

Somatické mutace u myelodysplastického syndromu a jejich klinické využití

‡ Tomáš Stopka

BIOCEV a 1. interní klinika, 1. lékařská fakulta UK a VFN, Praha

‡ Autor participuje na vědeckém projektu Národní program udržitelnosti NPU č. LQ1604.

Myelodysplastický syndrom (MDS) je klonální krevní onemocnění vycházející z poškozených kmenových buněk, jež po fázi cytopenie často přechází v akutní myeloidní leukemii (AML). MDS je charakterizován rozličnými cyto-genetickými projevy včetně aberací chromozomů 5, 7, 8, 17 či jejich komplexními změnami. Recentně s objevem až stovek mutací rozličných genů se ukazuje, jak komplexní tato nemoc je. Nejvýznamnější somatické mutace postihují RNA-sestrih (SF3B1, SRSF2, ZRSR2, U2AF1, U2AF2); metylaci DNA (TET2, DNMT3A, IDH1/2); modifikaci chromatinu (ASXL1, EZH2); transkripční faktory (TP53, RUNX1); signální dráhy (KRAS, NRAS, CBL, NF1, PTPN11) včetně receptorových kináz (FLT3, JAK2); kohezinový komplex (STAG2, CTCF, SMC1A, RAD21); opravu DNA (ATM, BRCC3, DLRE1C, FANCL); a další méně zastoupené regulátory buněčných procesů. Předmětem následujících řádek je zhodnotit stav recentních poznatků o klíčových mutacích u MDS a zhodnotit východiska, jež tyto poznatky přináší pro klinickou praxi.

Genetické změny u MDS jsou známy již desítky let, a to prostřednictvím seminálních cytogenetických studií a nutno poznamenat, že i v roce 2016 je cytogenetické sledování MDS pacientů top prioritou, a to jak v době diagnózy, tak i při každém monitorování léčebné odpovědi. Cytogenetické nálezy jsou především součástí revidovaného prognostického indexu (IPSS-R), který je asociován s délkou přežití v jednotlivých pěti podskupinách.⁽¹⁾ Přítomnost získaných bodových somatických variant u MDS byla potvrzena celogenomovými metodami, aniž by zcela objasnila, jak budou klinicky využitelné po vzoru cytogenetických změn.⁽²⁾ Avšak nelze upřít fakt, že některé

z těchto mutací (TP53, EZH2, ETV6, RUNX1, ASXL1) asociují s kratším celkovým přežíváním pacientů.⁽³⁾ Vedle somatických změn nelze však zapomenout ani na germinální mutace, mimo jiné zjištěné u genů pro RUNX1, ANKRD26, DDX41, ETV6, GATA2, CEBPA and SRP72, a dále také na ne zcela prozkoumané predispozice pro vznik MDS, jež jsou v současnosti předmětem intenzivního výzkumu.⁽⁴⁾ Z uvedeného vyplývá, že jak cytogenetické, tak i bodové somatické změny jsou typické pro MDS a lze vypožorovat jejich předpokládaný vliv na patogenezi onemocnění. V současné době **je třeba v klinické praxi především určit precizně IPSS-R, zatímco prognostický index spojený s výsledky mutační analýzy (tzv. IPSS-Rm) je stále předmětem výzkumu** (jež také probíhá na pracovišti autora). Mutace lze identifikovat v buňkách kostní dřeně, ale abychom mohli spolehlivě odlišit somatické varianty od vrozených změn, je nutné mít k dispozici i materiál pacienta, jež tyto mutace nenese, například separované T-lymfocyty, stěr ústní sliznice apod. V neposlední řadě je třeba zmínit, že se rapidně rozvíjí i detekce mutací ze séra pacientů,⁽⁵⁾ což odráží vysoký obrát (vznik a zánik) nádorových buněk, které zanikají, zatímco jejich DNA je uvolňována do nebuňčné frakce periferní krve.

Cílem intenzivního výzkumu je nejen zjistit, jaké geny jsou u MDS mutovány, ale také zda postižené dráhy přispívají ke vzniku tohoto onemocnění, či „pouze“ modifikují jeho průběh (řidičské mutace), nebo jsou „pouhou“ koincidencí (pasažerské mutace) někdy zdlouhavého procesu patogeneze MDS. Také je nutné zdůraznit, že některé mutace jsou považovány za časně, a proto velmi pravdě-

podobně iniciační ve vztahu k MDS a jiné jsou považovány jen za následek klonální evoluce. Některé mutace byly na základě rozsáhlých studií asociovány s lepší prognózou vůči ostatním MDS pacientům, což se týká například mutací RNA-sestříhového aparátu (genů pro SF3B1), zatímco jiné jsou notoricky známé prediktory horší prognózy (TP53). Recentní celogenomové studie prokázaly vznik některých mutací ještě před vznikem MDS (CHIP, Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential), nebo se již objevují u zjevně primárních cytopenií před vypuknutím MDS (ICUS, Idiopathic Cytopenia of Unknown Significance).⁽⁶⁾ Z uvedeného vyplývá, že je nutno MDS pacienty sledovat z hlediska cytopenií již na úrovni anamnézy a zapisovat do karty, od kdy je pacient cytopenický a od kdy je diagnostikován dle MDS kritérií. Identifikace somatických změn je jedním ze způsobů potvrzení klonálního původu ICUS. **Jedním ze současných úkolů klinického hodnocení je také zmapovat incidenci ICUS a trvání progresu do MDS v českých zemích.**

Mutace RNA-sestříhového aparátu, jak je výše zmíněno, jsou detekovány nejčastěji u MDS a u některých podtypů jsou nalezeny až v 80 % případů. Například u RARS-MDS se toto týká mutací SF3B1, zatímco v neselektované skupině MDS pacientů je to jen 20 %.⁽³⁾ Také některé další podtypy MDS obsahují vyšší frekvenci mutací RNA sestříhového aparátu, jako například CMML (58 %). Co je RNA sestříhový aparát? Jedná se o proteiny, tvořící komplex tzv. „spliceozom“ v buněčném jádře, který se akumuluje na rozhraní exonu a intronu za účelem odstranění intronů z RNA. Pokud je tento mechanismus postižen, dochází k retenci intronu a poruše čtení přepisovaných genů v translačním aparátu. Výsledkem je porucha genové exprese vedoucí

ke poruše buněčných funkcí. Podle některých autorů vede porucha RNA sestříhu k bloku diferenciaci. Zatímco mutace SF3B1 (a také PRPF8) jsou spíše prognosticky příznivější, mutace ostatních členů sestříhové mašinerie (SRSF2, ZRSR2, U2AF1) nejsou s prognózou nijak spjaty a pokud ano, pak spíše nepříznivě a navíc se častěji nacházejí u jiných podtypů (CMML). Je dále nutné poznamenat, že mutace spliceozomu jsou vzájemně exkluzivní, tedy většinou je u jednoho MDS pacienta mutace jen jednoho z členů spliceozomu (SF3B1, SRSF2, ZRSR2); podobně je to i u mutací kohezinového komplexu u AML⁽⁷⁾ a MDS. Z těchto řádek lze učinit závěr, **že je vhodné sledovat mutace SF3B1, jež jsou asociovány s RARS-MDS a značí spíše dobrou prognózu MDS** (a to i v pozdějších fázích nemoci), a to i proto, že procento pozitivit RS (věnečkových sideroblastů) může být v nátěru menší a v tomto ohledu je přítomnost mutace jistě rozhodující. V poslední době je spliceozom považován za ideální terapeutický cíl a první klinické zkoušky s látkami inhibujícími RNA sestříh jsou plánovány již v roce 2016.⁽⁸⁾ Toto se týká látky E7107 (pladienolid B), u níž byl prokázán modulační efekt na RNA sestříh v preklinických modelech; toto klinické testování je již například schváleno pro léčbu solidních tumorů.⁽⁸⁾ Pro léčbu MDS, AML a CMML se připravuje selektivní inhibitor SF3B1 s názvem H3B-8800.⁽⁸⁾ Předpokládaný mechanismus účinku je postaven na předpokladu, že mutační status SF3B1 tlumí diferenciaci, ale neovlivňuje buněčnou viabilitu, zatímco inhibice produktu zbylé zdravé alely SF3B1 vede ke ztrátě schopnosti MDS buňky přežít.

Mezi druhé nejčastější somatické změny u MDS patří mutace v epigenetickém aparátu zajišťující metylaci (DNMT3A) DNA a histonu H3 (ASXL1, EZH2), či odstranění

Tabulka č. 1: Geny vhodné pro analýzu mutací u MDS

Gen	Genová funkce	Typ mutace	Effekt mutace	MDS Podtypy	Prognostika	Metoda SaS/NGS
SF3B1	RNA SESTRÍH	ZÁMĚNA, HOT SPOT	DOM. NEGATIVNÍ, POZITIV.	RARS, RARS-T	POZITIVNÍ	SaS
JAK2	RECEPTOR SIGNÁL.	V617F	DOM. POZITIV.	RARS-T, MPN, MF	POZITIVNÍ	PCR, SaS
TP53	GENOVÁ OPRAVA	ZÁMĚNA, INDEL (+ GERMINÁLNÍ)	ZTRÁTA FUNKCE	5q-, tMDS	NEGATIVNÍ	SaS, NGS
ASXL1	CHROMATIN	INDEL EX12	DOM. NEGATIVNÍ	CMML, MPN	NEGATIVNÍ	SaS, NGS, WB?
RUNX1	TRANSKRIPCE	ZÁMĚNA, INDEL (+ GERMINÁLNÍ)	DOM. NEGATIVNÍ, ZTRÁTA FUNKCE	tMDS, MDS/AML	NEGATIVNÍ	SaS, NGS

metylace DNA (TET2, IDH1/2).⁽⁹⁾ Jak metylace DNA ovlivňuje patogenezi MDS? Bylo prokázáno, že mutace DNMT3A v myším modelu vedou ke vzniku myeloproliferativní nemoci s dysplastickými rysy.⁽¹⁰⁾ Role inaktivace DNMT3A byla ukázána i v lidských kmenových buňkách, kde vedla k poruše diferenciaci. Přes mnohé nejasnosti byl také prokázán vliv inhibitorů DNA metyl transferázy I na přežívání MDS pacientů s vyšším rizikem (24,5 vs. 15,0 měsíců; $p = 0,0001$) v rámci studie AZA001 a dalších studií.⁽¹¹⁾ Mutace DNMT3A patří mezi mutace s horším rizikem a toto platí i (společně s mutací TP53) pro pacienty léčené azacitidinem (AZA).⁽¹²⁾ Mutace TET2 a IDH1/2 působí v zásadě opačně a tlumí DNA demetylaci, ale současně se účastní odpovědi na poškození DNA.⁽¹³⁾ Je důležité poznamenat, že TET2 a IDH zajišťují na železe závislý proces produkce/výměny citrátu za alfa ketoglutarát (α KG) během Krebsova cyklu. Výsledkem je akumulace 2-hydroxyglutarátu (2HG), jež inhibuje funkci TET2. Podobně jako DNMT3A ovlivňuje i TET2 biologické vlastnosti kmenových buněk. Mutace TET2 (a také ASXL1 a DNMT3A) byly rovněž pozorovány u starších, ale v zásadě zdravých jedinců s klonální krvetvorbou (CHIP).⁽¹⁴⁾ **Mutace TET2 ani IDH1/2 překvapivě neovlivňují trvání odpovědi na AZA či celkové přežívání, avšak mají snad jistý význam v predikci odpovědi na terapii s AZA.** Přes značný optimismus z hlediska role epigenetických regulátorů v patogenezi MDS je testování mutací v genech TET2, IDH a DNMT3A prozatím součástí spíše vědeckých projektů než rutinního sledování. Jedinou výjimku snad mohou tvořit pacienti s mutacemi IDH, kteří vstupují do studií s inhibitory IDH. Detekci mutací IDH je možné obejít měřením hladiny 2HG. Je podstatné, že inhibitory IDH celkově snižují hladinu α KG, což vede k potlačení nádorového epigenetického procesu, jež umožňuje kmenovým buňkám dostatečnou buněčnou diferenciaci.⁽¹⁵⁾

Mezi další epigenetické regulátory, které fungují na úrovni modifikací histonových proteinů, patří ASXL1 a EZH2. EZH2 značí *Enhancer of Zeste Homolog 2* a představuje enzym, metyltransferázu, jež katalyzuje metylaci rezidua histonu H3 lysinu K27. EZH2 je tedy podobně jako DNMT3A spíše zahrnut v inhibici genové exprese, jelikož ovlivňuje funkci komplexu s názvem *Polycomb Repressive Complex 2* (PRC2), jež se účastní rozličného vypínání genové exprese, například i v průběhu inaktivace X chromozómu. Řada prací ukázala, že metylace H3K27 a metylace DNA se vzájemně doplňují a překrývají na genových oblastech podle instrukcí některých transkripčních faktorů. Mutace EZH2 u MDS zjevně asociují s významným rizi-

kem transformace do AML, avšak jejich abundance je pod 5 %, a tedy pro reálnou prognostiku, se *de facto* nehodí. ASXL1 značí *Addition of Sex Comb Like 1* a též se jedná, podobně jako u EZH2, o bílkovinu, která spolupracuje v rámci inhibičního PRC2 komplexu. Mutace se objevují v tzv. hot spot (horké místo) oblasti 5' konce 12. exonu, jež vedou ke ztrátě exprese ASXL1, nebo ke zkrácení proteinového produktu, jež lze dokonce detekovat na proteinové úrovni.⁽¹⁶⁾ Podobně jako TET2 a IDH, mutace ASXL1 mají údajně relativně pozitivní vliv na odpověď na terapii s AZA (v případě koexistence mutace pro TET2), ale celkově jsou považovány za negativní prognostický marker stran přežívání. Abychom zrekapitulovali tento odstavec, zatímco mutace EZH2 postihují minimum pacientů, jejich predikční úroveň (negativní prognózy) je vysoká. Přesto se testování mutací u EZH2 může hodit pro pacienty vstupující do klinických studií s rozličnými EZH2 inhibitory. Pro prognostiku se spíše vyplatí analyzovat mutace ASXL1, jež lze snadno zjistit Sangerovským sekvenováním (SaS) a jejichž predikční schopnost celkového přežívání je také relativně vysoká.

Významná, i z hlediska MDS, je analýza mutací signálních drah, a to především genů JAK2, NRAS/KRAS, FLT3 a KIT. Přestože se nacházejí u minima MDS pacientů, mají značný význam. Především testování mutace JAK2 V617F se uplatní také pro diferenciální diagnostiku myelofibrózy a v diagnostice a terapii MDS typu RARS-T, jež může být v některých případech léčen Lenalidomidem.⁽¹⁷⁾ Další ze zmiňovaných mutací se uplatňují pro diferenciálně diagnostické či prognostické účely, avšak pro rutinní využití u MDS se prozatím nepoužívají.

Další mutace u MDS jsou zjištěny u transkripčních faktorů. Je zajímavé, že některé transkripční faktory mohou být mutovány v zárodečné linii a být kauzální příčinou vrozených nádorových syndromů; toto platí například pro GATA2,⁽¹⁸⁾ ale i pro některé další geny (RUNX1, CEBPA). Současně mohou být tyto geny i cíli somatických mutací v dospělém věku. Takovým příkladem je právě RUNX1 (alias AML1), jež je přítomen asi u 20 % případů MDS, ale může predisponovat k familiární trombocytopenii asociované se vznikem AML. Jak RUNX1 ovlivňuje krvetvorbu, je popsáno v literatuře. Zkráceně, RUNX1 se účastní vývoje časných krvetvorby na úrovni vzniku hematopoetické kmenové buňky a RUNX1 také významně ovlivňuje její vývoj do stadia časných progenitorů.⁽¹⁹⁾ Jeho role tkví především v tom, že zajišťuje regulaci exprese dalších transkripčních

faktorů krvetvorby. Mutace RUNX1 tedy povedou k potlačení krvetvorné diferenciace. Mutace RUNX1 jsou typické pro tMDS a též jsou častější u MDS s vyšším rizikem dle IPSS-R. RUNX1 může být součástí fúzních genů (AML1-ETO či EVI1-RUNX1) u jiných malignit. V neposlední řadě může být gen pro RUNX1 amplifikován podobně jako například gen pro MYC. **Zjišťování mutací pro RUNX1 u MDS pacientů s vysokým rizikem může být přínosné i přes náročnost sekvenování** a může být instruktivní pro porozumění klonální evoluce jednotlivých pacientů. Pro běžné rutinní vyšetřování se však prozatím nepoužívá. Podobné je to i s transkripčním faktorem ETV6, jehož mutace jsou též prognosticky nepříznivé a jež se též nachází u některých fúzních transgenů (TEL-AML1) u jiných malignit.

Jedním z dlouhodobě sledovaných a stále diskutovaných faktorů je TP53, či zkráceně p53, jež je mutován u většiny nádorů včetně nádorů krve a ve většině případů jeho mutace značí negativní prognózu. Mutace p53 jsou též často detekovány u tMDS. Problémem mutací p53 je však i jejich falešná pozitivita a zdá se, že v některých případech nemusí přítomnost mutace znamenat zcela negativní prognózu. Vedle mutačního stavu p53 je také hojně využívána FISH na 17p13, ale ta pravděpodobně zcela nenahradí mutační analýzu. U některých podtypů MDS (5q- syndrom) jsou dokonce mutace p53 relativně častější a značí negativní prognózu a sníženou odpověď na lenalidomid, pokud je jeho alelická frekvence vyšší než 6 %.⁽²⁰⁾ Některé práce zdůrazňují spolehlivost klinického významu mutace p53 od 20 % alelické frekvence mutace.⁽²¹⁾ Také u pacientů s vyšším rizikem je přežívání na AZA výrazně kratší, pokud nesou mutace p53 (9,4 vs. 20,7 měsíců, $P < 0,001$).⁽²²⁾ Přihlédneme-li k alelické frekvenci a uplatníme-li stringentní kritéria mutačního typu, **pak lze mutace p53 s výhodou používat pro odhad negativní prognózy vývoje MDS ve všech jeho podtypech.**

Abych shrnul nejnovější poznatky a zmínil i některá doporučení (viz tabulka č. 1), v současnosti je výhodou analyzovat mutace u MDS především u těchto genů (SF3B1, JAK2, TP53, ASXL1, RUNX1). Mutace SF3B1 a JAK2 je důležité sledovat spíše u MDS s nízkým rizikem, například pro indikaci léčby lenalidomidem u RARS-T, či pro prognostické nebo diferenciální diagnostické účely. Využití mutačního stavu p53 je vhodné u většiny podtypů MDS včetně 5q- syndromu léčeného lenalidomidem. Mutace ASXL1 je vhodné identifikovat pro určení některých podtypů (CMML), nebo odhad odpovědi na AZA u MDS s vysokým rizikem (společ-

ně s p53 a RUNX1). Je doporučeno i využití sekvenáčnických přístupů pro detekci familiárního výskytu mutací (TP53, RUNX1, CEBPA, GATA2) v rodinách s častějším výskytem malignit.⁽²³⁾ Mezi velmi diskutované přístupy v současnosti patří i detekce mutací (DNMT3A, ASXL1, TET2) u případů vedoucích k MDS, tedy ICUS a CHIP, tak jak byly diskutovány výše. Asi nejdůležitější problém detekce mutací u MDS je, že během léčby dochází k rapidním změnám v zastoupení klonů a mutace tzv. „mizí a jsou nahrazeny novými“, neboli dochází k tomu, že jeden klon převažuje na základě schopnosti přežít (v tomto konkrétním případě na lenalidomidu).⁽²⁴⁾ Toto zjištění podobně i jako prozatím nepublikované výsledky autora vedou k předběžnému závěru, **že detekce mutací by se měla opakovat v době, kdy dochází k „restázování“ nemoci** s využitím technologie Next Generation Sequencing (NGS) s analýzou ~25-50 genu na jeden vzorek.⁽²⁵⁾ Je také otázkou, který klon v hypotetickém MDS je vůči pacientovi nejagresivnější. Existují xenotransplantační přístupy, kdy se buňky kostní dřene MDS pacienta transplantují do geneticky upravené myši a sleduje se mutační stav nádorových buněk, které přežijí. Tato technologie se označuje jako patientské xenotransplantáty (patient-derived xenografts). Přes zpočátku slibné úspěchy této strategie však prozatím přetrvává celá řada technických problémů v tomto směru,⁽²⁶⁾ který by umožnil testovat léčebné možnosti pro MDS na způsob individualizované terapie. Přesto je patrné, že vysoká heterogenita MDS bude takový či podobný přístup do budoucna vyžadovat. V nejbližší budoucnosti je stále prioritou především detekce vybraných mutací JAK2, SF3B1, IDH1/2 či EZH2 pro správnou indikaci některých MDS pacientů do klinických studií se specifickými inhibitory těchto proteinů, zatímco další mutační analýzy (p53, ASXL1, RUNX1) mají spíše důvod orientačně prognostický.

prof. MUDr. Tomáš Stopka, Ph.D.
BIOCEV a 1. interní klinika,
1. lékařská fakulta UK a VFN, Praha
e-mail: tstopka@lf1.cuni.cz

Literatura

- Greenberg PL, et al. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood* 2012;120(12):2454-2465.
- Bejar R & Ebert BL. The genetic basis of myelodysplastic syndromes. *Hematology/oncology clinics of North America* 2010;24(2):295-315.
- Bejar R, et al. Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes. *The New England journal of medicine* 2011; 364(26):2496-2506.

4. DiNardo CD, et al. Evaluation of Patients and Families With Concern for Predispositions to Hematologic Malignancies Within the Hereditary Hematologic Malignancy Clinic (HHMC). *Clinical lymphoma, myeloma & leukemia* 2016;16(7):417-428 e412.
5. Suzuki Y, et al. Peripheral blood cell-free DNA is an alternative tumor DNA source reflecting disease status in myelodysplastic syndromes. *Cancer science*. 2016.
6. Steensma DP, et al. Clonal hematopoiesis of indeterminate potential and its distinction from myelodysplastic syndromes. *Blood* 2015.
7. Welch JS, et al. The origin and evolution of mutations in acute myeloid leukemia. *Cell* 2012;150(2):264-278.
8. Brierley CK & Steensma DP. Targeting Splicing in the Treatment of Myelodysplastic Syndromes and Other Myeloid Neoplasms. *Current hematologic malignancy reports*. 2016.
9. Shih AH, Abdel-Wahab O, Patel JP, & Levine RL. The role of mutations in epigenetic regulators in myeloid malignancies. *Nat Rev Cancer* 2012;12(9):599-612.
10. Guryanova OA, et al. Dnmt3a regulates myeloproliferation and liver-specific expansion of hematopoietic stem and progenitor cells. *Leukemia* 2016;30(5):1133-1142.
11. Fenaux P & Ades L Review of azacitidine trials in Intermediate-2 and High-risk myelodysplastic syndromes. *Leukemia research* 2009;33 Suppl 2:S7-11.
12. Jung SH, et al. Somatic mutations predict outcomes of hypomethylating therapy in patients with myelodysplastic syndrome. *Oncotarget* 2016.
13. Inoue S, Lemonnier F & Mak TW Roles of IDH1/2 and TET2 mutations in myeloid disorders. *International journal of hematology* 2016;103(6):627-633.
14. Genovese G, et al. Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk inferred from blood DNA sequence. *The New England journal of medicine* 2014;371(26):2477-2487.
15. Dang L, Yen K. & Attar EC IDH mutations in cancer and progress toward development of targeted therapeutics. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 2016;27(4):599-608.
16. Inoue D, et al. Truncation mutants of ASXL1 observed in myeloid malignancies are expressed at detectable protein levels. *Experimental hematology* 2016;44(3):172-176 e171.
17. Hatzimichael E, et al. Durable response to lenalidomide in a patient with myelodysplastic syndrome associated with isolated 5q deletion and JAK2 V617F mutation despite discontinuation of treatment. *Molecular and clinical oncology* 2016;5(1):23-26.
18. Wlodarski MW, et al. Prevalence, clinical characteristics, and prognosis of GATA2-related myelodysplastic syndromes in children and adolescents. *Blood* 2016;127(11):1387-1397; quiz 1518.
19. Behrens K, et al. Runx1 downregulates stem cell and megakaryocytic transcription programs that support niche interactions. *Blood* 2016;127(26):3369-3381.
20. Belickova M, et al. TP53 mutation variant allele frequency is a potential predictor for clinical outcome of patients with lower-risk myelodysplastic syndromes. *Oncotarget* 2016.
21. Sallman DA, et al. Impact of TP53 mutation variant allele frequency on phenotype and outcomes in myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 2016;30(3):666-673.
22. Takahashi K, et al. Clinical implications of TP53 mutations in myelodysplastic syndromes treated with hypomethylating agents. *Oncotarget* 2016;7(12):14172-14187.
23. Babushok DV, Bessler M. & Olson TS. Genetic predisposition to myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia in children and young adults. *Leukemia & lymphoma* 2016;57(3):520-536.
24. Mossner M, et al. Mutational hierarchies in myelodysplastic syndromes dynamically adapt and evolve upon therapy response and failure. *Blood*. 2016.
25. Bartels S, Schipper E, Hasemeier B, Kreipe H. & Lehmann U. Routine clinical mutation profiling using next generation sequencing and a customized gene panel improves diagnostic precision in myeloid neoplasms. *Oncotarget*. 2016.
26. Salari A, et al. Establishing a murine xenograft-model for long-term analysis of factors inducing chromosomal instability in myelodysplastic syndrome: Pitfalls and successes. *Cancer genetics* 2016;209(6):258-266.