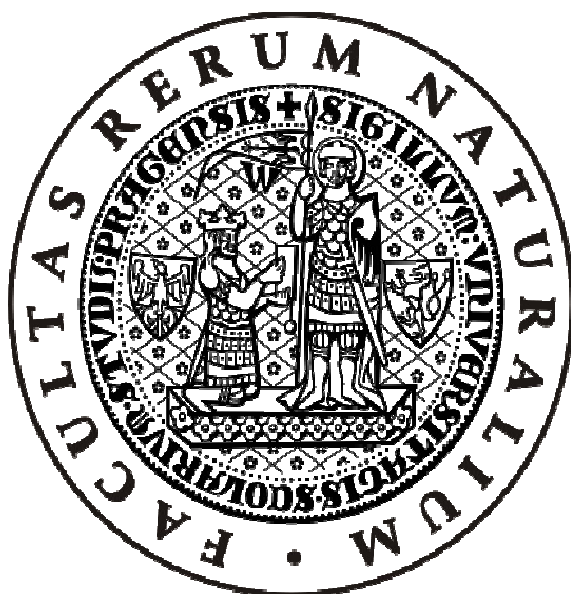


Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze

Katedra antropologie a genetiky člověka



Diplomová práce

**Studium genetických změn u dětí s akutními
lymfoblastickými leukémiemi (ALL) za využití
metod mFISH/mBAND a čipových technologií**

Řešitel: Bc. Linda Bártů

Školitel: doc. RNDr. Zuzana Zemanová, CSc.

V Praze 2012

Diplomová práce byla vypracována v laboratoři Centra nádorové cytogenetiky ÚLBD VFN a 1. LF UK pod vedením doc. RNDr. Zuzany Zemanové, CSc.

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně na základě uvedené literatury.

V Praze dne

.....

Linda Bártů

Ráda bych poděkovala své školitelce doc. RNDr. Zuzaně Zemanové, CSc., za odborné vedení a cenné rady při řešení diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat Prof. Ing. Kyře Michalové, DrSc., za to, že mi umožnila vypracovat tuto práci na pracovišti Centra nádorové cytogenetiky **ÚLBLD VFN a 1. LF UK**.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat všem pracovníkům laboratoře, především Jitce Němcové a Libuši Folberové za seznámení s metodou klasické cytogenetiky. Dále kolegyním Mgr. Evě Malinové a RNDr. Dagmar Bystřické, Ph.D za zasvěcení do molekulárně-cytogenetických metod.

Závěrem děkuji své rodině za podporu v průběhu mého studia.

Tato práce byla vypracována v letech 2010-2012 v laboratoři Centra nádorové cytogenetiky ÚLBLD VFN a 1.LF UK a byla podpořena granty *MSM 0021620813* a *MZOVFN2005*

Obsah

1	Úvod.....	10
2	Literární přehled	12
2.1	Lidský karyotyp	12
2.2	Vznik rakovinné buňky	13
2.2.1	Protoonkogeny.....	14
2.2.2	Tumor supresorové geny.....	15
2.2	Akutní lymfoblastická leukémie	16
2.2.3	Přestavby <i>MLL</i> genu	19
2.2.4	Translokace t(12;21)(p13;q22).....	20
2.2.5	Philadelphský chromosom	20
2.2.6	Duplikace dlouhých ramen chromosomu 1	22
2.2.7	Hyperdiploidie.....	22
2.2.8	Hypodiploidie.....	24
2.3	Cytogenetické a molekulárně cytogenetické metody.....	25
2.3.1	Příprava buněk pro cytogenetické vyšetření	25
2.3.2	G-Pruhování	26
2.3.3	Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace	27
2.3.4	mFISH.....	29
2.3.5	mBAND	30
2.3.6	Array CGH	31
3	Cíl práce	33
4	Materiál	34
4.1	Laboratorní technika pro klasickou cytogenetiku, FISH a array CGH.....	36
4.2	Chemikálie a roztoky pro klasickou cytogenetickou analýzu	37
4.2.1	Chemikálie a roztoky pro FISH, mFISH a mBAND analýzu.....	39
4.2.2	Chemikálie a roztoky pro izolaci DNA	40
4.2.3	Chemikálie a roztoky pro array CGH.....	41
5	Metody	42
5.1	Klasická cytogenetická analýza	42

5.1.1	Kultivace a zpracování buněk kostní dřeně	42
5.1.2	Příprava preparátů.....	42
5.1.3	Barvení	43
5.1.4	Mikroskopické vyhodnocení	44
5.2	Molekulárně cytogenetická analýza.....	44
5.2.1	Přehled použitých DNA sond pro detekci heteroploidii.....	45
5.2.2	Příprava preparátů.....	46
5.2.3	Příprava preparátů.....	47
5.2.4	Aplikace sondy a hybridizace	47
5.2.5	Mytí preparátu po hybridizaci	47
5.2.6	Analýza ve fluorescenčním mikroskopu.....	48
5.3	mFISH a mBAND	48
5.3.1	Příprava preparátu pro mFISH/mBAND	48
5.3.2	Příprava sondy	49
5.3.3	Hybridizace	49
5.3.4	Odmytí a detekce	49
5.4	Izolace DNA	49
5.5	Array CGH.....	51
5.5.1	Vyhodnocení dat.....	55
5.6	Statistická analýza	55
6	Výsledky práce	56
6.1	Výsledky konvenční cytogenetické analýzy.....	56
6.2	Výsledky I-FISH	56
6.2.1	Výsledky mFISH a mBAND.....	58
6.2.2	Výsledky array CGH	61
6.3	Současný klinický stav pacientů	62
6.4	Statistická analýza	62
6.4.1	Skupina 1	63
6.4.2	Skupina 2.....	63
6.4.3	Analýza délky přežití	63

7	Diskuse.....	66
8	Závěr	73
9	Použitá literatura.....	74
10	Přílohy. Chyba! Záložka není definována.Chyba! Záložka není definována.	

Abstrakt

Akutní lymfoblastická leukémie patří k nejčastějším maligním onemocněním u dětí. K nejdůležitějším vyšetřením v době stanovení diagnózy patří sestavení karyotypu leukemických buněk, které rozděluje nemocné do prognostických skupin dle cytogenetického nálezu. Až u 90 % nemocných jsou popisovány chromosomové aberace, u většiny z nich je přesně znám jejich klinický význam. Důležitým cytogenetickým nálezem je tzv. vysoká hyperdiploidie (51-68 chromosomů), která je spojena s velmi dobrou prognózou. Přesto i u těchto dětí dochází k relapsům onemocnění. Jedním z vysvětlení by mohla být zvýšená nestabilita genomu leukemických buněk, která je příčinou vzniku kryptických strukturních přestaveb.

V retrospektivní studii jsme celkem vyšetřili 232 dětí s nově diagnostikovanou B-ALL pomocí konvenční cytogenetické analýzy a metodou interfázní fluorescenční *in situ* hybridizace (I-FISH) s panelem DNA sond (Abbott Vysis) pro detekci heteroploidních buněk. U nemocných s podezřením na kryptické strukturní chromosomové aberace jsme karyotypy podrobně analyzovali metodou mnohobarevné FISH a mnohobarevného pruhování (mFISH/mBAND; MetaSystems), rozsah aberací jsme určili metodou komparativní genomové hybridizace na BAC čípech (array CGH; BlueGnome).

Buněčné klony s vysokou hyperdiploidií jsme prokázali celkem u 102 dětí (44 %), u 25 z nich (24,5 %) jsme detekovali další kryptické chromosomové aberace. Do strukturních přestaveb nejčastěji vstupovaly chromosomy 1, 13, 6 a 7. Nejčastější rekurentní změnou byla duplikace dlouhých ramen chromosomu 1 (9 dětí). Minimální oblast duplikovanou u všech nemocných jsme lokalizovali v pruzích 1q31 až 1q32.3 (velikost 22.5 Mb). U dalších 4 pacientů jsme našli delecii dlouhých ramen chromosomu 13. U dvou pacientů jsme našli delecii na dlouhých ramenech chromosomu 6.

Nemocní s kryptickými strukturními změnami měli statisticky významně kratší EFS (Event Free Survival; $p=0,038$).

Klíčová slova: B-ALL, hyperdiploidie, strukturní chromosomové aberace

Abstract

Acute lymphoblastic leukemia is the most common malignancy in children. The most important examination at the time of diagnosis includes karyotype of leukemic cells which divides patients into prognostic groups according to cytogenetic finding. In up to 90 % of patients the chromosomal aberrations with well known clinical significance are designated. One of cytogenetic type is high hyperdiploid ALL (51-68 chromosomes) associated with favorable prognosis. Nevertheless, relapses of the disease occur even in these children. One possible reason why this happens could be an increased genomic instability of leukemic cells that causes cryptic structural rearrangements.

In a retrospective study, we examined a total of 232 children with newly diagnosed B-ALL using conventional cytogenetic analyses and interphase fluorescence *in situ* hybridization (I-FISH) with a panel of DNA probes (Abbott Vysis) in order to detect heteroploid cells. In patients with suspect cryptic structural chromosome aberrations, we analyzed the karyotypes in detail by multicolor FISH and multicolor banding (mFISH/mBAND; MetaSystems). The extent of aberrations was determined by comparative genomic hybridization on BAC arrays (array CGH; BlueGnome).

Cell clones with high hyperdiploid karyotype were detected in a total of 102 children (44 %). In 25 of them (24,5 %), we revealed additional cryptic chromosome aberrations. Chromosomes 1, 13, 6 and 7 were most frequently structurally rearranged. The most common recurrent change found was the duplication of long arm of chromosome 1 (9 children). The minimal duplicated region in all patients was 1q31 to 1q32.3 (22.5 Mb). Further, we detected deletion of chromosome 13 long arm in 4 patients and deletion of long arm of chromosome 6 in two patients.

Patients with cryptic structural changes showed statically significant shorter EFS (Event Free Survival; $p=0,038$).

Keywords: B-ALL, hyperdiploidy, structural chromosome aberrations

Použité zkratky:

Array CGH	Komparativní genomová hybridizace na čípech
ALL	Akutní lymfoblastická leukémie
AML1	Acute myeloid leukemia 1 gen
BAC	Bacterial Artificial Chromosome
CEP	Chromosome Enumeration Probe
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
FISH	Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
He	Nespecifikovaná hyperdiploidie
HeH	Vysoká hyperdiploidie (High Hyperdiploidy)
HeL	Nízká hyperdiploidie (Low Hyperdiploidy)
ISCN	An International System for Human Cytogenetic Nomenclature
LSI	Locus Specific Probe
mBAND	Mnohobarevné pruhování
mFISH	Mnohobarevná fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
MLL	Myeloid/lymphoid leukemia gen
p	Označení krátkého ramene chromosomu
PT	Pokojová teplota
q	Označení dlouhého ramene chromosomu
rpm	Počet otáček za min (Revolutions per minute)
t	Translokace

1 Úvod

Akutní lymfoblastická leukémie (ALL) je heterogenní onemocnění charakterizované klonální proliferací maligních blastů v kostní dřeni a periferní krvi (Harrison, 2001). ALL je nejčastějším hematologickým onemocněním u dětí, celkově tvoří až jednu čtvrtinu dětských nádorových onemocnění (Starý, 2010). Nejvíce postihuje děti ve věku 2-5 let, ale může se objevit i u kojenců a starších pacientů. Většina nemocných trpí B-ALL (ALL vycházející z B lymfocytů, (viz Obrázek 1), naopak T-ALL jsou méně časté.

Příčiny vzniku ALL nejsou zcela známy, ale u jedinců trpících některými geneticky podmíněnými syndromy (Ataxia-telangiectasia, Downův syndrom) je jejich výskyt vyšší (Maloney, 2011; Seif, 2011). Proto je oprávněné se domnívat, že toto onemocnění má genetické pozadí.

Klasická cytogenetická a molekulární cytogenetická analýza karyotypu leukemických blastů umožňuje rozdělit pacienty s ALL do různých prognostických skupin dle cytogenetického nálezu a přispívá ke zvolení vhodného léčebného protokolu.

Chromosomové abnormality vyskytující se u dětských ALL mohou být dvojího typu. Jsou to jednak strukturní aberace, zejména translokace, nebo se jedná o numerické odchylky, při kterých chybí nebo přebývá jeden či více chromosomů (aneuploidie).

Mezi prognosticky příznivé strukturní aberace patří například nález translokace $t(12;21)(p13;q22)$. Za nepříznivé nálezy jsou považovány např. přestavby *MLL* genu v oblasti 11q23, tj. např. translokace $t(4;11)(q21;q23)$, dále tzv. Philadelphský chromosom, který vzniká translokací $t(9;22)(q32;q11)$, intrachromosomální amplifikace chromosomu 21 nebo translokace $t(1;19)(q23;p13)$ (Moorman et al., 2010; Harrison et al., 2010).

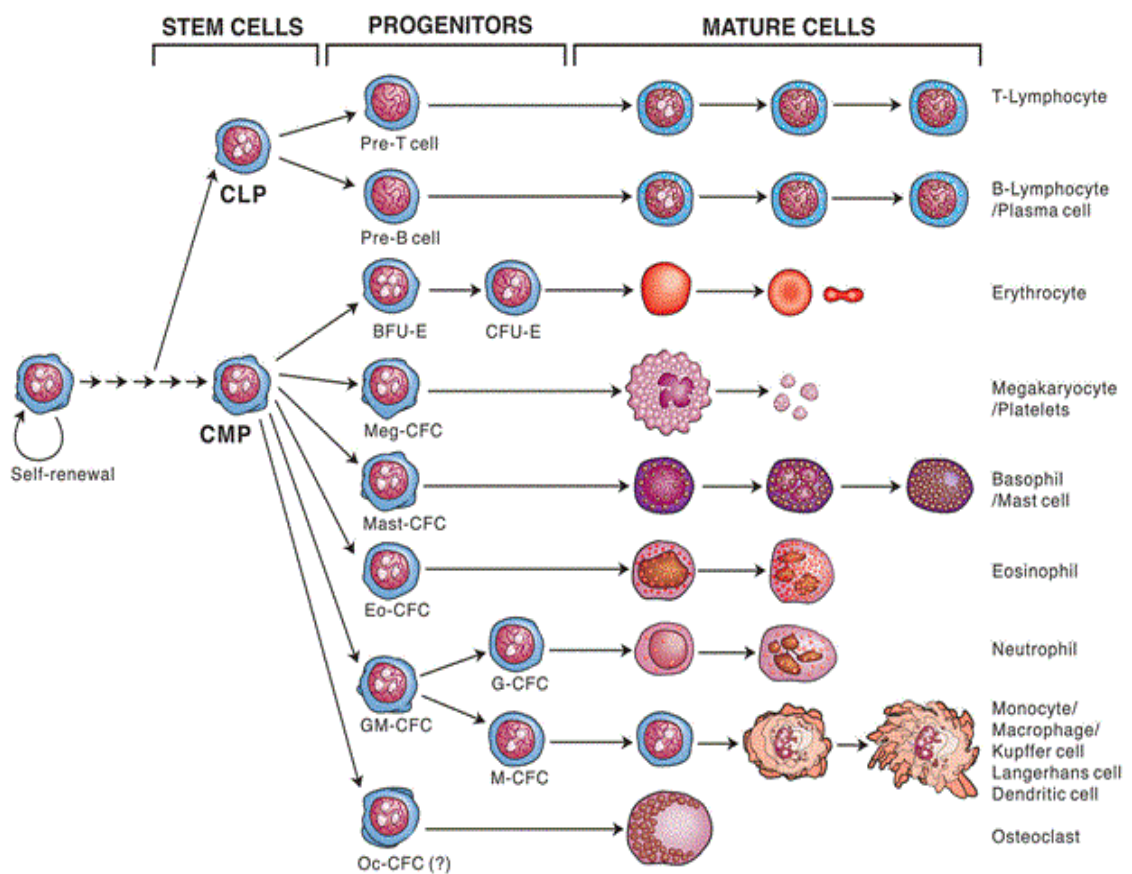
Další významnou skupinou jsou pacienti s aneuploidiemi, tj. s modálním počtem chromosomů větším nebo menším než 46. Jedná se například o tzv. hyperdiploidie s počtem chromosomů vyšším než 46. Prognosticky významný je nález vysoké hyperdiploidie, kdy se modální počet chromosomů pohybuje v rozmezí 51-68. Tento nález bývá spojován s dobrou prognózou. Naopak velmi špatná prognóza se udává u pacientů

s tzv. „near triploidy/near tetraploidy“, tj. s více než 68 chromosomy. Děti s buněčným klonem obsahujícím 47-50 chromosomů mají středně dobrou prognózu.

Opačným příkladem početních odchylek je tzv. hypodiploidie. Jedná se o pacienty, jejichž karyotyp v leukemickém klonu čítá méně jak 46 chromosomů. Tito pacienti mají velmi špatnou prognózu (Raimondi et al., 2003).

Některé změny jsou pod detekčním limitem klasické cytogenetické analýzy, proto při podezření na přítomnost chromosomové abnormality je třeba využít molekulárně cytogenetických metod, jako jsou I-FISH, mFISH popř. mBAND. V poslední době se jedná i o mikročipovou analýzu, která ovšem dokáže rozpoznat pouze nebalancované aberace přítomné alespoň v 30% klonu.

Obrázek 1 Hematopoetická řada



Převzato z <http://blognyahana.wordpress.com/2010/05/17/hematopoiesis/>

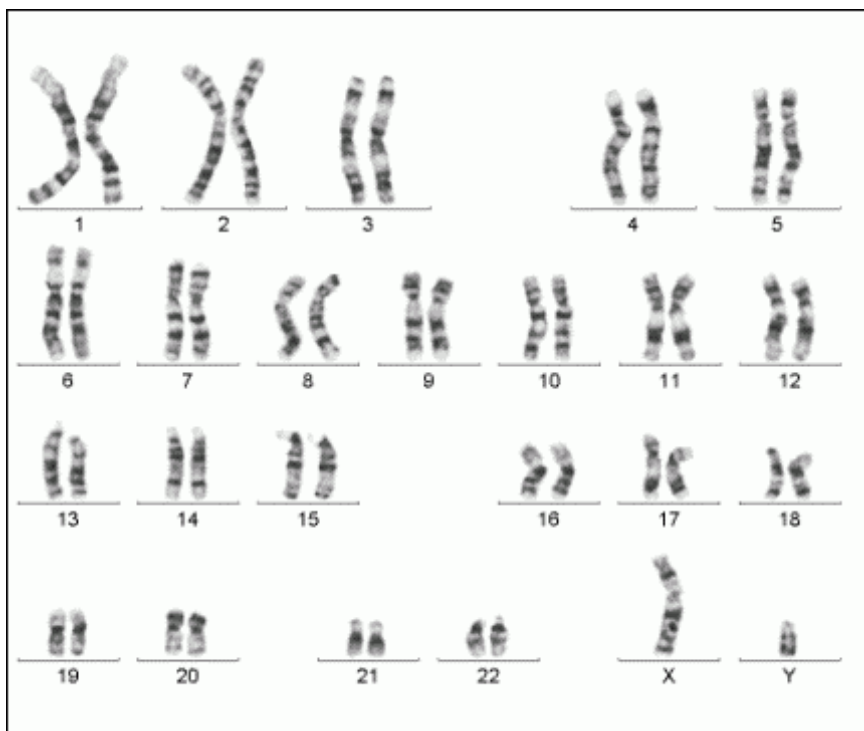
2 Literární přehled

2.1 Lidský karyotyp

V roce 1956 stanovili Tjio a Levan počet chromosomů ve zdravých lidských buňkách. Jádra buněk obsahují 22 párů autosomů a 2 gonosomy dle pohlaví (žena XX, muž XY) (viz Obrázek 2). Celkem se tedy jedná o 46 chromosomů ve dvou sadách.

Sada všech 46 chromosomů je uspořádána do karyotypu dle mezinárodní ISCN nomenklatury (ISCN-2009). Chromosomy jsou uspořádány do 7 skupin (A-G) na základě velikosti a tvaru. Vyskytují se zde chromosomy metacentrické, submetacentrické a akrocentrické, nikdy však telocentrické. Toto označení chromosomů závisí na poměru dlouhých (q) a krátkých (p) ramen každého z chromosomů, neboli na centromerickém indexu.

Obrázek 2 Mužský karyotyp 46,XY



Převzato z <http://www.biologie-lfhk.cz/index.php?s=spoluprace&c=17>

Metacentrické chromosomy mají přibližně stejně dlouhá p i q ramena, jejich centromera tudíž leží uprostřed. Submetacentrické chromosomy mají p-ramena výrazně kratší, centromera je posunuta blíže k jeho konci. U akrocentrických chromosomů

jsou p ramena velmi zkrácena, někdy se může zdát, že zcela chybí, jindy jsou vidět tzv. satelity, které jsou odděleny sekundární konstrikcí.

Aberace postihující chromosomy mohou být strukturního charakteru nebo může dojít ke změně počtu chromosomů v karyotypu, pak hovoříme o aneuploidii. Při aneuploidiích dochází ke ztrátě nebo naopak získání celých chromosomů. Strukturní změny vznikají nestabilitou chromosomů a následnou chybou při opravě poškozené DNA (Thompson et al., 2011).

2.2 Vznik rakovinné buňky

V roce 1914 formuloval německý biolog Theodor Boveri mutační teorii somatických buněk a položil tak základy nádorové cytogenetiky (Boveri, 1914). Již v roce 1902 stanovil, že vznik nádorového bujení by mohl být zapříčiněn poruchou chromosomové rovnováhy.

Dnes víme, že vznik rakovinového bujení je několika stupňový děj, při kterém dochází ke kumulaci změn v genomu jediné buňky. Nádorová buňka se vymkne z kontroly buněčného cyklu díky poruše regulačních dějů. Jedná se o poruchu proliferace, apoptózy a diferenciaci buňky. Dochází k preferenčnímu růstu těchto buněk a následně k nekontrolovatelnému dělení. Takto zvýhodněné buňky získávají schopnost neomezené proliferace, dokáží se vyhnout faktorům zastavujícím růst stejně tak, jako buňkám imunitního systému i apoptóze.

Nádory dělíme na solidní, tj. nádory tvořené maligními buňkami tvořícími pevné ložisko, které může být viditelné pouhým okem. Hematopoetické nádory (leukémie a lymfomy) postihují krevetvorné buňky. U solidních nádorů je vyvolána angiogeneze, invazivita a schopnost tvořit metastáze (Hanahan et al., 2011). Leukemické buňky ztrácí svou schopnost diferenciaci, zároveň jim zůstává schopnost proliferace. Tím se kumulují leukemické blasty, které utlačují normální krevetvorbu. Infiltrují ostatní orgány a tím narušují jejich funkci.

Maligní buňky se kumulují, hromadí se v nich mutace, které vznik nádorového bujení podporují a tvoří se tumor. Tato porucha vzniká na základě genetických mutací v kritických oblastech postihující geny, které se na správném průběhu buněčného cyklu

podílejí. Taková mutace může způsobit aktivaci protoonkogenu na onkogen nebo naopak poškození funkce tumor supresorových genů (viz níže).

Dříve se předpokládalo, že každý rakovinový typ má svůj vlastní marker. Přispěl k tomu i objev ze šedesátých let, kdy Nowell a Hungerford objevili tzv. Philadelphský chromosom (Ph), neboli $t(9;22)(q34;q11)$, u pacientů s chronickou myeloidní leukémií. Tento nález se ovšem stal jedinou nalezenou chromosomovou aberací související s leukemickým subtypem nádorového onemocnění na dlouhou dobu.

Až se zavedením pruhovacích metod, a v posledních letech se zavedením molekulárně cytogenetických metod, jsou nalézány a popisovány další chromosomové přestavby, mutace a numerické odchylky u nádorových buněk, které napomáhají jak v diagnostice samotného onemocnění, tak i k posouzení remise a včasnému odhalení relapsu.

2.2.1 Protoonkogeny

Produkty genů zvaných protoonkogeny regulují pochody v buněčném cyklu a umožňují správný růst a diferenciaci buněk. Tyto geny a jejich produkty v sobě mají onkogenetický potenciál. Zvýšená exprese protoonkogenů, nebo jejich mutace, která může způsobit abnormální aktivitu onkogenních produktů, vede k hyperstimulaci a nadměrné proliferaci buněk.

Z molekulárního hlediska můžeme rozlišit několik druhů protoonkogenů, které mají odlišný mechanismus působení, ale stejný výsledek. Známe protoonkogeny kódující růstové faktory nebo jejich receptory na buněčné membráně. Přímo v buňce fungují jako DNA vazebné proteiny či transkripční faktory. Produkty protoonkogenů mohou také hrát svou roli při přenosu signálu z membrány do jádra. Mohou to být cykliny a cyklin-dependentní kinázy, na kterých je závislé řízení buněčného cyklu, a jejich inhibitory (Kamb, 1995).

U protoonkogenů stačí mutace v jedné alele, aby byla porušena rovnováha buněčného cyklu. Jedná se tedy o mutaci s dominantním účinkem. Je ovšem nutné dodat, že mutace v jednom genu obvykle k nádorovému bujení nevede, je třeba několika různých změn genů, které hrají roli v regulaci proliferace.

Známým příkladem aberace, při které dochází k aktivaci protoonkogenu, je výše zmíněný Ph chromosom. Protoonkogen *c-abl*, kódující tyrosin-kinázu na chromosomu 9 v oblasti q34 fúzuje s genem *BCR* na chromosomu 22 v oblasti q11. Tyrosin kináza se stává aktivní i bez vnějších podnětů. Fosforyluje další molekuly v signální dráze (Deininger et al., 2000) a tím dochází k deregulaci exprese některých genů, poruše buněčného cyklu, zvýšení schopnosti odolávat apoptóze (Cambier et al., 1998) a vzniku nemoci. Tento typ translokace dává tedy vzniknout chimérickému genu, jehož produkt má vyšší aktivitu.

Druhým typem translokace a vzniku onkogenu je přesun protoonkogenu do oblasti se silným promotorem. Onkogen je více exprimován a dochází k nadbytku jeho produktu. Takovým protoonkogenem je např. *c-myc* ležící na lidském chromosomu 8. Je to gen, jehož produkt reguluje transkripční faktory mnoha dalších genů. V případě Burkytova lymfomu se setkáváme s translokací t(8;14)(q24;q32), která vede přesunu protoonkogenu *c-myc* na chromosom 14 pod promotor genu IgH (Siebert et al., 1998). Tím dochází k deregulaci transkripčních faktorů a vzniku nádorového bujení.

U leukemických buněk se často vyskytuje pouze jedna balancovaná translokace, která spouští vznik nádorového bujení (Mitelman et al., 2007). Při progresi onemocnění tak dochází ke vzniku dalších sekundárních aberací.

2.2.2 Tumor supresorové geny

Na rozdíl od protoonkogenů, dochází u tumor supresorových genů k inaktivaci jejich funkce. Tyto geny a jejich produkty potlačují buněčnou proliferaci a podporují apoptózu a diferenciaci buněk. Mutace postihující tumor supresorové geny má recesivní charakter, to znamená, že pro vyřazení z funkce musí být mutovány obě alely. To ovšem znamená, že výskyt forem rakoviny, které jsou způsobeny ztrátou funkce tumor supresorového genu, může být dědičný, jedná se o tzv. hereditární formu.

U jedinců, kteří si od narození nesou mutovanou formu genu v jedné alele v germinální linii může dojít ke ztrátě funkce i u alely druhé v somatických buňkách. V takovém případě se vyvine rakovina. Tuto teorii dvojího zásahu navrhl v roce 1971 Alfred G. Knudson, Jr. (Knudson, 1971).

Typickým příkladem je hereditární forma retinoblastomu, což je vzácný nádor retiny projevující se už v dětském věku. U jedince, který nemá dědičnou formu retinoblastomu, se nachází mutované alely genu *RBI* v pozici 13q14 pouze v nádorové tkáni. Naopak pacient s hereditární formou nádoru má jednu mutovanou alelu ve všech buňkách organismu. Je tedy jasné, že u těchto dětí mohou být postiženy obě oči, což je u ostatních pacientů velmi vzácné.

Zřejmě nejznámější tumor supresorový gen je *p53* lokalizovaný v oblasti 17p13.1. Tento gen kóduje transkripční faktor, který se účastní regulace buněčného cyklu. Gen *p53* hraje klíčovou roli v kaskádě několika genů, které v případě poškození DNA nebo vlivem faktorů jako je UV a radiační záření zastaví buňku v G_1 fázi, nebo vyvolají apoptózu (viz Obrázek 3).

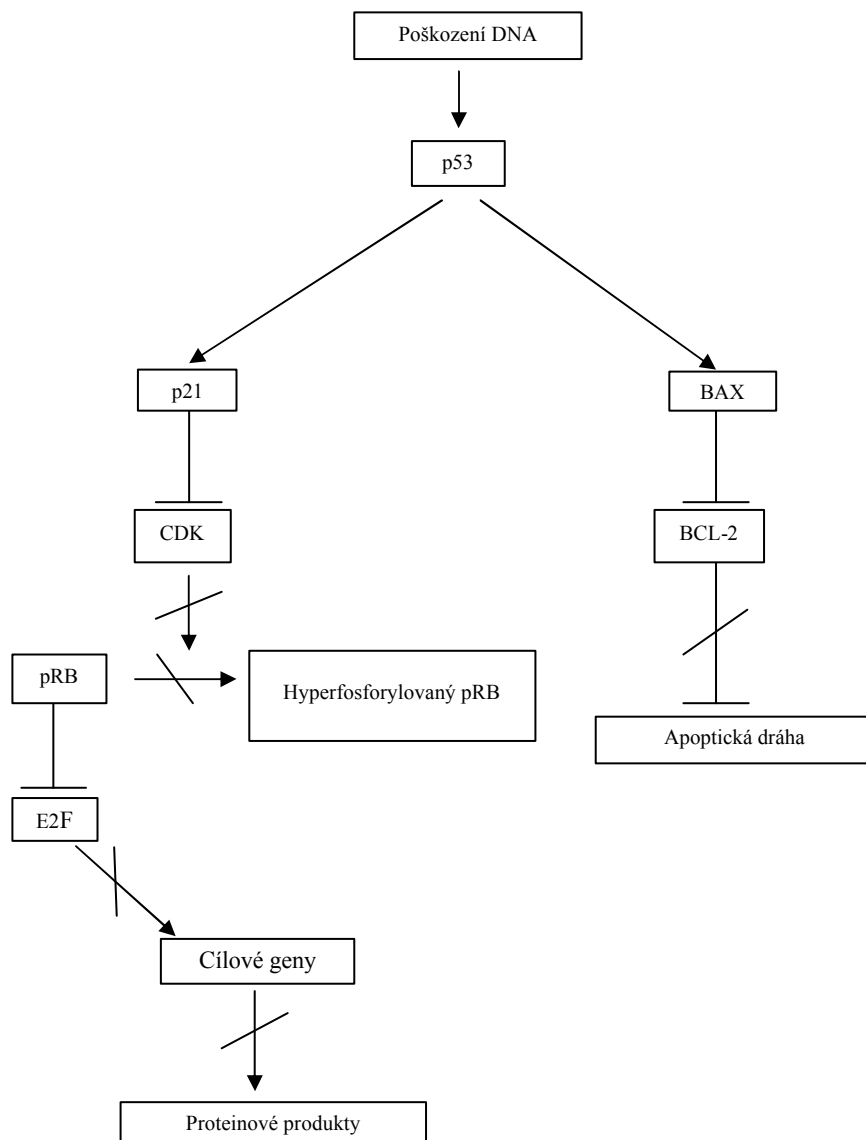
2.2 Akutní lymfoblastická leukémie

Akutní lymfoblastická leukémie je maligní lymfoproliferativní onemocnění, projevující se proliferací nevyzrálých blastů a jejich kumulací v kostní dřeni. Blasty mají schopnost dělení, avšak nedochází u nich k diferenciaci a zrání, čímž ztrácí svou funkčnost. Normální hematopoéza je tak suprimována (Kebriaei et al., 2003). Maligní blasty jsou primárně přítomny v kostní dřeni a periferní krvi, ale mohou se rozšířit i do ostatních orgánů, především centrální nervové soustavy, a tím poškodit jejich funkci.

ALL postihuje pacienty převážně v dětském věku. U dospělých se vyskytuje zřídka, avšak incidence stoupá u pacientů nad 50 let (viz Obrázek 4).

U pacientů s ALL můžeme nalézt v blastech kostní dřene získané cytogenetické změny. Jsou to translokace, delece, aneuploidie i amplifikace. Tyto strukturní a početní abnormality mohou vést ke vzniku maligní transformace a dají se také využít k určení prognózy nebo ke sledování průběhu nemoci a k monitorování účinnosti terapie. Cytogenetické nálezy a prognóza se liší v závislosti na věku (Moorman et al., 2010b).

Obrázek 3 Signální dráha proteinu p53

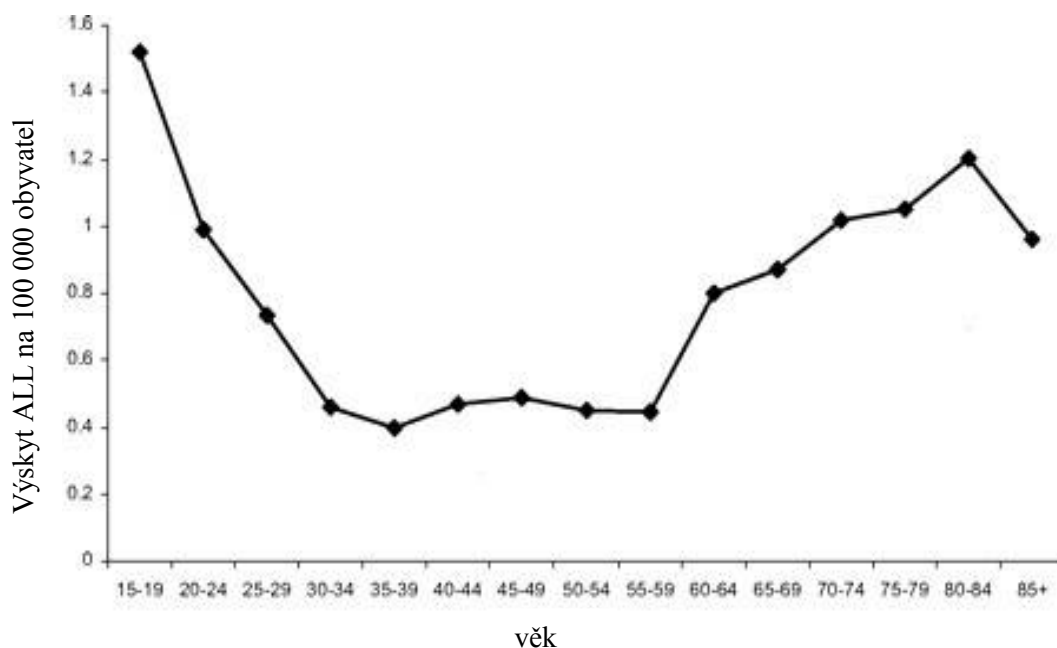


A) p53 funguje jako transkripční faktor pro p21, p21 inhibuje fosforylační aktivitu CDK, která nemůže fosforylovat pRB následkem čehož nedochází k fosforylaci dalších transkripčních faktorů potřebných pro pokračování buněčného cyklu

B) v apoptické dráze působí p53 jako transkripční faktor genu BAX, ten funguje jako antagonist blokátorového genu pro apoptózu Bcl-2, pokud není přítomen produkt genu BAX, nemůže dojít k navození apoptózy

Převzato a upraveno dle Snustad et al., 2009

Obrázek 4 Incidence ALL



Převzato a upraveno Moorman et al., 2010a

Pacienti s ALL se dělí do několika skupin dle cytogenetického nálezu, který koreluje s prognózou. Jedná se o strukturní aberace nebo numerické změny.

K nejvýznamnějším strukturním aberacím patří například translokace $t(12;21)(p13;q22)$, která je spojena s dobrou prognózou. Naopak, nález $t(9;22)(q34;q11)$ a přestavba genu *MLL* v oblasti 11q23, patří mezi nepříznivé faktory (Kebriaei et al., 2003).

Nejčastějším nálezem u dětí s ALL je tzv. hyperdiploidie s počtem chromosomů >46 , jenž je považován za příznivý prognostický faktor. Výjimku tvoří malá skupina pacientů s téměř triploidním/tetraploidním karyotypem. Zde se hovoří o špatné prognóze. Opačný stav, tedy hypodiploidie, kdy v jádrech nalézáme méně jak 46 chromosomů, je spojena se špatnou prognózou. Horší prognózu mají i pacienti, kteří kromě klasické hyperdiploidie mají ještě další strukturní přestavby v hyperdiploidním klonu (Zemanová et al., 2005). Proto včasná detekce sekundárních chromosomových aberací je důležité pro správné stanovení prognózy a zařazení nemocných do prognostické skupiny.

Vznik rakovinové buňky je vícestupňový děj, jak je zmíněno výše. I když vývoj a vznik leukémie není zcela znám, je jasné, že se jedná o kumulaci několika zásahů

do progenitorové buňky. Může se jednat o vystavení buňky fyzikálním či chemickým činidlům v kombinaci s poškozením chromosomového materiálu. Je možné, že pro vznik rakoviny z hematopoetických buněk stačí jedna mutace (Greenman et al., 2007) v genu zásadně ovlivňující buněčný cyklus a funkci těchto buněk.

U dětské akutní lymfoblastické leukémie se zdá, že k prvnímu zásahu může docházet již v prenatálním období během fetální hematogenese (Greaves, 2005; Zuna et al., 2011). Faktory, které mohou způsobovat tuto iniciaci, nejsou zatím zcela známy (Eden, 2010). Navíc se zdá, že vznik leukémie a mutace *in utero* je individuální děj, který je u každého pacienta spuštěn jinými agens v závislosti na genotypu, na funkci imunitního systému a na vnějším prostředí.

2.2.3 Přestavby *MLL* genu

Gen *MLL* (mixed-lineage leukemias) je lokalizován v oblasti 11q23. Zlom a translokace v tomto genu nalézáme často i u jiných typů leukemií jako například u akutní myeloidní leukémie nebo u myelodysplastických syndromů. Do dnešní doby bylo popsáno více jak 60 fúzních partnerů korelujících s prognózou a fenotypem onemocnění (Bernt et al., 2011). Translokaci tohoto genu nacházíme až u 70 % dětských pacientů s leukémiemi do 1 roku věku (Pui et al., 1995; Biondi et al., 2000).

Tyto přestavby bývají spojeny s velmi špatnou prognózou (Tirado et al., 2007). Akutní leukémie s nálezem přestavby genu *MLL* je onemocnění s rychlým nástupem brzy po narození dítěte (Marschalek, 2010). U starších dětí s ALL se incidence snižuje, prognóza ovšem zůstává stejná.

Gen *MLL* má mnoho fúzních partnerů. Nejčastěji se u B-ALL jedná o kryptickou translokaci t(4;11)(q21;q23). Při této translokaci dochází k fúzi genů *AF4* na dlouhých ramenech chromosomu 4 a genu *MLL* na dlouhých ramenech chromosomu 11. Dochází k expresi fúzních proteinů z obou chromosomů. Translokace mezi těmito geny může narušit regulaci exprese genů, které řídí protein *MLL* nebo je možné, že fúzní proteiny získávají regulační aktivitu pro transkripci (Von Berg et al., 2001). Ze studia dvojčat víme, že tato translokace vzniká *in utero*, ovšem účinky fúzního genu na hematopoézu v prenatálním věku nejsou zatím přesně známy (Bueno et al., 2012).

2.2.4 Translokace t(12;21)(p13;q22)

Translokace t(12;21)(p13;q22), při které vzniká fúzní gen *ETV6/RUNX1* (starší název *TEL/AML1*) je jeden z nejčastějších nálezů u dětské B-ALL, nacházíme ji u 25-30 % dětských ALL (Alvarez et al., 2007). Jedná se o kryptickou aberaci, která není zachytitelná běžnou cytogenetickou metodou. Proto byla tato translokace objevena až po zavedení metody FISH v roce 1994.

ETV6/RUNX1 pozitivních buňkách můžeme nalézt ještě další změny zahrnující chromosomy 12 a 21. Jedná se především o ztrátu netranslokované *TEL* respektive *ETV6* alely, duplikaci derivovaného chromosomu 21 nebo přítomnost nadpočetné alely *RUNX1* genu. Tyto sekundární změny pravděpodobně zpřičinují progresi *TEL/AML* pozitivní ALL a kombinace sekundárních aberací zvyšuje riziko relapsu onemocnění (Pais et al., 2008). (Peter et al., 2009).

Fúze genů ležících na chromosomech 12p12 (*ETV6*) a 21q22 (*RUNX1*) byla objevena u několika párů monozygotických dvojčat s akutní lymfoblastickou leukémií (Ford et al., 1998). To znamená, že translokace může vznikat již během vývoje *in utero* (Broadfield et al., 2004).

2.2.5 Philadelphský chromosom

Philadelphský chromosom (Ph) byl vůbec prvním popsáním cytogenetickým markerem maligního onemocnění. Nález translokace t(9;22)(q34;q11) je typický pro diagnózu chronické myeloidní leukémie (CML), vyskytuje se až u 95% nemocných s tímto onemocněním. Vzácně se vyskytuje i u dětí s ALL (3-5% nemocných), jeho incidence u pacientů s ALL však stoupá s věkem (Fletcher et al. 1991). Při této translokaci dochází k fúzi genu *ABL* v pozici 9q34 s genem *BCR* v pozici 22q11. 5' konec genu *ABL* se translokuje na 3' konec genu *ABL*. Tím vzniká chimérický protein BCR/ABL se zvýšenou tyrosin-kinázovou aktivitou, která je součástí intracelulární signalizační dráhy.

V nedávné době byly vyvinuty látky, které dokážou selektivně blokovat tuto aberantní kinázu. Jejich účinnost v kulturách *in vitro* byla až 98 % (Druker et al., 1996).

Inhibitory abl kinázy dali vzniknout preparátu Glivec®, který obsahuje účinnou látku imatinib mesylát. Jedná se o první lék, který je zaměřený přímo na rakovinové buňky.

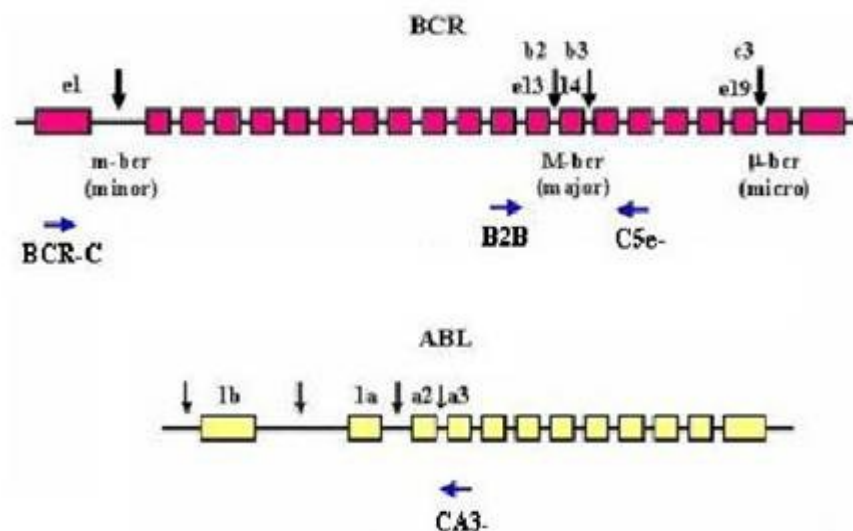
Pacienti s ALL byli dříve léčeni chemoterapií a alogenní transplantací (Hunger, 2011). Dnes se k léčbě využívá výše zmíněný Glivec®, kterým se původně vyvinut pro léčbu pacientů s chronickou myeloidní leukemií.

U Ph chromosomu nalzáme dvě hlavní zlomová místa v genu *BCR*. U nemocných s CML ve většině případů nalzáme zlom v tzv. *major breakpoint cluster region* (M-bcr). V tomto případě vzniká protein o molekulové hmotnosti 210 kDa. (Mrózek et al., 2004).

U dětí s ALL ve většině případů nalzáme translokaci t(9;22) se zlomem v genu *BCR* na tzv. *minor breakpoint cluster region* (m-bcr) (viz Obrázek 5). Toto zlomové místo leží v prvním intronu genu *BCR*. Při fúzi vzniká protein o molekulové hmotnosti 190 kDa (Suryanarayan et al., 1991). V obou případech se gen *ABL* translokuje na gen *BCR* v místě zlomu, tj. na druhý exon (Suryanaravan et al., 1991).

Děti s nálezem Ph chromosomu s diagnosou ALL mají velmi špatnou prognózu. Při jejich léčbě se v případě nálezu vhodného dárce přistupuje k transplantaci kostní dřeně (Fletcher et al., 1991).

Obrázek 5 Schéma genu *BCR* a *ABL*



Převzato z Yaghmaie et al., 2007

2.2.6 Duplikace dlouhých ramen chromosomu 1

Chromosom 1 představuje s 220 miliony párů bází největší lidský chromosom. Strukturální přestavby na chromosomu 1 nejsou u maligních onemocnění neobvyklé a vyskytují se u různých typů nádorů. Jedná se jak o translokace, tak o delece či amplifikace zasahující celá ramena chromosomu, nebo jen určitou část (Chan et al., 2002).

Parciální trisomie dlouhých ramen chromosomu 1 je v literatuře popisována jako jediná změna v karyotypu zejména u myelodysplastických syndromů (Solé et al., 2000), akutní myeloidní leukémie, Burkittova lymfomu a ALL (Onodera et al., 1992). U těchto nemocí se parciální trisomie 1q uvádí jako špatný prognostický faktor.

Význam parciální trisomie oblasti 1q u hematologických malignit zatím není objasněn (Djordjevic et al., 2008). V oblasti 1q21.2 jsou lokalizovány 3 potenciální protoonkogeny: *OTUD7B*, *SF3B4* a *MTMR11* (La Starza et al., 2007).

U hyperdiploidních klonů se duplikace dlouhých ramen chromosomu 1 vyskytuje jako nejčastější strukturální přestavba (Paulsson et al., 2010).

2.2.7 Hyperdiploidie

Nejpočetnější skupinou mezi pacienty s ALL jsou pacienti s hyperdiploidii (35-45 %). Jedná se o stav, při kterém dochází ke klonálnímu zmnožení jednoho nebo více chromosomů. V jádře se tak vyskytuje více než 46 chromosomů. Dle počtu chromosomů můžeme rozdělit pacienty do několika skupin lišících se svojí prognózou (viz Tabulka 1).

U jedné třetiny (Ritterbach et al., 1998) pacientů nalézáme buňky tzv. vysokou hyperdiploidii (HeH, z anglického high hyperdiploidy), kdy se počet chromosomů pohybuje v rozmezí 51-67 (Heerema et al., 2007). Malou a málo prozkoumanou skupinou pacientů jsou děti s tzv. near-triploidy/tetraploidy (méně než 1% dětí s ALL), kteří mají více než 65 chromosomů. Ke vzniku takovýchto buněk by mohlo docházet náhodnou nondisjunkcí při buněčném dělení (Mkrtychyan et al., 2010).

Tabulka 1 Rozdělení aneuploidií u dětských ALL

Typ aneuploidie	modální počet chromosomů	Frekvence %	Prognóza
Téměř haploidie	22-29	0,5	Špatná
Nízká hypodiploidie	33-39	0,8	Špatná
Vysoká hypodiploidie	42-45	5	Středně dobrá
Nízká hyperdiploidie	47-50	15	Dobrá
Vysoká hyperdiploidie	51-68	25-30	Velmi dobrá
Tri/tetraploidie	68>	1	Nejasná/ spíše špatná

Upraveno dle: Ritterbach et al., 1998; Harrison et al., 2004; Nachman et al., 2007

V porovnání s ostatními cytogenetickými nálezy mají pacienti s vysokou hyperdiploidií velmi dobrou prognózu. Zmnožení jednotlivých chromosomů není v hyperdiploidních buňkách náhodné (Heerema et al., 2007; Paulsson et al., 2009). Nejčastěji jsou zmnoženy chromosomy X, 4, 6, 8, 10, 14, 17, 18, 20 a 21. Hyperdiploidie může vznikat během jednoho abnormálního buněčného dělení, popřípadě zdvojením (endoreduplikací) určitých chromosomů v haploidních buňkách. Nejčastěji bývá zmnožen chromosom 21, který se vyskytuje i ve 4 kopiích.

Pacienti s nálezem hyperdiploidního klonu mají dobrou prognózu. Proč tomu tak je, však není zatím zcela jasné. Jedním z možných vysvětlení je, že buňky

s hyperdiploidním počtem chromosomů mají více genetického materiálu, proto jim replikace trvá delší dobu. Z toho důvodu se více buněk nachází v S-fázi (Look et al., 1982), a to je právě kritické období, ve kterém jsou buňky citlivé na léčbu.

Další vysvětlení souvisí s chemoterapií na bázi metotrexátu¹ (MTX). V leukemických blastech je zvýšené množství MTX díky zvýšené expresi genu RFC (Reduced Folate Carrier) (Belkov et al., 1999). RFC slouží jako přenašeč metotrexátu do buněk, kde dochází k jeho přeměně na polyglutamát, který inhibuje enzymy potřebné pro *de novo* syntézu purinů nezbytných k replikaci. Gen pro RFC leží na chromosomu 21, který se u vysoké hyperdiploidie vyskytuje i ve 4 kopiích.

Jiným možným vysvětlením by mohlo být, že leukemické buňky s vyšším počtem chromosomů než 50, by mohli mít vyšší sklon k apoptóze (Ito et al., 1999).

I přes dobré vyhlídky pacientů s hyperdiploidii se přibližně u jedné čtvrtiny zdravotní stav během léčby zhorší (Moorman et al., 2003). Tato skupina pacientů by měla být dále vyšetřována, aby se zjistila příčina zhoršení stavu pacienta a aby se mohla zvolit lepší (cílená) terapie.

2.2.8 Hypodiploidie

Hypodiploidie, je stav, při kterém jádro buňky obsahuje 45 a méně chromosomů. Děti s hypodiploidním počtem chromosomů mají velmi špatnou prognózu (Raimondi et al., 2003). Incidence tohoto onemocnění je u dětí 6 % (Harrison et al., 2004). Většina pacientů s hypodiploidii má ve svém jádře 45 chromosomů. Nemocní s méně než 45 chromosomy mají podstatně horší prognózu (Nachman et al., 2007). Pokud se v jádře nachází 23-29 chromosomů, mluvíme o tzv. near haploidii, která je rovněž asociována s velmi špatnou prognózou. Incidence takového nálezu je přibližně 0,5 %.

U některých pacientů s hypodiploidním klonem se setkáváme s druhou linií patologických klonů, u které došlo k endoreduplikaci haploidního klonu a vznikl tak hyperdiploidní klon (Ma et al. 1998, Harrison et al., 2004). Mluvíme o tzv. maskované hypodiploidii.

¹ Metotrexát je antimetabolit působící především na buňky v S fázi. Blokuje syntézu a buněčnou replikaci. Využívá se při léčbě rakovinového bujení

Špatná prognóza u dětí s hypodiploidii by měla indikovat agresivnější protokol léčby než u pacientů s hyperdiploidii a ostatními prognosticky dobrými nálezy (Harrison et al., 2004, Raimondi et al., 2003).

2.3 Cytogenetické a molekulárně cytogenetické metody

Leukemické buňky pro vyšetření chromosomů získáváme nejčastěji z kostní dřeně. V případech, kdy není možné buňky kostní dřeně získat, můžeme využít i odběr venózní krve, pokud dochází k infiltraci leukemických buněk do periferního oběhu.

Cílem cytogenetického vyšetření, je určit karyotyp, popřípadě identifikovat jeho změny. Při vyšetření nádorových buněk hledáme změny karyotypu, které jsou získané. Nevyskytují se tedy ve všech buňkách, ale pouze v určitém buněčném klonu z nádorové tkáně.

Jednotlivé páry chromosomů se od sebe liší svou morfologií a pruhováním (v našem případě G-pruhy). Znalost struktury a vzhledu pruhování jednotlivých chromosomů je základem úspěchu při stanovení karyotypu.

Některé aberace nejsou vidět při zobrazení lidského karyotypu pomocí klasického G-pruhování, taková jádra se nám jeví jako normální, tedy 46,XX popř. 46,XY. Ovšem při použití molekulárně cytogenetických metod, jako je mBAND nebo mFISH můžeme pozorovat kryptické přestavby, které mohou hrát důležitou roli při vzniku rakoviny.

Naopak některé změny jsou pozorovatelné hned na první pohled, jde jednak o početní odchylky, ale i o složité a rozsáhlé přestavby. V takovém případě mluvíme o tzv. komplexním karyotypu, který je definován jako karyotyp s numerickými nebo strukturními přestavbami, které zahrnují tři a více chromosomů a/nebo přestavby se třemi a více chromosomálními zlomy.

Cytogenetické nálezy jsou silnými a nezávislými faktory určující prognózu pacienta a vznik relapsu onemocnění (Moorman et al., 2010b).

2.3.1 Příprava buněk pro cytogenetické vyšetření

Chromosomy buněk pro metafázní FISH (fluorescenční *in situ* hybridizace) a cytogenetickou metodu musí být ve fázi metafáze. Pro zastavení buněk v mitóze

se přidává ke kultuře, ze které chceme buňky izolovat, inhibitor růstu mikrotubulů kolcemid či kolchicin, který poruší dělicí vřetenko a zastaví dělení buněk.

Takto ošetřené buňky je třeba hypotonizovat. Po přidání chloridu draselného (0,075M) dojde k nabobtnání buňky a narušení buněčných membrán. Chromosomy uvnitř jádra se více rozestoupí, což ulehčí následné vyhodnocení vzorku.

Buňky je třeba fixovat metanolem a kyselinou octovou v poměru 3:1. Nakonec se suspenze buněk kape na podložní sklo.

2.3.2 G-pruhování

G-pruhování je metoda, kterou lze identifikovat jednotlivé chromosomy na základě jejich pruhování, které je typické pro každý chromosomový pár. Při G-pruhování se chromosomy nejprve vystaví působení trypsinu nebo SSC a následně se barví Giemsou nebo Wrightovým barvivem.

U dětských hematologických malignit je výsledek a možnost cytogenetického vyšetření značně omezena nižší *in vitro* proliferací u nádorového klonu, nízkým mitotickým indexem popř. špatnou kvalitou hodnocených mitóz (Ritterbach et al., 1998, Zemanová et al., 2001).

Při stanovení karyotypu leukemických buněk se používají metafázní chromosomy, které obsahují 400-450 pruhů v haploidní sadě. Při vyšetření stanovujeme karyotyp nejlépe u 22 mitóz. Tato metoda dokáže odhalit početní odchylky, ale i translokace, delece, inverze či amplifikace, pokud jsou v dostatečně velkém rozsahu a nad úroveň rozlišovací schopnosti této metody.

Senzitivita této metody závisí na kvalitě hodnocených mitóz a pohybuje se kolem 10 Mb. V dnešní době existují více citlivá a méně časově náročná molekulárně-cytogenetické metody, kterými je možné určit zlomová místa, původ chromosomů zapojených do strukturních přestaveb, nebo detekovat kryptické aberace a patologické klony, které konvenční cytogenetická analýza nezachytí.

2.3.3 Fluorescenční *in situ* hybridizace

Molekulárně cytogenetické metody se začaly vyvíjet v 80. letech minulého století. Tyto metody přinesly lepší rezoluční schopnosti a tím pomohly k odhalení a pochopení genetického pozadí mnoha nemocí.

Fluorescenční² *in situ* hybridizace (FISH) je metoda založená na schopnosti molekuly DNA denaturovat při teplotách mezi 90-100°C, kdy dojde k přerušení vodíkových vazeb mezi komplementárními vlákny DNA, čímž se vlákna oddělí. Po odeznění denaturačních podmínek molekuly tzv. renaturují, znovu se vytvoří vodíkové můstky mezi bázemi jednořetězcových molekul DNA.

Při renaturaci dvou molekul různého původu (vyšetřovaná molekula z odebraného materiálu a značená sonda) hovoříme o hybridizaci. Při hybridizaci se využívá fluorescenčně značených, tzv. DNA sond, což jsou úseky DNA o známé sekvenci, které jsou nejčastěji značeny přímo různými fluorofory.

Sondy s vyšetřovanou DNA se po denaturaci smíchají a nechají hybridizovat při teplotě stanovené výrobcem přibližně 16 h. Před samotnou vizualizací vzorku ve fluorescenčním mikroskopu je třeba vymýt přebytečnou sondu pomocí série mycích roztoků. Dále je potřeba obarvit chromatinový materiál pomocí tzv. DAPI (4,6-diamidino-2-fenolindol).

V rutinní praxi se nejčastěji využívá tří typů DNA sond. Jedná se o sondy rozpoznávající repetitivní sekvence (telomerické, centromerické), sondy tzv. malovací (celochromosomové) a sondy lokus specifické (viz Obrázek 6). Každá sonda má své využití pro detekci různých typů aberací.

Sondy centromerické, vázající se k vysoce repetitivním sekvencím tzv. alfa nebo beta-satelitní DNA v oblasti lidských centromer, se využívají pro stanovení počtu chromosomů v buňce. Dle počtu signálů můžeme posoudit, jestli se jedná o buňky

² Fluorescence se projevuje jako záření vyvolané dopadajícími částicemi nebo jiným zářením. Při adsorpci energie z tohoto záření se zvětší energie atomu a jeho elektrony přejdou do vzdálenějších orbitalů, nachází se v tzv. excitovaném stavu. Po krátké době se ale elektron vrátí do původního orbitalu a přebytečná energie je vyzářena ve formě fotonu.

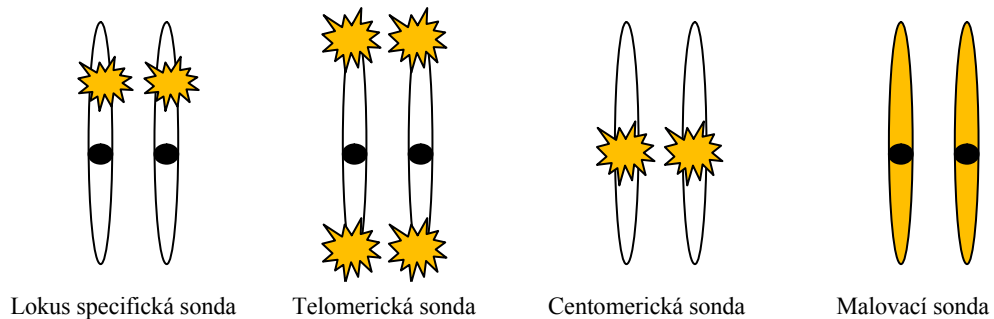
polyploidní, aneuploidní či s normálním počtem chromosomů. Tyto sondy se používají v metafázních i interfázních buňkách.

V onkogenetice mají význam také pro vyšetření buněk u pacienta, kterému byla transplantována kostní dřeň od dárce opačného pohlaví. V tomto případě použijeme centromerické sondy X a Y. Centromerická sonda ovšem neodhalí strukturní přestavby daného chromosomu.

Sondy celochromosomové obsahují sekvence z celých chromosomů. Obzvláště přínosné jsou pro identifikaci chromosomových translokací zahrnujících více chromosomů, které se objevují u nádorových onemocnění.

Lokus specifické sondy se používají k přímé lokalizaci genu na chromosomu, ale jsou užitečné i v případě detekce delecí, amplifikací, translokací či inverzí. Stejně jako u centromerických sond, je jejich využití možné jak u metafázních, tak u interfázních buněk.

Obrázek 6 Sondy pro FISH



Fluorescenční *in situ* hybridizace se v klinické praxi využívá jako doplněk cytogenetických metod. Díky lepšímu rozlišení jsme schopni určit přesnější rozsah změn a přestaveb. V onkogenetice pomáhají tyto metody vyhodnotit účinky léčby, úspěšnost transplantace kostní dřeně a vliv ozařování na pacienty (Michalová et al., 2005).

Přes všechny výhody má tato metoda jistá negativa. Pro správný výsledek a interpretaci je nutné před vyšetřením mít představu o možných abnormalitách, aby byla vhodně vybrána sonda nebo molekulární metoda, kterou chceme použít.

Jedná se tedy o cílené vyšetření. Před indikací k vyšetření metodou FISH je potřeba mít výsledky z klasické cytogenetické analýzy. Kromě toho lze FISH využít při monitorování úspěšnosti chemoterapie či transplantace kostní dřeně.

2.3.4 mFISH

Nevýhodou klasické FISH je, že umožňuje pouze cílenou detekci určité aberace za použití specifické sondy. Proto je nezbytné předem vědět, jakou aberaci či početní odchylku hledáme, popřípadě, které by se u pacienta mohly vyskytovat. Metody mnohobarevné FISH (mFISH) a SKY (spectral karyotyping) umožňují vizualizaci každého lidského chromosomu díky přesně stanovenému emisnímu spektru (Schröck et al., 1996). Tyto metody využívají panel několika různě značených malovacích sond, jejichž kombinací jsme schopni označit všechny lidské chromosomy během jediné hybridizace.

K tomu, abychom byli schopni zobrazit všechny chromosomy jinou barvou, využíváme sondy značené různým počtem fluoroforů, které ve výsledku dávají různé barvy. Použijeme fluorescenčního mikroskopu s několika filtry, CCD kamery (charge coupled device) a počítačového programu pro vyhodnocování FISH. Barva každého z chromosomů je dána vlnovou délkou emitovaných fotonů, software vyhodnotí informace a dle kombinace fluoroforů přiřadí chromosomům tzv. klasifikační barvu, hovoříme o tzv. pseudobarvení (Macville et al., 1997). Během jedné hybridizace můžeme analyzovat všechny chromosomy, což je velkou výhodou této metody.

Smícháním n počtu fluoroforů získáme $2^n - 1$ barevných kombinací. Pro lidský karyotyp obsahující 22 párů autosomů a dva gonosomy (24 různých chromosomů) stačí zkombinovat 5 fluoroforů v různých poměrech (viz Obrázek 7) (MetaSystems).

mFISH je metoda vhodná pro detekci kryptických aberací v metafázním jádře, určení původu marker chromosomů, k analýze komplexních přestaveb, detekci nebalancovaných translokací. Naopak méně vhodná je pro zjišťování duplikací, inverzí či delecí (intrachromosomových aberací). Rezoluční schopnost metody mFISH jsou 3 Mb (MacKinnon et al., 2011), můžeme tedy zachytit i kryptické aberace, přehlédnutelné metodou G-pruhování.

Obrázek 7 Kombinace fluoroforů pro metodu mFISH

chr.	DEAC	FITC	CpeOra	TexRed	Cy5
1					Yellow
2	Blue				
3				Pink	
4		Green			
5			Red		
6		Green			Yellow
7	Blue				Yellow
8				Pink	Yellow
9			Red		Yellow
10	Blue	Green			
11		Green		Pink	
12		Green	Red		
13	Blue			Pink	
14	Blue		Red		
15			Red	Pink	
16	Blue	Green			Yellow
17		Green		Pink	Yellow
18		Green	Red		Yellow
19	Blue			Pink	Yellow
20	Blue		Red		Yellow
21			Red	Pink	Yellow
22	Blue	Green		Pink	
X	Blue	Green	Red		
Y	Blue		Red	Pink	

Poměry značených sond pro jednotlivé chromosomy dle MetaSystems

2.3.5 mBAND

Mnohobarevná FISH dokáže odhalit početní odchylky i strukturní přestavby chromosomů. Nedokáže ovšem přesně určit pericentrické a paracentrické inverze a přesně lokalizovat zlomové místo na chromosomu (Chudoba et al., 1999). Proto byla vyvinuta pruhovací metoda (mBAND), která je založena na použití různě značených sond pro různé úseky téhož chromosomu, které se vzájemně překrývají (viz Obrázek 8), a které jsou označeny pomocí některého z pěti fluoroforů. Na základě měření intenzity fluorescence jednotlivých úseků a za použití sofistikovaného softwaru, který přiřazuje pseudo-barvy k úsekům podobné intenzity, získáme obraz chromosomu (Chudoba et al., 1999).

Klasickou cytogenetickou analýzou je v závislosti na kvalitě hodnocených mitóz obtížné přesně určit zlomová místa na chromosomech zahrnutých ve strukturních přestavbách. Mnohobarevná pruhovací technika je schopna identifikovat zlomová místa v komplexním karyotypu (Chudoba et al., 2004). Podmínkou pro úspěšný výsledek jsou stejně jako v případě využití metody mFISH kvalitně rozložené metafázní chromosomy.

Obrázek 8 Schéma sondy pro mBAND pro chromosom 1

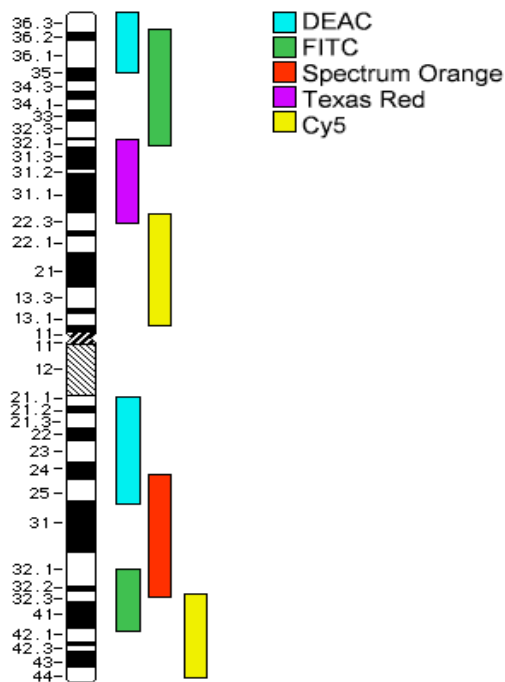


Schéma dle firmy MeteSystems

2.3.6 array CGH

Array CGH (neboli komparativní genomová hybridizace na čípech) je technologií, díky které můžeme zhodnotit velké množství genů a úseků DNA. Je založena na podobném principu jako klasická komparativní genomová hybridizace (CGH). Tato metoda porovnává intenzitu 2 různých fluoroforů, kterými je značena referenční a vyšetřovaná DNA. CGH se aplikuje na metafázní chromosomy. Při array CGH jsou chromosomy nahrazeny krátkými úseky DNA imobilizovanými na čipu (Solinas-Toldo et al., 1997).

Čipy jsou upravené skleněné destičky, na kterých jsou natištěny BAC nebo oligonukleotidové sondy. BAC, neboli Bacterial Artificial Chromosomes, jsou dlouhé přibližně 300 kb. V případě hematočipů jsou zde především úseky zahrnující geny spojené hematologickým maligním onemocněním.

Principem metody je naznačení vyšetřované a referenční DNA (normální DNA ze zdravého dárce) rozdílnými fluorofory (Cy3 a Cy5). Takto značené DNA se smíchají do jedné hybridizační směsi společně s lidskou Cot-1 DNA a nechají se hybridizovat na čip.

Skenováním čipu dostaneme data s výsledky hybridizace, které zhodnotíme pomocí počítačového programu, který porovná poměr fluorescence z vyšetřované DNA (Cyt5) a z referenční DNA (Cyt3) (Wadlow et al., 2005). Výsledky záleží především na čistotě a kvalitě značené DNA.

Touto metodou můžeme sledovat ve vysokém rozlišení pouze nebalancované změny v genomu. To jsou takové, které jsou spojeny se ztrátou (delece) nebo naopak získkem genetického materiálu (Shaffer et al., 2007). Výsledky z čipů nejsou v kontextu se strukturou chromosomu, nedokážeme tedy říci, jestli došlo k amplifikaci či delecii v důsledku jiné strukturní přestavby (translokace) (MacKinnon et al., 2011). Čip je schopen zachytit nebalancovanou změnu, která se nachází minimálně v 30 procentním klonu.

Díky vysoké rozlišovací schopnosti této metody, přibližně 100kb (Vissers et al., 2007), jsme schopni detekovat strukturní aberace, které nebyly zachyceny klasickými cytogenetickými a FISH metodami. S pomocí array CGH můžeme přesně určit zlomová místa a rozsah delecí a zmnožení genetického materiálu.

Pouze kombinací výše uvedených technik, získáme ucelený přehled o karyotypu vyšetřených pacientů.

3 Cíl práce

Na základě hypotézy: sekundární strukturní aberace zvyšují riziko vzniku relapsu u nemocných s prognosticky příznivými specifickými změnami, jsme si vytyčili následující cíle:

- sledovat změny v genomu leukemických buněk u nově diagnostikovaných dětí s ALL pomocí molekulárně cytogenetických metod (I-FISH, mFISH/mBAND a array CGH)
- u pacientů s prokázanou hyperdiploidíí podrobně analyzovat karyotyp za použití kombinace mFISH/mBAND a array CGH a sledovat frekvence nenáhodných a opakujících se strukturních aberací v hyperdiploidních buňkách
- posoudit, zda sekundární chromosomové aberace zvyšují riziko vzniku relapsu u nemocných s prognosticky příznivými specifickými změnami

4 Materiál

Vyšetřili jsme 232 vzorků kostní dřeně odebraných pacientům při diagnóze ALL v letech 1997-2012. Vzorky byly odebrány ve Fakultní nemocnici Motol na klinice Dětské hematologie a onkologie. Jednalo se o 88 dívek a 144 chlapců. Průměrná doba sledování (follow up) je 78,5 měsíců. Pacienty jsme rozdělili do skupin dle modálního počtu chromosomů (viz Tabulka 2). V našem souboru jsou zahrnuti pouze pacienti bez nálezů t(9;22), t(12;21) a přestaveb genu *MLL*.

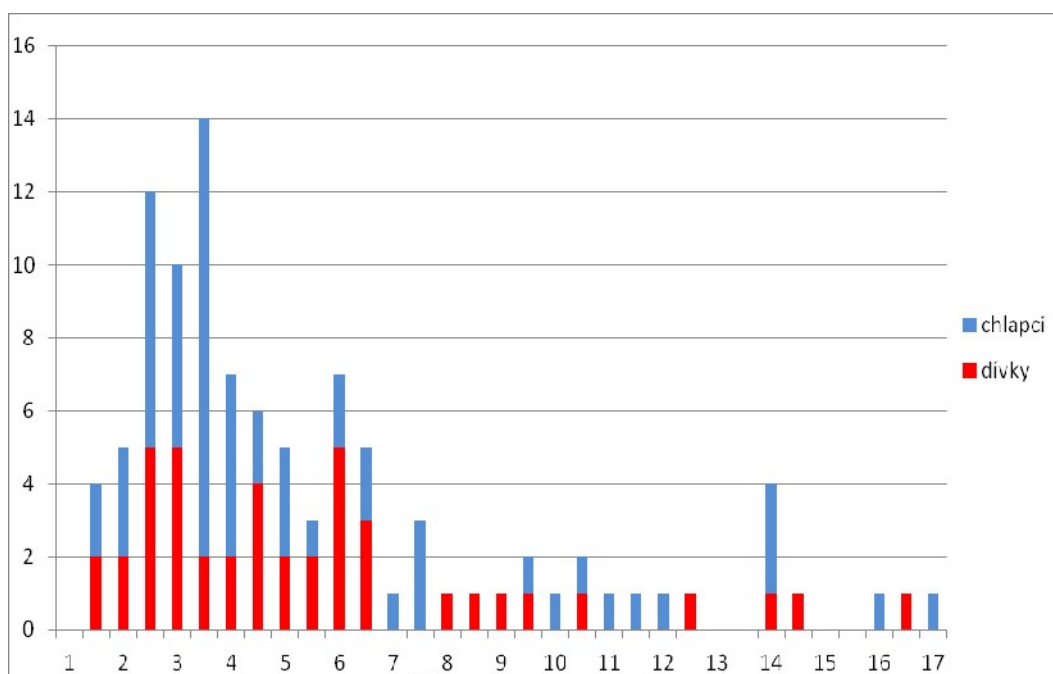
Detailně jsme se zaměřili na 102 dětí s potvrzenou vysokou hyperdiploidií, v této skupině bylo 43 dívek a 59 chlapců s průměrným věkem 5,6 let (viz. Graf 1).

Medián věku těchto pacientů je 4,1 let. Velikost nalezeného klonu s hyperdiploidním počtem chromosomů se pohybovala od 5 do 100 % (průměr 74 %, medián 84 %).

Tabulka 2 Rozložení pacientů dle modálního počtu chromosomů

Skupina	Procentuální zastoupení	Absolutní počty
Bez prokázané hyperdiploidie	42,7%	99
Nespecifikovaná hyperdiploidie (He)	3,9%	9
Nízká hyperdiploidie (HeL)	8,2%	19
Vysoká hyperdiploidie (HeH)	43,9 %	102
Tri/tetraploidie (TT)	1,3%	3
		232

Graf 1 Rozložení pacientů dle věku



4.1 Laboratorní technika pro klasickou cytogenetiku, FISH a array CGH

Agilent High-Resolution Microarray Scanner Bundle, G2565CA (Agilent, USA)

Biohazard třída II., EQU/04-EBC-2A (ESCO, Singapur)

Biologický termostat 37°C, BT 120 (LAB system, Česká Republika)

Centrifuga, Rotina 380 R (HettichLab, Německo)

Digestoř s ventilátorem, CK250C (Multivac Pardubice, Česká Republika)

Histologická plotýnka, MEDAX 12801 (Nagel GmbH, Německo)

Hybridizační blok, HYBrite (Vysis, USA), ThermoBrite (Vysis, USA)

Hybridizační stanice TECAN HSpro 4000 (Tecan, Švýcarsko)

Metafer/Metacyte, software pro vyhledávání buněk a mitóz a pro počítání fluorescenčních signálů (MetaSystems, Německo)

Microcentrifuga, SD 220VAC (Carl Roth, Německo)

Mikroskop fluorescenční s příslušenstvím, AXIOPLAN 2 Imaging (Carl Zeiss, Německo)

NanoQuant infinite M200 (Tecan, Švýcarsko)

Počítačová analýza obrazu, software pro karyotypování, IKAROS (MetaSystems, Německo)

Počítačová analýza obrazu, software pro FISH a mFISH/mBAND, ISIS (MetaSystems, Německo)

Spektrofotometr (Eppendorf, Německo)

Stolní laboratorní váhy, AND GX-200-EC (AD Instruments, Japonsko)

Světelný mikroskop, Axioskop (OPTON, Německo)

Termocykler, GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, USA)

Vodní lázeň, 30-80 °C, (Techne, Velká Británie)

Vortex (Biotech International, Německo)

VP 2000, automat pro mytí preparátů pro metody FISH (Abbott, USA)

4.2 Chemikálie a roztoky pro klasickou cytogenetickou analýzu

Chemikálie:

0,075 M KCl (lékárna VFN)

Kyselina octová (Penta)

0,2 M HCl (lékárna VFN)

L-glutamin (lékárna VFN)

Fetální telecí sérum (Sigma)

Metanol (Penta)

Fytohemaglutinin (Murex)

Na₂HPO₄ · 2 H₂O (Fluka)

Giemsa solution (Merck)

Olej imerzní (Zeiss)

Heparin (Léčiva)

PBS (lékárna VFN)

KH₂PO₄ (Lachema)

Penicilin G Biotika Drasel. Sul (lékárna VFN)

Kolcemid (CIBA)

Redestilovaná voda

Kultivační medium

Referenční pufry pH 4, 7, 10 (Fluka)

Kultivační medium RPMI-1640

Wrightovo barvivo

Roztoky:

Odběrové medium:

300 ml PBS

3,6 ml heparinu

Fixace:

Kyselina octová + metanol

(v poměru 1:3)

Hypotonický roztok:

2,796 g 0,075 KCl

500 ml redest. H₂O

Kultivační medium:

500 ml media RPMI

60 ml fetálního séra

5 ml glutaminu

5 ml penicilinu + streptomycinu

5 ml NaCl

Barvicí roztok A:

5,34 g Na₂HPO₄ · 2 H₂O

500 ml redest. H₂O

Barvicí roztok B:

4,05 g KH₂PO₄

500 ml redest. H₂O

Sørensenův pufr:

49 ml roztoku A

51 ml roztoku B

Wrightovo barvivo:

2,5 g Wrightova barviva

1000 ml metanolu

4.2.1 Chemikálie a roztoky pro FISH, mFISH a mBAND analýzu

Chemikálie:

20 x SSC (lékárna VFN)	NaOH(Penta)
0,2 M HCl (lékárna VFN)	NP 40 (Sigma)
Antifade (Vector)	PBS (lékárna VFN)
Blocking reagent (MetaSystems)	Redestilovaná voda
CEP [®] Hybridization Buffer (Abbott VYSIS)	Rubber cement (Marabu) Tween 20 (Sigma)
DAPI (Sigma)	24XCyte Probe Kit (MetaSystems)
Detekční protilátky (MetaSystems)	XCyte Probe Kit (MetaSystems)
Etanol 96% (Penta)	Značené DNA sondy (Abbott VYSIS, MetaSystems)
Etanol 99,9% (Penta)	
LSI Hybridization Buffer (Abbott VYSIS [™])	

Roztoky:

Alkoholová řada: 70% alkohol: 58 ml 96% etanolu
22 ml redest. H₂O
85% alkohol: 70,5 ml 96% etanolu
9,5 ml redest. H₂O

Barvicí roztok DAPI2xSSC:

45 µl DAPI (0,2 mg/ ml)

45 ml 2 x SSC

0,1 x SSC:

2,5 ml 20 x SSC

497,58 ml redest. H₂O

2 x SSC:

50 ml 20 x SSC

450 ml redest. H₂O

2 x SSC/0,1 % NP40:

50,0 ml 20 x SSC

449,5 ml redest. H₂O

0,5 ml NP40

4 x SSCT:

450 µl 0,05% Tween 20

100 ml 20 x SSC

400 ml redest. H₂O

NaOH 0,7 mol/l:

1,4 g NaOH

500 ml redest. H₂O

4.2.2 Chemikálie a roztoky pro izolaci DNA

Chemikálie:

100% etanol (Penta)

Agaróza (Top-Bio s.r.o.)

Eluační pufr (Qiagen)

Lyzační pufr (Qiagen)

PBS (lékárna VFN)

PCR vkládací pufr (Top-Bio s.r.o.)

Proteáza K (Qiagen)

Odmývací pufr 1 (Qiagen)

Odmývací pufr 2 (Qiagen)

RedGel (Biotium)

TBE pufr (Sigma)

Roztoky:1% agarózový gel:

0,4 g agarózy

40,0 ml TBE pufru

4.2.3 Chemikálie a roztoky pro array CGH**Chemikálie:**

100% etanol (Penta)

Mili Q voda

96% etanol (Petnta)

NaOAc (pH 5.2)

Cot-1-DNA (BlueGnom)

Primery (BlueGnom)

DTP značící směs (BlueGnom)

Reakční pufr (BlueGnom)

EDTA (Sigma)

Referenční DNA (žena, muž) (Kreatech)

Klenowův enzym (BlueGnom)

Značící fluorofor (Cy3,Cy5) (BlueGnom)

5 Metody

5.1 Klasická cytogenetická analýza

Cílem klasického cytogenetického vyšetření je sestavení karyotypu dělicích se maligních buněk podle závazné mezinárodní cytogenetické nomenklatury ISCN (2009). Klasická analýza se skládá z kultivace buněk kostní dřeně, fixace, barvení chromosomů (Wrightovým barvivem), analýzy chromosomů ve světelném mikroskopu a za použití počítačového programu IKAROS.

5.1.1 Kultivace a zpracování buněk kostní dřeně

- vzorek kostní dřeně byl sterilně odebrán do zkumavek s odběrovým médiem připraveným v naší laboratoři (odběrové zkumavky jsou připravovány předem a uchovávány v lednici při 4° maximálně po dobu 1 měsíce)
- přibližně 0,5 ml odebrané kostní dřeně jsme centrifugovali 5 min při 2 000 otáčkách/min
- vrstvu buněk s lymfocyty (asi 1 ml) jsme odsáli a převedli do připraveného kultivačního média a kultivovali v termostatu 24 h při 37 °C

5.1.2 Příprava preparátů

- po 24 hodinách kultivace jsme k buněčné kultuře přidali 0,1 ml kolcemidu (0,276 µl/ml média), z důvodu porušení funkce dělicího vřeténka a zastavení dělení buněk v metafázi
- vzorek jsme inkubovali 1 h při 37 °C
- buněčnou směs jsme centrifugovali 5 min při 2 000 otáčkách/min a pokojové teplotě (PT)
- supernatant jsme odsáli a sediment resuspendovali v hypotonickém roztoku (0,075 M KCl, asi 5 - 10 ml), objem buněk se tak zvětšil, membrány narušily a chromosomy se uvolnily
- směs jsme inkubovali v termostatu 20 min při 37 °C
- vzniklou suspenzi jsme opět centrifugovali 5 min při 2 000 otáčkách/min
- po odsání supernatantu jsme k sedimentu za stálého třepání přidávali po kapkách čerstvě připravený fixační roztok (metanol a kyselina octová v poměru 3:1

- resuspendovaný sediment jsme centrifugovali 5 min při 2 000 otáčkách/min
- přidání fixačního roztoku s následnou centrifugací jsme opakovali cca 5 krát, po poslední fixaci jsme buněčnou suspenzi ve fixačním roztoku uložili v lednici při 4-7 °C do druhého dne
- druhý den jsme centrifugovali suspenzi 5 min při 2 000 otáčkách/min a PT, odsáli jsme supernatant, sediment resuspendovali ve fixačním roztoku (množství fixačního roztoku závisí na hustotě buněčné suspenze), nakapali 1-3 kapky buněčné suspenze z výšky na připravené podložní sklo a nechali na vzduchu zaschnout
- kvalitu a hustotu jader na preparátu jsme zhodnotili ve světelném mikroskopu, případně jsme ředění upravili
- zpracované preparáty jsme vložili do krabic na mikroskopická skla a uchovávali při pokojové teplotě, zbývající buněčná suspenze se pro případ další potřeby (FISH, array CGH) uchovává v mrazničce při -18 až -20 °C

5.1.3 Barvení

V laboratoři používáme modifikaci Wrightova barvení, které odpovídá G-pruhům a je šetrné pro zachování morfologie chromosomů. K barvení jsme použili týden staré preparáty.

- preparáty jsme inkubovali v roztoku 0,2 M HCl 5 min při pokojové teplotě a v roztoku 2 x SSC 20 min při 60°
- připravili jsme barvicí roztok (3 ml Sørensenova pufru, 1 ml Wrightova barviva)
- preparáty jsme v horizontální poloze přelili připraveným roztokem a nechali působit 3 až 5 min
- skla jsme opláchli pod tekoucí vodou a nechali usušit na vzduchu
- kvalitu barvení chromosomů jsme zkontrolovali ve světelném mikroskopu, bylo-li barvení nedostatečné, pokračovali jsme přidáním nové směsi pufru a Wrightova barviva, byl-li preparát naopak přebarvený, odbarvili jsme jej v metanolu a po usušení celé barvení opakovali s kratším časem

5.1.4 Mikroskopické vyhodnocení

Obarvené preparáty jsme analyzovali ve světelném mikroskopu (Axioskop). Vyhledávali jsme vhodné mitózy a při 100 násobném zvětšení vyhodnocovali početní a strukturní odchylky chromosomů. Výsledný nálezn jsme zapsali podle závazné mezinárodní nomenklatury ISCN (2009). Pokud to kvalita preparátu umožňovala, zhodnotili jsme a takto zapsali u každého pacienta 22 mitóz. Poté jsme vhodně zvolili nejméně 4 mitózy, u kterých jsme pomocí počítačové analýzy obrazu (IKAROS) sestavili karyotyp.

5.2 Molekulárně cytogenetická analýza

Všechny děti s nově diagnostikovanou ALL vyšetřujeme automaticky na přítomnost tří nejčastějších cytogenetických aberací - hyperdiploidii, přestavbu genu *MLL* a translokaci *ETV6/RUNX1*. Další FISH analýzy provádíme cíleně na základě cytogenetického vyšetření.

Pro detekci hyperdiploidních buněk jsou nemocní nejprve vyšetřeni pomocí I-FISH s centromerickými sondami pro chromosomy X a 18. Dle výsledku pak určíme další postup vyšetření dle algoritmu navrženého Moormanem a kol. (Moorman et al., 1996), který umožňuje zachytit až 95 % všech hyperdiploidií (viz Příloha 1). Pomocí panelu centromerických a/nebo lokus specifických sond postupně vyšetřujeme 10 chromosomů, které bývají nejčastěji zmnožené v hyperdiploidních klonech. Na základě tohoto vyšetření určíme typ hyperdiploidie u každého pacienta.

Při FISH analýze používáme komerčně dodávané přímo značené translokační a centromerické sondy od firmy Abbott VYSIS. Jedná se o centromerické sondy pro chromosomy X, 4, 6, 8, 10, 14, 16, 18, 20 a 21. Pro vyšetření genu *MLL* (sonda LSI *MLL* Dual Color Probe) používáme tzv. break-apart sondu, to znamená, že je gen značen 2 různými fluorofory. V případě normálního nálezu vidíme v mikroskopu 2 fúzní signály. Pokud dojde ke zlomu ve sledovaném genu, signály se oddělí a my pozorujeme jeden fúzní signál (nezlomený gen *MLL*), jeden signál červený (na chromosomu, který se účastní

translokace společně s chromosomem 11) a jeden zelený signál (na derivovaném chromosomu 11).

Translokaci *ETV6/RUNXI* vyšetřujeme tzv. translokační sondou s extra signálem (LSI *TEL/AML1* ES probe), která výrazně snižuje riziko falešně pozitivních fúzních signálů. Zeleným fluoroforem je značená 350 kb dlouhá 5' část genu *ETV6* na chromosomu 12. Červeným fluoroforem je značen úsek genu *RUNXI* na chromosomu 21 v délce 500 kb. V případě fúze těchto genů, vidíme v mikroskopu 1 fúzní signál na derivovaném chromosomu 12, jeden zelený signál na normálním chromosomu 12, jeden červený signál na zdravém chromosomu 21 a tzv. extrasignál, tj. část značeného úseku na genu *RUNXI*, která zůstala na derivovaném chromosomu 21. Extra signál nám pomáhá rozeznat fúzi od překrývajících se signálů ve zdravých buňkách.

Postupujeme podle protokolů doporučených jejich výrobcí. Sondy jsou uchovávány v mrazicím boxu při teplotě -20 °C.

5.2.1 Přehled použitých DNA sond pro detekci heteroploidii

- CEP X ALPHA SATELLITE DNA/DXZ1 SG: α -satelitní sonda pro centromerickou oblast chromosomu X značená Spectrum Green
- CEP 18 ALPHA SATELLITE DNA/D18Z1 SO: α -satelitní sonda pro centromerickou oblast chromosomu 18 značená Spectrum Orange
- LSI 21 SO: lokus specifická sonda pro oblast 21q22.13 – 21q22.2 lokalizovanou na dlouhých ramenech chromosomu 21
- CEP 16 SATELLITE II DNA SG/SO: α -satelitní sonda pro centromerickou oblast chromosomu 16 značená Spectrum Green nebo Spectrum Orange
- CEP 6 ALPHA SATELLITE DNA/D6Z1 SG: α -satelitní sonda pro centromerickou oblast chromosomu 6 značená Spectrum Green
- CEP 8 ALPHA SATELLITE DNA/D8Z2 SO: α -satelitní sonda pro centromerickou oblast chromosomu 8 značená Spectrum Orange

- CEP 10 ALPHA SATELLITE DNA SG: α -satelitní sonda pro centromerickou oblast chromosomu 10 značená Spectrum Green
- LSI D20S108 SO: lokus specifická sonda pro oblast 20q13.2 lokalizovanou na dlouhých ramenech chromosomu 20 značená Spectrum Orange
- TEL VYSION 14q SO Probe/Hyb Set: sonda pro telomerickou oblast na dlouhých ramenech chromosomu 14 značená Spectrum Orange
- CEP 4 ALPHA SATELLITE DNA SG: α -satelitní sonda pro centromerickou oblast chromosomu 4 značenou Spectrum Green
- TEL VYSION 1p SG: sonda pro telomerickou oblast na krátkých ramenech chromosomu 1 značená Spectrum Green
- TEL VYSION 1q SO: sonda pro telomerickou oblast na dlouhých ramenech chromosomu 1 značená Spectrum Orange
- CEP 11 ALPHA SATELLITE DNA SG: α -satelitní sonda pro centromerickou oblast chromosomu 11 značená Spectrum Green
- RP11-54L12: BAC sonda pro oblast 11q21 o velikosti 94150469-94227040 b značená Spectrum Orange
- RP11-179B7: BAC sonda pro oblast 11q22.3 o velikosti 103777915-104035027 b Značená Spectrum Orange

5.2.2 Příprava preparátů

- skla s nakapanou suspenzí, jejíž příprava se shoduje s přípravou preparátu pro klasickou cytogenetickou analýzu, se vloží do roztoku 2 x SSC na 20 min při 37°C
- po vyjmutí jsme dehydratovali skla v alkoholové řadě (75%, 80%, 96% etanol), v každém roztoku po dvou min
- skla jsme nechali usušit na vzduchu

5.2.3 Příprava sondy

- sondy jsme nechali rozmrazit, protřepali a stočili na centrifuze
- poté jsme namíchali hybridizační směs dle návodu od výrobce: 7 μ l pufru, 2 μ l destilované vody a 0,5 μ l sondy
- připravenou hybridizační směs jsme znovu protřepali a stočili

5.2.4 Aplikace sondy a hybridizace

- krycí skla (22 x 22 mm) jsme položili na histologickou plotnu (37 °C)
- nanесли jsme na ně hybridizační směs s příslušnou sondou a přiložili na podložní skla s nakapaným vzorkem
- vytlačili jsme případné bubliny a krycí skla jsme oblepili rubber cementem, abychom zabránili vyschnutí sondy během hybridizace, pomocí diamantového pera jsme vyznačili pozici krycího skla se sondou
- skla jsme vložili do automatického hybridizačního bloku HYBrite nebo ThermoBrite (Abbott VYSIS), zde proběhla denaturace (2 min při 73 °C) a hybridizace (42 °C přes noc do druhého dne)

5.2.5 Mytí preparátů po hybridizaci

- další den jsme opatrně odstranili rubber cement a krycí sklo
- preparáty jsme vložili do kyvety a v přístroji VP 2000 Processor (Abbott VYSIS), se postupně inkubovali v roztoku 0,4 SSC/0,3% NP40 2 min při 73 °C, v roztoku 2 x SSC/0,1% NP40 1 min při PT
- následně preparáty prošly dehydratační alkoholovou řadou po 2 min v 70%, 85%, 96% etanolu
- na usušená skla jsme nanесли roztok DAPI/2x SSC a překryli je krycím sklem
- skla jsou dlouhodobě uchovávána v mrazicím boxu ve tmě

5.2.6 Analýza ve fluorescenčním mikroskopu

K vyhodnocení preparátů jsme používali fluorescenční mikroskop Axio Imager 1 (Zeiss). Mikroskop je vybavený specifickými optickými filtry pro detekci použitých fluoroforů. U každého preparátu jsme hodnotili nejméně 20 mitóz (pokud byly přítomny) při zvětšení 1000 za použití imerzního objektivu. Při stejně nastaveném mikroskopu jsme zhodnotili 200 interfázních jader. Každý preparát byl hodnocen dvěma nezávislými hodnotiteli, z nichž každý hodnotil nejméně 100 buněk. Nálezy jsme popsali podle mezinárodní nomenklatury ISCN (2009).

5.3 mFISH a mBAND

Metodu mnohobarevné FISH a mnohobarevného pruhování jsme použili u pacientů, u kterých byly pomocí G-pruhování nebo metodou FISH nalezeny strukturní přestavby. Tyto metody nám pomohly přesněji určit charakter přestaveb, původ marker chromosomů, zmnožení jednotlivých chromosomů nebo přesněji stanovit zlomy na přestavěných chromosomech.

K aplikaci metody mFISH a mBAND jsou nutné kvalitně rozložené mitózy, proto je důležité před nanesením sondy prohlédnout podložní sklo s nakapaným vzorkem a vybrat nejvhodnější místo s dostatečným počtem kvalitních mitóz.

5.3.1 Příprava preparátů pro mFISH/mBAND

- v kyvetě jsme předehřáli 50 ml 2x SSC na 70 °C ve vodní lázni
- vzorky jsme vložili do kyvety na 30 min
- po vyndání jsme vložili vzorky na 30 min do předehřáté vodní lázně na 37 °C
- poté jsme skla přenesli do kyvety s 0,1x SSC na 1 min
- po uplynutí 1 min jsme skla denaturovali 1 min v 0,07 M NaOH
- po denuraci jsme do kyvety s preparátem nalili 0,1x SSC, které jsme si předem vychladili v lednici na 4 °C, nechali jsme působit 1 min
- poté jsme do kyvety nalili 2x SSC, které jsme si stejně jako v předchozím kroku vychladili na 4 °C, nechali působit 1 min

- dále jsme skla dehydratovali v alkoholové řadě: 70%, 96%, 100% etanolu po 1 min
- skla jsme nechali usušit na vzduchu při pokojové teplotě

5.3.2 Příprava sondy

- sondu jsme protřepali a stočili, do předem označených ependorfech jsme odpipetovali 8 μ l hybridizační směsi se sondou
- sondu jsme denaturovali 5 min při 75 °C, po 5 min jsme sondu přenesli na led a prudce ochladili
- poté jsme sondy inkubovali 30 min při 37 °C

5.3.3 Hybridizace

- 8 μ l sondy jsme napipetovali na krycí sklo 22x22 mm a přiložili jsme na podložní sklo s příslušným vzorkem
- odstranili jsme případné bubliny a krycí sklo jsme oblepili rubber cementem
- skla jsme vložili do vlhké komůrky a hybridizovali v termostatu při 37 °C 1-3 dny

5.3.4 Mytí a detekce

- skla jsme vyndali z komůrky a opatrně jsme sejmuli rubber cement a krycí sklíčka z preparátů
- skla jsme vložili do přehřátého (72 °C) 0,4x SSC na 2 min
- poté jsme skla inkubovali 30 s ve 2x SSCT
- na krycí sklo 24x60 mm jsme nanесли 25 μ l DAPI/antifade a přiložili k dobře oschlému podložnímu sklu s nakapaným vzorkem

5.4 Izolace DNA

DNA jsme izolovali z fixovaných buněk kostní dřeně pomocí kitu QIAamp® DNA Mini Kit (Quiagen).

- vzorky jsme stočili na centrifuze při rychlosti 14000 rpm/3 min

- ze vzorků jsme odebírali 100-200 μ l buněčné suspenze, v závislosti na její hustotě, do 1,5 ml mikrozkuvek
- zkumavky jsme stočili při 14500 rpm/5 min
- důkladně jsme odsáli fixáž a peletu ještě jednou zcentrifugovali na stolní centrifuze, zbylou fixaci jsme odsáli pipetou
- pelety jsme resuspendovali v 200 μ l PBS
- přidali jsme 20 μ l proteinázy K
- vzorky jsme zamíchali, přidali jsme 200 μ l lyzačního pufru, protřepali a krátce stočili na stolní centrifuze (15 s)
- vzorky jsme inkubovali 10 min při 56°C za neustálého míchání 14000 rpm/min v heat-bloku
- ke každému vzorku jsme přidali 200 μ l 100% etanolu a protřepali 15 s
- celý objem vzorku jsme nanесли na kolonku a centrifugovali při 12000 rpm/1 min
- odsály jsme vzniklý eluát a kolonku přenesli do nové sběrné zkumavky
- na kolonku jsme nanесли 500 μ l odmývacího pufru AW1 a znovu stočili při 12000 rpm/1 min
- vzniklý eluát jsme odstranili a kolonku přenesli do nové sběrné zkumavky
- na kolonku jsme přidali AW2 pufr a zcentrifugovali při 14500 rpm/min
- kolonku jsme opět přendali do nové sběrné zkumavky
- na kolonku jsme nepipetovali 55 μ l AE pufru a inkubovali 5 min při PT
- centrifugovali jsme při 12000 rpm/min
- výslednou koncentraci a čistotu eluátu jsme změřili spektrofotometricky
- pomocí gelové elektroforézy, v 1% agarózovém gelu při napětí 80-120 V, jsme ověřili kvalitu izolované DNA
- do gelu jsme napipetovali 4 μ l RedGel
- ke každému vzorku jsme přidali PCR vkládací pufr

- vzorky jsme pipetovali do připravených komůrek, do jedné komůrky jsme napipetovali referenční DNA (tzv. žebřík)

5.5 Array CGH

Pro svou práci jsem využila metodu array CGH s DNA čipy Cytochip Cancer 4x180K v. 1.0 (BlueGnome). Jedná se o tzv. BAC čipy vycházející z techniky komparativní genomové hybridizace (array CGH).

Druhým typem použitých čipů jsou oligonukleotidové čipy. Na čipu jsou ukotveny oligonukleotidové sondy, jejichž velikost se pohybuje od 25-merů do velikosti 85-merů. Tyto sondy jsou natištěné na čipu v několika kopiích. Směs vyšetřované DNA společně s referenční DNA značené pomocí fluoroforů Cy3 a Cy5 hybridizuje se sondami imobilizovanými na čipu (Wadlow et al., 2005).

Izolovanou DNA jsme hybridizovali na BAC čipy a/nebo oligonukleotidové čipy (BlueGnome), pomocí hybridizační stanice TECAN HSpro 4000 (Schoeller).

První den jsme naznačili DNA a/nebo referenční DNA (zdravé ženy a zdravého muže) pomocí značícího kitu následujícím způsobem: vyšetřovanou DNA fluoroforem Cy3 (spectrum green), referenční DNA fluoroforem Cy5 (spectrum orange). Vždy jsme hybridizovali DNA ženy proti ženské referenční DNA a DNA muže proti mužské referenční DNA.

- jednotlivé komponenty jsme rozmrazili, protřepali, zcentrifugovali na centrifuze a uchovali na ledu
- značící reagentie jsme smíchali dle návodu, viz Tabulka 3
- značící mix jsme rozpipetovali do mikrokumavek dle koncentrace naší DNA (objem vody se upravoval dle objemu přidané DNA) a přidali jsme 400 ng DNA
- vzorky jsme denaturovali 5 min v předehřátém cykleru při 94 °C, poté jsme ihned přenesli na led a inkubovali 5 min
- přidali jsme 1μl Klenowova enzymu ke každému vzorku a inkubovali v cykleru při 37 °C 16-20 hodin

Tabulka 3 Příprava značících směsí

	Cy3 mix x1	Cy3 mix x6	Cy5 mix x1	Cy5 mix x6
Reakční pufr	10	62	10	62
Mili Q voda	19	116	19	116
Primery	10	62	10	62
DTP-značící směs	5	32	5	32
Cy3 dCTP	1	6	-	-
Cy5 dCTP	-	-	1	6

Druhý den jsme zastavili značící reakci a připravili vlastní hybridizaci vzorků na mikročipu.

- značící reakci jsme zastavili přidáním 5 μl EDTA, vzorky jsme protřepali a stočili 30 s na stolní centrifuze
- naznačenou DNA jsme přečistili na kolonce AutoSeqTMG50 columns (BlueGnome) dle návodu výrobce
- kvalitu značení jsme změřili na přístroji NanoQuant
- naměřené hodnoty jsme porovnali s hodnotami doporučenými výrobcem: koncentrace DNA 180-325 ng/ μl , inkorporace fluoroforu 6-15 pmol)
- smíchali jsme referenční a testovanou DNA a přidali jsme 25 μl Cot-1-DNA, 12,5 μl 3M NaOAc (pH 5.2)
- krátce jsme směs protřepali a stočili
- přidali jsme 312 μl 100% EtOH a dvakrát promíchali převrácením eppendorfký

- vzorek jsme precipitovali 30 min při -80 °C
- vzorek jsme centrifugovali při max. rychlosti 14500 rpm/min 15 min při PT
- odstranili jsme supernatant a přidali 500 µl 70% EtOH
- vzorek jsme opět centrifugovali při maximální rychlosti po dobu 5 min a odsáli supernatant
- peletu jsme vysušili při pokojové teplotě s otevřeným víčkem mikrozkuhavky
- peletu jsme resuspendovali v 55 µl předehřátého hybridizačního roztoku (10% SDS roztok připravený v naší laboratoři dle protokolu Tecan HSpro Version 4.1)
- vzorek jsme denaturovali po dobu 10 min v heat bloku při 75°C za stálého třepání 14000 rpm/min
- vzorek jsme krátce stočili a dále inkubovali za shodných podmínek
- vzorky a Tecan hybridizační pufr jsme prehybridizovali při 37°C 30 min
- během prehybridizace jsme připravili mycí roztoky dle návodu, viz Tabulka 4)
- roztoky jsme nalili do označených nádob a zapojili je k hybridizační stanici

Tabulka 4 Příprava roztoků pro hybridizační stanici Tecan

Kanál	Roztok	Celkový objem	20x SSC	Voda	10%
1	2x SSC/0,01%SDS	1000 ml	100 ml	899 ml	1 ml
3	H ₂ O	1000 ml	-	-	-
6	0,1 x SSC	1000 ml	5 ml	995 ml	-

- spustili jsme program RINSE a vybrali pozice, na kterých bude hybridizace probíhat
- čipová skla jsme vložili do hybridizační stanice, do volných pozic jsme vložili čistá skla
- injektovali jsme nejprve 70 μ l Tecan hybridizačního pufru a poté 55 μ l připravené sondy
- spustili jsme program pro hybridizaci (viz Tabulka 5)

Tabulka 5 Průběh protokolu hybridizační stanice Tecan

Proces	Teplota (°C)	Čas (hod)
Mytí	36,5	00:01:00
Injikace vzorku	36,5	-
Hybridizace	36,5	21:00:00
Mytí	36,5	00:01:00
Hybridizace	36,5	00:05:00
Mytí	54	00:01:00
Mytí	23	00:01:00
Hybridizace	23	00:05:00
Mytí	23	00:00:30
Osušení vzorku	23	00:02:00

- třetí den, po dokončení, hybridizace jsme čipy oskenovali pomocí scanneru při rozlišení 5 μ m u BAC čipů a na 3 μ m u oligonukleotidových čipů

5.5.1 Vyhodnocení dat

Pro vyhodnocení získaných dat jsme použili program BlueFuse Multi 2.5 (BlueGnome). Nálezy jsme ověřili pomocí metody mBAND a v jednom případě pomocí metody I-FISH s využitím BAC sond

5.6 Statistická analýza

Pro statistickou analýzu jsme nemocné s vysokou hyperdiploidií rozdělili do 2 skupin dle cytogenetického nálezu. Do první skupiny byli zařazeni pacienti s vysokou hyperdiploidií a dalšími strukturními aberacemi (skupina 1). Ve druhé skupině jsou zahrnuti děti s vysokou hyperdiploidií bez prokázaných strukturních přestaveb (skupina 2). Pět pacientů jsme ze statistického zpracování vyloučili, neboť jsme u nich nezískali kompletní klinická a cytogenetická data. Do statistického hodnocení jsme tedy zařadili 97 pacientů, u nichž jsme hodnotili hodnoty celkového přežití bez (OS= Overall Survival) a přežití do události (ESF= Event Free Survival), přičemž za událost jsme považovali relaps onemocnění nebo úmrtí pacienta z důvodu leukémie.

Pro porovnání hodnot ESF (Event Free Survival) a OS (Overall Survival) mezi skupinou 1 (pacienti s vysokou hyperdiploidií a strukturními aberacemi) a skupinou 2 (pacienti s vysokou hyperdiploidií bez prokázaných strukturních přestaveb) jsme využili Kaplan-Meierovu analýzu přežívání s Mantel-Coxovým testem křivek přežívání mezi skupinami. Jedná se o výpočet odhadu pravděpodobnosti přežití v kterémkoliv okamžiku v průběhu studie. Datum ukončení sledování jsme zvolili na 31. 12. 2011. Obě hodnoty jsme testovali na hladině významnosti $p=0,05$.

Statistickou analýzu jsme zpracovávali v programu SPSS 13.0.

6 Výsledky práce

V prospektivní a retrospektivní studii jsme pomocí konvenční cytogenetické analýzy a metody I-FISH vyšetřili celkem 232 dětí s ALL diagnostikovaných v letech 1997-2011. Celkem se jednalo o 88 dívek a 144 chlapců ve věku od 5 měsíců do 18 let (průměrný věk 6,5 roku, medián 4,6 let). V souboru nejsou zařazeni nemocní s prokázanou translokací $t(12;21)(p13;q22)$, $t(9;22)(q34;q11)$ a/nebo s přestavbou *MLL* genu v hyperdiploidních klonech, které představují odlišnou klinickou jednotku.

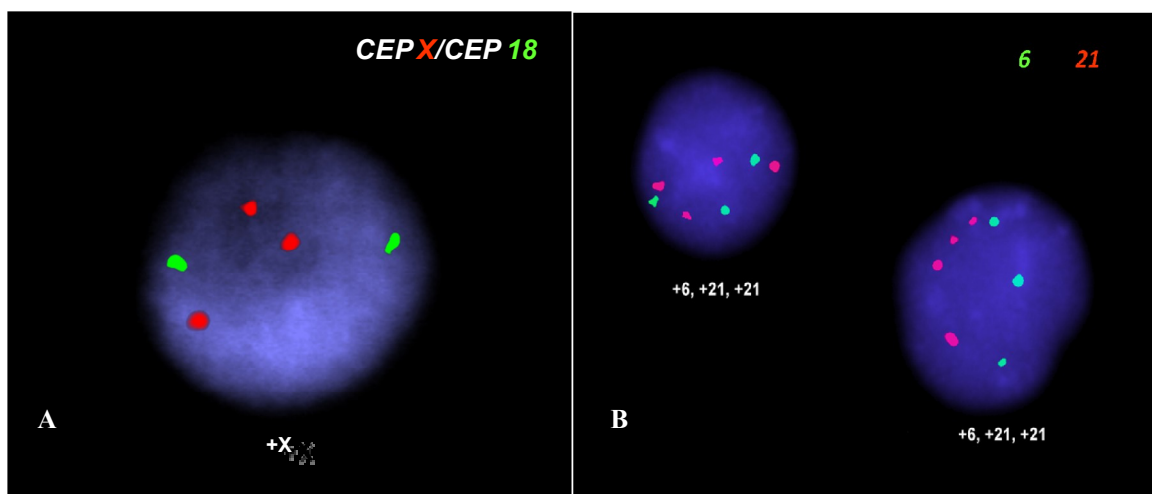
6.1 Výsledky konvenční cytogenetické analýzy

Pomocí konvenčního G-pruhování jsme úspěšně analyzovali karyotyp u 162 z 232 vyšetřených dětí (70 %). U 67 nemocných z toho souboru (41,4 %) jsme při cytogenetickém vyšetření detekovali buňky s hyperdiploidním počtem chromosomů, 95 dětí mělo normální karyotyp (58,7 %). U 70 dětí (30 %) byla klasická cytogenetická analýza neúspěšná, protože se nám nepodařilo vykultivovat žádné dělící se buňky ve stádiu metafáze. U 30 nemocných s hyperdiploidii jsme na základě cytogenetického nálezu vyslovili podezření na přítomnost dalších strukturních aberací v hyperdiploidních klonech. Tito nemocní byli dále indikováni k detailní analýze karyotypu metodami mFISH/mBAND a/nebo array CGH.

6.2 Výsledky I-FISH

Metodou I-FISH jsme patologické buňky s hyperdiploidními karyotypy detekovali celkem u 133 dětí (57,3%). Rozsah patologického klonu s hyperdiploidním počtem chromosomů se pohyboval od 5 % do 100 % buněk (průměr 74%, medián 84 %). Příklady nálezů interfázní FISH jsou na Obrázek 9. Na základě nálezů I-FISH s panelem DNA sond pro chromosomy X, 4, 6, 8, 10, 14, 16, 18, 20, 21 jsme pacienty rozdělili podle modálního počtu chromosomů v hyperdiploidních buňkách do pěti skupin (viz Graf 2).

Obrázek 9 Hyperdiploidní jádra detekovaná metodou I-FISH

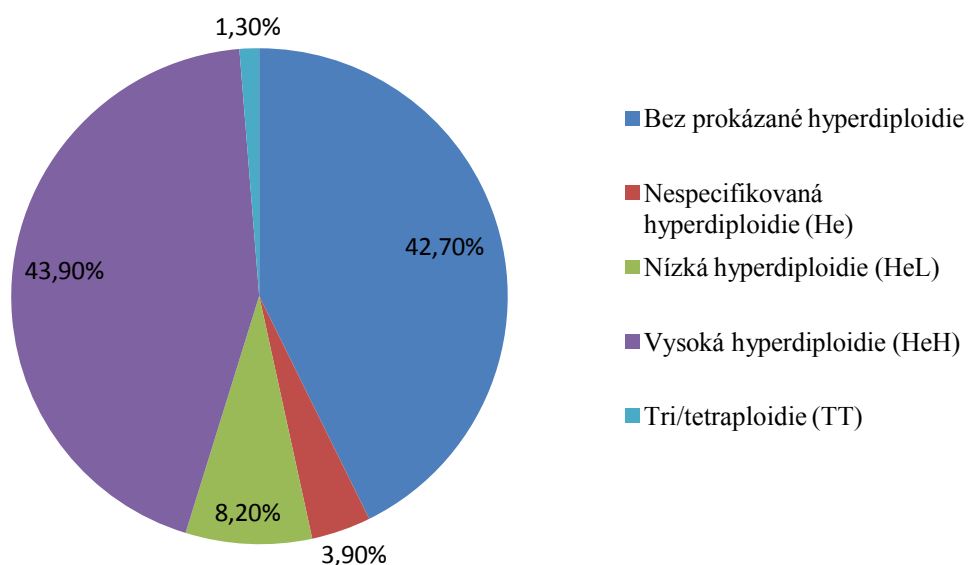


- A) Vyšetření I-FISH centromerickými sondami pro chromosomy X a 18 u dívky. V jádře vidíme nadpočetný chromosom X
- B) Vyšetření centromerickými sondami pro chromosomy 6 a 21. V obou jádrech je jedna nadpočetná kopie chromosomu 6 a dvě nadpočetné kopie chromosomu 21.

Do skupiny nízké hyperdiploidie (HeL, 47-50 chromosomů) bylo zařazeno 19 nemocných (8,2 %). U 102 pacientů (44%) jsme potvrdili přítomnost buněčného klonu s vysokou hyperdiploidí (HeH, 51-68 chromosomů). Tři pacienti měli více než 68 chromosomů. Blíže nespecifikovaná hyperdiploidie (He) byla potvrzena u 9 dětí (3,9 %). U 99 pacientů (42,7 %) jsme nenalezli žádné početní chromosomové změny.

V dalších analýzách jsme se detailně zaměřili na skupinu 102 dětí s prokázanou vysokou hyperdiploidí (HeH). Jednalo se o 43 dívek a 59 chlapců s průměrným věkem 5,6 let (medián 4,1 let). U 30 dětí z této skupiny jsme na základě výsledků konvenční cytogenetické analýzy vyslovili podezření na přítomnost dalších strukturních aberací v hyperdiploidních buňkách. Proto jsme jejich karyotypy podrobně analyzovali metodou mFISH a/nebo mBAND.

Graf 2 Rozdělení pacientů dle modálního počtu chromosomů



6.2.1 Výsledky mFISH a mBAND

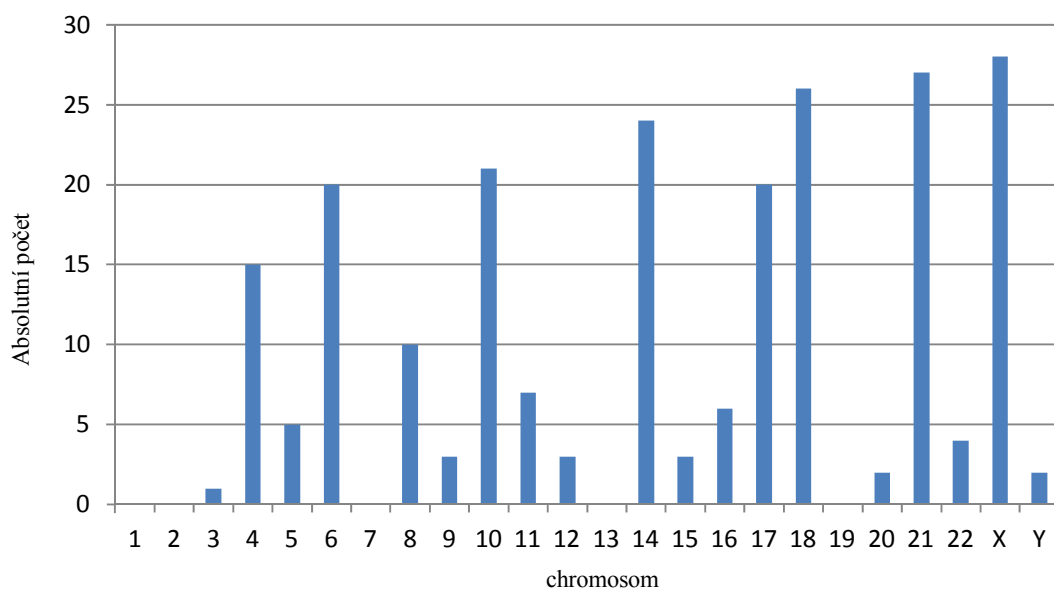
Kombinací metod mFISH/mBAND jsme vyšetřili karyotyp u 30 pacientů s vysokou hyperdiploidií a s podezřením na přítomnost dalších strukturních přestaveb.

V této skupině byly v hyperdiploidních klonech nejčastěji zmnoženy chromosomy X, 4, 6, 8, 10, 14, 17, 18, 21 (viz Graf 3). U 18/30 dětí jsme detekovali 4 kopie chromosomu 21. Naopak chromosomy 1, 2, 7, 13 a 19 nebyly zmnoženy ani v jednom případě.

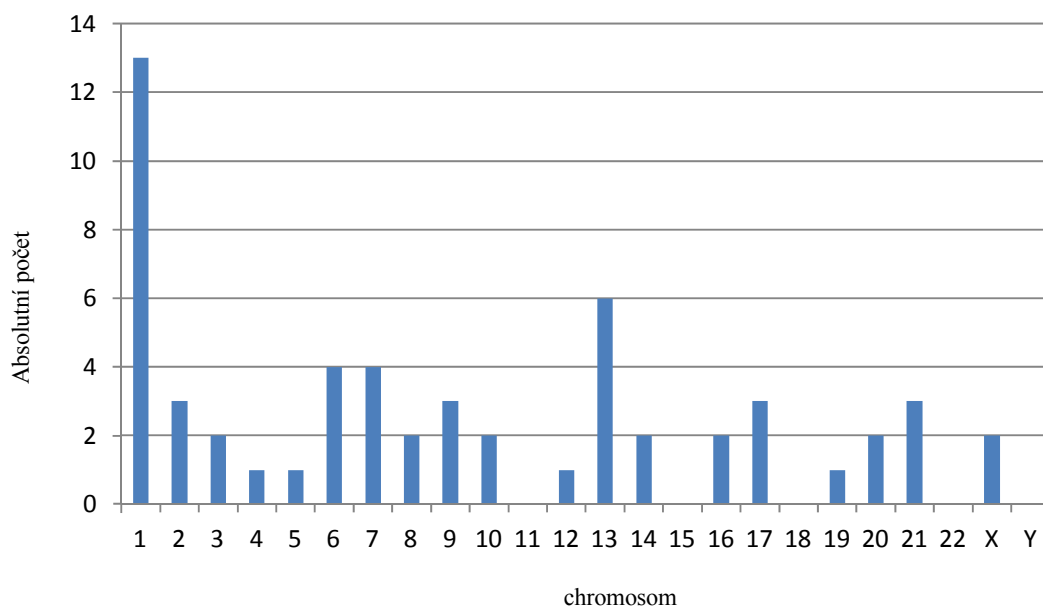
Přítomnost dalších strukturních přestaveb v hyperdiploidních buňkách jsme potvrdili celkem u 25 dětí (24,5 %). Nejčastěji se jednalo o nebalancované přestavby spojené se ziskem a/nebo ztrátou genetického materiálu. Přehled karyotypů nemocných s prokázanými strukturními přestavbami je uveden v Příloze 3. Příklady strukturních aberací analyzovaných metodami mFISH/mBAND a array CGH jsou v Přílohách 4,5 a 6.

V našem souboru do strukturních přestaveb nejčastěji vstupovaly chromosomy 1, 13, 7 a 6 (viz Graf 4).

Graf 3 Nejčastěji zmnožené chromosomy



Graf 4 Chromosomy vstupující do strukturních přestaveb



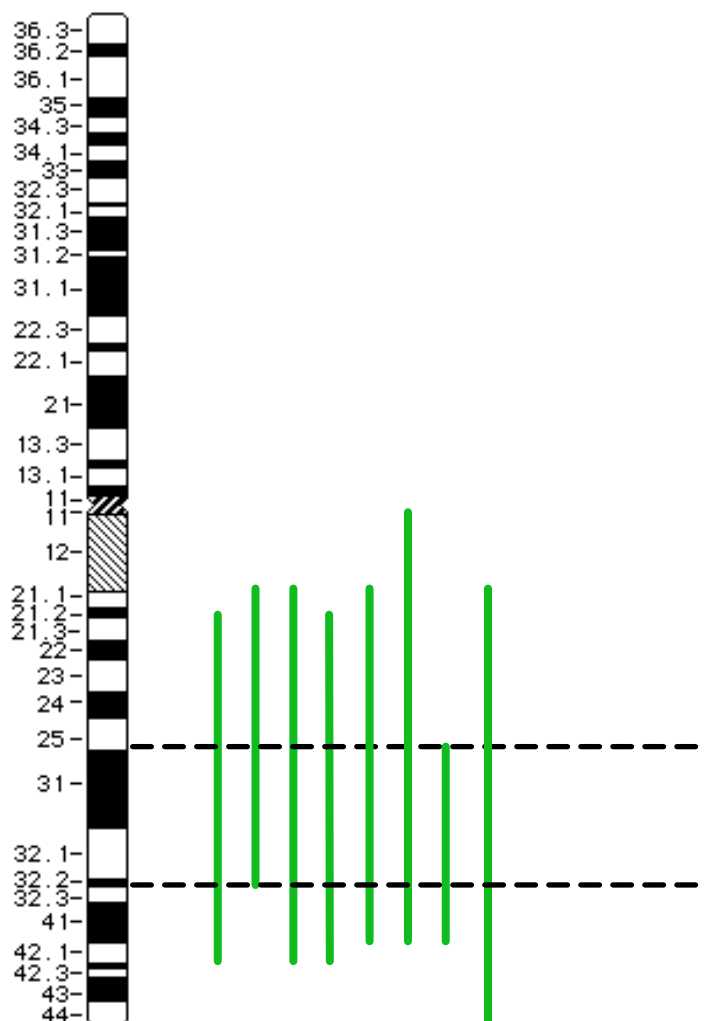
Nejčastější prokázanou rekurentní změnou v hyperdiploidních klonech byla parciální trisomie dlouhých ramen chromosomu 1. Tuto změnu jsme našli celkem u 9 pacientů (8.8 %). U 7 dětí se jednalo o duplikaci chromosomového materiálu na 1q. Přesný rozsah těchto aberací jsme určili metodami mBAND (viz Příloha 4) a array CGH (viz Příloha 4). Rozsah duplikací na chromosomu 1 se pohybovala v rozmezí

1q12 až 1q44. Minimální oblast, která byla duplikována u všech nemocných, jsme určili v pruzích 1q31 až 1q32.2, její velikost byla 22,5Mb (viz Obrázek 10). U pacienta č. 19 jsme pomocí metody mBAND prokázali, že se jedná o duplikaci invertovanou dup(1)(q42.1 q21.2) (viz **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**). U jednoho pacienta se nám přesný rozsah duplikace nepodařil určit (pacient č. 1).

U 2 dětí vznikla parciální trisomie 1q v důsledku nebalancované translokace s jiným chromosomem. V nebalancovaných přestavbách s chromosomem 1 byly zahrnuty chromosomy 3 a 9.

Další rekurentní změnou v tomto souboru byla delece dlouhých ramen chromosomu 13, kterou jsme našli celkem u 4 pacientů. U dvou nemocných jsme prokázali delecii dlouhých ramen chromosomu 6. Ostatní nalezené aberace se vyskytovaly náhodně.

Obrázek 10 Rozsah duplikací na chromosomu 1



minimální duplikovaná oblast 1q31 až 1q32.2 (22,5Mb)

6.2.2 Výsledky array CGH

Metodou array CGH jsme vyšetřili 7 pacientů s potvrzenými strukturními aberacemi, u kterých jsme sledovali rozsah nebalancovaných změn. U 5 nemocných jsme potvrdili a upřesnili rozsah duplikace dlouhých ramen chromosomu 1 (pacienti č. 5., 11, 15, 19, 20). Nově jsme identifikovali delecii na chromosomu 11 u pacienta 1. Tento nález jsme zpětně potvrdili i metodou mBAND (viz **Příloha 5**). U 2 pacientů (č. 8 a 21) jsme určili rozsah delecce na dlouhých ramenech chromosomu 13 (viz **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.). Souhrn nálezů array CGH je uveden

Tabulka 6 Výsledky metody array CGH

Pacient č.	Zisk chromosomového materiálu	Ztráta chromosomového materiálu
1	-	del(11)(q21q23.2)
5	add(1)(q21.1q32.2)	-
11	add(1)(q21.1q31.2)	-
16	add(20)(pter11.21) add(20)(q13.12q13.12) add(20)(q31.13qter)	del(20)(q11.22q13.12) del(13.12q13.32)
19	add(1)(q21.1q42.13)	-
20	add(1)(q21.1q41)	del(1)(q41qter)
23	add(1)(q21.1qter)	del(13)(q21.1qter)

6.3 Současný klinický stav pacientů

V současné době (k 31. 12. 2011) žije celkem 96 dětí s vysokou hyperdiploidií (94 %) v první nebo druhé kompletní remisi. Průměrná doba sledování celého souboru je 78,5 měsíce (medián 73,3 měsíců, rozmezí 1 až 192 měsíců).

Během tohoto období šest nemocných zemřelo (5,9 %), čtyři na relaps onemocnění nebo během indukční terapie, dva pacienti zemřeli na komplikace léčby (mykóza). Celkem 90 dětí (88 %) se nachází v první kompletní remisi (1. CR). K relapsu choroby došlo celkem u 9 dětí (8,8 %). Čtyři z těchto dětí zemřely, pět pacientů žije ve druhé kompletní remisi (2. CR), z toho dva po transplantaci kostní dřeně od HLA (Human Leukocyte Antigen) shodných dárců. Tři děti špatně odpovídaly na iniciační léčbu prednisonem (PPR - prednison poor responder).

6.4 Statistická analýza

Analýzu délky celkového přežití (OS) a přežití do události (EFS) jsme provedli celkem u 97 dětí, u kterých jsme měli k dispozici všechna potřebná klinická a cytogenetická data. Pět nemocných s neúplnými klinickými údaji bylo z hodnocení vyřazeno. Pro účely statistické analýzy jsme nemocné rozdělili do dvou skupin podle cytogenetických nálezů.

6.4.1 Skupina 1

Do skupiny 1 jsme zařadili 25 pacientů s prokázanými strukturními aberacemi v hyperdiploidním klonu. V této skupině došlo celkem k pěti událostem (20%). Ve všech 5 případech se jednalo o relaps onemocnění, z toho tři děti v současné době žijí ve 2. CR (dva po transplantaci kostní dřeně) a dva pacienti na relaps zemřeli. Kromě toho dvě děti z této skupiny špatně odpovídaly na indukční léčbu prednisonem (PPR).

6.4.2 Skupina 2

Do druhé skupiny jsme zařadili celkem 72 dětí s vysokou hyperdiploidií bez dalších strukturních aberací.

Ve skupině 2 došlo celkem k šesti událostem (8,3 %). U pěti dětí se objevil relaps a jeden pacient zemřel během indukční terapie. V současnosti čtyři děti po prodělaném relapsu žijí ve 2. CR (z toho jeden po transplantaci kostní dřeně) a jeden nemocný na relaps leukémie zemřel. Kromě toho jeden nemocný zemřel na komplikaci léčby (mykóza).

6.4.3 Analýza délky přežití

Testovali jsme dobu celkového přežití (Overall Survival, OS) a přežití bez události (EFS – Event Free Survival) u skupiny 1 a 2 (viz kapitola 5.6) metodou Kaplan-Meierovy analýzy přežívání a Mantel-Coxovým testem křivek přežívání mezi skupinami (viz Graf 5, Graf 6). Za událost jsme považovali relaps onemocnění nebo úmrtí z důvodu leukémie.

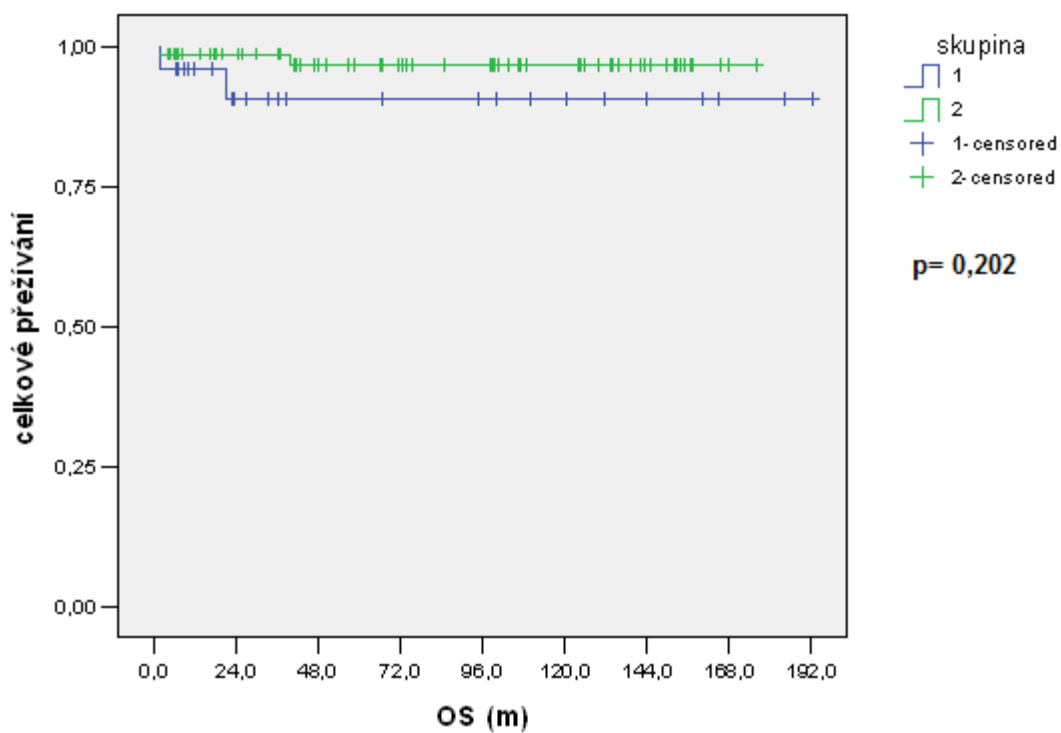
Celková doba přežití (OS) se mezi oběma skupinami statisticky významně nelišila (176 měsíců versus 171 měsíců; $p=0,202$).

Průměrná doba přežití do události byla ve skupině 1 statisticky významně kratší (145 m) než ve skupině 2 (161 m) a to na hladině významnosti 0,05 ($p=0,038$).

Tabulka 7 Porovnání celkového přežití (OS) mezi skupinami 1 a 2

skupina	n	Exit	žije	
			n	procento
1	25	2	23	92,0%
2	72	2	70	97,2%
celkem	97	4	93	95,9%

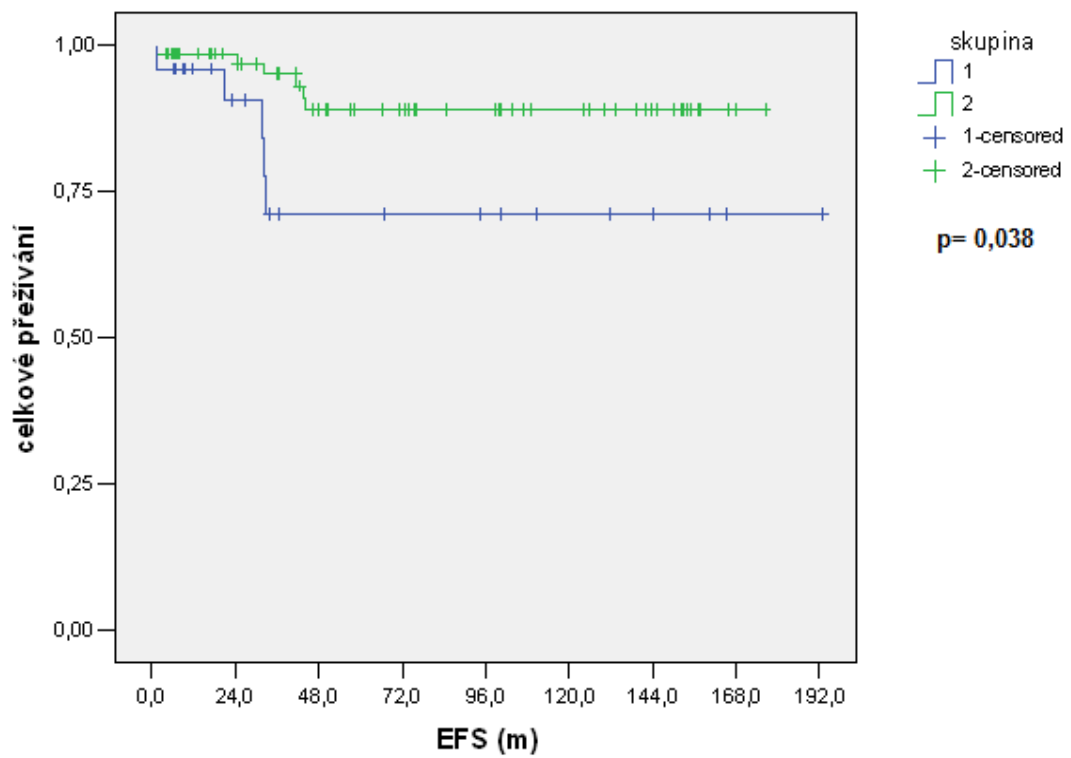
Graf 5 Porovnání celkového přežití (OS) mezi skupinami 1 a 2



Tabulka 8 Porovnání EFS mezi skupinami 1 a 2

skupina	n	Relaps či Exit	žije	
			n	procento
1	25	5	20	80,0%
2	72	6	66	91,7%
Overall	97	11	86	88,7%

Graf 6 Porovnání EFS mezi skupinami 1 a 2



7 Diskuse

U více než třetiny dětí s ALL jsou popisovány buněčné klony s tzv. vysokou hyperdiploidii (HeH), která je definována jako nález 51 až 68 chromosomů v karyotypu leukemických buněk. Nález vysoké hyperdiploidie je považován za nezávislý prognostický faktor spojený s velmi dobrou prognózou. Děti s prokázanou HeH obvykle dobře reagují na léčbu standardní chemoterapií a mají příznivý průběh onemocnění ve srovnání s dalšími non-hyperdiploidními ALL pacienty.

Biologická podstata lepšího průběhu onemocnění u dětí s vysokou hyperdiploidii není zatím zcela jasná, i když bylo formulováno několik hypotéz, které tuto skutečnost vysvětlují. Jednou z takovýchto teorií je, že hyperdiploidní buňky jsou více citlivé k lékům, které specificky působí v S-fázi buněčného cyklu. Při dělení hyperdiploidních buněk trvá S-fáze delší dobu a nemocní s hyperdiploidii tak mají relativně vyšší procento buněk v S-fázi buněčného dělení. Další teorie předpokládá, že v hyperdiploidních leukemických buňkách dochází ke zvýšené akumulaci methotrexátu a jeho polyglutamátů a ty jsou pak více citlivé k antimetabolitům. Podle další teorie mají hyperdiploidní blasty větší sklon k apoptóze (Look et al., 1982; Whitehead et al., 1992; Kaspers et al., 1995; Belkov et al., 1999).

Včasný záchyt strukturních a numerických abnormalit u dětí s ALL je velmi důležitý pro určení prognózy a zvolení odpovídajícího postupu léčby. Možnosti klasické cytogenetické analýzy založené na využití konvenčních pruhovacích technik jsou však často limitované nízkým mitotickým indexem leukemických buněk a horší kvalitou hodnocených mitos nebo omezenou proliferační aktivitou patologických buněčných klonů (Ritterbach et al., 1998). Heteroploidie se totiž velmi často vyskytují jako klonální aberace, tj. postihují pouze některé buněčné klony. Podle literárních údajů se však až u 15-30 % nemocných s hemoblastosami v buněčné kultuře dělí pouze buňky s normálním karyotypem, zatímco patologické buňky *in vitro* neproliferují (Moorman et al., 1996). Nález normálního klonu pomocí G-pruhování tak může znamenat preferenční růst buněk bez maligních změn, nebo výskyt abnormalit pod rezoluční schopností této metody (Kuchinskaya et al., 2008). Pro přesné stanovení karyotypu je proto nutné využívat kombinaci všech dostupných laboratorních metod (viz. **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.).

Například v našem souboru 232 dětí s ALL se nám u 70 pacientů (30 %) nepodařilo získat karyotyp pomocí konvenční cytogenetické analýzy, buď v důsledku nulového nebo velmi nízkého mitotického indexu leukemických blastů nebo kvůli špatné kvalitě hodnocených mitóz. Náš nález je srovnatelný s údaji v literatuře (Harrison et al., 2005), které uvádějí až 33-59% výskyt neinformativních cytogenetických nálezů.

Z těchto důvodů jsou k detekci změn v modálním počtu chromosomů v nedělicích se leukemických buňkách používány i některé další molekulárně cytogenetické metody. Jednou z nich je interfázická fluorescenční *in situ* hybridizace (I-FISH), která umožňuje záchyt i tzv. skrytých heteroploidií u nemocných, u kterých bylo klasické cytogenetické vyšetření neúspěšné nebo poskytlo zdánlivě normální výsledek. To umožňuje i záchyt velmi malých buněčných klonů (Avet-Loiseau, 1999). Další možnosti přinášejí technologie založené na využití mikročipů (komparativní genomová hybridizace na čípech - array CGH), které s vysokou citlivostí umožňují záchyt nebalancovaných změn v genomu leukemických buněk.

Vývoj molekulárně-cytogenetických metod v posledních letech přispěl k odhalení genetického pozadí ALL a vedl k vývoji nových léčebných protokolů. Díky novým metodám léčby tak v současné době dosahuje remise až 90 % dětí. To je velký pokrok od 60. let, kdy šance na přežití byla téměř nulová, v polovině 80. let byla šance kolem 60 % (Starý et al., 2003).

V naší laboratoři používáme pro detekci hyperdiploidií strategii popsanou Moormanem (Moorman et al., 1996), která je založena na postupné vícebarevné hybridizaci s různými kombinacemi centromerických a/nebo lokus-specifických DNA sond pro 10 chromosomů, které bývají nejčastěji zmnoženy v hyperdiploidních klonech (X, 4, 6, 8, 10, 14, 16, 18, 20 a 21). Pomocí tohoto přístupu lze podle autorů zachytit až 95 % všech hyperdiploidií.

Tímto způsobem jsme vyšetřili celkem 232 pacientů a u 102 z nich jsme potvrdili nález vysoké hyperdiploidie (51-68 chromosomů). Jedná se o 45 % pacientů z vyšetřeného souboru. V literatuře se obecně uvádí frekvence záchytu buněčných klonů s vysokou hyperdiploidií okolo 30 %. V naší studii je tento záchyt vyšší, než uvádí literární údaje, protože na začátku studie byli z analýzy vyloučeni všichni nemocní s prokázanými translokacemi t(12;21)(p13;q33), t(9;22)(q34;q11) a přestavbami *MLL* genu, protože tyto

aberrace představují samostatné klinické jednotky. Jednalo se tedy o nenáhodný výběr nemocných.

Pomocí lokus specifických a centromerických sond jsme zjistili přesné procentuální zastoupení patologického klonu v kostní dřeni nemocných (rozsah se pohyboval od 5 % do 100 % buněk), popřípadě jsme objevili aberaci či početní odchylku, která nebyla pruhovací metodou zachycena.

Metodou mFISH jsme vyšetřili karyotypy 30 pacientů, u nichž jsme na základě výsledků G-pruhování měli podezření, že by v hyperdiploidních buňkách mohli mít i další strukturní aberrace a přítomnost strukturních aberací jsme potvrdili u 25 z nich. Na základě výsledků jsme určili další postup vyšetření pomocí metody mBAND popř. array CGH.

Strukturní aberrace nalezené u 25 pacientů ze skupiny HeH zahrnovaly nejčastěji duplikaci části dlouhých ramen chromosomu 1, celkem u 9 pacientů (9 %). V literatuře je popisován výskyt dup(1q) u přibližně 10 % až 22 % nemocných s hyperdiploidní ALL (Moorman et al., 2003; Paulsson and Johansson, 2009; Paulsson et al., 2010). Nižší procento záchytu v našem souboru může být zapříčiněno zvoleným algoritmem vyšetření a/nebo použitou metodou. Zatímco my jsme indikovali pacienty k analýzám metodami mFISH a array CGH až na základě nálezů klasické cytogenetické analýzy (zejména z důvodu časové a finanční náročnosti těchto vyšetření), Paulsson a kol. vyšetřovali metodou SNP array všechny pacienty bez ohledu na znalost jejich karyotypu.

Na základě konvenčního cytogenetického vyšetření jsme detekovali duplikaci 1q u 8/9 pacientů, u jednoho nemocného byla tato aberrace potvrzena až na základě dalších molekulárně cytogenetických analýz. Cytogenetickou metodou jsme tedy našli duplikaci u 7,8 % pacientů, tato frekvence se shoduje s literaturou (Paulsson et al., 2010).

Ve dvou případech v našem souboru vznikla parciální trisomie 1q v důsledku nebalancovaných přestaveb s dalšími chromosomy. Například u tříletého chlapce (pacient č. 1) byla již při konvenční cytogenetické analýze ve všech 15 vyšetřených mitózách potvrzena vysoká hyperdiploidie. Při dalších analýzách karyotypu metodou mFISH byla nalezena jedna mitóza s derivovaným chromosomem 3, který vznikl nebalancovanou translokací t(1;3). Pro ověření klonality a zjištění velikosti patologického klonu jsme

provedli vyšetření pomocí subtelomerické sondy pro 1q a potvrdili jsme parciální trisomii dlouhých ramen chromosomu 1 ve 30 % jader. Zároveň jsme provedli vyšetření array CGH a touto metodou jsme objevili další kryptickou aberaci - mikrolepci na chromosomu 11 v oblasti 11q21 až 11q23.2, která byla pod rezoluční hranicí metody mFISH a konvenční cytogenetické analýzy. Tuto delecí jsme dále potvrdili v 70 % jader pomocí BAC sondy pro oblast q22.3, která zasahuje deletovanou oblast, a zároveň pomocí metody mBAND. Pomocí konvenční cytogenetiky jsme u tohoto pacienta našli pouze vysokou hyperdiploidii, ostatní strukturní aberace byly nalezeny a potvrzeny až díky kombinaci dalších molekulárně-cytogenetických metod. Pacient žil ke dni 31. 12. 2011 v první kompletní remisi.

Tandemová duplikace a parciální trisomie dlouhých ramen chromosomu 1 je v literatuře popisována jako nejčastější strukturní aberace v hyperdiploidním klonu u dětské ALL (Moorman et al., 2003, Paulsson et al., 2006). Její prognostický význam zatím není zcela jasný. Dlouhá ramena chromosomu 1 se u hematologických malignit obecně vyznačují vysokou chromosomovou nestabilitou, pravděpodobně díky specifickým vlastnostem chromatinu v této genově bohaté oblasti (Bacher et al., 2009). Duplikace 1q je popisována i u nemocných s jinými typy lymfoidních i myeloidních malignit, např. myelodysplastickými syndromy, akutní myeloidní leukémií i ostatními subtypy ALL. V těchto případech se autoři přiklání k variantě špatné prognózy pro tyto pacienty (Alfaro et al., 2008, Morerio et al., 2006).

Duplikace na dlouhých ramenech chromosomu 1 může být buď přímá, nebo invertovaná. Invertovanou duplikaci jako specifickou rekurentní změnu u lymfoidních i myeloidních malignit popisují například Bacher a kol., kteří určili rozsah invertované duplikace v pruzích 1q32 až 1q21 (Bacher et al., 2009). Autoři předpokládají, že tato aberace souvisí s klonální evolucí během progresu patologického klonu. Malbora a kol. popisují nepříznivý vliv této aberace na prognózu u dětských nemocných s Burkittovým lymfomem (Malbora et al., 2012).

V našem souboru jsme přítomnost invertované duplikace 1q prokázali u jednoho nemocného. U pacienta č. 19. (viz Příloha 5) byly objeveny konvenční cytogenetickou metodou rozsáhlé změny karyotypu v hyperdiploidním klonu. Vzorek pacienta byl vyšetřen pomocí metody mFISH, která prokázala duplikaci dlouhých ramen

chromosomu 1. Pro přesný rozsah duplikace jsme využili metody array CGH. Rozsah duplikace jsme určili v oblasti (q21.2q42.1). Při ověření výsledku z array CGH metodou mBAND jsme zjistili, že se jedná o duplikaci invertovanou.

Minimální oblast na dlouhých ramenech chromosomu 1 duplikovanou u všech nemocných jsme v této studii lokalizovali v pruzích 1q31 až 1q32.3, její velikost byla 22,5 Mb. Ostatní autoři uvádí minimální duplikace v oblastech 1q21.1 až 1q25.3, 1q31.1 až 1q32.3 (Paulsson et al., 2010) a q21.2 (La Starza et al., 2007).

Na chromosomu 1 byla v této oblasti popsána řada potencionálních protoonkogenů, jejichž amplifikace by mohla hrát roli v progresi onemocnění. Jsou to například geny tyrosin fosfatáza *MTMR11* (Wishart et al., 2001) a dále gen *NFκB* produkovaný aktivovanými B-lymfocyty (Marusawa et al., 2011).

V oblasti 1q31-1q32.2 jsou lokalizované i další geny spojené s hematopoézou. Je to například gen *PTPN7* (proteine tyrosine phosphatase, non-receptor type 7), jehož zvýšená exprese je popisována u myelodysplastických syndromů a myeloidní leukemie (Zanke et al., 1994). Naopak u dětských B-buněčných lymfomů je popisována jeho nižší exprese v porovnání se zdravou tkání (Fridberg et al., 2008). Příčina tohoto jevu zatím není jasná. Dalším v literatuře popisovaným genem lokalizovaným v této oblasti je gen *MAPKAPK-2*, který kóduje serin/threonin protein kinázu, jejíž zvýšená exprese je popisována například u mnohočetného myelomu (Felix et al., 2009). Kromě uvedených genů byla v literatuře popsána i up-regulace genů *B4GALT3*, *DAP3*, *RGS16*, *MEM183A* a *UCK2*, jejich potenciální význam pro patogenezi onemocnění však zatím nebyl prokázán (Paulsson and Johansson, 2009).

Další rekurentní změnou, kterou jsme v našem souboru našli celkem u čtyř dětí, byla intersticiální delecce dlouhých ramen chromosomu 13. Například u pacientky č. 21 (viz. **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.****Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**) jsme pomocí konvenční cytogenetiky našli hyperdiploidní klon s 51-52 chromosomy. Metodou mFISH a array CGH jsme našli delecí 13q a určili její rozsah do oblasti q21.32 až q33.3. U pacientky došlo po 20 měsících od stanovení diagnózy k relapsu onemocnění a následnému úmrtí.

Horší prognózu u dětí s ALL a delecí 13q popisuje ve své práci Heerema a kol. (Heerema et al., 2000). Efekt této delece na vznik relapsu zmiňuje rovněž Moorman a kol. (Moorman et al., 2010). Delece 13q se vyskytuje u různých typů hematologických malignit, například u mnohočetného myelomu (MM) a u chronické lymfocytární leukémie (CLL). U nemocných s MM je spojována se špatnou prognózou, zejména pokud je detekována pomocí G-pruhovacích technik (Chiecchio et al., 2006). Naopak u pacientů s CLL, pokud se delece oblasti 13q14 vyskytuje jako jediná abnormalita v karyotypu, znamená to pro pacienty lepší prognózu (Van Dyke et al., 2009). V oblasti 13q14 se nalézají tumor supresorové geny *RBI* a *DLEU7*, jehož delece by mohla souviset se vznikem CLL (Palamarchuk et al., 2010).

Ve dvou případech jsme v našem souboru objevili delecí dlouhých ramen chromosomu 6. Tato aberace bývá popisována u přibližně 5 % dětí vysoce hyperdiploidní ALL (Moorman et al., 2003). Minimální deletovanou oblast (CDR - Common Deleted Region) na 6q se zatím nepodařilo určit a její biologický význam tak není zcela jasný. Delece 6q byla popsána jak u pacientů s B-ALL (Paulsson et al., 2010) a T-ALL (Gladstone et al., 1998), tak i u nemocných s CLL a/nebo NHL (non-Hodgkinským lymfomem).

Význam strukturních chromosomových aberací je v literatuře stále diskutován. O možném nepříznivém vlivu strukturních změn na prognózu dětí s hyperdiploidní ALL referoval již Pui v roce 1989 (Pui et al., 1989). Nepříznivý prognostický efekt strukturních aberací v hyperdiploidních buňkách potvrdily i výsledky studie, která byla provedena v dřívějších letech v naší laboratoři (Zemanová et al., 2005). Naopak výsledky jiné studie tuto hypotézu nepotvrdily (Moorman et al., 2003). Přestože tato práce vycházela z analýzy velkého souboru nemocných, byla založena pouze na výsledcích konvenční cytogenetické analýzy. Ta má však, jak již bylo řečeno dříve, limitované resoluční možnosti a tak je pravděpodobné, že všechny strukturní aberace nemusely být správně detekovány, což mohlo ovlivnit výsledky.

V předkládané studii jsme nepotvrdili vztah mezi nálezem strukturních přestaveb a celkovou délkou přežití (OS, $p=0,202$), i když na grafu je vidět mírná tendence lepšímu OS u dětí bez prokázaných strukturních aberací. Minimální rozdíl v délce OS může

být způsoben tím, že pokud se pacient dostane do relapsu, začne být i přes původní dobrou prognózu léčen dle intenzivnějšího léčebného protokolu.

Naopak jsme potvrdili korelaci mezi cytogenetickým nálezem a klinickým průběhem onemocnění. V naší studii měli pacienti se strukturními aberacemi v hyperdiploidním klonu statisticky významně kratší dobu přežití bez události (EFS), tzn. větší riziko vzniku relapsu, než nemocní s čistou hyperdiploidí ($p=0,038$).

8 Závěr

Provedli jsme podrobnou molekulárně cytogenetickou analýzu buněk kostní dřeně u 102 pacientů s tzv. vysokou hyperdiploidií (>50 chromosomů). U 25 z nich jsme v hyperdiploidních buňkách našli další strukturní aberace. Do strukturních přestaveb nejčastěji vstupovaly chromosomy 1, 13, 7 a 6. U 9 dětí byla prokázána duplikace 1q. Minimální oblast duplikovaná u všech nemocných byla lokalizována v pruzích 1q31 až 1q32.2 (velikost 22.5 Mb). U 4 pacientů byla nalezena intersticiální delece 13q a u dvou pacientů delece dlouhých ramen chromosomu 6.

Prokázali jsme, že v této skupině dětí s hyperdiploidní ALL strukturní aberace statisticky významně ovlivňují dobu přežití bez události.

Kombinace molekulárně cytogenetických technik poskytuje komplexní informace o genomu leukemických buněk a umožňuje záchyt kryptických strukturních aberací, které mohou hrát významnou úlohu v patogenezi onemocnění.

9 Použitá literatura

1. Alfaro R, Pérez-Granero A, Durán MA, Besalduch J, Rosell J, Bernués M, (2008). Dup(1)(q21q32) as a sole cytogenetic event is associated to a leukemic transformation in myelodysplastic syndromes. *Leuk Res*, 32:159-161
2. Alvarez Y, Caballín MR, Gaitán S, Pérez A, Bastida P, Ortega JJ, Verdequer A, Tasso M, Aventín A, Badell I, Guitar M, Melo M, Granada I, Javier G, Dastuque N, Robert A, Coll MD, (2007). Presenting features of 201 children leukemia: Comparison according to ETV6/RUNX1 rearrangement. *Cancer Genet Cytogenet*, 177:161-163
3. Avet-Loiseau H, (1999). FISH analysis at diagnosis in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia & Lymphoma*, 33(5-6):441-449.
4. Bacher U, Schnittger S, Grüneisen A, Haferlach T, Kern W, Haferlach C, (2009). Inverted duplication dup(1)(q31q21) as a sole aberration in lymphoid and myeloid malignancies. *Cancer Genet Cytogenet*, 188:108-11
5. Belkov VM, Krynetski EY, Schuetz JD, Yanishevski Y, Masson E, Mathew S, Raimondi S, Pui CH, Reling MV, Evans WE, (1999). Reduced Folate Carrier Expression in Acute Lymphoblastic Leukemia: A Mechanism for Ploidy but not Lineage Differences in Methotrexate Accumulation. *Blood*, 93:1643-1650
6. Bernt KM, Armstrong SA, (2011). Targeting epigenetic programs in *MLL*-rearranged leukemias. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2011:354-360

7. Boveri T, (2008). Concerning the Origin of Malignant Tumors by Theodor Boveri. Translated and annotated by Henry Harris. *J Cell Sci*, 121:1-84
8. Broadfield ZJ, Hain RD, Harrison CJ, Reza Jalali G, McKinley M, Michalová K, Robinson HM, Zemanová Z, Martineau M, (2004). Complex chromosomal abnormalities in utero, 5 years before leukaemia. *Br J Haematol*, 126:307-312
9. Bueno C, Montes R, Melen GJ, Ramos-Mejia V, Real PJ, Ayllón V, Sanchez L, Ligeró G, Guitierrez-Aranda I, Fernández AF, Fraga MF, Moreno-Gimeno I, Burks D, Plaza-Valonge C, Rodríguez-Manzaneque JC, Menendez P, (2012). A human ESC model for *MLL*-AF4 leucemic fusion gene reveals an impaired early hematopoietic-endothelial specification. *Cell Res*, 3
10. Buginim Y, Rotter V, (2009). p53: Balancing tumour suppression and implication for the clinic. *Eur J Cancer*, 45:217-234
11. Cambier N, Chopra R, Strasser A, Metcalf D, Elefanty AG, (1998). BCR-ABL activates pathways mediating cytokine independence and protection against apoptosis in murine hematopoietic cells in a dose-dependent manner. *Oncogene*, 16:335-348
12. Deininger MWN, Vieira S, Mendiola R, Schltheis B, Goldman JM, Melo JV, (2000). BCR-ABL Tyrosin Kinase Activity Regulates the Expression of Multiple Genes Implicated in the Pathogenesis of Chronic Myeloid Leukemia. *Cancer Res*, 60:2049-2055

13. Djordjević V, Dénčić-Fekete M, Jovanović J, Drakulić D, Stevanović M, Janković G, Gotić M, (2008). Pattern of trisomy 1q in hematological malignancies: a single institution experience. *Cancer Genet Cytogenet*, 186: 12-18
14. Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, Ohno S, Segal GM, Fanning S, Zimmermann J, Lydon NB, (1996). Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosin kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat Med*, 2:561-566
15. Eden T, (2010). Aetiology of childhood leukaemia. *Cancer Treat Rev*, 39: 286-297
16. Felix RS, Colleoni GW, Caballero OL, Yamamoto M, Almeida MS, Andrade VC, Chauffaille Mde L, Silva WA Jr., Begnami MD, Soares FA, Simpson AJ, Zago MA, Vettore AL, (2009). SAGE analysis highlights the importance of p53, ddx5, mapkapk2 and ranbp2 to multiple myeloma tumorigenesis. *Cancer Lett*, 278:41-48
17. Fletcher JA, Lynch EA, Kimball VM, Donnelly M, Tantravahi R, Sallan SE, (1991). Translocation t(9;22) is associated with extremely poor prognosis in intensively treated children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 77: 435-442
18. Ford AM, Bennett CA, Price CM, Bruin MCA, van Wering ER, Greaves M, (1998). Fetal origins of the TEL-AML1 fusion gene in identical twins with leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95:4584-4588
19. Fridberg M, Kjellström S, Anagnostaki L, Skoqvall I, Mustelin T, Wiebe T, Persson JL, Dictor M, Wingren AG, (2008). Immunohistochemical analyses of phosphatases in childhood B-cell lymphoma: lower expression of PTEN and HePTP and higher number of positive cells for nuclear SHP2 in B-cell lymphoma cases compared to controls. *Pediatr Hematol Oncol*, 25:528-540

20. Gladstone B, Amare PS, Pai SK, Joshi S, Nair CN, Advanci SH, (1998). Cytogenetic studies in patients from India with T-acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet*, 106:44-48
21. Greaves M, (2005). In utero origins of childhood leukaemia. *Early Hum Dev*, 81:123-129
22. Greenman C, Stephens P, Smith R, Dalgliesh GL, Hunter C, Bignell G, Davies H, Teague J, Butler A, Stevens C, Edkins S, O'Meara S, Vastrik I, Schmidt EE, Avis T, Barthorpe S, Bhamra G, Buck G, Choudhury B, Clements J, Cole J, Dicks E, Forbes S, Gray K, Halliday K, Harrison R, Hills K, Hinton J, Jenkinson A, Jones D, Menzies A, Mironenko T, Perry J, Raine K, Richardson D, Shepherd R, Small A, Tofts C, Varian J, Webb T, West S, Widaa S, Yates A, Cahill DP, Louis DN, Goldstraw P, Nicholson AG, Brasseur F, Looijenga L, Weber BL, Chiew YE, de Fazio A, Greaves MF, Green AR, Campbell P, Birney E, Easton DF, Chenevix-Trench G, Tan M-H, Khoo SK, Teh BT, Yuen ST, Leung SY, Wooster R, Futreal A, Stratton MR, (2007). Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature*, 446:153-158
23. Harrison CJ, Haas O, Harbott J, Biondi A, Stranulla M, Trka J, Izraeli S, Biology and Diagnosis Committee of International Berlin-Frankfurt-Münster study group, (2010). Detection of prognostically relevant genetic abnormalities in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia: recommendations from the Biology and Diagnosis Committee of the International Berlin-Frankfurt-Münster study group. *Br J Haematol*, 151:132-142
24. Harrison CJ, Moorman AV, Broadfield ZJ, Cheung KL, Harris RL, Reza Jalali G, Robinson HM, Barber KE, Richards SM, Mitchell CD, Eden TO, Hann IM, Hill FG, Kinsey SE, Gibson BE, Lilleyman J, Vora A, Goldstone AH, Franklin IM, Durrant J, Martineau M, Childhood and Adult Leukaemia Working Parties, (2004). Three distinct subgroups of hypodiploidy in acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*, 125:552-559

25. Harrison CJ, Moorman AV, Barber KE, Broadfield ZJ, Cheung KL, Harris RL, Jalali GR, Robinson HM, Strefford JC, Stewart A, Wright S, Griffiths M, Ross FM, Harewood L, Martineau M, (2005). Interphase molecular cytogenetic screening for chromosomal abnormalities of prognostic significance in childhood acute lymphoblastic leukaemia: a UK Cancer Cytogenetics Group Study. *Br J Haematol*, 129:520–530.
26. Harrison CJ, (2001). Acute lymphoblastic leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol*, 14:593-607
27. Heerema NA, Raumondi SC, Anderson JR, Biegel J, Camitta BM, Cooley LD, Gaynon PS, Hirsch B, Magenis RE, McGavran L, Patil S, Pettenati MJ, Pullen J, Rao K, Roulston D, Schneider NR, Shuster JJ, Sanger W, Sutcliffe MJ, van Tuinen P, Watson MS, Carroll AJ, (2007). Specific extra chromosomes occur in a modal number dependent pattern in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*, 46:684-693
28. Heerema NA, Sather NS, Sensel MG, Lee MK, Hutchinson RJ, Nachman JB, Reaman GH, Lange BJ, Steinherz PG, Bostrom BC, Gyanon PS, Uckun FM, (2000). Abnormalities of Chromosome Bands 13q12 to 13q14 in Childhood Acute Lymphoblastic Leuemia. *J Clin Oncol*, 18:3837-3844
29. Hunger SP, (2011). Tyrosin kinase inhibitor use in pediatric Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic anemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2011:361-365
30. Chan NPH, Ng MHL, Lee V, Tsang KS, Lau TT, Li CK, (2002). Hereditary duplication of proximal chromosome 1q (q11q22) in a patient with T lymphoblastic lymphoma/leukaemia: a family study using G banding and comparative genomic hybridisation. *J Med Genet*, 39:e79

31. Chudoba I, Hickmann G, Friedrich T, Jauch A, Kozlowski P, Senger G, (2004). mBAND: a high resolution multicolor banding technique for the detection of complex intrachromosomal aberrations. *Cytogenet Genome Res* 104:390-393
32. 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. *Cytogenet Cell Genet*, 84:156-160
33. ISCN (2009): International System of Human Cytogenetic Nomenclature, Shaffer LG, Slovak ML, Campbell LJ (eds). (S Karger AG, Basel 2009).
34. Ito C, Kumagi M, Manabe A, Coustan-Smith E, Raimondi SC, Behm FG, Murti KG, Rubnitz JE, Pui CH, Campana D, (1999). Hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia with 52 to 65 chromosome: a distinct biological entity with a marked propensity to undergo apoptosis. *Blood*, 93:315-320
35. Kamb A. (1995): Cell-cycle regulators and cancer. *Trends Genet*, 11:136-140
36. Kaspers GJL, Smets LA, Pieters R, Van Zantwijk CH, Van Wering ER, Veerman AJP, (1995). Favorable prognosis of hyperdiploid common acute lymphoblastic leukemia may be explained by sensitivity to antimetabolites and other drugs: Results of an in vitro study. *Blood*, 85:751-756.
37. Kebriaei P, Anastasi J, Larson RA, (2003). Acute lymphoblastic leukaemia: diagnosis and classification. *Best Pract Res Clin Haematol*, 15:597-621
38. Knudson AG, (1971). Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 68:820-823

39. Kuchinskaya E, Heyman M, Nordgren A, Schoumans J, Staaf J, Borg Å, Söderhäll S, Grandér D, Nordenskjöld M, Blennow E, (2008). Array-CGH reveals hidden gene dose changes in children with acute lymphoblastic leukaemia and a normal or failed karyotype by G-banding. *Br J Haematol*, 140:572-577
40. La Starza R, Crescenzi B, Pierini V, Romoli S, Gorello P, Brandimarte L, Matteucci C, Kropp MG, Barba G, Martelli MF, Mecucci C, (2007). A common 93-kb duplicated DNA sequence at 1q21.2 in acute lymphoblastic leukemia and Burkitt lymphoma. *Cancer Genet Cytogenet*, 175:73-76
41. Look AT, Melvin SL, Williams DL, Brodeur GM, Dahl GV, Kalwinsky DK, Murphy SB, Mauer AM, (1982). Aneuploidy and percentage of S-phase cells determined by flow cytometry correlate with cell phenotype in childhood acute leukemia. *Blood*, 60:959-67
42. Ma SK, Chan GCF, Wan TSK, Lam CK, Ha SY, Lau YL, Chan LC, (1998). Near-haploid common acute lymphoblastic leukaemia of childhood with a second hyperdiploid line: a DNA ploidy and fluorescence *in-situ* hybridization study. *Br J Haematol*, 103:750-755
43. MacKinnon RN, Chudoba I, (2011). The Use of MFISH and MBAND to Define Chromosome Abnormalities. *Methods Mol Biol*, 730:203-218
44. Macville M, Veldman T, Pallida-Nash H, Wangsa D, O'Brien P, Schröck E, Reid T, (1997). Spectral karyotyping, a 24-colour FISH technique for the identification of chromosomal rearrangements. *Histochem Cell Biol* 108:299-305
45. Malbora B, Avci Z, Olgac A, Grusel O, Kurecki E, Ozbek N, (2012). Successful treatment of ICE-rituximab chemotherapy and subsequent bone marrow transplantation in a patient with early-relapse Burkitt leukemia and inverted duplication of 1q. *J Pediatr Hematol Oncol*, 34:84-85
46. Maloney KW, (2011). Acute lymphoblastic leukaemia in children with Down syndrome: an update review. *Br J Haematol*, 155:420-425

47. Marschalek R, (2010). Mechanisms of leukemogenesis by *MLL* fusion proteins. *Br J Haematol*, 152:141-154
48. Marusawa H, Takai A, Chiba T, (2011). Role of activation-induced cytidine deaminase in inflammation-associated cancer development. *Adv Immunol*, 111:109-141
49. Michalová K, Zemanová Z, (2005). Klasická a molekulární cytogenetika v klinické praxi. *Klin. Biochem. Metab.* 13:63-67
50. Mitelman F, Johansson B, Mertens F, (2007). The impact of translocations and genes fusions on cancer causation. *Nat Rev Cancer*, 7:233-245
51. Mkrtchyan H, Garcia Ney DR, de Ventrura ES, Liehr T, Felix GR, De Jesus Marques-Salles T, Abdelhay E, MacEdo-Silva ML, (2010). Molecular cytogenetic studies characterize a near-triploid complex karyotyp in a child with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet*, 197:71-74
52. Mrózek K, Heerema NA, Bloomfield CD, (2004). Cytogenetics in acute leukemia. *Blood Rev* 18:115-136
53. Moorman AV, Clark R, Farrell DM, Hawkins JM, Marrison M, Secker-Walker LM, (1996). Probes for hidden hyperdiploidy in acute lymphoblastic leukaemia. *Genes Chromosomes Cancer*, 16:40-45
54. Moorman AV, Richards SM, Martineau M, Cheung KL, Robinson HM, Reza Jalali G, Broadfield ZJ, Harris RL, Kerry ET, Gibson BES, Hann IM, Hill FGH, Kinsey SE, Eden TOB, (2003). Outcome heterogeneity in childhood high-hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 102:2756-2762
55. Moorman AV, Chilton L, Wilkinson J, Ensor HM, Bown N, Proctor SJ, (2010a). A population-based cytogenetic study of adults with acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 115:206-214
56. Moorman AV, Ensor HM, Richards SM, Chilton L, Schwab C, Kinsey SE, Vora A, Mitchell CD, Harrison CJ, (2010b). Prognostic effect of chromosomal abnormalities in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia:

results from the UK Medical Research Council ALL97/99 randomised trial. *Lancet Oncology*, 11:429-438

57. Morerio C, Rapella A, Tassano E, Lanino E, Micalizzi C, Rosanda C, Panarello C, (2006). Gain of 1q in pediatric myelodysplastic syndromes. *Leuk Res*, 30:1437-1441
58. Nachman JB, Heerema NA, Sather H, Camitta B, Forestier E, Harrison CJ, Dastugue N, Schrappe M, Pui CH, Basso G, Silverman LB, Janka-Schaub GE, (2007). Outcome of treatment in children with hypodiploid acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 110:1112-1115
59. Onodera N, McCabe NR, Rubin CM, (1992). Formation of hyperdiploidy in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 111:112-115
60. Palamarchuk A, Efanov A, Nazaryn N, Santanam U, Alder H, Rassenti L, Kipps T, Croce CM, Pekarsky Y, (2010). 13q14 deletion in CLL involve cooperating tumor suppressors. *Blood*, 115:3916-3922
61. Paulsson K, Heidenblad M, Morse H, Borg A, Fioretos T, Johansson B, (2006). Identification of cryptic aberrations and characterization of translocation breakpoints using array CGH in high hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 20:2002-2007
62. Paulsson K, Johansson B, (2009). High hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*, 48, 637-660
63. Paulsson K, Forestier E, Lilljebjörn H, Heldrup J, Behrendtz M, Young BD, Johansson B, (2010). Genetic landscape of high hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 170, 21719-21724
64. Pavlová S, Mayer J, Šmardová J, (2002). Nádorový supresor P53 a leukémie. *Klin Onkol*, 15:130-134
65. Peter A, Heiden T, Taube T, Körner G, Seeger K, (2009). Interphase FISH on TEL/AML1 positive acute lymphoblastic leukemia relapses-analysis

of clinical relevance of additional TEL and AML1 copy number changes. *Eur J Haematol*, 83:420-432

66. Pias AP, Amare Kadam PS, Raje GC, Banavali S, Parikh P, Kurkure P, Arora B, Gujral S, Kumar SA, Badrinath Y, (2008). RUNX1 aberrations in ETV6/RUNX1-positive and ETV6/RUNX1-negative patients: its hemato-pathological and prognostic significance in a large cohort (619) of ALL. *Pediatr Hematol Oncology*, 25:582-597
67. Pui CH, Kane JR, Crist WM, (1995). Biology and treatment of infant leukemias. *Leukemia*, 9:762-769
68. Pui CH, Raimondi SC, Dodge RK, Rivera GR, Fuchs LAH, Abromowitch M, Look AT, Furman WL, Crist WM, Williams DL. (1989). Prognostic importance of structural chromosomal abnormalities in children with hyperdiploid (>50 chromosomes) acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 73: 1963-1967.
69. Raimondi SC, Zhou Y, Mathew S, Shurtleff SA, Sandlund JT, Rivera GK, Behm FG, Pui CH, (2003). Reassessment of the Prognostic Signification of Hypodiploidy in Pediatric Patients with Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer*, 98:2715-2722
70. Ritterbach J, Hiddemann W, Beck JD, Schrappe M, Janka-Schaub G, Ludwig WD, Harbott J, Lampert F, (1998). Detection of hyperdiploid karyotypes (>50 chromosomes) in childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL) using fluorescence *in situ* hybridization (FISH). *Leukemia*, 12:427-433
71. Schröck E, du Manoir S, Veldman T, Schoell B, Wienberg J, Ferguson-Smith MA, Ning Y, Ledbetter DH, Bar-Am I, Soenksen D, Garini Y, Ried T, (1996). Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science*, 26:494-497
72. Seif AE, (2011). Pediatric leukemia predisposition syndromes: clues to understanding leukemogenesis. *Cancer Genet*, 204:227-244

73. Shaffer LG, Beaudet AL, Brothman AR, Hirsch B, Levy B, Martin CL, Mascarello JT, Rao KW, (2007). Microarray Analysis for Constitutional Cytogenetic Abnormalities. *Genet Med*, 9:654-662
74. Siebert R, Matthiesen P, Harder S, Zhang Y, Borowski A, Zühlke-Jenisch R, Metzke S, Joos S, Weber-Matthiesen K, Grote W, Schlegelberger B, (1998). Application of interphase fluorescence in situ Hybridization for the detection of the Burkitt translocation t(8;14)(q24;q32) in B-cell lymphomas. *Blood*, 91:984-990
75. Solé F, Espinet B, Sanz GF, Cervera J, Calasanz MJ, Luño E, Prieto F, Granada I, Hernández JM, Ciqudosa JC, Diez JL, Bureo E, Marquéz ML, Arranz E, Ríos R, Martínez Climent JA, Vallespi T, Florensa L, Woessner S, (2000). Incidence, characterization and prognostic signification of chromosomal abnormalities in 640 patients with primary myelodysplastic syndromes. *Bri J Haematol*, 14:531-551
76. Solinas-Toldo S, Lampel S, Stilqenbauer S, Nickolenko J, Benner A, Döhner H, Cremer T, Lichter P, (1997). Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. *Genes Chromosomes Cancer*, 20:399-407
77. Starý J, Gajdoš P, Blažek B, Ptoszková H, Mihál V, Pospíšilová D, Hrstková H, Dembická D, Kopečná L, Slavík Z, Hak J, Procházková D, Zahálka F, Černá Z, Jabali Y, Timr P, Vávra V, Mydlil J, Hrušák O, Trka J, (2003). Zlepšení výsledků léčby dětí s akutní lymfoblastickou leukémií podle protokolu ALL-BFM 90 v České republice. *Čas Lék Čes*, 142:404-409
78. Starý J, (2010). Akutní leukémie u dětí. *Onkologie*, 4:120-124
79. Suryanarayan K, Hunger SP, Kohler S, Carroll AJ, Crist W, Link MP, Cleary ML, (1991). Consistent involvement of the bcr gene by 9;22 breakpoints in pediatric acute leukemias. *Blood*, 77, 324:330
80. Thompson SL, Compton DA, (2011). Chromosomes and Cancer Cells. *Chromosome Res*, 19:433-444

81. Tirado CA, Meloni-Ehring AM, Edwards T, Scheerle J, Burks K, Repetti C, Christacos NC, Kelly JC, Greenberg J, Murphy C, Croft CD, Heritage D, Mowrey PN, (2007). Cryptic ins (4;11)(q21;q23q23) detected by fluorescence in situ hybridization: a variant of t(4;11)(q21;q23) in an infant with a precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia report of a second case. *Cancer Genet Cytogenet*, 174:166-169
82. Van Dyke DL, Shannafelt TD, Call TG, Zent CS, Smoley SA, Rabe KG, Schwager SM, Sonbert JC, Slager SL, Kay NE, (2009). A comprehensive evaluation of the prognostic significance of 13q deletions in patients with B-chronic lymphocyt leukaemia. *Br J Haematol*, 148:544-550
83. Von Berg A, Gargallo P, De Prijck B, Vranckx H, Marschalek R, Larripa I, Kluin Ph, Schuurin E, Hagemeijer A, (2001). Cryptic t(4;11) encoding *MLL*-AF4 due to insertion of 5'*MLL* sequences in chromosome 4. *Leukemia*, 15:595-600
84. Wadlow R, Ramaswamy S, (2005). DNA Microarrays in Clinical Cancer Research. *Curr Mol Med*, 5:111-120
85. Whitehead VM, Vuchich MJ, Lauer SJ, Mahoney D, Carroll AJ, Shuster JJ, Esseltine DW, Payment C, Look AT, Akabutu J, (1992). Accumulation of high levels of methotrexate polyglutamates in lymphoblasts from children with hyperdiploid (greater than 50 chromosomes) B-lineage acute lymphoblastic leukemia: A Pediatric Oncology Group study. *Blood*, 80:1316-1323
86. Wishart MJ, Taylor GS, Slama JT, Dixon JE, (2001). PTEN and myotubularin phosphoinositide phosphatases: bringing bioinformatics to the lab bench. *Curr Opin Cell Biology*, 13:172-181
87. Yaghmaie M, Ghaffari SH, Ghavamzadeh A, Alimoghaddam K, Jahani M, Mousavi S-A, Irvani I, Bahar B, Bibordi I, (2007). Frequency of BCR-ABL Fusion Transcripts in Iranian Patients with Chronic Myeloid Leukemia. *Arch Iranian Med*, 11:247-251
88. Zanke B, Squire J, Griesse H, Henry M, Suzuki H, Patterson B, Minden M, Mak TW, (1994). A hematopoietic protein tyrosine phosphatase (HePTP) gene that is

amplified and overexpressed in myeloid malignancies maps to chromosome 1q32.1. *Leukemia*, 8:236-244

89. Zemanová Z, Michalová K, Šindelářová L, Smíšek P, Březinová J, Ransdorfová Š, Vávra V, Dohnalová A, Starý J, (2005). Prognostic value of structural chromosomal rearrangements and small cell clones with high hyperdiploidy in children with acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res*, 29:273-281
90. Zemanová Z, Michalová K, Březinová J, Šindelářová L, Kurková Š, Smíšek P, Zuna J, Trka J, Starý J, (2001): Fluorescenční in situ hybridizace (FISH) v diagnostice dětských akutních lymfatických leukémií (ALL). *Čas Lék čes*, 140:519-524
91. Zuna J, Madžo J, Krejčí O, Zemanová Z, Kalinová K, Možíková K, Zápotocký M, Starková J, Hrušák O, Horák J, Trka J, (2011). ETV6/RUNX1 (TEL/AML1) is a frequent prenatal first hit in childhood leukemia. *Blood*, 117:368-369

Internetové a knižní zdroje:

Snustad, DP, Simmons, MJ, (2009): Genetika, MU Brno, kapitola 22

<http://www.cambridgebluegnome.com/productcytochipcancer> (staženo 5. 7. 2011)

http://www.uhkt.cz/files/nrl-dna/blp/Smernice_FISH.pdf (staženo 25. 10. 2011)

<http://blognyahana.wordpress.com/2010/05/17/hematopoiesis/> (staženo 29. 10. 2011)