

# Odlišná exprese genů spojených se signální drahou UPR u pacientů s mnohočetným myelomem a extramedulárním onemocněním

Different expression of genes involved in unfolded protein response in multiple myeloma and extramedullary disease patients

Dostálová A.<sup>1</sup>, Vlachová M.<sup>1</sup>, Růžičková T.<sup>1</sup>, Vaňhara P.<sup>2,3</sup>, Štork M.<sup>4</sup>, Ševčíková S.<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup> Babákova myelomová skupina, Ústav patologické fyziologie, LF MU Brno

<sup>2</sup> Ústav histologie a embryologie, LF MU Brno

<sup>3</sup> Výzkumné centrum aplikované molekulární onkologie (RECAMO), MOÚ Brno

<sup>4</sup> Interní hematologická a onkologická klinika LF MU a FN Brno

<sup>5</sup> Oddělení klinické hematologie, FN Brno

## Souhrn

**Východiska:** Signální dráha UPR (unfolded protein response, tj. odpověď na chybně složené proteiny) pomáhá myelomovým buňkám vyrovnat se se stresovými podmínkami vzniklými v důsledku nadměrné proteosyntézy, a představuje tak pro myelomové buňky prostředek umožňující jejich přežití. Extramedulární onemocnění je agresivnější forma mnohočetného myelomu, při které myelomové buňky ztrácí svoji závislost na mikroprostředí kostní dřeně a mohou infiltrovat jiné tkáně a orgány. Patogeneze vzniku extramedulárního onemocnění není dosud zcela objasněna. Cílem této studie bylo zjistit, zda existuje rozdíl v expresi genů spjatých s UPR mezi plazmatickými buňkami kostní dřeně od pacientů s mnohočetným myelomem a extramedulárním onemocněním. **Materiál a metody:** Pomocí reverzní transkripce ve spojení s kvantitativní polymerázovou řetězovou reakcí byla analyzována exprese šesti genů spjatých s UPR (*ERN1*, *DDIT3*, *EIF2AK3*, *TUSC3*, *XBP1*, *HSPA5*). Použito bylo celkem 76 vzorků plazmatických buněk kostní dřeně, z toho 44 bylo od pacientů s mnohočetným myelomem a 32 od pacientů s extramedulárním onemocněním. **Výsledky:** Byl pozorován statisticky významný rozdíl v expresi genů *HSPA5*, *DDIT3*, *EIF2AK3* a *ERN1* mezi skupinou mnohočetného myelomu a extramedulárního onemocnění; exprese byla ve všech případech vyšší u vzorků od pacientů s extramedulárním onemocněním. V případě genů *XBP1* a *TUSC3* nebyl pozorován statisticky významný rozdíl. Prokázáno bylo také několik statisticky významných korelací mezi hladinou exprese analyzovaných genů a klinickými daty pacientů. **Závěr:** Výsledky poukazují na možný význam signální dráhy UPR v patogenezi extramedulárního onemocnění. UPR se jeví jako vhodný směr dalšího výzkumu.

## Klíčová slova

mnohočetný myelom – extramedulární onemocnění – signální dráha UPR – plazmatické buňky

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare that they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE recommendation for biomedical papers.



doc. RNDr. Sabina Ševčíková, Ph.D.

Babákova myelomová skupina

Ústav patologické fyziologie,

LF MU Brno

Kamenice 5

625 00 Brno

e-mail: sevcik@med.muni.cz

Obdrženo/Submitted: 16. 8. 2024

Přijato/Accepted: 30. 10. 2024

doi: 10.48095/ccko202545

## Summary

**Background:** The unfolded protein response (UPR) enables myeloma cells to overcome the stress conditions arising from excessive proteosynthesis and thus provides a survival advantage for myeloma cells. Extramedullary disease is a more aggressive form of multiple myeloma in which myeloma cells lose their dependence on the bone marrow microenvironment and are able to infiltrate other tissues and organs. The pathogenesis of extramedullary disease is not fully elucidated yet. The aim of this study was to determine whether there is a difference in the expression of UPR-related genes between bone marrow plasma cells from multiple myeloma and extramedullary disease patients. **Materials and methods:** Gene expression of six genes involved in UPR (*ERN1*, *DDIT3*, *EIF2AK3*, *TUSC3*, *XBP1*, *HSPA5*) was analyzed by quantitative reverse transcription polymerase chain reaction. In total, 76 bone marrow plasma cell samples were used, of which 44 were from patients with multiple myeloma and 32 from patients with extramedullary disease. **Results:** A statistically significant difference was observed between the multiple myeloma and extramedullary disease groups regarding the expression of *HSPA5*, *DDIT3*, *EIF2AK3*, and *ERN1* genes. However, in the case of *XBP1* and *TUSC3* genes, no statistically significant difference in the expression was found. Several statistically significant correlations between the expression levels of the analyzed genes and the clinical data of the patients were observed as well. **Conclusion:** Our results suggest the importance of UPR in the pathogenesis of extramedullary disease. UPR appears to be a promising avenue for further research.

## Key words

multiple myeloma – extramedullary disease – unfolded protein response – plasma cells

## Úvod

Mnohočetný myelom (MM) je hematologické onemocnění charakterizované klonální proliferací maligního klonu plazmatických buněk v kostní dřeni pacientů. Tyto buňky, označované jako buňky myelomové, produkují monoklonální imunoglobulin prokazatelný v krvi a/nebo moči pacientů. Z klinického hlediska je MM provázen skupinou typických příznaků označovaných souhrnně zkratkou CRAB – hyperkalcemie, renální insuficience, anemie a kostní léze [1,2]. Medián věku pacientů v ČR je v době diagnózy 70 let, přičemž jen přibližně 17 % je v době diagnózy mladších 60 let a necelé 1 % mladší 40 let [3]. Pro MM jsou typické některé chromozomální aberace, které lze rozlišit na hyperdiploidní (obvykle trizomie lichých chromozomů) [4] a nonhyperdiploidní (např. translokace chromozomu 14) [2,5].

Extramedulární onemocnění (extramedullary disease – EMD) je forma MM, při níž dochází ke ztrátě závislosti myelomových buněk na mikroprostředí kostní dřeni [6]. Tato ztráta závislosti má souvislost se sníženou expresí některých adhezivních molekul na myelomových buňkách v případě EMD (zatímco u klasického MM zajišťují tyto molekuly adhezi myelomových buněk v kostní dřeni) [7–9]. Kromě toho se na patogenезi EMD, která však dosud není zcela objasněna, podílejí např. cytokiny [10] či některé mikroRNA [6,11,12]; popsán byl také zvýšený výskyt určitých chromozomálních aberací [13].

Nezávislost myelomových buněk na kostní dřeni umožňuje jejich vycestování a diseminaci v jiných tkáních a orgánech. Vychází-li nádor z původní kostní léze, jedná se o EMD paraskelální. Jsou-li zasaženy měkké tkáně, označuje se jako EMD extraskeletální. Dále lze EMD rozdělit také na primární (stanoveno již s prvotní diagnózou MM) a sekundární (stanoveno při relapsu MM) [6,14]. EMD se v porovnání s MM vyznačuje větší agresivitou [6]. Zatímco doba přežití u pacientů s MM se pohybuje od 2 let u těžkých forem onemocnění [15] a může přesáhnout až 8 let u pacientů dobře odpovídajících na léčbu [2], doba přežití pacientů s EMD je kratší [16]. Nedávný systematický přehled udává, že nejhorší prognózu mají pacienti s extraskeletálním EMD. Jedna ze zmiňovaných studií zaměřující se na nově diagnostikované pacienty s MM uvádí pro extraskeletální EMD medián přežití 27,8 měsíce, zatímco u paraskelálního EMD se jedná o 54,2 měsíce. Je však podstatné podotknout, že závěry jednotlivých studií se liší [17].

Vzhledem k tomu, že myelomové buňky vznikají maligní transformací buněk plazmatických, jejichž hlavní funkcí je tvorba imunoglobulinů, probíhá v myelomových buňkách intenzivní proteosyntéza [18]. Tvorba sekrečních proteinů, mezi které imunoglobuliny patří, je spojena s ribozomy drsného endoplazmatického retikula (ER), v jehož lumen následně dochází ke skládání vznikajících proteinů, které tak získávají správnou terciární strukturu [19,20].

Skládání proteinů je proces náchylný na chyby a při zvýšené proteosyntéze roste také riziko vzniku nesprávně poskládaných proteinů. Takové proteiny jsou v lumen ER zadržovány, může dojít k jejich nahromadění, a tím také k rozvoji stavu označovaného jako stres ER, který může vést až ke smrti buňky [18,21]. Aby buňka dokázala zachovat svou funkčnost, dochází v ní k aktivaci mechanismů, které umožňují obnovit homeostázu v buňce. Takovým mechanismem je aktivace signální dráhy UPR (unfolded protein response, tj. odpověď na chybně složené proteiny). Jedná se o proces, který prostřednictvím transkripčních faktorů ovlivňuje genovou expresi v buňce způsobem vedoucím ke zvýšení kapacity ER skládat proteiny a ke snížení proteinové zátěže [18,21]. Celý proces UPR je umožněn kaskádou reakcí, na jejichž začátku je aktivace některého ze tří transmembránových proteinů IRE1 $\alpha$  (inositol-requiring enzyme 1 $\alpha$ ), PERK (protein kinase R-like ER kinase) či ATF6 (activating transcription factor 6), které slouží jako senzory přítomnosti nesprávně poskládaných proteinů v lumen ER [21,22]. Aktivací i průběhem UPR se detailně zabývá např. Hetz et al. [21]. Vzhledem k intenzivní proteosyntéze (a tedy i zvýšenému riziku rozvoje stresu ER) představuje UPR pro myelomové buňky důležitý nástroj přežití [23]. UPR je ve vztahu k MM zkoumáno také z hlediska možného využití v léčbě, přičemž souvisí s odpovědí na léčbu proteazomovými inhibitory [19].

Cílem této studie bylo vyhodnotit hladinu exprese vybraných genů spjatých s UPR u myelomových buněk pacientů s MM a EMD.

### Materiál a metody

Zpracováno bylo celkem 76 vzorků CD138<sup>+</sup> plazmatických buněk kostní dřeně, z toho 44 od pacientů s MM a 32 od pacientů s EMD. Všechny vzorky pocházely od pacientů z Fakultní nemocnice Brno. Studie byla schválena Etickou komisí Fakultní nemocnice Brno a zahrnutí pacientů do studie bylo podmíněno podepsáním informovaného souhlasu. Blíží charakteristika souboru pacientů je uvedena v tab. 1.

### Izolace RNA z plazmatických buněk kostní dřeně

Ze vzorků byla izolována RNA pomocí miRNeasy Mini Kitu (Qiagen, Německo) a miRNeasy Micro Kitu (Qiagen, Německo) v závislosti na množství buněk. Koncentrace a čistoty všech vzorků byly změřeny pomocí spektrofotometru NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, USA). Následně byla koncentrace změněna prostřednictvím fluorimetru Qubit 4.0 a kitů Qubit RNA HS Assay nebo Qubit RNA BR Assay (Thermo Fisher Scientific, USA).

### Reverzní transkripce ve spojení s kvantitativní PCR (RT-qPCR)

RNA získaná ze vzorků byla transkribována do cDNA pomocí High-Capacity cDNA Reverse Transcription kitu (Thermo Fisher Scientific, USA). cDNA byla následně využita k analýze genové exprese prostřednictvím kvantitativní polymerázové řetězové reakce (quantitative polymerase chain reaction – qPCR). Měřena byla hladina exprese šesti genů spjatých s UPR (*ERN1*, *DDIT3*, *EIF2AK3*, *TUSC3*, *XBP1*, *HSPA5*), jako referenční gen byl použit *RPLP0*. Ke qPCR byly použity TaqMan Gene Expression Master Mix (Thermo Fisher Scientific, USA), TaqMan Gene Expression Assays (Thermo Fisher Scientific, USA) a QuantStudio 3 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA).

### Statistické vyhodnocení

Data získaná pomocí qPCR byla vyhodnocena s použitím softwaru MS Excel

Tab. 1. Klinická charakterizace souboru pacientů.

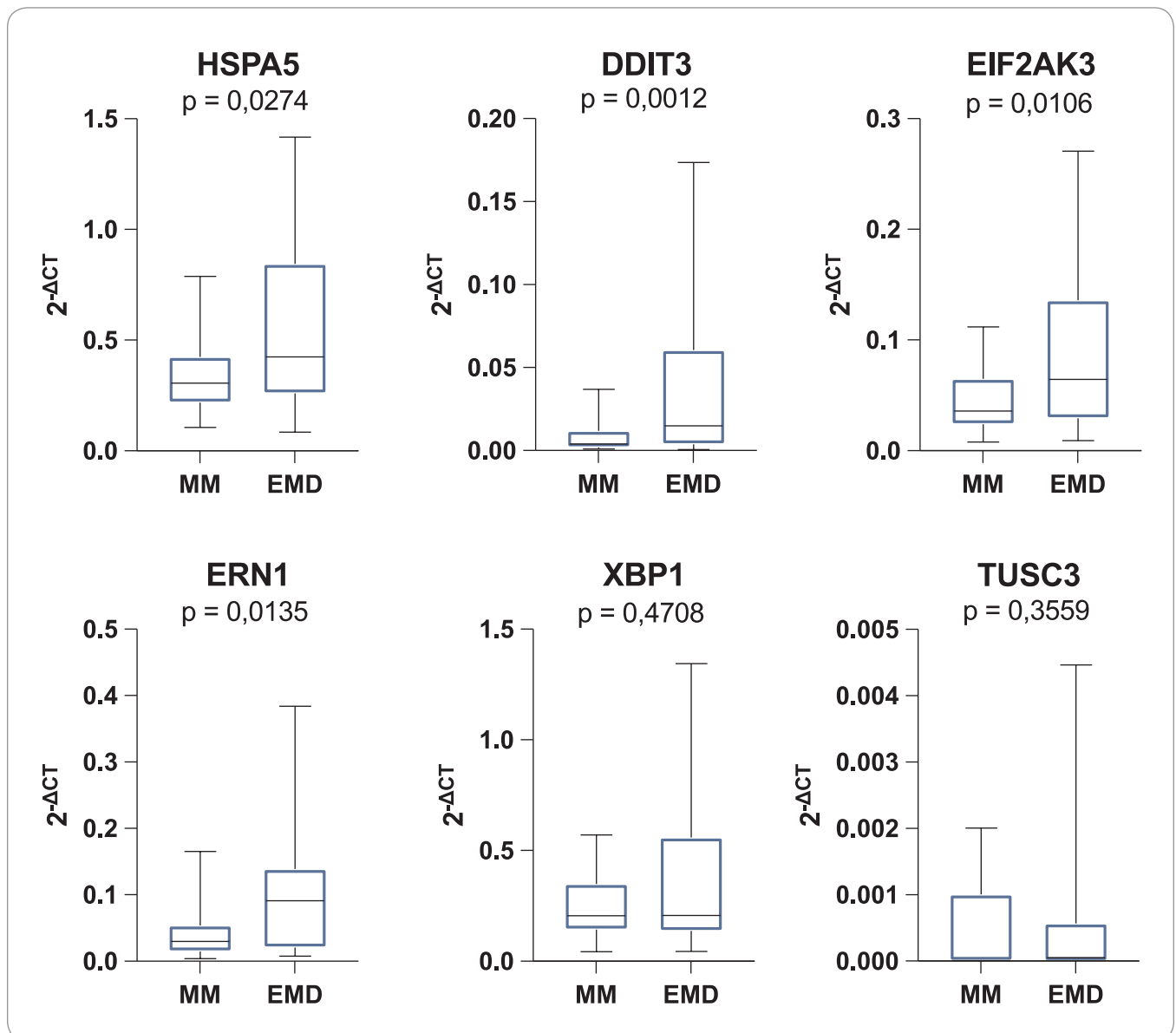
		MM	EMD
počet pacientů		44	32
typ EMD dle doby diagnózy	primární	–	30
	sekundární	–	2
typ EMD dle lokalizace	paraskelální	–	27
	extraskelální	–	5
Pohlaví	žena	16	16
	muž	28	16
věk (roky) medián (min–max)		70 (45–86)	69 (48–83)
R-ISS	I	5	4
	II	16	18
	III	16	8
	neurčeno	7	2
ISS	I	11	7
	II	3	12
	III	30	13
Durie-Salmon stadium	I	2	–
	II	4	4
	III	21	20
	neurčeno	17	8
Durie-Salmon substadium	A	17	18
	B	10	6
	neurčeno	17	8
izotyp imunoglobulinového řetězce	IgG	24	9
	IgA	12	5
	IgM	–	1
	pouze lehké řetězce	7	7
	biklonální	–	1
	neurčeno	1	9
typ lehkého řetězce	kappa	29	17
	lambda	14	6
	neurčeno	1	9

EMD – extramedulární onemocnění, MM – mnohočetný myelom, ISS – mezinárodní stagingový systém, R-ISS – revidovaný mezinárodní stagingový systém

(Microsoft Corporation, USA) a GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, USA). Hodnoty Ct byly normalizovány k hladině referenčního genu *RPLP0* pomocí metody  $2^{-\Delta Ct}$ , přičemž  $\Delta Ct$  je rozdíl Ct hodnoty cílového a referenčního genu. Na základě výpočtu interkvartilového

rozsahu (IQR) byly identifikovány a ze souboru normalizovaných Ct vyřazeny odlehle hodnoty.

Hladiny exprese zkoumaných genů mezi skupinou MM a EMD byly srovnány pomocí Mann-Whitneyho testu. Za statisticky významné byly považovány vý-



Obr. 1. Krabicové grafy expresních hladin zkoumaných genů. Krabicové grafy znázorňují rozpětí hodnot mezi 25. a 75. percentilem (obdélníková část) a medián (úsečka uvnitř obdélníkové části). Úsečky vycházející z grafu představují minimální a maximální hodnotu. Na ose y je vyjádřena normalizovaná expresní hladina cílového genu (vztahena k hladině referenčního genu).

sledky s p hodnotou < 0,05. Pokud byl zjištěn statisticky významný rozdíl v expresi, byla pro daný gen provedena také ROC (receiver operating characteristic) analýza, která hodnotí, s jakou senzitivitou a specificitou lze na základě daného parametru odlišit dvě skupiny. Za dobrý biomarker je považován takový parametr, u kterého je hodnota plochy pod křivkou (area under the curve – AUC) > 0,8 [24].

Pomocí Spearmanova korelačního koeficientu byly porovnány hladiny exprese všech zkoumaných genů s klinic-

kými daty pacientů. Korelace byly provedeny zvlášť pro kohortu MM a EMD. Normalizované Ct hodnoty byly korelovány s těmito klinickými parametry pacientů: věk v době stanovení diagnózy, stadium onemocnění dle prognostických systémů ISS (International Staging System) [25], R-ISS (Revised International Staging System) [26], systém dle Durieho a Salmona [27], poměr volných lehkých řetězců imunoglobulinů, hladina monoklonálního proteinu v séru, procentuální zastoupení plazmatických

buněk v kostní dřeni, množství hemoglobinu a trombocytů, sérová hladina vápníku, albuminu, kreatininu, beta-2-mikroglobulinu, laktátdehydrogenázy a C-reaktivního proteinu. Za statisticky významné byly považovány korelace s p hodnotou < 0,05.

### Výsledky

#### Srovnání hladin exprese genů spjatých se signální drahou UPR

Hladiny exprese jednotlivých genů byly srovnány mezi skupinou MM a EMD. Sta-

**Tab. 2. Statisticky významné korelace. Tabulka shrnuje všechny zjištěné statisticky významné korelace, pro každou z nich je uvedena hodnota p a r. Negativní korelace jsou vyznačeny modře, zbylé hodnoty představují pozitivní korelace.**

	MM				EMD	
	HSPA5		TUSC3		TUSC3	
	r	p	r	p	r	p
věk	–	–	–	–	0,379	0,033
plazmocyty v kostní dřeni	–	–	0,312	0,039	–	–
hemoglobin	<b>–0,347</b>	<b>0,021</b>	<b>–0,446</b>	<b>0,002</b>	–	–
kreatinin	–	–	0,321	0,033	–	–
beta-2-mikroglobulin	0,38	0,011	0,315	0,037	–	–
C-reaktivní protein	0,308	0,044				

EMD – extramedulární onemocnění, MM – mnohočetný myelom

tisticky významný rozdíl v expresi byl pozorován u genů *HSPA5* ( $p = 0,0274$ ), *DDIT3* ( $p = 0,0012$ ), *EIF2AK3* ( $p = 0,0106$ ) a *ERN1* ( $p = 0,0135$ ). Ve všech případech byla hladina exprese analyzovaného genu vyšší u kohorty EMD. V případě genů *XBP1* a *TUSC3* nebyl rozdíl v expresi statisticky významný. Výsledky jsou znázorněny pomocí krabicových grafů (obr. 1).

### ROC analýza

Pro geny, jejichž rozdíl v expresi mezi oběma skupinami byl statisticky významný (*HSPA5*, *DDIT3*, *EIF2AK3* a *ERN1*), byla provedena také ROC analýza. Žádný z genů nesplňoval kritéria dobrého biomarkeru. Výsledky byly následující: *HSPA5* (AUC = 0,6602), *DDIT3* (AUC = 0,7294), *EIF2AK3* (AUC = 0,6827), *ERN1* (AUC = 0,6817).

### Korelační analýza

V kohortě MM byly pozorovány statisticky významné korelace pouze některých parametrů s hladinami exprese genů *HSPA5* a *TUSC3*. Konkrétně se jednalo o pozitivní korelaci se sérovou hladinou beta-2-mikroglobulinu ( $p = 0,011$ ) a C-reaktivního proteinu ( $p = 0,044$ ) a negativní korelaci s množstvím hemoglobinu ( $p = 0,021$ ), obojí pro gen *HSPA5*. V případě genu *TUSC3* hladina exprese pozitivně korelovala s procentuálním zastoupením plazmatických buněk v kostní dřeni ( $p = 0,039$ ), sérovou hladinou kreatininu ( $p = 0,033$ ) a beta-2-mi-

kroglobulinu ( $p = 0,037$ ) a negativně s množstvím hemoglobinu ( $p = 0,002$ ). Jediná statisticky signifikantní korelace v kohortě EMD byla pozorována mezi hladinou exprese genu *TUSC3* a věkem pacientů ( $p = 0,033$ ). Uvedené výsledky jsou shrnuty v tab. 2.

### Diskuze

Cílem této studie bylo pomocí RT-qPCR analyzovat expresi vybraných genů spjatých s UPR u plazmatických buněk kostní dřene od pacientů s mnohočetným myelomem (MM) a extramedulárním onemocněním (EMD). Geny byly vybrány na základě preliminárních dat. Naší hypotézou byla existence rozdílu v expresi daných genů mezi kohortou MM a EMD. Takový výsledek by mohl poukazovat na význam UPR v patogenezi EMD.

Mezi vybrané geny patří gen *XBP1* (X-box binding protein 1), *DDIT3* (DNA damage-inducible transcript 3), *TUSC3* (tumor suppressor candidate 3), *HSPA5* (heat shock protein family A member 5), *EIF2AK3* (eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase 3) a *ERN1* (endoplasmic reticulum to nucleus signaling 1).

Gen *XBP1* kóduje protein, který je štěpen v rámci IRE1 $\alpha$  větve UPR kaskády. Výsledkem štěpení je vznik aktivního transkripčního faktoru, který se podílí na snížení proteinové zátěže a zvýšení schopnosti ER skládat proteiny [21]. V myelomových buňkách byla prokázána zvýšená exprese *XBP1* v po-

rovnání s normálními plazmatickými buňkami [28,29].

Gen *DDIT3* kóduje transkripční faktor CHOP (C/EBP homologous protein), který má proapoptotický účinek. Expresie může být indukována vlivem hyperaktivace PERK větve UPR [30,31].

Gen *TUSC3* kóduje stejnojmenný protein, který se nachází v membráně ER a podílí se na procesu skládání proteinů. Dysfunkce tohoto proteinu může vést k hromadění nesprávně poskládaných proteinů v lumen ER a rozvoji stresu ER [32]. Význam *TUSC3* je u některých nádorových onemocnění pronádorový (např. kolorektální karcinom), u jiných protinádorový (např. karcinom prsu) [33].

Gen *HSPA5* kóduje protein BiP (binding immunoglobulin protein), který se coby chaperon podílí na skládání proteinů v ER [34]. Byla prokázána jeho zvýšená exprese u buněk MM, přičemž nejvyšší exprese byla pozorována u refrakterních myelomových buněk a buněk EMD [35,36].

Gen *EIF2AK3* kóduje transmembránový protein PERK, jeden ze tří proteinů, jejichž aktivací dochází ke spuštění UPR kaskády [22,37]. PERK je exprimován myelomovými buňkami a jeho inhibice měla na myelomové buňky antiproliferativní až proapoptotický účinek [38].

Gen *ERN1* kóduje další z transmembránových proteinů aktivujících UPR – protein IRE1 $\alpha$  [21]. Existují studie prokazující jeho význam pro růst MM [39].

Analýza genové exprese těchto genů na souboru 76 vzorků plazmatických buněk kostní dřeni (44 MM a 32 EMD) vedla k následujícím zjištěním. Signifikantně rozdílná exprese mezi MM a EMD byla pozorována u genů *HSPA5*, *DDIT3*, *EIF2AK3* a *ERN1*. Zvýšená exprese genů *HSPA5*, *EIF2AK3* i *ERN1* je u myelomových buněk spojena s pronádorovým účinkem [35,38,39] a u všech těchto genů byla pozorována vyšší exprese u kohorty EMD. Takový výsledek by mohl poukazovat na význam dysregulace UPR pro rozvoj EMD. Zvýšená exprese těchto genů v kohortě EMD v porovnání s MM koresponduje se zjištěními, že při rozvoji EMD dochází k dalšímu hromadění genetických či epigenetických změn a ke změnám v buněčné signalizaci [10,12,13,36,40]. Nicméně zvýšená exprese u EMD v porovnání s MM byla pozorována i v případě genu *DDIT3*, který má u MM protinádorový účinek, a v souladu s předchozí úvahou by tak bylo možné očekávat spíše jeho nižší expresi u EMD ve srovnání s MM.

U genů *XBP1* a *TUSC3* nebyl pozorován signifikantní rozdíl v expresi mezi MM a EMD. Gen *XBP1* byl druhý nejsilněji exprimovaný gen z celé zkoumané skupiny (po genu *HSPA5*). Naproti tomu exprese genu *TUSC3* byla v obou skupinách nízká (ve skupině MM i EMD byl medián Ct hodnoty > 32). Vzhledem k tomuto zjištění by bylo možné uvažovat o tumor supresorové funkci *TUSC3* v patogenezi MM (resp. EMD).

Korelace výsledků analýzy genové exprese s klinickými daty pacientů poukázala na některé statisticky významné vztahy. Ve skupině MM se jednalo o pozitivní korelaci mezi hladinou exprese genu *HSPA5* a sérovou hladinou beta-2-mikroglobulinu a C-reaktivního proteinu a hladinou exprese genu *TUSC3* a procentuálním zastoupením plazmatických buněk v kostní dřeni, sérovou hladinou beta-2-mikroglobulinu a kreatininu. Zvýšená hodnota všech těchto parametrů (procentuální zastoupení plazmatických buněk v kostní dřeni, sérová hladina beta-2-mikroglobulinu, C-reaktivního proteinu a kreatininu) je u MM spojena s těžší formou onemocnění a horší prognózou [26,41–43]. Negativní korelace pak byla pozorována pro hladinu ex-

prese *HSPA5* a *TUSC3* a množství hemoglobinu, přičemž snížená hodnota hemoglobinu (anémie) patří mezi typické projevy MM [2]. Ve skupině EMD byla pozorována jediná statisticky významná korelace, a to pozitivní korelace mezi hladinou exprese *TUSC3* a věkem pacientů.

Limitací této studie je množství vzorků; analýzu by bylo vhodné rozšířit o další vzorky, zejména v kohortě EMD.

## Závěr

Cílem práce bylo zjistit, zda existuje rozdíl v expresi vybraných genů spjatých s UPR mezi skupinou MM a EMD. Statisticky významný rozdíl v expresi byl prokázán u čtyř z šesti zkoumaných genů (*HSPA5*, *DDIT3*, *EIF2AK3* a *ERN1*). V případě genů *XBP1* a *TUSC3* nebyl rozdíl v expresi statisticky významný. Získaná data byla dále srovnána s klinickými daty pacientů. Toto srovnání prokázalo několik statisticky významných korelací.

Výsledky této studie poukazují na možný význam UPR v patogenezi EMD. UPR by potenciálně mohlo představovat vhodný cíl léčby a pomoci zejména v případech, kde stávající léčebné režimy nedosahují dobrých výsledků. UPR se jeví jako vhodný směr dalšího výzkumu v oblasti patogeneze MM a EMD.

## Dedikace

Tato výzkumná práce vznikla za podpory Agentury pro zdravotnický výzkum České republiky (AZV ČR) pod grantovým číslem NU21-03-00076 a projektu Národní ústav pro výzkum rakoviny (Program EXCELES, ID: LX22NPO5102) – Financováno Evropskou unií – Next Generation EU.

## Literatura

1. van de Donk NWCJ, Pawlyn C, Yong KL. Multiple myeloma. *Lancet* 2021; 397(10272): 410–427. doi: 10.1016/S0140-6736(21)00135-5.
2. Rajkumar SV. Multiple myeloma: 2022 update on diagnosis, risk-stratification and management. *Am J Hematol* 2022; 97(8): 1086–1107. doi: 10.1002/ajh.26590.
3. Maisnar V, Minařík J, Štork M et al. Epidemiologie. *Trans Hematol Dnes* 2023; 29 (Suppl 2): 26.
4. Furukawa Y, Kikuchi J. Molecular pathogenesis of multiple myeloma. *Int J Clin Oncol* 2015; 20(3): 413–422. doi: 10.1007/s10147-015-0837-0.
5. Chesi M, Bergsagel PL. Molecular pathogenesis of multiple myeloma: basic and clinical updates. *Int J Hematol* 2013; 97(3): 313–323. doi: 10.1007/s12185-013-1291-2.
6. Sevcikova S, Minarik J, Stork M et al. Extramedullary disease in multiple myeloma – controversies and future directions. *Blood Rev* 2019; 36: 32–39. doi: 10.1016/j.blre.2019.04.002.
7. Bansal R, Rakshit S, Kumar S. Extramedullary disease in multiple myeloma. *Blood Cancer J* 2021; 11(9): 161. doi: 10.1038/s41408-021-00527-y.

8. Hathi D, Chanswangphuwana C, Cho N et al. Ablation of VLA4 in multiple myeloma cells redirects tumor spread and prolongs survival. *Sci Rep* 2022; 12(1): 30. doi: 10.1038/s41598-021-03748-0.
9. Stessman HAF, Mansoor A, Zhan F et al. Reduced CXCR4 expression is associated with extramedullary disease in a mouse model of myeloma and predicts poor survival in multiple myeloma patients treated with bortezomib. *Leukemia* 2013; 27(10): 2075–2077. doi: 10.1038/leu.2013.148.
10. Gregorova J, Vychytilova-Faltejskova P, Krmarova T et al. Proteomic analysis of the bone marrow microenvironment in extramedullary multiple myeloma patients. *Neoplasma* 2022; 69(2): 412–424. doi: 10.4149/neo\_2021\_210527N715.
11. Besse L, Sedlarikova L, Kryukov F et al. Circulating serum microRNA-130a as a novel putative marker of extramedullary myeloma. *PloS One* 2015; 10(9): e0137294. doi: 10.1371/journal.pone.0137294.
12. Vlachová M, Gregorová J, Vychytilová-Faltejsková P et al. Involvement of small non-coding RNA and cell antigens in pathogenesis of extramedullary multiple myeloma. *Int J Mol Sci* 2022; 23(23): 14765. doi: 10.3390/ijms232314765.
13. Besse L, Sedlarikova L, Greslikova H et al. Cytogenetics in multiple myeloma patients progressing into extramedullary disease. *Eur J Haematol* 2016; 97(1): 93–100. doi: 10.1111/ejh.12688.
14. Jagosky MH, Usmani SZ. Extramedullary disease in multiple myeloma. *Curr Hematol Malig Rep* 2020; 15(2): 62–71. doi: 10.1007/s11899-020-00568-3.
15. D'Agostino M, Cairns DA, Lahuerta JJ et al. Second revision of the international staging system (R2-ISS) for overall survival in multiple myeloma: a European Myeloma Network (EMN) report within the HARMONY project. *J Clin Oncol* 2022; 40(29): 3406–3418. doi: 10.1200/JCO.21.02614.
16. Stork M, Sevcikova S, Minarik J et al. Identification of patients at high risk of secondary extramedullary multiple myeloma development. *Br J Haematol* 2022; 196(4): 954–962. doi: 10.1111/bjh.17925.
17. Bladé J, Beksac M, Caers J et al. Extramedullary disease in multiple myeloma: a systematic literature review. *Blood Cancer J* 2022; 12(3): 45. doi: 10.1038/s41408-022-00643-3.
18. Oakes SA. Endoplasmic reticulum stress signaling in cancer cells. *Am J Pathol* 2020; 190(5): 934–946. doi: 10.1016/j.ajpath.2020.01.010.
19. Dostálová A, Vlachová M, Gregorová J et al. The endoplasmic reticulum and its signaling pathways – a novel target for multiple myeloma treatment. *Klin Onkol* 2023; 37(6): 440–446. doi: 10.48095/ccko2023440.
20. Lynes EM, Simmen T. Urban planning of the endoplasmic reticulum (ER): how diverse mechanisms segregate the many functions of the ER. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1813(10): 1893–1905. doi: 10.1016/j.bbamcr.2011.06.011.
21. Hetz C, Zhang K, Kaufman RJ. Mechanism, regulation and functions of the unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2020; 21(8): 421–438. doi: 10.1038/s41580-020-0250-z.
22. Almanza A, Carlesso A, Chinthia C et al. Endoplasmic reticulum stress signalling – from basic mechanisms to clinical applications. *FEBS J* 2019; 286(2): 241–278. doi: 10.1111/febs.14608.
23. Nikesitch N, Lee JM, Ling S et al. Endoplasmic reticulum stress in the development of multiple myeloma and drug resistance. *Clin Transl Immunol* 2018; 7(1): e1007. doi: 10.1002/cti2.1007.
24. Polo TCF, Miot HA. Use of ROC curves in clinical and experimental studies. *J Vasc Bras* 2020; 19: e20200186. doi: 10.1590/1677-5449.200186.
25. Greipp PR, San Miguel J, Durie BGM et al. International staging system for multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2005; 23(15): 3412–3420. doi: 10.1200/JCO.2005.04.242.

26. Palumbo A, Avet-Loiseau H, Oliva S et al. Revised international staging system for multiple myeloma: a report from International Myeloma Working Group. *J Clin Oncol* 2015; 33(26): 2863–2869. doi: 10.1200/JCO.2015.61.2267.
27. Durie BG, Salmon SE. A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival. *Cancer* 1975; 36(3): 842–854. doi: 10.1002/1097-0142(197509)36:3< 842::aid-cncr2820360303>3.0.co;2-u.
28. Munshi NC, Hideshima T, Carrasco D et al. Identification of genes modulated in multiple myeloma using genetically identical twin samples. *Blood* 2004; 103(5): 1799–1806. doi: 10.1182/blood-2003-02-0402.
29. Vincenz L, Jäger R, O'Dwyer M et al. Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response: targeting the Achilles heel of multiple myeloma. *Mol Cancer Ther* 2013; 12(6): 831–843. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-12-0782.
30. Jauhainen A, Thomsen C, Strömbom L et al. Distinct cytoplasmic and nuclear functions of the stress induced protein DDIT3/CHOP/GADD153. *PLoS One* 2012; 7(4): e33208. doi: 10.1371/journal.pone.0033208.
31. Urra H, Dufey E, Lisbona F et al. When ER stress reaches a dead end. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1833(12): 3507–3517. doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.07.024.
32. Yu X, Zhai C, Fan Y et al. TUSC3: a novel tumour suppressor gene and its functional implications. *J Cell Mol Med* 2017; 21(9): 1711–1718. doi: 10.1111/jcmm.13128.
33. Vašíčková K, Horak P, Vaňhara P. TUSC3: functional duality of a cancer gene. *Cell Mol Life Sci* 2018; 75(5): 849–857. doi: 10.1007/s00018-017-2660-4.
34. Ibrahim IM, Abdelmalek DH, Elfiky AA. GRP78: a cell's response to stress. *Life Sci* 2019; 226: 156–163. doi: 10.1016/j.lfs.2019.04.022.
35. Ninkovic S, Harrison SJ, Quach H. Glucose-regulated protein 78 (GRP78) as a potential novel biomarker and therapeutic target in multiple myeloma. *Expert Rev Hematol* 2020; 13(11): 1201–1210. doi: 10.1080/17474086.2020.1830372.
36. Rasche L, Menoret E, Dubljevic V et al. A GRP78-directed monoclonal antibody recaptures response in refractory multiple myeloma with extramedullary involvement. *Clin Cancer Res* 2016; 22(17): 4341–4349. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-3111.
37. Saptarshi N, Porter LF, Paraoan L. PERK/EIF2AK3 integrates endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis, oxidative stress and autophagy responses in immortalised retinal pigment epithelial cells. *Sci Rep* 2022; 12(1): 13324. doi: 10.1038/s41598-022-16909-6.
38. Bagratuni T, Patseas D, Mavrianou-Koutsoukou N et al. Characterization of a PERK kinase inhibitor with anti-myeloma activity. *Cancers* 2020; 12(10): 2864. doi: 10.3390/cancers12102864.
39. Harnoss JM, Le Thomas A, Shemorry A et al. Disruption of IRE1 $\alpha$  through its kinase domain attenuates multiple myeloma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2019; 116(33): 16420–16429. doi: 10.1073/pnas.1906999116.
40. Bhutani M, Foureau DM, Atrash S et al. Extramedullary multiple myeloma. *Leukemia* 2020; 34(1): 1–20. doi: 10.1038/s41375-019-0660-0.
41. Al Saleh AS, Parmar HV, Visram A et al. Increased bone marrow plasma-cell percentage predicts outcomes in newly diagnosed multiple myeloma patients. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2020; 20(9): 596–601. doi: 10.1016/j.clml.2020.03.012.
42. Korbet SM, Schwartz MM. Multiple myeloma. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17(9): 2533–2545. doi: 10.1681/ASN.2006020139.
43. Yang J, Liu Z, Liu H et al. C-reactive protein promotes bone destruction in human myeloma through the CD32-p38 MAPK-Twist axis. *Sci Signal* 2017; 10(509): eaan6282. doi: 10.1126/scisignal.aan6282.