

**Univerzita Karlova v Praze**

**1. lékařská fakulta**

Doktorské studijní programy v biomedicině

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie



**RNDr. Iveta Šárová**

Molekulárně cytogenetická analýza aberací chromosomu 11 u  
hematologických malignit

Molecular-cytogenetic analysis of chromosome 11 aberrations in  
hematological malignancies

Disertační práce

Vedoucí práce: RNDr. Jana Březinová, Ph.D.

Praha 2012

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze dne .....

.....

Iveta Šárová

**Identifikační záznam:**

ŠÁROVÁ, Iveta. *Molekulárně cytogenetická analýza aberací chromosomu 11 u hematologických malignit. [Molecular-cytogenetic analysis of chromosome 11 aberrations in hematological malignancies]*. Praha, 2012. 108 s., 7 příl. Disertační práce (Ph.D.). Ústav hematologie a krevní transfúze/Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Centrum nádorové cytogenetiky ÚLBLD. Vedoucí závěrečné práce Březinová, Jana.

## Abstrakt

Změny chromosomu 11 patří mezi časté cytogenetické nálezy u hematologických malignit. Zlomové místo se obvykle nachází v oblasti 11q23.3, v proto-onkogenu *MLL*. Vzácně se zlomy vyskytují i v jiných oblastech, což svědčí o účasti i dalších genů. V naší studii jsme se zaměřili na identifikaci zlomů a oblastí amplifikace/delece na chromosomu 11 v buňkách kostní dřeně/periferní krve nemocných s akutní myeloidní leukémií (AML).

Na chromosomu 11 jsme identifikovali množství rekurentních i náhodných zlomových míst (rekurentní v genech *MLL* (11q23.3) a *NUP98* (11p15.4) a v oblastech 11p13, 11p12 a 11q13.2) a vyhodnotili jsme deletované a duplikované/amplifikované oblasti. Poukázali jsme na nové kandidátní geny s možnou úlohou v patogenezi AML. Oproti představám *MLL* genu, jsme prokázali spojitost ostatních změn chromosomu 11 se starším věkem nemocných, komplexním karyotypem, nebalancovanou změnou a krátkou dobou přežití. FISH skriningové vyšetření se ukázalo velmi přínosné u pacientů s nedostatkem dělících se buněk a pro detekci kryptických přestaveb *MLL* genu.

Studium chromosomových změn slouží nejen ke klinické stratifikaci nemocných do prognostických skupin, ale je i nezbytným podkladem pro identifikaci genů, které asociují se vznikem a progresí nádorů. Analýzy těchto genů a jejich produktů nám pomáhají porozumět patogenezi maligní transformace. Významně přispívají k vývoji nových terapeutik a cílené léčby.

**Klíčová slova:** akutní myeloidní leukémie, *MLL*, komplexní karyotyp, FISH mapování.

## Abstract

Chromosome 11 abnormalities are found in many hematological malignancies. In acute myeloid leukemia (AML), a proto-oncogene *MLL* (11q23.3) is frequently altered. However, rearrangements to other regions of chromosome 11 have been reported. Therefore, we have identified and characterized the chromosome 11 breakpoints and common deleted and amplified areas in the bone marrow or peripheral blood cells of newly diagnosed patients with AML.

Many recurrent and random chromosome 11 breakpoints were identified (recurrent in bands 11p15.4 (in *NUP98* gene), 11q23.3 (in the *MLL* gene), 11p13, 11p12 and 11q13.2) and deleted or duplicated/amplified regions were determined. We notified new possibly significant genes in the development of AML. Contrary to the *MLL* rearrangements, patients with other chromosome 11 changes were older, with complex karyotype, unbalanced aberrations and short survival. FISH screening was proved very helpful in case of dividing cells lack and cryptic *MLL* gene rearrangement.

In conclusion, molecular analyses of chromosomal breakpoints and amplified or deleted areas are very important not only for the patient stratification into specific prognostic and clinical subgroups but also for the identification of genes involved in tumour pathogenesis. Further investigation of the affected genes and their protein products will improve our understanding of the oncogenesis of AML and could be clinically applied for the designation of more effective therapeutic approach.

**Key words:** acute myeloid leukemia (AML), *MLL*, complex karyotype, FISH mapping.

Na tomto místě bych velmi ráda vyjádřila své poděkování především RNDr. Janě Březinové, Ph.D za odborné vedení práce, poskytnutí řady konzultací ke zvolené problematice a trpělivosti. Také za podporu a nezdolný optimismus.

Velmi ráda bych také poděkovala Prof. Ing. K. Michalové za srdečné přijetí do kolektivu profesionálních cytogenetiků a poskytnutí možnosti vypracovat si tuto práci na velice dobře vybaveném, akreditovaném pracovišti. Prof. Ing. K. Michalové a doc. Z. Zemanové děkuji za mnoho užitečných rad a konzultací, a to především při získávání zkušeností v oblasti publikačních dovedností a prezentace výsledků.

Poděkovat musím i celému zbylému kolektivu z Centra nádorové cytogenetiky ÚLBLD VFN a 1.LF UK a především kolegyním z Cytogenetické laboratoře ÚHKT za velmi přátelské prostředí. Za rychlé zpracování statistických dat a milý přístup děkuji i Ing. A. Dohnalové a také všem klinickým lékařům, kteří nám věnovali čas a poskytli klinická data nemocných nutná pro statistické zpracování.

V neposlední řadě musím poděkovat své rodině nejen za vytvoření příznivých studijních podmínek, ale také za nezbytnou podporu a pochopení.

## SEZNAM ZKRATEK

AF...	ALL1 fused gene from chromosome ...
AML	akutní myeloidní leukemie
ATM	ataxia telangiectasia mutated
BCR	breakpoint cluster region
CCND1	cyclin D1
DCDC...	doublecortin domain-containing protein ...
del	delece
der	derivovaný chromosom
FAB	French-American-British
FISH	fluorescenční in situ hybridizace
GAL	galanin
ins	inzerce
inv	inverze
lncRNA	long non-coding RNA
MAML2	mastermind-like protein 2
mBAND	mnohobarevné pruhování
MDS	myelodysplastický syndrom
mFISH	mnohobarevná fluorescenční in situ hybridizace
MLL	myeloid/lymphoid leukemia
MLLT...	myeloid/lymphoid leukemia translocated to, ...
mRNA	microRNA
MTL5	metallothionein-like 5, testis-specific (tesmin)
NUP98	nucleoporin 98 KDa
p	označení pro krátké rameno chromosomu
PTD	parciální tandemová duplikace
q	označení pro dlouhé rameno chromosomu
RARA	retinoic acid receptor, alpha
t	translokace
TKD	transplantace kostní dřeně
TP53	gen pro protein 53 kDa
WHO	World Health Organization

# OBSAH

<b>1. ÚVOD</b> .....	9
<b>2. CÍLE PRÁCE</b> .....	11
<b>3. PŘEHLED LITERATURY</b> .....	12
<b>3.1. Chromosom 11</b> .....	12
<b>3.2. Molekulární podstata nádorových onemocnění</b> .....	13
<b>3.3. Změny chromosomu 11 u hematologických malignit</b> .....	14
<u>3.3.1. Změny dlouhého ramene chromosomu 11 (11q)</u> .....	15
<u>3.3.2. Změny krátkého ramene chromosomu 11 (11p)</u> .....	20
<b>3.4. Akutní myeloidní leukémie (AML)</b> .....	22
<u>3.4.1. Chromosomové změny u AML a jejich prognostický význam</u> .....	24
<u>3.4.2. Molekulární markery u AML a jejich prognostický význam</u> .....	27
<u>3.4.3. AML u dětí</u> .....	28
<b>4. MATERIÁL A METODY</b> .....	30
<b>4.1. Materiál</b> .....	30
<u>4.1.1. Soubor pacientů</u> .....	30
<b>4.2. Metodika</b> .....	31
<u>4.2.1. Klasická cytogenetická analýza</u> .....	31
<u>4.2.2. Molekulární cytogenetická analýza</u> .....	31
<u>4.2.3. Molekulárně genetická analýza</u> .....	33
<u>4.2.4. Statistická analýza</u> .....	34
<b>5. VÝSLEDKY</b> .....	35
<b>5.1. Změny chromosomu 11 u dospělých s AML</b> .....	36
<u>5.1.1. Mapování zlomů</u> .....	36
<u>5.1.2. Charakteristika a klinický význam zlomových míst</u> .....	49
<b>5.2. Změny chromosomu 11 u dětí s AML</b> .....	62
<b>5.3. Skrínigové vyšetření u AML</b> .....	62
<b>6. DISKUZE</b> .....	64
<b>7. ZÁVĚR</b> .....	77
<b>8. SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY</b> .....	81
<b>9. SEZNAM PŘÍLOH</b> .....	94
<b>10. SEZNAM PUBLIKACÍ, PŘEDNÁŠEK A POSTEROVÝCH SDĚLENÍ</b> .....	102



## 1. ÚVOD

Chromosomové a genetické změny jsou nezbytným zdrojem pro vznik a vývoj eukaryotních organismů v evolučním měřítku. Právě tyto změny vedly k vytvoření a variabilitě všech rostlinných a živočišných druhů, tak jak je známe dnes. Je paradoxem, že tyto mechanismy nemusí vést jen k zrodu, ale i zániku, a to pokud k nim dochází na buněčné úrovni v rámci jedince. Změny v DNA sekvenci, její struktuře nebo epigenetické regulaci umožňují buňce získat selekční výhodu nad ostatními a spustit tak klonální expanzi označovanou jako nádor.

Hypotéza o chromosomových abnormalitách jako zdrojích maligních onemocnění byla již formulována v roce 1914 německým biologem Theodorem Boverim a následně potvrzena řadou dalších studií. Objevení Filadelfského chromosomu, výsledku translokace  $t(9;22)(q34;q11)$ , u chronické myeloidní leukémie v roce 1960 spustilo vlnu cytogenetických studií hledajících podobné změny i u dalších hematologických a solidních nádorů a způsobilo rozvoj a expanzi molekulárně cytogenetických metod, které aberace snadněji zachytily a charakterizovaly. V současné době bylo u nádorových onemocnění popsáno přes 55 000 patologických karyotypů. Jejich archivace si vynutila vznik řady internetových databází jako je například Mitelman Database of Chromosome Aberrations in Cancer (<http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>) nebo Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Hematology (<http://atlasgeneticsoncology.org>).

Statistické studie skupin nemocných s hematologickou malignitou a se stejnou chromosomovou změnou dokázaly, že cytogenetická analýza je nedílnou součástí vyšetřovacích metod. Stala se velmi důležitým klinickým nástrojem, který při diagnostickém odběru přispívá k upřesnění diagnózy, určení stádia nemoci, stanovení prognózy a následnému výběru léčebné terapie. Mnoho studií již prokázalo, že přítomnost cytogeneticky abnormálního klonu je nepříznivým prognostickým znakem jak u hematologických, tak i solidních nádorů. O míře nepříznivosti rozhoduje i míra komplexity chromosomových změn. Informativní význam cytogenetické analýzy neklesá ani v průběhu onemocnění, kdy umožňuje sledovat jeho progresi, případně transformaci, ukazuje na úspěšnost léčby po chemoterapii nebo transplantaci kostní dřeně a v neposlední řadě může být použita i k stanovení minimální reziduální choroby.

Kromě klinického významu přinesla cytogenetická analýza i mnoho velmi důležitých poznatků ve studiu onkogeneze a zůstává významným nástrojem pro

lokalizaci konkrétních alterovaných genů, především je-li změna balancovaná a tím je pro řadu jiných celogenomových metod jako je například array analýza nedetekovatelná. Molekulárním genetikům poskytuje velmi cenné informace o tom, které místo je vhodné sekvenovat a identifikovat tak postižené geny. Následné biologické a funkční analýzy těchto genů jsou předpokladem pro vývoj individuální a cílené terapie. Příkladem významu objasnění molekulární podstaty chromosomových změn je translokace t(15;17)(q22;q21), charakteristická pro akutní promyelocytární leukémii, při níž dochází k přestavbě receptoru kyseliny retinové. Zavedení cílené léčby pomocí inhibitorů této kyseliny vedlo k přehodnocení dříve prognosticky nepříznivého onemocnění do skupiny prognosticky velmi příznivé s dlouhodobým stavem remise.

V naší studii jsme se zaměřili na detekci a charakteristiku změn na chromosomu 11, protože patří mezi časté cytogenetické nálezy u hematologických malignit. Většina cytogenetických i genetických analýz se zabývá oblastí 11q23.3, kde je lokalizovaný protoonkogen *MLL*. Mnohé ostatní změny chromosomu 11 se vyskytují vzácně a zůstávají tak cytogeneticky i geneticky málo probádané. Studií jsme tyto abnormality lépe definovali a charakterizovali jak na základě cytogenetickém, tak i klinickém.

## 2. CÍLE PRÁCE

Aberace chromosomu 11 byly popsány u řady hematologických malignit, nejčastěji u akutní myeloidní leukémie (AML). Proto jsme se v naší studii zaměřili na detekci aberací chromosomu 11 právě u tohoto onemocnění.

Cílem studie bylo:

- charakterizovat změny chromosomu 11 u dospělých a dětských pacientů s nově diagnostikovanou AML na molekulárně-cytogenetické úrovni
- určit a mapovat rekurentní zlomová místa a oblasti amplifikace/delece na chromosomu 11 pro identifikaci možných genů asociovaných s leukémií
- zjistit, zda se zlomová místa a frekvence jejich výskytu liší v reciprokých, n reciprokých a komplexních přestavbách, u primárních a sekundárních onemocnění, u dětí a dospělých
- vyhodnotit vztah mezi zlomovým místem a dalšími klinickými ukazateli, posoudit význam odlišných zlomových míst pro prognózu nemocných
- zhodnotit význam skrínigového molekulárně-cytogenetického vyšetření zaměřeného na nejčastější chromosomové změny u AML (abnormality oblasti 11q23.3, delece dlouhých ramen chromosomů 5 a 7 a početní změny chromosomů 8 a 9)

### 3. PŘEHLED LITERATURY

#### 3.1. Chromosom 11

Dle ISCN (International System of Human Cytogenetic Nomenclature) nomenklatury patří chromosom 11 do skupiny C, představující středně velké, submetacentrické chromosomy (Shaffer a kol. 2009). Představuje přibližně 4 až 4,5 % lidského genomu (asi 134,5 Mb včetně centromery), čímž se řadí mezi nejvíce genově bohaté chromosomy v lidském genomu. Euchromatin tvoří až 99,8 % chromosomu (Taylor a kol. 2006)

Na chromosomu 11 bylo dosud identifikováno 1 524 protein – kódujících genů z celkového množství 20 000 až 25 000 (viz **tabulka 1**). V průměru se odhaduje přítomnost 11,6 genů na 1 Mb. Jedna třetina protein – kódujících genů se překrývá. Zajímavostí je přítomnost značného množství CpG ostrůvků a sestřihových variant genů. Taylor a kol. (2006) našli nejméně 2 různé sestřihové varianty u 805 (52,8 %) genů lokalizovaných na chromosomu 11. Celkem bylo popsáno 3 723 variant pro 1 524 exprimovaných genů. Na chromosomu 11 se nachází řada významných genů i tzv. genových rodin. Z 856 genů nesoucích informaci pro čichové receptory se více než 40 % z nich vyskytuje právě na tomto chromosomu (Taylor a kol. 2006).

Chromosom 11 má velmi významnou roli v historii molekulární genetiky, a to díky genu pro β-řetězec hemoglobinu, který se nachází na jeho krátkém rameni v pruhu 11p15.5. Jedná se o jeden z nejlépe prostudovaných genů vůbec. Mutace, při níž dochází v 6. pozici k záměně kyseliny glutamové za valin, vede k změně tvaru červených krvinek z tzv. promáčknutých piškotů na protažené srpky. Onemocnění je známé jako srpkovitá anémie. Spojitost genetické nemoci s mutací specifického proteinu, kterou vyslovil slavný americký fyzikální chemik Linus Pauling v roce 1949, se stala historickým milníkem v oboru molekulární biologie.

V současné době jsou změny chromosomu 11 pokládány za podstatu více než 100 vrozených genetických onemocnění. Příkladem jsou Beckwith-Wiedemannův syndrom, Emanuelův syndrom, Jacobsenův syndrom, neuroblastom, Russell-Silverův syndrom, Wilmsův tumor a další. Sledována byla spojitost i s různými typy maligních onemocnění (Nowak a Shows, 1995).

**Tabulka 1. Výsledky sekvenace chromosomu 11 (převzato z Taylor a kol. 2006).**

Chromosome property	Value
Chromosome length (bp)	134,452,3843
Finished sequence length (bp)	131,130,853
Total gap length including 3 Mb centromere (bp)	3,321,531
Euchromatic region coverage (%)	99.76
Protein-coding gene loci	1,524
Known	1,195
Novel CDS	104
Novel transcripts	221
Putative	4
Pseudogenes	765
tRNAs (all)	19
tRNA pseudogenes	2
MicroRNAs	12
snoRNAs	27
Gene coverage (bp)	61,581,901 (46.96%)
Exon coverage (bp)	3,543,101 (2.70%)
Known gene mean size (bp)	45,007
CpG islands	1,369
Genes with 5' CpG islands	806
Gene deserts (>650 kb)	19
Gene desert coverage (bp)	23,378,900 (17.83%)

snoRNAs, small nucleolar RNAs.

### **3.2. Molekulární podstata nádorových onemocnění**

Vznik, vývoj a progresse nádorového onemocnění jsou založeny na kumulaci genetických mutací a epigenetických změn odehrávajících se v jediné somatické buňce. U hematologických malignit lze mnohé genetické změny sledovat již na cytogenetické úrovni. Některé chromosomové aberace se vyskytují pouze náhodně a nemají tak diagnostické, prognostické ani terapeutické uplatnění. Důležitou roli hrají nenáhodné chromosomové abnormality, které se velmi specificky vyskytují u konkrétního typu neoplázie a mají značný klinický význam (Mitelman 2010).

Genetické a epigenetické změny v buňce vedou k alteraci normálních buněčných procesů jako je buněčný růst, proliferace a diferenciace (Hanahan a Weinberg 2011). Ve výsledku dochází k nekontrolovatelnému dělení této buňky a založení nádorového klonu (nález nejméně dvou mitos se stejnou chromosomovou přestavbou nebo se stejným nadpočetným chromosomem, anebo výskyt tří mitos se stejným chybějícím chromosomem (Shaffer a kol. 2009). Při nádorové progresi lze sledovat klonální vývoj nemoci, a to přítomností dalších genetických abnormalit označovaných jako sekundární. Obvykle vedou k zhoršení prognózy nemocného.

U nádorových onemocnění se setkáváme s těmito chromosomovými abnormalitami: nebalancované ztráty/zmnožení genetického materiálu nebo balancované chromosomové aberace (Sandberg a Meloni-Ehrig 2010).

Z cytogenetického hlediska lze ztrátu genetického materiálu vyjádřit jako delecii nebo monosomii. Postiženy bývají oblasti obsahující nádorové supresorové geny nebo mutátorové geny, účastníci se reparace DNA. Produkty nádorových supresorových genů inhibují buněčný cyklus, čímž brání buňce v nekontrolovatelné proliferaci nutné k vzniku nádoru.

Zmnožení genetického materiálu můžeme pozorovat ve formě amplifikace, duplikace, trisomie nebo polyploidie. Patologický efekt spočívá ve zvýšení genové dávky vedoucí k nadprodukcii příslušných genových produktů. Amplifikované kopie genu na chromosomu vytváří homogenně se barvící oblast (HSRs). Mohou se ale vyskytovat i samostatně jako množství acentrických fragmentů tzv. double minutes (DMs). Amplifikace ovlivňují především protoonkogeny, jejichž produkty pozitivně regulují buněčný cyklus a diferenciaci.

Mezi chromosomové aberace bez ztráty nebo zisku genetického materiálu patří reciproké translokace, inverze a inserce. Postiženy bývají jak protoonkogeny, nádorové supresorové geny, tak i mutátorové geny. Změny v uspořádání genetického materiálu vyvolávají dva zásadní typy změn: deregulaci transkripce postiženého genu nebo jeho strukturní přestavby - syntézu změněného produktu s odlišnou funkcí.

V poslední době se studium vzniku nádorů upírá také na mikroRNA jako na důležitého zprostředkovatele iniciace a progresu nádorů. Cílem těchto krátkých regulačních RNA jsou protoonkogeny nebo nádorové supresorové geny. Exprese mikroRNA je ovlivňována genetickými a epigenetickými změnami zahrnujícími delecii, amplifikaci, bodové mutace a DNA metylace (Cho 2007). MikroRNA se jeví jako slibný diagnostický a patrně i prognostický molekulární ukazatel nádorových onemocnění.

### **3.3. Změny chromosomu 11 u hematologických malignit**

Jak již bylo uvedeno, abnormality chromosomu 11 byly popsány u řady maligních onemocnění, především u leukémií a lymfomů. S relativně častým nálezem aberací chromosomu 11 se setkáváme u akutní myeloidní leukémie (AML), myelodysplastického syndromu (MDS), akutní lymfatické leukémie (ALL), chronické lymfatické leukémie (CLL) a mnohočetného myelomu (MM). Postižena bývají především dlouhá ramena chromosomu 11.

### 3.3.1. Změny dlouhého ramene chromosomu 11 (11q)

Nejčastější abnormality chromosomu 11 u hematologických malignit souvisí s oblastí 11q23, která zahrnuje 10 až 15 Mb. Výzkum u sekundárních leukémií prokázal, že přestavby 11q23 jsou stejně frekventované jak u de novo, tak i sekundárních leukémií, způsobených léčbou zvláště pomocí inhibitorů topoizomerázy II, alkylačních činidel či radiace (Bloomfield a kol. 1998). Molekulárními analýzami zlomových míst v pruhu 11q23 došlo k identifikaci genu *MLL* (Zemin-van der Poel a kol. 1991). Oblast je však příliš velká na to, aby se její přestavby vždy týkaly tohoto genu. Mezi další často postižené geny u hematologických malignit patří i *CCND1* (11q13) a *ATM* (11q22), vzácně byly sledovány abnormality těchto oblastí: 11q22-q23 (gen *DDX10*), 11q14.1 (gen *GAB2*), 11q24.1 (gen *MIR100*), 11q13 (gen *NUMA1*) Přehled dalších genů lokalizovaných na 11q je uveden v **tabulce 2**.

**Tabulka 2. Alterované geny na 11q u hematologických malignit.**

Oblast	Gen	Funkce	Změna	Onemocnění	Poznámka
11q11	MACROD1	signální transdukce	t(11;21)(q13;q22)	myeloidní leukémie, MDS	
11q13	RELA	signální transdukce	mutace	lymfoproliferace	
11q13	MYEOV	neznámá	t(11;14)(q13;q32)	MM	↑ exprese
11q13	CCND1	regulátor buněčného cyklu	t(11;14)(q13;q32)	B-buněčné leukémie, MM	↑ exprese
11q13	NUMA1	poloha dělicího vřeténka	t(11;17)(q13;q21)	AML-M3	
11q13	INPPL1	signální transdukce	↑ exprese	CML	
11q14.1	GAB2	signální transdukce	amplifikace	myeloidní leukémie	
11q14	PICALM	signální transdukce	t(10;11)(p13;q14)	T-buněčné ALL	
11q21	CEP57	tvorba cytoskeletu	delece	MDS	
11q21	MAML2	signální transdukce	inv(11)(q21q23)	sekundární leukémie, MDS	
11q22	BIRC3	inhibitor apoptózy	t(11;18)(q21;q21)	lymfom	
11q22	ATM	signální transdukce	delece	CLL	
11q22	DDX10	RNA helikáza	inv(11)(p15q22)	AML, MDS	
11q23.1	ARHGAP20	signální transdukce	mutace	B-CLL	
11q23.1	POU2AF1	transkripční koaktivátor	amplifikace	MM, lymfom	
11q23.1	ZBTB16	transkripční faktor	t(11;17)(q23;q21)	AML-M3	
11q23.3	MLL	transkripční faktor	translokace	AML, ALL, MDS	
11q23.3	ARHGEF12	signální transdukce	del(11)(q23q23)	AML	fúzní gen
11q24.1	MIR100	regulační RNA	změna exprese	AML, ALL	
11q24.2	SPA17	signální transdukce	↑ exprese	MM	možná chemo-rezistence

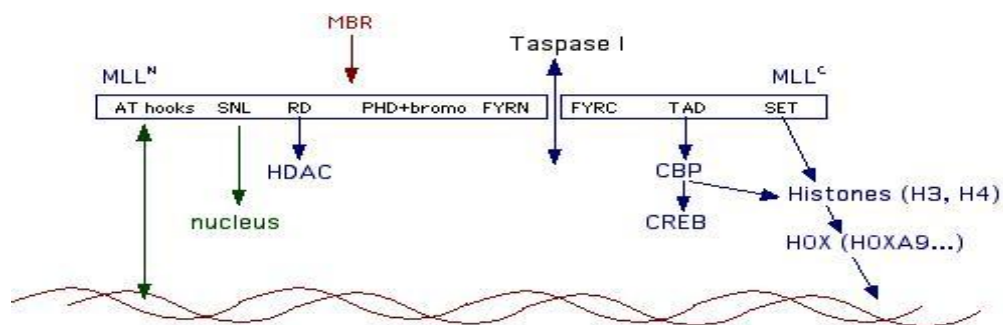
**Vysvětlivky:** MDS (myelodysplastický syndrom), MM (mnohočetný myelom), AML-M3 (akutní myeloidní leukémie – podtyp M3), CML (chronická lymfatická leukémie), ALL (akutní lymfatická leukémie), CLL (chronická lymfatická leukémie).

## MLL gen (myeloid/lymphoid or mixed lineage leukemia)

Aberace *MLL* genu jsou popisovány u 10 % všech akutních hematologických malignit zahrnujících myeloidní, lymfatické, bifenotypické, sekundární a dětské leukémie (Chowdhury a Brady 2008, Qian a kol. 2010).

Protoonkogen *MLL* obsahuje 37 exonů a velikostně přesahuje 100 kb. Transkripce probíhá ve směru od centromery. Gen kóduje protein obsahující 3 969 aminokyselin odpovídající 431 kDa. Posttranslačně je sestřižen specifickou taspázou (treoninendopeptidázou) do většího 320 kDa N-koncového a menšího 180 kDa C-koncového fragmentu (viz **obrázek 1**). Obě části zůstávají nadále nekovalentně vázány ve formě dimeru. MLL protein se nachází v jádře, kde je součástí komplexu tvořeného nejméně 30 proteiny. Jeho role spočívá v remodelaci, acetylaci, deacetylaci a metylaci nukleosomů a histonů. Ovlivňuje buněčnou diferenciaci, apoptózu, proliferaci a regulaci buněčného cyklu (Hess 2004, Marschalek 2011).

**Obrázek 1. Schématické znázornění MLL proteinu.**



**Vysvětlivky:** AT hooks (AT-vazebné motivy), SNL (sekvence nukleární lokalizace), RD (represní doména, cystein bohatý region homologní k savčí DNA - metyltransferáze), PHD+bromo (motivy zinkových prstů a bromodoména; protein - protein interakce), FYRN/FYRC (N- a C-koncová část proteinu), TAD (transaktivační doména; váže CBP (CREB vazebný protein), acetylace histonů H3 a H4 v oblasti *HOX* genů), SET (serin a treonin bohatá doména; homodimerizace; metylace histonů H3 v regionu *HOX* genů), MBR (hlavní zlomový region), HDAC (histondeacetyláza). Převzato z <http://www.infobiogen.fr/services/chromcancer/Genes/MLL.html> k datu 1.7.2012.

Velmi důležitou funkci má MLL protein během embryogeneze, kdy reguluje transkripci genů homeoboxu (*HOX*) (Slany 2005). Neiniciuje jejich expresi, ale udržuje ji po čas raného skeletárního, kraniofaciálního, neurálního a hematopoetického vývoje. V dospělosti je vyžadován pro diferenciaci myeloidních buněk. Uplatňuje se při proliferaci a přežití či nepřežití multipotentních progenitorů (Guenther a kol. 2005). Předpokládá se, že hlavním mechanismem leukemické transformace iniciované *MLL* onkogenem je právě deregulace specifických *HOX* genů. Teorii potvrzuje vyšší exprese



*HOXA7*, *HOXA9* a homeoboxového kofaktoru *MEIS1* u leukémií s *MLL* abnormalitami (Slany 2005, Marschalek a kol. 2010).

Zlomové místo v genu je obvykle lokalizováno uvnitř 8,3 kb regionu, označovaného BCR (breakpoint cluster region), mezi 5. a 11. exonem (dle nomenklatury NM\_005933.2 exony 7 až 13) (Gu a kol. 1992). Umístění a frekvenci zlomových míst ovlivňuje ve velké míře chromatinová struktura, přítomnost repetitivních sekvencí a místa pro vazbu topoizomerázy II (Gu a kol. 1994, Strissel a kol. 1998). Přibližně polovina *MLL* přestaveb souvisí s intronem 6, kde je nejvyšší incidence Alu repetitivních sekvencí (proximální část BCR). U sekundární formy leukémie se zlom obvykle nachází v distální části BCR, kde je lokalizováno vazebné místo pro topoizomerázu II. Vysvětluje to vznik leukémií způsobených léčbou inhibitory tlumícími ligázovou funkci enzymu, který poté zanechává volné konce DNA. To může vést k nehomologní rekombinaci mezi *MLL* genem a partnerským genem (Braekeleer 2005, Aplan 2006, Zhang a Rowley 2006).

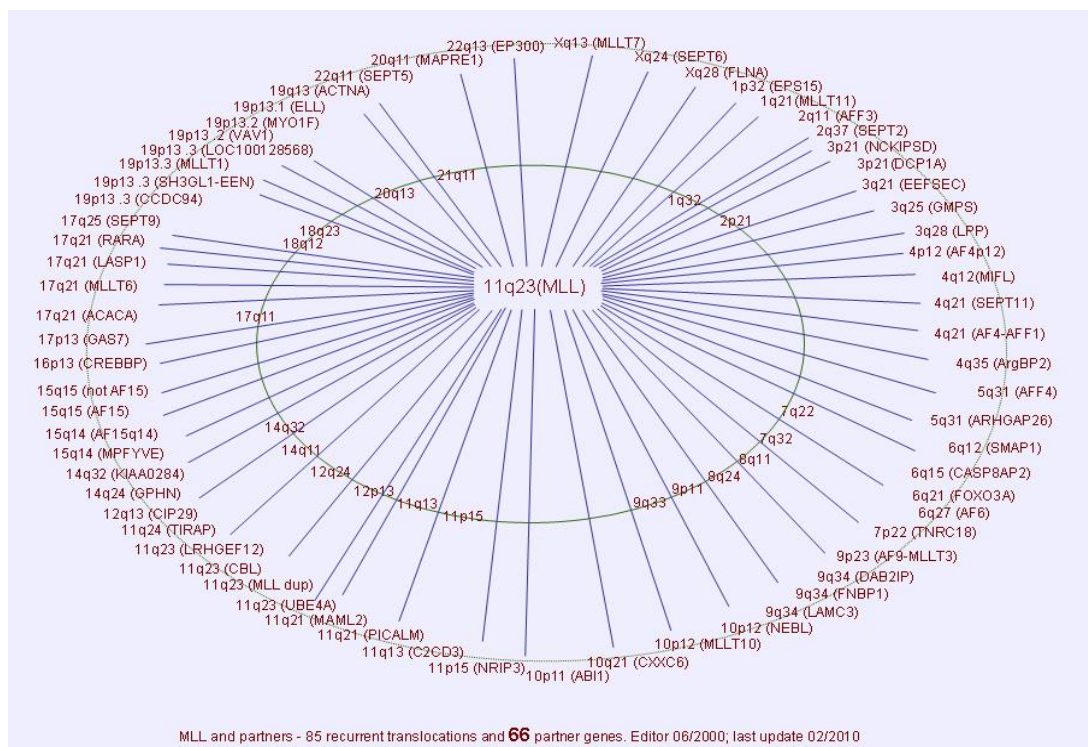
Změnami *MLL* genu mohou být translokace, amplifikace, duplikace a delece, zřídka se objevují inverze nebo inserce. Translokace a amplifikace se vyskytují nejčastěji.

Přestavba *MLL* genu vede k vzniku fúzního genu tj. genu vzniklého splynutím 5' konce *MLL* genu s 3' koncem partnerského genu (Rowley a kol. 1992, Daser a Rabbitts 2004). Výsledný fúzní gen obsahující 5'*MLL* je obvykle lokalizovaný na derivovaném chromosomu 11. V případě transkripčně opačně orientovaného partnerského genu než je gen *MLL* je k vzniku fúzního genu zapotřebí dalších mechanismů jako je inverze nebo inserce (Daser a Rabbitts 2004, Braekeleer 2005, Douet-Guilbert a kol. 2005). Obvykle mají *MLL* translokace reciprokou, balancovanou povahu. Na nukleotidové úrovni však mohou být přítomny i krátké delece, inverze, inserce nebo amplifikace (Aplan 2006).

Dle databáze Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Hematology bylo do roku 2010 popsáno 85 různých chromosomových partnerských oblastí, z nichž 66 bylo již charakterizováno i na molekulární úrovni (viz **obrázek 2**). Nejčastěji se vyskytují tyto translokace: t(6;11)(q27;q23), t(9;11)(p21;q23), t(10;11)(p12;q23) a t(11;19)(q23;p13) u AML a t(4;11)(q21;q23) a t(9;11)(p21;q23) u ALL (Gue a kol. 2006).

Obecně lze fúzní partnery *MLL* genu rozdělit do 2 skupin: jaderné proteiny s transkripční aktivitou (př. AFF1 (AF4), MLLT3 (AF9), MLLT10 (AF10), ENL

(MLLT1), ELL) a proteiny cytoplazmatické (př. MLLT4 (AF6), SEPT2, SEPT4, SEPT6, SEPT9, SEPT11). Existuje několik hypotéz o funkci chimérického proteinu. Může neutralizovat normální funkci MLL proteinu kompeticí o cílová vazebná místa nebo vytvořit nový transkripční faktor fúzí DNA vazebného motivu s transkripční doménou svého partnera. Dalším mechanismem leukemogeneze je oligomerizace *MLL* genu, způsobená přítomností dimerizační domény partnerského proteinu (Daser a Rabbitts 2004, So a Cleary 2004, Dou a Hess 2008). Současný pohled podporuje teorii nabytí nových onkogenních vlastností vlivem fúze s partnerským genem. To je v souladu s faktem, že heterozygotní ztráta *MLL* genu nevede u myši k vzniku leukémie (Yu a kol. 1995, Liu a kol. 2007, Takáčová a kol. 2007).



**Obrázek 2. *MLL* gen a jeho fúzní partnerské geny.**

Převzato z <http://www.infobiogen.fr/services/chromcancer/Genes/MLL.html> k datu 1.7.2012.

Odlišnou alterací *MLL* genu jsou parciální tandémové duplikace (PTD). Ty jsou popisovány u 6 – 10 % dospělých nemocných s AML převážně s normálním karyotypem nebo trisomií chromosomu 11 jako samostatnou abnormalitou (Caligiuri a kol. 1996, Caligiuri a kol. 1998, Whitman a kol. 2001, Döhner a kol. 2002, Mrozek a

kol. 2007). Duplikace *MLL* genu obvykle zahrnuje dle NM\_005933.3 exony 2 až 8 (Caligiuri a kol. 1996). V proteinu se PTD projeví duplikací N-konce. *MLL* PTD byly pozorovány i u zdravé populace avšak s menší frekvencí a nezahrnující typické exony (Basecke a kol. 2006). Velmi vzácně může dojít k duplikaci již translokovaného *MLL* genu. Takto vzniklé parciální duplikace, obsahující část DNA z jiného chromosomu, se označují jako netandemové (PNTD). Tyto aberace nejsou cytogeneticky detekovatelné a jejich identifikace vyžaduje více citlivé metody jako je například reverzní transkripční polymerázová řetězcová reakce (RT-PCR).

### **CCND1 (cyclin D1)**

Gen *CCND1*, kódující cyklin D1, o velikosti 4,5 kb obsahuje 5 exonů. Protein je tvořený 295 aminokyselinami celkově o 36 kDa. Nachází se v jádře, kde hraje důležitou roli v regulaci buněčného cyklu, a to v přechodu buňky z G1 do S fáze. Jeho exprese je závislá na fázi buněčného cyklu, v které se buňka nachází. Maximálně se exprimuje v G1 fázi a nejméně v S fázi cyklu. Mutace cyklinu D1 byly nalezeny u nejrůznějších typů neoplázií, z leukémií jsou přítomny u B-buněčných leukémií a lymfomů, méně u myeloidních leukémií (Jaroslav a kol. 2005). Mezi nejvýznamnější přestavby patří translokace t(11;14)(q13;q32) popisovaná u leukémie pláštěových buněk a myelomů. Při této fúzi je 5'konec *CCND1* translokován na chromosom 14 do oblasti genu pro těžký řetězec imunoglobulinu - IgH. Přestavba má za následek změnu v promotoru genu, což vede k zvýšené expresi cyklinu D1. Translokace bývá vždy spojena se špatnou prognózou a sníženou dobou přežití nemocných (Levy a kol. 1999).

### **ATM (ataxia telangiectasia mutated)**

Delece genu *ATM* byly prokázány u chronické lymfatické leukémie, jejímž rysem je vysoká invazivita a proliferace lymfatických buněk (Winrow a kol. 2005). Poprvé byly mutace *ATM* popsány u autosomálně recesivního onemocnění ataxia telangiectasia, charakterizovaném neuromuskulárními poruchami, imunodeficiencí, zvýšenou senzitivitou k radiačnímu záření, chromosomovou nestabilitou a vysokým rizikem vzniku lymfoidních malignit. Jejich studiem byly zjištěny mutace a delece genu *ATM* v obou alelách, proto je považován za nádorový supresorový gen (Stilgenbauer a kol. 1997). Gen *ATM* je lokalizován v oblasti 11q22.3. Obsahuje 66 exonů o celkové délce 184 kb. Gen je exprimován ve všech tkáních. Kóduje jaderný fosfoprotein o 3 056 aminokyselinách a velikosti 350 kDa. Tato serin/treoninová proteinkináza hraje

důležitou roli při reakci buňky na ionizující záření, které způsobuje dvouřetězcové zlomy DNA. Autofosforylací se inaktivní dimer rozdělí na aktivní monomery ATM, které fosforylují další proteiny. Mezi známé substráty kinázy patří proteiny p53, BRCA1 a mnoho dalších účastníků se reparace DNA a regulace buněčného cyklu. To vše má za následek aktivaci reparačních mechanismů a snahu pozastavit cyklus při poškození DNA ionizačním zářením (Chen a kol. 2005). Vorechovsky a kol. (1997) prokázali jako místo nejčastější mutace vysoce konzervativní oblast kódující kinázovou doménu proteinu. Důsledkem mutace je změna vazebné oblasti pro adenosintrifosfát či substrát.

### 3.3.2 Změny krátkého ramene chromosomu 11 (11p)

Abnormality krátkého ramene chromosomu 11 se u hematologických malignit vyskytují spíše jen vzácně. Obvykle postihují oblast 11p15 a zde lokalizovaný gen *NUP98* (nucleoporin 98kDa). Další popsáné alterace krátkého ramene jsou uvedeny v **tabulce 3**.

**Tabulka 3. Alterované geny na 11p u hematologických malignit.**

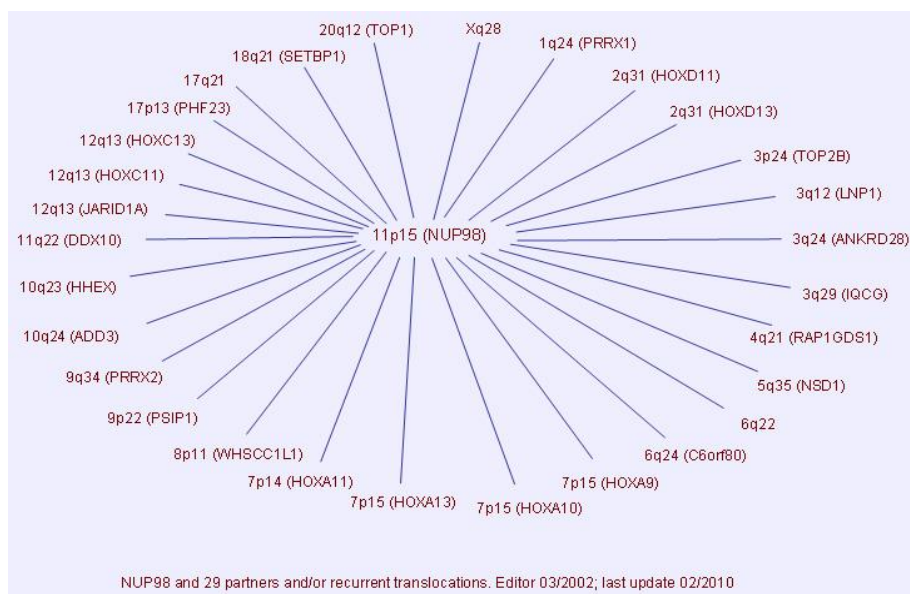
Oblast	Gen	Funkce	Aberace	Onemocnění
<b>11p15</b>	LMO1	transkripční faktor	t(11;14)(p15;q11)	T-buněčné ALL
<b>11p15.4</b>	NUP98	jaderný transport	přestavby 11p15	AML, MDS, ALL
<b>11p13</b>	LMO2	regulátor hematopoesy	t(11;14)(p13;q11), t(7;11)(q35;p13), del(11)(p12p13)	T-buněčné ALL

**Vysvětlivky:** MDS (myelodysplastický syndrom), AML (akutní myeloidní leukémie), ALL (akutní lymfatická leukémie).

### **NUP98 (nucleoporine 98 kDa)**

První změna genu *NUP98* byla identifikována v roce 1996 (Borrow a kol. 1996). Od té doby byly mutace *NUP98* jako vzácné rekurentní abnormality popsány u AML, MDS, CML, T-buněčné ALL, a to primárních i sekundárních typů (Nebral a kol. 2005, Zhang a kol, 2007, Wang a kol. 2010). Dle obsáhlé mezinárodní studie zabývající se sekundárními leukémiemi jsou nejčastějšími změnami inverze (11)(p15q23) a translokace t(7;11)(p15;p15). Jako přídatné aberace se objevují delece dlouhých ramen chromosomů 7 a 5 nebo monosomie 7 (Rowley a Olney, 2002). Vzhledem k své velmi distální lokalizaci je řada přestaveb genu *NUP98* klasickou cytogenetickou analýzou nedetekovatelná, pro identifikaci je proto třeba citlivějších molekulárních metod.

Gen kóduje protein o 920 aminokyselinách, velikosti 98 kDa. Obsahuje repetitivní motiv na N-konci (FG, FxFG nebo GLFG; G-glycin, L-leucin, F-fenylalanin, x-jakákoliv aminokyselina) a RNA vazebný motiv na C-konci. Protein se nachází v jaderné membráně savců, kde v asociaci s dalšími nukleoporiny tvoří supramolekulární strukturu důležitou pro jaderný transport (Iwamoto a kol. 2010). Jeho role v maligní transformaci není zcela objasněna, neboť jeho vysoce specializovaná funkce nezahrnuje vývoj krevních buněk. Zdá se tak, že významnou úlohu v nádorovém zvratu mají partnerské fúzní geny, které vlivem translokace vytvářející spolu s N-koncem NUP98 chimérický protein. Hypotézu potvrzuje fakt, že většina těchto genů patří mezi geny homeoboxu (až 50 % případů) (Kozev a kol. 2004). Do roku 2010 bylo identifikováno 29 různých fúzních partnerů (viz **obrázek 3**). Z důvodu vzácného výskytu *NUP98* přestaveb je jednoznačné stanovení prognózy zatím obtížné. Recentní studie poukazují na spojitost spíše se špatným klinickým průběhem (Hidaka a kol. 2007, La Starza a kol. 2009, Hollink a kol., 2011, Lundin a kol., 2011).



**Obrázek 3. *NUP98* gen a jeho partnerské geny.**

Převzato z <http://www.infobiogen.fr/services/chromcancer/Genes/NUP98.html> k datu 1.7.2012.

### 3.4. Akutní myeloidní leukémie (AML)

Myeloidní leukémie patří mezi nádorová onemocnění krvetvorné tkáně, které postihují buňky myeloidní řady. Akutní formy této nemoci jsou charakterizovány akumulací nezralých krevních elementů v kostní dřeni. Abnormální buňky patologického klonu mají omezenou schopnost diferenciaci a vykazují různé funkční poruchy. Zdravá krvetvorba bývá potlačena. Zpočátku se AML projevuje nespecificky. U nemocných se objevuje únava a krvácivé nebo infekční komplikace. Mezi symptomy patří horečka, ztráta hmotnosti, nechutenství, chudokrevnost nebo bolesti kostí (Adam a kol. 2008).

Nemoc bývá ročně diagnostikována u cca 3:100 000 obyvatel a tato incidence se v posledních letech nemění. Převažuje u dospělých, kde tvoří 80 až 85 % všech akutních leukémií u osob starších 20 let. Častěji postihuje obyvatele větších průmyslových měst. Medián vzniku tohoto onemocnění se pohybuje mezi 63 až 65 lety (Mayer a Starý 2002). V dětské populaci se objevuje relativně vzácně. Představuje asi jen 15 – 20 % dětských akutních leukémií. Jde především o děti velmi nízkého věku tj. mladších 1 rok (Hall 2001).

Charakteristickým znakem AML je v krvi zjištělá normocytární anémie, trombocytopenie a leukocytóza, zpravidla s vyplavením blastických elementů (> 20 % myeloblastů). Obvyklá bývá i infiltrace jednotlivých orgánů jako jsou játra, slezina, kůže nebo centrální nervový systém, což vede k poruše jejich funkce. Vzácně může dojít k vzniku granulocytárního sarkomu. Akutní myeloidní leukémii také relativně často provází trombo - hemoragické komplikace (Adam a kol. 2008).

AML může vzniknout de novo nebo vlivem předešlé léčby, obzvláště anti-topoizomerázními léky jako jsou etoposidy nebo teniposidy (Sung a kol. 2006). K vzniku leukémie také dochází po vystavení organismu některým chemickým látkám jako je benzen nebo vlivem přítomnosti některých virů. Leukémie tohoto typu se nazývají sekundární. Rizikovými faktory pro vznik akutní myeloidní leukémie je kromě ionizujícího záření a chemoterapeutické cytostatické léčby také předchozí myeloproliferativní onemocnění nebo myelodysplastický syndrom, který se vyskytuje poměrně vzácně především u starších lidí a v AML přechází u 25 až 30 % nemocných (Mayer a Starý 2002, Adam a kol. 2008). Zvýšené riziko vzniku AML mohou mít i některá vrozená genetická onemocnění jako je například Downův syndrom nebo syndromy chromosomové nestability. V současné době se k diagnostice AML využívá

cytomorfologie, konvenční cytogenetika, interfázní a metafázní fluorescenční in situ hybridizace (FISH), polymerázová řetězcová reakce (PCR) a imunofenotypizace.

Klasifikovat AML je možno na základě 2 systémů: staršího FAB (**F**rench-**A**merican-**B**ritish), který rozeznává 8 subtypů AML (M0 až M7) na základě morfologie a vyzrávání buněk (viz **Příloha 1**), a novějšího WHO (**W**orld **H**ealth **O**rganization), který zohledňuje nejen morfologické hodnocení, ale i cytogenetické výsledky vyšetření kostní dřeně a dalších doplňujících vyšetření (Swerdlow a kol. 2008, viz **Příloha 2**).

Snahou léčby leukémie je dosáhnout kompletní remise, což je stav, kdy pacient nepociťuje žádné příznaky nemoci a nemoc není diagnostikovatelná rutinními hematologickými metodami. To znamená, že nález leukemických buněk v kostní dřeni nepřesahuje 5 %. V 70. a 80. letech došlo k zavedení kombinované chemoterapie do léčby AML nemocných, založené na indukci daunorubicinem (DNR) a cytosin arabinosidem (Ara-C). Frekvence kompletní remise u nemocných se sice zvýšila, přesto však nedosahovala ani 50 %. Také k dlouhodobému přežití (více než 3 roky) docházelo velmi sporadicky. Jelikož v krvi zůstává stále malé množství leukemických buněk, nazývané minimální zbytková choroba (MRD), i při kompletní remisi, je vysoká pravděpodobnost, že bez další léčby nastane relaps. V 90. letech byla proto do léčby AML zařazena vysokodávkovaná konsolidace, která se přínosně projevila na dlouhodobém přežívání pacientů. Nevýhodou ale byla výrazná toxicita terapie. V 90. letech také došlo k zavedení alogenní transplantace krvetvorných buněk do léčebného programu AML nemocných. Od roku 2002 byla léčba volena na základě stratifikace nemocných do prognostických skupin dle cytogenetického nálezu. Indukce spočívala v kombinaci Idarubicinu ( $10 \text{ mg/m}^2$ , den 1-3) a Ara-C ( $100 \text{ mg/m}^2$ , den 1-7). K udržení navozené remise se podávala konsolidace ( $3 \text{ mg/m}^2$  Ara-C v den 1, 3 a 5). V případech vysokého rizika byla indikována transplantace kostní dřeně. Od roku 2010 je léčebný postup volen nejen na základě cytogenetického, ale i molekulárně-genetického nálezu a léčba je dále modifikována dle monitorace molekulárně genetických markerů minimální zbytkové choroby. Standardně je k indukci remise u AML pacientů mladších 60 let používán režim s DNR  $90 \text{ mg/m}^2$  podávaným tři dny v kombinaci s Ara-C  $100 \text{ mg/m}^2$  podávaným sedm dní. Starší pacienti jsou léčeni modifikací s Idarubicinem  $10 \text{ mg/m}^2$ . Frekvence dosažení kompletní remise u AML pacientů tak vzrostla na 70 % (Soukup a kol. 2012). Většině nemocných se středním a vysokým rizikem se však leukémie vrací do 3 let od stanovení diagnózy (Döhner a kol. 2010). Prognóza po relapsu bývá velmi nepříznivá a jediným kurativním přístupem zůstává transplantace kostní dřeně.

### 3.4.1. Chromosomové změny u AML a jejich prognostický význam

Akutní myeloidní leukémie je nejen fenotypicky, ale i geneticky velmi heterogenní onemocnění. Mitelman ve své databázi uvádí více než 200 různých strukturních a numerických chromosomových aberací popsaných u AML (<http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman> k datu 1.7.2012). Abnormální karyotyp lze sledovat u 50 až 60 % nemocných s AML (Grimwade a kol. 2001, Mrázek a kol. 2004, Marchesi a kol. 2011). Komplexní změny karyotypu (tři a více chromosomových abnormalit) se vyskytují u 10 až 15 % případů (Mrázek a kol. 2008, Marchesi a kol. 2011). Nejčastěji bývají jejich součástí chromosomy 5, 7, 8, 10, 11, 12, 17 a 21 (Babická a kol. 2007). Hyperdiploidie u AML nebývá příliš častá. Obvykle zahrnuje chromosomy 4, 8, 10, 11, 13, 14, 19 a 21, přičemž trisomie chromosomu 8 následovaná trisomií chromosomu 21 se vyskytují nejvíce (Luquet a kol. 2007).

Různé chromosomové aberace jsou popisovány i u jednotlivých morfologických FAB subtypů. Tyto přestavby mají diagnostický a prognostický význam a lze je využít k monitorování průběhu onemocnění a k detekci minimální zbytkové choroby (viz **tabulka 4**) (Haferlach a kol. 2003, Marcucci a kol. 2004, Grimwade a kol. 2010).

**Tabulka 4. Výskyt chromosomových změn u jednotlivých FAB subtypů AML.**

Chromosomová aberace	FAB subtyp	Výskyt v subtypu	Prognóza
t(8;21)(q22;q22)	M2	13 %	příznivá
t(15;17)(q22;q21)	M3	95 %	příznivá
inv(16)(p13q22)	M4	10 %	příznivá
aberrace 11q23	M4,M5	5 – 10 %	nepříznivá
t(9;11)(p22;q23)	M5	20 %	střední
inv(3)(q21q26)	M2, M4, M7	3 – 5 %	nepříznivá

Mezi nejčastější chromosomové aberace bez ohledu na AML FAB subtyp patří abnormality chromosomů 5 a 7 (delece dlouhých ramen nebo monosomie), 11 a trisomie chromosomu 8 (Marchesi a kol. 2011). Typickým nálezem jsou především pro sekundární formu AML. Zatímco abnormality chromosomu 11, zvláště oblasti q23 a zde lokalizovaného genu *MLL*, jsou spojovány s inhibitory topoizomerázy II, u nemocných léčených pomocí alkylačních látek nebo po expozici benzenu se objevují delece dlouhých ramen chromosomů 5 a 7 nebo monosomie chromosomu 7 (Escobar a kol. 2007, Tennant a kol. 2007, Qian a kol. 2010).

V současné době slouží řada cytogenetických abnormalit nejen jako diagnostické markery pro stanovení specifického typu AML, ale i jako nezávislé prognostické



faktory využívané ke sledování dosažení kompletní remise, rizika relapsu a celkového přežití (Mrózek a kol. 2007, Marchesi a kol. 2011). Dle cytogenetického nálezu lze AML rozdělit do 3 odlišných prognostických skupin (viz **tabulka 5, obrázek 4**).

První skupinu tvoří pacienti s balancovanými přestavbami: translokací  $t(15;17)(q22;q21)$ ,  $t(8;21)(q22;q22)$  a  $t(16;16)(p13;q22)$  nebo pericentrickou inverzí  $inv(16)(p13q22)$ . Jsou asociovány s dobrou odpovědí na chemoterapii a dlouhou dobou přežití. Díky svému specifickému charakteru, nespádají tyto abnormality dle WHO klasifikace do skupiny komplexního karyotypu ani tehdy, vyskytují-li se s dalšími, přídatnými chromosomovými změnami (Döhner a kol. 2010, Marchesi a kol. 2011). Translokace  $t(15;17)(q22;q21)$  je ukázkou významu objasnění molekulární podstaty chromosomových změn. Identifikací alterovaného genu, jímž je receptor kyseliny retinové *RARA* ( $17q21$ ), došlo k zavedení cílené terapie pro nemocné s touto translokací, a to pomocí inhibitorů kyseliny retinové tzv. ATRA léčba. Z dřívě prognosticky nepříznivého onemocnění se tak v současnosti stalo prognosticky velmi příznivé, dobře léčitelné (Adam a kol. 2008).

Druhou skupinu představují pacienti s normálním karyotypem, translokací  $t(9;11)(p22;q23)$ , trisomií chromosomu 8 a dalšími chromosomovými změnami, které nejsou řazeny do první nebo třetí prognostické skupiny. Klinický stav těchto nemocných je lepší než nemocných z třetí skupiny, ale horší než ze skupiny první (Grimwade a kol. 2010, Marchesi a kol. 2011).

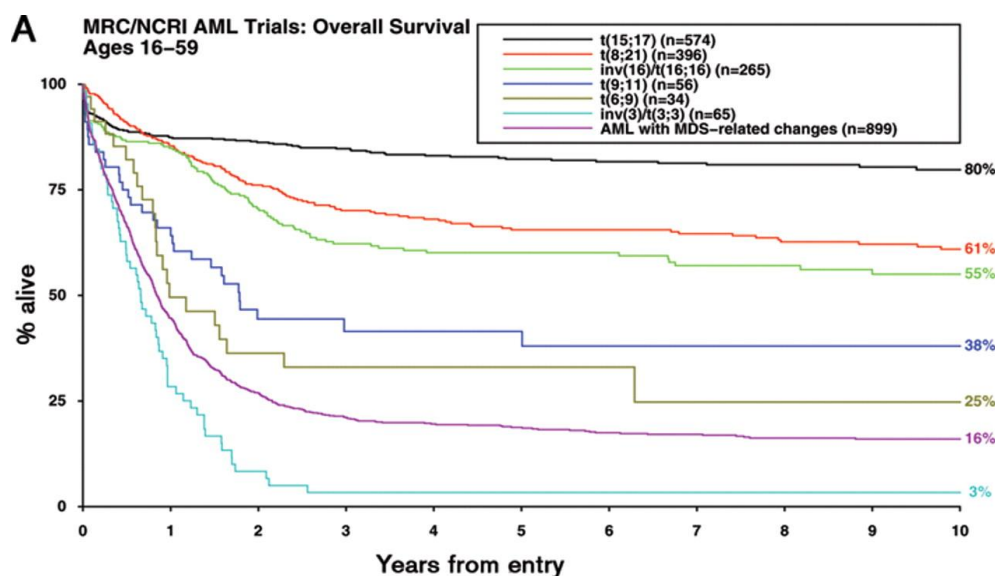
Třetí skupina je charakteristická velmi nepříznivou prognózou spojenou s celkově krátkou dobou přežití a špatnou odpovědí na léčbu, pokud se podaří dosáhnout remise je velmi vysoká pravděpodobnost relapsu (Grimwade a kol. 2010, Grimwade a Mrózek 2011, Marchesi a kol., 2011). Jsou do ní řazeny komplexní změny karyotypu,  $t(3;3)(q21;q26)$ ,  $inv(3)(q21;q26)$ ,  $t(6;9)(p23;q34)$ ,  $-7$ ,  $del(5q)$  a přestavby genu *MLL* kromě  $t(9;11)(p22;q23)$ . Grimwade a kol. (1998) ještě řadil všechny abnormality *MLL* genu ke středně příznivé prognóze, ale mnoho pozdějších studií, zabývajících se jednotlivými *MLL* translokacemi, poukázaly na jejich spojitost s prognózou velmi nepříznivou (Schoch a kol. 2003, Grimwade a kol. 2010, Marchesi a kol. 2011). Výjimku tvoří pouze translokace  $t(9;11)(p22;q23)$ , která zůstala v druhé prognostické skupině. Podobně jako je tomu u prognosticky příznivých balancovaných změn ani prognosticky nepříznivé balancované abnormality nespádají dle nové WHO klasifikace do skupiny komplexního karyotypu, a to i přes přítomnost dalších aberací (Döhner a kol. 2010, Marchesi a kol. 2011).

Pro pacienty s dobrou prognózou představuje léčba obvykle několik dávek intenzivní chemoterapie. U pacientů s nepříznivou prognózou se doporučuje transplantace kostní dřeně, stejně jako u pacientů s relapsem AML. U nemocných se středně příznivou prognózou se rozhoduje na základě konkrétní situace (Dohner a kol. 2010).

**Tabulka 5. Prognostický význam aberací u AML (Marchesi a kol. 2011).**

Prognóza	Chromosomová abnormalita
Příznivá	t(8;21)(q22;q22), t(15;17)(q22;q21), inv(16)/t(16;16)(p13;q22)
Středně příznivá	Normální karyotyp, t(9;11)(p22;q23), +8, +11, +13, +21, ostatní nezařazené do příznivé či nepříznivé prognózy
Nepříznivá	-7, add(7q)/del(7q), add(5q)/del(5q), t(3;5)(q25;q35), inv(3)(q21q26)/t(3;3)(q21;q26), abnormality 11q23, t(8;16)(p11;p13), inv(8)(p11q13), t(9;22)(q34;q11), komplexní změny karyotypu

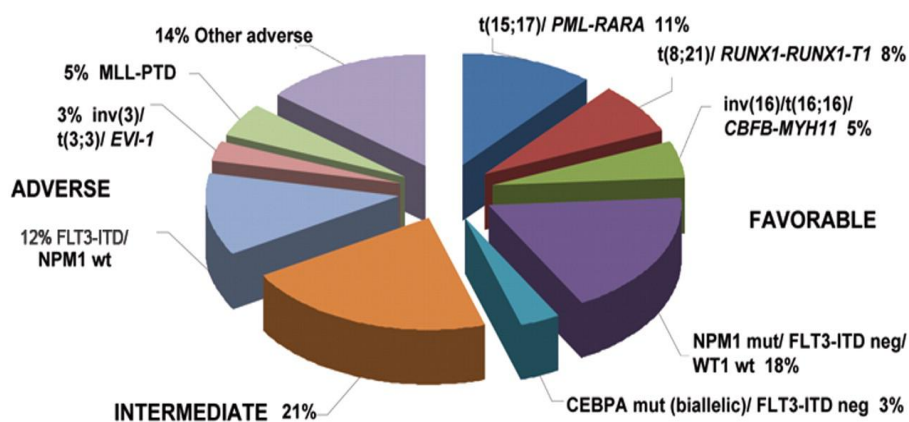
**Obrázek 4. Křivky přežití pro vybrané abnormality (Grimwade a Hills 2009).**



### 3.4.2. Molekulární markery u AML a jejich prognostický význam

Literatura udává 40 až 50 % případů AML s normálním karyotypem určeným klasickou cytogenetickou analýzou (Grimwade a kol. 2001, Mrózek a kol. 2004, Marchesi a kol. 2011). Snahou řady studií je proto najít vhodné molekulární prognostické markery i u této skupiny nemocných. Jejich přehled a prognostický význam je zobrazen na **obrázku 5**.

Nejčastější genetickou abnormalitou u AML s normálním karyotypem (NK) jsou mutace genu pro jaderný fosfoprotein nukleofosmin 1 (*NPM1*; 5q35). Nemocní s mutací tohoto genu mají lepší podíl úplné remise a celkového přežití. Je tomu tak ale jen v případě, že se nevyskytuje současně s mutací tyrozinkinázy 3 (*FLT3*; 13q12), která je druhou nejčastější genetickou změnou u AML s NK. Její interní tandemové duplikace (ITD) jsou spojovány s velmi nepříznivou prognózou a zhoršují klinický stav i u nemocných, u nichž byly současně prokázány jinak prognosticky příznivé abnormality. Doba trvání remise a celkové přežití jsou delší u nemocných s mutací genu pro transkripční faktor *CEBPA* (19q13), zvláště jde-li o mutaci bialelickou. Dalším důležitým alterovaným genem u AML s NK je i již zmiňovaný gen *MLL* (11q23) a jeho parciální tandemové duplikace. *MLL* PTD byly prvním molekulárním markerem u AML s NK spojeným se špatnou prognózou pro nemocné. Ve 30 až 40 % případů se vyskytují spolu *FLT3*-ITD. Mezi další studované geny na molekulární úrovni u AML patří *TP53*, *WT1*, *RAS*, *IDH1*, *IDH2*, *DNMT3A*, *TET2*, *BAALC*, *ERG*, *MNI*, *EVII*, *BCOR*, atd (Ghanem a kol. 2012, Grossmann a kol. 2012, Haferlach a kol. 2012). V současné době se výzkum zaměřuje především na mutační skrínink vybraného panelu genů pomocí metod sekvenace.



**Obrázek 5. Frekvence a prognostický význam vybraných molekulárních markerů u AML**

(převzato od Grimwade a Hills, 2009).

### 3.4.3. AML u dětí

Dětská AML tvoří jen 15 – 20 % ze všech dětských leukémií. Oproti dospělým nemocným s AML je u dětských pacientů patologický karyotyp prokázován až v 80 % případů (Mrózek a kol. 2004, Manola 2009). Dle věku, AML FAB subtypu a cytogenetického nálezu lze dětskou AML rozdělit do dvou kategorií.

První skupinu tvoří mladší děti, u kterých převažují FAB skupiny M4, M5 a M7. Cytogenetický nález bývá oproti starším dětem a dospělým více specifický. Mezi nejčastější chromosomové změny patří přestavby *MLL* genu (11q23.3), jejichž incidence roste s klesajícím věkem (nejvyšší u dětí do 3 let) (Manola 2009). Dle obsáhlé studie *MLL* přestaveb u dětí byla prokázána příznivější prognóza pro translokaci  $t(1;11)(q21;q23)$ , zatímco  $t(6;11)(q27;q23)$ ,  $t(10;11)(p12;q23)$  a  $t(10;11)(p11.2;q23)$  byly identifikovány jako nezávislý ukazatel nepříznivého klinického průběhu. Navzdory řadě analýz prokazujících lepší prognózu translokace  $t(9;11)(p22;q23)$  u AML se v této studii autorům nepodařilo spojitost potvrdit (Balgobind a kol. 2009). U dětí mladších 1 roku byly sledovány reciproké translokace, které dosud nebyly popsány u dospělých a jsou tak výlučně spjaty s nízkým věkem pacienta. Jedná se o translokace  $t(1;22)(p13;q13)$  a  $t(7;12)(q36;p13)$ , která bývá zaměňována za  $del(12)(p13)$ . U obou změn byl prokázán nepříznivý klinický průběh.

Významnou část mladších dětí s AML tvoří děti s Downovým syndromem, tedy vrozenou trisomií chromosomu 21. Z morfologického hlediska odpovídá jejich AML vždy typu akutní megakaryocytární leukémie AML-M7. U 10 % dětí s Downovým syndromem se již velmi časně objevuje transienční myeloproliferace s mutací genu *GATA1* (Xp11.23). V 80 % případů dojde k spontánnímu vymizení nemoci, ve zbylých 20 % dochází vlivem dalších mutací k přechodu do AML-M7. Na chromosomu 21 byla identifikována řada důležitých genů uplatňujících se v hematopoeze (např. *RUNX1*, *ERG*, *ETS2*, *miR99a*, *miR125b*), přídatně byly sledovány mutace genů *JAK3*, *JAK2*, *TP53*, *FLT3* a dalších (Khan a kol. 2011).

Starší děti, u kterých často převažuje FAB subtyp M0, M1, M2 a M3, tvoří druhou skupinu dětské AML. Výsledky cytogenetické analýzy se více shodují s nálezy dospělých nemocných. Mezi časté chromosomové změny patří prognosticky příznivé abnormality  $t(8;21)(q22;q22)$ ,  $t(15;17)(q22;q21)$  a  $inv(16)(p13q22)$  (Mrózek a kol. 2004). Z početních odchylek bývají detekovány trisomie chromosomů 8, 21 a 22. Delece  $del(5q)$ ,  $del(7q)/-7$ , abnormality chromosomu 3 nebo komplexní změny karyotypu se oproti dospělým vyskytují u dětí spíše vzácně. Spojeny jsou stejně jako u

starších AML pacientů s nepříznivou prognózou, kromě delece del(7q), u které se prokázal lepší klinický průběh než u úplné monosomie 7. Důvodem by mohl být vyšší výskyt del(7q) spolu s prognosticky příznivými aberacemi. Je tak doporučeno tyto dvě abnormality u dětí odlišovat (Manola 2009).

Mezi kryptické změny, často nedetekovatelné klasickou cytogenetickou analýzou, patří přestavby genu *NUP98* (11p15). Translokace t(5;11)(q35;p15) při zdánlivě normálním karyotypu nebo del(5q) byla poprvé popsána právě u dětí (Jaju a kol. 2001). Teprve později ji další analýzy potvrdily i u dospělých nemocných (Casas a kol. 2003). Vzhledem k vzácnému výskytu *NUP98* alterací, nebyl konečný prognostický význam řady těchto translokací zatím stanoven. V současné době se klinický průběh onemocnění u dětí i dospělých s touto abnormalitou jeví spíše jako nepříznivý.

Za posledních 20 let se 5leté přežití dětských pacientů s AML zvýšilo z původních 30 % na 65 %. I navzdory intenzivní terapii relabuje a zemře až polovina nemocných dětí s AML. Značným současným problémem je také stále poměrně vysoká úmrtnost na vysokodávkovou léčbu (Manola 2009). Cílem recentních výzkumů je proto vyvinutí cílené terapie s minimálním poškozením zdravých tkání.

## 4. MATERIÁL A METODY

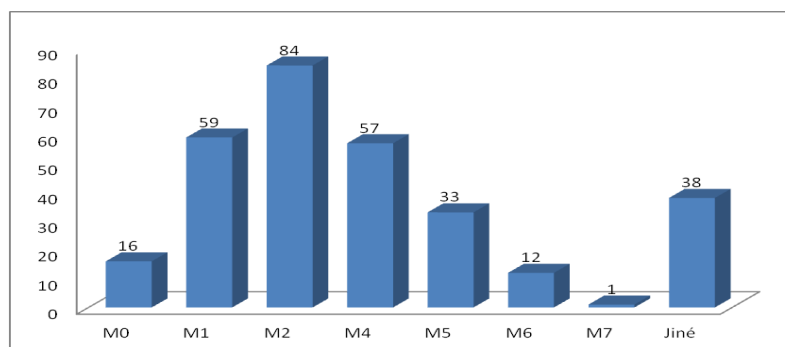
### 4.1. Materiál

#### 4.1.1. Soubor pacientů

Vyšetřovaný soubor byl sestaven z nemocných s nově diagnostikovanou AML, kteří byli od ledna 2006 do května 2012 vyšetřeni v cytogenetické laboratoři ÚHK v Praze. Od ledna 2009 do května 2012 byli do souboru zahrnuti i pacienti, jejichž vzorek kostní dřeně/periferní krve byl zaslán k cytogenetické analýze do Centra nádorové cytogenetiky ÚLBDL VFN a 1. LF UK. Všichni nemocní poskytli informovaný souhlas pro využití materiálu pro vědecké účely.

Diagnóza AML byla stanovena dle FAB a/nebo WHO (2008) nomenklatury. Ze studie byli vyloučeni nemocní s akutní promyelocytární leukémií (dle FAB AML-M3), která tvoří velmi specifický typ AML s odlišnou léčbou. Celkem jsme vyšetřili buňky kostní dřeně/periferní krve u 300 dospělých nemocných. Jednalo se o 159 mužů a 141 žen (průměrný věk 55 let, rozpětí 19 až 84 let). Primární typ AML byl diagnostikován u 229 nemocných, v 71 případech šlo o sekundárně vzniklou leukémii, převážně transformovanou z myelodysplastického syndromu, vzácněji na podkladě lymfomu nebo pravé polycytemie. Z karcinomů se nejčastěji jednalo o rakovinu prsu a ovarií u žen a rakovinu testes u mužů. Celkové zastoupení jednotlivých AML FAB subtypů je uvedeno v **grafu 1**. Dle WHO odpovídala AML převážně typu s multilineární dysplázií a blíže nespecifikované.

Během sledovaného období bylo v Centru nádorové cytogenetiky vyšetřeno i 14 dětí s nově diagnostikovanou primární AML. Dětský soubor zahrnoval 7 dívek a 7 hochů (průměrný věk 6,4 let, rozpětí od 1 roku do 15 let). Dle FAB subtypu se jednalo o AML: M5 (5x), M4 (4x), M2 (2x), M0 (2x) a M7 (1x, ve spojitosti s Downovým syndromem).



**Graf 1. Zastoupení jednotlivých AML FAB subtypů u dospělých nemocných.**

## 4.2. Metodika

### 4.2.1. Klasická cytogenetická analýza

Všichni nemocní (dospělí i děti) byli vyšetřeni klasickou cytogenetickou analýzou, při níž byl sestaven karyotyp dělicích se maligních buněk (kostní dřeně nebo periferní krve) podle závazné mezinárodní nomenklatury ISCN (Shaffer a kol. 2009). Buňky získané při odběru byly zpracovány standardními technikami (kultivace v MarrowGrow (buňky kostní dřeně) nebo LymphoGrow (buňky periferní krve) médiu, přidání kolcemidu, hypotonie, fixace a barvení Wright odpovídající G-pruhům). Pomocí IKAROS zobrazovacího systému pro karyotypování (MetaSystems<sup>TM</sup>) bylo zhodnoceno 22 mitos, pokud byly na preparátech přítomny.

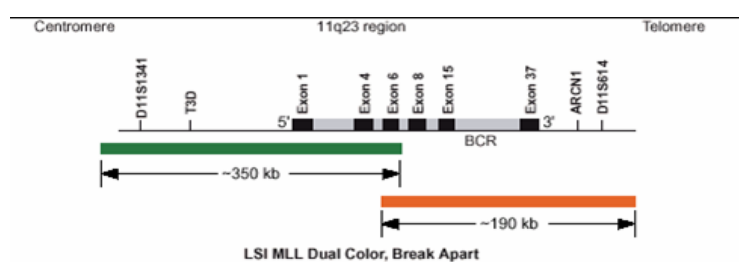
### 4.2.2. Molekulární cytogenetická analýza

#### Metoda FISH

Vzhledem ke kryptickému charakteru některých přestaveb *MLL* genu (11q23.3), byli dospělí i děti vyšetřeni metodou FISH s dvoubarevnou lokus-specifickou sondou pro tento gen LSI *MLL* Break Apart Rearrangement probe (Abbott Vysis<sup>TM</sup>) (viz **obrázek 6 a 7**).

U 245 dospělých pacientů bylo FISH vyšetření rozšířeno o sondy detekující další nejčastější chromosomové změny u AML: delecí dlouhých ramen chromosomu 7, oblasti 7q31/monosomii chromosomu 7 (sonda LSI 7q31/CEP 7), delecí dlouhých ramen chromosomu 5, oblasti 5q31 (sonda LSI 5q31/5p15.2) a početní odchylky chromosomu 8 (sonda CEP 8/kontrola – obvykle centromerická sonda pro chromosom 9 (CEP 9)). K potvrzení nebo upřesnění patologického nálezu klasické analýzy byly použity další lokus-specifické, centromerické a/nebo subtelomerické sondy (Abbott Vysis<sup>TM</sup>, Kreatech<sup>TM</sup>, MetaSystems<sup>TM</sup>).

**Obrázek 6. Schéma LSI *MLL* sondy (Abbott Vysis<sup>TM</sup>).**



BCR (breakpoint cluster region). Převzato z <http://www.vysis.com>; stav k 12.3.2008.

Zlomová místa na chromosomu 11 byla analyzována FISH metodou s komerčně dodávanými sondami LSI ATM (11q22) a LSI CCND1 (11q13) (Abbott Vysis™) a především s vybranými BAC (**b**acterial **a**rtificial **c**hromosome) (BlueGnome) sondami (v kombinaci s centromerickou sondou pro chromosom 11 (CEP 11) nebo subtelomerickými sondami (ToTel 11p nebo ToTel 11q) (Abbott Vysis™). Přehled použitých BAC sond je uveden v tabulce 5. Při FISH analýze jsme postupovali dle doporučení výrobce.

Z důvodu možné zkřížené hybridizace (cross-hybridization) BAC sond a pro kontrolu jejich správné lokalizace na chromosomu, jsme všechny BAC sondy nejprve otestovali hybridizací k normálním chromosomům buněk periferní krve. V případě zkřížené hybridizace byly odečteny pouze mitosy.

**Tabulka 5. Přehled použitých BAC sond pro mapování chromosomu 11.**  
(pozice bázi dle UCSC, hg19)

Oblast	BAC sonda (BlueGnome)	Lokalizace	Oblast	BAC sonda (BlueGnome)	Lokalizace
11p15.5	RP11-348A20	3714206-3879551	11q13.1	RP11-472D15	65264767-65455761
	RP11-92N11	3527309-3700113	11q13.2	RP11-424B4	67250546-67433461
	RP11-258P13	3829033-3996527		RP11-715F10	67250893-67420066
	RP11-120E20	3616884-3801429		RP11-98N24	67451657-67642689
		RP11-105D14		67905527-68071307	
11p14.1	RP11-406D1	27928285-28100841	RP11-569N5	68316743-68521009	
	RP11-244O16	28218113-28372201	RP11-554A11	68752975-68944872	
	RP11-242P4	28566594-28730752	11q13.4	RP11-92H23	71722315-71880350
	RP11-258H15	29152153-29312839	11q14.1	RP11-139M8	78009575-78164048
RP4-562D20	30158080-30272944	RP11-15N10		78233684-78399571	
		RP11-7H7		78356591-78529170	
		RP11-16H7		78624708-78780651	
11p13	RP11-140L23	30980762-31063912	RP11-153F6	78964050-79114206	
	RP11-366N23	31647248-31805088	11q14.2	RP11-241M12	85677853-85867355
	RP-11-26B16	31801015-31947742		RP11-496E23	87476238-87655401
	RP11-74J1	32344668-32510267	11q14.3	RP11-135L17	92108146-92289650
	RP11-98C11	33917054-34103281	11q21	RP11-54L12	94462197-94627839
	RP11-68D18	35189741-35372845		RP11-159N13	95167163-95340630
RP11-514F3	36226909-36423767	RP11-277H22		95647185-95851163	
11p12	RP11-465C16	36582872-36757443	11q22.1	RP11-16K5	95929953-96072988
	RP11-233I10	36888382-37068735		RP11-379J13	97597563-97823733
	RP11-144G8	37496788-37651718	11q22.3	RP11-179B7	104298333-104459820
	RP11-160M15	39374551-39541120		RP11-22J5	105518609-10567906
	RP11-40H19	40030058-40184713		RP11-273B11	106381726-106546139
	RP11-454H19	40117773-40267231		RP11-268L8	108813210-109008740
	RP11-375D13	41729356-41904999		RP11-18B19	109599924-109768970
	RP11-538D20	41879925-42060452	11q23.1	RP11-285P16	110538746-110709483
	RP11-108L12	42907476-43064281	11q23.2	RP11-267J11	113602882-113795872
RP11-484D2	43298907-43503015	11q23.3	RP11-215H18	118157705-118326418	
11p11.2	RP11-70A9	43931666-44103761	<b>Oblast</b>	<b>BAC sonda (BlueGnome)</b>	<b>Lokalizace</b>
	RP11-450F4	44333917-44483959	5q35	RP11-265K23	176618426-176802012
	RP11-12C11	44922592-45089517	6p21.31	RP11-175A4	33359606- 33507671
	RP11-164L18	46259653-46425889	20q12	RP1-1J6	39644838-39783261
	RP11-433B4	46378280-46540225		RP3-387E22	39521556-39733060
	RP11-425L10	46404217-46567753			
	RP11-368A23	46426444-46585305			
	RP11-165B4	46662029-46942819			
	RP11-169J24	47064847-47159540			
	RP11-390K5	47131081-47320097			
	RP11-17G12	47237825-47396177			
	RP11-125F14	47333173-47520993			



K vyhodnocení zhotovených preparátů jsme používali fluorescenční mikroskop AXIOPLAN 2 Imaging (Zeiss), vybavený specifickými optickými filtry pro detekci použitých fluorochromů. Na každém preparátu jsme počítali fluorescenční signály alespoň ve 20 mitosách (pokud jich bylo tolik přítomno pod krycím sklem) a ve 200 interfázních jádrech. Vyhodnocovali jsme počet a charakter fluorescenčních signálů, v mitosách navíc jejich lokalizaci na chromosomu. Cut-off level byla stanovena pro translokace, duplikace a amplifikace na 2,5 % a pro delece a monosomie na 5 %. Nález jsme popsali podle mezinárodní ISCN nomenklatury (Shaffer a kol. 2009). Patologický klon jsme z fluorescenčního mikroskopu zdokumentovali CCD kamerou a zpracovali pomocí softwaru ISIS (MetaSystems™).

### Metody mFISH, mBAND

Metoda mFISH byla použita k analýze mnohočetných změn chromosomů. Používali jsme celochromosomové sondy značené fluorochromy: FITC, Spectrum Orange™, TexasRed®, DEAC a Cy™5. Metodu mBAND jsme zvolili k zpřesnění lokalizace zlomových míst a k detekci oblastí amplifikace/delece. V obou případech jsme používali DNA sondy a detekční kity od firmy MetaSystems™, postupovali jsme dle doporučení výrobce.

### Metody mikroarray

Nebalancované změny genomu byly analyzovány metodami mikroarray. V 10 případech jsme použili SNP array (HumanCytoSNP-12 BeadChips, Illumina). DNA byla z fixovaných buněk kostní dřeně/periferní krve izolována užitím QIAamp DNA mini Kitu (Qiagen). Všechny metody byly provedeny dle instrukcí výrobce.

### 4.2.3. Molekulární genetická analýza

U 210 dospělých nemocných ze souboru byla provedena také molekulárně genetická analýza pro zjištění přítomnosti parciálních tandemových duplikací genu *MLL*.

### Izolace RNA a reverzní transkripční (RT) PCR

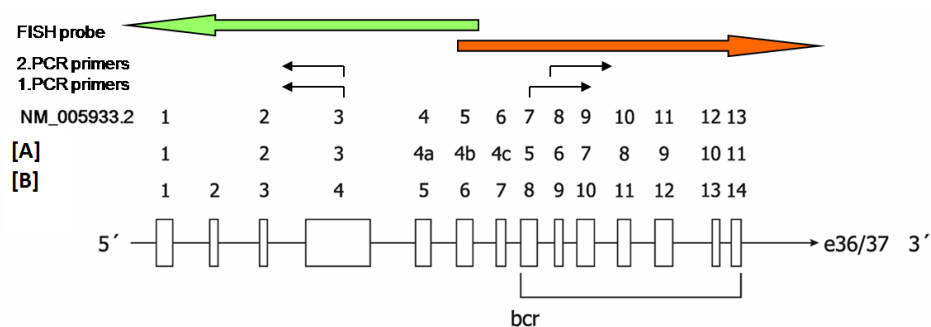
RNA byla z buněk kostní dřeně a/nebo periferní krve, vyizolována pomocí Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden) dle doporučení výrobce. K syntéze komplementární DNA byla použita SuperScript II reverzní

transkriptáza (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA). První kolo PCR proběhlo s primery MLLex7-F 5'-GGAAGTCAAGCAAGCAGGTC-3' a MLLex3-R 5'-AGGAGAGAGTTTACCTGCTC-3', druhé s primery MLLex8-F 5'-GTCCAGAGCAGAGCAAACAG-3' a MLLex3-RII 5'-ACACAGATGGATCTGAGAGG-3' (viz **obrázek 7**). PCR produkty byly následně zkontrolovány elektroforézou (2% agarosový gel).

## DNA sekvenace

PCR produkty získané z gelu elektroelucí byly přečištěny a osekvenovány v obou směrech (BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit; Applied Biosystems) na analyzátoru ABI 3100 (Applied Biosystems). Obdržené sekvenace byly vyhodnoceny dle parametrů genové banky NM 005933.2.

**Obrázek 7. Exon-intronová struktura genu *MLL*.**



**Vysvětlivky:** umístění sond pro FISH (5'konec *MLL* - zelená šipka, 3'konec *MLL* - oranžová šipka) a primerů užitých pro 1. a 2. kolo PCR. Porovnání klasifikací exonů *MLL* genu: NM\_005933.2 (námi užitá) a dvě starší verze [A] – dle Strout a kol. 1998; [B] – dle Nilson a kol. 1996. Převzato od Sarova a kol. (2009).

### 4.2.4. Statistická analýza

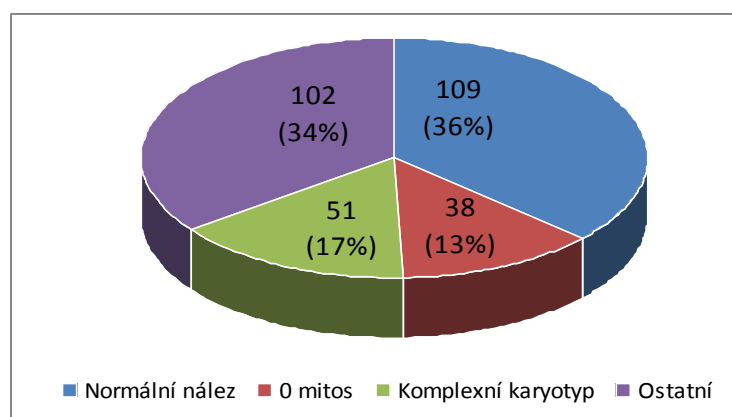
Statistické vyhodnocení bylo provedeno pomocí Kaplan-Mayerovy analýzy přežívání s Mantel-Coxovým testem přežívání. Jako kontrolní byl použit soubor nemocných s normálním karyotypem (>10 normálních mitos, negativní FISH skriningový panel a negativní *MLL* PTD). U žijících nemocných byla doba přežití stanovena k datu 10.4.2012.

## 5. VÝSLEDKY

U všech 300 dospělých a 14 dětských nemocných s nově diagnostikovanou AML byla provedena klasická cytogenetická analýza. U dvou dospělých nemocných jsme prokázali netypickou reciprokovou translokaci přítomnou ve všech sledovaných mitosách. Předpokládali jsme proto, že se jedná o vrozené chromosomové abnormality. U jednoho nemocného jsme hypotézu ověřili detekcí této změny v dělících se buňkách periferní krve kultivovaných 72h s přidavkem phytohemagglutininu (PHA). U druhého jsme kontrolní materiál k ověření neobdrželi.

Na základě klasické a molekulárně cytogenetické analýzy jsme patologický nález prokázali u 211 dospělých nemocných (70 %) (viz **graf 2**). U 38 (13 %) pacientů nebyly přítomny dělící se buňky (nález 0 mitos). Mezi nejčastější strukturální abnormality patřily: přestavba *MLL* genu (n=28), del(7)(q31)/-7 (n=16), t(8;21)(q22;q22) (n=9), inv(16)(p13q22)/t(16;16)(p13;q22) (n=8), del(5)(q31) (n=5) a t(3;3)(q21;q26)/ins(3;3)(q26;q21q26) (n=3). Nejčastějšími početními změnami byly +8, +13, +21 a +11. Komplexní karyotyp jsme prokázali u 51 nemocných (17 %). Jeho součástí byly obvykle chromosomy: 5, 17, 7, 21, 12, 11, 20, 8, 10 a 3.

**Graf 2. Cytogenetický nález u dospělých nemocných s nově diagnostikovanou AML.**



Kombinací klasické a molekulárně cytogenetické analýzy jsme získané chromosomové aberace prokázali u 12 dětských nemocných (86 %). U 2 (14 %) pacientů nebyly přítomny dělící se buňky (nález 0 mitos). Nejčastější strukturální abnormalitou byla přestavba *MLL* genu (n=5), sporadicky se vyskytly: del(7)(q31) (n=1), t(8;21)(q22;q22) (n=1), inv(16)(p13q22) (n=1) a +13 (n=1). Komplexní karyotyp jsme prokázali pouze u jednoho nemocného.

## 5.1. Změny chromosomu 11 u dospělých nemocných s AML

Změnu chromosomu 11 jsme prokázali u 55 (18 %) dospělých nemocných s nově diagnostikovanou AML. U jednoho nemocného se jednalo o reciprokovou translokaci  $t(11;22)(q23;q11)$ , přítomnou ve všech vyšetřovaných mitosách. Jelikož jsme translokaci potvrdili v PHA stimulovaných lymfocytech, uzavřeli jsme ji jako konstituční přestavbu chromosomů a pacient byl vyřazen z další analýzy.

U pěti nemocných jsme prokázali trisomi chromosomu 11 bez přítomnosti zlomu (viz **tabulka 6**, nemocní č. 1 až 5). U jedenácti pacientů se na jednom chromosomu 11 nacházelo více zlomových míst; dva zlomy u čtyř nemocných (č. 11, 41, 44, a 54), tři a více zlomů u sedmi (č. 7, 8, 10, 42, 48, 52, 53). Ve dvou případech byly postiženy oba homologní chromosomy 11 (č. 10 a 42).

Změna krátkého ramene chromosomu 11 (11p) byla prokázána u třinácti pacientů (č. 6-14 a 52-54). Alteraci dlouhého ramene chromosomu 11 (11q) jsme identifikovali u 40 pacientů (č. 15–54), u čtyř současně s abnormalitami krátkého ramene (č. 42, 52, 53, 54). Souhrn klinických dat nemocných a výsledků molekulárně cytogenetického mapování je shrnut v **tabulce 6**.

### 5.1.1. Mapování zlomů

Na základě konvenční cytogenetiky a metod mFISH/mBAND jsme rekurentní zlomová místa specifikovali do 12 různých chromosomových pruhů: 11p15 (n=7), 11p14 (n=2), 11p13 (n=6), 11p12 (n=1), 11p11.2 (n=6), 11p11.1 (n=2), 11q12 (n=2), 11q13 (n=3), 11q14-q21 (n=3), 11q22 (n=3), 11q23.3 (n=30) a 11q24 (n=3). Všichni nemocní byli vyšetřeni metodou FISH se sondou pro *MLL* gen (11q23.3). Vybrané oblasti jsme dále mapovali pomocí metody FISH se sondami pro geny *ATM* (11q22) a *CCND1* (11q13) a serií BAC sond. U 10 nemocných byla také provedena SNP mikroarray. Z důvodu nedostatku materiálu nebyla dále mapována zlomová místa u nemocných č. 14 a 53. Výsledky a použití BAC sond zvolených pro mapování jednotlivých nemocných jsou uvedeny v **tabulce 7**.

Užitím SNP array techniky byly nově odhaleny kryptické delece u čtyř nemocných č. 10, 42, 47 a 52. U čtyř nemocných (č. 13, 48, 50 a 52) bylo zlomové místo přehodnoceno do jiného pruhu, u jednoho nemocného (č. 45) zpřesněno ve stávajícím pruhu. U dvou nemocných (č. 40 a 41) s reciprokými přestavbami metoda neprokázala

žádné nebalancované změny chromosomu 11. Porovnání výsledků metod mBAND/mFISH, mikroarray a FISH jsou uvedeny v **tabulce 6**.

Metodou FISH jsme identifikovali další změny na chromosomu 11 u sedmi nemocných (č. 8, 10, 16, 18, 22, 26, 28). Lokalizace zlomových míst byla upravena užitím FISH mapování u devíti nemocných (č. 11, 12, 13, 44, 46, 47, 49, 50, 54), ve většině případů do sousedních chromosomových pruhů. U nemocného č. 47 nebyla kryptická delece, zjištěná metodou SNP mikroarray, potvrzena a zlomová místa tak nebyla započítána. U ostatních byl zlom upřesněn ve stávajícím pruhu identifikovaným metodou mBAND nebo mikroarray (viz **tabulka 6**).

Pomocí FISH mapování jsme na chromosomu 11 identifikovali více než 35 různých zlomových míst, z toho dvě rekurentní (11p15.4 v genu *NUP98* a 11q23.3 v genu *MLL*) a tři potenciálně nenáhodné v pruzích 11p13 (ch11:29.31-31.80 Mb), 11p12 (ch11:36.75-37.49 Mb) a 11q13.2 (68.31-68.52 Mb) (pozice bází dle UCSC, hg19). Další překrývající se zlomová místa jsme detekovali i v oblastech 11p15.5 (ch11:0-3.52 Mb), 11p15.4-p15.1 (ch11:3.87-27.92 Mb), 11p12 (42.06-43.29 Mb), 11q12 (nemapováno), 11q13.2 (67.42-68.31 Mb), 11q14.2-q21 (79.11-104.45 Mb) a 11q24 (nemapováno). Vzhledem k tomu, že tyto regiony nebyly z důvodu nedostatku materiálu dále upřesněny, zůstala oblast výskytu zlomu příliš velká na to, abychom je mohly označit za jednoznačně rekurentní. V pěti případech pokrývalo místo zlomu pouze jeden protein-kódující gen: *NUP98* (11p15.4), *MLL* (11q23.3), *LRRC4* (11p12), *ODZ4* (11q14.1) a *MAML2* (11q21). Přehled všech identifikovaných zlomových míst je zobrazen v tabulce **tabulce 8**.

Hlavním mechanismem vzniku zlomových míst na chromosomu 11 byly balancované přestavby, které jsme prokázali u 35 nemocných a jsou popsány v **tabulce 9**. Ve většině případů se jednalo o reciproké translokace genu *MLL*. Ostatní zlomy vznikly vlivem nebalancovaných změn.

## Oblasti duplikace a amplifikace

Zmnožení genetického materiálu chromosomu 11 jsme pozorovali převážně na jeho dlouhém rameni. Parciální trisomie chromosomu 11 se vyskytla u osmi nemocných (č. 9, 14, 27, 44, 45, 46, 48, 50), přičemž u nemocné č. 44 jsme prokázali dva klony s duplikací chromosomu 11 o různé velikosti (viz **tabulka 9** a **obrázek 8** pod označením 44a a 44b). Společnou oblastí duplikace u všech nemocných byl region 11q23.3→11q24 (n=9; ch11:118.35-125.00 Mb), začínající od 3'konce *MLL* genu.

Dalšími častými oblastmi duplikace byly 11q22.3→11q23.3 (n=8; ch11:109.00-118.35 Mb), 11q21→11q22.3 (n=7; ch11:94.00-109.00 Mb) a 11q24→11qter (n=7; ch11:125.00-134.50 Mb). U žádného pacienta se nevyskytla parciální trisomie zahrnující pouze krátké rameno chromosomu 11.

Amplifikaci oblastí chromosomu 11, tedy čtyři a více kopií, jsme prokázali u devíti nemocných (č. 7, 13, 18, 42, 48, 49, 51, 52 a 53). U nemocné č. 48 jsme v jednom klonu prokázali jak duplikaci (48a), tak i amplifikaci (48b) chromosomu 11 o různé velikosti. U nemocné č. 7 byla zmnožena pouze oblast na krátkém rameni chromosomu 11. V ostatních případech byly amplifikovány současně i oblasti z dlouhého ramene. Minimálním úsekem amplifikace na 11q u všech nemocných byl 5' konec *MLL* genu (n=8). Dále byly často postiženy oblasti 11q23.3→11q25 (n=7; ch11:118.35-132.50 Mb), 11q23.3 (n=7; ch11:118.00-118.30 Mb) a 11q23.1→11q23.3 (n=6; ch11:110.00-118.00 Mb). Na krátkém rameni byl součástí amplikonu obvykle region 11p15.5→11p15.1 (n=3). Přehled všech oblastí duplikace a amplifikace, jejich frekvence a kandidátní geny, které zahrnují, jsou uvedeny v **tabulce 9** a **obrázku 8**.

### Oblasti delece

Ztrátu genetického materiálu chromosomu 11 jsme popsali u devíti nemocných (č. 7, 8, 10, 11, 12, 42, 44, 48 a 52). Pouze u tří (č. 42, 44 a 48) byla deletována oblast na dlouhém rameni, v ostatních případech došlo k ztrátě části krátkého ramene chromosomu 11. V rámci 11p jsme neprokázali žádný společný deletovaný region. Některé se přesto vyskytovali častěji, a to 11pter-11p15.5 (n=4; ch11:0-3.52 Mb), 11p14.1-11p13 (n=4; ch11:28.00-31.00 Mb) a 11p13 (n=4; ch11:31.00-31.50 Mb) (viz **tabulka 9** a **obrázek 8**).

**Tabulka 6. Klinická data nemocných s abnormalitou chromosomu 11 a výsledky molekulárně cytogenetického mapování.**

Pacient č.	Pohl/ Věk	Datum diagnózy	Typ AML	Souhrnný karyotyp (Klasická cytogenetická analýza a/nebo mFISH/mBAND)	Zlomové místo na chromosomu 11 + nově detekované změny			alo- TKD	Přežití (dny)
					mBAND	SNP array (Mb)	FISH (Mb)		
<b>TRISOMIE 11</b>									
1	Ž/37	13.02.2008	M1	47,XX,+11[22]	-	-	nuc ish(MLLx3)[36/200]	ANO	žije
2	Ž/67	02.12.2008	sM6	53~55,XX,+X,+inv(X)(p21q12),+1+2,+4,del(5)(q13.3q33.1),t(8;12)(q24;q24),+10,+11,der(12)t(12;13)(p11;q11),-13,+14,+21,+22[cp22]	-	-	nuc ish(MLLx3)[100/200]	NE	193
3	M/63	16.02.2009	M2	42~45,XY,-3,der(4)t(4;17)(p31;?),der(5)t(5;12)(q12;p?),-7,t(8;9)(q;p22),+11,der(12)t(12;17)(p;p?),der(12)del(12)(p11.2)del(12)(q21),-17,-18,+21[cp22]	-	-	nuc ish(MLLx3)[24/200]	NE	22
4	M/62	01.04.2009	M0	47,XY,+11[3]/46,XY[14]	-	-	nuc ish(MLLx3)[18/200]	NE	43
5	M/66	01.02.2011	sAML	47,XY,+11[13]/46,XY[9]	-	-	nuc ish(MLLx3)[114/300]	NE	žije
<b>ABNORMALITY KRÁTKÉHO RAMENE CHROMOSOMU 11 (11p)</b>									
6	Ž/62	14.04.2011	sM6	43~48,XX,t(2;12)(p13;p13),del(5)(q13.3q33.3),t(5;11)(p13.3;p15),der(7)t(7;17)(q11;q12),-13,der(13)t(13;16)(p11;?),-17,-20,der(21)t(10;21)(q;q11)[cp20]/46,XX[3]	11p15	-	11p15.5; ch11:0-3.52	NE	žije
7	Ž/64	22.12.2009	M4	43~44,XX,del(5)(q13.3q33.3),der(11)del(11)(p11.2p14)inv(11)(p11.2p15.5)t(11;21)(p15;q22),del(12)(p12p13),-13,der(13)t(13;21)(p11.1;q11.2)t(14;21)(q23;q22),der(13)t(13;21)(p11.1;q11.2)t(17;21)(q;q22),der(14;14)(q10;q10),der(16)ins(16;11)(?;p11.2p14)t(1;16;17)(?;p11.1;?),der(16)t(13;16)(q;q12.1),-17,der(17)t(8;17)(q13;p11.2),der(18)del(18)(q11.2q22)ins(18;13)(q11.2;q12q32)x2,der(21)del(21)(q11.2q22.3)ins(21;11)(?;p15p15),der(21)t(17;21)(q;q21),der(22)t(16;22)(q22;p11.1),+mar[cp22]	11p15 11p14 11p11.2 11p11.2	-	11p15.5; ch11:0-3.52 11p15; ch11:3.87-27.92 11p11.2; ch11:47.13-47.23 11p11.2; ch11:47.33-47.39	NE	151
8	Ž/68	18.12.2007	M0	42~43,X,-X,-3,der(4)t(4;10)(p12;p12),-5,der(10)t(10;17)(p12;q?)t(17;20)(?;?),der(11)t(5;11)(p12;p11.2),der(12)t(11;12)(p11.2;q13)inv(11)(p15.5p13)t(3;11)(?;p13)t(3;16)(?;q22),der(16)t(3;16)(?;q22),-17,der(17)t(12;17)(q13;q11.1),der(20)t(17;20)(q;q;?) [cp22]	11p15.5 11p13 11p11.2	-	11p15.5; ch11:0-3.52 11p13; ch11:30.98-31.80 del(11)(p12p12) 11p12; ch11:36.88-37.49 11p12; ch11:42.06-43.06	NE	78
9	Ž/65	03.08.2009	M2	48~57,XX,+X,der(1)t(1;5)(q21.1;?),der(2)t(1;2)(q;q33),der(5)t(5;17)(q11.2;?)t(5;18)(p13;?),+8,+8,+9,+10,+10,+der(11)t(1;11;21)(q;q;p15;q?),der(12)t(12;20)(p12;?),+13,der(15)t(5;15;18)(q;q;p11.1;?),-17,+18,+19,der(21)t(17;21)(?;p11.1),+der(22)t(1;22)(?;p11.1)x2[cp22]	11p15	-	11p15.4 (NUP98)	NE	54
10	M/50	17.07.2009	M4	46,XY,t(11;20)(p11.2;q?) [16]	11p11.2	arr 11p13 (30.98-31.21)x1	11p15.4 (NUP98) 11p13; ch11:30.98-31.06 11p13; ch11:31.06-31.64 11p11.2; ch11:46.37-46.54	NE	228
11	M/68	21.05.2009	sAML	46~49,XY,+X,del(1)(q21),+r(1)(?),ins(5;1)(p15;?),del(11)(p12p13),der(12)t(1;12)(?;q12),ins(14;15)(q22;?),der(15)t(15;21)(q14;?)t(12;21)(q12;?),t(16;17)(?;p13),der(18)t(15;18)(q14;q21),+19[cp22]	11p13 11p12	-	11p14.1; ch11:28.56-29.15 11p12; ch11:41.87-42.06	NE	9
12	M/73	12.11.2007	M2	44~45,X,-Y,der(1)t(1;5)(q12;?),-5,del(5)(q11),der(7)ins(7;5)(q11.2;?)t(1;7)(q12;q22),+8,der(11)t(11;16)(p14;?),der(12)t(5;12)(?;p13),-16,der(18)t(Y;18)(q11;p11)[cp19]	11p14	-	11p13; ch11:29.31-31.06	NE	142
13	M/74	11.05.2009	M1	47,XY,der(2)t(2;15)(q34;q24),del(5)(q13q31),der(7)t(7;11)(q22;p13),del(11)(p13),+idic(11)(p11.1),del(15)(q24),der(18)del(18)(p11.2)del(18)(q21)[cp22]	11p13 11p11.1	arr 11p11.2qter (44.66-134.50)x3	11p12; ch11:36.75-37.06 11p11.2; ch11:44.48-45.08	NE	47
14	Ž/47	29.03.2012	sM0	45~48,XX,idic(5)(q11.1),dic(7;11)(q11.1;p11.1),+8,del(8)(q?),del(12)(p13),+13[cp22]	-	-	-	NE	žije

Zkratky: M, muž; Ž, žena; s, sekundární; -, neprovedeno; alo-TKD, alogenní transplantace kostní dřeně; žije, stav k 10.4.2012.

**Tabulka 6. Klinická data nemocných s abnormalitou chromosomu 11 a výsledky molekulárně cytogenetického mapování.**

Pacient č.	Pohl/ Věk	Datum diagnózy	Typ AML	Souhrnný karyotyp (Klasická cytogenetická analýza a/nebo mFISH/mBAND)	Zlomové místo na chromosomu 11 + nově detekované změny			alo- TKD	Přežití (dny)
					mBAND	SNP array (Mb)	FISH (Mb)		
<b>PŘESTAVBY GENU MLL</b>									
15	Ž/62	04.01.2006	M5a	47,XX,+8,t(9;11)(p22;q23)[14]/46,XX[2]	-	-	11q23.3 (MLL)	NE	6
16	Ž/63	13.01.2006	M5a	0 mitos	-	-	11q23.3 (MLL)	NE	6
17	Ž/36	22.03.2006	M5a	46,XX,t(7;11;10)(q22;q23;p12)[3]	-	-	11q23.3 (MLL)	ANO	žije
18	Ž/53	20.07.2006	M5a	46,XX,der(10)t(8;10)(?:p12)[11]/48,XX,+9,del(9)(p?)x2,der(10)t(9;10)(p?:p12),+19[4]/46,XX[1]	-	-	11q23.3 (MLL)	ANO	241
19	Ž/22	06.12.2006	M5a	46,XX,t(9;12;11)(p22;p13;q23)[8]/46,XX[6]	11q23.3	-	11q23.3 (MLL)	ANO	žije
20	Ž/61	08.06.2007	M5a	46,XX,t(9;11)(p22;q23)[2]/46,XX[19]	-	-	11q23.3 (MLL)	NE	88
21	Ž/66	23.04.2008	M1	45,XX,t(6;11)(q27;q23),-7[7]/46,XX[2]	-	-	11q23.3 (MLL)	NE	45
22	M/40	24.06.2008	M1	0 mitos	-	-	11q23.3 (MLL)	ANO	žije
23	Ž/28	11.07.2008	M1	46,XX,t(11;19)(q23;p13)[15]/46,XX[7]	-	-	11q23.3 (MLL)	ANO	369
24	Ž/51	29.01.2009	sM5a	46,XX,t(9;11)(p22;q23)[7]/46,XX[15]	-	-	11q23.3 (MLL)	ANO	žije
25	M/44	29.01.2009	sM4	46,XY,t(9;11)(p22;q23.3)[13]/46,XY[8]	-	-	11q23.3 (MLL)	NE	202
26	M/50	30.04.2009	M5	46~52,XY,t(2;11)(p24;q23.3),+4,+8,+8,+12,+16,+21[cp12]	-	-	11q23.3 (MLL)	NE	34
27	M/43	06.08.2009	M5	45~50,XY,+3,+8,t(9;11)(p22;q23),+der(9)t(9;11)(p22;q23),-13,+14[cp18]	-	-	11q23.3 (MLL)	ANO	žije
28	M/43	24.11.2009	sM1	46,XY,t(11;19)(q23;p13.3)[19]/46,XY[3]	-	-	11q23.3 (MLL)	NE	21
29	M/28	09.02.2010	sM5	46,XY,t(9;11)(p22;q23)[22]	-	-	11q23.3 (MLL)	NE	11
30	Ž/19	08.07.2010	M5a	46,XX,t(9;11)(p22;q23)[22]	-	-	11q23.3 (MLL)	NE	162
31	M/53	14.07.2010	M4	46,XY,t(9;11)(p22;q23)[22]	-	-	11q23.3 (MLL)	NE	371
32	M/31	12.08.2010	M1	46,XY,t(9;11)(p22;q23)[8]/46,XY[5]	-	-	11q23.3 (MLL)	ANO	žije
33	Ž/52	17.08.2010	sM4	46,XX,t(9;11)(p22;q23)[11]/46,XX[1]	-	-	11q23.3 (MLL)	NE	42
34	M/42	16.09.2010	M5a	46,XY,t(11;19)(q23;p13.3)[18]/46,XY[4]	-	-	11q23.3 (MLL)	ANO	žije
35	M/31	20.10.2010	M1	46,XY,t(11;19)(q23;p13.3)[18]/46,XY[3]	-	-	11q23.3 (MLL)	NE	429
36	Ž/36	28.01.2011	AML	46,XX,t(11;19)(q23;p13.1)[22]	-	-	11q23.3 (MLL)	ANO	406
37	Ž/50	01.03.2011	M5	46,XX,der(1)t(1;1)(p36.3;q12),t(9;11)(p22;q23)[cp18]	-	-	11q23.3 (MLL)	ANO	žije
38	Ž/58	04.04.2011	sM2	46,XX,t(11;17)(q23.3;q25)[26]	-	-	11q23.3 (MLL)	NE	339
39	M/68	02.06.2011	sM2	46,XY,t(1;11)(q21;q23.3)[3]/47,idem,+10[4]/46,XY[3]	-	-	11q23.3 (MLL)	NE	154
40	Ž/48	04.08.2011	sM1	92,XXXX,t(6;11)(p21.3;q23.3)x2[6]	11q23.3	arr(11)x2	11q23.3 (MLL)	NE	žije
41	M/48	28.08.2009	M5a	46,Y,ins(X;11)(q24;q23.3q13)[22]	11q13 11q23.3	arr(11)x2	11q13.2 (ch11:68.31-68.52) 11q23.3 (MLL)	ANO	žije
42	M/66	11.02.2010	M4	40~42,XY,der(2)t(2;12)(q34;?)t(7;12)(p21;?),del(3)(p11p26),del(4)(q?),der(5)t(5;15)(q11.2;q25),del(6)(q23),-7,der(7)del(7)(p11)del(7)(q11),der(8)t(8;10)(q21;q24), <b>der(11)t(7;11)(q31;p13),der(11)t(11;20)(q23.3;?),-12,t(13;21)(q12;q21),<b>der(14)t(11;14)(q23.3;p11)t(1;11)(?:q23.3),der(15)t(11;15)(q23.3;q22),-16,-17,der(20)t(20;21)(q11;q21),-20,der(21)t(11;21)(q23.3;?),-22,t(22;22)(p11;q11)[cp29]</b></b>	11p13 11q23.3	arr 11p13pter (31.05-0)x1 arr 11q14.3q21 (92.22-95.85)x1 arr 11q22.3q23.3 (105.67-113.66)x1 arr 11q23.3qter (118.24-134.50)x3	11p13; ch11:30.98-31.80 11q14.2; ch11:92.10-94.46 11q21; ch11:95.85-96.07 11q22.3; ch11:105.51-106.38 11q23.3; ch11:113.79-118.30 11q23.3 (MLL)	NE	6

Zkratky: M, muž; Ž, žena; s, sekundární; -, neprovedeno; alo-TKD, alogenní transplantace kostní dřeně; žije, stav k 10.4.2012.



**Tabulka 6. Klinická data nemocných s abnormalitou chromosomu 11 a výsledky molekulárně cytogenetického mapování.**

Pacient č.	Pohl/ Věk	Datum diagnózy	Typ AML	Souhrnný karyotyp (Klasická cytogenetická analýza a/nebo mFISH/mBAND)	Zlomové místo na chromosomu 11 + nově detekované změny			alo- TKD	Přežití (dny)
					mBAND	SNP array (Mb)	FISH (Mb)		
<b>OSTATNÍ ABNORMALITY DLOUHÉHO RAMENE CHROMOSOMU 11 (11q)</b>									
43	Ž/73	16.06.2006	M5b	46,XX,t(11;14)(q12;q31)[4]	-	-	11q12; nemapováno	NE	7
44	Ž/56	31.05.2012	sAML	45,XX,del(5)(q14q33),der(16)ins(16;9)(p13;?)t(16;19)(p13;?)-17,der(18)t(18;21)(p11;?)t(17;21)(q11;?)[6]/45,XX,del(5)(q14q33), <b>der(11)inv dup(11)(q24q12)t(1;11)(p?;q12)</b> , -17,der(18)t(18;21)(p11;?)t(17;21)(q11;?)5]/45,XX,del(5)(q14q33),der(16)t(7;16)(?;p13)t(7;20)(?;?)t(11;20)(q22;?)-17,der(18)t(18;21)(p11;?)t(17;21)(q11;?)2]	11q12 11q22 11q24	-	11q12; nemapováno 11q13.2; ch11:67.64-68.31 11q24; nemapováno	NE	žije
45	M/69	22.09.2006	M0	47,XY,+13, <b>der(17)t(11;17)(q13;p11)</b> [cp7]/46,XY[15]	-	arr 11q13.2qter (67.22-134.50)x3	11q13.2; ch11:67.42-67.90	NE	89
46	M/59	31.08.2009	M4	46,XY, <b>der(1)t(1;11)(p34.3;q14.3)</b> ,+13[cp16]/46,XY[2]	11q14.3	-	11q14.2; ch11:79.11-92.28	NE	173
47	Ž/84	29.10.2009	sAML	43,XX,-3,t(4;11)(q?;q22),der(5)t(5;16)(q12;?)+8,-9,der(14)t(14;20)(p10;?)t(3;20)(?;?),der(16)t(16;17)(?;q22),-17,-18,der(20)t(3;20)(?;?),der(22)t(9;22)(?;p10)[cp7]/46,XX[3]	11q22	arr 11q22.1q22.1 (95.61-98.35)x1	11q21; ch11:95.16-95.64 delece 11q22.1 nepotvrzena	NE	129
48	Ž/70	28.04.2009	M0	44,XX,-3,del(5)(q13q33.1),der(7)t(3;7)(?;q31.3), <b>der(11)hsr(q23.3),ins(12;11)(q13;q14q24)hsr(11)(q14)</b> ,der(16)del(16)(p11)del(16)(q12),der(17)t(17;20)(p12;?),-20[cp16]/44,XX,-3,del(5)(q13q33.1),der(7)t(3;7)(?;q31.3), <b>der(11)hsr(11)(q23.3)t(11;17)(q23;p12)</b> ,der(16)del(16)(p11)del(16)(q12),-17[3]	11q14 11q23.3 11q24	arr 11q21q22.3 (94.80-106.40)x3 arr 11q22.3.q24.1 (106.40-122.39)x4 arr 11q24.2q25 (124.80-131.91)x4 arr 11q25qter (131.91-134.50)x1	11q21; ch11:94.62-95.34 11q22.3; ch11:106.54-108.09 11q24.1; nemapováno 11q24.2; nemapováno 11q25; nemapováno	NE	22
49	M/72	20/07/2010	sAML	46~51,X,der(Y)t(Y;10)(q11.2;q22)+8,+9,der(10)t(10;15)(q22;22)+13,+20,+21[15]/46,XY, <b>der(11)hsr(11)(q14)[5]</b> /46,XY[2]	11q14	-	11q21-q22.3; ch11:95.85-104.45	NE	54
50	Ž/53	27.11.2008	M2	44~45,XX,t(4;20)(q12;p11.2),del(5)(q13q33),der(7)t(7;17)(q21;q?), <b>der(9)t(9;11)(q34;q22)</b> +10,-11,-17[cp10]	-	arr 11q23.1qter (110.20-134.50)	11q23.1; ch11:109.76-110.70	ANO	463
51	Ž/66	11.10.2011	sM2	74~77<3n>,XXX,+1,-3,+4,+7,+8,+10,-11, <b>ace(11)(q23.3q25)hsr(11)(q23.3)x1~3,del(11)(q23.3)</b> ,+12,-16,+17,-19,+21,+22[cp5]/46,XX[3]	11q23.3	-	11q23.3; ch11:110.70-113.60	NE	110

Zkratky: M, muž; Ž, žena; s, sekundární; -, neprovedeno; alo-TKD, alogenní transplantace kostní dřeně; žije, stav k 10.4.2012

**Tabulka 6. Klinická data nemocných s abnormalitou chromosomu 11 a výsledky molekulárně cytogenetického mapování.**

Pacient č.	Pohl/Věk	Datum diagnózy	Typ AML	Souhrnný karyotyp (Klasická cytogenetická analýza a/nebo mFISH/mBAND)	Zlomové místo na chromosomu 11 + nově detekované změny			alo-TKD	Přežití (dny)
					mBAND	SNP array (Mb)	FISH (Mb)		
<b>ABNORMALITY KRÁTKÉHO A SOUČASNĚ DLOUHÉHO RAMENE CHROMOSOMU 11</b>									
52	M/28	12.07.2007	M2	44~45,XY,der(1)t(1;12)(q12;q13),der(3)t(3;18)(p12;q11),del(5)(q12q33), <b>der(11)hsr(11)(p15)hsr(11)(p13)hsr(11)(q22.1)</b> ,-12,der(17)t(1;17)(q12;p13),-18,+21[8]/44,XY,der(1)t(1;12)(q12;q13),der(3)t(3;18)(p12;q11),del(5)(q12q33),-7, <b>der(9)ins(9;11)(p22;q22.1q23.3),r(11)(q?q?)</b> ,-12,der(17)t(1;17)(q12;p13),-18,+21[cp4]/32,X,-Y,der(1)t(1;12)(q12;q13),-3,-5,-7,-10,-11, <b>der(11)hsr(11)(p15)hsr(11)(p13)hsr(11)(q22.1)t(7;11)(q11.1;q23.3)</b> ,-12,-13,-15,-16,der(17)t(1;17)(q12;p13),-18,-19,-20,-21, <b>ins(22;11)(q12;q22.1q23.3)</b> [3]	11p15.5 11p15.1 11p13 11p11.2 11q22.1 11q23.3	arr 11p15.5pter (0-1.68)x1 arr 11p15.1p15.5 (1.68-21.02)x4 arr 11p12 (37.75-42.94)x3 arr 11q14.1q14.3 (78.71-88.00)x3 arr 11q14.3qter (88.00-134.50)x4	del(11)(p15.5pter)x1; amp(11)(11p15.5p15.1)x6; 11p15.5; ch11:0-3.52 11p15.4-15.1; ch11:3.87-27.92 amp(11)(p13p12)x3; 11p13; ch11:36.42-36.75 11p12; ch11:37.65-40.03 amp(11)(p12p12)x3; 11p12; ch11:40.18-40.26 11p12; ch11:42.90-43.29 amp(11)(q14.1q14.2)x3; 11q14.1; ch11:78.39-78.52 11q14.2; ch11:79.11-87.47 amp(11)(q14.2qter)x6; 11q14.2; ch11:87.65-92.10	NE	65
53	M/63	03.06.2008	M4	44,XY,t(3;7)(p?;?),der(11)(17?::21?::11p13→11q24::11p15.5→11p15.1::11q22.1→11q24::11p15.5→11p15.1::11q22.1→11q24::11p15.5→p11.2::9?),-17,-21[5]/46,XY[1]	11p15.5 11p15.1 11p13 11p11.2 11q22.1 11q24	-	-	NE	3
54	M/60	10.06.2008	M2	46,XY, <b>der(4)t(4;11)(q11;p15),der(5)t(5;11)(q35;q13),der(11)t(4;11)(q11;q13)t(5;11)(q35;p15)</b> [21]/46,XY[1]	11p15 11q13.5	-	11p15.4 (NUP98) 11q13.2; ch11:68.31-68.52	NE	411

Zkratky: M, muž; Ž, žena; s, sekundární; -, neprovedeno; alo-TKD, alogenní transplantace kostní dřeně; žije, stav k 10.4.2012.

**Tabulka 7. Přehled výsledků mapování zlomových míst na krátkém a dlouhém rameni chromosomu 11.**

Oblast	Použitá sonda	Lokalizace	Číslo pacienta														
			6	7			8	9	10		11	12	13		42	52	54
			der(11)	der(11)	der(11)	der(21)	der(11)	+der(11)	der(11)	der(11)	der(11)	der(11)	der(11)	der(11)	der(11)	der(11)	der(11)
11pter	ToTel 11p		□	-	-	-	□	□	-	-	-	-	-	-	-	□	-
11p15.5	RP11-348A20	3.714-3.879	■	■	□	■	-	-	□■	□	■	-	-	-	-	■	■
	RP11-92N11	3.527-3.700	-	■	□	■	□	□	-	-	-	□	-	-	-	-	□
	RP11-120E20	3.616-3.801	-	-	-	-	-	-	□	□	-	-	-	-	-	-	-
	RP11-258P13	3.829-3.996	■	■	□	■	□	■	■	□	-	□	-	-	-	■	■
11p14.1	RP11-406D1	27.92-28.10	-	-	-	-	-	-	-	-	■	-	-	-	□	■	-
	RP11-244O16	28.21-28.37	-	-	-	-	-	-	-	-	■	-	-	-	-	-	-
	RP11-242P4	28.56-28.73	-	-	-	-	-	-	-	-	■	-	-	-	-	-	-
	RP11-258H15	29.15-29.31	-	-	-	-	□↓	-	■	□	□	□	-	-	□	-	-
	RP4-562D20	30.15-30.27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	□	-	-
11p13	RP11-140L23	30.98-31.06	-	-	-	-	□↓	-	■□	□	□	■	-	-	□■	-	-
	RP11-366N23	31.64-31.80	-	-	-	-	□↑	-	■	□	□	-	-	-	-	-	-
	RP-11-26B16	31.80-31.94	-	-	-	-	□↑	-	■	□	□	-	-	-	-	-	-
	RP11-74J1	32.34-32.51	-	□	□	□	□↑	-	-	-	□	■	□	□	■	■	-
	RP11-98C11	33.91-34.10	-	□	□	□	□↑	-	-	-	□	-	□	□	■	■	-
	RP11-68D18	35.18-35.37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	■	-
RP11-514F3	36.22-36.42	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
11p12	RP11-465C16	36.58-36.75	-	-	-	-	□↑	-	-	-	□	-	□	□	-	■	■
	RP11-233I10	36.88-37.06	-	-	-	-	□↑	-	-	-	-	-	■	-	-	-	-
	RP11-144G8	37.49-37.65	-	-	-	-	□	-	-	-	-	-	■	□	-	■	■
	RP11-160M15	39.37-39.54	-	-	-	-	-	-	-	-	□	-	-	□	-	-	-
	RP11-40H19	40.03-40.18	-	-	-	-	□	-	-	-	□	-	-	-	-	■	-
	RP11-454H19	40.11-40.26	-	-	-	-	□	-	-	-	□	-	-	-	-	■	■
	RP11-375D13	41.72-41.90	-	-	-	-	-	-	-	-	□	-	-	-	-	■	■
	RP11-538D20	41.87-42.06	-	-	-	-	□	-	-	-	-	-	-	-	-	■	■
RP11-108L12	42.90-43.06	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	■	■	
RP11-484D2	43.29-43.50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	■	-	
11p11.2	RP11-70A9	43.93-44.10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	□	-	-	-
	RP11-450F4	44.33-44.48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	□	-	-	-
	RP11-12C11	44.92-45.08	-	□	□	□	■	-	■	□	-	-	■	■	-	■	-
	RP11-164L18	46.25-46.42	-	-	-	-	-	-	■	□■	-	-	■	■	-	■	-
	RP11-433B4	46.37-46.54	-	-	-	-	-	-	-	□■	-	-	-	-	-	-	-
	RP11-425L10	46.40-46.56	-	-	-	-	-	-	■	■	-	-	■	■	-	-	-
	RP11-368A23	46.42-46.58	-	-	-	-	-	-	■	■	■	-	■	■	-	-	-
	RP11-165B4	46.66-46.94	-	-	-	-	-	-	■	■	■	-	■	■	-	-	-
	RP11-169J24	47.06-47.15	-	□	□	□	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	RP11-390K5	47.13-47.32	-	□	□	□	■	-	■	■	-	-	-	-	-	-	-
RP11-17G12	47.23-47.39	-	□	□	□	-	-	-	-	-	-	-	-	-	■	-	
RP11-125F14	47.33-47.52	-	■	■	-	■	-	■	■	-	-	-	-	-	-	-	

**Vysvětlivky:** ■, přítomnost signálu; ■■, duplikace; ■■■, amplifikace; □ nepřítomnost signálu; ■□, zlom; -, neděláno; červeně ztráta oblasti; zeleně získání oblasti; ↓ signál na derivovaném chromosomu umístěn telomericky; ↑ signál na derivovaném chromosomu umístěn centromericky.

**Tabulka 7. Přehled výsledků mapování zlomových míst na krátkém a dlouhém rameni chromosomu 11.**

Oblast	Použitá sonda	Lokalizace	Číslo pacienta																
			41	42			44	45	46	47	48	49	50	51		52	54		
			der(11)	der(11)	der(11)	der(?)	der(11)	der(16)	der(17)	der(1)	der(11)	der(11)	der(12)	der(11)	der(9)	der(11)	ace	der(11)	der(11)
11q13.1	RP11-472D15	65.26-65.45	■	-	-	-	■■	□	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
11q13.2	RP11-424B4	67.25-67.43	■	-	-	-	■■	□	□	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	RP11-715F10	67.25-67.42	■	-	-	-	-	□	□	-	-	-	-	-	-	-	-	■	
	RP11-98N24	67.45-67.64	-	-	-	-	-	□	□■	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	RP11-105D14	67.90-68.07	■	-	-	-	-	-	■	-	-	-	-	-	-	-	-	■	
	RP11-569N5	68.31-68.52	■□	-	-	-	■■	■	-	-	-	-	-	-	-	-	-	■□	
RP11-554A11	68.75-68.94	□	-	-	-	-	-	■	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
11q13.3	LSI t(11;14) XT		□	-	-	-	-	-	■	-	-	-	-	-	-	-	-	□	
	LSI CCND1		-	-	-	-	-	-	■	-	-	-	-	-	-	-	-	□	
11q13.4	RP11-92H23	71.72-71.88	□	-	-	-	-	-	■	-	-	-	-	■	-	-	-	-	
11q14.1	RP11-139M8	78.00-78.16	-	-	-	-	-	-	■	-	-	-	-	■	-	-	-	-	
	RP11-15N10	78.23-78.39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	■	
	RP11-7H7	78.35-78.52	-	-	-	-	-	-	-	-	-	■	□	-	-	-	-	■■■	
	RP11-16H7	78.62-78.78	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	■■■	
	RP11-153F6	78.96-79.11	-	-	-	-	-	■	-	■	■	□	■	-	-	-	-	■■■	
11q14.2	RP11-241M12	85.67-85.86	-	-	-	-	-	-	-	■	-	-	-	-	-	-	-	■■■	
	RP11-496E23	87.47-87.65	-	■□	■	□	-	-	-	■	■	□	■	-	-	-	-	■■■	
11q14.3	RP11-135L17	92.10-92.28	-	■	■	□	■■	■	-	■	-	-	-	-	-	-	-	■■■	
11q21	RP11-54L12	94.46-94.62	-	□	■	□	■■	■	-	■	■	□	■	-	-	-	-	■■■	
	RP11-159N13	95.16-95.34	-	□	■	□	-	-	-	■	■	■	■	-	-	-	-	■■■	
	RP11-277H22	95.64-95.85	-	□	■	□	-	-	-	□	-	-	■	-	-	-	-	■■■	
11q22.1	RP11-16K5	95.92-96.07	-	□■	■	□	■■	■	-	□	-	-	-	-	-	-	-	■■■	
	RP11-379J13	97.59-97.82	-	■	■	□	■■	■	-	□	-	-	-	-	-	-	-	■■■	
11q22.3	RP11-179B7	104.29-104.45	-	■	■	□	■■	■	-	□	■	■	■■■	-	-	-	-	■■■	
	RP11-22J5	105.51-105.67	-	■	■	□	-	-	-	-	■	■	-	-	-	-	-	■■■	
	RP11-273B11	106.38-106.54	-	□	■	□	-	-	-	-	■	■	-	-	-	-	-	■■■	
	LSI ATM		-	□	■	□	-	-	-	□	■■■	■■■	-	□	-	-	-	■■■	
	RP11-268L8	108.81-109.00	-	-	■	□	-	-	-	-	-	-	-	□	-	-	-	■■■	
RP11-18B19	109.59-109.76	-	-	■	□	-	-	-	-	-	-	-	□	■	□	-	■■■		
11q23.1	RP11-285P16	110.53-110.70	-	□	■	□	-	-	-	-	■■■	■■■	-	■	■	□	-	■■■	
11q23.2	RP11-267J11	113.60-113.79	-	□	■	□	-	-	-	-	-	-	-	-	□	■	■■■	■■■	
	RP11-215H18	118.15-118.32	-	■	■	■	-	-	-	-	-	-	-	-	□	■	■■■	■■■	
11q23.3	LSI MLL		□■	■	■□	■	■■	■	■	■	□	■■■	■■■	■■■	■	□	■■■	■■■	
	ToTel 11q		-	-	-	-	□	■	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

**Vysvětlivky:** ■, přítomnost signálu; ■■, duplikace; ■■■, amplifikace; □ nepřítomnost signálu; ■□, zlom; -, neděláno; červeně ztráta oblasti; zeleně získání oblasti; ↓ signál na derivovaném chromosomu umístěn telomericky; ↑ signál na derivovaném chromosomu umístěn centromericky.

**Tabulka 8. Přehled zlomových míst identifikovaných na chromosomu 11 u AML.**

Oblast	Frekvence	Pacient č.	Lokalizace (Mb)	Kandidátní geny
11p15.5	n=5	6, 7, 8, 52, 53	ch11:0-3.52	cca 50 genů (HRAS, CD151, MUC6, MUC2, CARS)
11p15.4	n=3	9, 10, 54	ch11:3.73-3.81	NUP98
11p15.4-p15.1	n=3	7, 52, 53	ch11:3.87-27.92	cca 80 genů (RRM1, EIF3F, LMO1, HTATIP2, FANCF)
11p14.1	n=1	11	ch11:28.56-29.15	lincRNA
11p13	n=7	53	nemapováno	
		12	ch11:29.31-31.06	FSHB, KCNA4, C11orf46, MPPED2, DCDC5, DCDC1
		10	ch11:30.98-31.06	DCDC5, DCDC1
		8, 42	ch11:30.98-31.80	DCDC5, DCDC1, DNAJC24, ELP4, IMMP1L, miRNA
		10	ch11:31.06-31.64	DNAJC24, ELP4, IMMP1L, miRNA
11p12	n=7	52	ch11:36.42-36.75	TRAF6, RAG1, RAG2, C11orf74
		13	ch11:36.75-37.06	Žádný protein/RNA kódující gen
		8	ch11:36.88-37.49	Žádný protein/RNA kódující gen
		52	ch11:37.65-40.03	RNA geny: SNORA31, U6, lincRNA
		52	ch11:40.18-40.26	LRRC4C
		11	ch11:41.87-42.06	lincRNA
		8	ch11:42.06-43.06	lincRNA
11p11.2	n=5	52	ch11:42.90-43.29	Žádný protein/RNA kódující gen
		53	nemapováno	
		13	ch11:44.48-45.08	CD82, TP53I11, TSPAN18, lincRNA
		10	ch11:46.37-46.54	DGKZ, MDK, CHRM4, AMBRA1
		7	ch11:47.13-47.23	ARFGAP2, PACSIN3
11p11.1	n=1	14	ch11:47.33-47.39	SPI1, MYBPC3, MADD
11q12	n=2	43, 44	nemapováno	
11q13.2	n=4	45	ch11:67.42-67.90	NDUFS8, UNC93B1, ALDH3B1, TCIRG1, CHKA,
		44	ch11:67.64-68.31	ALDH3B2, lincRNA, miRNA, U6
		41, 54	ch11:68.31-68.52	GAL, MTL5, lincRNA
11q14.1	n=1	52	ch11:78.39-78.52	ODZ4
11q14.2	n=5	52	ch11:79.11-87.47	cca 25 genů (ODZ4, RSF1, THRSP, GAB2, PICALM, MIR708,
		46	ch11:79.11-92.28	RAB30, SYTL2, EED, FZD4)
		52	ch11:87.65-92.10	cca 20 genů (RAB38, TYR, NOX4, TRIM49, NAALAD2, CHORDC1, FAT3)
		42	ch11:92.10-94.62	cca 30 genů (FAT3, MRE11A, MTNR1B, PANX1, FUT4)
11q21	n=4	48	ch11:94.62-95.34	KDM4D, ENDOD1, CWC15, SESN3, KDM4DL
		47	ch11:95.16-95.64	CEP57, FAM76B, MTMR2, 5S RNA, lincRNA
		49	ch11:95.85-104.45	cca 30 genů (MAML2)
		42	ch11:95.85-96.07	MAML2
11q22.1	n=1	53	nemapováno	
11q22.3	n=2	42	ch11:105.51-106.38	GRIA4, U6, U4, KIAA1826, KBTBD3, AASDHPPT, lincRNA
		48	ch11:106.54-108.09	cca 11 genů (GUCY1A2, ALKBHB, RAB39A, CUL5, ACAT1, NPAT)
11q23.1	n=1	50	ch11:109.76-110.70	ARGHAP20, RDX, ZC3H12C, FDX1
11q23.3	n=31	51	ch11:110.70-113.60	cca 30 genů (POU2AF1, MIR34B, MIR34C, CRYAB, SIK2)
		42	ch11:113.79-118.00	cca 30 genů (ZBTB16, NNMT, TAGLN, APOA4, APOC3)
		42	ch11:118.00-118.30	cca 10 genů (TMPRSS4, UBE4A, AMICA1, MPZL2)
		15-42	ch11:118.30-118.39	MLL
11q24	n=3	44	nemapováno	
		48	ch11:121.00-121.50	TECTA, SC5DL, SORL1
		48	ch11:124.50-125.00	cca 25 genů (SPA17, ESAM, ROBO3, ROBO4, HEPACAM)
11q25	n=1	48	ch11:131.50-132.50	OPCML, NTM, C11orf39

Vysvětlivky: n, počet; lincRNA, dlouhé nekódující RNA, **rekurentní zlom**, potenciálně nenáhodný, překrývající se oblasti.

**Tabulka 9. Detekované oblasti nebalancovaných a balancovaných změn na chromosomu 11 u AML** (a,b, 2 změny o různé velikosti v 1 klonu nebo 2 různé klony (viz text)).

Změna	Oblast	Proxim./ distál. zlom(Mb)		Počet	Číslo pacienta	Počet genů	Kandidátní geny z alterované oblasti
Duplikace	11p15.5→p15.1	0.20	3.70	n=1	7	> 80	<b>RPLP2</b> , NUP98 (nukleární transport), <b>HRAS</b> , <b>CD151</b> , CARS (tRNA syntéza)
	11p15.4→p15.1	3.70	27.00	n=2	7, 9	> 80	5'NUP98 (nukleární transport), <b>LMO1</b> , <b>RPL27A</b> , EIF4G2 (iniciace translace), <b>RPS13</b> , FANCF (chromosomová nestabilita)
	11p14.1→p11.1	27.00	47.50	n=1	9	> 100	DCDC5 (polymerace mikrotubulinu), DCDC1 (polymerace mikrotubulinu), DNAJC24 (aktivace Hsp70 chaperonů), IMMP1L (mitochondriální peptidáza), <b>WT1</b> , LMO2 (regulátor hematopoézy), RAG1, RAG2 (rekombinace), <b>TRAF6</b> , API5 (inhibitor apoptózy), <b>CREB3L1</b> , <b>MDK</b> , DDB2 (reparace DNA), MADD (regulace přežití), <b>SPI1</b> , <b>SNORA31</b> , U6 RNA, mnoho miRNA a lincRNA
	11p11.1→q12	47.50	62.00	n=2	9, 14	> 100	<b>PTPRJ</b> , <b>CTNND1</b> , FEN1 (endonukleáza), mnoho miRNA a lincRNA
	11q12→q13.1	62.00	67.00	n=3	9, 14, 44a	> 100	<b>MACROD1</b> , BAD (inhibitor apoptózy), <b>RELA</b> , mnoho miRNA a lincRNA
	11q13.1→q14.1	67.00	79.00	n=4	9, 14, 44a, 45	> 100	RAD9A (rekombinace), CHKA (metabolismus), MTL5 (buněčný růst), THRSP (metabolismus), <b>GAB2</b> , mnoho miRNA a lincRNA
	11q14.1→q14.3	79.00	92.00	n=5	9, 14, 44a, 45, 46	> 30	<b>ODZ4</b> , PICALM, <b>PICALM</b> , <b>RAB30</b> , EED (remodelace chromatinu), <b>FZD4</b> , mnoho miRNA a lincRNA
	11q14.3→q21	92.00	94.00	n=6	9, 14, 44a, 44b, 45, 46	cca 30	<b>FAT3</b> , <b>PANX1</b> , množství malých jaderných RNA
	11q21→q22.3	94.00	109.00	n=7	9, 14, 44a, 44b, 45, 46, 48a	> 50	MRE11A (rekombinace), FUT4 (fukosyltransferáza), NOX4 (metabolismus), <b>RAB38</b> , <b>MAML2</b> , CEP57 (součást centrosomu, translokín), BIRC3, BIRC2 (inhibitor apoptózy), CASP1, CASP4, CASP5, CASP12 (kaspázy), <b>GUCY1A2</b> , CUL5 (ubiquitinylace), <b>RAB39</b> , NPAT (přechod z G1 do S fáze), DDX10 (RNA helikáza), mnoho miRNA a lincRNA
	11q22.3→q23.3	109.00	118.35	n=8	9, 14, 44a, 44b, 45, 46, 48a, 50	> 80	<b>ARHGAP20</b> , <b>POU2AF1</b> , NNMT (metyltransferáza), TMPRSS4 (serinová proteáza), <b>RAB39</b> , <b>ZBTB16</b> , BTG4 (inhibitor apoptózy), <b>SIK2</b> , <b>5'MLL</b> , <b>MIR34B</b> , <b>MIR34C</b>
	11q23.3→q24	118.35	125.00	n=9	9, 14, 27, 44a, 44b, 45, 46, 48a, 50	> 50	<b>3'MLL</b> , DDX6 (RNA helikáza), H2AFX (histon), <b>ARHGEF12</b> , <b>MIR100</b> , <b>SPA17</b> , mnoho miRNA a lincRNA
11q24→qter	125.00	134.50	n=7	9, 14, 27, 44b, 45, 46, 50	> 50	ETS1 (inhibitor apoptózy), <b>NFRKB</b> , U13 RNA, mnoho miRNA a lincRNA	
Amplifikace	11p15.5→p15.1	0.20	27.00	n=2	52, 53	> 150	NUP98 (nukleární transport), <b>HRAS</b> , <b>CD151</b> , <b>LMO1</b> , <b>RPL27A</b> , EIF4G2 (iniciace translace), <b>RPS13</b> , FANCF (chromosomová nestabilita)
	11p13	31.00	36.00	n=1	53	> 30	<b>PAX6</b> , <b>WT1</b> , LMO2 (regulátor hematopoézy), <b>CD44</b> , mnoho miRNA a lincRNA
	11p13→p12	36.00	43.50	n=2	52, 53	cca 30	RAG1, RAG2 (rekombinace), API5 (inhibitor apoptózy), <b>TRAF6</b> , <b>SNORA31</b> , U6 RNA, mnoho miRNA a lincRNA
	11p12→p11.1	43.50	47.50	n=2	13, 53	cca 40	<b>CREB3L1</b> , <b>MDK</b> , DDB2 (reparace DNA), MADD (regulace přežití), <b>SPI1</b> , mnoho miRNA a lincRNA
	11q14.1→q22.1	78.00	95.00	n=2	13, 52	> 50	<b>GAB2</b> , <b>ODZ4</b> , THRSP (metabolismus), <b>PICALM</b> , <b>RAB30</b> , EED (remodelace chromatinu), <b>FZD4</b> , MRE11A (rekombinace), FUT4 (fukosyltransferáza), mnoho miRNA a lincRNA
	11q22.1→q22.3	95.00	106.00	n=4	13, 49, 52, 53	cca 40	<b>MAML2</b> , CEP57 (součást centrosomu, translokín), BIRC3, BIRC2 (inhibitor apoptózy), CASP1, CASP4, CASP5, CASP12 (kaspázy)
	11q22.3→q23.1	106.00	110.00	n=5	13, 48b, 49, 52, 53	cca 15	<b>GUCY1A2</b> , CUL5 (ubiquitinylace), <b>RAB39</b> , NPAT (přechod z G1 do S fáze), DDX10 (RNA helikáza), mnoho miRNA a lincRNA
	11q23.1→q23.3	110.00	118.00	n=6	13, 48b, 49, 51, 52, 53	> 80	<b>ARHGAP20</b> , <b>POU2AF1</b> , NNMT (metyltransferáza), TMPRSS4 (serinová proteáza), <b>RAB39</b> , <b>ZBTB16</b> , BTG4 (inhibitor apoptózy), <b>SIK2</b> , <b>MIR34B</b> , <b>MIR34C</b>
	11q23.3	118.00	118.30	n=7	13, 42, 48b, 49, 51, 52, 53	cca 10	UBE4A (ubiquitinylace)
	11q23.3	118.30	118.35	n=8	13, 18, 42, 48b, 49, 51, 52, 53	1	<b>5'MLL</b>
	11q23.3→q25	118.00	132.50	n=7	13, 42, 48b, 49, 51, 52, 53	> 80	<b>3'MLL</b> , DDX6 (RNA helikáza), H2AFX (histon), <b>ARHGEF12</b> , <b>MIR100</b> , <b>SPA17</b> , ETS1 (inhibitor apoptózy), <b>NFRKB</b> , mnoho miRNA a lincRNA
11q25→qter	132.50	134.50	n=2	13, 42	cca 20	U13 RNA, miRNA, lincRNA	

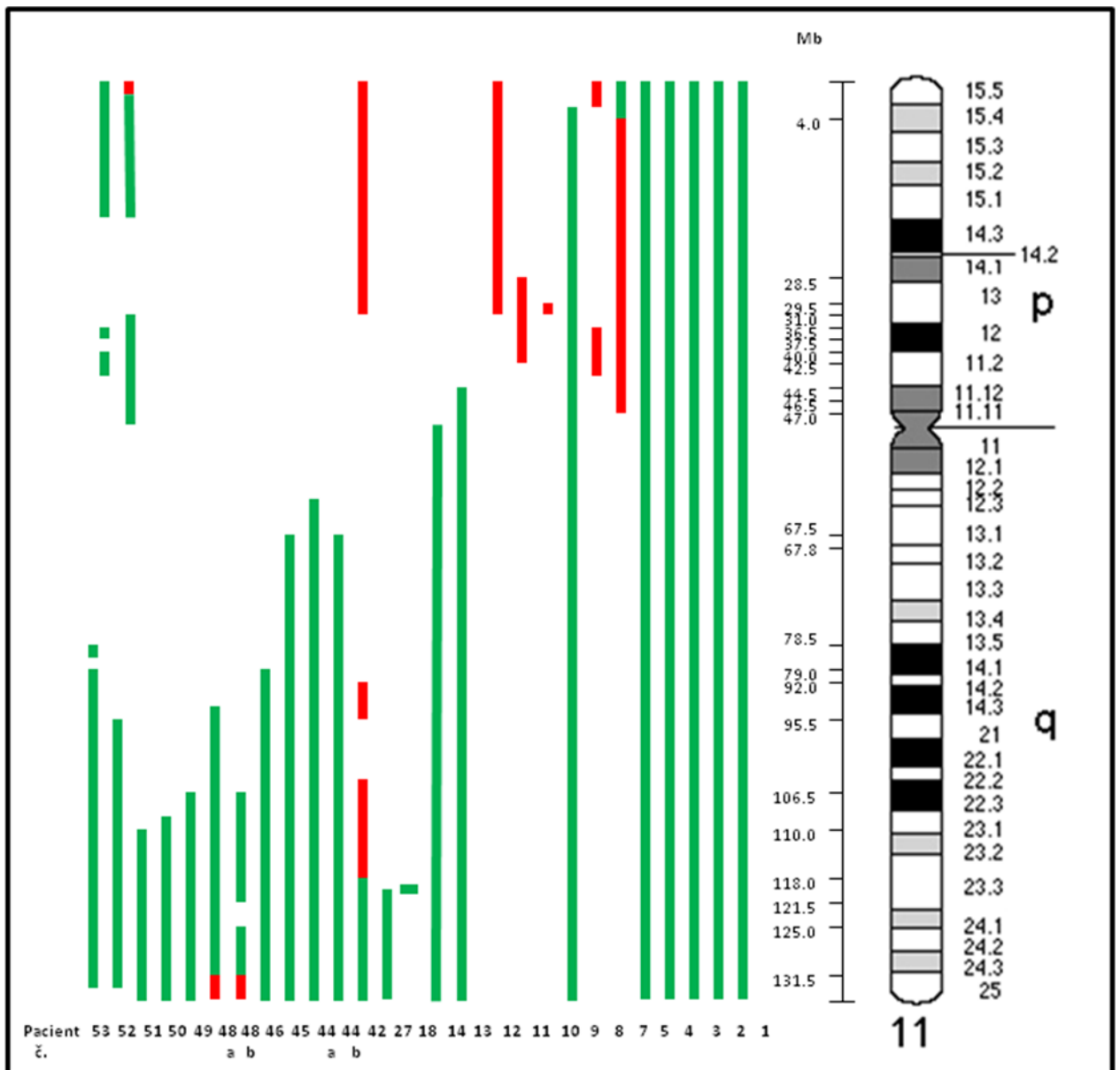
Vysvětlivky: transkripční faktor, tumor supresor, signalizace, ribozomální protein či RNA, RNA pro úpravu mRNA, ostatní nekódující RNA, jiné.

**Tabulka 9. Detekované oblasti nebalancovaných a balancovaných změn na chromosomu 11 u AML** (a, b, 2 změny o různé velikosti v 1 klonu nebo 2 různé klony (viz text)).

Změna	Oblast	Proximální/ distální zlom (Mb)		Počet	Číslo pacienta	Počet genů	Kandidátní geny z alterované oblasti
<b>Delece</b>	11pter→p15.5	0	3.52	n=4	8, 12, 42, 52	> 80	MIR210 (inhibice proliferace), RPLP2, HRAS, CD151, MUC6, MUC2, MUC5B (mucíny, ochrana povrchu žaludku, nádorový marker), CDKN1C (p57, inhibitor cyklin dependentní kinázy), CARS (tRNA syntéza)
	11p15.5→p14.1	3.80	28.00	n=3	7, 12, 42	> 80	RRM1 (reparace DNA), EIF3F (inhibice translace), RPL27A, ST5 (funkce neznámá), EIF4G2 (iniciace translace), RPS13, HTATIP2 (iniciace apoptózy), FANCF (chromosomová nestabilita)
	11p14.1→p13	28.00	31.00	n=4	7, 11, 12, 42	cca 24	MPPE2 (inhibice proliferace), DCDC5 (polymerace mikrotubulínu), 12x lincRNA, 3x miRNA
	11p13	31.00	31.50	n=4	7, 10, 11, 42	7	DCDC1 (polymerace mikrotubulínu), DNAJC24 (aktivace Hsp70 chaperonů), IMMP1L (mitochondriální peptidáza), 3x miRNA
	11p13	31.50	32.00	n=3	7, 11, 42	4	ELP4 (remodelace chromatinu), RCN1 (Ca <sup>2+</sup> vazebný protein), PAX6
	11p13→p12	32.00	36.80	n=2	7, 11	> 30	WT1, LMO2 (regulátor hematopoese), RAG1, RAG2 (rekombinace), TRAF6, CD44
	11p12	36.80	42.00	n=3	7, 8, 11	12	LRRC4 (regulace axenogeneze), SNORA31, U6 RNA, 4x lincRNA, 5x miRNA
	11p12	42.00	43.00	n=2	7, 8	2	2x lincRNA
	11p12→p11.2	43.00	47.50	n=1	7	cca 40	API5 (inhibitor apoptózy), CD82 (suprese metastáz), CREB3L1, DGKZ (regulace kinázy C), MDK, DDB2 (reparace DNA), MADD (regulace přežití), SPI1
	11q14.3→q22.1	92.00	96.00	n=1	42	> 20	FAT3, MRE11A (rekombinace), FUT4 (fukosyltransferáza)
11q22.3→q23.3	105.50	118.00	n=1	42	>50	ATM, ARHGAP20, POU2AF1, NNMT (metyltransferáza), TMPRSS4 (serinová proteáza), RAB39, ZBTB16, MIR34B, MIR34C	
11q25→qter	131.50	134.50	n=2	44a, 48	27	OPCML, NTM (adhezivní molekula), U6 RNA, U13 RNA, 3x miRNA, 5x lincRNA	
<b>Balancovaná přestavba</b>	11p15.5	0	3.52	n=1	6	cca 50	MIR210 (inhibice proliferace), RPLP2, HRAS, CD151, MUC6, MUC2, MUC5B (mucíny, ochrana povrchu žaludku, nádorový marker), CDKN1C (p57, inhibitor cyklin dependentní kinázy), CARS (tRNA syntéza)
	11p15.4	3.70	3.80	n=2	10, 54	1	NUP98 (nukleární transport)
	11p13	30.98	31.80	n=1	8	8	DCDC5 (polymerace mikrotubulínu), DCDC1 (polymerace mikrotubulínu), DNAJC24 (stimulace ATPázy), ELP4 (remodelace chromatinu), IMMP1L (mitochondriální peptidáza), 3x miRNA
	11p12	36.75	37.06	n=1	13		Žádný protein/RNA kódující gen
	11p11.2	46.37	46.54	n=1	10	5	DGKZ, MDK (růstový faktor), CHRM4 (inhibitor adenylát cyklázy), AMBRA1 (vývoj nervového systému), miRNA
	11p11.2	47.33	47.39	n=1	7	3	SPI1, MYBPC3 (myozin vazebný protein), MADD
	11q12	?	?	n=1	43		
	11q13.2	68.31	68.52	n=2	41, 54	4	GAL (galanin, neuropeptid), MTL5 (buněčný růst a diferenciaci), lincRNA, miRNA
	11q21	95.16	95.64	n=1	47	7	CEP57 (součást centrosomu, translokín), FAM76B (funkce neznámá), MTMR2 (metabolismus), 5S RNA, 2x lincRNA, miRNA
	11q23.3	118.30	118.40	n=25	15-17, 19-26, 28-41	1	MLL

**Vysvětlivky:** transkripční faktor, tumor supresor, signalizace, ribozomální protein či RNA, RNA pro úpravy mRNA, ostatní nekódující RNA, jiné.

**Obrázek 8. Detekované oblasti duplikace/amplifikace (zeleně) a delece (červeně) na chromosomu 11 u AML** (a,b, dvě změny o různé velikosti v jednom klonu nebo dva různé klony (viz text)).





## 5.1.2. Charakteristika a klinický význam zlomových míst

### Změny 11p

Alteraci krátkého ramene chromosomu 11 jsme prokázali u 13 z 54 (24 %) nemocných (viz **tabulka 6**). Porovnání klinických a cytogenetických dat nemocných dle postižení ramene chromosomu je zobrazeno v **tabulce 16**. Všechny alterace 11p byly součástí komplexního karyotypu, často detekovány spolu s dalším zlomem na chromosomu 11. Mechanizmy vzniku zlomových míst byly: balancované přestavby (n=6; nemocní č. 6, 7, 8, 10, 13, 54), delece (n=6; nemocní č. 7, 8, 10, 11, 12 a 42) a duplikace/amplifikace (n=5; nemocní č. 9, 13, 14, 52, 53).

Pomocí FISH mapování jsme na 11p identifikovali 18 různých zlomových míst. Rekurentní zlom byl identifikován v oblasti 11p15.4 v genu *NUP98* a další potenciálně nenáhodné zlomy v pruzích 11p13 (ch11:30.98-31.06 Mb) a 11p12 (ch11:36.72-37.49 Mb) (viz **tabulka 9**). Opakované alterace jsme prokázali i v regionech 11p15.5 a 11p15.4-p15.1. Ty ale nebyly z důvodu nedostatku materiálu přesněji specifikovány. Ostatní zlomy se vyskytovaly jen sporadicky.

Přestavbu genu *NUP98* jsme detekovali u tří nemocných (č. 9, 10 a 54, viz **tabulka 6 a 17**). Ve všech třech případech byly kromě alterace *NUP98* přítomné další změny chromosomů (u pacientů č. 10 a 54 i další zlomy na stejném chromosomu 11). U nemocných č. 10 a 54 měla přestavba genu *NUP98* reciprokovou povahu. Jednalo se o variantní komplexní translokaci zahrnující tři chromosomy: t(5;11;20)(q35;p15;p?) (nemocný č. 10) a t(4;5;11)(q11;q35;p15) (nemocný č. 54). U obou pacientů jsme pomocí FISH s BAC sondou RP11-265K23 prokázali fúzi genu *NUP98* s genem *NSDI* na 5q35. U nemocného č. 10 byla tato přestavba odhalena pouze metodou FISH. U nemocné č. 9 měla alterace genu *NUP98* nebalancovanou povahu. Vznikla přestavbou nadpočetného chromosomu 11, jehož telomerická část krátkých ramen 11p15.4→11pter byla nahrazena genetickým materiálem z chromosomu 1. Ve výsledku se tak jednalo o parciální trisomii 11 oblasti 11p15.4 (zahrnující pouze 5'konec *NUP98*) až 11qter. Ve FISH analýze jsme sledovali 3 kopie sondy RP11-258P13 značící 5'konec *NUP98* a pouze 2 kopie sondy RP11-92N11 značící 3'konec *NUP98*. Ztráta oblasti 11p15.4→11pter nadpočetného chromosomu byla potvrzena také subtelomerickou sondou pro 11p.

U čtyř nemocných (č. 8, 10, 12, 42) jsme zlomové místo v oblasti 11p13 specifikovali do společného regionu ch11:30.98-31.06 Mb (viz **tabulka 6 a 17**). U

dvou pacientů (č. 8 a 10) se na stejném derivovaném chromosomu 11 nacházeli i další zlomy. Ve dvou případech (č. 10 a 42) byl aberacemi postižen i druhý homologní chromosom 11. U nemocné č. 8 došlo k zlomu při translokaci invertované části chromosomu 11 do derivovaného chromosomu 12. Jednalo se tedy o balancovanou změnu. U nemocného č. 10 vznikl zlom s následkem kryptické intersticiální delecce v oblasti 11p13. Také v případě pacientů č. 12 a 42 měla změna nebalancovaný charakter. U obou se jednalo o nreciprokou translokaci vedoucí k terminální ztrátě krátkého ramene 11p13→11pter.

Zlom v oblasti 11p12 v regionu ch11:36.75-37.49 Mb jsme identifikovali u nemocných č. 8 a 13 (viz **tabulka 6 a 17**). U nemocné č. 8 vznikl zlom na základě kryptické delecce v oblasti 11p12, u pacienta č. 13 nreciprokou translokací 11p12→11pter na derivovaný chromosom 7. Při přestavbě nedošlo k ztrátě ani zisku genetického materiálu z chromosomu 11, proto byl zlom zařazen do skupiny balancovaných změn chromosomu 11.

## Změny 11q

Alteraci dlouhého ramene chromosomu 11 jsme prokázali u 40 pacientů (č. 15-54), u čtyř současně s abnormalitami 11p (č. 42, 52, 53, 54). Protože literatura doporučuje odlišovat přestavby *MLL* genu jako samostatný specifický soubor nemocných, jsou změny 11q dále rozděleny na přestavby *MLL* genu a ostatní změny 11q (porovnání klinických a cytogenetických dat nemocných dle postižení ramene chromosomu je zobrazeno v **tabulce 16**).

## Změny genu *MLL*

Přestavbu *MLL* genu jsme pozorovali u 28 z 54 pacientů (52 %). Identifikovali jsme tři nebalancované přestavby *MLL* genu (nemocní č. 18, 27 a 42) spojené se ziskem 5' nebo 3' konce *MLL* a 25 balancovaných (viz **tabulka 6 a 17**). Translokace *MLL* genu byla u 15 nemocných samostatnou aberací, u čtyř (č. 15, 20, 21, 39) byla detekována spolu s početní odchylkou jiného chromosomu (+8 nebo -7), u dvou šlo o komplexní translokaci/inzerci s celkem třemi zlomovými místy na účastněných chromosomech (č. 17, 19 a 41), a u pěti (č. 18, 26, 27, 37, 42) se vyskytovala s dalšími početními/strukturními přestavbami. V sedmi případech byla přestavba *MLL* genu prokázána pouze metodou FISH. Zatímco u dvou nemocných nebyly přítomné dělicí se buňky (č. 16 a 22), u tří pacientů se změnu genu nepodařilo zachytit klasickou

cytogenetickou analýzou: t(9;11)(p22;q23) (fúzní gen *MLL-MLLT3*) u nemocného č. 15, t(9;12;11)(p22;p13;q23) (fúzní gen *MLL-MLLT3*) u nemocného č. 19 a t(6;11)(q27;q23) (fúzní gen *MLL-MLLT4*) u nemocného č. 21. Ve dvou případech (č. 18, 26) došlo ke kryptické inserci *MLL* genu do derivovaného chromosomu 10 (fúzní gen *MLL-MLLT10*) v rámci rozsáhlých změn karyotypu. U obou nemocných se aberaci nepodařilo odhalit ani metodou mFISH, přítomnost 5'konce *MLL* genu na 10p12 tak byla prokázána pouze kombinací translokační sondy pro *MLL* gen a centromerické sondy pro chromosom 10. U nemocného č. 26 byla inserce maskována zdánlivě reciprokou translokací t(2;11)(p24;q23). Nejčastějšími přestavbami *MLL* genu byly t(9;11)(p22;q23) (n=13; jednou při nálezu 0 mitos, jednou v rámci variantní translokace), t(11;19)(q23;p13) (n=5) a translokace/inserce (10;11)(p12;q23) (n=3; jednou v rámci variantní translokace a dvakrát kryptická spolu s přídatnými aberacemi dalších chromosomů). U jednoho nemocného jsme identifikovali novou, dosud nepublikovanou, translokaci *MLL* genu t(6;11)(p21.3;q23) v tetraploidním karyotypu. Zlomové místo na partnerském chromosomu 6 bylo lokalizováno centromericky od oblasti 6p21.31 hybridizující k BAC sondě RP11-174A4.

### *Ostatní změny 11q*

Změnu dlouhého ramene chromosomu 11, jejíž součástí nebyla přestavba genu *MLL*, jsme prokázali u 14 pacientů (č. 41–54), u tří současně s abnormalitami krátkého ramene (č. 52, 53, 54). Porovnání klinických a cytogenetických dat nemocných dle postižení ramene chromosomu je zobrazeno v **tabulce 16**. U desíti nemocných byly alterace 11q součástí komplexního karyotypu (č. 42, 44, 47-54). Mechanizmy vzniku zlomových míst na 11q byly: balancovaná přestavba (nemocní č. 41, 43, 47, 54), duplikace/amplifikace (nemocní č. 42, 44, 45, 46, 48 – 53) a delece (č. 42, 44, 48). Pomocí FISH mapování jsme na 11q kromě genu *MLL* identifikovali 21 dalších různých zlomových míst. Potenciálně nenáhodný zlom se vyskytl v pruhu 11q13.2 (68.31-68.52 Mb) (viz **tabulka 7**). Opakované alterace jsme prokázali i v regionech 11q12, 11q13.2, 11q14 a 11q24. Z důvodu nedostatku materiálu ale nebyly tyto zlomy více specifikovány. Ostatní zlomy se vyskytly jen sporadicky.

Zlom v 11q13.2 regionu ch11:68.31-68.52 Mb jsme detekovali u dvou mužů (viz **tabulka 6 a 17**). U obou nemocných vznikl zlom na základě balancované přestavby a také se na stejném derivovaném chromosomu 11 nacházel i další zlom (v genu *NUP98* u pacienta č. 54 a v genu *MLL* u pacienta č. 41).

## Změny 11p i q

Změnu dlouhého a současně krátkého ramene chromosomu 11 jsme prokázali u čtyř pacientů (č. 42, 52, 53, 54) (viz **tabulka 6**). U nemocných č. 42, 52 a 53 vznikla zlomová místa na obou ramenech vlivem nebalancovaných změn způsobených amplifikacemi (č. 42, 52, 53) nebo delecemi (č. 42). Balancovanou tří cestou translokaci se dvěmi zlomovými místy na chromosomu 11 (na 11p v genu *NUP98*) jsme popsali u pacienta č. 54.

## Parciální tandémové a netandémové duplikace *MLL* genu

Pomocí molekulárně genetických metod jsme parciální tandémovou duplikaci genu *MLL* detekovali u 50 (23 %) nemocných a parciální netandémovou duplikaci *MLL* u tří (1 %) nemocných.

Soubor nemocných s *MLL* PTD tvořilo 23 žen a 27 mužů, medián věku 55 let. V devíti případech se jednalo o sekundární formu AML. FAB subtyp byl stanoven jako: M2 (n=18), M1 (n=13), M4 (n=10), M0 (n=4), M5 (n=2), M6 (n=2), jiný (n=1). Dle nálezu cytogenetické analýzy se *MLL* PTD nacházela spolu s: normálním karyotypem (n=21), nálezem 0 mitos (n=3), prognosticky příznivou změnou t(8;21)/inv(16) (n=4), komplexním karyotypem (n=5, z toho 2x s aberací chromosomu 11 a 1x s trisomií 11), přestavbou *MLL* genu (n=7), s dalšími chromosomovými abnormalitami (n=10, z toho 1x s parciální trisomií 11, 1x s úplnou trisomií 11, 2x s monosomií 7). Celkem se *MLL* PTD vyskytovala současně s nepřerušenu přestavbou *MLL* genu u 7 nemocných, s jinou změnou chromosomu 11 u čtyřech nemocných (viz **tabulka 10**). Při *MLL* PTD došlo nejčastěji k duplikaci exonů 2 až 6 (29x), dále exonů 2 až 8 (8x) a 2 až 7 (3x). U devíti nemocných byla duplikace přerušena delecí nukleotidů v různých exonech o různé velikosti.

Neparciální tandémovou duplikaci *MLL* genu jsme identifikovali u tří žen (medián věku 43 let). Všechny měly primární AML typu M5 (n=2) a M1 (n=1). *MLL* PNTD se vyskytovala společně s translokacemi t(9;11)(p22;q23), t(11;19)(p13;q23) a t(9;12;11)(p22;p13;q23) (viz **tabulka 11, obrázek 9**). U pacienta č. 20 byla navíc prokázána delece v exonu 7 genu *MLLT3* (ztráta 21 nukleotidů) a v exonu 1 genu *MLL* (ztráta 438 nukleotidů).

**Tabulka 10. Přehled *MLL* PTD u nemocných se změnou chromosomu 11.**

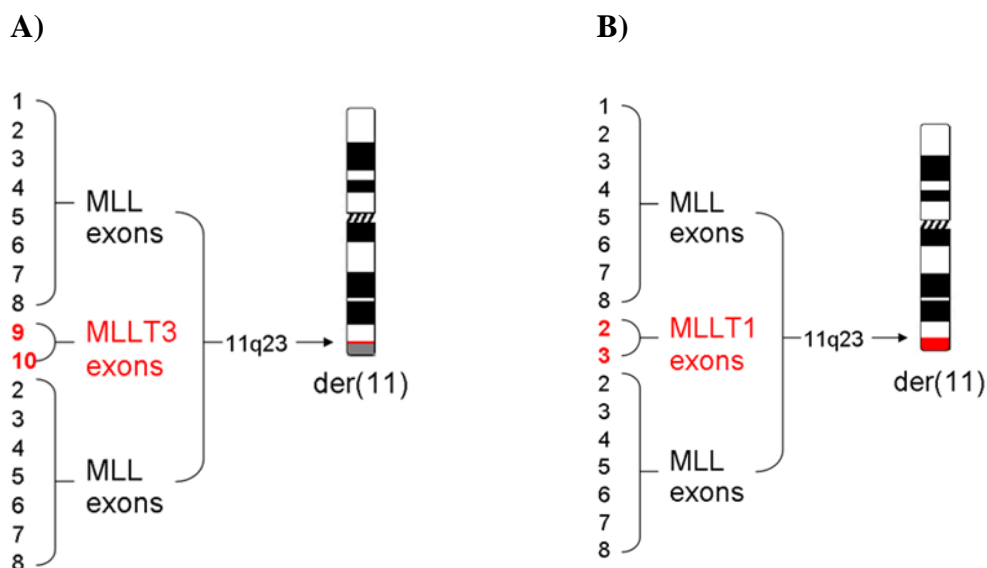
Pacient	Změna chromosomu 11	Duplikované <i>MLL</i> exony
1	trisomie 11	2 → 6
2	trisomie 11 v rámci KK	2 → 8
7	přestavba 11p v rámci KK	2 → 6
21	přestavba <i>MLL</i> genu - t(6;11)(q27;q23)	2 → 6
22	přestavba <i>MLL</i> genu - t(9;11)(p22;q23)	2 → 6
24	přestavba <i>MLL</i> genu - t(9;11)(p22;q23)	2 → 8
25	přestavba <i>MLL</i> genu - t(9;11)(p22;q23)	2 → 8
31	přestavba <i>MLL</i> genu - t(9;11)(p22;q23)	2 → 8
35	přestavba <i>MLL</i> genu - t(11;19)(q23;p13.3)	2 → 6
37	přestavba <i>MLL</i> genu - t(9;11)(p22;q23)	2 → 6
45	parciální trisomie 11q	2 → 6
54	balancovaná přestavba 11p i 11q	2 → 6

Vysvětlivky: KK, komplexní karyotyp.

**Tabulka 11. Přehled *MLL* PNTD u nemocných se změnou chromosomu 11.**

Pacient	Přestavba <i>MLL</i> genu	Duplikace <i>MLL</i> exonů	Partnerský gen (PG)	Exony PG přerušující <i>MLL</i> PTD
19	t(9;12;11)(p22; p13;q23)	2 → 8	MLLT3	9,10
20	t(9;11)(p22;q23)	1 → 10	MLLT3	6,7
23	t(11;19)(q23;p13.3)	2 → 8	MLLT1	2,3

**Obrázek 9. Struktura *MLL* PNTD (A, pacient č. 19; B, pacient č. 23).**



## Porovnání doby přežití nemocných s AML se změnou chromosomu 11

Na 5% hladině jsme prokázali statisticky významný rozdíl mezi dobou přežití nemocných se:

- 1) změnou 11p, přestavbou *MLL* genu a ostatními změnami 11q (viz **tabulka 12 a graf 3**).
- 2) duplikací *MLL* genu, amplifikací *MLL* genu a balancovanou přestavbou *MLL* genu (viz **tabulka 13 a graf 4**).

Na 0,1% hladině jsme prokázali statisticky významný rozdíl mezi dobou přežití nemocných s:

- 1) normálním karyotypem, přestavbou *MLL* genu a ostatními změnami chromosomu 11 (**tabulka 14, graf 5**).
- 2) normálním karyotypem, změnami chromosomu 11 včetně přestaveb *MLL* genu a komplexního karyotypu, jehož součástí byl/nebyl chromosom 11 (**tabulka 15, graf 6**).

Statisticky významný rozdíl se nepodařilo prokázat v době přežití nemocných se:

- 1) ziskem/ztrátou a balancovanou změnou chromosomu 11.
- 2) balancovanou přestavbou *MLL* genu a dalšími balancovanými přestavbami chromosomu 11.
- 3) balancovanou a nebalancovanou přestavbou genu *MLL*.
- 4) translokacemi t(9;11), t(11;19), ins(10;11) a ostatními přestavbami *MLL*.
- 5) normálním karyotypem a přestavbou genu *MLL*.
- 6) přestavbou genu *MLL* samostatnou či s jednou početní odchylkou a přestavbami *MLL* genu s dalšími strukturními nebo početními aberacemi.
- 7) přestavbami *MLL* a *MLL* PTD+, přestavbami *MLL* a *MLL* PTD- a *MLL* PNTD.
- 8) normálním karyotypem s *MLL* PTD+ a normálním karyotypem s *MLL* PTD-

**Tabulka 11. Přehled průměrné délky nemocných s jednotlivými nálezy zavzaté do statistické analýzy pro porovnání křivek přežití.**

Nález	n	žijící		průměr (dny)		medián (dny)	
		n	%	odhad	chyba	odhad	chyba
Normální karyotyp, MLL PTD-	57	24	42,1%	720,39	92,96	495,00	114,18
Normální karyotyp, MLL PTD+	21	10	47,6%	1072,80	174,84	1183,00	407,37
Přestavba MLL, MLL PTD+	7	3	42,9%	690,38	217,85	429,00	60,70
Přestavba MLL, MLL PTD-	12	5	41,7%	943,13	299,86	162,00	198,40
MLL PNTD	3	1	33,3%	793,67	466,19	369,00	229,44
Přestavba MLL + 1 početní odchylka	20	5	25,0%	446,74	117,15	202,00	187,48
Přestavba MLL + další přídatné změny	8	5	62,5%	1396,38	357,48	.	.
t(9;11)(p22;q23)	13	6	46,2%	955,85	249,82	371,00	.
t(11;19)(q23;p13)	5	1	20,0%	357,80	80,86	406,00	40,53
ins(10;11)(p12;q23)	3	1	33,3%	817,67	557,49	241,00	169,02
Ostatní translokace MLL	6	2	33,3%	354,42	159,16	154,00	144,03
Duplikace MLL	10	2	20,0%	353,40	170,76	89,00	94,08
Amplifikace MLL	6	0	0%	50,17	15,10	47,00	19,60
Přestavba MLL	28	10	35,7%	846,20	185,91	339,00	106,64
Nebalancovaná přestavba MLL	3	1	33,3%	403,67	235,37	241,00	191,88
Balancovaná přestavba MLL	25	9	36,0%	847,01	197,02	369,00	132,06
Balancovaná změna chromosomu 11 bez MLL	4	1	25,0%	238,00	109,50	129,00	136,67
Změny chromosomu 11 bez přídatných změn	34	12	35,3%	838,45	168,93	241,00	138,53
Komplexní karyotyp (s chromosomem 11)	19	1	5,3%	138,84	33,84	78,00	40,63
Komplexní karyotyp (bez chromosomu 11)	25	5	20,0%	293,14	93,82	114,00	36,44
Změny 11p	9	1	11,1%	120,55	35,59	78,00	35,78
Změny 11p+q	4	0	0%	121,25	97,63	6,00	31,00
Změny 11q bez účasti MLL	8	0	0%	130,87	51,30	89,00	39,60
Změny 11q s účastí MLL	35	10	28,6%	700,93	156,07	202,00	107,96
Duplikace/amplifikace chromosomu 11	16	3	18,8%	354,77	135,83	89,00	45,00
Delece chromosomu 11	5	0	0%	121,60	36,87	142,00	70,11
Balancovaná změna chromosomu 11	29	10	34,5%	791,65	181,57	369,00	137,09
Trisomie chromosomu 11	5	2	40,0%	650,40	310,26	193,00	164,32
Parciální trisomie chromosomu 11	6	1	16,7%	293,83	136,10	89,00	72,87
Amplifikace chromosomu 11	5	0	0%	94,60	40,36	65,00	12,05

**Tabulka 12a.** Porovnání přežití u nemocných se změnou 11p, přestavbou *MLL* genu a ostatními změnami 11q.

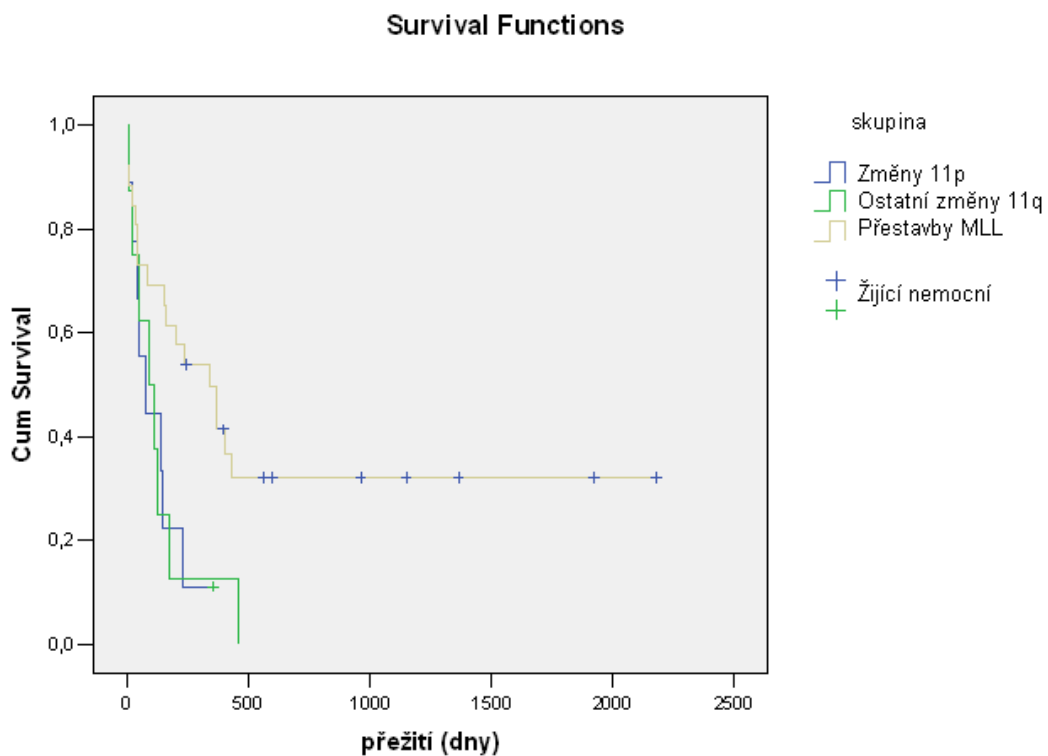
Nález	n	exit	žije	
			n	procento
Změny 11p	9	8	1	11,1%
Ostatní změny 11q	8	8	0	,0%
<i>MLL</i> přestavby	26	17	9	34,6%
Celkem	43	33	10	23,3%

**Tabulka 12b.** Průměrná doba a medián přežívání ve dnech.

	průměr		medián	
	odhad	chyba	odhad	chyba
Změny 11p	120,56	35,58	78,00	35,78
Ostatní změny 11q	130,87	51,30	89,00	39,60
<i>MLL</i> přestavby	823,70	190,82	339,00	102,44
Celkem	568,41	132,06	154,00	28,84

Mantel-Cox test (funkcí přežívání) = 7,574 **p = 0,023 (0,05)**

**Graf 3.** Funkce přežívání u nemocných se změnou 11p, přestavbou *MLL* genu a ostatními změnami 11q.





**Tabulka 13a.** Porovnání přežití u nemocných s duplikací *MLL* genu, amplifikací a balancovanou přestavbou.

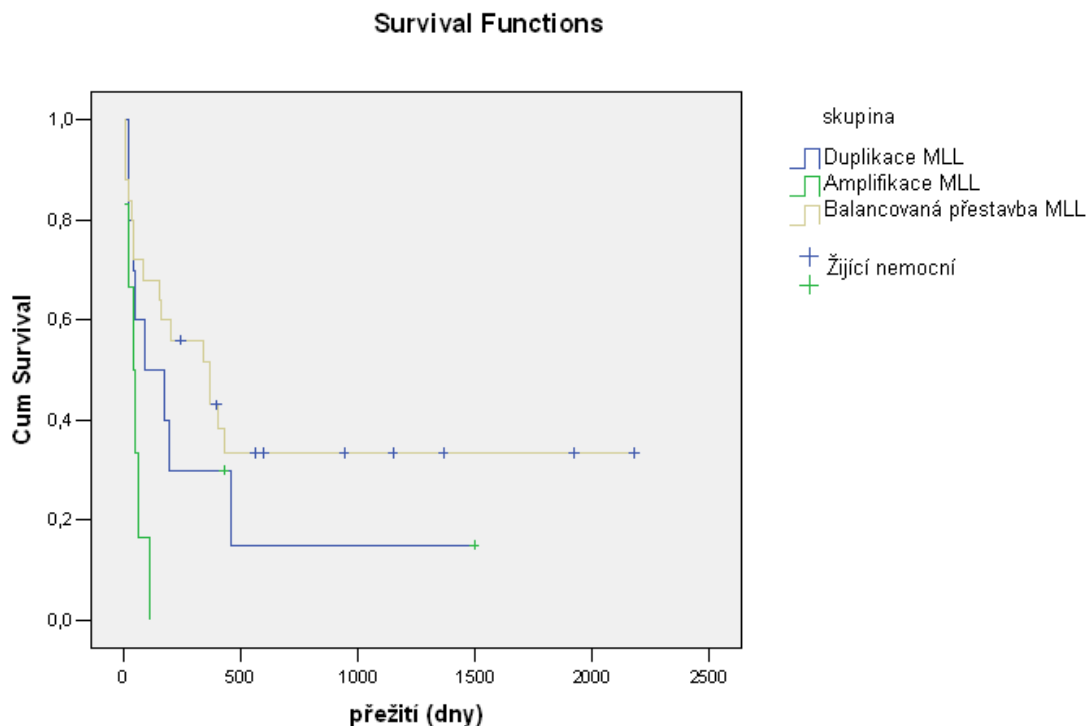
Nález	n	exit	žije	
			n	procento
Duplikace MLL	10	8	2	20,0%
Amplifikace MLL	6	6	0	,0%
Balancovaná přestavba MLL	25	16	9	36,0%
Celkem	41	30	11	26,8%

**Tabulka 13b.** Průměrná doba a medián přežívání ve dnech.

	průměr		medián	
	odhad	chyba	odhad	chyba
Duplikace MLL	353,40	170,76	89,00	94,08
Amplifikace MLL	50,17	15,10	47,00	19,60
Balancovaná přestavba MLL	847,01	197,02	369,00	132,06
Celkem	650,00	143,17	162,00	66,57

Mantel-Cox test (funkcí přežívání) = 8,675 **p = 0,013 (0,05)**

**Graf 4.** Funkce přežívání u nemocných s duplikací *MLL* genu, amplifikací a balancovanou přestavbou.



**Tabulka 14a.** Porovnání přežití u nemocných s normálním karyotypem, přestavbou *MLL* a ostatními změnami chromosomu 11.

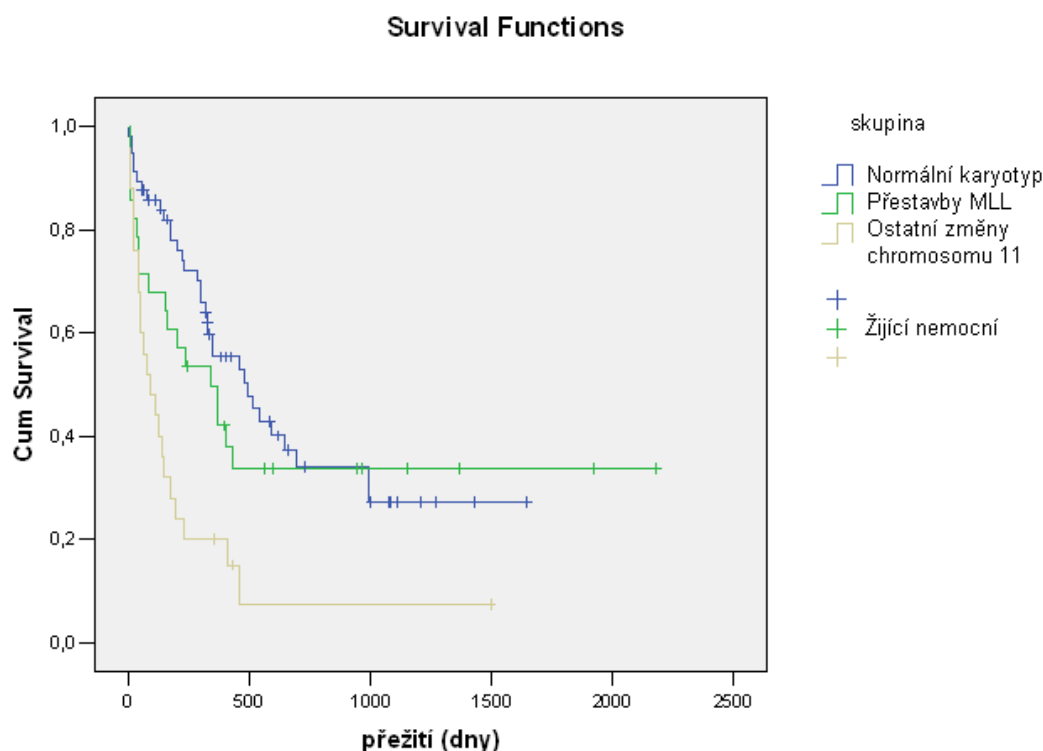
Nález	n	exit	žije	
			n	procento
Normální karyotyp	57	33	24	42,1%
Přestavby <i>MLL</i>	28	18	10	35,7%
Ostatní změny chromosomu 11	25	22	3	12,0%
celkem	110	73	37	33,6%

**Tabulka 14b.** Průměrná doba a medián přežívání ve dnech.

	průměr		medián	
	odhad	chyba	odhad	chyba
Normální karyotyp	720,39	92,96	495,00	114,18
Přestavby <i>MLL</i>	846,20	185,91	339,00	106,64
Ostatní změny chromosomu 11	233,11	86,07	89,00	37,47
celkem	727,07	90,72	329,00	60,62

Mantel-Cox test (funkcí přežívání) = 17,163 **p = 0,001 (0,001)**

**Graf 5.** Funkce přežívání u nemocných s normálním karyotypem, přestavbou *MLL* genu a ostatními změnami chromosomu 11.



**Tabulka 15a.** Porovnání přežití u nemocných s normálním karyotypem, změnami chromosomu 11 bez mnohočetných přídatných chromosomových změn a komplexním karyotypem (KK) s/bez účasti chromosomu 11.

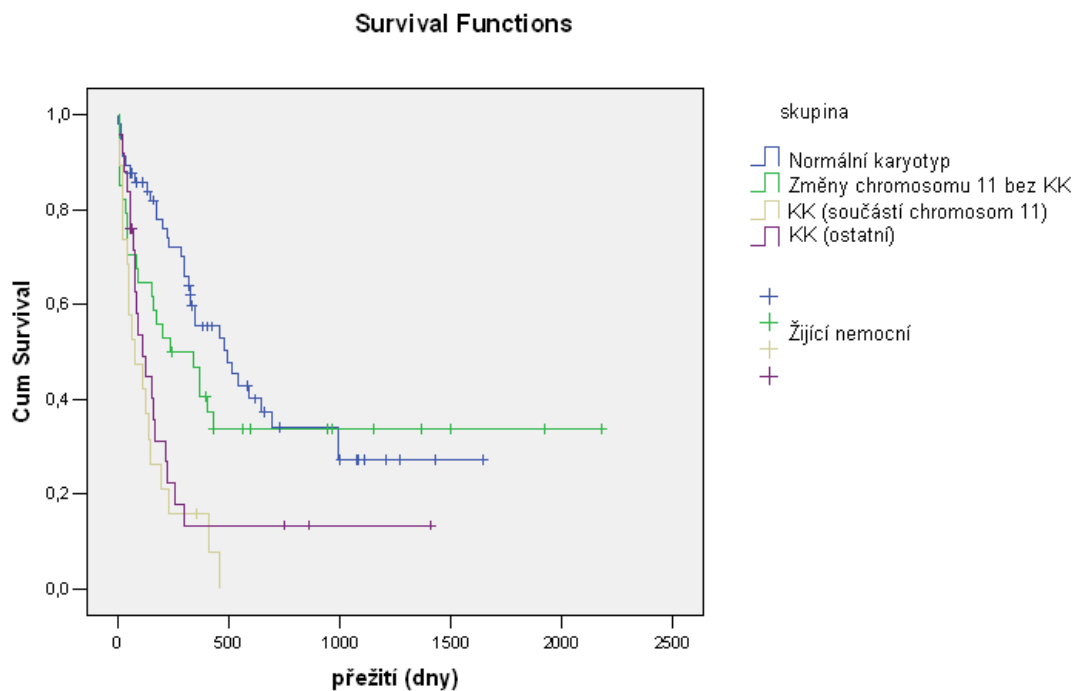
Nález	n	exit	žije	
			n	procento
Normální karyotyp	57	33	24	42,1%
Změny chromosomu 11	34	22	12	35,3%
KK (součástí chromosom 11)	19	18	1	5,3%
KK (ostatní)	25	20	5	20,0%
celkem	135	93	42	31,1%

**Tabulka 15b.** Průměrná doba a medián přežívání ve dnech.

	průměr		medián	
	odhad	chyba	odhad	chyba
Normální karyotyp	720,39	92,96	495,00	114,18
Změny chromosomu 11	838,45	168,93	241,00	138,53
KK (součástí chromosom 11)	138,84	33,84	78,00	40,63
KK (ostatní)	293,14	93,82	114,00	36,44
celkem	671,62	80,17	241,00	49,25

Mantel-Cox test (funkcí přežívání) = 25,509 **p = 0,001 (0,001)**

**Graf 6.** Funkce přežívání u nemocných s normálním karyotypem, změnami chromosomu 11 a KK, jehož součástí je/není chromosom 11.



**Tabulka 16. Porovnání klinických a cytogenetických dat u nemocných dle postižení ramene chromosomu.**

Postižené rameno	Rekurentní zlomy	Frekvence*	Ø věk	Poměr Ž/M	Poměr P/S	FAB typ (počet)	Mechanismus zlomu (počet)	Komplexní karyotyp	Dosažení 1. remise	alo-TKD	žije	Ø doba přežití (měsíce)
11p	11p15.4 ( <i>NUP98</i> ) 11p13 11p12	13/24 % (4x s 11q)	61	5/8	9/4	M2(4) M4(4) M0(2) M1(1) M6(1) jiné(1)	BP(6) delece(6) duplikace/ amplifikace(5)	13	3	0	2	4
11q ( <i>MLL</i> gen)	11q23.3 ( <i>MLL</i> )	28/52 % (1x s 11p)	46	15/13	20/8	M5(14) M1(7) M4(4) M2(2) jiné(1)	BP(25) NP(3)	3	15	12	10	15
11q (ostatní)	11q13.2	14/26 % (3x s 11p)	62	6/8	10/4	M2(4) M4(3) M0(2) M5(2) jiné(3)	BP(4) duplikace/ amplifikace(10) delece(3)	10	6	2	2 (jednou současně přestavba <i>MLL</i> )	4

**Vysvětlivky:** \* % z počtu nemocných s abnormalitou chromosomu 11; Ž, ženy; M, muži, P, primární; S, sekundární; BP, balancovaná přestavba; NP, nebalancovaná přestavba; alo-TKD, alogenní transplantace kostní dřeně.

**Tabulka 17. Porovnání klinických a cytogenetických dat u nemocných dle identifikovaného rekurentního zlomu na chromosomu 11.**

Oblast zlomu	Lokalizace (Mb)	Geny	Frekvence*	Ø věk	Poměr Ž/M	Poměr P/S	FAB typ (počet)	Mechanismus zlomu (počet)	Komplexní karyotyp	Dosažení 1. remise	alo-TKD	žije	Ø doba přežití (měsíce)
11p15.4	ch11:3.73-3.81	<i>NUP98</i>	3/5 %	58	1/2	3/0	M2(2) M4(1)	BP(2) duplikace(1)	3	2	0	0	8
11p13	ch11:30.98-31.06	<i>DCDC5, DCDC1</i>	4/7 %	64	1/3	4/0	M4(2) M0(1) M2(1)	BP(1) NP(2) delece (1)	4	1	0	0	15
11p12	ch11:36.75-37.49	žádné	2/4 %	71	1/1	2/0	M0(1) M1(1)	BP(1) delece(1)	2	0	0	0	2
11q13.2	ch11:68.31-68.52	<i>GAL, MTL5, lincRNA</i>	2/4 %	54	0/2	2/0	M2(1) M5(1)	BP(2)	1	2	1	1	22
11q23.3	ch11:118.30-118.39	<i>MLL</i>	28/52 %	46	15/13	20/8	M5(14) M1(7) M4(4) M2(2) jiné(1)	BP(25) NP(3)	3	15	12	10	15

**Vysvětlivky:** \* % z počtu nemocných s abnormalitou chromosomu 11; Ž, ženy; M, muži; P, primární; S, sekundární; BP, balancovaná přestavba; NP, nebalancovaná přestavba; alo-TKD, alogenní transplantace kostní dřeně.

## 5.2. Změny chromosomu 11 u dětí s AML

Změnu chromosomu 11 jsme prokázali u pěti (36 %) ze 14 dětí s nově diagnostikovanou AML (klinická data viz **tabulka 18**). U všech byla klasickou cytogenetickou analýzou prokázána reciproká přestavba oblasti 11q23.3. Metoda FISH potvrdila přestavbu genu *MLL* u všech nemocných. Klinická a cytogenetická data nemocných jsou zobrazeny v **tabulce 18**.

**Tabulka 18. Přehled klinických a cytogenetických dat u dětských pacientů s AML.**

Pacient	Pohl/věk	Datum dg.	AML	Karyotyp	Zlom	aloTKD	Přežití (dny)*
1	Ž/1	22.7.2009	M5	46,XX,t(11;19)(q23;p13.3)[18]	<i>MLL</i>	ANO	978 <sup>1</sup>
2	Ž/1	24.3.2011	M5	46,XX,t(3;9;11)(p21;p22;q23.3)[22]	<i>MLL</i>	NE	376 <sup>1</sup>
3	M/7	2.1.2012	M5	46,XY,t(9;11)(p22;q23)[12]	<i>MLL</i>	NE	98 <sup>1</sup>
4	M/1	6.2.2012	M5	46,XY,t(9;11)(p22;q23)[2]	<i>MLL</i>	NE	64 <sup>1</sup>
5	Ž/1	27.2.2012	M5	46,XX,t(9;11)(p22;q23)[22]	<i>MLL</i>	NE	43 <sup>1</sup>

Vysvětlivky: \*, k datu 10.4.2012; <sup>1</sup>, žijící.

## 5.3. Skriningové vyšetření u AML

Základem molekulárně cytogenetického skriningového vyšetření byla detekce přestaveb *MLL* genu, která byla provedena u všech 300 dospělých nemocných. Dále jsme se u 245 nemocných zaměřili na přítomnost delecí dlouhých ramen chromosomů 5 a 7 s využitím lokus specifických sond LSI 5q31/5p15.2 a LSI 7q31/CEP 7, a na detekci trisomie chromosomu 8 pomocí centromerické sondy CEP 8. K ní byla jako kontrolní obvykle použita centromerická sonda pro chromosom 9.

Změnu *MLL* genu jsme prokázali u 45 nemocných (15 %). Ve 25 případech se jednalo o balancovanou přestavbu, u tří nemocných o nebalancovanou, podrobnosti byly popsány v kapitole 5.1.2. Nadpočetné kopie celého *MLL* genu, tedy více než dva fúzní signály detekční sondy, jsme zjistili u 17 pacientů. Tři kopie *MLL* genu v rámci parciální nebo úplné trisomie 11 jsme prokázali u jedenácti nemocných, amplifikaci *MLL* genu (čtyři a více kopií) se nacházela u šesti pacientů, u všech současně s mnohočetnými změnami dalších chromosomů.

Deleci chromosomu 5 oblasti q31 jsme prokázali u 30 pacientů (12 %). Ve dvou případech se del(5)(q31) nepodařilo prokázat klasickou cytogenetickou analýzou, pouze metodou FISH.

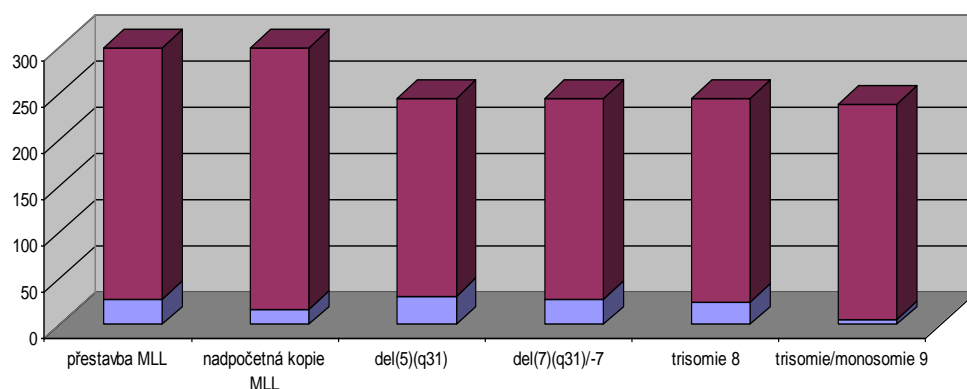
Deleci oblasti 7q31 nebo monosomii chromosomu 7 jsme detekovali u 28 pacientů (11 %). U čtyř nemocných byla změna chromosomu 7 odhalena jen metodou

FISH (dvakrát se jednalo o nález 0 mitos, jednou byla klasickou cytogenetickou analýzou prokázána pouze samostatná del(5)(q31) a jednou samostatná trisomie 8).

Trisomii chromosomu 8 jsme prokázali u 24 nemocných (10 %). Dvakrát byla trisomie 8 prokázána pouze metodou FISH, jednou se jednalo o nepřítomnost dělících se buněk (nález 0 mitos), u druhého byl nález z klasické cytogenetické analýzy normální.

U 238 nemocných byla jako kontrolní sonda pro detekci trisomie chromosomu 8 použita centromerická sonda pro chromosom 9. Početní odchylky chromosomu 9 jsme v rámci skrínungu prokázali u pěti nemocných (4 %). Ve čtyřech případech se jednalo o nadpočetnou kopii chromosomu 9 a jednou o monosomii 9.

**Graf 7. Výsledky FISH skrínungového vyšetření u dospělých nemocných s AML.**



**Vysvětlivky:** osa x (abnormalita), osa y (počet nemocných), modř patalogický nález.

## 6. DISKUZE

Změny chromosomu 11 byly popsány u řady hematologických onemocnění. Často se vyskytují například u akutní myeloidní leukémie. Pro naši studii jsme proto zvolili soubor nemocných právě s touto diagnózou. AML je velmi heterogenní onemocnění, a to z hlediska fenotypového i genetického. Průměrný věk nemocných s AML se pohybuje mezi 63 a 65 lety (Mayer a Starý, 2002). V našem souboru dospělých nemocných se často vyskytovali mladší pacienti, průměrný věk v době stanovení diagnózy byl 55 let. Důvodem tohoto rozporu je výběr nemocných do léčebného programu ÚHKT, do kterého bývají přijati především nemocní mladšího věku, u kterých je provedení transplantace kostní dřeně méně rizikové. Mezi časté AML podtypy dle FAB klasifikace patří M2, M4 a M1. Také v našem souboru se tyto FAB typy vyskytovaly nejčastěji: M2 u 28 %, M1 u 20 % a M4 u 19 % nemocných.

Při diagnostice onemocnění se v současné době klade zvláštní důraz na cytogenetický nálezn, protože mnoho chromosomových aberací je spojeno i s určitým prognostickým významem (Bloomfield a kol. 1998, Mrózek a kol. 2001). Uvádí se, že přes 50 % pacientů s AML má při diagnóze abnormální karyotyp (Mrózek a kol. 2001, Schoch a kol. 2003, Marcucci a kol. 2004). V našem souboru dospělých nemocných jsme na základě kombinace klasické a molekulárně - cytogenetické analýzy prokázali chromosomové změny u 51 % pacientů, normální karyotyp u 36 % a ve 13 % případů nebyly nalezeny žádné dělicí se buňky nebo bylo přítomno méně než 10 normálních mitos. Ve shodě s literaturou jsme jako nejčastější strukturní aberace detekovali translokaci 11q23.3, del(7)(q?), t(8;21)(q22;q22), inv(16)(p13q22)/t(16;16)(p13;q22), del(5)(q?) a t(3;3)(q21;q26)/ins(3;3)(q26;q21q26). Početní odchylky nejvíce postihovaly chromosomy 7, 8, 13 a 21. Komplexní přestavby karyotypu jsou detekovány u 10 až 15 % nemocných s AML (Mrózek a kol. 2001, Babická a kol. 2007). V naší studii jsme nálezn prokázali u 17 % nemocných. Dle Babické a kol. (2007) vstupují nejčastěji do komplexních přestaveb karyotypu chromosomy 5, 7 a 11. Podobnou asociaci prokázali Limberg a kol. (2002) a můžeme ji potvrdit i v našem souboru.

Oproti dospělým nemocným s AML je u dětských pacientů v literatuře udáván patologický karyotyp až v 80 % případů (Mrózek a kol. 2004, Manola 2009). Také v našem souboru nemocných dětí jsme získané chromosomové aberace detekovali u 86 %, nejčastěji se jednalo o přestavbu genu *MLL* (n=5).



Prokázali jsme, že změny chromosomu 11 patří mezi časté cytogenetické nálezy u dospělých nemocných s nově diagnostikovanou AML s frekvencí výskytu 18 %. Aberace postihovaly častěji dlouhé rameno chromosomu než krátké. Nestabilitu chromosomu 11 u AML jsme potvrdili nálezem dvou a více zlomů přítomných na stejném chromosomu 11 u jedenácti nemocných. Ve dvou případech byly postiženy oba homologní chromosomy 11. Naopak u pěti nemocných byla prokázána trisomie chromosomu 11, tedy žádné zlomové místo. Pomocí kombinace klasické cytogenetické analýzy, molekulárně – cytogenetické analýzy a SNP array jsme na derivovaných chromosomech 11 odhalili více než 35 různých zlomů. K zlomům došlo jak na základě balancovaných, tak i nebalancovaných změn.

Alteraci krátkého ramene chromosomu 11 jsme prokázali u 24 % nemocných se změnou chromosomu 11. Z klinického hlediska tvořili nemocní poměrně homogenní skupinu starších pacientů s průměrným věkem při diagnóze nad 60 let. AML FAB subtyp odpovídal převážně typu M2 a M4, oba patří mezi obecně nejčastější FAB subtypy u AML. Sekundární forma onemocnění, která byla diagnostikována u 31 % nemocných s abnormalitou 11p, byla jen o málo vyšší než incidence v celkovém souboru (24 %). Pro nemocné se změnou 11p byla charakteristická velmi krátká doba přežití, v průměru čtyři měsíce. Většině nemocných se nepodařilo dosáhnout ani první kompletní remise. Pokud k tomu došlo, následoval brzy relaps onemocnění. Velmi nepříznivá prognóza mohla být ovlivněna i dalšími chromosomovými změnami a jejich formou. Z cytogenetické hlediska byl typickým nálezem nemocných komplexní karyotyp a nebalancovaný charakter změn 11p, a to zejména vlivem delece.

Na krátkém rameni chromosomu 11 jsme neprokázali žádnou společně deletovanou oblast, která by chyběla u všech nemocných, přesto byly některé postiženy častěji: 11pter-11p15.5 (n=4; ch11:0-3.52 Mb), 11p14.1-11p13 (n=4; ch11:28.00-31.00 Mb) a 11p13 (n=4; ch11:31.00-31.50 Mb). V telomerické a subtelomerické oblasti 11p je lokalizována řada známých a předpokládaných tumor supresorových genů jako je například *MIR210* (mikroRNA inhibující přežití a proliferaci nádorových buněk), *MUC6*, *MUC2*, *MUC5B* (muciny uplatňující se při proliferaci a vzniku metastáz) a *CDKN1C* (inhibitor cyclin dependentní kinázy, p57). V oblasti se vyskytuje i řada genů, jejichž proteiny se uplatňují v transdukci signálu (*HRAS*, *CD151*) nebo jsou součástí ribozomu (*RPLP2*). Důležitou úlohu ztráty ribozomového proteinu jako kritického bodu při vzniku tzv. 5q- syndromu (myelodysplastický syndrom s izolovanou del(5)(q) a s charakteristickými klinickými projevy) popsali Boulwood a

kol. (2010) a Jadersten a kol. (2010). Nejen delece ale i ztráty heterozygoty oblasti 11p15 jsou popisovány u mnoha různých nádorů. Geny lokalizované v této oblasti jsou proto často cílem studií pro vývin protinádorové léčby (Gupta a kol. 2008, Jordheim a kol. 2011).

Naopak v deletované oblasti 11p14.1-p13 a 11p13 se vyskytuje jen několik málo genů například *MPPED2* (inhibitor proliferace), *DCDC5*, *DCDC1* (úloha při polymerizaci mikrotubulinu), *DNAJC24* (stimulátor ATPáz) nebo *IMMPL* (mitochondriální peptidáza). U žádného z těchto genů zatím nebyla prokázána asociace se vznikem malignity.

Bez ohledu na mechanismus vzniku zlomového místa jsme pomocí FISH mapování na 11p identifikovali 18 různých zlomových míst. Rekurentní zlom byl prokázán v oblasti 11p15.4 v genu *NUP98*. Další potenciálně nenáhodné zlomy jsme specifikovali do oblastí: 11p13 a 11p12.

Přestavbu genu *NUP98* (11p15.4) jsme prokázali u tří nemocných. U všech byly součástí komplexních změn karyotypu. Ve dvou případech se jednalo o variantní komplexní translokace  $t(5;11;20)(q35;p15;p?)$  a  $t(4;5;11)(q11;q35;p15)$ . Translokace  $t(5;11)(q35;p15)$  byla jako rekurentní chromosomová abnormalita poprvé popsána u dětí s de novo AML se zdánlivě normálním karyotypem nebo delecí  $del(5q)$  jako samostatnou aberací (Jaju a kol. 2001). Později ji další autoři prokázali i u dospělých nemocných s AML (Casas a kol. 2003). Jako partnerský gen na chromosomu 5 byl identifikován gen *NSD1* (5q35). Také v obou našich případech jsme prokázali fúzi obou genů. Předpokládá se, že výsledný chimérický protein je tvořen interakční doménou jaderného receptoru NSD1 a RNA vazebnými doménami NUP98. Protože se oba geny nachází v blízkosti telomer, je translokace klasickou cytogenetickou analýzou nedetekovatelná, a to i v rámci komplexního karyotypu - jak dokládáme. Často ji nelze prokázat ani metodami mFISH nebo mBAND. Jistotu detekce poskytuje pouze metoda FISH. Kryptickou komplexní translokaci  $t(3;5;11)(p25;q35;p15)$ , původně definovanou jako jednoduchá reciproká translokace  $t(3;5)$ , odhalili precizním mapováním zlomových míst i Ishikawa a kol. (2007). Další komplexní translokaci  $t(10;20;11)(q24;q11;p15)$  popsal Panagopoulos a kol. (2002). Jako fúzní partner genu *NUP98* byl identifikován gen *TOP1* (20q11). Protože u nemocného č. 10 byl chromosom 20 též postižen, otestovali jsme alteraci tohoto genu metodou FISH s BAC sondou. Přestavba genu *TOP1* ale nebyla potvrzena. U třetí nemocné byla přestavba genu *NUP98* nebalancovaná. Vzhledem k vzácnému výskytu je stanovení prognózy

*NUP98* přestaveb velmi obtížné. Recentní práce zatím stále více poukazují na spojitost přestaveb *NUP98* s nepříznivou prognózou pro nemocné, krátkou dobou přežití a špatnou odpovědí na léčbu, jak u dospělých tak i dětských pacientů (Hollink a kol. 2011, Lundin a kol. 2011). Hollink a kol. (2011) ve své studii zabývající se charakteristikou *NUP98-NSD1* fúzního genu prokázal, že nemocní tvoří homogenní skupinu mladších pacientů specifickou nepříznivým klinickým průběhem. Doporučil proto detekci této abnormality v rámci rutinního skríníngu. U našich dvou nemocných byla průměrná doba přežití vyšší než u ostatních nemocných s abnormalitou 11p. U nemocného č. 10 byl současně postižen i druhý homologní chromosom 11 a u nemocného č. 54 se na stejném chromosomu 11 nalézal další zlom. Je tak otázkou nakolik byl stav nemocných ovlivněn také přítomností dalších zlomů.

V oblasti 11p13 jsme identifikovali tři překrývající se místa, do nichž byl specifikován zlom: ch11:30.98-31.06 Mb, ch11:29.31-31.06 Mb a ch11:30.98-31.80 Mb. První region zahrnuje pouze geny *DCDC5* a *DCDC1*. Ve druhém a třetím regionu se sice nachází i několik dalších genů, ale součástí oblasti jsou opět i geny *DCDC5* a *DCDC1*. Oba geny mají významnou roli při polymerizaci mikrotubulů, která je nezbytná pro dělení buňky a cytoplasmatický transport. Geny jsme proto vyhodnotili jako důležité kandidáty.

V potencionálně nenáhodném zlomu v chromosomovém pruhu 11p12 (ch11:36.75-37.49 Mb) nebyl zatím prokázán ani není předpokládán žádný protein nebo RNA kódující gen. Role tohoto zlomového místa tak zůstává velmi diskutabilní. Může se jednat o repetitivní sekvence, u kterých dochází obecně často k skluzu polymerázy avšak bez poškození konkrétního genu anebo sekvence regulující transkripci genů lokalizovaných mimo region.

Další překrývající se místa na 11p, do nichž byl specifikován zlom, jsme identifikovali také v regionech: 11p15.5 (ch11:0-3.52 Mb), 11p15.4-p15.1 (ch11:3.87-27.92 Mb) a 11p12 (42.06-43.29 Mb). Z důvodu nedostatku dělících se buněk kostní dřeně však tyto oblasti nebyly zcela specifikovány a zůstaly příliš velké na to, abychom je mohli s určitostí označit za rekurentní. Vzhledem k malému překryvu místa, do něhož byly zlomy specifikovány v oblasti 11p12, předpokládáme i v tomto případě spíše dva různé zlomy.

V jednom případě jsme prokázali zlom v genu *LRRC4* (11p12). Protože v literatuře dosud nebyl tento gen zmíněn v souvislosti s hematologickou malignitou,

předpokládáme, že se jedná o náhodný zlom bez významné role v leukemogenezi. Hypotézu je ale nezbytné ověřit na větším souboru nemocných.

Změnu dlouhého ramene chromosomu 11 jsme prokázali u 40 nemocných. Literatura doporučuje odlišovat přestavby *MLL* genu jako samostatný specifický soubor od ostatních změn 11q (Döhner a kol. 2010, Marchesi a kol. 2011). Proto jsme i v naší studii abnormality oddělili a hodnotili zvlášť.

Alteraci 11q bez účasti genu *MLL* jsme podobně jako abnormality 11p identifikovali u 26 % nemocných. I tito nemocní tvořili z klinického hlediska poměrně homogenní skupinu, a to starších pacientů s průměrným věkem při diagnóze nad 60 let. AML FAB subtyp opět odpovídal převážně typu M2, tedy obecně nejčastějšímu FAB subtypu u AML. Sekundární forma onemocnění byla diagnostikována u 29 % nemocných s abnormalitou 11q nezahrnující přestavbu *MLL* genu. Přestože se u šesti nemocných podařilo dosáhnout první kompletní remise, doba přežití nemocných se změnou 11q byla velmi krátká, stejně jako u 11p změn činila v průměru čtyři měsíce. Také v případě 11q alterací se na nepříznivé prognóze podílely i další chromosomové změny a nebalancovaná forma postižení 11q. U 71 % nemocných byl nález součástí komplexního karyotypu. Jednoznačně převažující nebalancovanou formou alterací 11q byly amplifikace a duplikace.

Při amplifikaci dochází k vzniku mnohonásobných kopií genu a následné nadprodukci onkoproteinu. Předpokládá se, že amplifikace onkogenů mají důležitou roli v nádorové progresi a bývají typickým znakem metastazujících buněk (Hesketh 1997). U hematologických malignit se dlouho jevily jako vzácný jev. Tanaka a kol. (1993) detekovali genové amplifikace jen u přibližně 1 % případů AML. Pozdější i naše studie však poukazují na vyšší procento nálezů této aberace při využití metod molekulární cytogenetiky (Michaux a kol. 2000, Papenhausen a kol. 2005, Sarova a kol. 2010).

Pouze u jednoho nemocného postihovala amplifikace oblast krátkých ramen a nikoliv současně i dlouhých. Společnou oblastí duplikace byla 11q23.3→11q24 (n=10; ch11:118.35-125.00 Mb), začínající od 3' konce genu *MLL*. Společnou oblastí amplifikace na 11q (více než tři kopie) byl u všech nemocných 5' konec *MLL* genu. Dále byl často amplifikován úsek 11q23.3→11q25. Užitím aCGH, Rucker a kol. (2006) identifikovali tři společně amplifikované regiony na 11q: 11q12-q14, 11q23.3 a 11q23.3-q24.1. Zatkova a kol. (2009) detekovali devět rekurentních amplifikovaných oblastí, tři z nich byly zmnoženy u všech nemocných: 11q23.3, 11q24.2-q24.3 a

11q24.3-q25. Lze tedy shrnout, že součástí ampliconu je skoro vždy gen *MLL* nebo jeho části a distálně orientované oblasti.

V často zmnožené oblasti 11q23.3→11q25 je lokalizována řada důležitých genů. Kromě proto-onkogenu *MLL* se zde nachází i další geny uplatňující se při transdukci signálu *NFRKB*, *ARHGEF12* nebo *SPA17*. V patogenezi AML byl již gen *ARHGEF12* popsán při fúzi s *MLL* genem vlivem intersticiální delecce 11q23 (Kourlas a kol. 2000). Specifickou funkci s možnou úlohou při leukemogenezi mají také geny *DDX6* (RNA helikáza), *H2AFX* (histon), *ETS1* (inhibitor apoptózy), *UBE4A* (ubiquitinylace) nebo *miR-100*. Gen *miR-100* kóduje mikroRNA (miRNA). Ta je definována jako malá nekódující RNA o velikosti přibližně 22 nukleotidů. miRNA hrají velmi důležitou roli při diferenciaci buněk a při iniciaci a progresi nádoru. Wooi Loon Ng a kol. (2010) sledoval inhibiční účinek zvýšené exprese miR-100 na expresi tumor supresorového genu *ATM*, lokalizovaného také na chromosomu 11 (11q22). Serin-treoninová kináza *ATM* je nezbytná při procesech homologní i nehomologní rekombinace.

Účast amplifikace *MLL* genu u AML potvrdilo i mnoho dalších studií (Poppe a kol. 2004, Rucker a kol. 2006, Zatkova a kol. 2009). U nemocných s amplifikací nebo nadpočetnou kopií *MLL* genu popisují Schnittger a kol. (2000) a Arnaud a kol. (2005) dominanci FAB subtypu M2. Také v našem souboru jsme zaznamenali duplikaci/amplifikaci *MLL* genu nejčastěji u tohoto subtypu. Amplifikace genu je u myeloidních onemocnění často asociována se sekundárním typem onemocnění, s komplexními změnami karyotypu, zahrnujícími obvykle del(5q) a agresivním typem onemocnění s velmi špatnou odezvou na léčbu a krátkou dobou přežití. (Andersen a kol. 2001, Březinová a kol. 2002, Papenhuesen a kol. 2005, Herry a kol. 2006). Také v našem souboru jsme u všech šesti pacientů s více než třemi kopiemi genu současně prokázali rozsáhlé změny karyotypu, pouze u tří nebyla přítomna delecce del(5q). Velmi špatný klinický průběh nemocných s amplifikací *MLL* genu oproti jeho duplikacím a balancovaným změnám jsme prokázali i v našem souboru. Rucker a kol. (2012) uvádí, že amplifikace oblastí chromosomu 11 je také často specificky provázena molekulárními mutacemi genu *TP53*. Mutace tohoto tumor supresorového genu patří mezi obecně známé nepříznivé faktory a může tak umocňovat i velmi špatný klinický průběh u nemocných s amplifikací chromosomu 11.

Aventín a kol. (2003) popsal dva případy parciální trisomie chromosomu 11 s nadpočetnou kopií *MLL* genu, která byla zároveň detekována spolu s jeho interní duplikací. Podobně Pajuelo-Gámez a kol. (2007) pozoroval případy komplexních změn

karyotypu s mnohonásobnou amplifikací *MLL* genu dle FISH, u nichž byla pomocí RT-PCR zjištěna současně parciální tandemová duplikace *MLL*. V našem souboru jsme *MLL* PTD detekovali spolu s parciální trisomií chromosomu 11 pouze u jednoho nemocného (nemocný č. 45). Různorodost formy duplikací/amplifikací chromosomu 11 jsme také publikovali (Sarova a kol. 2010).

Bez ohledu na mechanismus vzniku zlomového místa jsme pomocí FISH mapování na 11q identifikovali 21 různých zlomových míst. Potencionálně nenáhodný zlom jsme specifikovali do oblasti 11q13.2.

V místě zlomu 11q13.2 se nachází dva kandidátní geny: *GAL* a *MTL5*. Galanin je neuropetid, který se uplatňuje při transferu molekul mezi centrálním a periferním nervovým systémem. Jeho deregulace byla již popsána u některých solidních nádorů (Rauch and Kofler 2010). Gen *MTL5* se uplatňuje při spermatogenezi, ale také při buněčném růstu a diferenciaci. U obou nemocných s alterací 11q13.2 byl současně přítomen i další zlom na chromosomu 11 v oblasti 11p15.4 (v genu *NUP98*) a v oblasti 11q23.3 (v genu *MLL*). Stanovení prognostického významu je tedy pro tento zlom nejasné.

Překrývající se oblasti, do nichž byl zlom specifikován, jsme identifikovali také v regionech: 11q12 (nemapováno), 11q14.2-q21 (79.11-104.45 Mb) a 11q24 (nemapováno). I v těchto případech se však z důvodu nedostatku dělících se buněk kostní dřeně nepodařilo zlomová místa zcela specifikovat a zůstala tak příliš velká na to, abychom je mohli s určitostí označit za rekurentní.

Ve dvou případech pokrývalo místo zlomu pouze jeden protein-kódující gen: *ODZ4* (11q14.1) a *MAML2* (11q21). Alterace *ODZ4* genu byla prokázána pouze jednou a také v literatuře dosud nebyla popsána v souvislosti s hematologickou malignitou. Předpokládáme proto, že se jedná o náhodný zlom. Dvě překrývající se místa, do níž byl specifikován zlom, byla pozorována v oblasti: 11q21: ch11:95.85-96.07 Mb zahrnující pouze gen *MAML2* a ch11:95.85-104.45 Mb pokrývající kromě *MAML2* genu přibližně 30 dalších genů. Jako fúzní partner genu *MLL* byl *MAML2* již popsán u nemocných s AML a MDS (Nemoto a kol. 2007). Protein genu slouží jako transkripční ko-aktivátor pro NOTCH receptory, čímž se podílí na transdukci signálu. Vzhledem k příliš velké oblasti, do níž bylo specifikováno druhé zlomové místo, je i v tomto případě vyhodnocení alterace genu *MAML2* jako rekurentní v našem souboru nemožné. Lze jej tak považovat jen na základě publikovaných dat.

Mnoho míst, do nichž byl specifikován zlom na 11p i 11q, nepokrývaly pouze protein kódující geny, ale často také některé mikroRNA (miRNA) nebo dlouhé nekódující RNA (lncRNA). Regulační role miRNA především jako supresorů genové exprese byla již prokázána a je předpokládána u více než 60 % protein kódujících genů. Oproti tomu lncRNA zatím nejsou tak dobře prostudovány (Nikitina a kol. 2012).

Podobně jako uvádí literatura (Braekeleer a kol. 2005, Meyer a kol. 2009), byl i v našem souboru nemocných identifikován gen *MLL* (11q23.3) jako nejčastější zlomové místo na chromosomu 11 vůbec, a to u poloviny ze všech nemocných se změnou chromosomu 11. Aberace *MLL* genu jsou popisovány u 5 až 10 % pacientů s de novo AML a 25 % pacientů se sekundárním typem onemocnění (Rowley a kol. 1999). V našem souboru jsme přestavbu *MLL* genu detekovali pouze u 11 % nemocných se sekundární formou AML. Průměrný věk pacientů v době stanovení diagnózy byl 46 let, což je přibližně o 15 let méně než u nemocných s ostatními změnami chromosomu 11. Také Schoch a kol. (2003) ve své studii zahrnující 54 nemocných s přestavbou *MLL* genu uvádí značně vyšší incidenci u pacientů mladších 60 let. Většina publikovaných případů AML s přestavbou *MLL* genu odpovídala dle FAB kritéria AML M4 nebo AML M5a (Ayton a Cleary 2001, Schoch a kol. 2003). Poirel a kol. (1996) udává spojitost *MLL* přestaveb i se subtypem M1. V našem souboru byly nemocní nejčastěji diagnostikováni jako AML M5a, M1 a M4.

Většina translokací *MLL* genu je balancovaná a dává vznik dvěma leukemogenním chimérickým genům. Při pokusech na myších modelech byl prokázán jako kritický fúzní gen tvořený 5'koncem *MLL* genu a 3'koncem partnerského genu. Obvykle bývá lokalizován na derivovaném chromosomu 11 (Ayton a Cleary 2001, Daser a Rabbitts 2004). Vzhledem k tomu, že se přestavby *MLL* genu vyskytují u hematologických malignit myeloidní i lymfatické řady buněk, předpokládá se, že se partnerské fúzní geny uplatňují v určení fenotypu leukémie (Collins a Rabbitts 2002).

V našem souboru jsme se nejčastěji setkali s translokacemi t(9;11)(p22;q23) a t(11;19)(p13;q23). Reciprokou translokaci t(9;11)(p22;q23) jsme prokázali u 11 nemocných. Jedná se o nejčastěji popisovanou translokaci *MLL* genu u AML, při které dochází k fúzi 5'konce *MLL* genu s 3'koncem genu *MLLT3* (*AF9*) (Schoch a kol. 2003, Braekeleer a kol. 2005). Uvádí se, že v 70 % případů je přestavba nalézána jako samostatná aberace, u 20 % případů se vyskytuje spolu s trisomií chromosomu 8 (Mrózek a kol. 1997). Tuto spojitost jsme potvrdili u tří nemocných.

Schoch a kol. (2003) detekovali přídatné chromosomové aberace u 41 % nemocných s přestavbou *MLL* genu. Prokázali také, že tyto přídatné změny nemají vliv na prognózu, která je vždy špatná. Meyer a kol. (2009) ve své studii rozděluje mnohočetné přestavby zahrnující translokaci *MLL* genu do dvou skupin. První zahrnuje inverze a inserce nutné k vzniku funkčního chimérického proteinu při neshodném směru transkripce fúzních genů vzhledem k jejich orientaci na chromosomu, druhou tvoří komplexní translokace.

Příkladem fúze transkripčně opačně orientovaných genů je translokace t(10;11)(p12;q23), vedoucí k *MLL-MLLT10 (AF10)* fúznímu genu. Zatímco gen *MLL* je transkripčně aktivní ve směru od centromery k telomeře, partnerský gen *MLLT10* je přepisován ve směru opačném. Jednoduchá fúze by tedy vedla na chromosomu 11 k vzniku fúzního genu složeného z 5'částí obou genů. Vznik funkčního chimérického transkriptu proto vyžaduje nejméně tři chromosomové zlomy. Fúze obou genů jsou tedy často doprovázeny dalšími aberacemi (Limbergen a kol. 2002, Matsuda a kol. 2006). Celkem bylo popsáno 6 různých mechanismů vedoucích k *MLL-MLLT10* fúznímu transkriptu. Translokaci může předcházet paracentrická inverze části 11q, obvykle 11q13/21-23, nebo naopak (mikro)inverze části *MLLT10* genu, přesunutá na derivovaný chromosom 11. Pozorovány byly také inserce asi megabázového regionu zahrnujícího 5'konec *MLL* genu do krátkých ramen chromosomu 10, případně 10p do 11q anebo kryptické přestavby v *MLL* genu (Klaus a kol. 2003). Inzerce 5'konce *MLL* genu do 10p12 jsme prokázali i v našem souboru nemocných, a to u pacienta č. 26. Inzerce nebyla detekovatelná metodou mFISH. Kryptické inserce 5'konce *MLL* genu byly popsány i do dalších chromosomů například do 6q, 9p a dalších (Dyson a kol. 2003, Douet-Guilbert kol. 2005). Dalším mechanismem je inserce amplifikovaného 5'konce *MLL* genu bez jakéhokoliv přeskupení či ztráty obou kopií *MLL* genu na obou homologních chromosomech 11 (Jarošová a kol. 2005). Tento způsob předpokládáme i u naší pacientky č.18 s přítomností dvou patologických klonů s amplifikovaným 5'koncem *MLL* genu inzertovaným do oblasti 10p12 a dvěmi normálními kopiemi *MLL* genu. Podobné přestavby s opačně orientovanými geny byly pozorovány i u solidních nádorů nebo i dalších typů leukémií jako je například chronická myeloidní leukémie a fúze genů *ETV6* (12p13) a *ABL1* (9q34) (Klaus a kol. 2003).

Druhá skupina komplexních přestaveb zahrnující *MLL* gen je tvořena reciprokými translokacemi mezi třemi chromosomy, při nichž dochází k fúzi 5'konce *MLL* genu s jedním z mnoha frekventovaných partnerských genů a fúzi 3'konce genu s novým



genem nebo je 3' konec *MLL* genu vložen do chromosomové oblasti nekódující žádný gen. Dle databáze Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Hematology do komplexních translokací ponejvíce vstupuje kromě chromosomu 11 také chromosom 9 (<http://atlasgeneticsoncology.org> k datu 12.3.2012). Třetí chromosom bývá variabilní. V našem souboru jsme komplexní přestavbu zahrnující tři chromosomy identifikovali u dvou nemocných č. 17 a 19. Jednalo se o translokace  $t(7;11;10)(q21;q23;p12)$  a  $t(9;12;11)(p22;p13;q23)$ , tedy variantní formy frekventovaných translokací  $t(10;11)(p12;q23.3)$  a  $t(9;11)(p22;q23.3)$ , k nimž přibyly partnerské chromosomy 7 a 12. Chromosomový pruh 7q22 patří mezi často deletované regiony na chromosomu 7 u hematologických malignit, předpokládá se, že je zde lokalizována řada nádorových supresorových genů, jejichž inaktivace má význam v patogenezi myeloidních onemocnění (Curtiss a kol. 2005, Březinová a kol. 2007). Na chromosomu 12 jsme v oblasti 12p13 prokázali zlom v genu *ETV6*. Gen *ETV6* je důležitým transkripčním regulátorem s významnou rolí v hematopoese. Podobně jako gen *MLL* má i on mnoho partnerských genů. Jeho mutace se vyskytují nejen u leukémií a myelodysplastických onemocnění, ale i u sarkomů (Viera a kol. 2005). Variantní formy častých jednoduchých reciprokových translokací byly popsány i v mnoha dalších studiích (Vieira a kol. 2006, De Braekeleer a kol. 2010).

Ve sledovaném souboru nemocných s alterací *MLL* genu jsme také identifikovali novou dosud nepublikovanou translokaci  $t(6;11)(p21.3;q23)$ . Na chromosomu 6 byly popsány čtyři partnerské geny, a to vždy na jeho dlouhém rameni. V našem případě jsme konkrétní partnerský gen neodhalili, jen jeho lokalizaci specifikovali do oblasti 6p21.3, centromericky k regionu hybridizujícímu k BAC sondě RP11-174A4. Zajímavostí je, že translokace se vyskytovala v rámci tetraploidního karyotypu. Hyperploidie a tetraploidie patří mezi vzácné chromosomové změny u AML a MDS (Iyer a kol. 2004). Nacházeny bývají u starších mužů s de novo typem onemocnění. Charakterizovány jsou krátkou dobou přežití a častým nedosažením remise, čímž se řadí do skupiny prognosticky velmi nepříznivých cytogenetických abnormalit (Iyer a kol. 2004). V našem případě se jednalo o ženu středního věku s doposud dobrým klinickým průběhem (přežití k 10.4.2012 činilo 246 dní).

Z počátku byly přestavby genu *MLL* řazeny do středně příznivé prognostické skupiny (Grimwade a kol. 1998). Mnoho pozdějších studií ale poukázali na spojitost s prognózou nepříznivou. Výjimku tvoří pouze translokace  $t(9;11)(p22;q23)$ , u které byl prokázán o něco lepší klinický průběh onemocnění než u ostatních translokací

(Grimwade a kol. 2010, Marchesi a kol. 2010). V našem souboru nemocných činila průměrná doba přežití 15 měsíců. Neprokázali jsme statisticky významný rozdíl mezi přežitím nemocných s různými *MLL* translokacemi. To může být zapříčiněno tím, že studie, které rozdíl zaznamenaly, byly založeny na větších souborech nemocných. Odlišné přežití jsme nepozorovali ani při porovnání skupiny nemocných s normálním karyotypem a nemocných s přestavbou *MLL* genu, což lze vysvětlit častou indikací pacientů s přestavbou *MLL* genu k provedení transplantace kostní dřeně. Ta byla v našem souboru provedena skoro u poloviny nemocných s přestavbou genu *MLL*. Také ve skupině nemocných s normálním karyotypem je možná přítomnost některé nepříznivé molekulární mutace, která je cytogeneticky nedetekovatelná, ale může zhoršit prognózu těchto nemocných. Statisticky významný rozdíl se nám nepodařilo prokázat ani při porovnání balancované a nebalancované přestavby *MLL* genu nebo přestavbou *MLL* genu jako samostatné abnormality či s jednou početní odchylkou v porovnání s případy s mnohočetnými přídatnými chromosomovými změnami. Tento výsledek je v souladu s literaturou, která uvádí, že přídatné chromosomové aberace neovlivňují prognostický význam *MLL* přestaveb (Marchesi a kol. 2010). Naopak významný rozdíl v přežití jsme sledovali u nemocných s různým typem *MLL* alterace. Nemocní s nadpočetnou kopií *MLL* genu měli kratší dobu přežití než nemocní s jeho balancovanou přestavbou. V našem souboru nemocných se při dodržení stávající léčebné strategie ukázaly přestavby *MLL* genu jako ukazatel lepšího klinického průběhu v porovnání s ostatními změnami chromosomu 11.

Potvrdili jsme, že přestavby genu *MLL* tvoří velmi specifický soubor nemocných s podobným klinickým stavem i charakterem onemocnění. Proto se tento gen stává často těžištěm analýz pro vytvoření nové cílené terapie. Velké množství heterogenních partnerských genů však znesnadňuje a velmi komplikuje snahu vědeckých pracovišť o vytvoření universální terapie pro *MLL* iniciované leukémie. Mnoho z nich je totiž nově popsanych a není u nich zatím známa jejich funkce. Je proto třeba ještě mnoha dalších molekulárních studií k porozumění funkce *MLL* genu a jeho fúzních partnerských genů v patogenezi akutních leukémií.

Alterace *MLL* genu jsme vyšetřovali i na molekulární úrovni v podobě parciální tandemové duplikace (PTD). *MLL* PTD je popisována u přibližně 5 až 9 % případů AML (Dohner a kol. 2002, Mrózek a kol. 2007). V našem souboru nemocných jsme *MLL* PTD prokázali u 23 % nemocných s AML. Tento nesoulad může být způsoben zaměřením řady studií pouze na nemocné s normálním karyotypem, u nichž je *MLL*

PTD nejčastější. Také v našem souboru tvořila největší část nemocných s *MLL* PTD skupina s normálním karyotypem. Druhým nejfrekventovanějším cytogenetickým nálezem spojeným s výskytem s *MLL* PTD je trisomie chromosomu 11 (Caligiuri a kol. 1996). Tuto souvislost můžeme potvrdit přítomností *MLL* PTD u dvou z pěti případů s trisomií chromosomu 11. Schnitger a kol. (2000) ve své studii nenašli žádnou spojitost s konkrétním FAB subtypem AML. Také my jsme *MLL* PTD sledovali převážně u obecně nejčastěji se vyskytujících FAB subtypů M2, M1 a M4. Schnitger a kol. (2000) nedetekovali *MLL* PTD u žádného pacienta s prognosticky příznovou cytogenetickou změnou, rekurentní translokací nebo komplexním karyotypem. Naproti tomu v našem souboru jsme *MLL* PTD prokázali u čtyř nemocných s prognosticky příznivou aberací, u pěti nemocných s komplexním karyotypem a u sedmi pacientů s přestavbou genu *MLL*, především s translokací t(9;11)(p22;q23). Při statistické analýze jsme však neprokázali, že by přítomnost *MLL* PTD měla vliv na přežití nemocných s přestavbou *MLL*. Nejčastěji dochází k duplikaci exonů 5 až 11 (12) nebo exonů 2 až 6, což jsme potvrdili i v naší studii (Whitman a kol. 2005).

Literatura uvádí nepříznivý prognostický význam u *MLL* PTD (Grimwade a Hills 2009). V našem souboru jsme odlišnost mezi přežitím nemocných s normálním karyotypem a *MLL* PTD- a normálním karyotypem a *MLL* PTD+ neprokázali. Důvodem může být opět častá indikace pacientů s *MLL* PTD k provedení transplantace kostní dřeně a také možná přítomnost nepříznivé molekulární mutace ve skupině nemocných s normálním karyotypem, která může zhoršit prognózu nemocných.

U tří nemocných jsme prokázali velmi vzácný jev – parciální netandémovou duplikaci (PNTD) – při cytogenetickém nálezu t(9;11)(p22;q23), t(9;12;11)(p22;p13;q23) a t(11;19)(q23;p13.3). Ve dvou případech byla *MLL* PTD přerušena sekvencemi partnerského genu *MLLT3* (9p22), jednou genem *MLLT1* (19p13.3). *MLL* PNTD maskovanou translokací t(9;11)(p22;q23) popsal u B-ALL také Whitman a kol. (2005). Autoři detekovali parciální duplikaci exonů 2 až 6 přerušenu insercí exonu 9 genu *MLLT3*. Prokázali, že komplexní abnormalita *MLL* genu vedla k vzniku tří transkriptů: transkriptu *MLL* PNTD, transkriptu *MLL* PTD a fúzního transkriptu analogického k transcriptu jednoduché translokace t(9;11)(p22;q23). Přestože zatím zůstává mnoho nezodpovězených otázek ohledně mechanismu vzniku *MLL* PNTD, je podle přerušené *MLL* duplikace jasné, že prvotním mechanismem je translokace. Poté následuje parciální tandemová duplikace vzniklého fúzního genu.

Zatímco Whitman a kol. (2005) popsal *MLL* PNTD v buňkách kostní dřeně u nemocných při prvním a druhém relapsu a předpokládal tak určitou možnou souvislost, my jsme u všech tří nemocných *MLL* PNTD detekovali při diagnóze AML. *MLL* PNTD u nemocných č. 19 a 23 jsme spolu s dalšími dvěma zde neuváděnými případy také publikovali (Sarova a kol. 2009).

V dětském souboru nemocných s nově diagnostikovanou AML jsme potvrdili značně vyšší incidenci změn chromosomu 11, konkrétně *MLL* přestaveb (36 %), oproti dospělým nemocným. Prokázali jsme jednoznačnou spojitost s AML FAB subtypem M5. Žádné jiné abnormality chromosomu 11 jsme u dětí neprokázali. Vzhledem ke krátkému časovému intervalu a malému souboru nemocných však nelze prognózu jednotlivých pacientů porovnávat.

V naší studii jsme prokázali jednoznačný přínos FISH analýzy a mapování pomocí BAC sond pro vytypování a identifikaci afektovaných oblastí a genů na chromosomu 11. Nevýhodou metody je nutnost velkého množství vstupního materiálu, přítomnost dělicích se buněk a nízká sensitivita, pohybující se na úrovni několika desítek kilobází. Někteří autoři proto doporučují k mapování postižených genů užití mikroarray metody (Manning a kol. 2010, De Braekeleer a kol. 2011). SNP array jsme proto použili u 10 nemocných. U čtyř pacientů tak byly odhaleny nové kryptické delece, v jednom případě však abnormalita nebyla metodou FISH potvrzena. U čtyř nemocných byl zlom přehodnocen do jiného chromosomového pruhu než určila metoda mBAND. Potvrdili jsme tak přínos metody SNP array pro detekci alterovaných oblastí nebalancovaných chromosomových aberací.

Detekce chromosomových aberací u pacientů s leukémií je v současné době nezbytná nejen pro identifikaci postižených oblastí genomu, ale také z důvodu stratifikace nemocných do konkrétních prognostických skupin, na jejichž základě je volena léčebná terapie a indikace k transplantaci kostní dřeně. Klasická cytogenetická analýza je však často limitována faktory jako je množství dělicích se buněk, míra kvality chromosomů a velikost nádorového klonu nebo chromosomové změny. V těchto případech je FISH vyšetření vhodným doplněním.

Proto jsme se také zaměřili na vyhodnocení významu skriningového FISH vyšetření u prvních odběrů buněk kostní dřeně/periferní krve nemocných s nově diagnostikovanou AML, jehož cílem byl průkaz přítomnosti nejčastěji se vyskytujících chromosomových změn u AML, to znamená abnormalit genu *MLL* (11q23.3), delecí dlouhých ramen chromosomu 5 a 7 a početních změn chromosomu 8. Potvrdili jsme

značný přínos skrínigového vyšetření především u nemocných s nedostatkem dělicích se buněk, u nichž FISH analýza byla jediným cytogenetickým informativním přístupem. Pro odhalení kryptických přestaveb genu *MLL* se FISH metoda ukázala nezbytnou. Kryptický charakter a únik některých translokací *MLL* genu rutinním cytogenetickým analýzám potvrdili také Park a kol. (2008) a Kim a kol. (2002). Na nutnost systematické detekce *MLL* přestaveb upozorňují i další autoři (Schoch a kol. 2003, Arnaud a kol. 2005). Abnormality chromosomů 5, 7 a 8 jsme často detekovali jako součást komplexního karyotypu. FISH skrínigové vyšetření se také ukázalo velmi přínosné jako rychlá analýza přítomnosti patologických nálezů spojených s nepříznivou prognózou.

## 7. ZÁVĚR

Určení a charakteristika chromosomových změn u hematologických onemocnění umožňuje lékařům stratifikovat nemocné do specifických skupin definovaných podle společných klinických znaků. Na jejich základě je pak volena léčebná terapie a indikace k transplantaci kostní dřeně. Studium a identifikace chromosomových změn a zlomových míst u hematologických malignit jsou nezbytné i pro identifikaci genů, které asociují se vznikem a progresí onemocnění a které mohou být také důvodem lékové rezistence. Molekulární a funkční analýzy těchto genů a jejich produktů jsou podkladem pro vývoj nových léků a individuální terapie pro nemocného.

V současné době patří detekce chromosomových aberací k standardním vyšetřením pacientů s leukémií. Klasická cytogenetická analýza je však limitována faktory jako je množství dělicích se buněk, míra kvality chromosomů a velikost nádorového klonu/chromosomové změny. V těchto případech je FISH vyšetření vhodným a nutným doplněním pro stanovení přesné diagnózy.

Proto jsme se zaměřili na vyhodnocení skrínigového FISH vyšetření u prvních odběrů nemocných s AML (to znamená při diagnóze). Dále jsme identifikovali a charakterizovali změny chromosomu 11 u akutní myeloidní leukémie, a to z pohledu cytogenetického i klinického. V průběhu let 2006 až 2012 jsme v cytogenetické laboratoři ÚHKT a Centru nádorové cytogenetiky vyšetřili 300 dospělých nemocných a 14 dětí s nově diagnostikovanou AML. Změnu chromosomu 11 jsme prokázali v buňkách kostní dřeně, případně periferní krve, u 18 % dospělých a 36 % dětí s AML. Jednotlivé cíle práce jsou zhodnoceny v následujících bodech.

- Prokázali jsme, že změny chromosomu 11 jsou často se vyskytujícím cytogenetickým nálezem u nově diagnostikovaných dospělých nemocných s AML. Alterováno bývá především dlouhé rameno chromosomu 11. Značnou nestabilitu chromosomu 11 u AML jsme potvrdili detekcí dvou a více zlomů na jednom homologním chromosomu nebo přítomností zlomu na obou homologních chromosomech 11.

- Výsledky naší studie potvrzují, že chromosom 11 se může uplatňovat v leukemogenezi jak vlivem balancovaných, tak i nebalancovaných změn s množstvím rekurentních i náhodných zlomových míst. Rekurentní zlom jsme identifikovali na 11q v genu *MLL* (11q23.3) a na 11p v genu *NUP98* (11p15.4). Další potencionálně nenáhodné zlomy jsme určili na krátkém i dlouhém rameni chromosomu 11, v oblastech 11p13, 11p12 a 11q13.2. Poukázali jsme na nové kandidátní geny s možnou úlohou v patogenezi AML.
- Vyhodnotili jsme nejčastěji deletované a duplikované/amplifikované oblasti a navrhli kandidátní tumor supresorové geny a onkogeny lokalizované v těchto částech chromosomu 11.
- Potvrdili jsme, že nemocní s přestavbou genu *MLL* tvoří poměrně homogenní skupinu mladších pacientů (<50 let) diagnostikovaných převážně jako AML M5, M1 nebo M4, charakterizovanou balancovanými změnami.
- Prokázali jsme významnou spojitost ostatních změn chromosomu 11 se starším věkem nemocných (>60 let), komplexním karyotypem, nebalancovanou změnou (na 11p převážně vlivem ztráty genetického materiálu a na 11q obvykle ziskem) a velmi nepříznivým klinickým průběhem s průměrnou dobou přežití 4 měsíců. Neprokázali jsme významnou spojitost s konkrétním AML FAB subtypem nebo sekundárním typem AML.
- U dětských pacientů jsme potvrdili vyšší frekvenci změn chromosomu 11 než u dospělých nemocných. Ve všech případech se jednalo o balancovanou přestavbu genu *MLL* spojenou s nízkým věkem (kolem 1 roku) a AML FAB subtypem M5.
- Skríníng zaměřený na změny genu *MLL*, delecí dlouhých ramen chromosomů 5 a 7 a početní odchylky chromosomů 8 a 9 u AML se ukázal velmi přínosný u pacientů s nedostatkem dělicích se buněk, jako rychlá analýza přítomnosti patologických nálezů spojených s nepříznivou prognózou a pro detekci

kryptických přestavěb *MLL* genu, které bývají často pod rozlišovací schopností klasické cytogenetické analýzy.

Prokázali jsme nesporný klinický i genetický význam detekcí změn chromosomu 11. Z klinického hlediska se nám podařilo definovat novou skupinu nemocných, a to se změnami chromosomu 11 nezahrnujícími přestavbu genu *MLL*. Bez ohledu na lokalizaci nebo mechanismus vzniku zlomového místa vykazovali nemocní společné klinické znaky jako je vyšší věk při diagnóze, častý relaps a krátká doba přežití. Z genetického hlediska jsme prokázali značnou nestabilitu chromosomu 11 u nemocných s AML s množstvím náhodných i opakujících se zlomů. Určili jsme často afektované oblasti na chromosomu 11 a identifikovali řadu nových kandidátních genů s možnou úlohou v leukemogenezi.

Molekulární objasnění translokace  $t(15;17)(q22;q21)$ , identifikace alterovaného genu *RARA* (17q21) a následné zavedení cílené terapie pomocí inhibitorů kyseliny retinové pro nemocné s touto translokací vedlo k vlně nadšení a doufání v objev dalších takových markerů, které by změnily status prognosticky nepříznivého onemocnění na prognosticky příznivé, dobře léčitelné jako tomu je u akutní promyelocytární leukémie. Zatím se však nepodařilo tuto snahu u ostatních akutních leukémií naplnit a možnost cílené a individuální terapie pro nemocné je stále velmi daleko. Již 50 let je léčba nemocných s AML založena na kombinaci cytarabinu a antracyklinu. Řada nemocných však neprofituje z této aktuálně používané léčby, jak dokazujeme i v naší studii. Vývoj nových terapeutik pro léčbu AML je tedy nezbytný. Základem a prvním krokem pro vznik cílené terapie je identifikace alterovaných chromosomových oblastí a konkrétních alterovaných genů. K těm se přiblížíme právě studiem chromosomových změn.



## 8. SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY

1. **Adam Z, Krejčí M, Vorlíček J a kolektiv** (2008): Hematologie (2. doplněné a zcela přepracované vydání). Grada.
2. **Andersen MK, Christiansen DH, Kirchhoff M, Pedersen-Bjergaard J** (2001): Duplication or amplification of chromosome band 11q23, including the unrearranged MLL gene, is recurrent abnormality in therapy-related MDS and AML, and is closely related to mutation of the TP53 gene and to previous therapy with alkylating agents. *Genes, chromosomes & cancer*, 31:33-41.
3. **Aplan PD** (2006): Chromosomal translocations involving the MLL gene: molecular mechanisms. *DNA Repair*, 5(9-10):1265-1272.
4. **Arnaud B, Douet-Guilbert N, Morel F, Le Bris MJ, Herry A, Banzakour S, Bourquard P, Morice P, Calvez G, Marion V, Abgrall J, Berthou Ch, Braekeleer M** (2005): Screening by fluorescence in situ hybridization for MLL status at diagnosis in 239 unselected patients with acute myeloblastic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 161:110-115.
5. **Aventín A, La Starza R, Casas S, Nomdedéu J, Queipo de Llano MP, Cimino G, Lo Coco F, Sierra J, Mecucci C** (2003): MLL tandem duplication in two cases of acute myelocytic leukemia with unbalanced translocations: der(16)t(11;16)(q23;p13) and der(18)t(11;18)(q22;p11.2). *Cancer Genet Cytogenet*,142(1):8-12.
6. **Ayton P, Cleary M** (2001): Molecular mechanisms of leukemogenesis mediated by MLL fusion proteins. *Oncogene*, 20:5695-5707.
7. **Babicka L, Ransdorfova S, Brezinova J, Zemanova Z, Sindelarova L, Siskova M, Maaloufova J, Cermak J, Michalova K** (2007): Analysis of complex chromosomal rearrangements in adult patients with MDS and AML by multicolor FISH. *Leuk Res*, 31(1):39-47.
8. **Balgobind BV, Raimondi SC, Harbott J, Zimmermann M, Alonzo TA, Auvrignon A, Beverloo HB, Chang M, Creutzig U, Dworzak MN, Forestier E, Gibson B, Hasle H, Harrison CJ, Heerema NA, Kaspers GJ, Leszl A, Litvinko N, Nigro LL, Morimoto A, Perot C, Pieters R, Reinhardt D, Rubnitz JE, Smith FO, Stary J, Stasevich I, Strehl S, Taga T, Tomizawa D, Webb D, Zemanova Z, Zwaan CM, van den Heuvel-Eibrink MM** (2009): Novel prognostic subgroups in childhood 11q23/MLL-rearranged acute myeloid leukemia: results of an international retrospective study. *Blood*, 114(12):2489-96.
9. **Basecke J, Podleschny M, Clemens R, Schnittger S, Viereck V, Trumper L, Griesinger F** (2006): Lifelong persistence of AML associated MLL partial tandem duplications (MLL-PTD) in healthy adults. *Leuk Res*, 30(9):1091-1096.
10. **Bloomfield CD, Lawrence D, Byrd JC, Carroll A, Pettenati MJ, Tantravahi R, Patil SR, Davey FR, Berg DT, Schiffer CA, Arthur DC, Mayer RJ** (1998): Frequency of prolonged remission duration after high-dose cytarabine intensification in acute myeloid leukemia varies by cytogenetic subtype. *Cancer Res*, 58(18):4173-4179.

11. **Borrow J, Shearman AM, Stanton VP Jr, Becher R, Collins T, Williams AJ, Dube I, Katz F, Knowng YL, Morris C, Ohiashiki K, Toyama K, Rowley J, Housman DE** (1996): The t(7;11)(p15;p13) translocation in acute myeloid leukemia fuses the genes for nucleoporin NUP98 and class I homeoprotein HOXA9. *Nat Genet* 12: 159-167.
12. **Boulwood J, Pellagatti A, McKenzie AN, Wainscoat JS** (2010): Advances in the 5q- syndrome. *Blood*, 116(26):5803-11.
13. **Braekeleer M, Morel F, Bris M-J, Herry A, Douget-guilbert N** (2005): The MLL gene and translocations involving chromosomal band 11q23 in acute leukemia. *Anticancer research*, 25:1931-1944.
14. **Brezinová J, Zemanová Z, Cermák J, Kurková S, Sindelárová L, Schwarz J, Michalová K** (2002): Variations in MLL amplification in a patient with acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma*, 43(10):2031-2035.
15. **Brezinová J, Zemanová Z, Ransdorfová S, Pavlistová L, Babická L, Housková L, Melichercíková J, Sisková M, Cermák J, Michalová K** (2007): Structural aberrations of chromosome 7 revealed by a combination of molecular cytogenetic techniques in myeloid malignancies. *Cancer Genet Cytogenet*, 173(1):10-16.
16. **Caligiuri MA, Strout MP, Lawrence D, Arthur DC, Baer MR, Yu F, Knuutila S, Mrózek K, Oberkircher AR, Marcucci G, de la Chapelle A, Elonen E, Block AW, Rao PN, Herzig GP, Powell BL, Ruutu T, Schiffer CA, Bloomfield CD** (1998): Rearrangement of ALL1 (MLL) in acute myeloid leukemia with normal cytogenetics. *Cancer Res*, 58(1):55-9.
17. **Caligiuri MA, Strout MP, Schichman SA, Mrózek K, Arthur DC, Herzig GP, Baer MR, Schiffer CA, Heinonen K, Knuutila S, Nousiainen T, Ruutu T, Block AW, Schulman P, Pedersen-Bjergaard J, Croce CM, Bloomfield CD** (1996): Partial tandem duplication of ALL1 as a recurrent molecular defect in acute myeloid leukemia with trisomy 11. *Cancer Res*, 56(6):1418-25.
18. **Calin GA, Pekarsky Y, Croce CM** (2007): The role of microRNA and other non-coding RNA in the pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. *Best Pract Res Clin Haematol*, 20(3):425-37.
19. **Casas S, Aventín A, Nomdedéu J, Sierra J** (2003): Cryptic t(5;11)(q35;p15.5) in adult de novo acute myelocytic leukemia with normal karyotype. *Cancer Genet Cytogenet*, 145(2):183.
20. **Collins EC, Rabbitts TH** (2002): The promiscuous MLL gene links chromosomal translocations to cellular differentiation and tumour tropism. *Trends Mol Med*, 8(9):436-442.
21. **Curtiss NP, Bonifas JM, Lauchle JO, Balkman JD, Kratz CP, Emerling BM, Green ED, Le Beau MM, Shannon KM** (2005): Isolation and analysis of candidate

myeloid tumor suppressor genes from a commonly deleted segment of 7q22. *Genomics*, 85(5):600-607.

**22. Daser A, Rabbitts TH** (2004): Extending the repertoire of the mixed-lineage leukemia gene MLL in leukemogenesis. *Genes Dev*, 18(9):965-974.

**23. De Braekeleer E, Meyer C, Douet-Guilbert N, Morel F, Le Bris MJ, Berthou C, Arnaud B, Marschalek R, Férec C, De Braekeleer M** (2010): Complex and cryptic chromosomal rearrangements involving the MLL gene in acute leukemia: a study of 7 patients and review of the literature. *Blood Cells Mol Dis*, 44(4):268-74.

**24. De Braekeleer E, Douet-Guilbert N, Basinko A, Morel F, Le Bris MJ, Férec C, De Braekeleer M** (2011): Using bacterial artificial chromosomes in leukemia research: the experience at the university cytogenetics laboratory in Brest, France. *J Biomed Biotechnol* 329471.

**25. Döhner H, Estey EH, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, Burnett AK, Dombret H, Fenaux P, Grimwade D, Larson RA, Lo-Coco F, Naoe T, Niederwieser D, Ossenkoppele GJ, Sanz MA, Sierra J, Tallman MS, Löwenberg B, Bloomfield CD; European LeukemiaNet.** (2010): Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*, 115(3):453-74.

**26. Döhner K, Tobis K, Ulrich R, Fröhling S, Benner A, Schlenk RF, Döhner H** (2002): Prognostic significance of partial tandem duplications of the MLL gene in adult patients 16 to 60 years old with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: a study of the Acute Myeloid Leukemia Study Group Ulm. *J Clin Oncol*, 20(15):3254-61.

**27. Dou Y, Hess JL** (2008): Mechanisms of transcriptional regulation by MLL and its disruption in acute leukemia. *Int J Hematol*, 87(1):10-18.

**28. Douet-Guilbert N, Arnaud B, Morel F, Le Bris MJ, De Braekeleer M** (2005): Cryptic 5'MLL gene insertion in an X-chromosome in acute myeloblastic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet*, 157(2):178-180.

**29. Dyson MJ, Talley PJ, Reilly JT, Stevenson D, Parsons E, Tighe J** (2003): Detection of cryptic MLL insertions using a commercial dual-color fluorescence in situ hybridization probe. *Cancer Genet Cytogenet*, 147(1):81-83.

**30. Escobar PA, Smith MT, Vasishtha A, Hubbard AE, Zhang L** (2007): Leukaemia-specific chromosome damage detected by comet with fluorescence in situ hybridization (comet-FISH). *Mutagenesis*, 22(5):321-327.

**31. Ghanem H, Tank N, Tabbara IA** (2012): Prognostic implications of genetic aberrations in acute myelogenous leukemia with normal cytogenetics. *Am J Hematol*, 87(1):69-77.

**32. Grimwade D, Hills RK** (2009): Independent prognostic factors for AML outcome. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 385-95.

- 33. Grimwade D, Hills RK, Moorman AV, Walker H, Chatters S, Goldstone AH, Wheatley K, Harrison CJ, Burnett AK; National Cancer Research Institute Adult Leukaemia Working Group (2010):** Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. *Blood*, 116(3):354-65.
- 34. Grimwade D, Mrózek K (2011):** Diagnostic and prognostic value of cytogenetics in acute myeloid leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am*, 25(6):1135-61.
- 35. Grimwade D, Vyas P, Freeman S (2010):** Assessment of minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *Curr Opin Oncol*, 22(6):656-63.
- 36. Grimwade D, Walker H, Harrison G, Oliver F, Chatters S, Harrison CJ, Wheatley K, Burnett AK, Goldstone AH; Medical Research Council Adult Leukemia Working Party (2001):** The predictive value of hierarchical cytogenetic classification in older adults with acute myeloid leukemia (AML): analysis of 1065 patients entered into the United Kingdom Medical Research Council AML11 trial. *Blood*, 98(5):1312-20.
- 37. Grimwade D, Walker H, Oliver F, Wheatley K, Harrison C, Harrison G, Rees J, Hann I, Stevens R, Burnett A, Goldstone A (1998):** The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. *Blood*, 92(7):2322-2333.
- 38. Grossmann V, Tiacci E, Holmes AB, Kohlmann A, Martelli MP, Kern W, Spanhol-Rosseto A, Klein HU, Dugas M, Schindela S, Trifonov V, Schnittger S, Haferlach C, Bassan R, Wells VA, Spinelli O, Chan J, Rossi R, Baldoni S, De Carolis L, Goetze K, Serve H, Peceny R, Kreuzer KA, Oruzio D, Specchia G, Di Raimondo F, Fabbiano F, Sborgia M, Liso A, Farinelli L, Rambaldi A, Pasqualucci L, Rabadan R, Haferlach T, Falini B (2011):** Whole-exome sequencing identifies somatic mutations of BCOR in acute myeloid leukemia with normal karyotype. *Blood*, 118(23):6153-63.
- 39. Gu Y, Alder H, Nakamura T, Schichman SA, Prasad R, Canaani O, Saito H, Croce CM, Canaani E (1994):** Sequence analysis of the breakpoint cluster region in the ALL-1 gene involved in acute leukemia. *Cancer Res*, 54(9):2327-2330.
- 40. Gu Y, Nakamura T, Alder H, Prasad R, Canaani O, Cimino G, Croce CM, Canaani E (1992):** The t(4;11) chromosome translocation of human acute leukemias fuse the ALL-1 gene, related to *Drosophila* Thithorax, to the AF-4 gene. *Cell*, 71:701-708.
- 41. Gué M, Sun J-S, Boudier T (2006):** Simultaneous localization of MLL, AF4 and ENL genes in interphase nuclei by 3D-FISH: MLL translocation revisited. *BMC Cancer*, 6:20.
- 42. Guenther MG, Jenner RG, Chevalier B, Nakamura T, Croce CM, Canaani E, Young RA (2005):** Global and Hox-specific roles for the MLL1 methyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(24):8603-8608.

- 43. Gupta M, Raghavan M, Gale RE, Chelala C, Allen C, Molloy G, Chaplin T, Linch DC, Cazier JB, Young BD (2008):** Novel regions of acquired uniparental disomy discovered in acute myeloid leukemia. *Genes, chromosomes & cancer*, 47(9):729-39.
- 44. Haferlach C, Kern W, Schindela S, Kohlmann A, Alpermann T, Schnittger S, Haferlach T (2012):** Gene expression of BAALC, CDKN1B, ERG, and MN1 adds independent prognostic information to cytogenetics and molecular mutations in adult acute myeloid leukemia. *Genes, chromosomes & cancer*, 51(3):257-65.
- 45. Haferlach T, Schoch C, Löffler H, Gassmann W, Kern W, Schnittger S, Fonatsch C, Ludwig WD, Wuchter C, Schlegelberger B, Staib P, Reichle A, Kubica U, Eimermacher H, Balleisen L, Grüneisen A, Haase D, Aul C, Karow J, Lengfelder E, Wörmann B, Heinecke A, Sauerland MC, Büchner T, Hiddemann W (2003):** Morphologic dysplasia in de novo acute myeloid leukemia (AML) is related to unfavorable cytogenetics but has no independent prognostic relevance under the conditions of intensive induction therapy: results of a multiparameter analysis from the German AML Cooperative Group studies. *J Clin Oncol*, 21(2):256-265.
- 46. Hall GW (2001):** Childhood myeloid leukaemias. *Best Pract Res Clin Haematol*, 14(3):573-591.
- 47. Hanahan D, Weinberg RA (2011):** Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5):646-74.
- 48. Herry A, Douet-Guilbert N, Gueganic N, Morel F, Le Bris MJ, Berthou C, De Braekeleer M (2006):** Del(5q) and MLL amplification in homogeneously staining region in acute myeloblastic leukemia: a recurrent cytogenetic association. *Ann Hematol*, 85(4):244-249.
- 49. Hesketh R (1997):** *The Oncogene and Tumour Suppressor Gene*, 2nd Ed. Academic Press, London, UK.
- 50. Hess JL (2004):** MLL: a histone methyltransferase disrupted in leukemia. *Trends Mol Med*, 10(10):500-507.
- 51. Hidaka E, Tanaka M, Matsuda K, Ishikawa-Matsumura M, Yamauchi K, Sano K, Honda T, Wakui K, Yanagisawa R, Nakazawa Y, Sakashita K, Shiohara M, Ishii E, Koike K (2007):** A complex karyotype, including a three-way translocation generating a NUP98-HOXD13 transcript, in an infant with acute myeloid leukemia. *Cancer Genet Cytogenet*, 15;176(2):137-43.
- 52. Hollink IH, van den Heuvel-Eibrink MM, Arentsen-Peters ST, Pratcorona M, Abbas S, Kuipers JE, van Galen JF, Beverloo HB, Sonneveld E, Kaspers GJ, Trka J, Baruchel A, Zimmermann M, Creutzig U, Reinhardt D, Pieters R, Valk PJ, Zwaan CM (2011):** NUP98/NSD1 characterizes a novel poor prognostic group in acute myeloid leukemia with a distinct HOX gene expression pattern. *Blood*, 29;118(13):3645-56.

- 53. Chen L, Gilkes DM, Pan Y, Lane WS, Chen J (2005):** ATM and Chk2-dependent phosphorylation of MDMX contribute to p53 activation after DNA damage. *EMBO J*, 24 (19): 3411-3422.
- 54. Cho WC (2007):** OncomiRs: the discovery and progress of microRNAs in cancers. *Mol Cancer*, 6:60.
- 55. Chowdhury T, Brady HJ (2008):** Insights from clinical studies into the role of the MLL gene in infant and childhood leukemia. *Blood Cells Mol Dis*, 40(2):192-199.
- 56. Ishikawa M, Yagasaki F, Okamura D, Maeda T, Sugahara Y, Jinnai I, Bessho M (2007):** A novel gene, ANKRD28 on 3p25, is fused with NUP98 on 11p15 in a cryptic 3-way translocation of t(3;5;11)(p25;q35;p15) in an adult patient with myelodysplastic syndrome/acute myelogenous leukemia. *Int J Hematol*, 86(3):238-45.
- 57. Iwamoto M, Asakawa H, Hiraoka Y, Haraguchi T (2010):** Nucleoporin Nup98: a gatekeeper in the eukaryotic kingdoms. *Genes Cells*, 15(7):661-9.
- 58. Iyer RV, Sait SN, Matsui S, Block AW, Barcos M, Slack JL, Wetzler M, Baer MR (2004):** Massive hyperdiploidy and tetraploidy in acute myelocytic leukemia and myelodysplastic syndrome. *Cancer Genet Cytogenet*. Jan 1;148(1):29-34.
- 59. Jädersten M, Hellström-Lindberg E (2010):** New clues to the molecular pathogenesis of myelodysplastic syndromes. *Exp Cell Res* 316(8):1390-6.
- 60. Jaju RJ, Fidler C, Haas OA, Strickson AJ, Watkins F, Clark K, Cross NC, Cheng JF, Aplan PD, Kearney L, Boulwood J, Wainscoat JS (2001):** A novel gene, NSD1, is fused to NUP98 in the t(5;11)(q35;p15.5) in de novo childhood acute myeloid leukemia. *Blood*, 98(4):1264-7.
- 61. Jaroslav P, Martina H, Jiri S, Hana K, Petr S, Tomas K, Julius M, Cedrik H (2005):** Expression of cyclins D1, D2, and D3 and Ki-67 in Leukemia. *Leuk Lymphoma* 46 (11): 1605-1612
- 62. Jarosova M, Takacova S, Holzerova M, Priwitzerova M, Divoka M, Lakoma I, Mihal V, Indrak K, Divoky V (2005):** Cryptic MLL-AF10 fusion cause by insertion of duplicated 5' part of MLL into 10p12 in acute leukemia: a case report. *Cancer Genet Cytogenet*, 162:179-182.
- 63. Jordheim LP, Sève P, Trédan O, Dumontet C (2011):** The ribonucleotide reductase large subunit (RRM1) as a predictive factor in patients with cancer. *Lancet Oncol*, 12(7):693-702.
- 64. Khan I, Malinge S, Crispino J (2011):** Myeloid leukemia in Down syndrome. *Crit Rev Oncog*, 16(1-2):25-36.
- 65. Kim HJ, Cho HI, Kim EC, Ko EK, See CJ, Park SY, Lee DS (2002):** A study on 289 consecutive Korean patients with acute leukaemias revealed fluorescence in situ hybridization detects the MLL translocation without cytogenetic evidence both initially and during follow-up. *Br J Haematol*, 119(4):930-939.

- 66. Klaus M, Schnittger S, Haferlach T, Dreyling M, Hiddemann W, Schoch C** (2003): Cytogenetics, fluorescence in situ hybridization, and reverse transcriptase polymerase chain reaction are necessary to clarify the various mechanisms leading to an MLL-AF10 fusion in acute myelocytic leukemia with 10;11 rearrangement. *Cancer Genet Cytogenet*, 144(1):36-43.
- 67. Kobzev YN, Marrtinez-Climent J, Lee S, Chen J, Rowly JD** (2004): Analysis of translocations that involve the NUP98 gene in patients with 11p15 chromosomal rearrangements. *Genes, Chromosomes & Cancer* 41: 339-352.
- 68. Kourlas PJ, Strout MP, Becknell B, Veronese ML, Croce CM, Theil KS, Krahe R, Ruutu T, Knuutila S, Bloomfield CD, Caligiuri MA** (2000): Identification of a gene at 11q23 encoding a guanine nucleotide exchange factor: evidence for its fusion with MLL in acute myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(5):2145-50.
- 69. La Starza R, Brandimarte L, Pierini V, Nofrini V, Gorello P, Crescenzi B, Berchicci L, Matteucci C, Romoli S, Beacci D, Rosati R, Martelli MF, Mecucci C** (2009): A NUP98-positive acute myeloid leukemia with a t(11;12)(p15;q13) without HOXC cluster gene involvement. *Cancer Genet Cytogenet*, 193(2):109-11.
- 70. Levy V, Ugo V, Delmer A, Tang R, Ramond S, Perrot J, Vrhovac R, Marie JP, Zittoun R, Ajchenbaum-Cymbalista F** (1999): Cyclin D1 overexpression allows identification of an aggressive subset of leukemic lymphoproliferative disorder. *Leukemia* 13(9):1343-1351.
- 71. Limbergen VH, Poppe B, Michaux L, Herens C, Brown J, Noens L, Berneman Z, De Bock R, De Paepe A, Speleman F** (2002): Identification of cytogenetic subclasses and recurring chromosomal aberrations in AML and MDS with complex karyotypes using M-FISH. *Genes, chromosomes & cancer*, 33(1):60-72.
- 72. Liu H, Cheng EH, Hsieh JJ** (2007): Bimodal degradation of MLL by SCFSkp2 and APCCdc20 assures cell cycle execution: a critical regulatory circuit lost in leukemogenic MLL fusions. *Genes Dev*, 21(19):2385-2398.
- 73. Luquet I, Lai JL, Barin C, Baranger L, Bilhou-Nabera C, Lippert E, Gervais C, Talmant P, Cornillet-Lefebvre P, Perot C, Nadal N, Mozziconacci MJ, Lafage-Pochitaloff M, Eclache V, Mugneret F, Lefebvre C, Herens C, Speleman F, Poirel H, Tigaud I, Cabrol C, Rousselot P, Daliphard S, Imbert M, Garand R, Geneviève F, Berger R, Terre C** (2007): Hyperdiploid karyotypes in acute myeloid leukemia define a novel entity: a study of 38 patients from the Groupe Francophone de Cytogenetique Hematologique (GFCH). *Leukemia*, 11:1-6.
- 74. Lundin C, Horvat A, Karlsson K, Olofsson T, Paulsson K, Johansson B** (2011): t(9;11)(p22;p15) [NUP98/PSIP1] is a poor prognostic marker associated with de novo acute myeloid leukaemia expressing both mature and immature surface antigens. *Leuk Res*, 35(6):e75-6.
- 75. Manning M, Hudgins L, Professional Practice and Guidelines Committee** (2010): Array-based technology and recommendations for utilization in medical genetics practice for detection of chromosomal abnormalities. *Genet Med*, 12(11):742-5.

76. **Manola KN** (2009): Cytogenetics of pediatric acute myeloid leukemia. *Eur J Haematol*, 83(5):391-405.
77. **Marcucci G, Mrózek K, Ruppert AS, Archer KJ, Pettenati MJ, Heerema NA, Carroll AJ, Koduru PR, Kolitz JE, Sterling LJ, Edwards CG, Anastasi J, Larson RA, Bloomfield CD** (2004): Abnormal cytogenetics at date of morphologic complete remission predicts short overall and disease-free survival, and higher relapse rate in adult acute myeloid leukemia: results from cancer and leukemia group B study 8461. *J Clin Oncol*, 22(12):2410-2418.
78. **Marchesi F, Annibali O, Cerchiara E, Tirindelli MC, Avvisati G** (2011): Cytogenetic abnormalities in adult non-promyelocytic acute myeloid leukemia: a concise review. *Crit Rev Oncol Hematol*, 80(3):331-46.
79. **Marschalek R** (2011): Mechanisms of leukemogenesis by MLL fusion proteins. *Br J Haematol*, 152(2):141-54.
80. **Matsuda K, Hidaka E, Ishida F, Yamauchi K, Makishima H, Ito T, Suzuki T, Imagawa E, Sano K, Katsuyama T, Ota H** (2006): A case of acute myelogenous leukemia with MLL-AF10 fusion caused by insertion of 5' MLL into 10p12, with concurrent 3' MLL deletion. *Cancer Genet Cytogenet*, 171(1):24-30.
81. **Mayer J, Starý J** (2002): *Leukemie*. 1.vydání, Grada Publishing, Praha.
82. **Meyer C, Kowarz E, Hofmann J, Renneville A, Zuna J, Trka J, Ben Abdelali R, Macintyre E, De Braekeleer E, De Braekeleer M, Delabesse E, de Oliveira MP, Cavé H, Clappier E, van Dongen JJ, Balgobind BV, van den Heuvel-Eibrink MM, Beverloo HB, Panzer-Grümayer R, Teigler-Schlegel A, Harbott J, Kjeldsen E, Schnittger S, Koehl U, Gruhn B, Heidenreich O, Chan LC, Yip SF, Krzywinski M, Eckert C, Möricke A, Schrappe M, Alonso CN, Schäfer BW, Krauter J, Lee DA, Zur Stadt U, Te Kronnie G, Sutton R, Izraeli S, Trakhtenbrot L, Lo Nigro L, Tsaour G, Fechina L, Szczepanski T, Strehl S, Ilencikova D, Molkenin M, Burmeister T, Dingermann T, Klingebiel T, Marschalek R** (2009): New insights to the MLL recombinome of acute leukemias. *Leukemia*, 23(8):1490-9.
83. **Michaux L, Wlodarska I, Stul M, Dierlamm J, Mugneret F, Herens C, Beverloo B, Verhest A, Verellen-Dumoulin C, Verhoef G, Selleslag D, Madoe V, Lecomte M, Deprijck B, Ferrant a, Delannoy A, Marichal S, Duhem C, Dicato M, Hagemeijer A** (2000): MLL amplification in myeloid leukemias: a study of 14 cases with multiple copies of 11q23. *Genes, chromosomes & cancer* 29:40-47.
84. **Mitelman F** (2000): Recurrent chromosome aberrations in cancer. *Mutat Res*, 462(2-3):247-53.
85. **Mrózek K** (2008): Cytogenetic, molecular genetic, and clinical characteristics of acute myeloid leukemia with a complex karyotype. *Semin Oncol*, 35(4):365-77.
86. **Mrózek K, Heerema NA, Bloomfield CD** (2004): Cytogenetics in acute leukemia. *Blood Rev*, 18(2):115-36.



- 87. Mrózek K, Heinonen K, Lawrence D, Carroll AJ, Koduru PR, Rao KW, Strout MP, Hutchison RE, Moore JO, Mayer RJ, Schiffer CA, Bloomfield CD (1997):** Adult patients with de novo acute myeloid leukemia and t(9;11)(p22;q23) have a superior outcome to patients with other translocations involving band 11q23: a cancer and leukemia group B study. *Blood*, 90(11):4532-4538.
- 88. Mrózek K, Marcucci G, Paschka P, Whitman SP, Bloomfield CD (2007):** Clinical relevance of mutations and gene-expression changes in adult acute myeloid leukemia with normal cytogenetics: are we ready for a prognostically prioritized molecular classification? *Blood*, 109(2):431-48.
- 89. Nebral K, König M, Schmidt HH, Lutz D, Sperr WR, Kalwak K, Brugger S, Dworzak MN, Haas OA, Strehl S (2005):** Screening for NUP98 rearrangements in hematopoietic malignancies by fluorescence in situ hybridization. *Haematologica*, 90(6):746-52.
- 90. Nemoto N, Suzukawa K, Shimizu S, Shinagawa A, Takei N, Taki T, Hayashi Y, Kojima H, Kawakami Y, Nagasawa T (2007):** Identification of a novel fusion gene MLL-MAML2 in secondary acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome with inv(11)(q21q23). *Genes, chromosomes & cancer*, 46(9):813-9.
- 91. Nikitina EG, Urazova LN, Stegny VN (2012):** MicroRNAs and human cancer. *Exp Oncol*, 34(1):2-8.
- 92. Nilson I, Löchner K, Siegler G, Greil J, Beck JD, Fey GH, Marschalek R (1996):** Exon/intron structure of the human ALL-1 (MLL) gene involved in translocations to chromosomal region 11q23 and acute leukaemias. *Br J Haematol*, 93(4):966-72.
- 93. Ng WL, Yan D, Zhang X, Mo YY, Wang Y (2010):** Over-expression of miR-100 is responsible for the low-expression of ATM in the human glioma cell line: M059J. *DNA Repair (Amst)*, 9(11):1170-5.
- 94. Nowak N, Shows T (1995):** Genetics of chromosome 11: Loci for pediatric and adult malignancies, developmental disorders, and other diseases. *Cancer Investigation*, 13(6):646-659.
- 95. Pajuelo-Gámez JC, Cervera J, García-Casado Z, Mena-Durán AV, Valencia A, Barragán E, Such E, Bolufer P, Sanz MA (2007):** MLL amplification in acute myeloid leukemia. *Cancer Genet Cytogenet*, 174(2):127-131.
- 96. Panagopoulos I, Fioretos T, Isaksson M, Larsson G, Billström R, Mitelman F, Johansson B (2002):** Expression of NUP98/TOP1, but not of TOP1/NUP98, in a treatment-related myelodysplastic syndrome with t(10;20;11)(q24;q11;p15). *Genes, chromosomes & cancer*, 34(2):249-54.
- 97. Papenhausen PR, Griffin S, Tepperberg J (2005):** Oncogene amplification in transforming myelodysplasia. *Experimental and Molecular pathology*, 79:168-175.
- 98. Park TS, Lee ST, Song J, Lee KA, Lee SG, Kim J, Suh B, Kim SJ, Lee JH, Park R, Choi JR (2008):** MLL rearrangement with t(6;11)(q15;q23) as a sole

abnormality in a patient with de novo acute myeloid leukemia: conventional cytogenetics, FISH, and multicolor FISH analyses for detection of rare MLL-related chromosome abnormalities. *Cancer Genet Cytogenet*, 187(1):50-3.

**99. Poirel H, Rack K, Delabesse E, Radford-Weiss I, Troussard X, Debert C, Leboeuf D, Bastard C, Picard F, Veil-Buzyn A, Flandrin G, Bernard O, Macintyre E (1996):** Incidence and characterization of MLL gene (11q23) rearrangements in acute myeloid leukemia M1 and M5. *Blood*, 87(6):2496-2505.

**100. Poppe B, Vandesompele J, Schoch C, Lindvall C, Mrozek K, Bloomfield CD, Beverloo HB, Michaux L, Dastugue N, Herens C, Yigit N, De Paepe A, Hagemeijer A, Speleman F (2004):** Expression analyses identify MLL as a prominent target of 11q23 amplification and support an etiologic role for MLL gain of function in myeloid malignancies. *Blood*, 103(1):229-35.

**101. Qian Z, Joslin JM, Tennant TR, Reshmi SC, Young DJ, Stoddart A, Larson RA, Le Beau MM (2010):** Cytogenetic and genetic pathways in therapy-related acute myeloid leukemia. *Chem Biol Interact*. Mar 19;184(1-2):50-7..

**102. Rauch I, Kofler B (2010):** The galanin system in cancer. *EXS*, 102:223-41.

**103. Rowley JD (1999):** The role of chromosome translocations in leukemogenesis. *Semin Hematol*, 36(7):59-72.

**104. Rowley JD a Olney HJ (2002):** International workshop on the relationship of prior therapy to balanced chromosome aberrations in therapy-related myelodysplastic syndromes and acute leukemia: overview report. *Genes, chromosomes & cancer* 33(4):331-345.

**105. Rücker FG, Bullinger L, Schwaenen C, Lipka DB, Wessendorf S, Fröhling S, Bentz M, Miller S, Scholl C, Schlenk RF, Radlwimmer B, Kestler HA, Pollack JR, Lichter P, Döhner K, Döhner H (2006):** Disclosure of candidate genes in acute myeloid leukemia with complex karyotypes using microarray-based molecular characterization. *J Clin Oncol*, 24(24):3887-94.

**106. Rücker FG, Schlenk RF, Bullinger L, Kayser S, Teleanu V, Kett H, Habdank M, Kugler CM, Holzmann K, Gaidzik VI, Paschka P, Held G, von Lilienfeld-Toal M, Lübbert M, Fröhling S, Zenz T, Krauter J, Schlegelberger B, Ganser A, Lichter P, Döhner K, Döhner H (2012):** TP53 alterations in acute myeloid leukemia with complex karyotype correlate with specific copy number alterations, monosomal karyotype, and dismal outcome. *Blood*, 119(9):2114-21.

**107. Sandberg AA, Meloni-Ehrig AM (2010):** Cytogenetics and genetics of human cancer: methods and accomplishments. *Cancer Genet Cytogenet*, 203(2):102- 26.

**108. Sárová I, Brezinová J, Zemanová Z, Izáková S, Lizcová L, Malinová E, Berková A, Cermák J, Maaloufová J, Nováková L, Michalová K (2010):** Cytogenetic manifestation of chromosome 11 duplication/amplification in acute myeloid leukemia. *Cancer Genet Cytogenet*, 199(2):121-7.

- 109. Sárová I, Brezinová J, Zemanová Z, Lizcová L, Berková A, Izáková S, Malinová E, Fuchs O, Kostecka A, Provazníková D, Filkuková J, Maaloufová J, Starý J, Michalová K** (2009): A partial nontandem duplication of the MLL gene in four patients with acute myeloid leukemia. *Cancer Genet Cytogenet*, 195(2):150-6.
- 110. Shaffer LG, Slovak ML, Cambel LJ, editors** (2009): *ISCN: an international system for human cytogenetic nomenclature*. Basel: S. Karger.
- 111. Schnittger S, Kinkelin U, Schoch C, Heinecke A, Haase D, Haferlach T, Büchner T, Wörmann B, Hiddemann W, Griesinger F** (2000): Screening for MLL tandem duplication in 387 unselected patients with AML identify a prognostically unfavorable subset of AML. *Leukemia*, 14(5):796-804.
- 112. Schoch C, Haferlach T, Haase D, Fonatsch C, Loffer H, Schlegelberger B, Staib P, Sauerland MC, Heinecke A, Buchner T, Hiddemann W, German AML Study Group** (2001): Patients with de novo acute myeloid leukaemia and complex karyotype aberrations show a poor prognosis despite intensive treatment: a study of 90 patients. *Br J Haematol*, 112:118-126.
- 113. Schoch C, Schnittger S, Klaus M, Kern W, Hiddemann W, Haferlach T** (2003): AML with 11q23/MLL abnormalities as defined by the WHO classification: incidence, partner chromosomes, FAB subtype, age distribution, and prognostic impact in an unselected series of 1897 cytogenetically analyzed AML cases. *Blood*, 102(7):2395-2402.
- 114. Slany RK** (2005): When epigenetics kills: MLL fusion proteins in leukemia. *Hematological Oncology*, 23:1-9.
- 115. So CW, Cleary ML** (2004): Dimerization: A versatile switch for oncogenesis. *Blood*, 104:919-922.
- 116. Soukup P, Soukupová Maaloufová J, Čermák J, Cetkovský P, Lukášová M** (2012): Akutní myeloidní leukémie-historický vývoj a současnost léčby ve světě a v UHKT. *Vnitřní lékařství* 58; suplementum 2S16.
- 117. Stilgenbauer S, Schaffner C, Litterst A, Liebisch P, Gilad S, Bar-Shira A, James MR, Lichter P, Dohner H** (1997): Biallelic mutations in the ATM gene in T-prolymphocytic leukemia. *Nat Med*, 3(10):1155-1159.
- 118. Strissel PL, Strick R, Rowley JD, Zeleznik-Le NJ** (1998): An in vivo topoisomerase II cleavage site and a DNase I hypersensitive site colocalize near exon 9 in the MLL breakpoint cluster region. *Blood*, 92(10):3793-3803.
- 119. Strout MP, Marcucci G, Bloomfield CD, Caligiuri MA** (1998): The partial tandem duplication of ALL1 b(MLL) is consistently generated by Alu-mediated homologous recombination in acute myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95:2390-2395.
- 120. Sung PA, Libura J, Richardson C** (2006): Etoposide and illegitimate DNA double-strand break repair in the generation of MLL translocations: New insights and new questions. *DNA Repair*, 5(9-10):1109-1118.

- 121. Swerdlow SH, Campo, E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW (2008):** WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, IARC, Lyon.
- 122. Takáčová S, Jarošová M, Divoký V (2007):** Porucha v regulácii chromatinu ako molekulárny mechanizmus MLL-ENL leukemogenézy. *Trans.Hemat.dnes*, 13:16-22.
- 123. Tanaka K, Takechi M, Nishimura S, Oguma N, Kamada N (1993):** Amplification of c-MYC oncogene and point mutation of N-RAS oncogene point mutation in acute myelocytic leukemias with double minute chromosomes. *Leukemia*, 7(3):469-471.
- 124. Taylor TD, Noguchi H, Totoki Y, Toyoda A, Kuroki Y, Dewar K, Lloyd C, Itoh T, Takeda T, Kim DW, She X, Barlow KF, Bloom T, Bruford E, Chang JL, Cuomo CA, Eichler E, FitzGerald MG, Jaffe DB, LaButti K, Nicol R, Park HS, Seaman C, Sougnez C, Yang X, Zimmer AR, Zody MC, Birren BW, Nusbaum C, Fujiyama A, Hattori M, Rogers J, Lander ES, Sakaki Y (2006):** Human chromosome 11 DNA sequence and analysis including novel gene identification. *Nature*, 440(7083):497-500.
- 125. Tennant TR, Huo D, Davis EM, Larson RA, Le Bau MM (2007):** Genomic Rearrangements Associated with -5/del(5q) and -7/del(7q) in Myeloid Leukemias. *Journal of the american society of hematology*, 110(11):537a.
- 126. Vieira L, Marques B, Cavaleiro C, Ambrósio AP, Jorge M, Neto A, Costa JM, Júnior EC, Boavida MG (2005):** Molecular cytogenetic characterization of rearrangements involving 12p in leukemia. *Cancer Genet Cytogenet*, 157(2):134-139.
- 127. Vieira L, Sousa AC, Matos P, Marques B, Alaiz H, Ribeiro MJ, Braga P, da Silva MG, Jordan P (2006):** Three-way translocation involves MLL, MLLT3, and a novel cell cycle control gene, FLJ10374, in the pathogenesis of acute myeloid leukemia with t(9;11;19)(p22;q23;p13.3). *Genes, chromosomes & cancer*, 45(5):455-469.
- 128. Vorechovsky I, Luo L, Dyer MJ, Catovsky D, Amlot PL, Yaxley JC, Foroni L, Hammarstrom L, Webster AD, Yuille MA (1997):** Clustering of missense mutations in the ataxia-telangiectasia gene in a sporadic T-cell leukemia. *Nat Genet*, 17(1): 96-99.
- 129. Wang Y, Xue Y, Chen S, Wu Y, Pan J, Zhang J, Shen J (2010):** A novel t(5;11)(q31;p15) involving the NUP98 gene on 11p15 is associated with a loss of the EGR1 gene on 5q31 in a patient with acute myeloid leukemia. *Cancer Genet Cytogenet*, 199(1):9-14.
- 130. Whitman SP, Liu S, Vukosavljevic T, Rush LJ, Yu L, Liu Ch, Klisovic MI, Maharry K, Guimond M, Strout MP, Becknell B, Dorrance A, Klisovic RB, Plass Ch, Bloomfield CD, Marcucci G, Caligiuri MA (2005):** The MLL tandem duplication: evidence for recessive gain-of-function in acute myeloid leukemia identifies a novel patient subgroup for molecular-targeted therapy. *Blood*, 1:345-352.

- 131. Whitman SP, Strout MP, Marcucci G, Freud AG, Culley LL, Zeleznik-Le NJ, Mrózek K, Theil KS, Kees UR, Bloomfield CD, Caligiuri MA (2001):** The partial nontandem duplication of the MLL (ALL1) gene is a novel rearrangement that generates three distinct fusion transcripts in B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res*, 61(1):59-63.
- 132. Winrow CJ, Pankratz DG, Vibat CR, Bowen TJ, Callahan MA, Warren AJ, Hilbush BS, Wynshaw-Boris A, Hasel KW, Weaver Z, Lockhart DJ, Barlow C (2005):** Aberrant recombination involving the granzyme locus occurs in *Atm*<sup>-/-</sup>-T-cell lymphomas. *Hum Mol Genet*, 14(18):2671-2684.
- 133. Zatkova A, Merk S, Wendehack M, Bilban M, Muzik EM, Muradyan A, Haferlach C, Haferlach T, Wimmer K, Fonatsch C, Ullmann R (2009):** AML/MDS with 11q/MLL amplification show characteristic gene expression signature and interplay of DNA copy number changes. *Genes, chromosomes & cancer*, 48(6):510-20.
- 134. Zhang L, Alsabeh R, Mecucci C, La Starza R, Gorello P, Lee S, Lill M, Schreck R (2007):** Rare t(1;11)(q23;p15) in therapy-related myelodysplastic syndrome evolving into acute myelomonocytic leukemia: a case report and review of the literature. *Cancer Genet Cytogenet*, 178(1):42-8.
- 135. Zhang Y, Rowley JD (2006):** Chromatin structural elements and chromosomal translocations in leukemia. *DNA Repair*, 5(9-10):1282-1297.
- 136. Ziemer-van der Poel S, McCabe NR, Gill HJ, Espinosa III R, Pattel YD, Harden AM, Le Beau MM, Smith SB, Rowley JD, Diaz MO (1991):** Identification of a gene (MLL) which spans the breakpoint in 11q23 translocations associated with human leukemias. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88:10735-10739.

## **8. SEZNAM PŘÍLOH**

**PŘÍLOHA Č. 1 FAB klasifikace AML**

**PŘÍLOHA Č. 2 WHO klasifikace AML (2008)**

**PŘÍLOHA Č. 3 Rekurentní změny 11p – oblast 11p15.4 a 11p13 (nemocný č. 10)**

**PŘÍLOHA Č. 4 Rekurentní změny 11p – oblast 11p12 (nemocný č. 13)**

**PŘÍLOHA Č. 5 Rekurentní změny 11q – oblast 11q13.2 (nemocný č. 54)**

**PŘÍLOHA Č. 6 Rekurentní změny 11q – oblast 11q23.3 (nemocný č. 26)**

**PŘÍLOHA Č. 7 Ukázky různých forem duplikace/amplifikace**

## PŘÍLOHA Č. 1 FAB klasifikace AML

FAB subtyp	Název	Výskyt	Charakteristika
<b>M0</b>	Nediferenciovaná AML	3 %	Velké blasty s hojnou cytoplazmou a nápadnými jádérky, cytochemicky negativní
<b>M1</b>	AML bez vyzrávání	15 %	Blasty s kulatým jádrem a menším množstvím cytoplazmy s ojedinělými azurofilními granuly a Auerovými tyčemi, MPO a Sudanová čern pozitivní
<b>M2</b>	AML s vyzráváním	25 %	Blasty obsahují četná azurofilní granula a Auerovy tyče, MPO a Sudanová čern pozitivní, věk kolem 30 let, častá t(8;21)(q22;q22)
<b>M3</b>	Akutní promyelocytární leukémie	5 %	Blasty s kulatým jádrem a jádérky, hojné Auerovy tyče a granula, MPO a Sudanová čern silně pozitivní, věk 30-40 let, častá t(15;17)(q22;q21)
<b>M4</b>	Akutní myelomonocytární leukémie	25 %	Blasty se světle šedou, granulovanou cytoplazmou a zprohýbanými jádry, pozitivní nespecifické esterázy
<b>M4eo</b>	Akutní myelomonocytární leukémie s eozinofilií		Blasty vzhledu myelomonocytární leukémie, eozinofily tvoří 5-10 % buněk dřeně, časté abnormality 16q22
<b>M5</b>	Akutní monocytární leukémie	6 %	Blasty se zprohýbanými jádry a hojnou, lehce granulovanou cytoplazmou s Auerovými tyčemi, častěji <50 let, abnormality 11q23
<b>M6</b>	Akutní erytroblastická leukémie	3 %	Bizardní erytroblasty, často mnohojaderné
<b>M7</b>	Akutní megakaryocytární leukémie	3 %	Mikromegakaryocyty jedno či dvoujaderné, kyselá fosfatáza pozitivní, častá inv(3)(q21q26)

Vysvětlivky: MPO, myeloperoxidáza.

## PŘÍLOHA Č. 2 WHO klasifikace AML (2008)

### AML s charakteristickými cytogenetickými abnormalitami

- ❖ AML s t(8;21)(q22;q22), *RUNX1-RUNX1T1*
- ❖ APL s t(15;17)(q22;q21), *PML-RARA*
- ❖ AML s abn. eozinofily v kostní dřeni a t(16;16)(p13;q22), inv(16)(p13;q22), *CBFB-MYH11*
- ❖ AML s t(9;11)(p22;q23), *MLLT3-MLL*
- ❖ AML s t(6;9)(p23;q34), *DEK-NUP214*
- ❖ AML s inv(3)(q21q26.2), t(3;3)(q21;q26.2), *RPN1-EVII*
- ❖ AML s t(1;22)(p13;q13), *RBM15-MKL1*
- ❖ AML s mutací *NPM1*
- ❖ AML s mutací *CEBPA*

### AML s myelodysplastickými změnami

#### Sekundární AML

#### AML blíže nespecifikované

- ❖ AML s minimální diferenciací (AML M0)
- ❖ AML bez vyzrávání (AML M1)
- ❖ AML s vyzráváním (AML M2)
- ❖ Akutní myelomonocytární leukémie (AML M4)
- ❖ Akutní monoblastická/monocytární leukémie (AML M5a/b)
- ❖ Akutní erytroblastická leukémie (AML M6)
- ❖ Akutní megakaryocytární leukémie (AML M7)
- ❖ Akutní bazofilní leukémie
- ❖ Akutní panmyelóza s myelofibrózou

#### Myeloidní sarkom

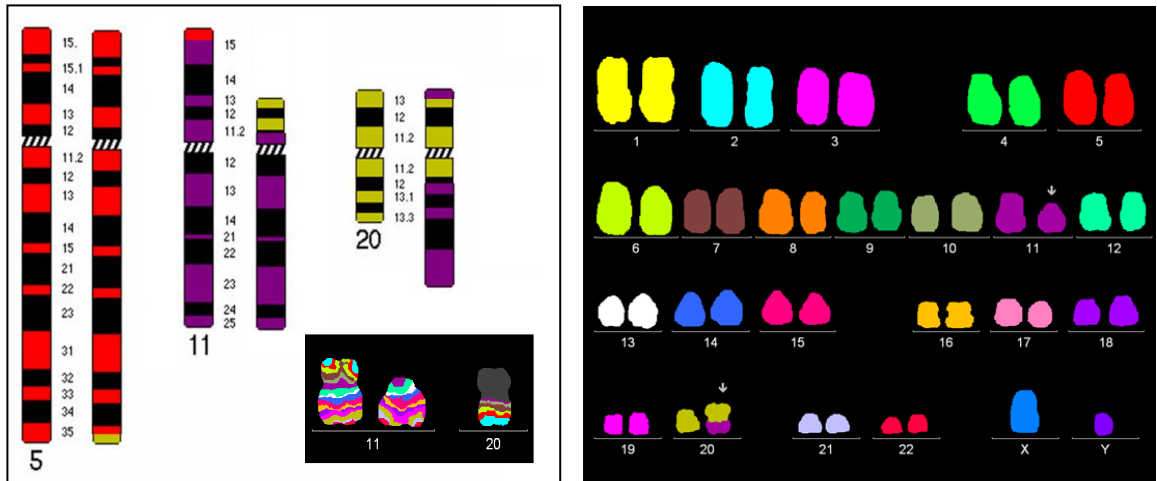
#### Myeloidní proliferace se vztahem k Downovu syndromu

- ❖ Transientní abnormální myelopoéza
- ❖ Myeloidní leukémie asociovaná s Downovým syndromem

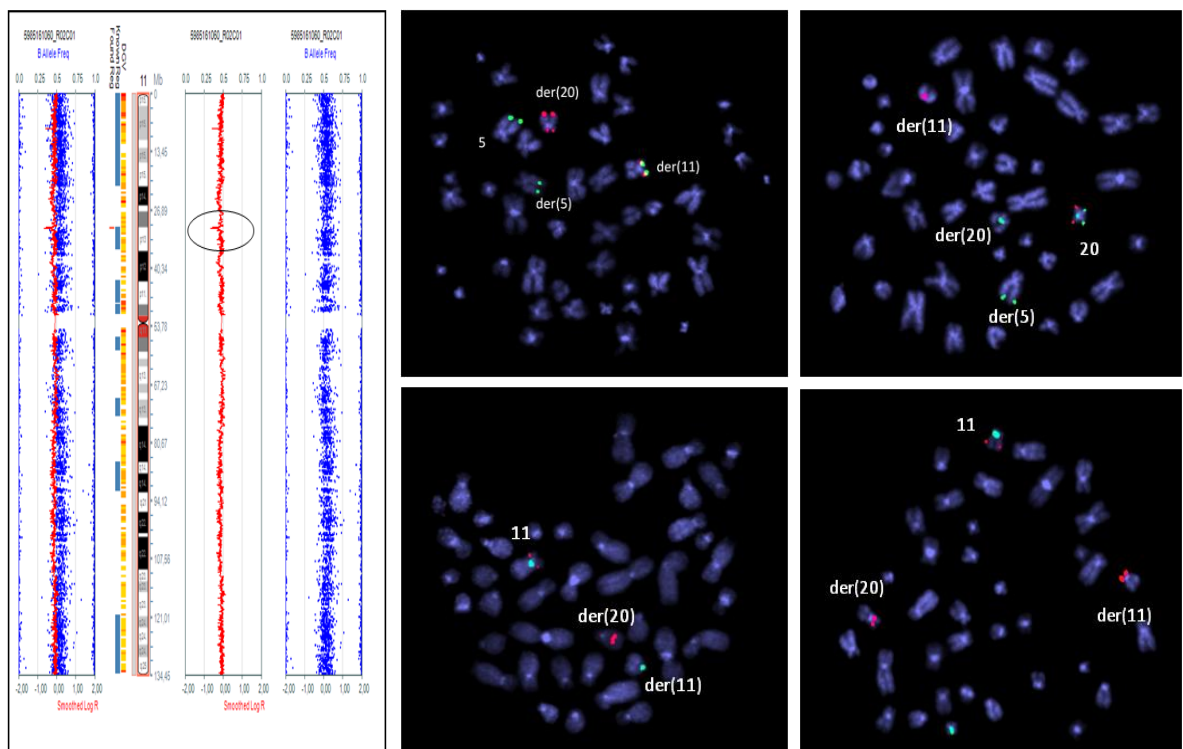
#### Neoplázie blastických plasmocytoidních dendritických buněk



### PŘÍLOHA Č. 3 Rekurentní změny 11p – oblast 11p15.4 a 11p13 (nemocný č. 10)

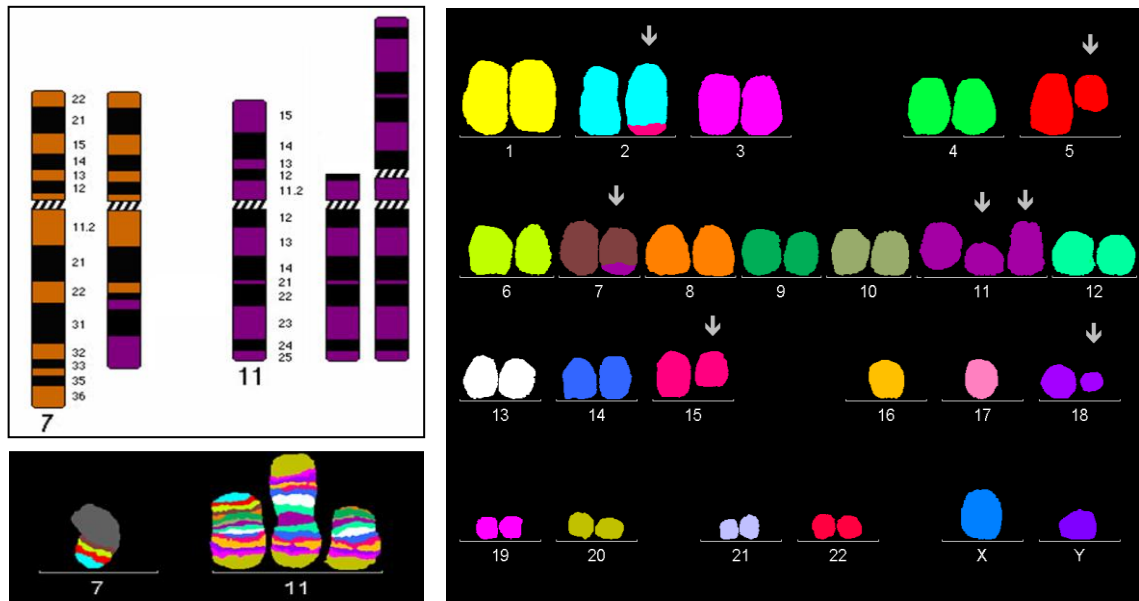


Ideogram komplexního karyotypu 46,XY,der(5)t(5;20)(q35;p?),der(11)t(5;11)(q35;p15),der(11)t(11;20)(p11.2;q?),der(20)t(11;20)(p15;p?)t(11;20)(p11.2;q?) (*vlevo*). mBAND analýza s XCyte11 sondou prokazující pouze jedním zlom na chromosomu 11, a to v oblasti 11p11.2 (*vlevo dole*). Vpravo výsledek mFISH analýzy zachycující pouze zdánlivě nebalancovanou translokaci t(11;20)(p12;q?).

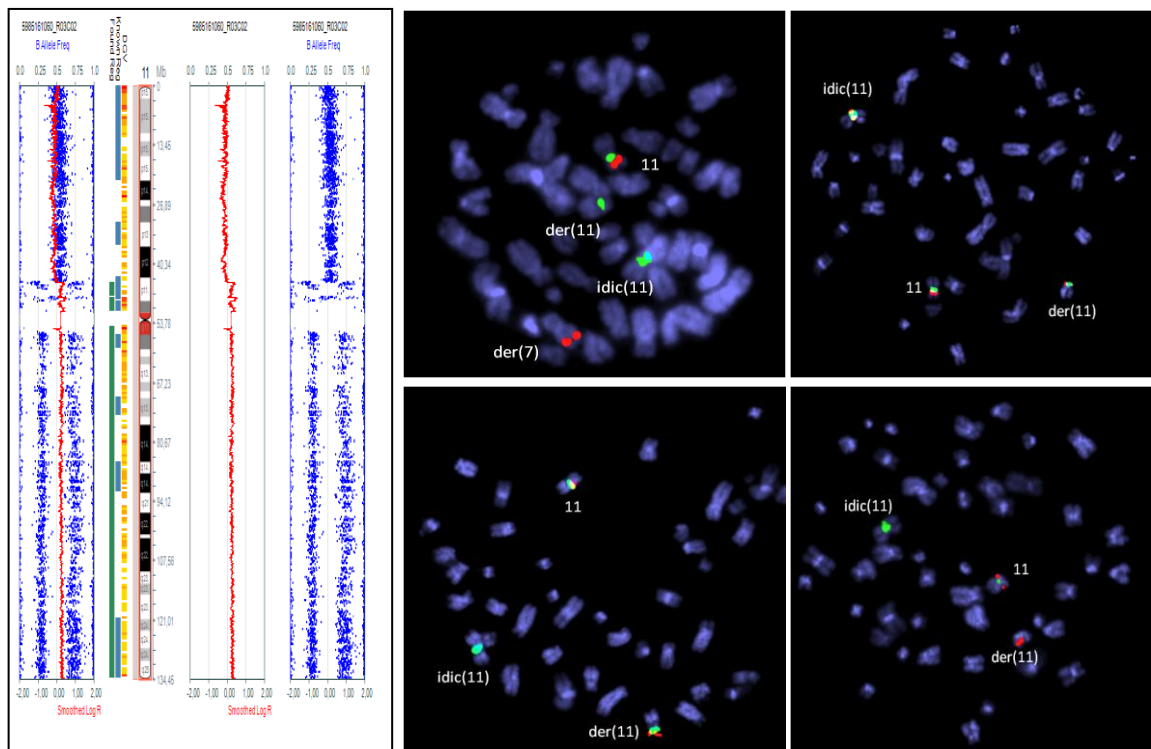


SNP mikroarray (*vlevo*) prokázala kryptickou delecí chromosomu 11 oblasti 11p13. FISH se sondami **RP11-340A20** (11p15.4) a **RP11-265K23** (5q35) prokazující fúzi genů *NUP98* a *NSD1* (*uprostřed nahoře*). FISH se subtelomerickou sondou pro 20p (**ToTel 20p**) a 20q (**ToTel 20q**) v kombinaci s centromerickou sondou **CEP 20** (20p11.1-q11.1) prokázala balancovaný charakter translokace t(11;20) a přestavbu obou ramen chromosomu 20 (*vlevo nahoře*). FISH s **RP11-140L23** (11p13) a **CEP 11** (11p11.1-q11.1) potvrdila delecí 11p13 (slabší oranžový signál na chromosomu 11, *uprostřed dole*). FISH s **RP11-433B4** (11p12) a **CEP 11** prokazující zlom v oblasti 11p12 (oranžový signál přítomný na der(20) i der(11) (*vpravo dole*)).

## PŘÍLOHA Č. 4 Rekurentní změny 11p – oblast 11p12 (nemocný č. 13)

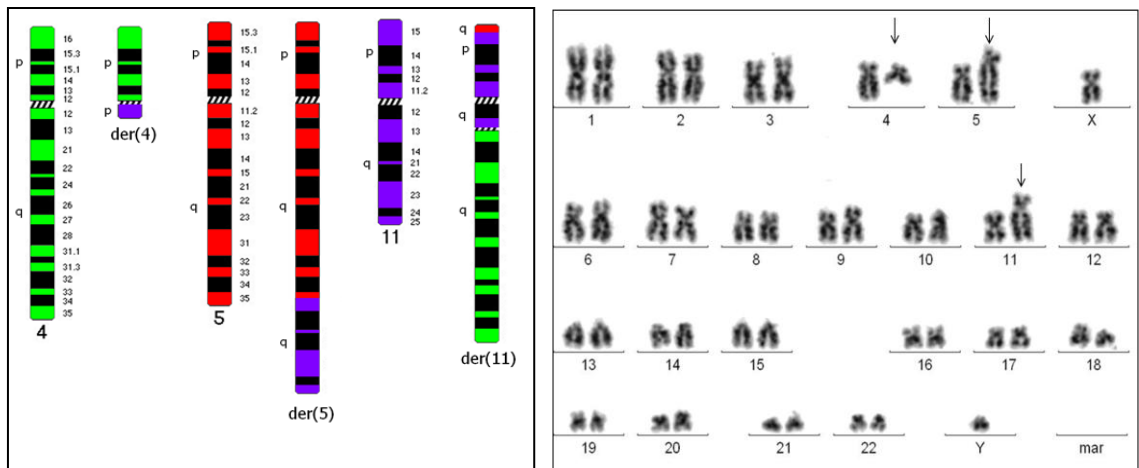


Výsledek mFISH analýzy prokazující komplexní karyotyp 47,XY,der(2)t(2;15)(q34;q24),del(5)(q13q31),**der(7)t(7;11)(q22;p13),del(11)(p13),+idic(11)(p11.1),del(15)(q24),der(18)del(18)(p11.2)del(18)(q21)[cp22]** (vpravo). mBAND analýza s XCyte11 sondou odhalila zlomy v oblastech 11p13 a 11p11.1 (vlevo dole). Vlevo nahoře ideogram translokace.

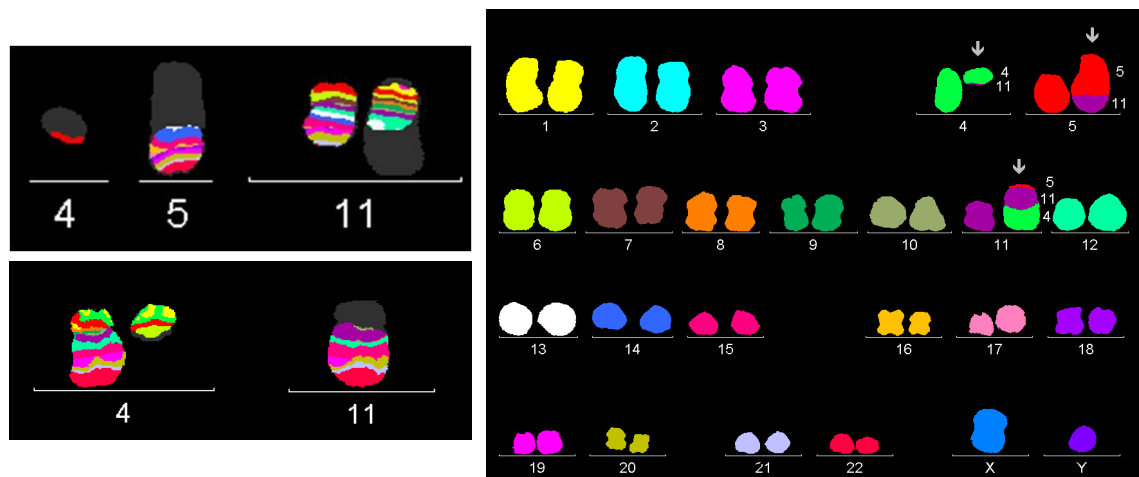


SNP mikroarray (vlevo) potvrdila zmožení oblasti 11p11.2→11qter. FISH se sondami **RP11-450F4** (11p11.2) a **CEP 11** (11p11.1-q11.1) (uprostřed nahoře) a **RP11-12C11** (11p11.2) a **CEP 11** (11p11.1-q11.1) (vpravo nahoře) specifikující zlomové místo do oblasti mezi těmito sondami. FISH se sondami **RP11-2331I0** (11p12) a **CEP 11** (11p11.1-q11.1) (uprostřed dole) a **RP11-456C16** (11p12) a **CEP 11** (11p11.1-q11.1) (vpravo dole) upřesňují zlomové místo do oblasti mezi těmito sondami.

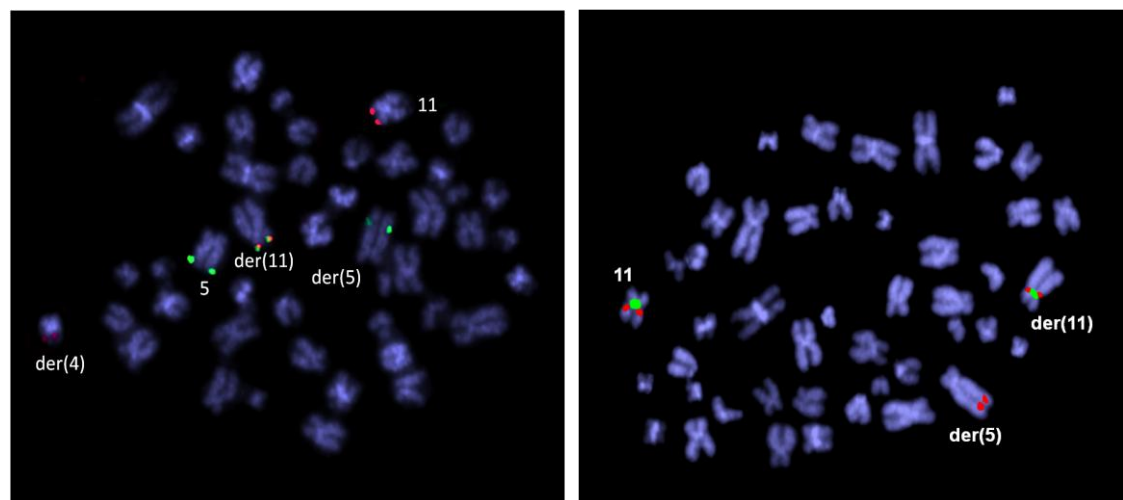
**PŘÍLOHA Č. 5 Rekurentní změny 11q – oblast 11q13.2 (nemocný č. 54)**



Komplexní karyotyp 46,XY,der(4)t(4;11)(q11;p15),der(5)t(5;11)(q35;q13),der(11)t(4;11)(q11;q13)t(5;11)(q35;p15)[21]: ideogram (*vlevo*), klasická cytogenetická analýza (*vpravo*).

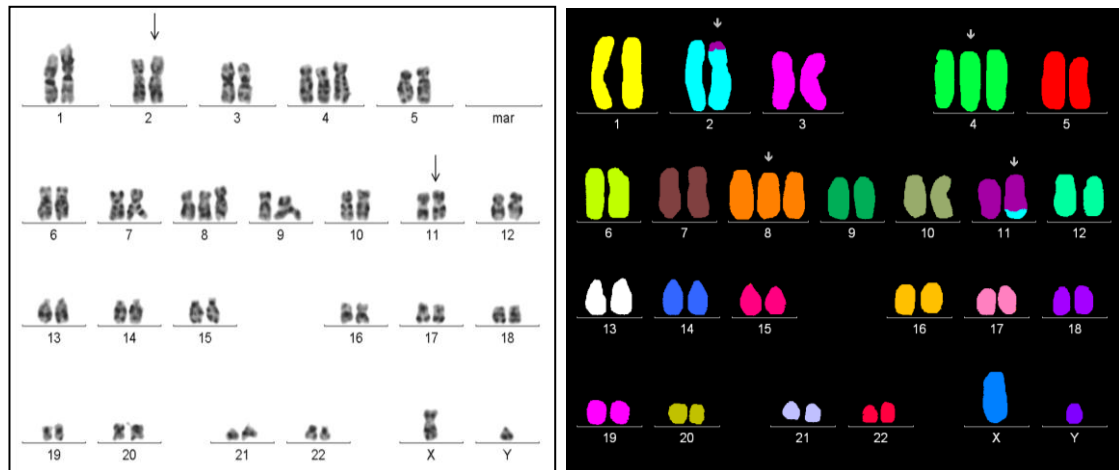


Zlomy v oblastech 11p15, 11q13.5 a 4q11 určené metodou mBAND pro chromosom 11 (*vlevo nahoře*) a chromosom 4 (*vlevo dole*). Komplexní karyotyp detekovaný metodou mFISH (*vpravo*).

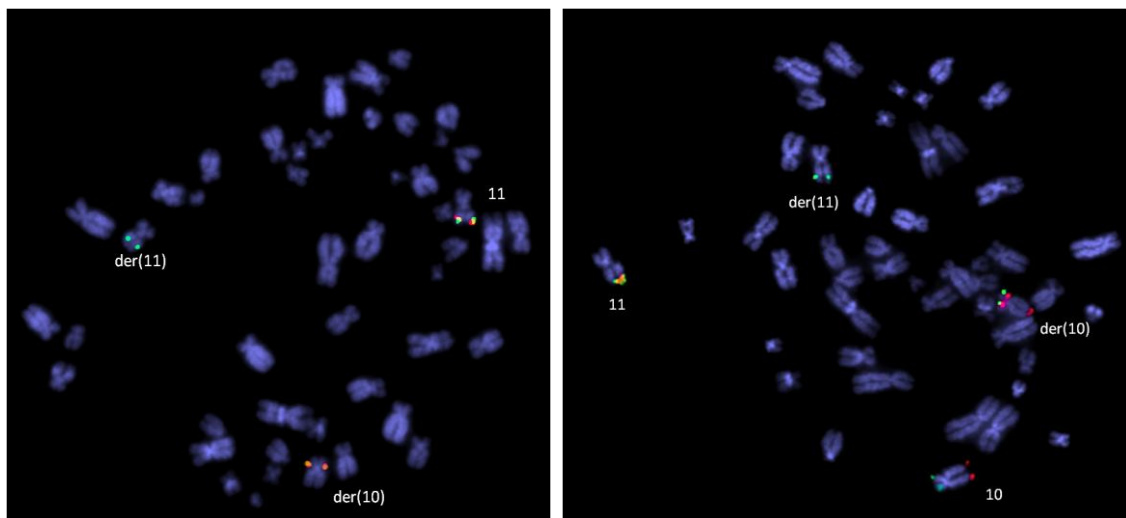


FISH se sondami RP11-340A20 (11p15.4) a RP11-265K23 (5q35) prokazující fúzi genů *NUP98* a *NSD1* (*vlevo*). FISH s RP11-569N5 (11q13.2) a CEP 11 (11p11.1-q11.1) prokazující zlom v oblasti 11q13.2 (orandžový signál přítomný na der(5) i der(11)) (*vpravo*).

## PŘÍLOHA Č. 6 Rekurentní změny 11q – oblast 11q23.3 (nemocný č. 26)



Karyotyp 46~52,XY,t(2;11)(p24;q23.3),+4,+8,+8,+12,+16,+21[cp12] prokázaný metodou klasické cytogenetické analýzy (*vlevo*) a metodou mFISH (*vpravo*).



FISH s dvoubarevnou sondou pro *MLL* gen (11q23.3) identifikovala zlom v genu *MLL* (oddělený orandžový a zelený signál) (*vlevo*). Partnerský chromosom morfologicky neodpovídal alterovanému chromosomu 2, ale zdánlivě normálnímu chromosomu 10. FISH analýza s dvoubarevnou sondou pro *MLL* gen v kombinaci se subtelomerickými sondami pro krátká (ToTel 10p) a dlouhá ramena (ToTel 10q) chromosomu 10 (*vpravo*) naši hypotézu inserce části *MLL* genu do derivovaného chromosomu 10 potvrdila.

## PŘÍLOHA Č. 7 Ukázky různých forem duplikace/amplifikace

Pacient č.	Konvenční cytogenetika	FISH (LSI MLL)	mFISH (24XCyte)	mBAND (XCyte11)
Amplifikace 5' <i>MLL</i>				
18				
Parciální trisomie 11q				
46				
50				
Isocentrický chromosom 11				
13				
Mnohočetná amplifikace části chromosomu 11				
52				
53				
48				

## SEZNAM PUBLIKACÍ, PŘEDNÁŠEK A POSTEROVÝCH SDĚLENÍ

### Články v odborných časopisech s IF:

*Šárová I, Březinová J, Zemanová Z, Lizcová L, Berková A, Izáková S, Malinová E, Fuchs O, Kostečka A, Provazníková D, Filkuková J, Maaloufová J, Starý J and Michalová K:* A partial nontandem duplication of the MLL gene in four patients with acute myeloid leukemia.

Cancer Genetics and Cytogenetics 2009, 195:150-156. **IF09 1.537**

*Sárová I, Brezinová J, Zemanová Z, Izáková S, Lizcová L, Malinová E, Berková A, Cermák J, Maaloufová J, Nováková L, Michalová K:* Cytogenetic manifestation of chromosome 11 duplication/amplification in acute myeloid leukemia.

Cancer Genet Cytogenet. 2010 Jun;199(2):121-7. **IF10 1.551**

*Březinová J, Berková A, Včelíková S, Zemanová Z, Izáková S, Šárová I, Čechová H, Tajtlová J, Grosová L, Lizcová L, Malinová E, Zemanová M, Cmunt E, Karban J, Trněný M, Schwarz J, Michalová K:* Telomere length, molecular cytogenetic findings, and immunophenotypic features in previously untreated patients with B-chronic lymphocytic leukemia.

Neoplasma. 2010;57(3):215-21. **IF10 1.449**

*Bystrická D, Zemanová Z, Březinová J, Gančarčíková M, Grosová L, Šárová I, Izáková S, Berková A, Michalová K:* The assessment of array comparative genomic hybridization in complex karyotype analyses. Folia Biol (Praha). 2010;56(5):223-30.

**IF10 0.729**

*Sárová I, Březinová J, Zemanová Z, Gančarčíková M, Vydra J, Cermák J, Michalová K:* A novel gene LRP5 on 11q13.2 is rearranged in two patients with acute myeloid leukemia.

Leuk Res. 2011 Nov;35(11):e200-2. **IF11 2.923**

*Brezinova J, Zemanova Z, Bystricka D, Sarova I, Lizcova L, Malinova E, Izakova S, Sajdova J, Sponerova D, Jonasova A, Cermak J and Michalova K:* Deletion of the long arm but not the 5q31 region of chromosome 5 in myeloid malignancies.

Leuk Res. 2012 Mar;36(3):e43-5. **IF11 2.923**

*Bystricka D, Sarova I, Zemanova Z, Brezinova J, Lizcova L, Izakova S, Dostalova-Merkerova M, Siskova M, Jonasova A, Neuwirtova R, Cerna O, Cermak J and Michalova K:* Recurrent chromosomal breakpoints in patients with myelodysplastic syndromes and complex karyotype versus fragile sites.

Leuk Res. 2012 Jun;36(6):e125-7. **IF11 2.923**

*Hájková H, Marková J, Haškovec C, Šárová I, Fuchs O, Kostečka A, Cetkovský P, Michalová K, Schwarz J:* Decreased DNA methylation in acute myeloid leukemia patients with DNMT3A mutations and prognostic implications of DNA methylation.

Leuk Res. 2012 Sep;36(9):1128-33. **IF11 2.923**

*Sarova I, Brezinova J, Zemanova Z, Bystricka D, Krejcik Z, Soukup P, Cetkovský P, Vydra J, Cermak J, Jonasova A and Michalova K:* Characterization of chromosome 11

breakpoints and the areas of deletions and amplifications in newly diagnosed acute myeloid leukemia.

*Odesláno k publikaci v Genes, chromosomes and cancer. IF11 3.306*

**Abstrakt na mezinárodních konferencích:**

**Šárová I, Březinová J, Lizcová L, Zemanová Z, Fuchs O, Kostečka A, Provazníková D, Filkuková J, Maaloufová J and Michalová K:** The unusual MLL rearrangement in acute myeloid leukemia.

14th Congress of the European Hematology Association (Berlín, 4.-7.6.2009).

**Abstrakt:** Haematologica/The Hematology Journal Haematologica, 2009;94(s2):13.

**IF09 6.416**

*Brezinova J, Vcelikova S, Berkova A, Zemanova Z, Izakova S, Sarova I, Cechova H, Tajtlova J, Grosova L, Lizcova L, Malinova E, Zemanova M, Cmunt E, Karban J, Schwarz J, Michalova K:* Prognostic significance of telomere length, molecular cytogenetic findings and immunophenotypic features in patients with B-chronic lymphocytic leukemia.

14th Congress of the European Hematology Association (Berlín, 4.-7.6.2009).

**Abstrakt:** Haematologica/The Hematology Journal Haematologica, 2009;94(s2):22.

**IF09 6.416**

*Zemanova Z, Michalova K, Brezinova J, Lizcova L, Izakova S, Bystricka D, Sarova I, Siskova M, Neuwirtova R, Cerna O, Cermak J:* Complex chromosomal aberrations in bone marrow cells of 86 patients with myelodysplastic syndromes (MDS).

14th Congress of the European Hematology Association (Berlín, 4.-7.6.2009).

**Abstrakt:** Haematologica/The Hematology Journal Haematologica, 2009;94(s2):13-14.

**IF09 6.416**

*Izáková S, Šárová I, Březinová J, Zemanová Z, Berková A, Lizcová L, Maaloufová J, Michalová K:* MLL amplification in patients with acute myeloid leukemia (AML).

The European Human Genetics (Víděň, 23.-26.5.2009).

**Abstrakt:** European Journal of Human Genetics, 2009;17(2):209-210. **IF09 3.564**

*Brezinova J, Berkova A, Zemanova Z, Izakova S, Sarova I, Vcelikova S, Cechova H, Lizcova L, Cmunt E, Schwarz J, Michalova K:* Molecular cytogenetics, telomere length and other molecular and immunophenotypic features in patients with B-chronic lymphocytic leukemia.

The European Cytogenetics Association (Stockholm, 4.-7.7.2009).

**Abstrakt:** Chromosome Research, 2009;17(1):127. **IF09 3.230**

*Zemanova Z, Michalova K, Brezinova J, Lizcova L, Izakova S, Bystricka D, Sarova I, Siskova M, Cerna O, Cermak J:* Molecular Cytogenetic Studies of Complex Chromosomal Aberrations in Myelodysplastic Syndromes (MDS).

The European Cytogenetics Association (Stockholm, 4.-7.7.2009).

**Abstrakt:** Chromosome Research, 2009;17(1):131. **IF09 3.230**

*Zemanova Z, Michalova K, Brezinova J, Lizcova L, Izakova S, Bystricka D, Sarova I, Berkova A, Siskova M, Neuwirtova R, Cerna O, Cermak J:* Frequency and Prognostic Impact of Complex Chromosomal Aberrations in Patients with Primary Myelodysplastic Syndromes and del(5q).

The American Society of Hematology (ASH) (New Orleans, 2009).

**Abstrakt:** Blood 2009;114: 1623. **IF09 10.555**

*Brezinova J, Vcelikova S, Berkova A, Zemanova Z, Izakova S, Sarova I, Cechova H, Grosova L, Lizcova L, Malinova E, Cmunt E, Trneny M, Karban J, Schwarz J, Michalova K:* Telomere length evaluation in patients with B-chronic lymphocytic leukemia – correlation with other molecular, cytogenetic and immunophenotypic features.

The European Human Genetics (Gothenburg, 12.-15.6.2010).

**Abstrakt:** European Journal of Human Genetics, 2010;18(1):193-194. **IF10 4.380**

*Sarova I, Brezinova J, Izakova S, Malinova E, Zemanova Z, Lizcova L, Cermak J, Polivka J, Vydra J, Siskova M, Michalova K:* Cytogenetic analyses of the chromosome 11 duplication/amplification in acute myeloid leukemia.

The European Human Genetics (Gothenburg, 12.-15.6.2010)

**Abstrakt:** European Journal of Human Genetics, 2010;18(1):195. **IF10 4.380**

*Šárová I, Březinová J, Bystřická D, Zemanová Z, Izáková S, Malinová E, Lizcová L, Čermák J, Jonášová A and Michalová K:* Molecular cytogenetic analysis of chromosome 11 breakpoints in acute myeloid leukemia.

8th European Cytogenetics Conference (Porto, 2.-5.7.2011).

**Abstrakt:** Chromosome Research 2011;19(1):S133. **IF11 3.087**

*Brezinova J, Zemanova Z, Bystřická D, Izakova S, Sarova I, Lizcova L, Merkerová-Dostálová M, Sponerová D, Jonasova J, Cermak J and Michalova K:* Combination of molecular cytogenetic techniques in mapping of the atypical 5q deletion in myeloid malignancies.

8th European Cytogenetics Conference (Porto, 2.-5.7.2011).

**Abstrakt:** Chromosome Research 2011;19(1):S133. **IF11 3.087**

*Zemanova Z, Michalova K, Bystricka D, Brezinova J, Lizcova L, Izakova S, Sarova I, Merkerová-Dostálová M, Siskova M, Zmolikova J, Cermak J:* True monosomy of chromosome 5 is presumably not an isolated cytogenetic entity in myelodysplastic syndromes (MDS).

8th European Cytogenetics Conference (Porto, 2.-5.7.2011).

**Abstrakt:** Chromosome Research 2011;19(1):S133. **IF11 3.087**

*Brezinova J, Zemanova Z, Bystricka D, Izakova S, Sarova I, Lizcova L, Malinova E, Sajdova J, Cermak J, Jonasova A, Michalova K:* Atypical deleted segments in three patients with myeloid malignancies and deletion 5q.

16th Congress of the European Hematology Association (Londýn, 4.-7.6.2009).

**Abstrakt:** 16th Congress of the European Hematology Association, London, United Kingdom, June 9–12, 2011 Haematologica 2011 96(s2): 559. **IF11 6.532**

*Zemanova Z, Michalova K, Bystricka D, Brezinova J, Lizcova L, Izakova S, Sarova I, Merkerová-Dostálová M, Siskova M, Zmolikova J, Cermak J:* True monosomy of chromosome 5 is presumably not an isolated cytogenetic entity in myelodysplastic syndromes (MDS).

16th Congress of the European Hematology Association (Londýn, 4.-7.6.2009)

**Abstrakt:** 16th Congress of the European Hematology Association, London, United Kingdom, June 9–12, 2011 Haematologica 2011 96(s2): 600. **IF11 6.532**



Zemanova Z, Bystricka D, Brezinova J, Lizcova L, Izakova S, **Sarova I**, Dostalova-Merkerova M, Siskova M, Jonasova A, Neuwirtova R, Cerna O, Zmolikova J, Cermak J and Michalova K: Genomic imbalances in 73 patients with MDS and complex karyotypes.

The 11th International Symposium on Myelodysplastic Syndromes (18.5.-21.5.2011, Edinburgh).

**Abstrakt:**

[http://www.abstractserver.com/mds2011/planner/index.php?go=abstract&action=abstract\\_iplanner&absno=435&MDS2011=9vg1q8c2752nip7ektuv2unar2&MDS2011=9vg1q8c2752nip7ektuv2unar2](http://www.abstractserver.com/mds2011/planner/index.php?go=abstract&action=abstract_iplanner&absno=435&MDS2011=9vg1q8c2752nip7ektuv2unar2&MDS2011=9vg1q8c2752nip7ektuv2unar2).

**Šárová I**, Březinová J, Bystřická D, Zemanová Z, Krejčík Z, Čermák J, Vydra J, Jonášová A and Michalová K: Chromosome 11 as a target of breakpoint mapping in acute myeloid leukemia.

The European Human Genetics (Norimberk, 23.-26.6.2012).

**Abstrakt:** European Journal of Human Genetics, 2012;20(1):202. **IF11 4.400**

**Přednášky v zahraničí:**

**Šárová I**, Březinová J, Izáková S, Zemanová Z, Malinová E, Lizcová L, Bystřická D, Gančarčíková M, Grosová L, Čermák J, Polívka J, Vydra J, Šišková M and Michalová K: Molecular cytogenetic analysis of chromosome 11 aberrations in hematological malignancies.

International Life Science Students Conference (Nijmegen, 10.-14.11.2010).

**Abstrakt:** Conference book 2011:76.

Michalova K, Brezinova J, **Sarova I**, Novakova M and Zemanova Z: Presence of two different clones with deletion 5q in bone marrow cells of MDS patient.

6th Work Group meeting and 8th Management Committee meeting (Bělehrad, 23.-24.4.2012).

**Abstrakta na konferencích v ČR:**

**Šárová I**, Březinová J, Zemanová Z, Izáková S, Maaloufova J, Čermák J, Michalová K: Význam aberací MLL genu u nemocných s akutní myeloidní leukémií. 10. studentská vědecká konference (Praha, 27.5.2009).

**Abstrakt:** Sborník 10. studentské vědecké konference, 2009:54.

**Šárová I**, Březinová J, Zemanová Z, Michalová K: Mapování zlomových míst na chromosomu 11 u akutní myeloidní leukémie. 12. studentská vědecká konference (Praha, 24.5.2011).

**Abstrakt:** Sborník 12. studentské vědecké konference, 2011: 100-102.

**Šárová I**, Březinová J, Bystřická D, Zemanová Z, Izáková S, Malinová E, Lizcová L and Michalová K: Molecular cytogenetic analysis of 11q13.2 breakpoints in free patients with acute myeloid leukemia.

The Student Scientific Conference on Cancer Research (Brno, 7.-8.4.2011).

**Abstrakt:** Conference book 2011:122.

**Šárová I, Březinová J, Zemanová Z, Bystřická D, Čermák J, Vydra J a Michalová K:** Variantní formy kryptické translokace t(5;11)(q35;p15) u 2 nemocných s nově diagnostikovanou AML.

XVI. Česko-slovenský hematologický a transfuziologický sjezd (Brno, 5.-8.9.2012).

**Abstrakt:** Sborník abstrakt 2012:142.

*Březinová J, Šárová I, Ransdorfová Š, Zemanová Z, Nováková M, Bystřická D, Sajdová J, Jonášová A, Šponerová D, Hrabánek J, Soukupová Maaloufová J, Čermák J, Michalová K:* Atypická místa zlomů v buňkách kostní dřeně nemocných s myeloidními malignitami.

XVI. Česko-slovenský hematologický a transfuziologický sjezd (Brno, 5.-8.9.2012).

**Abstrakt:** Sborník abstrakt 2012:94.

*Schwarz J, Marková J, Berková A, Březinová, Šárová I a Michalová K:* Transformace do sekundární akutní myeloidní leukemie u 2 pacientů s Ph myeloproliferativním onemocněním, spojená se ztrátou jedné alely genu TP53 a s mutací druhé alely. Leukemogenicita hydroxyurey?

XVI. Česko-slovenský hematologický a transfuziologický sjezd (Brno, 5.-8.9.2012).

**Abstrakt:** Sborník abstrakt 2012:137.

### **Přednášky (bez abstrakt) na konferencích v ČR:**

**Šárová I, Březinová J, Zemanová Z, Izáková S, Babická L, Čermák J, Maaloufová J, Michalová K:** Přestavby MLL genu u pacientů s akutní myeloidní leukemií. VII. Hradecký den cytogenetiky a molekulární genetiky (Hradec Králové, 16.4.2008).

*Malinová, E, Šárová I, Březinová J, Zemanová Z, Michalová K:* Komplexní přestavby chromosomů u pacienta s akutní myeloidní leukemií.

VII. Hradecký den cytogenetiky a molekulární genetiky (Hradec Králové, 16.4.2008).

**Šárová I, Březinová J, Izáková S, Zemanová Z, Lizcová L, Malinová E, Čermák J, Polívka J, Vydra J, Šišková M a Michalová K:** Amplifikace chromosomu 11 u nemocných s akutní myeloidní leukémií.

42. Cytogenetická konference (Brno, 10.-11.9.2009).

*Izáková S, Březinová J, Zemanová Z, Šárová I, Lizcová L, Gančarčíková M, Michalová K:* Izochromozóm 5p: ojediněle se opakující nález u myeloidních leukemií.

42. Cytogenetická konference (Brno, 10.-11.9.2009).

**Šárová I, Březinová J, Izáková S, Zemanová Z, Čermák J, Michalová K:** Molekulárně cytogenetická analýza aberací chromosomu 11 u hematologických malignit.

Konference doktorandů ÚHKT 2010 (Praha, 19.3.2010).

*Bystřická D, Zemanová Z, Gančarčíková M, Březinová J, Grosová L, Malinová E, Berková A, Lizcová L, Izáková S, Šárová I, Michalová K:* Retrospektivní studie komplexních karyotypů u 50 pacientů s myelodysplastickými syndromy pomocí technik microarray.

VIII. Hradecký cytogenetický den (Hradec Králové, 14.4.2010).

**Šárová I, Březinová J, Izáková S, Malinová E, Zemanová Z, Lizcová L, Michalová K:** Translokace chromosomu 11 u nemocných s akutní myeloidní leukémií.

VIII. Hradecký cytogenetický den (Hradec Králové, 14.4.2010).

*Gančarčíková M, Zemanová Z, Lizcová L, Březinová J, Malinová E, Grosová L, Bystřická D, Izáková S, Šárová I, Michalová K:* Variantní Ph translokace u chronické myeloidní leukémie (CML): geneze a prognóza.

VIII. Hradecký cytogenetický den (Hradec Králové, 14.4.2010).

*Lizcová L, Zemanová Z, Malinová E, Gančarčíková M, Berková A, Grosová L, Bystřická D, Březinová J, Šárová I, Izáková S, Smíšek P, Starý J, Michalová K:* Jumping translokace v buňkách kostní dřeně u dětských pacientů s hematologickými malignitami.

VIII. Hradecký cytogenetický den (Hradec Králové, 14.4.2010).

*Šárová I, Březinová J, Izáková S, Zemanová Z, Malinová E, Lizcová L, Bystřická D, Gančarčíková M, Čermák J, Polívka J, Vydra J, Šišková M a Michalová K:* Mapování zlomových míst na chromosomu 11 u akutní myeloidní leukémie.

43. Cytogenetická konference (Ostravice, 8.-10.9.2010).

*Zemanová Z, Březinová J, Bystřická D, Lizcová L, Izáková S, Šárová I, Šišková M, Neuwirtová R, Černá O, Čermák J, Michalová K:* Komplexní chromosomové aberace u dospělých nemocných s myelodysplastickým syndromem (MDS).

43. Cytogenetická konference (Ostravice, 8.-10.9.2010).

*Izáková S, Březinová J, Šárová I, Zemanová Z, Konvalinková D, Vrzáková M, Čermák J, Šišková M, Michalová K:* Přestavby genů PDGFRA/PDGFRB u myeloidních neoplasií s eosinofilií.

43. Cytogenetická konference (Ostravice, 8.-10.9.2010).

*Bystřická D, Zemanová Z, Březinová J, Merkerová-Dostálová M, Krejčí Z, Grosová L, Berková A, Lizcová L, Šárová I, Izáková S, Michalová K:* Techniky microarray: zajímavé nálezy u pacientů s preleukemií.

43. Cytogenetická konference (Ostravice, 8.-10.9.2010).

*Šárová I, Březinová J, Zemanová Z, Izáková S, Malinová E, Lizcová L, Gančarčíková M, Grosová L, Bystřická D, Polívka J, Vydra J, Čermák J a Michalová K:* Přínos molekulárně cytogenetického vyšetření u akutních leukemií.

V. Brněnské hematologické dny (Brno, 2.-3.11.2010).

*Šárová I:* Mapování zlomových míst na chromosomu 11 u akutní myeloidní leukémie. Konference doktorandů ÚHKT 2011 (Praha, 1.4.2011).

*Šárová I, Březinová J, Bystřická D, Zemanová Z, Gančarčíková M, Konvalinková D, Matuchová L, Folberová L a Michalová K:* Molekulárně cytogenetická analýza zlomových míst v oblasti 11q13.2 u tří nemocných s akutní myeloidní leukemií.

44. Cytogenetická konference (Třeboň, 7.-9.9.2011).

*Bystřická D, Zemanová Z, Březinová J, Šárová I, Lizcová L, Izáková S, Merkerová-Dostálová M, Matuchová L, Folberová L a Michalová K:* Mapování zlomových míst u pacientů s MDS a komplexním karyotypem pomocí technik microarray.

44. Cytogenetická konference (Třeboň, 7.-9.9.2011).

*Ransdorfová Š, Lizcová L, Berková A, Zemanová Z, Březinová J, Šárová I, Matuchová L, Konvalinková D a Michalová K: Ztráta Y chromosomu u mužů s hematologickými malignitami.*

44. Cytogenetická konference (Třeboň, 7.-9.9.2011).

*Březinová J, Zemanová Z, Bystřická D, Šárová I, Lizcová L, Malinová E, Izáková S, Michalová K: Atypická delece dlouhých ramen chromosomu 5 u myeloidních malignit.*

Onkogenetický den (Lékařský dům, Praha, 15.6.2011).

**Šárová I:** Rekurentní zlomová místa na chromosomu 11 u akutní myeloidní leukémie. Konference doktorandů ÚHKT 2012 (Praha, 9.3.2012).

**Šárová I:** Screeningová molekulárně-cytogenetická vyšetření u onkohematologických onemocnění.

Odborný seminář (Praha, 19.4.2012).

*Březinová J, Nováková M, Oltová Š, Šárová I, Ransdorfová Š, Izáková S, Malinová E, Vaňková G, Zemanová Z, Michalová K: Méně časté delece 5q u myelodysplastického syndromu.*

45. výroční cytogenetická konference (Olomouc, 13.-14.9.2012).

*Lizcová L, Zemanová Z, Kramář F, Ransdorfová Š, Pavlišťová L, Šárová I, Bystřická D, Nováková M, Izáková S, Hrabal P, Michalová K: Molekulárně cytogenetická analýza buněk difúzních gliomů.*

45. výroční cytogenetická konference (Olomouc, 13.-14.9.2012).

**Šárová I, Březinová J, Lizcová L, Izáková S, Ransdorfová Š, Malinová E, Gančarčíková M, Berková A, Zemanová Z a Michalová K:** Výskyt vrozených chromosomových změn u pacientů s hematologickým onemocněním.

45. výroční cytogenetická konference (Olomouc, 13.-14.9.2012).

*Gančarčíková M, Zemanová Z, Březinová J, Lizcová L, Izáková S, Šárová I, Malinová E, Michalová K: Jumping translokace u hematologických malignit.*

IX. Hradecký cytogenetický den (Hradec Králové, 23.5.2012).

*Ransdorfová Š, Březinová J, Zemanová Z, Šárová I, Malinová E, Vítovská K, Michalová K: Nestabilita genomu u nemocného s AML.*

IX. Hradecký cytogenetický den (Hradec Králové, 23.5.2012).