

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Genetika, molekulární biologie a virologie



Bc. Kristina Rochlová

Komplexní chromozomové aberace v buňkách kostní dřeně dospělých pacientů s myelodysplastickými syndromy (MDS): frekvence, mechanismus vzniku a klinický význam

Complex chromosomal aberrations in bone marrow cells of adult patients with myelodysplastic syndromes (MDS): frequency, mechanism of origin and clinical significance

Diplomová práce

Vedoucí práce: doc. RNDr. Zuzana Zemanová, CSc.

Odborná konzultantka: RNDr. Libuše Lizcová, Ph.D.

Praha, 2023

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou 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

Bc. Kristina Rochlová

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala všem, bez jejichž pomoci by tato diplomová práce nemohla vzniknout.

Děkuji především své školitelce doc. RNDr. Zuzaně Zemanové, CSc. za odborné vedení, cenné rady a veškerou podporu. Rovněž děkuji celému kolektivu Centra nádorové cytogenomiky, Ústavu lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky, Všeobecné fakultní nemocnice a 1. LF UK a Oddělení cytogenetiky Ústavu hematologie a krevní transfuze za přátelské a zároveň profesionální pracovní prostředí, které mi umožnilo získat řadu zkušeností. Děkuji také za finanční podporu zajištěnou výzkumným grantem RVO-VFN64165. V neposlední řadě si poděkování zaslouží i má rodina za to, že mi byla oporou a vytvořila příznivé podmínky pro psaní této práce.

Abstrakt

Komplexní chromozomové aberace jsou popisovány přibližně u 20 % pacientů s myelodysplastickými syndromy (MDS) a jsou asociovány se špatnou prognózou. Mechanizmy a možné příčiny zodpovědné za vznik těchto aberací však nejsou zcela jasné. Byly popsány dva modely, a to rozpad jednotlivých chromozomů či jejich částí během tzv. buněčné krize (chromothripsis) a/nebo postupná kumulace chromozomových aberací v průběhu onemocnění (klonální vývoj). Kombinací cytogenomických metod jsme vyšetřili 61 vzorků kostní dřeně dospělých nemocných s MDS a komplexním karyotypem. Ve většině případů jsme našli nebalancované aberace spojené se ztrátami genetického materiálu. Do přestaveb nejčastěji vstupovaly chromozomy 5, 7 a 12. Klonální vývoj jsme detekovali u 26, chromothripsis u 12 a oba mechanismy u 14 nemocných. Nejkratší celkové přežití měli pacienti s deletovaným chromozomem 5 zahrnutým do komplexních přestaveb. Příčina vzniku komplexních aberací neměla na přežití vliv. Cytogenomická analýza komplexních aberací umožňuje detekovat balancované i nebalancované změny a identifikovat významné procesy tumorigeneze jako je klonální vývoj a chromothripsis. Studium chromozomových aberací a identifikace mechanismů, které hrají významnou roli v průběhu onemocnění, se tak výrazně podílí na správném stanovení diagnózy a prognózy nemocných a může významně přispět k vývoji nových léčebných intervencí.

Klíčová slova: chromozomové aberace, komplexní přestavby, chromothripsis, klonální vývoj, myelodysplastické syndromy

Abstract

Complex chromosomal aberrations occurs are described in approximately 20 % of patients with myelodysplastic syndrome (MDS) and are associated with a poor prognosis. Nevertheless, the mechanism and possible causes responsible for the emergence of these aberrations are not fully understood. There are two models describing the emergence of these aberrations, namely shattering of single chromosomes or their parts during the so-called cellular crisis (chromothripsis) and/or progressive accumulation of chromosomal aberrations during the course of the disease (clonal evolution). Using combination of cytogenomic methods we examined 61 samples of bone marrow from adult patients with MDS and a complex karyotype. Unbalanced aberrations with loss of genetical material were found in most cases. Chromosomes 5, 7 and 12 were most frequently involved in rearrangements. Clonal development, chromothripsis and both mechanism was detected in 26, 12 and 14 patients, respectively. Patients with deleted chromosome 5 included in complex karyotype had the shortest overall survival. The cause of emergence of complex aberrations did not affect survival. Cytogenomic analysis of complex aberrations allows detection of balanced and unbalanced changes and identification of important processes of tumorigenesis such as clonal evolution and chromothripsis. Thus, the study of chromosomal aberration and identification of mechanism that play significant role in the course of the disease contributes to the correct diagnosis and prognosis of patients and might contribute to the development of new therapeutic interventions.

Key words: chromosomal aberrations, complex rearrangements, myelodysplastic syndromes, chromothripsis, clonal evolution

Obsah

Úvod.....	1
1 Literární rešerše.....	3
1.1 Chromozomové aberace v nádorových buňkách.....	3
1.1.1 Nenáhodné a náhodné chromozomové aberace.....	3
1.1.2 Cytogenetické a molekulárně-genetické změny u MDS.....	4
1.2 Komplexní chromozomové aberace.....	11
1.2.1 Mechanizmy a možné příčiny vzniku komplexních karyotypů.....	12
1.2.2 Klonální vývoj.....	12
1.2.3 Chromothripsis.....	17
1.3 Myelodysplastické syndromy.....	24
1.3.1 Charakteristické znaky a klinické projevy.....	24
1.3.2 Klasifikace MDS.....	25
1.3.3 Léčebné postupy.....	31
2 Cíle práce.....	33
3 Materiál.....	34
3.1 Soubor pacientů.....	34
3.2 Použité chemikálie, roztoky a sondy.....	37
3.2.1 Chemikálie.....	37
3.2.2 Roztoky.....	39
3.2.3 Sondy.....	40
4 Metodika.....	44
4.1 Konvenční cytogenetická analýza.....	44
4.1.1 Kultivace buněk kostní dřeně.....	44
4.1.2 Zpracování buněčných kultur.....	44
4.1.3 Barvení preparátů.....	45

4.1.4	Analýza karyotypu	46
4.2	Molekulárně-cytogenetická analýza	46
4.2.1	I-FISH	46
4.2.2	mFISH a mBAND.....	49
4.2.3	Mikročipové technologie	50
4.3	Statistické zhodnocení výsledků.....	54
5	Výsledky	55
5.1	Analýza karyotypu (klasické G-pruhování + mFISH/mBAND).....	55
5.2	Molekulárně-cytogenetická analýza	61
5.3	Analýza přežití a současný klinický stav	68
6	Diskuze	72
7	Závěr	80
	Seznam použitých zdrojů.....	82
	Přílohy.....	109

Seznam použitých zkratk

(M/k) bp	(mega/kilo) base pair	(mega/kilo) párů bází
aCGH	array comparative genomic hybridization	komparativní genomová hybridizace na čípech
alt-EJ	alternative end-joining	alternativní spojování konců
AML	acute myeloid leukemia	akutní myeloidní leukemie
APC	APC regulator WNT signaling pathway	APC regulátor WNT signalační dráhy
<i>ASXL1</i>	<i>ASXL1</i> transcriptional regulator 1	<i>ASXL1</i> transkripční regulátor 1
<i>ATRX</i>	<i>ATRX</i> chromatin remodeler	
aUPD	acquired uniparental disomy	získaná uniparentální dizomie
BFB	breakage-fusion-bridge	
BrdU	bromodeoxyuridine	bromdeoxyuridin
BSA	bovine serum albumin	hovězí sérový albumin
CCD	chargé coupled device	digitální chlazená kamera
<i>CDC25C</i>	cell division cycle 25C	
CDR	commonly deleted region	společná deletovaná oblast
CEP	chromosome enumeration probes	centromerické sondy
CLL	chronic lymphocytic leukemia	chronická lymfatická leukemie
CMML	chronic myelomonocytic leukemia	chronická myelomonocytární leukemie
cnLOH	copy number neutral loss of heterozygosity	získaná uniparentální dizomie
CNV	copy number variation	variabilita počtu kopií
<i>CTNNA1</i>	casein kinase 1 alpha 1	gen pro kasein kinázu 1 alfa
DAPI	4',6-diamidin-2-phenylindole	4',6-diamidin-2-fenylindol
<i>DNMT3A</i>	DNA methyltransferase 3 alpha	DNA methyltransferáza 3 alfa
EFS	event free survival	přežití do události
EGR1	early growth response 1	časná růstová odpověď 1
<i>ETV6</i>	ETS variant transcription factor 6	
<i>EZH2</i>	enhancer of zeste 2 polycomb repressive complex 2 subunit	
FAB	French-American-British co-operative group	Francouzsko-americko-britsko kooperativní skupina

FISH	fluorescence <i>in situ</i> hybridization	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
<i>FLT3</i>	Fms related receptor tyrosine kinase 3	
FoSTeS	fork stalling and template switching	zastavení replikační vidličky a výměna templátů
<i>GATA2</i>	GATA binding protein 2	
HSC	hematopoetic stem cell	hematopoetická kmenová buňka
ICC	International Consensus Classification	Mezinárodní konsensuální klasifikace
<i>IDH2</i>	isocitrate dehydrogenase (NADP(+)) 2	izocitrát dehydrogenáza (NADP(+)) 2
I-FISH	interphase fluorescence <i>in situ</i> hybridization	interfázni fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
IPSS	International Prognostic Scoring System	Mezinárodní prognostický skórovací systém
IPSS-M	The International Prognostic Scoring System – Molecular	Molekulární mezinárodní prognostický skórovací systém
IPSS-R	International Prognostic Scoring System Revised	Revidovaný mezinárodní prognostický skórovací systém
ISCN	An International System for Human Cytogenomic Nomenclature	Mezinárodní cytogenomická nomenklatura
<i>JAK2</i>	Janus kinase 2	
<i>KMT2A</i>	lysine methyltransferase 2A	lyzin methyltransferáza 2A
LIG4	DNA ligase 4	DNA ligáza 4
LOH	loss of heterozygosity	ztráta heterozygosity
LSI	locus-specific identifier probes	lokus-specifické sondy
mBAND	multicolor chromosome banding	mnohobarevné pruhování
MDS	myelodysplastic syndromes	myelodysplastický syndrom
MDS/AML	AML with myelodysplasia-related changes	AML s myelodysplastickými rysy
MDS-EB	MDS with excess blasts	MDS s přebytkem blastů
MDS-EB-1	MDS with excess blasts 1	MDS s přebytkem blastů 1
MDS-EB-2	MDS with excess blasts 2	MDS s přebytkem blastů 2
MDS-f	MDS with fibrosis	MDS s fibrózou
MDS-h	MDS, hypoplastic	MDS hypoplastický
MDS-IB1	MDS with increased blasts1	MDS se zvýšeným počtem blastů typu 1

MDS-IB2	MDS with increased blasts 2	MDS se zvýšeným počtem blastů typu 2
MDS-LB	MDS with low blasts	MDS s nízkým počtem blastů
MDS-MLD	MDS with multilineage dysplasia	MDS s multilineární dysplázií
MDS-NOS	MDS, nonspecified	MDS nespecifikovaný
MDS-RS	MDS with ring sideroblasts	MDS s prstenčitými sideroblasty
MDS-RS-MLD	MDS-RS with multilineage dysplasia	MDS-RS s multilineární dysplázií
MDS-RS-SLD	MDS and single lineage dysplasia	MDS-RS s jednou dysplastickou linií
MDS-SLD	MDS with single lineage dysplasia	MDS s unilineární dysplázií
MDS-U	MDS, unclassifiable	MDS neklasifikovaný
MDS-U	MDS, unclassifiable	MDS neklasifikovaný
mFISH	multicolor FISH	mnohobarevná fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
miR-145	micorRNA 145	mikroRNA 145
MMBIR	microhomology-mediated break-induced replication	replikace umožněná prostřednictvím mikrohomologií
NGS	next generation sequencing	sekvenování nové generace
NHEJ	non-homologous end joining	spojování nehomologních konců DNA řetězců
NLS	nuclear localization sequence	jaderná lokalizační sekvence
NP-40	nonyl phenoxypolyethoxyethanol 40	nonyl fenoxypolyetoxyethanol 40
<i>NPM1</i>	nucleophosmin 1	nukleofosmin 1
OS	overall survival	celkové přežití
<i>PRPF40B</i>	pre-mRNA processing factor 40 homolog B	
<i>PRPF8</i>	pre-mRNA processing factor 8	
RA	refractory anemia	refrakterní anémie
RAEB	refractory anemia with excess of blasts	refrakterní anémie s přebytkem blastů
RAEB-T	refractory anemia with excess of blasts in transformation	refrakterní anémie s přebytkem blastů v transformaci
RARS	refractory anemia with ring sideroblasts	refrakterní anémie s prstenčitými sideroblasty
RPS14	ribosomal protein S14	ribosomální protein S14
<i>SF1</i>	splicing factor 1	sestříhový faktor 1

<i>SF3A1</i>	splicing factor 3a subunit 1	sestříhový faktor 3a podjednotka 1
<i>SF3B1</i>	splicing factor 3b subunit 1	sestříhový faktor 3b podjednotka 1
SNP	single nucleotide polymorphism	jednonukleotidový polymorfismus
<i>SRSF2</i>	serine and arginine rich splicing factor 2	sestříhový faktor 2 bohatý na serin a arginin
TAE	Tris-acetate-EDTA	Tris-acetát-EDTA
TE	Tris-EDTA	Tris-EDTA
<i>TET2</i>	Tet methylcytosine dioxygenase 2	Tet methylcytosin dioxygenáza 2
<i>TP53</i>	tumor protein 53	tumorový protein p53
<i>U2AF1</i>	U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1	
<i>U2AF65</i>	U2 small nuclear RNA auxiliary factor 2	
WHO	World Health Organization	Světová zdravotnická organizace
XRCC4	X-ray repair cross complementing 4	
<i>ZRSR2</i>	zinc finger CCCH-type, RNA binding motif and serine/arginine rich 2	

ISCN nomenklatura

-	loss of chromosome	ztráta chromozomu
+	additional normal or abnormal chromosome	nadpočetné normální či aberované chromozomy
amp	amplification	amplifikace
arr	microarray	mikročip
cth	chromothripsis	chromothripsis
del	deletion	delece
der	derivative chromosome	derivovaný chromozom
dic	dicentric chromosome	dicentrický chromozom
dmin	double minute	double minute
dup	duplication	duplikace
chr	chromosome	chromozom
i	isochromosome	izochromozom
idem	the stemline karyotype in subclones	označení pro původní karyotyp v příbuzných subklonech
ider	isoderivative chromosome	izoderivovaný chromozom
idic	isodicentric chromosome	izodicentrický chromozom
inc	incomplete karyotype	nekompletní karyotyp
ins	insertion	inzerce
inv	inversion	inverze
ish	<i>in situ</i> hybridization	<i>in situ</i> hybridizace
mar	marker chromosome	marker chromozom
p	short arms	krátká ramena
psu	pseudo	pseudo
pter	terminal part of short arms	terminální část krátkých ramen
q	long arms	dlouhá ramena
qter	terminal part of long arms	terminální část dlouhých ramen
r	ring chromosome	kruhový chromozom
t	translocation	translokace

Úvod

Analýza genomu nádorových buněk je nedílnou součástí vyšetření nemocných s hematologickými malignitami. Nálezy z chromozomových analýz mají významný podíl na upřesnění diagnózy a prognózy nemocných. Umožňují monitorovat úspěšnost terapie a včas detekovat remisi či relaps onemocnění. Na základě dosavadních poznatků víme, že chromozomové aberace v nádorových buňkách bývají specifické pro daný typ nádoru. Detailní analýza chromozomových aberací umožňuje detekovat chromozomy, chromozomové oblasti a konkrétní zlomová místa, které bývají do přestaveb zahrnuty nejčastěji. Následná analýza na molekulární úrovni má potenciál odhalit možné mechanismy jejich vzniku, důsledky pro patogenezi, progresi a prognózu onemocnění (Bernard et al., 2022; Haase, 2008).

Nádorové buňky jsou charakteristické velkou mírou nestability genomu, která může vyústit až vznikem komplexního karyotypu. Komplexní chromozomové přestavby jsou definovány jako numerické či strukturní změny, které zahrnují alespoň tři chromozomy a/nebo strukturní přestavby, při kterých dochází ke třem a více zlomům na chromozomech (Schoch et al., 2001). Rozvoj nových cytogenomických metod s sebou přinesl zjištění, že se komplexní karyotypy vyskytují mnohem častěji, než se dříve předpokládalo. Odhaduje se, že existuje spojitost mezi agresivitou nádorového onemocnění a vznikem buněčných klonů se sekundárními aberacemi a komplexními přestavbami (Shahjahani et al., 2019). Přesné příčiny vzniku komplexních karyotypů zatím nejsou zcela jasné. Klasické schéma nádorové transformace buněk předpokládá postupný vznik aberací náhodně v celém genomu a jejich hromadění se v průběhu času, tj. v důsledku postupného klonálního vývoje (Nowell, 1976). Další možností může být katastrofická událost zvaná chromothripsis, během které dojde k masivnímu rozpadu jednoho či více chromozomů na malé fragmenty. Následkem špatných reparačních procesů jsou tyto fragmenty spojovány chybně a vznikají vysoce přestavěné chromozomy, které generují velké množství tumorogenních mutačních změn (Stephens et al., 2011).

Myelodysplastické syndromy (MDS) jsou heterogenní skupina klonálních onemocnění krvetvorby. Charakteristickými klinickými znaky jsou morfologická dysplázie kostní dřeně, cytopenie v periferní krvi a zvýšené riziko transformace do akutní myeloidní leukemie (AML) (Novák et al., 2021). Dle současných odhadů je incidence onemocnění značně podhodnocená a skutečný výskyt MDS bude pravděpodobně mnohem vyšší. Narůstající počty nových případů mohou zřejmě souviset s prodlužujícím se věkem populace a zvyšující se expozicí nejrůznějším

toxickým látkám (Zeidan et al., 2019). I přes rozsáhlý výzkum zatím nebyla patogeneze MDS zcela jasně vysvětlena. Předpokládá se, že se obdobně jako u ostatních nádorových onemocnění jedná o vícestupňový proces hromadění genetických a epigenetických změn, který zvrátí vývoj normální buňky v buňku nádorovou (da Silva-Coelho et al., 2017).

V diplomové práci jsem se zaměřila na detailní analýzu komplexních karyotypů detekovaných v době stanovení diagnózy u dospělých pacientů s myelodysplastickými syndromy. V Centru nádorové cytogenomiky Ústavu lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky Všeobecné fakultní nemocnice a 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy jsme identifikovali a charakterizovali nalezené chromozomové změny a posoudili jejich prognostický význam. K detekci chromozomových aberací jsme využili klasickou cytogenetickou analýzu a další cytogenomické metody založené především na fluorescenční *in situ* hybridizaci (FISH) a jejích modifikacích. Rozsah nebalancovaných změn a přesná zlomová místa jsme dále upřesňovali mikročipovou analýzou (aCGH/SNP; komparativní genomová hybridizace/jednonukleotidové polymorfizmy).

1 Literární řešerše

1.1 Chromozomové aberace v nádorových buňkách

1.1.1 Nenáhodné a náhodné chromozomové aberace

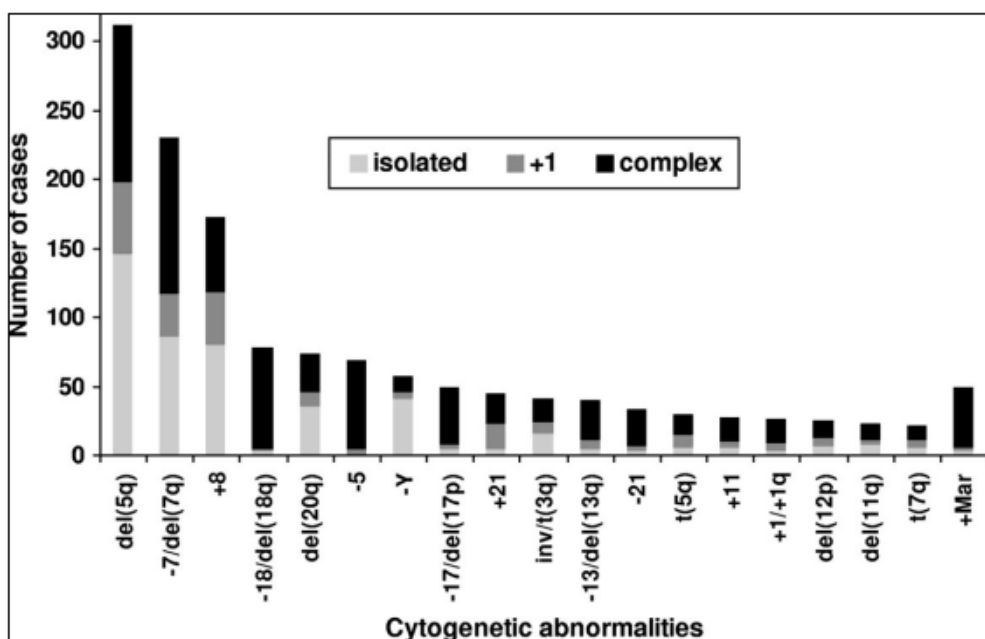
Pro správné fungování somatických buněk byla během evoluce vyvinuta řada kontrolních mechanismů, které v případě potřeby spouští opravné procesy. Přesto však může během buněčného cyklu dojít ke vzniku chromozomových aberací, které následně vedou ke zvratu normálního vývoje buňky v buňku maligní. Chromozomové aberace u člověka obecně rozdělujeme na vrozené (konstituční), které jsou zodpovědné za řadu známých chromozomových syndromů (Maděrková Tozzi et al., 2022), a aberace získané. Zatímco vrozené odchylky obvykle pozorujeme ve všech buňkách těla, odchylky získané až v průběhu života postihují pouze určité buněčné klony (tj. mají klonální charakter) a jsou typické pro nádorově změněné buňky. V nádorových buňkách můžeme pozorovat primární nenáhodné aberace, které přímo souvisí s konkrétním podtypem maligního onemocnění. Průběžně pak mohou vznikat další sekundární změny, které jsou ukazatelem progresse onemocnění. Tyto sekundární přestavby mohou být nenáhodné (rekurentní) nebo čistě náhodné (Bozic et al., 2010; Tang et al., 2019).

Změny na chromozomové úrovni představují numerické aberace a/nebo strukturní přestavby. Při numerických aberacích dochází k odchylkám od normálního počtu chromozomů. Tyto odchylky mohou představovat ztráty či zisky jednotlivých chromozomů (monozomie či trizomie), které souhrnně označujeme jako aneuploidie. V jiném případě dochází k polyploidizaci, tedy ke znásobení celé chromozomové sady (triploidie, tetraploidie atd.) (Thompson & Compton, 2011a). Všechny autozomální monozomie, většina trizomií a polyploidie jsou neslučitelné se životem. Ostatní numerické aberace způsobují závažné syndromy, nebo přispívají ke genomové nestabilitě a vzniku nádorů. K popsáným chromozomovým odchylkám nejčastěji dochází v důsledku chybné segregace chromozomů během mitózy (Shindo et al., 2021). Existuje řada faktorů, které přispívají k segregacním poruchám. Mezi tyto faktory patří například chybné interakce dělicího vřeténka s kinetochorem chromozomu (Kitajima et al., 2011), amplifikace centrozomu (Levine et al., 2017), multipolární vřeténka (Zasadil et al., 2014) či abnormální cytokineze (Ono et al., 2020). V současné době známe i řadu proteinů, které se významně podílí na regulaci těchto procesů a jejich defekt může přispět k nádorové progresi. Velmi významné jsou například Aurora kinázy, jejichž nadměrná exprese byla prokázána u řady nádorových onemocnění (Lassus et al., 2011; Jiang et al., 2022).

Strukturní aberace obvykle vznikají následkem zlomů v molekule DNA v důsledku chyb při kontrole buněčného cyklu a odpovědi na poškození. Zhoršená funkce reparačních mechanismů vede ke vzniku přestaveb, které porušují integritu genomu a predisponují ke vzniku malignit. Strukturní aberace dělíme na balancované a nebalancované. Při balancovaných aberacích nedochází ke změně v množství genetického materiálu, ale v jeho lokalizaci a orientaci. Mezi tyto změny řadíme inverze, balancované inserce a reciproké translokace. Nebalancované strukturní přestavby jsou provázené ztrátou či ziskem genetického materiálu. Mezi tyto přestavby řadíme delece, duplikace, izochromozomy a kruhové (ring) chromozomy (Gilbert, 1983; Weckselblatt a Rudd, 2015).

1.1.2 Cytogenetické a molekulárně-genetické změny u MDS

Myelodysplastické syndromy jsou skupina geneticky velmi heterogenních onemocnění. Nalezené cytogenetické a molekulárně-genetické abnormality představují hlavní determinanty patogeneze a prognózy tohoto onemocnění. Rekurentní klonální chromozomové aberace nacházíme v době diagnózy přibližně u 55 % dospělých nemocných s primárním MDS. U sekundárních MDS se jedná až o 80 % případů. Obvyklým nálezem bývají chromozomové aberace spojené se ztrátou genetického materiálu, tj. delece, monozomie a nebalancované translokace. Nadpočetné chromozomy a balancované translokace jsou méně časté (Haase, 2008; Greenberg et al., 2012; Schanz et al., 2011). Nejčastější cytogenetické aberace spojené s MDS shrnuje obrázek č. 1.

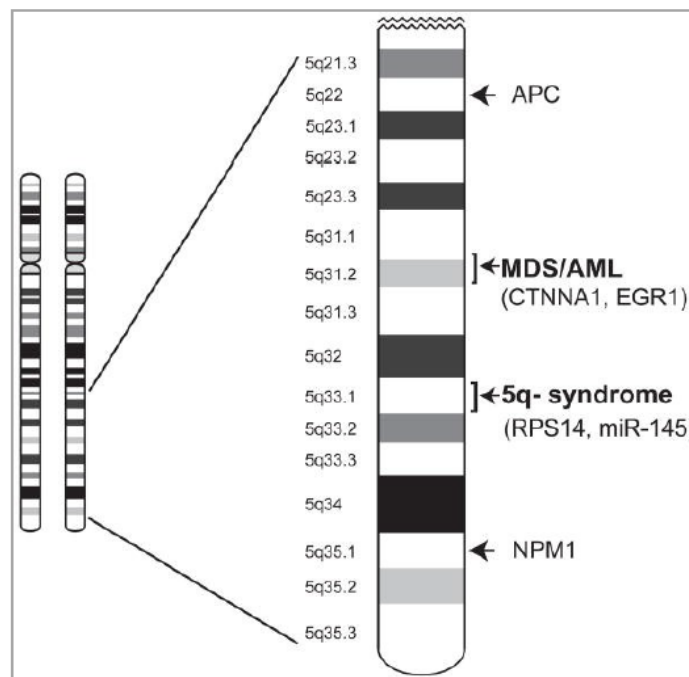


Obrázek č. 1 – Frekvence nejčastějších cytogenetických aberací u MDS. Isolated: aberace se vyskytuje izolovaně. **+1:** výskyt aberace v kombinaci s další abnormalitou. **Complex:** zahrnutí aberace do komplexních přestaveb (Haase et al., 2007).

Nejčastějším cytogenetickým nálezem je intersticiální delecce dlouhých ramen chromozomu 5 – del(5q), která je popisovaná přibližně u 30 % primárních MDS (Haase, 2008; Jerez et al., 2012). Tuto delecí nacházíme buď jako samostatnou změnu v karyotypu (nemocní s nízkým rizikem transformace do AML a dobrou prognózou) nebo v rámci komplexních karyotypů (pacienti s vysokým rizikem) (Giagounidis et al., 2004; Adema et al., 2022; Arber et al., 2016). Rozsah del(5q) je vysoce variabilní a její velikost se u jednotlivých pacientů liší. Dle literatury je nejčastěji deletována chromozomová oblast 5q31. Byly však popsány i atypické delecce 5q, které tuto oblast nezahrnují (Brezinova et al., 2012). V uplynulých letech byly v rámci delecce v úseku 5q31 až 5q33 popsány dvě společné deletované oblasti (CDR – commonly deleted region, obrázek č. 2). Proximální oblast lokalizovaná v lokusu 5q31.1 až 5q31.2 obsahuje 18 kauzálních genů zodpovědných za patogenezi MDS. Delecí tohoto lokusu nacházíme zejména u pacientů s pokročilejšími stádii (le Beau et al., 1993; Zhao et al., 1997). Distální region se nachází v lokusu 5q32 až 5q33.2. Tato oblast obsahuje 40 kandidátních genů zodpovědných za patogenezi tzv. 5q- syndromu spojeného s dobrou prognózou. Syndrom 5q- je podtypem MDS, který se vyskytuje přibližně u 10–15 % pacientů. Krevní obraz nemocných je charakteristický různě závažnou makrocytární anémií s možnou další cytopenií a trombocytózou (Van den Berghe et al., 1985; Gurnari et al., 2022). Dle klasifikace WHO (Arber et al., 2016) je pro tento syndrom přípustná ještě jedna cytogenetická změna kromě

aberrace chromozomu 7. Ve starších studiích byla u MDS popisována i úplná ztráta chromozomu 5. Na základě současných poznatků víme, že pravá monozomie ve skutečnosti neexistuje. Část genetického materiálu zůstává vždy zachována a v rámci komplexních přestaveb je přenesena na jiné místo v genomu. Velká komplexita těchto přestaveb je spojena s velmi špatnou prognózou (Zemanová a Březinová, 2010; Galván et al., 2010; Herry et al., 2007).

Naprostá většina nemocných s MDS (více než 95 %) má však rozsáhlé delecce, které zahrnují kromě obou CDR i další úseky dlouhých ramen chromozomu 5 (Jerez et al., 2012). Současné studie potvrzují velkou nestabilitu tohoto chromozomu spojenou s rozsáhlými ztrátami genetického materiálu a agresivním fenotypem onemocnění (Zemanová et al., 2014; Jerez et al., 2012). Literatura rovněž uvádí, že pacienti s *del(5q)* a komplexním karyotypem mají zvýšenou frekvenci mutací v genu *TP53*. To dokládá významnou úlohu daného genu při progresi onemocnění (Papaemmanuil et al., 2013; Feurstein et al., 2018).



Obrázek č. 2 – Schéma společných deletovaných oblastí (CDR) u MDS pacientů s delecí dlouhých ramen chromozomu 5 – *del(5q)*. Schéma zahrnuje klíčové geny nacházející se v těchto oblastech (Ebert, 2011).

Druhou nejčastější chromozomovou aberací u pacientů s MDS je monozomie chromozomu 7 nebo intersticiální delece jeho dlouhých ramen – del(7q) (Haase, 2008; Crisà et al., 2020). Na tomto chromozomu byly nalezeny tři CDR v oblastech 7q22, 7q34 a mezi pruhy 7q35 a 7q36.1 (Jerez, Sugimoto, et al., 2012). Aberace chromozomu 7 nacházíme přibližně u 10 % pacientů s primárním MDS a až u 50 % pacientů se sekundárním MDS. Změny na tomto chromozomu obvykle znamenají horší průběh onemocnění, přičemž nejhorší prognózu mají nemocní se ztrátou celého chromozomu 7 (Haase et al., 2007; Bernasconi et al., 2005).

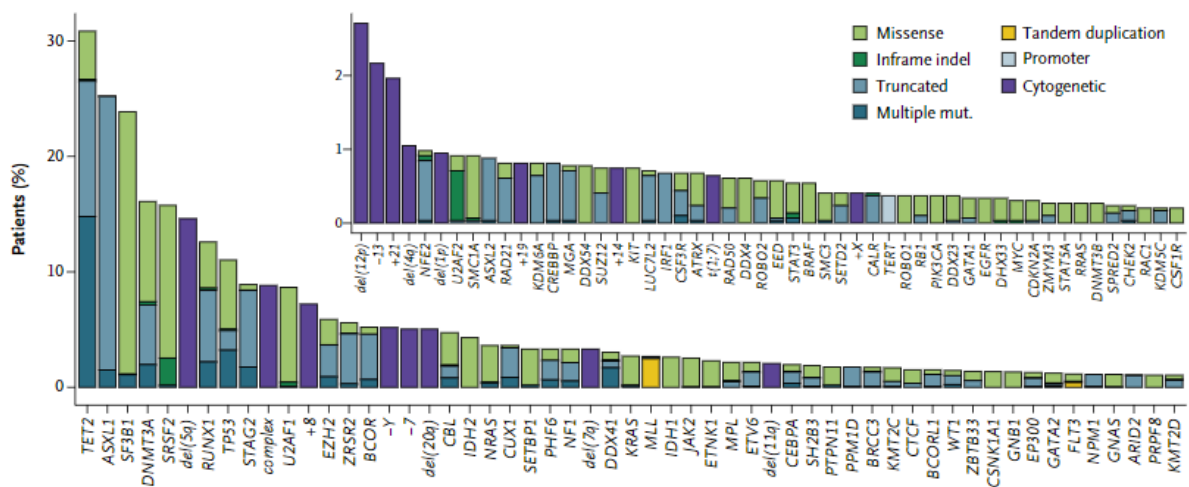
Další chromozomovou změnou popisovanou u MDS pacientů je izolovaná trizomie chromozomu 8. Nacházíme ji přibližně u 10 % *de novo* MDS případů a u 5 % MDS pacientů celkově. Tento nález je spojen se středním rizikem a objevuje se především v pozdějších fázích onemocnění (Drevon et al., 2018). Delece dlouhých ramen chromozomu 20 patří mezi další rekurentní změny u MDS. Její záchyt je však častý i u jiných typů myeloproliferativních chorob, a proto tento nález sám o sobě nestačí pro stanovení MDS diagnózy (Ravindran et al., 2020; Shiseki et al., 2019; Campagna et al., 2022; Mitev, 2021).

Mezi méně časté rekurentní abnormality patří derivovaný chromozom 3 (Podlipnik et al., 2018), delece dlouhých ramen chromozomu 11 (Lafage-Pochitaloff et al., 2022), delece krátkých ramen chromozomu 12 (Adema et al., 2016), izochromozom z dlouhých ramen chromozomu 17 (Britt et al., 2020), trizomie chromozomu 19 (Liquori et al., 2021) a ztráta chromozomu Y. Ztráta chromozomu Y je ovšem spojována i s procesem stárnutí a obecně ji častěji pozorujeme se stoupajícím věkem pacientů (Wiktor et al., 2000). Nelze tedy přesně stanovit souvislost mezi tímto nálezem a MDS. Nález izolované ztráty chromozomu Y představuje pro nemocné s MDS velmi dobrou prognózu (Ouseph et al., 2021).

Vedle cytogenetických změn se v posledních letech dostávají do popředí také mutace různých genů. V roce 2022 byl prezentován výsledek z mezinárodního výzkumu zaměřeného na mutační analýzy a jejich zařazení do prognostického skórovacího systému. Nově vydaný mezinárodní skórovací systém IPSS-M (The International Prognostic Scoring System – Molecular) zavedl hodnocení mutační nálože do klinické praxe (tabulka č. 1). V rámci studie bylo vyšetřeno 3711 MDS pacientů na přítomnost mutací ve 152 genech. Výsledek přinesl zjištění, že až 94 % MDS pacientů je nosičem alespoň jedné somatické mutace některého z genů běžně mutovaných u hematologických malignit. Studie zdůrazňuje význam hodnocení alelického stavu genu *TP53*. Ukázalo se, že pacienti s monoalelickou mutací mají výrazně nižší riziko oproti pacientům jejichž gen *TP53* prodělal více aberací (=TP53^{multihit}). Kromě genu

TP53 byl mezi hlavní nepříznivé faktory zařazen mutovaný gen *FLT3* a parciální terminální duplikace genu *KM2TA*. Zjištěná asociace genu *KM2TA* s horší prognózou a vyšším rizikem transformace nemoci do AML podněcuje jeho zařazení do panelu genů běžně vyšetřovaných u MDS pacientů.

Celkem bylo stanoveno 16 prognosticky významných genů (*ASXL1*, *CBL*, *DNMT3A*, *ETV6*, *EZH2*, *FLT3*, *IDH2*, *KRAS*, *MLL*^{PTD}, *NPM1*, *NRAS*, *RUNX1*, *SF3B1*^{sq}, *SF3B1*^a, *SRSF2*, *TP53*^{multihit}, *U2AF1*) a dalších 15 genů bylo zařazeno do skupiny tzv. přídatných genů (obrázek č. 3) (Bernard et al., 2022).



Obrázek č. 3 – Nejčastěji mutované geny a cytogenetické aberace u MDS pacientů. Konkrétní typy změn jsou rozlišeny barevně (Bernard et al., 2022).

Table 1. IPSS-M Risk Score Construction from an Adjusted Cox Multivariable Regression for Leukemia-Free Survival.*		
Category and Variable	Adjusted Hazard Ratio (95% CI)†	Model Weight‡
Clinical		
Bone marrow blasts — %	1.07 (1.05–1.09)	0.0704
min(Platelets,250) — x10 ⁹ /l	0.998 (0.997–0.999)	–0.00222
Hemoglobin — g/dl	0.84 (0.81–0.88)	–0.171
Cytogenetic		
IPSS-R cytogenetic category§	1.33 (1.21–1.47)	0.287
Gene main effects (17 variables, 16 genes)¶		
<i>TP53</i> ^{mut/ht}	3.27 (2.38–4.48)	1.18
<i>MLL</i> ^{PTD}	2.22 (1.49–3.32)	0.798
<i>FLT3</i> ^{ITD+TKD}	2.22 (1.11–4.45)	0.798
<i>SF3B1</i> ^{5q}	1.66 (1.03–2.66)	0.504
<i>NPM1</i>	1.54 (0.78–3.02)	0.430
<i>RUNX1</i>	1.53 (1.23–1.89)	0.423
<i>NRAS</i>	1.52 (1.05–2.20)	0.417
<i>ETV6</i>	1.48 (0.98–2.23)	0.391
<i>IDH2</i>	1.46 (1.05–2.02)	0.379
<i>CBL</i>	1.34 (0.99–1.82)	0.295
<i>EZH2</i>	1.31 (0.98–1.75)	0.270
<i>U2AF1</i>	1.28 (1.01–1.61)	0.247
<i>SRSF2</i>	1.27 (1.03–1.56)	0.239
<i>DNMT3A</i>	1.25 (1.02–1.53)	0.221
<i>ASXL1</i>	1.24 (1.02–1.51)	0.213
<i>KRAS</i>	1.22 (0.84–1.77)	0.202
<i>SF3B1</i> ^q	0.92 (0.74–1.16)	–0.0794
Gene residuals (1 variable, 15 genes; possible values of 0, 1, or 2)		
min(Nres,2)	1.26 (1.12–1.42)	0.231

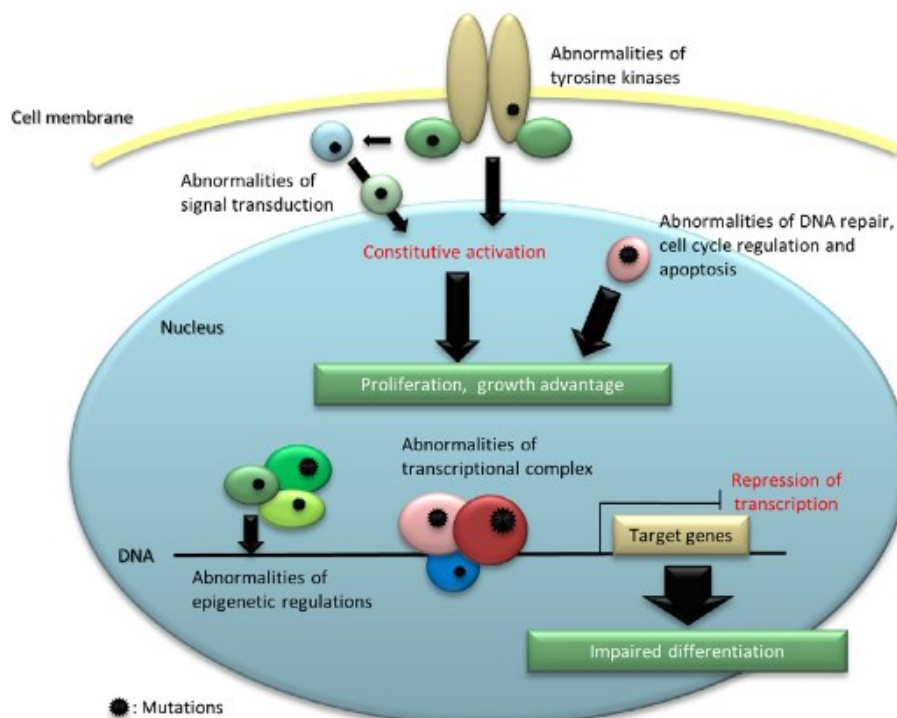
Tabulka č. 1 – IPSS-M prognostický skórovací systém pro MDS pacienty vydaný v roce 2022. Systém zohledňuje klinické a cytogenetické nálezy a výsledky mutačních analýz. Na základě výsledného součtu rizikových faktorů je pacientovi přiřazena prognóza a doporučena odpovídající léčba (převzato z Bernard et al. 2022).

Geny, jejichž aberace nalézáme u pacientů s diagnózou MDS nejčastěji, můžeme rozdělit do několika kategorií (obrázek č. 4). První jsou geny z kategorie RNA-sestříhového aparátu, které detekujeme s vysokou frekvencí (45–85 % případů). Jedná se o geny *SF3B1*, *U2AF1*, *SRSF2*, *ZRSR2*, *SF3A1*, *SF1*, *U2AF65*, *PRPF40B* a *PRPF8* (Yoshida et al., 2011). Mutace v genu *SF3B1* se vyskytuje u 24 % MDS pacientů a často bývá spjata s výskytem prstenčitých sideroblastů. Pro pacienty to představuje dobrou prognózu (Huber et al., 2022). Ostatní zmíněné mutace RNA-sestříhového aparátu mají pro pacienty spíše negativní dopad (Bernard et al., 2022).

Další často mutované geny bývají geny pro epigenetické faktory, které ovlivňují metylaci (např. *DNMT3A*, *TET2*), nebo histonové modifikace (*ASXL1*, *EZH2*, *ATRX*). Aberantní gen *TET2*, jehož mutace má neutrální prognostický význam, indukuje sebeobnovu a klonální expanzi hematopoetických zárodečných buněk (Kunimoto & Nakajima, 2021). Mutace

v genech RNA-sestříhového aparátu a DNA metylace se objevují obvykle jako první a bývají proto označovány jako „founding mutations“. Další přibývající mutace jsou pak subklonální (Papaemmanuil et al., 2013).

Třetí často mutovanou kategorií genů jsou geny signální transdukce (např. geny *NRAS*, *KRAS*, *JAK2*) a geny pro transkripční faktory (např. gen *RUNX1*, *GATA2*, *ETV6*). Mutované geny signální transdukce obvykle nacházíme u pacientů v pozdější fázi onemocnění a jsou asociovány s přechodem nemoci do AML (Meggen Dorfer et al., 2015). Mutace v genu *RUNX1* bývají obvykle subklonální. Jeho zárodečná mutace však může představovat významný spouštěč patogeneze vedoucí k MDS. Dle dosavadních výzkumů dojde u více než 40 % nosičů germinální mutace genu *RUNX1* k rozvoji myeloidní neoplázie (Simon et al., 2020). U těchto jedinců obvykle dochází k mutacím v dalších genech přispívajících k procesu leukemogeneze. Nejčastěji se jedná o mutaci v genu *CDC25C*, který dokáže přerušit G2/M kontrolní bod buněčného cyklu (Yoshimi et al., 2014) a gen *GATA2*, který reguluje hematopoézu a vývojové procesy (Nakazawa et al., 2021).



Obrázek č. 4 – Molekulární cesty a genové mutace asociované s MDS. Ke kauzální mutaci v klíčovém genu zodpovědném za patogenezi MDS může dojít na všech úrovních signální transdukce (Harada & Harada, 2015).

Samostatnou skupinou jsou mutace v tumor supresorovém genu *TP53*, který kóduje protein p53. Jedná se o klíčový regulační faktor celé řady genů ovlivňujících proliferaci, apoptózu, reparaci DNA a angiogenezi. Mutaci v tomto genu nacházíme přibližně u 10 % *de novo* MDS pacientů. Gen je lokalizován na krátkém rameni chromozomu 17 a u většiny hematologických malignit dochází k jeho mutaci nebo ztrátě v důsledku částečné či úplné delecce chromozomu 17. Mutace v genu může být germinální, případně somatická. Nejčastěji se jedná o bodové záměny typu missense v DNA vazebné doméně. Protein p53 pak ztrácí schopnost vázat své cílové sekvence (Ok et al., 2015). Často se stává, že po prvotním zásahu v jedné alele dojde i ke ztrátě alely druhé, a to buď její delecí, nebo ztrátou heterozygotnosti (LOH). LOH vzniká v důsledku získané uniparentální dizomie (aUPD) (Stengel et al., 2017; Bernard et al., 2020). Nádorový supresor tak zcela ztratí svoji funkci. Tento jev popisuje tzv. Knudsova teorie dvou zásahů (Knudson, 1971). Mutovaný gen *TP53* se může vyskytovat společně s delecí krátkých ramen chromozomu 17. Společný výskyt mutované alely spolu s delecí alely druhé detekujeme zhruba u 70 % MDS pacientů s komplexním karyotypem a del(5q) (Stengel et al., 2017; Bernard et al., 2020). Bialelické mutace v genu *TP53* jsou obvykle spojovány s pokročilejšími stádii MDS a představují nepříznivý prognostický faktor. Nemocní hůře odpovídají na léčbu a jejich medián přežití bývá nižší (Weinberg et al., 2022; Bernard et al., 2022).

1.2 Komplexní chromozomové aberace

Konkrétní definice komplexních změn karyotypu se mezi jednotlivými autory mírně liší (Breems et al., 2008; Göhring et al., 2010). Nejčastěji jsou však definovány jako numerické či strukturní změny, které zahrnují alespoň tři chromozomy a/nebo strukturní přestavby, při kterých dochází ke třem a více zlomům na chromozomech (Schoch et al., 2001). Jisté je, že existuje spojitost mezi progresí nádorového onemocnění a vznikem subklonů se sekundárními aberacemi a komplexními karyotypy, které odráží nestabilitu genomu nádorových buněk (Schanz et al., 2018).

Komplexní aberace bývají často velmi rozsáhlé a ovlivňují funkci řady genů nebo způsobují jejich úplnou disrupci. Genovou expresi ovlivňuje např. poziční efekt, kdy se gen následkem přestaveb dostane do oblasti heterochromatinu, která umlčí jeho expresi. Umístění genu do blízkého okolí silného promotoru může naopak jeho expresi posílit (Harewood a Fraser, 2014; Trembath et al., 2004). V důsledku četných strukturních přestaveb mohou

vznikat také fúzní geny, jejichž následkem vznikají proteiny s odlišnými vlastnostmi (Heyer et al., 2019; Parker et al., 2014). Ty vznikají také následkem změn v počtech kopií genů způsobených ztrátou celých chromozomů či chromozomových fragmentů, nebo naopak amplifikací chromozomového materiálu. To se následně projeví jako hromadné delece tumor supresorových genů a aktivace protoonkogenů. V obou případech se jedná o geny s významnou úlohou v buněčné proliferaci a diferenciaci, jejichž pozměněná funkce zásadně ovlivňuje nádorovou transformaci buňky (Carlo a Croce, 2008; Lafage-Pochitaloff et al., 2022; Ma et al., 2006).

Komplexní karyotypy jsou detekovány přibližně u 20 % nově diagnostikovaných pacientů s myelodysplastickými syndromy (Morel et al., 1993; Nevill et al., 1998). Nemocní s tímto nálezem spadají do nepříznivých prognostických skupin a jejich riziko přechodu do AML je vysoké. Medián přežití pacientů s komplexními karyotypy bývá nižší než jeden rok (Haase et al., 2007; Greenberg et al., 2012; Estey et al., 2022). Dosavadní studie naznačují, že na základě různých kombinací cytogenetických změn v rámci komplexního karyotypu můžeme rozlišit prognosticky rozdílné skupiny pacientů (Mrózek et al., 2019). Vědecká studie Schanzové a kolektivu ukazuje větší riziko u těch pacientů, kteří mají v komplexních přestavbách zahrnutý chromozom 5 a 7 (Schanz et al., 2011).

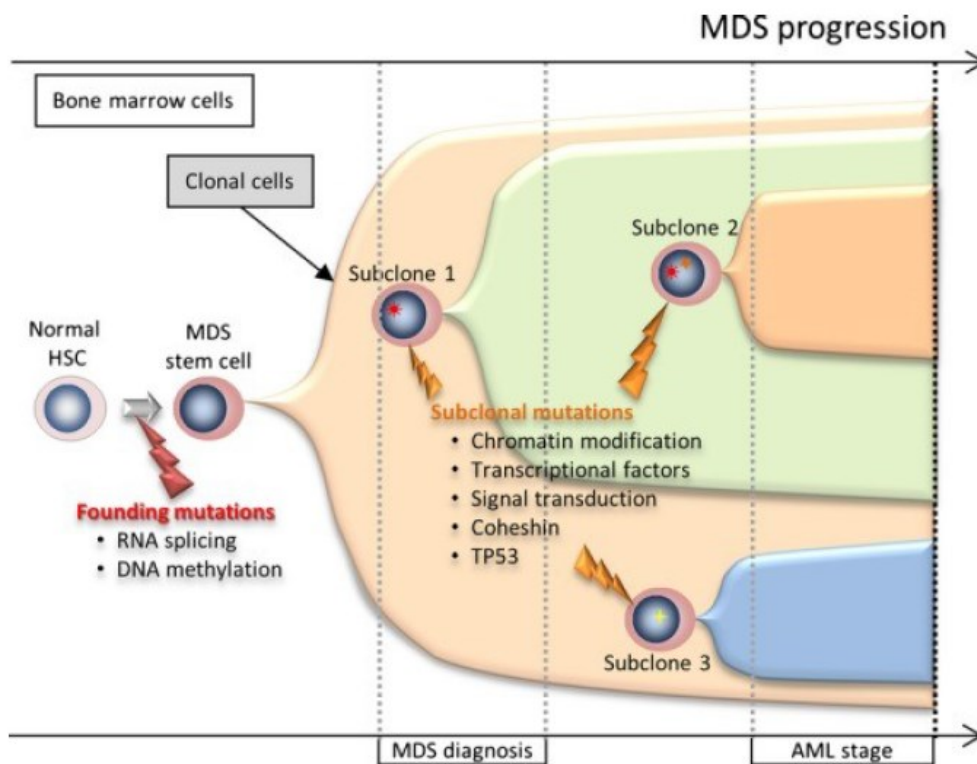
1.2.1 Mechanizmy a možné příčiny vzniku komplexních karyotypů

Mechanizmy a možné příčiny vzniku komplexních karyotypů zatím nejsou zcela jasné. V literatuře byly doposud popsány dva předpokládané modely jejich vzniku – postupná kumulace chromozomových aberací v průběhu onemocnění (tzv. klonální vývoj) a rozpad chromozomů nebo jejich částí v jednom okamžiku během tzv. buněčné krize (chromothripsis).

1.2.2 Klonální vývoj

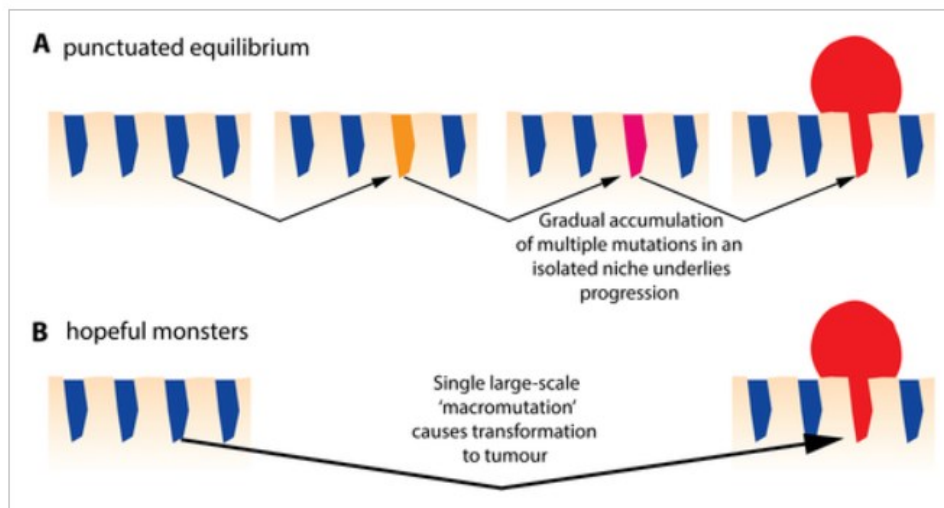
Klonální vývoj představuje vícestupňový proces hromadění genetických a epigenetických změn, který je obvykle spojený s progresí daného onemocnění. Na počátku nádorové transformace buněk má zásadní vliv tzv. „driver mutace“, která udělí zasažené buňce růstovou výhodu. Dělením takto pozměněné buňky vznikají buněčné klony se stejným genotypem a mutačním profilem (obrázek č. 5). Vzniklé buněčné klony mohou být odvozeny od jednoho základního klonu (příbuzné klony), nebo mohou být naopak geneticky nezávislé (nepříbuzné klony). Takto vzniklé populace nádorových buněk mohou postupně obsadit kostní dřev a utlačovat normální krvetvorbu (Nowell, 1976).

Rozlišujeme dva typy klonálního vývoje, lineární a divergentní. Při lineárním klonálním vývoji dochází k postupnému zisku chromozomových aberací nebo mutací v čase. Divergentní klonální vývoj je typický přítomností více buněčných klonů, příbuzných či nepříbuzných, které se odlišují genetickými aberacemi. Populace jednotlivých subklonů nejsou od sebe izolované, a tak může docházet k jejich vzájemným interakcím a kompeticím (Anderson et al., 2011). Jestliže má jeden klon výhodnější podmínky pro svůj růst, může vytlačit klony jiné a způsobit jejich redukci. Diverzita vzniklých dceřiných klonů má za následek genetickou, epigenetickou a fenotypovou variabilitu, která představuje hlavní překážku v přesné diagnostice a účinné léčbě (da Silva-Coelho et al., 2017). Experimentálně bylo prokázáno, že množství genetických změn v leukemických subpopulacích a míra heterogenity koreluje s klinicko-patologickými rysy pacienta (Arber et al., 2016). Nádorové buňky, které uniknou podávané terapeutické látce často vykazují ještě větší genetickou nestabilitu a rozvíjí mechanismy zodpovědné za rezistenci na podávanou léčbu (McMahon et al., 2019). Proto je velmi důležité zaměřit svoji pozornost rovněž na malé a těžko detekovatelné subklony, které mají potenciál zásadně ovlivnit další průběh onemocnění. Obecně platí, že u pacientů s divergentním klonálním vývojem je medián celkového přežití horší než u nemocných s lineárním klonálním vývojem a riziko transformace nemoci do akutní myeloidní leukemie se také zvyšuje (Schanz, Cet al., 2018; Schanz, Solé, et al., 2018). Záchyt klonální heterogenity nádorového onemocnění v diagnostických vzorcích tedy přináší zásadní diagnostické a prognostické informace, které jsou klíčové pro přesnou klasifikaci onemocnění, zvolení vhodné terapie a monitorování úspěšnosti podávané léčby (Zemanová et al., 2019).



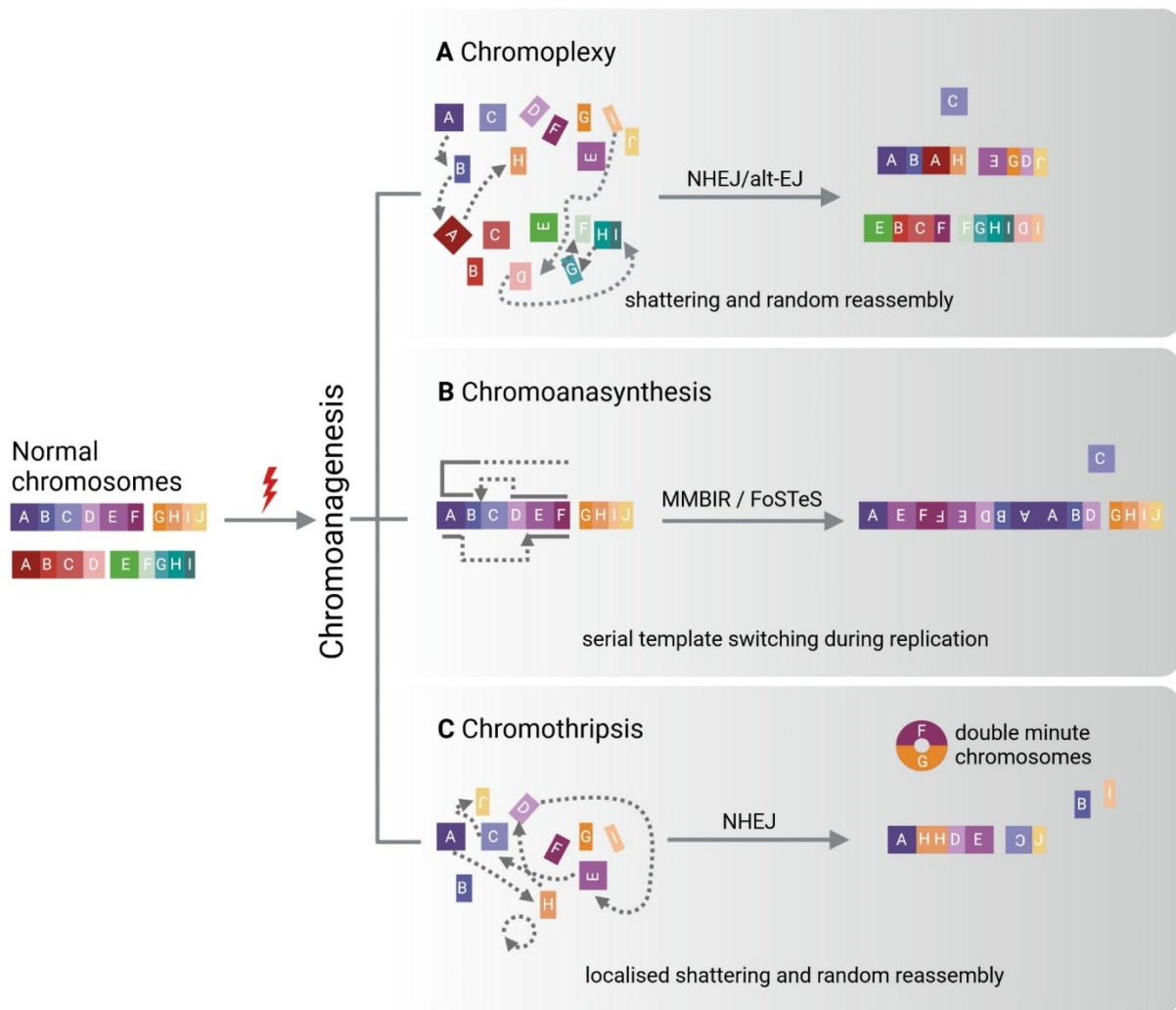
Obrázek č. 5 – Klonální vývoj hematopoetických kmenových buněk (HSC) vedoucí k rozvoji MDS a AML. Velkou roli hraje iniciální poškození kmenové buňky. Akumulace sekundárních genetických i epigenetických změn postupně vede ke vzniku rozdílných buněčných klonů a k nádorové heterogenitě. Proces získávání mutací je postupný a může trvat i několik let. Nemoc propuká v momentě, kdy se překročí prahová hodnota získaných mutací (Harada & Harada, 2015).

Průlom v tomto tradičním chápání nádorové transformace buněk přinesl leden roku 2011. Skupina vědců kolem Philipa J. Stephense přinesla důkaz, že u pacientky s chronickou lymfocytární leukémií došlo k současnému vzniku 42 chromozomových přestaveb na krátkém rameni chromozomu 4. Další různé přestavby zahrnovaly chromozomy 1, 12 a 15. Pozorované chromozomové aberace byly natolik složité, že se jejich vznik postupnou kumulací mutací jevil jako velice málo pravděpodobný. Pravděpodobnou se naopak jevila teorie, že k jejich vzniku došlo během krátkého časového úseku, a to následkem katastrofické buněčné události (obrázek č. 6). Tato náhlá katastrofická příhoda byla posléze označena pojmem chromothripsis. Pro tuto teorii svědčila přítomnost nalezených aberací v chromozomových klastrech, ve kterých se opakovaně střídaly oblasti se ztrátou nebo zachováním heterozygotnosti. Tyto nezvyklé komplexní chromozomové aberace byly objeveny na základě použití moderních cytogenomických metod jako jsou čipové technologie a sekvenování nové generace (Stephens et al., 2011).



Obrázek č. 6 – Modely nádorové transformace buněk. **A** – Znázornění klasického pojetí tumorigeneze jako vícestupňového procesu. Teprve po získání dostatečného počtu chromozomových aberací a genových mutací dochází ke zvratu buňky v nádorovou. **B** – Vznik nádorového klonu buněk v důsledku náhlé katastrofické události (Graham a Sottoriva, 2017).

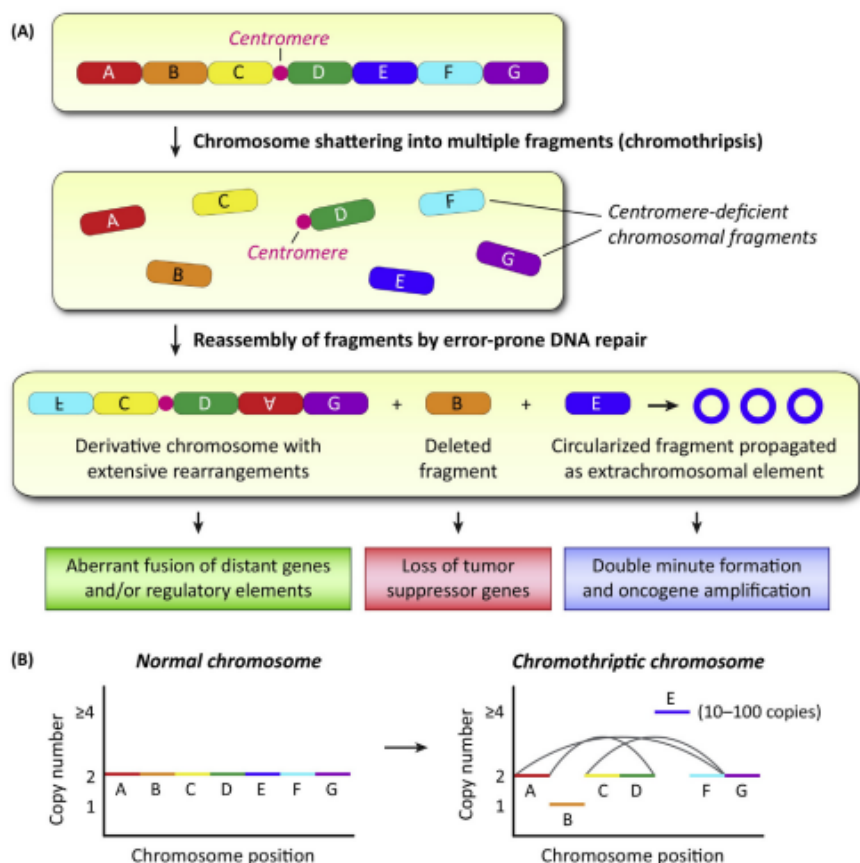
Později byly klasifikovány další dvě skupiny katastrofických událostí, a to chromoplexis a chromoanasyntesis. Obecně se od chromothripsis odlišují především strukturou chromozomových přestaveb. V případě chromoplexis spočívá hlavní rozdíl v menším počtu aberací na jednotlivých chromozomech (obvykle bez doprovodu CNV) a distribuce těchto přestaveb až po celém genomu. Dalším znakem chromoplexis je řetězení translokací chromozomového materiálu během více buněčných cyklů. Chromoplexis a chromothripsis bývají často chybně zaměňovány či shrnovány do jedné události. Dle dosavadních poznatků se však chromoplexis vyskytuje vzácněji a je primárně spjata s karcinomy prostaty (Baca et al., 2013; Ballas et al., 2014; Demeulemeester et al., 2018). Chromoanasyntesis představuje chybné replikační procesy, v jejichž důsledku vznikají četné strukturní varianty, zejména variabilní změny v počtu kopií DNA. Chromoanasyntesis byla pozorována u osob s poruchami vývoje a kognitivních funkcí, popsána však byla i u pacientek s karcinomem prsu (Liu et al., 2011; Vasmatzis et al., 2018). Pojem chromoanageneze (*chromo* = chromozom; *anagenesis* = znovuzrození) všechny pozorované katastrofické jevy shrnuje (Holland & Cleveland, 2012) (obrázek č. 7).



Obrázek č. 7 – Charakteristické rysy jednotlivých typů chromoanagenézí. (A) Chromoplexis zahrnuje sérii rozpadů několika chromozomů následované jejich opětovným spojením mechanismem NHEJ. Přestaveb vznikají jednotky až desítky a jsou rozptýlené až po celém genomu. (B) Další typ katastrofické události, chromoanasythesis, je zapříčiněn replikačními defekty, jejichž následkem vznikají četné strukturální varianty. Hlavními reparačními procesy pak bývají FoSTeS (zastavení replikační vidlice a vyměnění templátů) a MMBIR (spájení konců DNA založené na mikrohomologiích). Vzniklé aberace se obvykle vyskytují v klastrech, ale v některých případech bývají i rozptýlené napříč genomem. (C) Poslední katastrofický jev, chromothripsis představuje lokalizovaný rozpad jednoho či více chromozomů (nebo jejich částí) na chromozomové fragmenty. Prostřednictvím majoritního reparačního mechanismu NHEJ jsou tyto fragmenty spojovány zpět. Díky nepřesným opravám vznikají vysoce přestavěné chromozomy s četnými delecemi a amplifikacemi genetického materiálu (Keuper et al., 2021).

1.2.3 Chromothripsis

Pojem chromothripsis byl odvozen od řeckého slova *chromos*, které označuje chromozom a *thripsis* neboli rozpadnutí na kousky. Tento masivní rozpad jednoho, případně více chromozomů či jejich částí, nastane během náhlé katastrofické události. Buňka se poté snaží toto rozsáhlé poškození co nejdříve opravit. Reparační mechanismy bývají zastoupené především mechanismem NHEJ (nehomologní spojování konců DNA) a procesem založeným na mikrohomologiích (MMBIR). Chromozomových fragmentů však běžně bývají i stovky a urychlené reparační mechanismy probíhají nepřesně. Chromozomové fragmenty jsou spojovány zpět náhodně, což vede ke vzniku velmi přestavěných chromozomů, které neodpovídají původní struktuře. Dochází ke vzniku rozsáhlých, ale lokalizovaných přestaveb, které zahrnují celé chromozomové rameno, malé úseky na chromozomu, případně celý chromozom. Zlomy na chromozomech se obvykle vyskytují v klastrech, ve kterých se střídají úseky neporušené DNA s úseky o velikosti přibližně 50 kbp s 5 až 10 zlomy. Následkem prodělané chromothripsis vznikají četné delece, translokace, inverze a amplifikace genetického materiálu (obrázek č. 8). U buněk, které tuto katastrofickou událost přežijí, často dochází ke vzniku mnoha tumorogenních mutačních změn a získávají silnou selekční výhodu (Stephens et al., 2011).

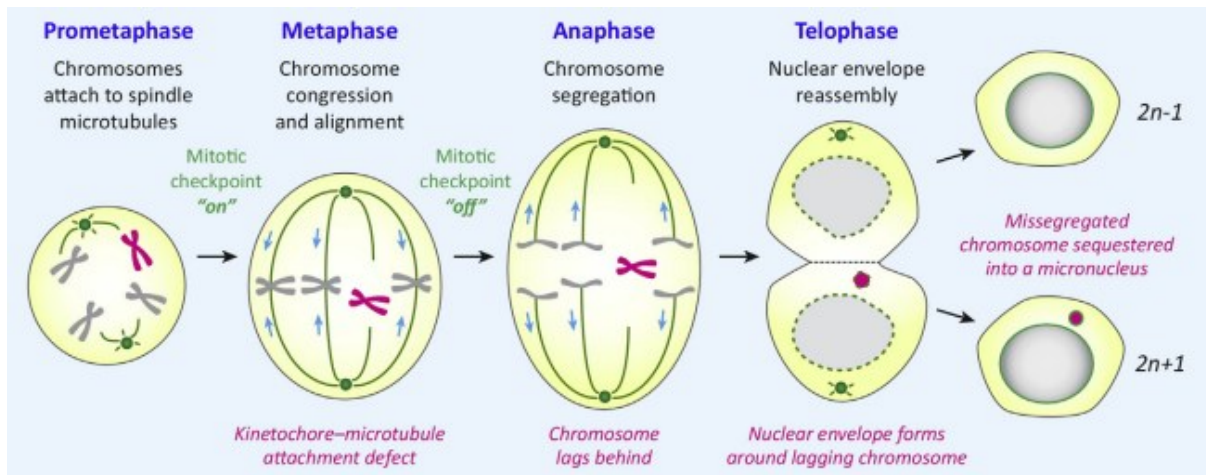


Obrázek č. 8 – Chromothripsis a její následky. (A) Během chromothripsis dochází k rozpadu jednotlivých chromozomů, případně jejich částí, na mnoho chromozomových fragmentů. Ty jsou posléze spojovány zpět. V důsledku příliš velkého poškození probíhají reparační mechanismy urychleně a dochází k řadě chyb. Výsledkem jsou vysoce přestavěné derivované chromozomy, tzv. anachromozomy. Chromozomové fragmenty, které nestihnou zligovat s ostatními částmi chromozomů, jsou obvykle ztraceny. Duplikací části chromozomu může dojít ke vzniku malých kruhovitých útvarů zvaných „double minutes“. Ty se poté replikují nezávisle na buněčném cyklu a jsou častými nosiči onkogenů představujícími selekční výhodou pro růst buňky a její přežití. (B) Hlavními charakteristickými rysy chromothripsis jsou desítky až stovky chromozomových přestaveb vyskytujících se v klastrech, kolísající počet kopií DNA sekvencí a spojování chromozomových fragmentů v náhodném pořadí i orientaci (Ly & Cleveland, 2017).

Na základě výsledků řady studií lze předpokládat, že k těmto rozsáhlým přestavbám dochází během jediného buněčného dělení, konkrétně v období metafáze, kdy jsou chromozomy kondenzovány. Pokud by k přestavbám docházelo postupně, změny by byly různorodější a nebyly by tak přesně lokalizované. Naznačuje to velký počet kopií DNA, které kolísají od delece (zachována jen jedna alela) až po duplikaci (tři alely) či amplifikaci (více alel) (Cortés-Ciriano et al., 2020).

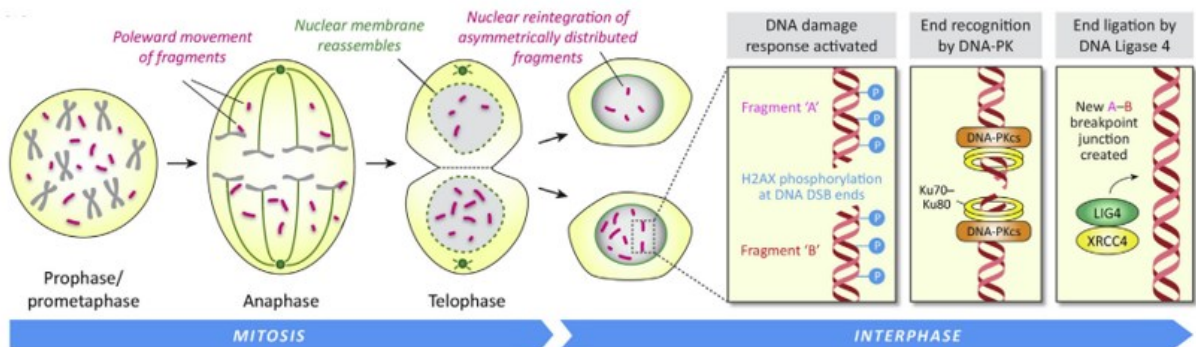
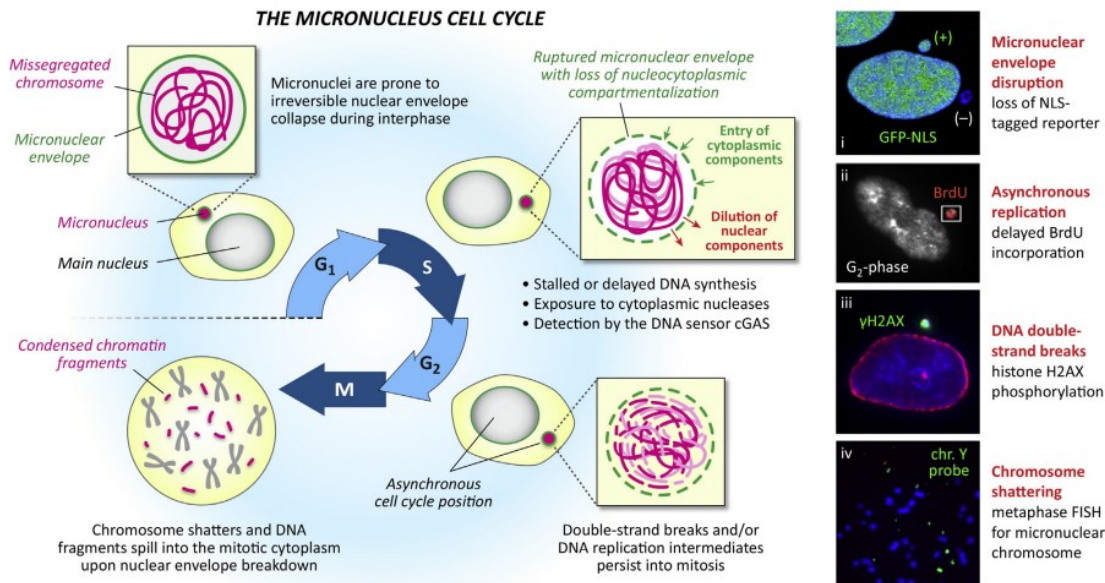
Doposud neexistuje jednotný názor na to, jakým způsobem k chromothripsis dochází. Nejvíce přijímaným názorem je vznik tzv. mikrojadra, která prozatím nejlépe vysvětlují výskyt velkého množství lokalizovaných chromozomových aberací v klastrech (C. Z. Zhang et al.,

2015). Tyto mimojaderné struktury vznikají odpojením od hlavního buněčného jádra během mitózy (obrázek č. 9). Na jejich vzniku se podílí mutagenní látky zastoupené především látkami interagujícími s komponenty mitotického aparátu, který zajišťuje správnou segregaci chromozomů k buněčným pólům během anafáze. Jiné mutagenní látky mohou vést k tvorbě acentrických fragmentů, které se nemohou zpětně inkorporovat do hlavního buněčného jádra (Fenech et al., 2003; Thompson & Compton, 2011b).



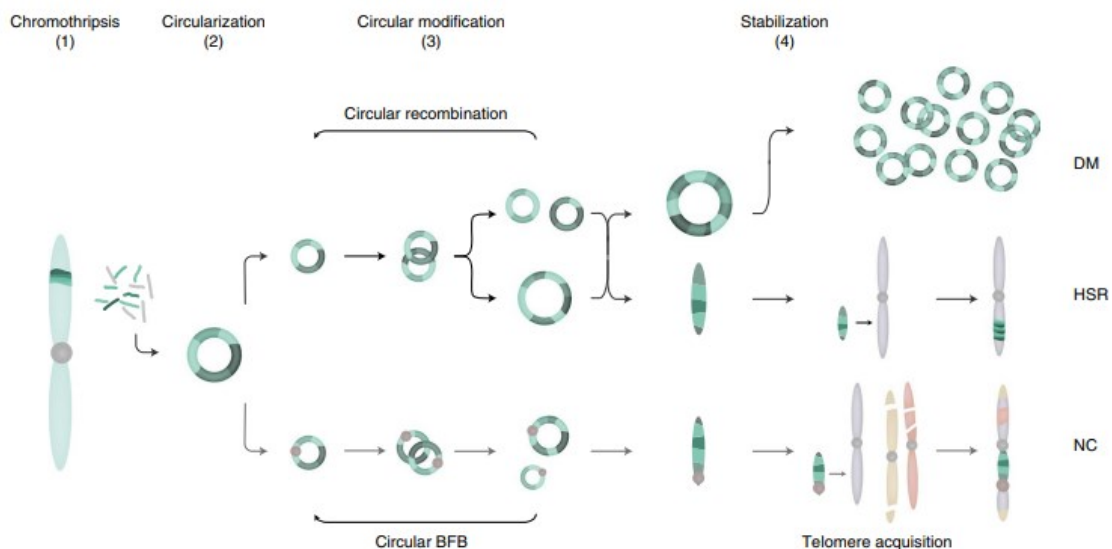
Obrázek č. 9 – Chybná segregace chromozomů během mitózy může vést k vytvoření mikrojadra. Chromozomy, které se špatně napojí na mikrotubuly dělicího vřeténka mohou být ponechány mimo hlavní buněčné jádro. Kolem oddělených chromozomů se vytvoří jaderný obal a dochází ke vzniku mikrojadra (Ly a Cleveland, 2017).

Mikrojadra mohou obsahovat chromozomové fragmenty nebo celé chromozomy. Tyto oddělené chromozomy se obvykle replikují pomaleji oproti chromozomům v hlavním buněčném jádře. Předčasná kondenzace neúplně zreplikovaných chromozomů bývá spouštěčem vzniku zlomů a může způsobit i rozpad chromozomů (Soto et al., 2018). Velkým problémem bývá defektní jaderný obal mikrojadra, který obsahuje pouze nejnnutnější proteiny. Jeho struktura je značně oslabená a netvoří se v ní jaderné póry nezbytné pro transport proteinů zajišťujících integritu genomu. Poškozený jaderný obal mikrojadra může mít za následek postupný rozpad pohlcených chromozomů (obrázek č. 10) (Crasta et al., 2012; Liu et al., 2018).



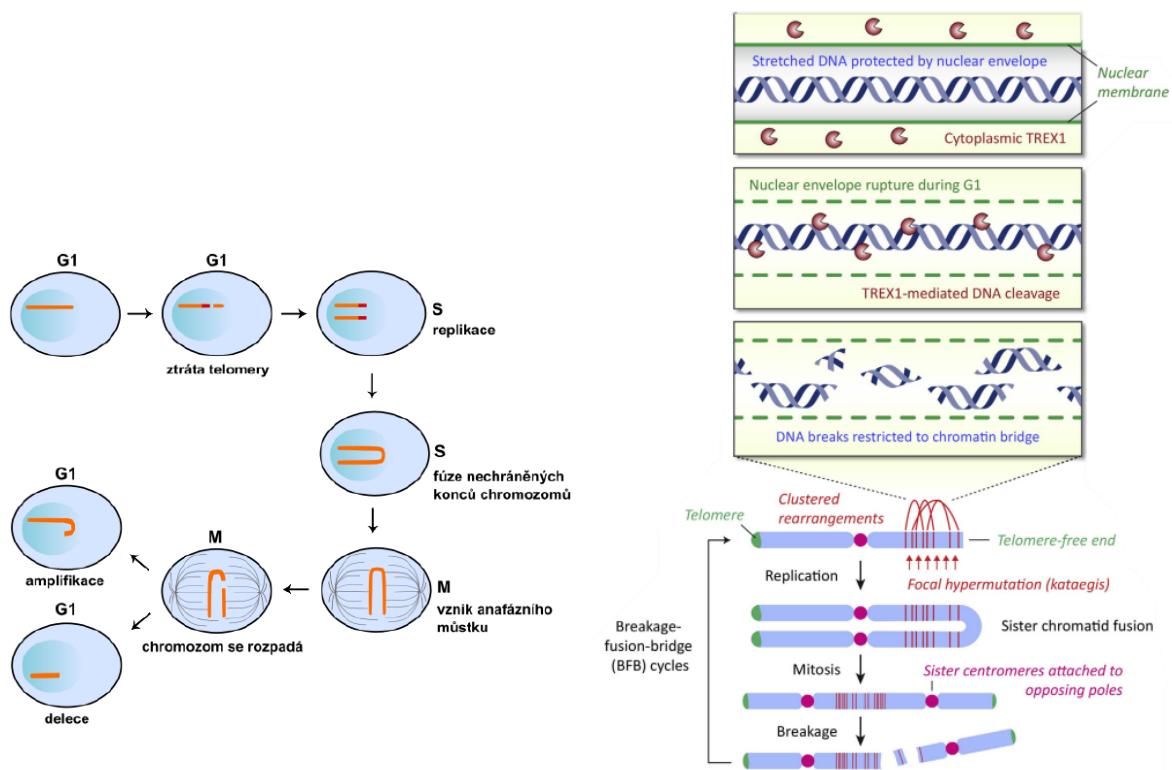
Obrázek č. 10 – Oddělené chromozomy předčasně kondenzují a rozpadají se. Rozpad chromozomů je zapříčiněn především defektním jaderným obalem mikrojádra, který je mnohem křehčí než běžný jaderný obal. Fragменты chromozomů se poté mohou z mikrojádra vyčlenit a vytvořit tzv. double-minute chromozomy, nebo se náhodně pospojují za vzniku derivovaného chromozomu (Ly & Cleveland, 2017).

Vzniklé chromozomové fragmenty se mohou náhodně spojit a vytvořit derivovaný chromozom, případně tzv. double-minute chromozomy. Double-minute chromozomy představují malé, cirkulární fragmenty DNA bez centromery i telomer. Tyto malé částice vznikají rozpadem tzv. homogenně se barvících oblastí, které obsahují mnohonásobně amplifikované geny (Oobatake & Shimizu, 2020). Derivovaný chromozom může setrvat v buněčném jádře i několik buněčných cyklů. Během buněčného dělení pak dochází k řadě chyb v důsledku absence partnerského homologního chromozomu. Následkem těchto chyb se přestavěný chromozom náhodně rozdělí do dceřiných buněk. Často se pak zpětně začlení do hlavního buněčného jádra a vznikají dceřiné buňky s různě přestavěným genomem (L'Abbate et al., 2014; Turner et al., 2017; Koche et al., 2020).



Obrázek č. 11 – Model seismických amplifikací DNA. Chromozomy, které prodělají chromothripsis, často ztrácí částí svého genetického materiálu. Vzniklé fragmenty DNA mohou být následně cirkularizovány a podstoupit několik cyklů cirkulárních rekombinací. Ke stabilizaci amplikonů může dojít třemi různými způsoby. Cirkulární fragmenty se mohou zachovat ve formě double minute, nebo se mohou integrovat do genomu hostitele a vytvořit homogenně se barvící oblasti. Ve třetím případě může dojít k linearizaci fragmentů, zisku telomer a vytvoření tzv. neochromozomů (Rosswog et al., 2021).

Ke vzniku chromothripsis pravděpodobně přispívá také opotřebení telomer a přerušení dvouvlákna DNA. To může být způsobeno například replikačním nebo onkogeny indukovaným stresem. Při abrazi telomer dochází k tzv. BFB („breakage-fusion-bridge“) cyklům, během kterých fúzíjí nechráněné konce chromozomů a vzniká derivovaný dicentrický chromozom (obrázek č. 12). Ten se posléze napojí na mitotické vřeténko a vytvoří tzv. anafázní můstek. Konce derivovaného chromozomu jsou během cytokineze taženy na opačnou stranu buňky a dochází k roztržení chromozomu. Zlom obvykle nastává mimo místo fúze a chromozom se rozdělí nerovnoměrně. V důsledku toho dochází ke ztrátám malých chromozomových fragmentů a nerovnoměrnému rozdělení genetického materiálu do dceřiných buněk. Uniklé chromozomové fragmenty mohou dát posléze základ mikrojadru. Celý proces BFB cyklu se opakuje tak dlouho, dokud chromozomy nezískají telomery nové. Obvykle je získají translokací chromozomového materiálu z jiného chromozomu (McClintock, 1941, Maciejowski et al., 2015; Umbreit et al., 2020; Dewhurst, 2020)



Obrázek č. 12 – Breakage-fusion-bridge cyklus jako možný mechanismus vzniku chromothripsis. Chromozomy, které mají zkrácené telomery (nebo je vůbec nemají), mohou svými nechráněnými konci fúzovat a vytvořit nestabilní dicentrický chromozom. Během anafázy vznikají chromatinové mosty, které propojují dceřiné buňky. Jejich formace indukuje prasknutí jaderné membrány, což umožňuje vstoupit nukleáze TREX1 do jádra. Nukleáza TREX1 generuje jednovláknové zlomy a umožňuje přerušení anafázních můstků. Rozrušení chromatinových můstků může mít za následek ztráty malých fragmentů DNA, které mohou dát základ mikrojádru. Jelikož se dicentrický chromozom roztrhne náhodně, genetický materiál se do dceřiných buněk předává nerovnoměrně. BFB cyklus se posléze opakuje tak dlouho, dokud chromozom nezíská nové telomery (Ly & Cleveland, 2017).

Další hypotézou, která by mohla objasnit vznik chromothripsis, je teorie přerušené apoptózy. Buňky s masivně poškozeným genomem místo toho, aby podstoupily programovanou buněčnou smrt, jsou opraveny reparačními procesy za vzniku četných chyb (Tubio & Estivill, 2011). Replikační stres vedoucí k zastavení replikační mašinerie a vzniku dvouvláknových zlomů má rovněž velký vliv na indukci chromothripsis (Shaikh et al., 2022; Wilhelm et al., 2020). Koltsova a kolektiv ve své studii zmiňují, že aberantní epigenetická regulace buňky může také hrát roli při vzniku rozsáhlých chromozomových přestavb (Koltsova et al., 2019). Ke vzniku chromothripsis mohou přispět i exogenní faktory jako jsou volné radikály nebo ionizující záření. V jejich důsledku vznikají zlomy náhodně a vedou k aktivaci široké škály opravných mechanismů (Morishita et al., 2016). Jiným vnějším faktorem může být např. integrace viru do genomu hostitele způsobující četné zlomy

a nestabilitu napříč genomem (Schütze et al., 2016). Dle literatury existuje i přímá souvislost mezi mutacemi genu *TP53* a výskytem chromothripsis (Cai et al., 2014; Feurstein et al., 2018). Mutace v daném tumor supresorovém genu mají za následek potlačení reparačních mechanismů buňky a deregulaci kontroly průchodu buněčným cyklem (Feurstein et al., 2018). Vzniklé defekty umožňují buňkám abnormální proliferaci a poskytují silnou selekční výhodu (Sasi et al., 2022; Shoshani et al., 2021).

Chromothripsis byla poprvé popsána u pacientky s chronickou lymfocytární leukémií, ale v současné době je zřejmé, že se tento jev vyskytuje napříč celou řadou dalších typů nádorových onemocnění a má zásadní vliv pro evoluci nádorového genomu. Data z publikovaných studií ukazují, že se frekvence chromothripsis značně liší napříč jednotlivými typy nádorů (Cortés-Ciriano et al., 2020; Rasnic a Linial, 2021; Bolkestein et al., 2020). Pro pacienty s MDS a komplexním karyotypem se udává frekvence přibližně 50 % (Zemanova et al., 2014; Voronina et al., 2020).

Chromothripsis je markerem velice nepříznivého průběhu nádorových onemocnění. Její včasná detekce významně přispívá k určení rozsahu maligního onemocnění u pacientů, stanovení jejich prognózy a k volbě vhodné cílené terapie. Jako zásadní se jeví vytipování konkrétních genů, které bývají zasažené nejčastěji a cílení léčby právě na tyto geny. Dobrým příkladem může být efektivní léčba zacílená na protoonkogen *PIMI*. Jedná se o nejčastěji deregulovaný gen v důsledku chromothripsis u pacientů s AML. Jeho produktem je serin/threoninová kináza, která se podílí na buněčné proliferaci (Rücker et al., 2018). Některé studie uvádí, že by exprese fúzních genů vzniklých v důsledku chromothripsis mohla napomoci ke zvýšení citlivosti buněk na určité druhy léčiv (Nijhawan et al., 2012). Příkladem může být fúzní transkript ETV6-PDGFRB nalezený u pacienta s MDS. Přestavby genu *PDGFRB* jsou citlivé na inhibitory tyrozinových kináz a zmíněný fúzní transkript by tedy mohl fungovat jako terapeutický cíl. Jako potenciální terapeutické cíle by mohly sloužit i další podobné fúzní varianty (Singh et al., 2019). V důsledku chromozomových přestaveb způsobených chromothripsis může dojít ke vzniku neoantigenů, které váží molekuly hlavního histokompatibilního komplexu a umožňují expanzi T-buněčných klonů. Toto zjištění umožnilo lépe indikovat imunoterapii pro vybrané pacienty (Mansfield et al., 2019). Dalším terapeutickým cílem by mohlo být zacílení léčby na signální a opravné mechanismy, které vedou k zastavení buněčného cyklu a korekci poškozené DNA. Nádorové buňky zasažené chromothripsis mívají poškozený mitotický aparát a funkci systému odpovědi buňky na

poškození. Mutované geny zahrnuté v procesu oprav molekuly DNA velmi přispívají k progresi nádoru (Bolkestein et al., 2020; Ratnaparkhe et al., 2017; Yamanishi et al., 2013).

1.3 Myelodysplastické syndromy

1.3.1 Charakteristické znaky a klinické projevy

Myelodysplastické syndromy (MDS) představují heterogenní skupinu klonálních onemocnění krvetvorby. Vyskytují se převážně u lidí ve vyšším věku (70–76 let), a to s incidencí 5 nových případů na 100 000 obyvatel ročně. Onemocnění však může postihnout i mladší osoby včetně dětí (Neukirchen et al., 2011; Novák et al., 2021; Keel et al., 2016). Přesné příčiny rozvoje MDS zatím nejsou zcela jasné. V patogenezi onemocnění hraje velkou roli iniciální poškození kmenové hematopoetické buňky, jehož následkem je vznik patologického buněčného klonu s proliferační výhodou. Časné prekurzory krvetvorby bývají stimulovány k proliferaci, zatímco zralejší formy buněk v důsledku abnormální imunitní odpovědi na poškození podstupují apoptózu. Neefektivní krvetvorba má za následek buněčně bohatou dysplastickou kostní dřeň spolu s periferní cytopenií v jedné či více krvetvorných liniích (mono-, bi-, až pancytopenie). Počet blastů s velmi nízkým stupněm apoptózy se může postupně zvyšovat, až dojde k přechodu nemoci do akutní myeloidní leukemie (AML) (Jonášová, 2013; Zeidan et al., 2019). K progresi do AML dochází až u 30 % nemocných s MDS. U pacientů s izolovanou delecí del(5q) je tomu tak pouze v 10 % případů, jelikož tito pacienti velmi dobře reagují na podávanou léčbu (Menssen a Walter, 2020; Mallo et al., 2011).

U velkého množství pacientů je MDS zjištěno náhodně při preventivním vyšetření krevního obrazu. Prvotním nálezem obvykle bývá anémie, trombocytopenie, či neutropenie. Mezi základní symptomy z důsledku anémie patří bledost, dušnost, extrémní únava stupňující se do bolestí hlavy, tachykardie a hypotenze. Nemocní s trombocytopenií mají obtíže s různě rozsáhlým krvácením, a to především ve formě krevních podlitin pod kůží. Projevem neutropenie je snížení počtu neutrofilních leukocytů nezbytných pro imunitní obranu organismu. Tito nemocní pak trpí únavou a opakovanými bakteriálními infekcemi (Červinek, 2015). Klinický obraz pacientů s MDS bývá obecně velmi různorodý v závislosti na konkrétním podtypu onemocnění. Asi u 10–20 % nemocných vzniká MDS jako sekundární forma následkem působení rizikových faktorů jako je léčba cytostatiky, ozařování nebo opakovaný kontakt s některými chemikáliemi (organická rozpouštědla, benzen, pesticidy)

(Smith et al., 2003; Feng et al., 2021). Pacienti se sekundárním MDS mají horší prognózu na přežití oproti pacientům s primárním MDS (Østgård et al., 2015).

1.3.2 Klasifikace MDS

Termín myelodysplastický syndrom byl poprvé zaveden v roce 1976, kdy francouzsko-americko-britská (FAB) skupina pro klasifikaci leukémií definovala dvě kategorie myelodysplastických syndromů – refrakterní anémii s nadbytkem blastů (RAEB) a chronickou myelomonocytární leukemii (CMML) (Bennett et al., 1976). V roce 1982 tatáž skupina odborníků vytvořila nové, podrobnější dělení (Bennett et al., 1982). Tato tzv. FAB klasifikace rozdělila MDS pacienty do pěti skupin dle procentuálního zastoupení blastů v periferní krvi a kostní dřeni (tabulka č. 2). Z tohoto uspořádání vycházel další klasifikační systém WHO (World Health Organization) z roku 1999. Tato klasifikace přinesla další diagnostická kritéria a přehodnotila stávající rozdělení pacientů. Nemocní byli rozřazeni do několika kategorií myelodysplastických syndromů s příslušným upřesněním. Systém poprvé zavedl samostatnou kategorii pacientů definovanou na základě specifické cytogenetické abnormality, a to na základě izolované delece 5q (Jaffe et al., 2000). Toto rozdělení bylo revidováno v roce 2008 (Campo et al., 2016) a posléze 2016 (Arber et al., 2016). Revidované formy ještě více zdůraznily diagnostický význam cytogenetických nálezů (tabulka č. 3). Forma WHO klasifikace z roku 2016 zavedla skupinu MDS-U pro ty pacienty, u kterých nejsou jasně splněna všechna kritéria pro MDS (např. mají pancytopenii v kostní dřeni, ale nemají zde dostatečný počet dysplastických krvinek). Do této kategorie obvykle spadají pacienti s prokázanými cytogenetickými odchylkami chromozomů, ale bez nálezu dysplastických změn v kostní dřeni. Tato klasifikace také poprvé zahrnula přítomnost molekulární změny. To vycházelo z nových poznatků na základě identifikace unikátních biomarkerů pomocí analýzy genové exprese a sekvenace nové generace (Arber et al., 2016).

FAB podtyp	% blastů v KD	% blastů v PK
RA (refrakterní anémie)	<5	<1
RARS (refrakterní anémie s prstenčitými sideroblasty)	<5	<1
RAEB (refrakterní anémie s nadbytkem blastů)	5-20	0-4
RAEB-T (refrakterní anémie s nadbytkem blastů v transformaci)	21-30	≥5
CMML (chronická myelomonocytární leukemie)	<20	-

Tabulka č. 2 – Kategorie MDS definované FAB systémem v roce 1982. MDS pacienti byli rozděleni do pěti skupin, a to na nemocné s refrakterní anémií (RA), s refrakterní anémií s prstenčitými sideroblasty (RARS), s refrakterní anémií s nadbytkem blastů (RAEB), s refrakterní anémií s nadbytkem blastů v transformaci (RAEB-T) a na pacienty s chronickou myelomonocytární leukémií (CMML) (Bennett et al., 1982).

Kategorie	Dysplastické linie	Cytopenie *	Prstenčité sideroblasty v kostní dřeni	Blasty v kostní dřeni	Blasty v periferní krvi	Cytopenetický nález
MDS s unilineární dysplázií (MDS-SLD)	1	1-2 **	< 15 % / < 5 %	> 5 %	> 1 %	Jakýkoliv, pokud nespĺňuje kritéria izolované del(5q)
MDS s multilineární dysplázií (MDS-MLD)	2-3	1-3 **	< 15 % / < 5 %	> 5 %	> 1 %	Jakýkoliv, pokud nespĺňuje kritéria izolované del(5q)
MDS s prstenčitými sideroblasty (MDS-RS)						
MDS-RS s unilineární dysplázií (MDS-RS-SLD)	1	1-2 **	≥ 15 % / ≥ 5 %	> 5 %	> 1 %	Jakýkoliv, pokud nespĺňuje kritéria izolované del(5q)
MDS-RS s multilineární dysplázií (MDS-RS-MLD)	2-3	1-3 **	≥ 15 % / ≥ 5 %	> 5 %	> 1 %	Jakýkoliv, pokud nespĺňuje kritéria izolované del(5q)
MDS s izolovanou delecí 5q	1-3	1-2	Žádné nebo jakýkoliv	> 5 %	> 1 %	Izolovaná del(5q) nebo s jednou další aberací kromě -7 či del(7q)
MDS s přebytkem blastů (MDS-EB)						
MDS-EB-1	0-3	1-3	Žádné nebo jakýkoliv	5-9 %	2-4 %	Jakýkoliv
MDS-EB-2	0-3	1-3	Žádné nebo jakýkoliv	10-19 %	5-19 %	Jakýkoliv
MDS, neklasifikované (MDS-U)						
S 1 % blastů v periferní krvi	1-3	1-3	Žádné nebo jakýkoliv	< 5 %	= 1 %	Jakýkoliv
S unilineární dysplázií	1	3	Žádné nebo jakýkoliv	< 5 %	< 1 %	Jakýkoliv
Podle definující cytopenetické abnormality	0	1-3	< 15 %	< 5 %	< 1 %	MDS definující abnormality
Dětská refrakterní cytopenie	1-3	1-3	Žádný	< 5 %	< 2 %	Jakýkoliv

Tabulka č. 3 – WHO klasifikace z roku 2016. Systém rozděluje pacienty na MDS s excesem blastů (MDS-EB), MDS s unilineární dysplázií (MDS-SLD), MDS s multilineární dysplázií (MDS-MLD), MDS s prstenčitými sideroblasty (MDS-RS), MDS s izolovanou delecí 5q a neklasifikované MDS (MDS-U) (Arber et al., 2016).

Pro zhodnocení prognózy pacientů bylo zavedeno několik prognostických systémů. V roce 1997 byl sestaven tzv. Mezinárodní prognostický skórovací systém IPSS (International Prognostic Scoring System), který se stal zlatým standardem pro stanovení rizika nemoci u nově diagnostikovaných MDS pacientů. Systém byl založen na základě procentuálního obsahu blastů v kostní dřeni, počtu cytopenií a cytogenetických změn v karyotypu (Greenberg et al., 1997). V roce 2011 byla publikována analýza cytogenetických nálezů u více než

2000 neléčených nemocných s MDS z německých a rakouských registrů. Tato analýza sloužila jako podklad pro Revidovaný mezinárodní prognostický skórovací systém (IPSS-R), který zahrnul více než 7000 nemocných s primárním MDS. IPSS-R vydaný v roce 2012 zdůraznil a upřesnil význam cytogenetických změn a míru cytopenie pro prognózu nemocných (Greenberg et al., 2012). Do klasifikačního systému navíc přibyly další prognostické hodnoty jako hladina hemoglobinu, počet krevních destiček a neutrofilů. Na základě zjištěných nálezů jsou nemocní řazeni do pěti kategorií s rozdílnou prognózou, přičemž prognóza se přímo úměrně zhoršuje se stoupajícím počtem chromozomových aberací v karyotypu. Vůbec nejhorší prognózu mají nemocní s komplexními karyotypy zahrnujícími více než tři chromozomové změny. Pacienti s velmi nízkým rizikem mají medián přežití 8,8 roku, zatímco pacienti s velmi vysokým rizikem mají medián přežití 0,8 roku. Hodnota rizika je stanovována součtem jednotlivých bodů přiřazených na základě rizikových faktorů. Ty představují aberantní cytogenetické nálezy, zmnožené blasty v kostní dřeni a nízké hodnoty hemoglobinu, krevních destiček a neutrofilů (Greenberg et al., 2012; Schanz et al., 2012). Systém hodnocení, kategorie rizika a cytogenetické aberace jsou uvedeny v tabulce č. 4, 5 a 6.

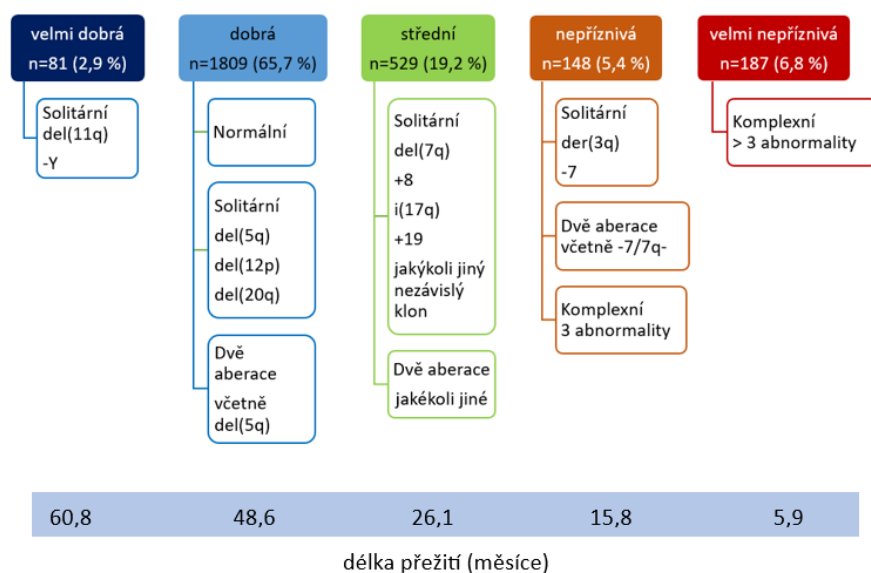
Hodnota rizika	0	0,5	1	1,5	2	3	4
Cytogenetický nález	Velmi dobrý	–	Dobrý	–	Špatný	Velmi špatný	Velmi špatný
Procento blastů v kostní dřeni	≥ 2	–	> 2 - < 5	–	5 - 10	> 10	–
Hemoglobin (g/dl)	≥ 10	–	8 - < 10	< 8	–	–	–
Krevní destičky (x10⁹/l)	≥ 100	50 - < 100	< 50	–	–	–	–
Absolutní počet neutrofilů (x10⁹/l)	≥ 0,8	< 0,8	–	–	–	–	–

Tabulka č. 4 – IPSS-R systém pro zhodnocení prognózy nemocných s MDS (převzato a upraveno dle Greenberg et al., 2012).

Kategorie rizika	Rizikové skóre
Velmi nízké	≤ 1,5
Nízké	> 1,5 - 3
Střední	> 3 - 4,5
Vysoké	> 4,5 - 6
Velmi vysoké	> 6

Tabulka č. 5 – IPSS-R systém pro zhodnocení prognózy nemocných. Prognóza se stanoví na základě součtu bodů z jednotlivých vyšetření. Výsledek součtu zařadí nemocného do příslušné rizikové kategorie (převzato a upraveno dle Greenberg et al., 2012).

Mezinárodní prognostický skórovací systém (IPSS-R)



Tabulka č. 6 – Revidovaný mezinárodní prognostický skórovací systém IPSS-R. Zhodnocení významu nalezených cytogenetických změn a jejich dopad na celkové přežití pacientů (převzato a upraveno dle Greenberg et al., 2012).

Rok 2022 přinesl nové klasifikační systémy, které zrevidovaly a zaktualizovaly do té doby platné klasifikační uspořádání. Jedná se o ICC – International Consensus Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemias (Arber et al., 2022), nový WHO klasifikační systém (Khoury et al., 2022) a IPSS-M – The International Prognostic Scoring System – Molecular (Bernard et al., 2022). ICC klasifikace nově řadí pacienty s diagnózou MDS-EB-2 do skupiny MDS/AML. Kategorie MDS-RS byla nahrazena MDS s mutací genu *SF3B1*. V případě, že pacienti nemají tento gen mutovaný, spadají do kategorie MDS NOS

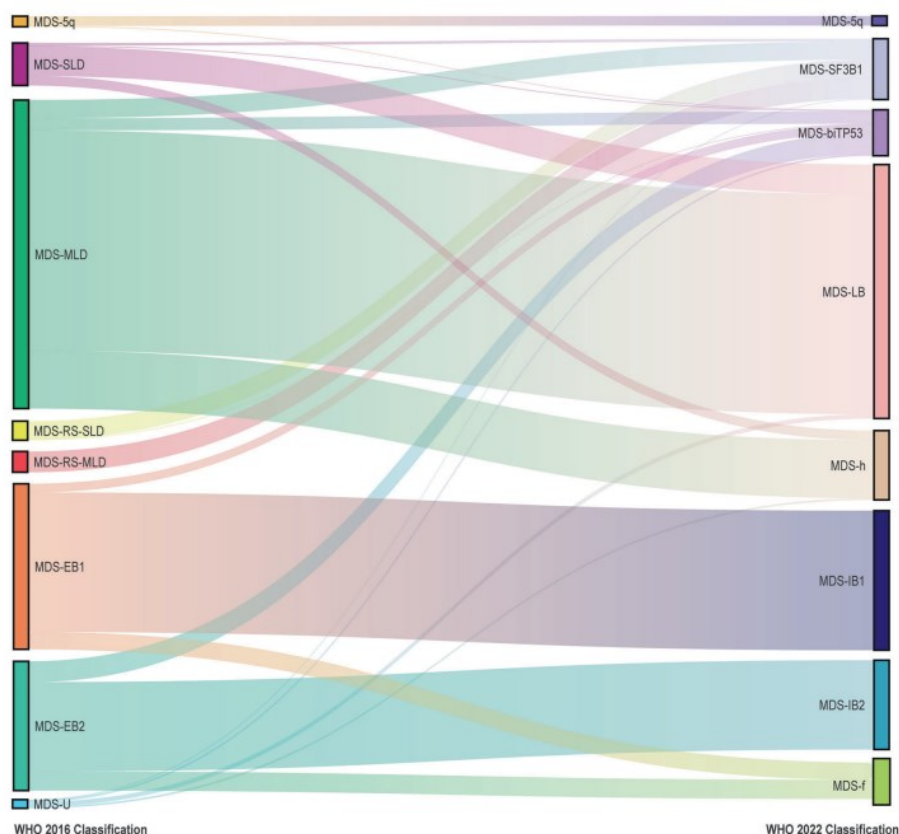
(nespecifikované MDS). Do skupiny MDS-NOS patří i pacienti s unilineární či multilineární dysplázií. Nová WHO klasifikace zachovala, navzdory ICC klasifikaci, kategorii MDS-EB-2. Nově však zavedla samostatnou skupinu pacientů s bialelickou mutací genu *TP53*. Pacienty bez zvýšeného počtu blastů rozdělila na hypoplastické MDS (MDS-h) a MDS-LB. Do kategorie MDS-RS zahrnuje nemocné s nízkým počtem blastů a mutací genu *SF3B1*. MDS pacienti se zvýšeným počtem blastů rozdělila na MDS-IB1, MDS-IB2 a MDS s fibrózou (MDS-f). Jednotlivé klasifikační systémy ICC a WHO jsou uvedeny v tabulce č. 7 a 8. Molekulární prognostický skórovací systém zdůraznil význam masivního paralelního sekvenování pro detekci genových mutací. Na základě tohoto vyšetření pacient získá molekulární skóre, které zohledňuje nalezené mutační změny. To posléze umožňuje nastavit danému pacientovi více personalizovanou léčbu. Na základě tohoto klasifikačního systému bylo restratifikováno přibližně 46 % MDS nemocných (Bernard et al., 2022). Pro snadnější klinické použití byl vytvořen také volně dostupný online kalkulátor, který po zadání vstupních dat vyhodnotí rizikost onemocnění pro daného pacienta (dostupný na <https://mds-risk-model.com>) (Bernard et al., 2022).

	Dysplastic lineages	Cytopenias	Cytoses*	BM and PB Blasts	Cytogenetics†	Mutations
MDS with mutated <i>SF3B1</i> (MDS- <i>SF3B1</i>)	Typically $\geq 1\ddagger$	≥ 1	0	<5% BM <2% PB§	Any, except isolated del(5q), -7/del(7q), abn3q26.2, or complex	<i>SF3B1</i> ($\geq 10\%$ VAF), without multi-hit <i>TP53</i> , or <i>RUNX1</i>
MDS with del(5q) [MDS-del(5q)]	Typically $\geq 1\ddagger$	≥ 1	Thrombocytosis allowed	<5% BM <2% PB§	del(5q), with up to 1 additional, except -7/del(7q)	Any, except multi-hit <i>TP53</i>
MDS, NOS without dysplasia	0	≥ 1	0	<5% BM <2% PB§	-7/del(7q) or complex	Any, except multi-hit <i>TP53</i> or <i>SF3B1</i> ($\geq 10\%$ VAF)
MDS, NOS with single lineage dysplasia	1	≥ 1	0	<5% BM <2% PB§	Any, except not meeting criteria for MDS-del(5q)	Any, except multi-hit <i>TP53</i> ; not meeting criteria for MDS- <i>SF3B1</i>
MDS, NOS with multilineage dysplasia	≥ 2	≥ 1	0	<5% BM <2% PB§	Any, except not meeting criteria for MDS-del(5q)	Any, except multi-hit <i>TP53</i> ; not meeting criteria for MDS- <i>SF3B1</i>
MDS with excess blasts (MDS-EB)	Typically $\geq 1\ddagger$	≥ 1	0	5-9% BM, 2-9% PB§	Any	Any, except multi-hit <i>TP53</i>
MDS/AML	Typically $\geq 1\ddagger$	≥ 1	0	10-19% BM or PB	Any, except AML-defining¶	Any, except <i>NPM1</i> , bZIP <i>CEBPA</i> or <i>TP53</i>

Tabulka č. 7 – ICC klasifikační systém pro MDS. Nově byla přidána kategorie MDS s mutací genu *SF3B1* a MDS NOS (nespecifikované MDS) (Arber et al., 2022).

	Blasts	Cytogenetics	Mutations
MDS with defining genetic abnormalities			
MDS with low blasts and isolated 5q deletion (MDS-5q)	<5% BM and <2% PB	5q deletion alone, or with 1 other abnormality other than monosomy 7 or 7q deletion	
MDS with low blasts and <i>SF3B1</i> mutation ^a (MDS- <i>SF3B1</i>)		Absence of 5q deletion, monosomy 7, or complex karyotype	<i>SF3B1</i>
MDS with biallelic <i>TP53</i> inactivation (MDS-bi <i>TP53</i>)	<20% BM and PB	Usually complex	Two or more <i>TP53</i> mutations, or 1 mutation with evidence of <i>TP53</i> copy number loss or cnLOH
MDS, morphologically defined			
MDS with low blasts (MDS-LB)	<5% BM and <2% PB		
MDS, hypoplastic ^b (MDS-h)			
MDS with increased blasts (MDS-IB)			
MDS-IB1	5–9% BM or 2–4% PB		
MDS-IB2	10–19% BM or 5–19% PB or Auer rods		
MDS with fibrosis (MDS-f)	5–19% BM; 2–19% PB		

Tabulka č. 8 – WHO klasifikační systém z roku 2022. **MDS-bi*TP53*** – MDS s bialelickou mutací v genu *TP53*, **MDS-h** – hypoplastické MDS, **MDS-LB** – MDS s nízkým počtem blastů, **MDS-*SF3B1*** – MDS s mutovaným genem *SF3B1*, **MDS-IB1/2** – MDS se zvýšeným počtem blastů typu 1 a 2 a **MDS-f** – MDS s fibrózou (Khoury et al., 2022).



Obrázek č. 13 – Vztahy mezi jednotlivými kategoriemi MDS definovanými klasifikacemi WHO 2016 (levá strana) a WHO 2022 (pravá strana). **MDS-U** – neklasifikované MDS, **MDS-SLD** – MDS s unilineární displázií, **MDS-MLD** – MDS s multilineární displázií, **MDS-RS-SLD** – MDS s prstenčitými sideroblasty a SLD, **MDS-RS-MLD** – MDS s prstenčitými sideroblasty a MLD, **MDS-EB-1/2** – MDS s excesem blastů typu 1 nebo 2, **MDS 5q-** – MDS s izolovanou delecí 5q, **MDS-bi*TP53*** – MDS s bialelickou inaktivací genu *TP53*, **MDS-LB** – MDS s nízkým počtem blastů, **MDS-*SF3B1*** – MDS s nízkým počtem blastů a mutací genu *SF3B1*, **MDS-h** – hypoplastické MDS, **MDS-IB1/2** – MDS se zvýšeným počtem blastů typu 1 nebo 2, **MDS-f** – MDS s fibrózou (Y. Zhang et al., 2022).

Volba vhodného skórovacího systému se odvíjí především od klinických požadavků a často rozhodují drobné rozdíly základního konceptu jednotlivých klasifikací. Při určování prognózy pro daného pacienta je vždy potřeba brát ohled i na jeho věk, psychický stav a přítomné komorbidity. V současné době je pozornost zaměřena na hledání nových prognostických faktorů, které by mohly pomoci vyhledat rizikové skupiny nemocných, a to především u časných forem MDS. V důsledku zhodnocení rizika vážných komplikací pro daného pacienta je umožněno již v počátečních stádiích choroby indikovat intenzivní léčbu nebo transplantaci krvetvorných buněk (Čermák, 2016).

1.3.3 Léčebné postupy

Léčba MDS spočívá ve snaze napravit poškozenou hematopoézu a snížit riziko relapsu onemocnění. Pacienti s mírnými změnami v krevním obraze bývají pouze sledováni bez další terapie. Ta se zahájí v momentě, kdy dojde ke zhoršení cytopenie a objeví se typické příznaky nemoci. Nemocným s nízkým či středním rizikem onemocnění bývá podávána substituční léčba ve formě transfuzí erytrocytů či trombocytů. Těmto pacientům bývá nasazována ještě doplňující chelatační léčba, která má v případě potřeby zamezit akumulaci železa v těle pacienta (Merkel et al., 2019; Mangan et al., 2019). Jiným krokem může být volba imunosupresivní léčby. Jednou z nejvýznamnějších imunomodulačních látek je lenalidomid. Jedná se o látku ze skupiny analogů thalidomidu s imunomodulačními, antiproliferativními a antiangiogenními účinky. Prozatímní výsledky ukazují, že léčba daným přípravkem bývá úspěšná, a to především u pacientů s izolovanou delecí 5q – del(5q). Až 90 % těchto pacientů přestává být závislých na transfuzích červených krvinek (Alan List et al., 2006; Gurnari et al., 2022).

Nemocní s nadbytkem blastů a středním či vysokým rizikem dle IPSS-R (Greenberg et al., 2012) podstupují intenzivní léčbu včetně transplantace krvetvorných buněk. Transplantace krevních buněk bývá častou cestou u mladších nemocných se závažnými komplikacemi, které nelze zvládnout jinými léčebnými přístupy. Pacienti se závažným rizikem bývají léčeni také kombinovanou chemoterapií, či hypomethylačními látkami. Významnou hypomethylační látkou je lék azacytidin, který úspěšně funguje na klony s různými cytogenetickými aberacemi a komplexními karyotypy. Terapeutická látka má však i několik nevýhod, mezi které patří především nemožnost odstranit patologickou hematopoetickou buňku a léčebná odpověď je tak dosahována přibližně u poloviny pacientů. Jedná se tedy pouze o přechodnou léčbu, která nedokáže zabránit relapsu onemocnění (Wei et al., 2020; Platzbecker et al., 2013).

V současné době probíhá celá řada studií zaměřených na nové typy léčebných preparátů a terapeutické kombinace léčiv stávajících. Objevují se nové léky, které zkvalitňují a prodlužují

život MDS nemocných (Stopka et al., 2022; Ivanov et al., 2022; Daver et al., 2021). Navzdory značnému pokroku však stále zůstává pouze jediná možnost, jak tuto nemoc zcela vyléčit, a to alogenní transplantací kmenových buněk krvetvorby.

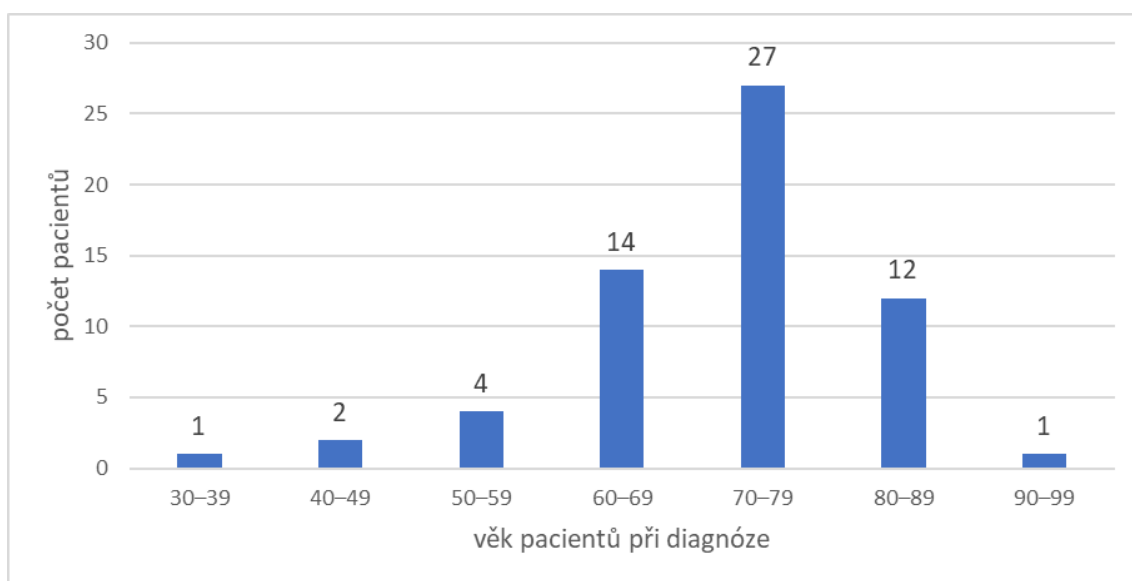
2 Cíle práce

Cílem předkládané diplomové práce bylo provést detailní cytogenomickou analýzu komplexních chromozomových aberací v diagnostických vzorcích u pacientů s různými subtypy myelodysplastických syndromů, určit chromozomy nejčastěji vstupující do komplexních přestaveb a zhodnotit frekvenci a klinický význam chromothripsis a klonální heterogenity u dříve neléčených pacientů s MDS a komplexními karyotypy.

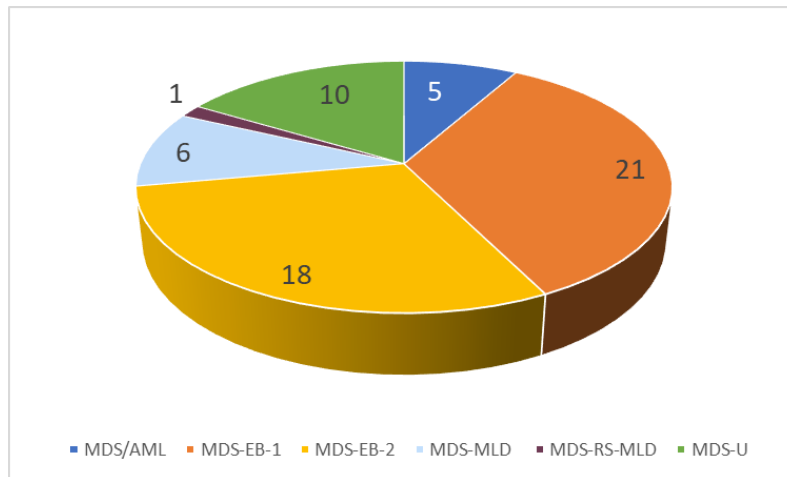
3 Materiál

3.1 Soubor pacientů

V období od 14. 11. 2017 do 31. 3. 2023 jsme v Centru nádorové cytogenomiky Ústavu lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky, Všeobecné fakultní nemocnice a 1. LF UK v Praze vyšetřili 61 vzorků buněk kostní dřeně nově diagnostikovaných dospělých pacientů s diagnózou MDS a komplexním karyotypem. Jednalo se o 25 žen (41 %) a 36 mužů (59 %). Rozmezí věku pacientů bylo 36 až 91 let (graf č. 1). Průměrný věk v době stanovení diagnózy byl 71,6 let (medián věku 73 let). U všech pacientů s dostatkem klinických dat byl stanoven konkrétní subtyp onemocnění dle WHO klasifikace (Arber et al., 2016) a prognóza dle IPSS-R prognostického skórovacího systému (Greenberg et al., 2012). Všichni nemocní měli primární MDS, případně AML se změnami typickými pro MDS (MDS-related changes). Diagnózy MDS-EB-1 a MDS-EB-2 byly zastoupeny v největším počtu. Do kategorie MDS-EB-1 spadalo 21 nemocných. Ve skupině MDS-EB-2 bylo 18 pacientů (viz graf č. 2). Základní charakteristiky analyzovaného souboru pacientů shrnuje tabulka v příloze č. 1.



Graf č. 1 – Rozložení věku pacientů v době stanovení diagnózy.



Graf č. 2 – Zastoupení jednotlivých subtypů MDS v analyzovaném souboru nemocných. MDS/AML – MDS se změnami typickými pro AML, MDS-EB – MDS s excesem blastů, MDS-MLD – MDS s multilineární dysplázií, MDS-RS – MDS s prstenčitými sideroblasty, MDS-U – neklasifikované MDS.

Vzorky kostní dřeně všech nemocných jsme analyzovali pomocí klasické cytogenetické analýzy. U každého pacienta jsme určili počet přítomných chromozomových aberací v karyotypu. Za komplexní karyotyp jsme považovali nález numerických či strukturních změn, které zahrnovaly alespoň tři chromozomy a/nebo strukturní přestavby, při kterých docházelo ke třem a více zlomům na chromozomech (dle Schoch et al., 2001). Chromozomové přestavby jsme hodnotili na základě platné ISCN nomenklatury (McGowan-Jordan et al., 2020). Pravidla pro počítání chromozomových aberací shrnuje následující tabulka č. 9.

Typy změn	Příklady chromozomových aberací	Počet změn
početní zisky	trizomie duplikace derivovaných chromozomů	1
početní ztráty	monozomie autozomů/gonozomů	1
balancované strukturní aberace	balancované translokace komplexní balancované translokace inverze balancované inzerce	1
nebalancované aberace, které zahrnují 1 chromozom	izochromozom delece duplikace ring chromozom izodicentrický chromozom homogenně se barvící oblast double minute chromozom marker chromozom	1
nebalancované aberace, které zahrnují 2 a více chromozomů	nebalancovaná translokace nebalancovaná inzerce derivovaný chromozom komplexní ring chromozom izoderivovaný chromozom	2
ploidie	násobení celé chromozomové sady	1

Tabulka č. 9 – Pravidla pro počítání chromozomových přestaveb (převzato a upraveno dle McGowan-Jordan et al., 2020).

Velikost patologických klonů jsme dále ověřovali metodou interfázní *in situ* hybridizace (I-FISH). Komplexní karyotypy jsme analyzovali metodou mnohobarevné fluorescenční *in situ* hybridizace (mFISH). Zlomová místa na přestavěných chromozomech a rozsah deletovaných chromozomových oblastí jsme upřesnili metodou mBAND (mnohobarevné pruhování s vysokým rozlišením). U 41 nemocných s dostatečným množstvím genetického materiálu jsme rozsah nebalancovaných změn upřesnili mikročipovou analýzou (aCGH/SNP). U 20 pacientů jsme již neměli k dispozici genetický materiál a vyšetření aCGH/SNP jsme nemohli provést.

3.2 Použité chemikálie, roztoky a sondy

3.2.1 Chemikálie

Klasická cytogenetická analýza

A) kultivace a zpracování vzorků kostní dřeně:

- Heparin Léčiva (Heparinum natricum 5000 IU/ml; Zentiva)
- PBS (lékárna VFN)
- kultivační médium (MarrowGrow medium; Cytogen)
- kolcemid (Demecolcine solution; Sigma)
- 0,075 M KCl (lékárna VFN)
- dH₂O
- methanol (Penta)
- kyselina octová (Penta)

B) barvení:

- 0,2 N HCl (lékárna VFN)
- 2x SSC (lékárna VFN)
- Wrightovo barvivo (eosin + methylenová modř; Sigma)
- Na₂HPO₄ · 2 H₂O (Fluka)
- KH₂PO₄ (Penta)
- dH₂O

I-FISH

- 20x SSC (lékárna VFN)
- absolutní ethanol (Penta)
- dH₂O
- FIXOGUM-Rubber cement (Marabu)
- DAPI/antifade (VECTASHIELD Antifade Mounting Medium With DAPI; MetaSystems)
- NP-40 (Nonidet P40; Glenham Life Aciences)
- imerzní olej (Immersol; Carl Zeiss)

mFISH; mBAND

- 20x SSC (lékárna VFN)
- NaOH (lékárna VFN)
- Tween 20 (Polyoxyethylen-Sorbitan Monolurate; Sigma)
- absolutní ethanol (Penta)
- dH₂O
- FIXOGUM-Rubber cement (Marabu)
- DAPI/antifade (VECTASHIELD Antifade Mounting Medium With DAPI; MetaSystems)
- imerzní olej (Immersol; Carl Zeiss)

aCGH/SNP

- 1x PBS (lékárna VFN)
- proteináza K (Qiagen)
- AL pufr (Qiagen)
- absolutní EtOH (Penta)
- promývací pufr 1 a 2 (Qiagen)
- AE pufr (Qiagen)
- agaróza (PCR agarose; Top-Bio s.r.o.)
- 1x TAE pufr (Tris-acetát-acid-EDTA; Sigma)
- GelRed (Biotium)
- GeneRuler DNA Ladder (Thermo Fisher)
- nanášecí pufr (Thermo Fisher)
- dH₂O
- ddH₂O
- anotovaná referenční genomová DNA (OneSeq Reference DNA Male or Female; Agilent Technologies)
- 10x reakční pufr pro restriční enzymy (Agilent Technologies)
- BSA
- AluI (Agilent Technologies)
- RsaI (Agilent Technologies)
- random primer (Agilent Technologies)
- 5x reakční pufr pro značící polymerázu (Agilent Technologies)

- 10x dNTPs (Agilent Technologies)
- Cyanine 3-dUTP (Cy-3) (Agilent Technologies)
- Cyanine 5-dUTP (Cy-5) (Agilent Technologies)
- Exo-Klenowův fragment (Agilent Technologies)
- TE pufr (Tris-EDTA; Sigma)
- Cot-1 DNA (Agilent Technologies)
- 10x CGH blokující činidlo (Agilent Technologies)
- 2x HI-RPM hybridizační pufr (Agilent Technologies)

3.2.2 Roztoky

Klasická cytogenetická analýza

- odběrové médium: 400 ml PBS + 4,8 ml heparinu
- hypotonický roztok: 0,075 M KCl (2,796 g KCl + 500 ml dH₂O)
- fixační roztok: methanol + kyselina octová v poměru 3:1
- 2x SSC: 50 ml 20x SSC + 450 ml dH₂O
- 0,2 N HCl: 7,3 g HCl + 1000 ml dH₂O
- Sörensenův pufr:
 - 5,34 g Na₂HPO₄ · 2 H₂O + 500 ml dH₂O (1. roztok)
 - 4,05 g KH₂PO₄ + 500 ml dH₂O (2. roztok)
 - 1. + 2. roztok jsme smíchali v poměru 1:1
- barvicí roztok: 2,5 g Wrightova barviva + 1000 ml methanolu

I-FISH

- 70% EtOH: 700 ml EtOH + 300 ml dH₂O
- 85% EtOH: 850 ml EtOH + 150 ml dH₂O
- 95% EtOH: 950 ml EtOH + 50 ml dH₂O
- 2x SSC: 50 ml 20x SSC + 450 ml dH₂O
- 0,4x SSC/0,3% NP-40: 10 ml 20x SSC + 488,5 ml dH₂O + 1,5 ml NP-40
- 2x SSC/0,1% NP-40: 50 ml 20x SSC + 9,5 ml dH₂O + 0,5 ml NP-40
- CEP hybridizační pufr: 55% formamid, 1x SSC, 10% dextran sulfát
- LSI/WCP hybridizační pufr: 50% formamid, 2x SSC, 10% dextran sulfát

mFISH; mBAND

- 70% EtOH: 700 ml EtOH + 300 ml dH₂O
- 85% EtOH: 850 ml EtOH + 150 ml dH₂O
- 96% EtOH: 960 ml EtOH + 40 ml dH₂O
- 0,1x SSC: 2,5 ml 20x SSC + 497,5 ml dH₂O
- 0,4x SSC: 10 ml 20x SSC + 490 ml dH₂O
- 2x SSC: 50 ml 20x SSC + 450 ml dH₂O
- 2x SSC/0,05% Tween 20: 50 ml 20x SSC + 449,75 ml dH₂O + 0,25 ml Tween 20
- 0,07 M NaOH: 1,4 g NaOH + 500 ml dH₂O

aCGH/SNP

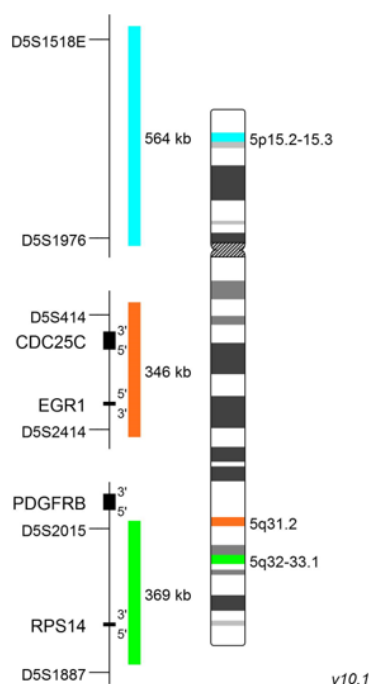
- 1% agarózový gel: 0,9 g agarózy + 90 ml 1x TAE pufru

3.2.3 Sondy

Pro detekci nejčastějších a prognosticky nejvýznamnějších aberací u MDS jsme použili panel komerčně dostupných lokus specifických (LSI) a centromerických (CEP) sond od firem MetaSystems a Abbott Molecular. Lokus specifické sondy, které hybridizují ke konkrétním lokusům na chromozomech, slouží k přímé lokalizaci genů a k detekci strukturních chromozomových aberací (delecí, translokací, inverzí, inzercí, amplifikací atd.). Příklad lokus specifické sondy pro detekci delecce chromozomu 5 je uveden na obrázku č. 14. Mezi lokus specifické sondy řadíme i tzv. break apart sondy, jejichž pomocí detekujeme přestavby konkrétního genu a sondy translokační, které umožňují detekovat fúze jednotlivých genů při translokacích. Centromerické sondy se váží k α -satelitní DNA lokalizované v oblasti centromer a jsou vhodné pro detekci početních odchylek chromozomů (monozomie, trizomie atd.). U pacientů s MDS se nejčastěji využívá kombinace čtyř sond, tzv. MDS panel. Jednotlivé sondy zahrnuté v MDS panelu shrnuje následující tabulka č. 10.

Název sondy	Cílová oblast	Výrobce
XL 5q31/5q33/5p15	5q31, 5q33, 5p15	MetaSystems
XL del(20q) plus	20q12-q13.1	MetaSystems
LSI D7S486 Spectrum Orange	7q31	Abbott Molecular
CEP 7 Spectrum Green	Centromera chromozomu 7	Abbott Molecular
CEP 8 Spectrum Orange	Centromera chromozomu 8	Abbott Molecular
CEP 9 Spectrum Green	Centromera chromozomu 9	Abbott Molecular

Tabulka č. 10 – DNA sondy zahrnuté v MDS panelu.



Obrázek č. 14 – Schéma fluorescenčně značené sondy XL 5q31/5q33/5p15 od firmy MetaSystems. Tříbarevná lokus specifická sonda určená k detekci delecí dlouhých ramen chromozomu 5 specificky hybridizuje k oblastem 5q31 (oranžový signál), 5q33 (zelený signál) a 5p15 (modrý signál). Převzato z: <https://metasystems-probes.com/en/probes/>.

Sondy od firmy MetaSystems jsou rovnou připravené k aplikaci. Sondy Abbott Molecular je nutné před použitím naředit s hybridizačním pufrům a redestilovanou vodou. Dle typu použité Abbott sondy se jedná buď o CEP hybridizační pufr (centromerické sondy), nebo LSI/WCP hybridizační pufr (lokus-specifické sondy).

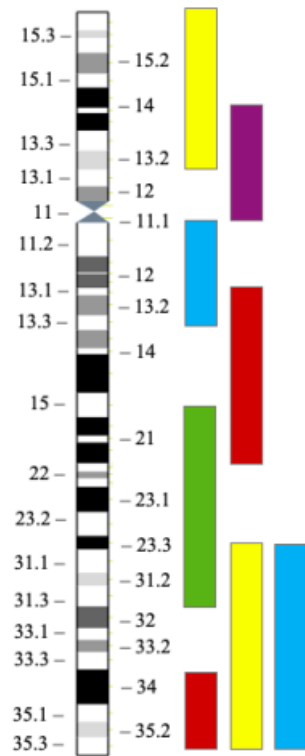
Pro analýzu komplexních karyotypů metodou mFISH jsme využívali sondu 24Xyte od firmy MetaSystems. Rozsahy delecí a zlomová místa na přestavěných chromozomech jsme

ověřovali metodou mBAND se specifickými sondami pro jednotlivé chromozomy, rovněž od firmy MetaSystems (obrázek č. 15 a 16).

24XCyte

Chr.	aqua	green	orange	red	near infrared
1					yellow
2	aqua				
3				red	
4		green			
5			orange		
6		green			yellow
7	aqua				yellow
8				red	yellow
9			orange		yellow
10	aqua	green			
11		green		red	
12		green	orange		
13	aqua			red	
14	aqua		orange		
15			orange	red	
16	aqua	green			yellow
17		green		red	yellow
18		green	orange		yellow
19	aqua			red	yellow
20	aqua		orange		yellow
21			orange	red	yellow
22	aqua	green		red	
X	aqua	green	orange		
Y	aqua		orange	red	

Obrázek č. 15 – Schéma kombinatoriálního značení malovacích sond pro metodu mFISH pomocí pěti fluorochromů. Kombinace rozdílných fluorochromů umožňuje barevně odlišit všechny chromozomy v karyotypu během jediného hybridizačního pokusu. Převzato z: <https://metasystems-probes.com/en/probes/mfish/d-0125-060-di/>.



Obrázek č. 16 – Schéma kombinatoriálního značení mBAND sondy chromozomu 5 (MetaSystems). Tato sonda umožňuje přesně určit zlomová místa na přestavěném chromozomu a analyzovat složité inter- a intra-chromozomové aberace. Převzato z: <https://metasystems-probes.com/en/probes/?c=All>.

4 Metodika

4.1 Konvenční cytogenetická analýza

Základ klasického cytogenetického vyšetření spočívá v analýze karyotypu dělících se buněk. Tu umožní nabarvení chromozomů pomocí některé z barvicích technik. Pro naši analýzu jsme použili tzv. G-pruhování, které je založené na částečné degradaci chromozomových proteinů po krátkodobém působení trypsinu nebo solných roztoků a následném obarvení chromatinu roztokem Giemsky nebo Wrighta. Následně se vyhodnocuje počet a vzor příčných tmavých pruhů, který je pro každý chromozomový pár specifický a neměnný. Na základě toho lze rozeznat a popsat odchylky od normální struktury chromozomů. Výsledkem jsou komplexní informace o karyotypu pacienta, které slouží ke stanovení diagnózy, upřesnění prognózy a k určení klonality onemocnění (Seabright, 1971).

4.1.1 Kultivace buněk kostní dřeně

Pro analýzu chromozomů v metafázi jsme použili dělící se buňky kostní dřeně. Sterilně odebranou kostní dřeň jsme obdrželi ve speciálních odběrových zkumavkách s odběrovým médiem, které obsahovalo PBS a heparin. Vzorky jsme centrifugovali po dobu 5 minut při 2 000 rpm. Získali jsme tak oddělenou vrstvu leukocytů, kterou jsme ve sterilním boxu odebrali do zkumavky s 5 ml kultivačního média. Buňky jsme následně kultivovali v termostatu s 5 % CO₂ při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin.

4.1.2 Zpracování buněčných kultur

Po kultivaci jsme buněčnou kulturu přenesli do centrifugačních zkumavek a doplnili kultivačním médiem na jednotný maximální objem 6 ml. Poté jsme ke každé kultuře přidali 100 µl kolcemidu, který zastavuje buněčné dělení ve stádiu metafáze tím, že blokuje funkci dělicího vřeténka. Centrifugační zkumavky jsme vložili do sklízecího automatu HANABI-PII Plus Metaphase Chromosome Harvester (ADS Biotec, USA), kde nejdříve probíhala kultivace buněk s kolcemidem po dobu 1 hodiny. Následně v automatu proběhla centrifugace a po odsátí supernatantu bylo k sedimentu přidáno 5 ml hypotonického roztoku (0,075 M KCl) na 20 minut. Hypotonický roztok způsobil zvětšení objemu buněk, popraskání buněčných membrán a uvolnění genetického materiálu. Následovala další centrifugace a po odsátí supernatantu bylo ke kultuře přidáno 5 ml směsi hypotonického a fixačního roztoku (methanol a kyselina octová v poměru 3:1) na 5 minut. Poté následovala další centrifugace, odsátí supernatantu a přidání 5 ml fixačního roztoku na 5 minut. Tento postup fixace a následné centrifugace proběhl celkem

pětkrát, čímž došlo ke kompletnímu odmytí zbytků buněčných membrán, cytoplazmy a hemoglobinu. Takto zpracované buněčné kultury jsme uchovávali v lednici při teplotě 4–7 °C do dalšího dne.

Další den jsme vzorky centrifugovali po dobu 5 minut při 2 000 rpm. Odebrali jsme větší část supernatantu a zbytek jsme promíchali s peletou. Vzorky jsme doplnili fixačním roztokem do požadované hustoty. Výsledkem byla čirá opaleskující tekutina. Pro přípravu mikroskopických preparátů jsme použili speciální přístroj, který udržuje optimální mikroklima (HANABI PVI Metaphase Spreader; ADS Biotec) a tím zajišťuje kvalitní rozptřeni buněčné suspenze na preparátu. Podložní skla jsme umístili do přístroje a po dosažení optimálního prostředí jsme speciálními otvory na každé sklo nakapali 100 µl připravené buněčné suspenze a nechali ji v přístroji řádně usušit.

Ve světelném mikroskopu jsme zkontrolovali hustotu jader a množství metafázi na preparátu. V případě příliš vysoké hustoty jsme suspenzi naředili přidáním fixačního roztoku. Jestliže byla hustota jader naopak příliš nízká, suspenzi jsme koncentrovali centrifugací a odebráním většího množství supernatantu, abychom snížili výsledný objem suspenze. Preparáty jsme poté nechali zhruba 1 týden při laboratorní teplotě dostatečně vyschnout. V případě potřeby lze čerstvě nakapané preparáty „ostaršit“ pro možnost dalšího okamžitého zpracování. Pro ostaršení jsme skla umístili na 20 minut na histologickou plotýnku vyhřátou na 70 °C a poté je inkubovali 5 minut v 0,2 N roztoku HCl o laboratorní teplotě a 20 minut v kyvetě s 2x SSC předehřátém na 60 °C. Zbylé buněčné suspenze jsme uložili do mrazících boxů o teplotách -15 až -30 °C pro případné další využití.

4.1.3 Barvení preparátů

Takto zpracované preparáty jsme přelili barvicím roztokem, který jsme předem připravili smícháním 3 ml Sörensenova pufru a 1 ml Wrightova barviva. Barvivo jsme nechali působit různě dlouho dle jeho účinnosti a dle kvality daného preparátu (rozmezí 30 vteřin až 5 minut). Po slítí barviva ze skla jsme preparát opláchli v nádobě s čistou vodou a nechali usušit při laboratorní teplotě. Kvalitu barvení jsme zkontrolovali ve světelném mikroskopu. Jestliže skla nebyla dostatečně obarvená, opakovali jsme celý proces barvení s prodlouženou dobou působení barviva. Přebarvená skla jsme odbarvili v methanolu a zopakovali proces barvení s kratší dobou působení barviva. Správně nabarvené preparáty jsme uchovávali v deskách při laboratorní teplotě.

4.1.4 Analýza karyotypu

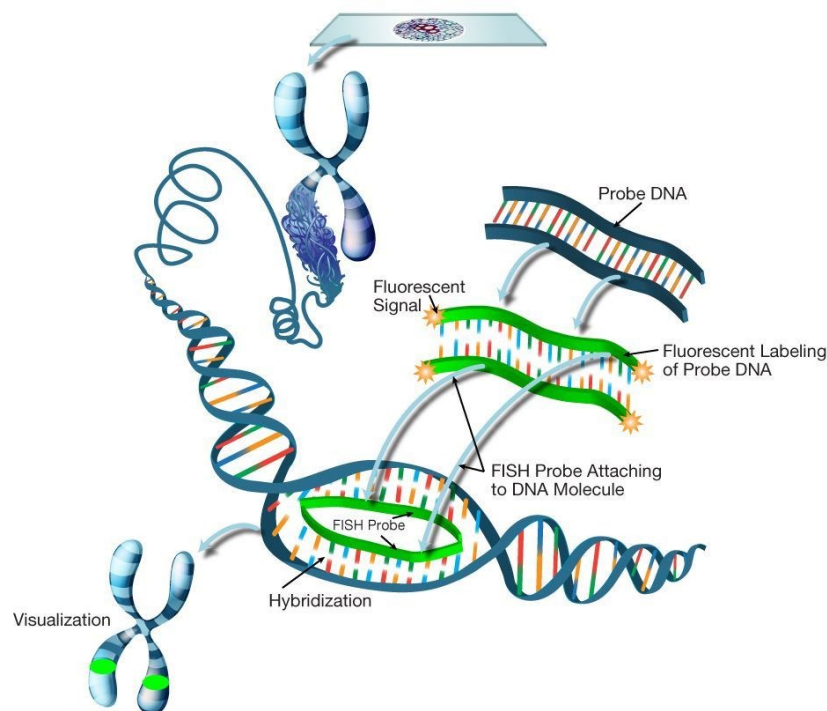
Pro vyhledání metafázi na mikroskopických preparátech jsme používali automatický systém Metafer (MetaSystemsTM) v kombinaci s mikroskopem AXIOPLAN 2 Imaging (Carl Zeiss, Německo). Karyotypy jsme následně analyzovali pomocí počítačového systému pro analýzu obrazu z mikroskopu Ikaros (MetaSystemsTM). U všech vzorků jsme hodnotili alespoň 20 metafází, pokud byly na preparátu přítomny. U hematologických malignit často bývá kvalita mikroskopických preparátů limitována špatnou kvalitou analyzovaných chromozomů a nízkým mitotickým indexem studovaných buněk. V případech, kdy jsme nenalezli dostatečné množství hodnotitelných metafází, jsme přistoupili k metodě fluorescenční *in situ* hybridizace s panelem DNA sond pro nejčastější a prognosticky nejvýznamnější chromozomové aberace. Zjištěný nález jsme popsali dle pravidel mezinárodní cytogenetické nomenklatury ISCN (McGowan-Jordan et al., 2020).

4.2 Molekulárně-cytogenetická analýza

Chromozomové aberace nalezené pomocí konvenční cytogenetické analýzy jsme dále ověřovali a upřesňovali metodou interfázní fluorescenční *in situ* hybridizace (I-FISH), mnohobarevné fluorescenční *in situ* hybridizace (mFISH) a/nebo mnohobarevným pruhováním s vysokým rozlišením (mBAND). Pro určení přesných zlomových míst, identifikaci uniparentálních dizomií (uUPD) a k analýze nebalancovaných aberací jsme používali metodu komparativní genomové hybridizace na čipech (aCGH/SNP).

4.2.1 I-FISH

Metoda fluorescenční *in situ* hybridizace umožňuje detekovat numerické či strukturní aberace, a to jak v buňkách v mitóze, tak i v nedělících se interfázních jádrech. Metoda využívá DNA sondy, které jsou komplementární ke specifickým chromozomovým oblastem. Může se jednat o sondy lokus-specifické, centromerické či subtelomerické. Princip FISH je založen na denuraci a následné hybridizaci DNA sond k cílovým sekvencím DNA chromozomů fixovaných na cytogenetických preparátech (obrázek č. 17). K denuraci DNA sond i vyšetřované DNA dochází vlivem vysoké teploty (cca 70–80 °C), případně působením labilizujících činidel (formamid). K hybridizaci, tedy k vytvoření komplementární vazby DNA sondy k vyšetřovanému úseku na chromozomu, dochází po opětovném snížení teploty na cca 37–42 °C. Fluorescenční signály navázaných sond jsou pak detekovány ve fluorescenčním mikroskopu.



Obrázek č. 17 – Schematické znázornění principu metody I-FISH. Pro úspěšné navázání fluorescenčně značené sondy k molekule DNA jsou sondy i DNA chromozomů fixovaných na cytogenetických preparátech nejprve denaturovány účinkem zvýšené teploty. Po opětovném snížení teploty dojde ke komplementární vazbě DNA sondy ke studované chromozomové oblasti. Fluorescenční signály navázaných sond jsou poté analyzovány ve fluorescenčním mikroskopu (Kumar, 2020).

4.2.1.1 Laboratorní postup

Pomocí přístroje HANABI PVI Metaphase Spreader (ADS Biotec) jsme nakapali na podloží skla 100 μ l buněčné suspenze. Skla jsme nechali oschnout při laboratorní teplotě do druhého dne. Druhý den jsme preparáty na 20 minut vložili do kyvety s 2x SSC předehřáté na 37 $^{\circ}$ C. Skla jsme dále dehydratovali po 2 minutách ve vzestupné alkoholové řadě (70%, 85% a 96% ethanol). Preparáty jsme nechali uschnout při laboratorní teplotě.

Komerčně dodávané DNA sondy jsme uchovávali ve tmě v mrazicím boxu o teplotě -20 $^{\circ}$ C. Při přípravě sond jsme postupovali dle instrukcí výrobce. Mikrozkušavky se sondami jsme před pipetováním vždy důkladně protřepali na vortexu a krátce stočili v mikrocentrifuze. Sondy od firmy MetaSystems nevyžadovaly další ředění. Na cytogenetický preparát jsme tak nanášeli 4-10 μ l hotové hybridizační směsi. Sondy Abbott Molecular jsme míchali se 7 μ l centromerického pufru (Abbott Molecular CEP Hybridization Buffer), nebo s LSI/WCP pufrem, dle typu použité sondy. Do hybridizační směsi jsme kromě pufru přidávali 0,5 μ l sondy a 2 μ l redestilované vody. Takto připravenou hybridizační směs jsme nanášeli na

preparáty s fixovanými chromozomy umístěné na histologické plotně předeřtá na 42 °C. Nakapanou sondu jsme přikryli krycím sklem nejčastěji o velikosti 22 x 22 mm a vytlačili jsme případné bubliny. Umístění krycího skla jsme pomocí diamantového popisovače označili na rubovou stranu podložního skla. Krycí sklo jsme pro zabránění vyschnutí nanesené hybridizační směsi oblepili rubbercementem. Připravené preparáty jsme vložili do automatického hybridizačního bloku ThermoBrite (Abbott Molecular), do kterého jsme předem umístili navlhčené buničínové pláty pro udržení požadované vlhkosti. Hybridizační blok umožňuje rychlé přechody mezi teplotou denaturace a samotnou hybridizací. Nastavili jsme odpovídající program dle typu použité DNA sondy. U sond od MetaSystems se jednalo o 2 minuty denaturace při 75 °C a následná hybridizace probíhala přes noc při 37 °C. Čas a teplota denaturace sond firmy Abbott Molecular byly 2 minuty při 73 °C s následnou hybridizací při 42 °C přes noc.

Druhý den jsme z preparátů odstranili rubbercement i krycí skla. Následně jsme v sérii mycích roztoků odmyli nespecificky navázané sondy a zbytky hybridizační směsi. Pro odmyváání jsme využili automat VP 2000 Processor (Abbott Molecular). Preparáty jsme nejdříve ponořili na 2 minuty do roztoku 0,4x SSC/0,3% NP-40 při teplotě 73 °C. Na další 1 minutu jsme je přenesli do kyvety s roztokem 2x SSC/0,1% NP-40 při laboratorní teplotě. Následovala dehydratace ve vzestupné alkoholové řadě po 2 minutách (70%, 85%, 95% ethanol). Odmyté preparáty jsme vyndali z automatu a nechali je oschnout ve tmě při laboratorní teplotě. Po jejich usušení jsme na každé sklo nanесли 25 µl směsi DAPI/antifade a přikryli jej velkým krycím sklem (22 x 60 mm). Nanášení podbarvovací směsi jsme prováděli na histologické plotně vyhřáté na 42 °C. Pomocí buničité vaty jsme odstranili přebytky směsi DAPI/antifade a zbavili jsme se případných bublin.

Hotové preparáty jsme vložili do tmavých desek a nechali je alespoň krátce ve tmě v mrazícím boxu. Následně jsme preparáty hodnotili ve fluorescenčním mikroskopu Axio Imager 2 (Zeiss, Německo). Dle fluorescenčního značení příslušné sondy jsme pro detekci signálu používali vhodný optický filtr. Vždy jsme se snažili vyhodnotit alespoň 20 mitóz a 200 interfázních jader, která jsme hledali pomocí 60x zvětšujícího imerzního objektivu. Pro objektivní posouzení byl každý preparát hodnocen alespoň dvěma nezávislými hodnotiteli. Pro dokumentaci byl obraz z fluorescenčního mikroskopu snímán chlazenou CCD kamerou a zpracován pomocí speciálního počítačového softwaru pro počítačovou analýzu obrazu ISIS (MetaSystems). Vyhodnocené preparáty jsme dále skladovali v mrazícím boxu při teplotě -20 °C.

4.2.2 mFISH a mBAND

Principem metod mnohobarevné FISH (mFISH) a mnohobarevného pruhování s vysokým rozlišením (mBAND) je, stejně jako u metody I-FISH, komplementární vazba fluorescenčně značené sondy k vyšetřované oblasti DNA. Metoda mFISH je založená na použití celochromozomových sond pro všechny chromozomy v lidském karyotypu, které jsou označeny pomocí kombinace pěti fluorochromů. Pomocí fluorescenčního mikroskopu, který je vybavený speciálními optickými filtry a citlivou CCD kamerou (charged coupled device), jsou přes sadu šesti fluorescenčních filtrů nasnímány dělicí se buňky ve stádiu metafáze. Počítačový software je posléze schopen změřit intenzitu jednotlivých fluorescenčních signálů a přiřadit každému chromozomu unikátní klasifikační barvu (tzv. pseudobarvu). Tato metoda poskytuje ucelený přehled o karyotypu pacienta. Nevýhodou je, že k hodnocení chromozomových aberací lze použít pouze mitózy a není možné identifikovat přesná zlomová místa strukturních přestaveb (Ward, 1996).

Metoda mBAND je založená na použití parciálních malovacích sond, které hybridizují k jednotlivým úsekům vybraného chromozomu (Chudoba et al., 1999). DNA pro přípravu mBAND sond se získává mikrodisekcí příslušného chromozomu z cytogenetického preparátu. Takto získaná DNA je naštěpena na různě velké vzájemně se překrývající fragmenty, které jsou dále amplifikovány. Amplifikované fragmenty jsou značeny pěti různými fluorochromy. Po hybridizaci je obraz z fluorescenčního mikroskopu snímán CCD kamerou za použití šesti specifických optických filtrů (pět odpovídá použitým fluorochromům a jeden je pro DAPI). Vzhledem k tomu, že se různě značené fragmenty mBAND sond překrývají, dochází ke vzniku různých barevných kombinací. Fluorescenční signály podél chromozomu jsou následně proměřeny pomocí speciálního softwaru, který ke každé barevné kombinaci přiřadí pseudobarvu. Výsledkem jsou specifické barevné pruhy na jednotlivých chromozomech. Tato metoda umožňuje analyzovat chromozomy bez ohledu na míru jejich kondenzace a je vhodná pro stanovení rozsahu delecí a k mapování zlomových míst.

4.2.2.1 *Laboratorní postup*

Preparáty jsme vložili do kyvety s roztokem 2x SSC přehřátým na 70 °C. Po 30 minutách jsme nechali preparáty v kyvetě při laboratorní teplotě ochladit na 37 °C. Následně jsme skla vložili do roztoku 0,1x SSC na 1 minutu při laboratorní teplotě. Další 1 minutu jsme nechali preparáty denaturovat v roztoku 0,07 N NaOH při laboratorní teplotě

a dále je inkubovali 1 minutu v 0,1x SSC vychlazeném na 4 °C a 1 minutu ve 2x SSC vychlazeném rovněž na 4 °C. Preparáty jsme poté dehydratovali ve vzestupné alkoholové řadě (70%, 96%, 100% ethanol) po 1 minutě. Dehydratované preparáty jsme nechali při laboratorní teplotě oschnout.

Do mikroskopu jsme dle velikosti krycího skla odebrali 8–12 µl komerčně dodávané sondy a nechali ji denaturovat při 75 °C po dobu 5 minut. Denaturovanou sondu jsme přenesli na 1–2 minuty na led. Následujících 30 minut jsme sondu inkubovali při 37 °C. Před nanášením na preparáty jsme sondu důkladně protřepali na vortexu a stočili v mikrocentrifuze. Hybridizační směs jsme poté nanášeli na krycí sklo položené na histologické plotně vyhřáté na 42 °C. Na krycí sklo s hybridizační směsí jsme přiklopili podložní sklo, vytlačili jsme bubliny a diamantovým popisovačem jsme označili oblasti s nanesenou sondou. Okraje krycího skla jsme oblepili rubbercementem. Hybridizace probíhala 1–2 dny ve vlhké komůrce v termostatu při 37 °C.

Po ukončení hybridizace jsme z podložního skla odstranili rubbercement a sklo krycí. Preparáty jsme vložili do kyvety s 0,4x SSC při teplotě 72 °C na 2 minuty. Následně jsme je přenesli na 30 sekund do roztoku 2x SSC/0,05% Tween 20. Poté jsme preparáty opláchli redestilovanou vodou a nechali oschnout ve tmě při laboratorní teplotě. Suché preparáty jsme umístili na vyhřátou histologickou plotnu, na každý jsme nanесли 27 µl směsi DAPI/Antifade a překryli je krycím sklem o velikosti 22 x 60 mm. Hotové preparáty jsme uchovávali ve tmavých deskách v mrazícím boxu při -20 °C.

Pomocí automatického vyhledávače Metafer (MetaSystems) v kombinaci s fluorescenčním mikroskopem Axio Imager 2 (Zeiss) vybaveným specifickými optickými filtry a citlivou CCD kamerou jsme nasníмали dělicí se buňky ve stádiu metafáze, které jsme dále hodnotili pomocí speciálního softwaru pro počítačovou analýzu obrazu ISIS (MetaSystemsTM).

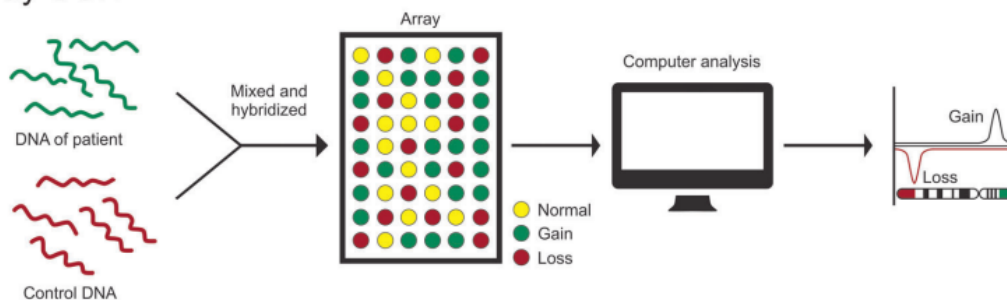
4.2.3 Mikročipové technologie

Mikročipové technologie umožňují detekovat změny v počtu kopií DNA sekvencí a přesně určit zlomová místa na chromozomech. Principem metody komparativní genomové hybridizace na mikročipech (aCGH) je hybridizace rozdílně značené referenční a vyšetřované DNA k fragmentům genomu umístěným na mikročipu. Po proběhlé hybridizaci je čip vložen do speciálního laserového skeneru, který čip naskenuje. Počítačový software posléze vyhodnotí

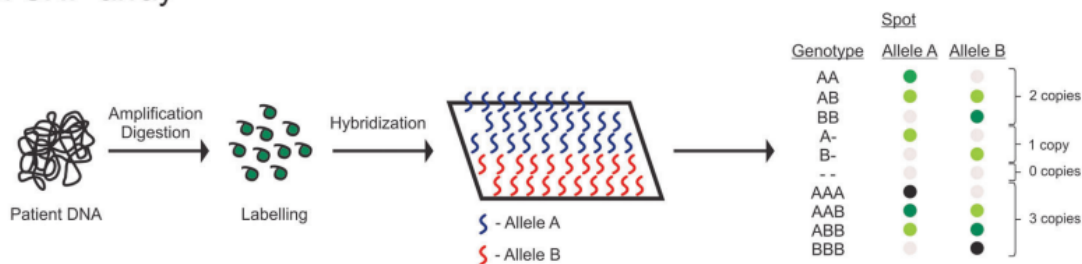
poměr a intenzitu fluorescenčních signálů v jednotlivých bodech. Jestliže převládá barva signálu, kterým byla značená vyšetřovaná DNA, došlo k zisku genetického materiálu. Pokud naopak převládá barva signálu, který odpovídá barvě značení referenční DNA, došlo ke ztrátě DNA sekvencí (obrázek č. 18). Dané vyšetření umožňuje detekovat pouze aberace, při kterých došlo ke změně v obsahu DNA sekvencí, ale nepřináší informace o balancovaných změnách karyotypu ani o změnách v repetitivních oblastech (Solinas-Toldo et al., 1997).

Kombinace aCGH a SNP čipu umožňuje detekovat i jednonukleotidové polymorfizmy a oblasti se ztrátou heterozygotnosti bez ztráty kopií DNA sekvencí (cnLOH), tzv. uniparentální dizomie. Tento typ změn je často asociován s homozygotními mutacemi tumor supresorových genů nebo onkogenů (Bignell et al., 2004).

a. Array CGH



b. SNP array



Obrázek č. 18 – Schematické znázornění metody aCGH (a) a SNP array (b). (a) Kontrolní DNA a vyšetřovaná DNA označené odlišnými fluorochromy jsou nanášeny na mikročip a specificky hybridizují k fragmentům genomu, které jsou na něm umístěny. Pomocí speciálního laserového skeneru je změřena intenzita fluorescenčních signálů v jednotlivých bodech. Počítačový software pak hodnotí nebalancované změny karyotypu. (b) Metoda SNP array se liší použitím alelově specifických oligonukleotidových sond, které dokáží odhalit i jednonukleotidové polymorfizmy (Lakshmi a Girisha, 2020).

4.2.3.1 *Laboratorní postup*

DNA pro mikročipovou analýzu jsme izolovali pomocí QIAamp DNA Blood Mini kitu (Qiagen, Německo) z fixovaných buněk kostní dřeně. Nejdříve jsme odebrali 200 μ l buněčné suspenze a centrifugovali ji při 12 000 rpm po dobu 3 minut. Odebrali jsme supernatant a zbylou peletu jsme resuspendovali ve 200 μ l PBS. Přidali jsme 20 μ l proteinázy K a 200 μ l lyzačního AL pufru. Směs jsme promíchali a poté jsme ji nechali inkubovat 10 minut v termobloku vyhřátém na 56 °C. Ke vzorku jsme přidali 200 μ l absolutního ethanolu. Směs jsme přenesli na sterilní kolonku, kterou jsme posléze nechali centrifugovat 1 minutu při 6 000 g. Přidali jsme 500 μ l AW1 pufru a opět jsme vzorek centrifugovali 1 minutu při 6 000 g. Následovalo přidání 500 μ l pufru AW2 a centrifugace po dobu 3 minut při 20 000 g. Provedli jsme eluci do nové mikrozkušavky za užití 55 μ l AE pufru. Vzorek jsme nechali inkubovat 5 minut při laboratorní teplotě a poté jej opět 1 minutu centrifugovali při 6 000 g. Koncentraci a čistotu izolované DNA jsme ověřili pomocí spektrofotometru NanoDrop 2000 (ThermoFisher Scientific, USA). Optimální množství gDNA pro microarray formát 4x180K bylo 1000 ng. Ekvivalentní množství nukleové kyseliny jsme potřebovali i pro referenční DNA. Vzorek experimentální DNA jsme doplnili destilovanou vodou bez nukleáz na objem 20,2 μ l. Kvalitu izolované DNA jsme dále ověřili pomocí gelové elektroforézy. Na 1% agarózový gel jsme nanесли 80 ng vzorku smíchaného s nanášecím pufrem. Elektroforézu jsme nechali probíhat 1 hodinu při napětí 5V/cm.

Dalším krokem bylo restriční štěpení izolované DNA. Master Mix pro jeden vzorek jsme připravili z 2 μ l ddH₂O; 2,6 μ l 10x reakčního pufru pro restriční enzymy; 0,2 μ l BSA; 0,5 μ l AluI restriktázy a 0,5 μ l restriktázy RsaI. Směs jsme celou dobu drželi na ledu. Do každé zkumavky se vzorkem gDNA jsme přidali 5,8 μ l připraveného Master Mixu a nechali jej inkubovat 2 hodiny při 37 °C. Následně jsme na 20 minut zvýšili teplotu na 65 °C. Vzorek jsme přenesli na led a nechali jej alespoň 5 minut chladit. Výsledek štěpení jsme ověřili elektroforeticky na 1% agarózovém gelu (0,9 g agaru + 90 ml TAE pufru), na který jsme nanесли 2 μ l vzorku smíchaného s nanášecím pufrem. Elektroforézu jsme nechali běžet 5 minut při napětí 50 V a posléze 50 minut při napětí 90 V.

Dále jsme postupovali fluorescenčním značením vzorku. Do každé reakční zkumavky jsme přidali 5 μ l Random Primeru. Vzorky jsme nechali inkubovat v termobloku o teplotě 98 °C po dobu 3 minut. Dalších 5 minut jsme inkubovali vzorek na ledu. Připravili jsme značící Master Mix – 2 μ l ddH₂O; 10 μ l 5x reakčního pufru (pro značící polymerázu); 5 μ l 10x dNTPs; 3 μ l Cy-3 (pro vyšetřovanou DNA) a 3 μ l Cy-5 (pro referenční DNA); 1 μ l Exo-Klenowova

fragmentu. Do každé reakční zkumavky jsme přidali 21 μl připraveného Master Mixu. Vzorky jsme inkubovali v termobloku 2 hodiny při 37 °C. Následně jsme teplotu na 10 minut zvýšili na 65 °C. Vzorky jsme dále přenesli na led a nechali je zde inkubovat alespoň 5 minut. Značenou gDNA bylo následně nutné přečistit. K purifikaci DNA jsme využívali SureTag DNA Labelling Kit (Agilent Technologies, USA). Ke každému vzorku jsme přidali 430 μl TE pufru a přenesli jej na purifikační kolonku, která byla vložena do 2 ml sběrné zkumavky. Vzorek jsme centrifugovali 10 minut při 14 000 g. Odstranili jsme eluát a přidali 480 μl TE pufru. Vzorek jsme opět centrifugovali po dobu 10 minut a 14 000 g. Kolonku jsme přenesli dnem vzhůru do nové sběrné zkumavky a centrifugovali ji 1 minutu při 1 000 g. Purifikovanou gDNA jsme koncentrovali ve vakuové odparce na objem 22–24 μl . Míru inkorporace fluorescenčně značené DNA do vzorku (pmol/ μl) jsme ověřili spektrofotometricky (spektrofotometr NanoQuant Infinite M200 Microplate Reader, Tecan, Švýcarsko) a vypočítali jsme specifickou aktivitu značených vzorků (specifická aktivita = pmol/ μl fluorescenční barvivo/ μg na μl gDNA). Do nové zkumavky jsme smíchali 20 μl fluorescenčně značené DNA vzorku a příslušné ekvivalentní množství fluorescenčně značené referenční DNA do výsledného objemu 40 μl .

Ke každému vzorku jsme přidali 5,5 μl Cot-1 DNA, 11,5 μl 10x aCGH blokovacího činidla a 60 μl 2x HI-RPM hybridizačního pufru. Připravenou značenou DNA pro hybridizaci jsme nechali inkubovat 3 minuty při 98 °C a dalších 30 minut v 37 °C.

Umístili jsme těsnící sklíčko (gasket slide) do hybridizační komůrky Agilent SureHyb (Agilent Technologies). Do vyznačených oblastí na sklíčku jsme aplikovali celý objem hybridizační směsi vzorku a referenční DNA. Na připravené těsnící sklíčko jsme přiklopili aktivní stranou sklíčko mikročipu SurePrint G3 Cancer CGH+SNP Microarray a uzavřeli jsme hybridizační komůrku. Komůrku jsme umístili do hybridizační pece Microarray Hybridization Oven (Agilent Technologies). Rychlost otáčení jsme nastavili na 20 rpm a čip jsme nechali hybridizovat při 67 °C po dobu 16 hodin.

Předešli jsme si promývací pufr 2 na 37 °C. Promývací pufr 1 jsme ve dvou kyvetách zchladili na teplotu 20–22 °C. Po otevření hybridizační komůrky jsme pod hladinou odmývacího pufru 1 sundali mikročip z těsnícího sklíčka. Mikročip jsme umístili do druhé kyvety s odmývacím pufrem 1 na 5 minut. Poté jsme mikročip přenesli do promývacího pufru 2 a při 37 °C jsme jej inkubovali 1 minutu. Z odmývacího pufru 2 jsme mikročip pomalu vyndali a umístili jej do držáku určenému ke skenování ve speciálním scanneru (SureScan Dx Microarray Scanner, Agilent Technologies). Skenování mikročipu proběhlo na Ústavu biologie

a lékařské genetiky (Purkyňův ústav, Albertov 4, Praha 2). Prostřednictvím programu Agilent Cytogenomics (Agilent Technologies) jsme vyhodnotili získané výsledky.

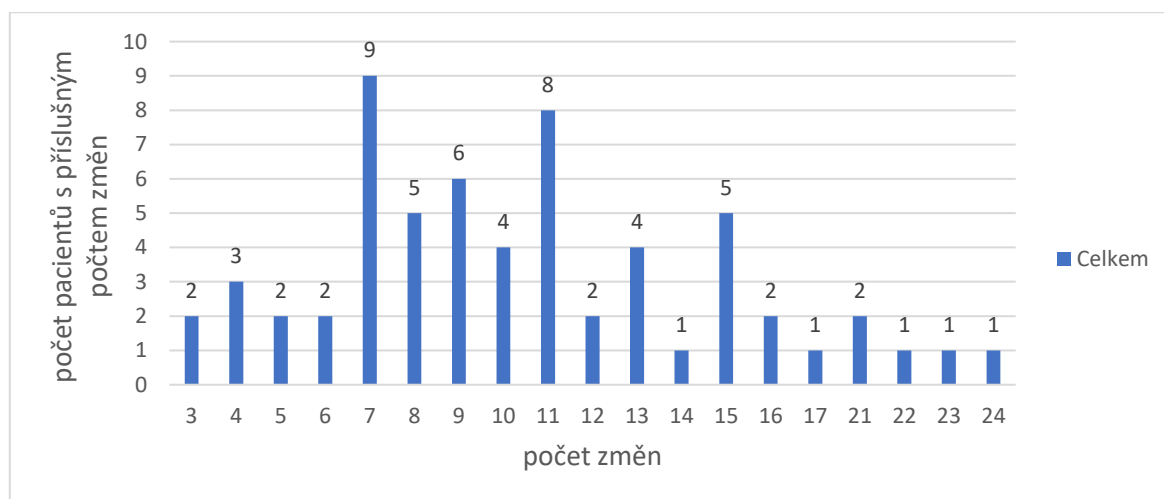
4.3 Statistické zhodnocení výsledků

Statistické zhodnocení výsledků jsme provedli Kaplan-Meierovou analýzou. Tímto rozbořením jsme vyhodnotili rozdíly v celkovém přežití (OS) pacientů a v přežití do události (EFS). OS jsme definovali jako dobu od stanovení diagnózy do úmrtí pacienta, nebo do data jeho poslední kontroly. EFS představovalo přežití do události, kterou jsme definovali jako relaps či progresi onemocnění. Následně jsme použili Coxovu vícerozměrnou regresní analýzu pro zhodnocení vlivu jednotlivých faktorů na OS. Pro další statistické analýzy jsme využívali program RStudio Desktop 1.4.1717. Všechna testování jsme prováděli na hladině významnosti $p = 0,05$.

5 Výsledky

5.1 Analýza karyotypu (klasické G-pruhování + mFISH/mBAND)

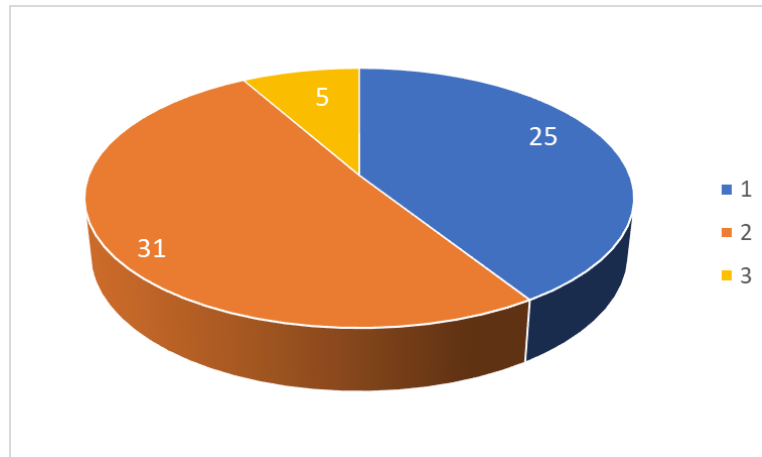
Analýzu karyotypu metodou klasického G-pruhování v kombinaci s metodami mFISH a mBAND jsme provedli u všech pacientů v analyzovaném souboru. Karyotypy jednotlivých pacientů jsou uvedeny v tabulce č. 1 v příloze. V patologickém klonu jsme nejčastěji detekovali počet 45 až 46 chromozomů. Chromozomové ztráty výrazně převažovaly nad zisky. V jednotlivých karyotypech jsme detekovali od 3 do 26 změn (průměrně 11 chromozomových změn na karyotyp). Na grafu č. 3 můžeme pozorovat zastoupení počtu změn u pacientů v souboru. U 38 pacientů (62 %) jsme v době diagnózy detekovali dva nebo více heterogenních klonů – tzv. divergentní klonální vývoj. Počet klonů se pohyboval od dvou do pěti. Ve dvou případech jsme v heterogenních klonech pozorovali tetraploidní počet chromozomů.



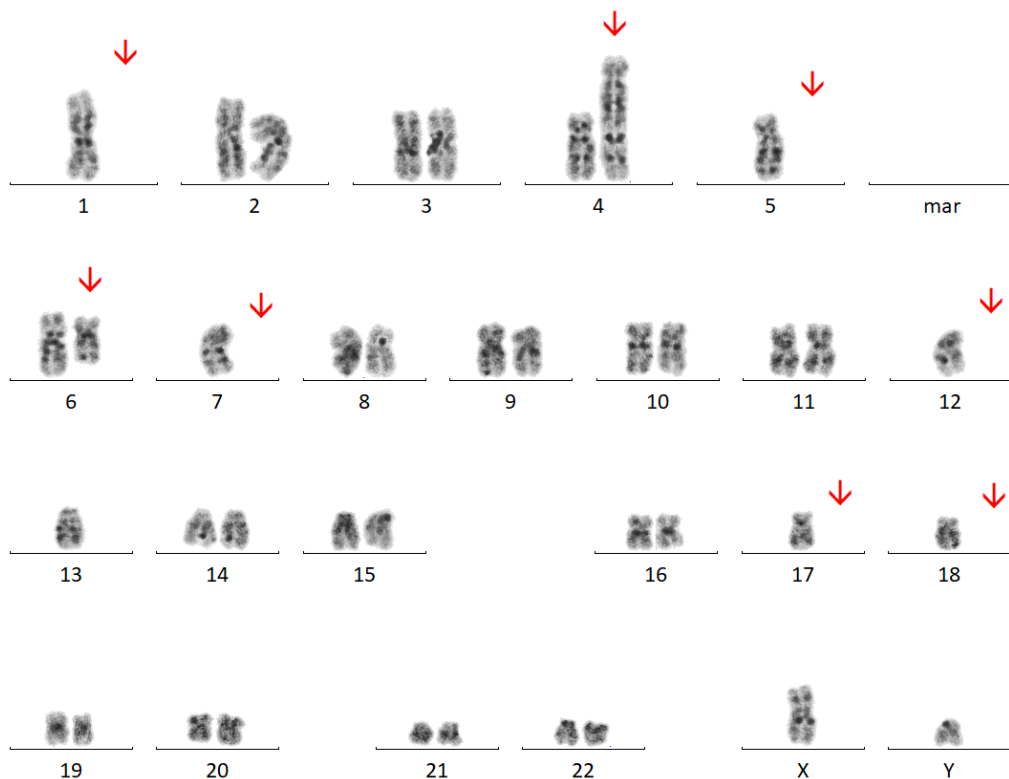
Graf 1 – Rozložení pacientů dle počtu nalezených chromozomových změn.

V souboru byl nejčastěji aberovaný chromozom 5 (graf č. 6). Podle cytogenomického nálezu jsme pacienty rozdělili do tří skupin. V první skupině bylo zařazeno 25 pacientů (41 %) s rozsáhlými změnami karyotypu, které zahrnovaly delecí chromozomu 5. Do druhé skupiny spadalo 31 pacientů (51 %), u kterých se deletovaný chromozom 5 účastnil dalších přestaveb. Skupinu tři tvořilo 5 nemocných (8 %), kteří neměli chromozom 5 aberovaný (viz graf č. 4). U pacientů číslo 35 a 39 jsme na základě klasické cytogenetické analýzy měli podezření na monozomii chromozomu 5. Příklad jednoho z karyotypů ukazuje obrázek č. 19. Po ověření nálezu metodami mFISH a mBAND jsme však u obou pacientů potvrdili, že i v těchto

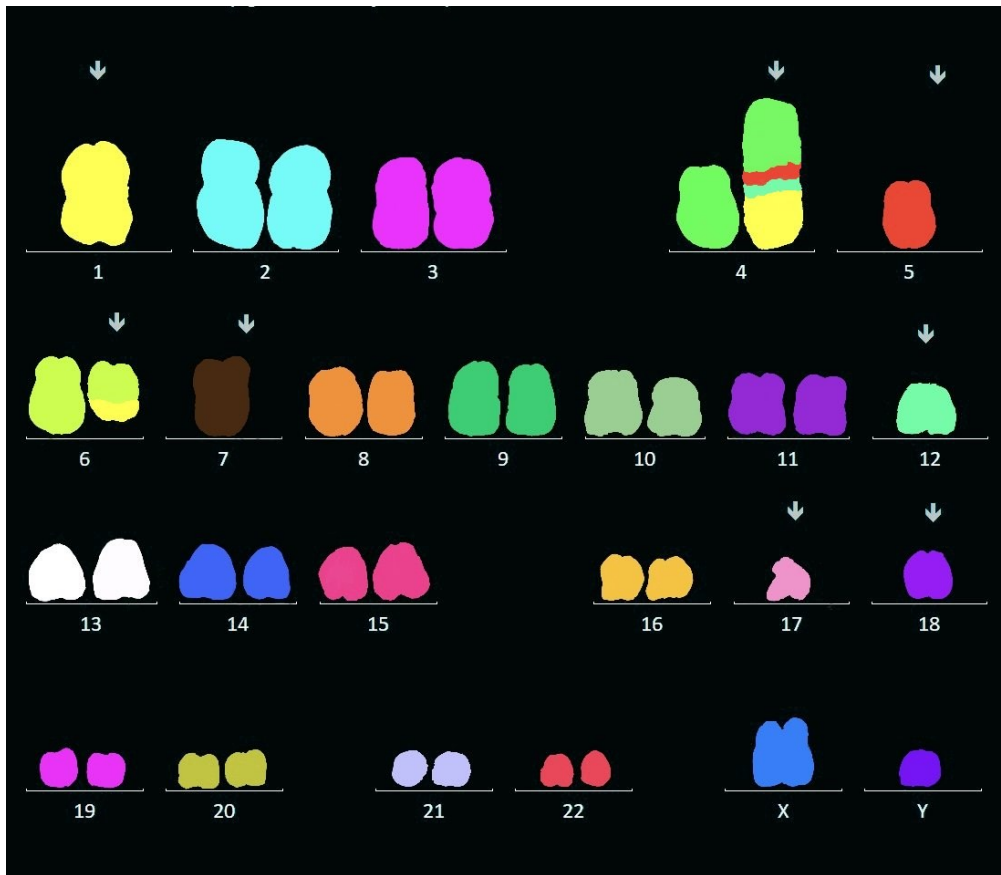
případech zůstaly části chromozomu 5 zachovány a byly inzertovány na jiná místa v genomu (obrázky č. 19, 20 a 21). Oba tyto pacienti tak spadali do skupiny dva.



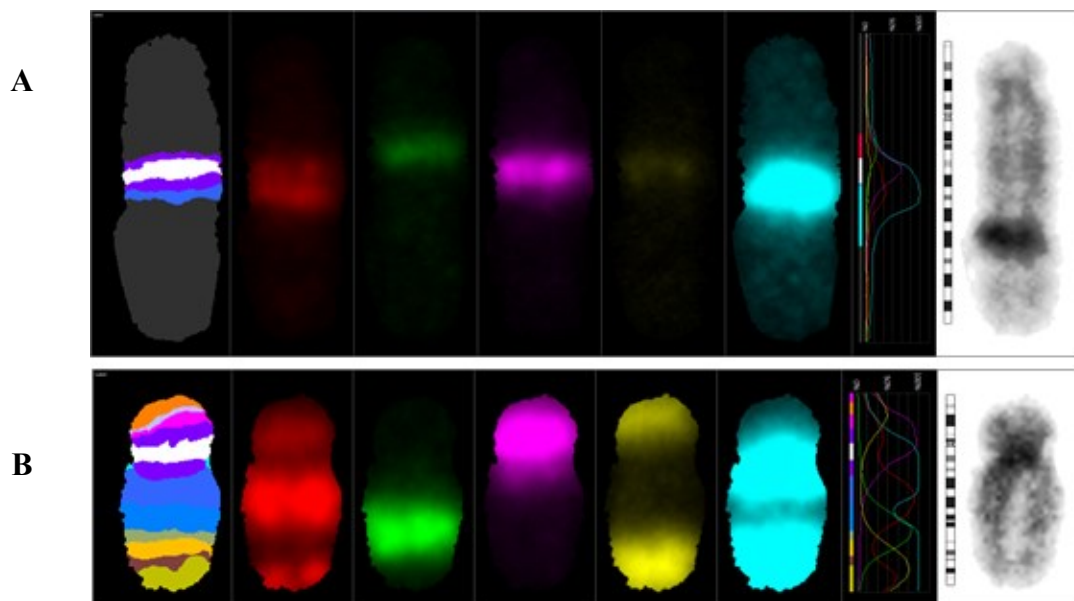
Graf č. 4 – Rozdělení pacientů do skupin dle nálezu. Skupina 1 – nemocní s rozsáhlými změnami karyotypu a delecí chromozomu 5. **Skupina 2** – pacienti s deletovaným chromozomem 5 zahrnutým v dalších přestavbách. **Skupina 3** – nemocní bez aberace chromozomu 5.



Obrázek č. 19 – Karyotyp pacienta č. 39 analyzovaný metodou konvenčního G-pruhování. Nález svědčí pro suspektní monozomii chromozomu 5.



Obrázek č. 20 – Karyotyp pacienta č. 39 analyzovaný metodou mFISH (výsledný popis karyotypu: 40,XY,-1,der(4)t(4;5)(q?31;q?23.3)t(5;12)(q?35.2;?)t(1;12)(?;?)-5,der(6)t(1;6)(?;q12),-7,-12,-17,-18). Metodou mFISH jsme prokázali, že se nejedná o čistou monozomii chromozomu 5, ale o nebalancovanou přestavbu deletovaného chromozomu 5, kdy část materiálu z tohoto chromozomu zůstala zachována a byla přemístěna na derivovaný chromozom 4.



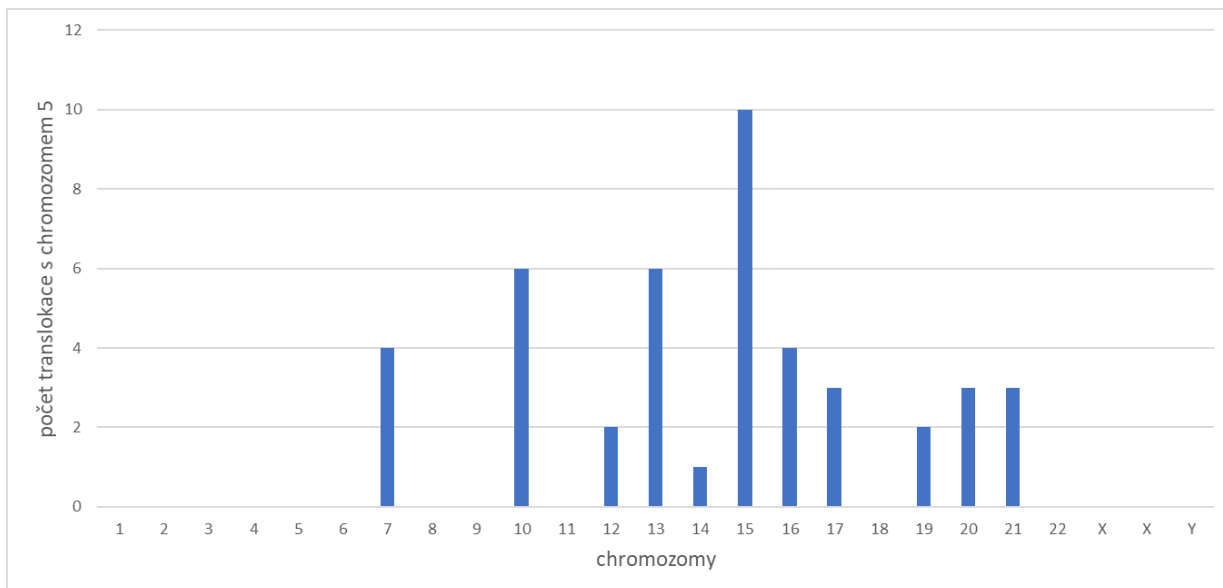
Obrázek č. 21 – mBAND analýza chromozomu 5 u pacienta č. 39. (A) Derivovaný chromozom 4, do kterého je inzertována část genetického materiálu z chromozomu 5. (B) Normální chromozom 5.

Početní chromozomové odchylky jsme našli celkem u 50 nemocných (82 %). Nejčastěji se jednalo o trizomii chromozomu 8, kterou jsme detekovali u 17 nemocných (28 %). V jednom případě jsme našli tetrazomii chromozomu 8. Další časté trizomie zahrnovaly chromozomy 21 (6x; 10 %) a 1 (5x; 8,2 %). Trizomie chromozomů 9, 11, 14 a 22 jsme detekovali celkem u 4 nemocných. Trizomie chromozomů 3, 4, 5, 7, 10, 12, 15, X a Y se v našem souboru nevyskytovaly vůbec. Ke ztrátám celých chromozomů nejčastěji docházelo u chromozomů 7 a 11 (celkem 11x; 18 %). U devíti pacientů jsme detekovali monozomii chromozomu 13, stejně tak u chromozomu 17. U chromozomů 4, 5, 8, 10, 11 a X jsme monozomie nepozorovali.

Delece různých chromozomů jsme detekovali u 45 pacientů (74 %). Dlouhá ramena byla deletována přibližně čtyřikrát častěji než ramena krátká. Podle očekávání byla nejčastějším nálezem delece dlouhých ramen chromozomu 5, kterou jsme pozorovali u 31 nemocných (51 %). U chromozomů 3, 10, 14, 16, 18, 22 a Y jsme delece nezachytili. Duplikaci genetického materiálu jsme odhalili u 5 pacientů (8 %). Ve dvou případech se jednalo o chromozom 11 (na dlouhém rameni) a po jednom případě o chromozomy 3, 21 (dlouhá ramena) a 9 (krátká ramena).

U 12 pacientů (20 %) jsme pozorovali inverze genetického materiálu. Nejčastěji se jednalo o paracentrické inverze (n=10), zejména na chromozomu 3, které jsme detekovali u tří nemocných. U 11 nemocných (18 %) jsme pozorovali inserce genetického materiálu. Nejčastěji se jednalo o inserci do chromozomu 5 (5x dlouhá a 2x krátká ramena). Dvakrát jsme detekovali inserci do chromozomů 7, 10 a 12. Dále byly touto aberací zasaženy chromozomy 2, 3, 4, 8, 9, 14 a 18. U pacientů v našem souboru převládaly nebalancované inserce (nalezeny u osmi nemocných) nad balancovanými (detekovány u tří pacientů).

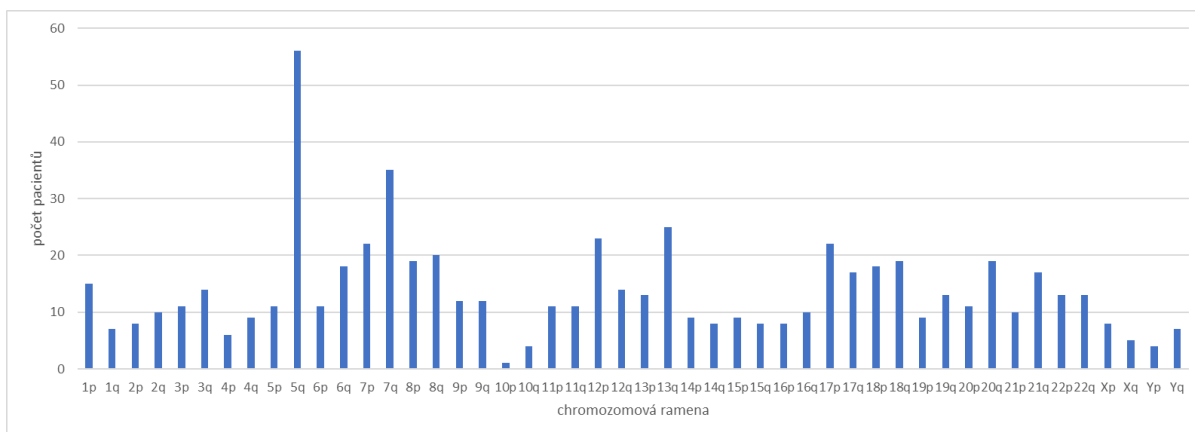
Translokace jsme detekovali celkem u 55 pacientů (90 % případů). Nebalancované translokace jsme pozorovali 284x, balancované translokace 22x. Nebalancovaných translokací se nejčastěji účastnil chromozom 5 (44x). Nejčastějším translokačním partnerem byl chromozom 15 (10x), jak ukazuje graf č. 5. Chromozom 7 se účastnil nebalancovaných translokací celkem 36x (nejčastěji s chromozomy 16 a 17). Balancované translokace jsme nejvíce pozorovali u chromozomu 22 (6x). Translokace typu „whole-arm“ jsme odhalili celkem v 16 případech. Těchto přestaveb se nejvíce účastnily chromozomy 21 (5x), 22 (4x) a 13 (4x).



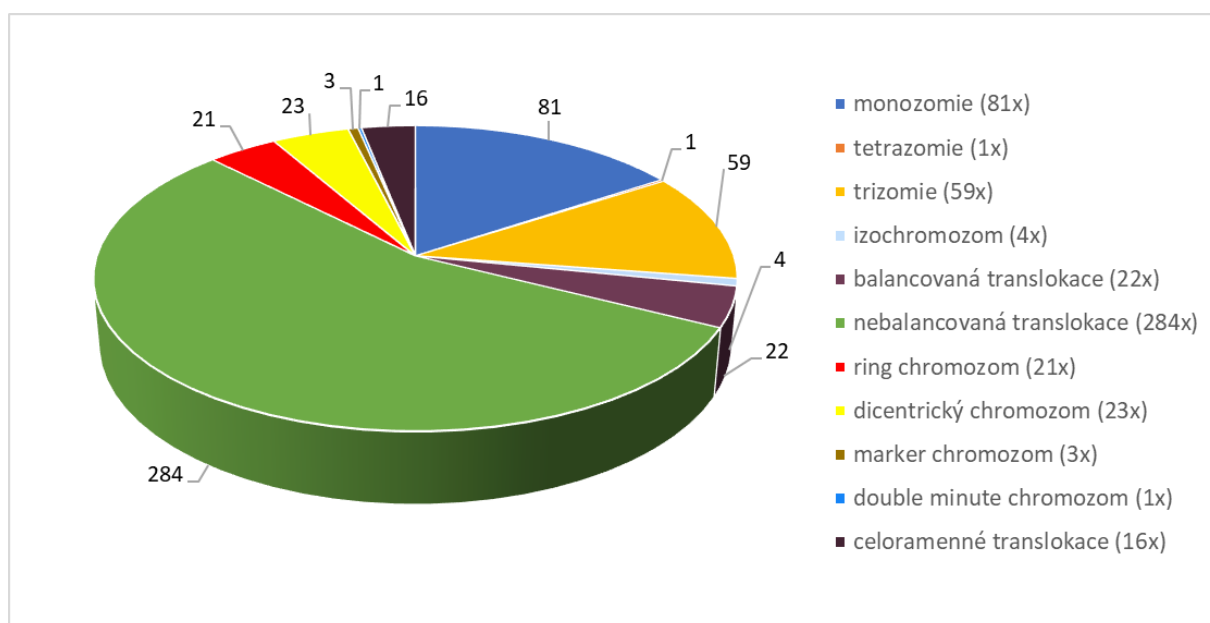
Graf č. 5 – Nejčastější translokační partneři chromozomu 5 v nebalancovaných přestavbách.

Izochromozomy jsme pozorovali celkem u čtyř nemocných. Jednalo se o izochromozom pro dlouhá ramena chromozomů 11, 22, 18 a 21. Dicentrický chromozom mělo v karyotypu 17 nemocných (28 %). Jednalo se o jiné pacienty, než u kterých jsme detekovali translokace typu „whole-arm“. Dcentrický chromozom nejčastěji tvořil chromozom 5 (5x) a chromozom 7 (4x). U čtyř pacientů jsme pozorovali dicentrický chromozom zahrnující chromozomy 17 a 18.

U 14 pacientů (23 %) jsme v rámci komplexního karyotypu našli ring chromozom. Nejčastěji se jednalo o ring chromozom 7 (celkem 5x). Dále jsme detekovali ring chromozomy 11 (2x), 18 (2x), 21 (2x), 1 (1x), 9 (1x) a 13 (1x). U 7 pacientů jsme odhalili ring chromozom tvořený materiálem ze dvou a více chromozomů. Do kruhových chromozomů tvořených materiálem z více chromozomů byly nejčastěji zahrnuty chromozomy 21 (3x) a 7 (2x). V jednom případě jsme detekovali ring chromozom tvořený genetickým materiálem z chromozomů 9, 17 a 21. Nadpočetný marker chromozom nejasného původu jsme identifikovali u třech pacientů. U pacienta číslo 18 jsme v karyotypu objevili jeden až čtyři tzv. double minute chromozomy. Následující grafy č. 6 a 7 shrnují celkové zastoupení jednotlivých typů chromozomových přestaveb a ukazují zahrnutí jednotlivých chromozomových ramenech do komplexních aberací.



Graf č. 6 – Zahrnutí jednotlivých chromozomových ramen do komplexních přestaveb.

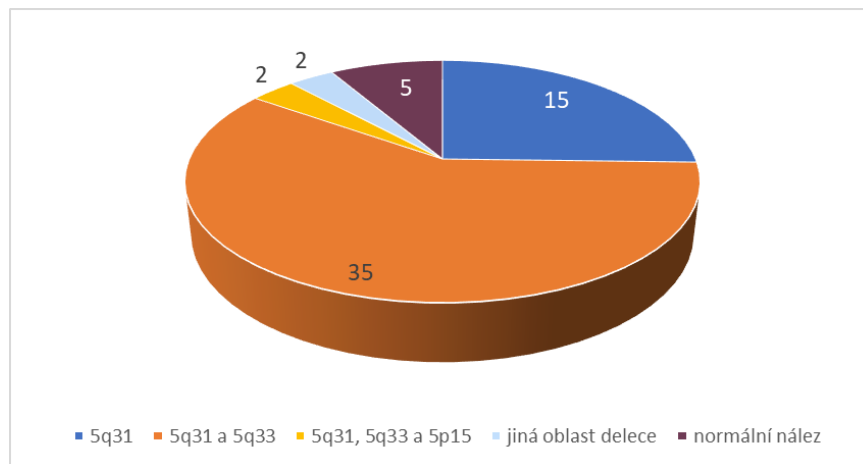


Graf č. 7 – Zastoupení jednotlivých typů chromozomových aberací v komplexních karyotypech.

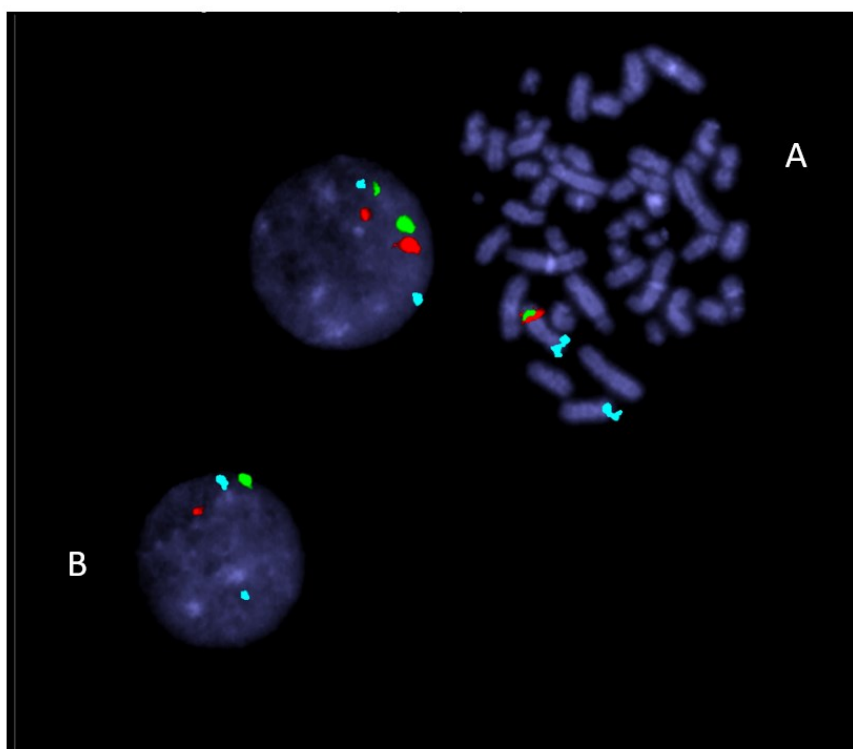
U 30 pacientů jsme prováděli kontrolní vyšetření opakovaně v průběhu onemocnění. Zjistili jsme, že u osmi z nich (27 %) došlo ke klonálnímu vývoji. V důsledku klonálního vývoje se počet chromozomových aberací v komplexním karyotypu navýšil průměrně o 3 změny. Průměrný počet dní od data diagnózy do detekce klonálního vývoje byl 301 dnů. Porovnání karyotypů nemocných v době stanovení diagnózy a po klonálním vývoji ukazuje tabulka v příloze č. 2.

5.2 Molekulárně-cytogenetická analýza

Všechny nemocné jsme dále vyšetřili metodou FISH. Deleci chromozomu 5 jsme ověřovali u 59 pacientů za použití lokus specifické sondy XL 5q31/5q33/5p15 od firmy MetaSystems (viz obrázky č. 14 a 22). Deleci oblasti 5q31 jsme potvrdili u 15 nemocných (24,5 %). Oblasti 5q31 a 5q33 byly deletované u 35 pacientů (57,5 %). Dva pacienti měli deletované oblasti 5q31, 5q33 i oblast 5p15 (suspektní monozomie chromozomu 5). U dvou pacientů jsme deleci chromozomu 5 zjistili až metodou mBAND, jelikož byla v jiné oblasti, než kterou pokrývala použitá lokus specifická sonda zaměřená na konkrétní rekurentní oblasti. U pěti pacientů jsme deleci 5q metodou FISH neprokázali (graf č. 8). Velikost patologického klonu s deletovaným chromozomem 5 se pohybovala od 9 % do 97,5 % buněk (medián 78 %). Přesná zlomová místa a rozsah delece na chromozomu 5 jsme analyzovali metodou mBAND. Delece nejčastěji zahrnovala oblast 5q14.1 až 5q33.3 (82 MB) (20x; 33 %). Celkem 10 pacientů mělo deleci na krátkých ramenech chromozomu 5. Nejčastěji se jednalo o deleci v rozsahu 5p14.2 až 5p15.2 (14 MB) (4x; 6,5 %).



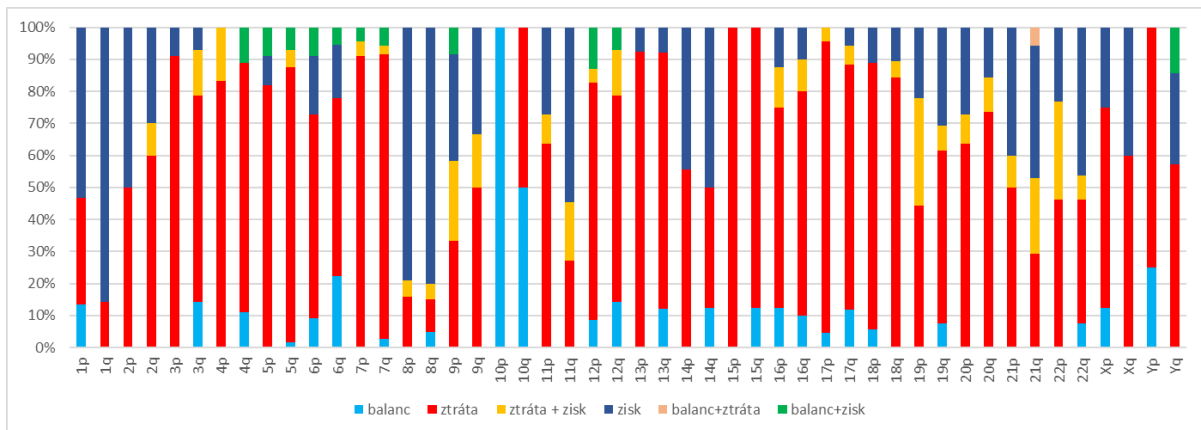
Graf č. 8 – Oblasti delece na chromozomu 5 detekované metodou I-FISH za použití lokus specifické sondy XL 5q31/5q33/5p15 od firmy MetaSystems.



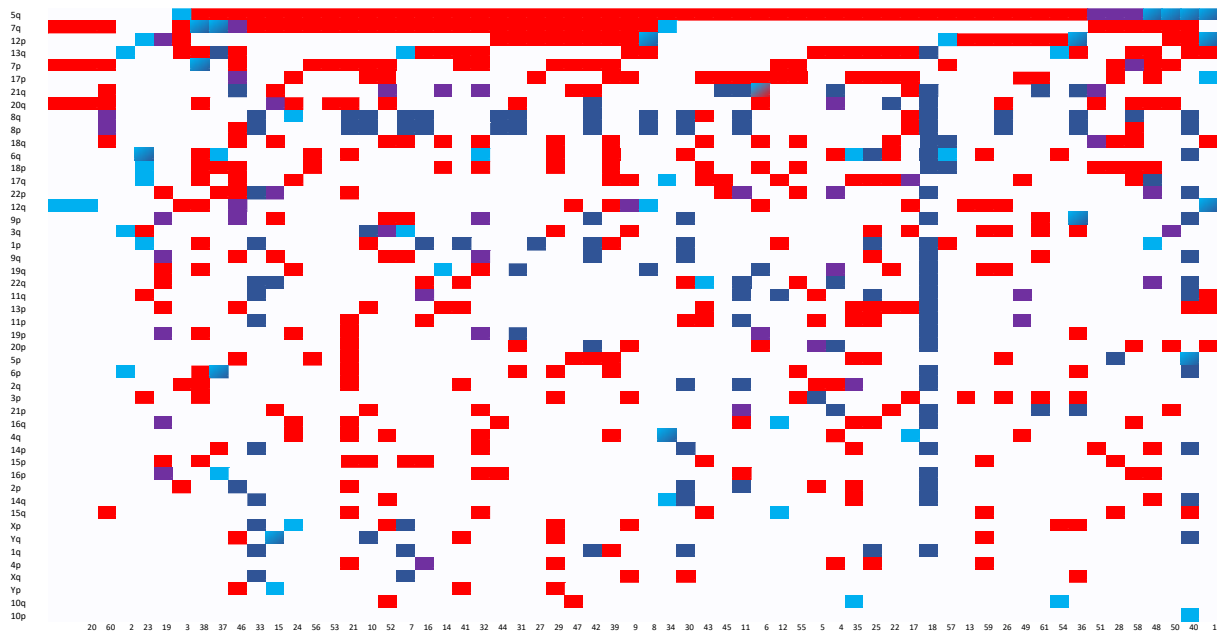
Obrázek č. 22 – Delece 5q31 a 5q33 detekovaná metodou I-FISH za použití lokus specifické sondy XL 5q31/5q33/5p15 od firmy MetaSystems (pacient č. 24). (A) Metafáze s delecí 5q31 (chybí červený signál) a 5q33 (chybí zelený signál). (B) Stejný nálezn v interfázním jádře.

Další vyšetření metodou I-FISH jsme prováděli individuálně pro ověření nálezů z klasické cytogenetické analýzy a z mFISH. Jestliže pacient neměl dostatek hodnotitelných metafází (dvacet) pro klasickou cytogenetickou analýzu, prováděli jsme dle platných evropských doporučení (Rack et al., 2019) vyšetření panelem sond pro nejčastější chromozomové aberace u MDS. Tento panel zahrnuje sondy pro detekci delece chromozomu 5, 7 a 20 a sondu pro odhalení trizomie chromozomu 8. Sondu LSI 7q31/CEP 7 (Abbott Molecular) jsme použili celkem u 39 nemocných (64 %). Deleci oblasti 7q31 jsme prokázali u 11 z nich (28 %). Sedm pacientů (11,5 %) mělo monozomii chromozomu 7. Monozomie spolu s delecí oblasti 7q31 se vyskytovala u 4 pacientů (2 patologické klony). U jednoho nemocného jsme detekovali ztrátu centromerické oblasti chromozomu 7, ale oblast 7q31 zůstala zachována. Ve třech případech byl chromozom 7, nebo jeho určitá oblast, translokován na jiný chromozom. Trizomii chromozomu 8 jsme za použití centromerické sondy CEP 8 Spectrum Orange (Abbott Molecular) potvrdili u 17 nemocných (28 %). Pacient č. 40 měl tetrazomii chromozomu 8 (modální počet chromozomů $2n \pm$). Sondu pro detekci delece dlouhých ramen chromozomu 20 (XL del(20q) plus, MetaSystems) jsme použili u 14 nemocných a u dvou z nich jsme delecii prokázali.

Metodu aCGH/SNP jsme použili k detekci nebalancovaných změn u 40 nemocných, kteří měli dostatek genetického materiálu pro další analýzu. Díky této metodě jsme byli schopni odhalit i submikroskopické aberace a potvrdit zlomová místa a rozsahy delecí. Díky kombinaci nálezů metod aCGH/SNP a mFISH jsme pro každého pacienta stanovili výsledné ztráty a zisky genetického materiálu. Výsledky shrnují grafy č. 9 a 10.

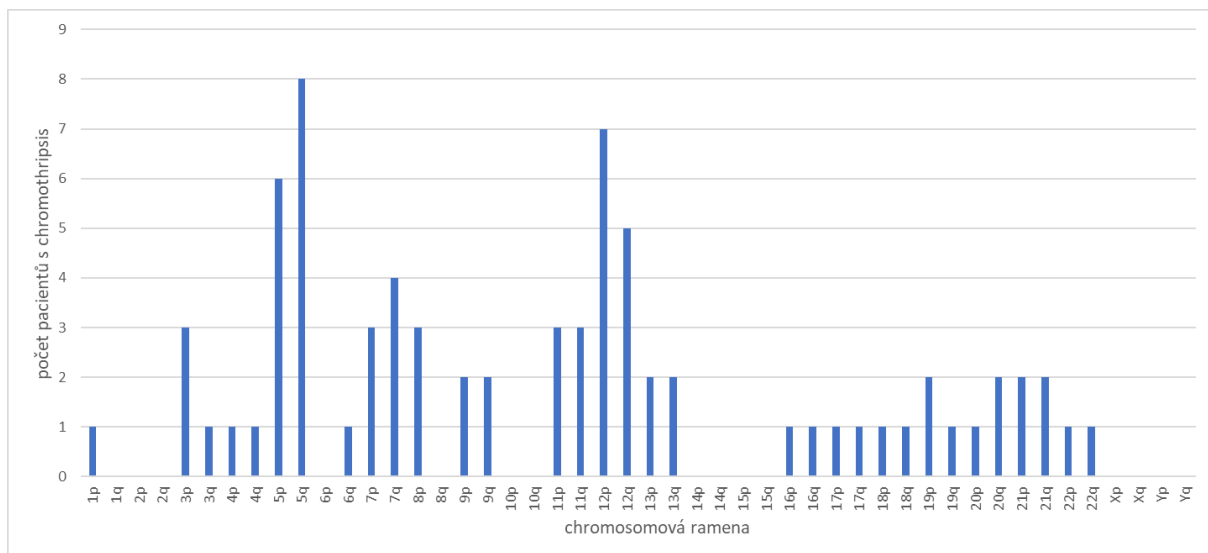


Graf č. 9 – Podíl různých typů změn na jednotlivých chromozomech.

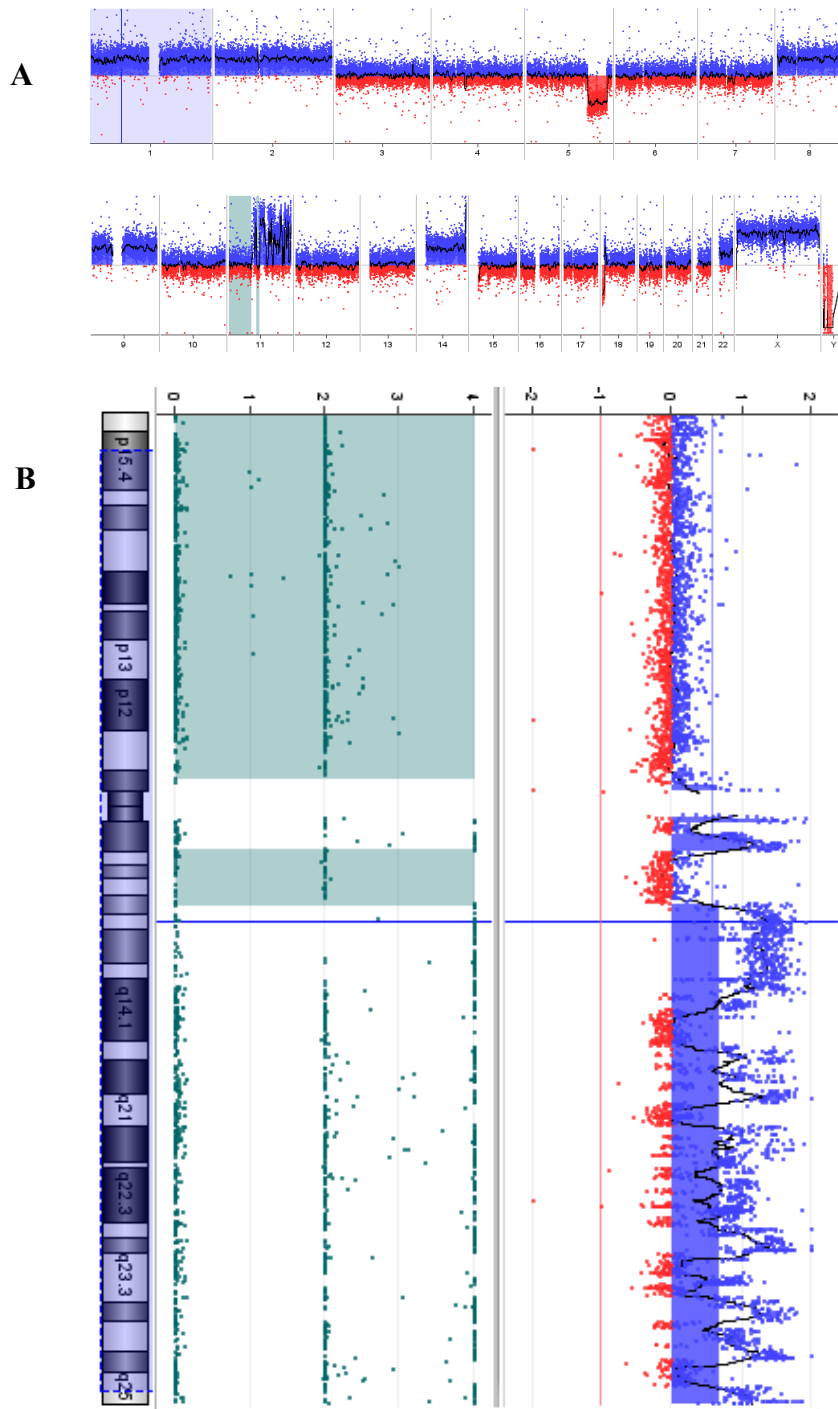


Graf č. 10 – Distribuce chromozomových změn u jednotlivých pacientů. Na vodorovné ose jsou čísla pacientů. Na svislé ose jsou vynesena jednotlivá chromozomová ramena. Světle modrá barva znázorňuje balancované přestavby. Tmavě modrá barva zisky genetického materiálu. Červeně jsou označené ztráty. Fialová pole znázorňují současný zisk i ztrátu genetického materiálu.

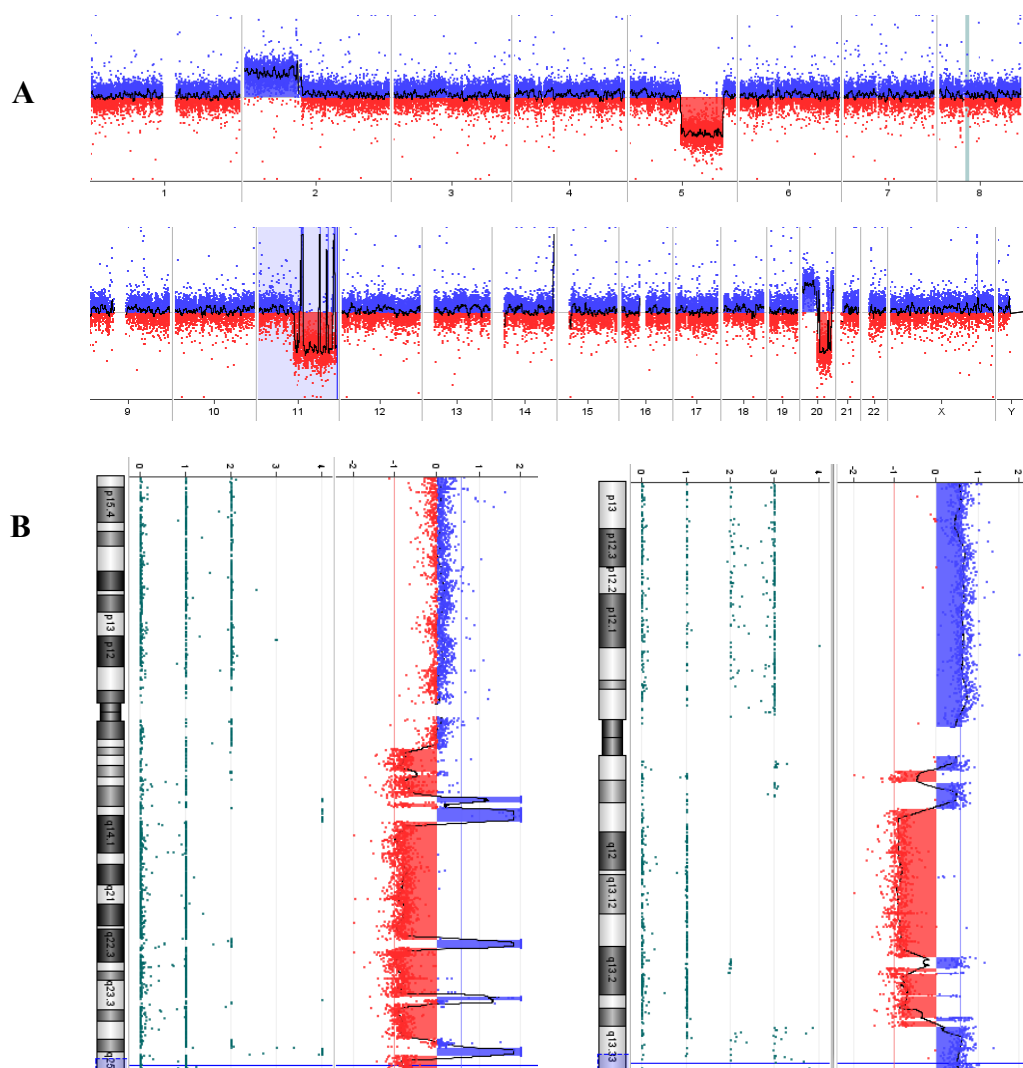
Chromothripsis jsme detekovali celkem u 28 pacientů (46 %). Tyto masivní přestavby jsme nejčastěji pozorovali u chromozomu 5, a to celkem 9x (1x na krátkém a 3x na dlouhém rameni; 5x byl zasažen celý chromozom). Chromozom 12 byl postižen chromothripsis celkem u osmi pacientů (3x na krátkém a 1x na dlouhém rameni; 4x celý chromozom). U pěti nemocných jsme detekovali chromothripsis chromozomu 11 (2x na krátkém a 2x na dlouhém rameni; 1x celý chromozom). Ukázky chromothripsis detekované metodou aCGH/SNP jsou na obrázcích č. 23 a 24. Chromothripsis chromozomu 7 jsme našli u čtyř pacientů (1x na dlouhém rameni a 3x celý chromozom). U chromozomů 2, 10, 14, 15, X a Y jsme chromothripsis nepozorovali. Výskyt chromothripsis na jednotlivých chromozomových ramenech shrnuje graf č. 12.



Graf č. 12 – Frekvence chromothripsis na jednotlivých chromozomových ramenech.



Obrázek č. 23 – Chromothripsis dlouhých ramen chromozomu 11 detekovaná metodou aCGH/SNP u pacientky č. 30. (A) Zobrazení celého karyotypu nemocné. **(B)** Detailní vizualizace masivně přestavěného chromozomu 11. Zobrazeny hodnoty \log_2 ratio. Modrá barva představuje zisky genetického materiálu. Červeně jsou značeny ztráty. Zeleně jsou značeny sondy pro detekci SNP. Detekovali jsme trizomie chromozomů 1, 2, 8, 9, 14 a 22, parciální delece oblastí 5q a 18p a parciální amplifikaci oblastí 18p a dále chromothripsis oblasti 11q a získanou uniparentální dizomii (aUPD) oblastí 11p a 11q. Výsledný popis nálezu dle ISCN: arr[GRCh37](1)x3[0.5],(2)x3[0.5],5q23.3q35.1(130257404_170520788)x1[0.8],(8)x3[0.5],(9)x3[0.5],11p15.5p11.12(200289_49827220)x2mos hmz,11q12.1q13.2(59370949_67227006)x2mos hmz,11q11qter(66796215_134934196)cth[0.7],(14)x3[0.5],18p11.32p11.23(124641_8055875)x1[0.8],18p11.23p11.22(8084746_10847073)x3[0.5],(22)x3[0.3].



Obrázek č. 24 – Chromothripsis dlouhých ramen chromozomu 11 a 20 detekovaná metodou aCGH/SNP u pacienta č. 5. (A) Zobrazení celého karyotypu pacienta. **(B)** Detailní vizualizace masivně přestavěných chromozomů 11 a 20. Zobrazeny hodnoty \log_2 ratio. Modrá barva představuje zisky genetického materiálu. Červeně jsou značeny ztráty. Zeleně jsou značeny sondy pro detekci SNP. V karyotypu jsme detekovali parciální trizomie 3p a 20p, parciální delecii 5q, získanou uniparentální dizomií (aUPD) 8q a chromothripsis 11q a 20q. Výsledný popis nálezu dle ISCN:

```
arr[GRCh37]2p25.3p11.2(10702_90265119)x3[0.6],2q11.1q11.2(95529039_97474164)x3[0.5],5q14.3q33.3
(88141282_159432737)x1[0.9],8q11.21q11.23(48296930_54910006)x2mos mz,11q12.3(61878367_62650351)x
1[0.9],11q12.3q13.2(62849314_66990749)x1[0.8],11q13.2q13.4(67973430_72742823)x1[0.7],11q13.4
(72765310_72883560)x10[1.0],11q13.4(72978107_73978655)x10[1.0],11q13.4(74216151_75138247)x1[0.8],
11q13.5q14.1(75486495_78325431)x10[1.0],11q14.1q22.3(78346925_105171179)x1[0.8],11q22.3
(105189597_106959524)x3[1.0],11q22.3q23.3(106988344_118215709)x1[0.9],11q23.3
(118241906_118822120)x10[1.0],11q23.3q24.2(119760935_127679191)x1[0.8],11q24.3q25
(129763090_131419774)x10[1.0],11q25(131429201_134934196)x1[0.8],20p13p11.1(61012_26312663)x3[0.6],
20q11.21(29423251_30977164)x3[0.5],20q11.21q11.22(31001594_32210622)x1[0.9],20q11.22q11.23
(32239960_35029657)x3[0.5],20q11.23q13.2(35103332_50943006)x1[0.9],20q13.2(50965324_52108170)x3
[0.5],20q13.2(52151411_52560659)x1[1.0],20q13.2(52593987_52713610)x3[0.5],20q13.2q13.31
(52742488_55002547)x1[0.8],20q13.31(55031353_55167912)x3[0.4],20q13.31q13.32(55188505_57415963)x1
[0.9],20q13.32(57420581_57787877)x3[0.5],20q13.32(57811949_58379525)x1[0.9],20q13.32q13.33
(58398610_62904501)x3[0.6],Xq26.2(130624709_130964135)x2[1.0].
```

U 48 pacientů jsme pomocí molekulárně-cytogenetických metod vyšetřili gen *TP53*. K detekci mutací, delecí a aUPD tohoto genu jsme použili různé kombinace metod I-FISH, aCGH/SNP a NGS (viz tabulka č. 11). Celkem u 40 pacientů (83 %) jsme zjistili aberaci genu *TP53*. U 15 ze 48 nemocných (30 %) jsme detekovali patogenní mutaci a u osmi (16 %) pravděpodobně patogenní mutaci genu *TP53*. U pacientů s mutacemi *TP53* potvrzenými NGS se procento readů, ve kterých byla nalezena mutace, pohybovalo od 9 % do 88 %. Mutaci/pravděpodobně patogenní mutaci v genu *TP53* jsme detekovali celkem u 20 pacientů (33 %) s prokázanou delecí dlouhých ramen chromozomu 5. U 19 ze 48 nemocných (38 %) jsme odhalili delecí genu *TP53*. Devět ze 48 pacientů (18 %) mělo aUPD 17p. Jeden pacient měl v nálezů dvě patogenní mutace genu *TP53*. U dalšího pacienta jsme detekovali současně tři pravděpodobně patogenní mutace a nadpočetný deletovaný chromozom 17. U deseti ze 48 pacientů (20 %) jsme potvrdili normální nález. Celkově nejvyšší frekvenci aberací genu *TP53* jsme zaznamenali u pacientů s chromothripsis (93 % pacientů s cth).

Typ vyšetření	Počet pacientů
I-FISH	4
NGS	6
aCGH/SNP	11
I-FISH + NGS	3
I-FISH + aCGH/SNP	8
aCGH/SNP + NGS	10
I-FISH + NGS + aCGH/SNP	6

Tabulka č. 11 – Četnost využití molekulárně-cytogenetických metod pro detekci aberací genu *TP53*.

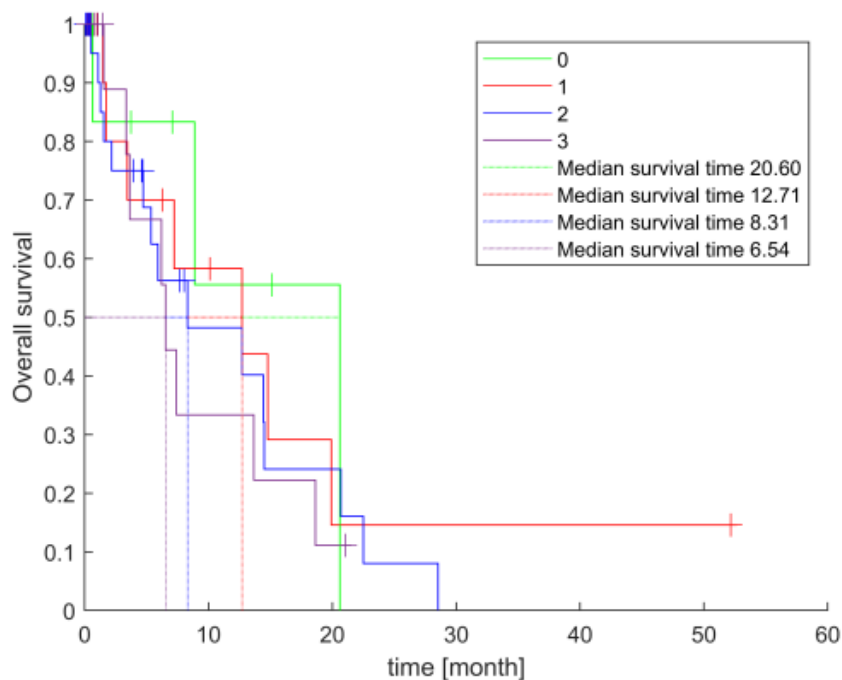
č.p.	patogenní mutace	pravděpodobně patogenní mutace	delece	UPD 17p	NN
1	p.His179Gln(c.537T>A) (f = 42,5%)	p.Pro152Thr(c.454C>A) (f = 41,4%)	-	-	-
4	p.Val272Met(c.814G>A) (f = 87%)	-	-	-	-
14	p.Tyr220Cys(c.659A>G) (f = 88 %)	-	-	Ano	-
29	-	p.Arg175His(c.524G>A) (f = 73,3%)	-	-	-
41	p.Cys275Tyr(c.824G>A) (f = 68,5 %)	-	-	Ano	-
46	-	p.Val216Met(c.646G>A) (f = 60,9 %)	Ano	-	-

Tabulka č. 12 – Výsledky vyšetření genu *TP53* u šesti pacientů, které jsme měli možnost vyšetřit kombinací metod I-FISH, aCGH/SNP a NGS. Č.p. – číslo pacienta; NN – normální nález.

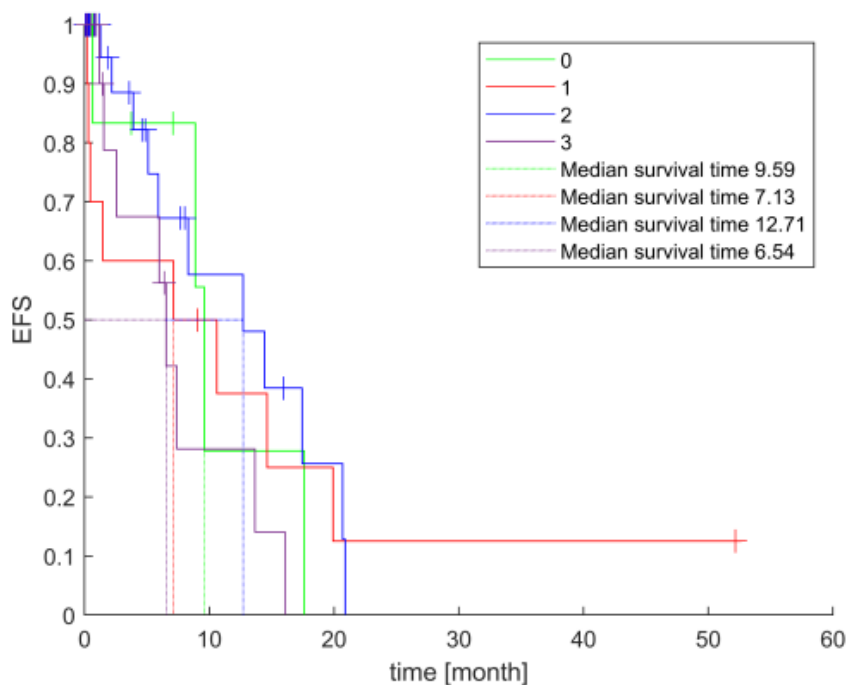
5.3 Analýza přežití a současný klinický stav

Průměrný věk v době stanovení diagnózy byl 71,6 let a medián 73 let. Ke dni 31. 3. 2023 žilo 15 pacientů (31 %) a 33 nemocných zemřelo (54 %). Medián délky sledování pacientů byl devět měsíců.

Pro analýzu přežití jsme nemocné rozdělili do čtyř skupin dle nálezu v době diagnózy. Do skupiny nula jsme zařadili pacienty, u kterých jsme nedetekovali chromothripsis ani divergentní klonální vývoj. Celkem se jednalo o devět nemocných (15 %). Ve skupině jedna byli pacienti s chromothripsis (12 pacientů, tedy 20 % z celého souboru). Ve skupině dva byli nemocní, u kterých jsme detekovali klonální heterogenitu (26 pacientů, 43 %). Třetí skupina zahrnovala 14 pacientů (23 %) s klonální heterogenitou i chromothripsis. Rozdíl v celkovém přežití (OS) mezi definovanými skupinami vyšel na hladině významnosti $p=0,8060$ jako statisticky nesignifikantní. Medián přežití byl u skupiny nula 20,6 měsíce. Skupina jedna měla medián přežití 12,7 měsíce, skupina dva 8,3 měsíce a skupina tři 6,5 měsíce. Výsledné křivky přežití zobrazuje graf č. 13. Skupiny pacientů se významně nelišily ani v přežití do události (EFS), kterou jsme definovali jako relaps či progresi onemocnění. Rozdíl jsme stanovili na hladině významnosti $p=0,4310$ jako statisticky nesignifikantní (graf č. 14). Analýzou jsme prokázali, že příčina vzniku komplexních přestaveb neovlivňuje celkové přežití pacientů.

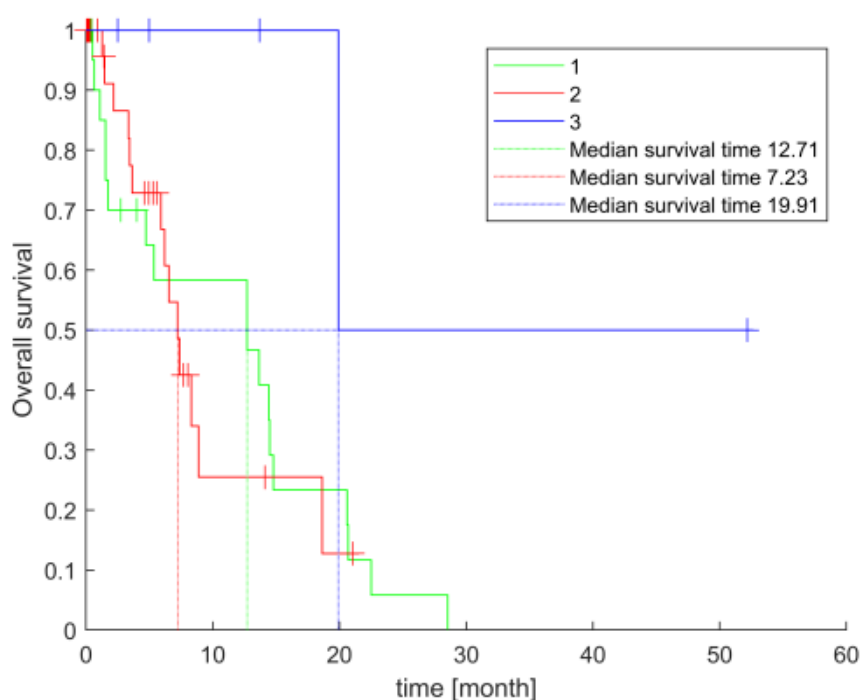


Graf č. 13 – Analýza celkového přežití (OS) pro definované skupiny pacientů. Zelená barva představuje přežití nemocných bez chromothripsis i klonální heterogenity. Červenou barvou je značena křivka přežití pacientů s chromothripsis. Modrá křivka znázorňuje přežití nemocných s klonální heterogenitou. Fialově je značena křivka přežití pacientů s klonální heterogenitou i chromothripsis.

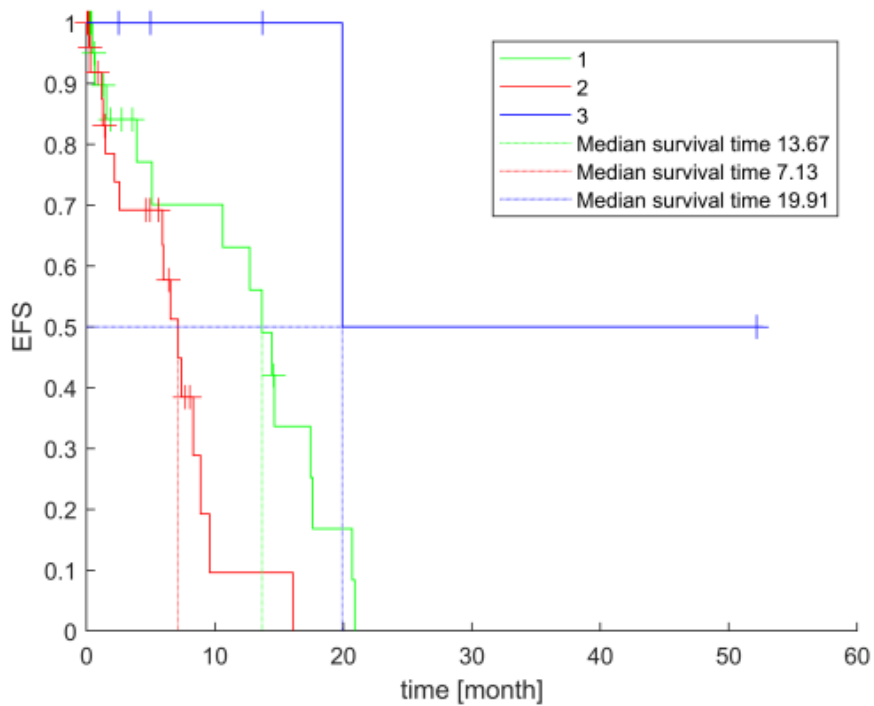


Graf č. 14 – Analýza přežití do události (tj. do progresu či relapsu onemocnění). Zelená barva znázorňuje křivku přežití nemocných bez chromothripsis i klonální heterogenity. Červenou barvou je znázorněna křivka přežití pacientů s chromothripsis. Modrá křivka znázorňuje přežití nemocných s klonální heterogenitou. Fialově je značena křivka přežití pacientů s klonální heterogenitou i chromothripsis.

Pro druhou část statistické analýzy jsme nemocné rozdělili do tří odlišných kategorií. První tvořili pacienti s komplexními karyotypy, které kromě jiných změn zahrnovaly i delecí dlouhých ramen chromozomu 5. Spadalo sem 25 nemocných. Ve druhé kategorii bylo zařazeno 31 pacientů s rozsáhlými změnami karyotypu, do kterých vstupoval i deletovaný chromozom 5. Třetí skupina zahrnovala pět nemocných s komplexními karyotypy bez delecce 5q. V této analýze jsme pozorovali statisticky významný rozdíl v délce celkového přežití ($p=0,0420$) i v přežití do události ($p=0,0040$). Nejhorší OS i EFS (medián 7,2 měsíce) měli nemocní s derivovaným chromozomem 5, který byl zahrnut do komplexních přestaveb (skupina 2). Pacienti ve skupině 1 měli medián OS 12,7 a EFS 13,6 měsíce. Nejlepší OS i EFS jsme detekovali u nemocných, kteří v komplexním karyotypu neměli delecí 5q (medián 19,9 měsíce). Výsledky shrnují grafy č. 15 a 16. Analýzou jsme prokázali, že zahrnutí chromozomu 5 do nebalancovaných aberací představuje nepříznivý prognostický faktor.



Graf č. 15 – Analýza celkového přežití (OS) pro výše definované skupiny pacientů. Zelená křivka znázorňuje přežití nemocných s deletovaným chromozomem 5 v komplexním karyotypu. Červenou barvou je značena křivka přežití pacientů, u kterých se deletovaný chromozom 5 účastnil dalších přestaveb. Modrá křivka ukazuje přežití nemocných, kteří měli komplexní karyotyp bez deletovaného chromozomu 5.



Graf č. 16 – Analýza přežití do události, tj. do progresu či relapsu onemocnění. Zelená křivka znázorňuje přežití nemocných s komplexním karyotypem a deletovaným chromozomem 5. Červená křivka znázorňuje přežití pacientů, u kterých se deletovaný chromozom 5 účastnil dalších komplexních přestaveb. Modrá křivka ukazuje přežití nemocných, kteří měli komplexní karyotyp bez deletovaného chromozomu 5.

6 Diskuze

Cytogenetická analýza genomu nádorových buněk je nedílnou součástí vyšetření nemocných s nádorovým onemocněním. Detekce chromozomových aberací přispívá ke stanovení a upřesnění diagnózy, prognózy, monitorování účinnosti terapie a při objasňování příčin maligní transformace buněk. Chromozomové analýzy umožňují identifikovat geny a mechanismy, které mají zásadní vliv na rozvoj maligního onemocnění. Toho lze následně využít pro vývoj nových léčebných přístupů. Pro většinu hematologických malignit již byly popsány specifické chromozomové aberace s odpovídajícími klinickými nálezy. Nalezené cytogenetické a molekulárně-genetické abnormality představují hlavní determinanty patogeneze a prognózy daného onemocnění. V nádorových buňkách však kromě rekurentních změn dochází i ke vzniku celé řady dalších náhodných a nenáhodných změn, které odrážejí celkovou nestabilitu genomu. Na chromozomové úrovni tuto nestabilitu pozorujeme jako komplexní změny karyotypu a pacienti s tímto nálezem jsou řazeni do nepříznivých prognostických skupin. Analýza komplexních změn umožňuje odhalit chromozomové oblasti a konkrétní zlomová místa, která jsou do přestaveb zahrnuta nejčastěji. Přináší také poznatky o mechanismech vzniku nádorových aberací a jejich důsledcích pro progresi a prognózu onemocnění. V předkládané diplomové práci jsem se zaměřila na analýzu komplexních karyotypů u dospělých pacientů s různými subtypy MDS. Cílem bylo určit jednotlivé chromozomové aberace a chromozomy nejčastěji vstupující do komplexních přestaveb, dále zhodnotit frekvenci a klinický význam chromothripsis a klonálního vývoje jako příčiny vzniku komplexních aberací.

Myelodysplastický syndrom zahrnuje skupinu klonálních onemocnění krve tvorby spojených s abnormální proliferací, diferenciací a apoptózou krvetvorných buněk. Ta se projevuje neefektivní tvorbou krevních elementů s různým počtem cytopenií v periferní krvi (Novák et al., 2021). Obdobně jako u ostatních typů neoplázií souvisí MDS s procesem stárnutí, a tudíž bývá nejčastěji diagnostikován v pokročilejším věku. Dle dostupné literatury je více než 85 % MDS pacientů starších 60 let. Medián věku při diagnóze je udáván v rozmezí 70 až 76 let (Jaiswal et al., 2014, Da Silva-Coelho et al., 2017). Nemocní v mladším věku bývají spíše výjimkou. Jejich nemoc je často spojena se zárodečnými mutacemi v kauzálních genech pro efektivní hematopoézu (Jaiswal et al., 2014; Keel et al., 2016). Medián věku v našem souboru nemocných byl 73 let. Nejstaršímu pacientovi bylo 91 let. Z tohoto klasického schématu nejvíce vybočovala jedna pacientka ve věku 36 let a další dvě nemocné ve věku 46 let.

Některé ze současných studií dokládají, že existuje závislost výskytu MDS na pohlaví. Konkrétně zmiňují vyšší incidenci nemoci u mužů. Studie také prokazují, že věk mužských pacientů v době stanovení diagnózy bývá vyšší než u žen (Wang et al., 2019; Tinsley-Vance et al., 2023; Karantanos et al., 2021). V našem souboru nemocných jsme nezaznamenali nerovnoměrné zastoupení nemoci v závislosti na pohlaví. Věk v době diagnózy ani celkové přežití se rovněž mezi pohlavími významně nelišily.

Jedním z nejdůležitějších prognostických faktorů MDS je nález chromozomových přestaveb v karyotypu pacienta. Do současné chvíle byla popsána řada rekurentních chromozomových aberací typických pro MDS včetně jejich vlivu na průběh onemocnění (Haase et al., 2007). Klasická cytogenetická analýza karyotypu buněk kostní dřeně založená na pruhovacích technikách představuje zlatý standard pro jejich detekci. Tato metoda má však určitá omezení, mezi která patří především omezená proliferační aktivita leukemických buněk, nízká rozlišovací schopnost (rozlišení 5–10 Mbp) a případně špatná kvalita hodnocených chromozomů. Na tato omezení jsme naráželi i během naší analýzy. Míra některých přestaveb byla natolik rozsáhlá, že nebylo možné poskládat karyotyp pacienta bez dalších molekulárně-cytogenetických analýz. Pro upřesnění nálezu z klasické cytogenetické analýzy jsme využívali zejména metody mFISH, mBAND a aCGH/SNP, které dokáží odhalit i kryptické abnormality. U každého pacienta jsme následně stanovili počet chromozomových změn v karyotypu. Jestliže bylo přítomno více buněčných klonů, každou opakující se aberaci jsme započítali pouze jednou. U dvou pacientů jsme v důsledku velké komplexity přestaveb určili pouze rozmezí počtu patologických změn. V celém souboru nemocných jsme dohromady prokázali 656 chromozomových změn. Počty chromozomových přestaveb v karyotypech se pohybovaly od 3 do 26. Průměrně se jednalo o 11 aberací na karyotyp. Nález numerických a strukturních změn, které zahrnovaly tři a více chromozomů, a/nebo strukturní přestavby, při kterých docházelo ke třem a více zlomům na chromozomech jsme považovali za komplexní karyotyp (Schoch et al., 2001). Dle IPSS-R z roku 2012 (Greenberg et al., 2012) je nález tři a více změn asociován se špatnou prognózou, nález čtyř a více aberací pak s velmi špatnou prognózou. V našem souboru jsme pozorovali pouze dva pacienty se třemi změnami v karyotypu a tři nemocné se čtyřmi aberacemi. Zbytek nemocných měl pět a více změn (88,5 % nemocných ze souboru). Karyotyp s více než pěti změnami lze považovat za velice komplexní asociovaný se špatnou léčebnou odpovědí nemocných (Haase et al., 2019). Komplexní aberace v předkládaném souboru nemocných jsme, bez ohledu na počet přítomných změn, asociovali se špatnou odpovědí na léčbu, častou progresí nemoci do AML a krátkou

dobou přežití. Na konci naší studie žilo 15 pacientů (31 %) a 33 nemocných zemřelo (54 %). U třech žijících pacientů víme, že již progradovali do AML. Dva nemocní jsou po léčbě azacytidinem v kompletní remisi. U zbytku pacientů jsme neměli k dispozici aktuální klinická data.

Myelodysplastické syndromy se vyznačují výskytem převážně nebalancovaných změn v karyotypu. Nejčastěji dochází ke ztrátám genetického materiálu ve formě delecí a monozomií. Zisky genetického materiálu a balancované přestavby jsou méně časté (Haase, 2008; Schanz et al., 2009). To jsme potvrdili i v našem souboru pacientů, kde nález nebalancovaných změn výrazně převažoval. Nejčastěji přestavěný byl chromozom 5. V analyzovaném souboru se nacházelo pouze pět pacientů, kteří měli oba chromozomy 5 bez patologie. Delece dlouhých ramen chromozomu 5 – del(5q) patří mezi nejčastější prognosticky významné rekurentní změny u MDS. Nález samostatné del(5q) je spojen s dobrou prognózou, zatímco del(5q) zahrnutá v komplexních karyotypech představuje prognózu špatnou (Haase et al., 2007; Lee et al., 2019; Gurnari et al., 2022). Deleci dlouhých ramen chromozomu 5 v rámci komplexního karyotypu jsme detekovali u 25 nemocných. Velikost patologického klonu se pohybovala od 9 % do 97,5 % (medián 78 %). Rozsah del(5q) bývá u MDS pacientů velmi variabilní a zatím není jasné, zda velikost delece ovlivňuje prognózu pacientů. Jerez a kolektiv prokázali spojitost komplexních karyotypů s rozsáhlejšími delecemi chromozomu 5, které zahrnují krátká i dlouhá ramena (Jerez et al., 2012). Tuto skutečnost potvrdila i další studie z roku 2012 (Nofrini et al., 2012). V naší práci delece chromozomu 5 nejčastěji zahrnovala oblast 5q14.1 až 5q33.3. U některých pacientů jsme detekovali deleci téměř celých dlouhých ramen chromozomu 5. Deleci na krátkých ramenech chromozomu 5 jsme pozorovali u deseti nemocných. Nejčastěji zahrnovala oblast 5p14.2 až 5p15.2. Ve starších studiích byla u MDS popisována i úplná ztráta chromozomu 5. Novější studie využívající metody molekulární cytogenetiky však dokládají, že pravá monozomie ve skutečnosti neexistuje (Zemanová a Březinová, 2010; Galván et al., 2010; Herry et al., 2007). Část genetického materiálu zůstává zachována a v rámci komplexních přestaveb je přenesena na jiné místo v genomu. Na monozomii chromozomu 5 jsme měli na základě klasické cytogenetické analýzy podezření u dvou pacientů. Pomocí molekulárně-cytogenetických metod jsme ale potvrdili, že i v těchto případech zůstaly části chromozomu 5 zachovány a byly přemístěny na jiná místa v genomu.

Na základě současných poznatků víme, že deletovaný chromozom 5 bývá velmi nestabilní a často vstupuje do dalších přestaveb. Nestabilita chromozomu 5 je spojena s rozsáhlými ztrátami genetického materiálu, které často postihují i celá chromozomová

ramena. V našem souboru nemocných mělo 31 pacientů (51 %) derivovaný chromozom 5 zahrnutý v mnoha nebalancovaných přestavbách s řadou různých chromozomů. Převážně se jednalo o nebalancované translokace. Nejčastějšími translokačními partnery byly chromozomy 15 (n=10), 13 (n=6), 10 (n=6), 16 (4) a 17 (n=3). Vědecké studie potvrzují, že ztráty dlouhých ramen chromozomu 5, vzniklé v důsledku nebalancovaných translokací, bývají spojené s klonálním vývojem, komplexními karyotypy a mutacemi genu *TP53* (Volkert et al., 2014; Hosono et al., 2017; Zemanova et al., 2014). Zahrnutí deletovaného chromozomu 5 do dalších přestaveb výrazně zhoršuje prognózu pacientů (Giagounidis et al., 2005). Prozatím není jasné, zda celkové přežití nemocných ovlivňuje rozsah delece 5q, nebo komplexita karyotypu, která je sama o sobě považována za nepříznivý prognostický faktor (Zemanova et al., 2014). V naší studii mělo rovněž zahrnutí chromozomu 5 do nebalancovaných přestaveb statisticky signifikantní vliv na přežití pacientů.

Kromě delece 5q jsme opakovaně detekovali ztrátu chromozomu 7 nebo delece jeho dlouhých ramen. Tento nález patří mezi významné rekurentní cytogenetické změny u MDS (Haase, 2008; Greenberg et al., 2012). Dalšími typickými aberacemi pro MDS pacienty, které jsme detekovali, jsou trizomie chromozomu 8 a delece dlouhých ramen chromozomu 20. Tyto nálezy jsou v souladu s odbornou literaturou (Greenberg et al., 2012; Schanz et al., 2011; Sperling et al., 2017).

Nadpočetné kopie a strukturální přestavby chromozomu 11 jsou spojeny s alteracemi genu *KMT2A* a progresí nemoci do AML (Sarova et al., 2013). Tuto souvislost jsme prokázali u čtyř pacientů, u kterých jsme aberaci genu *KMT2A* ověřovali metodou FISH. U všech čtyř zmíněných pacientů jsme prokázali nadpočetnou kopii tohoto genu. Další častou změnou u nemocných s hematologickými malignitami jsou aberace krátkých ramen chromozomu 12, kde je lokalizován gen *ETV6* (12p13.2), který kóduje transkripční faktor důležitý pro prenatální vývoj a hematopoézu. Deregulace tohoto genu způsobená translokací, delecí nebo somatickou mutací se vyskytuje přibližně u 0,6 % MDS pacientů s vysokým rizikem (Gurney et al., 2022; Wall et al., 2012; Q. Wang et al., 2014). Některé studie dokládají, že je incidence aberací tohoto genu u komplexních karyotypů vyšší (Rücker et al., 2006; Wall et al., 2012). Tomu odpovídá i náš nález, jelikož jsme aberace krátkých ramen chromozomu 12 pozorovali u 22 pacientů. Tetraploidní počet chromozomů jsme detekovali u dvou pacientů. Literatura uvádí, že tento nález svědčí pro horší prognózu, kratší přežití a mutaci genu *TP53* (Iyer et al., 2004; Watanabe et al., 2004). U jednoho z pacientů jsme potvrdili delecí krátkých ramen chromozomu 17.

V případě druhého pacienta jsme potvrdili patogenní mutaci genu *TP53*. Oba nemocní během naší studie zemřeli.

Příčiny vzniku komplexních karyotypů jsou zatím stále nejasné. Genetické a epigenetické studie hematopoetických kmenových buněk dokládají vícestupňový proces spojený s postupnou akumulací chromozomových aberací v průběhu onemocnění (tzv. klonální vývoj). Klonální vývoj může být lineární, nebo divergentní. Při lineárním klonálním vývoji dochází k postupné kumulaci genetických změn v čase. Dle literatury je detekován u 8–39 % MDS pacientů (Feurstein et al., 2018). Toto široké rozmezí je způsobené především velkou heterogenitou pozorovaných vzorků, různou dobou sledování pacientů a odlišnostmi v metodologických přístupech. Divergentní klonální vývoj vzniká v důsledku vysoké genomové nestability a v jeho důsledku dochází k rozvoji několika příbuzných či nepříbuzných heterogenních buněčných klonů, které se odlišují genetickými aberacemi (Nowell, 1976). Současné studie dokládají, že klonální heterogenita a genetická diverzita buněk jsou jedním z nejčastějších důvodů rezistence na podávanou terapii, klonální evoluce a relapsu onemocnění (Schanz et al., 2018; Zemanová et al., 2019).

V předkládané studii jsme u 38 pacientů (62 %) detekovali klonální heterogenitu již v době diagnózy. Nejčastěji se jednalo o dva příbuzné patologické buněčné klony. Největší počet přítomných klonů byl pět. U třech nemocných jsme v jednom klonu detekovali pouze intersticiální delecí dlouhých ramen chromozomu 5. V odvozených buněčných klonech pak k delecí 5q přibyly další aberace. Tento nálezn je v souladu s názorem, že *del(5q)* je u MDS pacientů primární změnou, která souvisí s procesem rozvoje nemoci (Acha et al., 2021; Woll et al., 2014). Přítomnost nezávislých buněčných klonů je u MDS poměrně vzácnou rekurentní změnou. Obvykle je spojován se střední prognózou nemoci (Greenberg et al., 2012). V našem souboru jsme pozorovali pouze jeden případ nezávislých buněčných klonů se zcela rozdílnými aberacemi. Obdobně jako ve studii z roku 2014 (Zemanova et al., 2014) jsme neprokázali odlišnost v celkovém přežití u pacientů s klonální heterogenitou od ostatních nemocných s komplexním karyotypem. Na prognóze nemocných se nejvíce odrážela celková nestabilita nádorového genomu a míra komplexity přítomných aberací.

V průběhu času jsme měli možnost opakovaně vyšetřit 30 pacientů. Další klonální vývoj prodělalo 8 z nich (27 %). Nález je v souladu s publikovanými daty v literatuře. Neukirchenová a kolektiv například uvádí, že z celkového počtu 549 pacientů prodělalo lineární klonální vývoj 24 % (Neukirchen et al., 2017). Převážná většina nově detekovaných aberací v našem souboru nemocných představovala nespecifické změny odrážející míru nestability maligního klonu.

Pouze u jednoho pacienta jsme nově detekovali delecii dlouhých ramen chromozomu 7 – del(7q) a v dalším případě trizomii chromozomu 8. Tyto aberace typicky značí progresi nádorového onemocnění (Schanz et al., 2018).

V roce 2011 bylo poprvé publikováno, že za masivními přestavbami některých chromozomů může stát i náhlá událost pojmenovaná jako chromothripsis. Tato událost představuje rozpad chromozomů nebo jejich částí v jednom okamžiku během tzv. buněčné krize. Hlavním znakem prodělané chromothripsis je přítomnost desítek až stovek zlomů na jednotlivých chromozomech nebo jejich částech (tzv. zlomové klastry). Chromozomové fragmenty jsou následně pomocí reparačních mechanismů náhodně poskládány zpět. Přestavěné chromozomy vykazují charakteristické kolísání mezi jednou až mnoha kopiemi DNA sekvencí. V důsledku masivních přestaveb dochází ke ztrátám tumor supresorových genů, genovým deregulacím a fúzím, které mají vážný dopad na buněčnou transformaci (Stephens et al., 2011).

Stephens a kolektiv v původní studii uvádí, že známky chromothripsis lze pozorovat u 2–3 % nádorových onemocnění (Stephens et al., 2011). Současné analýzy uvádí, že se frekvence chromothripsis značně liší napříč jednotlivými typy nádorů (Rode et al., 2016; Závacká et al., 2019). Tento rozdíl je způsoben odlišnou mírou genomové nestability nádorových subtypů a používáním rozdílných metodologických přístupů pro detekci chromothripsis. Pro pacienty s MDS a komplexním karyotypem se udává frekvence přibližně 50 % (Zemanova et al., 2014, Voronina et al., 2020). V úvodní studii, která popisovala chromothripsis u pacientky s CLL, byly do přestaveb nejvíce zahrnuty chromozomy 4, 1, 12 a 15. Studie z roku 2018 (Zemanova et al., 2018) dokládá, že u MDS pacientů postihuje chromothripsis téměř všechny chromozomy v karyotypu. Nejvíce přestavěné bývají chromozomy 5, 7, 17, 11 a 12.

V rámci naší studie jsme znaky chromothripsis posuzovali na základě výsledků metod mFISH, mBAND a/nebo aCGH/SNP. Za kauzální jsme považovali přítomnost vysoce rozpadlých či přestavěných anachromozomů. Metodou mFISH a mBAND jsme nejčastěji detekovali mnohačetné delecce, ring chromozomy, izodicentrické chromozomy a amplifikace genových regionů. Analýza pomocí DNA čipů dokázala odhalit kryptické změny, které se skládaly z velkého množství ztrát a zisků genetického materiálu v rámci ohraničeného úseku chromozomu. Mezi 61 pacienty jsme takto identifikovali 28 pacientů s chromothripsis (46 %). Nejčastěji se jednalo o masivní rozpad chromozomů 5 (n=9), 12 (n=8), 11 (n=5) a 7 (n=4). U chromozomu 5 se jednalo především o rozpad jeho dlouhých ramen. Chromozom 12 měl

naopak nejčastěji představěná krátká ramena. Prvotní studie věnující se chromothripsis dokládaly, že pacienti s tímto nálezem mají agresivnější formy nádorových onemocnění a horší prognózu (Jones a Jallepalli, 2012; h a Wilson, 2012). V naší studii jsme neprokázali statisticky signifikantní rozdíl v OS pacientů s komplexním karyotypem s chromothripsis a bez chromothripsis. Stejně jako ve studii z roku 2014 (Zemanova et al., 2014) ukazujeme, že komplexní karyotypy mají stejně špatnou prognózu bez ohledu na to, jestli příčinou jejich vzniku byl klonální vývoj, nebo chromothripsis.

Recentní výzkumy dokládají, že kromě chromozomových změn mají v procesu tumorigeneze zásadní roli genové mutace (Bersanelli et al., 2021; Haferlach et al., 2014; Ogawa, 2019). V roce 2022 byly publikovány nové ICC (Arber et al., 2022) a WHO klasifikace (Khoury et al., 2022), které zohledňují přítomnost mutačních změn v genomech nemocných. Jelikož je předkládaná studie retrospektivní, použili jsme klasifikační a prognostické skórovací systémy platné po celou dobu studie. U 25 nemocných jsme již v rámci rutinní diagnostiky provedli vyšetření genovým panelem Archer Myeloid VariantPlex (Invitae), který pokrývá 75 kandidátních genů asociovaných s myeloidními malignitami. Jedná se o vyšetření s vysokou citlivostí, které umožňuje detekovat i mutace s velmi nízkou frekvencí. Nejčastěji jsme odhalili mutace genu *TP53*, které představují jeden z nejvíce nepříznivých prognostických faktorů. Gen *TP53* má klíčový vliv na zajištění stability genomu. V důsledku jeho aberací dochází k potlačení funkce opravných mechanismů, deregulaci průchodu buněčným cyklem a k narušení stability telomer (Cai et al., 2014; Rücker et al., 2018). Gen je umístěn na krátkých ramenech chromozomu 17, která jsou u MDS pacientů často deletovaná. Jedná se buď o částečnou delecii, nebo o ztrátu celého chromozomu. Případně může také dojít k uniparentální dizomii. V důsledku těchto přestaveb pak dochází k úplné ztrátě tumor supresorového genu, kdy je obvykle jedna alela genu deletována a druhá mutována (Bersanelli et al., 2021; Svobodova et al., 2016). Mutace genu *TP53* jsou u MDS pacientů typicky spojeny s rozsáhlými změnami karyotypu (Haase et al., 2019). Často dochází k několika mutačním zásahům (*TP53*^{multihit}) a prognóza těchto pacientů je špatná (Bernard et al., 2020; Belickova et al., 2016).

V rámci předkládané studie jsme gen *TP53* vyšetřovali za pomoci metod I-FISH, aCGH/SNP a NGS. Nejlepší výsledky přinášela kombinace všech tří metod, která nám umožnila zjistit stav obou alel. Tuto kombinaci vyšetření jsme však mohli provést pouze u 6 pacientů, kteří měli dostatek genetického materiálu. Celkem jsme aberaci genu *TP53* vyšetřili u 48 nemocných a patologický nález jsme prokázali u 40 z nich (83 %). Naše výsledky

se shodují s vědeckou studií Weinbergové a kolektivu, která rovněž uvádí frekvenci aberací genu *TP53* u 83 % nemocných s komplexním karyotypem (Weinberg et al., 2022).

V rámci statistické analýzy jsme analyzovali aberace genu *TP53* ve spojitosti s klonální heterogenitou a chromothripsis. U pacientů s klonální heterogenitou jsme v době diagnózy detekovali aberaci genu *TP53* v 58 % případů. Nejvyšší frekvenci mutací jsme zaznamenali u pacientů s chromothripsis (93 % pacientů s cth). Prozatím není zcela jasné, zda změněná exprese genu *TP53* předchází vzniku rozsáhlých přestaveb, nebo je až jejím následkem. Jako více pravděpodobná se jeví teorie, že změněná exprese genu *TP53* vzniku rozsáhlých přestaveb předchází (Jasek et al., 2010; Feurstein et al., 2018).

Tato diplomová práce dokládá, že existuje spojitost mezi komplexními karyotypy, výskytem chromothripsis a klonální heterogenitou. Navzdory prvotním studiím jsme prokázali, že příčina masivně přestavěného genomu příliš neovlivňuje celkové přežití pacientů. Hlavním prognostickým faktorem je komplexita chromozomových přestaveb a zahrnutí chromozomu 5 do nebalancovaných aberací. Dále jsme prokázali souvislost komplexních karyotypů s aberacemi genu *TP53*. Potvrzujeme tím, že studie mutačního stavu genů mají zásadní význam pro přesné stanovení prognózy pacientů a správné zacílení jejich terapie. Mutace dalších genů nebyly předmětem diplomové práce. Vzhledem k důrazu, který je nově kladen na přítomnost mutačních změn v karyotypech nemocných, by se mohlo jednat o vhodnou cestu pro další analýzy našeho souboru nemocných.

7 Závěr

Provedli jsme detailní cytogenomickou analýzu buněk kostní dřeně 61 dospělých pacientů s různými subtypy myelodysplastických syndromů. Pomocí molekulárně-cytogenetických metod jsme u všech nemocných prokázali komplexní karyotyp v době stanovení jejich diagnózy. Detailně jsme popsali jednotlivé aberace a určili jsme chromozomy, které byly do přestaveb zahrnuty nejčastěji. Komplexní změny byly zastoupené především nebalancovanými aberacemi se ztrátami genetického materiálu. Přestaveb se nejčastěji účastnily chromozomy 5, 7 a 12. Změny se týkaly zejména dlouhých ramen chromozomů. Výjimku tvořily chromozomy 12 a 17, u kterých jsme z velké většiny detekovali aberace na krátkých ramenech. Nejvíce nestabilní byl chromozom 5, který se často účastnil mnoha nebalancovaných přestaveb.

Pro detailní analýzu prognostického významu komplexních aberací jsme nemocné rozdělili do tří skupin, a to na pacienty s delecí 5q a dalšími komplexními aberacemi, nemocné s delecí 5q jako součástí komplexních přestaveb a na nemocné s komplexními změnami bez delecce 5q. Nejkratší celkové přežití a rychlou progresi nemoci jsme prokázali u skupiny s deletovaným chromozomem 5, který byl součástí komplexních přestaveb (medián OS byl 7 měsíců).

Charakteristikou maligního procesu je vysoká nestabilita genomu spojená s klonálním vývojem patologického klonu, při kterém dochází k postupnému hromadění chromozomových aberací a genových mutací v průběhu onemocnění. Klonální heterogenitu v době diagnózy jsme detekovali u 62 % nemocných. V průběhu času jsme měli možnost opakovaně vyšetřit 30 pacientů a další klonální vývoj prodělalo osm z nich (27 %). U 46 % nemocných s MDS a komplexním karyotypem jsme detekovali rozpad některých chromozomů nebo jejich částí, který je v literatuře popisován jako chromothripsis. V důsledku chromothripsis byly nejčastěji přestavěné chromozomy 5, 7 a 12. Převážná většina pacientů s chromothripsis měla aberovaný gen *TP53*. Analýza celkového přežití neodhalila významné rozdíly mezi pacienty s klonální heterogenitou a/nebo s chromothripsis. Navzdory starším studiím jsme prokázali, že hlavním prognostickým faktorem je míra komplexity přestaveb genomu než příčina jejich vzniku.

Předkládaná diplomová práce dokládá význam cytogenomických analýz, díky kterým jsme schopni detailně zanalyzovat genom nádorových buněk. Molekulárně-cytogenetické metody nám umožňují detekovat balancované i nebalancované změny a zachytit významné procesy tumorigeneze, jako je klonální vývoj a chromothripsis. Odhalené patologie pak mají

významnou roli při určování subtypu a prognózy onemocnění. Umožňují monitorovat léčebnou odpověď pacienta a včasné detekovat případný relaps. Studium podstaty chromozomových změn a identifikace mechanismů, které hrají významnou roli při počátečních i pokročilejších fázích onemocnění, může významně přispět k lepší diagnostice a vývoji nových léčebných přístupů.

Seznam použitých zdrojů

* sekundární zdroje

Adema, V., Hirsch, C. M., Przychodzen, B. P., Pellagatti, A., Boulwood, J., Nazha, A., Carraway, H. E., Sole, F., Sekeres, M. A., Visconte, V., & Maciejewski, J. P. (2016). Molecular and Clinical Characterization of Patients with Myeloid Neoplasms Carrying the 12p Deletion. *Blood*, *128*(22), 2007–2007. <https://doi.org/10.1182/blood.v128.22.2007.2007>

Adema, V., Palomo, L., Walter, W., Mallo, M., Hutter, S., Framboise, T. la, Arenillas, L., Meggendorfer, M., Radivoyevitch, T., Xicoy, B., Pellagatti, A., Haferlach, C., Boulwood, J., Kern, W., Visconte, V., Sekeres, M., Barnard, J., Haferlach, T., Sol, F., & Maciejewski, J. P. (2022). *Pathophysiologic and clinical implications of molecular profiles resultant from deletion 5q*. <https://doi.org/10.1016/j>

Acha, P., Palomo, L., Fuster-Tormo, F., Xicoy, B., Mallo, M., Manzanares, A., Grau, J., Marcé, S., Granada, I., Rodríguez-Luaces, M., Diez-Campelo, M., Zamora, L., & Solé, F. (2021). Analysis of intratumoral heterogeneity in myelodysplastic syndromes with isolated del(5q) using a single cell approach. *Cancers*, *13*(4), 1–17. <https://doi.org/10.3390/cancers13040841>

Alan, L., Dewald, G., Bennett, J., Giagounidis, A., Raza, A., Feld, E., Powell, B., Peter Greenberg, Deborah Thomas, Richard Stone, Craig Reeder, Kenton Wride, John Patin, Michele Schmidt, Jerome Zeldis, & Robert Knight. (2006). Lenalidomide in the Myelodysplastic Syndrome with Chromosome 5q Deletion. *The New England Journal of Medicine*, *355*, 1456–1465.

Anderson, K., Lutz, C., Van Delft, F. W., Bateman, C. M., Guo, Y., Colman, S. M., Kempster, H., Moorman, A. V., Tittley, I., Swansbury, J., Kearney, L., Enver, T., & Greaves, M. (2011). Genetic variegation of clonal architecture and propagating cells in leukaemia. *Nature*, *469*(7330), 356–361. <https://doi.org/10.1038/nature09650>

Arber, D. A., Orazi, A., Hasserjian, R. P., Borowitz, M. J., Calvo, K. R., Kvasnicka, H.-M., Wang, S. A., Bagg, A., Barbui, T., Branford, S., Bueso-Ramos, C. E., Cortes, J. E., Dal Cin, P., DiNardo, C. D., Dombret, H., Duncavage, E. J., Ebert, B. L., Estey, E. H., Facchetti, F., ... Tefferi, A. (2022). International Consensus Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemias: integrating morphologic, clinical, and genomic data. *Blood*, 1200–1228.

Arber, D. A., Orazi, A., Hasserjian, R., Thiele, J., Borowitz, M. J., Le Beau, M. M., Bloomfield, C. D., Cazzola, M., & Vardiman, J. W. (2016). The 2016 revision to the World Health

Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*, 127(20), 2391–2405. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-03-643544>

Baca, S. C., Prandi, D., Lawrence, M. S., Mosquera, J. M., Romanel, A., Drier, Y., Park, K., Kitabayashi, N., MacDonald, T. Y., Ghandi, M., van Allen, E., Kryukov, G. v., Sboner, A., Theurillat, J. P., Soong, T. D., Nickerson, E., Auclair, D., Tewari, A., Beltran, H., ... Garraway, L. A. (2013). Punctuated evolution of prostate cancer genomes. *Cell*, 153(3), 666–677. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.03.021>

Ballas, L. K., Hu, B. R., & Quinn, D. I. (2014). Chromoplexy and hypoxic microenvironment drives prostate cancer. *The Lancet Oncology*, 15(13), 1419–1421. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)71114-3](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)71114-3)

Belickova, M., Vesela, J., Jonasova, A., Pejsova, B., Votavova, H., Dostalova Merkerova, M., Zemanova, Z., Brezinova, J., Mikulenкова, D., Lauermannova, M., Valka, J., Michalova, K., Neuwirtova, R., & Cermak, J. (2016). TP53 mutation variant allele frequency is a potential predictor for clinical outcome of patients with lower-risk myelodysplastic syndromes. *Oncotarget*, 7(24), 36266–36279. www.impactjournals.com/oncotarget

Bennett, J. M., Catovsky, D., Daniel, M., Flandrin, G., G Galton, D. A., & Gralnick, H. R. (1976). Proposals for the Classification of the Acute Leukaemias. *British Journal of Haematology*, 33, 451–458.

Bernard, E., Nannya, Y., Hasserjian, R. P., Devlin, S. M., Tuechler, H., Medina-Martinez, J. S., Yoshizato, T., Shiozawa, Y., Saiki, R., Malcovati, L., Levine, M. F., Arango, J. E., Zhou, Y., Solé, F., Cargo, C. A., Haase, D., Creignou, M., Germing, U., Zhang, Y., ... Papaemmanuil, E. (2020). Implications of TP53 allelic state for genome stability, clinical presentation and outcomes in myelodysplastic syndromes. *Nature Medicine*, 26(10), 1549–1556. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-1008-z>

Bernard, E., Tuechler, H., Greenberg, P. L., Hasserjian, R. P., Arango Ossa, J. E., Nannya, Y., Devlin, S. M., Creignou, M., Pinel, P., Monnier, L., Gundem, G., Medina-Martinez, J. S., Domenico, D., Jädersten, M., Germing, U., Sanz, G., van de Loosdrecht, A. A., Kosmider, O., Follo, M. Y., ... Papaemmanuil, E. (2022). Molecular International Prognostic Scoring System for Myelodysplastic Syndromes. *NEJM Evidence*, 1(7). <https://doi.org/10.1056/evidoa2200008>

Bernasconi, P., Klersy, C., Boni, M., Cavigliano, P. M., Calatroni, S., Giardini, I., Rocca, B., Zappatore, R., Caresana, M., Quarna, J., Lazzarino, M., & Bernasconi, C. (2005). Incidence

and prognostic significance of karyotype abnormalities in de novo primary myelodysplastic syndromes: A study on 331 patients from a single institution. *Leukemia*, *19*(8), 1424–1431. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2403806>

Bersanelli, M., Travaglini, E., Meggendorfer, M., Matteuzzi, T., Sala, C., Mosca, E., Chiereghin, C., Di Nanni, N., Gnocchi, M., Zampini, M., Rossi, M., Maggioni, G., Termanini, A., Angelucci, E., Bernardi, M., Borin, L., Bruno, B., Bonifazi, F., Santini, V., ... Della Porta, M. G. (2021). Classification and Personalized Prognostic Assessment on the Basis of Clinical and Genomic Features in Myelodysplastic Syndromes. *J Clin Oncol*, *39*, 1223–1233. <https://doi.org/10.1200/JCO.20>

Bignell, G. R., Huang, J., Greshock, J., Watt, S., Butler, A., West, S., Grigorova, M., Jones, K. W., Wei, W., Stratton, M. R., Futreal, P. A., Weber, B., Shaper, M. H., & Wooster, R. (2004). High-resolution analysis of DNA copy number using oligonucleotide microarrays. *Genome Research*, *14*(2), 287–295. <https://doi.org/10.1101/gr.2012304>

Bolkestein, M., Wong, J. K. L., Thewes, V., Körber, V., Hlevnjak, M., Elgaafary, S., Schulze, M., Kommos, F. K. F., Sinn, H. P., Anzeneder, T., Hirsch, S., Devens, F., Schröter, P., Höfer, T., Schneeweiss, A., Lichter, P., Zapatka, M., & Ernst, A. (2020). Chromothripsis in human breast cancer. *Cancer Research*, *80*(22), 4918–4931. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-20-1920>

Bozic, I., Antal, T., Ohtsuki, H., Carter, H., Kim, D., Chen, S., Karchin, R., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., & Nowak, M. A. (2010). Accumulation of driver and passenger mutations during tumor progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(43), 18545–18550. <https://doi.org/10.1073/pnas.1010978107>

Breems, D. A., Van Putten, W. L. J., De Greef, G. E., Van Zelderen-Bhola, S. L., Gerssen-Schoorl, K. B. J., Mellink, C. H. M., Nieuwint, A., Jotterand, M., Hagemeyer, A., Beverloo, H. B., & Löwenberg, B. (2008). Monosomal karyotype in acute myeloid leukemia: A better indicator of poor prognosis than a complex karyotype. *Journal of Clinical Oncology*, *26*(29), 4791–4797. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.16.0259>

Brezinova, J., Zemanova, Z., Bystricka, D., Sarova, I., Lizcova, L., Malinova, E., Izakova, S., Sajdova, J., Sponerova, D., Jonasova, A., Cermak, J., & Michalova, K. (2012). Deletion of the long arm but not the 5q31 region of chromosome 5 in myeloid malignancies. *Leukemia Research*, *36*(3). <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2011.11.007>

- Britt, A., Mohyuddin, G. R., McClune, B., Singh, A., Lin, T., Ganguly, S., Abhyankar, S., Shune, L., McGuirk, J., Skikne, B., Godwin, A., Pessetto, Z., Golem, S., Divine, C., & Dias, A. (2020). Acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndrome with chromosome 17 abnormalities and long-term outcomes with or without hematopoietic stem cell transplantation. *Leukemia Research*, *95*. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2020.106402>
- Bystricka, D., Zemanova, Z., Brezinova, J., Gancarikova, M., Grosova, L., Sarova, I., Izakova, S., Berkova, A., & Michalova, K. (2010). The Assessment of Array Comparative Genomic Hybridization in Complex Karyotype Analyses. *Folia Biologica*, *50*, 223–230. <https://www.researchgate.net/publication/49664993>
- Cai, H., Kumar, N., Bagheri, H. C., von Mering, C., Robinson, M. D., & Baudis, M. (2014). Chromothripsis-like patterns are recurring but heterogeneously distributed features in a survey of 22,347 cancer genome screens. *BMC Genomics*, *15*(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-82>
- Campagna, A., De Benedittis, D., Fianchi, L., Scalzulli, E., Rizzo, L., Niscola, P., Piccioni, A. L., Di Veroli, A., Mancini, S., Villivà, N., Martini, T., Mohamed, S., Carmosino, I., Criscuolo, M., Fenu, S., Spiriti, M. A. A., Buccisano, F., Mancini, M., Tafuri, A., ... Latagliata, R. (2022). Myelodysplastic Syndromes with Isolated 20q Deletion: A New Clinical–Biological Entity? *Journal of Clinical Medicine*, *11*(9). <https://doi.org/10.3390/jcm11092596>
- Campo, E., Pileri, S., Swerdlow, S. H., Pileri, S. A., Harris, N. L., Stein, H., Siebert, R., Advani, R., Ghielmini, M., Salles, G. A., Zelenetz, A. D., & Jaffe, E. S. (2016). WHO Classification of Tumours of the Haematopoietic and Lymphoid Tissues Review Series THE UPDATED WHO CLASSIFICATION OF HEMATOLOGICAL MALIGNANCIES The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*, *127*(20), 2357–2390. <https://doi.org/10.1182/blood-2016>
- *Carlo, M., & Croce, M. D. (2008). Oncogenes and Cancer. *the new england journal of medicine*, *358*(5), 502–513. <https://doi.org/DOI: 10.1056/NEJMra072367>
- Cortés-Ciriano, I., Lee, J. J. K., Xi, R., Jain, D., Jung, Y. L., Yang, L., Gordenin, D., Klimczak, L. J., Zhang, C. Z., Pellman, D. S., Akdemir, K. C., Alvarez, E. G., Baez-Ortega, A., Beroukhim, R., Boutros, P. C., Bowtell, D. D. L., Brors, B., Burns, K. H., Campbell, P. J., ... Zhang, C. Z. (2020). Comprehensive analysis of chromothripsis in 2,658 human cancers using whole-genome sequencing. *Nature Genetics*, *52*(3), 331–341. <https://doi.org/10.1038/s41588-019-0576-7>

Crasta, K., Ganem, N. J., Dagher, R., Lantermann, A. B., Ivanova, E. v., Pan, Y., Nezi, L., Protopopov, A., Chowdhury, D., & Pellman, D. (2012). DNA breaks and chromosome pulverization from errors in mitosis. *Nature*, *482*(7383), 53–58. <https://doi.org/10.1038/nature10802>

Crisà, E., Kulasekararaj, A. G., Adema, V., Such, E., Schanz, J., Haase, D., Shirmeshan, K., Best, S., Mian, S. A., Kizilors, A., Cervera, J., Lea, N., Ferrero, D., Germing, U., Hildebrandt, B., Martínez, A. B. V., Santini, V., Sanz, G. F., Solé, F., & Mufti, G. J. (2020). Impact of somatic mutations in myelodysplastic patients with isolated partial or total loss of chromosome 7. *Leukemia*, *34*(9), 2441–2450. <https://doi.org/10.1038/s41375-020-0728-x>

Čermák, J. (2016). Myelodysplastický syndrom v roce 2016. *Onkologie (Czech Republic)*, *10*(3), 114–119.

Červinek, L. (2015). Myelodysplastický syndrom. *Onkologie*, *9*(3), 112–118. <https://www.onkologiecs.cz/pdfs/xon/2015/03/04.pdf>

da Silva-Coelho, P., Kroeze, L. I., Yoshida, K., Koorenhof-Scheele, T. N., Knops, R., van de Locht, L. T., de Graaf, A. O., Massop, M., Sandmann, S., Dugas, M., Stevens-Kroef, M. J., Cermak, J., Shiraishi, Y., Chiba, K., Tanaka, H., Miyano, S., de Witte, T., Blijlevens, N. M. A., Muus, P., ... Jansen, J. H. (2017). Clonal evolution in myelodysplastic syndromes. *Nature communications*, *8*(1). <https://doi.org/10.1038/ncomms15099>

Daver, N., Konopleva, M., Maiti, A., Kadia, T. M., DiNardo, C. D., Loghavi, S., Pemmaraju, N., Jabbour, E. J., Montalban-Bravo, G., Tang, G., Sasaki, K., Borthakur, G., Yilmaz, M., Alvarez, J., Golez, M., Pierce, S. A., Noguera González, G. M., Ning, J., Abbas, H. A., ... Kantarjian, H. (2021). Phase I/II Study of Azacitidine (AZA) with Venetoclax (VEN) and Magrolimab (Magro) in Patients (pts) with Newly Diagnosed Older/Unfit or High-Risk Acute Myeloid Leukemia (AML) and Relapsed/Refractory (R/R) AML. *Blood*, *138*(Supplement 1), 371–371. <https://doi.org/10.1182/blood-2021-153638>

Demeulemeester, J., Tarabichi, M., Fittal, M., Van Loo, P., Korbel, J., & Campbell, P. (2018). Patterns of clustered mutational processes: pan-cancer analysis of chromothripsis, chromoplexy and kataegis. *ESMO Open*, *3*, A2. <https://doi.org/10.1136/esmoopen-2018-eacr25.4>

Dewhurst, S. M. (2020). Chromothripsis and telomere crisis: engines of genome instability. In *Current Opinion in Genetics and Development* (60), 41–47. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2020.02.009>

- Drevon, L., Marceau, A., Maarek, O., Cuccuini, W., Clappier, E., Eclache, V., Cluzeau, T., Richez, V., Berkaoui, I., Dimicoli-Salazar, S., Bidet, A., Vial, J. P., Park, S., Vieira Dos Santos, C., Kaphan, E., Berthon, C., Stamatoullas, A., Delhommeau, F., Abermil, N., ... Fenaux, P. (2018). Myelodysplastic syndrome (MDS) with isolated trisomy 8: a type of MDS frequently associated with myeloproliferative features? A report by the Groupe Francophone des Myélodysplasies. *British Journal of Haematology*, *182*(6), 843–850. <https://doi.org/10.1111/bjh.15490>
- Ebert, B. L. (2011). Molecular Dissection of the 5q Deletion in Myelodysplastic Syndrome. *Seminars in Oncology*, *38*(5), 621–626. <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2011.04.010>
- Fenech, M., Chang, W. P., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S., & Zeiger, E. (2003). HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, *534*(1–2), 65–75. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(02\)00249-8](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(02)00249-8)
- Feng, Y., Chen, X., Jiang, K., Zhang, D., Tao, F., Ni, D., Zhang, J., Wu, L., Cai, J., Jiang, L., Yu, G. H., & Shi, L. (2021). Secondary myelodysplastic syndromes identified via next-generation sequencing in a non-small cell lung cancer patient. *BMC Medical Genomics*, *14*(1). <https://doi.org/10.1186/s12920-021-01147-y>
- Feurstein, S., Thomay, K., Hofmann, W., Buesche, G., Kreipe, H., Thol, F., Heuser, M., Ganser, A., Schlegelberger, B., & Göhring, G. (2018). Routes of clonal evolution into complex karyotypes in myelodysplastic syndrome patients with 5q deletion. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(10). <https://doi.org/10.3390/ijms19103269>
- Galván, A. B., Mallo, M., Arenillas, L., Salido, M., Espinet, B., Pedro, C., Florensa, L., Serrano, S., & Solé, F. (2010). Does monosomy 5 really exist in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia? *Leukemia Research*, *34*(9), 1242–1245. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2010.03.022>
- Giagounidis, A. A. N., Germing, U., Haase, S., Hildebrandt, B., Schlegelberger, B., Schoch, C., Wilkens, L., Heinsch, M., Willems, H., Aivado, M., & Aul, C. (2004). Clinical, morphological, cytogenetic, and prognostic features of patients with myelodysplastic syndromes and del(5q) including band q31. *Leukemia*, *18*(1), 113–119. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2403189>

Giagounidis, A. A. N., Germing, U., Strupp, C., Hildebrandt, B., Heinsch, M., & Aul, C. (2005). Prognosis of patients with del(5q) MDS and complex karyotype and the possible role of lenalidomide in this patient subgroup. *Annals of Hematology*, *84*(9), 569–571. <https://doi.org/10.1007/s00277-005-1054-0>

Gilbert, F. (1983). A Classification of Chromosome Abnormalities in Cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, *71*(6), 1107–1114.

Göhring, G., Michalova, K., Beverloo, H. B., Betts, D., Harbott, J., Haas, O. A., Kerndrup, G., Sainati, L., Bergstraesser, E., Hasle, H., Starý, J., Trebo, M., van den Heuvel-Eibrink, M. M., Zecca, M., van Wering, E. R., Fischer, A., Noellke, P., Strahm, B., Locatelli, F., ... Schlegelberger, B. (2010). Complex karyotype newly defined: The strongest prognostic factor in advanced childhood myelodysplastic syndrome. *Blood*, *116*(19), 3766–3769. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-04-280313>

Graham, T. A., & Sottoriva, A. (2017). Measuring cancer evolution from the genome. *Journal of Pathology*, *241*(2), 183–191. <https://doi.org/10.1002/path.4821>

Greenberg, P., Cox, C., Lebeau, M. M., Fenaux, P., Morel, P., Sanz, G., Sanz, M., Vallespi, T., Hamblin, T., Oscier, D., Ohyashiki, K., Toyama, K., Aul, C., Mufti, G., & Bennett, J. (1997). International Scoring System for Evaluating Prognosis in Myelodysplastic Syndromes. *Blood*, *89*(6), 2079–2088. <https://doi.org/https://doi.org/10.1182/blood.V89.6.2079>

Greenberg, P. L., Tuechler, H., Schanz, J., Sanz, G., Garcia-Manero, G., Solé, F., Bennett, J. M., Bowen, D., Fenaux, P., Dreyfus, F., Kantarjian, H., Kuendgen, A., Levis, A., Malcovati, L., Cazzola, M., Cermak, J., Fonatsch, C., le Beau, M. M., Slovak, M. L., ... Haase, D. (2012). Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood*, *120*(12), 2454–2465. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-03-420489>

Gurnari, C., Piciocchi, A., Soddu, S., Bonanni, F., Scalzulli, E., Niscola, P., Di Veroli, A., Piccioni, A. L., Piedimonte, M., Maiorana, G., Salutari, P., Cicconi, L., Santopietro, M., Gumenyuk, S., Sarlo, C., Fenu, S., Tafuri, A., Latagliata, R., Fianchi, L., ... Voso, M. T. (2022). Myelodysplastic syndromes with del(5q): A real-life study of determinants of long-term outcomes and response to lenalidomide. *Blood Cancer Journal*, *12*(9). <https://doi.org/10.1038/s41408-022-00724-3>

Gurney, M., Chekkaf, I., He, R., Viswanatha, D. S., Greipp, P., Mangaonkar, A. A., Begna, K., Gangat, N., Patnaik, M. M., Litzow, M. R., Foran, J. M., Badar, T., Shah, M. V., Alkhateeb, H. B., & Al-Kali, A. (2022). Clinical and Molecular Characteristics of ETV6 Mutated Myeloid

Malignancies. *Blood*, 140(Supplement 1), 6912–6914. <https://doi.org/10.1182/blood-2022-170641>

Haase, D. (2008). Cytogenetic features in myelodysplastic syndromes. *Annals of Hematology*, 87(7), 515–526. <https://doi.org/10.1007/s00277-008-0483-y>

Haase, D., Germing, U., Schanz, J., Pfeilstö, M., Nö, T., Hildebrandt, B., Kundgen, A., Lü, M., Kunzmann, R., Giagounidis, A. A. N., Aul, C., Trü Mper, L., Krieger, O., Stauder, R., Mü, T. H., Wimazal, F., Valent, P., Fonatsch, C., & Steidl, C. (2007). New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: evidence from a core dataset of 2124 patients. *Blood*, 110(13), 4385–4395. <https://doi.org/10.1182/blood-2007>

Haase, D., Stevenson, K. E., Neuberg, D., Maciejewski, J. P., Nazha, A., Sekeres, M. A., Ebert, B. L., Garcia-Manero, G., Haferlach, C., Haferlach, T., Kern, W., Ogawa, S., Nagata, Y., Yoshida, K., Graubert, T. A., Walter, M. J., List, A. F., Komrokji, R. S., Padron, E., ... Bejar, R. (2019). TP53 mutation status divides myelodysplastic syndromes with complex karyotypes into distinct prognostic subgroups. *Leukemia*, 33(7), 1747–1758. <https://doi.org/10.1038/s41375-018-0351-2>

Haferlach, T., Nagata, Y., Grossmann, V., Okuno, Y., Bacher, U., Nagae, G., Schnittger, S., Sanada, M., Kon, A., Alpermann, T., Yoshida, K., Roller, A., Nadarajah, N., Shiraishi, Y., Shiozawa, Y., Chiba, K., Tanaka, H., Koefler, H. P., Klein, H. U., ... Ogawa, S. (2014). Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia*, 28(2), 241–247. <https://doi.org/10.1038/leu.2013.336>

Harada, H., & Harada, Y. (2015). Recent advances in myelodysplastic syndromes: Molecular pathogenesis and its implications for targeted therapies. *Cancer Science*, 106(4), 329–336. <https://doi.org/10.1111/cas.12614>

*Harewood, L., & Fraser, P. (2014). The impact of chromosomal rearrangements on regulation of gene expression. *Human Molecular Genetics*, 23(R1). <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu278>

Herry, A., Douet-Guilbert, N., Morel, F., Bris, M. J. Le, & Braekeleer, M. De. (2007). Redefining monosomy 5 by molecular cytogenetics in 23 patients with MDS/AML. *European Journal of Haematology*, 78(6), 457–467. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0609.2007.00847.x>

Heyer, E. E., Deveson, I. W., Wooi, D., Selinger, C. I., Lyons, R. J., Hayes, V. M., O’Toole, S. A., Ballinger, M. L., Gill, D., Thomas, D. M., Mercer, T. R., & Blackburn, J. (2019).

Diagnosis of fusion genes using targeted RNA sequencing. *Nature Communications*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09374-9>

Holland, A. J., & Cleveland, D. W. (2012). Mechanisms and consequences of localized, complex chromosomal rearrangements in cancer and developmental diseases. *Nature Medicine*, 18(11), 1630–1638. <https://doi.org/10.1038/nm.2988.Mechanisms>

Hosono, N., Makishima, H., Mahfouz, R., Przychodzen, B., Yoshida, K., Jerez, A., Laframboise, T., Polprasert, C., Clemente, M. J., Shiraishi, Y., Chiba, K., Tanaka, H., Miyano, S., Sanada, M., Cui, E., Verma, A. K., Mcdevitt, M. A., List, A. F., Saunthararajah, Y., ... Maciejewski, J. P. (2017). Recurrent genetic defects on chromosome 5q in myeloid neoplasms. *Oncotarget*, 8(4), 6483–6495. <https://doi.org/doi:10.18632/oncotarget.14130>

Huber, S., Haferlach, T., Meggendorfer, M., Hutter, S., Hoermann, G., Baer, C., Kern, W., & Haferlach, C. (2022). SF3B1 mutated MDS: Blast count, genetic co-abnormalities and their impact on classification and prognosis. *Leukemia*, 36, 2894–2902. <https://doi.org/10.1038/s41375-022-01728-5>

Chudoba, I., Plesch, A., Lörch, T., Lemke, J., Claussen, U., & Senger, G. (1999). High resolution multicolor-banding: A new technique for refined FISH analysis of human chromosomes. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 84(3–4), 156–160. <https://doi.org/10.1159/000015245>

Ivanov, V., Yeh, S. P., Mayer, J., Saini, L., Unal, A., Boyiadzis, M., Hoffman, D. M., Kang, K., Addo, S. N., Mendes, W. L., & Fathi, A. T. (2022). Design of the VIALE-M phase III trial of venetoclax and oral azacitidine maintenance therapy in acute myeloid leukemia. *Future Oncology*, 18(26), 2879–2889. <https://doi.org/10.2217/fon-2022-0450>

Iyer, R. V., Sait, S. N. J., Matsui, S. I., Block, A. W., Barcos, M., Slack, J. L., Wetzler, M., & Baer, M. R. (2004). Massive hyperdiploidy and tetraploidy in acute myelocytic leukemia and myelodysplastic syndrome. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 148(1), 29–34. [https://doi.org/10.1016/S0165-4608\(03\)00214-0](https://doi.org/10.1016/S0165-4608(03)00214-0)

Jaffe, E. S., Harris, N., Jä, E., Diebold, J., Flandrin, G., Müller-Hermelink, H., Vardiman, J., Lister, T., & Bloom, C. (2000). The World Health Organization Classification of Neoplasms of the Hematopoietic and Lymphoid Tissues: Report of the Clinical Advisory Committee Meeting. *The Hematology Journal*, 1, 53–66. <https://doi.org/10.1038/sj/thj/6200013>

Jaiswal, S., Fontanillas, P., Flannick, J., Manning, A., Grauman, P. V., Mar, B. G., Lindsley, R. C., Mermel, C. H., Burt, N., Chavez, A., Higgins, J. M., Moltchanov, V., Kuo, F. C., Kluk, M. J., Henderson, B., Kinnunen, L., Koistinen, H. A., Ladenvall, C., Getz, G., ... Ebert, B. L. (2014). Age-Related Clonal Hematopoiesis Associated with Adverse Outcomes. *New England Journal of Medicine*, 371(26), 2488–2498. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1408617>

Jasek, M., Gondek, L. P., Bejanyan, N., Tiu, R., Huh, J., Theil, K. S., O’Keefe, C., McDevitt, M. A., & Maciejewski, J. P. (2010). TP53 mutations in myeloid malignancies are either homozygous or hemizygous due to copy number-neutral loss of heterozygosity or deletion of 17p. *Leukemia*, 24(1), 216–219. <https://doi.org/10.1038/leu.2009.189>

Jerez, A., Gondek, L. P., Jankowska, A. M., Makishima, H., Przychodzen, B., Tiu, R. V., O’Keefe, C. L., Mohamedali, A. M., Batista, D., Sekeres, M. A., McDevitt, M. A., Mufti, G. J., & Maciejewski, J. P. (2012). Topography, clinical, and genomic correlates of 5q myeloid malignancies revisited. *Journal of Clinical Oncology*, 30(12), 1343–1349. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.36.1824>

Jerez, A., Sugimoto, Y., Makishima, H., Verma, A., Jankowska, A. M., Przychodzen, B., Visconte, V., Tiu, R. v., O’Keefe, C. L., Mohamedali, A. M., Kulasekararaj, A. G., Pellagatti, A., McGraw, K., Muramatsu, H., Moliterno, A. R., Sekeres, M. A., McDevitt, M. A., Kojima, S., List, A., ... Maciejewski, J. P. (2012). Loss of heterozygosity in 7q myeloid disorders: Clinical associations and genomic pathogenesis. *Blood*, 119(25), 6109–6117. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-12-397620>

Jiang, Y., Wang, T., Sheng, D., Han, C., Xu, T., Zhang, P., You, W., Fan, W., Zhang, Z., Jin, T., Duan, X., Yuan, X., Liu, X., Zhang, K., Ruan, K., Shi, J., Guo, J., Cheng, A., & Yang, Z. (2022). Aurora A-mediated pyruvate kinase M2 phosphorylation promotes biosynthesis with glycolytic metabolites and tumor cell cycle progression. *Journal of Biological Chemistry*, 298(11). <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.102561>

*Jonášová, A. (2013). Myelodysplastický syndrom - pokrok v léčbě v 21. století. *Vnitřní lékařství*, 59(7), 635–640. https://casopisvnitrnilekarstvi.cz/artkey/vnl-201307-0020_myelodysplastic-syndromes-therapy-progress-over-the-last-two-decades.php

Jones, M. J. K., & Jallepalli, P. V. (2012). Chromothripsis: Chromosomes in Crisis. *Developmental Cell*, 23(5), 908–917. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2012.10.010>

Karantanos, T., Gondek, L. P., Varadhan, R., Moliterno, A. R., DeZern, A. E., Jones, R. J., & Jain, T. (2021). Gender-related differences in the outcomes and genomic landscape of patients

with myelodysplastic syndrome/myeloproliferative neoplasm overlap syndromes. *British Journal of Haematology*, 193(6), 1142–1150. <https://doi.org/10.1111/bjh.17534>

Keel, S. B., Scott, A., Bonilla, M. S., Ho, P. A., Gulsuner, S., Pritchard, C. C., Abkowitz, J. L., King, M. C., Walsh, T., & Shimamura, A. (2016). Genetic features of myelodysplastic syndrome and aplastic anemia in pediatric and young adult patients. *Haematologica*, 101(11), 1343–1350. <https://doi.org/10.3324/haematol.2016.149476>

Keuper, K., Wieland, A., Räsche, M., & Storchova, Z. (2021). Processes shaping cancer genomes – From mitotic defects to chromosomal rearrangements. *DNA Repair*, 107, 103207. <https://doi.org/10.1016/J.DNAREP.2021.103207>

Khoury, J. D., Solary, E., Abla, O., Akkari, Y., Alaggio, R., Apperley, J. F., Bejar, R., Berti, E., Busque, L., Chan, J. K. C., Chen, W., Chen, X., Chng, W. J., Choi, J. K., Colmenero, I., Coupland, S. E., Cross, N. C. P., De Jong, D., Elghetany, M. T., ... Hochhaus, A. (2022). The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. *Leukemia*, 36(7), 1703–1719. <https://doi.org/10.1038/s41375-022-01613-1>

Kitajima, T. S., Ohsugi, M., & Ellenberg, J. (2011). Complete kinetochore tracking reveals error-prone homologous chromosome biorientation in mammalian oocytes. *Cell*, 146(4), 568–581. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.07.031>

Knudson, A. G. (1971). *Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma*. 68(4), 820–823. <https://doi.org/10.1073/pnas.68.4.820>

Koche, R. P., Rodriguez-Fos, E., Helmsauer, K., Burkert, M., MacArthur, I. C., Maag, J., Chamorro, R., Munoz-Perez, N., Puiggròs, M., Dorado Garcia, H., Bei, Y., Röefzaad, C., Bardinet, V., Szymansky, A., Winkler, A., Thole, T., Timme, N., Kasack, K., Fuchs, S., ... Henssen, A. G. (2020). Extrachromosomal circular DNA drives oncogenic genome remodeling in neuroblastoma. *Nature Genetics*, 52(1), 29–34. <https://doi.org/10.1038/s41588-019-0547-z>

Koltsova, A. S., Pendina, A. A., Efimova, O. A., Chiryaeva, O. G., Kuznetzova, T. V., & Baranov, V. S. (2019). On the complexity of mechanisms and consequences of chromothripsis: An update. *Frontiers in Genetics*, 10(APR). <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00393>

Kumar, A. (2020, květen 17). *Trends | FISH: Fluorescence In Situ Hybridization | Clinical Lab Manager*. <https://www.clinicallabmanager.com/trends/fluorescence-in-situ-hybridization/fish-fluorescence-in-situ-hybridization-22054>

- Kunimoto, H., & Nakajima, H. (2021). TET2: A cornerstone in normal and malignant hematopoiesis. *Cancer Science*, *112*(1), 31–40. <https://doi.org/10.1111/cas.14688>
- L'Abbate, A., Macchia, G., D'Addabbo, P., Lonoce, A., Tolomeo, D., Trombetta, D., Kok, K., Bartenhagen, C., Whelan, C. W., Palumbo, O., Severgnini, M., Cifola, I., Dugas, M., Carella, M., de Bellis, G., Rocchi, M., Carbone, L., & Storlazzi, C. T. (2014). Genomic organization and evolution of double minutes/homogeneously staining regions with MYC amplification in human cancer. *Nucleic Acids Research*, *42*(14), 9131–9145. <https://doi.org/10.1093/nar/gku590>
- Lafage-Pochitaloff, M., Gerby, B., Baccini, V., Largeaud, L., Fregona, V., Prade, N., Juvin, P. Y., Jamrog, L., Bories, P., Hebrard, S., Lagarde, S., Mansat-De Mas, V., Dovey, O. M., Yusa, K., Vassiliou, G. S., Jansen, J. H., Tekath, T., Rombaut, D., Ameye, G., ... Delabesse, E. (2022). The CADM1 tumor suppressor gene is a major candidate gene in MDS with deletion of the long arm of chromosome 11. *Blood Advances*, *6*(2), 386–398. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2021005311>
- Lakshmi, D., & Girisha, M. (2020). Genomic Testing for Diagnosis of Genetic Disorders in Children: Chromosomal Microarray and Next-Generation Sequencing. *INDIAN PEDIATRICS*, *57*, 549–556.
- Lassus, H., Staff, S., Leminen, A., Isola, J., & Butzow, R. (2011). Aurora-A overexpression and aneuploidy predict poor outcome in serous ovarian carcinoma. *Gynecologic Oncology*, *120*(1), 11–17. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2010.09.003>
- Le Beau, M. M., Espinosa Iii, R., Neuman, W. L., Stock, W., Roulston, D., Larson, R. A., Keinanen, M., & Westbrook, C. A. (1993). *Cytogenetic and molecular delineation of the smallest commonly deleted region of chromosome 5 in malignant myeloid diseases (myeloid leukemias/tumor-suppressor genes/fluorescence in situ hybridization/therapy-related leukemia)*. *90*, 5484–5488. <https://www.pnas.org>
- Lee, J. hoon, List, A., & Sallman, D. A. (2019). Molecular pathogenesis of myelodysplastic syndromes with deletion 5q. *European Journal of Hematology*, *102*(3), 203–209. <https://doi.org/10.1111/ejh.13207>
- Levine, M. S., Bakker, B., Boeckx, B., Moyett, J., Lu, J., Vitre, B., Spierings, D. C., Lansdorp, P. M., Cleveland, D. W., Lambrechts, D., Foijer, F., & Holland, A. J. (2017). Centrosome Amplification Is Sufficient to Promote Spontaneous Tumorigenesis in Mammals. *Developmental Cell*, *40*(3), 313–322.e5. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2016.12.022>

- Liquori, A., Lesende, I., Palomo, L., Avetisyan, G., Ibáñez, M., González-Romero, E., Boluda-Navarro, M., Morote-Faubel, M., Garcia-Ruiz, C., Martinez-Valiente, C., Santiago-Balsera, M., Gomez-Seguí, I., Sanjuan-Pla, A., Sanz, M. A., Sanz, G., Solé, F., Such, E., & Cervera, J. (2021). A single-run next-generation sequencing (Ngs) assay for the simultaneous detection of both gene mutations and large chromosomal abnormalities in patients with myelodysplastic syndromes (mds) and related myeloid neoplasms. *Cancers*, *13*(8). <https://doi.org/10.3390/cancers13081947>
- Liu, P., Erez, A., Nagamani, S. C. S., Dhar, S. U., Kołodziejska, K. E., Dharmadhikari, A. v., Cooper, M. L., Wiszniewska, J., Zhang, F., Withers, M. A., Bacino, C. A., Campos-Acevedo, L. D., Delgado, M. R., Freedenberg, D., Garnica, A., Grebe, T. A., Hernández-Almaguer, D., Immken, L., Lalani, S. R., ... Bi, W. (2011). Chromosome catastrophes involve replication mechanisms generating complex genomic rearrangements. *Cell*, *146*(6), 889–903. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.07.042>
- Liu, S., Kwon, M., Mannino, M., Yang, N., Renda, F., Khodjakov, A., & Pellman, D. (2018). Nuclear envelope assembly defects link mitotic errors to chromothripsis. *Nature*, *561*(7724), 551–555. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0534-z>
- Ly, P., & Cleveland, D. W. (2017). Rebuilding Chromosomes After Catastrophe: Emerging Mechanisms of Chromothripsis. *Trends in Cell Biology*, *27*(12), 917–930. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2017.08.005>
- Ma, Y., Cui, W., Yang, J., Qu, J., Di, C., Amin, H. M., Lai, R., Ritz, J., Krause, D. S., & Chai, L. (2006). SALL4, a novel oncogene, is constitutively expressed in human acute myeloid leukemia (AML) and induces AML in transgenic mice. *Blood*, *108*(8), 2726–2735. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-02-001594>
- Maciejowski, J., Li, Y., Bosco, N., Campbell, P. J., & Titia de Lange. (2015). Chromothripsis and kataegis induced by telomere crisis. *Cell*, *176*(10), 1641–1654. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040>
- Maděrková Tozzi, M., Dvořák, V., Klásková, E., Šuláková, S., Wita, M., Hálek, J., Vrtěl, R., Curtisová, V., Pilka, R., Dušek, L., & Ľubušký, M. (2022). Screening for congenital defects and genetic diseases of the fetus at University Hospital in Olomouc and sending/reporting to the National register of reproductive health in the Czech Republic. *Ceska Gynekologie*, *87*(3), 162–172. <https://doi.org/10.48095/cccg2022162>

- Maher, C. A., & Wilson, R. K. (2012). Chromothripsis and human disease: Piecing together the shattering process. *Cell*, *148*(1–2), 29–32. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.006>
- Mallo, M., Cervera, J., Schanz, J., Such, E., García-Manero, G., Lño, E., Steidl, C., Espinet, B., Vallespí, T., Germing, U., Blum, S., Ohyashiki, K., Grau, J., Pfeilstöcker, M., Hernández, J. M., Noesslinger, T., Giagounidis, A., Aul, C., Calasanz, M. J., ... Solé, F. (2011). Impact of adjunct cytogenetic abnormalities for prognostic stratification in patients with myelodysplastic syndrome and deletion 5q. *Leukemia*, *25*(1), 110–120. <https://doi.org/10.1038/leu.2010.231>
- Mangan, J. K., Ajmal, I., Frey, N. V., Hexner, E. O., Loren, A. W., Carroll, M., & Luger, S. M. (2019). A Pilot Study of Exjade (Deferasirox) As Monotherapy in Higher Risk MDS or Acute Myeloid Leukemia. *Blood*, *134*(Supplement_1), 5155–5155. <https://doi.org/10.1182/blood-2019-131668>
- Mansfield, A. S., Peikert, T., Smadbeck, J. B., Udell, J. B. M., Garcia-Rivera, E., Elsbernd, L., Erskine, C. L., van Keulen, V. P., Kosari, F., Murphy, S. J., Ren, H., Serla, V. v., Schaefer Klein, J. L., Karagouga, G., Harris, F. R., Sosa, C., Johnson, S. H., Nevala, W., Markovic, S. N., ... Vasmatazis, G. (2019). Neoantigenic Potential of Complex Chromosomal Rearrangements in Mesothelioma. *Journal of Thoracic Oncology*, *14*(2), 276–287. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2018.10.001>
- McClintock, B. (1941). The Stability of Broken Ends of Chromosomes in Zea Mays. *Genetics*, *26*(2), 234–282. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17247004>
- McGowan-Jordan, J., Hastings, R. J., & Moore, S. (2020). *ISCN 2020: An International System for Human Cytogenomic Nomenclature (2020)*. Reprint Of: *Cytogenetic and Genome Research 2020, Vol. 160, No. 7-8*. DOI: 10.1159/00510090
- McGowan-Jordan, J., Hastings, R. J., Moore, S., & GmbH, S. K. (2020). *ISCN 2020 an International System for Human Cytogenomic Nomenclature (2020) : recommendations of the International Standing Committee on Human Cytogenomic Nomenclature including revised sequence-based cytogenomic nomenclature developed in collaboration wi.*
- McMahon, C. M., Ferng, T., Canaani, J., Wang, E. S., Morrissette, J. J. D., Eastburn, D. J., Pellegrino, M., Durruthy-Durruthy, R., Watt, C. D., Asthana, S., Lasater, E. A., Defilippis, R., Peretz, C. A. C., McGary, L. H. F., Deihimi, S., Logan, A. C., Luger, S. M., Shah, N. P., Carroll, M., ... Perl, A. E. (2019). Clonal selection with RAS pathway activation mediates secondary clinical resistance to selective FLT3 inhibition in acute myeloid leukemia. *Cancer Discovery*, *9*(8), 1050–1063. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-18-1453>

Meggendorfer, M., Albuquerque, A. De, Nadarajah, N., Alpermann, T., Kern, W., Steuer, K., Perglerová, K., Erlach, C., Schnittger, S., & Haferlach, T. (2015). Karyotype evolution and acquisition of FLT3 or RAS pathway alterations drive progression of myelodysplastic syndrome to acute myeloid leukemia. *Haematologica*, *100*(12), e487–e490. <https://doi.org/10.3324/haematol.2015.127985>

*Menssen, A. J., & Walter, M. J. (2020). Genetics of progression from MDS to secondary leukemia. *Blood*, *136*(1), 50–60. <https://doi.org/10.1182/blood.2019000942>

Merkel, D. G., Avigdor, A., Nagler, A., Benjamini, O., Davidovitz, Y., & Goitein, O. (2019). Assessment By MRI T2* of Iron Accumulation and Removal in Transfusion Dependent MDS Patients. *Blood*, *134*(Supplement_1), 5432–5432. <https://doi.org/10.1182/blood-2019-125279>

Mitev, L. (2021). Evidence of two different molecular mechanisms as a consequence of an isolated 20q- abnormality in a case of multiple myeloma accompanied with myelodysplastic syndrome. *Leukemia Research Reports*, *16*. <https://doi.org/10.1016/j.lrr.2021.100273>

Morel, P., Hebbar, M., Lai, J. L., Duhamel, A., Preudhomme, C., Wattel, E., Bauters, F., & Fenaux, P. (1993). Cytogenetic analysis has strong independent prognostic value in de novo myelodysplastic syndromes and can be incorporated in a new scoring system: a report on 408 cases. *Leukemia*, *7*(9), 1315–1323. <https://europepmc.org/article/med/8371581>

Morishita, M., Muramatsu, T., Suto, Y., Hirai, M., Konishi, T., Hayashi, S., Shigemizu, D., Tsunoda, T., Moriyama, K., & Inazawa, J. (2016). Chromothripsis-like chromosomal rearrangements induced by ionizing radiation using proton microbeam Irradiation system. *Oncotarget*, *7*(9), 10182–10192. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7186>

Mrózek, K., Eisfeld, A. K., Kohlschmidt, J., Carroll, A. J., Walker, C. J., Nicolet, D., Blachly, J. S., Bill, M., Papaioannou, D., Wang, E. S., Uy, G. L., Kolitz, J. E., Powell, B. L., Blum, W., Stone, R. M., Byrd, J. C., & Bloomfield, C. D. (2019). Complex karyotype in de novo acute myeloid leukemia: typical and atypical subtypes differ molecularly and clinically. *Leukemia*, *33*(7), 1620–1634. <https://doi.org/10.1038/s41375-019-0390-3>

Nakazawa, H., Yamaguchi, T., Sakai, H., Maruyama, M., Kawakami, T., Kawakami, F., Nishina, S., Ishikawa, M., Kosho, T., & Ishida, F. (2021). A novel germline GATA2 frameshift mutation with a premature stop codon in a family with congenital sensory hearing loss and myelodysplastic syndrome. *International Journal of Hematology*, *114*(2), 286–291. <https://doi.org/10.1007/s12185-021-03130-w>

- Neukirchen, J., Lauseker, M., Hildebrandt, B., Nolting, A. C., Kaivers, J., Kobbe, G., Gattermann, N., Haas, R., & Germing, U. (2017). Cytogenetic clonal evolution in myelodysplastic syndromes is associated with inferior prognosis. *Cancer*, *123*(23), 4608–4616. <https://doi.org/10.1002/cncr.30917>
- Neukirchen, J., Schoonen, W. M., Strupp, C., Gattermann, N., Aul, C., Haas, R., & Germing, U. (2011). Incidence and prevalence of myelodysplastic syndromes: Data from the Düsseldorf MDS-registry. *Leukemia Research*, *35*(12), 1591–1596. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2011.06.001>
- Nevill, T. J., Fung, H. C., Shepherd, J. D., Horsman, D. E., Nantel, S. H., Klingemann, H.-G., Forrest, D. L., Toze, C. L., Sutherland, H. J., Hogge, D. E., Naiman, S. C., Le, A., Brockington, D. A., & Barnett, M. J. (1998). Cytogenetic Abnormalities in Primary Myelodysplastic Syndrome Are Highly Predictive of Outcome After Allogeneic Bone Marrow Transplantation. *Blood*, *92*(6), 1910–1917.
- Nijhawan, D., Zack, T. I., Ren, Y., Strickland, M. R., Lamothe, R., Schumacher, S. E., Tsherniak, A., Besche, H. C., Rosenbluh, J., Shehata, S., Cowley, G. S., Weir, B. A., Goldberg, A. L., Mesirov, J. P., Root, D. E., Bhatia, S. N., Beroukhi, R., & Hahn, W. C. (2012). Cancer vulnerabilities unveiled by genomic loss. *Cell*, *150*(4), 842–854. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.07.023>
- Nofrini, V., la Starza, R., Crescenzi, B., Pierini, V., Barba, G., & Mecucci, C. (2012). Different boundaries characterize isolated and non-isolated 5q deletions in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemias. *Haematologica*, *97*(5), 792–794. <https://doi.org/10.3324/haematol.2011.060111>
- Novák, J., Lauermannová, M., & Vydra, J. (2021). *Hematologie v kostce*. Mladá fronta.
- Nowell, P. C. (1976). The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*, *194*(4260), 23–28. <https://doi.org/10.1126/science.959840>
- Ogawa, S. (2019). Review Series MYELODYSPLASTIC SYNDROMES Genetics of MDS. *Blood*, *133*(10), 1049–1059. <https://doi.org/https://doi.org/10.1182/blood-2018-10-844621>
- Ok, C. Y., Patel, K. P., Garcia-Manero, G., Routbort, M. J., Peng, J., Tang, G., Goswami, M., Young, K. H., Singh, R., Medeiros, L. J., Kantarjian, H. M., Luthra, R., & Wang, S. A. (2015). TP53 mutation characteristics in therapy-related myelodysplastic syndromes and acute

myeloid leukemia is similar to de novo diseases. *Journal of Hematology and Oncology*, 8(1). <https://doi.org/10.1186/s13045-015-0139-z>

Ono, T., Terada, F., Okumura, M., Chihara, T., & Hamao, K. (2020). Impairment of cytokinesis by cancer-associated DAPK3 mutations. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 533(4), 1095–1101. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.09.078>

Oobatake, Y., & Shimizu, N. (2020). Double-strand breakage in the extrachromosomal double minutes triggers their aggregation in the nucleus, micronucleation, and morphological transformation. *Genes Chromosomes and Cancer*, 59(3), 133–143. <https://doi.org/10.1002/gcc.22810>

Østgård, L. S. G., Medeiros, B. C., Sengeløv, H., Nørgaard, M., Andersen, M. K., Dufva, I., Friis, L. S., Kjeldsen, E., Marcher, C. W., Preiss, B., Severinsen, M., & Nørgaard, J. M. (2015). Epidemiology and clinical significance of secondary and therapy-related acute myeloid leukemia: A national population-based cohort study. *Journal of Clinical Oncology*, 33(31), 3641–3649. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.60.0890>

Ouseph, M. M., Hasserjian, R. P., Dal Cin, P., Lovitch, S. B., Steensma, D. P., Nardi, V., & Weinberg, O. K. (2021). Genomic alterations in patients with somatic loss of the Y chromosome as the sole cytogenetic finding in bone marrow cells. *Haematologica*, 106(2), 555–564. <https://doi.org/10.3324/haematol.2019.240689>

Papaemmanuil, E., Gerstung, M., Malcovati, L., Tauro, S., Gundem, G., Loo, P. van, Yoon, C. J., Ellis, P., Wedge, D. C., Pellagatti, A., Shlien, A., Groves, M. J., Forbes, S. A., Raine, K., Hinton, J., Mudie, L. J., McLaren, S., Hardy, C., Latimer, C., ... Campbell, P. J. (2013). Prepublished online as Blood First Edition paper. *BLOOD*, 122, 22. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-08>

Parker, M., Mohankumar, K. M., Punchihewa, C., Weinlich, R., Dalton, J. D., Li, Y., Lee, R., Tatevossian, R. G., Phoenix, T. N., Thiruvengatam, R., White, E., Tang, B., Orisme, W., Gupta, K., Rusch, M., Chen, X., Li, Y., Nagahawhatte, P., Hedlund, E., ... Gilbertson, R. J. (2014). C11orf95-RELA fusions drive oncogenic NF-κB signalling in ependymoma. *Nature*, 506(7489), 451–455. <https://doi.org/10.1038/nature13109>

Platzbecker, U., Bräulke, F., Kündgen, A., Götze, K., Bug, G., Schönefeldt, C., Shirneshan, K., Röllig, C., Bornhäuser, M., Naumann, R., Neesen, J., Giagounidis, A., Hofmann, W. K., Ehninger, G., Germing, U., Haase, D., & Wermke, M. (2013). Sequential combination of azacitidine and lenalidomide in del(5q) higher-risk myelodysplastic syndromes or acute

myeloid leukemia: A phase i study. *Leukemia*, 27(6), 1403–1407.
<https://doi.org/10.1038/leu.2013.26>

Podlipnik, S., Guijarro, F., Combalia, A., To-Figueras, J., Badenas, C., Costa, D., Rozman, M., Jorge, S., Aguilera, P., & Gaya, A. (2018). Acquired erythropoietic uroporphyrin secondary to myelodysplastic syndrome with chromosome 3 alterations: a case report. *British Journal of Dermatology*, 179(2), 486–490. <https://doi.org/10.1111/bjd.15927>

Rack, K. A., van den Berg, E., Haferlach, C., Beverloo, H. B., Costa, D., Espinet, B., Foot, N., Jeffries, S., Martin, K., O'Connor, S., Schoumans, J., Talley, P., Telford, N., Stioui, S., Zemanova, Z., & Hastings, R. J. (2019). European recommendations and quality assurance for cytogenomic analysis of haematological neoplasms. *Leukemia*, 33(8), 1851–1867. <https://doi.org/10.1038/s41375-019-0378-z>

Rasnic, R., & Linial, M. (2021). Chromoanagenesis landscape in 10,000 tcga patients. *Cancers*, 13(16). <https://doi.org/10.3390/cancers13164197>

Ratnaparkhe, M., Hlevnjak, M., Kolb, T., Jauch, A., Maass, K. K., Devens, F., Rode, A., Hovestadt, V., Korshunov, A., Pastorczak, A., Mlynarski, W., Sungalee, S., Korbel, J., Hoell, J., Fischer, U., Milde, T., Kramm, C., Nathrath, M., Chrzanowska, K., ... Ernst, A. (2017). Genomic profiling of Acute lymphoblastic leukemia in ataxia telangiectasia patients reveals tight link between ATM mutations and chromothripsis. *Leukemia*, 31(10), 2048–2056. <https://doi.org/10.1038/leu.2017.55>

Ravindran, A., He, R., Ketterling, R. P., Jawad, M. D., Chen, D., Oliveira, J. L., Nguyen, P. L., Viswanatha, D. S., Reichard, K. K., Hoyer, J. D., Go, R. S., & Shi, M. (2020). The significance of genetic mutations and their prognostic impact on patients with incidental finding of isolated del(20q) in bone marrow without morphologic evidence of a myeloid neoplasm. *Blood Cancer Journal*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41408-020-0275-8>

Rode, A., Maass, K. K., Willmund, K. V., Lichter, P., & Ernst, A. (2016). Chromothripsis in cancer cells: An update. *International Journal of Cancer*, 138(10), 2322–2333. <https://doi.org/10.1002/ijc.29888>

Rosswog, C., Bartenhagen, C., Welte, A., Kahlert, Y., Hemstedt, N., Lorenz, W., Cartolano, M., Ackermann, S., Perner, S., Vogel, W., Altmüller, J., Nürnberg, P., Hertwig, F., Göhring, G., Lilienweiss, E., Stütz, A. M., Korbel, J. O., Thomas, R. K., Peifer, M., & Fischer, M. (2021). Chromothripsis followed by circular recombination drives oncogene amplification in

human cancer. *Nature Genetics*, 53(12), 1673–1685. <https://doi.org/10.1038/s41588-021-00951-7>

Rücker, F. G., Bullinger, L., Schwaenen, C., Lipka, D. B., Wessendorf, S., Fröhling, S., Bentz, M., Miller, S., Scholl, C., Schlenk, R. F., Radlwimmer, B., Kestler, H. A., Pollack, J. R., Lichter, P., Döhner, K., & Döhner, H. (2006). Disclosure of candidate genes in acute myeloid leukemia with complex karyotypes using microarray-based molecular characterization. *Journal of Clinical Oncology*, 24(24), 3887–3894. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.04.5450>

Rücker, F. G., Dolnik, A., Blätte, T. J., Teleanu, V., Ernst, A., Thol, F., Heuser, M., Ganser, A., Döhner, H., Döhner, K., & Bullinger, L. (2018). *Chromothripsis is linked to TP53 alteration, cell cycle impairment, and dismal outcome in acute myeloid leukemia with complex karyotype*. <https://doi.org/10.3324/haematol.2017.180497>

Sarova, I., Brezinova, J., Zemanova, Z., Bystricka, D., Krejcik, Z., Soukup, P., Vydra, J., Cermak, J., Jonasova, A., & Michalova, K. (2013). Characterization of chromosome 11 breakpoints and the areas of deletion and amplification in patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia. *Genes Chromosomes and Cancer*, 52(7), 619–635. <https://doi.org/10.1002/gcc.22058>

Sasi, R., Senft, J., Spruill, M., Barua, S., Dougaparsad, S., Vos, J. A., & Perrotta, P. L. (2022). A treatment-refractory aggressive MDS-MLD with multiple highly complex chromosome 5 intrachromosomal rearrangements: a case report. *Molecular Cytogenetics*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/s13039-022-00630-0>

Seabright, M. (1971). A RAPID BANDING TECHNIQUE FOR HUMAN CHROMOSOMES. *The Lancet*, 298(7731), 971–972. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(71\)90287-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(71)90287-X)

*Shahjehani, M., Hadad, E. H., Azizidoost, S., Nezhad, K. C., & Shahrabi, S. (2019). Complex karyotype in myelodysplastic syndromes: Diagnostic procedure and prognostic susceptibility. *Oncology Reviews*, 13(1), 30–36. <https://doi.org/10.4081/oncol.2019.389>

Shaikh, N., Mazzagatti, A., De Angelis, S., Johnson, S. C., Bakker, B., Spierings, D. C. J., Wardenaar, R., Maniati, E., Wang, J., Boemo, M. A., Foijer, F., & McClelland, S. E. (2022). Replication stress generates distinctive landscapes of DNA copy number alterations and chromosome scale losses. *Genome Biology*, 23(1). <https://doi.org/10.1186/s13059-022-02781-0>

0

Shindo, N., Otsuki, M., Uchida, K. S. K., & Hirota, T. (2021). Prolonged mitosis causes separate deregulation and chromosome nondisjunction. *Cell Reports*, 34(3). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108652>

Shiseki, M., Ishii, M., Okada, M., Ohwashi, M., Wang, Y. H., Osanai, S., Yoshinaga, K., Mori, N., Motoji, T., & Tanaka, J. (2019). Expression analysis of genes located within the common deleted region of del(20q) in patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia Research*, 84. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2019.106175>

Shoshani, O., Brunner, S. F., Yaeger, R., Ly, P., Nechemia-Arbely, Y., Kim, D. H., Fang, R., Castillon, G. A., Yu, M., Li, J. S. Z., Sun, Y., Ellisman, M. H., Ren, B., Campbell, P. J., & Cleveland, D. W. (2021). Chromothripsis drives the evolution of gene amplification in cancer. *Nature*, 591(7848), 137–141. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-03064-z>

Schanz, J., Cevik, N., Fonatsch, C., Braulke, F., Shirneshan, K., Bacher, U., & Haase, D. (2018). Detailed analysis of clonal evolution and cytogenetic evolution patterns in patients with myelodysplastic syndromes (MDS) and related myeloid disorders. *Blood Cancer Journal*, 8(3). <https://doi.org/10.1038/s41408-018-0061-z>

Schanz, J., Solé, F., Mallo, M., Luño, E., Cervera, J., Granada, I., Hildebrandt, B., Slovak, M. L., Ohyashiki, K., Fonatsch, C., Pfeilstöcker, M., Nösslinger, T., Valent, P., Giagounidis, A., Aul, C., Lübbert, M., Stauder, R., Krieger, O., le Beau, M. M., ... Haase, D. (2018). Clonal architecture in patients with myelodysplastic syndromes and double or minor complex abnormalities: Detailed analysis of clonal composition, involved abnormalities, and prognostic significance. *Genes Chromosomes and Cancer*, 57(11), 547–556. <https://doi.org/10.1002/gcc.22667>

Schanz, J., Steidl, C., Fonatsch, C., Pfeilstöcker, M., Nösslinger, T., Tuechler, H., Valent, P., Hildebrandt, B., Giagounidis, A., Aul, C., Lübbert, M., Stauder, R., Krieger, O., Garcia-Manero, G., Kantarjian, H., Germing, U., Haase, D., & Estey, E. (2011). Coalesced multicentric analysis of 2,351 patients with myelodysplastic syndromes indicates an underestimation of poor-risk cytogenetics of myelodysplastic syndromes in the International Prognostic Scoring System. *Journal of Clinical Oncology*, 29(15), 1963–1970. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.28.3978>

Schanz, J., Tuechler, H., Solé, F., Mallo, M., Hildebrandt, B., Slovak, M. L., Ohyashiki, K., Steidl, C., Fonatsch, C., Pfeilstoecker, M., Noesslinger, T., Valent, P., Giagounidis, A., Luebbert, M., Stauder, R., Krieger, O., Le Beau, M. M., Bennett, J. M., Greenberg, P. L., ...

Haase, D. (2009). Cytogenetic Risk Features in MDS-Update and Present State. *Blood*, *114*(22), 2772–2772. <https://doi.org/10.1182/blood.v114.22.2772.2772>

Schanz, J., Tüchler, H., Solé, F., Mallo, M., Luño, E., Cervera, J., Granada, I., Hildebrandt, B., Slovak, M. L., Ohyashiki, K., Steidl, C., Fonatsch, C., Pfeilstöcker, M., Nösslinger, T., Valent, P., Giagounidis, A., Aul, C., Lübbert, M., Stauder, R., ... Haase, D. (2012). New comprehensive cytogenetic scoring system for primary myelodysplastic syndromes (MDS) and oligoblastic acute myeloid leukemia after MDS derived from an international database merge. *Journal of Clinical Oncology*, *30*(8), 820–829. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.35.6394>

Schoch, C., Haferlach, T., Haase, D., Fonatsch, C., Löffler, H., Schlegelberger, B., Staib, P., Sauerland, M. C., Heinecke, A., Büchner, T., & Hiddemann, W. (2001). Patients with de novo acute myeloid leukaemia and complex karyotype aberrations show a poor prognosis despite intensive treatment: A study of 90 patients. *British Journal of Haematology*, *112*(1), 118–126. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.2001.02511.x>

Schütze, D. M., Krijgsman, O., Snijders, P. J. F., Ylstra, B., Weischenfeldt, J., Mardin, B. R., Stütz, A. M., Korbel, J. O., de Winter, J. P., Meijer, C. J. L. M., Quint, W. G. v, Bosch, L., Wilting, S. M., & Steenbergen, R. D. M. (2016). Immortalization capacity of HPV types is inversely related to chromosomal instability. *Oncotarget*, *7*(25), 37608–37621. www.impactjournals.com/oncotarget

Simon, L., Spinella, J.-F., Yao, C.-Y., Lavalí, V.-P., Boivin, I., Eve Boucher, G., Audemard, E., Bordeleau, M.-E., Ebastien Lemieux, S. ', Josée, J. J., Ebert, H. ', & Sauvageau, G. (2020). High frequency of germline RUNX1 mutations in patients with RUNX1-mutated AML. *Blood*, *135*(21), 1882–1886. <https://doi.org/10.1182/blood.2019003357>

Singh, Z. N., Richards, S., El Chaer, F., Duong, V. H., Gudipati, M. A., Waters, E. O., Koon, S., Webley, M., Pitel, B., Hoppman, N. L., Baer, M. R., & Zou, Y. S. (2019). Cryptic ETV6–PDGFRB fusion in a highly complex rearrangement of chromosomes 1, 5, and 12 due to a chromothripsis-like event in a myelodysplastic syndrome/myeloproliferative neoplasm. *Leukemia and Lymphoma*, *60*(5), 1304–1307. <https://doi.org/10.1080/10428194.2018.1480774>

Smith, S. M., Le Beau, M. M., Huo, D., Karrison, T., Sobecks, R. M., Anastasi, J., Vardiman, J. W., Rowley, J. D., & Larson, R. A. (2003). Clinical-cytogenetic associations in 306 patients with therapy-related myelodysplasia and myeloid leukemia: The University of Chicago series. *Blood*, *102*(1), 43–52. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-11-3343>

- Solinas-Toldo, S., Lampel, S., Stilgenbauer, S., Nickolenko, J., Benner, A., Dö, H., Cremer, T., & Lichter, P. (1997). Matrix-Based Comparative Genomic Hybridization: Biochips to Screen for Genomic Imbalances. *Genes Chromosomes Cancer*, *20*, 399–407.
- Soto, M., García-Santisteban, I., Krenning, L., Medema, R. H., & Raaijmakers, J. A. (2018). Chromosomes trapped in micronuclei are liable to segregation errors. *Journal of Cell Science*, *131*(13). <https://doi.org/10.1242/JCS.214742>
- Sperling, A. S., Gibson, C. J., & Ebert, B. L. (2017). The genetics of myelodysplastic syndrome: From clonal haematopoiesis to secondary leukaemia. *Nature Reviews Cancer*, *17*(1), 5–19. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.112>
- Stengel, A., Kern, W., Haferlach, T., Meggendorfer, M., Fasan, A., & Haferlach, C. (2017). The impact of TP53 mutations and TP53 deletions on survival varies between AML, ALL, MDS and CLL: An analysis of 3307 cases. *Leukemia*, *31*(3), 705–711. <https://doi.org/10.1038/leu.2016.263>
- Stephens, P. J., Greenman, C. D., Fu, B., Yang, F., Bignell, G. R., Mudie, L. J., Pleasance, E. D., Lau, K. W., Beare, D., Stebbings, L. A., McLaren, S., Lin, M. L., McBride, D. J., Varela, I., Nik-Zainal, S., Leroy, C., Jia, M., Menzies, A., Butler, A. P., ... Campbell, P. J. (2011). Massive genomic rearrangement acquired in a single catastrophic event during cancer development. *Cell*, *144*(1), 27–40. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.11.055>
- Stopka, T., Minařík, L., Dusilková, N., Pešta, M., Kulvait, V., Špaček, M., Zemanová, Z., Kalousová, M., & Jonášová, A. (2022). G-CSF plus azacitidine versus azacitidine alone for patients with high-risk myelodysplastic syndrome: academic, open label, randomized trial. *Blood Cancer Journal*, *12*(7). <https://doi.org/10.1038/s41408-022-00698-2>
- Svobodova, K., Zemanova, Z., Lhotska, H., Novakova, M., Podskalska, L., Belickova, M., Brezinova, J., Sarova, I., Izakova, S., Lizcova, L., Berkova, A., Siskova, M., Jonasova, A., Cermak, J., & Michalova, K. (2016). Copy number neutral loss of heterozygosity at 17p and homozygous mutations of TP53 are associated with complex chromosomal aberrations in patients newly diagnosed with myelodysplastic syndromes. *Leukemia Research*, *42*, 7–12. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2016.01.009>
- Tang, Y. J., Huang, J., Tsushima, H., Ban, G. I., Zhang, H., Oristian, K. M., Puvindran, V., Williams, N., Ding, X., Ou, J., Jung, S. H., Lee, C. L., Jiao, Y., Chen, B. J., Kirsch, D. G., & Alman, B. A. (2019). Tracing Tumor Evolution in Sarcoma Reveals Clonal Origin of

Advanced Metastasis. *Cell Reports*, 28(11), 2837-2850.e5.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.08.029>

*Thompson, S. L., & Compton, D. A. (2011a). Chromosomes and cancer cells. *Chromosome Research*, 19(3), 433–444. <https://doi.org/10.1007/s10577-010-9179-y>

Thompson, S. L., & Compton, D. A. (2011b). Chromosome missegregation in human cells arises through specific types of kinetochore-microtubule attachment errors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(44), 17974–17978. <https://doi.org/10.1073/pnas.1109720108>

Tinsley-Vance, S. M., Ali, N. Al, Ball, S., Aguirre, L. E., Jain, A. G., Hussaini, M. O., Chan, O., Kuykendall, A., Sweet, K., Lancet, J., Padron, E., Sallman, D. A., & Komrokji, R. S. (2023). Sex Disparities in Myelodysplastic Syndromes: Genotype, Phenotype, and Outcomes. *Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia*, 16(33). <https://doi.org/10.1016/j.clml.2023.01.007>

Trembath, D. G., Semina, E. v., Jones, D. H., Patil, S. R., Qian, Q., Amendt, B. A., Russo, A. F., & Murray, J. C. (2004). Analysis of Two Translocation Breakpoints and Identification of a Negative Regulatory Element in Patients with Rieger’s Syndrome. *Birth Defects Research Part A - Clinical and Molecular Teratology*, 70(2), 82–91. <https://doi.org/10.1002/bdra.10154>

Tubio, J. M. C., & Estivill, X. (2011). When catastrophe strikes a cell. *Nature*, 470, 476–477. <http://arxiv.org/abs/1102.3725>

Turner, K. M., Deshpande, V., Beyter, D., Koga, T., Rusert, J., Lee, C., Li, B., Arden, K., Ren, B., Nathanson, D. A., Kornblum, H. I., Taylor, M. D., Kaushal, S., Cavenee, W. K., Wechsler-Reya, R., Furnari, F. B., Vandenberg, S. R., Rao, P. N., Wahl, G. M., ... Mischel, P. S. (2017). Extrachromosomal oncogene amplification drives tumour evolution and genetic heterogeneity. *Nature*, 543(7643), 122–125. <https://doi.org/10.1038/nature21356>

Umbreit, N. T., Zhang, C.-Z., Lynch, L. D., Blaine, L. J., Cheng, A. M., Tourdot, R., Sun, L., Almubarak, H. F., Judge, K., Mitchell, T. J., Spektor, A., & Pellman, D. (2020). MECHANISMS GENERATING CANCER GENOME COMPLEXITY FROM A SINGLE CELL DIVISION ERROR HHS Public Access. *Science*, 368(6488). <https://doi.org/10.5061/dryad.rn8pk0p61>

- Van den Berghe, H., Vermaelen, K., Mecucci, C., Barbieri, D., & Tricot, G. (1985). The 5q- anomaly. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, *17*(3), 189–255. [https://doi.org/10.1016/0165-4608\(85\)90016-0](https://doi.org/10.1016/0165-4608(85)90016-0)
- Vasmatazis, G., Wang, X., Smadbeck, J. B., Murphy, S. J., Geiersbach, K. B., Johnson, S. H., Gaitatzes, A. G., Asmann, Y. W., Kosari, F., Borad, M. J., Serie, D. J., McLaughlin, S. A., Kachergus, J. M., Necela, B. M., & Aubrey Thompson, E. (2018). Chromoanasythesis is a common mechanism that leads to ERBB2 amplifications in a cohort of early stage HER2 + breast cancer samples. *BMC Cancer*, *18*(1). <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4594-0>
- Volkert, S., Kohlmann, A., Schnittger, S., Kern, W., Haferlach, T., & Haferlach, C. (2014). Association of the type of 5q loss with complex karyotype, clonal evolution, TP53 mutation status, and prognosis in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *Genes Chromosomes and Cancer*, *53*(5), 402–410. <https://doi.org/10.1002/gcc.22151>
- Voronina, N., Wong, J. K. L., Hübschmann, D., Hlevnjak, M., Uhrig, S., Heilig, C. E., Horak, P., Kreutzfeldt, S., Mock, A., Stenzinger, A., Hutter, B., Fröhlich, M., Brors, B., Jahn, A., Klink, B., Gieldon, L., Sieverling, L., Feuerbach, L., Chudasama, P., ... Ernst, A. (2020). The landscape of chromothripsis across adult cancer types. *Nature Communications*, *11*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16134-7>
- Wall, M., Rayeroux, K. C., MacKinnon, R. N., Zordan, A., & Campbell, L. J. (2012). ETV6 deletion is a common additional abnormality in patients with myelodysplastic syndromes or acute myeloid leukemia and monosomy 7. *Haematologica*, *97*(12), 1933–1936. <https://doi.org/10.3324/haematol.2012.069716>
- Wang, F., Ni, J., Wu, L., Wang, Y., He, B., & Yu, D. (2019). Gender disparity in the survival of patients with primary myelodysplastic syndrome. *Journal of Cancer*, *10*(5), 1325–1332. <https://doi.org/10.7150/jca.28220>
- Wang, Q., Dong, S., Yao, H., Wen, L., Qiu, H., Qin, L., Ma, L., & Chen, S. (2014). ETV6 mutation in a cohort of 970 patients with hematologic malignancies. *Haematologica*, *99*(10), e176–e178. <https://doi.org/10.3324/haematol.2014.104406>
- Ward, D. (1996). *Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH*. <http://www.nature.com/naturegenetics>
- Watanabe, A., Inokuchi, K., Yamaguchi, H., Mizuki, T., Tanosaki, S., Shimada, T., & Dan, K. (2004). Near-triploidy and near-tetraploidy in hematological malignancies and mutation of the

p53 gene. *Clinical and Laboratory Haematology*, 26(1), 25–30. <https://doi.org/10.1111/j.0141-9854.2003.00574.x>

*Weckselblatt, B., & Rudd, M. K. (2015). Human Structural Variation: Mechanisms of Chromosome Rearrangements. *Trends in Genetics*, 31(10), 587–599. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2015.05.010>

Wei, A. H., Döhner, H., Pocock, C., Montesinos, P., Afanasyev, B., Dombret, H., Ravandi, F., Sayar, H., Jang, J.-H., Porkka, K., Selleslag, D., Sandhu, I., Turgut, M., Giai, V., Ofran, Y., Kizil Çakar, M., Botelho de Sousa, A., Rybka, J., Frairia, C., ... Roboz, G. J. (2020). Oral Azacitidine Maintenance Therapy for Acute Myeloid Leukemia in First Remission. *New England Journal of Medicine*, 383(26), 2526–2537. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2004444>

Weinberg, O. K., Siddon, A., Madanat, Y. F., Gagan, J., Arber, D. A., Cin, P. D., Narayanan, D., Ouseph, M. M., Kurzer, J. H., & Hasserjian, R. P. (2022). TP53 mutation defines a unique subgroup within complex karyotype de novo and therapy-related MDS/AML. *Blood Advances*, 6(9), 2847–2853. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2021006239>

Wiktor, A., Rybicki, B. A., Piao, Z. S., Shurafa, M., Barthel, B., Maeda, K., & Van Dyke, D. L. (2000). Clinical significance of Y chromosome loss in hematologic disease. *Genes Chromosomes and Cancer*, 27(1), 11–16. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2264\(200001\)27:1<11::AID-GCC2>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2264(200001)27:1<11::AID-GCC2>3.0.CO;2-I)

Wilhelm, T., Said, M., & Naim, V. (2020). Dna replication stress and chromosomal instability: Dangerous liaisons. *Genes*, 11(6), 1–35. <https://doi.org/10.3390/genes11060642>

Woll, P. S., Kjällquist, U., Chowdhury, O., Doolittle, H., Wedge, D. C., Thongjuea, S., Erlandsson, R., Ngara, M., Anderson, K., Deng, Q., Mead, A. J., Stenson, L., Giustacchini, A., Duarte, S., Giannoulatou, E., Taylor, S., Karimi, M., Scharenberg, C., Mortera-Blanco, T., ... Jacobsen, S. E. W. (2014). Myelodysplastic syndromes are propagated by rare and distinct human cancer stem cells in vivo. *Cancer Cell*, 25(6), 794–808. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.03.036>

Yamanishi, A., Yusa, K., Horie, K., Tokunaga, M., Kusano, K., Kokubu, C., & Takeda, J. (2013). Enhancement of microhomology-mediated genomic rearrangements by transient loss of mouse Bloom syndrome helicase. *Genome Research*, 23(9), 1462–1473. <https://doi.org/10.1101/gr.152744.112>

Yoshida, K., Sanada, M., Shiraishi, Y., Nowak, D., Nagata, Y., Yamamoto, R., Sato, Y., Sato-Otsubo, A., Kon, A., Nagasaki, M., Chalkidis, G., Suzuki, Y., Shiosaka, M., Kawahata, R., Yamaguchi, T., Otsu, M., Obara, N., Sakata-Yanagimoto, M., Ishiyama, K., ... Ogawa, S. (2011). Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature*, *478*(7367), 64–69. <https://doi.org/10.1038/nature10496>

Yoshimi, A., Toya, T., Kawazu, M., Ueno, T., Tsukamoto, A., Iizuka, H., Nakagawa, M., Nannya, Y., Arai, S., Harada, H., Usuki, K., Hayashi, Y., Ito, E., Kirito, K., Nakajima, H., Ichikawa, M., Mano, H., & Kurokawa, M. (2014). Recurrent CDC25C mutations drive malignant transformation in FPD/AML. *Nature Communications*, *5*. <https://doi.org/10.1038/ncomms5770>

Zasadil, L. M., Andersen, K. A., Yeum, D., Rocque, G. B., Wilke, L. G., Tevaarwerk, A. J., Raines, R. T., Burkard, M. E., & Weaver, B. A. (2014). Cytotoxicity of paclitaxel in breast cancer is due to chromosome missegregation on multipolar spindles. *Science Translational Medicine*, *6*(229). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3007965>

Závacká, K., Plevová, K., Jarošová, M., & Pospíšilová, Š. (2019). Chromotripse – rozsáhlé chromozomové přestavby a jejich význam u onkologických onemocnění. *Klinická Onkologie*, *32*(2), 101–108. <https://doi.org/10.14735/amko2019101>

*Zeidan, A. M., Shallis, R. M., Wang, R., Davidoff, A., & Ma, X. (2019). Epidemiology of myelodysplastic syndromes: Why characterizing the beast is a prerequisite to taming it. *Blood Reviews*, *34*, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2018.09.001>

Zemanova, Z., Michalova, K., Brezinova, J., Lhotska, H., Svobodova, K., Sarova, I., Lizcova, L., Izakova, S., Ransdorfova, S., Krejcik, Z., Belickova, M., Siskova, M., Jonasova, A., Neuwirtova, R., Zmolikova, J., & Cermak, J. (2014). Clonal Heterogeneity in Patients with Myelodysplastic Syndromes (MDS) and Complex Karyotypes. *Blood*, *124*(21), 859–859. <https://doi.org/10.1182/blood.v124.21.859.859>

Zemanová, Z., Michalová, K., & Březinová, J. (2019). Význam cytogenetické a molekulárně cytogenetické analýzy v diagnostice hematologických malignit v době nových sekvenčních technik. *Časopis lékařů českých*, *158*(1), 22–27.

Zemanova, Z., Michalova, K., Buryova, H., Brezinova, J., Kostylkova, K., Bystricka, D., Novakova, M., Sarova, I., Izakova, S., Lizcova, L., Ransdorfova, S., Krejcik, Z., Merkerova, M. D., Dohnalova, A., Siskova, M., Jonasova, A., Neuwirtova, R., & Cermak, J. (2014). Involvement of deleted chromosome 5 in complex chromosomal aberrations in newly

diagnosed myelodysplastic syndromes (MDS) is correlated with extremely adverse prognosis. *Leukemia Research*, 38(5), 537–544. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2014.01.012>

Zemanova, Z., Michalova, K., Svobodova, K., Brezinova, J., Lhotska, H., Lizecova, L., Sarova, I., Izakova, S., Hodanova, L., Vesela, D., Ransdorfova, S., Belickova, M., Vesela, J., Polackova, H., Siskova, M., Neuwirtova, R., Cermak, J., Stopka, T., & Jonasova, A. (2018). Chromothripsis in High-Risk Myelodysplastic Syndromes: Incidence, Genetic Features, Clinical Implications, and Impact on Survival of Patients Treated with Azacytidine (Data from Czech MDS Group). *Blood*, 132(Supplement 1), 1815–1815. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-99-114151>

Zhang, C. Z., Spektor, A., Cornils, H., Francis, J. M., Jackson, E. K., Liu, S., Meyerson, M., & Pellman, D. (2015). Chromothripsis from DNA damage in micronuclei. *Nature*, 522(7555), 179–184. <https://doi.org/10.1038/nature14493>

Zhang, Y., Wu, J., Qin, T., Xu, Z., Qu, S., Pan, L., Li, B., Wang, H., Zhang, P., Yan, X., Gong, J., Gao, Q., Gale, R. P., & Xiao, Z. (2022). Comparison of the revised 4th (2016) and 5th (2022) editions of the World Health Organization classification of myelodysplastic neoplasms. *Leukemia*, 36(12), 2875–2882. <https://doi.org/10.1038/s41375-022-01718-7>

Zhao, N., Stoffel, A., Wang, P. W., Eisenbart, J. D., Iii, R. E., Larson, R. A., & Le Beau, M. M. (1997). Molecular delineation of the smallest commonly deleted region of chromosome 5 in malignant myeloid diseases to 1-1.5 Mb and preparation of a PAC-based physical map. *Medical Sciences*, 94, 6948–6953. <https://doi.org/DOI: 10.1073/pnas.94.13.6948>

Přílohy

Příloha č. 1 – Karyotypy pacientů detekované klasickou cytogenetickou analýzou a metodou mFISH/mBAND

č. p. – číslo pacienta; dg. – diagnóza

č. p.	pohlaví	věk při diagnóze	dg.	karyotyp (G-pruhování + m-FISH/mBAND)
1	Ž	79	MDS-EB-1	46,XX,der(5)del(5)(q14q33.3)t(5;17)(q33.2;p12),der(11)t(11;13)(q12;?)t(12;13)(q?q;?),der(12)t(12;13)(p13;q?)t(11;12)(?;p11.2),der(13)r(12;13)(?;?),der(17)t(5;17)(q33.2;p12),der(18)t(12;18)(?;q22),der(20)t(11;20)(?;p11.2)[5]/45,idem,-13[29]/45,XX,der(5)del(5)(q14q33.3)t(5;17)(q33.2;p12),der(11)t(11;13)(q12;?)t(12;13)(q?q;?),der(12)inv(12)(p11.2q13)t(12;13)(p11.2;?p11.2)t(11;12)(?;q?)t(11;13)(?;13)(?;q?),-13,der(17)t(5;17)(q33.2;p12),der(18)t(12;18)(?;q22),der(20)t(11;20)(?;p11.2)[8]
2	M	71	MDS-RS-MLD	46,XY,der(3)t(3;?)(p24.??;?)inv(3)(q21q2?9)t(3;6)(q21;p12),der(6)t(3;6)(q21;p12)t(3;13)(q21;q1?3),der(13)t(3;13)(p24.??;q1?3)[20]
3	Ž	77	MDS-MLD	46,XX,der(2)t(2;5)(?p11.2;?)del(2)(?q?31),der(5)t(2;5)(?;q1?2),der(12)t(2;12)(?;q24.3)[10]/45,idem,dic(7;12)(q11.2;p11.2),der(?13)t(12;13)(p13.??1;?) [19]/46,XX[1]
4	M	70	MDS-EB-1	48~49,XY,?ins(2;5)(p?13;q23.3q23.3),der(4)t(4;13)(p16;q1?4)del(4)(q?31),der(5;19)(p10;?p10),del(13)(q1?4),del(20)(q12),+21,der(20;22)(p10;q10)x2~3[41]
5	M	72	MDS/AML	45,XY,del(5)(q14q33.2),der(11)t(2;11)(q12;q12),dic(11;13)(q11;p11.2),+20,der(2;20)(p10;p10)x2[26]/90,XXYY,idemx2[7]
6	M	79	MDS-EB-2	45,XY,del(5)(q22q33),der(17)t(17;20)(p13;?),der(18;20)(p10;?q10),der(19)t(19;21)(?p13.3;q21),der(21)t(19;21)(?p13.3;q21)inv(19;21)(p?;q?)[40]
7	Ž	78	MDS-EB-1	45,XX,del(5)(q14q33.3),der(7)t(7;9)(q22;?),-9,t(9;12)(q13;p12),der(18)t(9;18)(?;q22)[21]/46,XX,+X,t(3;13)(?;q21),del(5)(q14q33.3),der(7)t(7;9)(q22;?),+der(7)t(7;9)(q22;?),+8,-9,der(15)t(1;15)(?;p12),der(18)t(9;18)(?;q22)[cp10]/46,XX[7]
8	M	69	MDS-EB-2	46,XY,del(5)(q14.3q33.2)[2]/47,idem,der(7)t(7;19)(q21.12;q13.2),+8,der(12)del(12)(p12.1p13.32)inv(p13.32q24.33),del(13)(q13.1q31.1)[14]/46,XX[34]
9	Ž	65	MDS-EB-2	43,XX,-3,del(5)(q14.1q33.3),der(7)t(7;17)(q?21;q?11.3),-12,der(13)t(12;13)(?;q34)t(3;12)(?q13;?),-17[43]/43,X,der(X)del(X)(p?11.4)del(X)(q?13),-3,del(5)(q14.1q33.3),der(7)t(7;17)(q?21;q?11.3),-12,der(13)t(12;13)(?;q34)t(3;12)(?q13;?),-17,der(20)t(X;20)(q?13;?p13)[5]/46,XX[3]

10	M	69	MDS-EB-2	44,XY,der(1)t(Y;1)(q12;p36.3),dup(3)(q2?6.1q2?6.3),der(5)t(5;7)(q13.2;p13),r(7)(p11.2q21),+8,der(13;21)(p10;p10),der(15;17)(p10;p10)[30]/43,XY,der(1)t(Y;1)(q12;p36.3),dup(3)(q2?6.1q2?6.3),der(5)t(5;7)(q13.2;p13),-7,+8,der(13;21)(p10;p10),der(15;17)(p10;p10)[6]
11	M	68	MDS-U	47,XY,+2,der(5)t(5;16)(q13.1;?),+11,dic(16;17)(p11.2;p11.2)t(5;16)(q31.3;q13),+21,?dic(21;22)(p12;p12)x2,-22[32]/48,idem,+8[7]
12	Ž	72	MDS-EB-1	45,XX,der(1)t(1;7)(p?32;p22),del(5)(q14q34),der(7)t(7;11)(p15.3;?)t(1;11)(p?31;?),der(11;17)(q10;q10),t(15;16)(q?23;q?23),ider(17)(p10)t(11;17)(q13;11.2)[18]/46,XX[23]
13	Ž	77	MDS-EB-2	45~46,XX,der(3)t(3;12)(p14.3;p13.31)ins(3;12)(q27.1;p11.1q21.32),der(3)t(3;12)(p14.3;p13.31)ins(3;12)(q27.1;q1?5q21.32),der(5)t(5;12)(q15;p12.2)t(12;12)(p11.22;q23.1),-12,der(12)del(12)(p11.22)del(12)(q13.3)[35]/46,XX[1]
14	Ž	77	MDS-EB-2	42~46,XX,del(5)(q12q34),del(7)(q11.2),-13,-18,t(19;19)(q?;q?),del(21)(q?12),+der(21;21)(p10;p10)t(13;21)(q?13;q?12),+r(21)(p?;q?) [41]
15	M	83	MDS-EB-1	44,X,der(Y)inv(Y)(p11.3q12)t(Y;22)(q12;q11.1),del(5)(q14.1q33.3),der(7)t(7;21)(q21.11;q21.1),der(9)del(9)(p13.1)del(9)(q21.11),der(18)t(9;18)(p13.2;q22.1)del(18)(q21.2q21.31),dic(20;22)(q11.21;p11.1),-21[19]/43,X,der(Y)inv(Y)(p11.3q12)t(Y;22)(q12;q11.1),del(5)(q14.1q33.3),der(7)t(7;21)(q21.11;q21.1),-9,der(18)t(9;18)(p13.2;q22.1)del(18)(q21.2q21.31),dic(20;22)(q11.21;p11.1),-21[2]
16	Ž	70	MDS-EB-1	47,XX,del(5)(q11.2q34),del(7)(q11q21.1)(q21.3q36),+8,r(11)(p11.2q25),del(13)(q12),der(15)t(1;15)(?;p11.1)[33]/47,XX,der(4)t(4;13)(p16;q12),del(5)(q11.2q34),del(7)(q11q21.1)(q21.3q36),+8,dup(11)(q13.1q14.1),del(13)(q12),der(15)t(1;15)(?;p11.1)[2]/46,XX,der(4)t(4;13)(p16;q12),del(5)(q11.2q34),der(7)del(7)(q11q21.1)(q21.3q36)t(7;22)(q36;q11.2),dup(11)(q13.1q14.1),del(13)(q12),der(15)t(1;15)(?;p11.1),r(7;22)(q11q21.1;pterq11.2)[12]/47,XX,der(4)t(4;13)(p16;q12),del(5)(q11.2q34),+8,del(13)(q12),der(15)t(1;15)(?;p11.1),der(22)t(3;22)(?;q11.2)[3]
17	M	74	MDS-U	44,XY,-3,t(4;17)(q12;q11.1),der(5)t(5;13)(q11.1;q?),+der(8)del(8)(p11.1pter)t(3;8)(q11.2;q11.2),del(12)(q13),-13,-17,der(21)t(3;21)(p11.1;11.1)[13]/46,XY[31]
18	M	91	MDS/AML	47,XY,+8[5]/55~60,XY,+1,+2,der(5)del(5)(q11.2q14)del(5)(q21q33),+6,+8,+9,+11,+13,+14,+16,+19,+20,+21,+der(18)r(18;21)(p10q11.2;p?q?),+r(21)(p?q?),+22,1~4dmin[23]/46,XY[3]
19	M	79	MDS-EB-2	43,XY,der(9;13)(p10;p10),r(9)(p13q12),der(12)t(12;22)(p11.2;q11.21),der(15)t(15;16)(p11.2;?)t(9;16)(?;?),-16,der(19)t(9;19)(q?13.3)t(9;19)(?;?)t(16;19)(q?12;?),-22[13]/43,XY,der(9;13)(p10;p10),-9,der(12)t(12;22)(p11.2;q11.21),der(15)t(15;16)(p11.2;?)t(9;16)(?;?),-16,der(19)t(9;19)(q?13.3)t(9;19)(?;?)t(16;19)(q?12;?),-22[24]/43,XY,der(9;13)(p10;p10),der(12)t(12;22)(p11.2;q11.21),der(15)t(15;16)(p11.2;?)t(9;16)(?;?),-16,der(19)t(9;19)(?;?)t(16;19)(q?12;?),-22[11]/46,XY[8]
20	M	72	MDS-U	46,XY,r(7)(p1?4q22),der(12)t(12;20)(q13;?),der(20)t(12;20)(q13;q11.2)[33]/46,XY[5]

21	M	81	MDS-U	44~47,XY,del(4)(q?),der(5)t(5;15)(q14;q?22),del(6)(q?),der(7)r(7;20)(?:p?),+der(7)del(7)(p11)del(7)(q11)x1~5,+8,+8,der(11)t(6;11)(?:p11.2),-15,-20,der(19;22)(?q10;q10)[cp28]
22	Ž	78	MDS-U	41~45,XX,del(5)(q13.2q33.3),der(6)t(6;17)(q27;?),-13,der(13)t(13;21)(p11.1;q22),-17,der(17)t(13;17)(q?14;p12),der(18;19)(p10;p10),der(19)t(19;20)(?:?),r(21;21)(p11.1;q?)inc[8]/46,XX[14]
23	M	81	MDS-EB-1	43~46,XY,der(1)t(1;3;12)(p12;?:p13),der(3)t(1;3)(p12;q?13)t(3;17)(p?12;q?24),der(6)inv(6)(q14q23.2)t(3;6)(?:q23.2),der(11)del(11)(q?13q?)t(11;18)(q?13;p11.1),der(12)t(3;12)(?:p13),der(17)t(6;17)(q23.2;q?24),der(18)t(11;18)(q?:p11.1)[18]/46,XY[9]
24	M	65	MDS-EB-2	46,XY,der(5)t(5;7)(q14.3;?),der(7)t(7;17)(q11.23;?),der(7)t(7;20)(q11.23;?),der(17)t(17;19)(p13.1;p13.2)t(7;17)(q21.11;q22),del(20)(?)q[26]/46,idem,t(X;8)(p?22.1;q?24.1),der(4)t(4;19)(q35;?),-16,der(19)t(16;19)(?:?),+der(19)del(19)(p12)del(19)(q12)[13]/92,idemx2,t(X;8)(p?22.1;q?24.1)x2,der(4)t(4;19)(q35;?)x2,-16,-16,der(19)t(16;19)(?:?)x2,+der(19)del(19)(p12)del(19)(q12)x2[2]/46,XY[4]
25	Ž	73	MDS-EB-1	45~46,XX,+1,der(3)t(3;6)(q2?8;?),del(5)(q14q33.3),der(9)t(9;?11)(q3?3;?),del(11)(p11.2),der(11)t(11;13)(q24;q12),der(11;17)(p11.2;?)t(17;?)t(17;?)t(17;?),+i(11)(q10),-13,der(16)t(16;?)t(16;?)t(16;?),-17[33]
26	M	73	MDS-EB-2	46,XY,der(3)(12qter->12q12::3p24.2->3p14.3::3p12.2->3q11.2::3q26.1->3qter),der(5)(12pter->12p13.31::5p15.2->5q14.2::5p15.2->5pter),+8,-12[25]/46,XY,der(3;12)(12qter->12q12::3p24.2->3p14.3::3p12.2->3q11.2::12p11.1->12q11::3q13.3->3qter),der(5)(12pter->12p13.31::5p15.2->5q14.2::5p15.2->5pter),+8[6]/47,XY,der(3)r(3;12)(:3p14.3->3p14.1::3p12.1->3q11.2::12q13.1->12q1?4::),der(5)(12pter->12p13.31::5p15.2->5q14.2::5p15.2->5pter),+8,der(12)(3qter->3q21::12p11.2->12q11::12q1?4->12qter)[2]
27	M	80	MDS-EB-2	46,XY,del(5)(q13.2q34),del(7)(q21.1q31.3),der(17)t(1;17)(?:p12)[34]/46,XY[4]
28	Ž	46	MDS-EB-1	45,XX,dic(5;17)(q11.1;p11.2)[5]/44,idem,-7,dic(5;15)(q11.1;p11.1)[16]/45,idem,r(18)(p11.1q21.2)[12]/45,idem,-7,+8,dic(7;18)(q11;q11.1)[3]/43,idem,-7,-18[2]/46,XX[15]
29	M	67	MDS-EB-2	44,XY,der(4)t(4;5)(p11;q34),der(5)del(5)(q13.1q34)t(4;5)(p11;q13.1),-7[2]/43,XY,-3,der(4)t(4;5)(p11;q34),der(5)del(5)(q13.1q34)t(4;5)(p11;q13.1),-6,-7,del(12)(p12.1p13.3),der(18)r(6;18)(?:p11.3q11.1)[37]/42,X,-Y,-3,der(4)t(4;5)(p11;q34),der(5)del(5)(q13.1q34)t(4;5)(p11;q13.1),-7,del(12)(p12.1p13.3),-18,der(19)t(11;19)(?:p13.1)[3]/44,XY,der(2)t(2;13)(p22;q14),-3,der(4)t(4;5)(p11;q34),der(5)del(5)(q13.1q34)t(4;5)(p11;q13.1),-7,del(12)(p12.1p13.3),der(13)t(6;13)(?:q14)t(2;6)(p22;?)t(2;6)/46~48,XY,del(1)(q21)x1~2,der(4)t(4;5)(p11;q34),der(5)del(5)(q13.1q34)t(4;5)(p11;q13.1),der(6)t(6;15)(p21;q?15),der(15)t(6;15)(p25;q?15),+17,der(18)r(6;18)(?:p11.3q11.1)[4]
30	Ž	46	MDS-EB-1	52,XX,+1,+2,del(5)(q23.2q35.1),+8,+9,+psu idic(11)(p11.1),+14[12]/52,X,del(X)(q2?2q2?5),+1,+2,del(5)(q23.2q35.1),del(6)(q2?1q2?4),+8,+9,+psu idic(11)(p11.1),+14,i(22)(q11.1)[32]
31	Ž	59	MDS-EB-1	46,XX,del(5)(q13q34),der(6;7)(q10;p10),der(12;20)(p13;p11.1),+19,-20[6]/47,idem,+8[12]/46,XX[16]

32	Ž	80	MDS-U	43,XX,der(4)t(4;21)(q12;q11.2)del(21)(q22.1q22.3),del(5)(q14.2q33.3),der(6)t(6;7)(q13;q11.23),der(7)del(7)(p11p14.3)del(7)(q11.1q11.23)t(6;7)(q13;q11.23),der(9)t(4;19)(?;?)t(9;19)(?;?)t(9;19)(?;?),der(13;14)(p10;q10),del(15)(q13.1),der(16)t(15;16)(q14;p13.3),-18,-19,-21[38]/46,XX[9]
33	Ž	71	MDS-U	53,XX,+X,+1,del(5)(q14q33.3)x2,+8,+11,+14,+22[25]/53,idem,del(7)(q31q?35)[5]/53,idem,der(7)t(7;?)(q31;?) [9]/53,XX,+X,+r(1)(p36.3q11),del(5)(q14q33.3)x2,del(7)(q31q?35),+8,+11,+14,+22[2]/53,XX,+X,+r(1)(p36.3q11),del(5)(q14q33.3)x2,der(7)t(7;?)(q31;?)+8,+11,+14,+22[2]
34	M	87	MDS-U	46,XY,del(4)(q11q34),del(5)(q14.3q31.2),ins(14;4)(q24;q24q21::q31q33)[39]/46,XY,del(4)(q11q34),t(7;17)(q32;q12),ins(14;4)(q24;q24q21::q31q33)[2]/46,XY,del(4)(q11q34),der(7;17)(q10;p10),ins(14;4)(q24;q24q21::q31q33),der(16)t(7;16)(?;p12),der(17)t(7;17)(?;p10)t(7;16)(?;p12)[2]/45,XY,del(4)(q11q34),der(7;17)(q10;p10),ins(14;4)(q24;q24q21::q31q33),der(16)t(7;16)(?;p12),der(17)t(7;17)(?;p10)t(7;16)(?;p12),-18,der(22)t(18;22)(?;q12)[2]/46,XY,del(4)(q11q34),t(7;11)(q21;q24),ins(14;4)(q24;q24q21::q31q33)[4]
35	M	64	MDS/AML	42~45,XY,-2,-5,dic(5;16)(q11.2;q13),t(6;10)(q25;q25),der(11)t(11;13)(p15;q?),r(13)(?)x2,-14,der(16)t(5;16)(q34;q13)t(5;16)(p11;q24),der(17)t(2;17)(q11.2;p13)inv(2)(q?q?)t(13;17)(q?q21)[10]/46,XY[33]
36	M	81	MDS/AML	45,XY,-3,der(5)t(3;5)(q11.1;q12.1),der(9)t(9;12)(p21.1;p13.1),der(12)t(9;12)(p21.1;p13.1)del(12)(p11.2p12.2),del(13)(q12.2q13.3)(q14.2q14.3)[29]/47,idem,+8,+21[8]/87~90<4n>,idemx2[2]
37	M	80	MDS-MLD	43,XY,dic(5;18)(q11.1;p11.1),-7,del(13)(q?),der(14;22)(p10;p10),-18[1]/44,XY,dic(5;18)(q11.1;p11.1),der(6)?inv(6)(p?q?)t(6;13)(p?q31.2),t(7;16)(q22;p13.3),der(13)t(6;13)(p?q13.2),der(14;22)(p10;p10),-18[39]
38	M	62	MDS-MLD	45,XY,der(3)t(3;13)(?;q?14),der(5)del(5)(q11.1q35)ins(5;6)(q11.1;?),der(6)del(6)(p12)del(6)(q13),der(7)t(6;7)(?;p13)t(6;13)(?;q?),der(7)inv(7)(p?q?)ins(7;6)(q?;?),-13,der(19)t(5;19)(q35;p12)[2]/45,idem,del(12)(q?12),der(20)t(12;20)(?;q?12)[3]/43~45,XY,der(5)del(5)(q11.1q35)ins(5;6)(q11.1;?),der(6)t(6;13)(p21;q?),der(6)del(6)(p12)del(6)(q13),der(7)inv(7)(p?q?)ins(7;6)(q?;?),der(13;14)(p10;p10),der(15)t(2;15)(?;p11),-17,der(18)t(17;18)(q;p10),der(19)t(5;19)(q35;p12),2mar[8]/46,XY[27]
39	M	59	MDS-EB-2	40,XY,-1,der(4)t(4;5)(q?31;q?23.3)t(5;12)(q?35.2;?)t(1;12)(?;?),-5,der(6)t(1;6)(?;q12),-7,-12,-17,-18[31]/46,XY[9]
40	M	74	MDS-U	45,XY,der(5)t(5;15)(p12;q22),del(5)(q13.3q34),der(7)t(7;12)[21]/49,idem,+8,+9,+ins(10;5)(p11.2;p11q13.2),+14[9]/51,idem,+6,+8,+8,+ins(10;5)(p11.2;p11q13.2)x2,+14,+22[9]/44,XY,der(5)t(5;15)(p12;q22),del(5)(q13.3q34),der(7)t(7;12)(q?21;?),i(8)(q10),-13,der(15)t(5;15)(p13.3;q21)t(5;13)(p14;q?)[4]
41	M	78	MDS-MLD	38~42,X,-Y,der(1)t(1;2)(p32.3;?)-2,der(5)t(2;5)(?;q22)t(1;2)(p32.3;?)-7,-13[36]/46,XY[4]
42	M	72	MDS-EB-2	49,XY,+1,der(5)del(5)(p15.1p15.33)del(5)(q21.1q34)(5pter::5q21.1-->5q21.1::5p15.1-->5q21.1::5q34-->5qter),-7,+8,+9,der(12)t(7;12)(12pter-->12p13.32::7q36.2-->7q36.3::7q22.2-->7q34::7p21.2-->7p14.3::12p12.3-->12qter),+20,del(21q11.2q21.3)(q22.11q22.13)[40]/46,XY[1]

43	Ž	79	MDS/AML	44,XX,del(5)(q13.3q33.2),-17,-18,t(22;22)(q12;q13.3)[3]/43,idem,dic(8;11)(q24.3;p14)[11]/43,idem,der(13)t(13;15)(p11.1;q22),-15[2]/44,idem,der(13)t(13;18)(p11.1;?) [22]/40~43,idem,dic(13;15)(q12;p11.1),der(11)t(11;15)(q13;q22),der(7)t(7;18)(q32;?),r(18)(p?;q?),dic(11;22)(q12;p11.1)t(22;22)(q12;q13.3)[4]
44	M	76	MDS-EB-1	45,XY,dic(5;12)(5pter->5q11.2::5q3?4->5q35.?2::12p11.2->12qter),der(7)t(7;16)q11.1;?)+8,-16[15]/46,XY[24]
45	Ž	69	MDS-EB-1	46,XX,del(5)(q13.2q34),-17,dup(21)(q?q?),der(21)t(17;21)(q?q22.3),der(22)t(21;22)(q11.2;p11.2)t(17;21)(?;q22.3)[2]/47,idem,+mar[32]/45,XX,-4,del(5)(q13.2q34),-17,der(21)t(4;21)(?;p11.1)t(21;22)(q21.1;?),der(22)t(21;22)(q11.2;p11.2)t(17;21)(?;q22.3)[2]
46	M	74	MDS-EB-2	44,X,-Y,der(5)del(5)(q11.2q15)t(5;13)(p15.3;q?)t(8;13)(p21.1;q?)t(5;17)(q21.1;?),der(7)ins(7;5)(p14;q11.2q11.2)t(5;7)(q35.3;p22),der(7)t(7;12)(q33;q14.3),der(8)t(8;13)(p11.2;q31),r(9)(p24.3p22.2),+r(9)(p24.3p21.1::q33.2q34.3),der(12)t(2;12)(p15;q14.3),-13,der(17)r(17;21)(p?q;q23.3q23.3,-18,der(22)t(9;22)(?;p11.1)[36]
47	Ž	80	MDS-MLD	46,XX,del(5)(q14q33.3)[13]/45,XX,der(5)del(5)(q13q33.3)t(5;10)(p13.1;q?)-7,der(10)ins(10;5)(q?p13.1p14)t(5;10)(p14;q?) [3]/45,XX,der(5)t(5;10)(p13.1;q?)t(5;12)(q14;q23),-7,der(10)ins(10;5)(q?p13.1p14)t(5;10)(p14;q?),der(12)r(5;12;21)(q34q35;p?q;q?),del(21)(q?) [15]/45,XX,der(5)del(5)(q13q33.3)t(5;10)(p13.1;q?),der(5)t(5;?) (q11;?),-7,der(10)ins(10;5)(q?p13.1p14)t(5;10)(p14;q?),der(12)t(12;14)(p13;q12),der(14)t(5;14)(q11;q12)[10]
48	Ž	50	MDS-EB-2	43~45,XX,der(1)t(1;5)(p?q33.3),der(5)del(5)(q22q33.3)t(1;5)(p?q33.3),-7,der(13)t(7;13)(?;q12),-14,der(16)t(13;17)t(13;16)(q?q11)(q?p11),der(17)t(16;17)(p11;q11),der(18)t(18;20)(p11;q?),der(20)t(14;20)(q?q11.2),+22,-22[19]/44,XX,der(1)t(1;5)(p?q33.3),der(5)del(5)(q22q33.3)t(1;5)(p?q33.3),dic(7;22)(?;?),der(13)t(7;13)(?;q12),-14,der(16)t(13;17)t(13;16)(q?q11)(q?p11),der(17)t(16;17)(p11;q11),der(18)t(18;20)(p11;q?),der(20)t(14;20)(q?q11.2),-22[15]/45,XX,der(1)t(1;5)(p?q33.3),der(5)del(5)(q22q33.3)t(1;5)(p?q33.3),der(7)del(7)(p12)del(7)(q11.2),der(13)t(7;13)(?;q12),-14,der(16)t(13;17)t(13;16)(q?q11)(q?p11),der(17)t(16;17)(p11;q11),der(18)t(18;20)(p11;q?),der(20)t(14;20)(q?q11.2)[4]
49	Ž	64	MDS-U	45~50,XX,del(4)(q?21),del(5)(q14.1q34),r(11)(p15.5-->15.4::p11.11-->q21.1),r(11)(p15.5-->p15.2::q23.2-->q25)x5,der(12)t(12;17)(p11.1;q?11.2),-17[40]
50	Ž	62	MDS-EB-1	43,XX,der(3)t(3;5)(q12;q14),-5,der(5)inv(5)(q11q14)t(3;5)(q24;q14)x2,-7,der(12)psu dic(12;20)(p13.1;?)del(12)(p11.1p12.2),der(21;22)(q10;q10)[21]/46,XX[21]
51	M	77	MDS-EB-2	44,XY,psu dic(14;5)(5pter->5q13::5q34->5q35::14p11.2->14qter),-18,der(20)t(18;20)(?;?q11.2)[24]/45,XY,der(7)t(7;18)(7pter->7q?::18q2?->18q2?::18p11.2->18pter),psu dic(14;5)(5pter->5q13::5q34->5q35::14p11.2->14qter),i(18)(q10),r(18)(p11.2q12.3),i(21)(q10)[11]/44,XY,psu dic(14;5)(5pter->5q13::5q34->5q35::14p11.2->14qter),-18,t(19;20)(?p13;?q11.2;?) [2]/46,XY[6]
52	Ž	69	MDS-EB-1	46,XX,del(5)(q14.3q34)[5]/46~47,XX,der(3)inv(3)(q24q28)t(3;7)(q29;q31)t(7;14)(q21q24),t(3;10)(q22;q11.2),der(4)t(4;21)(q11;q11.2),del(5)(q14.3q34),r(7)(p13q11.2),der(14)t(3;14)(q29;q24),der(21;21)(p11.1;q11.2),

				+r(21)(q?) ^[5] /41~44,X,der(X)t(X;18)(p11.1;?),der(3)inv(3)(q24q28)t(3;7)(q29;q31)t(7;14)(q21q24),der(3)t(3;10)(q22;q11.2),der(4)t(4;21)(q11;q11.2),del(5)(q14.3q34),r(7)(p13q11.2),der(9)ins(9;18)(p?;?)t(X;9)(?;q13),der(10)t(10;20)(q11.2;?),der(14)t(3;14)(q29;q24),der(17)t(9;17)(?;p12),-18,-20,der(21;21)(p11.1;q11.2) ^[27]
53	Ž	73	MDS-EB-1	46,XX,del(5)(q14.3q34) ^[2] /43,XX,t(1;9)(p36;p22),der(4;7)(p10;p10)del(7)(p11.1p14),del(5)(q13.3q33.3),dic(12;18)(p11.1;p11.1),der(16)t(10;16)(?;p11.1),der(17)t(16;17)(q?;q25)t(10;16)(?;q?),der(10;20)(p10;p10) ^[10] /46,XX ^[1]
54	Ž	84	MDS-EB-1	46,X,del(X)(p?11.3),del(5)(q14.3q34),der(16)t(X;16)(p?11.3;q?24) ^[11] /46,X,del(X)(p?11.3),del(5)q14.3q34),del(6)(q?12),t(10;13)(q?22;q?12),der(12)t(6;12)(q?12;p?13) ^[3] /47,XX,+8 ^[2] /46,XX ^[46]
55	Ž	36	MDS-EB-1	45,XX,der(3)t(3;18)(p13;q?),der(5)del(5)(q13.3q33.3)ins(5;18)(q13.3;q?q?),der(6)t(6;22)(p?21;q?),dic(7;17)(p11.2;p?11.1),+der(17)del(17)(p11)del(17)q(11),-18,-22 ^[19] /46,XX,der(5)del(5)(q13.3q33.3)ins(5;18)(q13.3;q?q?),dic(3;7)(p11.1;p11.2),dic(17;18)(p?11.1;p?11.1) ^[19]
56	M	67	MDS-EB-1	46,XY,der(5)(5pter->5p13.3::5q22->5p11::6q?->6q?::5p11->5p13.3::6q?->6qter),del(6)(q?),der(7)t(6;7)(q?;q22),r(7)(p21q22),der(18)t(7;18)(q22;p?11.2) ^[9] /46,XY,der(5)(5pter->5p13.3::5q22->5p11::6q?->6q?::5p11->5p13.3::6q?->6qter),del(6)(q?),der(7)t(6;7)(q?;q22),dic(7;18)(p15;p?11.2) ^[3] /47,idem,+der(6)(?) ^[2]
57	M	56	MDS-EB-1	47,XY,+18 ^[3] /45,XY,del(1)(p36.2p34.1),dic(5;7)(q11.2;p11) ^[25] /45,idem,t(6;12)(q?23.3;p13.?) ^[10] /46,XY ^[18]
58	M	80	MDS-EB-2	44,XY,der(5)t(5;20)(q13.1;?),+8,ider(8)(q10)ins(8;5)(q?11.21;q13.1q13.2),der(8)t(5;21)(q33.3;q?)t(21;18)(q?;?)t(18;21)(?;q?)t(21;8)(q?;p?11.2)ins(8;5)(q?11.21;q15q21),-16,-18,-20 ^[9] /44,idem,r(7)(p22;q31.3) ^[26] /43,idem,-7 ^[6]
59	M	78	MDS-EB-1	46,X,der(Y)t(Y;19)(q?;?),der(3)t(3;?) ^(q?;?) der(4)t(4;12)(p?12;q?),der(5)t(5;15)(q?23;q?),der(6)t(6;?) ^(?;?) ,-12,-15,der(19)t(19;19)(q?;q?),+mar,+mar ^[2]
60	M	66	MDS-EB-2	46,XY,-7,+8,der(8)del(8)(p?12)del(8)(q?12),der(15)del(15)(q?21),der(18)t(8;18)(?;q?),der(20)t(20;21)(q?;q?),der(21)del(21)(q?),der(21)t(15;21)(q?;q?) ^[27] /46,XY ^[8]
61	M	81	MDS-MLD	44,XY,-3,der(5)t(3;5)(q?;q?12),-9,der(12)t(9;12)(?;p?13),der(17)t(17;21)(p?13;q?) ^[19] /45,idem,+21 ^[10] /90<4n>,XXYY,-3,-3,der(5)t(3;5)(q?;q?12)x2,-9,-9,der(12)t(9q12)(?;p?13)x2,der(17)t(17;21)(p?13;q?)x2,+21, ^[5] /46,XY ^[1]

Příloha č. 2 – Karyotypy pacientů v době diagnózy a po klonálním vývoji

číslo pacienta	karyotyp v době diagnózy	karyotyp po klonálním vývoji	počet nových změn	počet dní od diagnózy
3	46,XX,der(2)t(2;5)(?p11.2;?)del(2)(?q?31),der(5)t(2;5)(?;q1?2),der(12)t(2;12)(?;q24.3)[10]/45,idem,dic(7;12)(q11.2;p11.2),der(?13)t(12;13)(p13.?1;?) [19]/ 46,XX[1]	46,XX,der(2)t(2;5)(?p11.2;?)del(2)(?q?31),der(5)t(2;5)(?;q1?2),der(12)t(2;12)(?;q24.3)[4]/45,idem,dic(7;12)(q11.2;p11.2),der(13)t(12;13)(p13.?1;?) [4]/ 46,idem,+der(7)del(7)(p11.2)del(7)(q11.21),dic(7;12)(q11.2;p11.2),der(13)t(12;13)(p13.?1;?) / 46,XX[9]	2	489
5	46,XY,-2,del(5)(q14q33.2),der(11)t(2;11)(q12;q12),dic(11;13)(p10;q10),der(2;20)(p10;p10)x2[26]/ 92,XXYY,idemx2[7]	46,XY,der(3)t(3;22)(q21.3;q11.2),del(5)(q14q33.2),der(22)t(3;22)(q21.3;q11.2)inv(3)(q21.3q26.3)[6]/ 46,XY[14]	2	141
7	45,XX,del(5)(q14q33.3),der(7)t(7;9)(q22;?)-9,t(9;12)(q13;p12),der(18)t(9;18)(?;q22)[21]/46,XX,+X,t(3;13)(?;q21),del(5)(q14q33.3),der(7)t(7;9)(q22;?)+der(7)t(7;9)(q22;?)+8,-9,der(15)t(1;15)(?;p12),der(18)t(9;18)(?;q22)[cp10]/46,XX[7]	45,XX,del(5)(q14q33.3),der(7)t(7;9)(q22;?)-9,t(9;12)(q13;p12),der(18)t(9;18)(?;q22)[5]/45,idem,der(2)t(2;4)(p?25.1;?)ins(2;4)(q?23;?),der(4)del(4)(p?12)del(4)(q?31)[14]	5	636
12	45,XX,der(1)t(1;7)(p?32;p22),del(5)(q14q34),der(7)t(7;11)(p15.3;?)t(1;11)(p?31;?),der(11;17)(q10;q10),t(15;16)(q?23;q?23),ider(17)(p10)t(11;17)(q13;11.2) [18]/46,XX[23]	45,XX,der(1)t(1;7)(p?32;p22),del(5)(q14q34),der(7)t(7;11)(p15.3;?)t(1;11)(p?31;?),der(11;17)(q10;q10),t(15;16)(q?23;q?23),ider(17)(p10)t(11;17)(q13;11.2) [8]/46,idem,+r(11;17)(?;?) [2]/46,XX[12]	2	384
26	46,XY,der(3)(12qter->12q12::3p24.2->3p14.3::3p12.2->3q11.2::3q26.1->3qter),der(5)(12pter->12p13.31::5p15.2->5q14.2::5p15.2->5pter)+8,-12[25]/46,XY,der(3;12)(12qter->12q12::3p24.2->3p14.3::3p12.2->3q11.2::12p11.1->12q11::3q13.3->3qter),der(5)(12pter->12p13.31::5p15.2->5q14.2::5p15.2->5pter)+8[6]/ 47,XY,der(3)r(3;12)(::3p14.3->3p14.?1::3p12.1->3q11.2::12q13.?1->12q1?4::),der(5)(12pter->12p13.31::5p15.2->5q14.2::5p15.2->5pter)+8,der(12)(3qter->3q21::12p11.2->12q11::12q1?4->12qter)[2]	46,XY,der(3)(12qter->12q12::3p24.2->3p14.3::3p12.2->3q11.2::3q26.1->3qter),der(5)(12pter->12p13.31::5p15.2->5q14.2::5p15.2->5pter)+8,-12[13]/46,XY,der(3;12)(12qter->12q12::3p24.2->3p14.3::3p12.2->3q11.2::12p11.1->12q11::3q13.3->3qter),der(5)(12pter->12p13.31::5p15.2->5q14.2::5p15.2->5pter)+8[5]/ 48-49,XY,der(3;12)(12qter->12q12::3p24.2->3p14.3::3p12.2->3q11.2::12p11.1->12q11::3q13.3->3qter),der(5)(12pter->12p13.31::5p15.2->5q14.2::5p15.5->5pter)+8,+19,+22[2]	2	36

27	46,XY,del(5)(q13.2q34),del(7)(q21.1q31.3),der(17)t(1;17)(?;p12)[34]/46,XY[4]	46,XY,del(5)(q13.2q34)[2]/47,XY,del(5)(q13.2q34),del(7)(q21.1q31.3),der(17)t(1;17)(?;p12),+22[5]/46,XY[15]	1	531
38	45,XY,der(3)t(3;13)(?;q?14),der(5)del(5)(q11.1q35)ins(5;6)(q11.1;?),der(6)del(6)(p12)del(6)(q13),der(7)t(6;7)(?;p13)t(6;13)(?;q?),der(7)inv(7)(p?q?)ins(7;6)(q?;?)-13,der(19)t(5;19)(q35;?p12)[2]/45,idem,del(12)(q?12),der(20)t(12;20)(?;q?12)[3]/43~45,XY,der(5)del(5)(q11.1q35)ins(5;6)(q11.1;?),der(6)t(6;13)(p21;q?),der(6)del(6)(p12)del(6)(q13),der(7)inv(7)(p?q?)ins(7;6)(q?;?),der(13;14)(p10;p10),der(15)t(2;15)(?;p11),-17,der(18)t(17;18)(q?p10),der(19)t(5;19)(q35;?p12),2mar[8]/46,XY[27]	45,XY,der(3)t(3;13)(?;q?14),der(5)del(5)(q11.1q35)ins(5;6)(q11.1;?),der(?)t(5;?)x2,der(6)del(6)(p12)del(6)(q13),der(7)t(6;7)(?;p13)t(6;13)(?;q?),der(7)inv(7)(p?q?)ins(7;6)(q?;?)-13,der(19)t(5;19)(q35;?p12)[2]/45,idem,del(12)(q?12),der(20)t(12;20)(?;q?12)[3]/43~45,XY,der(5)del(5)(q11.1q35)ins(5;6)(q11.1;?),der(6)t(6;13)(p21;q?),der(6)del(6)(p12)del(6)(q13),der(7)inv(7)(p?q?)ins(7;6)(q?;?),der(13;14)(p10;p10),der(15)t(2;15)(?;p11),-17,der(18)t(17;18)(q?p10),der(19)t(5;19)(q35;?p12),2mar[3]/46,XY[12]	2	71
45	46,XX,del(5)(q13.2q34),-17,dup(21)(q?q?),der(21)t(17;21)(q?q22.3),der(22)t(21;22)(q11.2;p11.2)t(17;21)(?;q22.3)[2]/47,idem,+mar[32]/45,XX,-4,del(5)(q13.2q34),-17,der(21)t(4;21)(?;p11.1)t(21;22)(q21.1;?),der(22)t(21;22)(q11.2;p11.2)t(17;21)(?;q22.3)[2]	43~46,XX,der(5)t(5;17)(q35;q?),del(5)(q13.2q34),der(11)t(11;13)(p11.1;q?13),del(13)(q?13),-17,t(19;19)(q?q?),del(21)(q22),der(22)t(21;22)(q11.2;p11.1)[23]	7	120