

# Patogeneze mnohočetného myelomu

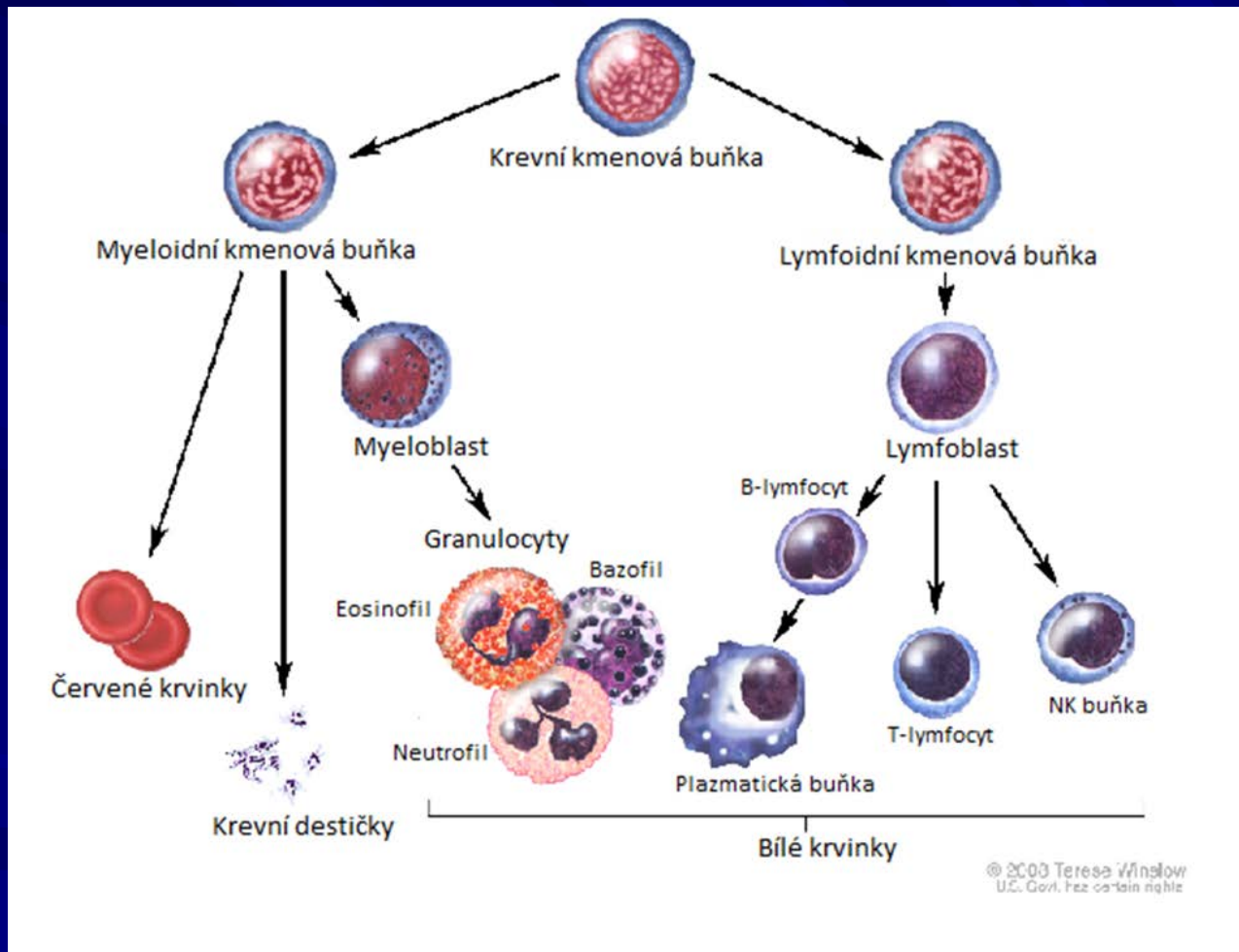
Doc. RNDr. Sabina Ševčíková, Ph.D.  
Babáková myelomová skupina  
ÚPF LF MU

# Monoklonální gamapatie

- Abnormální proteiny v séru nebo v moči
- Tyto proteiny jsou produkovány klonem plazmatických nebo lymfoidních buněk
  - MGUS
  - Mnohočetný myelom
  - Plasmocelulární leukémie
  - Primární amyloidóza
  - Solitární plasmocytom
  - Waldenströмова makroglobulinémie

World Health  
Organization  
Adam, 2011

# Hematopoéza



# Plazmatické buňky

- Druh bílých krvinek zodpovědných za tvorbu protilátek
- Obvykle 5% v kostní dřeni
- U MM nádorově změněny
- Vytvářejí monoklonální imunoglobulin = paraprotein

# Protilátky

- ❑ Rozeznat a zneškodnit cizí objekty v organismu.
- ❑ Eliminace daného patogenu
- ❑ Funkce: opsonizace (vede k fagocytoze), neutralizace, tvorba komplexů
- ❑ IgG, IgA, IgM, IgE a IgD

Protilátky třídy **IgG** jsou schopné pronikat do tkání a jako jediné během těhotenství prostupují placentou do těla plodu.

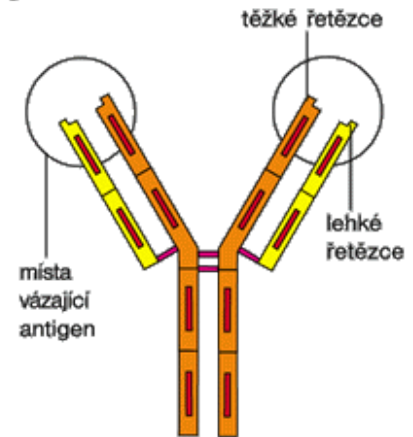
Protilátky třídy **IgA** vznikají hlavně ve sliznicích (střeva a dýchacích cest) a zabraňují průniku mikroorganismů do těla.

Protilátky třídy **IgM** se tvoří jako první během infekce. Zajišťují tak ochranu organismu během prvních dní, než se vytvoří ostatní typy protilátek.

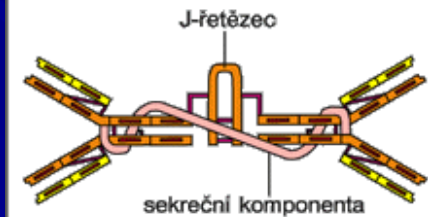
Protilátky třídy **IgE** se účastní hlavně při obraně proti cizorodým parazitům a účastní se alergických reakcí.

Funkce protilátek třídy **IgD** je stále nejasná.

IgG

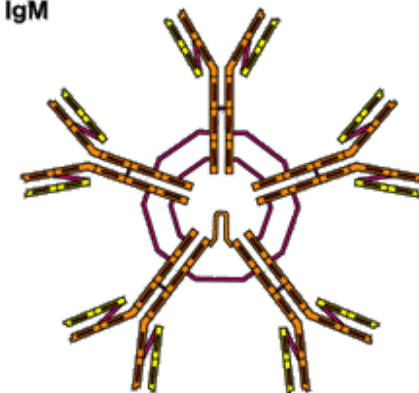


IgA



IgA se vyskytuje na sliznicích jako spojení 2 molekul protilátek. Spojeny jsou J-řetězcem, opatřeny jsou dále sekreční komponentou.

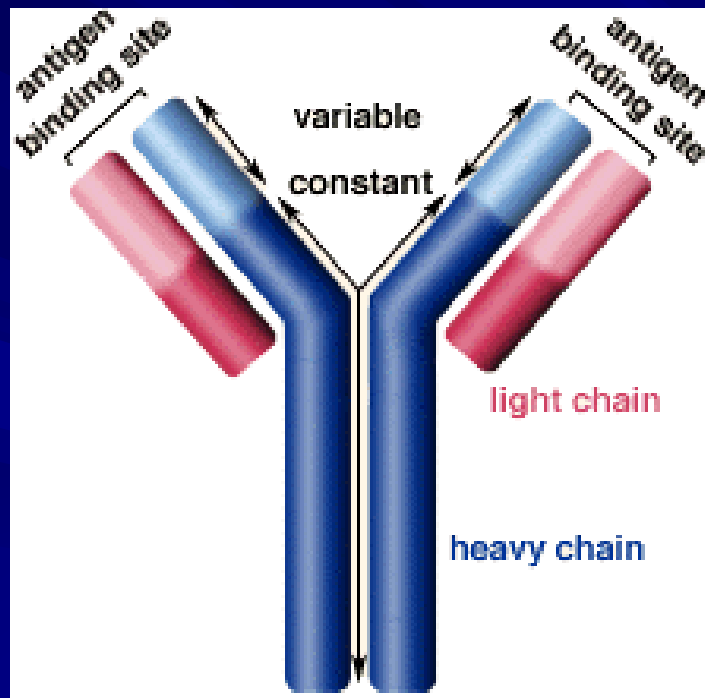
IgM



IgM se skládá z 5 molekul protilátek spojených dohromady. V průběhu infekce se tato protilátka tvoří jako první.



# Základní struktura imunoglobulinu



# MGUS

- Prekarcinóza
- V populaci nad 50 let: 3-4 %
- Riziko progresse do MM: 1 % ročně



# Mnohočetný myelom

- Druhé nejčastější krevní nádorové onemocnění
- 10 % hematologických malignit
- Věk při diagnóze 65 let
- Incidence 4/100 000
- Častější u mužů
- MGUS prekanceróza
- Infiltrace kostní dřeně PB
- Kostní léze
- Přítomnost M-Ig v séru a/nebo moči

Hájek, 2012  
Anderson, 2011

# PCL

- ❑ Nejagresivnější forma MG
- ❑ Incidence 0,04/100 000
- ❑ Více než 20 % cirkulujících plazmatických buněk a více než  $2 \times 10^9/L$
- ❑ Medián při diagnóze - 52 let
- ❑ Medián přežití 1,5 roku, ale i méně

# Primární amyloidóza

- Amyloidové depozity v orgánech
- Produkce abnormálních proteinových filament
- Raritní onemocnění
- Může doprovázet MM
- Přežití cca 40 měsíců

# Solitární plazmocytom

- Solitární leze abnormálních plazmatických buněk
- Bez postižení kostní dřeně
- Bez postižení skeletu nebo CRAB symptomy
- Riziko progresse do MM - 10 % za 3 roky

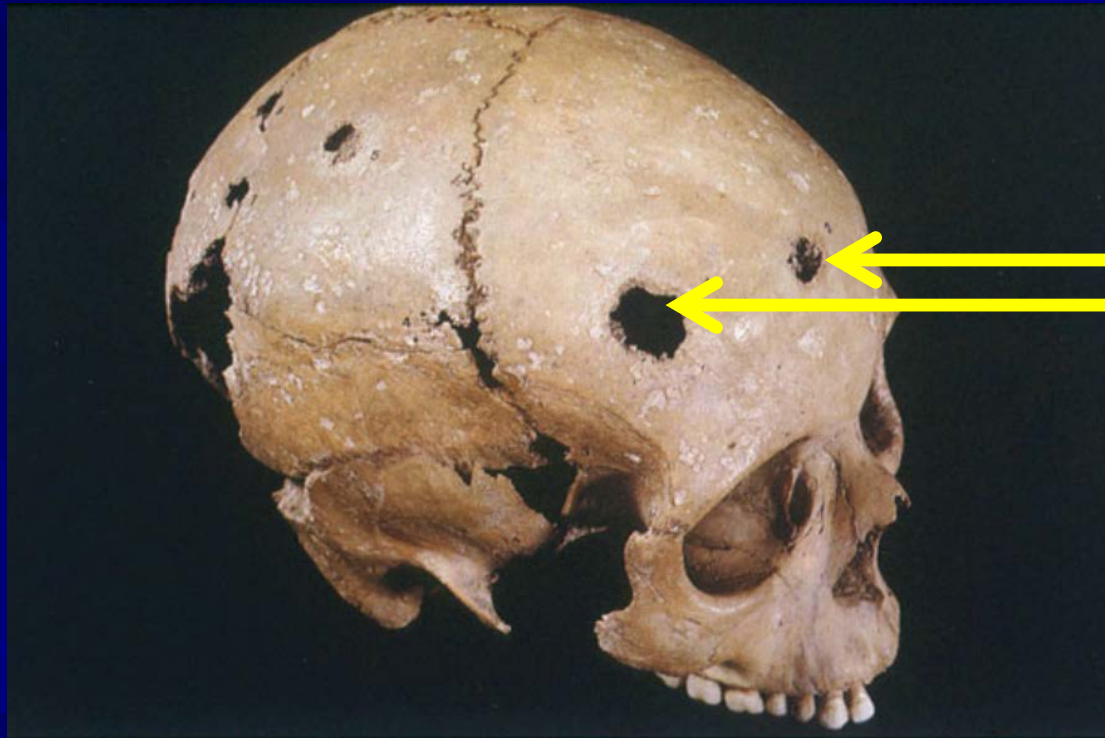
# Waldenstromova makroglobulinémie

- Postižení lymfocytoplazmoidních buněk (znaky plazmatických buněk ale i lymfoidních)
- Produkce velkého množství IgM
- Velice raritní

# Mnohočetný myelom

# Historie MM

Mužská lebka z doby bronzové s charakteristickými rysy mnohočetného myelomu



Capasso, 2005



# Historie MM

- 1844 - první zdokumentovaný případ - Sarah Newbury (Dr. Solly)



destrukce sterna

zlomeniny kostí

destrukce femuru

Kyle et Rajkumar, 2008

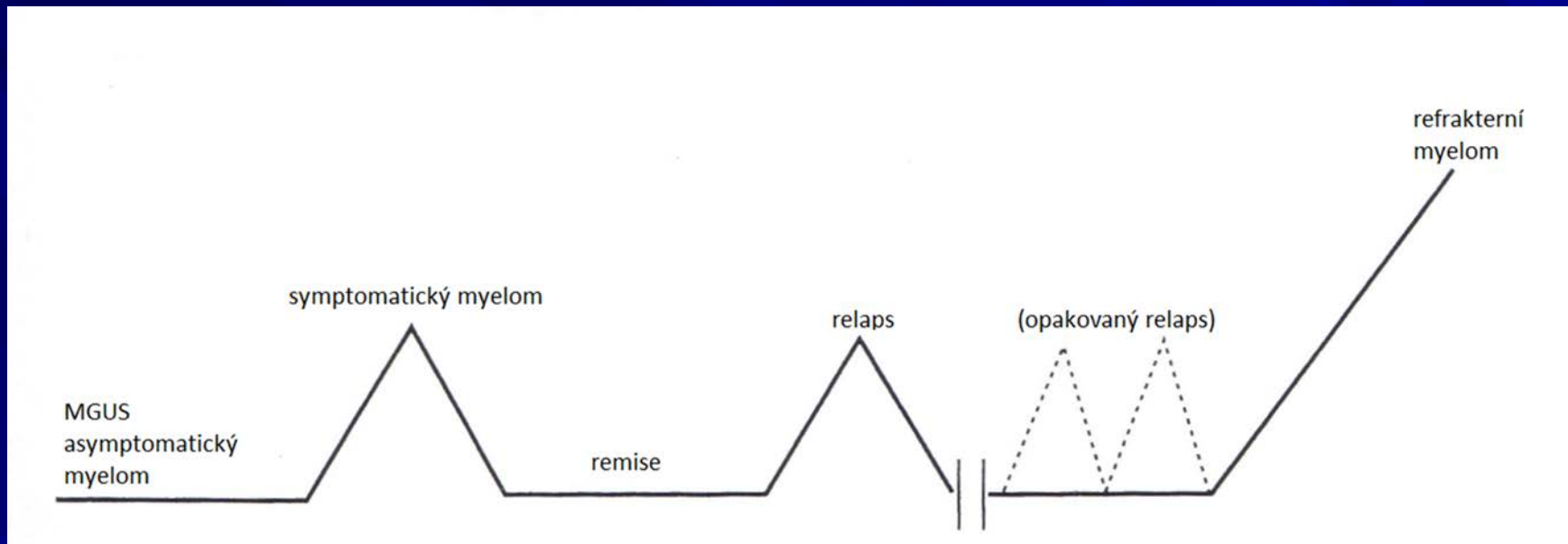
# Historie MM

- 1845 - přítomnost proteinu v moči pacienta (Bence Jones - Bence Jonesova bílkovina)
- Kahlerova choroba - podle pražského lékaře Otty Kahlera

Kyle et Rajkumar, 2008

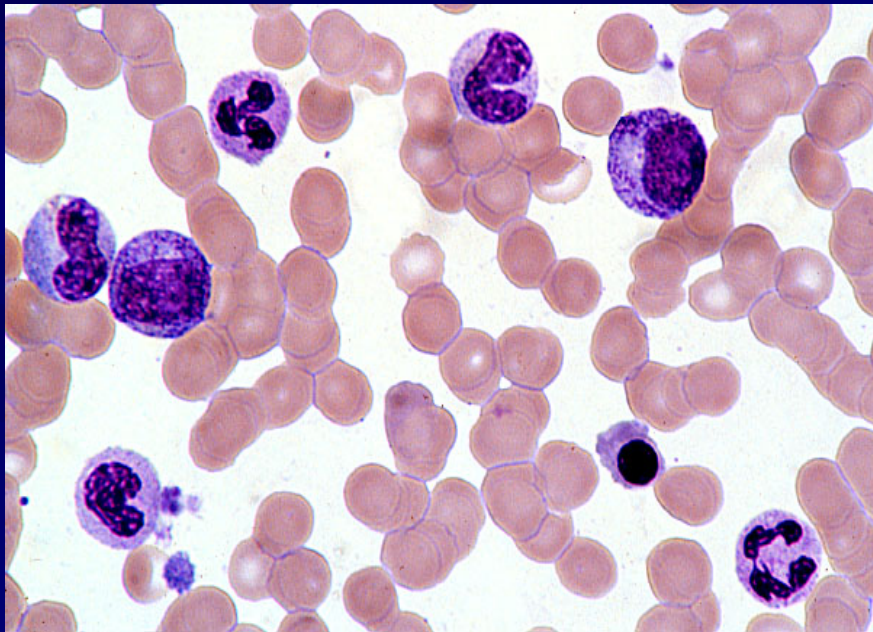
# Patogeneze MM

- Několikastupňový proces

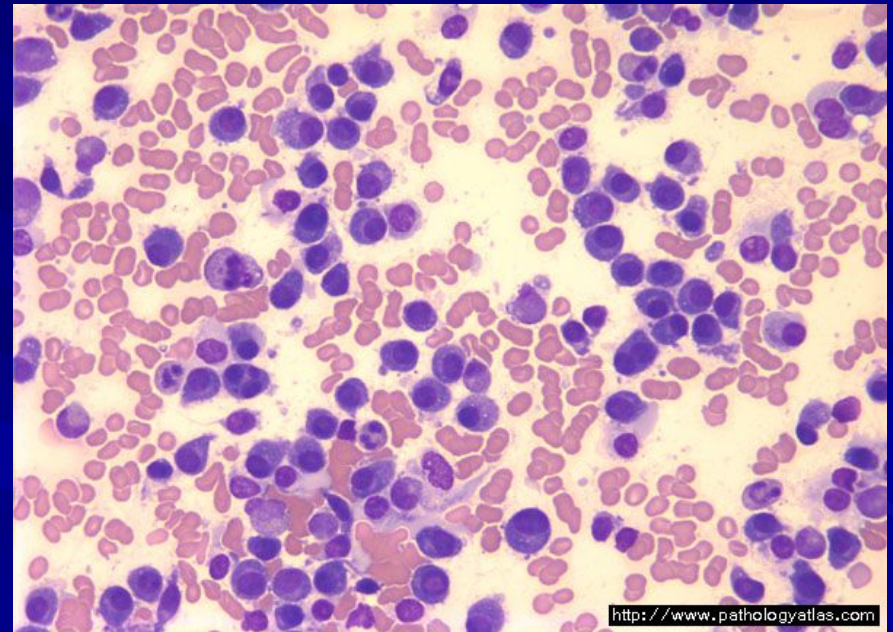


Špička, 2005

## Zdravá kostní dřeň



## MM kostní dřeň



[www.pathologyatlas.com](http://www.pathologyatlas.com)

# Mnohočetný myelom

klinická část

(doc Minařík FNOI)



# Příčiny MM

- Příčina není přesně známa
  - věkem podmíněný pokles imunity
  - nahromadění „nepříznivých vlivů“ v průběhu života
  - hormonální změny
  - vliv chemických látek
  - radiační záření
- → změny vedoucí k nestabilitě genetické výbavy plazmatických buněk
- Nejde o onemocnění nakažlivé ani přenosné

# Projevy

- 1) útlum kostní dřeně:
  - ↓ červených krvinek → anemie
  - ↓ bílých krvinek → pokles imunity
  - ↓ destiček → krvácivé projevy



# Projevy

- 2) Narušení kostní struktury: tvorba osteolytických ložisek:
  - oslabení pevnosti kostí
  - bolest, zduření kostí
  - samovolné zlomeniny kostí
  - vzestup vápníku v séru

# Projevy

- 3) Tvorba defektních imunoglobulinů - Ig (paraproteinu):
  - zhoršení vlastností krve - „hyperviskozita“
  - střádání paraproteinu v drobných cévách - porucha funkce orgánů (ledviny, porucha zraku, ...).
  - pokles imunity - paraprotein na úkor normálních Ig

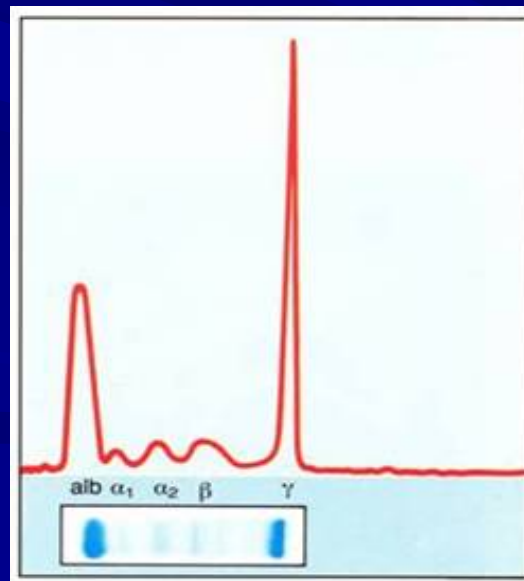
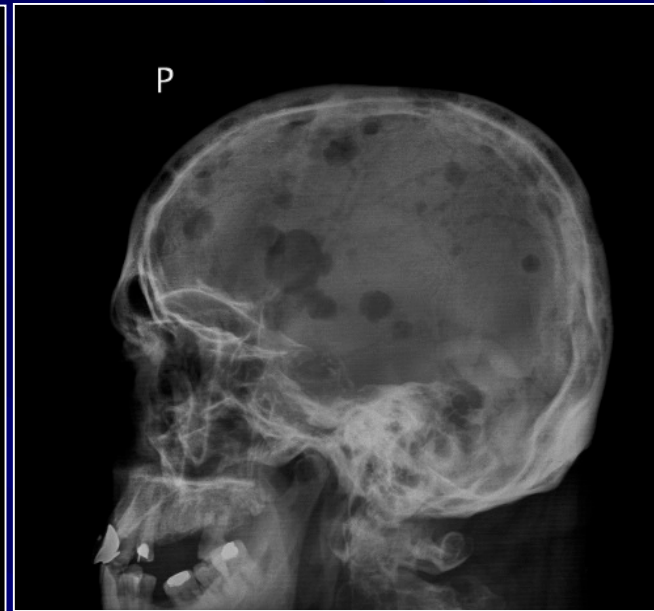
# Diagnóza

- Poměrně obtížná (bolest, slabost, nevykonnost, opakované infekce, únavový syndrom - časté příznaky „běžných“ onemocnění)
  
- 1) Počet myelomových buněk v kostní dřeni
- 2) Přítomnost abnormální bílkoviny v krvi/moči
- 3) Typické změny na kostech

# Vyšetřovací metody

- ❑ Rozbor krve a moči - elektroforéza (ELFO) analýza proteinového spektra
- ❑ Odběr a vyšetření kostní dřeně
- ❑ Rentgenové vyšetření rozsahu postižení, event. CT a MR, PET, kostní densitometrie

Nezřídka na MM upozorní ↑ sedimentace, změny v krevním obraze, vždy však nutno doplnit uvedená vyšetření.



# Vyšetřovací metody - obecné

- Škála doplňujících „nepřímých ukazatelů“:
  - Sedimentace
  - Krevní obraz
  - Hladina vápníku
  - Ledvinné funkce (urea, kreatinin)
  - Hodnoty normálních protilátek (imunoglobulinů)
  - Testy jaterních funkcí
  - Hodnocení kostního metabolismu

# Vyšetřovací metody - speciální

- ❑ Beta-2-mikroglobulin
- ❑ Cytogenetické vyšetření
- ❑ Imunofenotypizace povrchových znaků MM buněk
- ❑ Proliferační charakteristiky MM buněk
- ❑ Angiogenní cytokiny
- ❑ Vyšetření párů lehkých/těžkých řetězců
- ❑ Albumin
- ❑ ...+ nové systémy stážování



# Hodnocení závažnosti a průběh

- 3 stádia pokročilosti onemocnění
- I-III určují závažnost postižení organismu
- A/B normální/zhoršená funkce ledvin
  
- Průběh
- Rozmanitý, individuální
- Škála od „laboratorní formy nemoci“ po samovolné zlomeniny obratlů s útlakem míchy, selhání funkce ledvin, závažná infekční onemocnění, krvácivé stavy

# Léčba MM

- ❑ Pomerančová kůra, rebarbora a opiáty
- ❑ Chemoterapie
- ❑ Transplantace
- ❑ Imunomodulační léky
- ❑ Inhibitory proteasomu

Hájek, 2012  
Anderson, 2011

# Prognóza MM

- Neléčení pacienti přežívají 14 měsíců
- Standardní terapie 3-4 roky
- Transplantace 6-7 let
- Nové léky 5-leté přežití pro cca 80 % pacientů

Hájek, 2012

# Chemoterapie a transplantace

- Používaná i dnes
- Léčebný program Junior-Senior
- Melfalan
  - Alkylační cytostatikum
- Prednison
  - Glukokortikoid - apoptóza hematologických buněk
  
- Transplantace od roku 1957
  - Autologní - do 65 let, i tandemově
  - Allogenní - omezeně, jen v rámci klinických studií

Hájek, 2012  
Anderson, 2011

# Možnosti léčby MM

- IMiDs
- Proteasomové inhibitory

# Možnosti léčby MM

- **IMiDs**
- Proteasomové inhibitory

# Thalidomid

- ❑ 1953- Chemie Grünenthal
- ❑ 1957- distribuce
- ❑ Sedativum, hypnotikum
- ❑ Proti ranní nevolnosti u těhotných
- ❑ Těžký teratogen
- ❑ Nebyl dostatečně otestován
- ❑ Zhruba 10 000 dětí takto narozených - zhruba 40% dětí přežilo
- ❑ FDA - Dr. Francis Kelsey



White House Archive

Sedlaříková, 2012



# Thalidomid

- 1964 - Jason Sheskin - pacient s leprou a těžkými komplikacemi
- 1993- Judah Folkman - angiogeneze, solidní nádory ale i hematologické
- 1994 - refrakterní MM pacient - thalidomid - klinická studie 1/3 pacientů odpověď
- 2006 - FDA - léčba MM
- Nepříjemné vedlejší účinky - neuropatie

Sedlaříková, 2012

# IMiDs imunomodulační léky

- Analogy thalidomidu - lenalidomid a pomalidomid
- Významný posun v léčbě MM
- Pleiotropní účinky proti MM:
  - Kostimulace T-lymfocytů
  - Antiangiogenní účinky
  - Protizánětlivé účinky
  - Inhibice osteoklastů
  - Apoptóza a zástava BC MM
  - Inhibice interakcí mezi buňkami MM a buňkami KD

Sedlaříková, 2012

# Možnosti léčby MM

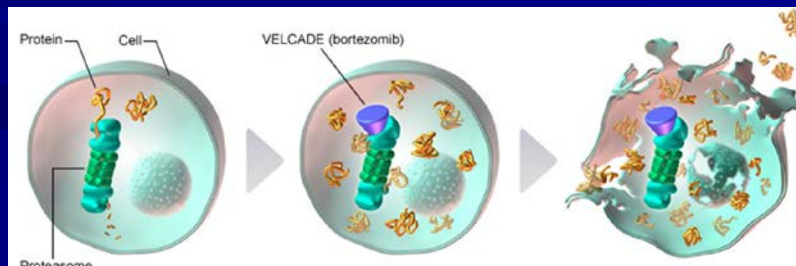
- IMiDs
- Proteasomové inhibitory

# Možnosti léčby MM

- IMiDs
- Proteasomové inhibitory

# Inhibitory proteasomu

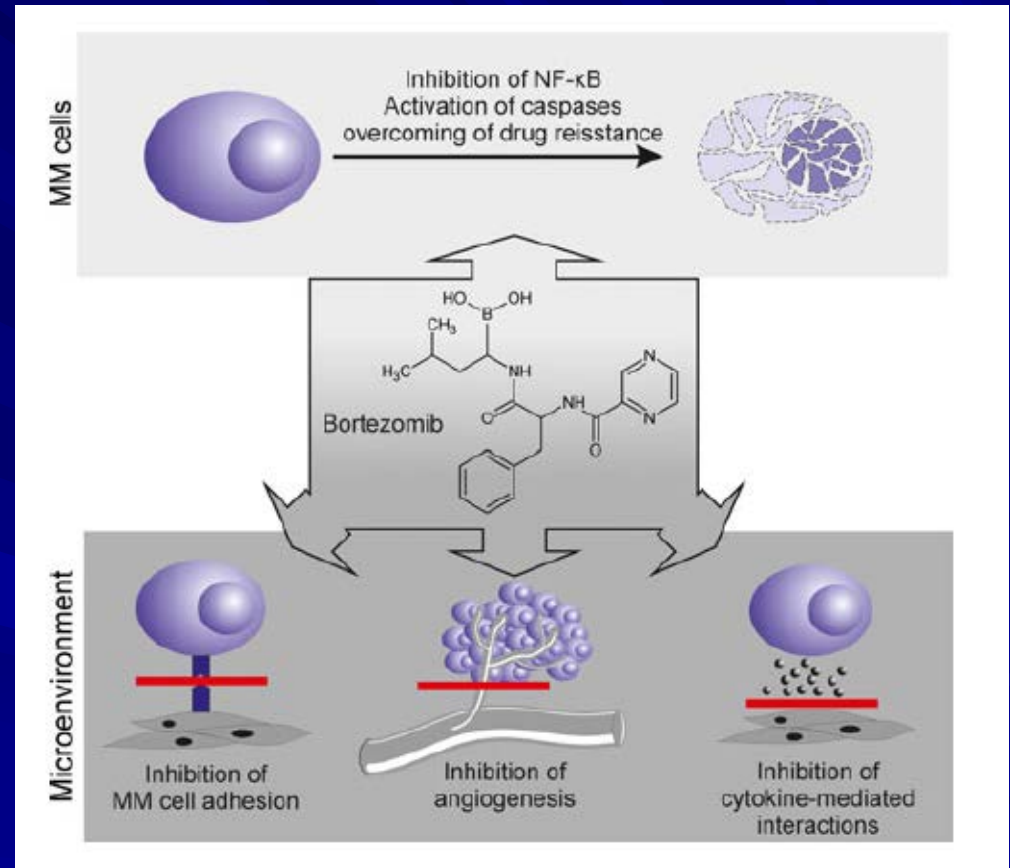
- Úspěšná léčebná strategie MM posledních 10 let
- Nádorové buňky citlivější k inhibici proteasomu
  - Zvýšená proliferace
  - Zvýšené nároky na syntézu proteinů a jejich degradaci
- Ovlivňují:
  - Expresi transkripčního faktoru NF- $\kappa$ B
  - Zástavu buněčného cyklu
  - Indukci apoptózy preferenčně u MM buněk
  - Indukují ER stresové odpovědi



Kubiczková, 2014

# Efekt inhibitorů proteasomu na mikroprostředí KD

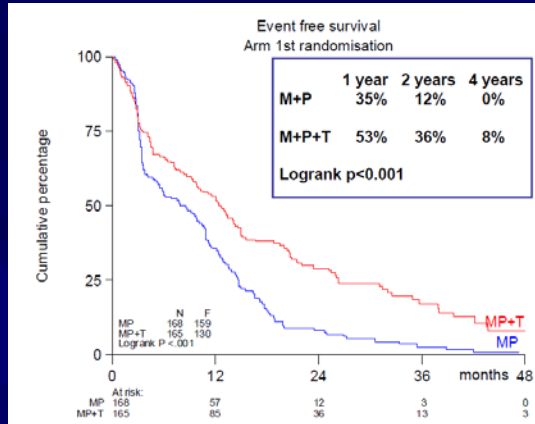
- Vliv na přežití
- Cílí signální dráhy vedoucí k apoptóze
- Inhibují adhezi buněk MM a mikroprostředí KD, angiogenezi a interakce zprostředkované cytokiny



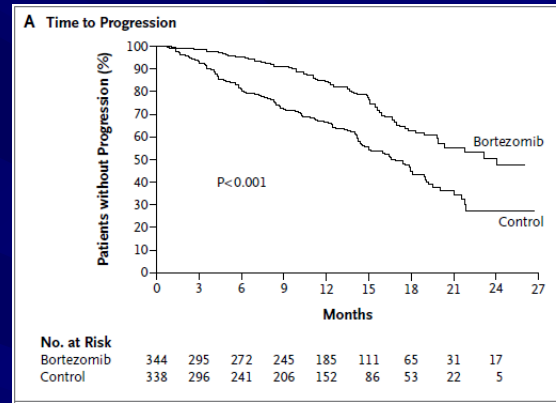
Kubiczková, 2014



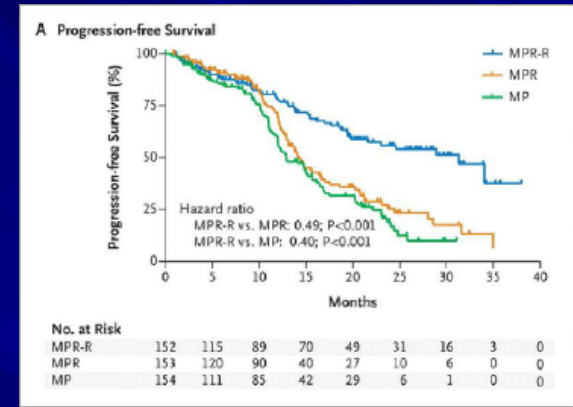
# Nové léky prodlužují přežití, ale ne k vyléčení



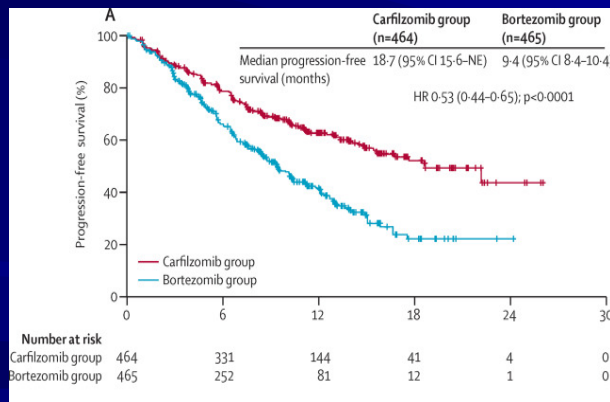
Thalidomid (Myrin)



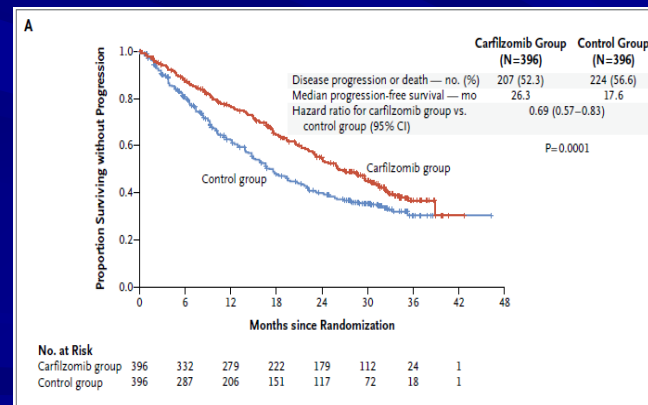
Bortezomib (Velcade)



Lenalidomid (Revlimid)



Carfilzomib > Bortezomib



Carfilzomib+Revlimid > Revlimid



# Nové léky = nová naděje

- Nové inhibitory proteasomu:
  - carfilzomib (Kyprolis)
  - ixazomib (Ninlaro)
- Monoklonální protilátky:
  - daratumumab (Darzalex)
  - elotuzumab (Empliciti)
- Perspektivy pro nové nemocné:
  - časnější diagnostika → časnější léčba (před vznikem komplikací - kritéria z roku 2014)
  - kombinace nových léků

# Co lze koupit za 1 rok léčby:



Myrin



Velcade/  
Bortezomib



Revlimid



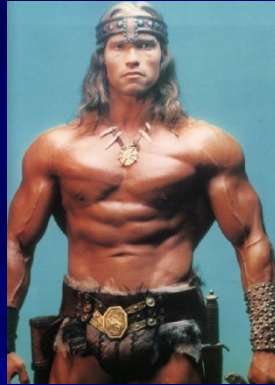
Imnovid

# Rozdíly v léčbě

ostatní

MM

Před léčbou



Léčba



Po léčbě



# Mnohočetný myelom

## molekulární část

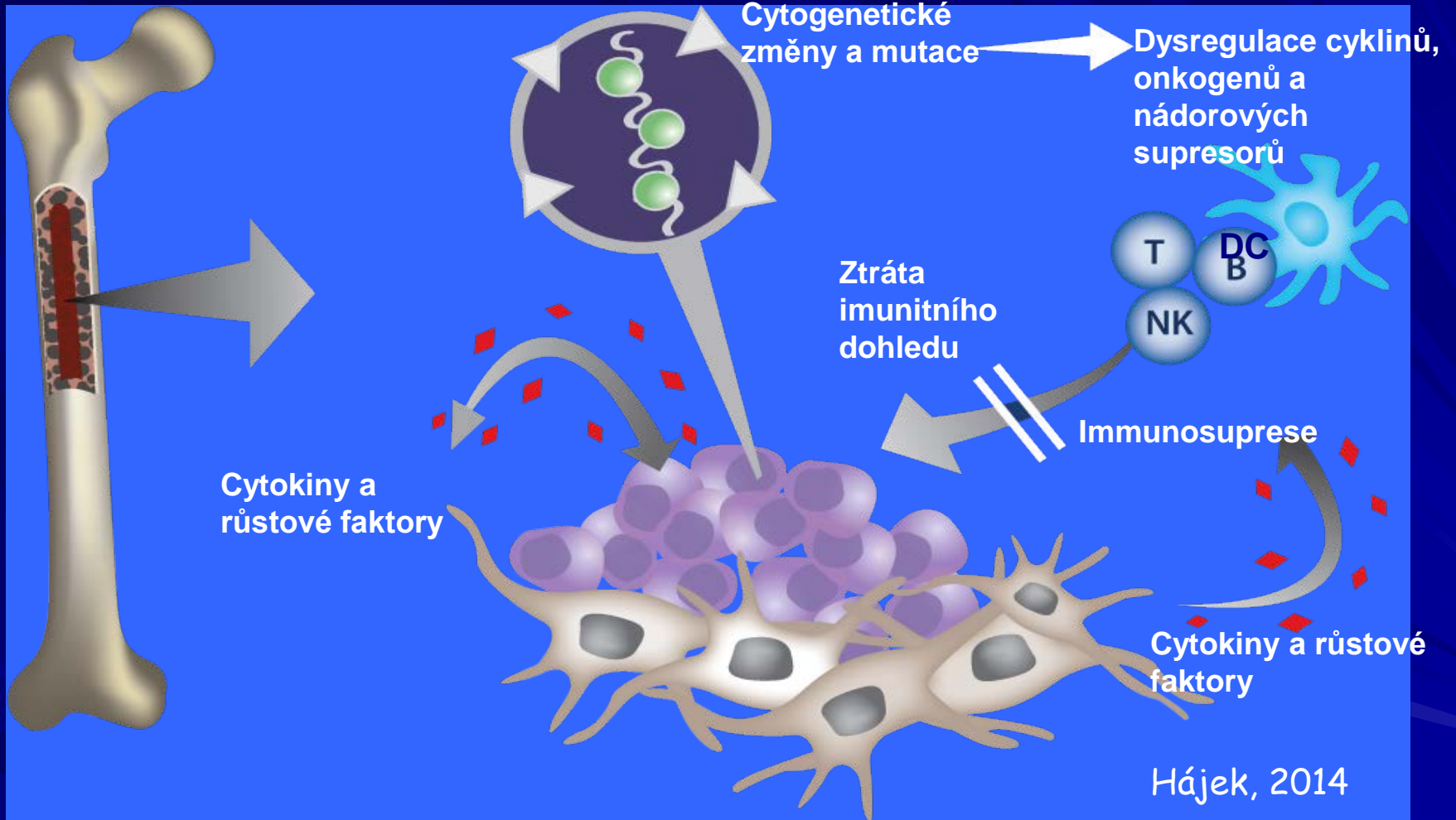
# Patogeneze MM

- Zatím neznámá
- Genetické predispozice - příbuzní až 6x vyšší riziko
- Expozice - pesticidy, herbicidy, ionizující záření
  
- Mutace v PB
- Změny v mikroprostředí KD - podpora růstu PB

Hájek, 2012  
Anderson, 2011



# Patogeneze MM



# Flowcytometrie

- Diagnóza MM - CD19<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>CD138<sup>+</sup>
- Riziko progresu MGUS (% klonálních PB)
- Detekce MRD - vyšší PFS i OS u pacientů s MRD<sup>-</sup>

Hájek, 2012  
Anderson, 2011  
Říhová, 2013



# Cytogenetické aberace u MM

- Nestabilní genom - delece, amplifikace, translokace
- Změny se kumulují v čase
- Numerické a strukturní změny chromozomů
- Aneuploidie lichých chromozomů a translokace lokusu pro IgH

Palumbo, 2013  
Anderson, 2011  
Kuglík, 2012  
Němec, 2012

# Numerické aberace u MM

- Non-hyperdiploidní (48 < >74 chr.) x hyperdiploidní (48-74 chr.)
- Hyperdiploidní:
  - trisomie chromozomů - 3,5,7,9,11,15,19,21 - lepší prognóza
- Non-hyperdiploidní:
  - monosomie 8,13,14,16,17,22

Palumbo, 2013  
Anderson, 2011  
Kuglík, 2012  
Němec, 2012

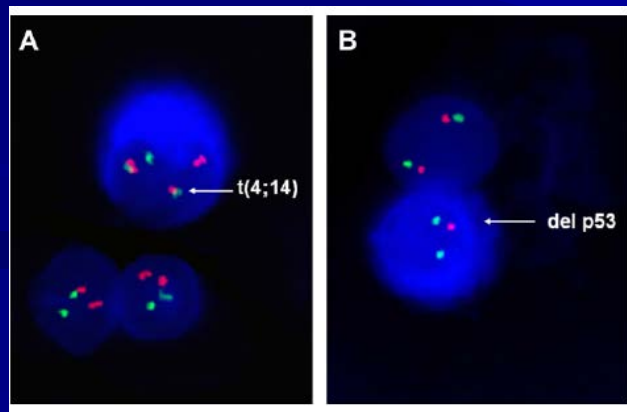
# Strukturní aberace u MM

- Translokace lokusu 14q32 (IgH)
- Primární změny:
  - t(11;14) 15-20 % cyklin D1
  - t(4;14) 10-15 % FGFR3/MMSET
  - t(14;16) 2-10 % c-MAF
  - t(6;14) 5 % cyklin D3
- Sekundární změny:
  - Komplexní karyotypové změny v oblasti MYC
  - Delece nebo duplikace chr. 1 (1q21)
  - Delece nebo monozomie chr.13
  - Delece chr. 17 - delece TP53

Palumbo, 2013  
Anderson, 2011  
Kuglík, 2012  
Němec, 2012

# FISH

- Většina MM buněk zastavený cyklus - není možné použít klasickou cytogenetiku
- i-FISH - výrazně lepší výsledky
- Spojení s prognózou pacientů - t(4;14), t(14;16), t(14;20) a del (17p) - špatná prognóza



Kuglík, 2012  
Němec, 2012  
Bešše, 2015

# Vyšetření

- ❑ Nutná vyšetření kostní dřeně
- ❑ Bolestivé, eticky nemožné opakovat tak často, jak by bylo potřeba
- ❑ Potřeba nového markeru? Jiný způsob?

# Používané markery

- Diagnostické
- Prognostické - faktory ovlivňující přežití pacientů
  - Věk
  - Nádor - proliferační index, genetické aberace
  - Staging nádoru
- Prediktivní - poskytne informaci o účinnosti konkrétní léčby a pravděpodobnost odpovědi na léčbu
  - dávka je ovlivněna renální funkcí a věkem

Chng, 2014

# Dobrý marker musí být

- ❑ Snadno dostupný
- ❑ Minimálně invazivní
- ❑ Stabilní
- ❑ Snadno měřitelný
- ❑ Dostatečně sensitivní a specifický
- ❑ Reproducibilní mezi laboratořemi
- ❑ Použitelný pro všechny nebo většinu pacientů
  
- ❑ Zaměřili jsme se na tzv. tekuté biopsie



# Proč se zajímat o tekuté biopsie?

# Limitace klasické biopsie

- Invazivní
- Bolestivá
- Odběr jedné oblasti nádoru - není reprezentována celá jeho heterogenita
- Zejména u MM - přítomnost subklonů v různých fokálních ložiscích

# Tekuté biopsie

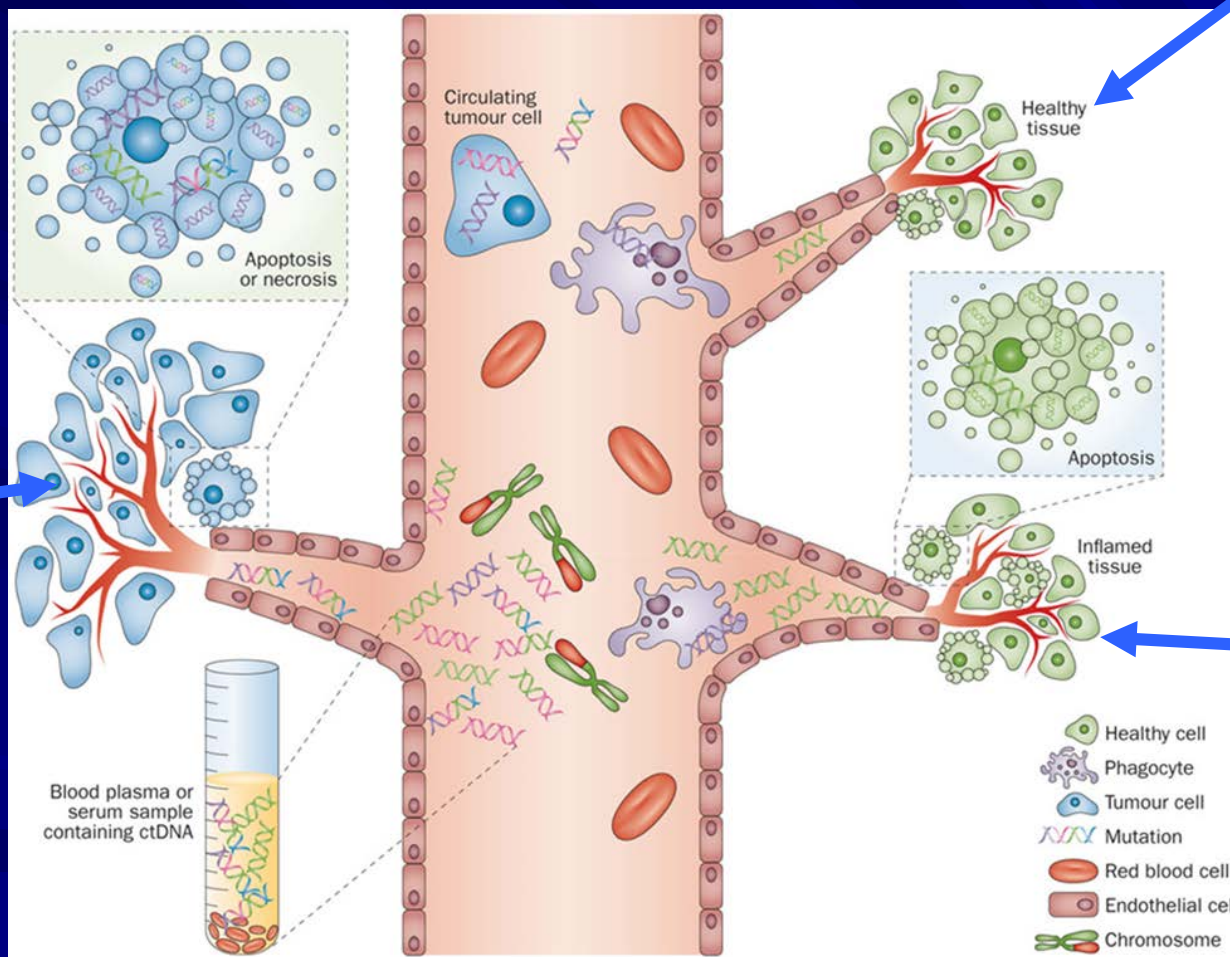
- ❑ Biopsie z periferní krve
- ❑ Detekce cirkulujících nádorových buněk
- ❑ Detekce cirkulujících nukleových kyselin
- ❑ Jednodušší odběr vzorku
- ❑ Celá heterogenita nádoru

# Tekuté biopsie

zdravá tkáň

nádor

záněť

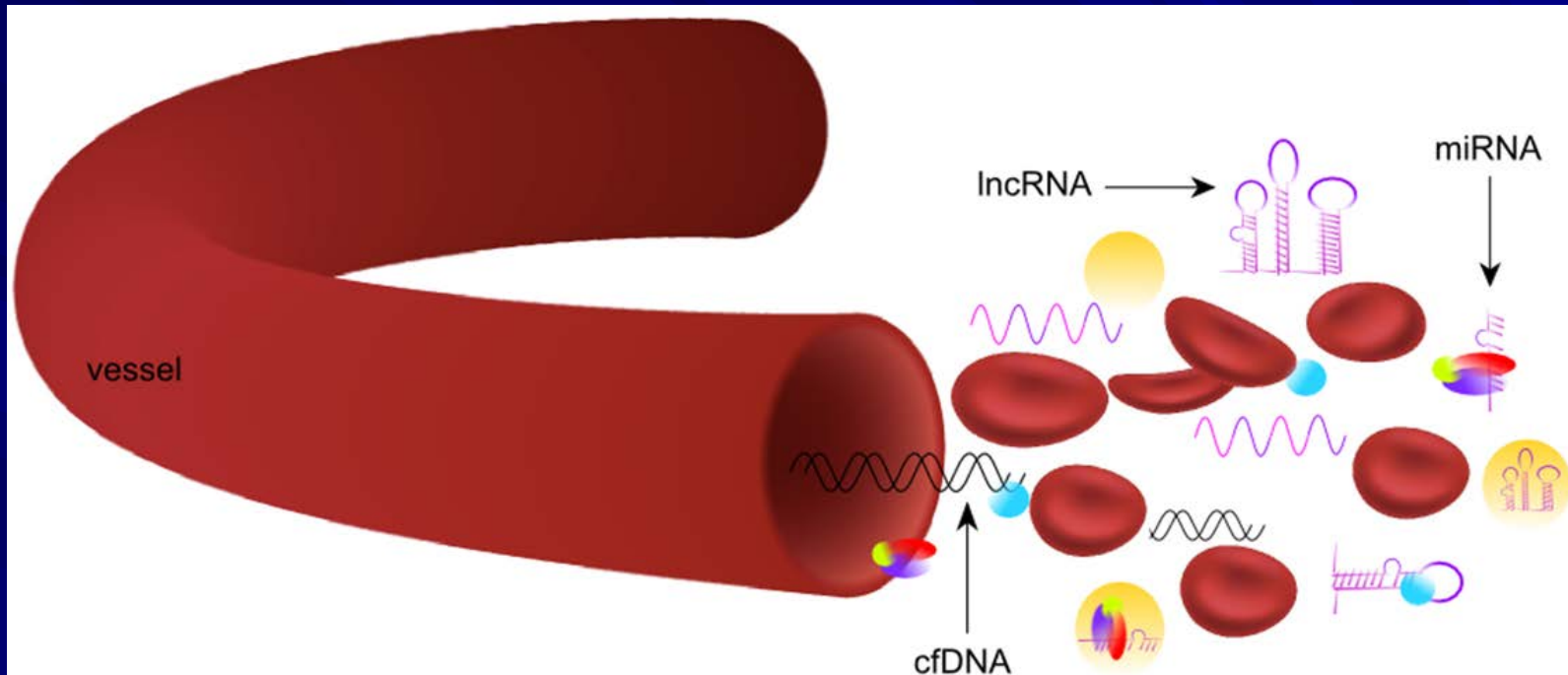


Crowley et al 2013

# Cirkulující PC (cPC)

- ❑ Prognostický marker
- ❑ Ztráta závislosti na mikroprostředí KD
- ❑ Změny exprese adhezivních molekul, chemokinů ale i počtu aberací
- ❑ Rychlejší progresse MGUS do MM
- ❑ U MM - vyšší infiltrace KD
- ❑ Negativní prognostický faktor u refrakterního MM
- ❑ Granell et al - 428 MM pts
- ❑ 5-20 % cPC - horší přežití bez ohledu na věk
- ❑ > 5 % cPC - prognóza jako PCL

# Jaké molekuly lze analyzovat?

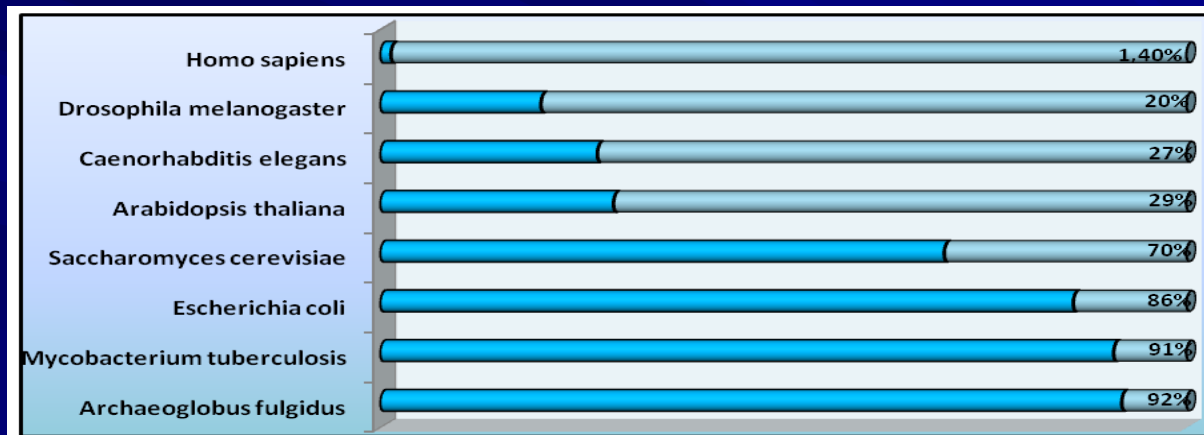


KO supplementum 2017



# Nekódující molekuly RNA ?

- Jen zhruba 1,5 % lidského genomu kóduje proteiny
- Více než 90 % je ale transkripčně aktivní
- Nejznámější nekódující RNA (ncRNA): rRNA, tRNA



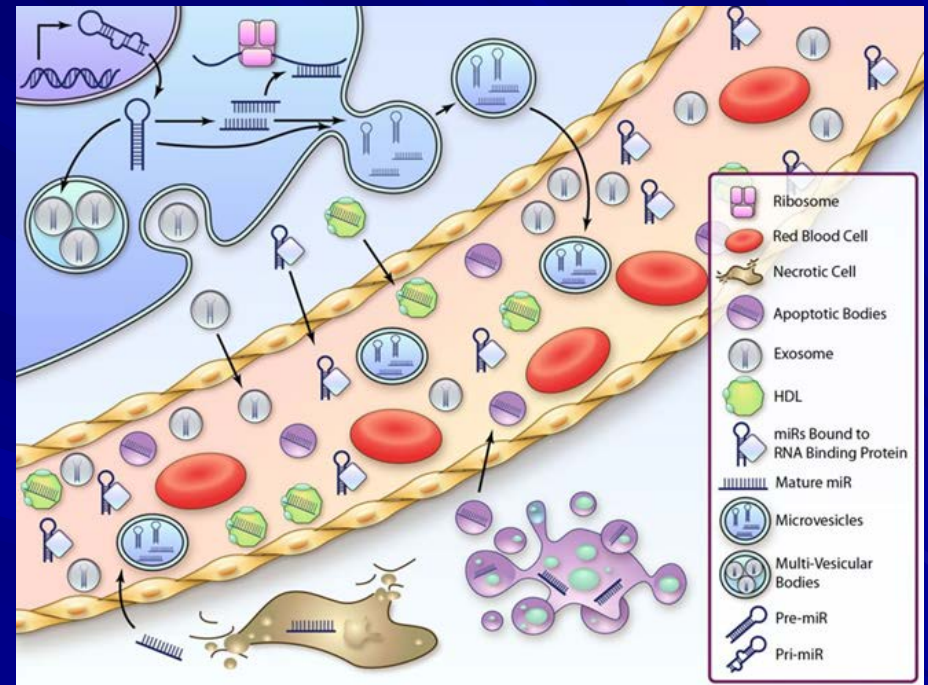
(Sana, 2012; upraveno)

- Základní rozdělení ncRNA:
  - Krátké ncRNA < **200 bp** < Dlouhé ncRNA



# Cirkulující ncRNA

- Tělní tekutiny
- Stabilní a odolné k účinkům RNáz
- Snadno dostupné
- Mezibuněčná komunikace
- Souvislost s nemocí
  - Diagnostika nemoci
  - Monitorování relapsu
  - Monitorování MRD



<http://circresearch.com/gallery/tag/circulating-mirna/>

# Nové markery pro MM

- MikroRNA
- Cell-free DNA
- LncRNA

# Nové markery pro MM

- MikroRNA
- Cell-free DNA
- LncRNA

# mikroRNA

- Krátké nekódující molekuly RNA
- 20-22 nt dlouhé
- Post-transkripční regulace genové exprese
- Fyziologické procesy (proliferace, diferenciace...)
- Tumorigeneze

Lee, 1993  
Calin, 2002

# Historie miRNA

- Identifikovány v roce 1993 u *C. elegans*
- Lin-4 - larvální stádia *C. elegans*
- Zhruba 1/3 lidských genů je regulována miRNA
- Kolem 2200 lidských miRNA

Lee, 1993  
Calin, 2002

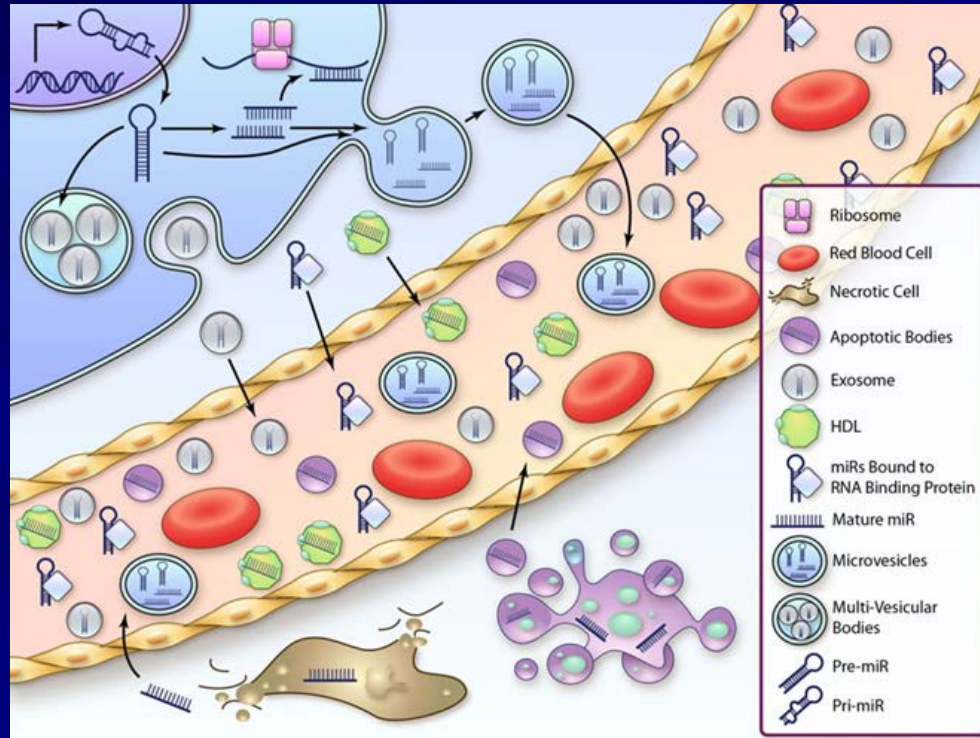
# miRNA u hematologických malignit

- miR-15a a miR-16 identifikovány v oblasti 13q14 - potenciální onkogeny u CLL
- Expresní profily miRNA u buněčných liniích, PB ve srovnání se zdravými dárce
- První publikace Picchiori
  - 48 miRNA se změněnou expresí u MGUS proti ZD
  - 96 miRNA se změněnou expresí mezi MM a MGUS

Calin, 2002  
Masri, 2005  
Picchiori, 2008



# Cirkulující miRNA



<http://circresearch.com/gallery/tag/circulating-mirna/>

# Exozomy

- 50-140 nm vezikuly
- Proteiny, NK
- Aktivní sekrece z buněk
- Mění genovou expresi, signalizaci v buňkách
- Udržují resistenci k chemoterapii (odvádějí chemo mimo buňku)
- Podporují tumorigenezi - předávání miRNA



# Cirkulující miRNA u MM

- Jones et al, 2012
- Cirkulující miRNA v séru MM pacientů vs MGUS vs ZD
- Potenciální biomarkery u MM: miR-720, miR-1246 a miR-1308

Jones, 2012

# Exozomálních miRNA u MM jako prognostické faktory

- miRNA nejvíce zastoupená skupina molekul v exozomech (procesovat premiRNA na miRNA)
- 156 MM pacientů při diagnóze sekvenací i qPCR
- let-7b, miR-155, miR-18a - PFS
- let-7b and miR-18a - OS

Manier et al 2016

# Naše pilotní studie

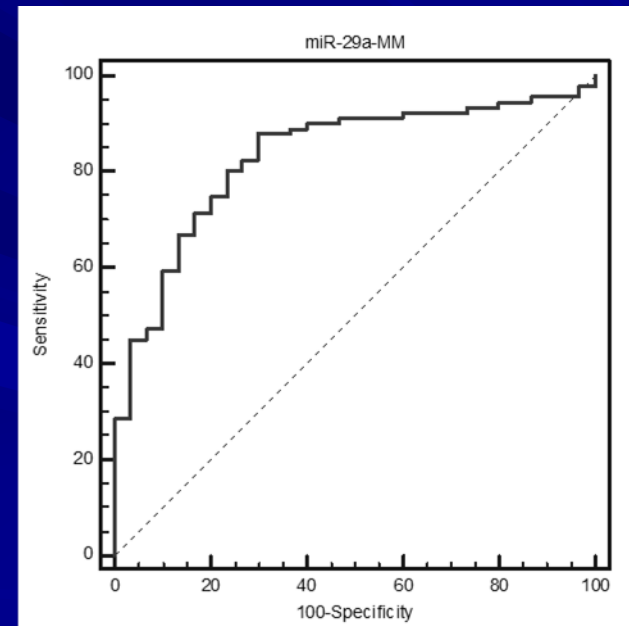
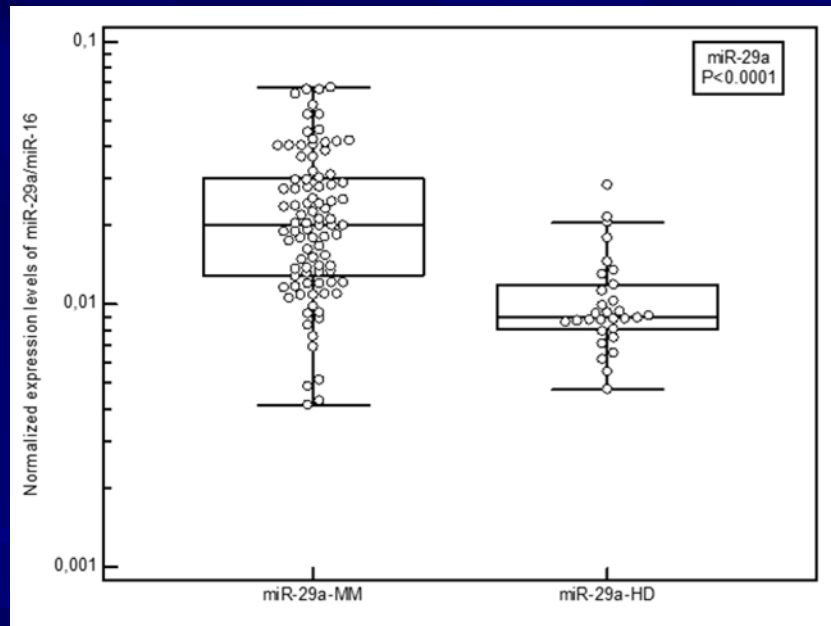
- Vybrány 4 miRNA v souvislosti s patogenezí MM
- Jejich přítomnost ověřena v séru 91 MM pacientů
  - **miR-410** - lokus 14q32 - MM translokace
  - **miR-660** - aberantní exprese spojená s MM
  - **miR-142-5p** - aberantní exprese spojená s MGUS a MM
  - **miR-29a** - zvýšená exprese u MM PB

Ševčíková, 2012



# Výsledky pilotní studie

- miR-29a zvýšena u MM
- Specificita 70 %, sensitivita 88 %, AUC=0,832



Ševčíková, 2012



# Cirkulující miRNA jako MG markery

- MM, MGUS a ZD
- 103 MM při diagnóze
- 18 MM v relapsu
- 57 MGUS
- 30 ZD

Kubiczková, 2014

# Metody

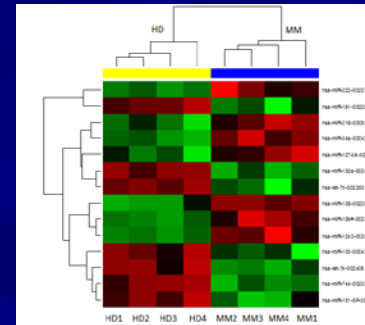
Izolace miRNA



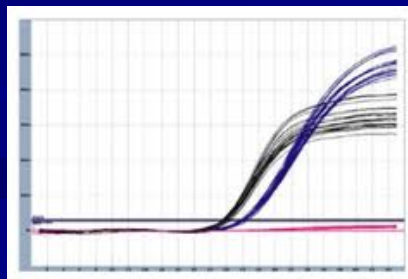
TaqMan Low Density Arrays



Analýza rozdílně exprimovaných miRNA

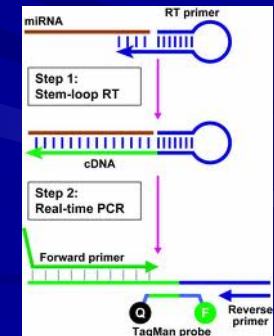
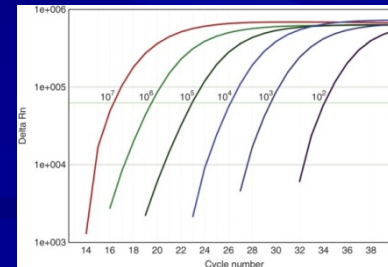


Analýza dat



Korelace s klinicky významnými parametry

qPCR Specific TaqMan miRNA assays

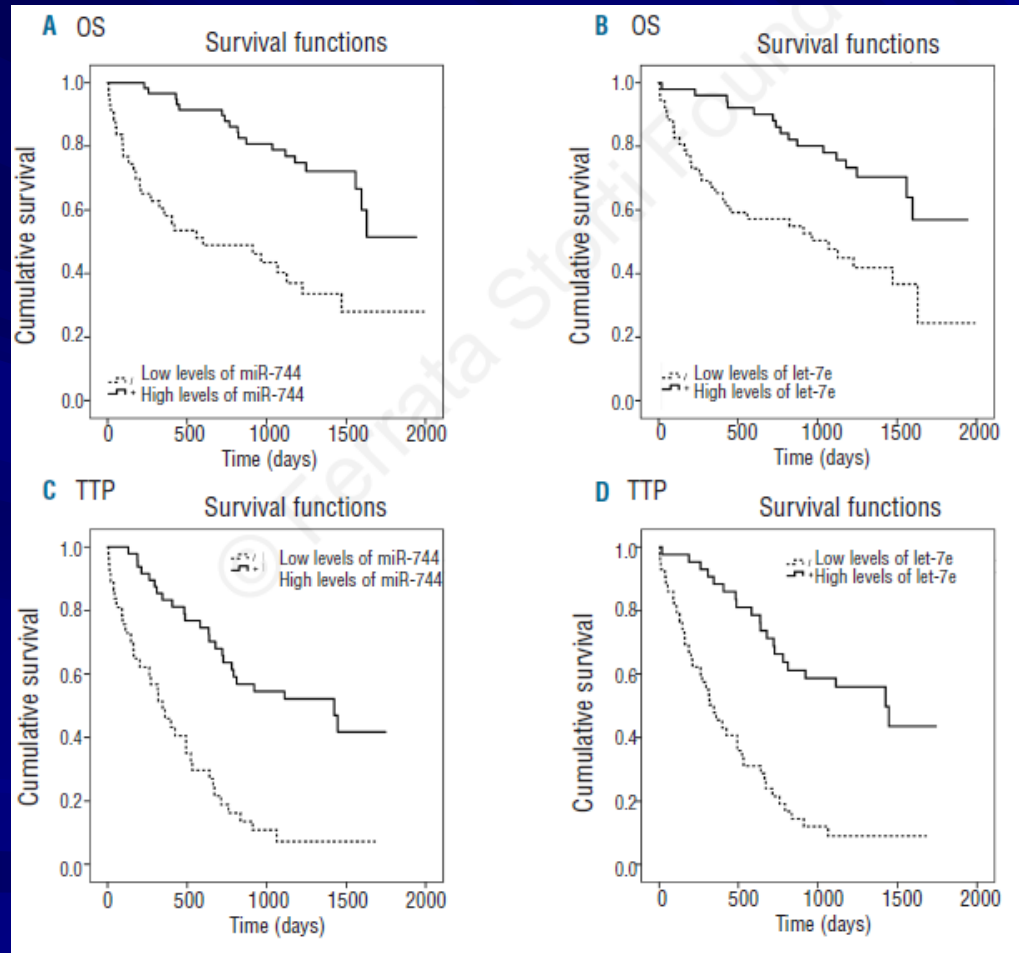


# Cirkulující miRNA jako MG markery

- miR-744, miR-130a, miR-34a, let-7d, let-7e deregulovány u MG pacientů ve srovnání se ZD
- Kombinace miR-34a a let-7e: MM vs ZD vs MGUS (sensitivita i specificita > 89 %), ale nejsou samostatné prognostické markery
- Nemí korelace s PB v KD - jiné patologické změny u MM

Kubiczková, 2014

# Nízké hladiny miR-744 a let-7e spojeny s kratším přežitím



Kubiczková, 2014

# Extramedulární relaps

- Poprvé publikován v roce 1948
- PB mimo kostní dřeň
- Sekundární mutace - PB nezávislé na mikroprostředí
- Primární vs sekundární EM
- Spojený s kostí nebo infiltrace do měkkých tkání
- Zvýšená incidence?
  - Nové léky ovlivňují mikroprostředí kostní dřeně
  - Lepší detekce PET/CT

Usmani, 2013  
Pour, 2014

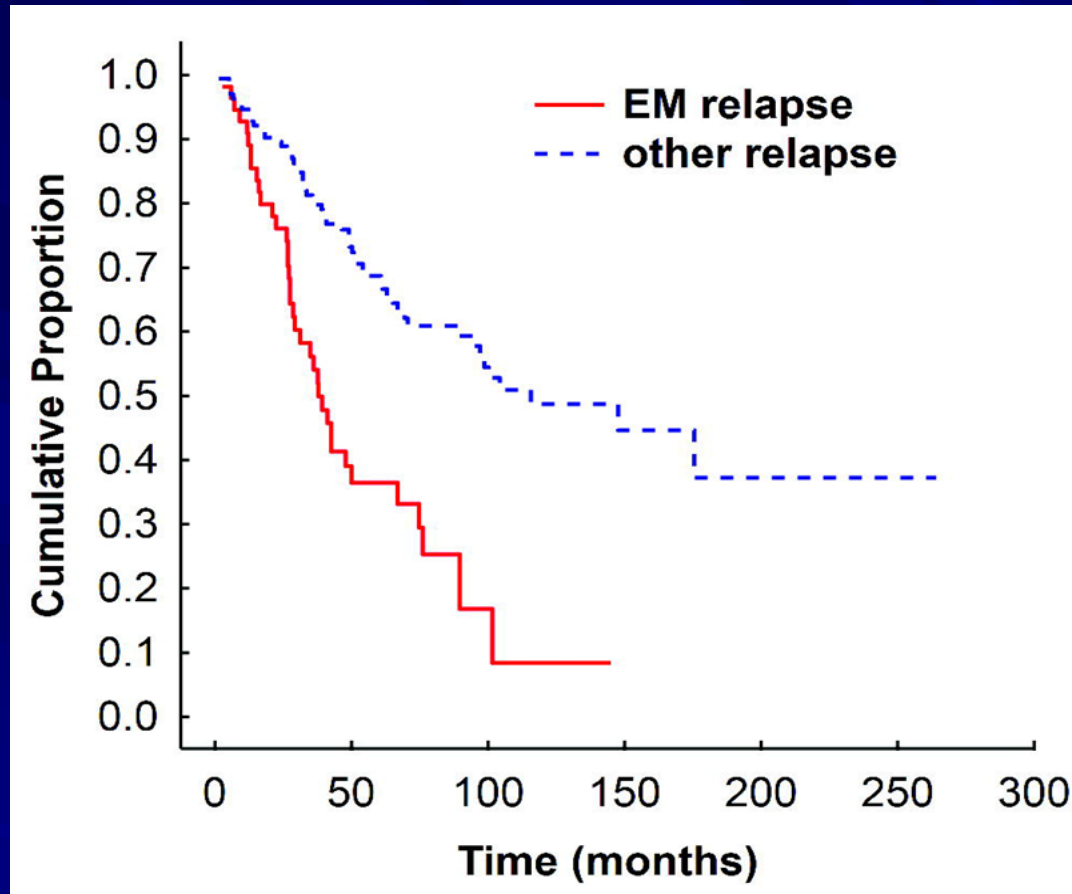
# EM relaps- klinická zkušenost

- Analýza 226 relabovaných MM pacientů
- EM u 24 %
  - 14 % do měkkých tkání (EM-S)
  - 10 % spojeno s kostí (EM-B)

Pour, 2014

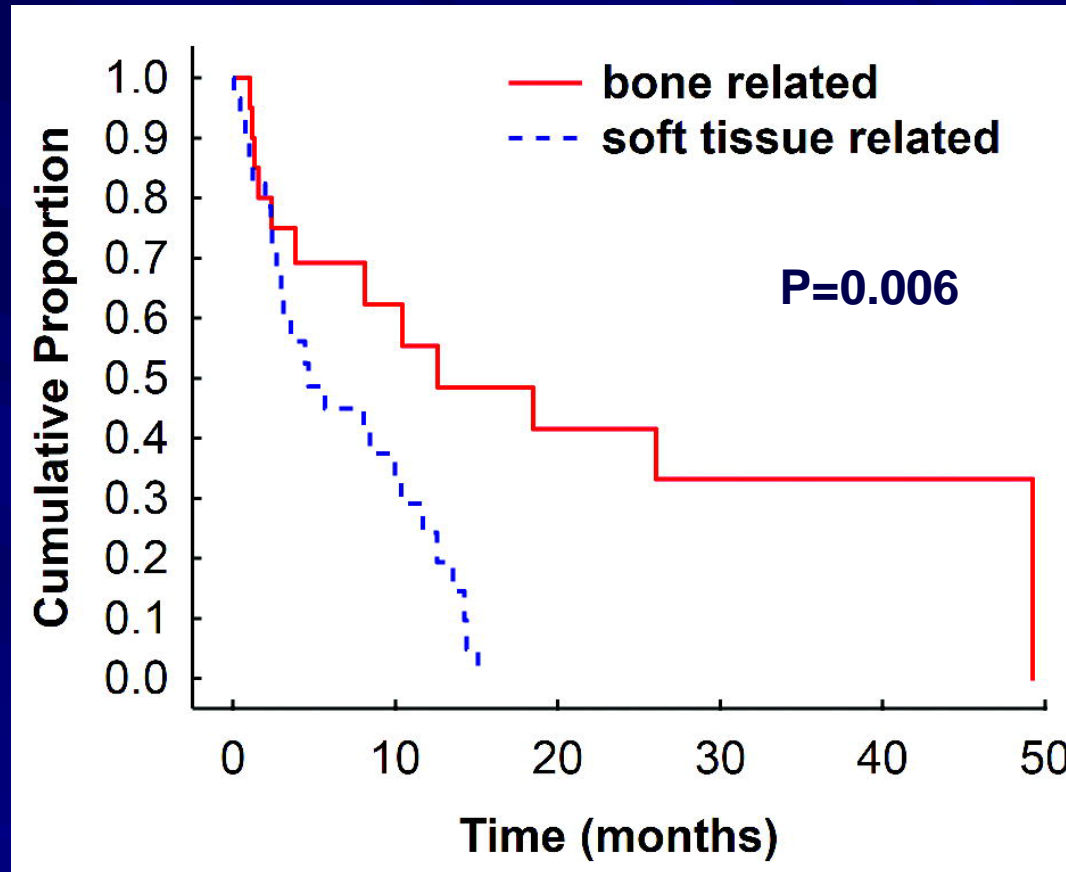


# Přežití EM pacientů



Pour, 2014

# Přežití 2 skupin EM pacientů



Pour, 2014

# Můžeme použít cirkulující miRNA jako markery EM?

# EM miRNA projekt

- Sérum periferní krve
- 55 EM pacientů - 5 primárních, 50 sekundárních
- 59 MM pacientů - 49 při diagnóze, 10 v relapsu
- 30 ZD

Bešše, 2015

# Testovací kohorta

- 35 EM, 35 MM, 30 ZD
- miR-195 - nesignifikantní, vyřazena
- miR-222 - vyšší v EM vs ZD
- miR-34a - rozdíly MM vs EM a ZD
- miR-130a - rozdíly MM vs EM a ZD

Bešše, 2015

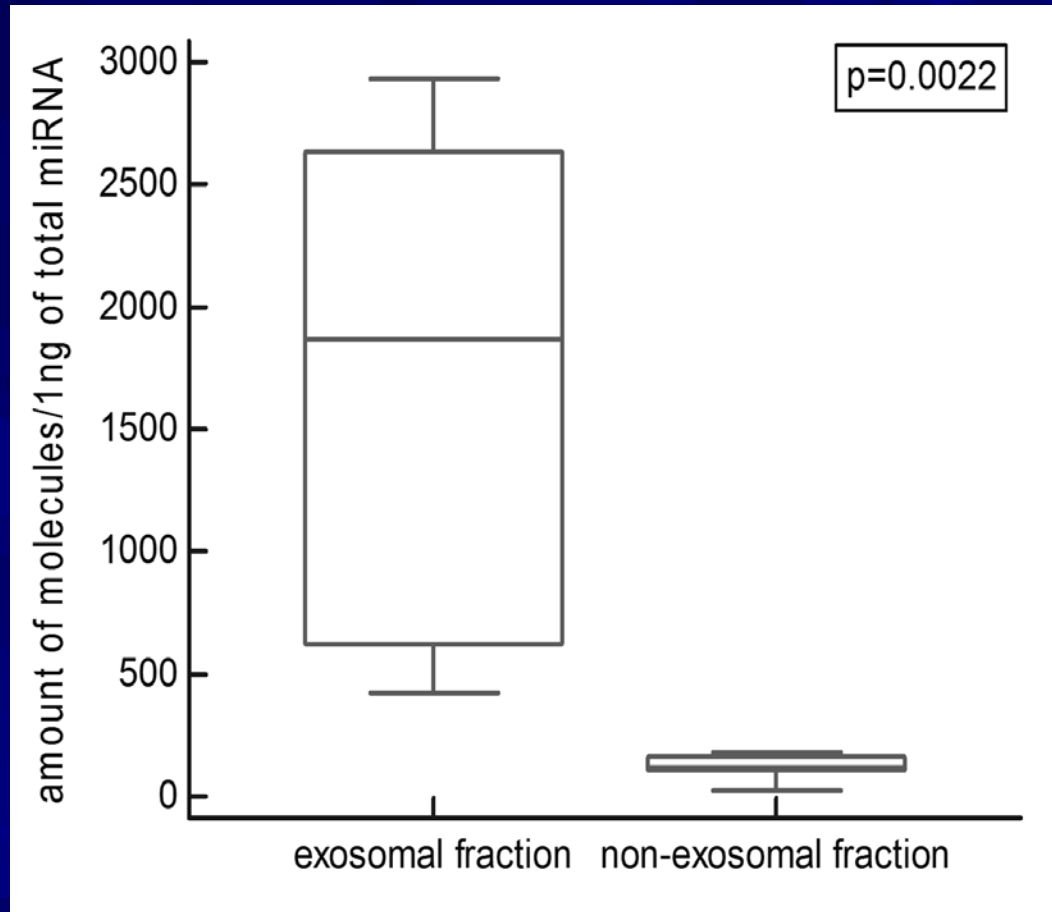
# Validační kohorta

- 20 EM (2 primární EM, 18 sekundární EM)
- 24 MM (14 při diagnóze, 10 v relapsu) - PET/CT
- miR-34a nerozlišila EM vs MM
  
- miR-130a snížena ( $p=0,012$ )
- Sensitivita a specificita poměrně nízká

Bešše, 2015



# miR-130a - mezibuněčná komunikace?



Bešše, 2015

# Co víme o miR-130a?

- Účastní se patogeneze CML, glioblastomu, ovariálního karcinomu
- Buňky se sníženou hladinou - snížená proliferace, změna v BC, změna v maturaci
- Naše předchozí práce - snížena u MG vs ZD
- Proangiogenní vlastnosti
- Spojené s EM tumorigenezí?
- Hladina snížena v PB v KD u EM pacientů ve srovnání s PB v KD u MM, ale zvýšena u PB v nádoru ( $p=0,001$ )

Bešše, 2015

# A co cirkulující miRNA v moči?

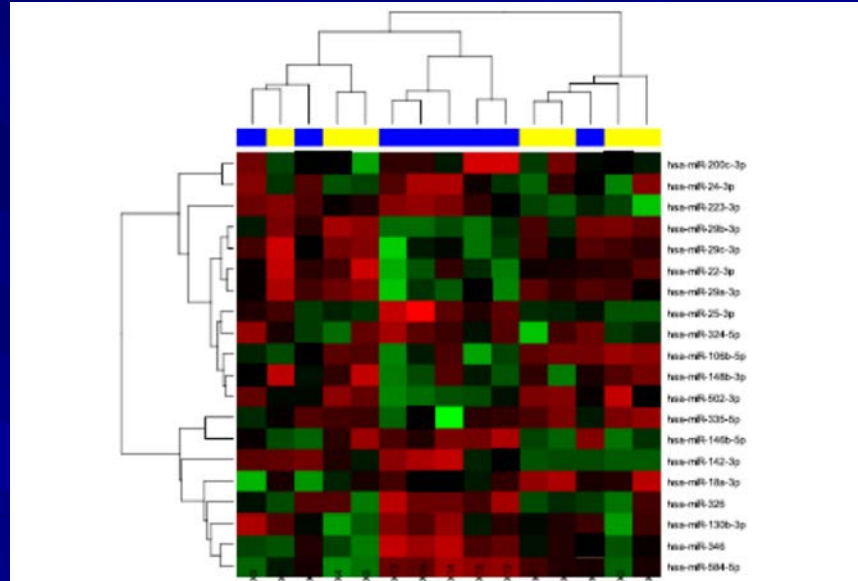
# Cirkulující miRNA v moči

- ❑ Opravdu neinvazivní marker
- ❑ Identifikovány u renálního karcinomu
- ❑ Ledviny postiženy u MM
- ❑ Existují miRNA, které umožní diagnostiku MM z moče?
- ❑ NE, alespoň v našich rukách

Slabý, 2014  
Mlčochová, 2014  
Sedlaříková, 2015

# Cirkulující miRNA v moči

- 85 vzorků - MM, ZD, RCC
- 20 deregulovaných miRNA v první fázi
- 8 vybráno pro validaci
- Není statisticky signifikantní
- Profil není specifický pro MM, ale pro poškození ledvin



Sedlaříková, 2015

# Shrnutí - cirkulující miRNA

- Velký potenciál
- Možný marker MM i EM
- U EM - můžeme identifikovat pacienty, kteří mají zvýšené riziko vzniku EM, již při diagnóze?
- Ověření miR-130a jako markeru
  
- Cirkulující miRNA z moče nespecifické
- Stále nevíme
  - Odkud cirkulující miRNA pocházejí, z jakých tkání?
  - Účastní se přímo patogeneze MM?
  - A co miR-130a?



# Nové markery pro MM

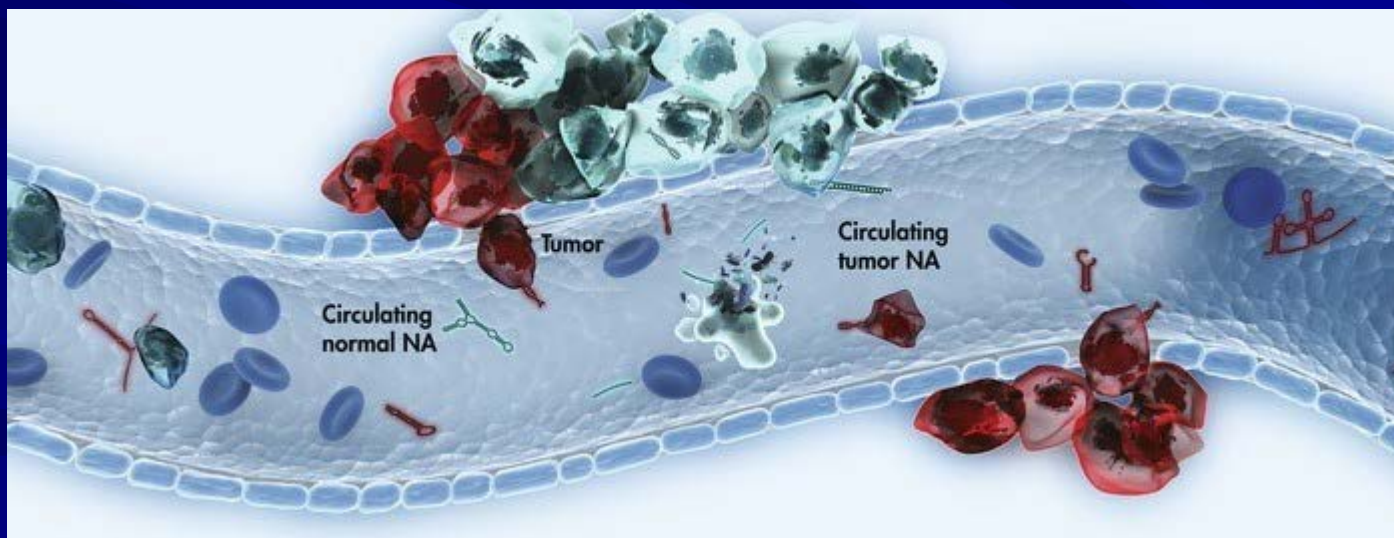
- MikroRNA
- Cell-free DNA
- LncRNA

# Cell-free DNA

- Krátké fragmenty DNA (180 bp) v periferní krvi
- Popsány v roce 1949 (Mandel et Métais)
- 1977 - popsány u pacientů s nádory (Leon et al)
  - Vyšší hladiny u pacientů než u kontrol
  - Vyšší hladiny u pacientů s metastázami
  - Snížené hladiny po radioterapii u 66-90 % pacientů
- 1994 - popsány cfDNA s mutací RAS u MDS
- Využití v prenatální diagnostice

# Hladiny cfDNA

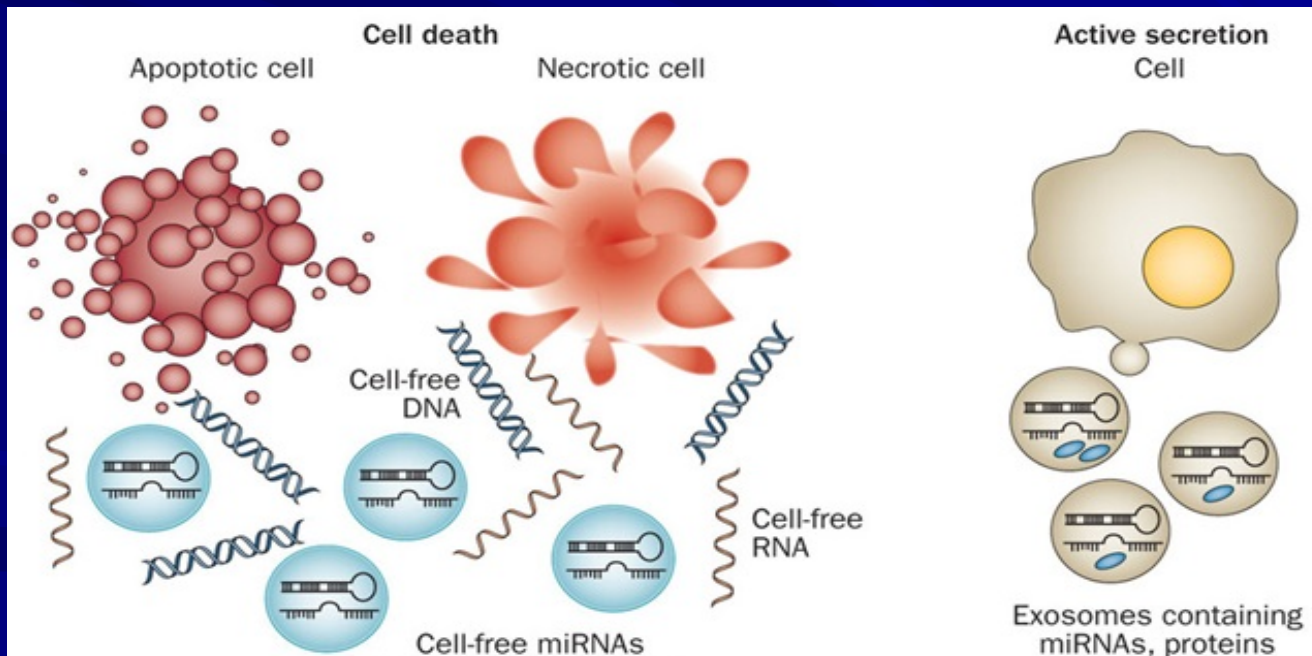
- Fyziologicky velmi nízké (10-100 ng/ml)
- U patologických stavů změna kvality a kvantity
- Vyšší hladiny (1000 ng/ml) u malignit, autoimunitních onemocnění, zánětů aj. - nutné rozlišit zdravou cfDNA od patologické



<http://biomarkerinsights.qiagen.com/2016/08/17>

# Jak se dostanou cfDNA z buněk?

- Apoptóza
- Nekróza (nádorové buňky)
- Aktivní sekrecí (signalizace mezi buňkami a tkáněmi)



Schwarzenbach et al 2014

# Sledování dynamiky cfDNA u MM

- ❑ Sledování pacientů do CR (+6) nebo 2 roky
- ❑ Detekce VDJ přestavby těžkého řetězce imunoglobulinu (nádorový marker MM)
- ❑ Analýza oblasti specifické pro každého pacienta
- ❑ Detekce majoritního klonu myelomových buněk
- ❑ Analýza cfDNA nesoucí daný nádorový marker



# Schéma pro jednoho pacienta

Vzorek při diagnóze  
detekce klonu v KD



Léčba



Vzorek po léčbě



# Schéma pro jednoho pacienta

Vzorek při diagnóze

detekce klonu v KD

Detekce daného klonu v cf-DNA



Léčba



Vzorek po léčbě

detekce daného klonu v cf-DNA

# Co jsme zatím zjistili?

- Do studie zařazeno 81 MM pacientů při diagnóze
- Vyřazeno 26 pacientů - přestavba nestanovena
- Sledujeme 55 pacientů
- Zanalyzováno 17 pacientů
  - sledování do CR+6, nebo 24 měsíců od diagnózy
- Analýza qPCR dle ESG-MRD-ALL GUIDELINES

# Průběžné výsledky

Pacient	cfDNA										
	DG	DG+3	DG+6	DG+9	DG+12	DG+15	DG+18	DG+24	CR	CR+3	CR+6
3	PNQ	PNQ	PNQ	neg.	neg.	neg.	-	neg.	-	-	-
4	pozit.	PNQ	neg.	neg.	pozit.	neg.	poz.	neg.	-	-	-
5	neg.	neg.	-	-	-	-	-	-	neg.	PNQ	neg.
6	PNQ	neg.	-	-	-	-	-	-	PNQ	PNQ	PNQ
7	pozit.	PNQ	neg.	-	-	-	-	-	neg.	neg.	neg.
8	pozit.	neg.	neg.	PNQ	-	-	-	-	PNQ	neg.	neg.
9	PNQ	PNQ	PNQ	PNQ	PNQ	-	-	-	PNQ	-	PNQ
10	PNQ	PNQ	PNQ	-	-	-	-	-	PNQ	neg.	neg.
11	pozit.	PNQ	pozit.	PNQ	PNQ	neg.	neg.	-	neg.	neg.	neg.
12	pozit.	neg.	neg.	neg.	-	-	-	-	neg.	neg.	
13	neg.	PNQ	neg.	neg.	neg.	-	-	-	neg.		
14	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	-	-	neg.	neg.		
15	PNQ	PNQ	neg.	neg.	-	-	-	-	poz.		

# Shrnutí - cfDNA

- ❑ Metoda mnohá technická úskalí ale funguje
- ❑ Zatím není zanalyzováno dostatečné množství pacientů
- ❑ Pokračujeme v analýzách

# Nové markery pro MM

- MikroRNA
- Cell-free DNA
- LncRNA

# Dlouhé nekódující molekuly RNA

- > 200 nt
- Intergenové, intronové, ...
- Většinou v jádře
- Transkripce RNA polymerázou II (III)
- Post-transkripční modifikace
- Nepřítomnost otevřených čtecích rámců (ORF)
- Tkáňově specifická exprese
- Regulace genové exprese

Mercer, 2009

Derrien, 2012



# Molekulární podstata funkce lncRNA

- Aktivace transkripce genů
- Represe transkripce genů
- Modifikace funkce chromatinu a histonů

Mercer, 2009

Derrien, 2012

# LncRNA v nádorech

- Účast v mnoha procesech včetně tumorigeneze
- Změny exprese u různých nádorů
- Některé specifické pro daný typ nádoru - PCA3 u karcinomu prostaty
- Onkogeny - HOTAIR vysoká exprese v nádorech prsu
- Vznik metastáz a prognóza - HOTAIR
- Supresory - MEG3 - stimuluje transaktivaci p53

Mercer, 2009

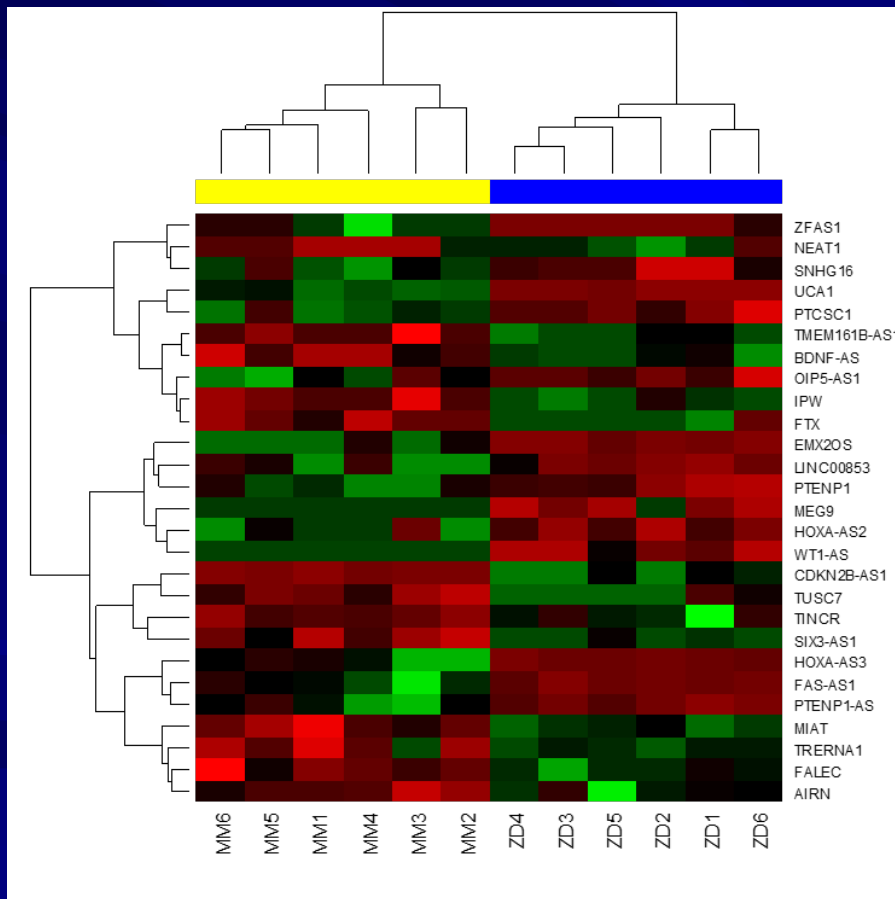
Derrien, 2012

# LncRNA v buňkách MM

# Explorativní fáze

- 6 MM vs. 6 HD CD138+

\* fenotyp zdravých PC buněk: CD45+/dim, CD38+, CD19+, CD56-

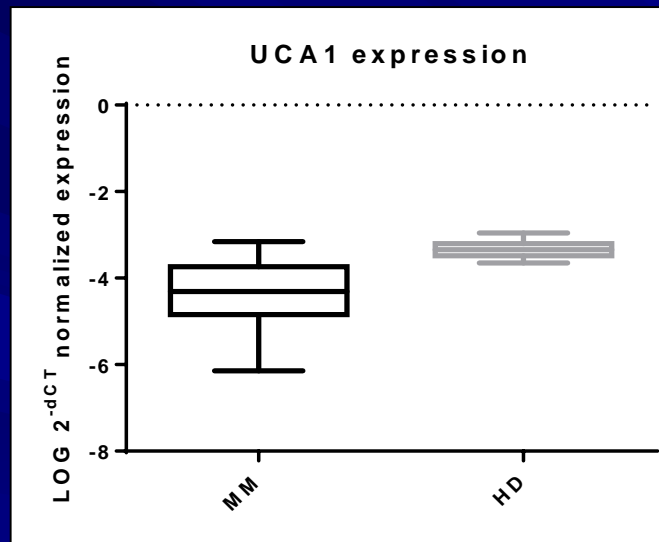


27 lncRNA  $p < 0,01$

- 14 nižší exprese
- 13 vyšší exprese u MM

# Validační fáze

- 40 MM vs. 19 ZD
- rozdílná exprese UCA1 mezi MM a ZD:



UCA1 ( $p < 0,0001$ )

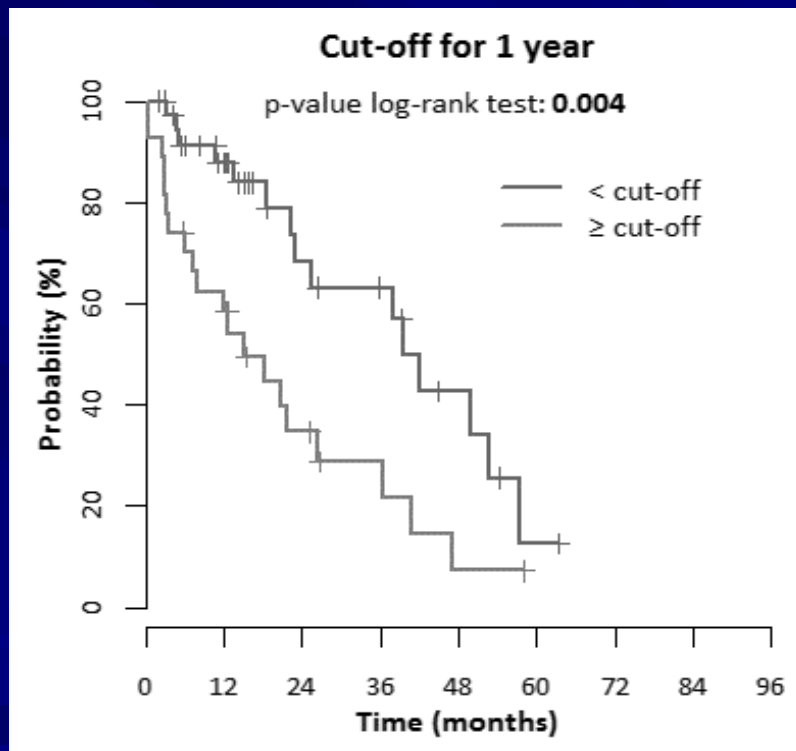
# LncRNA UCA1

- marker pro nádory močového měchýře, karc.žaludku
- popsána u AML
  
- Korelace s biochemickými parametry a cytogenetikou
- Prognostický význam pro celkové přežití



# Analýza přežití

- time-dependent ROC, rozdělení na skupiny s vyšší a nižší expresí UCA1



Sedlarikova et al 2017

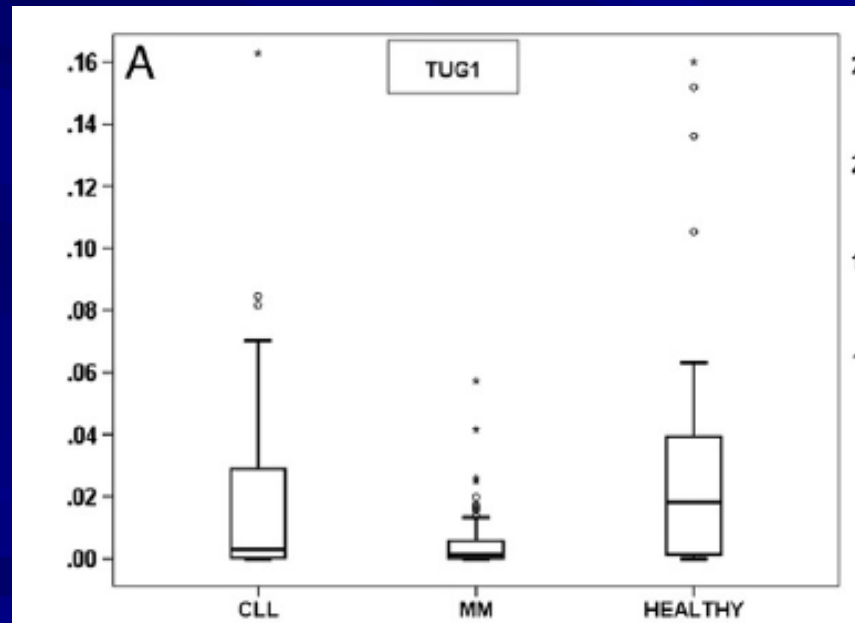
# LncRNA UCA1

- ❑ deregulována u MM s vysokou senzitivitou i specificitou
- ❑ korelace s biochemickými parametry, cytogenetikou, ISS
- ❑ potenciální biomarker prognózy MM

# Cirkulující LncRNA

# Cirkulující lncRNA u MM

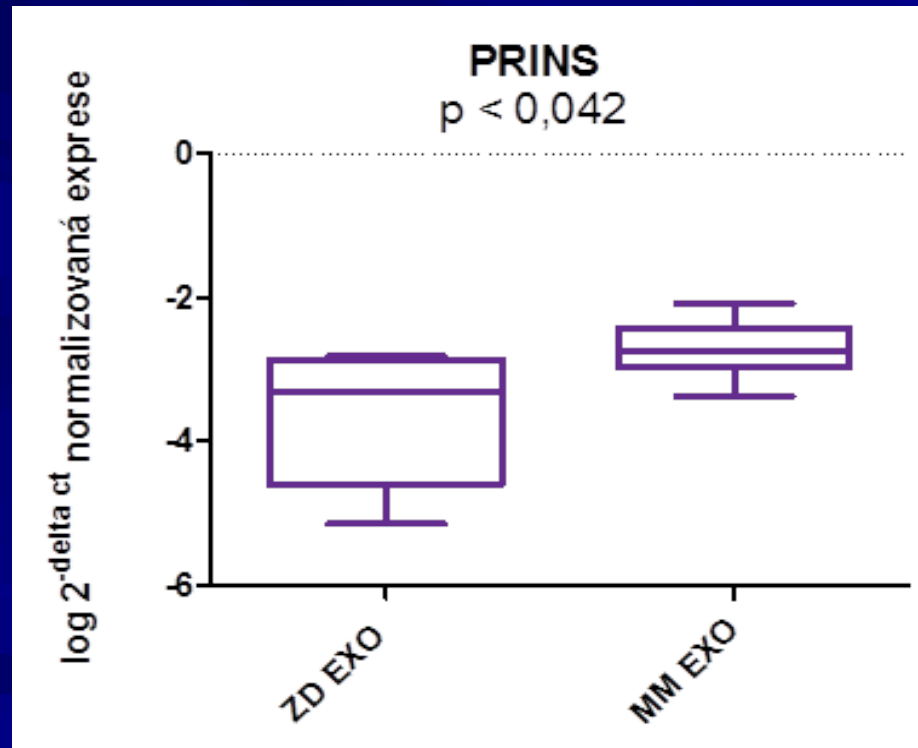
- TUG1, MALAT1, HOTAIR, GAS5 deregulovány v plazmě PK u MM pacientů
- Jen TUG1 deregulována s porovnání s ZD



Isin 2014

# Cirkulující lncRNA u MM | Brno

- Porovnání lncRNA z exozomální/neexozomální frakce séra u MM, MGUS a ZD na platformě Qiagen

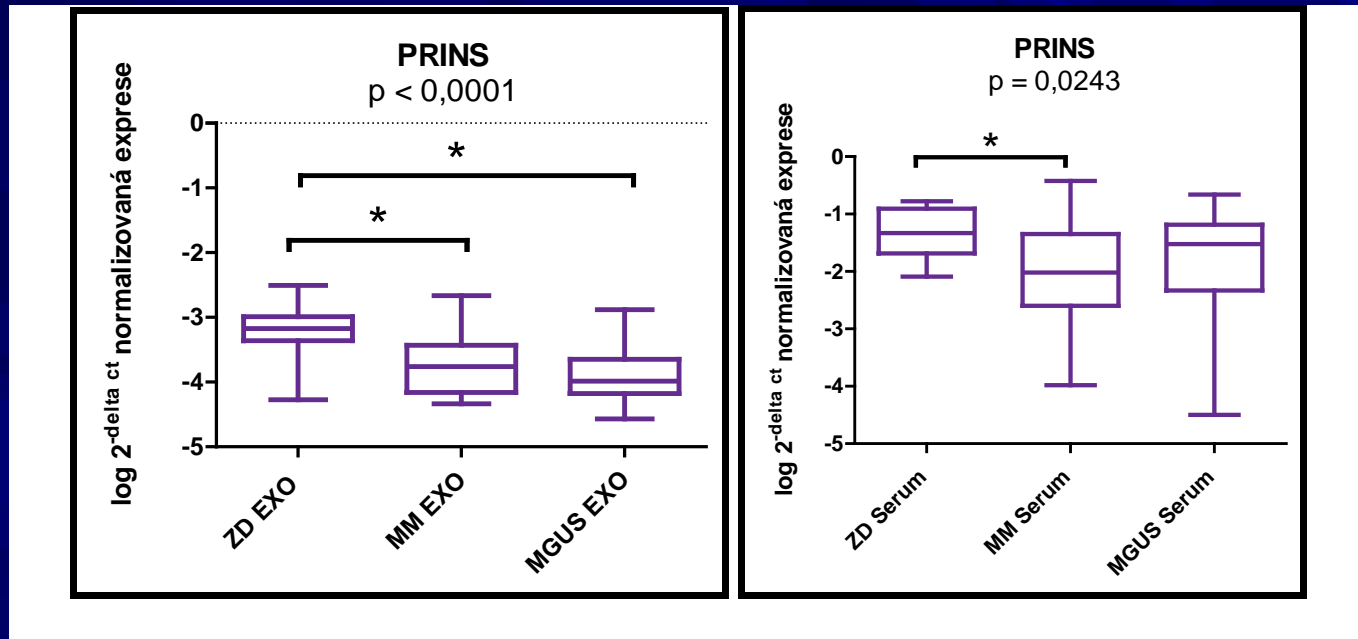


# Validace lncRNA na MM, MGUS a ZD

- PRINS, LINC-ROR, UCA1, NEAT1
- 50 MM, 50 MGUS, 30 ZD
- qPCR



# Exozomální a neexozomální frakce



Hladiny exprese lncRNA PRINS v exozomální ( $p < 0,0001$ ) a neexozomální ( $p = 0,0243$ ) frakci séra PK u MM, MGUS a ZD

# LncRNA

- ❑ PRINS odlišuje MG pacienty od ZD
- ❑ Ale nízká sensitivita i specificita
- ❑ Korelace s cytogenetikou
- ❑ Nutná lepší platforma nebo NGS

# Shrnutí

- MM onemocnění starších lidí
- Nové léky zlepšují přežívání
- Potřebujeme nové snadno dostupné markery pro MM, nejlépe z PK
- Několik možností - miRNA, cf-DNA, lncRNA
  - splňují kritéria dobrých biomarkerů
- Doufáme, že se podaří zlepšit diagnostiku a monitorování MM pacientů

# Výhledy do budoucna - tekuté biopsie?

- Biopsie z periferní krve - schopné zahrnout celou heterogenitu nádoru
- Méně bolestivé
- I jiné molekuly
- Velký potenciál



# Poděkování

**Babákova myelomová skupina,**  
Ústav patologické fyziologie,  
Lékařská fakulta, MU

**Sabina Ševčíková**

Veronika Kubaczková  
Lenka Sedlaříková  
Božena Bollová  
Martina Valachová  
Jana Gregorová  
Veronika Kelbichová  
Kamila Novosadová

**Oddělení klinické hematologie,**  
Fakultní nemocnice Brno



**Miroslav Penka**

Martina Almáši  
Renata Bezděková  
Božena Hanáková  
Lucie Říhová  
Barbora Sábliková  
Renata Suská  
Pavla Všianská

**Oddělení klinické hematologie**  
Fakultní nemocnice Ostrava

**Roman Hájek**

Tomáš Jelínek  
Fedor Kryukov  
Elena Kryukova  
Zuzana Kuřová



**Laboratoř molekulární cytogenetiky**  
Ústav experimentální biologie, PŘF MU  
**Petr Kuglík**



Aneta Mikulášová  
Jan Smetana  
Markéta Wayhelová



**Interní hematologická a onkologická klinika**

Fakultní nemocnice Brno

Zdeněk Adam  
Marta Krejčí  
Luděk Pour  
Viera Sandecká  
Martin Štork

**Institut biostatistiky a analýz**  
LF MU



Jiří Jarkovský  
Lucie Brožová

**Ústav patologické fyziologie**  
Lékařská fakulta, MU

Anna Vašků



# Děkuji za pozornost

