsahovat další dva miR, miR-223 a miR-22, které byly dříve prokázány upregulované v nádorové tkáni CTCL, zatímco v plazmě MF nebo SS (jak je ukázáno na Obr. 9 a Obr. 10) hladiny miR-223 a miR-22 nebyly významně ovlivněny. Navíc, jak ukazuje další studie, hladiny miR-223 jsou v CTCL sníženy, zatímco jejich cíle byly vzájemně upregulované (McGirt, Adams et al. 2014). Podobně jiná studie zaznamenala snížení miR-223 během progresu MF na pokročilé MF. Dále bylo pozorováno snížení miR-22 v obou formách CTCL, MF i SS, ve srovnání s kontrolami v jiné studii (Sibbesen, Kopp et al. 2015).

Dohromady nástroj zahrnující detekci miR v plazmě umožňuje jak správně diagnostikovat CTCL a odlišit od benigních lézí, tak i umožňuje monitorování progresu CTCL. Přestože naše práce představuje počáteční nálezy na relativně malé kohortě pacientů, jsme přesvědčeni, že spojování úrovně miR s klinickým výsledkem umožňuje zahájit další validační studie u pacientů s CTCL.

Studie genové exprese: Onkogenní mikroRNA-155 a PU.1 v nejčastějších lymfoidních malignitách (Huskova, Korecka, 2015)

V tomto článku prezentujeme expresi onkogenního miR-155 a jejího cíle, transkripčního faktoru PU.1 u LPD. Zde jsme stanovili zde expresi těchto molekul ve vzorcích primárních solidních nádorů šesti nejrozšířenějších LPD: agresivních (DLBCL, HL a MCL) a indolentních (B-CLL/SLL, MZL a FL). Naše studie poskytuje validaci různých typů lymfomů a jsou ve shodě se studiemi, které uváděly vysokou hladinu miR-155 jak ve vzorcích od pacientů s maligním onemocněním, tak v buněčných liniích odvozených z těchto nádorů (Eis, Tam et al. 2005), (Lawrie, Soneji et al. 2007), (Torlakovic, Bilalovic et al. 2006), (Gibcus, Tan et al. 2009). Tyto studie však používaly různé techniky, kontroly a normalizace, takže výsledky nelze plně porovnat a vyhodnotit. Kromě dříve již publikovaných studií, i v našem souboru 12 vzorků MZL jsme zjistili významnou upregulaci exprese miR-155. (Obr. 23h - i). Podpořeno jedním dříve publikovaným případem (Eis, Tam et al. 2005), můžeme konstatovat, že hladiny miR-155 jsou u MZL také celkově zvýšené. Zajímavé je, že se v této oblasti objevuje mnoho dalších významných změn, např. jsme nenalezli zvýšené hladiny exprese miR-155 v uzlinových vzorcích MCL, protože se pohybovaly v rozmezí reaktivních lymfatických uzlin a normálních B-buněk. Nicméně, jsme skutečně potvrdili významnou zvýšenou regulaci miR-155 v nádorových buňkách MCL cirkulujících v periferní krvi. Primární MCL se nachází v lymfatických uzlinách, prakticky ve všech případech ale zpočátku se vyskytuje postižení periferní krve (Ferrer, Salaverria et al. 2007). PU.1 představuje ověřený cíl miR-155 jak na úrovni RNA i na úrovni proteinu (Vargova, Curik et al. 2011), (Vigorito, Perks et al. 2007). Zjistili jsme, že hladiny PU.1 jsou snižené, a tak pravděpodobně odrážejí upregulaci miR-155. Bylo zjištěno, že hladiny PU.1 jsou významně nižší u všech studovaných malignit, překvapivě včetně MCL, s průměrnou downregulací přibližně 75 % u B-CLL/ SLL, FL, MZL a MCL a ještě výraznější v případě přibližně 90 % u HL a DLBCL. Skutečně, jsme zaznamenali negativní korelaci mezi miR-155 a PU.1 v našem souboru pacientů s LPD (Obr. 23a). Tato data poskytují nepřímý důkaz, že nádorový supresor PU.1 je cílem onkogenní aktivity miR-155 v těchto LPD. Vzhledem k dříve publikovaným zjištěním o PU.1 a miR-155 pro diferenciaci B-buněk (Dahl and Simon 2003), (Lu, Nakagawa et al. 2014), tato data společně podporují roli miR-155/PU.1 v patofyziologii LPD. Hladiny exprese miR-155 v našem souboru vzorků jsou zvýšené a PU.1 respektive snižené, celkově, ale mezi jednotlivými vzorky existuje široké rozpětí exprese v jednotlivých typech LPD. Proto jsme analyzovali expresi miR-155 a PU.1 v jednotlivých skupinách vzorků ve vztahu ke klinickým a molekulárním charakteristikám pacientů, z nichž byly vzorky odebrány. Zaznamenali jsme několik klinicky použitelných pozorování. Za prvé, u B-CLL/SLL jsme zjistili významně nižší expresi PU.1 (v lymfatických uzlinách) u CLL pozitivních pro ZAP-70 a CD38, než u pacientů negativních pro tyto nepříznivé prognostické

markery (Schroers, Griesinger et al. 2005). Tyto výsledky poskytují další důkazy podporující PU.1 jako prognostického ukazatele u B-CLL/SLL (Vargova, Curik et al. 2011). Naše pozorování je podpořeno dalšími údaji, které považují miR-155 za prediktor transformace benigní lymfocytózy do maligní B-CLL (Ferrajoli, Shanafelt et al. 2013). Za druhé, vysoké hladiny miR-155 odlišily tři velmi neobvyklé případy HL refrakterní na standardní terapii od ostatních případů HL. (Obr. 23g). Takové údaje vybízejí k rozšíření souboru pacientů s HL za účelem dalšího ověření tohoto pozorování s použitím větších souborů dat. Výsledky ukazují, že miR-155 je důležitou molekulou pro biologii a pravděpodobně i pro klinické sledování potenciálně refrakterních případů HL. Naše studie také poskytla některé neočekávané pozorování. Například jsme očekávali rozdílnou expresi miR-155 u podtypů DLBCL, jak bylo uvedeno v dříve publikovaných studiích (Lawrie, Soneji et al. 2007). Takový rozdíl v našem souboru dat však nebyl odhalen. Je možné, že náš soubor dat neobsahoval dostatečný počet vzorků pro signifikantní hodnocení (N = 5) a navíc s náhodně výjimečně vysokou hodnotou miR-155.

Souhrnně lze říci, že naše data poskytují důkaz, že tento přístup sledování exprese miR-155 a PU.1 ve vzorcích lymfatických uzlin a periferní krve je proveditelný. Zjistili jsme upregulaci miR-155 a downregulaci jejího cíle PU.1 v šesti nejčastějších LPD: DLBCL, B-CLL/SLL, HL, MZL a FL. Zjistili jsme downregulaci PU.1 u MCL v souvislosti s normální expresí miR-155, což naznačuje, že regulace hladiny PU.1 je komplexnější u tohoto podtypu lymfomu. Naše výsledky rovněž naznačují roli PU.1 a miR-155 v nepříznivé prognóze B-CLL/SLL a HL. Stanovení exprese miR-155 a PU.1 v lidských LPD tak představuje nový nástroj, který by měl být začleněn do diagnostických hodnocení.

Onkogenní mikroRNA: miR-155, miR-19a, miR-181b a miR-24 umožňují sledování časného karcinomu prsu v séru (Sochor, Basova et al. 2014)

Další naše práce využívající genovou expresi vybraných miRNA, potvrdila, že nádorová tkáň v tomto případě karcinomu prsu (BC) skutečně produkuje onkomiRy, a že jejich zvýšené hladiny v séru odrážejí charakter tohoto onemocnění. Detekce onkomiRů může být navíc užitečná pro detekci relapsu, je však zapotřebí mnohem delšího sledování.

MiR-155 je jedním z nejvíce studovaných miR u pacientů s BC (Sun, Wang et al. 2012). Produkce miR-155 nádorem však vysoce reaguje na chirurgickou léčbu, a proto její hladiny velmi rychle klesají. Na rozdíl od toho se miR-19a po chirurgickém odstranění zdá být

stabilnější a detekovatelnější (ve srovnání s miR-155, miR-181b nebo miR-24). Nakonec se hladiny všech studovaných onkomiR po adjuvantní terapii snížily (časový bod III).

Naše studie prokázala, že hladiny onkomiR u vysoce rizikových pacientů klesají méně rychle než v případě nízkorizikových pacientů. Navíc vysoce riziková pacienta na rozdíl od nízkorizikových nedosahují po adjuvantní léčbě normální hladiny onkomiR (časový bod III). Například miR-19a, který je součástí klastru miR-17-92 se jeví jako velmi důležitý faktor v agresivním BC (Farazi, Horlings et al. 2011). Podobně další mikroRNA miR-181b byla spojena s agresivnějším BC charakterizovaným horším klinickým stagingem a vyšší Ki-67 (Bisso, Faleschini et al. 2013). miR-24 je spojován s patogenezí BC (Papadimitriou, Vasilaki et al. 2012), ale dosud nebylo navrženo, aby byl zapojen do diagnostického modelu agresivity BC. Navíc nemůžeme úplně vyloučit možnost, že hladiny onkomiR klesají méně rychle u vysoce rizikových pacientů v důsledku pooperační přítomnosti nádorových buněk, které však nejsou klinicky využívanými technikami detekovatelné. Jak pečlivé chirurgické odstranění okolní ne-nádorové tkáně, tak i velmi nízký počet recidivujících pacientů s EBC však naznačují, že to odráží spíše zvýšenou stabilitu a možná také pomalejší degradaci onkomiRů v séru pacienta. V naší kohortě pacientů jsme pozorovali relaps BC u tří pacientů, což vedlo ke změnám hladin onkomiRů. Protože však naše studie sestávala z malého počtu recidivujících pacientů, neumožnila důkladnější analýzu hladin onkomiRů.

Podélná vícerozměrná analýza exprese onkomiR v kohortě pacientů s EBC silně podporuje klinický význam čtyř onkogenních mikroRNA. Částečně pomáhá spojit pozorované deregulace ve vzorcích séra s agresivními klinickými parametry, jako jsou HER2, Ki-67 a klinický stupeň III. To je v souladu s předchozími analýzami, které byly založeny na datech exprese v nádorové tkáni, a data týkající se miR-155 v séru byla rovněž v souladu s ostatními výsledky (Eichelsler, Flesch-Janys et al. 2013). Naše práce tak poskytuje důležité spojení biologické funkce miRů v nádoru s jejich hladinami v séru.

Výše uvedená data poskytují důkaz, že exprese čtyř onkomiRů souvisejících s patogenezí BC (miR-155, miR-19a, miR-181b a miR-24) v séru je zvýšená v diagnostických vzorcích pacientů s EBC. Tyto hladiny onkomiR se snižují po kombinované terapii. Důležité je, že vysoce riziková pacienta s EBC vykazují zejména opožděné a méně výrazné snížení exprese onkomiR po chirurgickém odstranění nádoru. Při relapsu se zvyšuje hladina některých onkomiR v séru, což naznačuje jejich potenciál pro monitorování pacientů s EBC.

8. Shrnutí závěrů disertační práce

Stanovení plazmatických hladin mikroRNA v hematologických malignitách představuje velmi užitečný nástroj jak pro diagnostické rozlišení např. od benigních lézí, tak pro monitorování průběhu onemocnění. Ve studiích, které byly provedeny na poli mikroRNA, jsme využili různé přístupy a metody pro co nejdetailnější hodnocení. Velkým přínosem je možnost využití vzorků plazmy a/nebo séra periferní krve u pacientů se solidními nádory (což na jedné straně odráží biologii nádorové hmoty a její schopnost secernovat molekuly do periferního řečiště, a na straně druhé ukazuje na skutečnost, že miRNA hrají významnou roli v komunikaci mezi nádorem, imunitním systémem a mikroprostředí tumoru). Výsledné soubory miRNA, kde často hraje role vzájemné působení několika onkogenních a supresorových miRNA, jsou využitelné nejen při diferenciální diagnostice nádorů, ale mají potenciál při hodnocení aktuálního klinického stavu pacienta a tím i přesnější stanovení léčebných odpovědí. Využití miRNA skórovacích systému dovolí kvantifikovat klinické objektivní výsledky a subjektivní znaky. Navíc, miRNA mohou předpovídat možný scénář vývoje onemocnění se stanovením prognostického rizika pro každého pacienta v aktuálním čase. Výše uvedené výsledky práce mohou být použity při zavádění nových terapií k vyhodnocení jejich účinnosti a hodnocení zbývajících nádorové zátěže.

Summary of dissertation conclusions

Determination of plasma microRNA levels in hematological malignancies is a very useful tool for diagnostic differentiation from e.g. benign lesions as well as for monitoring the course of the disease. In the studies that have been performed in the microRNA field, we have used different approaches and methods to make the most detailed assessment. The possibility of using peripheral blood plasma and/or serum samples from patients with solid tumours is a major contribution (which on the one hand reflects the biology of the tumour mass and its ability to secrete molecules into the peripheral circulation, and on the other hand points to the fact that miRNAs play an important role in the communication between the tumour, the immune system and the tumour microenvironment). The resulting sets of miRNAs, where the interaction of several oncogenic and tumor suppressor miRNAs often plays a role, are not only useful in the differential diagnosis of tumors, but also have the potential to assess the current clinical status of the patient and thus more accurately determine treatment responses. The use of miRNA scoring systems allows quantification of clinical objective outcomes and subjective features. In addition, miRNAs can predict possible disease scenarios with the determination of prognostic risk for each patient at the current time. The above results of this work can be used in the introduction of new therapies to evaluate their efficacy and assess the remaining tumor burden.

9. Publikace autora

Dusílková N, Bašová P, Polívka J, Kodet O, Kulvait V, Pešta M, Trněný M, Stopka T. Plasma miR-155, miR-203, and miR-205 are Biomarkers for Monitoring of Primary Cutaneous T-Cell Lymphomas. *Int J Mol Sci.* 2017 Oct 15;18(10):2136. doi: 10.3390/ijms18102136.PMID: 29036928 **(IF 4.5)**

Vargova K, Pesta M, Obrtlíkova P, **Dusílková N**, Minarik L, Vargova J, Berkova A, Zemanova Z, Michalova K, Spacek M, Trneny M, Stopka T. MiR-155/miR-150 network regulates progression through the disease phases of chronic lymphocytic leukemia. *Blood Cancer J.* 2017 Jul 21;7(7):e585. doi: 10.1038/bcj.2017.63.PMID: 28731457 **(IF 7.6)**

Vargova J, Vargova K, **Dusílková N**, Kulvait V, Pospisil V, Zavadil J, Trneny M, Klener P, Stopka T. Differential expression, localization and activity of MARCKS between mantle cell lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Blood Cancer J.* 2016 Sep 23;6(9):e475. doi: 10.1038/bcj.2016.80.PMID: 27662204 **(IF 7.6)**

Sochor M, Basova P, Pesta M, **Dusílková N**, Bartos J, Burda P, Pospisil V, Stopka T. Oncogenic microRNAs: miR-155, miR-19a, miR-181b, and miR-24 enable monitoring of early breast cancer in serum. *BMC Cancer.* 2014 Jun 18;14:448. doi: 10.1186/1471-2407-14-448.PMID: 24938880 **(IF 3.3)**

Huskova H, Korecka K, Karban J, Vargova J, Vargova K, **Dusílková N**, Trneny M, Stopka T. Oncogenic microRNA-155 and its target PU.1: an integrative gene expression study in six of the most prevalent lymphomas. *Int J Hematol.* 2015 Oct;102(4):441-50. doi: 10.1007/s12185-015-1847-4. Epub 2015 Aug 11.PMID: 26261072 **(IF 2.24)**

10. Reference

- Alexander-Savino, C. V., M. S. Hayden, C. Richardson, J. Zhao and B. Poligone (2016). "Doxycycline is an NF-kappaB inhibitor that induces apoptotic cell death in malignant T-cells." Oncotarget **7**(46): 75954-75967.
- Azimi, A., M. F. Hagh, B. Yousefi, M. A. Rahnama, A. Khorrami, M. Z. Heydarabad, M. Najafpour, J. Hallajzadeh and A. Ghahremani (2016). "The Effect of Prednisolone on miR 15a and miR16-1 Expression Levels and Apoptosis in Acute Lymphoblastic Leukemia Cell Line: CCRF-CEM." Drug Res (Stuttg) **66**(8): 432-435.
- Bahloul, M., N. Rekik, I. Chabchoub, A. Chaari, H. Ksibi, H. Kallel, H. Damak, A. Chaari, C. Ben Hamida, H. Chelly and M. Bouaziz (2005). "Neurological complications secondary to severe scorpion envenomation." Med Sci Monit **11**(4): CR196-202.
- Benton, E. C., S. Crichton, R. Talpur, N. S. Agar, P. A. Fields, E. Wedgeworth, T. J. Mitchell, M. Cox, S. Ferreira, P. Liu, A. Robson, E. Calonje, C. M. Stefanato, B. Wilkins, J. Scarisbrick, E. M. Wain, F. Child, S. Morris, M. Duvic and S. J. Whittaker (2013). "A cutaneous lymphoma international prognostic index (CLIPi) for mycosis fungoides and Sezary syndrome." Eur J Cancer **49**(13): 2859-2868.
- Bisso, A., M. Faleschini, F. Zampa, V. Capaci, J. De Santa, L. Santarpia, S. Piazza, V. Cappelletti, M. Daidone, R. Agami and G. Del Sal (2013). "Oncogenic miR-181a/b affect the DNA damage response in aggressive breast cancer." Cell Cycle **12**(11): 1679-1687.
- Bolland, S., R. N. Pearse, T. Kurosaki and J. V. Ravetch (1998). "SHIP modulates immune receptor responses by regulating membrane association of Btk." Immunity **8**(4): 509-516.
- Bonneau, E., B. Neveu, E. Kostantin, G. J. Tsongalis and V. De Guire (2019). "How close are miRNAs from clinical practice? A perspective on the diagnostic and therapeutic market." EJIFCC **30**(2): 114-127.
- Boyerinas, B., S. M. Park, A. E. Murmann, K. Gwin, A. G. Montag, M. Zillhardt, Y. J. Hua, E. Lengyel and M. E. Peter (2012). "Let-7 modulates acquired resistance of ovarian cancer to Taxanes via IMP-1-mediated stabilization of multidrug resistance 1." Int J Cancer **130**(8): 1787-1797.
- Budgin, J. B., S. K. Richardson, S. B. Newton, M. Wysocka, M. H. Zaki, B. Benoit and A. H. Rook (2005). "Biological effects of bexarotene in cutaneous T-cell lymphoma." Arch Dermatol **141**(3): 315-321.
- Calin, G. A., C. D. Dumitru, M. Shimizu, R. Bichi, S. Zupo, E. Noch, H. Aldler, S. Rattan, M. Keating, K. Rai, L. Rassenti, T. Kipps, M. Negrini, F. Bullrich and C. M. Croce (2002). "Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(24): 15524-15529.
- Carvalho de Oliveira, J., G. Molinari Roberto, M. Baroni, K. Bezerra Salomao, J. Alejandra Pezuk and M. Sol Brassesco (2018). "MiRNA Dysregulation in Childhood Hematological Cancer." Int J Mol Sci **19**(9).
- Cimmino, A., G. A. Calin, M. Fabbri, M. V. Iorio, M. Ferracin, M. Shimizu, S. E. Wojcik, R. I. Aqeilan, S. Zupo, M. Dono, L. Rassenti, H. Alder, S. Volinia, C. G. Liu, T. J. Kipps, M. Negrini and C. M. Croce (2005). "miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(39): 13944-13949.

- Coffre, M. and S. B. Koralov (2017). "miRNAs in B Cell Development and Lymphomagenesis." Trends Mol Med **23**(8): 721-736.
- Costinean, S., S. K. Sandhu, I. M. Pedersen, E. Tili, R. Trotta, D. Perrotti, D. Ciarlariello, P. Neviani, J. Harb, L. R. Kauffman, A. Shidham and C. M. Croce (2009). "Src homology 2 domain-containing inositol-5-phosphatase and CCAAT enhancer-binding protein beta are targeted by miR-155 in B cells of Emicro-MiR-155 transgenic mice." Blood **114**(7): 1374-1382.
- Costinean, S., N. Zanesi, Y. Pekarsky, E. Tili, S. Volinia, N. Heerema and C. M. Croce (2006). "Pre-B cell proliferation and lymphoblastic leukemia/high-grade lymphoma in E(mu)-miR155 transgenic mice." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(18): 7024-7029.
- da Silva Almeida, A. C., F. Abate, H. Khiabani, E. Martinez-Escala, J. Guitart, C. P. Tensen, M. H. Vermeer, R. Rabadan, A. Ferrando and T. Palomero (2015). "The mutational landscape of cutaneous T cell lymphoma and Sezary syndrome." Nat Genet **47**(12): 1465-1470.
- Dahl, R. and M. C. Simon (2003). "The importance of PU.1 concentration in hematopoietic lineage commitment and maturation." Blood Cells Mol Dis **31**(2): 229-233.
- Dai, J., T. H. Almazan, E. K. Hong, M. S. Khodadoust, S. Arai, W. K. Weng and Y. H. Kim (2018). "Potential Association of Anti-CCR4 Antibody Mogamulizumab and Graft-vs-Host Disease in Patients With Mycosis Fungoides and Sezary Syndrome." JAMA Dermatol **154**(6): 728-730.
- de Leeuw, D. C., W. van den Ancker, F. Denkers, R. X. de Menezes, T. M. Westers, G. J. Ossenkoppele, A. A. van de Loosdrecht and L. Smit (2013). "MicroRNA profiling can classify acute leukemias of ambiguous lineage as either acute myeloid leukemia or acute lymphoid leukemia." Clin Cancer Res **19**(8): 2187-2196.
- de Oliveira, J. C., M. S. Brassesco, C. A. Scrideli, L. G. Tone and A. Narendran (2012). "MicroRNA expression and activity in pediatric acute lymphoblastic leukemia (ALL)." Pediatr Blood Cancer **59**(4): 599-604.
- Deeb, S. J., R. C. D'Souza, J. Cox, M. Schmidt-Suppryan and M. Mann (2012). "Super-SILAC allows classification of diffuse large B-cell lymphoma subtypes by their protein expression profiles." Mol Cell Proteomics **11**(5): 77-89.
- Dou, L., D. Zheng, J. Li, Y. Li, L. Gao, L. Wang and L. Yu (2012). "Methylation-mediated repression of microRNA-143 enhances MLL-AF4 oncogene expression." Oncogene **31**(4): 507-517.
- Dusilkova, N., P. Basova, J. Polivka, O. Kodet, V. Kulvait, M. Pesta, M. Trneny and T. Stopka (2017). "Plasma miR-155, miR-203, and miR-205 are Biomarkers for Monitoring of Primary Cutaneous T-Cell Lymphomas." Int J Mol Sci **18**(10).
- Eichelser, C., D. Flesch-Janys, J. Chang-Claude, K. Pantel and H. Schwarzenbach (2013). "Deregulated serum concentrations of circulating cell-free microRNAs miR-17, miR-34a, miR-155, and miR-373 in human breast cancer development and progression." Clin Chem **59**(10): 1489-1496.
- Eis, P. S., W. Tam, L. Sun, A. Chadburn, Z. Li, M. F. Gomez, E. Lund and J. E. Dahlberg (2005). "Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(10): 3627-3632.
- Elenitoba-Johnson, K. S. and R. Wilcox (2017). "A new molecular paradigm in mycosis fungoides and Sezary syndrome." Semin Diagn Pathol **34**(1): 15-21.
- Faber, J., R. I. Gregory and S. A. Armstrong (2008). "Linking miRNA regulation to BCR-ABL expression: the next dimension." Cancer Cell **13**(6): 467-469.

- Farazi, T. A., H. M. Horlings, J. J. Ten Hoeve, A. Mihailovic, H. Halfwerk, P. Morozov, M. Brown, M. Hafner, F. Reyat, M. van Kouwenhove, B. Kreike, D. Sie, V. Hovestadt, L. F. Wessels, M. J. van de Vijver and T. Tuschl (2011). "MicroRNA sequence and expression analysis in breast tumors by deep sequencing." *Cancer Res* **71**(13): 4443-4453.
- Ferrajoli, A., T. D. Shanafelt, C. Ivan, M. Shimizu, K. G. Rabe, N. Nourae, M. Ikuo, A. K. Ghosh, S. Lerner, L. Z. Rassenti, L. Xiao, J. Hu, J. M. Reuben, S. Calin, M. J. You, J. T. Manning, W. G. Wierda, Z. Estrov, S. O'Brien, T. J. Kipps, M. J. Keating, N. E. Kay and G. A. Calin (2013). "Prognostic value of miR-155 in individuals with monoclonal B-cell lymphocytosis and patients with B chronic lymphocytic leukemia." *Blood* **122**(11): 1891-1899.
- Ferrer, A., I. Salaverria, F. Bosch, N. Villamor, M. Rozman, S. Bea, E. Gine, A. Lopez-Guillermo, E. Campo and E. Montserrat (2007). "Leukemic involvement is a common feature in mantle cell lymphoma." *Cancer* **109**(12): 2473-2480.
- Fierro, M. T., G. Banche, F. Marengo, M. Novelli, V. Allizond, N. Mandras, P. Murabito, C. Merlino, P. Quaglino, M. G. Bernengo and A. M. Cuffini (2012). "Functional and phenotypical impairment of polymorphonuclear cells in atopic dermatitis: an additional cause for the known susceptibility to infections?" *Dermatology* **224**(4): 323-330.
- Fire, A., S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver and C. C. Mello (1998). "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*." *Nature* **391**(6669): 806-811.
- Fredholm, S., A. Willerslev-Olsen, O. Met, L. Kubat, M. Gluud, S. L. Mathiasen, C. Friese, E. Blumel, D. L. Petersen, T. Hu, C. Nastasi, L. M. Lindahl, T. B. Buus, T. Krejsgaard, M. A. Wasik, K. L. Kopp, S. B. Koralov, J. L. Persson, C. M. Bonefeld, C. Geisler, A. Woetmann, L. Iversen, J. C. Becker and N. Odum (2018). "SATB1 in Malignant T Cells." *J Invest Dermatol* **138**(8): 1805-1815.
- Fulci, V., T. Colombo, S. Chiaretti, M. Messina, F. Citarella, S. Tavolaro, A. Guarini, R. Foa and G. Macino (2009). "Characterization of B- and T-lineage acute lymphoblastic leukemia by integrated analysis of MicroRNA and mRNA expression profiles." *Genes Chromosomes Cancer* **48**(12): 1069-1082.
- Gibcus, J. H., L. P. Tan, G. Harms, R. N. Schakel, D. de Jong, T. Blokzijl, P. Moller, S. Poppema, B. J. Kroesen and A. van den Berg (2009). "Hodgkin lymphoma cell lines are characterized by a specific miRNA expression profile." *Neoplasia* **11**(2): 167-176.
- Girardi, M., P. W. Heald and L. D. Wilson (2004). "The pathogenesis of mycosis fungoides." *N Engl J Med* **350**(19): 1978-1988.
- Girardi, M., J. Schechner, E. Glusac, C. Berger and R. Edelson (2002). "Transimmunization and the evolution of extracorporeal photochemotherapy." *Transfus Apher Sci* **26**(3): 181-190.
- Gutierrez-Camino, A., E. Lopez-Lopez, I. Martin-Guerrero, M. A. Pinan, P. Garcia-Miguel, J. Sanchez-Toledo, A. Carbone Baneres, J. Uriz, A. Navajas and A. Garcia-Orad (2014). "Noncoding RNA-related polymorphisms in pediatric acute lymphoblastic leukemia susceptibility." *Pediatr Res* **75**(6): 767-773.
- Han, Q., D. Liu, M. Convertino, Z. Wang, C. Jiang, Y. H. Kim, X. Luo, X. Zhang, A. Nackley, N. V. Dokholyan and R. R. Ji (2018). "miRNA-711 Binds and Activates TRPA1 Extracellularly to Evoke Acute and Chronic Pruritus." *Neuron* **99**(3): 449-463 e446.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." *Cell* **144**(5): 646-674.

- He, L. and G. J. Hannon (2004). "MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation." Nat Rev Genet **5**(7): 522-531.
- He, L., X. He, L. P. Lim, E. de Stanchina, Z. Xuan, Y. Liang, W. Xue, L. Zender, J. Magnus, D. Ridzon, A. L. Jackson, P. S. Linsley, C. Chen, S. W. Lowe, M. A. Cleary and G. J. Hannon (2007). "A microRNA component of the p53 tumour suppressor network." Nature **447**(7148): 1130-1134.
- He, L., J. M. Thomson, M. T. Hemann, E. Hernando-Monge, D. Mu, S. Goodson, S. Powers, C. Cordon-Cardo, S. W. Lowe, G. J. Hannon and S. M. Hammond (2005). "A microRNA polycistron as a potential human oncogene." Nature **435**(7043): 828-833.
- Hermeking, H. (2007). "p53 enters the microRNA world." Cancer Cell **12**(5): 414-418.
- Huang, X., S. Schwind, B. Yu, R. Santhanam, H. Wang, P. Hoellerbauer, A. Mims, R. Klisovic, A. R. Walker, K. K. Chan, W. Blum, D. Perrotti, J. C. Byrd, C. D. Bloomfield, M. A. Caligiuri, R. J. Lee, R. Garzon, N. Muthusamy, L. J. Lee and G. Marcucci (2013). "Targeted delivery of microRNA-29b by transferrin-conjugated anionic lipopolyplex nanoparticles: a novel therapeutic strategy in acute myeloid leukemia." Clin Cancer Res **19**(9): 2355-2367.
- Huet, D., M. Bagot, D. Loyaux, J. Capdevielle, L. Conraux, P. Ferrara, A. Bensussan and A. Marie-Cardine (2006). "SC5 mAb represents a unique tool for the detection of extracellular vimentin as a specific marker of Sezary cells." J Immunol **176**(1): 652-659.
- Huskova, H., K. Korecka, J. Karban, J. Vargova, K. Vargova, N. Dusilkova, M. Trneny and T. Stopka (2015). "Oncogenic microRNA-155 and its target PU.1: an integrative gene expression study in six of the most prevalent lymphomas." Int J Hematol **102**(4): 441-450.
- Chen, J., W. X. Li, D. Xie, J. R. Peng and S. W. Ding (2004). "Viral virulence protein suppresses RNA silencing-mediated defense but upregulates the role of microRNA in host gene expression." Plant Cell **16**(5): 1302-1313.
- Chen, X., Y. Ba, L. Ma, X. Cai, Y. Yin, K. Wang, J. Guo, Y. Zhang, J. Chen, X. Guo, Q. Li, X. Li, W. Wang, Y. Zhang, J. Wang, X. Jiang, Y. Xiang, C. Xu, P. Zheng, J. Zhang, R. Li, H. Zhang, X. Shang, T. Gong, G. Ning, J. Wang, K. Zen, J. Zhang and C. Y. Zhang (2008). "Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases." Cell Res **18**(10): 997-1006.
- Chim, C. S., K. Y. Wong, C. Y. Leung, L. P. Chung, P. K. Hui, S. Y. Chan and L. Yu (2011). "Epigenetic inactivation of the hsa-miR-203 in haematological malignancies." J Cell Mol Med **15**(12): 2760-2767.
- Chim, S. S., T. K. Shing, E. C. Hung, T. Y. Leung, T. K. Lau, R. W. Chiu and Y. M. Lo (2008). "Detection and characterization of placental microRNAs in maternal plasma." Clin Chem **54**(3): 482-490.
- Chooi, Y. H., D. M. Stalker, M. A. Davis, I. Fujii, J. A. Elix, S. H. Louwhoff and A. C. Lawrie (2008). "Cloning and sequence characterization of a non-reducing polyketide synthase gene from the lichen *Xanthoparmelia semiviridis*." Mycol Res **112**(Pt 2): 147-161.
- Iliopoulos, D., S. A. Jaeger, H. A. Hirsch, M. L. Bulyk and K. Struhl (2010). "STAT3 activation of miR-21 and miR-181b-1 via PTEN and CYLD are part of the epigenetic switch linking inflammation to cancer." Mol Cell **39**(4): 493-506.
- Iorio, M. V. and C. M. Croce (2017). "MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review." EMBO Mol Med **9**(6): 852.
- Iorio, M. V., M. Ferracin, C. G. Liu, A. Veronese, R. Spizzo, S. Sabbioni, E. Magri, M. Pedriali, M. Fabbri, M. Campiglio, S. Menard, J. P. Palazzo, A. Rosenberg, P. Musiani, S. Volinia, I.

- Nenci, G. A. Calin, P. Querzoli, M. Negrini and C. M. Croce (2005). "MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer." Cancer Res **65**(16): 7065-7070.
- Jiang, S., H. W. Zhang, M. H. Lu, X. H. He, Y. Li, H. Gu, M. F. Liu and E. D. Wang (2010). "MicroRNA-155 functions as an OncomiR in breast cancer by targeting the suppressor of cytokine signaling 1 gene." Cancer Res **70**(8): 3119-3127.
- Jin, H. Y., H. Oda, M. Lai, R. L. Skalsky, K. Bethel, J. Shepherd, S. G. Kang, W. H. Liu, M. Sabouri-Ghomi, B. R. Cullen, K. Rajewsky and C. Xiao (2013). "MicroRNA-17~92 plays a causative role in lymphomagenesis by coordinating multiple oncogenic pathways." EMBO J **32**(17): 2377-2391.
- Johnson, L. D. S., S. Banerjee, O. Kruglov, N. N. Viller, S. M. Horwitz, A. Lesokhin, J. Zain, C. Querfeld, R. Chen, C. Okada, A. Sawas, O. A. O'Connor, E. L. Sievers, Y. Shou, R. A. Uger, M. Wong and O. E. Akilov (2019). "Targeting CD47 in Sezary syndrome with SIRPalphFc." Blood Adv **3**(7): 1145-1153.
- Jones, D., N. H. Dang, M. Duvic, L. T. Washington and Y. O. Huh (2001). "Absence of CD26 expression is a useful marker for diagnosis of T-cell lymphoma in peripheral blood." Am J Clin Pathol **115**(6): 885-892.
- Joshi, D., S. Chandrakala, S. Korgaonkar, K. Ghosh and B. R. Vundinti (2014). "Down-regulation of miR-199b associated with imatinib drug resistance in 9q34.1 deleted BCR/ABL positive CML patients." Gene **542**(2): 109-112.
- Juliusson, G. and R. Hough (2016). "Leukemia." Prog Tumor Res **43**: 87-100.
- Karenko, L., S. Sarna, M. Kahkonen and A. Ranki (2003). "Chromosomal abnormalities in relation to clinical disease in patients with cutaneous T-cell lymphoma: a 5-year follow-up study." Br J Dermatol **148**(1): 55-64.
- Kaur, G., V. Ruhela, L. Rani, A. Gupta, K. Sriram, A. Gogia, A. Sharma, L. Kumar and R. Gupta (2020). "RNA-Seq profiling of deregulated miRs in CLL and their impact on clinical outcome." Blood Cancer J **10**(1): 6.
- Kim, E. J., S. Hess, S. K. Richardson, S. Newton, L. C. Showe, B. M. Benoit, R. Ubriani, C. C. Vittorio, J. M. Junkins-Hopkins, M. Wysocka and A. H. Rook (2005). "Immunopathogenesis and therapy of cutaneous T cell lymphoma." J Clin Invest **115**(4): 798-812.
- Kim, J. and J. G. Krueger (2015). "The immunopathogenesis of psoriasis." Dermatol Clin **33**(1): 13-23.
- Klemke, C. D., D. Brenner, E. M. Weiss, M. Schmidt, M. Leverkus, K. Gulow and P. H. Krammer (2009). "Lack of T-cell receptor-induced signaling is crucial for CD95 ligand up-regulation and protects cutaneous T-cell lymphoma cells from activation-induced cell death." Cancer Res **69**(10): 4175-4183.
- Knobler, R. M., F. Trautinger, T. Radaszkiewicz, E. M. Kokoschka and M. Micksche (1991). "Treatment of cutaneous T cell lymphoma with a combination of low-dose interferon alfa-2b and retinoids." J Am Acad Dermatol **24**(2 Pt 1): 247-252.
- Kohnken, R., J. Wen, B. Mundy-Bosse, K. McConnell, A. Keiter, L. Grinshpun, A. Hartlage, M. Yano, B. McNeil, N. Chakravarti, B. William, J. E. Bradner, M. A. Caligiuri, P. Porcu and A. Mishra (2018). "Diminished microRNA-29b level is associated with BRD4-mediated activation of oncogenes in cutaneous T-cell lymphoma." Blood **131**(7): 771-781.
- Kopp, K. L., U. Ralfkiaer, L. M. Gjerdrum, R. Helvad, I. H. Pedersen, T. Litman, L. Jonson, P. H. Hagedorn, T. Krejsgaard, R. Gniadecki, C. M. Bonefeld, L. Skov, C. Geisler, M. A. Wasik,

- E. Ralfkiaer, N. Odum and A. Woetmann (2013). "STAT5-mediated expression of oncogenic miR-155 in cutaneous T-cell lymphoma." *Cell Cycle* **12**(12): 1939-1947.
- Kopp, K. L., U. Ralfkiaer, B. S. Nielsen, R. Gniadecki, A. Woetmann, N. Odum and E. Ralfkiaer (2013). "Expression of miR-155 and miR-126 in situ in cutaneous T-cell lymphoma." *APMIS* **121**(11): 1020-1024.
- Lagos-Quintana, M., R. Rauhut, W. Lendeckel and T. Tuschl (2001). "Identification of novel genes coding for small expressed RNAs." *Science* **294**(5543): 853-858.
- Landau, D. A. and C. J. Wu (2013). "Chronic lymphocytic leukemia: molecular heterogeneity revealed by high-throughput genomics." *Genome Med* **5**(5): 47.
- Lau, N. C., L. P. Lim, E. G. Weinstein and D. P. Bartel (2001). "An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*." *Science* **294**(5543): 858-862.
- Lawrie, C. H., R. Shilling, X. Troussard, H. Cattan, H. Mossafa, F. Pezzella, J. Boulwood, J. S. Wainscoat and C. S. Hatton (2009). "Expression profiling of persistent polyclonal B-cell lymphocytosis suggests constitutive expression of the AP-1 transcription complex and downregulation of Fas-apoptotic and TGFbeta signalling pathways." *Leukemia* **23**(3): 581-583.
- Lawrie, C. H., S. Soneji, T. Marafioti, C. D. Cooper, S. Palazzo, J. C. Paterson, H. Cattan, T. Enver, R. Mager, J. Boulwood, J. S. Wainscoat and C. S. Hatton (2007). "MicroRNA expression distinguishes between germinal center B cell-like and activated B cell-like subtypes of diffuse large B cell lymphoma." *Int J Cancer* **121**(5): 1156-1161.
- Lee, R. C. and V. Ambros (2001). "An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*." *Science* **294**(5543): 862-864.
- Lee, R. C., R. L. Feinbaum and V. Ambros (1993). "The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*." *Cell* **75**(5): 843-854.
- Lenz, G., G. W. Wright, N. C. Emre, H. Kohlhammer, S. S. Dave, R. E. Davis, S. Carty, L. T. Lam, A. L. Shaffer, W. Xiao, J. Powell, A. Rosenwald, G. Ott, H. K. Muller-Hermelink, R. D. Gascoyne, J. M. Connors, E. Campo, E. S. Jaffe, J. Delabie, E. B. Smeland, L. M. Rimsza, R. I. Fisher, D. D. Weisenburger, W. C. Chan and L. M. Staudt (2008). "Molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma arise by distinct genetic pathways." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(36): 13520-13525.
- Lewis, B. P., C. B. Burge and D. P. Bartel (2005). "Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets." *Cell* **120**(1): 15-20.
- Li, S., C. Yang, L. Zhai, W. Zhang, J. Yu, F. Gu, R. Lang, Y. Fan, M. Gong, X. Zhang and L. Fu (2012). "Deep sequencing reveals small RNA characterization of invasive micropapillary carcinomas of the breast." *Breast Cancer Res Treat* **136**(1): 77-87.
- Litvinov, I. V., B. Cordeiro, S. Fredholm, N. Odum, H. Zargham, Y. Huang, Y. Zhou, K. Pehr, T. S. Kupper, A. Woetmann and D. Sasseville (2014). "Analysis of STAT4 expression in cutaneous T-cell lymphoma (CTCL) patients and patient-derived cell lines." *Cell Cycle* **13**(18): 2975-2982.
- Lodygin, D., V. Tarasov, A. Epanchintsev, C. Berking, T. Knyazeva, H. Korner, P. Knyazev, J. Diebold and H. Hermeking (2008). "Inactivation of miR-34a by aberrant CpG methylation in multiple types of cancer." *Cell Cycle* **7**(16): 2591-2600.
- Lu, D., R. Nakagawa, S. Lazzaro, P. Staudacher, C. Abreu-Goodger, T. Henley, S. Boiani, R. Leyland, A. Galloway, S. Andrews, G. Butcher, S. L. Nutt, M. Turner and E. Vigorito (2014).

- "The miR-155-PU.1 axis acts on Pax5 to enable efficient terminal B cell differentiation." J Exp Med **211**(11): 2183-2198.
- Luan, C., Z. Yang and B. Chen (2015). "The functional role of microRNA in acute lymphoblastic leukemia: relevance for diagnosis, differential diagnosis, prognosis, and therapy." Onco Targets Ther **8**: 2903-2914.
- Malek, M., J. Glen, K. Rebala, A. Kowalczyk, M. Sobjanek, R. Nowicki, K. Ruckemann-Dziurdzinska and M. Sokolowska-Wojdylo (2015). "IL-31 does not correlate to pruritus related to early stage cutaneous T-cell lymphomas but is involved in pathogenesis of the disease." Acta Derm Venereol **95**(3): 283-288.
- Manfe, V., E. Biskup, A. Willumsgaard, A. G. Skov, D. Palmieri, P. Gasparini, A. Lagana, A. Woetmann, N. Odum, C. M. Croce and R. Gniadecki (2013). "cMyc/miR-125b-5p signalling determines sensitivity to bortezomib in preclinical model of cutaneous T-cell lymphomas." PLoS One **8**(3): e59390.
- Manso, R., N. Martinez-Magunacelaya, I. Erana-Tomas, V. Monsalvez, J. L. Rodriguez-Peralto, P. L. Ortiz-Romero, C. Santonja, I. Cristobal, M. A. Piris and S. M. Rodriguez-Pinilla (2018). "Mycosis fungoides progression could be regulated by microRNAs." PLoS One **13**(6): e0198477.
- Marstrand, T., C. B. Ahler, U. Ralfkiaer, A. Clemmensen, K. L. Kopp, N. A. Sibbesen, T. Krejsgaard, T. Litman, M. A. Wasik, C. M. Bonefeld, K. Gronbaek, L. M. Gjerdum, R. Gniadecki, E. Ralfkiaer, C. Geisler, A. Woetmann, M. A. Ropke, C. Glue, L. Skov and N. Odum (2014). "Validation of a diagnostic microRNA classifier in cutaneous T-cell lymphomas." Leuk Lymphoma **55**(4): 957-958.
- McGinnis, K. S., M. Shapiro, C. C. Vittorio, A. H. Rook and J. M. Junkins-Hopkins (2003). "Psoralen plus long-wave UV-A (PUVA) and bexarotene therapy: An effective and synergistic combined adjunct to therapy for patients with advanced cutaneous T-cell lymphoma." Arch Dermatol **139**(6): 771-775.
- McGirt, L. Y., C. M. Adams, D. A. Baerenwald, J. P. Zwerner, J. A. Zic and C. M. Eischen (2014). "miR-223 regulates cell growth and targets proto-oncogenes in mycosis fungoides/cutaneous T-cell lymphoma." J Invest Dermatol **134**(4): 1101-1107.
- McGirt, L. Y., D. A. Baerenwald, E. C. Vonderheid and C. M. Eischen (2015). "Early changes in miRNA expression are predictive of response to extracorporeal photopheresis in cutaneous T-cell lymphoma." J Eur Acad Dermatol Venereol **29**(11): 2269-2271.
- Merritt, W. M., Y. G. Lin, L. Y. Han, A. A. Kamat, W. A. Spannuth, R. Schmandt, D. Urbauer, L. A. Pennacchio, J. F. Cheng, A. M. Nick, M. T. Deavers, A. Mourad-Zeidan, H. Wang, P. Mueller, M. E. Lenburg, J. W. Gray, S. Mok, M. J. Birrer, G. Lopez-Berestein, R. L. Coleman, M. Bar-Eli and A. K. Sood (2008). "Dicer, Drosha, and outcomes in patients with ovarian cancer." N Engl J Med **359**(25): 2641-2650.
- Metzler, M., M. Wilda, K. Busch, S. Viehmann and A. Borkhardt (2004). "High expression of precursor microRNA-155/BIC RNA in children with Burkitt lymphoma." Genes Chromosomes Cancer **39**(2): 167-169.
- Mi, S., J. Lu, M. Sun, Z. Li, H. Zhang, M. B. Neilly, Y. Wang, Z. Qian, J. Jin, Y. Zhang, S. K. Bohlander, M. M. Le Beau, R. A. Larson, T. R. Golub, J. D. Rowley and J. Chen (2007). "MicroRNA expression signatures accurately discriminate acute lymphoblastic leukemia from acute myeloid leukemia." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(50): 19971-19976.
- Mirvish, J. J., R. G. Pomerantz, L. D. Faló, Jr. and L. J. Geskin (2013). "Role of infectious agents in cutaneous T-cell lymphoma: facts and controversies." Clin Dermatol **31**(4): 423-431.

- Mitchell, P. S., R. K. Parkin, E. M. Kroh, B. R. Fritz, S. K. Wyman, E. L. Pogosova-Agadjanian, A. Peterson, J. Noteboom, K. C. O'Briant, A. Allen, D. W. Lin, N. Urban, C. W. Drescher, B. S. Knudsen, D. L. Stirewalt, R. Gentleman, R. L. Vessella, P. S. Nelson, D. B. Martin and M. Tewari (2008). "Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(30): 10513-10518.
- Moyal, L., A. Barzilai, B. Gorovitz, A. Hirshberg, N. Amariglio, J. Jacob-Hirsch, L. Maron, M. Feinmesser and E. Hodak (2013). "miR-155 is involved in tumor progression of mycosis fungoides." *Exp Dermatol* **22**(6): 431-433.
- Mraz, M., L. Chen, L. Z. Rassenti, E. M. Ghia, H. Li, K. Jepsen, E. N. Smith, K. Messer, K. A. Frazer and T. J. Kipps (2014). "miR-150 influences B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia by regulating expression of GAB1 and FOXP1." *Blood* **124**(1): 84-95.
- Netchiporouk, E., I. V. Litvinov, L. Moreau, M. Gilbert, D. Sasseville and M. Duvic (2014). "Deregulation in STAT signaling is important for cutaneous T-cell lymphoma (CTCL) pathogenesis and cancer progression." *Cell Cycle* **13**(21): 3331-3335.
- Newman, M. A., J. M. Thomson and S. M. Hammond (2008). "Lin-28 interaction with the Let-7 precursor loop mediates regulated microRNA processing." *RNA* **14**(8): 1539-1549.
- Ning, M. S. and T. Andl (2015). "Concise review: custodians of the transcriptome: how microRNAs guard stemness in squamous epithelia." *Stem Cells* **33**(4): 1047-1054.
- Nishimura, T., M. Nakui, M. Sato, K. Iwakabe, H. Kitamura, M. Sekimoto, A. Ohta, T. Koda and S. Nishimura (2000). "The critical role of Th1-dominant immunity in tumor immunology." *Cancer Chemother Pharmacol* **46 Suppl**: S52-61.
- Ohmatsu, H., M. Sugaya, H. Suga, S. Morimura, T. Miyagaki, H. Kai, S. Kagami, H. Fujita, Y. Asano, Y. Tada, T. Kadono and S. Sato (2012). "Serum IL-31 levels are increased in patients with cutaneous T-cell lymphoma." *Acta Derm Venereol* **92**(3): 282-283.
- Olsen, E., E. Vonderheid, N. Pimpinelli, R. Willemze, Y. Kim, R. Knobler, H. Zackheim, M. Duvic, T. Estrach, S. Lamberg, G. Wood, R. Dummer, A. Ranki, G. Burg, P. Heald, M. Pittelkow, M. G. Bernengo, W. Sterry, L. Laroche, F. Trautinger, S. Whittaker and Iscl/Eortc (2007). "Revisions to the staging and classification of mycosis fungoides and Sezary syndrome: a proposal of the International Society for Cutaneous Lymphomas (ISCL) and the cutaneous lymphoma task force of the European Organization of Research and Treatment of Cancer (EORTC)." *Blood* **110**(6): 1713-1722.
- Olsen, E. A., A. H. Rook, J. Zic, Y. Kim, P. Porcu, C. Querfeld, G. Wood, M. F. Demierre, M. Pittelkow, L. D. Wilson, L. Pinter-Brown, R. Advani, S. Parker, E. J. Kim, J. M. Junkins-Hopkins, F. Foss, P. Cacchio and M. Duvic (2011). "Sezary syndrome: immunopathogenesis, literature review of therapeutic options, and recommendations for therapy by the United States Cutaneous Lymphoma Consortium (USCLC)." *J Am Acad Dermatol* **64**(2): 352-404.
- Ory, B., M. R. Ramsey, C. Wilson, D. D. Vadysirisack, N. Forster, J. W. Rocco, S. M. Rothenberg and L. W. Ellisen (2011). "A microRNA-dependent program controls p53-independent survival and chemosensitivity in human and murine squamous cell carcinoma." *J Clin Invest* **121**(2): 809-820.
- Papadimitriou, E., E. Vasilaki, C. Vorvis, D. Iliopoulos, A. Moustakas, D. Kardassis and C. Stournaras (2012). "Differential regulation of the two RhoA-specific GEF isoforms Net1/Net1A by TGF-beta and miR-24: role in epithelial-to-mesenchymal transition." *Oncogene* **31**(23): 2862-2875.
- Polli, M., A. Dakic, A. Light, L. Wu, D. M. Tarlinton and S. L. Nutt (2005). "The development of functional B lymphocytes in conditional PU.1 knock-out mice." *Blood* **106**(6): 2083-2090.

- Puiggros, A., G. Blanco and B. Espinet (2014). "Genetic abnormalities in chronic lymphocytic leukemia: where we are and where we go." Biomed Res Int **2014**: 435983.
- Pulitzer, M. (2017). "Cutaneous T-cell Lymphoma." Clin Lab Med **37**(3): 527-546.
- Pulitzer, M. P., P. Horna and J. Almeida (2021). "Sezary syndrome and mycosis fungoides: An overview, including the role of immunophenotyping." Cytometry B Clin Cytom **100**(2): 132-138.
- Ralfkiaer, U., P. H. Hagedorn, N. Bangsgaard, M. B. Lovendorf, C. B. Ahler, L. Svensson, K. L. Kopp, M. T. Vennegaard, B. Lauenborg, J. R. Zibert, T. Krejsgaard, C. M. Bonefeld, R. Sokilde, L. M. Gjerdrum, T. Labuda, A. M. Mathiesen, K. Gronbaek, M. A. Wasik, M. Sokolowska-Wojdylo, C. Queille-Roussel, R. Gniadecki, E. Ralfkiaer, C. Geisler, T. Litman, A. Woetmann, C. Glue, M. A. Ropke, L. Skov and N. Odum (2011). "Diagnostic microRNA profiling in cutaneous T-cell lymphoma (CTCL)." Blood **118**(22): 5891-5900.
- Ralfkiaer, U., L. M. Lindahl, T. Litman, L. M. Gjerdrum, C. B. Ahler, R. Gniadecki, T. Marstrand, S. Fredholm, L. Iversen, M. A. Wasik, C. M. Bonefeld, C. Geisler, T. Krejsgaard, C. Glue, M. A. Ropke, A. Woetmann, L. Skov, K. Gronbaek and N. Odum (2014). "MicroRNA expression in early mycosis fungoides is distinctly different from atopic dermatitis and advanced cutaneous T-cell lymphoma." Anticancer Res **34**(12): 7207-7217.
- Reinhart, B. J., F. J. Slack, M. Basson, A. E. Pasquinelli, J. C. Bettinger, A. E. Rougvie, H. R. Horvitz and G. Ruvkun (2000). "The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*." Nature **403**(6772): 901-906.
- Rosenfeld, N., R. Aharonov, E. Meiri, S. Rosenwald, Y. Spector, M. Zepeniuk, H. Benjamin, N. Shabes, S. Tabak, A. Levy, D. Lebanony, Y. Goren, E. Silberschein, N. Targan, A. Ben-Ari, S. Gilad, N. Sion-Vardy, A. Tobar, M. Feinmesser, O. Kharenko, O. Nativ, D. Nass, M. Perelman, A. Yosepovich, B. Shalmon, S. Polak-Charcon, E. Fridman, A. Avniel, I. Bentwich, Z. Bentwich, D. Cohen, A. Chajut and I. Barshack (2008). "MicroRNAs accurately identify cancer tissue origin." Nat Biotechnol **26**(4): 462-469.
- Saulite, I., D. Ignatova, Y. T. Chang, C. Fassnacht, F. Dimitriou, E. Varypataki, F. Anzengruber, M. Nageli, A. Cozzio, R. Dummer, J. Scarisbrick, S. Pascolo, W. Hoetzenecker, M. Bobrowicz and E. Guenova (2020). "Blockade of programmed cell death protein 1 (PD-1) in Sezary syndrome reduces Th2 phenotype of non-tumoral T lymphocytes but may enhance tumor proliferation." Oncoimmunology **9**(1): 1738797.
- Shapiro, M., A. H. Rook, M. S. Lehrer, J. M. Junkins-Hopkins, L. E. French and C. C. Vittorio (2002). "Novel multimodality biologic response modifier therapy, including bexarotene and long-wave ultraviolet A for a patient with refractory stage IVa cutaneous T-cell lymphoma." J Am Acad Dermatol **47**(6): 956-961.
- Schroers, R., F. Griesinger, L. Trumper, D. Haase, B. Kulle, L. Klein-Hitpass, L. Sellmann, U. Dührsen and J. Durig (2005). "Combined analysis of ZAP-70 and CD38 expression as a predictor of disease progression in B-cell chronic lymphocytic leukemia." Leukemia **19**(5): 750-758.
- Schwarzenbach, H. (2013). "Circulating nucleic acids as biomarkers in breast cancer." Breast Cancer Res **15**(5): 211.
- Si, W., J. Shen, H. Zheng and W. Fan (2019). "The role and mechanisms of action of microRNAs in cancer drug resistance." Clin Epigenetics **11**(1): 25.
- Sibbesen, N. A., K. L. Kopp, I. V. Litvinov, L. Jonson, A. Willerslev-Olsen, S. Fredholm, D. L. Petersen, C. Nastasi, T. Krejsgaard, L. M. Lindahl, R. Gniadecki, N. P. Mongan, D. Sasseville, M. A. Wasik, L. Iversen, C. M. Bonefeld, C. Geisler, A. Woetmann and N. Odum

- (2015). "Jak3, STAT3, and STAT5 inhibit expression of miR-22, a novel tumor suppressor microRNA, in cutaneous T-Cell lymphoma." *Oncotarget* **6**(24): 20555-20569.
- Sochor, M., P. Basova, M. Pesta, N. Dusilkova, J. Bartos, P. Burda, V. Pospisil and T. Stopka (2014). "Oncogenic microRNAs: miR-155, miR-19a, miR-181b, and miR-24 enable monitoring of early breast cancer in serum." *BMC Cancer* **14**: 448.
- Sommer, V. H., O. J. Clemmensen, O. Nielsen, M. Wasik, P. Lovato, C. Brender, K. W. Eriksen, A. Woetmann, C. G. Kaestel, M. H. Nissen, C. Ropke, S. Skov and N. Odum (2004). "In vivo activation of STAT3 in cutaneous T-cell lymphoma. Evidence for an antiapoptotic function of STAT3." *Leukemia* **18**(7): 1288-1295.
- Song, J., Z. Bai, W. Han, J. Zhang, H. Meng, J. Bi, X. Ma, S. Han and Z. Zhang (2012). "Identification of suitable reference genes for qPCR analysis of serum microRNA in gastric cancer patients." *Dig Dis Sci* **57**(4): 897-904.
- Song, W. F., L. Wang, W. Y. Huang, X. Cai, J. J. Cui and L. W. Wang (2013). "MiR-21 upregulation induced by promoter zone histone acetylation is associated with chemoresistance to gemcitabine and enhanced malignancy of pancreatic cancer cells." *Asian Pac J Cancer Prev* **14**(12): 7529-7536.
- Sonkoly, E., T. Wei, P. C. Janson, A. Saaf, L. Lundeberg, M. Tengvall-Linder, G. Norstedt, H. Alenius, B. Homey, A. Scheynius, M. Stahle and A. Pivarcsi (2007). "MicroRNAs: novel regulators involved in the pathogenesis of psoriasis?" *PLoS One* **2**(7): e610.
- Sun, Y., M. Wang, G. Lin, S. Sun, X. Li, J. Qi and J. Li (2012). "Serum microRNA-155 as a potential biomarker to track disease in breast cancer." *PLoS One* **7**(10): e47003.
- Thumann, P., M. Luftl, I. Moc, M. Bagot, A. Bensussan, G. Schuler and L. Jenne (2003). "Interaction of cutaneous lymphoma cells with reactive T cells and dendritic cells: implications for dendritic cell-based immunotherapy." *Br J Dermatol* **149**(6): 1128-1142.
- Tietsche de Moraes Hungria, V., C. Chiattonne, M. Pavlovsky, L. M. Abenoza, G. P. Agreda, J. Armenta, C. Arrais, O. Avendano Flores, F. Barroso, A. L. Basquiera, C. Cao, M. S. Cugliari, A. Enrico, L. M. Fogliatto, K. M. Galvez, D. Gomez, A. Gomez, D. de Iracema, D. Farias, L. Lopez, W. A. Mantilla, D. Martinez, M. J. Mela, C. E. Miguel, R. Ovilla, L. Palmer, C. Pavlovsky, C. Ramos, G. Remaggi, R. Santucci, S. Schusterschitz, C. L. Sossa, E. Tuna-Aguilar, J. Vela, T. Santos, O. de la Mora, G. Machnicki, M. Fernandez and P. Barreyro (2019). "Epidemiology of Hematologic Malignancies in Real-World Settings: Findings From the Hemato-Oncology Latin America Observational Registry Study." *J Glob Oncol* **5**: 1-19.
- Torlakovic, E. E., N. Bilalovic, R. Golouh, A. Zidar and S. Angel (2006). "Prognostic significance of PU.1 in follicular lymphoma." *J Pathol* **209**(3): 352-359.
- Tran, M. N., W. Choi, M. F. Wszolek, N. Navai, I. L. Lee, G. Nitti, S. Wen, E. R. Flores, A. Siefker-Radtke, B. Czerniak, C. Dinney, M. Barton and D. J. McConkey (2013). "The p63 protein isoform DeltaNp63alpha inhibits epithelial-mesenchymal transition in human bladder cancer cells: role of MIR-205." *J Biol Chem* **288**(5): 3275-3288.
- Turchinovich, A., L. Weiz, A. Langheinze and B. Burwinkel (2011). "Characterization of extracellular circulating microRNA." *Nucleic Acids Res* **39**(16): 7223-7233.
- Umezumi, T., K. Ohayashiki, M. Kuroda and J. H. Ohayashiki (2013). "Leukemia cell to endothelial cell communication via exosomal miRNAs." *Oncogene* **32**(22): 2747-2755.
- Valadi, H., K. Ekstrom, A. Bossios, M. Sjostrand, J. J. Lee and J. O. Lotvall (2007). "Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells." *Nat Cell Biol* **9**(6): 654-659.

- van Kester, M. S., E. Ballabio, M. F. Benner, X. H. Chen, N. J. Saunders, L. van der Fits, R. van Doorn, M. H. Vermeer, R. Willemze, C. P. Tensen and C. H. Lawrie (2011). "miRNA expression profiling of mycosis fungoides." Mol Oncol **5**(3): 273-280.
- Vargova, J., K. Vargova, N. Dusilkova, V. Kulvait, V. Pospisil, J. Zavadil, M. Trneny, P. Klener and T. Stopka (2016). "Differential expression, localization and activity of MARCKS between mantle cell lymphoma and chronic lymphocytic leukemia." Blood Cancer J **6**(9): e475.
- Vargova, K., N. Curik, P. Burda, P. Basova, V. Kulvait, V. Pospisil, F. Savvulidi, J. Kokavec, E. Necas, A. Berkova, P. Obrtlíkova, J. Karban, M. Mraz, S. Pospisilova, J. Mayer, M. Trneny, J. Zavadil and T. Stopka (2011). "MYB transcriptionally regulates the miR-155 host gene in chronic lymphocytic leukemia." Blood **117**(14): 3816-3825.
- Vargova, K., M. Pesta, P. Obrtlíkova, N. Dusilkova, L. Minarik, J. Vargova, A. Berkova, Z. Zemanova, K. Michalova, M. Spacek, M. Trneny and T. Stopka (2017). "MiR-155/miR-150 network regulates progression through the disease phases of chronic lymphocytic leukemia." Blood Cancer J **7**(7): e585.
- Vasudevan, S., Y. Tong and J. A. Steitz (2007). "Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation." Science **318**(5858): 1931-1934.
- Vieyra-Garcia, P., J. D. Crouch, J. T. O'Malley, E. W. Seger, C. H. Yang, J. E. Teague, A. M. Vromans, A. Gehad, T. S. Win, Z. Yu, E. L. Lowry, J. I. Na, A. H. Rook, P. Wolf and R. A. Clark (2019). "Benign T cells drive clinical skin inflammation in cutaneous T cell lymphoma." JCI Insight **4**(1).
- Vigorito, E., K. L. Perks, C. Abreu-Goodger, S. Bunting, Z. Xiang, S. Kohlhaas, P. P. Das, E. A. Miska, A. Rodriguez, A. Bradley, K. G. Smith, C. Rada, A. J. Enright, K. M. Toellner, I. C. MacLennan and M. Turner (2007). "microRNA-155 regulates the generation of immunoglobulin class-switched plasma cells." Immunity **27**(6): 847-859.
- Vonderheid, E. C., M. G. Bernengo, G. Burg, M. Duvic, P. Heald, L. Laroche, E. Olsen, M. Pittelkow, R. Russell-Jones, M. Takigawa, R. Willemze and Iscl (2002). "Update on erythrodermic cutaneous T-cell lymphoma: report of the International Society for Cutaneous Lymphomas." J Am Acad Dermatol **46**(1): 95-106.
- Wallace, J. A. and R. M. O'Connell (2017). "MicroRNAs and acute myeloid leukemia: therapeutic implications and emerging concepts." Blood **130**(11): 1290-1301.
- Wilcox, R. A. (2016). "Cutaneous T-cell lymphoma: 2016 update on diagnosis, risk-stratification, and management." Am J Hematol **91**(1): 151-165.
- Willemze, R., E. S. Jaffe, G. Burg, L. Cerroni, E. Berti, S. H. Swerdlow, E. Ralfkiaer, S. Chimenti, J. L. Diaz-Perez, L. M. Duncan, F. Grange, N. L. Harris, W. Kempf, H. Kerl, M. Kurrer, R. Knobler, N. Pimpinelli, C. Sander, M. Santucci, W. Sterry, M. H. Vermeer, J. Wechsler, S. Whittaker and C. J. Meijer (2005). "WHO-EORTC classification for cutaneous lymphomas." Blood **105**(10): 3768-3785.
- Willerslev-Olsen, A., T. B. Buus, C. Nastasi, E. Blumel, M. Gluud, C. M. Bonefeld, C. Geisler, L. M. Lindahl, M. Vermeer, M. A. Wasik, L. Iversen, J. C. Becker, M. H. Andersen, L. M. R. Gjerdrum, I. V. Litvinov, T. Litman, T. Krejsgaard, A. Woetmann and N. Odum (2020). "Staphylococcus aureus enterotoxins induce FOXP3 in neoplastic T cells in Sezary syndrome." Blood Cancer J **10**(5): 57.
- Wu, M., Q. Duan, X. Liu, P. Zhang, Y. Fu, Z. Zhang, L. Liu, J. Cheng and H. Jiang (2020). "MiR-155-5p promotes oral cancer progression by targeting chromatin remodeling gene ARID2." Biomed Pharmacother **122**: 109696.

- Wysocka, M., B. M. Benoit, S. Newton, L. Azzoni, L. J. Montaner and A. H. Rook (2004). "Enhancement of the host immune responses in cutaneous T-cell lymphoma by CpG oligodeoxynucleotides and IL-15." Blood **104**(13): 4142-4149.
- Wysocka, M., M. H. Zaki, L. E. French, J. Chehimi, M. Shapiro, S. E. Everetts, K. S. McGinnis, L. Montaner and A. H. Rook (2002). "Sezary syndrome patients demonstrate a defect in dendritic cell populations: effects of CD40 ligand and treatment with GM-CSF on dendritic cell numbers and the production of cytokines." Blood **100**(9): 3287-3294.
- Xu, C., C. Wan, L. Wang, H. J. Yang, Y. Tang and W. P. Liu (2011). "Diagnostic significance of TCR gene clonal rearrangement analysis in early mycosis fungoides." Chin J Cancer **30**(4): 264-272.
- Xu, L. H., Y. Guo, J. N. Cen, W. Y. Yan, H. L. He, Y. N. Niu, Y. X. Lin, C. S. Chen and S. Y. Hu (2015). "Overexpressed miR-155 is associated with initial presentation and poor outcome in Chinese pediatric acute myeloid leukemia." Eur Rev Med Pharmacol Sci **19**(24): 4841-4850.
- Yang, C., J. Cai, Q. Wang, H. Tang, J. Cao, L. Wu and Z. Wang (2012). "Epigenetic silencing of miR-130b in ovarian cancer promotes the development of multidrug resistance by targeting colony-stimulating factor 1." Gynecol Oncol **124**(2): 325-334.
- Yuan, A., E. L. Farber, A. L. Rapoport, D. Tejada, R. Deniskin, N. B. Akhmedov and D. B. Farber (2009). "Transfer of microRNAs by embryonic stem cell microvesicles." PLoS One **4**(3): e4722.
- Yuki, H., S. Ueno, H. Tatetsu, H. Niino, T. Iino, S. Endo, Y. Kawano, Y. Komohara, M. Takeya, H. Hata, S. Okada, T. Watanabe, K. Akashi, H. Mitsuya and Y. Okuno (2013). "PU.1 is a potent tumor suppressor in classical Hodgkin lymphoma cells." Blood **121**(6): 962-970.
- Zhang, C. and M. Duvic (2003). "Retinoids: therapeutic applications and mechanisms of action in cutaneous T-cell lymphoma." Dermatol Ther **16**(4): 322-330.
- Zhang, C. L., J. Kamarashev, J. Z. Qin, G. Burg, R. Dummer and U. Dobbeling (2003). "Expression of apoptosis regulators in cutaneous T-cell lymphoma (CTCL) cells." J Pathol **200**(2): 249-254.
- Zhang, H., J. H. Yang, Y. S. Zheng, P. Zhang, X. Chen, J. Wu, L. Xu, X. Q. Luo, Z. Y. Ke, H. Zhou, L. H. Qu and Y. Q. Chen (2009). "Genome-wide analysis of small RNA and novel MicroRNA discovery in human acute lymphoblastic leukemia based on extensive sequencing approach." PLoS One **4**(9): e6849.
- Zhao, H., J. Shen, L. Medico, D. Wang, C. B. Ambrosone and S. Liu (2010). "A pilot study of circulating miRNAs as potential biomarkers of early stage breast cancer." PLoS One **5**(10): e13735.
- Zhao, J. J., J. Lin, T. Lwin, H. Yang, J. Guo, W. Kong, S. Dessureault, L. C. Moscinski, D. Rezania, W. S. Dalton, E. Sotomayor, J. Tao and J. Q. Cheng (2010). "microRNA expression profile and identification of miR-29 as a prognostic marker and pathogenetic factor by targeting CDK6 in mantle cell lymphoma." Blood **115**(13): 2630-2639.
- Zhao, Y., C. Deng, W. Lu, J. Xiao, D. Ma, M. Guo, R. R. Recker, Z. Gatalica, Z. Wang and G. G. Xiao (2011). "let-7 microRNAs induce tamoxifen sensitivity by downregulation of estrogen receptor alpha signaling in breast cancer." Mol Med **17**(11-12): 1233-1241.
- Zhu, J. (2010). "Transcriptional regulation of Th2 cell differentiation." Immunol Cell Biol **88**(3): 244-249.

11. Přílohy

11.1.

Plasma miR-155, miR-203, and miR-205 are Biomarkers for Monitoring of Primary Cutaneous T-Cell Lymphomas. Dusilková N, Bašová P, Polívka J, Kodet O, Kulvait V, Pešta M, Trněný M, Stopka T. *Int J Mol Sci.* 2017 Oct 15;18(10):2136. doi: 10.3390/ijms18102136.PMID: 29036928

11.2.

Oncogenic microRNA-155 and its target PU.1: an integrative gene expression study in six of the most prevalent lymphomas. Huskova H, Korecka K, Karban J, Vargova J, Vargova K, **Dusilkova N**, Trneny M, Stopka T. *Int J Hematol.* 2015 Oct;102(4):441-50. doi: 10.1007/s12185-015-1847-4. Epub 2015 Aug 11.PMID: 26261072

11.3.

MiR-155/miR-150 network regulates progression through the disease phases of chronic lymphocytic leukemia. Vargova K, Pesta M, Obrtlíkova P, **Dusilkova N**, Minarik L, Vargova J, Berkova A, Zemanova Z, Michalova K, Spacek M, Trneny M, Stopka T. *Blood Cancer J.* 2017 Jul 21;7(7):e585. doi: 10.1038/bcj.2017.63.PMID: 28731457

11.4.

Oncogenic microRNAs: miR-155, miR-19a, miR-181b, and miR-24 enable monitoring of early breast cancer in serum. Sochor M, Basova P, Pesta M, **Dusilkova N**, Bartos J, Burda P, Pospisil V, Stopka T. *BMC Cancer.* 2014 Jun 18;14:448. doi: 10.1186/1471-2407-14-448.PMID: 24938880