

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Katedra genetiky a mikrobiologie

Aberace chromozomu 11 u leukemií

Bakalářská práce

Iveta Šárová

Praha, 2006

Vedoucí práce:

RNDr. Jana Březinová, Ph.D.

Cytogenetické oddělení Ústavu hematologie a krevní transfúze

Prohlašuji, že tuto práci jsem vypracovala samostatně, jen s použitím citované literatury a pod vedením mé školitelky RNDr. Jany Březinové, Ph.D.

Abstrakt

Cytogenetická analýza buněk kostní dřeně se u pacientů s leukemií stala nedílnou součástí vyšetření. Poskytuje upřesnění diagnózy, určení stádia nemoci, prognózu onemocnění a kontrolu úspěšnosti léčby chemoterapií nebo transplantací kostní dřeně.

Jedním z nejčastěji aberacemi zasažených chromozomů u leukemií je chromozom 11. Jeho přestavba znamená obvykle pro nemocného špatnou prognózu. Změny postihují dlouhá i krátká ramena chromozomu.

Cílem této práce je vytvořit ucelený přehled aberací chromozomu 11 u leukemií. Součástí práce je i vysvětlení molekulární podstaty vzniku neoplazií a přiblížení některých metod molekulární cytogenetiky detekujících chromozomové přestavby. Jelikož je nejčastěji mutovaným místem chromozomu 11 u akutních leukemií oblast dlouhého ramena 11q23 a zde lokalizovaný protoonkogen MLL, nejvíce prostoru této práce je proto také věnováno tomuto genu. Významnou vlastností MLL genu je velké množství fúzních partnerských genů a ještě větší počet zaznamenaných translokací. Časté jsou ale i amplifikace a delece genu.

U chronické lymfatické leukemie se změny na chromozomu 11 týkají hlavně nádorového supresorového genu ATM a genu CCND1, který kóduje cyklin D1. Aberace krátkého ramena chromozomu 11 se objevují především u sekundárních typů leukemií, vzniklých na základě předešlé léčby. Nejčastěji bývá zasažena oblast 11p15, kde se nachází gen NUP98, jehož protein je součástí nukleoporinového komplexu. Zajímavou otázkou se tak stalo, jakou roli může mít takový gen v leukemogenezi. Možnou odpovědí může být fakt, že podobně jako MLL gen, má i NUP98 větší množství fúzních partnerských genů, které mají důležitou funkci ve vývoji organismu.

Zmíněny jsou i další dosud zaznamenané aberace chromozomu 11 u leukemií.

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK	5
1. ÚVOD	7
1.1. Chromozomové změny u leukemií	7
1.1.1. <u>Leukemie</u>	8
1.1.2. <u>Molekulární podstata hematologických malignit</u>	9
1.1.2.1. Mutace protoonkogenů	10
1.1.2.2. Mutace nádorových supresorových genů	10
2. ABERACE CHROMOZOMU 11 U LEUKEMIÍ	11
2.1. Přestavby 11q	11
2.1.1. <u>MLL gen</u>	12
2.1.2. <u>ATM gen</u>	18
2.1.3. <u>Cyklin D1</u>	19
2.1.4. <u>Ostatní</u>	19
2.2. Přestavby 11p	20
3. METODY DETEKCE CHROMOZOMOVÝCH ZMĚN	22
3.1. Metody klasické cytogenetiky	22
3.2. Molekulární cytogenetika	22
3.2.1. <u>Fluorescenční hybridizace in situ</u>	23
3.2.2 <u>Modifikace FISH</u>	24
4. ZÁVĚR	26
5. CÍLE DALŠÍ PRÁCE	27
6. SEZNAM LITERATURY	28
7. SEZNAM PŘÍLOH	32

SEZNAM ZKRATEK

ABL	protoonkogen z oblasti 9q34 (z angl. A belson murine leukemia viral oncogene homolog 1)
ACACA	gen lokalizovaný v oblasti 17q12 (z angl. a cetyl- C oenzyme A carboxylase alpha)
AF4	fúzní partner MLL genu, lokalizovaný v oblasti 4q21
AF6	fúzní partner MLL genu, lokalizovaný v oblasti 6q27
AF9	fúzní partner MLL genu, lokalizovaný v oblasti 9p22
AF10	fúzní partner MLL genu, lokalizovaný v oblasti 10p12
ALL	akutní lymfatická leukemie
AML	akutní myeloidní leukemie
ATM	gen z oblasti 11q22.3-q23.1 (z angl. a taxia t elangiectasia m utated)
AT	onemocnění ataxia telangiectasia
ATP	adenosintrifosfát
BCL	gen z oblasti 11q13 (z angl. B -cell leukemia/lymphoma 1)
B-CLL	B-lymfocyty postihující chronická lymfatická leukemie
BCR	zlomové místo genu (z angl. b reakpoint cluster r egion)
BIRC3	gen lokalizovaný v oblasti 11q21 (z angl. b aculoviral I AP repeat-containing 3)
BRCA1	protoonkogen lokalizovaný v oblasti 17q21-q24 (z angl. b reast c ancer 1)
CCND1	gen pro cyklin D1 z oblasti 11q13
CGH	komparativní genomová hybridizace
CLL	chronická lymfatická leukemie
CML	chronická myeloidní leukemie
DDX6	gen lokalizovaný v oblasti 11q23.3 (z angl. D EAD box polypeptide 6)
del	delece
der	derivovaný chromozom
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ELL	fúzní partner MLL genu, lokalizovaný v oblasti 19p13.1
ENL	fúzní partner MLL genu, lokalizovaný v oblasti 19p13.3
ETS1	protoonkogen lokalizovaný v oblasti 11q23.3
FISH	fluorescenční hybridizace in situ
HOX	homeotické geny
HOXA7	gen lokalizovaný v oblasti 7p15-p14 (z angl. h omeobox A7)

HOXA9	gen lokalizovaný v oblasti 7p15-p14 (z angl. homeobox A9)
ISCN	The International System for Human Cytogenetic Nomenclature
KCl	chlorid draselný
LARG	gen z oblasti 11q23 (z angl. Rho guanine nukleotide exchange factor (GEF) 12)
LMO2	gen z oblasti 11p13 (z angl. LIM domain only 2 (rhombotin like 1))
M4-AML	myelomonocytární akutní myeloidní leukemie
M5-AML	monoblastická akutní myeloidní leukemie
MALT1	gen z oblasti 18q21 (z angl. mucosa associated lymphoid tissue lymphoma translocation gene 1)
mBAND	metoda mnohobarevného pruhování chromozomu
MDS	myelodysplastický syndrom
MEIS1	gen z oblasti 2p14-p13 (z angl. myeloid ecotropic viral integration site 1 homolog)
mFISH	mnohobarevná fluorescenční hybridizace in situ
MLL	protoonkogen z oblasti 11q23 (z angl. myeloid/lymphoid leukemia)
MYC	protonkogen z oblasti 8q24 (z angl. myelocytomatosis viral oncogene homolog)
NaCl	chlorid sodný
NUMA1	gen z oblasti 11q13 (z angl. nuclear mitotic apparatus protein 1)
NUP98	gen z oblasti 11p15 (z angl. nucleoporin 98kDa)
p	krátké rameno chromozomu
PCR	polymerázová řetězcová reakce
PICALM	gen z oblasti 11q14-21 (z angl. phosphatidylinositol binding clathrin assembly)
PLZF	gen z oblasti 11q23 (z angl. promyelocytic leukemia zinc finger)
PTD	parciální tandémová duplikace
q	dlouhé rameno chromozomu
RARA	gen lokalizovaný v oblasti 17q12 (z angl. retinoic acid receptor, alpha)
RB1	antionkogen lokalizovaný v oblasti 13q14.2 (z angl. retinoblastoma 1)
RT-PCR	reverzně transkripční polymerázová řetězcová reakce
SELB	fúzní partner MLL genu, lokalizovaný v oblasti 3q21
SMAP1	gen lokalizovaný v oblasti 6q13 (z angl. stromal membrane-associated protein 1)
t	translokace
T-CLL	T-lymfocyty postihující chronická lymfatická leukemie
TIRAP	gen z oblasti 11q24 (z angl. toll-interleukin 1 receptor containing adaptor protein)
TP53	antionkogen z oblasti 17p13.1, kódující protein p53

1. ÚVOD

Nádorová cytogenetika se zabývá aberacemi chromozomů v buňkách nádorů. Předmětem jejího studia jsou získané chromozomové odchylky.

Základy tohoto oboru spadají do počátku 20. století, kdy Boveri roku 1914 formuloval první teorii o vzniku nádoru jako poruchy chromozomové rovnováhy. Podle Boveriho vzniká nádorová buňka z buňky normální, u které vlivem abnormálního obsahu chromatinu došlo k změně původních vlastností. Nádor je tak založen jedinou defektní buňkou.

Jednou z nejvýznamnějších událostí nádorové cytogenetiky se stal objev Philadelphského chromozomu u chronické myeloidní leukemie (NOWELL a HUNGERFORD, 1960). Až o 13 let později identifikovala Rowley tento chromozom jako produkt recipročné translokace t(9;22) (ROWLEY, 1973). Jelikož je změna přítomna u většiny ze všech případů chronické myeloidní leukemie, stal se Philadelphský chromozom jedním ze specifických znaků této nemoci. Postupně pak bylo odhaleno množství dalších specifických aberací a to i u akutní myeloidní leukemie, myelodysplastického syndromu a jiných hemoblastóz.

Dnes jsou změny karyotypu detekovány u více než 80% nemocných s leukemiemi. Karyotypová analýza leukemií se tak stala důležitou součástí vyšetření. Poskytuje upřesnění diagnózy, určení stádia nemoci a kontrolu úspěšnosti léčby chemoterapií nebo transplantací kostní dřeně.

Mezi chromozomy, jejichž aberace se často objevují u leukemií, patří i chromozom 11. Zjištění přítomnosti jeho přestavby v karyotypu je velmi důležité, neboť obvykle znamená pro nemocného špatnou prognózu.

1.1 Chromozomové změny u leukemií

Obecně lze rozlišit dva druhy chromozomových změn: primární a sekundární. Primární změny představují samostatné cytogenetické aberace, obvykle úzce spjaté se specifickým typem nádoru. Sekundární změny značí většinou klonální vývoj nemoci, nádorovou progresi.

Dle Gilberta (1983) patří mezi klasické chromozomové změny u nádorů, a tedy i leukemií, přestavby bez ztráty (translokace a inverze), ztráty (delece a monozomie) a zmožení genetického materiálu (amplifikace, duplikace, trizomie a polyploidie).

Zvláště aneuploidie charakterizují pozdější, více invazivnější stádium vývoje nádoru.

1.1.1 Leukemie

Leukemie je definována jako nekontrolovatelná klonální proliferace hematopoetických buněk, které ztratily schopnost se diferencovat do normálních zralých buněk. Teorie vzniku leukemie předpokládá, že maligní neoplazie vzniká mitotickým dělením jedné hematopoetické kmenové buňky, která byla postižena jednou či více mutacemi. Leukemická populace je tak zpravidla tvořena klonem maligních buněk odvozeným od jediné hematopoetické kmenové buňky, maligně transformované (VONKA a kol., 1992).

Klinicky lze leukemie rozdělit na akutní a chronické formy. Akutní formy jsou charakterizovány rychlým nárůstem nezralých krvinek, které velmi brzy zemřou. Tento typ se často objevuje u dětí. Chronické formy vznikají přílišným nahromaděním abnormálních zralých krvinek. Vyskytují se především u starších lidí.

Podle postižení typu buněk lze leukemie dále dělit na myeloidní a lymfatické.

Leukemie může vzniknout de novo nebo vlivem předešlé léčby, obzvláště anti-topoizomerázními léky (př. etoposidy, teniposidy). Takto vzniklé leukemie se nazývají sekundární.

Formy leukemií:

• ***Akutní myeloidní leukemie (AML)***

Dle FAB (French-American-British) subtypu rozeznáváme několik typů AML: M1 (myeloblastická bez vyžrávání), M2 (myeloblastická s vyžráváním), M3 (promyelocytární), M4 (myelomonocytární), M5 (monoblastická), M6 (erytroblastická), M7 (megakaryocytární) a M0 (nediferenciované myeloblasty).

Nejčastějšími změnami jsou translokace $t(8;21)(q22;q22)$ u M2, translokace $t(15;17)(q22;q21)$ u M3 a $t(9;11)(p22;q23)$ u M5. Někdy bývají ještě spojeny s trizomií 8, monozomií 7 nebo delecí dlouhých ramen chromozomů 7 a 5. Translokace $t(8;21)$ a $t(15;17)$ jsou spojeny s lepší prognózou. Přítomnost translokace $t(9;11)$ znamená naopak prognózu horší (MICHALOVÁ, 1999).

• ***Chronická myeloidní leukemie (CML)***

Typickým cytogenetickým nálezem u CML je Philadelphský chromosom, označovaný Ph, vzniklý translokací $t(9;22)(q34;q11)$. V tomto případě dochází k přemístění protoonkogenu ABL z chromozomu 9, lokalizovaném na 9q34, na chromozom 22 do oblasti

22q11 nazývané BCR (breakpoint cluster region). Výsledkem je fúzovaný gen BCR/ABL. V průběhu progresu CML se objevují další změny. Nejčastěji izochromozom 17 či trizomie chromozomů 8, 19 či 21. Juvenilní CML je charakterizovaná normálním karyotypem nebo monozomií chromozomu 7. CML bez translokace t(9;22) má horší prognózu.

• **Akutní lymfatická leukemie (ALL)**

U tohoto onemocnění je častá hyperploidie tj. 47 a více chromozomů. Nejčastěji jde o chromozomy 4, 6, 8, 10, 14, 16, 18, 20, 21 a X (MOORMAN a kol., 1996).

Nejběžnějšími změnami jsou translokace t(1;19)(q23;p13), t(4;11)(q21;q23), t(9;22)(q34;q11) a t(12;21)(p12;q22). Tyto přestavby jsou vždy spojeny s velmi špatnou prognózou (MICHALOVÁ, 1999).

• **Chronická lymfatická leukemie (CLL)**

U CLL jsou z 90% zasaženy B-lymfocyty (B-CLL), méně T-lymfocyty (T-CLL). Frekventovaná je trizomie 12, delece (13)(q14), delece (11)(q22.3) představující ztrátu ATM genu, a delece (17)(p13) vedoucí k ztrátě genu TP53. V současnosti se využívají výsledky FISH jako prognostický faktor (MICHALOVÁ, 1999).

Mezi poruchy krvetvorby patří i **myelodysplastický syndrom (MDS)**. Vyskytuje se poměrně vzácně především u starších lidí. U 25-30% přechází v AML. Postihuje myeloidní a megakaryocytické prekurzory. Specifickými aberacemi jsou trizomie 8, monozomie chromozomů 5 a 7 nebo delece dlouhých ramen chromozomů 5, 7 a 20 (MICHALOVÁ, 1999).

1.1.2. Molekulární podstata hematologických malignit

Nádorová buňka vzniká původně z normální buňky, jež nabyla schopnosti nekontrolovatelně se dělit. Za tuto změnu jsou zodpovědné mutace, jejichž cílem bývají protoonkogeny, antionkogeny nebo-li nádorové supresorové geny, a nebo geny, účastníci se reparace DNA čili mutátorové geny. Důsledkem mutací je ztráta kontrolních mechanismů regulující buněčný růst, diferenciaci a mortalitu buňky.

U hematologických maligních onemocnění se nejčastěji uplatňují mutace protoonkogenů, spojené se změnou uspořádání genetického materiálu při inverzích a translokacích, a ztráty nádorových supresorových genů, doprovázející monozomie či delece chromozomů.

1.1.2.1 Mutace protoonkogenů

Protoonkogeny jsou geny, jejichž produkty pozitivně regulují buněčný cyklus a diferenciaci. Aktivovány jsou proto v období růstu zdravé tkáně nebo v případě potřeby její reparace. Jsou plně pod kontrolou zpětně vazebných mechanismů. Exprimují se tak jen v určité době. Při vzniku nádoru dochází k mutaci protoonkogenu, která vede k jeho aktivaci. Protoonkogen se mění v onkogen, schopný vyvolat neoplastickou transformaci buňky. Mutace zodpovědné za tuto přeměnu bývají nejčastěji bodové mutace, amplifikace nebo změny uspořádání genetického materiálu. Z genetického hlediska jsou dominantního charakteru.

Většina protoonkogenů kóduje transkripční faktory nebo enzymy s tyrozinkinázovou aktivitou. Jejich funkce může být pozměněna translokací, která vede k vzniku hybridního genu, jehož produktem je fúzovaný protein s odlišnými vlastnostmi od proteinu vzniklého z nefúzovaného genu. Příkladem této přestavby je již výše zmíněný Philadelphský chromozom. Výsledný fúzní gen BCR/ABL produkuje protein s vyšší tyrozinkinázovou aktivitou než má původní produkt (CHISSOE a kol., 1995).

K aktivaci onkogenu může dojít i jeho přenosem (transpozice) do oblasti aktivního chromatinu. Poprvé byl tento typ změny prokázán u Burkittova lymfomu, kdy je MYC onkogen z chromozomu 8q24 přemístěn do oblasti kódující imunoglobulinový řetězec. MYC onkogen je tak vytržen z kontrolních mechanismů vložím do oblasti aktivního chromatinu o vysoké expresi.

Mezi oblastmi, do kterých jsou nejčastěji onkogeny přemístěny patří geny pro imunoglobuliny a T – buněčné receptory (RABBITS, 1994). Buňky s přestavbou pak patrně získávají selekční výhodu.

1.1.2.2. Mutace nádorových supresorových genů

Antionkogeny mají důležitou úlohu především v regulaci buněčné proliferace, neboť jejich produkty inhibují buněčný cyklus. Mutace nebo delece těchto genů vede k ztrátě jejich inhibiční funkce. K fenotypickému projevu je však na rozdíl od onkogenů nutné postižení alel obou. Nejlépe prostudovanými antionkogeny jsou RB1 gen a TP53.

2. ABERACE CHROMOZOMU 11 U LEUKEMIÍ

Chromozom 11 reprezentuje přibližně 4,2% lidského genomu, to znamená asi 140 Mb. Odhaduje se, že se zde nachází 2 100 až 4 000 genů z celkového množství 20 000 až 30 000. Ačkoliv je to jeden z chromozomů, u něhož bylo identifikováno nejvíce genů, většina nám zůstává stále utajena (NOWAK a SHOWS, 1995).

Studium tohoto chromozomu je důležité proto, že se zde nachází řada genů zodpovědná jak za vrozené genetické nemoci, tak i maligní onemocnění. Aberace postihují dlouhá i krátká ramena chromozomu.

2.1. Přestavby 11q

Nejčastější aberace chromozomu 11 u leukemií souvisí s oblastí 11q23, která zahrnuje 10 až 15 Mb.

Přestavby se vyskytují především u akutních myeloidních leukemií, u akutních lymfatických leukemií, kde postihuje hlavně B-lymfocyty, a v menší míře u myeloidních dysplazií. Přibližně polovinu pacientů tvoří děti.

Výzkum balancovaných chromozomových aberací u sekundárních leukemií prokázal, že přestavby 11q23 jsou stejně frekventované jak u de novo tak i sekundárních leukemií, způsobených léčbou zvláště pomocí inhibitorů topoizomerázy II, alkylačních činidel či radiace (BLOOMFIELD a kol., 2002).

Prognóza u přestaveb 11q23 bývá většinou špatná. Záleží na typu translokace, fenotypu, věku, na tom, zda-li jde o mutaci vzniklou de novo nebo vlivem léčby, nebo je-li zasažen gen MLL, který bývá obvyklým zlomovým místem této oblasti.

Translokační zlomy byly poprvé studovány u translokace t(4;11). Její molekulární analýzou tak došlo k identifikaci genu MLL, zodpovědného za většinu změn v této oblasti (ZIEMIN-VAN DER POEL a kol., 1991). Ta je však příliš velká na to, aby se její přestavby vždy týkaly tohoto genu. Studium případů s aberacemi 11q23 tak byly objeveny další geny (př. LARG, PLZF), jejichž mutace též souvisí s leukemogenezí.

Někdy bývají přítomny ještě další změny karyotypu. Nejčastěji jde o trizomii X, abnormální krátké rameno chromozomu 12 nebo 9 a delecí dlouhých ramen chromozomu 6. Nejvyšší incidence těchto přídatných aberací je u delecí dlouhých ramen chromozomu 11 (MOORMAN a kol., 2005).

2.1.1. MLL gen (myeloid/lymphoid or mixed lineage leukemia)

Pro tento gen se užívají také názvy ALL1, HRX, Htrx, TRX1. Obsahuje 37 exonů a velikostně přesahuje 100 kb. Kódující sekvence má 11,9 kb.

MLL gen kóduje obrovský protein z 3 969 aminokyselin, což odpovídá 431 kDa. Posttranslačně je sestřižen specifickou taspázou do většího 320 kDa N-koncového a menšího 180 kDa C-koncového fragmentu. Obě části zůstávají nadále nekovalentně vázány ve formě dimeru. Ten se nachází v jádře, kde působí jako regulační transkripční faktor. Pozitivně udržuje expresi homeotických (HOX) genů během vývoje (SLANY, 2005). Je to hlavní regulátor hematopoézy a embryonálního vývoje. Ovlivňuje buněčnou diferenciaci, apoptózu, proliferaci a regulaci buněčného cyklu.

Od N-konce se MLL gen skládá z tří AT-vazebných motivů, transkripční represní domény, dvou motivů zinkových prstů a bromodomény, serin a treonin bohaté oblasti, a SET domény. AT-vazebné motivy se váží do oblasti bohaté na adenin a tymin v malém žlábků DNA, čímž ji ohýbají, a umožňují tak interakci dalších proteinů. Transkripční represní doména zahrnuje cystein bohatý region homologní k savčí DNA-metyltransferáze. Motivы zinkových prstů a bromodoména hrají důležitou roli v protein-protein interakcích. Serin a treonin bohatá oblast funguje jako transaktivační doména, která váže CREB vazebný protein. CREB je důležitým regulátorem genové exprese. Též má schopnost acetylovat histony H3 a H4 v oblasti HOX genů. SET doména má metyltransferázovou aktivitu, metyluje H3 v regionu HOX genů a tím se účastní remodelace chromatinu. Motivы zinkových prstů a SET doména jsou homologní k proteinu genu Trithorax u Drosophily, který má významnou roli v embryogenezi. Reguluje homeotické geny (AYTON a CLEARY, 2001).

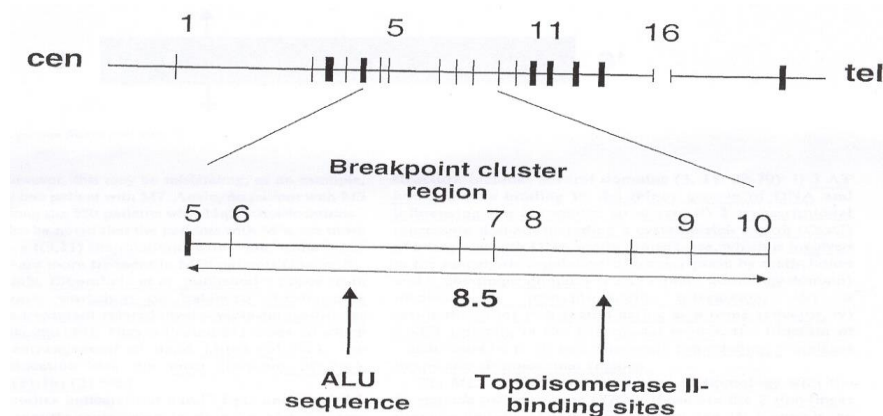
MLL gen se exprimuje v různých lidských tkáních zahrnujících slezinu, játra, mozek a T i B-buněčné linie (BERNARD a BERGER, 1995).

Není však absolutně vyžadován pro konečnou myeloidní diferenciaci. Může ale ovlivnit proliferaci a přežití či nepřežití multipotentních progenitorů. Jak se ukázalo, MLL gen reguluje expresi HOX genů přímou vazbou na jejich promotorové sekvence. A právě dysregulace specifických HOX genů je nejspíše hlavním mechanismem leukemické transformace iniciované MLL chimérickým onkogenem. Teorii by potvrzovala vyšší exprese HOXA7, HOXA9 a homeoboxového kofaktoru MEIS1 u leukemií s MLL aberacemi (SLANY, 2005). Za normálních okolností se totiž HOX geny vysoce exprimují jen v hematopoetických kmenových buňkách a během diferenciaci jejich exprese postupně

klesá. Stále ale ještě neexistuje uspokojivé a jasné vysvětlení (DASSER a RABBITS, 2004).

Při studiu tří translokací $t(4;11)(q21;q23)$, $t(9;11)(p22;q23)$ a $t(11;19)(q23;p13)$ se zjistilo, že zlomové místo genu je lokalizováno uvnitř 8,5 kb regionu, označovaného bcr (breakpoint cluster region), mezi 5. a 11. exonem (GU a kol., 1992, MCCABE a kol., 1992). Přesně jej lze detekovat pomocí metod Southern blotting a RT-PCR.

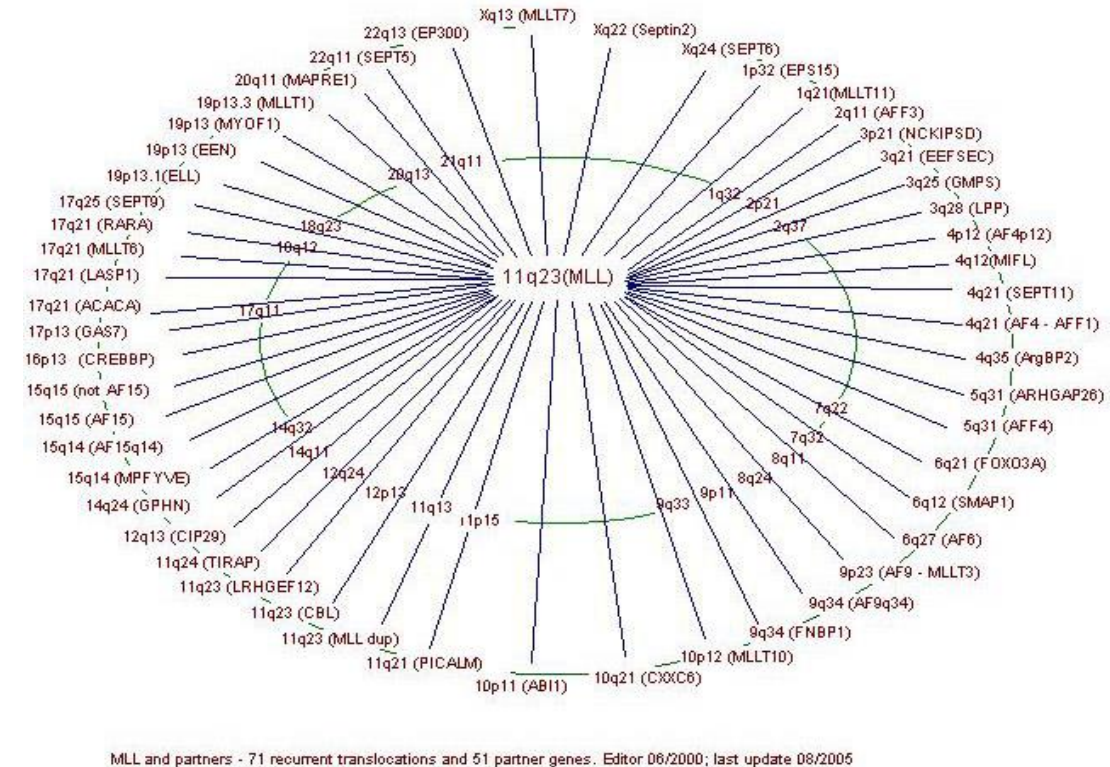
Výzkum MLL přestaveb ukázal, že přibližně polovina z nich souvisí s intronem 6, kde je nejvyšší incidence Alu repetitivních sekvencí (centromerická část bcr, viz obr.1). Je tedy možné, že právě tyto regiony mohou mít vliv v určení místa zlomu u de novo leukemií. Podobné repetitivní sekvence však v okolí zlomových míst partnerských chromozomů nalezeny nebyly (BERNARD a BERGER, 1995). U sekundární formy leukemie se zlom často nachází v telomerické části bcr, kde je lokalizováno vazebné místo pro topoizomerázu II. Vysvětlovalo by to vznik leukemií způsobených léčbou topoizomerázovými II inhibitory. Ty inhibují ligázovou funkci enzymu, který tak zanechává volné konce DNA, což může vést k nehomologní rekombinaci mezi MLL genem a partnerským genem. Přesný mechanismus ale stále není zcela jasný (BRAEKELEER, 2005).



Obr.1 Schéma zlomového místa MLL genu (Braekeleer, 2005).

Nejběžnějšími změnami MLL genu jsou translokace, amplifikace a delece. Při translokaci dochází k vzniku fúzního genu, tj. genu vzniklého splynutím dvou genů. Dosud bylo popsáno přes 40 partnerů MLL genu (viz obr.2 a příloha č.1) a více než 50 různých chromozomových translokací (MEYER a kol., 2005). Výsledkem je derivovaný 11. chromozom, kódující chimérický protein s N-koncem MLL a C-koncem druhého produktu genu, který může, ale

nemusí být exprimován. Zřídka ale může také vzniknout derivovaný partnerský chromozom, kódující protein s N-koncem partnerského genu a C-koncem MLL. V tomto případě u 25% pacientů dochází k delecí MLL sekvence umístěné telomericky od translokačního zlomového místa (BRAEKELEER, 2005).



Obr.2 MLL gen a jeho fúzní partneři.

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

Existuje několik hypotéz o funkci chimérického proteinu. Může například neutralizovat normální funkci MLL proteinu kompeticí o cílová vazebná místa nebo vytvořit nový transkripční faktor fúzí DNA vazebného motivu s transkripční doménou svého partnera. Množství MLL partnerů kódujících proteiny různých funkcí ale svědčí o tom, že je jejich funkce v leukemogenezi jen minoritní. Na základě preferenčního spojení určitých přestaveb s určitým subtypem maligní proliferace, lze ale konstatovat, že fúzní partneři mají minimálně vliv na typ onemocnění (BERNARD a BERGER, 1995).

K detekci změn MLL genu se nejčastěji využívá FISH analýzy s lokus specifickou sondou pro tento gen, komerčně dodávanou např. firmou ABBOTT VYSIS (viz příloha č.3).

Translokace

Translokace MLL genu se vyskytují u 5% AML a 22% ALL. Z toho přibližně polovinu případů AML i ALL tvoří děti mladší 1 rok. Nejčastější translokací u ALL je $t(4;11)(q21;q23)$ a $t(11;19)(q23;p13.1)$. U AML je nejfrekventovanější translokace $t(9;11)(p21;q23)$ a $t(10;11)(p12;q23)$.

Translokace $t(4;11)$ je exkluzivně přítomná u malých dětí s ALL (pod 1 rok). U AML frekvence výskytu translokace $t(9;11)$ naopak stoupá s věkem (BRAEKELEER, 2005).

Nejčastější translokace:

• $t(4;11)(q21;q23)$

Translokace byla zaznamenána u 2 až 7% ALL dospělých a 60% lymfoblastických leukemií dětí do 1 roku. Často ji také nalezneme u bifenotypické a sekundární leukemie, někdy i u AML. Prognóza bývá špatná. Medián přežití je menší než rok u dětí i dospělých (ROWLEY, 1993).

Fúzním partnerem MLL je zde gen AF4, lokalizovaný na 4q21. Tento gen produkuje protein o 1 210 aminokyselinách a 140 kDa. Působí jako transkripční faktor v jádře.

Výsledný fúzní gen je typu 5'MLL-3'AF4. Zlomová místa jsou variabilní. Bývají situovaná za 354., 368. nebo 397. aminokyselinou. Transkript má 12 kb a takto získaný protein se skládá z 1 400 aminokyselin N-konce MLL a z 850 aminokyselin C-konce AF4. Odpovídá velikosti 240 kDa. Při translokaci může též vzniknout typ 5'AF4-3'MLL, ale jeho protein většinou není exprimován (BERNARD a BERGER, 1995).

Translokace může být doprovázena trizomií X a izochromozomem 7.

• $t(6;11)(q27;q23)$

Tato translokace se vyskytuje u AML typu M4 a M5, T-ALL a sekundárních leukemií. Nalezena byla hlavně u dětí a mladých lidí, dominantně u mužů. Prognóza je velmi špatná, zřídka dochází k remisi a doba přežití je krátká.

Partnerským genem se zde stává gen AF6 z oblasti 6q27. Jeho protein obsahuje 1 612 aminokyselin a působí v cytoplasmě v transportním systému a v signální transdukci. Zlomové místo bývá za 35. aminokyselinou.

Chimérický protein je složen z 1 400 aminokyselin. N-konec tvoří MLL, C-konec AF6 (BERNARD a BERGER, 1995).

Přídátnou chromozomovou aberací může být trizomie 8, 19 či 21.

• *t(9;11)(p22;q23)*

Translokace byla nalezena u AML typu M4, M5 a sekundárních leukemií. Velmi špatná prognóza se očekává u sekundárního typu, naopak pro de novo vzniklou leukemii je prognóza lepší.

Partnerský gen AF9 je lokalizovaný v oblasti 9p22. Kóduje jaderný transkripční faktor o 568 aminokyselinách a 63 kDa. Výsledný fúzní gen 5'MLL-3'AF9 vzniká variabilním zlomem. Obvykle se fúzní místo u AF9 nachází za 376. aminokyselinou. Produkt o 180 kDa má 1 444 aminokyselin z proteinu MLL a 192 aminokyselin z proteinu AF9 (BERNARD a BERGER, 1995).

Jako přídatná aberace se někdy vyskytuje trizomie 8 a 19.

• *t(10;11)(p12;q23)*

Přestavba je typická pro AML typu M4 a M5, ale může se vyskytovat i u ALL a sekundárních leukemií. Prognóza bývá opět špatná. Translokace je charakteristická vysokou diverzitou zlomových míst na chromozomu 10. Pohybuje se v oblasti 10p11 až 10p15. Někdy bývá doprovázena inverzí oblasti q13q22 chromozomu 11.

Partnerský gen AF10 vytváří jaderný transkripční faktor o 109 kDa. Fúzní protein má N-konec MLL a C-konec AF10 (BERNARD a BERGER, 1995).

Pomocí FISH analýzy byl u této translokace zaznamenán též případ derivovaného chromozomu 10 bez jakéhokoliv přeskupení či ztráty MLL. Jde tak o nový mechanismus vzniku fúzního genu MLL-AF10, způsobený inzercí duplikovaného 5'konce MLL (JAROSOVA a kol., 2005).

• *t(11;19)(q23;p13.1)*

Translokace byla zachycena u nemocí AML typu M4 a M5, a sekundárních akutních leukemií. Častěji postihuje dospělé. Prognóza je opět velmi špatná, medián přežití se pohybuje jen okolo 6 měsíců.

Partnerský gen ELL, lokalizovaný v oblasti 19p13.1, vytváří 68 kDa jaderný protein sloužící jako elongační faktor (BERNARD a BERGER, 1995).

Translokace může být provázena trizomií X, 6 a 8.

• *t(11;19)(q23;p13.3)*

Přestavba byla pozorována u B-ALL, AML typu M4 a M5, i bifenotypických a sekundárních leukemií. Vyskytuje se hlavně u dětí mladších 1 roku. Prognóza je opět velmi špatná, medián přežití nepřesahuje 1 rok. Pro de novo T-ALL je však lepší.

Partnerským genem je v tomto případě ENL, gen pro jaderný transkripční faktor, lokalizovaný v regionu 19p13.3. Vzniklý fúzní gen je typu 5'MLL-3'ENL (BERNARD a BERGER, 1995).

Někdy se translokace vyskytuje s trizomií 8.

V květnu 2005 došlo k objevu tří do té doby neznámých MLL partnerů. Prvním je gen ACACA, lokalizovaný v oblasti 17q12. Zatím byl znám jako obvyklý partner genu BRCA1 u karcinomu prsu. Druhým je gen SELB z regionu 3q21, jehož protein slouží jako elongační faktor. Posledním je SMAP1 umístěný na pruhu 6q13. Jeho protein je důležitý pro interakci mezi stromálními a hematopoetickými buňkami.

Součástí objevu byla i dosud nepopsaná fúze genu MLL s genem TIRAP, vzniklá delecí 13 Mbp intervalu mezi 11q23 a 11q24 (MEYER a kol., 2005).

Amplifikace a delece 11q23 (MLL)

Odlíšnou aberací MLL genu je jeho amplifikace vedoucí k produkci velkého množství kopií proteinu MLL. Vzniká většinou parciální tandémovou duplikací (PTD). Nejčastěji dochází k zduplikování exonů 5 až 11 (12), umístěných za exonem 11 (12). Jinou možností je duplikace exonů 2 až 6 (WHITMAN a kol., 2005).

PTD není detekovatelná klasickými cytogenetickými metodami, proto se k jejímu studiu používá například Southern analýza, PCR nebo RT-PCR. Též u ní nebyla potvrzena dysregulace HOX genů jako v případech zahrnující MLL fúzní protein, což zůstává nevyřešenou otázkou (HESS, 2004).

Amplifikace se intrachromozomálně projevuje jako homogenně se barvící region (hsr, homogenously staining region), extrachromozomálně jako double minutes (dmin). Pozorovat ji ale můžeme i jako numerickou abnormalitu polyzomii (trizomie, tetrazomie) nebo izochromozom 11q (ARNAUD a kol., 2005).

Duplikace MLL genu dominuje především u dospělých s de novo AML s normálním karyotypem nebo trizomií 11. Nalezneme ji ale i u dětských leukemií, ALL dospělých a

sekundárních leukemií. Pokud je PTD v kombinaci s normálním karyotypem, znamená pro nemocného většinou horší prognózu (WHITMAN a kol., 2005).

Při výzkumu amplifikace 11q23 pomocí FISH analýzy se zjistilo, že kromě MLL genu se poměrně vysoce exprimuje i gen DDX6, který patří do rodiny RNA-helikázových genů a je pravděpodobně potřebný v množství vývojových procesů. Kromě amplifikace MLL genu byla též popsána amplifikace genu ETS1, která ovšem nastává s mnohem nižší frekvencí. Geny DDX6 a ETS1 jsou lokalizovány v oblasti 11q23.3 (POPPE a kol., 2004).

Delece MLL genu se vyskytuje u AML, ALL a MDS. Velikost delece se pohybuje od 20 kb do více než 1 Mb. Může být detekovaná pomocí FISH analýzy nebo Southern blottingu. Nejčastěji postihuje exon 8 MLL genu (BERG a kol., 2000).

2.1.2. ATM gen (ataxia telangiectasia mutated)

Dalším genem, jehož přestavby či delece byly nalezeny u leukemií je ATM gen. Jeho mutace byly popsány u autozomálně recesivního onemocnění ataxia telangiectasia (AT), charakterizovaném neuromuskulárními poruchami, imunodeficiencí, zvýšenou senzitivitou k radiačnímu záření, chromozomovou nestabilitou a vysokým rizikem vzniku lymfoidních malignit. Leukemie u tohoto onemocnění je typická vysokou invazivitou a proliferací (WINROW a kol., 2005).

Gen ATM je lokalizován v oblasti 11q22.3-q23.1. Obsahuje 66 exonů o celkové délce 184 kb. Kóduje jaderný fosfoprotein o 3 056 aminokyselinách a velikosti 350 kDa. Gen je exprimován ve všech tkáních během celého buněčného cyklu. 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 této kinázy patří p53, BRCA1 a mnoho dalších proteinů účastnících se reparace DNA a regulace buněčného cyklu. To vše má za následek aktivaci reparačních mechanismů a snahu pozastavit cyklus při poškození DNA ionizačním zářením. Přesná dráha signální transdukce však není stále zcela jasná (CHEN a kol., 2005).

Studiem lymfoidních malignit u nemocných s AT byly zjištěny mutace či delece genu ATM v obou alelách (STILGENBAUER a kol., 1997). Gen je proto považován za nádorový supresorový gen. Vorechovsky a kol. (1997) prokázali jako místo nejčastější mutace vysoce konzervativní oblast kódující kinázovou doménu proteinu. Důsledkem mutace je změna vazebné oblasti pro adenosintrifosfát (ATP) či substrát.

2.1.3. Cyklin D1

Velká pozornost v souvislosti s neoplazií se v současné době věnuje oblasti 11q13 a zde lokalizovanému genu CCND1, jinak též BCL, kódující cyklin D1. Gen 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 především 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.

(<http://www.infobiogen.fr/services/chromcancer/Genes/BCL1.html>; stav k 2.5.2006).

Mutace cyklinu D1 byly nalezeny u nejrůznějších typů neoplazií, z leukemií jsou přítomny u chronické lymfatické leukemie, méně u akutní formy a myeloidních leukemií (JAROSLAV a kol., 2005). Mezi nejvýznamnější přestavby patří translokace t(11;14)(q13;q32) popsané u CLL. Při této fúzi je 5'konec CCND1 translokován na chromozom 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).

2.1.4. Ostatní

Mezi dosud popsané geny z dlouhého ramene chromozomu 11 asociované s leukemogenezí patří dále gen LARG a gen PLZF, kódující jaderný transkripční faktor ovlivňující diferenciaci myeloidní řady buněk. Oba jsou lokalizovány v oblasti 11q23, LARG telomericky k MLL a PLZF centromericky (KOURLAS a kol., 2000, AYTON a CLEARY, 2001).

V oblasti 11q13 je lokalizován gen NUMA1, jehož protein se během mitózy podílí na umístění dělicího vřeténka. Jeho změna byla nalezena u AML způsobené translokací t(11;17)(q13;q21). Partnerem se mu u této přestavby stal gen RARa (WELLS a kol., 1997).

V oblasti 11q14 až 21 byla zaznamenána translokace t(10;11)(p13;q14-21), popsaná u T-ALL. Vyskytuje se ale jen s velmi malou frekvencí. Fúzní gen vzniká spojením genu PICALM z chromozomu 11 a genu AF10 z chromozomu 10 (DREYLING, 1996).

V září 2005 byla též popsána nová kryptická přestavba, a to translokace t(7;11)(q35;q24) asociovaná s translokací t(1;14)(p32;q32) u pacienta s T-ALL. Následné FISH analýzy

prokázaly, že přestavba lokusu T-buněčného receptoru β z oblasti 7q35 vede k zvýšené expresi zatím neidentifikovaného genu na 11q24 (POPPE a kol., 2005).

2.2. Přestavby 11p

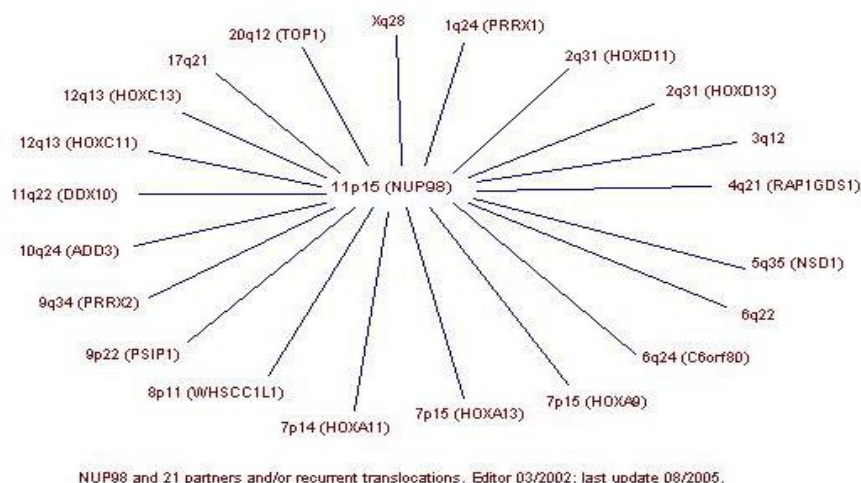
Přestavby krátkého ramene chromozomu 11 postihují většinou oblast 11p15. Aberace tohoto typu je typická u sekundárních leukemií. Nejčastěji jde o AML a myelodysplastický syndrom. Primárním onemocněním může být solidní tumor nebo hematologická malignita, léčené chemoterapií nebo v kombinaci s radioterapií. Onemocnění se týká častěji žen než mužů.

Dle obsáhlé studie International Workshop on treatment related leukemias (ROWLEY a OLNEY, 2002) jsou nejfrekventovanějšími změnami inverze (11)(p15q23) a translokace t(7;11)(p15;p15). Jako přídatná aberace se objevuje monozomie 7 či 5, nebo delece dlouhých ramen těchto chromozomů.

Při přestavbách oblasti 11p15 bývá obvykle zasažen zde lokalizovaný gen NUP98 (nucleoporin 98kDa). První změna tohoto genu byla identifikována v roce 1996 (BORROW a kol., 1996). Od té doby byly mutace NUP98 popsány u AML, CML a T-ALL. Gen kóduje protein o 920 aminokyselinách, velikosti 97 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. Při fúzi se zachovává N-konec.

Protein se nachází v jaderné membráně savců, kde v asociaci s dalšími nukleoporiny tvoří supramolekulární strukturu důležitou pro jaderný transport. Jeho role v maligní transformaci není zcela objasněna, neboť jeho vysoce specializovaná funkce nezahrnuje vývoj krevních buněk. Příčina tak nejspíše souvisí s fúzí genu s jadernými transkripčními faktory, kofaktory a chromatin-remodelačními proteiny způsobenou translokacemi. Hypotézu potvrzuje fakt, že většina fúzních partnerských genů jsou geny homeoboxu (až 50 % případů), které regulují vývoj (KOBZEV a kol., 2004).

Dodnes bylo identifikováno více než 12 fúzních partnerů (*viz obr.3 a příloha č.2*). Výsledný gen má většinou 5'konec z NUP98 a 3'konec partnerského genu. K analýze se využívá metoda FISH.



Obr.3 NUP98 a jeho fúzní partneři

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

Vzácně mohou změny krátkých ramen chromozomu 11 postihnout i oblast 11p13 a v ní lokalizovaný gen LMO2. Gen dává vznik malému cystein bohatému jadernému proteinu Lmo2 o 158 aminokyselinách a 18 kDa. Je exprimován v rané embryogenezi ve všech typech tkání, nejsilněji v prekurzorech erytrocytů, megakaryocytů, neutrofilů a makrofágů. Způsobuje leukemie myeloidní i lymfoidní řady. Zaznamenány byly dvě translokace t(7;11)(q35;p13) a t(11;14)(p13;q11). U translokace t(7;11) je partnerským genem T-buněčný receptor β a u translokace t(11;14) T-buněčný receptor α a δ (NOWAK a SHOWS, 1995).

3. METODY DETEKCE CHROMOZOMOVÝCH ZMĚN

3.1 Metody klasické cytogenetiky

Cytogenetické vyšetření u leukemií se provádí na odebraném vzorku kostní dřeně. Někdy je ale nutné pro zjištění vrozených aberací použít krevní buňky z periferní krve. Buňky se kultivují, zpracovávají a barví. Poté se pomocí mikroskopu a počítačové analýzy obrazu sestaví karyotyp podle závazné mezinárodní nomenklatury ISCN (2005).

Kultivace buněk kostní dřeně probíhá v kultivačním mediu (medium RPMI 1640, 10% fetální sérum, antibiotika, glutamin a NaCl) při 37°C po dobu 24 hodin. Zpracování vzorku začíná přidáním kolcemidu, který porušuje funkci dělicího vřeténka a zastavuje dělení buněk v metafázi. Následnou hypotonizací v 0,075 M roztoku KCl se poruší cytoplazmatická membrána. Chromozomy se tak uvolní a oddálí od sebe. Fixace se provádí směsí metanol – kyselina octová v poměru 3:1. Suspenze buněk se poté přenesse ve fixačním roztoku na podložní sklíčko například kapáním centrifugovaných buněk z výšky (MICHALOVÁ, 1999).

Po zpracování se preparát barví některou z pruhovacích metod, která umožní rozeznat jednotlivé chromozomy podle typického a pro každý chromozomový pár specifického střídání světlých a tmavých pruhů po celé délce chromozomu. K barvení preparátů můžeme použít G, Q, R či C pruhování. V cytogenetické laboratoři ÚHKT se používá Wrightovo barvení, které odpovídá G-pruhům a je šetrné pro zachování morfologie chromozomů.

Podle výsledků klasického vyšetření je pak dále indukováno vyšetření molekulárně cytogenetické.

3.2 Molekulární cytogenetika

Většinu molekulárně cytogenetických metod představuje fluorescenční hybridizace in situ (FISH) a její modifikace. Tato technika je založena na schopnosti fluorescenčně značené jednořetězcové DNA sondy vázat se s komplementárními úseky cílové DNA, fixované na mikroskopickém preparátu. Umožňuje nám tak zjistit lokalizaci specifických sekvencí DNA. Využívá se v případech, kdy je nutno potvrdit nebo upřesnit výsledky klasické cytogenetické analýzy. Výhodou této metody je možnost rozboru buněk i v interfázi, což řeší možný problém nedostatečného počtu mitóz, a schopnost analýzy velkého množství materiálu.

3.2.1. Fluorescenční hybridizace in situ

Metoda FISH se provádí na nebarvených preparátech chromozomů, které byly zpracovány klasickými metodami. Prvním krokem této techniky je denaturace DNA chromozomů a značené DNA sondy při vysokých teplotách (65 až 75°C). Následuje hybridizace jednořetězcové chromozomové DNA se sondou při 37°C. Hybridizovat se ponechává 24 hodin. Poté dochází k odstranění nespecifických signálů působením formamidu nebo roztoku o nízké iontové síle za současné zvýšené teploty. Sonda se tímto odstraní z míst, ke kterým není úplně komplementární. Posledním krokem je detekce sondy.

Sondy mohou být centromerické, lokus – specifické nebo celochromozomové. Centromerické sondy hybridizují s repetitivními satelitními sekvencemi, které se nachází především v oblasti centromer a telomer. Využívají se k vyšetření aneuploidii či detekci chromozomů neznámého původu.

Lokus – specifické nebo-li genové sondy se váží na jedinečné sekvence DNA. Jsou proto vhodné k vyšetření mikroleccí, amplifikací nebo specifických translokací. U chromozomu 11 se využívají k označení přestaveb například MLL genu nebo genu pro cyklin D1. V obou případech jde u komerčně dodávaných sond firmy ABBOTT VYSIS o kombinaci dvou odlišně barevných sond. U MLL genu jedna sonda zahrnuje 350 kb dlouhý úsek obsahující proximální část MLL genu a sekvence umístěné centromericky od genu, druhá sonda zahrnuje distální část MLL genu a následující sekvence celkem o 190 kb (*viz příloha č.3*). V případě genu pro cyklin D1 (*viz příloha č.4*) je celý gen a distální sekvence přítomné v jedné sondě o 530 kb, zatímco druhá sonda obsahuje oblast o 700 kb proximálně od genu ve vzdálenosti 420 kb (<http://www.vysis.com>; stav k 2.5.2006). Nedošlo-li k přestavbám v těchto oblastech pozorujeme ve fluorescenčním mikroskopu fúzovaný signál obou sond.

Celochromozomové sondy obsahují množství chromozomových sekvencí a označují tedy celý chromozom. Slouží k detekci strukturálních odchylek a k identifikaci marker chromozomů.

Pro vizualizaci se sondy značí buď radioaktivně nebo neradioaktivně. Radioaktivní značení se provádí označením několika nukleotidů triciem nebo izotopy jódu a síry. K detekci se pak užívá autoradiografie. Nevýhodou tohoto značení je nejen nebezpečnost této metody, ale i poměrně dlouhá doba expozice. V současné době se nejčastěji používají sondy přímo značené pomocí fluorescenčních barviv fluorochromů. Při nepřímém značení se do DNA inkorporují biotinem nebo digoxigeninem značené nukleotidy. Nepřímá detekce pak

probíhá na základě imunofluorescenčních protilátek. Například pro biotin jde nejčastěji o avidin nebo streptavidin značené fluorescenční barvou.

3.2.2 Modifikace FISH

V současné době existuje řada modifikací FISH. Mezi nejčastěji používané patří CGH, mFISH a mBAND.

- *Komparativní genomová hybridizace (CGH)*

Tato metoda poskytuje přehled o změně počtu DNA sekvencí v buňkách nádorových tkání a mapuje tyto změny přímo na normálních chromozomech. Jako sondy zde slouží dvě různé celogenomové DNA (jedna normální, druhá aberantní), každá značená odlišnou barvou. Po hybridizaci jsou změny v nádorové DNA sledovány porovnáním intenzity signálu normální a nádorové DNA na jednotlivých lokusech metafázických chromozomů. Odhalí se tak rozdíly v počtu kopií nebo dávky konkrétního chromozomového úseku a to podle převládající barvy. Vyhodnocení je prováděno pomocí speciálně vyvinutých počítačových programů. Poměr obou signálů 1:1 představuje normální nález. Došlo-li k amplifikaci, bude hodnota barvy příslušného chromozomového úseku větší než 1. Šlo-li o delecii, bude hodnota menší.

Určitou variací dnes již klasické CGH je *microarray*, kdy sondy hybridizují s velkým počtem malých úseků genomu umístěných na destičce (čipu). Jednovláknové nukleové kyseliny mohou být upevněny na membráně (membránové šiky) nebo na skleněném podložním sklíčku (skleněné biočipy), pokrytém tenkou vrstvou chemicky reagujících látek, které uvolňují nebo nabízejí -OH, -NH₂ či -C=O skupiny pro pevné spojení s nukleovou kyselinou. U aktivních biočipů, kde je každá pracovní ploška ovládána zvlášť, lze místa vodivě spojit se zdrojem napětí a jeho regulací umožnit opakované použití, neboť záporným napětím lze molekuly vzorku uvolnit a odstranit.

- *Mnohobarevná FISH (mFISH)*

Metoda umožňuje rozlišit všech 22 párů autozomů i pohlavní chromozomy X a Y v jednom hybridizačním pokusu. Je založena na skutečnosti, že kombinatorním smícháním n počtu fluorochromů získáme 2^{n-1} různých barevných kombinací. Pro obarvení celého karyotypu tak stačí kombinace 5 fluorochromů. Výsledek je nutno hodnotit mikroskopem vybaveným příslušnými filtry. Dle intenzity signálu je softwarem přidělena každému typu

chromozomu jiná barva. Metoda se uplatňuje při výzkumu mnohočetných změn chromozomů.

Variantou mFISH je *spektrální karyotypování (SKY)*, kdy se místo filtrů používá spektrometr.

- *Mnohobarevné pruhování (mBAND)*

Tato metoda je podobně jako mFISH založena na kombinatorním značení 5 fluorochromy. Značíme takto ale pouze úseky jednoho chromozomu. Výsledkem je proto chromozom s různě barevnými pruhy, který je opět nutno vyhodnotit mikroskopem vybaveným příslušnými filtry. mBAND se využívá k detekci nejen delecí a inverzí, ale i k lokalizaci zlomových míst aberantního chromozomu.

4. ZÁVĚR

V současné době se cytogenetická analýza stala nedílnou součástí vyšetření všech hematologických onemocnění. Studium a identifikace chromozomových změn je nejen důležitá pro upřesnění diagnózy, určení stádia nemoci a průběhu léčby, ale i pro stanovení prognózy onemocnění a rozpoznání podstaty vzniku nádoru. Při přestavbách chromozomu 11 se stala nezbytnou částí analýzy detekce změn na dlouhém rameni chromozomu, které jsou vždy spojeny se špatnou prognózou.

U akutních leukemií postihují mutace nejčastěji MLL gen a oblast 11q23. MLL gen patří mezi onkogeny. Jeho charakteristickým rysem je velké množství fúzních partnerských genů a ještě větší počet zaznamenaných translokací. Časté jsou ale i amplifikace a delece genu.

U chronické lymfatické leukemie bývají mutacemi zasažené geny ATM (11q22.3-q23.1) a CCND1 (11q13). Gen ATM je řazen mezi nádorové supresorové geny. Jeho proteinem je serin/treoninová proteinkináza, která se uplatňuje v reakci buňky na ionizující záření. Mutace tohoto genu vede často k změně vazebného místa pro substrát či ATP. Mezi známé substráty této kinázy patří p53, BRCA1 a mnoho dalších proteinů účastnících se reparace DNA a regulace buněčného cyklu.

Gen CCND1 kóduje cyklin D1, který se účastní regulace buněčného cyklu. Přestavba genu bývá vždy spojena se sníženou dobou přežití nemocných.

Na krátkém rameni chromozomu je obvykle pozměněným genem NUP98 (11p15), jehož přestavby jsou charakteristické pro sekundární leukemie. Protein genu NUP98 je součástí nukleoporinového komplexu. Podobně jako MLL gen, má i gen NUP98 větší množství fúzních partnerských genů, které mají důležitou funkci ve vývoji organismu a mohou tak vést k vzniku leukemie.

V současnosti je přesnost a citlivost cytogenetického vyšetření dána především rozvojem molekulární cytogenetiky a jejích metod, díky nimž lze zjistit přítomnost aberací, které jsou pod rozlišovací schopností klasických cytogenetických metod.

5. CÍLE DALŠÍ PRÁCE

Ve své diplomové práci se zaměřím na detekci přestaveb MLL genu v buňkách kostní dřeně nemocných s akutní myeloidní leukémií. Vzhledem k tomu, že v literatuře jsou aberace MLL genu popisovány i u nemocných s normálním karyotypem, bude u všech nemocných s diagnózou AML provedeno vyšetření buněk kostní dřeně metodou FISH s lokus specifickou sondou pro MLL gen. Vyhodnocovány budou delece, amplifikace a přestavby tohoto genu. V případě nálezu přestavby MLL genu bude chromozomový partner v translokaci detekován metodou FISH s celochromozomovou malovací sondou, zvolenou na základě výsledku klasického cytogenetického vyšetření. Komplexní přestavby karyotypu budou analyzovány metodou mnohobarevné FISH. Cytogenetické nálezy budou korelovány s klinickým stavem nemocných, prognózou a průběhem onemocnění.

6. SEZNAM LITERATURY

1. **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 Genetics and Cytogenetics* 161: 110-115.
2. **Ayton P, Cleary M** (2001): Molecular mechanisms of leukemogenesis mediated by MLL fusion proteins. *Oncogene* 20: 5695-5707.
3. **Bergh A**, Emanuel B, Zelderen-Bhola S, Smetsers T, Soest R, Stul M, Vranekx H, Schuurin E, Hagemeierr A, Klun P (2000): A DNA probe combination for improved detection of MLL/11q23 breakpoints by double-color interphase FISH in acute leukemias. *Genes, chromosomes & cancer* 28: 14-22.
4. **Bernerd OA, Berger R** (1995): Molecular basis of 11q23 rearrangements in hematopoietic malignant proliferations. *Genes, chromosomes & cancer* 13:75-85.
5. **Bloomfield CD**, Archer KJ, Mrozek K, Lillington DM, Kaneko Y, Heal DR, Dal Cin P a Rainmondi SC (2002): 11q23 balanced chromosome aberrations in treatment – related myelodysplastic syndromes and acute leukemia: report from an international workshop. *Genes, chromosomes & cancer* 33: 362-378.
6. **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.
7. **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.
8. **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.* Oct 5; 24 (19): 3411-3422.
9. **Daser A, Rabbitts TH** (2004 May1): Extending the repertoire of the mixed-lineage leukemia gene MLL in leukemogenesis. *Genes Dev* 18 (9): 965-974.
10. **Dreyling MH**, Martinez-Climent JA, Zheng M, Mao J, Rowley JD, Bohlander SK (1996): The t(10;11)(p13;q14) in the U937 cell line results in the fusion of the AF10

- gene and CALM , encoding a new member of the AP-3 clathrin assembly protein family. Proc Natl Acad Sci USA 93: 4804-4809.
11. **Gilbert F** (1983): Chromosomes, genes and cancer: A classification of chromosome abnormalities in cancer. JNCI 71: 1107-1114.
 12. **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.
 13. **Hess JL** (Oct 2004): MLL: a histone methyltransferase disrupted in leukemia. Trends in molecular medicine Vol.10 No.10:500-507.
 14. **Chissoe SL, Bodenteich A, Wang YP, Burian D, Clifton SW, Crabtree J, Freeman A, Iyer K, Jian L** (1995): Sequence and analysis of the human ABLgene, the BCR gene, and regions involved in the Philadelphia chromosomal translocation. Genomics 27(1): 67-82.
 15. **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.
 16. **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 Genetics and Cytogenetics 162: 179-182.
 17. **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.
 18. **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 29; 97(5): 2145-2150.
 19. **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.
 20. **McCabe NR, Burnett RC, Gill HJ, Thirman MJ, Mbanngkollo D, Kipiniak M, van Melle E, Ziemin-van der Poel S, Rowley JD, Diaz MO** (1992): Cloning of c DNAs of the

- MLL gene that detect DNA rearrangements and altered RNA transcripts in human leukemic cells with 11q23 translocations. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 11794-11798.
21. **Meyer C**, Schneider B, Reichel M, Angermueller S, Strehl S, Schnittger S, Schoch C, Jansen M, Dongen J, Pieters R, Haas O, Dingermann T, Klingebiel T, Marschalek R (2005 Jan): Diagnostic tool for the identification of MLL rearrangements including unknown partner genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 11; 102 (2): 449-454.
 22. **Michalová K** (1999): Úvod do lidské cytogenetiky. Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví , Brno.
 23. **Morman A**, Clark R, Farrel DM, Hawkins JM, Martineau M, Secker-Walker LM (1996): Probes for hidden hyperploidy in acute lymphoblastic leukemia. *Genes, chromosomes & cancer* 16: 40-45.
 24. **Morman A**, Raimindi S, Pui CH, Baruchel A, Biondi A, Carrol A, Fostier E, Gaynon P, Harbott J, Harms D, Heerema N, Pieters R, Schrape M, Silverman L, Vilmer E, Harrison C (2005 Apr): No prognosis affect of additional chromosomal abnormalities in children with acute lymphoblastic leukemia and 11q23. *Leukemia* 19 (4): 557-563.
 25. **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
 26. **Nowell PC a Hungerford DA** (1960): A minute chromosome in human granulocytic leukemia. *Science* 132: 1497-1499.
 27. **Poppe B**, Cauwelier B, Van Limbergen H, Yigit N, Philippe J, Verhasselt B, De Paepe A, Benoit Y, Speleman F (2005 Sep): Novel cryptic chromosomal rearrangements in childhood acute lymphoblastic leukemia detected by multiple color fluorescent in situ hybridization. *Haematologica* 90 (9): 1179-1185.
 28. **Poppe B**, Vandesompele J, Schoch C, Lindvall Ch, Mrózek K, Bloomfield CD, Beverloo HB, Michaux L, Dastugue N, Heren Ch, Živit N, Paepe A, Hagemeyer A, Speleman F (2004 Jan): Expression analyse identify MLL as prominent target of 11q23 amplification and support an etologic role for MLL gain of function in myeloid malignancies. *Blood* (1) 103: 229-235.
 29. **Rabbitts TH** (1994): Chromosomal translocations in human cancer. *Nature* 372:143-149.
 30. **Rowley JD** (1973): Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* 243 (5405): 290-293.

31. **Rowley JD** (1993): Rearrangements involving chromosome band 11q23 in acute leukemia. *Cancer biology* 4: 377-385.
32. **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.
33. **Slany RK** (Aug 2005): When epigenetics kills: MLL fusion proteins in leukemia. *Hematological Oncology* 23:1-9.
34. **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.
35. **Vonka V a kol.** (Brdička R, Elleder M, Hradec J, Hynie S, Krčmář K, Mareš V, Musil J, Neuwirt J, Šterzl J) (1992): *Kapitoly z molekulové biologie*. H&H, Praha.
36. **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.
37. **Wells RA, Catzavelos C, Kamel-Reid S** (1997 Sep): Fusion of retinoic acid receptor alpha to NuMA, the nuclear mitotic apparatus protein, by a variant translocation in acute promyelocytic leukaemia. *Nat Genet.* 17(1):109-113.
38. **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 Jul): 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.
39. **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*^{-/-}-T-cell lymphomas. *Hum Mol Genet.* Sep 15; 14 (18): 2671-2684.
40. **Ziemin-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.

7. SEZNAM PŘÍLOH

Příloha č. 1 Přehled translokací genu MLL

Příloha č. 2 Přehled translokací genu NUP98

Příloha č. 3 Sonda pro MLL gen

Příloha č. 4 Sonda pro CCND1 gen

Příloha č. 5 Příklad vyšetření aberace chromozomu 11

PŘÍLOHA Č. 1 Přehled translokací MLL genu

Aberace	Partnerský gen	Funkce	Nemoc
t(1;11)(p32;q23)	AF1p	signální transdukce	ALL
t(1;11)(q21;q23)	AF1q	růstový faktor	AML
t(2;11)(p21;q23)	neznámý	-	MDS, AML, ALL
t(2;11)(q11;q23)	LAF4	transkripční aktivátor	MDS, B-ALL
t(3;11)(p21;q23)	AF3p21	signální transdukce ?	sekundární AML
t(3;11)(q21;q23)	SELB	elongační faktor	
t(3;11)(q25;q23)	GMPS	role v buněčném dělení	sekundární AML typ M4
t(3;11)(q28;q23)	LPP	signální transdukce	sekundární AML
t(4;11)(p12;q23)	AF4p12	?	sekundární ALL
t(4;11)(q12;q23)	MIFL	?	
t(4;11)(q21;q23)	AF4	transkripční aktivátor	AML, ALL
t(4;11)(q21;q23)	SEPT11	?	
t(4;11)(q35;q23)	ArgBP2	?	
t(5;11)(q31;q23)	AF5q31	transkripční aktivátor	AML, ALL, CLL
t(5;11)(q31;q23)	GRAF	GTPázový aktivační protein pro Rho	CML, AML, ALL
t(6;11)(q15;q23)	SMAP1	interakce mezi stromálními a hematopoetickými buňkami	
t(6;11)(q21;q23)	AF6q21	transkripční faktor	AML
t(6;11)(q27;q23)	AF6	signální transdukce	AML
t(7;11)(q21;q23)	CDK6	cyklin-dependentní kináza	
t(9;11)(p22;q23)	AF9	transkripční aktivátor	AML
t(9;11)(q34;q23)	AF9q34	negativní regulátor RAS proteinů	AML-M5
t(9;11)(q34;q23)	FBP17	udržování telomer	AML
t(9;11)(q34;q23)	FNBP1	?	
t(10;11)(p11.2;q23)	ABI1	růstový inhibitor, signální transdukce	AML
t(10;11)(p12;q23)	AF10	transkripční aktivátor	AML
t(10;11)(q21;q23)	CXXC6	metyltransferáza	
t(11;11)(q21;q23)	PICALM	integrace signálu	
t(11;11)(q23-25;q23)	CBL	tyrozin-kinázová signalizační dráha	
t(11;11)(q23.3;q23)	LARG	guaninový výměnný faktor	
t(11;11)(q23;q24)	TIRAP	?	
t(11;12)(q23;q13)	CIP29	role v transkripci DNA	MLL
t(11;14)(q23.3;q24)	h-gephyrin	Gly-receptor asociovaný protein	AML
t(11;15)(q23;q14)	AF15q14	růstový represor	AML typ M4
t(11;15)(q23;q14)	MPFYVE	signální transdukce ?	
t(11;15)(q23;q15)	AF15	?	
t(11;16)(q23;p13)	CBP	transkripční koaktivátor	sekundární AML a MDS
t(11;17)(q23;p13)	GAS7	růstový specifický protein	AML, ALL
t(11;17)(q23;q12)	ACACA	?	
t(11;17)(q23;q12-21)	LASP1	regulace dynamiky aktinu	AML-M4
t(11;17)(q23;q21)	RARa	maturace hematopoetických buněk	AML-M5
t(11;17)(q23;q21)	AF17	transkripční faktor	AML
t(11;17)(q23;q25)	SEPT9	organizace cytoskeletu	sekundární i de novo AML, MDS, ALL

Aberace	Partnerský gen	Funkce	Nemoc
t(11;18)(q23;q23)	neznámý	-	
t(11;19)(q23;p13)	EEN	signální transdukce ?	AML
t(11;19)(q23;p13)	MYOF1	?	
t(11;19)(q23;p13.1)	ELL	elongační faktor	ALL
t(11;19)(q23;p13.3)	ENL	transkripční faktor	ALL, CLL
t(11;20)(q23;q11)	MAPRE1	regulace dynamiky mikrotubulů	AML
t(11;21)(q23;q11)	neznámý	-	
t(11;22)(q23;q13)	P300	transkripční koaktivátor	sekundární AML
t(11;22)(q23;q11.2)	SEPT5	organizace cytoskeletu	AML
t(X;11)(q13;q23)	AFX1	transkripční faktor	AML, T-ALL
t(X;11)(q22;q23)	Septin2	organizace cytoskeletu	AML

? – funkce zatím neznámá

AML akutní myeloidní leukemie
CML chronická myeloidní leukemie
ALL akutní lymfatická leukemie
CLL chronická lymfatická leukemie
MDS myelodysplastický syndrom

Zdroj informací:

<http://www.infobiogen.fr/services/chromcancer/Anomalies/11q23ID1030.html>

PŘÍLOHA Č. 2 Přehled tranlokací genu NUP98

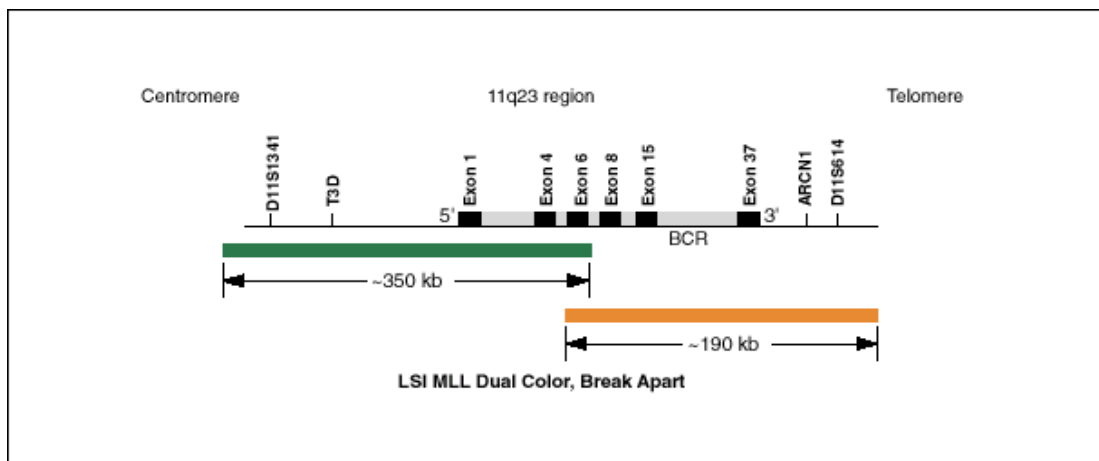
Aberace	Partnerský gen	Funkce	Nemoc
t (1;11) (q23;p15.5)	PRRX1	homeobox	1 případ sekundární AML
t (2;11) (q31;p15)	HOXD11	homeobox	de novo AML
t (2;11) (q31;p15)	HOXD13	homeobox	AML
t (3;11) (q12;p15)	neznámý		
t (4;11) (q21;p15.5)	RAP1GDS1	guaninový výměnný faktor	T-ALL, přežití < 18 měsíců po diagnóze
t (5;11) (q35;p15.5) většina s del(5q)	NSD1	SET doménu obsahující protein	AML
t (6;11) (q22;p15)	neznámý		
t (6;11) (q24;p15)	C6orf80	?	
t (7;11) (p14;p15)	HOXA11	homeobox	sekundární AML, MDS a de novo AML
t (7;11) (p15;p15)	HOXA9	homeobox	AML
t (7;11) (p15;p15)	HOX13	homeobox	AML
t (8;11) (p11;p15)	WHSC1L1(NSD3)	SET doménu obsahující protein	AML
t (9;11) (p22;p15.5)	LEDGF	transkripční koaktivátor	AML
t (9;11) (q34;p15)	PRRX2	homeobox	1 případ M4-AML
t (10;11) (q25;p15)	ADD3 (adducin)	organizace cytoskeletu	T-ALL, vzácná
t (11;12) (p15; q13)	HOXC11	homeobox	AML
t (11;12) (p15; q13)	HOXC13	homeobox	AML
t (11;17) (p15.5;q21)	neznámý		
t (11;20) (p15;q11)	TOP1	DNA topoizomeráza I	sekundární MDS a de novo AML
t (11;X) (p15; q28)	neznámý		

? – funkce zatím neznámá

AML akutní myeloidní leukemie
 CML chronická myeloidní leukemie
 ALL akutní lymfatická leukemie
 CLL chronická lymfatická leukemie
 MDS myelodysplastický syndrom

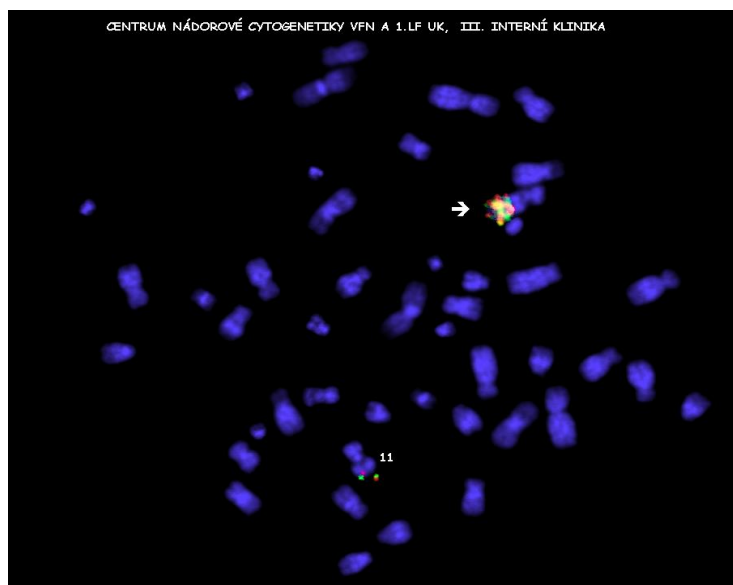
Převzato z článku: Analysis of translocations that involve the NUP98 gene in patients with 11p15 chromosomal rearrangements (KOBZEV a kol., 2004).

PŘÍLOHA Č. 3 Sonda pro MLL gen



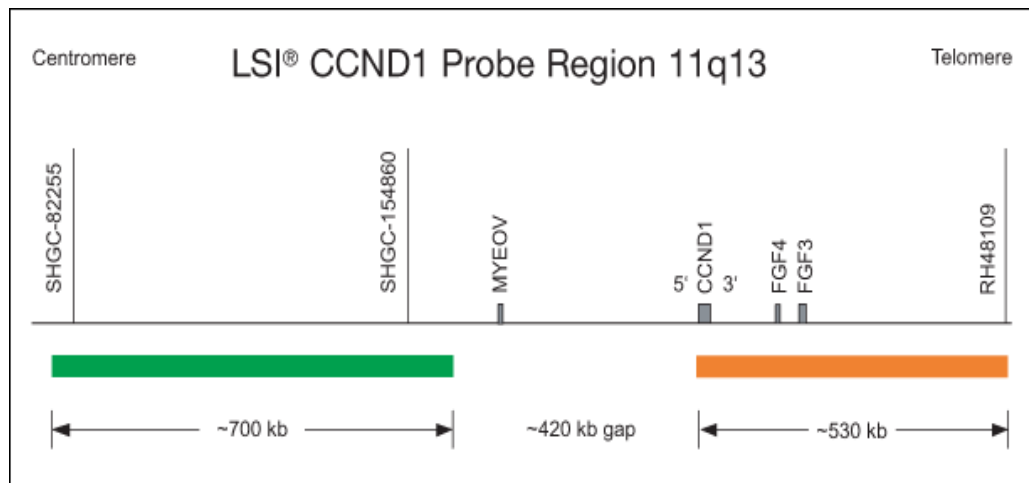
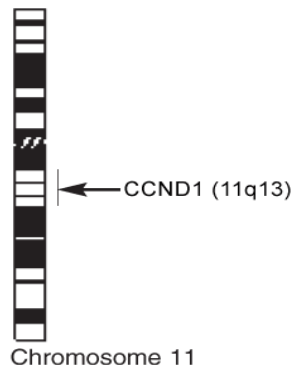
Převzato z <http://www.vysis.com>

Příklad užití sondy:



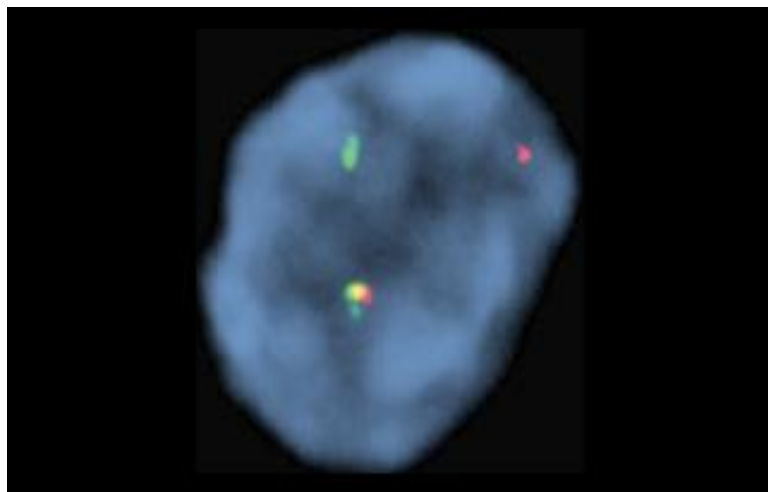
FISH analýza chromozomu 11 pomocí dvoubarevné sondy ABBOTT VYSIS pro MLL gen. Šipka ukazuje na mnohonásobnou amplifikaci genu. Dole normální chromozom 11. Obrázek byl pořízen v laboratoři Centra nádorové cytogenetiky VFN a 1.LF UK.

PŘÍLOHA Č. 4 Sonda pro CCND1 gen



Převzato z <http://www.vysis.com>

Příklad užití CCND1 sondy:



FISH analýza chromozomu 11 pomocí dvoubarevné sondy ABBOTT VYSIS pro CCND1 gen. Oddělený červený a zelený signál v horní části obrázku ukazují změny v oblasti genu. Fúzní signál v dolní části obrázku představuje normální chromozom 11.

Převzato z <http://www.vysis.com>

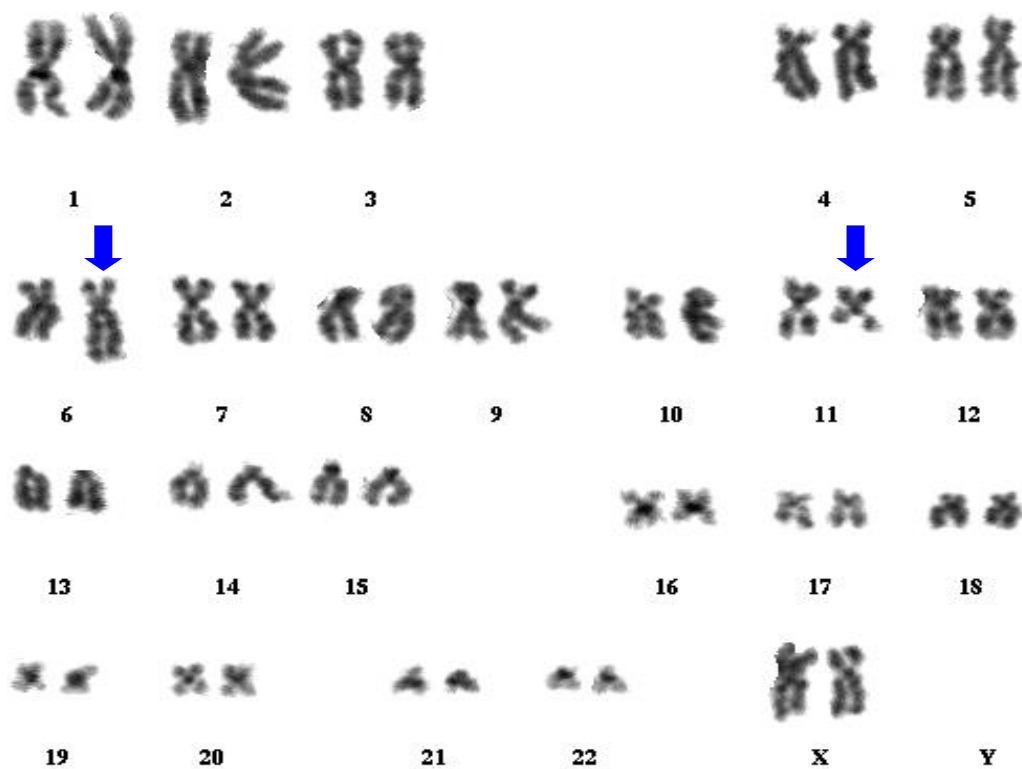
PŘÍLOHA Č. 5 Příklad vyšetření aberace chromozomu 11

Pacient: žena, 48 let.

Diagnóza: AML

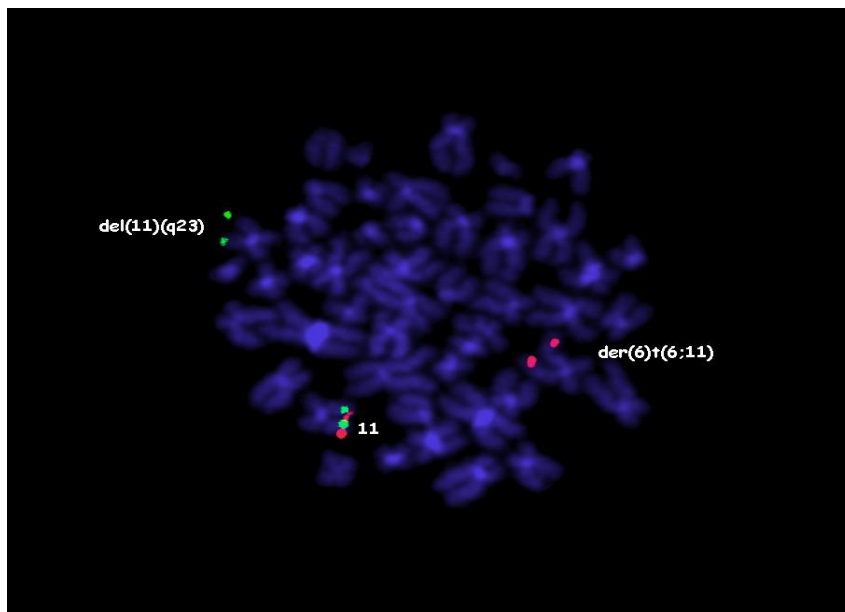
Karyotyp: 48,XX, der(6)t(6;11), t(10;17), +10, del(11)(q23), +17

• *Klasické cytogenetické vyšetření:*



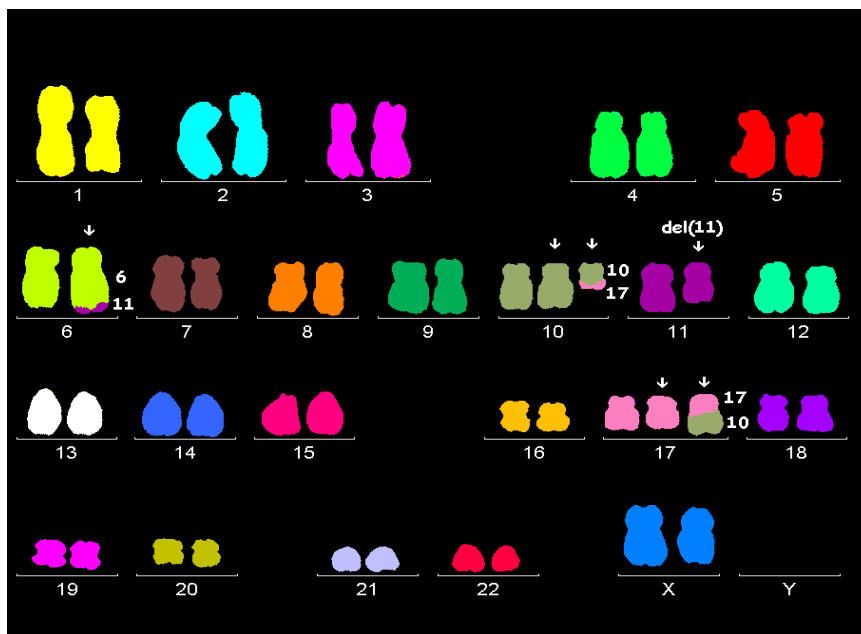
Výsledky klasického cytogenetického vyšetření, ke kterému bylo použito Wrightovo barvení chromozomů, odhalily nápadně delší dlouhá ramena chromozomu 6 a naopak značně kratší dlouhá ramena chromozomu 11 (postižené chromozomy jsou označeny šipkou).

- Molekulární cytogenetické vyšetření pomocí dvoubarevné MLL sondy VYSIS:



Vyšetření prokázalo delecii na chromozomu 11 (zelený signál vlevo nahoře) a translokaci této deletované části na chromozom 6 (červený signál vpravo). V dolní části obrázku je fúzní signál normálního chromozomu 11.

- Molekulární cytogenetické vyšetření pomocí mFISH



Výsledky mFISH analýzy potvrdily výsledky FISH s lokus specifickou sondou pro MLL gen a nově odhalily změny na chromozomech 10 a 17.

Obrázky byly pořízeny v laboratoři Centra nádorové cytogenetiky VFN a 1.LF UK.

