

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra genetiky a virologie



Disertační práce

**MikroRNA v patogenezi AML
MicroRNAs in AML pathogenesis**

Mgr. Linda Koutová

Školitel: Prof. RNDr. Marie Korabečná, Ph.D.

Praha 2019

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 15.3.2019

.....

Mgr. Linda Koutová

Poděkování

Ráda bych zde poděkovala své školitelce, prof. RNDr. Marii Korabečné, Ph.D., za odborné vedení, cenné rady a čas a trpělivost věnovanou této práci. Děkuji Mgr. Monice Štěrbové za spolupráci při laboratorním zpracování vzorků a MUDr. Evě Pazourkové za pomoc při statistickém vyhodnocování získaných dat. Děkuji doc. MUDr. Danielu Lysákovi, Ph.D., za poskytnutí materiálu od pacientů s akutní myeloidní leukemií, léčených na Hematoonkologickém oddělení Fakultní nemocnice v Plzni. A velmi děkuji své rodině za podporu a trpělivost.

Obsah

Abstrakt.....	7
Klíčová slova.....	7
Abstract.....	8
Keywords.....	8
1. Úvod.....	9
2. Současný stav problematiky.....	11
2.1 MikroRNA.....	11
2.1.1 Vznik a funkce miRNA.....	11
2.1.2 MiRNA nomenklatura.....	13
2.1.3 MiRNA v tělních tekutinách.....	13
2.1.4 MiRNA v exosomech.....	14
2.1.5 Zdroje miRNA.....	15
2.2 Akutní myeloidní leukemie.....	15
2.2.1 Výskyt.....	16
2.2.2 Genetické faktory.....	16
2.2.3 Fyzikální a chemické vlivy.....	17
2.2.4 Sekundární AML.....	18
2.2.5 Viry.....	19
2.2.6 Klasifikace AML.....	19
2.2.7 Projevy.....	22
2.2.8 Diagnostika.....	22
2.2.9 Prognostické faktory.....	23
2.2.9.1 Cytogenetické změny.....	24
2.2.9.2 Genové mutace.....	25
2.2.10 Léčba AML.....	30
2.2.11 Transplantace hematopoetických kmenových buněk.....	31
2.2.12 MiRNA a zdravá hematopoéza.....	32
2.2.13 Leukemické kmenové buňky a miRNA.....	34
2.3 Exprese miRNA u AML.....	35
2.3.1 Odlišnosti v miRNA expresi mezi akutní myeloidní a lymfoblastickou leukemií.....	35

2.3.2	Změny v expresi miRNA u AML s různými cytogenetickými změnami.....	36
2.3.3	Změny v expresi miRNA u AML s molekulárně-genetickými přestavbami.....	41
2.3.4	Srovnání exprese miRNA u nemocných s AML a zdravých myeloidních progenitorových (CD34+) buněk.....	44
2.3.5	MiRNA a FAB klasifikace AML, rodina miR-181.....	46
2.3.6	Prognostický význam deregulace miRNA.....	47
2.4	Role makrofágů v patogenezi AML.....	49
3.	Cíle práce.....	50
4.	Materiál a metodika.....	51
4.1	Pacienti.....	51
4.2	Kontrolní vzorky.....	51
4.3	Odběr plazmy.....	52
4.4	Analýza miRNA ve vzorcích.....	52
4.4.1	Izolace RNA ve fázi I.....	52
4.4.2	Reverzní transkripce ve fázi I.....	53
4.4.3	Preamplifikace – fáze I.....	53
4.4.4	Kvantitativní PCR v reálném čase (Real-time PCR) – fáze I.....	53
4.4.5	Analýza dat z TaqMan MicroRNA Array – fáze I.....	54
4.4.6	Izolace RNA – fáze II.....	54
4.4.7	Reverzní transkripce – fáze II.....	54
4.4.8	Real Time PCR – fáze II.....	55
4.4.9	Analýza dat – fáze II.....	55
4.5	Vyhledání miRNA transportovaných do makrofágů z nádorových buněk a analýza jejich cílových genů.....	55
5.	Výsledky.....	57
5.1	Výsledky I. fáze experimentů.....	57
5.2	Výsledky validační – II. Fáze – experimentů.....	59
5.3	Vyhledání validovaných cílových genů pro nalezené abundantní miRNA.....	62
5.4	Vyhledání miRNA, transportovaných z makrofágů do rakovinných buněk či naopak jako součást mikrovesikulů.....	63

5.5 Vyhledání validovaných cílových genů pro exosomální miRNA, vylučovaných rakovinnými buňkami a přijímaných makrofágy.....	63
6. Diskuse.....	65
7. Závěr.....	73
8. Seznam použitých zkratk.....	74
9. Seznam použité literatury.....	77
10. Přílohy.....	102

Abstrakt

Akutní myeloidní leukemie (AML) je značně heterogenní onemocnění, za jehož vznikem leží cytogenetické či molekulárně genetické aberace. Množství těchto změn bylo již odhaleno a jejich detekce je běžnou součástí diagnostického procesu. Mezi méně známé a pro diagnostiku zatím nepoužívané abnormality patří změny expresního profilu malých, nekódujících RNA, tzv. mikroRNA (miRNA). Tyto RNA 19-24 nukleotidů dlouhé se podílejí na regulaci exprese různých genů prostřednictvím komplementární vazby k 3'netranslatovanému konci (3'UTR) cílové messenger RNA (mRNA). Dokážou ovlivňovat klíčové procesy buňky, jako jsou diference, proliferace, apoptóza.

Změny v expresi různých miRNA jsou popsány u odlišných typů nádorových onemocnění. U solidních nádorů jsou obvykle detekovány z biotických vzorků, v současnosti se věnuje velká pozornost vyšetření plazmy jako tzv. tekuté biopsie schopné podat informace o molekulárně genetických dějích v organismu. Nemalé množství studií odhalilo deregulované miRNA v kostní dřeni, plné krvi či izolovaných progenitorových buňkách (CD34+ buňky) pacientů s AML, pouze čtyři studie byly zaměřeny na analýzu plazmy. Zaměřili jsme se na vyšetření plazmy s cílem najít miRNA, jejichž hladiny se výrazně liší při záchytu AML a po prodělané chemoterapii. Z více než 750 testovaných miRNA jsme po validaci výsledků našli 6 miRNA jako výrazně odlišně exprimovaných při prvozáchytu ve srovnání se zdravými kontrolami, jejich hladiny pak korelovaly s vývojem onemocnění.

Dále byly v rámci studia možných mechanismů patogeneze AML studovány také cílové geny miRNA nacházejících se v mikroveziklech uvolňovaných obecně nádorovými buňkami a schopných fúzovat s makrofágy a teoretické možnosti ovlivnění makrofágů těmito miRNA.

Klíčová slova:

Akutní myeloidní leukemie (AML), mikroRNA (miRNA), plazma, chemoterapie

Abstract

Acute myeloid leukemia (AML) is a very heterogeneous disease associated with cytogenetic aberrations and genetic mutations. Many of these changes have been revealed and their detection became usual part of the diagnostic process today. However, changes of expression profiles of small, noncoding RNAs, so called microRNAs (miRNAs), are less known and not used for diagnostics yet. These RNAs, 19-24 nucleotides long, take part in the regulation of expression of different genes through complementary base pairing to the 3' non-translated region (3'UTR) of the target messenger RNA (mRNA). They can influence key processes of the cell, like differentiation, proliferation or apoptosis.

The changes in expression of different miRNAs are known from different types of cancers. In solid tumors, they are usually detected from bioptic samples; but also plasma samples are now in the center of attention as so called liquid biopsies providing the information about molecular genetic events in the organism. Many studies have revealed deregulated miRNAs in the bone marrow, full blood or isolated progenitor cells (CD34+) of AML patients, only four of them have analyzed plasma samples. We focused on the plasma samples and we targeted on such miRNAs, which levels differ at AML diagnosis and after the chemotherapy. Out of more than 750 examined miRNAs, we have found and validated 6 miRNAs differently expressed between the AML patients at diagnosis and healthy controls; their levels also correlated with the disease development.

As a part of study of possible mechanisms of AML pathogenesis, target genes of miRNAs found in microvesicles released by cancer cells and able to fuse with macrophages and theoretical possibility of influencing the macrophages by these miRNAs were also investigated.

Keywords:

Acute myeloid leukemia (AML), microRNA (miRNA), plasma, chemotherapy

1. Úvod

Akutní myeloidní leukemie (AML) je biologicky i geneticky heterogenní onemocnění krvetvorné tkáně, jehož vznik je obvykle zapříčiněn cytogenetickými či molekulárně genetickými abnormalitami. Dochází při něm k maligní transformaci hematopoetické krvetvorné buňky a následně k poruše diferenciaci myeloidních progenitorů a jejich klonální expanzi. Kumulace nezralých buněk a utlačení normální krvetvorby v kostní dřeni vede k souboru příznaků, skrytých pod pojmem hematopoetická insuficience (granulocytopenie, trombocytopenie, anemie, leukocytóza) (Mayer et al., 2016). Bez intenzivní léčby je onemocnění fatální. Dnešní medicína má již mnoho nástrojů k upřesnění rizik a díky tomu se zlepšilo přežití pacientů, nicméně přesto jsou i nadále hledány nástroje ke zpřesnění prognózy i k pochopení procesu vzniku AML.

Při hledání nových biomarkerů je značná pozornost věnována mikroRNA (miRNA), 19-24 nukleotidů dlouhým, nekódujícím RNA, které fungují jako regulátory exprese genů prostřednictvím komplementární vazby k 3'netranslatovanému konci (3'UTR) cílové messenger RNA (mRNA), jsou tedy důležitou součástí epigenetické regulace. Podílejí se na řízení všech klíčových procesů buňky – její proliferaci, metabolismu, průběhu buněčného cyklu, migraci, diferenciaci i apoptóze. Právě podílem na těchto dějích mohou hrát významnou roli i ve vzniku nádorových onemocnění, jak bylo již prokázáno mnoha studiemi (např. Yang et al., 2016; Liu et al., 2014). Vzorky plasmy onkologických pacientů jsou v současnosti nahlíženy jako tzv. tekutá biopsie, v níž je možné zachytit molekulárně genetické změny charakteristické pro nádor pacienta (Montani a Bianchi, 2016).

Tato dizertační práce se zaměřila na expresi extracelulárních miRNA z plazmy pacientů s AML. Dosud se touto problematikou zabývaly pouze čtyři zahraniční studie (Tanaka et al., 2009; Fayyad-Kazan et al., 2013; El-Halawani et al., 2014; Elhamamsy et al., 2017) a žádná z těchto studií nesrovnávala miRNA u stejných pacientů při záchytu jejich onemocnění a po dosažení remise v důsledku chemoterapie.

Pro naši analýzu jsme použili TaqMan® MicroRNA Arrays (Applied Biosystems, USA), díky níž byla kvantifikována exprese více než 750 lidských miRNA pro každý vzorek. Následná analýza a validace získaných dat vedla k nálezu 6 miRNA, jejichž hladiny v plazmě vykazují největší rozdíly před a po chemoterapii a odrážejí tudíž efekt prodělané léčby na molekulární úrovni (Koutová et al., 2015).

V rámci studia možných drah patogeneze AML byly studovány také cílové geny miRNA nacházejících se v mikroveziklech uvolňovaných nádorovými buňkami a schopných

fúzovat s makrofágy a teoretické možnosti ovlivnění makrofágů těmito miRNA (Korabečná et al., 2016). Studium makrofágů nalézajících se v kostní dřeni je na samém začátku. Ukazuje se, že tyto makrofágy nevznikají diferenciacním procesem z myeloidní řady, jak bylo dokázáno u pacientů po transplantacích kostní dřeně, a zároveň hrají zásadní roli v regulaci proliferace a diferenciacních procesů v kostní dřeni (Heideveld a van der Akker, 2017). Regulace prostřednictvím miRNA přijatých formou transportních vezikulů může tedy hrát nečekané role i v procesu karcinogeneze hemoblastóz, zatím však chybí konkrétní důkazy.

2. Současný stav problematiky

2.1 MikroRNA

MikroRNA jsou malé, 19-24 nukleotidů dlouhé nekódující RNA, přítomné v různých buňkách, tkáních a tělních tekutinách. Hrají významnou roli v posttranskripční regulaci genové exprese, jsou součástí epigenetické regulace podobně jako chemické modifikace histonů. Mají velmi důležitou funkci při řízení téměř veškerých dějů v buňce, ovlivňují proliferaci a apoptózu (Brennecke et al., 2003), kontrolu buněčného cyklu, diferenciaci (Esau et al., 2004), migraci a metabolismus, zasahují tedy do všech klíčových procesů vzniku a vývoje nádorových onemocnění. Mnoho detailů jejich funkce je ještě neznámých, nicméně proces vzniku miRNA v buňkách a základní principy jejich funkce už jsou popsány, stejně jako vliv deregulace jejich exprese na rozvoj nádorových onemocnění (Calin et al., 2002). miRNA mohou být z buněk také aktivně či pasivně uvolňovány do tělních tekutin, v nichž můžeme změny exprese miRNA detekovat.

MiRNA byly poprvé objeveny u háďátka *Caenorhabditis elegans* – jako produkty genů *lin-4* a *let-7*, jejichž funkcí je posttranskripční represe cílových genů pomocí komplementárního párování s jejich 3' netranslatovanými regiony (3'UTR) (Lee et al., 1993). Nedlouho poté byly nalezeny stovky dalších miRNA u *C. elegans*, stejně jako u octomilky, rostlin i obratlovců (např. review Carrington a Ambros, 2003).

2.1.1 Vznik a funkce miRNA

Geny pro miRNA jsou transkribovány stejným způsobem, jako protein kódující geny. Geny kódující miRNA se nachází v intergenových oblastech, v exonech, některé také v intronech (exonové/intronové miRNA) (např. Lau et al., 2001). Asi polovina z nich se vyskytuje v clusterech s dalšími miRNA a tvoří polycistronické transkripty, pouze ve velmi vzácných případech jsou transkribovány ze svých vlastních promotorů jako monocistronické.

O jejich transkripci se stará obvyklá RNA polymeráza II (pouze velmi malou část transkribuje RNAPIII) (Lee et al., 2004). Vzniklé pri-miRNA, opatřené 5'-methylguanositovou čepičkou a poly-A koncem a dlouhé až stovky basí (Carthew a Sontheimer, 2009), jsou dále zpracovávány proteinovým komplexem, sestávající u člověka z proteinů Drosha s ribonukleázovou aktivitou a DGCR8 (DiGeorge syndrome Critical Region 8) a proteinů Drosha a Pasha u *Drosophily melanogaster* a *Caenorhabditis elegans* (např. Lee et al., 2003). Tyto vysoce konzervované proteiny společně tvoří tzv.

mikroprocesorový komplex. Rozstípnou duplex pre-miRNA a vytvoří asi 60-70bp dlouhé vlásenky pre-miRNA, které dále přejdou do cytoplazmy (např. Lee et al., 2002). Pre-miRNA jsou dopraveny z jádra do cytoplazmy RanGTP-dependentním jaderným transportním receptorem, exportinem 5 (EXP5) (např. Yi et al., 2003; Zeng a Cullen, 2004). Ten pravděpodobně dokáže rozpoznat ds-RNA vlásenku s převisem na 3'konci, pak naváže pre-miRNA a GTP-vázaný kofaktor Ran. Následná hydrolýza GTP je nezbytným předpokladem dokončení celého procesu.

V cytoplazmě pokračuje proces vyzrávání pre-miRNA. Vysoce konzervovaný protein s endonukleázovou aktivitou, enzym typu RNáza III jménem Dicer (Grishok et al., 2001) stříhá pre-miRNA v kooperaci s dalšími proteiny (RNAi deficient-4 (RDE-1) u *C. elegans*, R2D2, fragile X mental retardation 1 (FMR1) u *D. melanogaster*, Argonaute family (Ago) u dalších organismů) (např. Tabara et al., 2002). Lidský Dicer pracuje spolu s dvěma dalšími proteiny, „trans-activation response RNA-binding“ proteinem (TRBP) a protein-kinázou, zvanou „interferon-inducible double stranded RNA-dependent-activator“ (PRKRA nebo PACT) (Chendrimada et al., 2005; Haase et al., 2005; Lee et al., 2006), které bez Diceru nejsou aktivní. Společně štěpí pre-miRNA na cca 22nt dlouhý miRNA duplex, který je poté umístěn do komplexu proteinů z Ago rodiny, s nimiž vytvoří efektorový komplex – tzv. RISC komplex (RNA-induced silencing komplex) (Maniataki et al., 2005). Obvykle je jedno z vláken poté degradováno („passenger strand“ nebo miRNA*). Druhé vlákno s navázaným Ago proteinem se nazývá „guide strand“ nebo miRNA. Někdy, zdá se, může i tzv. „passenger strand“ zůstat funkční. Které z vláken zůstane funkčním a které bude degradováno, je nejspíše ovlivněno termodynamickou stabilitou konců duplexu (Khvorova et al., 2003). Vzhledem k odlišnostem v expresi miRNA mezi tkáněmi téhož organismu se od označování hvězdičkou upouští a zavádí se jednotné označení buď -3p nebo -5p podle toho, který z konců původního transkriptu dotyčná miRNA obsahuje (Griffiths-Jones, 2010).

Zralá miRNA poté inhibuje translaci genu, k němuž se RISC komplex přiloží na základě částečné komplementarity miRNA a sekvence mRNA cílového genu nejčastěji v 3'-UTR (untranslated, netranslatovaném) regionu. Následkem toho dojde k degradaci a/nebo represi translace daného genu (Lee et al., 1993; Bartel et al., 2009). Cílová mRNA je degradována v případě dokonalé či téměř dokonalé komplementarity mezi mRNA a miRNA (Hutvagner a Zamore, 2002) za přítomnosti proteinu Ago2, který jediný podporuje štěpení (Liu et al., 2004).

Za normální, fyziologické situace jsou miRNA nedílnou a běžnou součástí mnoha drah. Slouží k ovlivňování genové exprese pomocí zpětné vazby, tlumením produkce proteinů. Jedna miRNA může sloužit jako přepínač mezi různými diferenciačními drahami (jak bylo dokázáno v časných studiích na hád'átkách, regulace genu *lin-41* pomocí miRNA *let-7*, Reinhart et al., 2000). Obdobné studie prokázaly tutéž funkci různých miRNA v savčích diferenciačních drahách (za všechny např. Yi et al., 2008). Z těchto a dalších poznatků o miRNA vyplývá, že ztráta funkce miRNA může vést ke zvýšení buněčné mnohotvárnosti, dediferenciaci a vyšší možnosti nádorové transformace buněk. MiRNA také hrají důležitou roli v kmenových buňkách a jejich diferenciaci (Heinrich a Dimmeler, 2012), případně v indukované pluripotenci (miR-302 dokáže z lidských a myších fibroblastů vytvořit indukované pluripotentní kmenové buňky, Anokye-Danso et al., 2011). Souhrnně lze říci, že díky malé změně v souboru miRNA v buňce lze tuto buňku poslat zcela jiným směrem, než který jí byl původně určen, včetně její přeměny v buňku nádorovou (Sotiropoulou et al., 2009).

Dodnes bylo identifikováno asi 1881 lidských miRNA (dle miRBase), přičemž mnoho z nich je konzervováno mezi vzdáleně příbuznými obratlovci i bezobratlými (Griffiths-Jones, 2010). Studie provedená na 13 různých lidských buněčných typech k tomuto číslu přidala dalších 3707 sekvencí zralých miRNA (Londin et al., 2015).

2.1.2 MiRNA nomenklatura

MiRNA mají sekvenční číslování, nově objevená miRNA bude mít další číslo po poslední zaznamenané. První tři písmena názvu označují jméno organismu, poté následuje *mir* jako miRNA a poté pořadové číslo. Hsa-mir-121 je miRNA číslo 121 u člověka *Homo sapiens*. *miR* je název pro zralou miRNA, *mir* pro její gen.

Pro některé miRNA však platí jejich tradiční, historické názvy, jako pro *let-7* nebo *lin-4*, a pro rostlinné miRNA platí poněkud jiná pravidla.

2.1.3 MiRNA v tělních tekutinách

Přítomnost miRNA je prokázána v mnoha tělních tekutinách, včetně slin (Michael et al., 2010), moči (Lv et al., 2013), mateřského mléka (Zhou et al., 2012) a krve (Hu et al., 2010; Arroyo et al., 2011). Kromě sbalení miRNA v exosomech či mikrověsikulech, extracelulární miRNA mohou být spojeny s high-density lipoproteiny (HDL) (Tabet et al.,

2014; Vickers et al., 2011) nebo navázány na protein Ago2 mimo vesikuly (Arroyo et al., 2011). Všechny tyto způsoby uložení chrání miRNA před degradací a zaručují její stálost.

2.1.4 MiRNA v exosomech

Exosomy byly poprvé popsány v roce 1983 Panem a Johnstonem (Pan a Johnstone, 1983) a v roce 1989 dostaly svůj název (Johnstone et al., 1989). Od té doby nicméně stále neexistuje jednotná terminologie a v literatuře se lze setkat s pojmy exosom, mikroversikul, mikropartikule, označujícími obdobné struktury. Díky hlubšímu poznání jejich vzniku je lze rozlišit na dva typy: na mikroversikuly, které vznikají přímo z buněčné membrány, a na exosomy, které jsou vylučovány exocytózou, když tzv. multivesikulární tělíska (multivesicular bodies, MVBs) splývají s plazmatickou membránou (Heijnen et al., 1999). O těchto útvarech pojednává stručně další text.

Exosomy jsou malé vesikuly o průměru 40-100 nm přítomné téměř ve všech tělních tekutinách (např. Simons a Raposo, 2009). Do extracelulárního prostoru je vypouští většina typů buněk. Majoritní složky jejich membrán jsou lipidy a bílkoviny, v jejich vnitřním prostoru se často nacházejí různé nukleové kyseliny (mRNA, miRNA a další nekódující (nc) RNA) (Sato-Kuwabara et al., 2015). Tyto nukleové kyseliny mohou být převzaty sousedními či vzdálenějšími buňkami, kde následně slouží k modifikaci těchto buněk. Tvorba a sekrece exosomů vyžaduje enzymy a ATP (Kosaka et al., 2010). Obsah exosomů se liší podle toho, z jaké buňky pochází.

Existují tři způsoby, kterými si buňky navzájem předávají informace, obsažené v exosomech. Během prvního transmembránové proteiny exosomů přímo interagují se signálními receptory cílové buňky (Munich et al., 2012). Při druhém způsobu exosom splyne s plazmatickou membránou příjemcovské buňky a svůj obsah doručí rovnou do cytosolu (Mulcahy et al., 2014). Třetí způsob, kdy je exosom internalizován do cílové buňky, může končit dvěma způsoby: buď je exosom pohlcen endosomem, projde transcytozou a je po průchodu příjemcovskou buňkou následně vyloučen do sousední buňky, nebo po fúzi s endosomem dozraje v lysozóm a zdegraduje (např. Mulcahy et al., 2014). Přesný průběh internalizace exosomů a faktory ovlivňující jejich osud nejsou doposud plně poznány.

miRNA v exosomech může sloužit k ovlivnění sousedních či velmi vzdálených buněk. Běžným, očekávaným způsobem působení je funkce negativního regulátoru genové exprese (např. exosomální miR-105 uvolněná z buněk buněčné linie nádoru prsu MDF-10A a MDA-MB-231 redukuje expresi genu *ZO-1* v endoteliálních buňkách, čímž způsobuje metastázy do

plic a mozku (Zhou et al., 2014)). Druhá, spíše překvapivá funkce exosomální miRNA (na rozdíl od vnitrobuněčných miRNA), spočívá v ovlivňování imunitního systému. Bylo zjištěno, že exosomální miR-21 a miR-29a, kromě obvyklé role v regulaci genové exprese, mohou pracovat jako ligandy pro toll-like receptory (TLRs) a tím aktivovat imunitní systém (Fabbri et al., 2012).

2.1.5 Zdroje miRNA

Kromě slin, mateřského mléka, moči a plné krve byly v minulosti pro analýzu miRNA vyzkoušeny i nebuněčné složky krve, jmenovitě plazma či sérum. Plazma byla v minulosti úspěšně používána pro analýzu miRNA a je stále jedním z nejlepších zdrojů. Funguje jako “tekutá biopsie”, bez invazivnosti u biopsie obvyklé, takže je možné ji odebírat opakovaně, bez nežádoucích vedlejších účinků. I proces izolace miRNA z plazmy je snadný, přestože někteří autoři upozorňují na poněkud nízké hladiny miRNA (Wang et al., 2012). Pouze čtyři studie se dosud zabývaly plazmatickými miRNA u pacientů s AML (Tanaka et al., 2009; Fayyad-Kazan et al., 2013; El-Halawani et al., 2014; Elhamamsy et al., 2017), a žádná z těchto studií nesrovnávala miRNA u pacientů při záchytu jejich onemocnění a v remisi nemoci.

2.2 Akutní myeloidní leukemie

Akutní myeloidní leukemie (AML) je zhoubným onemocněním krvetvorných buněk, při němž dochází k poruše vyžívání a klonální expanzi myeloidních progenitorů v určitém stadiu jejich diferenciaci. Jedná se o nemoc značně heterogenní (Lowenberg et al., 1999), ať už biologicky nebo prognosticky. Nahromadění nezralých krvetvorných buněk v kostní dřeni obvykle vede k hematopoetické insuficienci (granulocytopenie, trombocytopenie nebo anemie, ať už s leukocytózou nebo bez ní), jejímiž následky jsou vážné infekce, krvácení nebo infiltrace vnitřních orgánů, které bez léčby vedou ke smrti do roka od diagnózy. Výskyt AML není omezený na určitou skupinu, přestože incidence výrazně narůstá s věkem (s mediánem v cca 67 letech) (Altekruse et al., 2010). Dříve byla diagnostika založena převážně na patologické a cytologické analýze krve a kostní dřeni, nicméně v průběhu posledních několika dekád se diagnostický postup mnohem více posunul k metodám cytogenetickým a molekulárně genetickým. I díky tomu se kromě diagnostiky zlepšily i možnosti léčby a délka přežití se prodloužila (Döhner et al., 2015).

2.2.1 Výskyt

AML je nejčastější z leukemií dospělých, také s nejvyšší úmrtností, obzvláště mezi staršími pacienty. Také je nejčastější příčinou smrti na nádorové onemocnění mezi dětmi a dospělými do 39 let (např. Wingo et al., 2003). Její výskyt je přibližně 2-4 případů na 100 000 (u dětí), incidence dále narůstá s věkem (medián této diagnózy je asi 67 let) (Altekruse et al., 2010), s převahou mužů nad ženami (3:2).

Bylo popsáno množství vlivů, které mohou mít jako následek vznik AML, tyto faktory jsou však zodpovědné pouze za malé procento skutečně vzniklých AML (Sandler a Collman, 1987). Patří mezi ně jak působení chemických činidel (např. benzen, pesticidy, herbicidy atd.), ozáření ionizujícím zářením (terapeutické/neterapeutické), předcházející chemoterapie (alkylační činidla, inhibitory DNA topoizomerázy II, anthracykliny...), tak individuální rizikové faktory způsobené genetickými poruchami nebo onemocněními (Downův syndrom, Klinefelterův syndrom, syndrom Li-Fraumeni, Patauův syndrom, Kostmannův syndrom, Shwachmanův syndrom, ataxia telangiectasia, Fanconio anemie, neurofibromatoza). Leukemogeneze je vícestupňový proces, který potřebuje progenitorovou buňku v různých stupních vývoje, citlivou na vyvolávající agens. Různé druhy AML se v mechanismu vzniku liší, což naznačuje možnou souvislost mezi vyvolávající faktory a určitými molekulárními abnormalitami nebo mutacemi (Crane et al., 1996). Většina *de novo* vzniklých AML ovšem vzniká bez objektivizovatelného vnějšího vlivu.

2.2.2 Genetické faktory

Zvláště u dětí je významným činitelem vzniku AML právě genetická vada. Děti s Downovým syndromem mají 10-20x vyšší pravděpodobnost, že onemocní AML (Fong et al., 1987). Obdobně jsou s AML spojeny další dědičné choroby jako Klinefelterův syndrom, syndrom Li-Fraumeni, Fanconio anemie nebo neurofibromatoza (Pöttsch et al., 2002). Jedna studie odhalila, že dalšími rizikovými faktory pro dětskou AML mohou být také rasová či etnická příslušnost, věk otce při početí a také doba od matčina posledního porodu živého dítěte (Reynolds et al., 2002). Například děti s asijským či pacifickým původem mají vyšší riziko vzniku AML, než bílé děti ne-hispánského původu, obdobně jako děti otců nad 35 let ve srovnání s dětmi otců ve věku 20 – 34 let. Také čas delší než 7 let od posledního porodu živého dítěte může být faktorem, zvyšujícím pravděpodobnost onemocnění AML.

Zajímavá z tohoto hlediska je akutní promyelocytární leukemie (APL). Byl prokázán její zvýšený výskyt u dospělých pacientů s původem v latinské Americe a jižní Evropě. S diagnózou APL se pojí přestavba PML/RAR α se třemi možnými transkripty do mRNA, přičemž u nemocných z latinské Ameriky převažoval typ bcr1. Je možné, že tato preference je dána geneticky (Douer et al., 2003).

Získané genetické chromozomální abnormality jsou přítomny u 50-80% AML, s vyšším výskytem u pacientů se sekundární AML nebo ve vyšším věku (např. Head, 1996; Rossi et al., 2000). Často detekované abnormality zahrnují ztrátu nebo delecii na chromozomech 5, 7, Y a 9, translokace jako t(8;21) (q22;q22); t(15;17)(q22;q11), trizomii chrom. 8 a 21, a další změny na chromozomech 16, 9 a 11. Mnoho studií bylo věnováno prognostickému významu různých cytogenetických změn. Dnes jsou tyto faktory nejdůležitějšími činiteli pro krátkodobou i dlouhodobou prognózu (např. Keating et al., 1988; Ferrant et al., 1997). Pacienti s funkční inaktivací core binding faktoru (CBF) – AML1 a CBF β – mají dobrou prognózu, stejně jako ti s AML s t(8;21)(q22;q22) nebo inv (16)(p13;q22), dvěma nejčastějšími cytogenetickými abnormalitami u *de novo* vzniklých AML u mladších pacientů (Cheson et al., 2003). Špatnou prognózu mají naopak pacienti se ztrátou části nebo celého chromozomu 5 a 7, translokacemi zahrnujícími 11q23, nebo abnormalitami na chromozomu 3 (Grimwade et al., 2001).

2.2.3 Fyzikální a chemické vlivy

Bylo popsáno velké množství faktorů prostředí, které podporují vznik AML. Ionizující záření patří mezi ně. Lidé, kteří přežili výbuch jaderné bomby v roce 1945 v Japonsku, onemocněli AML častěji než ti, kteří mu nebyli vystaveni, s nejvyšším výskytem 5 – 7 let po expozici záření (Preston et al., 1994). I terapeutické ozáření zvyšuje riziko onemocnění AML (Kossmann et al., 2000).

Také pracující v jaderném průmyslu častěji onemocní AML (Cardis et al., 1995), totéž ale neplatí pro lidi, žijící v blízkosti jaderných elektráren (von Muehlendahl, 1998). I časté létání může vlivem zvýšené dávky záření vést ke vzniku AML (Gundestrup et al., 1999).

Různé chemické látky byly také spojeny se vznikem AML. AML asociovaná s expozicí benzenu je charakteristická změnami na chromozomech 5 a 7 nebo na obou, obdobně jako AML následkem cytotoxické chemoterapie (Travis et al., 1994). Benzen se do těla nejčastěji dostává v důsledku kouření, které zvyšuje riziko vzniku AML 1,2 – 2,3krát. AML v důsledku kouření má široký rozptyl abnormalit na chromozomech 5 a 7 a často je

doprovázená také trizomií chromozomu 8 a balancovanou translokací mezi chromozomy 8 a 21 (např. Travis et al., 1994; Moorman et al., 2002), což je podle FAB klasifikace AML subtypu M2.

2.2.4 Sekundární AML

Jako sekundární akutní leukemie se označuje AML, vzniklá u pacienta s předešlou diagnózou myelodysplastického syndromu (MDS), myeloproliferativního onemocnění nebo vystaveného potenciálně leukemogenní terapii nebo činidlu – jedná se o kategorii poměrně širokou (Cheson et al., 2003). Více než 90% sekundárních leukemií má myeloidní původ a zvláště špatnou prognózu, méně pacientů dosahujících kompletní remise a kratší dobu přežití, než pacienti s AML vzniklou *de novo* (Gajewski et al., 1989).

AML asociovaná s předešlou léčbou byla poprvé pozorována u pacientů úspěšně léčených pro Hodgkinův lymfom (Arseneau et al., 1972), později se objevila i u pacientů dříve léčených pro ALL a jiná onemocnění jako mnohočetný myelom (např. Pui et al., 1989).

Chemoterapeutika jako alkylační činidla a inhibitory DNA topoizomerázy II byla prokázána jako spouštěče vzniku AML (Le Beau et al., 1986). Pouze 10 – 15% pacientů onemocní AML v důsledku předešlé cytotoxické léčby, obvykle solidního nádoru, nicméně riziko vzniku AML se intenzivní chemoterapií zvyšuje 100x i více. Existují dva typy takových AML (Smith, 2003): nejčastější je obvykle 5-10 let po vystavení alkylačním činidlům a je charakteristický monozomiemi nebo delecemi dlouhých ramének chromozomů 5 nebo 7 (např. Le Beau et al., 1986; Odero et al., 2001). Druhý takový typ se objevuje 1-5 let po léčbě léky jako jsou doxorubicin nebo etoposid, které reagují s DNA topoizomerázou II. Chromozomální abnormality u tohoto typu jsou obvykle spojeny s dlouhým raménkem chromozomu 11 (11q) (epipodophyllotoxiny s balancovanými translokacemi 11q23, zvláště u dětí (Pui et al., 1989), a balancovanými translokacemi mezi chromozomy 15 a 17 (t(15;17)) a chimérickými přestavbami mezi PML a RARA geny, typickými pro akutní promyelocytární leukemii, a translokacemi t(8;21) nebo inv(16) (Quesnel et al., 1993).

Kromě výše popsaných chromozomálních a genových aberací existují i epigenetické změny, vedoucí ke vzniku AML. U pacientů s AML, zvláště u pacientů se sekundární AML (Christiansen et al., 2003), je popsána častá metylace promotoru genu *p15/IN4b*, genu pro retinovou kyselinu (*RAR*) β 2, genu *SOCS-1* a dalších.

Chromozomální abnormality na chromozomech 5 a 7, spojené s třemi výše popsanými vlivy na vznik AML, jsou totožné s abnormalitami vznikajícími spontánně. Pouze výskyt

AML s delecemi 5. a 7. chromozomu roste s věkem, zatímco počet AML asociovaných s balancovanými translokacemi nikoliv (Head, 1996).

2.2.5 Viry

Viry, zvláště RNA retroviry, byly uznány jako původci vzniku různých nádorů, leukemii nevyjímaje, u experimentálních zvířat (Ben-David a Bernstein, 1991). U člověka zatím nebyla žádnému konkrétnímu viru přiřazena zodpovědnost za vznik AML, přestože spojení mezi určitými viry a patogenezí AML nejspíše existuje. Parvovirus B19 může hrát roli ve vzniku AML (Kerr et al., 2003). Zatím však nebylo prokázáno, že by pouhá infekce jakýmkoliv DNA či RNA virem byla hlavním důvodem vzniku onemocnění.

2.2.6 Klasifikace AML

Pro klasifikace leukemií existují různé systémy. Takzvaná French-American-British (FAB) klasifikace vychází z buněčné morfologie a cytochemie a jako AML označuje přítomnost blastů nad 30% buněk kostní dřene (KD). Od svého vzniku v roce 1976 byla již vícekrát doplňována a modifikována, dnes rozlišuje osm základních forem AML (viz Tab.1) (Bennett et al., 1976; Bennett et al., 1985; Bennett et al., 1991). Jedná se o klasifikaci dodnes používanou, její výhodou je rychlé orientační určení diagnózy.

Jak se ovšem diagnostické metody nadále rozšiřují, změnil se i přístup k rozlišování typů leukemií. Díky širokému spektru nalezených genetických abnormalit vznikla v roce 2001, resp. byla revidována v r. 2008 World-Health Organisation (WHO) klasifikace (Vardiman et al., 2008), která byla v předloňském roce dále upravena a rozšířena (Arber et al., 2016). Tato klasifikace se opírá o cytogenetická data a definuje čtyři hlavní kategorie AML (viz Tab.2) (Arber et al., 2016). Pro diagnózu AML zde stačí 20% blastů v kostní dřeni (kostní dřeň, KD). Mezi systémy dochází k překryvu u nemocných s 20-30% blastů v KD, což jsou nejčastěji pacienti s myelodysplastickým syndromem vyššího stupně. Dosáhne-li počet blastů 20% hranice, tyto buňky musí mít prokazatelný myeloidní původ – aspoň 20% z nich musí být pozitivních pro povrchové antigeny asociované s myeloidní diferenciací, nejčastěji CD33 nebo CD13. Existují také zvláštní případy, kdy je nad 80% buněk kostní dřene monocytů – pak je diagnostikována akutní monocytární leukemie; pokud více než 50% buněk KD jsou normoblasty nebo pronormoblasty a myeloblasty z více než 30% ne-erytroidní populace, je detekovaná erytroleukemie. Pokud se kostní dřeň nedá nasát, měla by být zvážena diagnóza megakaryocytární leukemie a tato diagnóza ovšem potvrzena biopsií.

Tabulka 1. FAB klasifikace AML (dle Bennett et al., 1991).

FAB subtyp	Název	% pacientů
M0	Nediferencovaná akutní myeloidní leukemie	5%
M1	Akutní myeloidní leukemie s minimálním vyzríváním	15%
M2	Akutní myeloidní leukemie s vyzríváním	25%
M3	Akutní promyelocytární leukemie	10%
M4	Akutní myelomonocytární leukemie	20%
M4eos	Akutní myelomonocytární leukemie s eosinofilií	5%
M5	Akutní monocytární leukemie	10%
M6	Akutní erytroidní leukemie	5%
M7	Akutní megakaryocytární leukemie	5%

Tabulka 2. WHO klasifikace AML a příbuzných neoplazií, 2016 (dle Arber et al., 2016).

Akutní myeloidní leukemie s rekurentními genetickými aberacemi
AML s t(8;21)(q22;q22.1); <i>RUNX1-RUNX1T1</i>
AML s inv(16)(p13.1q22) nebo t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i>
AML s <i>PML-RARA</i>
AML s t(9;11)(p21.3;q23.3); <i>MLLT3-KMT2A</i>
AML s t(6;9)(p23;q34.1); <i>DEK-NUP214</i>
AML s inv(3)(q21.3q26.2) nebo t(3;3)(q21.3;q26.2); <i>GATA2, MECOM</i>
AML (megakaryoblastová) s t(1;22)(p13.3;q13.3); <i>RBM15-MKL1</i>
<i>Provizorní jednotka: AML s BCR-ABL1</i>
AML s mutovaným <i>NPM1</i>
AML s bialelickou mutací <i>CEBPA</i>
<i>Provizorní jednotka: AML s mutovaným RUNX1</i>
AML s myelodysplastickými změnami
Myeloidní neoplázie v důsledku předchozí terapie
AML nezařazená jinde
AML s minimální diferenciací
AML bez vyzrávání
AML s vyzráváním
Akutní myelomonocytární leukemie
Akutní monoblastická/monocytární leukemie
Čistě erytroidní leukemie
Akutní megakaryocytární leukemie
Akutní basofilická leukemie
Akutní panmyelocytis s myeloifibrozou
Myeloidní sarkom
Myeloidní proliferace spřízená s Downovým syndromem
Přechodná abnormální myelopoeza (TAM)
Myeloidní leukemie asociovaná s Downovým syndromem
Nádor z blastických plasmacytoidních dendritických buněk

2.2.7 Projevy

Ke klinickému obrazu akutní leukemie patří příznaky, vzniklé nedostatkem funkčních krvinek v krevním oběhu. Průvodním jevem jsou nespecifické chřipkové příznaky (únava, vyčerpání), dále také krvácivé projevy (koagulopatie), infekční komplikace, u některých nemocných také hyperviskózní syndrom. Kvůli předčasnému ukončení diferenciaci v kostní dřeni a akumulaci nezralých buněk nemá jedinec dost zralých krevních buněk, což způsobuje anemii, leukocytózu, granulocytopenii a trombocytopenii. S těmi souvisejí již zmíněné krvácivé projevy (z nosu, dásní, petechiální krvácení do kůže atd.). Mohou být infiltrovány i extramedulární orgány (játra, slezina, CNS) s následnými poruchami jejich funkce. Většina pacientů má zvýšenou hodnotu leukocytů, nicméně může dojít i k opačnému trendu (Mayer et al., 2016).

2.2.8 Diagnostika

Cesta k diagnóze akutní myeloidní leukemie vede přes klinické projevy a laboratorní část, kdy je hodnocen krevní obraz, diferenciální krevní rozpočet, hodnoty biochemických parametrů, cytologie kostní dřene (KD), cytochemie, imunofenotyp buněk pomocí průtokové cytometrie, cytogenetický nálezn až molekulárně genetické změny (základem je PCR nebo FISH vyšetření translokací *RUNX1-RUNX1T1*, *CBFB-MYH11*, *PML-RARA*, mutace *FLT3-ITD* a *NPM1*, viz dále) (Mayer et al., 2016).

První hodnocení spočívá v morfoloické identifikaci a zhodnocení počtu leukemických myeloblastů v histologických preparátech – nátěrech periferní krve a kostní dřene, barvených Wright-Giemsovým barvením. Tyto buňky mají kulatá či nepravidelná jádra, zřetelná jádérka a velmi málo cytoplazmy, která může obsahovat azurofilní granula a různé množství Auerových tyčí či tělísek. Spolu s nimi se mohou vyskytovat v malém počtu i zralé granulocyty, ale nikoliv jejich stadia, myelocyty a metamyelocyty (které jsou přítomny u chronické myeloidní leukemie). Pokud počet blastů v periferní krvi přesáhne 5%, je diagnostikována akutní leukemie, pro kostní dřeň je hranicí 20% (dle WHO klasifikace, Arber et al., 2016). Nicméně AML je nutno odlišit od dalších podobných diagnóz, jako je ALL (akutní lymfoblastická leukemie) nebo MDS (myelodysplastický syndrom), což se děje na jiné úrovni než pouze morfoloické.

K dalšímu odlišení slouží metody imunohistochemické, imunologické, cytogenetické, genetické, molekulárně genetické. Výše zmíněná FAB klasifikace rozlišuje mezi 8 subtypy AML původně na základě morfoloie a histochemické reaktivity (barvení myeloperoxidázou,

súdánskou černí...), dnes jsou v ní zahrnuty i genové a genomové přestavby, WHO klasifikace je založena právě na změnách genotypu.

Cytogenetické vyšetření sestavuje karyotyp metafázních buněk a aberace popisuje podle ISCN nomenklatury (International System for Human Cytogenetic Nomenclature). Ne vždy toto vyšetření odhalí použitelnou informaci, která může být pod rozlišovací schopností klasických cytogenetických metod, a proto se uplatňují i další metody, jako různé druhy FISH (Fluorescence In Situ Hybridization) nebo komparativní genomová hybridizace (CGH) (např. Keating et al., 1988; Cross et al., 1994; Repp et al., 1995).

V diagnostice AML se používají také metody pro nalezení fúzních genů pomocí reverzní transkripce a detekce pomocí PCR (RT-PCR) (Grimwade et al., 1997). Touto metodou lze nalézt i subtilnější změny v genomu, které běžnými cytogenetickými metodami nalézt nejdou.

2.2.9 Prognostické faktory

Prognóza AML je obvykle posuzována na základě věku pacienta, celkového stavu, přítomných komorbidit, jeho předešlé myelodysplastické fáze a především nalezených cytogenetických aberací. Mladší pacienti mají lepší prognózu než starší (s víceméně umělým předělem v 60 letech), stejně jako pacienti bez předcházející myelodysplastické fáze (Mayer et al., 2016). Bylo nalezeno velké množství cytogenetických i genetických změn, které mají vliv na průběh onemocnění, některé prognózu zhoršují, jiné působí opačně. Právě tyto změny hrají v předpovídání pacientových šancí největší roli (Meyer a Levine, 2014). Především podle těchto hledisek se pacienti dělí do tří kategorií – s příznivou prognózou, intermediární a nepříznivou (viz Tab.3).

Jako další, nezávislý prognostický faktor může posloužit i imunofenotyp maligních buněk (např. Repp et al., 2003). CD15, CD33, CD38, CD64 a myeloperoxidáza (MPO) jsou antigeny, jejichž přítomnost na leukemických blastech má příznivý dopad na prognózu, zatímco exprese CD9, CD11b, CD13, CD34 a CD41 je prognosticky nepříznivá.

Tabulka 3. Klasifikace do prognostických skupin dle European LeukemiaNet (ELN) (dle Döhner et al., 2017).

Riziková kategorie	Genetická abnormalita
Příznivá	t(8;21)(q22;q22.1); <i>RUNX1-RUNX1T1</i> inv(16)(p13.1;q22) nebo t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i> mutované <i>NPM1</i> bez <i>FLT3-ITD</i> nebo s <i>FLT3-ITD</i> ^{low} (alelický poměr <0,5) bialelická mutace <i>CEBPA</i>
Intermediární	mutované <i>NPM1</i> a <i>FLT3-ITD</i> ^{high} (alelický poměr ≥0,5) wild-type <i>NPM1</i> bez <i>FLT3-ITD</i> nebo s <i>FLT3-ITD</i> ^{low} (bez dalších genet.změn indik.nepříz. progn.) t(9;11)(p21.3;q23.3); <i>MLL3-KMT2A</i> cytogenetické abnormality neklasifikované jako příznivé či nepříznivé
Nepříznivá	t(6;9)(p23;q34.1); <i>DEK-NUP214</i> t(v;11q23.3); <i>KMT2A</i> přestavba t(9;22)(q34.1;q11.2); <i>BCR-ABL1</i> inv(3)(q21.3;q26.2) nebo t(3;3)(q21.3;q26.2); <i>GATA2</i> , <i>MECOM (EVII)</i> del 5.chrom. nebo 5q, del. 7.chrom., 17.chrom. nebo abnormální 17p komplexní karyotyp wild-type <i>NPM1</i> a <i>FLT3-ITD</i> ^{high} mutované <i>RUNX1</i> mutované <i>ASXL1</i> mutované <i>TP53</i>

2.2.9.1 Cytogenetické změny

U cca 50% pacientů dochází k detekci cytogenetických abnormalit (Medinger et al., 2016; Döhner et al., 2017). Nejčastěji se jedná o změny na chromozomech 5, 7 (delece jejich dlouhých ramének či monozomie), zlomy chromozomů 10, 12, 21, dále o změny na 11. chromozomu a v oblasti 11q23, trizomie chromozomu 8 a také o komplexní změny karyotypu (což znamená souběžný výskyt více než tří chromozomálních abnormalit). Takoví pacienti nemívají dobrou odpověď na léčbu a jejich šance na přežití nejsou vysoké.

Do kategorie s příznivou prognózou patří pacienti s balancovanými přestavbami jako $t(8;21)(q22;q22)$ (AML1/ETO), $inv(16)(p13.1;q22)$ a jejich variantami (oboje tzv. AML s core-binding faktorem) a $t(15;17)(q22;q12-q21)$ (*PML/RARA*) a variantami (typická přestavba pro akutní promyelocytární leukemii, APL). Pacienti s těmito aberacemi mívají dobrou odpověď na chemoterapii a dlouhou dobu přežití (Meyer a Levine, 2014).

Oproti tomu pacienti s komplexními změnami karyotypu, přestavbou mixed lineage leukemia genu (*MLL*, 11q23) (s výjimkou translokací $t(9;11)(p21-22;q23)$ a $t(11;19)(q23;p13)$, které mají prognózu o něco lepší) mají prognózu nepříznivou. Je u nich menší pravděpodobnost dosažení kompletní remise, a když už jí dosáhnou, trvá kratší dobu a hrozí vysoké riziko relapsu (např. Marcucci et al., 2011). Později byla doplněna další kategorie pacientů s nepříznivým rizikem, a to pacienti s tzv. monozomálním karyotypem, kdy jsou přítomny nejméně dvě monozomie autozomů nebo monozomie jednoho autozomu v přítomnosti dalších strukturálních abnormalit. Pacienti s tímto nálezem mají šanci na dlouhodobé přežití pouhá 3-4% (Estey, 2010).

Pacienti s jinými přestavbami nebo s normálním cytogenetickým nálezem mají intermediární prognózu (cca 40-50% pacientů) (Meyer a Levine, 2014). Pro zpřesnění jejich vyhlídek byly v minulých letech až desetiletích hledány méně výrazné změny v genotypu, a nemálo jich bylo také nalezeno.

2.2.9.2 Genové mutace

Díky next-generation sekvenování bylo u karyotypově normálních AML nalezeno průměrně 13 mutací, z nichž osm jsou náhodné mutace („pasažéři“) a pět rekurentní mutace („řidiči“) (Marcucci et al., 2011; Papaemmanuil et al., 2016). Detekováno bylo 23 genů, v nichž dochází k mutacím nejčastěji, a dalších 237 genů, mutovaných v jednom či dvou případech v nenáhodných vzorech společně nebo naopak navzájem výlučně. Tyto geny patřily do jedné z devíti kategorií: transkripční faktory po fúzi, gen *NPM1*, tumor supresorové geny, geny související s metylací DNA, signální geny, chromatin modifikující geny, transkripční faktory pro myeloidní diferenciaci, geny kohezinového komplexu a spliceozomového komplexu (Medinger a Passweg, 2017). Prognostický význam mnoha nalezených změn velmi závisí na kontextu jejich výskytu: zda jsou osamocené, či se vyskytují spolu s dalšími (Döhner et al., 2017). Nejznámějším případem je nepochybně kombinace mutovaného genu *NPM1* a přítomnosti/nepřítomnosti *FLT3-ITD*, kdy mutované *NPM1* přináší dobrou prognózu pouze v případě, že *FLT3-ITD* není přítomno. Dalším takovým je dvojitá mutace,

a to v genech *ASXL1* a *RUNX1*, která přináší zvláště nepříznivou prognózu. Pro prognózu jsou nadále významnější ještě mutace v genech *CEBPA* a *KIT*. Jiné změny se zase navzájem vylučují.

- *FLT3*

FLT3 I receptorová tyrosin kináza třídy III, která pracuje jako cytokinový receptor pro ligand FLT3. Je silně exprimována v hematopoetických kmenových buňkách a hraje důležitou roli jednak v přežití buněk, jednak v jejich proliferaci (Saultz a Garzon, 2016). Mutace v genu FLT3 patří u AML k jedné z nejčastějších a jsou zastoupeny dvěma typy změn – interní tandemovou duplikací (internal tandem duplication, ITD) a mutací v tyrosin-kinázové doméně (tyrosin kinase domain, TKD). FLT3-ITD se vyskytuje asi u 20% pacientů s AML a u 28-34% CN-AML (u nichž předpovídá špatnou prognózu) (Meyer a Levine, 2014; Medinger et al., 2016; Saultz a Garzon, 2016;). Tato mutace se vyskytuje v juxtamembránové doméně (juxtamembrane, JM), zatímco *FLT3-TKD* v tyrosin kinázové (a také přináší zvláště nepříznivou prognózu). Oba typy trvale aktivují *FLT3* signalizaci přes RAS, MAPK a STAT5 signální dráhy (Gale et al., 2008;), což vede k proliferaci blastů. Prognostický dopad je dán poměrem mutovaných a wild-type alel, s horším dopadem v případě zvýšené nálože ITD ve *FLT3*. Mutace *FLT3-ITD* je spojena se zvýšeným rizikem relapsu, zatímco prognostický význam *FLT3-TKD* zůstává nejistý (Gale et al., 2008).

Proběhlo také testování tyrosin-kinázových inhibitorů na pacientech s *FLT3-ITD*. Použití izolovaných inhibitorů nedokázalo dlouhodobě zlepšit stav pacientů a vedlo k objevení se sekundárních mutací a rezistenci (Small, 2008). Multi-kinázové inhibitory jako sorafenib a midostaurin v kombinaci s 5-azacytidinem vykazují lepší výsledky v celkém přežití. Midostaurin byl před nedávnou dobou ustanoven ve Spojených státech pro léčbu nové AML dospělých s pozitivní mutací ve *FLT3-ITD* v kombinaci se standardním cytarabinem a daunorubicinem v rámci indukční léčby a cytarabinem v rámci konsolidace.

- *NPM1*

NPM1 (nucleolar protein nucleophosmin 1) plní funkce v různých buněčných procesech, jako je geneze ribozomů, opravy DNA a regulace apoptózy. U AML se jeho mutace objevují poměrně často (25-35% všech pacientů a 45-64% CN-AML pacientů) a jejich výsledkem je změna lokalizace proteinu v cytosolu (Schnittger et al., 2005). Pokud se souběžně nevyskytuje *FLT3-ITD*, znamená mutované *NPM1* lepší vyhlídky pro pacienty a to včetně starších 60 let (Döhner et al., 2017), což je dáno pravděpodobně větší citlivostí na chemoterapii (Döhner et al., 2005). *NPM1* mutace jsou spojovány také s dalšími

abnormalitami, jako trizomie 8. chromozomu, *DNMT3A* mutací, *FLT3-ITD*, *FLT3-TKD* a mutace v genu *IDH* (Marcucci et al., 2012). Mutace v *NPM1* slouží také ke sledování vývoje onemocnění a minimální reziduální nemoci (MRN; minimal residual disease, MRD), podle nedávné studie dokonce lépe, než sledování mutací *FLT3-ITD*, *DNMT3A* a *WT1* zároveň (Ivey et al., 2016).

- *IDH*

Dva geny pro isocitrát dehydrogenázu (*IDH*), *IDH1* a *IDH2*, u pacientů s AML také podléhají mutacím. Díky těmto mutacím se alfa-ketoglutarát mění na 2-hydroxyglutarát (2-HG), jehož zvýšená hladina uvnitř buňky inhibuje enzymy TET a následně zablokuje myeloidní dozrávání (Lu et al., 2012). Nově získané mutace *IDH* jsou nalézány u 15-20% pacientů s AML a u 25-30% pacientů s CN-AML (Marcucci et al., 2010; Marcucci et al., 2011; Patel et al., 2012); častěji se vyskytují u starších pacientů a dokonce i u nehematologických malignit. Mutace v *IDH* spolu s mutacemi v *NPM1* a wild-typem *FLT3* jsou u CN-AML spojeny s kratší dobou přežití (Marcucci et al., 2010;). V současnosti probíhají klinické studie inhibitorů mutantních *IDH1* a *IDH2* (např. DiNardo et al., 2015).

- *DNMT3A*

Gen pro DNA metyltransferázu 3A (*DNMT3A*) prokazuje mutace u 18-22% všech AML a přibližně u 34% CN-AML (Ley et al., 2010). Mutace se objevují nejčastěji v argininovém kodonu 882, méně často pak v jiných kodonech, a vedou k nesprávné hematopoéze a chybám v metylaci (Ley et al., 2010; Saultz a Garzon, 2016). Mutace v *DNMT3A* byly označeny jako pre-leukemické, objevující se ve vývoji AML velmi časně a zůstávající i v období remise (Shlush et al., 2014). Jejich vliv na prognózu závisí na věku pacientů – u mladších pacientů s mutací v jiném než 882. argininovém kodonu znamenají snížené přežití, zatímco u starších pacientů se snížené přežití pojí s mutací v 882. argininovém kodonu (Marcucci et al., 2012). Velká studie s více než 1700 pacienty neukázala výrazný rozdíl v době přežití u pacientů s nebo bez *DNMT3A* mutace (Gaidzik et al., 2013). Nedávno byl prokázán pozitivní vliv vysokodávkovaného daunorubicinu na přežití pacientů s mutacemi v *DNMT3A* nebo *NPM1* nebo translokací v *KMT2A* (dříve *MLL*) (Patel et al., 2012).

- *TET2*

Tet methylcytosin dioxygenáza (*TET2*) bývá mutována v 9-23% AML (Metzeler et al., 2011). Tento enzym, důležitý pro konverzi 5-methylcytosinu na 5-hydroxymethylcytosin v DNA během procesu DNA demethylace, mutací ztratí svoji funkci. Prognostický význam těchto mutací zůstává prozatím nejasný, existují studie, prokazující negativní dopad na dosažení kompletní

remise a celkové přežití (Metzeler et al., 2011), stejně jako studie, které tento vliv nepotvrzují (Gaidzik et al., 2012).

- *RUNX1*

Protein RUNX1 (Runt-related transcription factor, také AML1 nebo CBF podjednotka α -2, CBFA2) je transkripční faktor, důležitý pro správné fungování hematopoézy (Meyers et al., 1993). Tento gen může projít dvěma různými změnami – dojde v něm k mutacím nebo se stane součástí genové fúze. K různým mutacím v tomto genu dochází u 5-90% pacientů, zvláště jsou asociovány s trizomií chromozomu 21 (gen *RUNX1* se nachází právě na 21. chromozomu). Nalezneme-li mutace v *RUNX1*, pro pacienta to znamená zhoršenou prognózu s nižším počtem dní bez onemocnění a s kratší dobou přežití. Ovšem v případě, že je *RUNX1* součástí fúzního genu u CBF (core-binding factor) leukemií, prognóza je opačná (Mendler et al., 2012). Translokace *RUNX1* s *RUNX1T1* na 8. chromozomu (jiný název *ETO/MTG8*) vede ke vzniku fúzního proteinu RUNX1-RUNX1T1 (neboli AML/ETO) a t(8;21)(q22;q22) AML. Kromě této možnosti se vyskytují již zmíněné mutace v *RUNX1*, často současně s trizomií chromozomu 13, 21, chyběním *NPM1* a u CN-AML u starších pacientů (Marcucci et al., 2011). Ve studii z r. 2016, provedené na nemalém množství pacientů, byly mutace v *RUNX1* nalezeny u 10% z nich, obvykle se vylučovaly s dalšími vzniklými abnormalitami a vyskytovaly se s různými jinými mutacemi, jako jsou mutace v epigenetických modifikátorech (*ASXL1*, *IDH2*, *KMT2A* aj.) a v součástech spliceosomového komplexu. Mutace v *RUNX1* byly spojeny s vyšším věkem, méně zralou morfologií blastů a AML vzniklými na podkladě myelodysplastického syndromu (MDS), častěji u mužů než u žen (Gaidzik et al., 2016).

- *CEBPA*

U 6-10% AML a 15-19% CN-AML se vyskytují mutace v transkripčním faktoru CCAAT/enhancer binding protein α (*CEBPA*), často asociovaná s delecí dlouhého raménka chromozomu 9 (del(9q)) (Mrózek et al., 2007). Tento transkripční faktor reguluje genovou expresi během hematopoézy (Koschmieder et al., 2009). Bialelická mutace (u 4-5% AML) znamená lepší prognózu a zvýšenou šanci na kompletní remisi (Fasan et al., 2014), zatímco pouze jednoalelická mutace má prognózu obdobnou jako pacienti s nezměněným *CEBPA* genem (Marcucci et al., 2011).

- *ASXL1*

Pravděpodobnou funkcí proteinu ASXL1 (additional sex-comb like 1) je epigenetická regulace (Gaidzik et al., 2012; Saultz a Garzon, 2016). Mutace v *ASXL1* se vyskytují u 5-11%

AML, pěkrát častěji u pacientů nad 60 let než u mladších (Metzeler et al., 2011). U starších pacientů jsou často spojeny s t(8;21), wild-typem *NPM1*, chybějící *FT3-ITD*, mutacemi v *CEBPA* a jejich celkové vyhlídky jsou spíše nepříznivé (Alpermann et al., 2015).

- *MLL/KMT2A*

Dřívější název pro tento gen byl mixed lineage leukemia gen (*MLL*), dnešní termín je gen pro lysin methyltransferázu 2A (*KMT2A*), v literatuře se nicméně lze setkat s oběma. Jako součást regulačního komplexu se podílí na modifikaci chromatinu (Ernst et al., 2002). U pacientů s akutní myeloidní i lymfoblastickou leukémií prochází parciální tandemovou duplikací (PTD), která vede k agresivnímu průběhu onemocnění. U dospělých s CN-AML se vyskytuje asi u 11% z nich a předznamenává špatný průběh onemocnění (Döhner et al., 2002).

- *TP53*

Tumor supresorový gen (tumour protein p53, *TP53*) patří mezi další, které u AML procházejí delecemi a mutacemi. Málokdy se vyskytuje u pacientů bez chromozomálních delecí, je spojen s AML s komplexním karyotypem (Rücker et al., 2012). Vyskytuje se u 8-14% AML a znamená špatnou prognózu s rezistencí na chemoterapii. Možná právě poruchy v tomto genu stojí za velmi nepříznivou prognózou pacientů s AML s komplexními změnami (Rücker et al., 2012).

- *KIT*

Tyrosin kinázový receptor *KIT* je transmembránový protein nutný pro normální hematopoézu (Sattler a Salgia, 2004). U AML se mutace v genu *KIT* vyskytuje u méně než 5% pacientů, nicméně je častější u pacientů s core-binding faktor mutacemi (CBF; 22-29% takových AML). Výskyt mutovaného *KIT* zvyšuje riziko relapsu a snižuje celkové přežití (Paschka et al., 2006), avšak může být cíleno tyrosin kinázovými inhibitory, jako je např. dasatinib (Sattler a Salgia, 2004).

- *WT1*

Transkripční faktor *WT1* (Wilms tumor 1) hraje důležitou roli ve vývoji urogenitální soustavy a zastává funkci tumor-supresoru ve tkáni ledvin, zatímco u AML funguje jako onkogen (Yang et al., 2007). Overexprese *WT1* je spjata se špatnou prognózou a zvýšeným rizikem relapsu, zvláště u AML s normálním karyotypem (Lyu et al., 2014; Woehlecke et al., 2014), nicméně je vhodná pro sledování vývoje onemocnění a případné včasné zachycení relapsu. V tomto genu se občas objeví i mutace (u 4-11% AML), která má pro prognózu obdobný význam jako overexprese (Krauth et al., 2015).

- *NRAS a KRAS*

KRAS (Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog) a *NRAS* (Neuroblastoma RAS Viral(v-ras) Oncogene Homolog) patří do genové rodiny RAS GTPáz. Mutovaný *NRAS* je přítomen u 8-13% AML, zatímco mutace v *KRAS* jsou méně časté (asi 2% AML, častější u dětských AML, tam 9%) (např. Patel et al., 2012; Schlenk et al., 2008). Mutace v *RAS* jsou častěji spjaty s CBF leukemiemi, zvláště s inv(16). Z hlediska prognostického významu není přínos *RAS* mutací jasný.

- *BCOR*

Gen *BCOR* (BCL6 Corepresor) lokalizovaný na chromozomu X hraje roli v represi BCL6 (Huynh et al., 2000). Protein BCOR interaguje s histon deacetylázami (HDAC). Mutace v tomto genu byly zatím popsány jen u malého počtu studií, vyskytují se asi u 4% CN-AML a často společně s mutacemi DNMT3A (např. Grossmann et al., 2011). Mutace *BCOR* byly také popsány u případů s trizomií chromozomu 13 (25% těchto AML) (Herold et al., 2014). Prognostický význam těchto mutací je dosud nejasný.

- *PHF6*

X-vázaný gen, který pravděpodobně hraje roli v remodelaci chromatinu, ačkoli jeho přesná funkce ještě není jasná (Todd a Picketts, 2012). Mutace v *PHF6* se vyskytují u 2-3% AML, častěji u mužů než žen (Yoo et al., 2012). Pro pacienty v intermediární prognostické skupině s nepřítomnou *FLT3-ITD* znamenají zhoršenou prognózu, nicméně toto tvrzení zatím nebylo spolehlivě podloženo (Patel et al., 2012).

2.2.10 Léčba AML

Neléčená AML je pro pacienta vždy fatální, a to v řádu několika měsíců. Zároveň, protože nemoc je značně heterogenní, není ani intenzivní léčba vždy úspěšná, odvíjí se od typu leukemie a prognostických faktorů (na věku a klinickém stavu pacienta – počtu leukocytů při stanovování diagnózy, na přítomnosti chromozomálních aberací). Pacient na ni nemusí odpovídat (rezistence na léčbu).

Léčba AML dnes zahrnuje dvě fáze – tzv. indukční léčbu, jejímž cílem je dosáhnout kompletní remise (CR; stavu, kdy je pacient bez příznaků nemoci a nemoc není detekovatelná běžnými hematologickými metodami – v kostní dřeni pod 5% leukemických buněk), a postremisní léčbu. Jejím úkolem je zabránění návratu nemoci po dosažení kompletní remise, protože i v CR je v krvi (a kostní dřeni) stále přítomno malé množství leukemických blastů, tzv. minimální zbytková nemoc (minimal residual disease – MRD), z nichž hrozí opětovné vzplanutí nemoci – relaps. Postremisní terapie může být tzv. konsolidace remise konvenční

chemoterapií, nebo vysokodávkovaná chemoterapie následovaná autologní nebo alogenní transplantací, čímž je intenzivní léčba u konce. Pacient může následně dostávat ještě dlouhodobou udržovací cytostatickou léčbu.

Standardní chemoterapie, tzv. „3+7“, spočívá v 7-denním podávání cytosinarabinosidu (analog cytosinu s cukrem arabinózou) v dávce 100-200 mg/m² v kontinuální infuzi a 3 dnů podávání anthracyklinů, buď idarubicinu 12 mg/m² nebo daunorubicinu 60-90 mg/m². Obvykle je k dosažení kompletní remise nutno podat 1-2 cykly standardní indukční chemoterapie (Mayer et al., 2016). Anthracykliny interkalují do DNA, jsou schopné bránit její replikaci, uvolňují histony a tím způsobují epigenetické změny a následně změny v transkriptomu. Po indukci dostávali pacienti s příznivou prognózou 3-4 cykly konsolidační terapie, skládající se z protokolu HiDAC (High-Doses of Cytarabine, vysoké dávky cytarabinu, 3g/m² den 1,3,5), dále je možné podat Mitoxantron (Mx, interkalační činidlo), Fludarabin (Flu, analog purinů), nebo Melphalan (Mel, alkylační agens). Pacienti s intermediární prognózou obvykle podstoupí alogenní transplantaci krvetvorných buněk od HLA shodného dárce, příbuzného či nepříbuzného, nebo konsolidační terapii. I během procesu hledání vhodného dárce dostávají takoví pacienti 1-2 cykly konsolidační chemoterapie. Transplantace krvetvorných buněk má podle metaanalýzy prospektivních studií příznivý vliv na přežití bez relapsu (zejména u mladších pacientů), méně na celkové přežití vzhledem k možnosti dosažení kompletní remise i po relapsu a provedení transplantace následně (Koreth et al., 2009). Pacienti s nepříznivou cytogenetikou dostávají transplantované buňky i v případě, že pro ně není nalezen ideální HLA shodný dárce, protože v případě pouze chemoterapeutické léčby jsou jejich vyhlídky neveselé (Mayer et al., 2016).

2.2.11 Transplantace hematopoetických kmenových buněk

Transplantace hematopoetických kmenových buněk (stem cell transplantation, SCT, hematopoietic stem cells, HSC) je široce rozšířenou metodou léčby různých maligních i nemaligních hematologických onemocnění. Podle typu zdroje se rozlišují dva základní typy těchto transplantací: autologní, kdy nemocný daruje krvetvorné buňky sám sobě v době remise či minimální aktivity onemocnění, a alogenní, kdy odebrané buňky pocházejí z jiného jedince, nejčastěji od vhodného sourozence či nepříbuzného dárce. Zejména alogenní transplantace krvetvorby je velkou zátěží pro organismus nemocného, takže každý pacient je řešen individuálně vzhledem k věku, komorbiditám, molekulárním prognostickým faktorům, stavu onemocnění a dostupnosti vhodného dárce.

Běžně se používají dva možné zdroje krvetvorných buněk: kostní dřev (KD) a periferní krvetvorné buňky (peripheral blood stem cells, PBSC). U autologních transplantací se staly běžným zdrojem právě PBSC (Passweg et al., 2015), které jsou odebírány pomocí separátorů krevních buněk. U alogenních transplantací se zohledňuje přání dárce, oba typy materiálu mají své přednosti i slabiny (Koza et al., 2006).

Nejčastěji se hematopoetické buňky ve formě PBSC získávají po mobilizaci růstovými faktory (Baldomero et al., 2011). Běžně používaným indikátorem kvality štěpu je obsah CD34+ buněk – dostatečná dávka těchto buněk je klíčová pro úspěšné přihojení štěpu a další přežití pacienta. Optimální množství CD34+ buněk je $3-5 \times 10^6$ CD34+ buněk/kg hmotnosti příjemce u autologního, resp. alogenního štěpu (např. Toor et al., 2004).

2.2.12 MiRNA a zdravá hematopoéza

Důležitost miRNA v regulaci hematopoézy byla prokázána experimentem s odstraněním Diceru u hematopoetických kmenových buněk (human stem cells, HSC) a progenitorů, po němž docházelo ke ztrátě funkčních HSC z důvodu zvýšené apoptózy. Samostatné miRNA i rodiny miRNA regulují sebeobnovu a diferenciaci HSC, čímž HSC získávají jedinečný miRNA profil v každém stadiu diferenciace. Například tzv. „long-term HSC“ (LT-HSC, dlouhodobě existující HSC) mají zvýšenou expresi miR-125a, miR-125b, miR-155, miR-99a, miR-126, miR-196b, miR-130a, miR-542-5p, miR-181c, miR-193b a let-7e (O'Connell et al., 2010). Mnoho z nich bylo popsáno jako deregulovaných u AML, např. miR-125b, miR-196b (specificky u AML s MLL přestavbami) (O'Connell et al., 2010; Popovic et al., 2009). U lidských hematopoetických progenitorových buněk a multipotentních progenitorů bylo nalezeno např. zvýšení hladin miR-29a a miR-125a/b (Han et al., 2010; Ooi et al., 2010) nepřítomné u diferencovaných progenitorů. Pokud miR-29a chybí, dojde ke snížení počtu HSC a progenitorových buněk, sníží se sebeobnova HSC, více procházejí buněčným cyklem a apoptózou, což souvisí se zvýšenou expresí *DNMT3A* (Hu et al., 2015). Ektopická exprese miR-29a v HSC vede naopak ke zvýšení sebeobnovy buněk, k jejich přednostnímu směřování k myeloidní diferenciaci a ke vzniku myeloproliferativního onemocnění, které může vyústit až do AML (Han et al., 2010). miR-125a dokáže při ektopické expresi v multipotentních progenitorech zvýšit sebeobnovovací potenciál (Wojtowicz et al., 2016) a modulovat velikost progenitorové populace pomocí regulace apoptózy (Guo et al., 2010). miR-125b, je-li ektopicky exprimována v normální kostní dřeví,

zvyšuje schopnost sebeobnovy nejvíce z 11 dalších zvýšených miRNA nalezených v HSC (O'Connell et al., 2010). Umí také snížit míru apoptózy u HSC (Ooi et al., 2010).

U HSC, avšak už ne u progenitorových buněk člověka i myši jsou exprimovány také miR-126 a miR-130 (Gentner et al., 2010). Snížení exprese miR-126 v HSC zvyšuje proliferaci do progenitorových buněk a postup do buněčného cyklu jakož i počet HSC (Lechman et al., 2016). miR-223 je exprimovaná u CD34+ buněk v kostní dřeni myši (Chen et al., 2004) i u člověka (Fazi et al., 2005). Exprese narůstá od hematopoetických kmenových buněk (HSC) a myeloidních progenitorových buněk přes progenitory granulocytů (miR-223 je pozitivním regulátorem granulopoézy) a monocytů směrem k neutrofilům kostní dřeně, přičemž maxima dosahuje u neutrofilů uvolněných do periferní krve (Johnnidis et al., 2008).

Bylo nalezeno mnoho dalších miRNA, které plní důležité funkce v myelopoéze (např. let-7, miR-12, miR-146a, miR-196b, miR-181a, miR-24, miR-150 atd.). V analýzách se dají najít i protichůdné výsledky, závisující na typu zpracovávaného materiálu a použité metodice. Mutace genetického materiálu, související se vznikem AML, ovlivňují i miRNA, které jsou produkovány kmenovými a progenitorovými buňkami, což ústí v nefunkční diferenciaci, apoptózu a změny v obnově buněk.

Pro megakaryopoézu byla jako zásadní popsána miR-299-5p, jejíž zvýšená exprese byla nalezena v megakaryoblastech (Tenedini et al., 2010). Pro diferenciaci do monocytů a makrofágů se ukázaly jako klíčové miR-17, miR-18a, miR-20a a miR-106a, které mají vysokou expresní hladinu u hematopoetických progenitorových buněk (HPC) a následně jejich exprese klesá během diferenciaci v monocyty (Fontana et al., 2007). Další miRNA, miR-424, je také zahrnuta v monocytární diferenciaci, snižuje totiž úroveň translace transkripčního faktoru NFI-A, která je podmínkou diferenciaci, a její vlastní exprese je zvyšována transkripčním faktorem PU.1 (který zvyšuje monocytární diferenciaci) (Rosa et al., 2007). miR-221 a miR-222 jsou downregulovány u normální erytropoézy (Felli et al., 2005). Overexprese miR-24 v buněčné linii K562 kultivované v podmínkách pro erytroidní diferenciaci vede ke zvýšení hromadění hemoglobinu v buňce, zatímco knockdown miR-24 ke snižování množství hemoglobinu v buňce (Wang et al., 2006).

Ačkoli pro hematopoézu už bylo popsáno nemálo miRNA, hrajících svou roli v jejím běžném, zdravém průběhu i deregulovaných při vývoji AML a jiných hematologických onemocněních, přesné vzájemné vztahy a cílové geny těchto miRNA zůstávají povětšinou neodhaleny, protože celkové porozumění procesu tak složitého, jako je hematopoéza, je ještě záležitostí mnoha dalších studií.

2.2.13 Leukemické kmenové buňky a miRNA

Přibližně polovina pacientů, kteří dosáhnou kompletní remise (CR), po čase prožije znovuvzplanutí nemoci (relaps). Bylo zjištěno, že významnou roli ve vzniku relapsu hrají takzvané leukemické kmenové buňky (leukemic stem cells, LSC), což jsou na terapii rezistentní leukemické buňky s potenciálem kmenových buněk. Velmi malá populace těchto heterogenních buněk perzistuje ve dřeni pacienta v remisi a po určité době z ní opět povstane klonální populace nezralých myeloidních progenitorů, které způsobí návrat onemocnění. Tyto buňky jsou charakterizovány poněkud odlišným imunofenotypem než běžné kmenové buňky, čímž se dají v kostní dřeni detekovat pomocí průtokové cytometrie (oproti HSC jsou např. CD123++ (silně pozitivní), CD45RA+ (pozitivní), CD44++, CLL-1+, TIM3++, CD25+ aj.)- (např. Horton a Huntly, 2012). Bohužel se jedná o značně různorodou skupinu buněk, které se sice nejčastěji vyskytují v CD34+CD38- kompartmentu buněk kostní dřene, nicméně v menší míře se dají detekovat i dalších podskupinách. Jejich genetický profil se od normálních hematopoetických buněk taktéž špatně odlišuje, byl proto zkoumán i jejich miRNA profil v naději, že se podaří najít odlišnost, která by se dala použít pro terapeutické účely.

Leukemické kmenové buňky se nacházejí ve stejném kompartmentu kostní dřene jako hematopoetické kmenové buňky (CD34+CD38-). Leukemické buňky ovlivňují mikroprostředí i HSC samotné – potlačují normální krvetvorbu i pomocí miRNA, vylučovaných v exosomech (Hornick et al., 2016). Pro rozlišení profilů miRNA mezi HSC a LSC je nutno napřed obě skupiny oddělit, obvykle na základě jiné povrchové exprese určitých proteinů (markerů), které patří do odlišných buněčných linií či nepřísluší danému vývojovému stadiu (Van Rhenen et al., 2007). Naneštěstí ani tyto markery nefungují dokonale, buňky se liší pacient od pacienta. Povrchové markery, jako CLL-1, TIM-3 a CD123 mohou pomoci k jejich rozlišení, pro funkční odlišení se používá také ALDH (aldehyddehydrogenáza). HSC mají vysokou ALDH aktivitu, zatímco LSC nízkou, což v kombinaci s dalšími znaky může vést k poměrně spolehlivému odlišení obou populací. U HSC byly detekovány zvýšené hladiny miR-551b, miR-10a, miR-151-5p, miR-29b, miR-125b, zatímco u LSC produkovaly více miR-181b, miR-221, miR-21 a miR-22 (De Leeuw et al., 2014). Nejvyšší rozdíl byl popsán v expresi miR-551b, která je vysoce exprimována nejen v HSC u nemocných AML, ale i u HSC zdravé kostní dřene. Zajímavý je význam této exprese pro prognózu – u pacientů s vyšší expresí miR-551b byla prognóza horší než u těch s nižší (De Leeuw et al., 2016). Stejný účinek vykazuje zvýšená exprese miR-551b i u rakoviny vaječníků, kde způsobuje neúčinnou apoptózu a zvýšení přežití a proliferaci nádorových buněk (Wei et al., 2016), a u

rakoviny plic, kde způsobuje rezistenci na terapii (Wei et al., 2016). miR-551b leží v oblasti 3q26, která je u některých pacientů s AML translokována a u pacientek s nádorem vaječníků amplifikována.

Již zmiňované miR-29b a miR-125b patří mezi vysoce exprimované u HSC (De Leeuw et al., 2014), zatímco u pacientů s AML byl zaznamenán jejich pokles (O'Connell et al., 2010; Ooi et al., 2010). Ovšem při srovnání exprese miR-125b mezi AML a plnou kostní dřeň vychází najevo, že miR-125 je up-regulovaná, a to zejména u pacientů s t(2;11)(p21;q23) (Bousquet et al., 2008; McCormick et al., 2015). Zvýšení hladiny u MDS a této AML vede k zastavení diferenciaci, overexprese samotná může být zodpovědná za vznik myeloproliferativního onemocnění, které během několika měsíců vede ke vzniku AML (O'Connell et al., 2010; Bousquet et al., 2010), případně i dalších hematologických malignit jako B-ALL či T-ALL jak ukázaly i pokusy na myších (Bousquet et al., 2010).

miR-181b byla popsána jako zvýšeně exprimovaná u LSC oproti HSC (De Leeuw et al., 2014). Jedná se o miRNA, exprimovanou u cytogeneticky normálních AML s vysoce rizikovou genetikou (např. *FLT3-ITD+*, *NPM1-*) a přináší pro ně dobrou prognózu (Marcucci et al., 2008a), také je spojena s AML s mutovaným *CEBPA*, což může být alespoň zčásti vysvětlením pro dobrou prognózu (Marcucci et al., 2008). Overexprese miR-181b podporuje apoptózu a inhibuje životnost AML buněk s přestavbou *MLL (KMT2A)* (Li et al., 2012).

2.3 Exprese miRNA u AML

2.3.1 Odlišnosti v miRNA expresi mezi akutní myeloidní a lymfoblastickou leukemií

V roce 2007 Mi et al. prokázali, že pacienti s AML mají jiný miRNA profil než pacienti s ALL. Našli 27 různě exprimovaných miRNA (zdrojem pro ně byla periferní krev či kostní dřeň), z nichž 21 bylo up-regulovaných a 6 down-regulovaných právě u pacientů s AML. Největší rozdíl našli u *let-7b* a miR-223 (up-regulované u AML) a miR-128a a miR-128b (down-regulované, bez zvýšení počtu kopií příslušného genu u ALL). Všechny odlišně exprimované miRNA byly miR-128a, miR-128b, miR-151*, j-miR-5, miR-130b a miR-210 s výrazně vyšší expresí u ALL, a *let-7b*, miR-223, *let-7e*, miR-125a, miR-130a, miR-221, miR-222, miR-23a, miR-23b, miR-24, miR-27a, miR-27b, *let-7a*, *let-7c*, miR-199b, miR-26a, miR-335, miR-21, miR-22, miR-424 a miR-45 se zvýšenou hladinou exprese u AML (Mi et al., 2007). V roce 2010 další skupina dokázala odlišit AML od ALL na základě odlišné exprese 16 miRNA, z toho 8 bylo již dříve popsaných a 8 nově identifikovaných (Wang et

al., 2010). De Leeuw popsal 5 miRNA, odlišující AML a ALL v případech leukemie z nejasné linie (miR-23a, miR-27a, miR-199b, miR-221 a miR-223) (de Leeuw et al., 2013).

2.3.2 Změny v expresi miRNA u AML s různými cytogenetickými změnami

Podle Yeh et al. a dalších autorů je prokázána deregulace nemalého počtu miRNA u AML s příznivou i nepříznivou prognózou (viz Tab.4) (např. Organista-Nava et al., 2015; Yeh et al., 2016; Liao et al., 2017). Různí autoři zkoumali miRNA u AML dle FAB subtypu, dle genetických aberací, dle prognózy, srovnávali exprese miRNA mezi zdravými a nemocnými jedinci (AML blasty vs. plná krev, kostní dřeň, HSC...). Ve studiích používali různé metody i vstupní materiál (plnou krev, kostní dřeň, purifikované buňky, sérum, plazmu, buněčné linie...). Není proto divu, že žádný z výsledků neplatí absolutně a závěry jednotlivých prací si mezi sebou mnohdy i protirečí.

Tabulka 4. Přehled některých deregulovaných miRNA u AML s příznivou či nepříznivou prognózou (dle Yeh et al., 2016; Liao et al., 2016; Ciccone a Calin, 2015).

zelená – upregulované, růžová – downregulované, modrá – popsáno obojí

Příznivá prognóza		Nepříznivá prognóza		
let-7a-2-3p	miR-204	let-7a-3	miR-191	miR-342
miR-107	miR-20a	miR-122	miR-194	miR-34a (<i>TP53</i> bez změn)
miR-10a	miR-210	miR-124	miR-196b	miR-375
miR-10b	miR-212	miR-124-1	miR-199a	miR-378
miR-124-1	miR-221/222	miR-126	miR-210	miR-409-3p
miR-125	miR-223	miR-128-1	miR-219-5p	miR-424
miR-126	miR-25	miR-132	miR-22	miR-503
miR-135a	miR-29a	miR-133a	miR-220a	miR-542
miR-142	miR-29b	miR-133b	miR-221	miR-644
miR-143	miR-30a	miR-135a	miR-222	miR-9-5p
miR-150	miR-30b	miR-146a	miR-24	miR-96
miR-15b	miR-30c	miR-146b	miR-26a	
miR-16	miR-342	miR-148a	miR-29a	
miR-181	miR-34a (bialel. změna <i>TP53</i>)	miR-150	miR-29b	
miR-181a	miR-409-3p	miR-155	miR-29c	
miR-181b	miR-9	miR-155-5p	miR-30a	
miR-191	miR-96	miR-181b	miR-3151	
miR-193a	rodina let-7	miR-181b-5p	miR-320	
miR-199a	rodina miR-29	miR-188-5p	miR-331	
miR-203		miR-193b	miR-335	

- **miRNA u AML s core-binding factorem (CBF) (AML s t(8;21), inv(16)), akutní promyelocytární leukemie (APL) (t(15;17))**

Bylo zjištěno, že každý z prognosticky příznivých subtypů, CBF-AML s t(8;21), CBF-AML s inv(16) nebo t(16;16) a APL (akutní promyelocytární leukemie) s t(15;17) má jedinečný expresní profil miRNA, který je odlišuje od ostatních typů AML. U APL bylo nalezeno 7 up-regulovaných miRNA (miR-127, miR-154, miR-154*, miR-299, miR-323, miR-368, miR-370), transkribovaných z genů lokalizovaných v imprintované doméně v oblasti 14q32. U stejné diagnózy bylo naopak typicky 9 down-regulovaných miRNA (miR-17-3p, miR-185, miR-187, miR-194, miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-330, miR-339). Vzorky s inv(16) měly zvýšené hladiny miR-99a, miR-100, miR-224 a s t(8;21) vysoké exprese miR-146a a sníženou expresi miR-133a (Dixon-McIver et al., 2008). Exprese miR-9

a miR-let7b korelovaly s prognostickou stratifikací, u AML s příznivou prognózou byly níže exprimovány, u střední a nepříznivé prognostické skupiny naopak vysoce. Snížení exprese miR-9 bylo doloženo také u pediatrické AML s t(8;21) a experimentálně potvrzena jeho funkce tumor-supresoru (Emmrich et al., 2014). MiR-194-5p byla identifikována jako regulátor transkripčního faktoru BCLAF1 (BCL-2-associated transcription factor 1). Tato miRNA downreguluje expresi *BCLAF1*, dokáže nastavit euchromatinový stav typický pro diferencující buňky a je spojena se zvýšením míry diferenciace a s mírou odpovědi na léčbu. Rovnováha mezi miR-194-5p a BCLAF1 je u AML buněčných linií a AML blastů přenesených do laboratorních podmínek deregulována a lze ji minimálně částečně obnovit pomocí inhibitoru histonových deacetyláz (histone deacetylase inhibitors, HDACi), konkrétně SAHA (Dell'Aversana et al., 2017). Kromě této miRNA ovlivnilo použití SAHA i hladinu miR-92a-1*. MiR-27a, miR-126 a miR-150 byly popsány jako zvýšeně exprimované a naopak miR-21 jako downregulovaná u pediatrických pacientů s AML s t(8;21) ve srovnání s případy s t(15;17). MiR-100 vykazovala 10-krát vyšší expresi u t(15;17) ve srovnání s ostatními cytogenetickými subtypy (Daschkey et al., 2013).

U AML s inv(16) (CBFB-MYH11 fúzní gen) byla dále nalezena také up-regulace miR-126/miR-126*. Exprese dvou (miR-126 a miR-126*), tří (miR-224, miR-368 a miR-382) a sedmi miRNA (miR-17-3p, miR-20a a výše zmíněných pět) dokázala s 94% přesností rozdělit AML na skupiny s přestavbami CBF-AML s t(8;21) nebo inv(16), s t(15;17) a MLL-rearanžemi (Li et al., 2008). Také bylo nalezeno celkem 24, 19, 11, 2, 3 a 5 odlišně exprimovaných miRNA u AML s MLL-přestavbami, u t(15;17), u t(8;21) s inv(16), u samotné t(8;21), u samotné inv(16) a u normálních kontrol ve srovnání se všemi ostatními vzorky (dohromady 41 různých miRNA) (Li et al., 2008). AML s normální cytogenetikou a abnormalitami typu t(8;21), inv(16) a t(15;17) měly zvýšenou expresi miR-181a/b a tím lepší vyhlídky, zatímco AML s MLL přestavbami a dalšími nepříznivými faktory měla hladinu této miRNA sníženou a s tím související i nepříznivou prognózu (Li et al., 2012).

U AML s t(8;21) (*AML1/ETO*) byla prokázána down-regulace miR-193a, spojená s vlivem na celkové přežití (overall survival, OS) a přežití bez nežádoucích epizod (event-free survival, EFS) (Li et al., 2013). *AML1/ETO* reprimuje miR-193a a PTEN vazbou na *AML1*-vazebná místa, čímž dojde k zapojení chromatin-remodelujících enzymů. Díky tomu dojde k poklesu exprese miR-193a, která pak neinhibuje onkoprotein *AML1/ETO*. Obdobně funguje pravděpodobně pro *DNMT3A*, *HDAC* a *KIT* geny, zatímco normálně navíc upreguluje PTEN, který je tumor supresorem (Li et al., 2013).

U stejného typu AML byla zjištěna také downregulace miR-223 (Fazi et al., 2005). miR-223 je přímým transkripčním cílem AML1/ETO, opět díky zapojení chromatin-remodelujících enzymů na AML1-vazebném místě na genu pro miR-223. AML1/ETO je tedy zodpovědné za snížení exprese miR-223.

Podobný expresní profil miRNA byl zjištěn u *AML1/ETO* a *CBFB/MYH11* AML (Cammarata et al., 2010). Down-regulovaných u *AML1/ETO* bylo 13 miRNA (miR-9, miR-196a, miR-10a, miR-135a, miR-125b, miR-148a, miR-133a a miR-221) a 4 up-regulované (miR-449b, miR-320, miR-126 a miR-328). U *CBF-AML* byly zvýšeny oproti jiným skupinám 2 miRNA (miR-126 a miR-320) (Cammarata et al., 2010).

AML s t(8;21) nebo inv(16) s nadměrnou expresí KIT antigenu mají sníženou expresi miR-221/222 a miR-223 (Brioschi et al., 2010). miR221/222 se vážou na 3'UTR KIT mRNA – snížením hladiny miR-221/222 se zvyšuje exprese KIT. Regulace genu *KIT* clusterem miR-221/222 již byla potvrzena dříve (Felli et al., 2005).

APL s typickou přestavbou t(15;17) kromě již výše zmíněných změn prokazatelně charakterizují i změny v miRNA. Z 12 miRNA, zapojených do granulopoézy, bylo u APL zvýšeno 9 miRNA a sníženy hladiny miR-107, miR-342 a *let-7c* (Careccia et al., 2009). Po úspěšné léčbě ATRA (all-trans retinoic acid, v kombinaci s trioxidem arsenu (ATO) nebo anthracyklinovou chemoterapií) došlo k poklesu miR-181b a nárůstu expresí miR-15a, miR-15b, miR-16, miR-107, miR-223, miR-342 a rodiny *let-7* (Careccia et al., 2009; Garzon et al., 2007). U pacientů po léčbě ATRA po dosažení kompletní remise došlo ke zvýšení exprese miR-15a/16, původně snížených, a u dvou pacientů v čase relapsu se exprese miR-15a opět snížila (Gao et al., 2011). Translokace t(15;17) ve srovnání s ostatními typy AML přinesla i významně sníženou expresi miR-124-1 (Chen et al., 2014) a souvislost nízké hladiny s příznivou prognózou, delší dobou přežívání bez relapsu a delší dobou celkového přežití.

Jongen-Lavrencic et al. uvádějí pro APL mnoho deregulovaných miRNA. miR-193b, miR-379, miR-382, miR-485-5p, miR-134, miR-376a, miR-299-5p, miR-452, miR-127, miR-224, miR-432, miR-370, miR-100, miR-323, miR-125b, miR-154, miR-424, miR-181a,b,d popsali jako up-regulované, zatímco miR-196a,b, miR-151, miR-10b a *let-7c* jako downregulované (vesměs ve shodě s jinými nálezy) (Jongen-Lavrencic et al., 2008). U AML s t(8;21) našli zvýšenou hladinu miR-126* (obdobně jako Li et al., 2008) a snížené hladiny miR-148a, miR-125b, miR-99a, miR-133a, b, miR-9, miR-10a, b, miR-196a, b, miR-133a a *let-7b, c*. Podobné nálezy popsali i pro AML s inv(16): downregulované miR-10a, b, miR-

196a, b, miR-127, miR-192, let-7b, c a up-regulované miR-424, miR-199b, miR-365, miR-335, miR-511, miR-99a, miR-100, miR-224 (Jongen-Lavrencic et al., 2008).

- **miRNA u AML s t(9;11)(11q23) – přestavby genu *MLL*, t(6;11), trizomie 8. chromozomu**

Typickou expresi, sestávající z 8 up-regulovaných miRNA (miR-326, miR-219, miR-194, miR-301, miR-324, miR-339, miR-99b, miR-328) a 14 down-regulovaných miRNA (miR-34b, miR-15a, miR-29a, miR-29c, miR-372, miR-30a, miR-29b, miR-30e, miR-196a, let-7f, miR-102, miR-331, miR-299, miR-193), uvádí u pacientů s t(11q23) studie z roku 2008 (Garzon et al., 2008). Stejná studie zjistila up-regulaci 16 miRNA u pacientů s t(6;11), a to včetně miR-21 (antiapoptotický účinek) a miR-26a/b. Pacienti s AML t(6;11)(q27;q23) měli podle Gong et al. více exprimovanou miR-29b-3p (Gong et al., 2014). Podle jiné studie bylo u AML s t(9;11) nalezeno 24 odlišně exprimovaných miRNA (downregulovány miR-126, miR-126*, miR-130a, miR-146a, miR-181a, miR-181c, miR-181b, miR-181d, miR-224, miR-368, miR-382, miR-424, upregulovány miR-10a, miR-10b, miR-124a, j-mir-2, miR-196b, miR-17-3p, miR-18a, miR-19a, miR-19b, miR-17-5p, miR-20a, miR-92, miR-93). Z overexprimovaných miRNA pochází 7 z unikátního polycistronního miRNA clusteru (mir-17-92: miR-17-5p, miR-17-3p, miR-18a, miR-19a, miR-19b, miR-20a a miR-92) (Li et al., 2008). Podle Li et al. (Li et al., 2012) došlo u AML s t(9;11) k poklesu exprese miR-181a, b, což opět odpovídá nepříznivé prognóze, kterou tato translokace přináší. Vyšší hladina prekurzorové miR-196b nalezená u AML s *MLL* přestavbami odpovídá výsledkům jedné z předešlých studií (Popovic et al., 2009). Vzorky z pediatrických AML s přestavbami genu *MLL* vykazovaly 15 odlišně exprimovaných miRNA oproti ostatním subtypům (Daschkey et al., 2013).

U AML s t(9;11) byla pozorována downregulace miR-150 (Bousquet et al., 2013) a upregulace miR-29b-3p (Gong et al., 2014). MiR-424 a miR-503 jsou u těchto pacientů také downregulovány. Obě přímo ovlivňují průběh buněčného cyklu – bylo pozorováno, že obě dokáží downregulovat miR-9 (s antidiferenčním potenciálem), který u *MLL* AML byl popsán jako zvýšeně exprimovaný (Forrest et al., 2010). Zvýšení miR-9 u tohoto typu AML bylo popsáno i dalšími studiemi (Chen et al., 2013). U AML s t(9;11)(p22;q23) byla detekována downregulovaná rovněž miR-126-5p (Wang et al., 2008).

Pacienti s izolovanou trizomií chromozomu 8 měli up-regulovaných 42 miRNA a žádnou down-regulovanou. Mezi up-regulovanými byly i miR-124a a miR-30d, lokalizované

na oblastech 8. chromozomu (8p21 a 8q23), což naznačuje možnost ovlivnění jejich exprese právě přidaným chromozomem (Garzon et al., 2008).

Pacienti s normálním karyotypem měli 10 up-regulovaných miRNA (miR-10a, miR-10b, miR-26a, miR-30c, let-7a-2, miR-16-2, miR-21, miR-181b, miR-368, miR-192) a 13 down-regulovaných miRNA (miR-126, miR-203, miR-200c, miR-182, miR-204, miR-196b, miR-193, miR-191, miR-199a, miR-194, miR-183, miR-299, miR-145) oproti pacientům s abnormálním karyotypem (Garzon et al., 2008). Nicméně podle jiné studie (Dixon-McIver et al., 2008) nepřinesl nadbytečný chromozom 8 žádné typické odlišnosti v miRNA profilu.

U AML s t(2;11)(p21;q23) byla prokázána zvýšená exprese miR-125b-1 (Bousquet et al., 2008).

2.3.3 Změny v expresi miRNA u AML s molekulárně-genetickými přestavbami

I menší změny než cytogenetické jsou spojeny s deregulací miRNA u AML. Prognosticky nepříznivá přítomnost *FLT3-ITD* se vyznačuje zvýšenou i sníženou expresí různých miRNA, podobně jsou na tom pacienti s mutovaným *NPM1*, zvýšenou expresí genu *BAALC* a další.

- ***FLT3-ITD*, mutované *NPM1*, *IDH*, *ERG*, *RUNX1***

MiR-155, miR-10a a miR-10b byly popsány jako zvýšeně exprimované u pacientů s *FLT3-ITD* (Garzon et al., 2008). Pacienti s *FLT3-ITD* s/bez mutovaného *NPM1* měli zvýšenou expresi miR-10a, miR-135a, miR-125b, miR-196a, miR-100, miR-27b, miR-155 a miR-196b (Cammarata et al., 2010), kde vzorky s oběma mutacemi nesly charakteristickou overexpresi miR-10a, miR-196a, miR-196b a miR-27b. Byla nalezena spojitost exprese rodiny miR-10 s mutačním statutem *NPM1* u CN-AML (Havelange et al., 2014), která potvrdila výsledky předešlých studií. Pacienti s mutovaným *NPM1* vykazovali 19 up-regulovaných miRNA (miR-10b, miR-10a, miR-148a, miR-202, miR-107, miR-597, miR-9, miR-452, miR-190, miR-196a, miR-34a, miR-95, miR-196b a miR-27b) (Cammarata et al., 2010). Downregulaci *miR-204* u AML s mutovaným *NPM1* popsala studie z roku 2008 (Schlenk et al., 2008). U pacientů se zvýšenou hladinou miR-3151 byla naopak vyšší pravděpodobnost nemutovaného *NPM1* s tím, že čím vyšší hladina miR-3151, tím horší prognóza (Diaz-Beya et al., 2015).

V jiné studii je shodně popsána up-regulace miR-155 u pacientů starších 60 let s *FLT3-ITD* a normální cytogenetikou a navíc up-regulace miR-125b-2* a down-regulace

miR-144, miR-451, miR-488 a miR-486-5p (Whitman et al., 2010). MiR-155 byla nalezena opět zvýšeně exprimována u pacientů s *FLT3-ITD*, kde indukuje myelomonocytární diferenciaci a apoptózu (Palma et al., 2014). U pacientů s mutovaným *NPM1* byla upregulována miR-9, let-7a a let-7c a downregulována miR-130a (Becker et al., 2010) a dále, bez ohledu na *FLT3* status, downregulována exprese miR-424 a opět potvrzena upregulace miR-155 u AML s *FLT3-ITD* s/bez mutovaného *NPM1* (Faraoni et al., 2012). Nedávná japonská studie spojila přítomnost *FLT3-ITD* také s downregulací miR-215 (Wang et al., 2016). MiR-10a, miR-10b, miR-196a a miR-196b byly overexprimovány u AML s mutovaným *NPM1* (Jongen-Lavrencic et al., 2008), což korelovalo s výsledky dalších studií (např. Cammarata et al., 2010).

Rodina miR-181 mívá sníženou expresi u AML s *FLT3-ITD* či nemutovaným *NPM1* nebo oběma změnami (Marcucci et al., 2008). Zvýšenou expresi miR-181a u pacientů s AML, zejména s nemutovaným *NPM1*, což je v souladu s výsledkem předešlé výzkumné skupiny, či s mutovaným *CEBPA*, mutovaným *IDH1* nebo nižší expresí *ERG* či vyšší expresí *BAALC* prokázala jiná studie (Schwind et al., 2010). U CN-AML s nízkou expresí *ERG* bylo navíc upregulováno 5 miRNA a downregulováno 6 miRNA – vyšší expresi se vyznačovala především miR-107, která cílí na gen *NFIX*, zahrnutý v regulační smyčce obsahující mj. rovněž miR-223 a gen *CEBPA* (Fazi et al., 2005). Dalšími upregulovanými byly miR-148a a miR-208 a downregulovaná miR-302d, spojená s časnými stádii vývoje krevních buněk (Schwind et al., 2010). U AML s *FLT3-ITD* byla nalezena mírně zvýšená hladina miR-92a, avšak výsledek nebyl statisticky signifikantní (El-Halawani et al., 2014). Pediatrickí pacienti s *FLT3-ITD* a mutovaným *NPM1* měli také výrazně nízkou expresi miR-150 (Morris et al., 2013).

S mutovaným *IDH2* (mutace R172) souvisí zvýšená hladina miR-1, miR-133 a miR-125a-5p a miR-125b (jejichž cílovým genem je *TP53*) a dalších miRNA. Všechny tyto miRNA byly již dříve spojeny s hematopoézou a jejími poruchami (Bousquet et al., 2008; Klusmann et al., 2010; O'Connell et al., 2010). MiR-133 je také popsána jako regulátor Evi1 (ecotropical viral integration site 1, Evi1), kdy dokáže dokonce zvýšit senzitivitu Evi1-vysoce exprimujících buněk na chemoterapeutika (Yamamoto et al., 2016). Evi1 je transkripční faktor, popsáný jako zvýšeně exprimovaný u AML a myelodysplastického syndromu (MDS) a spojený s nepříznivou prognózou (Nucifora et al., 2006).

Downregulovány v případech s mutovaným *IDH2* byly mj. miR-194-1, miR-526, miR-520a-3p a miR-548b (Marcucci et al., 2010).

Favreau et al. zkoumali souvislost exprese miR-199b s mutacemi *NPM1* a *IDH1*. Zjistili, že pacienti s normální hladinou miR-199b mají většinou nemutované *NPM1* a *IDH1*. Zároveň odhalili, že výrazně sníženou expresi miR-199b lze nalézt u pacientů s AML FAB subtypu M5, který má velmi špatnou prognózu. U buněčné linie tohoto typu odhalili, že mechanismem změny exprese miR-199b bude nejspíše epigenetická regulace prostřednictvím acetylace histonů. Ostatní subtypy AML měly nižší procento zastoupení pacientů se sníženou expresí této miRNA, což souvisí i s jejich prognózou (Favreau et al., 2016).

U starších pacientů s mutovaným *RUNX1* a *NPM1**wt* došlo ke snížení exprese rodiny let-7, miR-223, miR-99a, miR-100 a zvýšení exprese miR-211, miR-220 a miR-595 (Mendler et al., 2012).

- **Mutovaný gen *CEBPA*, *DNMT3*, zvýšená exprese genu *BAALC* a další**

Cyto geneticky normální AML s *CEBPA* mutací mají zvýšenou expresi celé rodiny miR-181, miR-335, miR-128, miR-192, miR-219-1-3p, miR-224 a miR-340 a sníženou expresi celé řady miRNA (miR-196a, b, miR-149, miR-9, miR-21, miR-130b, let-7b, miR-99b, miR-148, miR-34a, miR-194) (Garzon et al., 2008; Marcucci et al., 2008; Jongen-Lavrencic et al., 2008; Schwind et al., 2010). MiR-34a je prokázaným regulátorem *CEBPA* genu během granulopoézy – zvýšením miR-34a exprese u AML blastů s *CEBPA* mutací došlo k nastartování granulocytární diferenciace (Pulikkan et al., 2010). Další miRNA, která je u buněk s *CEBPA* mutací (*in vitro*) downregulována, je miR-124a. Ošetření testovaných buněčných linií DNA-demetylačním činidlem 5-aza-2'-deoxycytidinem způsobilo opět obnovení exprese (Hackanson et al., 2008).

Snížená exprese miR-29b nepřímo způsobuje zvýšení exprese tyrosin kinázy KIT a přispívá k leukemogenezi (Paschka et al., 2006). MiR-29b přímo interaguje s 3'UTR regiony metyltransferáz *DNMT3A* a *DNMT3B*, inhibice *DNMT1* probíhá přes mediátor Sp1. Infekce AML buněčné linie miR-29b vedla ke snížení exprese všech tří metyltransferáz (Garzon et al., 2009). Snížení hladiny této miRNA způsobuje zvýšenou hladinu Sp1, což zesiluje aktivitu komplexu SP1/NFκB/HDAC, který následně zvyšuje expresi genu *BAALC* a miR-3151, které leží v oblasti 8q22 (Eisfeld et al., 2014). MiR-3151 se váže na 3'UTR region *TP53*, čímž ovlivňuje na *TP53* vázanou apoptózu. Gen *BAALC* je pod kontrolou *RUNX1*, který je u AML často translokován (Eisfeld et al., 2014). Zvýšení exprese *BAALC* a miR-3151 vede ke špatné prognóze pro pacienty (Schwind et al., 2010; Eisfeld et al., 2012; Diaz-Beya et al., 2015). U pacientů s vysokou hladinou exprese *BAALC* byla popsána výrazně snížená hladina miR-148a

– tato miRNA může zřejmě fungovat jako negativní regulátor *BAALC* exprese (Langer et al., 2008). U AML nad 60 let věku a s nízkou expresí genu *BAALC* došlo k získání specifického miRNA podpisu – 10 upregulovaných miRNA (včetně miR-10a, miR-10b a miR-9 – všechny jsou součástí *HOX* clusteru a jejich overexprese odpovídá zvýšené expresi *HOX* genů u lidí s nízkou expresí *BAALC*) a 18 downregulovaných miRNA (např. miR-126, miR-222) (Schwind et al., 2010).

U AML s mutovaným *DNMT3* nalezla studie z roku 2012 zvýšenou expresi miR-10a*, miR-659, miR-147, miR-361-3p a sníženou expresi miR-30c-1*, miR-181c, miR-504, miR-365-2, miR-410, miR-626, miR-640 (Marcucci et al., 2012).

Pozitivní korelaci mezi expresí genu *MNI* a expresí miR-126, miR-126*, miR-424 a negativní korelaci mezi *MNI* a miR-16, miR-17-92, miR-100, miR-196a přinesla studie z roku 2009 (Langer et al., 2009). AML s nízkou expresí *MNI* se od ostatních podle jiné studie odlišuje zvýšením hladin miR-30b, miR-126, miR-126*, miR-30a, miR-146a, miR-146, miR-199a, miR-363 a snížením exprese let-7b, miR-10a, miR-10a*, miR-10b, miR-449a, miR-550* a miR-766 (Schwind et al., 2011).

Mutovaný gen *TET2* je spojen se zvýšenou expresí miR-148a, miR-148b, miR-24, miR-640, miR-107 a sníženou expresí miR-135a a miR-186 (Metzeler et al., 2011).

U pacientů s komplexními změnami karyotypu (complex karyotype, CK) byly nalezeny změny v miRNA expresi v souvislosti se statutem *TP53*. U případů s abnormálním *TP53* (ztráta, mutace) bylo identifikováno 22 deregulovaných miRNA, z nichž největší snížení exprese vykazovala miR-34a a nejvyšší zvýšení miR-100 (Rücker et al., 2013).

2.3.4 Srovnání exprese miRNA u nemocných s AML a zdravých myeloidních progenitorových (CD34+) buněk

Zdravé myeloidní progenitorové buňky (CD34+) vykazují jiné hladiny různých miRNA oproti myeloidním blastům u AML.

Zvýšená hladina miR-34a, miR-23b a klastru miR-221/miR-222 byla nalezena u pacientů s AML (Isken et al., 2008). Up-regulaci miR-221 spolu s miR-26a popisuje také další studie (Cammarata et al., 2010) a v případě miR-221/miR-222 ještě další studie (Rommer et al., 2013). Další studie odhalila 26 down-regulovaných miRNA a žádnou up-regulovanou (Garzon et al., 2008). Oproti kostní dřeni zdravých jedinců vykazují pacienti s AML také snížení exprese miR-150 (Morris at al., 2013), což potvrdila i studie, která se zabývala vzorky plazmy (Fayyad-Kazan et al., 2013).

Srovnání zdravých myeloidních progenitorů a AML blastů prokázalo 33 deregulovaných miRNA u AML (17 up-regulovaných: let-7e, miR-27a, miR-30d, miR-142-5p, miR-155, miR-181a, miR-181b, miR-181c, miR-195, miR-221, miR-222, miR-324-5p, miR-326, miR-328, miR-331, miR-340, miR-374; 16 down-regulovaných: miR-9*, miR-15b, miR-26a, miR-30a-3p, miR-34c, miR-103, miR-147, miR-151, miR-182, miR-184, miR-199a, miR-302b*, miR-302d, miR-325, miR-367, miR-372) (Dixon-McIver et al., 2008).

Zhang et al. zjistili u pacientů s nově diagnostikovanou AML sníženou expresi miR-370 ve srovnání se vzorky kostní dřeně od zdravých dárců. Srovnali také hladinu exprese této miRNA u 6 pacientů při záchytu a po dosažení kompletní remise, kdy došlo k 2,1-násobnému nárůstu exprese miR-370 (Zhang et al., 2012).

Bylo prokázáno, že exprese miR-199b se snižuje u pacientů s AML oproti zdravým kontrolám (Favreau et al., 2016).

Rozdíl v expresi miRNA (zejména miR-126, miR-126, miR-224, miR-368, miR-382, miR-17-5p, miR-20a) mezi pacienty s AML a zdravými kontrolami byl pozorován skupinou Li et al. (2008). Zvláště výrazná byla up-regulace miR-126/miR-126*, ovšem bez nalezeného zmnožení příslušného genu. Zjistili také, že deregulace miR-126/miR-126* je dána nejspíše epigeneticky, hypometylací CpG regionu. MiR-126 inhibuje apoptózu a má synergistický efekt spolu s *AML1-ETO*.

Srovnáním hladiny miR-92a v plazmě a leukemických buňkách pacientů s AML, ALL vs. zdravé kontroly se zabývala studie z r. 2009 (Tanaka et al., 2009). Byl použit poměr miR-92a/miR-638, který byl významně snížený u pacientů s AL (bez ohledu na typ a subtyp), avšak v samotných leukemických buňkách byla exprese miR-92a významně vyšší, než u normálních blastů. Její exprese byla obdobně silná u AML i ALL blastů. Stejnou miRNA se zabývala i další výzkumná skupina (El-Halawani et al., 2014), která opět přes srovnání poměru miR-92a/miR-638 zjistila v plazmě pacientů sníženou hladinu miR-92a, což je v souladu s výsledkem předešlé studie.

Expese miRNA v séru zdravých kontrol a nemocných s AML byla odlišná i v případě studie z r. 2013 (Zhi et al., 2013), která identifikovala 6 odlišně exprimovaných, up-regulovaných miRNA (miR-10a-5p, miR-93-5p, miR-129-5p, miR-155-5p, miR-181-5p, miR-320d) u AML.

Plazmatická hladina miR-150, miR-339, miR-342 a let-7d byla down-regulována a let-7b a miR-523 up-regulována u pacientů s AML ve srovnání se zdravými kontrolami (Fayyad-Kazan et al., 2013). Jako diagnosticky nejpřesnější byly určeny miR-150 a miR-342 a co víc,

pacienti v CR se blížili svými hladinami exprese zdravým kontrolám, což naznačuje možnost použití pro sledování vývoje nemoci.

Nejnovější studie, která se zabývala expresí miRNA v plazmě pacientů s AML ve srovnání se zdravými jedinci, popsala snížení exprese miR-92a a miR-342 v souladu s výsledky předešlých studií, a přidala k nim ještě downregulaci miR-143. Ze zmíněných miRNA pouze miR-92a prokazovala spojitost s FAB klasifikací (nejvyšší exprese u AML M4) (Elhamamsy et al., 2017).

Downregulace miR-215 u pacientů s AML byla prokázána studií z roku 2016 (Wang et al., 2016). Naopak zvýšení hladiny let-7a-3 bylo zjištěno u 25% *de novo* vzniklých AML (Li et al., 2013).

2.3.5 MiRNA a FAB klasifikace AML, rodina miR-181

Pozornost byla opakovaně věnována rodině miR-181 (miR-181a/b/c/d), které byly poprvé identifikované jako specificky exprimované v hematopoetických buňkách. Jsou evolučně konzervovány mezi téměř všemi obratlovci. U člověka jsou geny pro miR-181a a miR-181b společně lokalizovány na chromozomech 1 a 9, zatímco geny pro miR-181c a miR-181d leží společně na chromozomu 19 (Weng et al., 2015).

Debernardi et al. zjistili, že exprese miR-181a je signifikantně vyšší u AML M1 a M2 než u M4 a M5 (Debernardi et al., 2007). To bylo potvrzeno další studií, kde byla up-regulace miR-181b popsána jako typická pro AML M1 a M2, zatímco pro FAB subtypy M4 a M5 vycházela charakteristická up-regulace u miR-17-5p, miR-17-3p a down-regulaci miR-181a (Isken et al., 2008). Lutherborrow et al. (2011) prokázali, že na základě odlišné exprese miRNA je možné odlišit FAB subtypy M1 a M5. U AML subtypu M1 je přítomna overexprese členů rodiny miR-181 (miR-181a, miR-181b, miR-181d a miR-181a*) a navíc také miR-130a, miR-135b, miR-146-a, miR-146b, miR-663, zatímco subtyp M5 byl charakteristický up-regulací miR-193a, miR-21 a miR-370 (Lutherborrow et al., 2011). U AML s normální cytogenetikou a CEBPA mutacemi dochází ke zvýšení exprese *miR-181a* a lepší prognóze takových pacientů (Marcucci et al., 2008), čemuž neodporuje zjištění, že AML s *FLT3-ITD* a/nebo wild-typem *NPM1* mívá sníženou expresi miR-181a/b a zvýšené riziko selhání léčby, relapsu nebo smrti (Marcucci et al., 2008; Schwind et al., 2010). AML s MLD (dysplázie více řad, multilineage dysplasia) se vyznačuje sníženou expresí miR-181a, která je spojena se špatnou odpovědí na terapii (Garzon et al., 2008). Vliv hladiny miR-181a/b na prognózu pacienta potvrdily i další studie (Marcucci et al., 2008; Schwind et al., 2010; Li et

al., 2012). Podle výsledků těchto studií se dají miR-181a a miR-181b považovat za prediktory prognózy – zvýšená exprese znamená lepší vyhlídky. Kromě toho dokáže ektopická exprese miR-181 snížit životnost AML buněk s přestavbami MLL a nastartovat v nich apoptózu, což je zřejmě mechanismus jejího účinku (Li et al., 2012).

Studie zabývající se rozdílem v expresi miR-335 mezi pediatrickými pacienty s AML a vzorky zdravých kontrol odhalila, že miR-335 je významně up-regulována v kostní dřeni i séru nemocných (Lin et al., 2015). Vyšší hladina miR-335 byla přítomna u AML M7 oproti ostatním FAB subtypům, a byla asociována s nepříznivou prognózou (bez ohledu na cytogenetické faktory).

V další studii se autoři snažili najít rozdíly v expresi miR-335 v séru a kostní dřeni mezi pacienty s AML po dosažení kompletní remise (CR) a pacienty, kteří jí nedosáhli (non-CR). Zjistili, že hladina v séru se neliší, ale u vzorků kostní dřene převažovala nízká exprese miR-335 u těch pacientů, kteří dosáhli CR (Yingchun et al., 2015). Ve shodě s předešlou studií byl prokázán onkogenní potenciál miR-335 a také její prognostický význam.

Nejnižší nalezená exprese miR-92a byla přítomna u AML M0, zatímco nejvyšší u AML M6, avšak tyto rozdíly nebyly statisticky signifikantní (El-Halawani et al., 2014).

2.3.6 Prognostický význam deregulace miRNA

Od počátku studií miRNA u AML pacientů bylo zkoumáno také spojení deregulace exprese miRNA a prognózy.

Pro CBF-AML, které mají lepší prognózu, bylo prokázáno zvýšení miR-126 u t(8;21) i inv(16) (např. Li et al., 2008, Jongen-Lavrencic et al., 2008). Snížení hladiny miR-193 bylo asociováno s celkovým přežitím (overall survival, OS) a dobou přežití bez nežádoucích událostí (events free survival, EFS). Pro stejnou skupinu s overexpresí *KIT* bylo popsáno i snížení exprese miR-221/222 a miR-223 (Brioschi et al., 2010). U pediatrických pacientů s t(8;21) byla popsána deregulace tumor-supresorové miR-9 (Emmrich et al., 2014). Souvislost s pravděpodobností dosažení kompletní remise (CR) s expresí rodiny miR-10 u pacientů s AML nad 60 let věku prokázala studie z roku 2014 (Havelange et al., 2014). Zvýšení exprese miR-181 u CN-AML a AML s *CEBPA* mutací bylo asociováno se zvýšením OS (overall survival, celkové přežití) a EFS (events free survival, přežití bez nežádoucích událostí) (Marcucci et al., 2008). Zvýšení miR-20a vedlo ke zvýšení procenta dosažených remisí a delší OS u pacientů se zvýšenou expresí *MNI*, a zvýšení exprese miR-181b, které obvykle mívá na prognózu pozitivní vliv, mělo u těchto pacientů vliv zcela opačný, vedlo ke

snížení počtu CR, snížení OS i RFS (relaps-free survival) (Xiang et al., 2013). Pokles miR-29a u pediatrických AML blastů ve srovnání s normální kostní dřeví byl spojen s nepříznivým karyotypem a snížením RFS a OS (Zhu et al., 2013). Výraznější vliv miR-29a a prognózy byl znát u kategorie se středním rizikem. Horší OS u snížené exprese miR-29b prokázala jiná studie (Xiong et al., 2011). Zvýšené riziko relapsu popisuje u snížení miR-135a a miR-409-3p jiná studie (Díaz-Beyá et al., 2014), naopak zvýšení miR-142 je spojeno s delším celkovým přežitím (Dahlhaus et al., 2013). U AML s komplexním karyotypem ovlivňuje roli miR-34a status *TP53* – zvýšení exprese miR-34a znamená u pacientů s nezměněným *TP53* zhoršení OS, zatímco u pacientů s bialelickou změnou *TP53* naopak zlepšení OS (Rücker et al., 2013), to vše bez prokázané spojitosti mezi miR-34a a geny, působícími v této signální dráze. Snížená exprese miR-96 byla u *de novo* vzniklé AML asociována s vyšším počtem bílých krvinek, vyšším počtem blastů v kostní dřeví, sníženým množstvím hemoglobinu a krevních destiček a přinášela s sebou kratší dobu RFS a OS, kdy po indukční chemoterapii cytarabinem a daunorubicinem se exprese miR-96 opět zvýšila (Zhao et al., 2014). Obdobný efekt je popsán pro miR-204, jejíž pokles je svázán se snížením OS. Po dosažení CR se její hladina opět zvýšila (Butrym et al., 2015). MiR-204 zasahuje do translace genů *HOXA10* a *MEIS1*, které hrají roli v myeloidní diferenciaci a ve vzniku AML (Garzon et al., 2008). Bez ohledu na cytogenetický nálezn bylo zjištěno, že zvýšené exprese miR-212, miR-25a a miR-203 jsou spojeny s lepší prognózou, vyšším OS, EFS i RFS, aniž by bylo zatím zřejmé propojení těchto miRNA s hematopoezou či leukemogenezí (Wang et al., 2010; Gentner et al., 2015). Pacienti s příznivou cytogenetikou měli vyšší expresi miR-92a spolu s pacienty se středním cytogenetickým rizikem, avšak u skupiny s nepříznivou cytogenetikou byla tato miRNA výrazně down-regulovaná (El-Halawani et al., 2014). Dixon-McIver et al. (2008) prokázali, že nižší exprese miR-9 a let-7b je přítomna u pacientů v cytogeneticky příznivé skupině, zatímco zvýšení hladin těchto miRNA se dalo nalézt u pacientů se střední a špatnou prognózou. MiR-155 byla potvrzena jako nezávislý prognostický faktor pro mladší i starší pacienty s CN-AML (Marcucci et al., 2013; Zhi et al., 2013) spolu s miR-9-5p. Snížení exprese miR-188-5p souviselo u CN-AML s lepší prognózou (Jinlong et al., 2015).

Bylo prokázáno, že pacienti s vysokou expresí miR-199a a miR-191 mají výrazně kratší dobu přežití (Garzon et al., 2008). Také miR-181b-5p koreluje s přežitím pacientů – pacienti s vyšší expresí této miRNA měli významně kratší dobu přežití (Zhi et al., 2013), zatímco snížená exprese miR-181a/b vedla v případech s různými přestavbami k horší reakci na léčbu, vyššímu výskytu relapsu a celkově ke zhoršení prognózy (Weng et al., 2015).

Zhoršenou prognózu měli pediatričtí pacienti se sníženou expresí miR-150 při současné přítomnosti *FLT3-ITD* a mutovaném *NPM1* a obdobně, avšak statisticky neprůkazně díky nízkému počtu případů, vyšla v této studii i populace dospělých AML (Morris et al., 2013).

Overexprese *let-7a-3* byla nalezena u 25% pacientů s AML a u těch pacientů, kteří dosáhli CR, znamenala snížení celkové doby přežití (Li et al., 2013). Zvýšená exprese miR-378, přítomná u 31% AML, byla spojena s nižší hladinou hemoglobinu a kratším RFS (Qian et al., 2013). Další miRNA, jejíž zvýšení souvisí s nepříznivou prognózou, je miR-126. Pacienti s vyšší expresí této miRNA měli vyšší riziko relapsu a kratší doby přežití (de Leeuw et al., 2014; Shibayama et al., 2015), což je v rozporu se zjištěním u pacientů s CBF-AML. Opět zvýšené hladiny miR-124, miR-128-1, miR-194, miR-219-5p, miR-220a a miR-320 souvisely se zvýšeným rizikem, ačkoliv jejich role ve vzniku AML ještě není objasněna (Marcucci et al., 2008). MiR-124-1 je spojena s krašším OS a RFS (Chen et al., 2014). Upregulace miR-196b, miR-644, miR-26a, miR-29b, miR-146a souvisí podle více než jedné studie se zhoršenými vyhlídkami a kratším OS (Wang et al., 2010; Díaz-Beyá et al., 2014). Zvýšení exprese miR-146a souvisí se zhoršenou prognózou nejen u AML, ale i u ALL, zatímco opačný vztah platí pro miR-29b, jejíž exprese inverzně koreluje s expresí *MLLT11* – pacienti s nízkou hladinou miR-29b a zvýšenou hladinou *MLLT11* měli významně snížené OS (Xiong et al., 2011). U pacientů s nepříznivou prognózou bylo nalezeno zvýšení exprese miR-3151 (Eisfeld et al., 2012; Díaz-Beyá et al. 2015), spojené s vysokými hladinami miR-501-5p a nízkými hladinami miR-590, miR-135a, miR-100*, miR-186* a *let-7a**. Mir-335 má prokázaný negativní prediktivní význam u dospělé i pediatrické AML bez ohledu na cytogenetické i jiné faktory (Lin et al., 2015; Yingchun et al., 2015).

2.4 Role makrofágů v patogenezi AML

Makrofágy v kostní dřeni, které zde hrají zásadní úlohu v regulaci proliferace buněk a jejich diferenciaci, nevznikají diferenciacním procesem z myeloidní řady, jak bylo dokázáno u pacientů po transplantacích kostní dřeně (Heideveld a van der Akker, 2017). Studium jejich původu a jejich bližší charakteritace jsou však v samých začátcích.

Role jednotlivých mikroRNA v diferenciaci buněk jednotlivých krevních řad již byla částečně rozpoznána a popsána (Stavast et al., 2018).

Regulace prostřednictvím miRNA přijaté formou transportních vezikulů může tedy hrát nečekané role i v procesu karcinogeneze hemoblastóz, zatím však chybí konkrétní důkazy.

3. Cíle práce

Prvním cílem naší práce bylo pomocí běžně dostupných molekulárně genetických technik identifikovat extracelulárně přítomné miRNA vykazující signifikantně odlišné koncentrace v plazmě pacientů s AML při prvozáchytu onemocnění nezávisle na jeho subtypu a zdravých jedinců. V případě nálezu takovýchto miRNA lze uvažovat o jejich využití jako biomarkerů k monitorování úspěšnosti chemoterapie.

Jako druhý cíl jsme si vytýčili nalezení a charakterizaci souboru genů, které mohou být v makrofázích teoreticky ovlivněny přijetím miRNA ve formě vesikulů pocházejících z nádorově pozměněné buňky. K volbě tohoto cíle nás vedly recentní literární údaje: funkce kostní dřeně jsou regulovány také rezidentními makrofágy, které nemají svůj původ v myeloidní řadě. Studium této problematiky je však v úplných začátcích, proto jsme hledali kandidátní cílové geny společné pro miRNA prokazatelně dle literatury v experimentech transportované do makrofágů uvnitř vesikulů tak, aby bylo možné určit vybrané signální dráhy, jejichž regulace se tyto miRNA zúčastňují, a tím mohou modifikovat způsob interakce makrofágů s rakovinnými buňkami.

4. Materiál a metodika

4.1 Pacienti

Pro izolaci miRNA bylo v letech 2010-2012 vybráno 8 pacientů Fakultní nemocnice s nově diagnostikovanou akutní myeloidní leukemií. Při záchytu onemocnění bylo provedeno morfologické vyšetření odebrané kostní dřeně, pomocí průtokové cytometrie určen imunofenotyp nezralých myeloidních buněk, bylo provedeno molekulárně genetické a cytogenetické vyšetření a následně určen konkrétní subtyp AML. Odebíraný soubor tvořili 4 muži a 4 ženy ve věku od 31 – 62 let (další charakteristiky viz Tab. 5), léčení podle stejného protokolu. Vzorky periferní krve jim byly odebrány nejprve vstupně při záchytu onemocnění a poté po proběhnutí léčby, která sestávala z indukční terapie (tzv. 7+3 cytarabin a idarubicin). Pět pacientů dosáhlo kompletní remise (CR), dva parciální remise (PR) a jeden byl rezistentní na terapii (NR, no response). Vzorky plazmy byly odebrány před plánovanou transplantací krvetvorných buněk. Pacienti byli dále sledováni do roku 2013, kdy 4 z nich byli stále naživu.

Studie byla provedena se souhlasem etické komise Fakultní nemocnice Univerzity Karlovy v Plzni. Všichni pacienti podepsali na Hematoonkologickém oddělení FN UK Plzeň informovaný souhlas s odběrem a zpracováním plazmy.

Tabulka 5. Charakteristika pacientů zahrnutých ve studii (transplantace kmenových buněk následovala po proběhnutí chemoterapie).

Pacient	Pohlaví	FAB subtyp	Léčba	Po indukční terapii	Cytogenet.nález
1	f	M2	7+3, HiDAC+Mx, SCT	CR	normální
2	f	M2	7+3, HiDAC+Mx, SCT	CR	normální
3	f	M2	7+3, HiDAC+Mx, SCT	CR	normální
4	f	M5	7+3, HiDAC+Mx, SCT	CR	normální
5	m	M1	7+3, HiDAC+Mx, SCT	PR	normální
6	m	M7	7+3, HiDAC+Mx, SCT	PR	komplexní aberace
7	m	M2	7+3, 2x HiDAC+Mx, SCT	rezistentní	normální
8	m	neurčený	7+3, 3x HiDAC+Mx, SCT	CR	inv(16)

4.2 Kontrolní vzorky

Pro kontrolní vzorky byla v roce 2012 odebrána plazma od 10 dobrovolníků (1 muž, 9 žen) na Ústavu biologie a lékařské genetiky 1. LF UK. První vzorek periferní krve do zkumavky s EDTA byl odebírán ráno, druhý po 4 hodinách k vyloučení vlivu cirkadiálních

rytmů na koncentraci zkoumaných miRNA.

4.3 Odběr plazmy

Všechny vzorky o objemu 10 ml periferní krve byly odebírány do zkumavek s EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová), aby se zabránilo srážení krve. Neprodleně po odběru byla oddělena plazma, aby se zabránilo případnému ovlivnění vzorku hemolýzou či delším skladováním. Plazma byla získána centrifugací krve při 1400g po dobu 10 minut a poté při 13000g po dobu 10 minut. Takto připravené vzorky byly zamrazeny při -20°C. Z každého vzorku krve byly získány 2 ml plazmy při záchytu onemocnění a po léčbě.

4.4 Analýza miRNA ve vzorcích

Experimenty probíhaly ve dvou fázích. Fáze I (tzv. „discovery phase“) využila možností erejové technologie umožňující vyšetřit velký panel miRNA v jednom experimentu. Nevýhodou této technologie je, že jednotlivé PCR reakce zde probíhají v objemu 1 µl, vzniká tak prostor pro stochastické jevy, a proto je nutné získané výsledky dále validovat.

Zvolené erejové platformě musí být přizpůsoben způsob izolace, reverzní transkripce a preamplifikace studovaných molekul. Po interpretaci výsledků této fáze a výběru vhodných miRNA bylo přistoupeno k validaci získaných výsledků ve fázi II („validation phase“).

Ve validační fázi byly použity zamrazené alikvoty analyzovaných plazem, izolace RNA z nich byla nově provedena jinou metodou než ve fázi I. Po reverzní transkripci s primery specifickými jen pro danou miRNA v tzv. „single target“ reakcích následovala opět „single target“ Real-Time PCR analýza., která probíhala v triplikátech pro každou ze studovaných molekul. Každá z Real-Time PCR reakcí ve fázi II probíhala v objemu 15 µl- tedy s větším množstvím vstupního materiálu.

4.4.1 Izolace RNA ve fázi I

Problémem izolace RNA může být nejen nízká koncentrace ve vzorku, ale i její nestabilita. Většina RNA je v organismu rychle odbourána všudypřítomnými RNázami. MiRNA tento problém obcházejí obvykle svým sbalením do exosomů či spojením s proteiny, majícími ochrannou funkci, přesto je nutno při izolaci ze vzorku, kdy dojde k uvolnění samotných miRNA, tomuto možnému působení zabránit, a to se děje dvojím způsobem – uchováním izolované RNA při nízké teplotě (-70°C), kdy RNázy nepůsobí, nebo přidáním specifického inhibitoru.

Námi použitý způsob izolace – miRNeasy Serum/Plasma Kit (QIAGEN, Německo) – je vyzkoušená, efektivní a komerčně dostupná fenol/guanidinová metoda, sloužící jednak k lýze vzorků, jednak k odstranění RNáz i dalších interferujících proteinů a DNA. Po lyzování vzorků lyzačním činidlem se chloroformovou extrakcí oddělí dvě frakce – horní vodná s cílovou RNA a spodní organická, plná proteinů; na rozhraní mezi těmito dvěma fázemi zůstane DNA. Vodná fáze se dále smísí s etanolem, který zapříčiní navázání molekul RNA od vel. cca 18 nukleotidů na kolonku, následuje odmytí nečistot a zbytkových reagensů a uvolnění RNA do malého množství RNase-free vody (14 μ l).

Při izolaci bylo postupováno přesně v souladu s pokyny výrobce kitu.

4.4.2 Reverzní transkripce ve fázi I

MicroRNA purifikované výše popsaným způsobem byly použity pro reverzní transkripci za využití kitu pro reverzní transkripci (TaqMan MicroRNA ReverseTranscription Kit, Life Technologies, New York, USA) a souboru primerů dodávaných výrobcem erejí (Megaplex RT primer Human Pool A and Pool B, Life Technologies, New York, USA). Získaná cDNA byly okamžitě zamrazena. Zbylé izoláty miRNA byly rovněž uchovávány při -70°C . Postupovali jsme v souladu s protokoly doporučenými dodavatelem reagensů.

4.4.3 Preamplifikace – fáze I

Preamplifikace je krokem, který zvyšuje počet specifických cDNA molekul. Ty pak slouží pro analýzu genové exprese za použití TaqMan[®] MicroRNA Arrays. Pro preamplifikaci jsme použili Megaplex[™] PreAmp Primers (10x) – dvě sady genově-specifických přímých a zpětných primerů (MegaplexPreAmp primer Human Pool A and Pool B, Life Technologies, NewYork, USA) určených pro velmi malé množství výchozího materiálu. Primery umožňují preamplifikaci cílových cDNA (přepsaných z miRNA) pomocí PCR reakce.

Postupovali jsme dle doporučení výrobce kitu.

4.4.4 Kvantitativní PCR v reálném čase (Real-time PCR) – fáze I

Pro kvantifikaci genové exprese jsme použili TaqMan[®] MicroRNA Arrays (TaqMan[®]Array Human MicroRNA A Card v2.1, TaqMan[®]Array Human MicroRNA B Card v3.0) (Applied Biosystems, USA). Na každé z karet lze analyzovat expresi 378 miRNA a 3 malých jaderných RNA (RNU6, RNU44, RNU48) (viz kapitola Přílohy), které ovšem nejsou

vhodné k využití pro normalizaci v experimentech na plazmě. Jako vstupní materiál zde slouží cDNA získaná jako výsledek výše popsané preamplifikace.

Bylo postupováno přesně v souladu s pokyny výrobce.

4.4.5 Analýza dat z TaqMan[®] MicroRNA Array – fáze I

Byly vyloučeny všechny hodnoty s $C_T > 38$. Byly použity dva normalizační přístupy – normalizace vůči miR-16 a normalizace metodou „global mean“ (Expression Suite software v1.0.3., Life Technologies).

Získali jsme výsledky ze dvou odběrů (ranní a odpolední) od 10 zdravých dobrovolných dárců a od 8 pacientů s AML před a po chemoterapii. Přehled všech analyzovaných miRNA udávají Tab. 6 a 7 v Přílohách.

Pro párové srovnávání skupin byly použity Mann-Whitney testy s Benjamini-Hochbergovu korekcí (program STATISTICA version 10 (StatSoft, Inc., Tulsa, USA)). 6 miRNA s abundancí v plazmě signifikantně odlišnou při záchytu onemocnění a po prodělané chemoterapii bylo na základě této analýzy vybráno pro další ověřování ve validační fázi (dále fáze II).

4.4.6 Izolace RNA – fáze II

Malé RNA (včetně miRNA) byly izolovány z nového alikvotu zamražené plasmy o objemu 300 μ l kitem NucleoSpin[®]miRNA Plasma kit (MACHEREY-NAGEL, Německo) v souladu s pokyny výrobce kitu. Malé RNA a DNA jsou nejprve navázány na NucleoSpin[®] miRNA kolonku, na níž následně proběhne enzymatické odbourání DNA. Zbylé nukleové kyseliny jsou pak vymyty do 40 μ l vody (RNase-free).

4.4.7 Reverzní transkripce – fáze II

Bezprostředně po izolaci RNA bylo přistoupeno k reverzní transkripci za použití kitu „TaqMan MicroRNA Reverse TranscriptionKit“ (Applied Biosystems, Německo) a primerů specifických pro jednotlivé vybrané miRNA (hsa-miR-16, hsa-miR-199b, hsa-miR-301b, hsa-miR-326, hsa-miR-361, hsa-miR-625 a hsa-miR-655) (Applied Biosystems, Německo). „Single-target“ reakce byly prováděny v objemu 15 μ l. Každá reakce obsahovala 1.5 μ l 10 \times RT pufru, 0.15 μ l 1 dNTP mixu (100 mM), 0.19 μ l 1 RNase inhibitoru (20 U/VI), 1.0 μ l Multiscribe RT enzymu (50 U/ μ l), 4.16 μ l „nuclease-free“ vody pro injekce (Fresenius Kabi, Česká republika) a 3 μ l miRNA specifického RT primeru. Do reakcí bylo vnášeno 5 μ l RNA

izolované v předchozím kroku. Reverzní transkripce byla prováděna na přístroji Veriti® Thermal Cycler (Applied Biosystems, Německo). Teplotní profil byl následující: 16°C 30 min, 42 °C 30 min, 85°C 5 min, následováno udržováním teploty na 4 °C. Produkty byly skladovány při -20°C.

4.4.8 Real Time PCR – fáze II

Všechny reakce byly prováděny v triplicátech obsahujících 8.0 µl TaqMan® Universal PCR Master Mixu II, No UNG (Applied Biosystems, Německo), 0.8 µl 20×miRNA-specifických primerů (Applied Biosystems, Německo), 2.2 µl „nuclease-free“ vody pro injekce (Fresenius Kabi, Česká republika) a 4.0 µl produktu reverzní transkripce. Experimenty byly prováděny na přístroji QuantStudio™ 12K FlexReal-time PCR system (Applied Biosystems, Německo). Teplotní profil byl následující: 50° C 2 min, 95°C 10 min, potom 40 cyklů: 95 °C po dobu 15 s a 60°C po dobu 60 s.

4.4.9 Analýza dat – fáze II

Data získaná v této fázi byla normalizována k miR-16. Mann-Whitney test s Benjamini-Hochbergovou korekcí byl aplikován pro detekci miRNA vykazujících rozdílné plazmatické hladiny u pacientů a kontrol. Wilcoxonův test s Benjamini-Hochbergovou korekcí byl využit k analýze rozdílů mezi vzorky pacientů před a po chemoterapii. Statistické analýzy byly provedeny pomocí software qbase+version 2.6.1 (Biogazelle, Belgie) a STATISTICA version 10 (Stat Soft, Inc., Tulsa, USA). Program GENE-E (<http://broadinstitute.org/cancer/software>) byl využit pro klastrovou analýzu. Validované cílové geny vybraných miRNA byly hledány pomocí miRWalk databáze (Dweep et al., 2014).

4.5 Vyhledání miRNA transportovaných do makrofágů z nádorových buněk a analýza jejich cílových genů

Provedli jsme literární rešerši studií publikovaných do června 2016 tak, abychom vyhledali jen takové práce, které poskytují jasný experimentální důkaz o funkčním transportu určitých miRNA molekul v extracelulárních veziklech mezi nádorovými buňkami a makrofágy. Zahrnuli jsme jen takové studie, které pozorovaly změněné funkce cílových buněk a byly doplněny experimenty využívajícími některou z existujících metod k inhibici studované miRNA.

Po nalezení studií splňujících tato kritéria jsme použili miRWalk databázi (Dweep et al., 2014) k vyhledání validovaných cílů selektovaných miRNA. Tyto cílové geny byly dále analyzovány s pomocí the Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) (Dennis et al., 2003). Zajímalo nás klastrování cílových genů dle jejich funkcí, výsledky jsme hodnotili s ohledem na hodnoty FDR (False Discovery Rate) s cílem najít takové regulační dráhy, které mohou být v cílových buňkách potenciálně ovlivněny přijetím určité miRNA molekuly. Vennovy diagramy byly získány za pomoci webového nástroje Moved Permanently. Bioinformatics and Systems Biology [online] (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn>).

5. Výsledky

5.1 Výsledky I. fáze experimentů

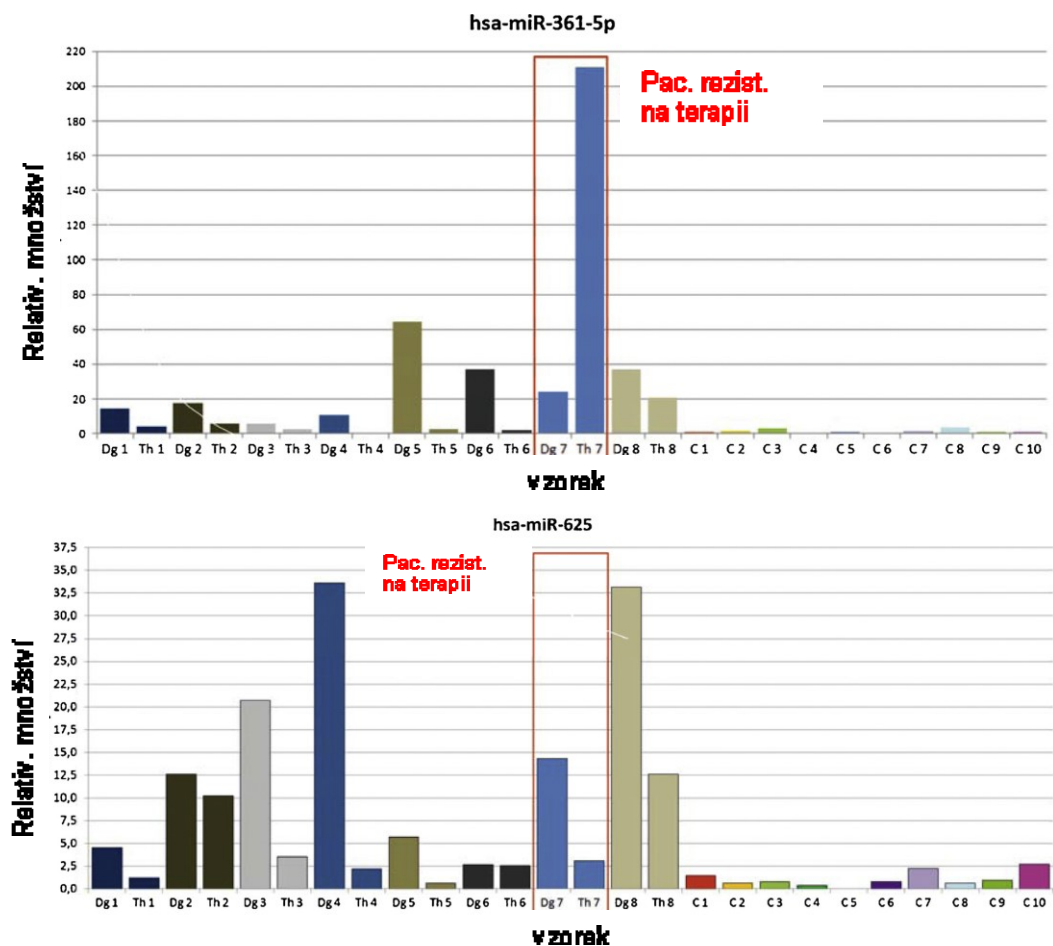
Zdraví dárči byli odebíráni jednak v ranních, jednak v odpoledních hodinách, k vyloučení vlivu cirkadiálních rytmů na hladinu miRNA. V první fázi studie jsme porovnali výsledky získané od pacientů při diagnóze s ranními odběry zdravých dárců, stejné porovnání jsme provedli mezi pacienty při diagnóze a poledními odběry zdravých dárců, ve všech případech párových porovnání jsme využili Mann-Whitney testu s Benjamini-Hochbergovou korekcí. Normalizovali jsme jednak k miR-16 jako endogenní kontrole, jednak jsme použili metody „global mean“.

Zjistili jsme, že výsledky se nemění v závislosti na výběru metody, kterou použijeme pro normalizaci. Na 5% hladině významnosti jsme nenalezli také žádné rozdíly v závislosti na typu použitých kontrolních vzorků (ranní či polední odběry zdravých dárců). Výsledky shrnuje Tab. 8. Pro další analýzy jsme proto zvolili normalizaci k miR-16 a porovnávání s ranními odběry zdravých dárců.

Nalezli jsme statisticky signifikantní rozdíly u miR-199b-5p, miR-301-b, miR-326, miR-361-5p, miR-625 a miR-655. Pacienti s AML se od zdravých jedinců odlišovali významně zvýšenými koncentracemi všech těchto miRNA. Následná chemoterapie snížila koncentrace těchto miRNA, které ale přesto zůstaly na signifikantně vyšších hodnotách než u zdravých dárců (viz Graf 1, Obr. 1). Výrazně jiné chování měly miR-361-5p a miR-655 u pacienta rezistentního na chemoterapii. Koncentrace miR-361-5p u tohoto nemocného po léčbě nepoklesla, jak je patrné z obrázku (viz Graf 1).

Ve validační fázi experimentů (fáze II) jsme proto přistoupili k ověření těchto výsledků za pomoci tzv. „single-target“ PCR reakcí provozovaných v triplikátech pro každou zkoumanou miRNA na základě izolace RNA z jiného alikvotu zamražené plazmy odlišnou izolační metodou, jak je popsáno v metodické části práce.

Graf 1. Srovnání koncentrací miR-361-5p a miR-625 ve vzorcích plazmy pacientů a kontrol, srovnání změny koncentrací těchto miRNA před a po chemoterapii. Po léčbě došlo k poklesu koncentrace miR-625 u všech pacientů, zatímco u pacienta rezistentního na chemoterapii je velmi patrný postterapeutický nárůst koncentrace miR-361-5p (Dg1-8, vzorky pacientů při diagnóze; Th1-8, vzorky pacientů po terapii; C1-10, zdravé kontroly).



Tabulka 8. Výsledky I. fáze experimentů. Hodnoty p obdržené po dvou různých způsobech normalizace, dále srovnání vzorků pacientů se vzorky kontrol odebraných ráno a v poledne (Mann-Whitneyho test s Benjamini-Hochbergovou korekcí; Dg, pacienti v době diagnózy; Cm, ranní kontrolní náběry; Ca, polední kontrolní náběry).

miRNA	data normalizovaná k miR-16		data normalizovaná ke global meanu	
	Dg. Vs. Cm	Dg. Vs. Ca	Dg. Vs. Cm	Dg. Vs. Ca
miR-199b-5p	0,0174	0,0087	0,0174	0,0174
miR-301b	0,0116	0,007	0,0417	0,0232
miR-326	0,0116	0,0087	0,0471	0,055
miR-361-5p	0,0122	0,0058	0,0347	0,0174
miR-625	0,0087	0,0043	0,0413	0,0243
miR-655	0,0087	0,0236	0,0367	0,0413

5.2 Výsledky validační - II.fáze - experimentů

Výsledky validační fáze plně potvrdily výsledky I. fáze experimentů. V podobě zkoumaných 6 miRNA byla nalezena tzv. „miRNA signature“ – skupina miRNA, jejichž hladiny v plazmě pacientů výrazně odpovídají na chemoterapii. Díky proběhlé chemoterapii se významně snížily plazmatické hladiny miR-199b-5p, miR-301b, miR-326, miR-625 a miR-655, jak dokumentují výsledky Wilcoxonova testu. Jejich hladiny nicméně přesto zůstaly výrazně vyšší než hladiny u zdravých jedinců (viz Tab.9, Tab.10, Graf 2).

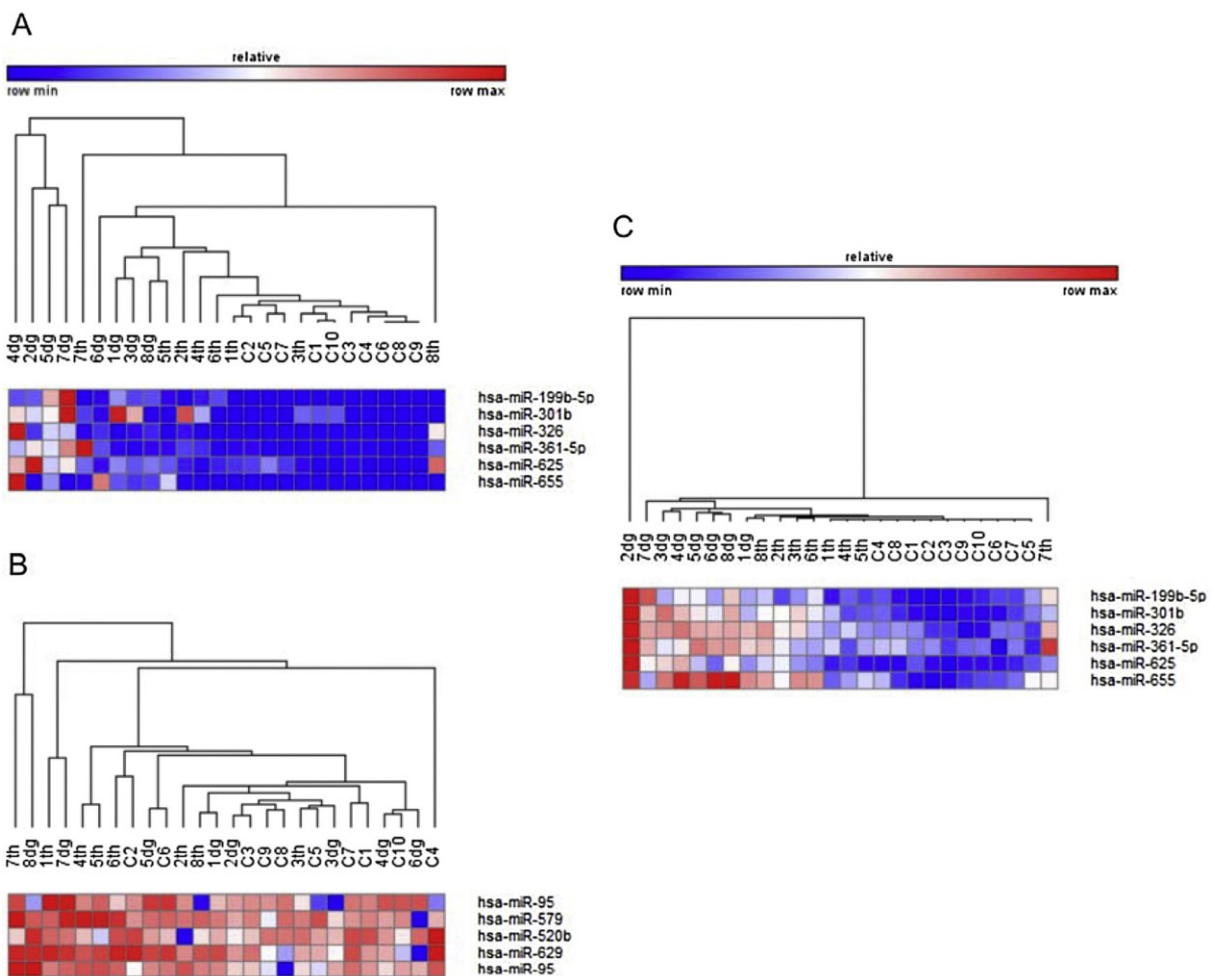
Tabulka 9. Výsledky validační fáze, provedené v tripletech v „single-target“ reakcích. (Mann-Whitneyho test s Benjamini-Hochbergovou korekcí; Dg., pacienti při záchytu; Postter., pacienti po indukční terapii; Cm, ranní kontrolní náběry).

miRNA	Dg. Vs. Cm		Postter. Vs. Cm	
	kolikanásobná změna	hodnota p	kolikanásobná změna	hodnota p
miR-199-5p	19,8	0,00005	3,4	0,01554
miR-301b	31,9	0,00005	7,0	0,00164
miR-326	31,7	0,00005	6,9	0,00109
miR-361-5p	38,8	0,00005	6,4	0,01554
miR-625	21,3	0,00005	3,4	0,01554
miR-655	19,3	0,00018	4,5	0,00411

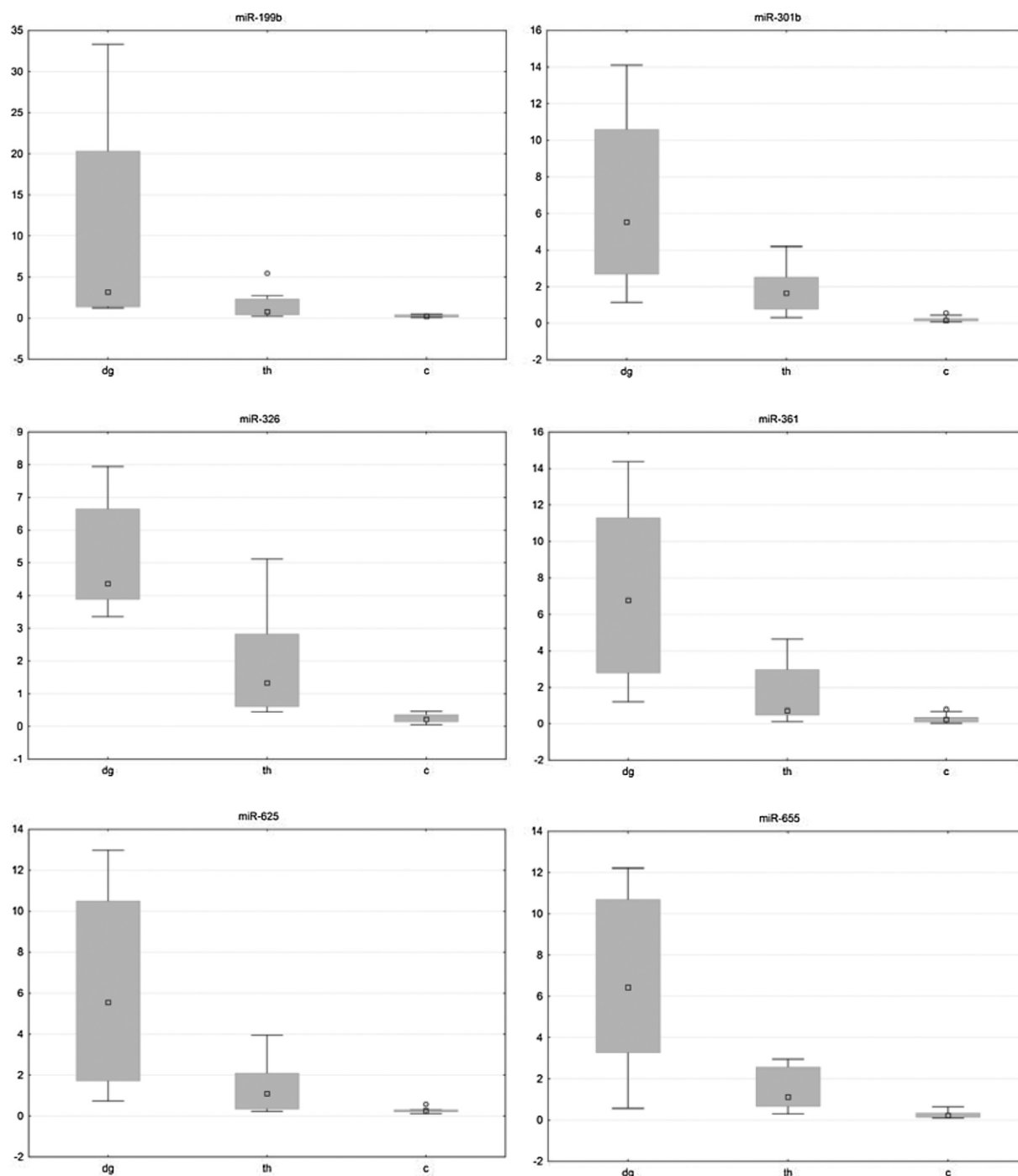
Tabulka 10. Výsledky validační fáze provedené v single-target reakcích v triplikátech (Wilcoxonův test; Dg, pacienti v době diagnózy; Th, pacienti po proběhlé chemoterapii před transplantací krvetvorných buněk).

miRNA	Dg. Vs. Th.	
	kolikanásobná změna	hodnota p
miR-199b-5p	5,77	0,03516
miR-301b	4,55	0,04688
miR-326	4,56	0,03516
miR-361-5p	6,04	0,05469
miR-625	6,21	0,03516
miR-655	4,26	0,03516

Obr. 1. Výsledek hierarchického clusteringu sledovaných miRNA pacientů s AML při diagnóze (1-8 Dg) a po chemoterapii (1-8 Th) ve srovnání se vzorky zdravých kontrol (C1-10, ranní náběry). A – výsledky první fáze experimentů pro miRNA reagující na terapii, B – výsledky první fáze experimentů pro miRNA neovlivněné, nereagující na chemoterapii, C – výsledky validační fáze experimentů pro miRNA odpovídající na terapii. Ve všech případech byla použita normalizace podle miR-16. Je výrazně patrný rozdíl mezi chováním miR-361-5 a miR-655 u pacienta rezistentního na terapii (7dg a 7th) a ostatními pacienty i kontrolami. Dále je vidět trend směřující k normalizaci abundančních miRNA u pacientů po terapii (C). Klastrová analýza provedena v GENE-E (city block distance, average linkage).



Graf 2. Boxploty pro 6 miRNA dokumentují výsledky validační fáze. Grafy ukazují kalibrovaná normalizovaná relativní množství (CNRQ hodnoty) pro každou kombinaci vzorek-cíl (mediány označeny čtverečkem, odlehlé body značeny kroužkem, úsečkou vyznačeny 25%, 75% percentily; Dg., pacienti v době diagnózy; Th., pacienti po terapii; C, kontrolní náběry).



5.3 Vyhledání validovaných cílových genů pro nalezené abundanční miRNA

Pomocí databáze MiRWalk byly vyhledány validované cílové geny těch miRNA, které jsme našli jako odlišně koncentrované u pacientů s prvozáchytem AML a po indukční terapii. Takových genů bylo nalezeno vícero, ale zajímavé pro procesy regulace genové exprese byly především dva – *DICER1*, bez něhož není možný samotný vznik miRNA (regulován dvěma miRNA z našeho výběru – miR-625 a miR-655), a druhý *DNMT1* (gen pro DNA metyltransferázu 1), na jehož regulaci se podílí jak miR-199-5p, tak miR-301b. Celkový přehled validovaných cílových genů je uveden v Tab.11.

Tabulka 11. Validované cílové geny námi zjištěných deregulovaných miRNA dle miRWalk databáze (Dweep et al., 2014). Geny regulované dvěma miRNA vyznačeny tučně.

MiRNA	Validované cílové geny
miR-199-5p	<i>DMTF1, SLC27A4, GADD45A, STK3, CYP2A6, SIRT1, EPB41L3, PPIG, IL1B, FOSB, ACTG1, ELA2, IRAK1, MAPK14, LTBP1, VEGFA, SUFU, MECP2, RPIA, DOK4, PARP8, HES1, DYRK1A, FBXW11, NCALD, C6orf134, C21orf33, CRYGC, TMEM184B, CACNA2D2, SMC1A, PROM1, EGFL7, GPD1, MTSS1, STK24, DECR1, SOX9, TMOD3, CCNT2, SET, DNMT1, LAMC2, KIAA0152, MYB, HIF1A, TPPP3</i>
miR-301b	<i>DNMT1, EGFR, CNOT2 -CCR4-NOT, OXAIL, CNIH4, R3HDM4</i>
miR-326	<i>NFYC, NRAS, CD47, SMOX, RC3H1, PTEN, IL10, GLI1, SMO, IL17A, ETS1, TP53, IL17D, IL17A, TP63, COX8A, ABCC1, ACVR2A, ABCG2, APRT, CD47, ATP8A2, GLI1, PKM2, KRAS</i>
miR-361-5p	<i>MTPN, NBN, AKT1, IRS1, TLR4</i>
miR-625	<i>DICER 1, NTRK3</i>
miR-655	<i>DICER 1</i>

5.4 Vyhledání miRNA, transportovaných z makrofágů do rakovinných buněk či naopak jako součást mikrovesikulů

V publikovaných pracích jsme vyhledali experimentálně potvrzené důkazy o miRNA, které dokáží změnit osud makrofágů, do nichž se ve formě exosomů dostanou v souvislosti s probíhajícím rakovinným bujením. Tyto miRNA jsou shrnuty v Tab. 12.

Tabulka 12. Přehled miRNA, exosomálně transportovaných z/do makrofágů do/z rakovinných buněk (Korabečná et al., 2016).

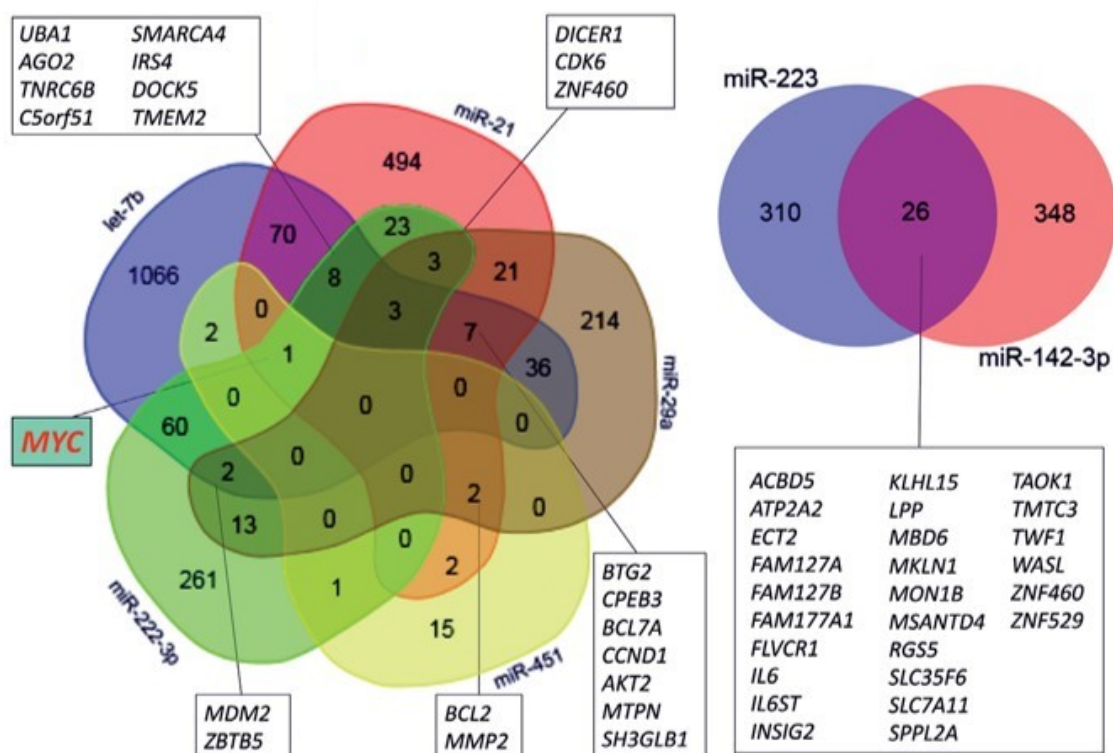
miRNA transportované z rakovinných buněk do makrofágů	typ nádoru	autor studie
miR-29a	linie z karcinomu plic	Fabbri et al., 2012
miR-21	hepatocelulární karcinom β-buňky slinivky břišní	Li et al., 2012
let-7b		Salama et al., 2014
miR-29		
miRNA transportované z makrofágů do rakovinných buněk		
miR-223	karcinom prsu	Yang et al., 2011
miR-451	glioblastom	van der Vos et al., 2016
miR-21	tumor vaječnicků	Ying et al., 2016
miR-222-3p		
miR-142	hepatocelulární karcinom	Aucher et al., 2013
miR-223		

5.5 Vyhledání validovaných cílových genů pro exosomální miRNA, vylučovaných rakovinnými buňkami a přijímaných makrofágy

Pomocí databáze MiRWalk byly vyhledány validované cílové geny pro miRNA, které byly potvrzeny jako součást obsahu mikrovesikul, vylučovaných rakovinnými buňkami a přijímanými makrofágy. Pro každý gen bylo nalezeno nemalé množství takových genů a všechny tyto geny následně pomocí databáze DAVID prozkoumány v kontextu klíčových procesů, které mohou vést ke vzniku nádorového onemocnění (regulace apoptózy a buněčného cyklu, transkripční regulace, transport proteinů, signální dráhy zahrnuté v kancerogenezi aj.). Byly nalezeny opakující se sety genů, pro čtyři miRNA byl společným genem protoonkogen *MYC* (myelocytomatosis viral oncogene) (viz Tab.13 a Obr.2). Obdobně byly porovnány sety genů pro dvě miRNA, předávané makrofágy rakovinným buňkám, z nichž většina souvisela s regulací transkripce a opět signálními drahami, souvisejícími se

vznikem rakoviny. Poslední zmíněná skupina genů je zvláště zajímavá, protože se v ní nachází jak tumor supresorové geny, tak onkogeny.

Obr. 2. Přehled překrývajících se setů cílových genů jednotlivých miRNA transportovaných z rakovinných buněk do makrofágů (levý diagram) a z makrofágů do rakovinných buněk (pravý diagram)(Korabečná et al., 2016).



Tabulka 13. Přehled počtu validovaných cílových genů pro jednotlivé miRNA, zahrnuté v oboustranném transportu mezi rakovinnými buňkami a makrofágy (Korabečná et al., 2016).

miRNA transportované z rakovinných buněk do makrofágů	počet validovaných cíl. genů
let-7b	1255
miR-21	634
miR-29a	301
miR-222-3p	375
miR-451	23
Celkem	2304
miRNA transportované z makrofágů do rakovinných buněk	počet validovaných cíl. genů
miR-223	335
miR-142-3p	374
Celkem	684

6. Diskuse

V naší studii jsme porovnávali expresi miRNA v plazmě mezi zdravými dárci a pacienty s akutní myeloidní leukémií. Tomuto tématu se zatím věnovalo jen málo výzkumníků, do nynějška byly na exprese miRNA v plazmě u pacientů s AML zaměřeny pouze tři studie. Skupina vedená Tanakou (Tanaka et al., 2009) zkoumala poměry expresí miRNA-92a/miRNA-638 a zjistila, že miRNA-92a je výrazně down-regulována u pacientů s prvozáchytém akutní leukémií. Navrhli proto tuto miRNA jako možný marker pro akutní leukémií, avšak bez rozlišení mezi myeloidní a lymfoidní leukémií. Stejnému markeru se věnovali El-Halawani a další (El-Halawani et al., 2014), u 50 pacientů s AML vs. 50 zdravých dárců a dospěli ke stejnému závěru. Také objevili, že existuje silná negativní korelace mezi relativní kvantifikací miRNA-92a/miRNA-638 a počtem leukocytů a procentem blastů v kostní dřeni u pacientů s AML. Třetí studie (Fayyad-Kazan et al., 2013) studovala miR-150 a miR-342 a označila je jako potenciální biomarkery pro AML. Při srovnání 20 pacientů s AML a 20 pacientů v kompletní remisi (neidentických pacientů) použili miR-16 jako normalizer a objevili významná snížení exprese miR-150 a miR-342 u pacientů s prvozáchytém AML oproti zdravým kontrolám. Expese těchto miRNA u pacientů v kompletní remisi se podobala jejich expresi u zdravých jedinců. Novější studie z roku 2015 popisuje změny hladin miRNA v séru pacientů s AML, mnohočetným myelomem (MM) a lymfomy před a po léčbě ve srovnání se sedmi zdravými kontrolami. Byla zde popsána deregulace 23 miRNA před a po chemoterapii, kdy po léčbě se znatelně snížilo množství i počet miRNA přítomných v séru a tyto změny korelovaly s počtem leukocytů v krvi pacientů. Nejmarkantnější rozdíly v expresi vykazovaly miR-320c, miR-1275 (downregulovány) a miR-3663-3p (upregulována) (Diener et al., 2015). Studie z roku 2017 na plazmě vykazuje shodné výsledky jako její předchůdci, tj. downregulaci miR-92a a miR-342 a nově také downregulaci miR-143 (Elhamamsy et al., 2017).

Pilotní studie na našich 8 vzorcích našla 45 odlišně exprimovaných miRNA u pacientů se záchytém AML oproti zdravým kontrolám, z toho 25 bylo downregulovaných a 20 upregulovaných (Štěrbová, 2014). Po dosažení remise vykazovalo rozdíl stále ještě 34 miRNA (21 sníženou expresi, 13 zvýšenou). Žádná miRNA nebyla popsána jako odlišně exprimována v důsledku způsobu práce softwarů použitých k analýze dat, které nejsou při určitém nastavení schopny registrovat rozdíly mezi skupinami, když v jedné z analyzovaných skupin k expresi téměř nedochází. Z tohoto důvodu až další analýza dat přinesla velmi zásadní výsledky, které byly dále validovány ve validační fázi a dále interpretovány.

Srovnávali jsme nejen pacienty při prvozáchytu se zdravými kontrolami, nýbrž také stejné pacienty při záchytu a po indukční terapii. Nalezli jsme vysoké hladiny miR-199b-5p, miR-301b, miR-326, miR-361-5p, miR-625 a miR-655 u pacientů v čase určení diagnózy AML oproti zdravým kontrolám. Hladiny expresí těchto miRNA po chemoterapii klesly, avšak zůstaly přesto na vyšší úrovni než u zdravých jedinců, kde jsou velmi nízké nebo nulové. Jeden pacient byl rezistentní na terapii, což se projevilo i v expresi miRNA, ostatní dosáhli úplné nebo alespoň částečné remise.

Gen, kódující miR-199, je lokalizován na 9. chromozomu jako intragenní miRNA kódovaná v genu pro dynamin 1 (DNM1). Transkripce je nezávislá na *DNM1*. Cílem pro miR-199b je jaderná kináza Dyrk1 a v kardiomyocytech spouští signální dráhu kalcineurin/NFAT. Suprese miR-199b byla popsána u hepatocelulárního karcinomu (HCC) a predikovala špatnou prognózu (Wang et al., 2011). Dalším popsáním cílem pro miR-199b je *HIF-1alfa* u buněk HCC a rakoviny prostaty (Wang et al., 2011; Shang et al., 2013) a *HER2* u rakoviny prsu (Fang et al., 2013).

Podle Favreau et al. byly geny *PODXL* (podokalyxin) a *DDR1* (Disco domain receptor 1), oba s analogickými funkcemi, identifikovány jako vysoce konzervované cílové geny pro miR-199b-5p. *DDR1* je receptorem pro kolagen, vyskytující se na neutrofilech, monocytech, lymfocytech a podocytech (Yoshimura et al., 2005) a je zvýšeně exprimován u různých typů nádorů. Zvýšení exprese *DDR1* u AML, doprovázené zvýšením exprese *PODXL*, bylo poprvé dokázáno v roce 2012 (Favreau et al., 2012). U nemalobuněčného karcinomu plic byla zvýšená exprese *DDR1* spojena se zvýšením buněčné motility a invazivity a celkově také s horší prognózou (Yang et al., 2010), což s obměnou platilo také u hepatocelulárního karcinomu a buněk gliomu (zvýšení hladiny *DDR1* – zvýšená migrace nádorových buněk) (Ram et al., 2006; Park et al., 2007). Tato zjištění naznačují, že i u AML by overexprese *DDR1* mohla znamenat zvýšenou migraci a invazivitu leukemických buněk do míst mimo kostní dřeň a vznik extramedulárního onemocnění. V těchto studiích byla poprvé naznačena možnost, že miR-199-5p reguluje dva proteiny s obdobnými funkcemi a že její snížená exprese může mít přímý vliv na následné zvýšení exprese *PODXL* a *DDR1*.

Favreau et al. následně prokázali, že exprese miR-199b se snižuje u pacientů s AML ve srovnání se zdravými kontrolami (Favreau et al., 2016), což neodpovídá námi zjištěnému poznatku. Rozdíl může být způsoben především vyšetřovaným materiálem (my používali plazmu, tato skupina kostní dřeň a buňky z ní získané) – často je v plazmě/séru zvýšená

hladina miRNA, která je ve tkáni nízce exprimována a naopak (Jarry et al., 2014). Nádorové buňky jsou podezírány z toho, že aktivně uvolňují exprimované miRNA či je naopak přijímají ve formě exosomů. Nejvyšší expresi miR-199b mají CD33+ myeloidní progenitory, během další diferenciaci hladina klesá. Umělé navození poklesu exprese miR-199b u CD34+ progenitorových buněk z kostní dřeně vede k posunu buněk do dalšího diferenciačního stupně (Favreau et al., 2016). HDAC inhibitory mají schopnost opět podmínit expresi miR-199b, což může mít klinický význam pro léčbu pacientů.

MiR-301b byla dalším markerem, který jsme našli zvýšený u pacientů s AML. Jeho exprese byla studována v séru pacientů s hepatocelulárním karcinomem, kde byla v době diagnózy také popsána jako zvýšená oproti normálním kontrolám (He et al., 2015). Zvýšená hladina vedla ke zvýšené klonogenicitě, invazivitě a denzitě vznikajících kapilár, zatímco snížená napomáhala supresi proliferace, migrace a pomalejšímu růstu nádoru (Shi et al., 2011). Další studie také popsaly její up-regulaci u karcinomu prostaty, slinivky, jater, ústní dutiny a kolorektálního karcinomu (Liu et al., 2012; Lee et al., 2007; Jiang et al., 2008; Lu et al., 2012; Wang et al., 2010). MiR-301b má popsanou funkci i u rakoviny močového měchýře, kde byla její hladina nalezena zvýšená v inverzní korelaci s *EGR1* genem a snížení její exprese vedlo ke snížení proliferace, migrace a invazivity nádorových buněk (Yan et al., 2017). Existují ovšem i studie, které popisují snížení exprese miR-301 u cholangiokarcinomu, hematomu a malobuněčného karcinomu plic (Braconi et al., 2010; Zhang et al., 2013; Miko et al., 2009). Byla popsána negativní korelace miR-301b s expresí tumor supresorového genu *HOXA5*, jehož produkt pozitivně reguluje expresi *TP53* (Raman et al., 2000). U zvláště agresivního subtypu rakoviny slinivky – PDAC (pancreatic ductal adenocarcinoma) s vysokou expresí *MIF* (migration inhibitory factor; jeden z protizánětlivých cytokinů) byla zjištěna zvýšená hladina miR-301b, kterou reguluje právě MIF. Cílovým genem miR-301b je *NR3C2* (orphan nuclear receptor) – zvýšení exprese miR-301b suprimuje jeho expresi. Funkcí *NR3C2* je mj. i zvýšení citlivosti ke gemcitabinu, což je standardně používaná chemoterapie u PDAC. Je-li *NR3C2* málo exprimován, snižuje se účinnost léčby a zhoršuje se prognóza. Osa *MIF-miR-301b-NR3C2* by mohla být slibným potenciálním cílem pro terapii (Yang et al., 2016). Již dříve bylo prokázáno, že u buněčných linií z karcinomu pankreatu miR-301b inverzně koreluje s *TP63*, kdy transfekce miR-301b zvýšila rezistenci na gemcitabin (Funamizu et al., 2014).

Rozdíly ve výsledcích jednotlivých studií mohou být způsobeny odlišným vstupním materiálem a způsobem zpracování, ale především je ve hře rozličná funkce této miRNA ve vzniku a vývoji různých typů nádorových onemocnění.

Exprese miR-326 byla poprvé zaznamenána u neuronů (Kim et al., 2004) a postupně evidována jako součást různých patologických procesů jako jsou roztroušená skleróza (Du et al., 2009), tumor mozku (Kefas et al., 2009), rakovina plic (Wang et al., 2014), plicní fibróza (Das et al., 2014) a diabetes 1. typu (Sebastiani et al., 2011). MiR-326 byla u našich pacientů nalezena zvýšeně exprimována, což odpovídá dřívějším zjištěním z kostní dřeně či krve pacientů s AML (Garzon et al., 2008; Dixon-McIver et al., 2008), ale je v rozporu s popsánými hladinami miR-326 u solidních tumorů. U rakoviny žaludku byla nalezena snížená exprese miR-326, která byla spojena s klinickým stadiem, metastázami v lymfatických uzlinách a vzdálenými metastázami. Downregulace miR-326 předznamenávala horší prognózu. Zároveň byl potvrzen gen *FSCN1* (Fascin1) jako cílový gen pro miR-326 a také funkce miR-326 jako tumor supresoru pro tuto diagnózu (Li et al., 2015). To potvrdila i další studie, která jako přímý cíl identifikovala gen *NOB1* (NIN1/RPN12 binding protein 1 homolog), který funguje jako protoonkogen u rakoviny žaludku i dalších nádorů (Ji et al., 2017). NOB1 je nutný pro biogenezi a funkčnost 26S proteazomu (Zhang et al., 2005) a jeho zvýšená exprese byla popsána u různých typů solidních nádorů – u rakoviny prsu (Huang et al., 2012), vaječníků (Lin et al., 2012), nemalobuněčného karcinomu plic (Li et al., 2014), hepatocelulárního karcinomu (Lu et al., 2012) nebo gliomu (Zhou et al., 2013) a kolorektálního karcinomu (Wu et al., 2015). I u kolorektálního karcinomu byl *NOB1* popsán jako cílový gen pro miR-326, kdy miR-326 dokázala inhibovat růst rakovinných buněk a indukovat apoptózu přes tuto interakci (Wu et al., 2015). Tento vliv na apoptózu a útlum růstu nádorů byl potvrzen i další studií na buněčných liniích rakoviny plic (Wang et al., 2016). Snížená exprese miR-326 byla prokázána v séru pacientů s osteosarkomem ve srovnání se zdravými kontrolami, a měla i prognostický význam – pacienti s nižší expresí trpěli rozvinutějším stadiem nemoci, měli častěji vzdálenější metastázy a kratší dobu přežití. MiR-326 inhibovala proliferaci, migraci a invazivitu nádorových buněk (Cao et al., 2016).

Byl také testován vliv této miRNA na vznik rezistence na léčbu. U buněčné linie rakoviny prsu MCF-7/VP, odvozené z multirezistentní linie MDR (multidrug resistance), byla prokázána downregulace miR-326. Testované buňky – i vzorky pacientek s rakovinou prsu – vykazovaly výrazně sníženou miR-326 v případě vysoké hladiny MRP1 (multidrug

resistance-associated protein ABCC1), jehož gen *MRP1* byl následně prokázán jako regulovaný miR-326 (Liang et al., 2010).

MiR-361-5p, kódovaná v oblasti Xq21.2, byla opakovaně popsána jako deregulovaná u různých typů karcinomů. U kastročně rezistentního karcinomu prostaty funguje jako tumor supresor. Je začleněna do dráhy STAT/Bcl-xL, kde funguje jako inhibitor exprese *STAT6* (signal transducer and activator of transcription-6), který zvyšuje expresi *Bcl-xL* (B-cell lymphoma-extra large) (Liu et al., 2014). U karcinomu žaludku a kolorektálního karcinomu plní také funkci tumor supresoru přes přímou vazbu na SND1 (Tudor-staphylococcal nuclease 1, p100), což je vysoce konzervovaná nukleáza s aktivitou např. v RISC komplexu (Jariwala et al., 2015), jejíž zvýšená exprese vede ke zvýšené metastatické agresivitě nádorů, zejména u kolorektálního karcinomu (Naumov et al., 2013). SND1 se váže k *pre-miR-361-5p* a suprimuje tím expresi miR-361-5p. U karcinomu žaludku a kolorektálního karcinomu byla nalezena snížená hladina miR-361-5p, která prokazatelně souvisela s nepříznivou prognózou a rozvinutým stadiem nemoci; naopak overexprese miR-361-5p snižovala proliferaci, migraci a invazivitu nádorových buněk (Ma et al., 2015). Byla nalezena inverzní korelace hladiny miR-361-5p s expresí VEGFA (vascular endothelial growth factor A) u spinocelulárního karcinomu kůže (Kanitz et al., 2012). U rakoviny děložního hrdla byla miR-361-5p popsána naopak jako onkogen, který zvyšuje proliferaci a invazivitu buněk (Wu et al., 2013). Pomocí miRNA microarray bylo zjištěno, že miR-361-5p je zvýšeně exprimována u rakoviny prsu s metastázami (Sun et al., 2014). Metodou *in situ* hybridizace, což je přímá metoda detekce konkrétní miRNA v buňce, byla posouzena exprese miR-361-5p u rakoviny prsu – exprese přímo souvisela s prodloužením doby přežití bez nemoci (DFS) (Cao et al., 2016). Densita exprese souvisela se subtypem rakoviny a fungovala jako nezávislý prognostický faktor, který nejvíce vynikl u pacientů s „triple-negative“ rakovinou prsu (TNBC, triple-negative breast cancer; bez exprese ER, PR a HER2). Rozsáhlou globální analýzou stovek vzorků byla miR-361-5p určena jako jedna z nejvhodnějších referenčních miRNA pro 9 z 14 typů nádorů pro svou stabilní a vysokou expresi spolu s let-7i-5p (Zhan et al., 2014). Snížení exprese miR-361-5p bylo prokázáno u hepatocelulárního karcinomu, kde snížená hladina souvisela s hypermetylací promotoru, což naznačuje epigenetickou regulaci miR-361-5p. Uměle navozená overexprese snižovala proliferaci HepG2 buněk, což opět potvrzuje roli tumor supresoru. Možným cílovým genem pro miR-361-5p, souvisejícím s tumorogenezí, byl určen gen CXCR6 (chemokine (C-X-C motiv) receptor 6), a spojitost mj. dokázána zvýšenou

expresí CXCR6 po inhibici miR-361-5p (Sun et al., 2016). Z většiny dosud uveřejněných studií vyplývá, že miR-361-5p může plnit různé role v kancerogenezi, pravděpodobně i v závislosti na typu postižené tkáně.

Downregulace další miRNA, miR-625, byla zaznamenána u rakoviny žaludku, jícnu, kolorektálního karcinomu i rakoviny prsu. Měla vliv na snížení invazivity a vznik metastáz rakoviny žaludku *in vitro* i *in vivo*. Jako cílový gen byl určen gen *ILK* (integrin-linked kinase), jehož experimentální knockdown měl fenotypově obdobné účinky jako overexprese miR-625. Pacienti s nižší expresí miR-625 trpěli častějším výskytem metastáz v lymfatických uzlinách (Wang et al., 2012). Sníženou expresí miR-625 popsala i studie, provedená u pacientů s rakovinou jícnu, kde opět souvisela s hloubkou nádoru a jeho stadiem a výskytem metastáz. Snížená hladina ovlivňovala invazivitu buněk, ale neměla vliv na apoptózu použitých buněčných linií. Výzkumníci hledali cílové geny a soustředili se na gen *SOX2* (SRY-box2; sex determining region Y-box2), který se podílí na progresi rakoviny jícnu, a prokázali, že overexprese miR-625 umí účinně snižovat expresi *SOX2* a dokonce, že *SOX2* je přímým cílem pro miR-625 (Wang et al., 2014). U dalšího typu nádoru, kolorektálního karcinomu, je opět doloženo snížení exprese miR-625, spojené s metastázami ve vzdálených lymfatických uzlinách, jaterními metastázami, zhoršenou prognózou a kratší dobou přežití (Lou et al., 2013). I tato studie potvrdila inhibiční účinek na invazivitu a migrační schopnost (v tomto případě) HCT116 CRC buněk *in vitro* a *in vivo*. Stejně výsledky vykázala studie na rakovině prsu (snížená exprese, jejíž zvýšení zastavuje proliferaci a invazivitu buněk) a cílovým genem pro tuto diagnózu byl určen *HMGAI* (High Mobility Group AT-Hook1), spolupodílející se na regulaci genové transkripce a vzniku metastáz (Zhou et al., 2016). Všechny tyto výsledky podporují hypotézu, že miR-625 může mít funkci tumor supresoru a reguluje řadu genů, souvisejících s kancerogenezi.

Také miR-655, kódovaná na 19. chromozomu, byla již v minulosti spojena s nádorovými diagnózami, jako jsou melanom, adenokarcinom plic a rakovina slinivky (Wang et al., 2013; Kitamura et al., 2014). Dokáže zablockovat epitel-mesenchymální transici (EMT) nádorových buněk, což bylo experimentálně zjištěno u buněčné linie rakovinných buněk pankreatu. U této diagnózy byla zjištěna korelace exprese miR-655 s příznivou prognózou a jako cílové geny určeny *ZEB1* a *TGFBR2*, které jsou klíčovými součástmi TGF-beta signální dráhy (Harazono et al., 2013). U skvamózního karcinomu jícnu byla nalezena

snížená exprese ve vzorcích pacientů i u dvou použitých buněčných linií tohoto karcinomu a po indukovaném zvýšení exprese došlo k inhibici proliferace a invazivity rakovinných buněk. Nízká exprese navíc souvisela se zhoršenou prognózou (Chang et al., 2017). U rakoviny prsu byla zjištěna souvislost mezi overexpresí *COX2* (cyklooxygenázou 2) a následným nárůstem hladiny miR-655, zároveň ektopická exprese miR-655 v buněčných liniích zvyšovala proliferaci, migraci, invazivitu buněk. U primárních vzorků od pacientů vykazovala miR-655 výrazně vyšší přítomnost než u zdravých tkání a souvisela s horší prognózou a nižší dobou přežití (Majumder et al., 2017).

Jak vyplývá z výše uvedeného, je velice obtížné jednoznačně zhodnotit roli námi nalezených miRNA v procesu kancerogeneze AML. Tato obtížnost vyplývá z faktu, že každá miRNA může regulovat expresi řady genů a funkce jednoho transkriptu mohou být ovlivňovány poměrně velkým počtem miRNA, což navíc bude zřejmě záležet také na buněčném typu a fyziologickém stavu buněk (např. Yi et al., 2008).

Se vznikem metastáz a rozvojem nádoru i jinde, než v jeho původní lokalizaci, souvisí i schopnost miRNA dostávat se z rakovinných buněk do jiných buněk, v kontextu kancerogeneze například do specializovaných buněk imunitního systému – makrofágů. Cílem druhé naší studie bylo shrnout dosavadní poznatky o komunikaci mezi makrofágy a nádorovými buňkami v rámci vzájemné výměny miRNA, obsažených ve vesikulech. Makrofágy jsou nedílnou součástí nádorového mikroprostředí a jejich přítomnost je nutná např. pro hojení ran a s ním spojené procesy, které se mohou podílet i na vzniku nádoru (Brady et al., 2016). Existují dva hlavní typy makrofágů, M1 a M2, klasické a alternativní, které se od sebe odlišují spektrem činností, které vykonávají. M1 makrofágy produkují cytotoxické faktory, zvyšují míru fagocytózy a zvyšují prezentaci antigenu na svém povrchu, mají tedy vliv na vznik zánětlivé odpovědi. Chronický zánět je jedním z možných spouštěčů nádorového bujení. M2 makrofágy vznikají v rámci hojení a zánět naopak potlačují, produkují enzymy remodelující okolní mimobuněčnou hmotu a také látky, podporují vznik nového krevního zásobení. Makrofágy spojené s rakovinným onemocněním vykazují kombinaci znaků, typických pro obě skupiny, v závislosti na stadiu nádoru. V kostní dřeni přebývá specifická skupina makrofágů, hrajících významnou roli v přežití a udržování populace hematopoetických kmenových buněk (Ehninger a Trumpp, 2011).

Hledali jsme experimentální důkazy o tom, že příjem miRNA, obsažené v exosomech, může hrát roli v rozhodování o činnostech, které makrofág vykonává. U exosomů z buněčných linií rakoviny plic bylo pozorováno navázání miR-29a a miR-21 na endosomální

TLR8 (toll-like receptor) u makrofágů na okraji nádoru, díky čemuž pak dojde k aktivaci NF- κ B a dále sekreci prozánětlivých cytosinů TNF- α (tumor-necrosis factor alfa) a IL-6 (interleukin 6) (Fabbri et al., 2012). Opět interleukin 6, avšak tentokrát jeho snížená produkce, byl součástí reakce na příjem tumorové let-7b, obsažené v exosomech a pohlcené makrofágy, následkem čehož došlo k poklesu zánětlivé reakce spojené s nádorem (Li et al., 2012). Makrofágy přijímaná miR-29, původem z beta-buněk slinivky břišní způsobila nárůst v produkci TNF- α , což mj. prokázalo i to, že vliv na makrofágy nemají jen miRNA, pocházejí z nádorových buněk (Salama et al., 2014).

Existuje i opačný případ, kdy je miRNA v exosomech, původně vyloučená makrofágy, dopravena do rakovinných buněk. Buňky rakoviny prsu dokázaly při kokultivačních experimentech přijímat miR-223, původem z makrofágů aktivovaných IL-4, a následkem toho se zvyšovala jejich invazivita, která opět poklesla při zavedení antisense oligonukleotidu (Yang et al., 2011). Monocyty, makrofágy a mikroglie z mozkové tkáně s glioblastomem přijímaly miR-451 a miR-21 z vesikulů produkovaných nádorem. U cílových buněk byla zjištěna snížená exprese genu MYC (van der Vos et al., 2016). Exosomy s vysokým obsahem miR-222-3p, uvolněné z buněk epiteliální rakoviny vaječníků dokázaly změnit fenotyp makrofágů na tzv. tumor asociované makrofágy (TAM), které dokáží urychlit rozvoj nádoru. Overexprese miR-222-3p dokáže u makrofágů podpořit jejich směřování k fenotypu M2 (Ying et al., 2016). Ze všech miRNA, které makrofágy ukládají do mikrověsikulů, má nejvyšší expresi již zmiňovaná miR-223, která má dokonce zachovanou funkci v buňkách, které ji přijmou (monocyty). Tato miRNA je pozitivním regulátorem granulopoézy a umožňuje diferenciaci monocytů v makrofágy (Ismail et al., 2013; Johnnidis et al., 2008). V kokultivačních experimentech byl prokázán její vliv na buňky hepatocelulárního karcinomu, které po přijetí exosomů, produkovaných makrofágy a obsahujících miR-223 a miR-142, zpomalovaly svůj růst (Aucher et al., 2013).

Pomocí databáze MiRWalk byly vyhledány validované cílové geny pro miRNA, které byly potvrzeny jako součást obsahu mikrověsikul, vylučovaných rakovinnými buňkami a přijímanými makrofágy. Pomocí databáze DAVID byly tyto geny prozkoumány v kontextu klíčových procesů kancerogeneze. Pro čtyři miRNA byl společným genem protoonkogen *MYC* (myelocytomatosis viral oncogene). Pro dvě miRNA, předávané makrofágy rakovinným buňkám, souvisela většina genů s regulací transkripce a opět signálními drahami, souvisejícími s procesem karcinogeneze (a to jak protoonkogeny, tak tumor supresorové geny).

7. Závěr

Podářilo se nám splnit oba cíle předkládané disertační práce. V první části práce jsme srovnávali abundanci miRNA v plazmě pacientů s AML při diagnóze a po chemoterapii se situací v plazmě zdravých dobrovolníků. V první fázi studie jsme použili erejovou technologii, jejíž výsledky jsme dále validovali specifickými „single-target“ Real Time PCR reakcemi pro každou jednotlivou miRNA selektovanou v předchozích experimentech.

Podářilo se nám najít skupinu 6 miRNA (miR-199b-5p, miR-301-b, miR-326, miR-361-5p, miR-625 a miR-655), které jednoznačně odrážejí průběh chemoterapie. Před začátkem chemoterapie jsou jejich úrovně v plazmě pacientů vysoké ve srovnání se zanedbatelnými koncentracemi v plazmě zdravých lidí. U pacientů, kteří nejsou rezistentní vůči chemoterapii, jsou pak koncentrace těchto miRNA po dosažení remise onemocnění nízké, stále však významně statisticky odlišné od zdravých jedinců. Výsledky této části studie tedy naznačují, že lze najít takové miRNA, které u pacientů s AML nezávisle na jejím subtypu mohou velice výrazně odpovídat na chemoterapii a být tak potenciálně využity pro monitorování její úspěšnosti na molekulární úrovni.

Jako druhý cíl jsme si vytkli nalezení genů a drah, které mohou být v makrofázích ovlivněny miRNA transportovanými v extracelulárních vesiklech potenciálně rovněž přítomných v plazmě. Na základě dostupných literárních údajů jsme našli set miRNA prokazatelně v experimentálních systémech vstupujících do makrofágů a ovlivňujících některou z jejich experimentálně uchopitelných funkcí. Provedli jsme analýzu validovaných cílů těchto miRNA a našli jako validovaný cíl čtyř miRNA (miR-21, miR-222-3b, miR-451 a let-7b) gen MYC, jehož funkce a zapojení do signálních drah je obzvláště důležité zejména s ohledem na interakci makrofágů s nádorově transformovanými buňkami.

8. Seznam použitých zkratk

AML	akutní myeloidní leukemie
Ago	protein z argonautové rodiny
ALDH	aldehyddehydrogenáza
ALL	akutní lymfoblastická leukemie
AML1/ETO	fúzní gen z genů <i>AML1</i> a <i>ETO</i>
APL	akutní promyelocytární leukemie
ASXL1	additional sex-comb like 1
ATP	adenosintrifosfát
ATRA	all trans retinoid acid, all-trans kyselina retinová
BAALC	brain and acute leukemia, cytoplasmic
BCLAF1	BCL-2-associated transcription factor 1
BCOR	BCL6 corepresor
CBFB	core-binding factor, beta subunit
CBF-AML	AML s core binding faktorem
CD	cluster of differentiation
cDNA	copy DNA
CEBPA	CCAAT/enhancer binding protein-alpha
CGH	comparative genomic hybridization, komparativní genomová hybridizace
CK	complex karyotype, komplexní karyotyp
CN-AML	cytogenetically normal AML, AML s normálním cytogenetickým nálezem
CNS	centrální nervová soustava
CpG	ostrůvky bohaté na guanosin
CR	complete remission, kompletní remise
Ct	threshold cycle, prahový cyklus
del	delece
DFS	disease free survival, doba přežití bez onemocnění
DGCR8	DiGeorge syndrome critical region 8
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DNMT	DNA methyltransferáza
dNTP	deoxyribonukleotidtrifosfát
ds RNA	double stranded RNA, dvojřetězcová RNA
DS-AMKL	Down syndrome-related acute megakaryoblastic leukemia, akutní megakaryoblastická leukemie asociovaná s Downovým syndromem
dsDNA	double stranded DNA, dvojřetězcová DNA
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EFS	event free survival, doba přežití bez nežádoucích událostí
Evi1	ecotropical viral integration site 1
FAB	French-American-British, Francouzsko-americko-britská
FISH	Fluorecence in situ hybridizace
FLT3	FLT3 I receptorová tyrosin kináza třídy III

FMR1	fragile X mental retardation 1 protein
GATA1	protein GATA1, kód. genem <i>GATA1</i> , erytroidní transkripční faktor
HDAC, HDACi	histone deacetylase inhibitors, inhibitory histon deacetyláz
HDL	high-density lipoproteins
HiDAC	high doses of cytarabine, vysoké dávky cytarabinu
HOXA5	homeobox A5
hsa-mir-123	<i>Homo sapiens</i> miRNA 123, lidská miRNA 123
HSC	hematopoietic stem cell, krvetvorná kmenová buňka
IDH	isocitrát dehydrogenáza
inv	inverze
ISCN	International System for Human Cytogenetic Nomenclature, mezinárodní systém lidské cytogenetické nomenklatury
ITD	internal tandem duplication, interní tandemová duplikace
K562	buněčná linie akutní myeloidní leukemie
KD	kostní dřeň
KIT	Tyrosin kinázový receptor
KMT2A	lysine methyltransferase 2A
KRAS	KRAS Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
LSC	leukemic stem cell, leukemická kmenová buňka
LT-HSC	long-term hematopoietic stem cell, dlouhodobá krvetvorná kmenová buňka
MAPK	mitogenem aktivovaná protein kináza
MDS	myelodysplastický syndrom
MEIS1	protein MEIS1, kód. homeoboxovým genem <i>MEIS1</i>
Mel	melphalan
miRNA	mikro RNA
MLL	mixed lineage leukemia
MN1	meningioma 1
M0-M7	kategorie AML dle FAB klasifikace M0 až M7
MPO	myeloperoxidáza
MRD	minimal residual disease, minimální zbytková nemoc
MRN	minimální zbytková nemoc
mRNA	messenger RNA
MVBs	multivesicular bodies, multivesikulární tělíška
Mx	mitoxantron
NFI-A	protein nuclear factor 1 A-type, kód. genem <i>NFIA</i>
NFkB	transkripční faktor nukleární faktor kappa B
NPM1	nucleophosmin 1
NPM1mut/wt	nucleophosmin 1 mutated/wild type
NR	no response, rezistence na terapii
NRAS	neuroblastoma RAS viral oncogene homolog
OS	overall survival, celková doba přežití

PACT	interferon-inducible double stranded RNA-dependent-activator
PHF6	PHD finger protein 6, kód. genem <i>PHF6</i>
PML	promyelocytic leukemia
PR	partial remission, parciální remise
pre-miRNA	prekurzor miRNA
pri-miRNA	primární prekurzor miRNA
PRKRA	interferon-inducible double stranded RNA-dependent-activator
PTD	parciální tandemová duplikace
PTEN	phosphatase and tensin homolog
R2D2	protein R2D2, važí se k dsRNA
RARA	retinoic acid receptor alpha
Ran GTP	forma Ran-G protein s navázaným GTP
RFS	relaps free survival, doba přežití bez relapsu
RISC	RNA induced silencing complex, RNA-indukovaný tlumící komplex
RNA	ribonukleová kyselina
Rnáza	ribonukleáza
RNAP	RNA polymeráza
RPE	promývací pufr
RT	reverzní transkripce
RT-PCR	reverzně-transkripční polymerázová řetězová reakce
RUNX1	runt-related transcription factor 1
RWT	promývací pufr
SAHA	histonová deacetyláza suberoylanilide hydroxamic acid, Vorinostat
SP1	specificity protein 1*
STAT5	signal transducer and activator of transcription 5
t	translokace
TET2	Tet methylcytosin dioxygenáza
TKD	tyrosine kinázová doména
TLR	Toll like receptor
TP53	tumor protein p53
TRBP	trans-activation response RNA-binding protein
WHO	World Health Organisation, Světová zdravotnická organizace
WT1	Wilm's tumor 1
3'UTR	3'untranslated region, 3'netranslatovaný region

9. Seznam použité literatury

- Alpermann, T., Haferlach, C., Eder, C., Nadarajah, N., Meggendorfer, M., Kern, W., Haferlach, T. and Schnittger, S. (2015). AML with gain of chromosome 8 as the sole chromosomal abnormality (+8 sole) is associated with a specific molecular mutation pattern including ASXL1 mutations in 46.8% of the patients. *Leukemia Research*,39(3):265-272.
- Altekruse, S. F., Kosary, C. L., Krapcho, M., Neyman, N., Aminou, R., Waldron, W., Ruhl, J., Howlander, N., Tatalovich, Z., Cho, H., Mariotto, A., Eisner, M.P., Lewis, D.R., Cronin, K., Chen, H.S., Feuer, E.J., Stinchcomb, D.G. and Edwards, B.K. (eds). SEER Cancer Statistics Review 1975–2007. Bethesda, MD: National Cancer Institute; 2010. http://seer.cancer.gov/csr/1975_2007/, based on November 2009 SEER data submission, posted to the SEER web site, 2010. – navštíveno naposledy 1.12.2018
- Anokye-Danso, F., Trivedi, C.M., Jühr, D., Gupta, M., Cui, Z., Tian, Y., Zhang, Y., Yang, W., Gruber, P.J., Epstein, J.A. and Morrisey, E.E. (2011). Highly efficient miRNA-mediated reprogramming of mouse and human somatic cells to pluripotency. *Cell Stem Cell*,8(4):376-388.
- Arber, D.A., Orazi, A., Hasserjian, R., Thiele, J., Borowitz, M.J., Le Beau, M.M., Bloomfield, C.D., Cazzola, M. and Vardiman, J.W. (2016) The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*,127(20):2391-2405.
- Arroyo, J.D., Chevillet, J.R., Kroh, E.M., Ruf, I.K., Pritchard, C.C., Gibson, D.F., Mitchell, P.S., Bennett, C.F., Pogosova-Agadjanian, E.L., Stirewalt, D.L., Tait, J.F. and Tewari, M. (2011). Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(12):5003-5008.
- Arseneau, J.C., Sponzo, R.W., Levin, D.L., Schnipper, L.E., Bonner, H., Young, R.C., Canellos, G.P., Johnson, R.E. and DeVita, V.T. (1972). Nonlymphomatous malignant tumors complicating Hodgkin's disease. Possible association with intensive therapy. *The New England Journal of Medicine*,287(22):1119-1122.
- Aucher, A., Rudnicka, D. and Davis, D.M. (2013). MicroRNAs transfer from human macrophages to hepato-carcinoma cells and inhibit proliferation. *Journal of Immunology*,191(12):6250-6260.
- Baldomero, H., Gratwohl, M., Gratwohl, A., Tichelli, A., Niederwieser, D., Madrigal, A., Frauendorfer, K. and European Group for Blood and Marrow Transplantation EBMT. (2011). The EBMT activity survey 2009: trends over the past 5 years. *Bone Marrow Transplantation*,46(4):485-501.
- Bartel, D.P. (2009). MicroRNAs Target recognition and regulatory functions. *Cell*,136(2):215-233.
- Becker, H., Marcucci, G., Maharry, K., Radmacher, M.D., Mrózek, K., Margeson, D., Whitman, S.P., Wu, Y.Z., Schwind, S., Paschka, P., Powell, B.L., Carter, T.H., Kolitz, J.E., Wetzler, M., Carroll, A.J., Baer, M.R., Caligiuri, M.A., Larson, R.A. and Bloomfield, C.D. (2010). Favorable Prognostic Impact of NPM1 Mutations in Older Patients With Cytogenetically Normal De Novo Acute Myeloid Leukemia and Associated Gene and MicroRNA-Expression Signatures: A Cancer and Leukemia Group B Study. *Journal of Clinical Oncology*,28(4):596-604.
- Ben-David, Y., and Bernstein, A. (1991). Friend virus-induced erythroleukemia and the multistage nature of cancer. *Cell*,66(5):831-834.
- Bennett, J.M., Catovsky, D., Daniel, M.T., Flandrin, G., Galton, D.A., Gralnick, H.R. and Sultan, C. (1976). Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *British Journal of Haematology*,33(4):451-458.

- Bennett, J.M., Catovsky, D., Daniel, M.T., Flandrin, G., Galton, D.A., Gralnick, H.R. and Sultan, C. (1985). Criteria for the diagnosis of acute leukemia of megakaryocyte lineage (M7). A report of the French-AmericanBritish Cooperative Group. *Annals of Internal Medicine*, 103(3):460-462.
- Bennett, J.M., Catovsky, D., Daniel, M.T., Flandrin, G., Galton, D.A., Gralnick, H.R. and Sultan, C. (1991). Proposal for the recognition of minimally differentiated acute myeloid leukaemia (AML-MO). *British Journal of Haematology*, 78(3):325-329.
- Bousquet, M., Harris, M.H., Zhou, B. and Lodish, H.F. (2010). MicroRNA miR-125b causes leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(50):21558-21563.
- Bousquet, M., Quelen, C., Rosati, R., Mansat-De Mas, V., La Starza, R., Bastard, C., Lippert, E., Talmant, P., Lafage-Pochitaloff, M., Leroux, D., Gervais, C., Vigiú, F., Lai, J.L., Terre, C., Beverlo, B., Sambani, C., Hagemeyer, A., Marynen, P., Delsol, G., Dastugue, N., Mecucci, C. and Brousset, P. (2008). Myeloid cell differentiation arrest by miR-125b-1 in myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia with the t(2;11)(p21;q23) translocation. *The Journal of Experimental Medicine*, 205(11):2499-2506.
- Bousquet, M., Zhuang, G., Meng, C., Ying, W., Cheruku, P.S., Shie, A.T., Wang, S., Ge, G., Wong, P., Wang, G., Safe, S. and Zhou, B. (2013). miR-150 Blocks MLL-AF9-associated leukemia through oncogene repression. *Molecular Cancer Research*, 11(8):912-922.
- Braconi, C., Huang, N. and Patel, T. (2010). MicroRNA-dependent regulation of DNA methyltransferase-1 and tumor suppressor gene expression by interleukin-6 in human malignant cholangiocytes. *Hepatology*, 51(3):881-890.
- Brady, N.J., Chuntova, P. and Schwertfeger, K.L. (2016). Macrophages: Regulators of the Inflammatory Microenvironment during Mammary Gland Development and Breast Cancer. *Mediators of Inflammation* 2016:4549676.
- Brennecke, J., Hipfner, D. R., Stark, A., Russell, R. B. and Cohen, S. M. (2003). bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in Drosophila. *Cell*, 113(1):25-36.
- Brioschi, M., Fischer, J., Cairoli, R., Rossetti, S., Pezzetti, L., Nichelatti, M., Turrini, M., Corlazzoli, F., Scarpati, B., Morra, E., Sacchi, N. and Beghini, A. (2010). Down-regulation of microRNAs 222/221 in acute myelogenous leukemia with deranged corebinding factor subunits. *Neoplasia*, 12(11):866-876.
- Butrym, A., Rybka, J., Baczyńska, D., Tukiendorf, A., Kuliczkowski, K. and Mazur, G. (2015). Low expression of microRNA-204 (miR-204) is associated with poor clinical outcome of acute myeloid leukemia (AML) patients. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 34(1):68.
- Calin, G. A., Dumitru, C. D., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E., Aldler, H., Rattan, S., Keating, M., Rai, K., Rassenti, L., Kipps, T., Negrini, M., Bullrich, F. and Croce, C. M. (2002). Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(24):15524-15529.
- Cammarata, G., Augugliaro, L., Salemi, D., Agueli, C., La Rosa, M., Dagnino, L., Civiletto, G., Messana, F., Marfia, A., Bica, M.G., Cascio, L., Florida, P.M., Mineo, A.M., Russo, M., Fabbiano, F. and Santoro, A. (2010). Differential expression of specific microRNA and their targets in acute myeloid leukemia. *American Journal of Hematology*, 85(5):331-339.
- Cao, Z.G., Huang, Y.N., Yao, L., Liu, Y.R., Hu, X., Hou, Y.F. and Shao, Z.M. (2016). Positive expression of miR-361-5p indicates better prognosis for breast cancer patients. *Journal of Thoracic Disease*, 8(7):1772-1779.

- Cao, L., Wang, J. and Wang, P.Q. (2016). MiR-326 is a diagnostic biomarker and regulates cell survival and apoptosis by targeting Bel-2 in osteosarcoma. *Biomedicine & Pharmacotherapy*,84:828-835.
- Cardis, E., Gilbert, F.S., Carpenter, L., Howe, G., Kato, I., Armstrong, B. K., Beral, V., Cowper, G., Douglas, A., Fix, J., Fry, S. A., Kaldor, J., Lavé, C., Salmon, L., Smith, P. G, Voelz, G. L. and Wiggs, L. D. (1995). Effects of low doses of and low dose rates of external ionizing radiation: cancer mortality among nuclear industry workers in three countries. *Radiation Research*,142(2):117-132.
- Careccia, S., Mainardi, S., Pelosi, A., Gurtner, A., Diverio, D., Riccioni, R., Testa, U., Pelosi, E., Piaggio, G., Sacchi, A., Lavorgna, S., Lo-Coco, F., Blandino, G., Levrero, M. and Rizzo, M.G. (2009). A restricted signature of miRNAs distinguishes APL blasts from normal promyelocytes. *Oncogene*,28(45):4034-4040.
- Carrington, J.C. and Ambros, V. (2003). Role of microRNAs in plant and animal development. *Science*,301(5631):336-338.
- Carthew, R. W. and Sontheimer, E. J. (2009). Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*,136(4):642-655.
- Ciccone, M. and Calin, G.A. (2015). MicroRNAs in Myeloid Hematological Malignancies. *Current Genomics*,16(5):336-348.
- Crane, M.M., Strom, S.S., Halabi, S., Berman, E.L., Fueger, J.J., Spitz, M.R. and Keating, M.J. (1996). Correlation between selected environmental exposures and karyotype in acute myelocytic leukemia. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*,5(8):639-644.
- Cross, N.C., Melo, J.V., Feng, L. and Goldman, J.M. (1994). An optimized multiplex polymerase chain reaction (PCR) for detection of *BCR-ABL* fusion mRNAs in haematological disorders. *Leukemia*,8(1):186-189.
- Chang, P., Xiangjun W., Zhou, Y. and Hou Y. (2017) Analysis of the correlation between the expression of miR-655 and esophageal cancer prognosis. *Oncology Letters*,13(6):4691-4694.
- Chen, C.Z., Li, L., Lodish, H.F. and Bartel, D.P. (2004). MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science*,303(5654):83-86.
- Chen, X.X., Lin, J., Qian, J., Qian, W., Yang, J., Ma, J.C., Deng, Z.Q., Xie, D., An, C., Tang, C.Y. and Qian, Z. (2014). Dysregulation of miR-124-1 predicts favorable prognosis in acute myeloid leukemia. *Clinical Biochemistry*,47(1-2):63-66.
- Chen, P., Price, C., Li, Z., Li, Y., Cao, D., Wiley, A., He, C., Gurbuxani, S., Kunjamma, R.B., Huang, H., Jiang, X., Arnovitz, S., Xu, M., Hong, G.M., Elkahloun, A.G., Neilly, M.B., Wunderlich, M., Larson, R.A., Le Beau, M.M., Mulloy, J.C., Liu, P.P., Rowley, J.D. and Chen, J. (2013). miR-9 is an essential oncogenic microRNA specifically overexpressed in mixed lineage leukemia-rearranged leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,110(28):11511-11516.
- Chendrimada, T.P., Gregory, R.I., Kumaraswamy, E., Norman, J., Cooch, N., Nishikura, K. and Shiekhattar, R. (2005). TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature*,436(7051):740-744.
- Cheson, B.D., Bennett, J.M., Kopecky, K.J., Büchner, T., Willman, C.L., Estey, E.H., Schiffer, C.A., Doehner, H., Tallman, M.S., Lister, T.A., Lo-Coco, F., Willemze, R., Biondi, A., Hiddemann, W., Larson, R.A., Löwenberg, B., Sanz, M.A., Head, D.R., Ohno, R., Bloomfield, C.D. and International Working Group for Diagnosis, Standardization of Response Criteria, Treatment Outcomes, and Reporting Standards for Therapeutic Trials in Acute Myeloid Leukemia. (2003). Revised recommendations of the International Working Group for Diagnosis, Standardization of Response Criteria, Treatment Outcomes, and Reporting Standards for Therapeutic Trials in Acute Myeloid Leukemia. *Journal of Clinical Oncology*,21(24):4642-4649.

- Christiansen, D.H., Andersen, M.K. and Pedersen-Bjergaard, J. (2003). Methylation of p15INK4B is common, is associated with deletion of genes on chromosome arm 7q and predicts a poor prognosis in therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia. *Leukemia*,17(9):1813-1819.
- Dahlhaus, M., Rooff, C., Ruck, S., Lange, S., Freund, M. and Junghanss, C. (2013). Expression and prognostic significance of hsa-miR-142-3p in acute leukemias. *Neoplasma*,60(4):432-438.
- Das, S., Kumar, M., Negi, V., Pattnaik, B., Prakash, Y.S., Agrawal, A. and Ghosh, B. (2014). MicroRNA-326 regulates profibrotic functions of transforming growth factor-beta in pulmonary fibrosis. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*,50(5):882-892.
- Daschkey, S., Röttgers, S., Giri, A., Bradtke, J., Teigler-Schlegel, A., Meister, G., Borkhardt, A. and Landgraf, P. (2013). MicroRNAs Distinguish Cytogenetic Subgroups in Pediatric AML and Contribute to Complex Regulatory Networks in AML-Relevant Pathways. *PloS One*,8(2):e56334.
- Debernardi, S., Skoulakis, S., Molloy, G., Chaplin, T., Dixon-McIver, A. and Young, B.D. (2007). MicroRNA miR-181a correlates with morphological sub-class of acute myeloid leukaemia and the expression of its target genes in global genome-wide analysis. *Leukemia*,21(5):912-916.
- Dell'Aversana, C., Giorgio, C., D'Amato, L., Lania, G., Matarese, F., Saeed, S., Di Costanzo, A., Belsito Petrizzi, V., Ingenito, C., Martens, J.H.A., Pallavicini, I., Minucci, S., Carissimo, A., Stunnenberg, H.G. and Altucci, L. (2017). miR-194-5p/BCLAF1 deregulation in AML tumorigenesis. *Leukemia*,31(11):2315-2325.
- de Leeuw, D.C., Denkers, F., Olthof, M.C., Rutten, A.P., Pouwels, W., Schuurhuis, G.J., Ossenkoppele, G.J. and Smit, L. (2014). Attenuation of microRNA-126 expression that drives CD34+38- stem/progenitor cells in acute myeloid leukemia leads to tumor eradication. *Cancer Research*,74(7):2094-2105.
- de Leeuw, D.C., van den Ancker, W., Denkers, F., de Menezes, R.X., Westers, T.M., Ossenkoppele, G.J., van de Loosdrecht, A.A. and Smit, L. (2013). MicroRNA profiling can classify acute leukemias of ambiguous lineage as either acute myeloid leukemia or acute lymphoid leukemia. *Clinical Cancer Research*,19(8):2187-2196.
- de Leeuw, D.C., Verhagen, H.J.M.P., Denkers, F., Kavelaars, F.G., Valk, P.J.M., Schuurhuis, G.J., Ossenkoppele, G.J. and Smit, L. (2016). MicroRNA-551b is highly expressed in hematopoietic stem cells and a biomarker for relapse and poor prognosis in acute myeloid leukemia. *Leukemia*,30(3):742-746.
- Dennis, G. Jr, Sherman, B.T., Hosack, D.A., Yang, J., Gao, W., Lane, H.C., and Lempicki, R.A. (2003). DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome Biology*,4(9):R60.
- Díaz-Beyá, M., Brunet, S., Nomdedéu, J., Tejero, R., Díaz, T., Pratcorona, M., Tormo, M., Ribera, J.M., Escoda, L., Duarte, R., Gallardo, D., Heras, I., Queipo de Llano, M.P., Bargay, J., Monzo, M., Sierra, J., Navarro, A., Esteve, J. and Cooperative AML group CETLAM (Grupo Cooperativo Para el Estudio y Tratamiento de las Leucemias Agudas y Mielodisplasias). (2014). MicroRNA expression at diagnosis adds relevant prognostic information to molecular categorization in patients with intermediate-risk cytogenetic acute myeloid leukemia. *Leukemia*,28(4):804-812.
- Díaz-Beyá, M., Brunet, S., Nomdedéu, J., Cordeiro, A., Tormo, M., Escoda, L., Ribera, J.M., Arnan, M., Heras, I., Gallard, D., Bargay, J., Queipo de Llano, M.P., Salamero, O., Martí, J.M., Sampol, A., Pedro, C., Hoyos, M., Pratcorona, M., Castellano, J.J., Nomdedeu, M., Risueñ, R.M., Sierra, J., Monzó, M., Navarro, A. and Esteve J. (2015). The expression level of BAALC-associated microRNA miR-3151 is an independent prognostic factor in younger patients with cytogenetic intermediate-risk acute myeloid Leukemia. *Blood Cancer Journal*,5(10):e352.

- Diener, Y., Walenda, T., Jost, E., Brümmendorf, T.H., Bosio, A., Wagner, W. and Bissels, U. (2015). MicroRNA expression profiles of serum from patients before and after chemotherapy *Genomics Data*,6:125-127.
- DiNardo, C., de Botton, S., Pollyea, D.A., Stein, E.M., Fathi, A.T., Roboz, G.J., Collins, R., Swords, R.T., Flinn, I.W., Altman, J.K., Tallman, M.S., Kantarjian, H.M., Derti, A., Goldwasser, M., Prah, M., Wu, B., Yen, K., Agresta, S. and Stone, R.M. (2015). Molecular profiling and relationship with clinical response in patients with IDH1 mutation-positive hematologic malignancies receiving AG-120, a first-in-class potent inhibitor of mutant IDH1, in addition to data from the completed dose escalation portion of the phase 1 study. *Blood*,126(23):1306.
- Dixon-McIver, A., East, P., Mein, C.A., Cazier, J.B., Molloy, G., Chaplin, T., Andrew Lister, T., Young, B.D. and Debernardi, S. (2008). Distinctive patterns of microRNA expression associated with karyotype in acute myeloid leukaemia. *PLoS One*,3(5):e2141.
- Douer, D. (2003). The epidemiology of acute promyelocytic leukaemia. *Best Practice and Research Clinical Haematology*,16(3):357-367.
- Döhner, H., Weisdorf, D.J. and Bloomfield, C.D. (2015). Acute myeloid leukemia. *New England Journal of Medicine*,373(12):1136-1152.
- Döhner, H., Estey, E., Grimwade, D., Amadori, S., Appelbaum, F.R., Büchner, T., Dombret, H., Ebert, B.L., Fenaux, P., Larson, R.A., Levine, R.L., Lo-Coco, F., Naoe, T., Niederwieser, D., Ossenkoppele, G.J., Sanz, M., Sierra, J., Tallman, M.S., Tien, H.-F., Wei, A.H., Löwenberg, B. and Bloomfield, C.D. (2017). Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*,129(4):424-447.
- Döhner, K., Schlenk, R.F., Habdank, M., Scholl, C., Rücker, F.G., Corbacioglu, A., Bullinger, L., Fröhling, S. and Döhner, H. (2005). Mutant nucleophosmin (NPM1) predicts favorable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: interaction with other gene mutations. *Blood*, 106(12):3740-3746.
- Döhner, K., Tobis, K., Ulrich, R., Fröhling, S., Benner, A., Schlenk, R.F. and Döhner, H. (2002). Prognostic significance of partial tandem duplications of the MLL gene in adult patients 16 to 60 years old with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: a study of the Acute Myeloid Leukemia Study Group Ulm. *Journal of Clinical Oncology*,20(15):3254-3261.
- Douer, D., Santillana, S., Ramezani, L., Samanez, C., Slovak, M.L., Lee, M.S., Watkins, K., Williams, T. and Vallejos, C. (2003). Acute promyelocytic leukaemia in patients originating in Latin America is associated with an increased frequency of the bcr1 subtype of the PML/RARalpha fusion gene. *British Journal of Haematology*,122(4):563-570.
- Du, C., Liu, C., Kang, J., Zhao, G., Ye, Z., Huang, S., Li, Z., Wu, Z. and Pei, G. (2009). MicroRNA miR-326 regulates TH-17 differentiation and is associated with the pathogenesis of multiple sclerosis. *Nature Immunology*,10(12):1252-1259.
- Dweep, H., Gretz, N. and Sticht, C. (2014). miRWalk database for miRNA-target interactions. *Methods in Molecular Biology*,1128:289-305.
- Ehninger, A. and Trumpp, A. (2011). The bone marrow stem cell niche grows up: mesenchymal stem cells and macrophages move in. *Journal of Experimental Medicine*,208(3):421-428.
- Eisfeld, A.K., Marcucci, G., Maharry, K., Schwind, S., Radmacher, M.D., Nicolet, D., Becker, H., Mrózek, K., Whitman, S.P., Metzler, K.H., Mendler, J.H., Wu, Y.Z., Liyanarachchi, S., Patel, R., Baer, M.R., Powell, B.L., Carter, T.H., Moore, J.O., Kolitz, J.E., Wetzler, M., Caligiuri, M.A., Larson, R.A., Tanner, S.M., de la Chapelle, A. and Bloomfield, C.D. (2012). miR-3151 interplays with its host gene BAALC and independently affects outcome of patients with cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Blood*,120(2):249-258.

- Eisfeld, A.K., Schwind, S., Patel, R., Huang, X., Santhanam, R., Walker, C.J., Markowitz, J., Hoag, K.W., Jarvinen, T.M., Leffel, B., Perrotti, D., Carson, W.E., Marcucci, G., Bloomfield, C.D. and de la Chapelle, A. (2014). Intronic miR-3151 within BAALC drives leukemogenesis by deregulating the TP53 pathway. *Science Signaling*,7(321):ra36.
- El-Halawani, N., Hamed, N., Eldafrawi, M., Mourad, Z., Sorour, A. and Ghallab, O. (2014). Diagnostic and prognostic value of plasma level of microRNA-92a in acute myeloid leukemia. *American Journal of Molecular Biology*,4(1):1-10.
- Elhamamsy, A.R., El Sharkawy, M.S., Zanaty, A.F., Mahrous, M.A., Mohamed, A.E. and Abushaaban, E.A. (2017). Circulating miR-92a, miR-143 and miR-342 in Plasma are Novel Potential Biomarkers for Acute Myeloid Leukemia. *International Journal of Molecular and Cellular Medicine*,6(2):77-86.
- Emmrich, S., Katsman-Kuipers, J.E., Henke, K., Khatib, M.E., Jammal, R., Engeland, F., Dasci, F., Zwaan, C.M., den Boer, M.L., Verboon, L., Stary, J., Baruchel, A., de Haas, V., Danen-van Oorschot, A.A., Fornerod, M., Pieters, R., Reinhardt, D., Klusmann, J.H. and van den Heuvel-Eibrink, M.M. (2014). miR-9 is a tumor suppressor in pediatric AML with t(8;21). *Leukemia*,28(5):1022-1032.
- Ernst, P., Wang, J. and Korsmeyer, S.J. (2002). The role of MLL in hematopoiesis and leukemia. *Current Opinion in Hematology*,9(4):282-287.
- Esau, C., Kang, X., Peralta, E., Hanson, E., Marcusson, E. G., Ravichandran, L. V., Sun, Y., Koo, S., Perera, R.J., Jain, R., Dean, N.M., Freier, S.M., Bennett, C.F., Lollo, B. and Griffey, R. (2004). MicroRNA-143 regulates adipocyte differentiation. *The Journal of biological chemistry*,279(50):52361-52365.
- Estey E. (2010). High cytogenetic or molecular risk acute myeloid leukemia. *Hematology. American Society of Hematology. Education Program*.2010:474-80.
- Fabbri, M., Paone, A., Calore, F., Galli, R., Gaudio, E., Santhanam, R., Lovat, F., Fadda, P., Mao, C., Nuovo, G.J., Zanesi, N., Crawford, M., Ozer, G.H., Wernicke, D., Alder, H., Caligiuri, M.A., Nana-Sinkam, P., Perrotti, D. and Croce, C.M. (2012). MicroRNAs bind to toll-like receptors to induce prometastatic inflammatory response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,109(31):2110-2116.
- Fang, C., Zhao, Y. and Guo, B. (2013). MiR-199b-5p targets HER2 in breast cancer cells. *Journal of Cellular Biochemistry*,114(7):1457-63.
- Faraoni, I., Laterza, S., Ardiri, D., Ciardi, C., Fazi, F. and Lo-Coco, F. (2012). MiR-424 and miR-155 deregulated expression in cytogenetically normal acute myeloid leukaemia: correlation with NPM1 and FLT3 mutation status. *Journal of Hematology & Oncology*,5:26.
- Fasan, A., Haferlach, C., Alpermann, T., Jeromin, S., Grossmann, V., Eder, C., Weissmann, S., Dicker, F., Kohlmann, A., Schindela, S., Kern, W., Haferlach, T. and Schnittger, S. (2014). The role of different genetic subtypes of CEBPA mutated AML. *Leukemia*,28(4):794-803.
- Favreau, A.J., McGlaufflin, R.E., Duarte, C.W. and Sathyanarayana, P. (2016). miR-199b, a novel tumor suppressor miRNA in acute myeloid leukemia with prognostic implications. *Experimental Hematology & Oncology*,5:4.
- Fayyad-Kazan, H., Bitar, N., Najar, M., Lewalle, P., Fayyad-Kazan, M., Badran, R., Hamade, E., Daher, A., Hussein, N., ElDirani, R., Berri, F., Vanhamme, L., Burny, A., Martiat, P., Rouas, R. and Badran, B. (2013). Circulating miR-150 and miR-342 in plasma are novel potential biomarkers for acute myeloid leukemia. *Journal of Translational Medicine*,11:31-41.
- Fazi, F., Rosa, A., Fatica, A., Gelmetti, V., De Marchis, M.L., Nervi, C. and Bozzoni, I. (2005). A minicircuitry comprised of microRNA-223 and transcription factors NFI-A and C/EBPalpha regulates human granulopoiesis. *Cell*,123(5):819-831.

- Felli, N., Fontana, L., Pelosi, E., Botta, R., Bonci, D., Facchiano, F., Liuzzi, F., Lulli, V., Morsilli, O., Santoro, S., Valtieri, M., Calin, G.A., Liu, C.G., Sorrentino, A., Croce, C.M. and Peschle, C. (2005). MicroRNAs 221 and 222 inhibit normal erythropoiesis and erythroleukemic cell growth via kit receptor down-modulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*,102(50):18081-18086.
- Ferrant, A., Labopin, M., Frassoni, F., Prentice, H.G., Cahn, J.Y., Blaise, D., Reiffers, J., Visani, G., Sanz, M.A., Boogaerts, M.A., Löwenberg, B. and Gorin, N.C. (1997). Karyotype in acute myeloblastic leukemia: prognostic significance for bone marrow transplantation in first remission: a European Group for Blood and Marrow Transplantation study. Acute Leukemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Blood*,90(8):2931-2938.
- Fong, C.T. and Brodeur, G.M. (1987). Down's syndrome and leukemia: epidemiology, genetics, cytogenetics and mechanisms of leukemogenesis. *Cancer Genetics and Cytogenetics*,28(1):55-76.
- Fontana, L., Pelosi, E., Greco, P., Racanicchi, S., Testa, U., Liuzzi, F., Croce, C.M., Brunetti, E., Grignani, F. and Peschle, C. (2007). MicroRNAs 17-5p-20a-106a control monocytopenia through AML1 targeting and M-CSF receptor upregulation. *Nature Cell Biology*,9(7):775-87.
- Forrest, A.R., Kanamori-Katayama, M., Tomaru, Y., Lassmann, T., Ninomiya, N., Takahashi, Y., de Hoon, M.J., Kubosaki, A., Kaiho, A., Suzuki, M., Yasuda, J., Kawai, J., Hayashizaki, Y., Hume, D.A. and Suzuki, H. (2010). Induction of microRNAs, mir-155, mir-222, mir-424 and mir-503, promotes monocytic differentiation through combinatorial regulation. *Leukemia*,24(2):460-466.
- Funamizu, N., Lacy, C.R., Parpart, S.T., Takai, A., Hiyoshi, Y. and Yanaga, K. (2014). MicroRNA-301b promotes cell invasiveness through targeting TP63 in pancreatic carcinoma cells. *International Journal of Oncology*,44(3):725-734.
- Gaidzik, V.I., Paschka, P., Spath, D., Späth, D., Habdank, M., Köhne, C.H., Germing, U., von Lilienfeld-Toal, M., Held, G., Horst, H.A., Haase, D., Bentz, M., Götze, K., Döhner, H., Schlenk, R.F., Bullinger, L., and Döhner, K. (2012). TET2 mutations in acute myeloid leukemia (AML): results from a comprehensive genetic and clinical analysis of the AML study group. *Journal of Clinical Oncology*,30(12):1350-1357.
- Gaidzik, V.I., Schlenk, R.F., Paschka, P., Stölzle, A., Späth, D., Kuendgen, A., von Lilienfeld-Toal, M., Brügger, W., Derigs, H.G., Kremers, S., Greil, R., Raghavachar, A., Ringhoffer, M., Salih, H.R., Wattad, M., Kirchen, H.G., Runde, V., Heil, G., Petzer, A.L., Girschikofsky, M., Heuser, M., Kayser, S., Goehring, G., Teleanu, M.V., Schlegelberger, B., Ganser, A., Krauter, J., Bullinger, L., Döhner, H. and Döhner, K. (2013). Clinical impact of DNMT3A mutations in younger adult patients with acute myeloid leukemia: results of the AML Study Group (AMLSG). *Blood*,121(23):4769-4777.
- Gaidzik, V.I., Teleanu, V., Papaemmanuil, E., Weber, D., Paschka, P., Hahn, J., Wallrabenstein, T., Kolbinger, B., Köhne, C.H., Horst, H.A., Brossart, P., Held, G., Kündgen, A., Ringhoffer, M., Götze, K., Rummel, M., Gerstung, M., Campbell, P., Kraus, J.M., Kestler, H.A., Thol, F., Heuser, M., Schlegelberger, B., Ganser, A., Bullinger, L., Schlenk, R.F., Döhner, K. and Döhner, H. (2016). RUNX1 mutations in acute myeloid leukemia are associated with distinct clinico-pathologic and genetic features. *Leukemia*,30(11):2160-2168.
- Gajewski, J.L., Ho, W.G., Nimer, S.D., Hirji, K. F., Gekelman, L., Jacobs, A. D. and Champlin, R. E. (1989). Efficacy of intensive chemotherapy for acute myelogenous leukemia associated with a preleukemic syndrome. *Journal of Clinical Oncology*,7(11):1637-1645.
- Gale, R.E., Green, C., Allen, C., Mead, A.J., Burnett, A.K., Hills, R.K., Linch, D.C. and Medical Research Council Adult Leukaemia Working Party. (2008). The impact of FLT3 internal tandem duplication mutant level, number, size, and interaction with NPM1 mutations in a large cohort of young adult patients with acute myeloid leukemia. *Blood*,111(5):2776-2784.

- Gao, S.M., Yang, J., Chen, C., Zhang, S., Xing, C.Y., Li, H., Wu, J. and Jiang, L. (2011). miR-15a/16-1 enhances retinoic acid-mediated differentiation of leukemic cells and is up-regulated by retinoic acid. *Leukemia & Lymphoma*, 52(12):2365-2371.
- Garzon, R., Garofalo, M., Martelli, M.P., Briesewitz, R., Wang, L., Fernandez-Cymering, C., Volinia, S., Liu, C.G., Schnittger, S., Haferlach, T., Liso, A., Diverio, D., Mancini, M., Meloni, G., Foa, R., Martelli, M.F., Mecucci, C., Croce, C.M. and Falini, B. (2008). Distinctive microRNA signature of acute myeloid leukemia Bering cytoplasmic mutated nucleophosmin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(10):3945-3950.
- Garzon, R., Liu, S., Fabbri, M., Liu, Z., Heaphy, C.E., Callegari, E., Schwind, S., Pang, J., Yu, J., Muthusamy, N., Havelange, V., Volinia, S., Blum, W., Rush, L.J., Perrotti, D., Andreeff, M., Bloomfield, C.D., Byrd, J.C., Chan, K., Wu, L.C., Croce, C.M. and Marcucci, G. (2009). MicroRNA-29b induces global DNA hypomethylation and tumor suppressor gene reexpression in acute myeloid leukemia by targeting directly DNMT3A and 3B and indirectly DNMT1. *Blood*, 113(25):6411-6418.
- Garzon, R., Pichiorri, F., Palumbo, T., Visentini, M., Aqeilan, R., Cimmino, A., Wang, H., Sun, H., Volinia, S., Alder, H., Calin, G.A., Liu, C.G., Andreeff, M. and Croce, C.M. (2007). MicroRNA gene expression during retinoic acid-induced differentiation of human acute promyelocytic leukemia. *Oncogene*, 26(28):4148-4157.
- Garzon, R., Volinia, S., Liu, C.G., Fernandez-Cymering, C., Palumbo, T., Pichiorri, F., Fabbri, M., Coombes, K., Alder, H., Nakamura, T., Flomenberg, N., Marcucci, G., Calin, G.A., Kornblau, S.M., Kantarjian, H., Bloomfield, C.D., Andreeff, M. and Croce C.M. (2008). MicroRNA signatures associated with cytogenetics and prognosis in acute myeloid leukemia. *Blood*, 111(6):3183-3189.
- Gentner, B., Pochert, N., Rouhi, A., Boccalatte, F., Plati, T., Berg, T., Sun, S.M., Mah, S.M., Mirkovic-Hösle, M., Ruschmann, J., Muranyi, A., Leierseder, S., Argiropoulos, B., Starczynowski, D.T., Karsan, A., Heuser, M., Hogge, D., Camargo, F.D., Engelhardt, S., Döhner, H., Buske, C., Jongen-Lavrencic, M., Naldini, L., Humphries, R.K. and Kuchenbauer, F. (2015). MicroRNA-223 dose levels fine tune proliferation and differentiation in human cord blood progenitors and acute myeloid leukemia. *Experimental Hematology*, 43(10):858-868.
- Gentner, B., Visigalli, I., Hiramatsu, H., Lechman, E., Ungari, S., Giustacchini, A., Schira, G., Amendola, M., Quattrini, A., Martino, S., Orlacchio, A., Dick, J.E., Biffi, A. and Naldini, L. (2010). Identification of hematopoietic stem cell-specific miRNAs enables gene therapy of globoid cell leukodystrophy. *Science Translational Medicine*, 2(58):58ra84.
- Gong, J.N., Yu, J., Lin, H.S., Zhang, X.H., Yin, X.L., Xiao, Z., Wang, F., Wang, X.S., Su, R., Shen, C., Zhao, H.L., Ma, Y.N. and Zhang J.W. (2014). The role, mechanism and potentially therapeutic application of microRNA-29 family in acute myeloid leukemia. *Cell Death and Differentiation*, 21(1):100-112.
- Griffiths-Jones, S. (2010). miRBase: microRNA sequences and annotation. *Current Protocols in Bioinformatics*, 29(1):12.9.1-12.9.10.
- Grimwade, D., Gorman, P., Duprez, E., Howe, K., Langabeer, S., Oliver, F., Walker, H., Culligan, D., Waters, J., Pomfret, M., Goldstone, A., Burnett, A., Freemont, P., Sheer, D. and Solomon, E. (1997). Characterization of cryptic rearrangements and variant translocations in acute promyelocytic leukemia. *Blood*, 90(12):4876-4885.
- Grimwade, D., Walker, H., Harrison, G., Oliver, F., Chatters, S., Harrison, C.J., Wheatley, K., Burnett, A.K., Goldstone, A.H. and Medical Research Council Adult Leukemia Working Party (2001). The predictive value of hierarchical cytogenetic classification in older adults with acute myeloid leukemia (AML): analysis of 1065 patients entered into the United Kingdom Medical Research Council AML11 trial. *Blood*, 98(5):1312-1320.

- Grishok, A., Pasquinelli, A.E., Conte, D., Li, N., Parrish, S., Ha, I., Baillie, D.L., Fire, A., Ruvkun, G. and Mello, C.C. (2001). Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing, *Cell*,106(1):23-34.
- Grossmann, V., Tiacci, E., Holmes, A.A., Kohlmann, A., Martelli M.P., Kern, W., Spanhol-Rosetto, A., Klein, H.U., Dugas, M., Schindela, S., Trifonov, V., Schnittger, S., Haferlach, C., Bassan, R., Wells, V.A., Spinelli, O., Chan, J., Rossi, R., Baldoni, S., De Carolis, L., Goetze, K., Serve, H., Peceny, R., Kreuzer, K.A., Oruzio, D., Specchia, G., Di Raimondo, F., Fabbiano, F., Sborgia, M., Liso, A., Farinelli, L., Rambaldi, A., Pasqualucci, L., Rabadan, R., Haferlach, T. and Falini, B. (2011). Whole-exome sequencing identifies static mutations of *BCOR* in acute myeloid leukemia with normal karyotype. *Blood*,118(23):6153-6163.
- Gundestrup, M. and Storm, H.H. (1999). Radiation-induced acute myeloid leukaemia and other cancers in commercial jet cockpit crews: a population-based cohort study. *Lancet*,354(9195):2029-2031.
- Guo, S., Lu, J., Schlanger, R., Zhang, H., Wang, J.Y., Fox, M.C., Purton, L.E., Fleming, H.H., Cobb, B., Merckenschlager, M., Golub, T.R. and Scadden, D.T. (2010). MicroRNA miR-125a controls hematopoietic stem cell number. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*,107(32):14229-14234.
- Haase, A.D., Jaskiewicz, L., Zhang, H., Laine, S., Sack, R., Gagnon, A. and Filipowicz, W. (2005). TRBP, a regulator of cellular PKR and HIV-1 virus expression, interacts with Dicer and functions in RNA silencing. *EMBO Reports*,6(10):961-967.
- Hackanson, B., Bennett, K.L., Brena, R.M., Jiang, J., Claus, R., Chen, S.S., Blagitko-Dorfs, N., Maharry, K., Whitman, S.P., Schmittgen, T.D., Lübbert, M., Marcucci, G., Bloomfield, C.D. and Plass, C. (2008). Epigenetic modification of CCAAT/enhancer binding protein alpha expression in acute myeloid leukemia. *Cancer Research*,68(9):3142-3151.
- Han, Y.C., Park, C.Y., Bhagat, G., Zhang, J., Wang, Y., Fan, J.B., Liu, M., Zou, Y., Weissman, I.L. and Gu, H. (2010). microRNA-29a induces aberrant self-renewal capacity in hematopoietic progenitors, biased myeloid development, and acute myeloid leukemia. *Journal of Experimental Medicine*,207(3):475-489.
- Harazono, Y., Muramatsu, T., Endo, H., Uzawa, N., Kawano, T., Harada, K., Inazawa, J. and Kozaki, K. (2013). miR-655 Is an EMT-suppressive microRNA targeting ZEB1 and TGFBR2. *PLoS One*,8(5):e62757.
- Havelange, V., Ranganathan, P., Geyer, S., Nicolet, D., Huang, X., Yu, X., Volinia, S., Kornblau, S.M., Andreeff, M., Croce, C.M., Marcucci, G., Bloomfield, C.D. and Garzon, R. (2014). Implications of the miR-10 family in chemotherapy response of NPM1-mutated AML. *Blood*,123(15):2412-2415.
- He, K., Hu, Z., Ruan, J., Ma, Q., Zhong, F., Cheng, X., Sun, S. and Zhou, J. (2015). MicroRNA301 is a potential diagnostic biomarker for hepatocellular cancer. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*,8(5):5603-5608.
- Head D. (1996). Revised classification of acute myeloid leukemia. *Leukemia*,10(11):1826-31.
- Heideveld, E., and van den Akker, E. (2017). Digesting the role of bone marrow macrophages on hematopoiesis. *Immunobiology*,222(6),814-822.
- Heijnen, H.F., Schiel, A.E., Fijnheer, R., Geuze, H.J. and Sixma, J.J. (1999). Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules. *Blood*,94(11):3791-3799.
- Heinrich, E.M. and Dimmeler, S. (2012). MicroRNAs and Stem Cells Control of Pluripotency, Reprogramming, and Lineage Commitment. *Circulation Research*,110(7):1014-1022.

- Herold, T., Metzeler K.H., Vosberg, S., Hartmann, L., Röllig, C., Stölzel, F., Schneider, S., Hubmann, M., Zellmeier, E., Ksienzyk, B., Jurinovic, V., Pasalic, Z., Kakadia, P.M., Dufour, A., Graf, A., Krebs, S., Blum, H., Sauerland, M.C., Büchner, T., Berdel, W.E., Woermann, B.J., Bornhäuser, M., Ehninger, G., Mansmann, U., Hiddemann, W., Bohlander, S.K., Spiekermann, K. and Greif, P.A. (2014). Isolated trisomy 13 defines a homogeneous AML subgroup with high frequency of mutations in spliceosome genes and poor prognosis. *Blood*,124(8):1304-1311.
- Hornick, N.I., Doron, B., Abdelhamed, S., Huan, J., Harrington, C.A., Shen, R., Cambronne, X.A., Chakkaramakkil Verghese, S. and Kurre, P. (2016). AML suppresses hematopoiesis by releasing exosomes that contain microRNAs targeting c-MYB. *Science Signal*,9(444):ra88.
- Horton, S.J. and Huntly, B.J.P. (2012). Recent advances in acute myeloid leukemia stem cell biology. *Haematologica*,97(7):966-974.
- Hu, Z., Chen, X., Zhao, Y., Tian, T., Jin, G., Shu, Y., Chen, Y., Xu, L., Zen, K., Zhang, C. and Shen, H. (2010). Serum microRNA signatures identified in a genome-wide serum microRNA expression profiling predict survival of non-small-cell lung cancer. *Journal of Clinical Oncology*,28:1721-1726.
- Hu, W., Dooley, J., Chung, S.S., Chandramohan, D., Cimmino, L., Mukherjee, S., Mason, C.E., de Strooper, B. Liston, A. and Park, C.Y. (2015). miR-29a maintains mouse hematopoietic stem cell self-renewal by regulating Dnmt3a. *Blood*,125(14):2206-2216.
- Huang, W.Y., Chen, D.H., Ning, L. and Wang, L.W. (2012). siRNA mediated silencing of NIN1/RPN12 binding protein 1 homolog inhibits proliferation and growth of breast cancer cells. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*,13(5):1823-1827.
- Hutvagner, G. and Zamore, P.D. (2002). A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science*,297(5589):2056-2060.
- Huynh, K.D., Fischle, W., Verdin, E. and Bardwell, V.J. (2000). *BCOR*, a novel corepressor involved in BCL-6 repression. *Genes & Development*,14(14):1810-1823.
- Isken, F., Steffen, B., Merk, S., Dugas, M., Markus, B., Tidow, N., Zühlsdorf, M., Illmer, T., Thiede, C., Berdel, W.E., Serve, H. and Müller-Tidow, C. (2008). Identification of acute myeloid leukaemia associated microRNA expression patterns. *British Journal of Haematology*,140(2):153-161.
- Ismail, N., Wang, Y., Dakhllallah, D., Moldovan, L., Agarwal, K., Batte, K., Shah, P., Wisler, J., Eubank, T.D., Tridandapani, S., Paulaitis, M.E., Piper, M.G. and Marsh, C.B. (2013). Macrophage microvesicles induce macrophage differentiation and miR-223 transfer. *Blood*,121(6):984-995.
- Ivey, A., Hills, R.K., Simpson, M.A., Jovanovic, J.V., Gilkes, A., Grech, A., Patel, Y., Bhudia, N., Farah, H., Mason, J., Wall, K., Akiki, S., Griffiths, M., Solomon, E., McCaughan, F., Linch, D.C., Gale, R.E., Vyas, P., Freeman, S.D., Russell, N., Burnett, A.K., Grimwade, D. and UK National Cancer Research Institute AML Working Group. (2016). Assessment of minimal residual disease in standard-risk AML. *The New England Journal of Medicine*,374(5):422-433.
- Jariwala, N., Rajasekaran, D., Srivastava, J., Gredler, R., Akiel, M.A., Robertson, C.L., Emdad, L., Fisher, P.B. and Sarkar, D. (2015). Role of the staphylococcal nuclease and tudor domain containing 1 in oncogenesis (Review). *International Journal of Oncology*,46:465-473.
- Jarry, J., Schadendorf, D., Greenwood, C., Spatz, A., and van Kempen, L.C. (2014). The validity of circulating microRNAs in oncology: five years of challenges and contradictions. *Molecular Oncology*,8(4):819-829.

- Ji, S., Zhang, B., Kong, Y., Ma, F. and Hua, Y. (2017). miR-326 Inhibits Gastric Cancer Cell Growth Through Downregulating NOB1. *Oncology Research*,25(6):853-861.
- Jiang, J., Gusev, Y., Aderca, I., Mettler, T.A., Nagorney, D.M., Brackett, D.J., Roberts, L.R. and Schmittgen, T.D. (2008). Association of MicroRNA expression in hepatocellular carcinomas with hepatitis infection, cirrhosis, and patient survival. *Clinical Cancer Research*,14(2): 419-427.
- Jinlong, S., Lin, F., Yonghui, L., Li, Y. and Weidong, W. (2015). Identification of let-7a-2-3p or/and miR-188-5p as prognostic biomarkers in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *PLoS One*,10(2):e0118099.
- Johnnidis, J.B., Harris, M.H., Wheeler, R.T., Stehling-Sun, S., Lam, M.H., Kirak, O., Brummelkamp, T.R., Fleming, M.D. and Camargo, F.D. (2008). Regulation of progenitor cell proliferation and granulocyte function by microRNA-223. *Nature*,451(7182):1125-9.
- Johnstone, R.M., Bianchini, A. and Teng, K. (1989). Reticulocyte maturation and exosome release: transferrin receptor containing exosomes shows multiple plasma membrane functions. *Blood*,74(5):1844-51.
- Jongen-Lavrencic, M., Sun, S.M., Dijkstra, M.K., Valk, P.J. and Löwenberg, B. (2008). MicroRNA expression profiling in relation to the genetic heterogeneity of acute myeloid leukemia. *Blood*,111(10):5078-5085.
- Kanitz, A., Imig, J., Dziunycz, P.J., Primorac, A., Galgano, A., Hofbauer, G.F., Gerber, A.P. and Detmar, M. (2012). The expression levels of microRNA-361-5p and its target VEGFA are inversely correlated in human cutaneous squamous cell carcinoma. *PLoS One*,7(11):e49568.
- Keating, M.J., Smith, T.L., Kantarjian, H., Cork, A., Walters, R., Trujillo, J.M., McCredie, K.B., Gehan, E.A. and Freireich, E.J. (1988). Cytogenetic pattern in acute myelogenous leukemia: a major reproducible determinant of outcome. *Leukemia*,2(7):403-412.
- Kefas, B., Comeau, L., Floyd, D.H., Seleverstov, O., Godlewski, J., Schmittgen, T., Jiang, J., diPierro, C.G., Li, Y., Chiocca, E.A., Lee, J., Fine, H., Abounader, R., Lawler, S. and Purow, B. (2009). The neuronal microRNA miR-326 acts in a feedback loop with notch and has therapeutic potential against brain tumors. *The Journal of Neurosciences*,29(48):15161-15168.
- Kerr, J.R., Barah, F., Cunniffe, V.S., Smith, J., Vallely, P.J., Will, A.M., Wynn, R.F., Stevens, R.F., Taylor, G.M., Cleator, G.M., and Eden, O.B. (2003). Association of acute parvovirus B19 infection with new onset of acute lymphoblastic and myeloblastic leukemia. *Journal of Clinical Pathology*,56(11):873-875.
- Khvorova, A., Reynolds, A. and Jayasena S.D. (2003). Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell*,115(2):209-216.
- Kim, J., Krichevsky, A., Grad, Y., Hayes, G.D., Kosik, K.S., Church, G.M. and Ruvkun, G. (2004). Identification of many microRNAs that copurify with polyribosomes in mammalian neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,101(1):360-365.
- Kitamura, K., Seike, M., Okano, T., Matsuda, K., Miyanaga, A., Mizutani, H., Noro, R., Minegishi, Y., Kubota, K. and Gemma, A. (2014). MiR-134/487b/655 cluster regulates TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition and drug resistance to gefitinib by targeting MAGI2 in lung adenocarcinoma cells. *Molecular Cancer Therapy*,13(2):444-453.
- Klusmann, J.H., Li, Z., Bohmer, K., Maroz, A., Koch, M.L., Emmrich, S., Godinho, F.J., Orkin, S.H. and Reinhardt, D. (2010). miR-125b-2 is a potential oncomiR on human chromosome 21 in megakaryoblastic leukemia. *Genes & Development*,24(5):478-90.
- Korabečná, M., Koutová, L. and Tesařová, P. (2017). The potential roles of vesicle-enclosed miRNAs in communication between macrophages and cancer cells in tumor microenvironment. *Neoplasia*,64(3):406-411.

- Koreth, J., Schlenk, R., Kopecky, K.J., Honda, S., Sierra, J., Djulbegovic, B.J., Wadleigh, M., DeAngelo, D.J., Stone, R.M., Sakamaki, H., Appelbaum, F.R., Döhner, H., Antin, J.H., Soiffer, R.J., and Cutler, C. (2009). Allogeneic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia in first complete remission: systematic review and meta-analysis of prospective clinical trials. *JAMA*,301(22):2349-61.
- Kosaka, N., Iguchi, H., Yoshioka, Y., Takeshita, F., Matsuki, Y. and Ochiya, T. (2010). Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells. *Journal of Biological Chemistry*,285(23):17442-52.
- Koschmieder, S., Halmos, B., Levantini, E. and Tenen, D.G. (2009). Dysregulation of the C/EBPalpha differentiation pathway in human cancer. *Journal of Clinical Oncology*,27(4):619-628.
- Kossmann, S.E. and Weiss, M.A. (2000). Acute myelogenous leukemia after exposure to strontium-89 for the treatment of adenocarcinoma of the prostate. *Cancer*,88(3):620-624.
- Koutova, L., Sterbova, M., Pazourkova, E., Pospisilova, S., Svobodova, I., Horinek, A., Lysak, D. and Korabecna, M. (2015). The impact of standard chemotherapy on miRNA signature in plasma in AML patients. *Leukemia Research*,9(12):1389-1395.
- Koza, V., Cetkovský, P., Faber, E., Hájek, R., Indrák, K., Ivašková, E., Jebavý, L., Jindra, P., Kozák, T., Mayer, J., Sedláček, P., Starý, J., Trněný, M., Vítek, A., Vorlíček, J., and Žák, P. (2006). Indikace k alogenním a autologním transplantacím krvetvorných buněk. Doporučení České hematologické společnosti ČLS JEP a České onkologické společnosti ČLS JEP. *Klinická onkologie*,19(6):310-316.
- Krauth, M.T., Alpermann, T., Bacher, U., Eder, C., Dicker, F., Ulke, M., Kuznia, S., Nadarajah, N., Kern, W., Haferlach, C., Haferlach, T. and Schnittger, S. (2015). WT1 mutations are secondary events in AML, show varying frequencies and impact on prognosis between genetic subgroups. *Leukemia*,29(3):660-667.
- Langer, C., Radmacher, M.D., Ruppert, A.S., Whitman, S.P., Paschka, P., Mrózek, K., Baldus, C.D., Vukosavljevic, T., Liu, C.G., Ross, M.E., Powell, B.L., de la Chapelle, A., Kolitz, J.E., Larson, R.A., Marcucci, G., Bloomfield, C.D. and Cancer and Leukemia Group B (CALGB). (2008). High *BAALC* expression associates with other molecular prognostic markers, poor outcome, and a distinct gene-expression signature in cytogenetically normal patients younger than 60 years with acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B (CALGB) study. *Blood*,111(11): 5371-5379.
- Langer, C., Marcucci, G., Holland, K.B., Radmacher, M.D., Maharry, K., Paschka, P., Whitman, S.P., Mrózek, K., Baldus, C.D., Vij, R., Powell, B.L., Carroll, A.J., Kolitz, J.E., Caligiuri, M.A., Larson, R.A. and Bloomfield, C.D. (2009). Prognostic importance of MN1 transcript levels, and biologic insights from MN1-associated gene and microRNA expression signatures in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study. *Journal of Clinical Oncology*,27(19):3198-3204.
- Lau, N.C., Lim, L.P., Weinstein, E.G. and Bartel, D.P. (2001). An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science*,294(5543):858-862.
- Le Beau, M.M., Albain, K.S., Larson, R.A., Vardiman, J.W., Davis, E.M., Blough, R.R., Golomb, H.M. and Rowley, J.D. (1986). Clinical and cytogenetic correlations in 63 patients with therapy-related myelodysplastic syndromes and acute nonlymphocytic leukemia: further evidence for characteristic abnormalities of chromosomes no. 5 and 7. *Journal of Clinical Oncology*,4(3):325-345.
- Lechman, E.R., Gentner, B., Ng, S.W.K., Schoof, E.M., van Galen, P., Kennedy, J.A., Nucera, S., Ciceri, F., Kaufmann, K.B., Takayama, N., Dobson, S.M., Trotman-Grant, A., Krivdova, G., Elzinga, J., Mitchell, A., Nilsson, B., Hermans, K.G., Marke, R., Isserlin, R., Voisin, V., Bader, G.D., Zandstra, P.W., Golub, T.R., Ebert, B.L., Lu, J., Minden, M., Wang, J.C.Y., Naldini, L. and Dick, J.E. (2016). miR-126 Regulates Distinct Self-Renewal Outcomes in Normal and Malignant Hematopoietic Stem Cells. *Cancer Cell*,29(4):602-606.

- Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Radmark, O., Kim, S. and Kim, V.N. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, 425(6956):415-419.
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L., and Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75(5):843-854.
- Lee, E.J., Gusev, Y., Jiang, J., Nuovo, G.J., Lerner, M.R., Frankel, W.L., Morgan, D.L., Postier, R.G., Brackett, D.J. and Schmittgen, T.D. (2007). Expression profiling identifies microRNA signature in pancreatic cancer. *International Journal of Cancer*, 120(5):1046-1054.
- Lee, Y., Hur, I., Park, S.Y., Kim, Y.K., Suh, M.R. and Kim, V.N. (2006). The role of PACT in the RNA silencing pathway. *EMBO Journal*, 25(3):522-532.
- Lee, Y., Jeon, K., Lee, J.T., Kim, S. and Kim, V.N. (2002). MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO Journal*, 21(17):4663–4670.
- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.H., Lee, S., Baek, S.H. and Kim, V.N., (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO Journal*, 23(20):4051-4060.
- Ley, T.J., Ding, L., Walter, M.J., McLellan, M.D., Lamprecht, T., Larson, D.E., Kandath, C., Payton, J.E., Baty, J., Welch, J., Harris, C.C., Lichti, C.F., Townsend, R.R., Fulton, R.S., Dooling, D.J., Koboldt, D.C., Schmidt, H., Zhang, Q., Osborne, J.R., Lin, L., O’Laughlin, M., McMichael, J.F., Delehaunty, K.D., McGrath, S.D., Fulton, L.A., Magrini, V.J., Vickery, T.L., Hundal, J., Cook, L.L., Conyers, J.J., Swift, G.W., Reed, J.P., Alldredge, P.A., Wylie, T., Walker, J., Kalicki, J., Watson, M.A., Heath, S., Shannon, W.D., Varghese, N., Nagarajan, R., Westervelt, P., Tomasson, M.H., Link, D.C., Graubert, T.A., DiPersio, J.F., Mardis, E.R. and Wilson, R.K. (2010). DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. *The New England Journal of Medicine*, 363(25):2424-2433.
- Li, Y., Gao, L., Luo, X., Wang, L., Gao, X., Wang, W., Sun, J., Dou, L., Li, J., Xu, C., Wang, L., Zhou, M., Jiang, M., Zhou, J., Caligiuri, M.A., Nervi, C., Bloomfield, C.D., Marcucci, G. and Yu, L. (2013). Epigenetic silencing of microRNA-193a contributes to leukemogenesis in t(8;21) acute myeloid leukemia by activating the PTEN/PI3K signal pathway. *Blood*, 121(3):499-509.
- Li, Y., Gao, Y., Xu, Y., Ma, H. and Yang, M. (2015). Down-regulation of miR-326 is associated with poor prognosis and promotes growth and metastasis by targeting FSCN1 in gastric cancer. *Growth Factors*, 33(4):267-274.
- Li, Z., Huang, H., Li, Y., Jiang, X., Chen, P., Arnovitz, S., Radmacher, M.D., Maharry, K., Elkahlon, A., Yang, X., He, C., He, M., Zhang, Z., Dohner, K., Neilly, M.B., Price, C., Lussier, Y.A., Zhang, Y., Larson, R.A., Le Beau, M.M., Caligiuri, M.A., Bullinger, L., Valk, P.J.M., Delwel, R., Lowenberg, B., Liu, P.P., Marcucci, G., Bloomfield, C.D., Rowley, J.D. and Chen, J. (2012). Up-regulation of a HOXA-PBX3 homeobox- gene signature following down-regulation of miR-181 is associated with adverse prognosis in patients with cytogenetically abnormal AML. *Blood*, 119(10):2314-2324.
- Li, Y., Lin, J., Yang, J., Qian, J., Qian, W., Yao, D.M., Deng, Z.Q., Liu, Q., Chen, X.X., Xie, D., An, C. and Tang, C.Y. (2013). Overexpressed let-7a-3 is associated with poor outcome in acute myeloid leukemia. *Leukemia Research*, 37(12):1642-1647.
- Li, Z., Lu, J., Sun, M., Mi, S., Zhang, H., Luo, R.T., Chen, P., Wang, Y., Yan, M., Qian, Z., Neilly, M.B., Jin, J., Zhang, Y., Bohlander, S.K., Zhang, D.E., Larson, R.A., Le Beau, M.M., Thirman, M.J., Golub, T.R., Rowley, J.D. and Chen, J. (2008). Distinct microRNA expression profiles in acute myeloid leukemia with common translocations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(40):15535-15540.

- Li, Y., Ma, C., Qian, M., Wen, Z., Jing, H. and Qian, D. (2014). Downregulation of NOB1 suppresses the proliferation and tumor growth of non-small cell lung cancer *in vitro* and *in vivo*. *Oncology Reports*,31(3):1271-1276.
- Liang, Z., Wu, H., Xia, J., Li, Y., Zhang, Y., Huang, K., Wagar, N., Yoon, Y., Cho, H.T., Scala, S. and Shim, H. (2010). Involvement of miR-326 in chemotherapy resistance of breast cancer through modulating expression of multidrug resistance-associated protein 1. *Biochemical Pharmacology*,79(6):817-824.
- Liao, Q., Wang, B., Li, X. and Jiang, G. (2017). miRNAs in acute myeloid leukemia. *Oncotarget*,8(2):3666-3682.
- Lin, Y., Peng, S., Yu, H., Teng, H. and Cui, M. (2012). RNAi-mediated downregulation of *NOB1* suppresses the growth and colony-formation ability of human ovarian cancer cells. *Medical Oncology*,29(1):311-317.
- Lin, X., Wang, Z., Zhang, R. and Feng, W. (2015). High serum microRNA-335 level predicts aggressive tumor progression and unfavorable prognosis in pediatric acute myeloid leukemia. *Clinical & translational oncology*,17(5):358-364.
- Liu, J., Carmell, M.A., Rivas, F.V., Marsden, C.G., Thomson, J.M., Song, J.J., Hammond, S.M., Joshua-Tor, L. and Hannon, G.J. (2004). Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science*,305(5689):1437-1441.
- Liu, C., Kelnar, K., Vlassov, A.V., Brown, D., Wang, J., and Tang, D.G. (2012). Distinct microRNA expression profiles in prostate cancer stem/progenitor cells and tumor-suppressive functions of let-7. *Cancer Research*,72(13):3393-3404.
- Liu, D., Tao, T., Xu, B., Chen, S., Liu, C., Zhang, L., Lu, K., Huang, Y., Jiang, L., Zhang, X., Huang, X., Zhang, L., Han, C. and Chen, M. (2014). MiR-361-5p acts as a tumor suppressor in prostate cancer by targeting signal transducer and activator of transcription-6(STAT6). *Biochemical and Biophysical Research Communications*,445(1):151-156.
- Londin, E., Loher, P., Telonis, A.G., Quann, K., Clark, P., Jing, Y., Hatzimichael, E., Kirino, Y., Honda, S., Lally, M., Ramratnam, B., Comstock, C.E., Knudsen, K.E., Gomella, L., Spaeth, G.L., Hark, L., Katz, L.J., Witkiewicz, A., Rostami, A., Jimenez, S.A., Hollingsworth, M.A., Yeh, J.J., Shaw, C.A., McKenzie, S.E., Bray, P., Nelson, P.T., Zupo, S., Van Roosbroeck, K., Keating, M.J., Calin, G.A., Yeo, C., Jimbo, M., Cozzitorto, J., Brody, J.R., Delgrosso, K., Mattick, J.S., Fortina, P. and Rigoutsos, I. (2015). Analysis of 13 cell types reveals evidence for the expression of numerous novel primate- and tissue-specific microRNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,112(10):1106-1115.
- Lou, X., Qi, X., Zhang, Y., Long, H. and Yang, J. (2013). Decreased expression of microRNA-625 is associated with tumor metastasis and poor prognosis in patients with colorectal cancer. *Journal of Surgical Oncology*,108(4):230-235.
- Löwenberg, B., Downing, J.R. and Burnett, A. (1999). Acute myeloid leukemia. *The New England Journal of Medicine*,341(14):1051-1062.
- Lu, Y.C., Chen, Y.J., Wang, H.M., Tsai, C.Y., Chen, W.H., Huang, Y.C., Fan, K.H., Tsai, C.N., Huang, S.F., Kang, C.J., Chang, J.T. and Cheng, A.J. (2012). Oncogenic function and early detection potential of miRNA-10b in oral cancer as identified by microRNA profiling. *Cancer Prevention Research (Philadelphia, Pa.)*,5(4): 665-674.
- Lu, Z., Guo, Q., Shi, A., Xie, F. and Lu, Q. (2012). Downregulation of NIN/RPN12 binding protein inhibit the growth of human hepatocellular carcinoma cells. *Molecular Biology Reports*,39(1): 501-507.
- Lu, C., Ward, P.S., Kapoor, G.S., Rohle, D., Turcan, S., Abdel-Wahab, O., Edwards, C.R., Khanin, R., Figueroa, M.E., Melnick, A., Wellen, K.E., O'Rourke, D.M., Berger, S.L., Chan, T.A., Levine, R.L., Mellinghoff, I.K. and Thompson, C.B. (2012). IDH mutation impairs histone demethylation and results in a block to cell differentiation. *Nature*,483(7390):474-478.
- Lutherborrow, M., Bryant, A., Jayaswal, V., Agapiou, D., Palma, C., Yang, Y.H. and Ma, D.D. (2011). Expression Profiling of Cytogenetically Normal Acute Myeloid Leukemia Identifies MicroRNAs that Target Genes Involved in Monocytic Differentiation. *American Journal of Hematology*,86(1):2-11.

- Lv, L.L., Cao, Y., Liu, D., Xu, M., Liu, H., Tang, R.N., Ma, K.L. and Liu, B.C. (2013). Isolation and quantification of microRNAs from urinary exosomes/microvesicles for biomarker discovery. *International Journal of Biological Sciences*,9(10):1021-1031.
- Lyu, X., Xin, Y., Mi, R., Ding, J., Wang, X., Hu, J., Fan, R., Wei, X., Song, Y. and Zhao, R.Y. (2014). Overexpression of Wilms tumor 1 gene as a negative prognostic indicator in acute myeloid leukemia. *PLoS One*,9(3):e92470.
- Ma, F., Song, H., Guo, B., Zhang, Y., Zheng, Y., Lin, C., Wu, Y., Guan, G., Sha, R., Zhou, Q., Wang, D., Zhou, X., Li, J. and Qiu, X. (2015). MiR-361-5p inhibits colorectal and gastric cancer growth and metastasis by targeting staphylococcal nuclease domain containing-1. *Oncotarget*,6(19):17404-17416.
- Majumder, M., Dunn, L., Liu, L., Hasan, A., Vincent, K., Brackstone, M., Hess, D. and Lala, P.K. (2018). COX-2 induces oncogenic microRNA miR655 in human breast cancer. *Scientific Reports*,8(1):327.
- Maniatakis, E. and Mourelatos, Z. (2005). A human, ATP-independent, RISC assembly machine fueled by pre-miRNA. *Genes & Development*,19(24):2979-2990.
- Marcucci, G., Haferlach, T. and Döhner, H. (2011). Molecular genetics of adult acute myeloid leukemia: prognostic and therapeutic implications. *Journal of Clinical Oncology*,29(5):475-486.
- Marcucci, G., Maharry, K.S., Metzeler, K.H., Volinia, S., Wu, Y.Z., Mrózek, K., Nicolet, D., Kohlschmidt, J., Whitman, S.P., Mender, J.H., Schwind, S., Becker, H., Eisfeld, A.K., Carroll, A.J., Powell, B.L., Kolitz, J.E., Garzon, R., Caligiuri, M.A., Stone, R.M. and Bloomfield, C.D. (2013). Clinical role of microRNAs in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: miR-155 upregulation independently identifies high-risk patients. *Journal of Clinical Oncology*,31(17):2086-2093.
- Marcucci, G., Maharry, K., Radmacher, M.D., Mrózek, K., Vukosavljevic, T., Paschka, P., Whitman, S.P., Langer, C., Baldus, C.D., Liu, C.G., Ruppert, A.S., Powell, B.L., Carroll, A.J., Caligiuri, M.A., Kolitz, J.E., Larson, R.A. and Bloomfield, C.D. (2008). Prognostic significance of, and gene and microRNA expression signatures associated with, CEBPA mutations in cytogenetically normal acute myeloid leukemia with high-risk molecular features: A Cancer and Leukemia Group B Study. *Journal of Clinical Oncology*,26(31):5078-5087.
- Marcucci, G., Maharry, K., Wu, Y.Z., Radmacher, M.D., Mrózek, K., Margeson, D., Holland, K.B., Whitman, S.P., Becker, H., Schwind, S., Metzeler, K.H., Powell, B.L., Carter, T.H., Kolitz, J.E., Wetzler, M., Carroll, A.J., Baer, M.R., Caligiuri, M.A., Larson, R.A. and Bloomfield, C.D. (2010). IDH1 and IDH2 gene mutations identify novel molecular subsets within de novo cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study. *Journal of Clinical Oncology*,28(14):2348-2355.
- Marcucci, G., Metzeler, K.H., Schwind, S., Becker, H., Maharry, K., Mrózek, K., Radmacher, M.D., Kohlschmidt, J., Nicolet, D., Whitman, S.P., Wu, Y.Z., Powell, B.L., Carter, T.H., Kolitz, J.E., Wetzler, M., Carroll, A.J., Baer, M.R., Moore, J.O., Caligiuri, M.A., Larson, R.A. and Bloomfield, C.D. (2012). Age-related prognostic impact of different types of DNMT3A mutations in adults with primary cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Journal of Clinical Oncology*,30(7):742-750.
- Marcucci, G., Radmacher, M.D., Maharry, K., Mrózek, K., Ruppert, A.S., Paschka, P., Vukosavljevic, T., Whitman, S.P., Baldus, C.D., Langer, C., Liu, C.G., Carroll, A.J., Powell, B.L., Garzon, R., Croce, C.M., Kolitz, J.E., Caligiuri, M.A., Larson, R.A. and Bloomfield, C.D. (2008). MicroRNA expression in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *The New England Journal of Medicine*,358(18):1919-1928.
- Mayer, J. (ed.) (2016). Léčebné postupy v hematologii: doporučení České hematologické společnosti České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně. Vydra, J., Mayer, J., Starý, J., Ráčil, Z. Akutní myeloidní leukemie. Kap 4.,22-36. Nové Město na Metují, Česká hematologická společnost České lékařské společnosti J. E. Purkyně

- McCormick, S.R., Higgins, R.R., Grutkoski, P.S., Bousquet, M., Quelen, C., Bartholomaeus, L.M. and Brousset, P. (2015). Myeloid neoplasm with translocation t(2;11)(p21;q23-24), elevated microRNA 125b-1, and JAK2 exon 12 mutation. *British Journal of Haematology*,169(2):290-293.
- Medinger, M., Lengerke, C. and Passweg, J. (2016). Novel prognostic and therapeutic mutations in acute myeloid leukemia. *Cancer Genomics & Proteomics*,13(5):317-329.
- Medinger, M. and Passweg, J.R. (2017). Acute myeloid leukaemia genomics. *British Journal of Haematology*,179(4):530-542.
- Mendler, J.H., Maharry, K., Radmacher, M.D., Mrózek, K., Becker, H., Metzeler, K.H., Schwind, S., Whitman, S.P., Khalife, J., Kohlschmidt, J., Nicolet, D., Powell, B.L., Carter, T.H., Wetzler, M., Moore, J.O., Kolitz, J.E., Baer, M.R., Carroll, A.J., Larson, R.A., Caligiuri, M.A., Marcucci, G. and Bloomfield, C.D. (2012). RUNX1 mutations are associated with poor outcome in younger and older patients with cytogenetically normal acute myeloid leukemia and with distinct gene and MicroRNA expression signatures. *Journal of Clinical Oncology*,30(25):3109-3118.
- Metzeler, K.H., Maharry, K., Radmacher, M.D., Mrózek, K., Margeson, D., Becker, H., Curfman, J., Holland, K.B., Schwind, S., Whitman, S.P., Wu, Y.Z., Blum, W., Powell, B.L., Carter, T.H., Wetzler, M., Moore, J.O., Kolitz, J.E., Baer, M.R., Carroll, A.J., Larson, R.A., Caligiuri, M.A., Marcucci, G. and Bloomfield, C.D. (2011). TET2 mutations improve the new European LeukemiaNet risk classification of acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study. *Journal of Clinical Oncology*,29(10):1373-1381.
- Metzeler, K.H., Becker, H., Maharry, K., Radmacher, M.D., Kohlschmidt, J., Mrózek, K., Nicolet, D., Whitman, S.P., Wu, Y.Z., Schwind, S., Powell, B.L., Carter, T.H., Wetzler, M., Moore, J.O., Kolitz, J.E., Baer, M.R., Carroll, A.J., Larson, R.A., Caligiuri, M.A., Marcucci, G. and Bloomfield, C.D. (2011). ASXL1 mutations identify a high-risk subgroup of older patients with primary cytogenetically normal AML within the ELN Favorable genetic category. *Blood*,118(26):6920-6929.
- Meyer, S.C. and Levine, R.L. (2014). Translational implications of somatic genomics in acute myeloid leukaemia. *The Lancet. Oncology*,15(9):382-394.
- Meyers, S., Downing, J.R. and Hiebert, S.W. (1993). Identification of AML-1 and the (8;21) translocation protein (AML-1/ETO) as sequence-specific DNA-binding proteins: the runt homology domain is required for DNA binding and protein-protein interactions. *Molecular and Cellular Biology*,13(10):6336-6345.
- Mi, S., Lu, J., Sun, M., Li, Z., Zhang, H., Neilly, M.B., Wang, Y., Qian, Z., Jin, J., Zhang, Y., Bohlander, S.K., Le Beau, M.M., Larson, R.A., Golub, T.R., Rowley, J.D. and Chen, J. (2007). MicroRNA expression signatures accurately discriminate acute lymphoblastic leukemia from acute myeloid leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,104(50):19971-19976.
- Michael, A., Bajracharya, S.D., Yuen, P.S., Zhou, H., Star, R.A., Illei, G.G., and Alevizos, I. (2010). Exosomes from human saliva as a source of microRNA biomarkers. *Oral Diseases*,16(1):34-38.
- Miko, E., Czimmerer, Z., Csanky, E., Boros, G., Buslig, J., Dezso, B. and Scholtz, B. (2009). Differentially expressed microRNAs in small cell lung cancer. *Experimental Lung Research*,35(8):646-664.
- Montani, F., and Bianchi, F. (2016). Circulating Cancer Biomarkers: The Macro-revolution of the Micro-RNA. *EBioMedicine*,5:4-6.
- Moved Permanently. Bioinformatics and Systems Biology [online]. Dostupné z: <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn> - navštíveno naposledy 1.2.2019

- Moorman, A.V., Roman, E., Cartwright, R.A., and Morgan, G.J. (2002). Smoking and the risk of acute myeloid leukaemia in cytogenetic subgroups. *British Journal of Cancer*, 86(1):60-62.
- Morris, V.A., Zhang, A., Yang, T., Stirewalt, D. L., Ramamurthy, R., Meshinchi, S. and Oehler V.G. (2013). MicroRNA-150 Expression Induces Myeloid Differentiation of Human Acute Leukemia Cells and Normal Hematopoietic Progenitors. *PLoS One*, 8(9):e75815.
- Mrózek, K., Marcucci, G., Paschka, P., Whitman, S.P. and Bloomfield, C.D. (2007). Clinical relevance of mutations and gene-expression changes in adult acute myeloid leukemia with normal cytogenetics: are we ready for a prognostically prioritized molecular classification? *Blood*, 109(2):431-448.
- Mulcahy, L.A., Pink, R.C. and Carter, D.R. (2014). Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *Journal of Extracellular Vesicles*, 3.
- Munich, S., Sobo-Vujanovic, A., Buchser, W.J., Beer-Stolz, D. and Vujanovic, N.L. (2012). Dendritic cell exosomes directly kill tumor cells and activate natural killer cells via TNF superfamily ligands. *Oncoimmunology*, 1(7):1074-83.
- Naumov, V.A., Generozov, E.V., Zaharjevskaya, N.B., Matushkina, D.S., Larin, A.K., Chernyshov, S.V., Alekseev, M.V., Shelygin, Y.A. and Govorun, V.M. (2013). Genome-scale analysis of DNA methylation in colorectal cancer using Infinium HumanMethylation450 BeadChips. *Epigenetics*, 8(9):921-934.
- Nucifora, G., Laricchia-Robbio, L. and Senyuk, V. (2006). EVI1 and hematopoietic disorders: history and perspectives. *Gene*, 368:1-11.
- O'Connell, R.M., Chaudhuri, A.A., Rao, D.S., Gibson, W.S., Balazs, A.B. and Baltimore, D. (2010). MicroRNAs enriched in hematopoietic stem cells differentially regulate long-term hematopoietic output. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(32):14235-14240.
- Odero, M.D., Carlson, K.M., Calasanz, M.J. and Rowley, J.D. (2001). Further characterization of complex chromosomal rearrangements in myeloid malignancies: spectral karyotyping adds precision in defining abnormalities associated with poor prognosis. *Leukemia*, 15(7):1133-1136.
- Ooi, A.G.L., Sahoo, D., Adorno, M., Wang, Y., Weissman, I.L. and Park, C.Y. (2010). MicroRNA-125b expands hematopoietic stem cells and enriches for the lymphoid-balanced and lymphoid-biased subsets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(50):21505-21510.
- Organista-Nava, J., Gómez-Gómez, Y., Illades-Aguiar, B. and Leyva-Vázquez, M.A. (2015). Expression of miRNAs Associated with the AML1-ETO, CBFβ-MYH1, PML-RARA and AF9-MLL Oncoproteins in Acute Myeloid Leukemia. *Journal of Human Anatomy and Physiology*, 1(1):5.
- Palma, C.A., Al Sheikha, D., Lim, T.K., Bryant, A., Vu, T.T., Jayaswal, V. and Ma, D.D. (2014). MicroRNA-155 as an inducer of apoptosis and cell differentiation in acute myeloid leukaemia. *Molecular Cancer*, 13:79.
- Pan, B.T. and Johnstone, R.M. (1983). Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor. *Cell*, 33(3):967-78.
- Pan, B.T. and Johnstone, R. (1984). Selective externalization of the transferrin receptor by sheep reticulocytes in vitro. Response to ligands and inhibitors of endocytosis. *The Journal of Biological Chemistry*, 259(15):9776-9782.
- Papaemmanuil, E., Gerstung, M., Bullinger, L., Gaidzik, V.I., Paschka, P., Roberts, N.D., Potter, N.E., Heuser, M., Thol, F., Bolli, N., Gundem, G., Van Loo, P., Martincorena, I., Ganly, P., Mudie, L., McLaren, S., O'Meara, S., Raine, K., Jones, D.R., Teague, J.W., Butler, A.P., Greaves, M.F., Ganser, A., Döhner, K., Schlenk, R.F., Döhner, H. and Campbell, P.J.

- (2016). Genomic classification and prognosis in acute myeloid leukemia. *The New England Journal of Medicine*,374(23):2209-2221.
- Park, H.S., Kim, K.R., Lee, H.J., Choi, H.N., Kim, D.K., Kim, B.T. and Moon, W.S. (2007). Overexpression of discoidin domain receptor 1 increases the migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells in association with matrix metalloproteinase. *Oncology Reports*,18(6):1435-1441.
- Paschka, P., Marcucci, G., Ruppert, A.S., Mrózek, K., Chen, H., Kittles, R.A., Vukosavljevic, T., Perrotti, D., Vardiman, J.W., Carroll, A.J., Koltz, J.E., Larson, R.A., Bloomfield, C.D. and Cancer and Leukemia Group B. (2006). Adverse prognostic significance of KIT mutations in adult acute myeloid leukemia with inv(16) and t(8;21): a Cancer and Leukemia Group B Study. *Journal of Clinical Oncology*,24(24):3904-3911.
- Passweg, J.R., Baldomero, H., Bader, P., Bonini, C., Cesaro, S., Dreger, P., Duarte, R.F., Dufour, C., Falkenburg, J.H., Farge-Bancel, D., Gennery, A., Kröger, N., Lanza, F., Nagler, A., Sureda, A., Mohty, M. and European Society for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) (2015). Hematopoietic SCT in Europe 2013: recent trends in the use of alternative donors showing more haploidentical donors but fewer cord blood transplants. *Bone Marrow Transplantation*,50(4):476-482.
- Patel, J.P., Gönen, M., Figueroa, M.E., Fernandez, H., Sun, Z., Racevskis, J., Van Vlierberghe, P., Dolgalev, I., Thomas, S., Aminova, O., Huberman, K., Cheng, J., Viale, A., Socci, N.D., Heguy, A., Cherry, A., Vance, G., Higgins, R.R., Ketterling, R.P., Gallagher, R.E., Litzow, M., van den Brink, M.R.M., Lazarus, H.M., Rowe, J.M., Luger, S., Ferrando, A., Paietta, E., Tallman, M.S., Melnick, A., Abdel-Wahab, O. and Levine, R.L. (2012). Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia. *The New England Journal of Medicine*,366(12):1079-1089.
- Popovic, R., Riesbeck, L.E., Velu, C.S., Chaubey, A., Zhang, J., Achille, N.J., Erfurth, F.E., Eaton, K., Lu, J., Grimes, H.L., Chen, J., Rowley, J.D. and Zeleznik-Le, N.J. (2009). Regulation of mir-196b by MLL and its overexpression by MLL fusions contributes to immortalization. *Blood*,113(14):3314-3322.
- Pöttsch, C., Voigtländer, T. and Lübbert, M. (2002). p53 Germline mutation in a patient with Li-Fraumeni Syndrome and three metachronous malignancies. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*,128(8):456-460.
- Preston, D.L., Kusumi, S., Tomonaga, M., Izumi, S., Ron, E., Kuramoto, A., Kamada, N., Dohy, H., Matsuo, T., Nonaka, H., Thompson, D.E., Soda, M. and Mabuchi, K. (1994). Cancer incidence in atomic bomb survivors. Part III. Leukemia, lymphoma and multiple myeloma, 1950–1987. *Radiation Research*,137(2 Suppl):S68-97.
- Pui, C.H., Behm, F.G., Raimondi, S.C., Dodge, R.K., George, S.L., Rivera, G.K., Mirro, J. Jr., Kalwinsky, D.K., Dahl, G.V., Murphy, S.B., Crist, W.M. and Williams, D.L. (1989). Secondary acute myeloid leukemia in children treated for acute lymphoid leukemia. *The New England Journal of Medicine*,321(3):136-142.
- Pulikkan, J.A., Peramangalam, P.S., Dengler, V., Ho, P.A., Preudhomme, C., Meshinchi, S., Christopheit, M., Nibourel, O., Müller-Tidow, C., Bohlander, S.K., Tenen, D.G. and Behre, G. (2010). C/EBPα regulated microRNA-34a targets E2F3 during granulopoiesis and is down-regulated in AML with CEBPA mutations. *Blood*,116(25):5638-5649.
- Qian, J., Lin, J., Qian, W., Ma, J.C., Qian, S.X., Li, Y., Yang, J., Li, J.Y., Wang, C.Z., Chai, H.Y., Chen, X.X. and Deng, Z.Q. (2013). Overexpression of miR-378 is frequent and may affect treatment outcomes in patients with acute myeloid leukemia. *Leukemia Research*,37(7):765-768.
- Quesnel, B., Kantarjian, H., Bjergaard, J.P., Brault, P., Estey, E., Lai, J.H., Tilly, H., Stoppa, A.M., Archimbaud, E. and Harousseau, J.L. (1993). Therapy related acute myeloid leukemia with t(8;21), inv(16), and t(8;16): a report on 25 cases and review of the literature. *Journal of Clinical Oncology*,11(12):2370-2379.

- Ram, R., Lorente, G., Nikolich, K., Urfer, R., Foehr, E. and Nagavarapu, U. (2006). Discoidin domain receptor-1a (DDR1a) promotes glioma cell invasion and adhesion in association with matrix metalloproteinase-2. *Journal of Neuro-oncology*, 76(3):239-248.
- Raman, V., Martensen, S.A., Reisman, D., Evron, E., Odenwald, W.F., Jaffee, E., Marks, J. and Sukumar, S. (2000). Compromised HOXA5 function can limit p53 expression in human breast tumours. *Nature*, 405(6789):974-978.
- Reinhart, B.J., Slack, F.J., Basson, M., Bettinger, J.C., Pasquinelli, A.E., Rougvie, A.E., Horvitz, H.R. and Ruvkun, G. (2000). The 21 nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 403(6772):901-906.
- Repp, R., Borkhardt, A., Haupt, E., Kreuder, J., Brettreich, S., Hammermann, J., Nishida, K., Harbott, J. and Lampert, F. (1995). Detection of four different 11q23 chromosomal abnormalities by multiplex-PCR and fluorescence based automatic DNA-fragment analysis. *Leukemia*, 9(1):210-215.
- Repp, R., Schaekel, U., Helm, G., Thiede, C., Soucek, S., Pascheberg, U., Wandt, H., Aulitzky, W., Bodenstein, H., Sonnen, R., Link, H., Ehninger, G., Gramatzki, M. and AML-SHG Study Group. (2003). Immunophenotyping Is an Independent Factor for Risk Stratification in AML. *Clinical Cytometry Part B*, 53(1):11-19.
- Reynolds, P., Von Behren and J. Elkin, E.P. (2002). Birth characteristics and leukemia in young children. *American Journal of Epidemiology*, 155(7):603-613.
- Rommer, A., Steinleitner, K., Hackl, H., Schneckeleithner, C., Engelmann, M., Scheideler, M., Vlatkovic, I., Kralovics, R., Cerny-Reiterer, S., Valent, P., Sill, H. and Wieser, R. (2013). Overexpression of primary microRNA 221/222 in acute myeloid leukemia. *BMC Cancer*, 13:364.
- Rossi, G., Pelizzari, A.M., Bellotti, D., Tonelli, M. and Barlati, S. (2000). Cytogenetic analogy between myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia of elderly patients. *Leukemia*, 14(4):636-641.
- Rosa, A., Ballarino, M., Sorrentino, A., Sthandier, O., De Angelis, F.G., Marchioni, M., Masella, B., Guarini, A., Fatica, A., Peschle, C. and Bozzoni, I. (2007). The interplay between the master transcription factor PU.1 and miR-424 regulates human monocyte/macrophage differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(50):19849-19854.
- Rücker, F.G., Russ, A.C., Cocciardi, S., Kett, H., Schlenk, R.F., Botzenhardt, U., Langer, C., Krauter, J., Fröhling, S., Schlegelberger, B., Ganser, A., Lichter, P., Zenz, T., Döhner, H., Döhner, K. and Bullinger, L. (2013). Altered miRNA and gene expression in acute myeloid leukemia with complex karyotype identify networks of prognostic relevance. *Leukemia*, 27(2):353-361.
- Rücker, F.G., Schlenk, R.F., Bullinger, L., Kayser, S., Teleanu, V., Kett, H., Habdank, M., Kugler, C.M., Holzmann, K., Gaidzik, V.I., Paschka, P., Held, G., von Lilienfeld-Toal, M., Lübbert, M., Fröhling, S., Zenz, T., Krauter, J., Schlegelberger, B., Ganser, A., Lichter, P., Döhner, K. and Döhner, H. (2012). TP53 alterations in acute myeloid leukemia with complex karyotype correlate with specific copy number alterations, monosomal karyotype, and dismal outcome. *Blood*, 119(9):2114-2121.
- Salama, A., Fichou, N., Allard, M., Dubreil, L., De Beaurepaire, L., Viel, A., Jégou, D., Bösch, S. and Bach, J.M. (2014). MicroRNA-29b modulates innate and antigen-specific immune responses in mouse models of autoimmunity. *PLoS One*, 9(9):e106153.
- Sandler, D.P. and Collman, G.W. (1987). Cytogenetic and environmental factors in the etiology of the acute leukemias in adults. *American Journal of Epidemiology*, 126(6):1017-1032.

- Sattler, M. and Salgia, R. (2004). Targeting c-Kit mutations: basic science to novel therapies. *Leukemia Research*,28(Suppl 1):11-20.
- Sato-Kuwabara, Y., Melo, S.A., Soares, F.A. and Calin, G.A. (2015). The fusion of two worlds: non-coding RNAs and extracellular vesicles – diagnostic and therapeutic implications (Review). *International Journal of Oncology*,46(1):17-27.
- Saultz, J.N. and Garzon, R. (2016). Acute myeloid leukemia: a concise review. *Journal of Clinical Medicine*,5(3):33.
- Sebastiani, G., Grieco, F.A., Spagnuolo, I., Galleri, L., Cataldo, D. and Dotta, F. (2011). Increased expression of microRNA miR-326 in type 1 diabetic patients with ongoing islet autoimmunity. *Diabetes Metabolism Research and Reviews*,27(8):862-866.
- Schlenk, R.F., Döhner, K., Krauter, J., Fröhling, S., Corbacioglu, A., Bullinger, L., Habdank, M., Späth, D., Morgan, M., Benner, A., Schlegelberger, B., Heil, G., Ganser, A., Döhner, H. and German-Austrian Acute Myeloid Leukemia Study Group. (2008). German-Austrian Acute Myeloid Leukemia Study Group. Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *The New England Journal of Medicine*,358(18):1909-1918.
- Schnittger, S., Schoch, C., Kern, W., Mecucci, C., Tschulik, C., Martelli, M.F., Haferlach, T., Hiddemann, W. and Falini, B. (2005). Nucleophosmin gene mutations are predictors of favorable prognosis in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *Blood*,106(12):3733-3739.
- Schwind, S., Maharry, K., Radmacher, M.D., Mrózek, K., Holland, K.B., Margeson, D., Whitman, S.P., Hickey, C., Becker, H., Metzeler, K.H., Paschka, P., Baldus, C.D., Liu, S., Garzon, R., Powell, B.L., Kolitz, J.E., Carroll, A.J., Caligiuri, M.A., Larson, R.A., Marcucci, G. and Bloomfield, C.D. (2010). Prognostic significance of expression of a single microRNA, miR-181a, in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study. *Journal of Clinical Oncology*,28(36):5257-5264.
- Schwind, S., Marcucci, G., Kohlschmidt, J., Radmacher, M.D., Mrózek, K., Maharry, K., Becker, H., Metzeler, K.H., Whitman, S.P., Wu, Y.Z., Powell, B.L., Baer, M.R., Kolitz, J.E., Carroll, A.J., Larson, R.A., Caligiuri, M.A. and Bloomfield, C.D. (2011). Low expression of MN1 associates with better treatment response in older patients with de novo cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Blood*,118(15):4188-4198.
- Schwind, S., Marcucci, G., Maharry, K., Radmacher, M.D., Mrózek, K., Holland, K.B., Margeson, D., Becker, H., Whitman, S.P., Wu, Y.Z., Metzeler, K.H., Powell, B.L., Kolitz, J.E., Carter, T.H., Moore, J.O., Baer, M.R., Carroll, A.J., Caligiuri, M.A., Larson, R.A. and Bloomfield, C.D. (2010). BAALC and ERG expression levels are associated with outcome and distinct gene and microRNA expression profiles in older patients with de novo cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study. *Blood*,116(25):5660-5669.
- Shang, W., Chen, X., Nie, L., Xu, M., Chen, N., Zeng, H. and Zhou, Q. (2013) MiR199b suppresses expression of hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF-1alpha) in prostate cancer cells. *International Journal of Molecular Sciences*,14(4):8422-8436.
- Shi, W., Gerster, K., Alajez, N.M., Tsang, J., Waldron, L., Pintilie, M., Hui, A.B., Sykes, J., P'ng, C., Miller, N., McCready, D., Fyles, A. and Liu, F.F. (2011). MicroRNA-301 mediates proliferation and invasion in human breast cancer. *Cancer Research*,71(8): 2926-2937.
- Shibayama, Y., Kondo, T., Ohya, H., Fujisawa, S., Teshima, T. and Iseki, K. (2015). Upregulation of microRNA-126-5p is associated with drug resistance to cytarabine and poor prognosis in AML patients. *Oncology Reports*,33(5):2176-2182.
- Shlush, L.I., Zandi, S., Mitchell, A., Chen, W.C., Brandwein, J.M., Gupta, V., Kennedy, J.A., Schimmer, A.D., Schuh, A.C., Yee, K.W., McLeod, J.L., Doedens, M., Medeiros, J.J., Marke, R., Kim, H.J., Lee, K., McPherson, J.D., Hudson, HALT Pan-

- Leukemia Gene Panel Consortium, T.J., Brown, A.M., Yousif, F., Trinh, Q.M., Stein, L.D., Minden, M.D., Wang, J.C. and Dick, J.E. (2014). Identification of pre-leukaemic haematopoietic stem cells in acute leukaemia. *Nature*,506(7488):328-333.
- Simons, M. and Raposo, G. (2009). Exosomes – vesicular carriers for intercellular communication. *Current Opinion in Cell Biology*,21(4):575-581.
- Small, D. (2008). Targeting FLT3 for treatment of leukemia. *Seminars in Hematology*,45(3 Suppl 2):S17–S21.
- Smith, S.M., Le Beau, M.M., Huo, D., Karrison, T., Sobecks, R.M., Anastasi, J., Vardiman, J.W., Rowley, J.D. and Larson, R.A. (2003). Clinical-cytogenetic associations in 306 patients with therapy-related myelodysplasia or myeloid leukemia: the University of Chicago series. *Blood*,102(1):43-52.
- Sotiropoulou, G., Pampalakis, G., Lianidou, E. and Mourelatos, Z. (2009) Emerging roles of microRNAs as molecular switches in the integrated circuit of the cancer cell. *RNA*,15(8):1443-1461.
- Stavast, C.J., Leenen, P.J.M., and Erkeland, S.J. (2018). The interplay between critical transcription factors and microRNAs in the control of normal and malignant myelopoiesis. *Cancer Letters*,427:28-37.
- Sun, J.J., Chen, G.Y. and Xie, Z.T. (2016). MicroRNA-361-5p Inhibits Cancer Cell Growth by Targeting CXCR6 in Hepatocellular Carcinoma. *Cellular Physiology and Biochemistry*,38(2):777-785.
- Sun, E.H., Zhou, Q., Liu, K.S., Wei, W., Wang, C.M., Liu, X.F., Lu, C. and Ma, D.Y. (2014). Screening MiRNAs related to different subtypes of breast cancer with miRNAs microarray. *European Review of Medical and Pharmacological Sciences*,18(19):2783-2788.
- Štěrbová, M. *Profilování extracelulárních mikroRNA u pacientů s akutní myeloidní leukémií před léčbou a po léčbě*. Praha, 2014. Diplomová práce. Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy, Katedra antropologie a genetiky člověka. Vedoucí diplomové práce Marie Korabečná.
- Tabara, H., Yigit, E., Siomi, H. and Mello, C. (2002). The dsRNA binding protein RDE-4 interacts with RDE-1, DCR-1, and a DEXH-box helicase to direct RNAi in *C. elegans*. *Cell*,109(7):861–871.
- Tabet, F., Vickers, K.C., Cuesta Torres, L.F., Wiese, C.B., Shoucri, B.M., Lambert, G., Catherinet, C., Prado-Lourenco, L., Levin, M.G., Thacker, S., Sethupathy, P., Barter, P.J., Remaley, A.T. and Rye, K.A. (2014). HDL-transferred microRNA-223 regulates ICAM-1 expression in endothelial cells. *Nature Communications*,5:3292.
- Tanaka, M., Oikawa, K., Takanashi, M., Kudo, M., Ohyashiki, J., Ohyashiki, K. and Kuroda, M. (2009). Down-regulation of miR-92 in human plasma is a novel marker for acute leukemia patients. *PLoS One*,4(5):e5532.
- Tenedini, E., Roncaglia, E., Ferrari, F., Orlandi, C., Bianchi, E., Bicciato, S., Tagliafico, E. and Ferrari, S. (2010). Integrated analysis of microRNA and mRNA expression profiles in physiological myelopoiesis: role of hsa-mir-299-5p in CD34+ progenitor cells commitment. *Cell Death & Disease*,1:28.
- Todd, M.A. and Picketts, D.J. (2012). *PHF6* interacts with the nucleosome remodeling and deacetylation (NuRD) complex. *Journal of Proteome Research*,11(8):4326-4337.
- Toor, A.A., Ayers, J., Strupeck, J., Parthasarathy, M., Creech, S., Rodriguez, T. and Stiff, P.J. (2004). Favorable results with a single autologous stem cell transplant following conditioning with busulphan and cyclophosphamide in patients with multiple myeloma. *British Journal of Haematology*,124(6):769-776.
- Travis, L.B., Li, C.Y., Zhang, Z.N., Li, D.G., Yin, S.N., Chow, W.H., Li, G.L., Dosemeci, M., Blot, W., Fraumeni, J.F., Hazes, R.B. and Linet, M.S. (1994). Hematopoietic malignancies and related disorders among benzene-exposed workers in China. *Leukemia & Lymphoma*,14(1-2):91-102.

- van der Vos K.E., Abels, E.R., Zhang, X., Lai, C., Carrizosa, E., Oakley, D., Prabhakar, S., Mardini, O., Crommentuijn, M.H., Skog, J., Krichevsky, A.M., Stemmer-Rachamimov, A., Mempel, T.R., El Khoury, J., Hickman, S.E. and Breakefield, X.O. (2016). Directly visualized glioblastoma-derived extracellular vesicles transfer RNA to microglia/macrophages in the brain. *Neuro-Oncology*,18(1):58-69.
- van Rhenen, A., Moshaver, B., Kelder, A., Feller, N., Nieuwint, A.W.M., Zweegman, S., Ossenkoppele, G.J. and Schuurhuis, G.J. (2007). Aberrant marker expression patterns on the CD34+CD38- stem cell compartment in acute myeloid leukemia allows to distinguish the malignant from the normal stem cell compartment both at diagnosis and in remission. *Leukemia*,21(8):1700-1707.
- Vardiman, J.W., Thiele, J., Arber, D.A., Brunning, R.D., Borowitz, M.J., Porwit, A., Harris, N.L., Le Beau, M.M., Hellström-Lindberg, E., Tefferi, A. and Bloomfield, C.D. (2009). The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*,114(5):937-951.
- Vickers, K.C., Palmisano, B.T., Shoucri, B.M., Shamburek, R.D. and Remaley, A.T. (2011). MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nature Cell Biology*,13(4):423-433.
- von Muehlendahl, K.E. (1998). Chernobyl fallout, nuclear plants and leukaemia: review of recent literature. *European Journal of Pediatrics*,157(7):602-604.
- Wang, S., Aurora, A.B., Johnson, B.A., Qi, X., McAnally, J., Hill, J.A., Richardson, J.A., Bassel-Duby, R. and Olson, E.N. (2008). The endothelial-specific microRNA miR-126 governs vascular integrity and angiogenesis. *Developmental cell*,15(2):261-271.
- Wang, R., Chen, X. and Shu, Y. (2014). Prediction of non-small cell lung cancer metastasis-associated microRNAs using bioinformatics. *American Journal of Cancer Research*,5(1):32-51.
- Wang, R., Chen, X., Xu, T., Xia, R., Han, L., Chen, W., De, W. and Shu, Y. (2016). MiR-326 regulates cell proliferation and migration in lung cancer by targeting phox2a and is regulated by HOTAIR. *American Journal of Cancer Research*,6(2):173-186.
- Wang, Y., Li, Z., He, C., Wang, D., Yuan, X., Chen, J. and Jin J. (2010). MicroRNAs expression signatures are associated with lineage and survival in acute leukemias. *Blood Cells, Molecules and Diseases*,44(3):191-197.
- Wang, M., Li, C., Nie, H., Lv, X., Qu, Y., Yu, B., Su, L., Li, J., Chen, X., Ju, J., Yu, Y., Yan, M., Gu, Q., Zhu, Z. and Liu, B. (2012). Down-regulated miR-625 suppresses invasion and metastasis of gastric cancer by targeting ILK. *FEBS Letters*,586(6):2382-2388.
- Wang, H.W., Lo, H.H., Chiu, Y.L., Chang, S.J., Huang, P.H., Liao, K.H., Tasi, C.F., Wu, C.H., Tsai, T.N., Cheng, C.C. and Cheng, S.M. (2014). Dysregulated miR-361-5p/VEGF axis in the plasma and endothelial progenitor cells of patients with coronary artery disease. *PLoS One*,9(5):e98070.
- Wang, Z., Qiao, Q., Chen, M., Li, X., Wang, Z., Liu, C. and Xie, Z. (2014). miR-625 down-regulation promotes proliferation and invasion in esophageal cancer by targeting Sox2. *FEBS Letters*,588(6):915-921.
- Wang, C., Song, B., Song, W., Liu, J., Sun, A., Wu, D., Yu, H., Lian, J., Chen, L. and Han, J. (2011). Underexpressed microRNA-199b-5p targets hypoxia-inducible factor-1alpha in hepatocellular carcinoma and predicts prognosis of hepatocellular carcinoma patients. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*,26(11):1630-1637.
- Wang, C.L., Wang, B.B., Bartha, G., Channa, N., Klinger, M., Killeen, N. and Wabl, M. (2006). Activation of an oncogenic microRNA cistron by provirus integration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,103(49):18680-18684.

- Wang, K., Yuan, Y., Cho, J.H., McClarty, S., Baxter, D. and Galas, D.J. (2012). Comparing the MicroRNA spectrum between serum and plasma. *PLoS One*,7(7):e41561.
- Wang, Y., Zang, W., Du, Y., Ma, Y., Li, M., Li, P., Chen, X., Wang, T., Dong, Z. and Zhao, G. (2013). Mir-655 up-regulation suppresses cell invasion by targeting pituitary tumor-transforming gene-1 in esophageal squamous cell carcinoma. *Journal of Translational Medicine*,11:301.
- Wang, Y.X., Zhang, T.J., Yang, D.Q., Yao, D.M., Yang, L., Zhou, J.D., Deng, Z.Q., Ma, J.C., Guo, H., Wen, X.M., Lin, J. and Qian, J. (2016). Reduced miR-215 expression predicts poor prognosis in patients with acute myeloid leukemia *Japanese Journal of Clinical Oncology*,46(4):350-356.
- Wang, Y.X., Zhang, X.Y., Zhang, B.F., Yang, C.Q., Chen, X.M. and Gao, H.J. (2010). Initial study of microRNA expression profiles of colonic cancer without lymph node metastasis. *Journal of Digestive Diseases*,11:50-55.
- Wei, Z., Liu, Y., Wang, Y., Zhang, Y., Luo, Q., Man, X., Wei, F. and Yu, X. (2016). Downregulation of Foxo3 and TRIM31 by miR-551b in side population promotes cell proliferation, invasion, and drug resistance of ovarian cancer. *Medical Oncology*,33(11):126.
- Weng, H., Lal, K., Yang, F.F. and Chen, J. (2015). The pathological role and prognostic impact of miR-181 in acute myeloid leukemia. *Cancer genetics*,208(5):225-229.
- Whitman, S.P., Maharry, K., Radmacher, M.D., Becker, H., Mrozek, K., Margeson, D., Holland, K.B., Wu, Y.Z., Schwind, S., Metzeler, K.H., Wen, J., Baer, M.R., Powell, B.L., Carter, T.H., Kolitz, J.E., Wetzler, M., Moore, J.O., Stone, R.M., Carroll, A.J., Larson, R.A., Caligiuri, M.A., Marcucci, G. and Bloomfield, C.D. (2010). FLT3 internal tandem duplication associates with adverse outcome and gene- and microRNA-expression signatures in patients 60 years of age or older with primary cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study. *Blood*,116(18):3622-3626.
- Wingo, P.A., Cardinez, C.J., Landis, S.H., Greenlee, R.T., Ries, L.A., Anderson, R.N. and Thun, M.J. (2003). Long-term trends in cancer mortality in the United States, 1930–1998. *Cancer*,97(12 Suppl):3133-3275.
- Woehlecke, C., Wittig, S., Arndt, C. and Gruhn, B. (2015). Prognostic impact of WT1 expression prior to hematopoietic stem cell transplantation in children with malignant hematological diseases. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*,141(3):523-529.
- Wojtowicz, E.E., Lechman, E.R., Hermans, K.G., Schoof, E.M., Wienholds, E., Isserlin, R., van Veelen, P.A., Broekhuis, M.J.C., Janssen, G.M.C., Trotman-Grant, A., Dobson, S.M., Krivdova, G., Elzinga, J., Kennedy, J., Gan, O.I., Sinha, A., Ignatchenko, V., Kislinger, T., Dethmers-Ausema, B., Weersing, E., Alemdehy, M.F., de Looper, H.W., Bader, G.D., Ritsema, M., Erkeland, S.J., Bystrykh, L.V., Dick, J.E. and de Haan, G. (2016). Ectopic miR-125a Expression Induces Long-Term Repopulating Stem Cell Capacity in Mouse and Human Hematopoietic Progenitors. *Cell Stem Cell*,19(3):383-396.
- Wu, X., Xi, X., Yan, Q., Zhang, Z., Cai, B., Lu, W. and Wan, X. (2013). MicroRNA-361-5p facilitates cervical cancer progression through mediation of epithelial-to-mesenchymal transition. *Medical Oncology*,30(4):751.
- Wu, L., Hui, H., Wang, L.J., Wang, H., Liu, Q.F. and Han, S.X. (2015). MicroRNA-326 functions as a tumor suppressor in colorectal cancer by targeting the nin one binding protein. *Oncology Reports*,33(5):2309-2318.
- Xiang, L., Li, M., Liu, Y., Cen, J., Chen, Z., Zhen, X., Xie, X., Cao, X. and Gu, W. (2013). The clinical characteristics and prognostic significance of MN1 gene and MN1-associated microRNA expression in adult patients with de novo acute myeloid leukemia. *Annals of Hematology*,92(8):1063-1069.

- Xiong, Y., Li, Z., Ji, M., Tan, A.C., Bemis, J., Tse, J.V., Huang, G., Park, J., Ji, C., Chen, J., Bemis, L.T., Bunting, K.D. and Tse, W. (2011). MIR29B regulates expression of MLLT11 (AF1Q), an MLL fusion partner, and low MIR29B expression associates with adverse cytogenetics and poor overall survival in AML. *British Journal of Haematology*,153(6):753-757.
- Yamamoto, H., Lu, J., Oba, S., Kawamata, T., Yoishimi, A., Kurosaki, N., Yokoyama, K., Matsushita, H., Kurokawa, M., Tojo, A., Ando, K., Morishita, K., Katagiri, K. and Kotani, A. (2016). miR-133 regulates Evi1 expression in AML cells as a potential therapeutic target. *Scientific Reports*,6:19204.
- Yan, L., Wang, Y., Liang, J., Liu, Z., Sun, X. and Cai, K. (2017). MiR-301b Promotes the Proliferation, Mobility and Epithelial-to-Mesenchymal Transition of Bladder Cancer Cells by Targeting EGR1. *Biochemistry and Cell Biology*,95(5):571-577.
- Yang, S.H., Baek, H.A., Lee, H.J., Park, H.S., Jang, K.Y., Kang, M.J., Lee, D.G., Lee, Y.C., Moon, W.S. and Chung, M.J. (2010). Discoidin domain receptor 1 is associated with poor prognosis of non-small cell lung carcinomas. *Oncology Reports*,24(2):311-319.
- Yang, L., Han, Y., Suarez Saiz, F. and Minden, M.D. (2007). A tumor suppressor and oncogene: The WT1 story. *Leukemia*,21(5):868-876.
- Yang, S., He, P., Wang, J., Schetter, A., Tang, W., Funamizu, N., Yanaga, K., Uwagawa, T., Satoskar, A.R., Gaedcke, J., Bernhardt, M., Ghadimi, B.M., Gaida, M.M., Bergmann, F., Werner, J., Ried, T., Hanna, N., Alexander, H.R. and Hussain, S.P. (2016). A Novel MIF Signaling Pathway Drives the Malignant Character of Pancreatic Cancer by Targeting NR3C2. *Cancer Research*,76(13):3838-3850.
- Yang, M., Chen, J., Su, F., Yu, B., Su, F., Lin, L., Liu, Y., Huang, J.D. and Song, E. (2011). Microvesicles secreted by macrophages shuttle invasion-potentiating microRNAs into breast cancer cells. *Molecular Cancer*,10:117.
- Ying, X., Wu, Q., Wu, X., Zhu, Q., Wang, X., Jiang, L., Chen, X. and Wang, X. (2016). Epithelial ovarian cancer-secreted exosomal miR-222-3p induces polarization of tumor-associated macrophages. *Oncotarget*,7(28):43076-43087.
- Yeh, C.H., Moles, R. and Nicot, C. (2016). Clinical significance of microRNAs in chronic and acute human leukemia. *Molecular Cancer*,15(1):37.
- Yi, R., Poy, M.N., Stoffel, M. and Fuchs, E. (2008). A skin microRNA promotes differentiation by repressing 'stemness'. *Nature*,452(7184):225-229.
- Yi, R., Qin, Y., Macara, L.G. and Cullen, B.R. (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes & Development*,17(24):3011-3016.
- Yingchun, L., Rong, Z., Kun, Y., Ying, Y. and Zhuogang, L. (2015). Bone marrow MicroRNA-335 level predicts the chemotherapy response and prognosis of adult acute myeloid leukemia. *Medicine*,94(33):e0986.
- Yoo, N.J., Kim, Y.R. and Lee, S.H. (2012). Somatic mutation of *PHF6* gene in T-cell acute lymphoblastic leukemia, acute myelogenous leukemia and hepatocellular carcinoma. *Acta Oncologica*,51(1):107-111.
- Yoshimura, T., Matsuyama, W. and Kamohara, H. (2005). Discoidin domain receptor 1: a new class of receptor regulating leukocyte-collagen interaction. *Immunologic Research*,31(3):219-230.
- Zeng, Y. and Cullen, B.R. (2004). Structural requirements for pre-microRNA binding and nuclear export by Exportin 5. *Nucleic Acids Research*,32(16):4776-4785.

- Zhan, C., Yan, L., Wang, L., Jiang, W., Zhang, Y., Xi, J., Chen, L., Jin, Y., Qiao, Y., Shi, Y. and Wang, Q. (2014). Identification of reference miRNAs in human tumors by TCGA miRNA-seq data. *Biochemical and Biophysical Research Communications*,453(3):375-378.
- Zhang, X., Daucher, M., Armistead, D., Russell, R. and Kottlilil, S. (2013). MicroRNA expression profiling in HCV-infected human hepatoma cells identifies potential anti-viral targets induced by interferon-alpha. *PLoS One*,8(2):e55733.
- Zhang, Y., Ni, J., Zhou, G., Yuan, J., Ren, W., Shan, Y., Tang, W., Yu, L. and Zhao, S. (2005). Cloning, expression and characterization of the human NOB1 gene. *Molecular Biology Reports*,32(3):185-189.
- Zhang, X., Zeng, J., Zhou, M., Li, B., Zhang, Y., Huang, T., Wang, L., Jia, J. and Chen, C. (2012). The tumor suppressive role of miRNA-370 by targeting FoxM1 in acute myeloid leukemia. *Molecular Cancer*,11:56.
- Zhao, J., Lu, Q., Zhu, J., Fu, J. and Chen, Y.X. (2014). Prognostic value of miR-96 in patients with acute myeloid leukemia. *Diagnostic Pathology*,9:76.
- Zhi, F., Cao, X., Xie, X., Wang, B., Dong, W., Gu, W., Ling, Y., Wang, R., Yang, Y. and Liu, Y. (2013). Identification of Circulating MicroRNAs as Potential Biomarkers for Detecting Acute Myeloid Leukemia. *PLoS One*,8(2):e56718.
- Zhou, W., Fong, M.Y., Min, Y., Somlo, G., Liu, L., Palomares, M.R., Yu, Y., Chow, A., O'Connor, S.T., Chin, A.R., Yen, Y., Wang, Y., Marcusson, E.G., Chu, P., Wu, J., Wu, X., Li, A.X., Li, Z., Gao, H., Ren, X., Boldin, M.P., Lin, P.C. and Wang, S.E. (2014). Cancer-secreted miR-105 destroys vascular endothelial barriers to promote metastasis. *Cancer Cell*,25(4):501-515.
- Zhou, J., Xu, T., Yan, Y., Qin, R., Wang, H., Zhang, X., Huang, Y., Wang, Y., Lu, Y., Fu, D., and Chen, J. (2013). MicroRNA-326 functions as a tumor suppressor in glioma by targeting the Nin one binding protein (NOB1). *PLoS One*,8(7):e68469.
- Zhou, W.B., Zhong, C.N., Luo, X.P., Zhang, Y.Y., Zhang, G.Y., Zhou, D.X. and Liu, L.P. (2016). miR-625 suppresses cell proliferation and migration by targeting HMGA1 in breast cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*,470(4):838-844.
- Zhu, C., Wang, Y., Kuai, W., Sun, X., Chen, H. and Hong, Z. (2013). Prognostic value of miR-29a expression in pediatric acute myeloid leukemia. *Clinical Biochemistry*,46(1-2):49-53.
- Zhou, Q., Li, M., Wang, X., Li, Q., Wang, T., Zhu, Q., Zhou, X., Wang, X., Gao, X. and Li, X. (2012). Immune-related microRNAs are abundant in breast milk exosomes. *International Journal of Biological Sciences*,8:118-123.

10. Přílohy

Tabulka 6. TaqMann Array karta A v2.1, část 1

	A	B	C	D	E	F	G	H	I
1	hsa-let-7a	hsa-miR-23a	hsa-miR-95	miR-130a	hsa-miR-148a	hsa-miR-195	hsa-miR-222	hsa-miR-335	hsa-miR-374b
2	hsa-let-7c	hsa-miR-23b	hsa-miR-96	hsa-miR-130b	hsa-miR-148b	hsa-miR-196b	hsa-miR-223	hsa-miR-337-5p	hsa-miR-375
3	hsa-let-7d	hsa-miR-24	hsa-miR-98	hsa-miR-132	hsa-miR-149	hsa-miR-197	hsa-miR-224	hsa-miR-338-3p	hsa-miR-376a
4	hsa-let-7e	hsa-miR-25	hsa-miR-99a	hsa-miR-133a	hsa-miR-150	hsa-miR-198	hsa-miR-296-3p	hsa-miR-339-3p	hsa-miR-376b
5	hsa-let-7f	hsa-miR-26a	hsa-miR-99b	hsa-miR-133b	hsa-miR-152	hsa-miR-199a-5p	hsa-miR-296-5p	hsa-miR-339-5p	hsa-miR-377
6	hsa-let-7g	hsa-miR-26b	hsa-miR-100	hsa-miR-134	hsa-miR-153	hsa-miR-199a-3p	hsa-miR-299-3p	hsa-miR-340	hsa-miR-379
7	hsa-miR-1	hsa-miR-27a	hsa-miR-101	hsa-miR-135a	hsa-miR-154	hsa-miR-199b-5p	hsa-miR-299-5p	hsa-miR-155	hsa-miR-380
8	hsa-miR-9	hsa-miR-27b	hsa-miR-103	hsa-miR-135b	hsa-miR-181a	hsa-miR-200a	hsa-miR-301a	hsa-miR-7b	hsa-miR-381
9	hsa-miR-10a	hsa-miR-28-3p	hsa-miR-105	hsa-miR-136	hsa-miR-181c	hsa-miR-200b	hsa-miR-301b	hsa-miR-342-3p	hsa-miR-382
10	hsa-miR-10b	hsa-miR-28-5p	hsa-miR-106a	hsa-miR-137	hsa-miR-182	hsa-miR-200c	hsa-miR-302a	hsa-miR-342-5p	hsa-miR-383
11	U6 snRNA	U6 snRNA	RNU44	hsa-miR-138	RNU48	hsa-miR-202	ath-miR-159a	hsa-miR-345	hsa-miR-409-5p
12	U6 snRNA	U6 snRNA	hsa-miR-106b	hsa-miR-139-3p	hsa-miR-183	hsa-miR-203	hsa-miR-302b	hsa-miR-361-5p	hsa-miR-410
13	hsa-miR-15a	hsa-miR-29a	hsa-miR-107	hsa-miR-139-5p	hsa-miR-184	hsa-miR-204	hsa-miR-302c	hsa-miR-362-3p	hsa-miR-411
14	hsa-miR-15b	hsa-miR-29b	hsa-miR-122	hsa-miR-140-3p	hsa-miR-185	hsa-miR-205	hsa-miR-320	hsa-miR-362-5p	hsa-miR-422a
15	hsa-miR-16	hsa-miR-29c	hsa-miR-124	hsa-miR-140-5p	hsa-miR-186	hsa-miR-208b	hsa-miR-323-3p	hsa-miR-363	hsa-miR-423-5p
16	hsa-miR-17	hsa-miR-30b	hsa-miR-125a-3p	hsa-miR-141	hsa-miR-187	hsa-miR-210	hsa-miR-324-3p	hsa-miR-365	hsa-miR-424
17	hsa-miR-18a	hsa-miR-30c	hsa-miR-125a-5p	hsa-miR-142-3p	hsa-miR-188-3p	hsa-miR-214	hsa-miR-324-5p	hsa-miR-367	hsa-miR-425
18	hsa-miR-18b	hsa-miR-31	hsa-miR-125b	hsa-miR-142-5p	hsa-miR-190	hsa-miR-215	hsa-miR-326	hsa-miR-369-3p	hsa-miR-429
19	hsa-miR-19a	hsa-miR-32	hsa-miR-126	hsa-miR-143	hsa-miR-191	hsa-miR-216a	hsa-miR-328	hsa-miR-369-5p	hsa-miR-431
20	hsa-miR-19b	hsa-miR-33b	hsa-miR-127-3p	hsa-miR-145	hsa-miR-192	hsa-miR-216b	hsa-miR-329	hsa-miR-370	hsa-miR-433
21	hsa-miR-20a	hsa-miR-34a	hsa-miR-127-5p	hsa-miR-146a	hsa-miR-193a-3p	hsa-miR-217	hsa-miR-330-3p	hsa-miR-371-3p	hsa-miR-449a
22	hsa-miR-20b	hsa-miR-34c-5p	hsa-miR-128	hsa-miR-146b-3p	hsa-miR-193a-5p	hsa-miR-218	hsa-miR-330-5p	hsa-miR-372	hsa-miR-449b
23	hsa-miR-21	hsa-miR-92a	hsa-miR-129-3p	hsa-miR-146b-5p	hsa-miR-193b	hsa-miR-219-5p	hsa-miR-331-3p	hsa-miR-373	hsa-miR-450a
24	hsa-miR-22	hsa-miR-93	hsa-miR-129-5p	hsa-miR-147b	hsa-miR-194	hsa-miR-221	hsa-miR-331-5p	hsa-miR-374a	hsa-miR-450b-3p

Tabulka 7. Taq Mann Array karta B v3, část 1

	A	B	C	D	E	F	G	H	I
1	dme-miR-7	hsa-miR-1238	hsa-miR-558	hsa-miR-626	hsa-miR-644	hsa-miR-668	hsa-miR-26a-2*	hsa-miR-101*	hsa-miR-933
2	hsa-miR-548l	hsa-miR-488	hsa-miR-559	hsa-miR-629	hsa-miR-645	hsa-miR-767-5p	hsa-miR-361-3p	hsa-miR-138-2*	hsa-miR-934
3	hsa-miR-30a-3p	hsa-miR-517*	hsa-miR-562	hsa-miR-630	hsa-miR-621	hsa-miR-767-3p	hsa-let-7g*	hsa-miR-141*	hsa-miR-935
4	hsa-miR-30a-5p	hsa-miR-516-3p	hsa-miR-563	hsa-miR-631	hsa-miR-646	hsa-miR-454*	hsa-miR-302b*	hsa-miR-143*	hsa-miR-936
5	hsa-miR-30d	hsa-miR-518c*	hsa-miR-564	hsa-miR-603	hsa-miR-647	hsa-miR-769-5p	hsa-miR-302d*	hsa-miR-144*	hsa-miR-937
6	hsa-miR-30e-3p	hsa-miR-519e*	hsa-miR-566	hsa-miR-604	hsa-miR-648	hsa-miR-770-5p	hsa-miR-367*	hsa-miR-145*	hsa-miR-938
7	hsa-miR-34b	hsa-miR-520h	hsa-miR-567	hsa-miR-605	hsa-miR-649	hsa-miR-769-3p	hsa-miR-374a*	hsa-miR-920	hsa-miR-939
8	hsa-miR-126*	hsa-miR-524	hsa-miR-569	hsa-miR-606	hsa-miR-650	hsa-miR-802	hsa-miR-23b*	hsa-miR-921	hsa-miR-941
9	hsa-miR-154*	mmu-let-7d*	hsa-miR-586	hsa-miR-607	hsa-miR-661	hsa-miR-675	hsa-miR-376a*	hsa-miR-922	hsa-miR-335*
10	hsa-miR-182*	hsa-miR-363*	hsa-miR-587	hsa-miR-608	hsa-miR-662	hsa-miR-505*	hsa-miR-377*	hsa-miR-924	hsa-miR-942
11	U6 snRNA	U6 snRNA	RNU44	hsa-miR-609	RNU48	hsa-miR-218-1*	ath-miR-159a	hsa-miR-337-3p	hsa-miR-943
12	U6 snRNA	U6 snRNA	hsa-miR-588	hsa-miR-633	hsa-miR-571	hsa-miR-221*	hsa-miR-30b*	hsa-miR-125b-2*	hsa-miR-944
13	hsa-miR-206	rno-miR-7*	hsa-miR-589	hsa-miR-634	hsa-miR-572	hsa-miR-222*	hsa-miR-122*	hsa-miR-135b*	hsa-miR-99b*
14	hsa-miR-213	hsa-miR-656	hsa-miR-550	hsa-miR-635	hsa-miR-635	hsa-miR-223*	hsa-miR-130a*	hsa-miR-148b*	hsa-miR-124*
15	hsa-miR-302c*	hsa-miR-549	hsa-miR-591	hsa-miR-637	hsa-miR-575	hsa-miR-136*	hsa-miR-132*	hsa-miR-146a*	hsa-miR-541*
16	hsa-miR-302d	hsa-miR-657	hsa-miR-592	hsa-miR-638	hsa-miR-578	hsa-miR-34b	hsa-miR-148a*	hsa-miR-149*	hsa-miR-875-5p
17	hsa-miR-378	hsa-miR-658	hsa-miR-593	hsa-miR-639	hsa-miR-580	hsa-miR-185*	hsa-miR-33a	hsa-miR-29b-1*	hsa-miR-888*
18	hsa-miR-380-5p	hsa-miR-659	hsa-miR-596	hsa-miR-640	hsa-miR-581	hsa-miR-186*	hsa-miR-33a*	hsa-miR-29b-2*	hsa-miR-892b
19	hsa-miR-1257	hsa-miR-551a	hsa-miR-622	hsa-miR-641	hsa-miR-583	hsa-miR-195*	hsa-miR-92a-1*	hsa-miR-105*	hsa-miR-9*
20	hsa-miR-200a*	hsa-miR-552	hsa-miR-599	hsa-miR-613	hsa-miR-584	hsa-miR-30c-1*	hsa-miR-92a-2*	hsa-miR-106a*	hsa-miR-411*
21	hsa-miR-432	hsa-miR-553	hsa-miR-623	hsa-miR-614	hsa-miR-585	hsa-miR-30c-2*	hsa-miR-93*	hsa-miR-16-2*	hsa-miR-378
22	hsa-miR-432*	hsa-miR-554	hsa-miR-600	hsa-miR-616	rno-miR-29c*	hsa-miR-32*	hsa-miR-96*	hsa-let-7i*	hsa-miR-151-3p
23	hsa-miR-497	hsa-miR-555	hsa-miR-624	hsa-miR-617	hsa-miR-766	hsa-miR-31*	hsa-miR-99a*	hsa-miR-15b*	hsa-miR-340*
24	hsa-miR-500	hsa-miR-557	hsa-miR-601	hsa-miR-643	hsa-miR-595	hsa-miR-130b*	hsa-miR-100*	hsa-miR-27b*	hsa-miR-190b

Taq Mann Array karta B v3, část 2

	J	K	L	M	N	O	P
1	hsa-miR-545*	hsa-miR-409-3p	hsa-miR-593	hsa-miR-620	hsa-miR-548J	hsa-miR-1200	hsa-miR-1304
2	hsa-miR-183*	hsa-miR-181c*	hsa-let-7f-1*	hsa-miR-577	hsa-miR-1263	hsa-miR-1182	hsa-miR-1203
3	hsa-miR-192*	hsa-miR-196*	hsa-let-7f-2*	hsa-miR-144	hsa-miR-1294	hsa-miR-1288	hsa-miR-1206
4	hsa-miR-200b*	hsa-miR-483-3p	hsa-miR-15a*	hsa-miR-590-3P	hsa-miR-1269	hsa-miR-1291	hsa-miR-548G
5	hsa-miR-200c*	hsa-miR-708*	hsa-miR-16-1*	hsa-miR-191*	hsa-miR-1265	hsa-miR-1275	hsa-miR-1208
6	hsa-miR-155*	hsa-miR-92b*	hsa-miR-17*	hsa-miR-665	hsa-miR-1244	hsa-miR-1183	hsa-miR-548E
7	hsa-miR-10a*	hsa-miR-551b*	hsa-miR-18a*	hsa-miR-520D-3P	hsa-miR-1303	hsa-miR-1184	hsa-miR-1274A
8	hsa-miR-214*	hsa-miR-202*	hsa-miR-19a*	hsa-miR-1224-3P	hsa-miR-1259	hsa-miR-1276	hsa-miR-1274B
9	hsa-miR-218-2*	hsa-miR-193b*	hsa-miR-19b-1*	hsa-miR-1305	hsa-miR-548P	hsa-miR-320B	hsa-miR-1267
10	hsa-miR-129*	hsa-miR-497*	hsa-miR-625*	hsa-miR-513C	hsa-miR-1264	hsa-miR-1272	hsa-miR-1250
11	hsa-miR-22*	hsa-miR-518e*	hsa-miR-628-3p	hsa-miR-513B	hsa-miR-1255B	hsa-miR-1180	hsa-miR-548N
12	hsa-miR-425*	hsa-miR-543	hsa-miR-20a*	hsa-miR-1226*	hsa-miR-1282	hsa-miR-1256	hsa-miR-1283
13	hsa-miR-30d*	hsa-miR-125b-1*	hsa-miR-21*	hsa-miR-1236	hsa-miR-1255A	hsa-miR-1278	hsa-miR-1247
14	hsa-let-7a*	hsa-miR-194*	hsa-miR-23a*	hsa-miR-1228*	hsa-miR-1270	hsa-miR-1262	hsa-miR-1253
15	hsa-miR-424*	hsa-miR-106b*	hsa-miR-24-1*	hsa-miR-1225-3P	hsa-miR-1197	hsa-miR-1243	hsa-miR-720
16	hsa-miR-18b*	hsa-miR-302a*	hsa-miR-24-2*	hsa-miR-1233	hsa-miR-1324	hsa-miR-663B	hsa-miR-1260
17	hsa-miR-20b*	hsa-miR-519b-3p	hsa-miR-25*	hsa-miR-1227	hsa-miR-548H	hsa-miR-1252	hsa-miR-664
18	hsa-miR-431*	hsa-miR-518f*	hsa-miR-26a-1*	hsa-miR-1286	hsa-miR-1254	hsa-miR-1298	hsa-miR-1302
19	hsa-miR-7-2*	hsa-miR-374b*	hsa-miR-26b*	hsa-miR-548M	hsa-miR-548K	hsa-miR-1290	hsa-miR-1300
20	hsa-miR-10b*	hsa-miR-520c-3p	hsa-miR-27a*	hsa-miR-1179	hsa-miR-1251	hsa-miR-1249	hsa-miR-1284
21	hsa-miR-34a*	hsa-let-7b*	hsa-miR-29a*	hsa-miR-1178	hsa-miR-1285	hsa-miR-1248	hsa-miR-548L
22	hsa-miR-181a-2*	hsa-let-7c*	hsa-miR-151-5P	hsa-miR-1205	hsa-miR-1245	hsa-miR-1289	hsa-miR-1293
23	hsa-miR-744*	hsa-let-7e*	hsa-miR-765	hsa-miR-1271	hsa-miR-1292	hsa-miR-1204	hsa-miR-1825
24	hsa-miR-452*	hsa-miR-550	hsa-miR-338-5P	hsa-miR-1201	hsa-miR	hsa-miR-1826	hsa-miR-1296