

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Molekulární biologie a biochemie organismů

Studijní obor: Speciální chemicko-biologické obory



**Lucie Sládková**

Chromosomové aberace u akutních leukémií dětského věku

Chromosomal aberrations in childhood acute leukemia

Bakalářská práce

Školitel: doc. RNDr. Zuzana Zemanová, CSc.

Praha, 2017

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Lucie Sládková

Ráda bych poděkovala své školitelce doc. RNDr. Zuzaně Zemanové, CSc., za odbornou pomoc a vedení při řešení bakalářské práce. Dále děkuji Prof. Ing. Kyře Michalové, DrSc., za možnost vypracování své práce na pracovišti Centra nádorové cytogenetiky ÚLBLD VFN a 1. LF UK.

Mé poděkování patří i RNDr. Libuši Lizcové, Ph.D., za zasvěcení do molekulárně-cytogenetických metod a cenné rady z oboru. Dále všem laborantkám, zejména Veronice Ticháčkové, za jejich ochotu a čas, který mi věnovaly při seznamování s metodou klasické cytogenetiky.

A v neposlední řadě své rodině a přáteli za podporu během mého studia.

## Abstrakt

Leukémie jsou nejčastějším nádorovým onemocněním, které se v dětském věku vyskytuje. Většina případů tvoří leukémie akutní, z nichž nejčastější je akutní lymfoblastická leukémie (ALL), druhou nejčastější formou je akutní myeloidní leukémie (AML). Jedním ze základních vyšetření při stanovení diagnózy je analýza karyotypu leukemických buněk, při které hledáme rekurentní chromosomové aberace. Tyto změny ve struktuře či počtu chromosomů lze nalézt až u 90 % nemocných a u většiny z nich je znám i jejich prognostický význam. U ALL jsou za prognosticky nejvýznamnější cytogenetické změny považovány nálezy tzv. vysoké hyperdiploidie (>50 chromosomů) a translokace  $t(12;21)(p13;q22)$ , které jsou spojené s dobrou prognózou, a dále translokace zahrnující gen *KMT2A* v oblasti 11q23 spojené se špatnou prognózou. U AML se k nejčastějším aberacím řadí  $t(8;21)(q22;q22)$ ,  $t(15;17)(q24;q21)$  a  $inv(16)(p13;q22)$ , které jsou považovány za ukazatel dobré prognózy. Významným prognosticky nepříznivým nálezem u AML jsou rovněž přestavby genu *KMT2A*, z nichž k nejčastějším patří translokace  $t(9;11)(q23;p13.1)$ . V dnešní době existuje mnoho možností, jak chromosomové aberace v leukemických buňkách detekovat. Z klasických cytogenetických metod se nejčastěji používá G-pruhování, které má nespornou výhodu v tom, že umožňuje zároveň pozorovat všechny chromosomy a chromosomové aberace přítomné v jedné buňce. Molekulárně-cytogenetické metody (FISH, mFISH, mBAND, aCGH/SNP atd.) umožňují s vysokou přesností analyzovat specifické změny, stanovit přesná místa chromosomových zlomů či určit původ marker chromosomů a významně tak doplňují výsledky získané při konvenční cytogenetické analýze.

**Klíčová slova:** akutní leukémie dětského věku, ALL, AML, chromosomové aberace, konvenční cytogenetická analýza, molekulárně cytogenetické metody

## **Abstract**

Leukemias are the most common cancer diseases in childhood. The majority of cases represent acute leukemias, the most common of which is acute lymphoblastic leukemia (ALL), the second most frequent subtype is acute myeloid leukemia (AML). One of the basic laboratory examinations at the time of diagnosis is the cytogenetic analysis of the karyotype of leukemic cells in which we are looking for the recurrent chromosomal aberrations. These changes in the structure or number of the chromosomes can be found in up to 90 % of patients and the exact prognostic significance is known for most of them. In ALL, the findings of high hyperdiploidy (>50 chromosomes) and translocation t(12;21)(p13;q22) are considered the most significant prognostic factor associated with good prognosis and translocations involving the *KMT2A* gene in the 11q23 region are associated with poor prognosis. In AML, the most frequent aberrations are t(8;21)(q22;q22), t(15;17)(q24;q21) and inv(16)(p13;q22) which are considered indicator of good prognosis. An important unfavourable prognostic finding in AML are the *KMT2A* gene rearrangements, the most common of which is the translocation t(9;11)(q23;p13.1). Nowadays, there are many ways to detect chromosomal aberrations in leukemic cells. G-banding is the most common method of classical cytogenetics, which has the great advantage because it allows simultaneous observation of all chromosomes and chromosomal aberrations present in one cell. Molecular cytogenetic methods (FISH, mFISH, mBAND, aCGH/SNP, etc.) allow detection of specific genetic aberrations, precise identification of chromosomal breakpoints and/or determination of the origin of marker chromosomes, and therefore significantly complement the results of conventional cytogenetic analysis.

**Key words:** childhood acute leukemias, ALL, AML, chromosomal aberrations, conventional cytogenetic analysis, molecular-cytogenetic methods

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

---

<i>ABL1</i>	Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1
<i>AFDN</i>	Afadin, adherens junction formation factor
<i>AFF1</i>	<i>AF4/FMR2</i> family member 1
ALL	Akutní lymfoblastická leukémie
AML	Akutní myeloidní leukémie
APL	Akutní promyeloidní leukémie
Array CGH	Komparativní genomová hybridizace na čípech
B-ALL	B-buněčná akutní lymfoblastická leukémie
BCR	Break cluster region
BCP-ALL	B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia
bZIP	Leucin zipper dimerizační doména
<i>CBFB</i>	Core-binding factor beta subunit
<i>CDKN2A</i>	Cyclin dependent kinase inhibitor 2A
<i>CDKN2B</i>	Cyclin dependent kinase inhibitor 2B
CGH	Komparativní genomová hybridizace
CML	Chronická myeloidní leukémie
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride
EFS	Event free Survival
<i>ETV6</i>	Ets variant gene 6
<i>FANCB</i>	Fanconi anemia complementation group B
<i>HLF</i>	<i>PAR</i> bZIP transcription factor
HTLV-1	Human T-cell Leukaemia/Lymphotropic virus type 1
<i>IgH</i>	Immunoglobulin heavy chain
ISCN	An International System for Human Cytogenetic Nomenclature
<i>KMT2A</i>	Lysine methyltransferase 2A
LOH	Loss of heterozygosity, ztráta heterozygotnosti
mBAND	Mnohobarevné pruhování
mFISH	Mnohobarevná fluorescenční hybridizace

<i>MLLT1</i>	<i>MLLT1</i> , super elongation complex subunit
<i>MLLT3</i>	<i>MLLT3</i> , super elongation complex subunit
<i>MLLT10</i>	Myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia; translocated to, 10
<i>MLLT11</i>	Myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia; translocated to, 11
<i>MYB</i>	<i>MYB</i> proto-oncogene, transcription factor
<i>MYC</i>	<i>MYC</i> proto-oncogene, bHLH transcription factor
<i>MYH11</i>	Myosin heavy chain 11
NGS	Next Generation Sequencing, sekvenování nové generace
<i>PBX1</i>	<i>PBX</i> homeobox 1
PCR	Polymerázové řetězové reakce
<i>PML</i>	Promyelocytic leukemia
<i>RARA</i>	Retinoic acid receptor alpha
RT-PCR	Reverzní polymerázové řetězové reakce
<i>RUNX1</i>	Runt related transcription factor 1
<i>RUNX1T1</i>	<i>RUNX1</i> translocation partner 1
SNP	Single-nucleotide polymorphisms
<i>STIL</i>	<i>SCL/TAL1</i> interrupting locus
T-ALL	T-buněčná akutní lymfoblastická leukémie
<i>TAL1</i>	<i>TAL</i> bHLH transcription factor 1, erythroid differentiation factor
<i>TCF3</i>	Transcription factor 3
<i>TFPT</i>	<i>TCF3</i> fusion partner
<i>TLX1</i>	T-cell leukemia homeobox 1
TSG	Tumor supresorové geny
<i>TRA</i>	T-cell receptor alpha locus
<i>TRB</i>	T-cell receptor beta locus
UPD	Uniparentální disomie

# OBSAH

---

1	Úvod .....	1
1.1	Cíle bakalářské práce .....	2
2	Etiologie akutních leukémií .....	3
3	Chromosomové aberace v nádorových buňkách.....	4
3.1	Strukturní aberace .....	4
3.2	Numerické aberace .....	5
3.3	Onkogeny .....	6
3.4	Nádorové supresorové geny .....	7
4	Chromosomové aberace u ALL.....	7
4.1	Strukturní aberace u ALL.....	8
4.2	Numerické aberace u ALL .....	12
5	Chromosomové aberace u AML.....	15
6	Metody detekce chromosomových aberací .....	18
6.1	Konvenční cytogenetická analýza .....	19
6.2	Molekulárně cytogenetické metody .....	22
7	Závěr.....	30
8	Seznam použité literatury .....	32



# 1 ÚVOD

---

Dětské akutní leukémie představují heterogenní skupinu maligních onemocnění krvetvorby. Obecně jsou leukémie nejčastější onkologická choroba u dětí ve věku 1-15 let a představují 30 % všech nádorových onemocnění. Dětské leukémie dělíme na základě morfologie na několik podtypů, které se liší v expresi různých genů a v molekulárních a chromosomových aberacích.

Nejčastějším typem je akutní lymfoblastická leukémie (ALL), která se vyskytuje až u 80 % případů leukémií a tvoří asi 25 % všech nádorů, ročně jí onemocní 65 dětí v České republice. Dalšími nejčastějšími podtypy maligních onemocnění krvetvorby v dětském věku jsou akutní myeloidní leukémie (AML) s podílem 15 % nemocných, chronická myeloidní leukémie (CML) s 2-3 % nemocných a nejvzácnější myelodysplastický syndrom (MDS), kterým může onemocnět 1-2 % dětských pacientů. Statisticky je léčba výrazně úspěšnější u ALL než u AML. U ALL je šance na vyléčení 70-90 % a šance na remisi převyšují 90 %, zatímco u AML je to pouze 40-50 % (Pui a Evans 1998), (Pui 2000), (Creutzig a kol. 2001), (Starý, Gajdos a kol. 2003).

Leukémie se řadí mezi klonální onemocnění, má tedy původ v jedné buňce. Její evoluční vývoj je dán hromaděním mutací v jednom buněčném klonu, což znamená, že její heterogenitu určuje evoluční výběr dominantních aberantních klonů. Z klinického hlediska nezáleží jen na konkrétním typu klonu, ale i na mutacích, jež vzniknou v průběhu doby, než se nemoc projeví, diagnostikuje a začne léčit. Čím delší je tato prodleva, tím je větší pravděpodobnost, že dojde ke vzniku dalších mutací, které mohou zapříčinit rezistenci k určitým typům chemoterapie, což zásadně ztěžuje léčbu těchto nemocných (Greaves 2002).

Podle údajů v odborné literatuře existují dvě teorie vzniku leukemických onemocnění. V prvním případě iniciální mutace proběhne až v pozdějších stádiích hematopoézy a transformované buňky se již nemění. U druhého modelu se předpokládá, že iniciální mutace proběhne již v pluripotentní hematopoetické kmenové buňce, která se pod vlivem onkogenu diferencuje a vzniká konkrétní typ leukémie (Sverre a Mitelman 2009).

Téma, týkající se obecně chromosomových aberací u dětských akutních leukémií jsem si vybrala proto, že bych se později v diplomové práci ráda podrobněji věnovala genetickým změnám v buňkách kostní dřeně u dětí s T-ALL. U ALL je nejvíce prostudován její častější subtyp, tj. B-ALL, u kterého již byla popsána celá řada chromosomových aberací a genetických změn s jasným prognostickým významem, což v posledních letech vedlo k významným léčebným úspěchům. Podrobnější analýza genetické podstaty T-ALL by tak rovněž mohla přinést lepší výsledky v diagnostice a subklasifikaci tohoto onemocnění a tím přispět i k vyšší úspěšnosti léčby.

## **1.1 CÍLE BAKALÁŘSKÉ PRÁCE**

Cílem mé bakalářské práce je sestavit ucelený přehled nejdůležitějších rekurentních chromosomových aberací v buňkách kostní dřeně u dětí s akutními leukémiemi, zaměřit se zejména na jejich frekvenci, typ, klinický význam a dále představit cytogenetické a molekulárně cytogenetické metody, které jsou v současné době k detekci chromosomových aberací v nádorových buňkách rutinně využívány a porovnat jejich výhody a nevýhody při diagnostice hematologických malignit.

## 2 ETIOLOGIE AKUTNÍCH LEUKÉMIÍ

---

Na vzniku leukémie se může podílet celá řada různých vnějších i vnitřních faktorů. Podle epidemiologických důkazů lze za vnější získané faktory podílející se na vzniku některých subtypů leukémií nebo lymfomů u dětí i dospělých považovat ionizující záření, chemikálie (např. benzen), viry (HTLV-1, virus Epstein-Baarové) a bakterie (*Helicobacter pylori*) (Greaves 2002).

Existují dvě hypotézy, že se na rozvinutí dětské ALL mohou podílet neobvyklé reakce na běžné infekce. První říká, že je to dáno mobilitou a míšením populace. Konkrétně, že jsou v dnešní době děti vystavovány novým typům onemocnění, na které nejsou připraveny (Kinlen 1995). Druhá, že ALL u dětí může propuknout kvůli nedostatečně vyvinutému imunitnímu systému, který nebyl vystaven adekvátnímu množství infekcí pro správný rozvoj. Pak nastává problém i u běžných infekcí, protože si s nimi tělo nedokáže poradit a reaguje neobvykle (Greaves 1997).

K vnitřním faktorům, které mohou přispět ke vzniku akutních leukémií, patří získání genových mutací a chromosomových aberací.

Podle některých autorů je velmi pravděpodobné, že dětské leukémie vznikají již prenatálně. Důkaz poskytují výsledky z novorozeneckých screeningů založených na vyšetření DNA získané z kapky novorozenecké krve archivované na tzv. Guthrieho kartách. Při těchto retrospektivních studiích byly s využitím metody PCR, specifické pro určitou genovou fúzi, detekovány fúze stejných úseků genů jak při screeningu tak při diagnostickém vyšetření. Studie britských autorů založená na použití Guthrieho karet například ukázala, že všechny kojenecké leukémie (tzn. leukemie diagnostikované u dětí mladších jednoho roku) s přestavbou *KMT2A* genu, všechny dětské leukémie (tzn. leukemie diagnostikované u dětí ve věku 2-12 let) s fúzním genem *ETV6/RUNX1* a zhruba polovina případů AML s translokací t(8;21)(q22;q22) jsou prenatálního původu (Greaves 2002).

## 3 CHROMOSOMOVÉ ABERACE V NÁDOROVÝCH BUŇKÁCH

---

Charakteristickým znakem nádorových buněk jsou chromosomové abnormality. Chromosomové aberace v nádorových buňkách se řadí mezi změny získané, protože vznikají v průběhu života člověka. Tyto změny mají klonální charakter, tzn. že se vyskytují pouze v některých tkáních nebo buněčných klonech, což je odlišuje od změn vrozených (konstitučních). Ty jsou obvykle přítomny ve všech buňkách těla a jsou spjaty s geneticky podmíněnými syndromy (např. Downův syndrom) (Thompson a Compton 2011).

Chromosomové aberace v nádorových buňkách dělíme na balancované a nebalancované. U balancovaných aberací nedochází ke ztrátám či zisku genetického materiálu, ale pouze k jeho přemístění. Příkladem jsou inverze a reciproké translokace. U nebalancovaných aberací dochází ke změnám v obsahu genetického materiálu. Může se jednat o ztráty (delece, nereciproké translokace, monosomie) nebo naopak zisk (duplikace, amplifikace, trisomie, polyploidie) (Gilbert 1983).

Chromosomové aberace dělíme na strukturní a numerické podle toho, zda dochází ke změně v počtu chromosomů či jejich struktuře.

### 3.1 STRUKTURNÍ ABERACE

Častým nálezem u hematologických malignit jsou strukturní změny chromosomů. Mezi strukturní aberace patří různé přestavby chromosomů nebo jejich částí. Řadíme sem translokace, delece, duplikace/amplifikace, inverze, isochromosomy a další. Při translokacích se z chromosomu oddělí segment a přemístí se na jiný chromosom, což způsobuje změnu pozice genů. U translokace rozlišujeme dva hlavní typy: reciproké nebo nereciproké. U leukémií je významný zejména nález reciprokových (tj. balancovaných) translokací, u kterých dochází k vzájemné výměně dvou nebo více částí nehomologních chromosomů. Reciproké translokace jsou považovány za jednu z hlavních příčin vzniku leukémií, přičemž často stačí pouze jedna aberace k rozvoji nemoci (Mitelman, Johansson a Mertens 2007). Mohou se ale vyskytovat i nereciproké (tj. nebalancované) translokace, při kterých dochází k zisku či ztrátě genetického materiálu. Jejich výsledkem je parciální trisomie jednoho z translokovaných

chromosomů a parciální monosomie druhého. Translokace jsou často specifické pro konkrétní subtyp leukémie (Nambiar, Kari a Raghavan 2008). Delece nastává, když chromosomu chybí určitý segment. Dělí se na terminální (součástí aberace je terminální část chromosomového ramene) a intersticiální (součástí je střed chromosomového ramene). Jako duplikace či amplifikace se označuje stav, kdy jsou přítomny dvě a více kopií určitého genu nebo DNA segmentu na konkrétním chromosomu. Velké delece a duplikace mohou být studovány klasickými cytogenetickými metodami, malé jsou však těmito metodami velmi špatně detekovatelné a většinou se u nich přistupuje k molekulárně-cytogenetické analýze. Inverze vzniká tak, že dojde současně ke dvěma zlomům na jednom chromosomu a část chromosomu se otočí o 180°, výsledkem je, že daný úsek obsahuje geny v obráceném pořadí. Isochromosomy vznikají zlomem na dvou homologních chromosomech a následnou fúzí sesterských chromatid příslušného chromosomu. Nově vzniklý chromosom je pak tvořen materiálem z krátkých či dlouhých ramen (Michalová 1999), (Nussbaum, Willard a McInnes 2004), (Mitelman, Johansson a Mertens 2007), (Thompson a Compton 2011).

### **3.2 NUMERICKÉ ABERACE**

Numerické aberace dělíme podle toho, zda postihují celou chromosomovou sadu (polyploidie) nebo jednotlivé chromosomy (aneuploidie). Pojem polyploidie je používán pro vyjádření modálního počtu chromosomů, který vznikl znásobením celé haploidní chromosomové sady. Jako aneuploidní se označuje takový počet chromosomů, který není celým násobkem haploidní chromosomové sady. Mezi aneuploidní aberace řadíme změny, při kterých jsou zmnoženy jednotlivé chromosomy v chromosomové sadě (trisomie, tetrasomie atd.) nebo ty, u nichž dochází ke ztrátám jednotlivých chromosomů (monosomie). Aneuploide často vzniká jako důsledek poruch při mitóze, např. při špatném rozchodu chromosomů do dceřiných buněk (nondisjunkce) a je způsobena chromosomovou nestabilitou (chromosomal instability-CIN) (Lengauer, Kinzler a Vogelstein 1997). Hyperdiploidní buněčná linie obsahuje buňky s více než 46 chromosomy. Naopak hypodiploidní linie je ta, kde je přítomno

méně než 45 chromosomů (Nussbaum, Willard a McInnes 2004), (Sverre a Mitelman 2009), (Thompson a Compton 2011).

### 3.3 ONKOGENY

Při vzniku nádorového procesu hraje významnou roli skupina genů, které jsou souhrnně označovány jako onkogeny. Jedná se obvykle o regulační geny, jejichž produkty jsou zodpovědné za iniciaci a regulaci buněčné proliferace a diferenciaci. Samotné geny i jejich produkty mají onkogenní potenciál. Inaktivní formu těchto genů označujeme jako protoonkogeny a vyskytují se ve zralých buňkách, kde již nedochází k mitóze. V určitých případech dochází k jejich zpětné reaktivaci na onkogeny v důsledku bodové mutace, chromosomové přestavby nebo genové amplifikace, což způsobuje jejich zvýšenou expresi. Tím dojde k hyperstimulaci a nadměrné proliferaci buněk. Protože jsou změny zodpovědné za reaktivaci onkogenů řazeny mezi dominantní, stačí mutace pouze jedné alely, aby došlo k narušení rovnováhy buněčného cyklu. Největší roli při aktivaci onkogenů hrají strukturní aberace, zejména translokace, inzerce a inverze, což bylo potvrzeno lokalizací různých onkogenů v rekurentních zlomových místech nebo v jejich blízkosti (Friend, Dryja a Weineberg 1997). Bylo prokázáno, že v důsledku chromosomových zlomů či fúzí může dojít k aktivaci onkogenů a následně k tumorigenezi. Zatím však není přesně známo, zda jsou tyto přestavby přímo zodpovědné za vznik nádorů nebo jsou pouze výsledkem nesprávných oprav DNA či chyb při segregaci chromosomů během mitózy (Thompson a Compton 2011).

Při chromosomových translokacích mohou vznikat fúzní geny, které kódují nové proteiny. Příkladem je vznik *BCR/ABL1* genu, který je výsledkem translokace  $t(9;22)(q34;q11)$  (tzv. Ph chromosom). Fúzní gen *BCR/ABL1* kóduje protein, který má tyrozin-kinázovou aktivitu (Nowell a Hungerford 1960), (Secker-Walker, Craig, a další 1991), (Kurzrock, a další 2003), (Mitelman, Johansson a Mertens 2007).

Při strukturních přestavbách se onkogeny rovněž mohou dostat pod vliv silnějších promotorů, což způsobí jejich zvýšenou expresi. Příkladem je Burkittův lymfom, který je asociován s translokací  $t(8;14)(q24;q32)$ . Při této přestavbě je gen *MYC*, který normálně leží v pruhu q24 na dlouhých ramenech chromosomu 8 (Rabbitts

1994), translokován do oblasti na dlouhá ramena chromosomu 14 do oblasti 14q32, kde je lokalizován gen pro těžké řetězce imunoglobulinu (IgH) (Taub, a další 1982). Tím se gen *MYC* dostane pod vliv enhancerů imunoglobulinu a dochází ke zvýšení jeho exprese (Berger a Bernheim 1982), (Hoeltzer, a další 1996).

### **3.4 NÁDOROVÉ SUPRESOROVÉ GENY**

Další významnou skupinu nádorových genů představují tzv. tumor supresorové geny (TSG), u kterých dochází v důsledku genetických aberací k jejich inaktivaci. Ve zdravých buňkách mají tyto geny regulační funkci (zabraňují proliferaci buněk a podporují apoptózu/diferenciaci buněk). Mutace TSG jsou recesivního charakteru, což znamená, že musí dojít k inaktivaci obou alel, aby došlo k iniciaci maligní transformace. Tyto mutace mohou být často dědičné. Dle Knudsonova „two hit“ modelu se u jedinců s vrozenou mutací jedné alely onemocnění rozvine až po vzniku mutace druhé alely v somatických buňkách (Knudson 1971). Příkladem jsou mutace genu *TP53*. Aberace krátkých ramen chromosomu 17, kde je v oblasti 17p13 tento gen lokalizován, patří k nejčastějším genetickým změnám v nádorových buňkách a k jeho delecím či mutacím dochází u mnoha hematologických malignit i solidních nádorů (Zemanová 2007), (Morris a Chan 2015).

## **4 CHROMOSOMOVÉ ABERACE U ALL**

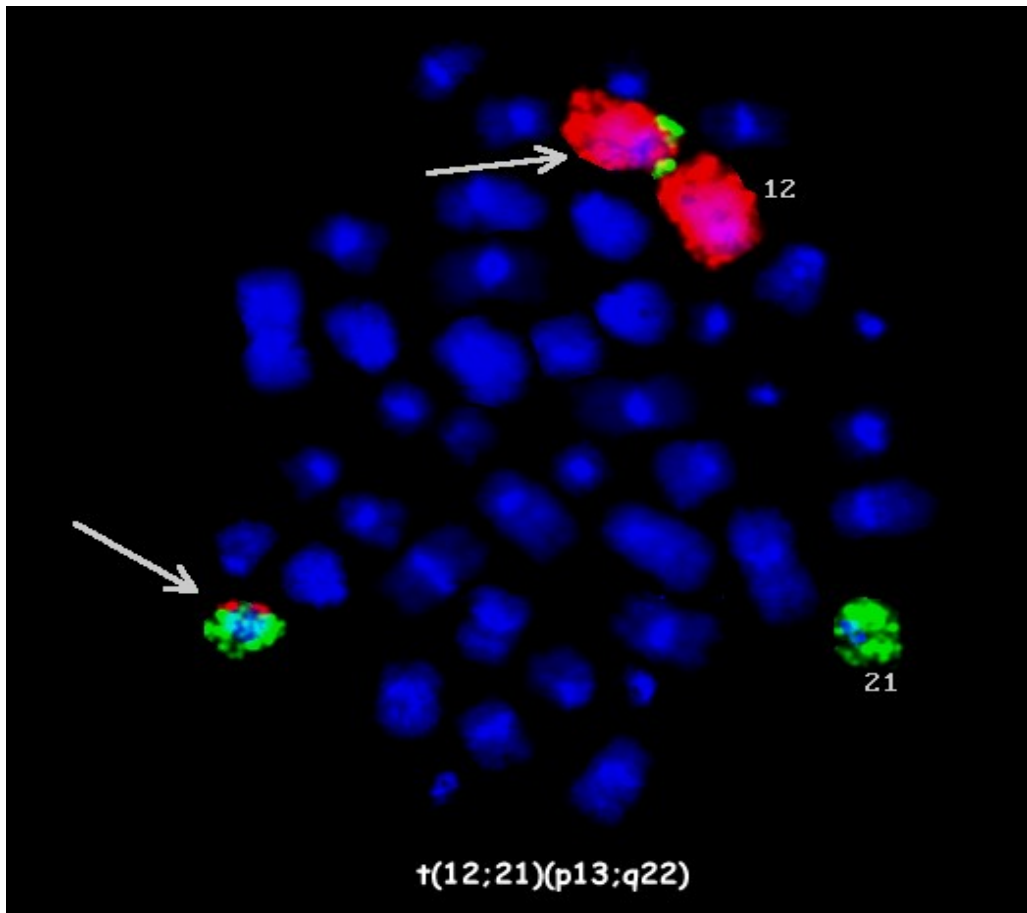
---

V buňkách kostní dřeně dětí s ALL byla popsána celá řada chromosomových abnormalit, mezi něž patří například translokace, aneuploidie, delece i amplifikace. Některé chromosomové aberace jsou specifické pro určité subtypy onemocnění a mohou být proto používány k upřesnění diagnózy a jako ukazatel účinnosti léčby. Přesto však dochází u přibližně 15-20 % dětí s ALL k relapsu onemocnění, přičemž nejdůležitějším rizikovým faktorem pro přežití po relapsu je délka první remise a lokalizace relapsu (Bailey, a další 2008).

#### 4.1 STRUKTURNÍ ABERACE U ALL

Nejčastější strukturní aberací u dětské ALL z B-buněk (B-ALL) je reciproká translokace  $t(12;21)(p13;q22)$ , při které dochází k fúzi genů *ETV6* (dříve *TEL*) a *RUNX1* (dříve *AML1*). Při této translokaci dochází k přestavbě velmi malých chromosomových segmentů, a proto ji ve většině případů nelze detekovat klasickými cytogenetickými metodami (kryptická změna). Translokace tak byla poprvé popsána až v roce 1994 díky zavedení metod FISH (Romana, Le Coniat a Berger 1994). Je velmi pravděpodobné, že k jejímu vzniku dochází již během prenatalního vývoje plodu a k rozvoji leukémie je pak nutná ještě další sekundární genetická událost, která vzniká postnatálně (Ford, Fasching, a další 2001), (Zuna, a další 2004). Při translokaci mezi chromosomem 12 a 21 dochází ke špatné opravě jejich zlomů a následnému spojení DNA obou chromosomů za vzniku fúzního genu *ETV6/RUNX1*. Přesná místa zlomů v *ETV6* a *RUNX1* genech lze detekovat pomocí long distance PCR, tato místa jsou vždy v nekódujících sekvencích DNA (intronech). Každý pacient má jedinečná nebo klon specifická místa zlomu, protože se zlomy vyskytují v rámci těchto genů náhodně (Greaves 2002). Bylo zjištěno, že u dvojčat se shodnou ALL se zlomy v *ETV6* a *RUNX1* genech vyskytují na stejných místech, obdobně jako u dvojčat se shodnou AML, kde jsou zlomy na stejných místech v genu *KMT2A* (dříve *MLL*) (Ford, Ridge, a další 1993), (Wiemels, Ford, a další 1999). Translokace  $t(12;21)$  se nejvíce vyskytuje u pacientů ve věku 3-6 let (Rubnitz, Downing, a další 1997). Dle retrospektivních i prospektivních studií je translokace  $t(12;21)$  popisována u 22-27 % dětí s pre-B ALL, což ji činí nejčastější specifickou chromosomovou aberací u dětských ALL. Podle mezinárodně platné WHO klasifikace (Swerdlow 2008) je nález  $t(12;21)$  spojen s velmi dobrou prognózou. Její včasná detekce v době stanovení diagnózy je proto velmi důležitá pro správné zařazení nemocných do rizikových skupin a volbu vhodné terapie.





Obrázek 1: Kryptická translokace  $t(12;21)(p13;q22)$  detekovaná metodou FISH s malovacími sondami. Při přestavbě dochází k přemístění velmi malých chromosomových segmentů, takže ji není možné detekovat konvenčním G-pruhováním. Převzato z databáze Centra nádorové cytogenetiky VFN a 1.LF UK.

Přestavby genu *KMT2A* jsou velmi časté u dětí s B-ALL mladších 1 roku L (až 75 % všech případů), popsány byly ale i u AML. Řadí se mezi strukturní chromosomové aberace a postihují oblast 11q23 na dlouhých ramenech chromosomu 11 (Rowley 1993). Tento nález je zejména u dětí provázen velmi špatnou prognózou (Pui, Crist a Look 1990). U přestaveb *KMT2A* genu na chromosomu 11 dochází k translokaci v oblasti BCR (break cluster region), přičemž vznikají chimerické geny způsobující expresi chimerických transkriptů (Zemanová, Michalová, a další 2001). U novorozenců nebo dětí s ALL do jednoho roku věku je nejčastěji přítomna translokace  $t(4;11)(q21;q23)$ , která se vyskytuje až u 40 % všech nemocných. Při této translokaci fúzí geny *KMT2A* a *AFF1* za vzniku chimerického genu *KMT2A/AFF1* na chromosomu 11, který je považován za nezávislý rizikový faktor. Pacienti s  $t(4;11)$  a nálezem fúzního genu *KMT2A/AFF1* jsou řazeni do prognosticky nepříznivé skupiny. Kromě translokace

t(4;11) byly u dětí s ALL popsány i další chromosomové aberace zahrnující *KMT2A* gen např. t(6;11)(q27;q23), t(9;11)(p21;q23), t(10;11)(p12;q23) a t(11;19)(q23;p13.3) - s jinými fúzními partnery (např. geny *AFDN* – dříve *AF6*, *MLLT3* – dříve *AF9*, *MLLT10* – dříve *AF10*, *MLLT1* – dříve *ELN*, atd.) (Secker-Walker a Participants 1998).

U dětí s B-ALL můžeme vzácně detekovat i reciprokou translokaci t(9;22)(q34;q11), která je popisována u asi 2-5 % těchto pacientů (Fletcher, Lynch, a další 1991), (Zemanová, Michalová, a další 2001), (Secker-Walker, Craig, a další 1991). Translokace (9;22) je u dětské ALL přítomna jako klonální změna a postihuje lymfoidní progenitorové buňky, které jsou zodpovědné za diferenciaci T-lymfocytů nebo B-lymfocytů. V důsledku t(9;22) vzniká hybridní gen *BCR/ABL1* s tyrozin-kinázovou aktivitou. Tento gen je typickým nálezem u nemocných s CML, u kterých se vyskytuje až v 95-98 % případů, ale vzácně může být detekován i u ALL. (Secker-Walker, Craig, a další 1991). Byly popsány 3 typy zlomů v oblasti BCR: major (M-bcr), minor (m-bcr) a mikro (mu-bcr). U pacientů s CML výrazně převažuje M-bcr, zatímco m-bcr je spojována s Ph-pozitivní ALL (Melo 1997). Nález translokace t(9;22) je u dětí vždy spojen s velmi špatnou prognózou. Děti s ALL a t(9;22) mají pouze 15-20 % pravděpodobností 5-tiletého přežití bez události (event free survival, EFS) a jsou proto řazeni do vysoce rizikové prognostické skupiny s nejintenzivnější protinádorovou terapií (Trka, a další 1999), (Avet-Loiseau 1999), (Fletcher, Tu, a další 1992).

Další strukturní aberací u dětských B-ALL je translokace t(1;19)(q23;p13), při které vzniká fúzní gen *TCF3/PBX1* (dříve *E2A/PBX1*) kódující aberantní protein, který má významnou úlohu v řízení v buněčného dělení (Hunger, a další 1991). Existují balancované (reciproké) a nebalancované (nereciproké) formy této translokace. U nebalancované formy je přítomen pouze derivovaný chromosom 19 – der(19)t(1;19), přičemž zůstávají zachovány oba homologní chromosomy 1 (tj. vzniká parciální trisomie 1q) (Secker-Walker, Berger, a další 1992), (Privitera, a další 1992). Podle údajů v literatuře mají pacienti s nebalancovanou formou translokace lepší prognózu, než pacienti s balancovanou formou (Harrison 2001).

Další vzácnou translokací zahrnující gen *TCF3* je t(17;19)(q22;p13). Dochází při ní k fúzi *TCF3* a leucin zipper dimerizační domény (bZIP) na *HLF* genu na chromosomu 17. Předpokládá se, že fúzní gen *TCF3/HLF* hraje roli v potlačování programované

buněčné smrti (Look 1998). Dále se může vyskytovat fúzní gen *TCF3/TFPT* (dříve *E2A/FB1*) vznikající při kryptické inverzi chromosomu 19, inv(19)(p13q13) (Boomer, a další 2000).

Abnormality dlouhého ramene chromosomu 6 (6q) jsou nalézány až u 7 % případů všech dětských ALL. Nejčastěji jsou to delecce del(6q) (Merup, a další 1998), které se často objevují jako sekundární změna při klonálním vývoji onemocnění. Delecce 6q jsou popisovány u dětí s ALL z B- i T-buněk. U B-ALL jsou detekovány přibližně v 5-15 % případů konvenční cytogenetickou analýzou a až ve 30 % případů metodou FISH. Prognóza se významně neliší od prognózy pacientů bez aberací 6q. U dětí s T-ALL patří del(6q) k nejčastějším cytogenetickým změnám a je nalézána u přibližně 10-20 % těchto pacientů, často v kombinaci s dalšími aberacemi (např. s přestavbami 14q11 nebo delecemi 9p). Prognóza dětí s T-ALL a del(6q) je podobná jako u T-ALL s normálním diploidním karyotypem. Předpokládá se, že v oblasti 6q by mohly být lokalizovány TSG, které se mohou podílet na vzniku leukemie. Zatím se ale žádný TSG gen v této oblasti nepodařilo přesně identifikovat (Harrison 2001). Ze známých proto-onkogenů je na dlouhých ramenech chromosomu v oblasti 6q23.3 lokalizován například gen *MYB* kódující transkripční faktor.

Abnormality krátkého ramene chromosomu 9 jsou podle literatury přítomny u 6-10 % případů dětské ALL. Tyto abnormality jsou považovány za nepříznivý rizikový faktor u B-ALL, zatímco děti s T-ALL a aberacemi 9p jsou řazeni spíše do skupiny se středním rizikem (Heerema, Sather, a další 1999). Jejich incidence u T-ALL je vyšší (cca 12,5 %) než u B-ALL (Secker-Walker 1997). Nejčastěji se jedná o delecce krátkých ramen chromosomu 9, která obvykle zahrnuje geny *CDKN2A* a *CDKN2B* (dříve *p16<sup>INK4A</sup>*, *p16<sup>INK4B</sup>* a *p14<sup>ARF</sup>*). Tyto geny hrají roli v regulaci buněčného cyklu. Gen *CDKN2A* byl pomocí molekulární analýzy nalezen u zhruba 80 % dětí s T-ALL a cca 20 % dětí s c/pre-B-ALL (Rubnitz, Behm, a další 1997). Horší prognózu mají nemocní s homozygotní formou delecce 9p (Kees, a další 1997).

Chromosomové aberace u dětí s T-ALL jsou zatím mnohem méně prozkoumané, než u B-ALL. V porovnání s B-ALL jsou specifické abnormality u T-ALL také méně významné při určování rizika onemocnění (Raimondi, Behm, a další 1988), (Pullen, a další 1999). Aberace nejčastěji zahrnují geny pro T-buněčné receptory (*TR* geny), tj. gen

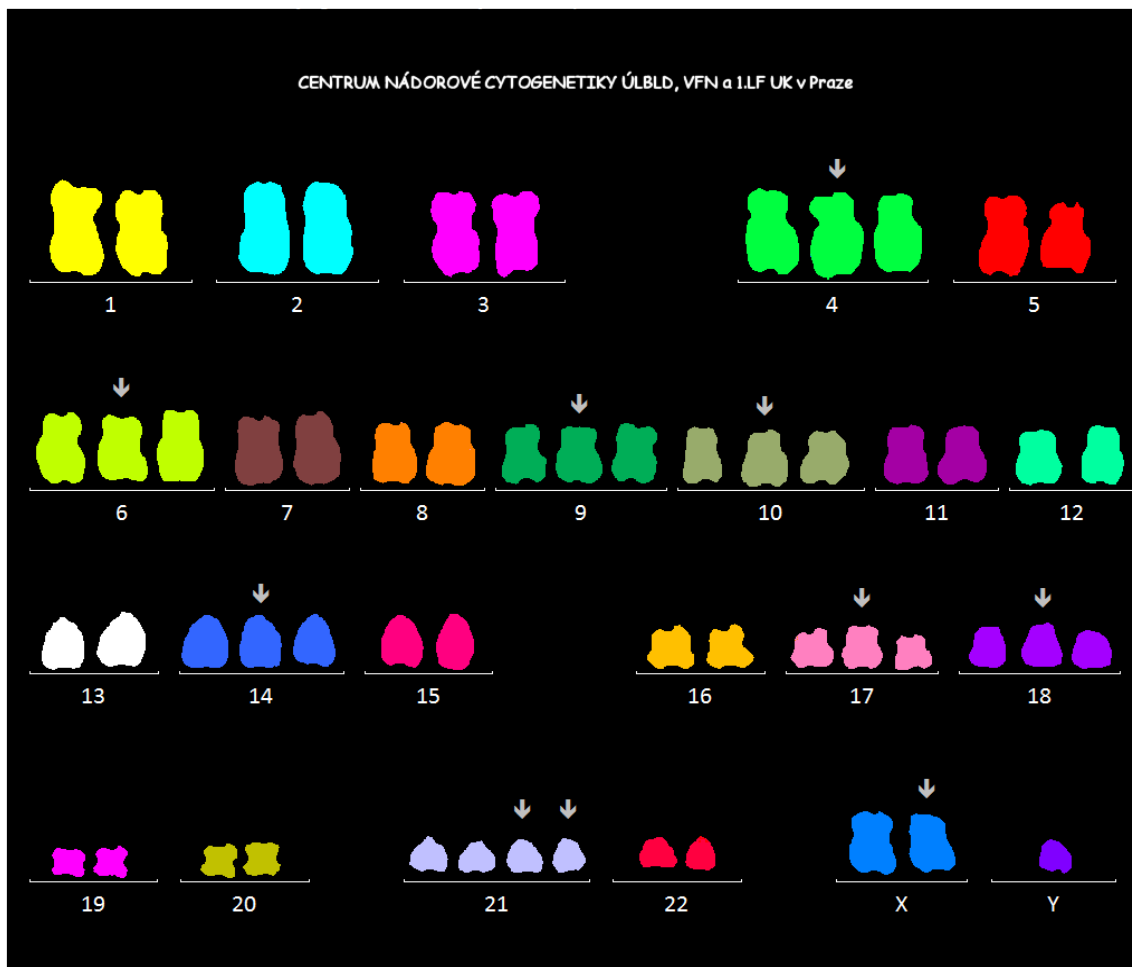
*TRA* (dříve *TCRA*) lokalizovaný v oblasti 14q11, gen *TRB* (dříve *TCRB*) v oblasti 7q32-q36 a gen *TRG* (dříve *TCRG*) v oblasti 7p15. Tyto aberace se objevují u více než 20 % všech pacientů s T-ALL (Raimondi, Behm, a další 1988), (Berger, Le Conait, a další 1990) a dochází při nich k přemístění tzv. „enhancer elementů“ *TR* genů do blízkosti některých onkogenů, čímž se mnohonásobně zvyšuje exprese onkogenů, podobně jako tomu je u přestaveb zahrnujících *IgH* gen v buňkách zralých B-ALL (Ferrando a Look 2000). U 4-7 % dětských T-ALL se vyskytují translokace t(10;14)(q24;q11) a t(7;10)(q35;q24), při kterých dochází k přemístění genu *TLX1* (dříve *HOX11*) do blízkosti genů *TRA* nebo *TRB*, čímž se rovněž zvyšuje jeho exprese (Harrison 2001), (Raimondi, Behm, a další 1988). U 3 % nemocných s T-ALL je možné detekovat translokaci t(1;14)(p33;q11), která zahrnuje gen pro transkripční faktor *TAL1*, jež ovlivňuje hematopoézu (Begley a Green 1999). Výsledkem translokace t(1;14) je vysoká exprese *TAL1*. Až u 30 % dětí s ALL dochází ke kryptické intersticiální delecí ~100 kb fragmentu DNA vedle lokusu *TAL1* (*TALd*) a kombinaci 5' konce genu *TAL1* s promotorem genu *STIL* (dříve *SIL*) (Pui, Raimondi, a další 1994). K aktivaci *TAL1* kvůli chybné expresi tohoto genu dochází až u 60 % všech T-ALL, výše jmenované abnormality tedy nejsou jedinou příčinou zodpovědnou za aktivaci *TAL1* (Bash, a další 1995).

## 4.2 NUMERICKÉ ABERACE U ALL

Hyperdiploidie je pojem označující klonální zmnožení jednoho či více chromosomů. Vyskytuje se u více než 35-45 % dětí s ALL, což ji činí nejčastějším cytogenetickým nálezem vedle strukturních přestaveb. Zmnožení jednotlivých chromosomů v hyperdiploidním klonu je nenáhodné a podle literatury nejčastěji postihuje chromosomy X, 4, 6, 8, 10, 14, 16, 18, 20 a 21 (Pui, Crist a Look 1990), (Moorman, Clark, a další 1996).

Pacienty dělíme do několika skupin podle modálního počtu chromosomů, jejich prognostický význam se liší. V tomto ohledu je prognosticky nejvýznamnější nález klonů s tzv. vysokou hyperdiploidíí (více než 50 chromosomů), pacienti s tímto nálezem mají více než 80 % pravděpodobnost pětiletého EFS (Trueworthy, a další 1992), (Secker-Walker, Lawler a Hardisty 1978). Včasná identifikace numerických aberací konkrétních chromosomů je u dětských ALL důležitá, protože podle některých autorů

se prognostický význam u jednotlivých chromosomů může lišit. Například trisomie chromosomu 5 je spojována s horší prognózou (Sandoval, a další 2000), kdežto zmnožení chromosomů 4, 10 (Harris, a další 1992) a 17 (Heerema, Sather, a další 2000) je spojováno naopak s lepší prognózou (Raimondi, Pui, a další 1996), (Mertens, Johansson a Mitelman 1996).



Obrázek 2: Karyotyp s tzv. vysokou hyperdiploidií detekovaný metodou mFISH u chlapce s B-ALL. Popis karyotypu podle ISCN: 56,XY,+X,+4,+6,+9,+10,+14,+17,+18,+21,+21. Převzato z databáze Centra nádorové cytogenetiky VFN a 1.LF UK.

Přestože je vysoká hyperdiploide obecně považována za ukazatel dobré prognózy, mohou v některých případech v hyperdiploidních klonech vznikat i strukturní změny, které prognózu negativně ovlivňují. Ke strukturním aberacím asociovaným s hyperdiploidií patří například duplikace 1q, která se vyskytuje až u 16 % případů (Moorman, Hawkins, a další 1997). Další popisované rekurentní aberace jsou del(6q), abnormality 9p a 12p a isochromosom i(17)(q10) (Martineu, a další 1996).

Nízká hyperdiploidie (tj. 47-49 chromosomů) se vyskytuje asi u 10-15 % dětí s B-ALL a je spojována se středně dobrou prognózou. Nejčastěji dochází k zisku chromosomů X, 8, 10 a 21. U 70 % pacientů nalézáme 47 chromosomů. Velmi často (až 50 %) jsou u těchto nemocných v karyotypu přítomny další strukturní aberace, nejčastěji přestavby 1q, 6q, 12p a 19p (Raimondi, Roberson, a další 1992), (Mrózek, Heerema a Bloomfield 2004).

Téměř tetraploidní karyotyp („near tetraploidy“; 84-100 chromosomů) je vzácný a vyskytuje se u přibližně 1 % případů dětské BCP-ALL (B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia), zřídka se dá nalézt i u T-ALL (Attarbaschi, a další 2006). Podle některých studií může být v karyotypu přibližně 6 % dětí s téměř tetraploidním počtem chromosomů přítomna kryptická translokace t(12;21)(p13;q22) (Raynaud, a další 1999). Ještě vzácnější je nález téměř triploidního počtu chromosomů („near triploidy“; 68-80 chromosomů), který se prognosticky výrazně neliší od běžné ALL, na rozdíl od téměř tetraploidního klonu, který je spojován se špatnou prognózou (Pui, Crist a Look 1990). Novější studie však ukazují, že nález téměř triploidního/tetraploidního karyotypu je prognosticky srovnatelný s nálezem vysoké hyperdiploide a může být tedy naopak spojován s dobrou prognózou (Raimondi, Zhou, a další 2006), (Lemez, a další 2010).

Nález hypodiploide, tj. méně než 46 chromosomů, je provázen horší prognózou. Nejčastější je nález 45 chromosomů, který pozorujeme až u 30 % nemocných s hypodiploidii. Děti s touto abnormalitou se obvykle řadí do skupiny se střední prognózou, záleží však na konkrétní aberaci (např. monosomie 7 má špatnou prognózu) (Heerema, Nachman, a další 1999), (Wetzler, a další 1999). Mezi hypodiploidie řadíme rovněž skupinu s téměř haploidním počtem chromosomů („near-haploidy“), tj. s počtem chromosomů pohybujícím mezi 23 a 29. Ačkoli je tento nález u dětských pacientů vzácný (incidence zhruba 0,7-2,4 %), je její nález i významný, protože je spojen s velmi špatnou prognózou (Pui, Williams, a další 1987), (Gibbons, a další 1991). U dětských ALL jsou nejvzácnější nálezy klonů s 33-44 chromosomy, které jsou popisovány u méně než 1 % případů. Nálezy s méně než 44 chromosomy jsou obecně spojovány se špatnou prognózou (Heerema, Nachman, a další 1999).

Zvláštním typem hypodiploidie je tzv. maskovaná hypodiploidie. V těchto případech dochází k endoreduplikaci původně haploidního klonu, čímž vzniká hyperdiploidní počet chromosomů. V karyotypu nemocných pak obvykle nalézáme buňky hypodiploidní současně se zdánlivě hyperdiploidními buněčnými klony. Maskovanou hypodiploidii lze při cytogenetické analýze detekovat podle toho, že se některé chromosomy (nejčastěji gonosomy a chromosomy 14 a 21) vyskytují ve čtyřech kopiích. Na rozdíl od pravé hyperdiploide je tento nález spojen s velmi špatnou prognózou a jeho správná interpretace je proto velmi důležitá (Ma, a další 1998), (Harrison, Moorman, a další 2004).

## 5 CHROMOSOMOVÉ ABERACE U AML

---

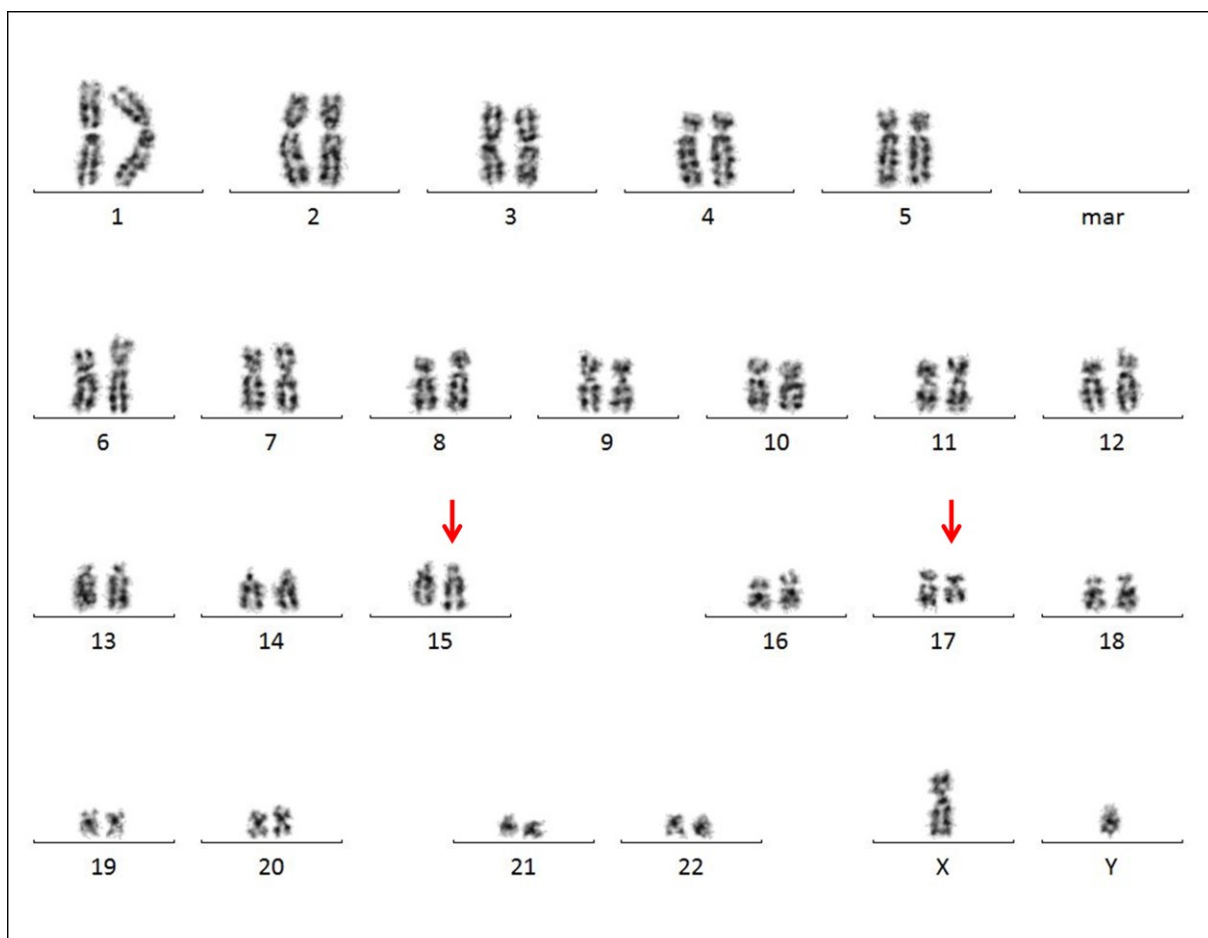
V uplynulých 30 letech se výsledky léčby AML u dětí významně zlepšily díky novým poznatkům o molekulárně-genetické podstatě specifických chromosomových aberací, které se u těchto nemocných vyskytují. Momentálně je pravděpodobnost pětiletého přežití u dětí a dospívajících cca 50-60 %. (Kaspers a Creutzig 2005). Diagnosticky a prognosticky významné molekulární nebo cytogenetické aberace nalézáme až u 70 % dětí s AML (Mrozek, a další 2001), (Betts, a další 2007)

Do skupiny s dobrou prognózou jsou řazeni pacienti s translokacemi  $t(8;21)(q22;q22)$  a  $t(15;17)(q24;q21)$  (Obrázek 3) nebo s inverzí  $inv(16)(p13q22)$  (Obrázek 4), které mají nejvyšší frekvenci výskytu u dětí od 2 do 18 let (asi 33% všech AML) (Creutzig, a další 2016).

Translokace  $t(8;21)$  se vyskytuje u ~7 % všech cytogeneticky abnormálních AML, což ji činí nejčastější translokací a čtvrtou nejčastější aberací u AML. Přestože je tuto translokaci obvykle snadné odhalit, může být maskována v komplexních karyotypech nebo může být výsledkem kryptických přestaveb (GFCH 1990). Asi v 8 % případů byly nalezeny skryté inserce (Gamerdinger, a další 2003) (Harrison, Radford-Weiss, a další 1999). Při této aberaci vzniká fúzní gen *RUNX1/RUNX1T1*, který lze nalézt hlavně u pacientů s dlouhodobou remisí (Nucifora, Larson a Rowley 1993), což naznačuje, že  $t(8;21)$  není sama o sobě postačující pro vývoj leukémie. Tato teorie byla prokázána přítomností tohoto genu *in utero* s dlouhou latentní fází před vznikem AML (Wiemels,

Xiao, a další 2002). Pro rozvoj AML jsou tedy pravděpodobně potřeba další genetické události, např. mutace *FLT3*, *KIT* a *NRAS* (Peterson, a další 2007). Fúzní gen *RUNX1/RUNX1T1* na rozdíl od původního *RUNX1* genu funguje jako represor pro důležité hematopoetické transkripční faktory (Elagib a Goldfarb 2007).

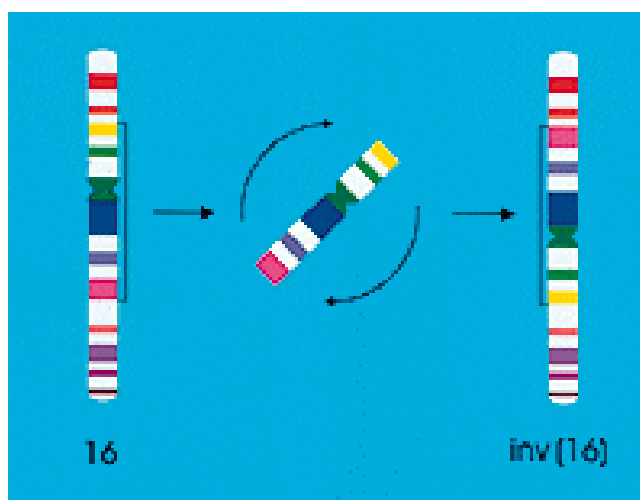
Translokace t(15;17), při které vzniká fúzní gen *PML/RARA*, je typickým nálezem u subtypu AML označovaném jako akutní promyeloidní leukémii (APL). Kromě fúze *PML/RARA*, která je nejčastějším nálezem u tohoto onemocnění (>98 % případů), mohou vznikat i variantní přestavby, při kterých *RARA* fúzuje s jinými geny, např. *NPM1*, *NUMA1*, *ZBTB16* a *STAT5B* (ta je mimo 17q21) (Redner, a další 1996), (Wells, Catzavelos a Kamel-Reid 1997), (Arnould, a další 1999). Literatura uvádí, že fúze *PML/RARA* se může vyskytovat i u APL bez typické t(15;17) jako důsledek kryptické translokace či inserce (Baranger, a další 1993), (Grimwade, Gorman, a další 1997).



Obrázek 3: Translokace t(15;17)(q24;q21) při které vzniká fúzní gen *PML/RARA* detekovaná konvenční cytogenetickou analýzou (G-pruhy) u pacienta s AML (subtyp akutní promyelocytární leukémie, APL). Převzato z databáze Centra nádorové cytogenetiky VFN a 1.LF UK.



Aberace chromosomu 16,  $inv(16)$  nebo  $t(16;16)$ , se vyskytují u 4 % všech cytogeneticky abnormálních AML, přičemž  $inv(16)$  je výrazně častější (95 %) než translokace (5 %). Výsledkem těchto přestaveb je fúze genu *CBFB* (dříve *PEBP2B*) lokalizovaném v oblasti 16q22 s genem *MYH11* (dříve *SMMHC/SMHC*) v oblasti 16p13 (Claxton, a další 1994), (Marlton, a další 1995). Fúzní gen *CBFB/MYH11* inhibuje funkci *RUNX1*, což způsobuje změnu v genové expresi a blokuje diferenciaci buněk, přičemž dochází ke změnám, které jsou nutné pro propuknutí leukemie, jako např. *KIT* a *RAS* mutace (Sverre a Mitelman 2009).



Obrázek 4: Schéma inverze chromosomu 16. Převzato z <http://www.pathologyoutlines.com/topic/leukemiainv16.html>

Pacienti s monosomií chromosomu 7 nebo delecí dlouhých ramen 7q, trisomií chromosomu 8, translokacemi či inverzemi dlouhých ramen chromosomu 3, translokacemi  $t(6;9)(p23;q34)$  a  $t(9;22)(q34;q11)$  jsou řazeni do skupiny se špatnou prognózou, zatímco ostatní nemocní s normálním karyotypem nebo s jinými strukturními či početními aberacemi mají střední prognózu.

S obecně špatnou prognózou jsou spojovány rovněž translokace zahrnující chromosomovou oblast 11q23, které se vyskytují u 15-20 % všech dětských AML (Grimwade, Walker, a další 1998), (Raimondi, Chang, a další 1999). Ve více než 95 % případů s translokací zahrnující oblast 11q23 je zapojen gen *KMT2A* (von Bergh, a další 2000). V současné době bylo popsáno již více než různých 66 fúzních partnerů *KMT2A* genu, což potvrzuje vysokou heterogenitu AML s přestavbou *KMT2A* (Meyer, a další 2009). Nejčastější přestavby u AML zahrnující oblast 11q23 jsou translokace

t(9;11)(p22;q23), která se vyskytuje až v ~50 % případů, a dále translokace t(11;19)(q23;p13.1), t(11;19)(q23;p13.3), t(6;11)(q27;q23), t(10;11)(p12;q23) atd. (Grimwade, Walker, a další 1998), (Raimondi, Chang, a další 1999). Podle literárních údajů mají kojenci vyšší procentuální zastoupení 11q23/*KMT2A* přestaveb (cca 45 %) a horší prognózu než starší děti. Prognosticky příznivé balancované translokace se v takto nízkém věku příliš nevyskytují, což naznačuje, že dědičné genetické změny nebo aberace vzniklé prenatálně mohou předurčit jedince ke vzniku AML s nepříznivou prognózou. Toto bylo poprvé prokázáno u kojeneckých AML s fúzí *KMT2A/AFF1* (Gale, a další 1997).

Výjimku tvoří translokace t(1;11)(q21;q23), která je podle studie z roku 2009 spjatá s dobrou prognózou. Při této translokaci dochází ke zvýšené expresi genu *MLLT11* (dříve *AF1q*) (Balgobind, a další 2009). V jiné starší studii z roku 2004 však byla zvýšená exprese *MLLT11* genu naopak spojována se špatnou prognózou (Tse, a další 2004). Podle některých studií lze do skupiny s dobrou prognózou řadit i t(9;11)(p22;q23) (Rubnitz, Raimondi, a další 2002), (Zwaan, a další 2002).

Translokace t(6;11)(q27;q23), při které vzniká fúzní gen *KMT2A/AFDN*, je považována za nezávislý ukazatel špatné prognózy. Rovněž translokace t(10;11)(p12;q23) a t(10;11)(p11.2;q23) jsou spojeny se špatnou prognózou bez ohledu na přítomnost dalších rizikových faktorů. t(10;11)(p12;q23) představuje druhou nejčastější translokaci u dětské AML s přestavbami 11q23/*KMT2A*. Pacienti s těmito nálezy by měly být zařazeni do skupiny s nejvyšší protinádorovou terapií (Balgobind, a další 2009).

## 6 METODY DETEKCE CHROMOSOMOVÝCH ABERACÍ

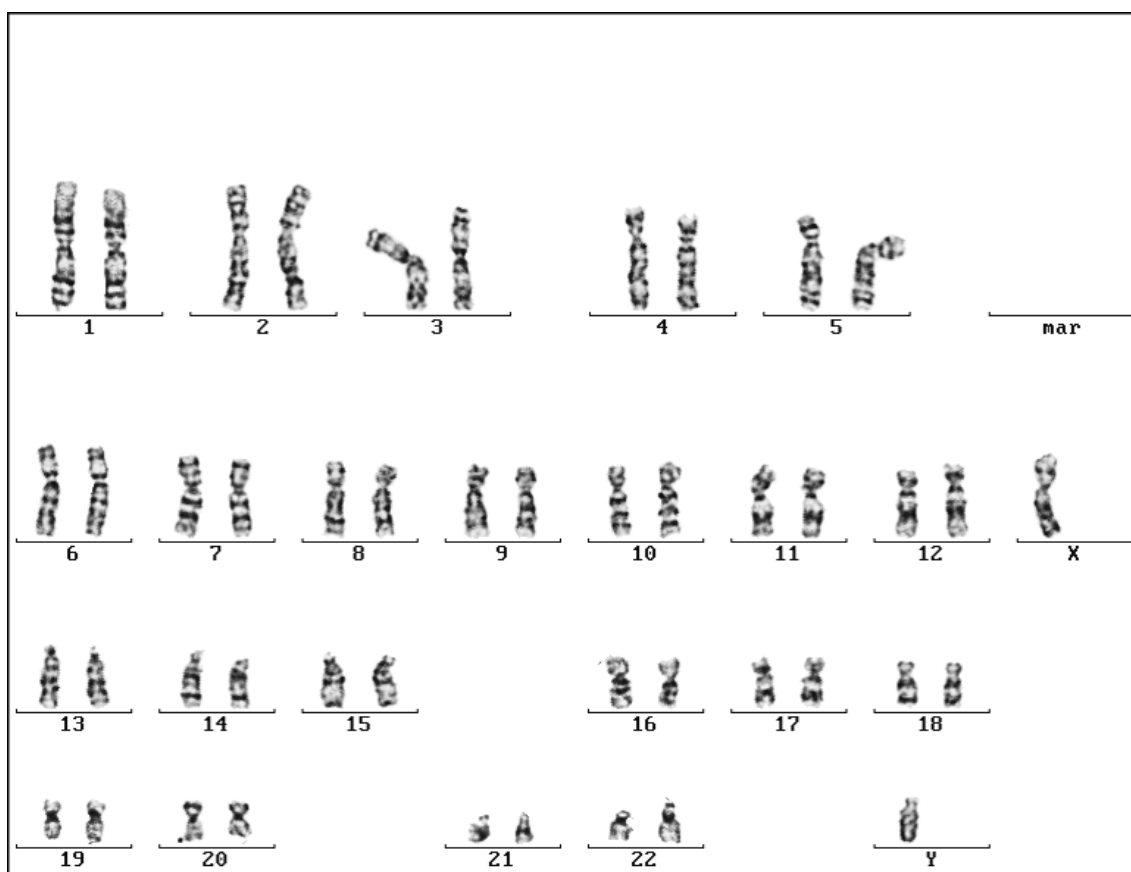
---

Chromosomové aberace lze detekovat pomocí konvenční cytogenetické analýzy a molekulárně cytogenetických metod. Vzorek tkáně, který se používá k cytogenetickému vyšetření, musí obsahovat nádorové nebo potencionálně nádorové buňky. U hematologických malignit to jsou buňky kostní dřeně, případně, pokud dochází k infiltraci leukemických buněk do periferního oběhu, se mohou zkoumat buňky z periferní krve.

## 6.1 KONVENČNÍ CYTOGENETICKÁ ANALÝZA

Základní cytogenetickou metou je konvenční cytogenetická analýza pruhovaných chromosomů, jejíž princip je založen na odběru a kultivaci buněk kostní dřeně, zpracování buněčných kultur, přípravě a barvení chromosomových preparátů a následné analýze chromosomů ve světelném mikroskopu.

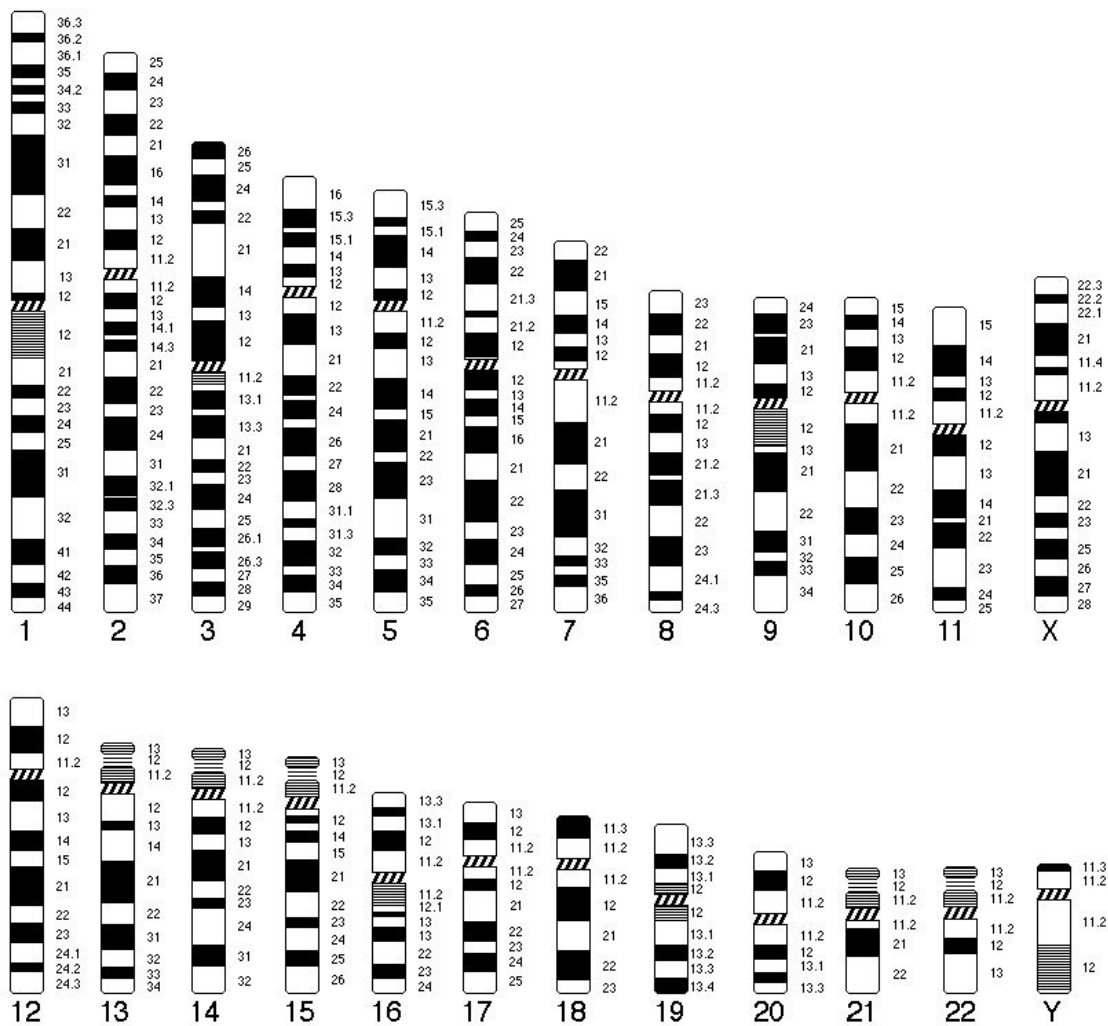
Sterilně odebraný vzorek kostní dřeně (cca 1-2 ml) musí obsahovat buňky schopné dělení. Buňky jsou v růstovém médiu kultivovány v termostatu při teplotě 37°C obvykle po dobu 24 hodin. Cílem kultivace je získat co největší počet buněk ve stádiu metafáze, kdy jsou chromosomy dostatečně kondenzované a jsou dobře viditelné v mikroskopu. Po uplynutí příslušné doby se ke vzorku přidává kolcemid, který zastavuje mitotické dělení rozrušením dělicího vřeténka. Poté se k buněčným kulturám přidává hypotonický roztok, který rozruší buněčné membrány a dojde k uvolnění cytoplasmy. Buňky jsou následně fixovány opakovaným promýváním ve fixačním roztoku (methanol/kyselina octová v poměru 3:1). Cytogenetické preparáty se připravují z fixovaných buněčných suspenzí kapáním na čistá a odmaštěná podložní mikroskopická skla. Cílem je získat chromosomový preparát s dostatečným množstvím dobře rozložených mitóz. Po zaschnutí při pokojové teplotě jsou preparáty obarveny některou z pruhovacích technik. V současné době je nejvíce používaná metoda tzv. G-pruhování, kdy jsou chromosomy nejprve vystaveny působení trypsinu a následně barveny Giemsovým roztokem. Alternativním přístupem může být využití kombinace Wrightova barviva a Giemsy (Wright-Giemsa stain). Cytogenetické preparáty jsou následně analyzovány ve světelném mikroskopu, kdy hledáme buňky ve stádiu metafáze a hodnotíme počet a strukturu chromosomů s cílem detekovat chromosomové aberace. Buňky ve stádiu metafáze jsou nasnímány pomocí citlivé CCD kamery a zpracovány pomocí počítače vybaveného speciálním softwarem (tzv. počítačová analýza obrazu). Z metafázních chromosomů je za pomoci karyotypovacího programu sestaven karyotyp a nalezené chromosomové aberace jsou popsány podle mezinárodní cytogenetické nomenklatury ISCN (2016) (Michalová 1999). Přestože byla metoda konvenční cytogenetické analýzy pruhovaných chromosomů zavedena již v 70. letech minulého století, je v cytogenetických laboratořích dodnes využívána jako základní vyšetřovací technika při rutinní diagnostice hematologických malignit.



Obrázek 5: Normální mužský karyotyp 46,XY získaný z lymfocytů periferní krve a zpracovaný metodami konvenční cytogenetické analýzy (G-pruhy). Převzato z databáze Centra nádorové cytogenetiky VFN a 1.LF UK.

Její nespornou výhodou je, že umožňuje hodnotit současně při jediném vyšetření celý karyotyp včetně všech aberací v rámci jedné buňky. Díky tomu je možné analyzovat i všechny heterogenní buněčné klony, které jsou typickým znakem nádorových onemocnění a jsou považovány za jednu z hlavních příčin relapsu a rezistence na léčbu. Studium klonální heterogenity a přesná analýza chromosomových aberací v jednotlivých heterogenních klonech je proto pro přesné stanovení prognózy nemocných s leukemiemi velmi důležité. Metody klasické cytogenetiky ale mají u nemocných s leukémiemi bohužel i řadu omezení, ke kterým patří např. nízká citlivost G-pruhování, horší kvalita chromosomů nebo omezená proliferační aktivita nádorových buněk *in vitro*. V literatuře se uvádí, že úspěšnost cytogenetického vyšetření u leukémií je pouze cca 80 % a přibližně u 20 % nemocných s leukemiemi je toto vyšetření neinformativní (Harrison 2001). Zejména u dětí s ALL bývá cytogenetická

analýza často velmi obtížná, kvůli nízkému mitotickému indexu (tj. poměru buněk, u kterých probíhá mitóza, a normálních buněk) a často velmi špatné morfologii chromosomů, na kterých nelze přesně určit zlomová místa. (Zemanová, Michalová, a další 2001), (Ritterbach, a další 1998). Aby i v těchto případech bylo možné získat informace o prognosticky významných genetických změnách v nádorových buňkách, byly zavedeny tzv. molekulárně cytogenetické metody, které doplňují výsledky konvenční cytogenetické analýzy.

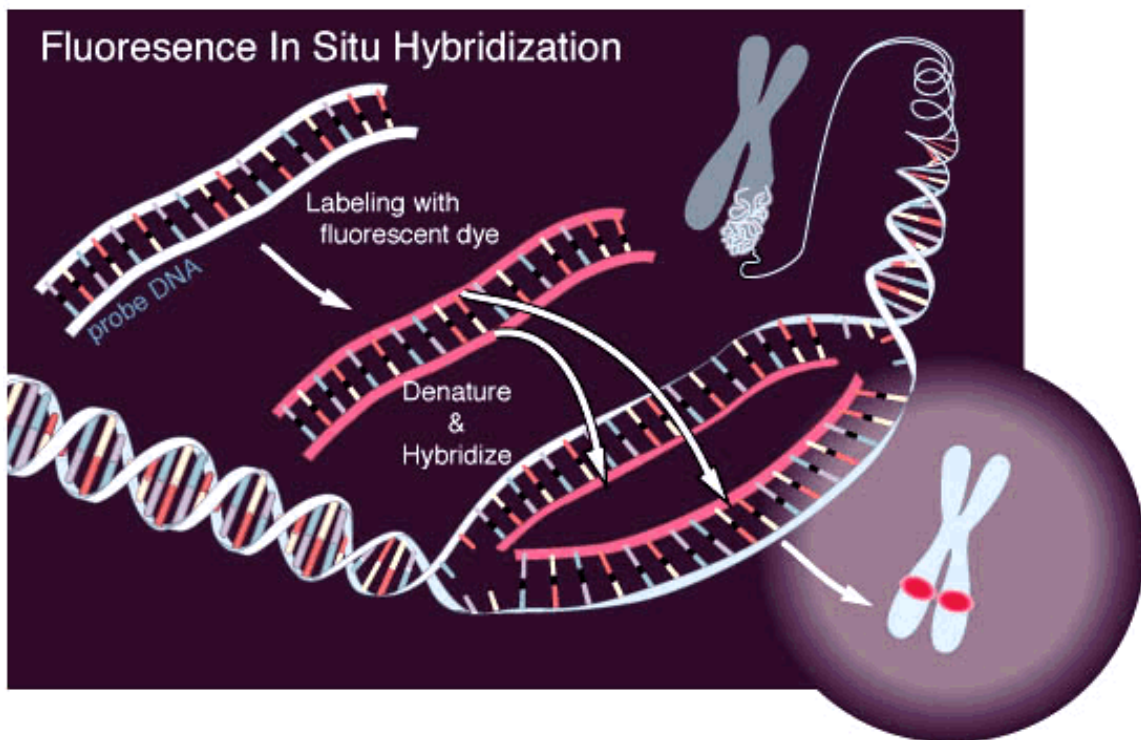


Obrázek 6: Schématické znázornění G-pruhů na lidských chromosomech (tzv. ideogram) (ISCN 2016).

## 6.2 MOLEKULÁRNĚ CYTOGENETICKÉ METODY

Metody molekulární cytogenetiky jsou založeny na využití vlastností nukleových kyselin, tj. na jejich schopnosti denaturace a opětovné renaturace za vhodných podmínek. Při použití většiny těchto metod se předpokládá přesná znalost a charakterizace postižených genů, tudíž se obvykle využívají pro cílené sledování omezeného počtu specifických aberací. (Zemanová, Michalová, a další 2001). Výjimku představují nejmodernější modifikace molekulárně cytogenetických metod, jako jsou tzv. čipové technologie a sekvenování nové generace (NGS), které podobně jako konvenční cytogenetika umožňují analýzu celého genomu studovaných buněk

Základní molekulárně cytogenetickou metodou je fluorescenční *in-situ* hybridizace (FISH), která je založena na použití značených DNA sond, což jsou úseky DNA o známé sekvenci, které jsou komplementární ke konkrétním genům nebo chromosomovým oblastem. DNA sondy mohou být značeny různými způsoby, ale v současné době se již téměř výhradně používá tzv. přímého fluorescenčního značení, kdy je fluorescenční barvivo přímo inkorporováno do struktury DNA sondy. Před samotnou hybridizací musí být sondy nejdříve denaturovány, což se nejčastěji provádí zahříváním dvoušroubovice DNA na vysoké teploty (okolo cca 70-80°C), kdy zanikají vodíkové vazby a dochází k oddělení obou vláken DNA. Takto denaturovaná sonda se následně nanáší na cytogenetický preparát připravený klasickým způsobem, na kterém jsou fixované chromosomy. DNA chromosomů nebo interfázních jader na preparátu je rovněž přítomna v podobě dvouřetězcové DNA, takže je také nutné preparát nejdříve denaturovat (opět pomocí vysokých teplot nebo labilizačních činidel, jako je formami). Po nanesení denaturované sondy na denaturovaný preparát, se upraví podmínky okolního prostředí (teplota okolo 37°C, dostatečná vlhkost) a za optimálních podmínek dojde k navázání (hybridizaci) jednovláknové DNA sondy ke komplementárním úsekům jednovláknových DNA fixovaných na cytogenetickém preparátu.

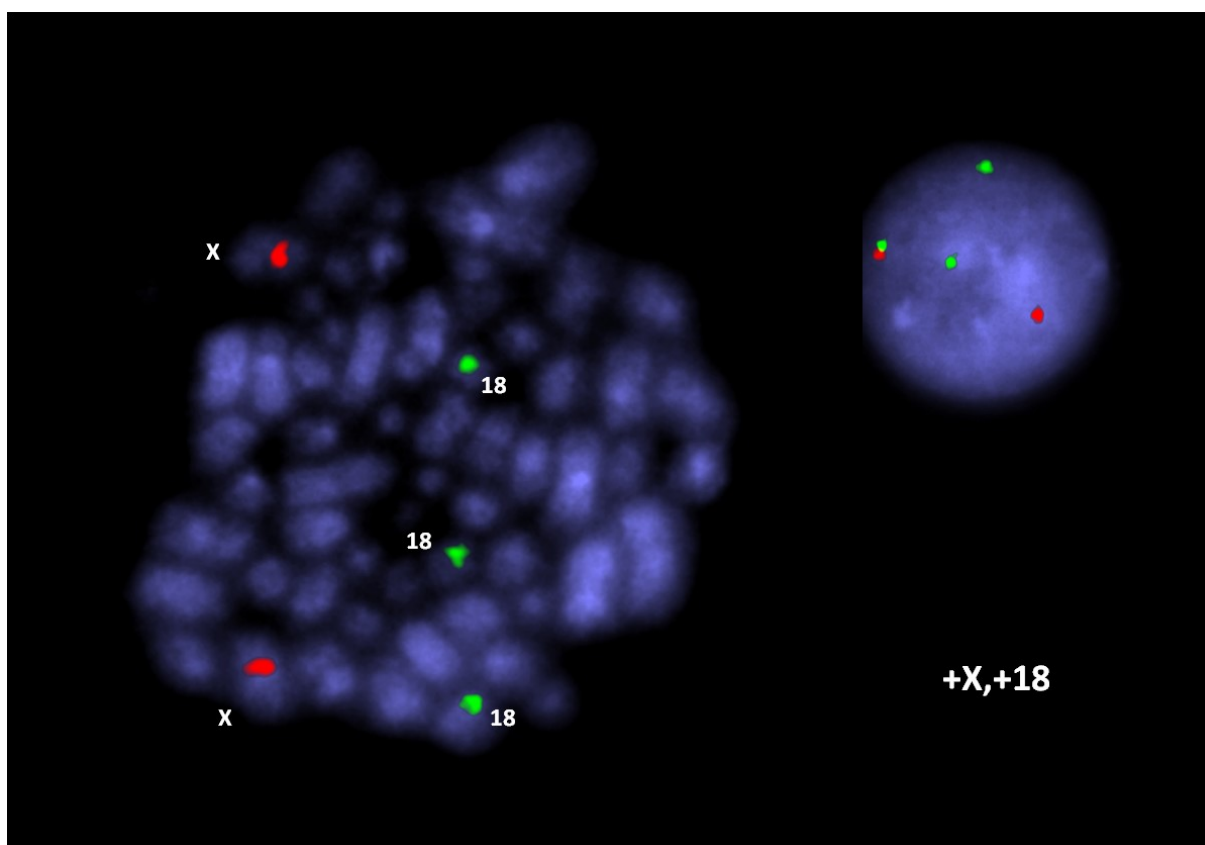


Obrázek 7: Schématické znázornění metody FISH. Převzato z: [https://en.wikipedia.org/wiki/Fluorescence\\_in\\_situ\\_hybridization#/media/File:FISH\\_\(technique\).gif](https://en.wikipedia.org/wiki/Fluorescence_in_situ_hybridization#/media/File:FISH_(technique).gif)

Po obarvení pozadí cytogenetického preparátu pomocí DAPI jsou fluorescenční signály takto navázaných sond hodnoceny ve fluorescenčním mikroskopu. Podle toho, k jakým chromosomovým oblastem sondy hybridizují, je můžeme rozdělit do několika skupin. Pro detekci numerických odchylek se obvykle používají tzv. centromerické sondy, které hybridizují k  $\alpha$ -satelitní DNA lokalizované v oblasti centromer lidských chromosomů. Výjimku tvoří chromosom Y, kde je  $\alpha$ -satelitní DNA lokalizovaná v heterochromatinovém bloku na jeho dlouhých ramenech. K detekci strukturních přestaveb (delecí, translokací, inverzí atd.) a dále k přímé lokalizaci genů na chromosomech se využívají sondy pro jedinečné genové sekvence (tzv. lokus-specifické). Výhodou obou výše zmíněných typů DNA sond je, že poskytují jasný fluorescenční signál jak na chromosomech v metafázi, tak i v nedělích se interfázních jádrech. Posledním typem DNA sond jsou tzv. malovací sondy, které obsahují sekvence z celých chromosomů a po jejich aplikaci jsou tak celé chromosomy obarveny příslušným fluorochemem. Používají se k detekci strukturních aberací většího rozsahu a k určování původu marker chromosomů. Tento typ sond lze využít pouze k analýze

chromosomů v metafázi a nedají se využít pro analýzu interfázních jader, kdy je DNA chromosomů nespiralizovaná a výsledný fluorescenční signál je příliš difúzní (Michalová 1995).

Zásadní výhodou této metody je, že je možné ji využívat k detekci početních či strukturních aberací jak v mitózách, tak v nedělících se interfázních jádrech, (Michalová, Zemanová a Březinová 1998), takže poskytuje výsledky i v případech, kdy při kultivaci nezískáme dostatečný počet buněk v metafázi vhodných pro cytogenetickou analýzu. K dalším výhodám patří rychlost získání výsledků (2-24 hodin), vysoká specifita a citlivost metody a možnost analyzovat několik cílových sekvencí najednou. Navíc lze zkoumat i transkripčně inaktivní buňky, což neumožňuje např. molekulárně genetická metoda RT-PCR (reverzní polymerázová řetězová reakce) (Zemanová, Michalová, a další 2001).

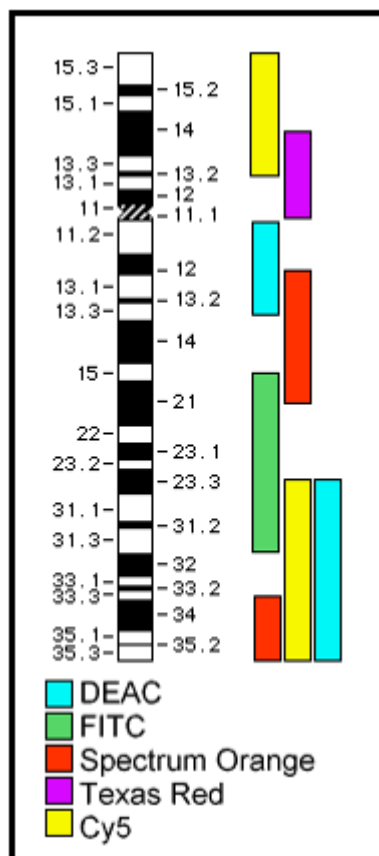


Obrázek 8: Vysoká hyperdiploidie (nadpočetná kopie chromosomu X a trisomie chromosomu 18) detekovaná metodou FISH u chlapce s B-ALL (centromerická sonda pro chromosom X značená červenou barvou, centromerická sonda pro chromosom 18 značená zelenou barvou). Převzato z databáze Centra nádorové cytogenetiky VFN a 1.LF UK.

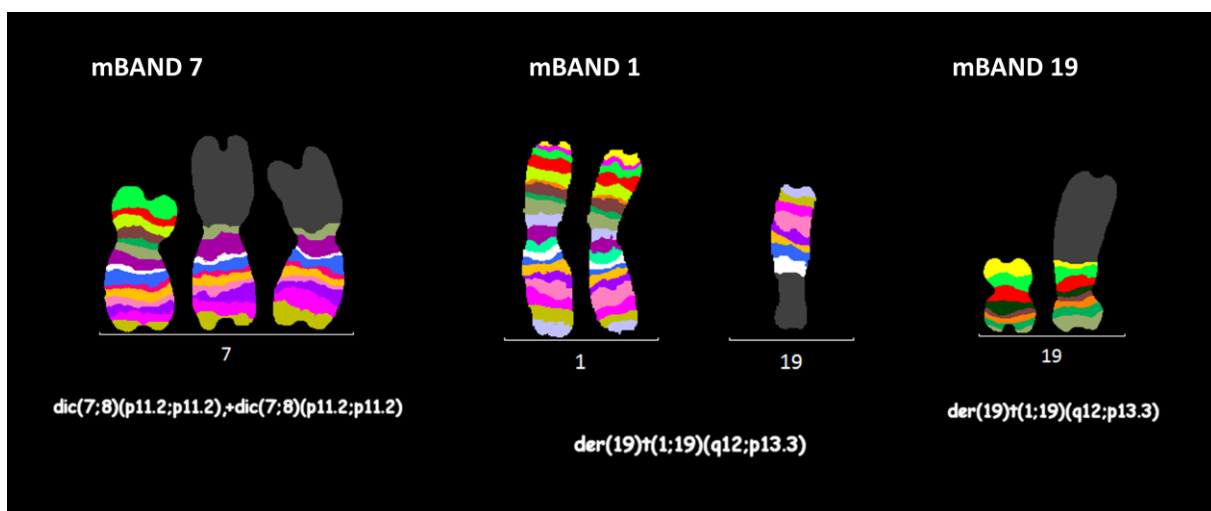
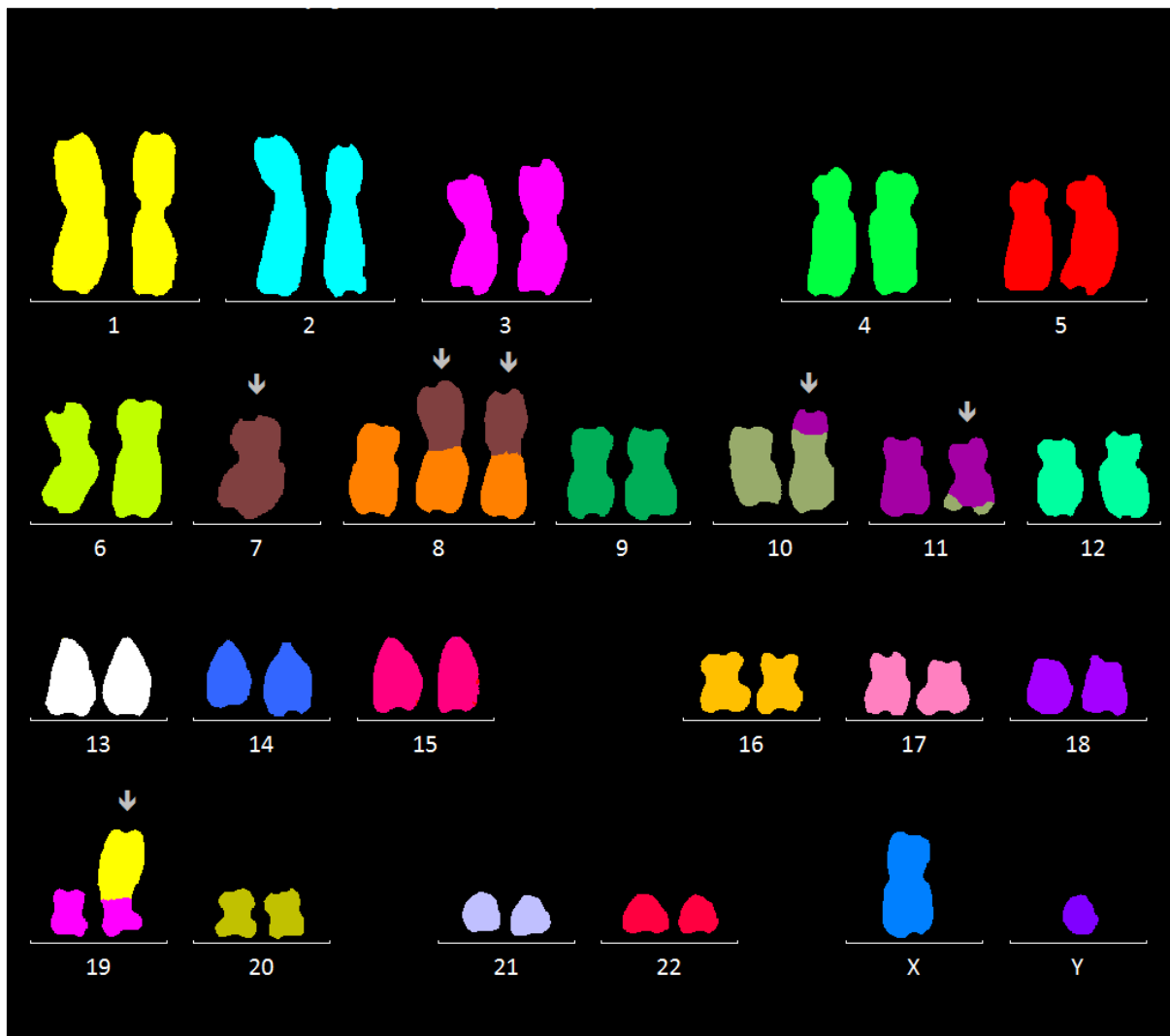


Dosud zmíněné hybridizační techniky sondy jsou omezené na analýzu maximálně několika cílových sekvencí současně a neposkytují tedy informace o případných dalších změnách, které mohou být v nádorových buňkách přítomny. Proto byly vyvinuty další metody, díky kterým lze současně analyzovat celý genom a získat tak informace o všech numerických a strukturních aberacích. Mezi tyto metody řadíme např. metodu mnohobarevné fluorescenční *in situ* hybridizace (mFISH). Sondy pro mFISH jsou vlastně směsí malovacích sond pro všechny chromosomy lidského karyotypu, které jsou označeny pomocí pěti fluorochromů v různých barevných kombinacích (tzv. kombinatoriální značení). Při běžné FISH jsou sondy značeny jednoduchým způsobem jednotlivými fluorochromy, takže můžeme získat jen omezený počet různých fluorescenčních signálů a sledovat tak jen omezený počet cílových DNA sekvencí. Ukázalo se však, že při použití alespoň pěti různých fluorochromů, které jsou zkombinovány v různých poměrech, lze získat tolik barevných odstínů, že je možné barevně odlišit všechny chromosomy v lidském karyotypu během jediné hybridizace. Takto obarvené chromosomy nelze hodnotit pouhým okem ve fluorescenčním mikroskopu, k jejich analýze se využívá počítačová analýza obrazu vybavená příslušným softwarem. Obraz z mikroskopu je nasnímán citlivou CCD kamerou přes sadu šesti specifických fluorescenčních filtrů, které odpovídají použitým fluorochromům (pět fluorochromů + DAPI, kterým je obarveno pozadí preparátu) a následně zpracován speciálním softwarem, který změří intenzitu jednotlivých fluorescenčních signálů podél každého chromosomu a na základě měření přiřadí ke každému z chromosomů unikátní klasifikační barvu (tzv. pseudobarvu). Tato metoda je vhodná zejména k analýze složitých komplexních karyotypů, k jejichž vzniku často dochází v leukemických buňkách při progresi maligního procesu (Michalová, Zemanová a Březinová 2001). Výhodou metody mFISH je, že podobně jako konvenční cytogenetická analýza umožňuje při jediném hybridizačním experimentu analyzovat všechny chromosomy a chromosomové aberace přítomné ve studované buňce. Při použití metody mFISH jsou ale chromosomy obarveny jednoduše, takže sice lze určit chromosomy zahrnuté v přestavbách, ale není možné přesně identifikovat zlomová místa. Metoda tak není vhodná pro detekci duplikací, inverzí a rozsahu delecí (intrachromosomových aberací) (MacKinnon a Chudoba 2011).

Z tohoto důvodu byla vyvinuta modifikace této metody, tzv. mnohobarevné pruhování s vysokou rezolucí – mBAND. Metoda mBAND je rovněž založena na použití pěti fluorochromů, ale na rozdíl od mFISH je opět cílena pouze na jednotlivé konkrétní chromosomy. DNA pro přípravu sond pro mBAND se získává nejčastěji mikrodisekcí přímo z cytogenetického preparátu. Takto získaná DNA je dále amplifikována a štěpena na různě dlouhé fragmenty, které se vzájemně překrývají. Tyto fragmenty jsou pak v dalším kroku značeny pomocí jednoho z pěti fluorochromů. Pro vyhodnocení se, stejně jako u mFISH, využívá počítačový software, jež přiřadí konkrétní pseudobarvy k úsekům se stejnou intenzitou fluorescence. Výsledkem je mnohobarevně pruhovaný chromosom, na kterém můžeme přesně odlišit jednotlivé pruhy a určit zlomová místa. Na rozdíl od mFISH tedy můžeme metodou mBAND přesně odhalit pericentrické a paracentrické inverze a lokalizovat místa zlomů na přestavěných chromosomech (Chudoba, a další 1999). Tato metoda však umožňuje pouze cílenou analýzu jednotlivých chromosomů, ale neposkytuje informace o celém genomu.



Obrázek 9: Schéma mBAND sondy pro chromosom 5 (firma MetaSystems).



Obrázek 10: Komplexní karyotyp zahrnující detekovaný metodou mFISH u chlapce s AML. Zlomová místa na přestavěných chromosomech byla identifikována metodou mBAND. Popis karyotypu podle ISCN: 46,XY,dic(7;8)(p11.2;p11.2),+dic(7;8)(p11.2;p11.2),der(10)t(10;11)(p12;q23. Převzato z databáze Centra nádorové cytogenetiky VFN a 1.LF UK.

Další molekulárně cytogenetickou metodou založenou na využití vlastností DNA je tzv. komparativní genomová hybridizace na čípech (array CGH), která, na rozdíl od většiny FISH metod, umožňuje během jediného hybridizačního experimentu analyzovat celý genom. Je založena na použití dvou celogenomových DNA – jednak tzv. referenční DNA izolované ze zdravých buněk (obvykle se získává komerčně) a jednak DNA izolované ze studovaných buněk. Obě DNA jsou označeny dvěma různými fluorochromy a jsou smíchány v poměru 1:1. Takto připravená hybridizační směs se nanáší na tzv. čip (array), což je obvykle skleněná nebo plastová destička, na které jsou ukotveny 100 až tisíce oligonukleotidů. Tímto způsobem mohou být na čipu umístěny v jednotlivých spotech stovky až tisíce genů případně i celý genom. Po hybridizaci je každý čip analyzován pomocí speciálního laserového skeneru, který porovná intenzitu fluorescenčních signálů v jednotlivých bodech a vyhodnotí, ve kterých genech nebo chromosomových oblastech došlo k zisku (převládá barva signálu, který odpovídá značení studované DNA) nebo naopak ke ztrátám DNA sekvencí (převládá barva signálu, která odpovídá barvě fluorochromu použitého ke značení referenční DNA). (Solinas-Toldo, a další 1997). Tato metoda má vysoké rozlišovací schopnosti (100 kb), tudíž můžeme popsat aberace, které nebylo možné detekovat konvenčními cytogenetickými a FISH metodami, a to včetně přesného místa zlomu a rozsahu změny v množství genetického materiálu (Vissers, a další 2007). Díky array CGH lze velmi přesně analyzovat nebalancované změny v genomu (tj. delece nebo amplifikace) (Shaffer, a další 2007), tyto výsledky však nevidíme v kontextu chromosomů, proto nelze říct, zda došlo k delecí nebo amplifikaci v důsledku nebalancovaných strukturních přestaveb (např. translokací) nebo prostých numerických změn (MacKinnon a Chudoba 2011). Obdobou array CGH je metoda SNP (single-nucleotide polymorphisms) array, která se používá pro odhalení jednonukleotidových polymorfismů (Sachidanandam, a další 2001), které se řadí mezi nejčastější formy genetických variant v lidské populaci (Brookes 1999). Pomocí SNP arrays můžeme detekovat kromě zisku a ztrát genetického materiálu i tzv. ztráty heterozygotnosti (LOH), ke kterým patří například i vrozené nebo získané uniparentální disomie (UPD) což pomocí CGH arrays nelze. (Bignell, a další 2004), (Zhao, a další 2004).

Podobně jako ostatní molekulárně cytogenetické techniky mají i čipové technologie svoje výhody a nevýhody. Kromě vysoké citlivosti je jejich velkou výhodou, že při jejich využití analyzujeme celkovou genomovou DNA, takže, podobně jako v případě konvenční cytogenetiky a mFISH, získáme informace o celém genomu. Na rozdíl od těchto dvou metod ale nepotřebujeme mitózy, takže můžeme získat informativní výsledky i v těch případech, kdy se nepodaří vykultivovat žádné buňky ve stádiu metafáze. Naopak velkou nevýhodou čipových technik je, že tyto metody umožňují pouze detekci takových změn, při kterých dochází k zisku či ztrátě DNA sekvencí. Balancované aberace, které hrají důležitou úlohu v patogenezi leukémií, nelze touto metodou detekovat vůbec. Další nevýhodou je, že pomocí čipových technik lze zachytit pouze aberace, které jsou přítomny v dostatečně velkém buněčném klonu (minimálně 20-30 % buněk). Abnormální klony o menší velikosti, které však mohou být později příčinou relapsu onemocnění, těmito technikami detekovat nelze.

## 7 ZÁVĚR

---

Chromosomové aberace patří k nejdůležitějším nezávislým prognostickým faktorům u nemocných s hematologickými malignitami, protože řada z nich je specifická pro konkrétní subtyp onemocnění a u řady z nich je také přesně známý jejich prognostický význam. U dětí s ALL řadíme mezi nejvýznamnější chromosomové změny tzv. vysoké hyperdiploidie (>50 chromosomů) a translokace  $t(12;21)(p13;q22)$ , které jsou spojeny obvykle s velmi dobrou prognózou. Přestavby zahrnující gen *KMT2A* jsou naopak považovány za nepříznivý prognostický faktor. U dětí s AML jsou nevýznamnějšími aberacemi translokace  $t(8;21)(q22;q22)$  a  $t(15;17)(q24;q21)$  a inverze  $inv(16)(p13;q22)$  spojené s dobrou prognózou a dále translokace zahrnující oblast 11q23, z nichž nejčastější je translokace  $t(9;11)(q23;p13.1)$ , které jsou spjaté se špatnou prognózou.

Včasný záchyt prognosticky významných aberací je zvláště u dětí s akutními leukémiemi velmi důležitý, protože může přispět nejen k upřesnění diagnózy a prognózy nemocných, ale i k zařazení pacientů do rizikových skupin a k volbě odpovídající terapie. U pacientů s vysokým rizikem je nezbytné co nejdříve zahájit intenzivní chemoterapii případně začít hledat vhodného dárce pro transplantaci kostní dřeně, což je jediná šance na jejich vyléčení. Naopak u dětí s nízkým rizikem je možné zvolit méně agresivní terapii, což významným způsobem snižuje riziko vedlejších účinků a pozdních následků léčby. Opakovaná cytogenetické vyšetření v průběhu nemoci rovněž umožňují zhodnotit úspěšnost léčby, sledovat změny v zastoupení a velikosti patologických klonů a případně včas předpovědět blížící se relaps onemocnění.

Jedním ze základních laboratorních vyšetření u dětí s akutními leukémiemi v době stanovení diagnózy i v průběhu onemocnění je konvenční cytogenetická analýza karyotypu leukemických buněk doplněná vhodnými molekulárně cytogenetickými metodami. Díky konvenčnímu pruhování chromosomů můžeme pozorovat karyotyp a tím odhalit všechny chromosomové aberace přítomné v jedné buňce i ve všech heterogenních buněčných klonech. Tato metoda však má určitá technická omezení a v některých případech tak může být její výsledek neinformativní. Právě pro tyto případy byly vyvinuty metody molekulární cytogenetiky (FISH, mFISH, mBAND, array

CGH, SNP array atd.), které významným způsobem doplňují a upřesňují výsledky konvenční cytogenetické analýzy. Každá z těchto metod přináší důležité informace o genomu nádorových buněk, ale žádná z nich zatím nemůže konvenční karyotypování úplně nahradit. Proto pouze vhodně zvolená kombinace cytogenetických a molekulárně cytogenetických technik poskytuje komplexní informace o genomu nádorových buněk a umožňuje záchyt klonálních chromosomových aberací, které mohou významně ovlivnit vznik, průběh a prognózu onemocnění.

## 8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

---

\* sekundární citace

Arnould, C, C Philippe, V Bourdon, MJ Gr goire, R Berger, a P Jonveaux. „The signal transducer and activator of transcription STAT5b gene is a new partner of retinoic acid receptor alpha in acute promyelocytic-like leukaemia.“ *Hum Mol Genet*, 1999: 8(9):1741-9.

Attarbaschi, A, G Mann, M König, M Steiner, MN Dworzak, H Gadner, OA Haas, Group Austrian Berlin-Frankfurt-Münster Cooperative Study. „Near-tetraploidy in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia is a highly specific feature of ETV6/RUNX1-positive leukemic cases.“ *Genes Chromosomes Cancer*, 2006: 45(6):608-11.

\*Avet-Loiseau, H. „Fish analysis at diagnosis in acute lymphoblastic leukemia.“ *Leukemia & Lymphoma*, Vol. 33, 1999: 441-449.

Bailey, LC, BJ Lange, SR Rheingold, a NJ Bunin. „Bone-marrow relapse in paediatric acute lymphoblastic leukaemia.“ *Lancet Oncol*, 2008: 9: 873-883.

Balgobind, BV, SC Raimondi, J Harbott, M Zimmermann, TA Alonzo, A Auvrignon, BH Beverloo, M Chang a kol. „Novel prognostic subgroups in childhood 11q23/MLL-rearranged acute myeloid leukemia: results of an international retrospective study.“ *Blood*, 2009: 114(12): 2489–2496.

Baranger, L, M Gardembas, J Hillion, C Foussard, N Ifrah, M Boasson, R Berger. „Rearrangements of the RARA and PML genes in a cytogenetic variant of acute promyelocytic leukemia.“ *Genes Chromosomes Cancer*, 1993: 6(2):118-20.

Bash, RO, S Hall, CF Timmons, WM Crist, M Amylon, RG Smith, R Baer. „Does activation of teh TAL1 gene occur in majority of patients with T-cell acute lymphoblastic leukemia? A Pediatric group study.“ *Blood*, 1995: 86: 666-676.

Begley, CR, a AR Green. „The SCL gene: from case report to critical hematopoetic regulator.“ *Blood*, 1999: 93: 2760-2770.

Berger, R, a A Bernheim. „Cytogenetic studies on Burkitt's lymphoma-leukemia.“ *Cancer Genet Cytogenet*, 1982: 7: 231-244.



- Berger, R, M Le Conait, D Vecchione, J Derre, a SJ Chen. „Cytogenetic studies of 44 T-cell acute lymphoblastic leukemias.“ *Cancer Genet Cytogenet*, 1990: 44: 69-75.
- Betts, DR, RA Ammann, A Hirt, a kol. „The prognostic significance of cytogenetic aberrations in childhood acute myeloid leukaemia: A study of the Swiss Paediatric Oncology Group (SPOG).“ *Eur J Haematol*, 2007: 78: 468-476.
- Bignell, GR, J Huang, J Greshock, S Watt, A Butler, S West, M Grigorova, KW Jones, W Wei, MR Stratton, PA Futreal, B Weber, MH Shapero, R Wooster. „High-resolution analysis of DNA copy number using oligonucleotide microarrays.“ *Genome Res*, 2004: 14(2):287-95.
- Boomer, T, M Varella-Garcia, L McGavran, L Meltesen, AS Olsen, a P Hunger. „FISH Detection of E2A Translocations in Leukemia.“ *Blood*, 2000: 11: 463a.
- \*Brookes, AJ. „The essence of SNPs.“ *Gene*, 1999: 234(2):177-86.
- Claxton, DF, P Liu, HB Hsu, P Marlton, J Hester, F Collins, AB Deisseroth, JD Rowley, MJ Siciliano. „Detection of fusion transcripts generated by the inversion 16 chromosome in acute myelogenous leukemia.“ *Blood*, 1994: 83(7):1750-6.
- Creutzig, U, Reinhardt D, Zimmermann M, Klingebiel T, Gardner H. „Intensive chemotherapy versus bone marrow transplantation in pediatric acute myeloid leukemia: a matter of controversies.“ *Blood*, 2001: 3671-3672.
- Creutzig, U, M Zimmermann, D Reinhardt, M Rasche, C von Neuhoff, T Alpermann, M Dworzak, K Perglerová, Z Zemanová, J Tchinda, J Bradtke, C Thiede, C Haferlach. „Changes in cytogenetics and molecular genetics in acute myeloid leukemia from childhood to adult age groups.“ *Cancer*, 2016: 122(24):3821-3830.
- Elagib, KE, a AN Goldfarb. „Oncogenic pathways of AML1-ETO in acute myeloid leukemia: multifaceted manipulation of marrow maturation.“ *Cancer Lett*, 2007: 251:179-186.
- Ferrando, AA, a TA Look. „Clinical implications of recurring chromosomal and associated molecular abnormalities in acute lymphoblastic leukemia.“ *Seminars in Hematology*, 2000: 37: 381-395.
- Fletcher, JA, EA Lynch, VM Kimball, M Donnelly, R Tantravahi, a SE Sallan. „Translocation (9;22) is associated with extremely poor prognosis in intensively treated children with acute lymphoblastic leukemia.“ *Blood*, 1991: 435-439.

- Fletcher, JA, N Tu, R Tantravahi, a SE Sallan. „Extremely poor prognosis of pediatric acute lymphoblastic leukemia with translocations (9;22): updated experience.“ *Leukemia & Lymphoma*, 1992: 8: 75-79.
- Ford, AM, SA Ridge, ME Cabrera, H Mahmoud, CM Steel, LC Chan, a kol. „In utero rearrangements in the trithorax-related oncogene in infant leukemias.“ *Nature*, 1993: 358-360.
- Ford, AM, K Fasching, ER Panzer-Grümayer, a kol. „Origin of „late“ relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia with TEL-AML1 fusion genes.“ *Blood*, 2001: 98(3):558-564.
- Friend, SH, TP Dryja, a RA Weineberg. „Oncogenes and tumor-suppressing genes.“ *N Engl J Med*, 1997: 618-622.
- Gale, KB, AM Ford, R Repp, a kol. „Backtracking leukemia to birth: identification of clonotypic gene fusion sequences in neonatal blood spots.“ *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997: 94: 13950-13954.
- Gamerding, U, A Teigler-Schlegel, S Pils, J Bruch, S Viehmann, M Keller, A Jauch, J Harbott. „Cryptic chromosomal aberrations leading to an AML1/ETO rearrangement are frequently caused by small insertions.“ *Genes Chromosomes Cancer*, 2003: 36(3):261-72.
- GFCH. „Acute myelogenous leukemia with an 8;21 translocation. A report on 148 cases from the Groupe Français de Cytogénétique Hématologique.“ *Cancer Genet Cytogenet*, 1990: 44(2):169-79.
- Gibbons, B, P MacCallum, E Watts, a kol. „Near haploid acute lymphoblastic leukemia: seven new casses and review of the literature.“ *Leukemia*, 1991: 5: 738-743.
- \*Gilbert, F. „Chromosomes, genes and cancer: a classification of chromosome abnormalities in cancer.“ *J Natl Cancer Inst*, 1983: 1107-1114.
- \*Greaves, M. „Actiology of acute leukemia.“ *Lancet*, 1997: 344-349.
- \*Greaves, M. „Childhood leukaemia.“ *British medical journal*, 2002: 283-286.
- Grimwade, D, P Gorman, E Duprez, K Howe, S Langabeer, F Oliver, H Walker, D Culligan, J Waters, M Pomfret, S Goldstone, A Burnett, P Freemont, D Sheer, E Solomon. „Characterization of cryptic rearrangements and variant translocations in acute promyelocytic leukemia.“ *Blood*, 1997: 90(12):4876-85.

- Grimwade, D, H Walker, F Oliver, K Wheatley, C Harrison, G Harrison, J Rees, I Hann, R Stevens, A Burnett, A Goldstone. „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*, 1998: 92(7):2322-33.
- Harris, MB, JJ Shuster, A Carroll, a kol. „Trisomy of leukemic cell chromosomes 4 and 10 identifies children with B-progenitor cell acute lymphoblastic leukemia with a very low risk of treatment failure: a Pediatric Oncology Group study.“ *Blood*, 1992: 79: 3316-3324.
- Harrison, CJ, Radford-Weiss I, Ross F, Rack K, le Guyader G, Vekemans M, Macintyre E. „Fluorescence in situ hybridization analysis of masked (8;21)(q22;q22) translocations.“ *Cancer Genet Cytogenet*, 1999: 112(1):15-20.
- \*Harrison, CJ. „The detection and significance of chromosomal abnormalities in childhood acute lymphoblastic leukaemia.“ *Blood Rev.*, 2001: 49-59.
- Harrison, CJ, I Radford-Weiss, F Ross, K Rack, G le Guyader, M Vekemans, E Macintyre. „Three distinct subgroups of hypodiploidy in acute lymphoblastic leukaemia.“ *Br J Haematol.*, 2004: 125(5):552-9.
- Harrison, CJ, AV Moorman, ZJ Broadfield, KL Cheung, RL Harris, G Reza Jalali, HM Robinson, KE Barber, SM Richards, CD Mitchell, TO Eden, IM Hann, FG Hill, SE Kinsey, BE Gibson, J Lilleyman, A Vora, AH Goldstone, IM Franklin, J Durrant, M Martineau, Childhood and Adult Leukaemia Working Parties. "Three distinct subgroups of hypodiploidy in acute lymphoblastic leukaemia." *Br J Haematol*, 2004: 125(5):552-9.
- Heerema, NA, HN Sather, MG Sensel, a kol. „Association of of chromosome arm 9p abnormalities with abverse risk in childhood acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children's Cancer Group.“ *Blood*, 1999: 94: 1537-1544.
- Heerema, NA, JB Nachman, HN Sather, a kol. „Hypodiploidy with less than 45 chromosomes confers adverse risk in childhood acute lymphoblastic leukemia: A report from the Children's Cancer Group.“ *Blood*, 1999: 94: 4036-4046.

- Heerema, NA, HN Sather, MG Sensel, a kol. „Prognostic impact of trisomies 10, 17 and 5 among children with acute lymphoblastic leukemia and high hyperploidy (>50 chromosomes).“ *J Clin Oncol*, 2000: 18: 1876-1887.
- Hoeltzer, D, W Ludwig, E Eckhard, a kol. „Improved outcome in adult B-cell acute lymphoblastic leukemia.“ *Blood*, 1996: 87: 495-508.
- Hunger, SP, N Galili, AJ Carroll, WM Crist, MP Link, a ML Cleary. „The t(1;19)(q23;p13) results in consistent fusion of E2A and PBX1 coding sequences in acute lymphoblastic leukemias.“ *Blood*, 1991: 77: 687-693.
- Chudoba, I, A Plesh, T Lorch, J Lemke, U Claussen, a G Senger. „High resolution multicolor-banding: a new technique for refined FISH analysis in human chromosomes.“ *Cytogenet Cell Genet*, 1999: 84:156-160.
- \*Kaspers, GJ, a U Creutzig. „Pediatric acute myeloid leukemia: International progress and future directions.“ *Leukemia*, 2005: 19: 2025-2029.
- Kees, UR, PR Burton, C Lü, a DL Baker. „Homozygous deletion of the p16/MTS1 gene in pediatric acute lymphoblastic leukemia is associated with unfavorable clinic outcome.“ *Blood*, 1997: 89: 4161-4166.
- \*Kinlen, LJ. „Epidemiological evidence for an infective basis in childhood leukemia.“ *British Journal of Cancer*, 1995: 1-5.
- Knudson, AG. „Mutation and cancer: Statisticaly Study of Retinoblastoma.“ *Proc Natl Acad Sci USA*, 1971: 68:820-823.
- \*Kurzrock, R, HM Kantarjian, BJ Drucker, a M Talpaz. „Philadelphia chromosome-positive leukemias: from basic mechanism to molecular therapeutics.“ *Ann Intern Med*, 2003: 138:816-830.
- Lemez, P, A Attarbaschi, MC Béné, Y Bertrand, G Castoldi, E Forestier, R Garand, OA Haas, S Kagialis-Girard, WD Ludwig, E Matutes, E Mejstříková, MP Pages, W Pickl, A Porwit, A Orfao, R Schabath, J Starý, H Strobl, P Talmant, MB vant Veer, Z Zemanová. „Childhood near-tetraploid acute lymphoblastic leukemia: an EGIL study on 36 cases.“ *Eur J Haematol*, 2010: 85(4):300–308.
- Lengauer, C, KW Kinzler, a B Vogelstein. „Genetic instability in colorectal cancers.“ *Nature*, 1997: 386:623-627.

- \*Look, AT. „Genes altered by chromosomal translocations in leukemias and lymphomas. In: Anonymous (ed.) the genetic basis of human disease.“ *New York: Mc-Graw-Hill*, 1998: 109-141.
- Ma, SK, GCF Chan, TSK Wan, CK Lam, SY Ha, YL Lau, LC Chan. „Near-haploid common acute lymphoblastic leukaemia of childhood with a second hyperdiploid line: a DNA ploidy and fluorescence in-situ hybridization study.“ *Br J Haematol*, 1998: 103:750-755.
- MacKinnon, RN, a I Chudoba. „The Use of mFISH and mBAND to define chromosome abnormalities.“ *Methods Mol Bio*, 2011: 730:203-218.
- Marlton, P, DF Claxton, P Liu, EH Estey, M Beran, M LeBeau, JR Testa, FS Collins, JD Rowley, MJ Siciliano. „Molecular characterization of 16p deletions associated with inversion 16 defines the critical fusion for leukemogenesis.“ *Blood*, 1995: 85(3):772-9.
- Martineu, M, R Clark, DM Farrell, JM Haekins, AV Moorman, a LM Secker-Walker. „Isochromosomes in acute lymphoblastic leukemia: i(21q) is a significant finding.“ *Genes Chromosom Cancer*, 1996: 17: 21-30.
- \*Melo, JV. „BCR-ABL gene variants.“ *Baillieres Clin Haematol*, 1997: 10(2):203-222.
- \*Mertens, F, B Johansson, a F Mitelman. „Dichotomy of hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia on the basis of the distribution of gained chromosomes.“ *Cancer Genet Cytogenet.*, 1996: 8-10.
- Merup, M, TC Moreno, M Heyman, a kol. „6q deletions in acute lymphoblastic leukemia and non-Hodgkin's lymphomas.“ *Blood*, 1998: 91: 3397-3400.
- Meyer, C, E Kowarz, J Hofmann, a kol. „New insights to the MLL recombinome of acute leukemias.“ *Leukemia*, 2009: 23: 1490-1499.
- Michalová, K. „Fluorescenční in situ hybridizace (FISH) v klinické cytogenetice.“ *Čas Lék Čes*, 1995: 134: 73-76.
- Michalová, K, Z Zemanová, a J Březinová. „Detection of leukemic cells by fluorescence in situ hybridization.“ *Fluorescence Microscopy and Fluorescent probes (vol 2) Plenum Press, New York, edit. J. Slavík*, 1998: 177-183.
- Michalová, K, Z Zemanová, a J Březinová. „Mnohobarevná fluorescenční in situ hybridizace (mFISH).“ *Čas Lék Čes*, 2001.

- \*Mitelman, F, B Johansson, a F Mertens. „The impact of translocations and gene fusions on cancer causation.“ *Nat Rev Cancer*, 2007: 7:233-245.
- Moorman, AV, HM Hawkins, R Clark, M Martineu, a LM Secker-Walker. „Duplication of the long arm of chromosome 1 in acute lymphoblastic leukemia in the LRF UKCCG karyotype database.“ *Br J Haematol*, 1997: 97: 51.
- Moorman, AV, R Clark, DM Farrell, JM Hawkins, M Martineu, a LM Secker-Walker. „Probes for hidden hyperdiploidy in acute lymphoblastic leukemia.“ *Genes, Chromosomes and Cancer*, 1996: 40-45.
- \*Morris, LG, a TA Chan. „Therapeutic targeting of tumor suppressor genes.“ *Cancer*, 2015: 121(9):1357-68.
- \*Mrózek, K, NA Heerema, a CD Bloomfield. „Cytogenetics in acute leukemia.“ *Blood Rev*, 2004: 18(2):115–36.
- Mrózek, K, TW Prior, C Edwards, a kol. „Comparison of cytogenetic and molecular genetic detection od t(8;21) and inv(16) in a prospective series of adults de novo acute myeloid leukemia: A Cancer and Leukemia Group B Study.“ *J Clin Oncol*, 2001: 19: 2482-2492.
- \*Nambiar, M, V Kari, a SC Raghavan. „Chromosomal translocation in cancer.“ *Biochim Biophys Acta*, 2008: 1786:139-152N.
- Nowell, PC, a DA Hungerford. „Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes.“ *J Natl Cancer Inst*, 1960: 25:85-109.
- Nucifora, G, RA Larson, a JD Rowley. „Persistence of the 8;21 translocation in patients with acute myeloid leukemia type M2 in long-term remission.“ *Blood*, 1993: 82(3):712-5.
- Peterson, LF, A Boyapati, EY Ahn, JR Biggs, AJ Okumura, MC Lo, M Yan, DE Zhang. „Acute myeloid leukemia with the 8q22;21q22 translocation: secondary mutational events and alternative t(8;21) transcripts.“ *Blood*, 2007: 110(3):799-805.
- Privitera, E, MP Kamps, Y Hayashi, a kol. „Different molecular consequences of the 1;19 chromosomal translocation in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia.“ *Blood*, 1992: 79: 1781-1788.

- Pui, CH, DJ Williams, SC Raimondi, a kol. „Hypodiploidy is associated with a poor prognosis in childhood acute lymphoblastic leukemia.“ *Blood*, 1987: 70: 247-253.
- Pui, CH, WM Crist, a AT Look. „Biology and clinical significance of cytogenetic abnormalities in childhood acute lymphoblastic leukemia.“ *Blood*, 1990: 1449-1463.
- Pui, CH, SC Raimondi, ML Hancock, a kol. „Immunologic, cytogenetic and clinical characterization of childhood acute lymphoblastic leukemia with the t(1;19) (q23;p13) or its derivative.“ *J Clin Oncol*, 1994: 12: 2601-2606.
- \*Pui, CH, a WE Evans. „Acute lymphoblastic leukemia.“ *N Eng J Med*, 1998: 339: 605-615.
- \*Pui, CH. „Acute lymphoblastic leukemia in children.“ *Current Opinion in Oncology*, Leden 2000: 3-12.
- Pullen, J, JJ Shuster, M Link, a kol. „Significance of commonly used prognostic factors differs for children with T cell acute lymphocytic leukemia (ALL), as compared to those with B- precursor ALL. A Pediatric Oncology Group (POG) study.“ *Leukemia*, 1999: 13: 1696-1707.
- \*Rabbitts, TH. „Chromosomal translocations in human cancer.“ *Nature*, 1994: 372: 143-149.
- Raimondi, SC, FG Behm, PK Robertson, CH Pui, GK Rivera, SB Murphy, DL Williams. „Cytogenetics of childhood T-cell leukemia.“ *Blood*, 1988: 72: 1560-1566. 94(11):3707-16.
- Raimondi, SC, PK Roberson, CH Pui, FG Behm, a GK Rivera. „Hyperdiploid (47-50) acute lymphoblastic leukemia in children.“ *Blood*, 1992: 79(12):3245–52.
- Raimondi, SC, CH Pui, ML Hancock, FG Behm, L Filatov, a GK Rivera. „Heterogeneity of hyperdiploid (51-67) childhood acute lymphoblastic leukemia.“ *Leukemia*, 1996: 213-224.
- Raimondi, SC, MN Chang, Y Ravindranath, FG Behm, MV Gresik, CP Steuber, HJ Weinstein, AJ Carroll. „Chromosomal abnormalities in 478 children with acute myeloid leukemia: clinical characteristics and treatment outcome in a cooperative pediatric oncology group study-POG 8821.“ *Blood*, 1999:

- Raimondi, SC, Y Zhou, S Shurtleff, JE Rubnitz, CH Pui, a FG Behm. „Near-triploidy and near-tetraploidy in childhood acute lymphoblastic leukemia: association with B-lineage blast cells carrying the ETV6-RUNX1 fusion, T-lineage immunophenotype, and favorable outcome.“ *Cancer Genet Cytogenet*, 2006: 169(1):50–57.
- Raynaud, SD, N Dastugue, D Zoccola, SA Shurtleff, S Mathew, a SC Raimondi. „Cytogenetic abnormalities associated with the t(12;21): a collaborative study of 169 children with t(12;21)-positive acute lymphoblastic leukemia.“ *Leukemia*, 1999: 13(9):1325-30.
- Redner, RL, EA Rush, S Faas, WA Rudert, a SJ Corey. „The t(5;17) variant of acute promyelocytic leukemia expresses a nucleophosmin-retinoic acid receptor fusion.“ *Blood*, 1996: 87(3):882-6.
- Ritterbach, J, W Hiddenmann, JD Beck, M Schrappe, G Janka-Schaub, WD Ludwig, J Harbott, F Lampert. „Detection of hyperdiploid karyotypes (>50 chromosomes) in childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL) using fluorescence in situ hybridization (FISH).“ *Leukemia*, 1998: 12:427-433.
- Romana, SP, M Le Coniat, a R Berger. „t(12;21): A new recurrent translocation in acute lymphoblastic leukaemia.“ *Gen Chrom Cancer*, 1994: 9:186-191.
- \*Rowley, JD. „Rearrangements Involving Chromosome Band 11Q23 in Acute Leukaemia.“ *Seminars in Cancer Biology*, 4, 1993: 377-385.
- Rubnitz, JE, FG Behm, CH Pui, a kol. „Genetic studies od childhood acute lymphoblastic leukemia with emphasis on p16, MLL and ETV6 gene abnormalities: result of St Jude Total Therapy Study XII.“ *Leukemia*, 1997: 11: 1201-1206.
- Rubnitz, JE, JR Downing, CH Pui, a kol. „TEL gene rearrangements in acute lymphoblastic leukemia: a new gene marker with prognosis significance.“ *J Clin Oncol*, 1997: 15: 1150-1157.
- Rubnitz, JE, SC Raimondi, X Tong, a kol. „Favorable impact of the t(9;11) in childhood acute myeloid leukemia.“ *J Clin Oncol*, 2002: 20: 2302-2309.
- Sachidanandam, R, D Weissman, SC Schmidt, JM Kakol, LD Stein, G Marth, S Sherry, JC Mullikin, BJ Mortimore, DL Willey, SE Hunt, CG Cole, PC Coggill, CM Rice, Z Ning, J Rogers, DR Bentley, a kol. „A map of human genome sequence variation



- containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms." *Nature*, 2001: 409(6822): 928-933.
- Sandoval, C, SP Mayer, MF Ozkaynak, O Tugal, a S Jayabose. „Trisomy 5 as a sole cytogenetic abnormality in pediatric acute lymphoblastic leukemia." *Cancer Gen Cytogene*, 2000: 118: 69-71.
- \*Secker-Walker, LM. „Chromosomes and genes in acute lymphoblastic leukemia." *New York: Chapman and Hall*, 1997.
- Secker-Walker, LM, on behalf of the European 11q23 Workshop Participants. „General report on the European Union Concerted Action Workshop on 11q23." *Leukemia*, 1998: 12: 779-778.
- Secker-Walker, LM, JM Craig, JM Hawkins, a AV Hoffbrand. „Philadelphia positive acute lymphoblastic leukemia in adults: age distribution, BCR breakpoint and prognostic significance." *Leukemia*, 1991: 5: 196-199.
- Secker-Walker, LM, R Berger, P Fenaux, a kol. „Prognostic significance of the balanced t(1;19) and unbalanced der(19)t(1;19) translocations in acute lymphoblastic leukemia." *Leukemia*, 1992: 6: 363-369.
- \*Secker-Walker, LM, SD Lawler, a RM Hardisty. „The prognostic implications of chromosomal findings in acute lymphoblastic leukemia at diagnosis." *Br Med J*, 1978: 2: 1529-1530.
- Shaffer, LG, AL Beaudet, AR Brothman, B Hirsch, B Levy, CL Martin, JT Mascarello, KW Rao. „Microarray Analysis for constitutional cytogenetic abnormalities." *Genet Med*, 2007: 9:654-662.
- Solinas-Toldo, S, S Lampel, S Stilqenbauer, J Nickolenko, A Benner, H Dohner, T Cremer, P Lichter. „Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances." *Genes Chromosomes Cancer*, 1997: 20:399-407.
- Starý, J, P Gajdos, a kol. „Improved results in children with acute lymphoblastic leukemia treated with the ALL-BFM 90 protocol in the Czech Republic." *Časopis lékařů českých*, 2003: 404-409.
- Swerdlow, SH, E Campo, NL Harris, ES Jaffe, SA Pileri, H Stein, J Thiele, JW Vardiman (eds.). "WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues." *IARC: Lyon*, 2008.

- Taub, R, I Kirsch, C Morton, a kol. „Translocation of the c-myc gene into immunoglobulin heavy chain locus in human Burkitt lymphoma and murine plasmacytoma cells.“ *Proc Natl Acad Sci*, 1982: 79:7837-7841.
- \*Thompson, SL, a DA Compton. „Chromosomes and cancer cells.“ *Chromosomes Res*, 2011: 19:433-444.
- Trka, J, J Zuna, C Haškovec, A Brabencová, M Kalinová, K Mužíková, R Paukertová, O Hrušák, Z Zemanová, K Michalová, J Starý. „Detekce hybridních genů BCR/ABL, MLL/AF4 a TEL/AML1 a sledování minimální residuální nemoci u dětských pacientů s akutní lymfoblastickou leukémií.“ *Časopis Lékařů českých*, 1999: 12-17.
- Trueworthy, R, J Shuster, T Look, a kol. „Ploidy of lymphoblasts is the strongest predictor of treatment outcome in B-progenitor cell acute lymphoblastic leukemia of childhood: a Pediatric Oncology Group study.“ *J Clin Oncol*, 1992: 10: 606-613.
- Tse, W, S Meshinchi, TA Alonzo, a kol. „Elevated expression of the AF1q gene, an MLL fusion partner, is an independent adverse prognostic factor in pediatric acute myeloid leukemia.“ *Blood*, 2004: 104: 3058-3063.
- Visser, LE, P Stankiewicz, SA Yatsenko, E Crawford, H Creswick, VK Proud, BB de Vries, R Pfundt, CL Marcelis, J Zackowski, W Bi, AG van Kessel, JR Lupski, JA Veltman. „Complex chromosome 17p rearrangements associated with low-copy repeats in two patients with congenital anomalies.“ *Hum Genet*, 2007: 121(6):697-709.
- von Bergh, A, B Emanuel, S van Zelder-Bhola, T Smetsers, R van Soest, M Stul, H Vranckx, E Schuur, A Hagemeyer, P Kluijn. „A DNA probe combination for improved detection of MLL/11q23 breakpoints by double-color interphase-FISH in acute leukemias.“ *Genes Chromosomes Cancer*, 2000: 28(1):14-22.
- Wells, RA, C Catzavelos, a S Kamel-Reid. „Fusion of retinoic acid receptor alpha to NuMA, the nuclear mitotic apparatus protein, by a variant translocation in acute promyelocytic leukaemia.“ *Nat Genet*, 1997: 17(1):109-13.
- Wetzler, M, RG Dodge, K Mrózek, a kol. „Prospective karyotype analysis in adult acute lymphoblastic leukemia: the cancer and leukemia Group B experience.“ *Blood*, 1999: 93: 3983-3993.

- Wiemels, JL, A Pagnamenta, GM Taylor, OB Eden, FE Alexander, MF Greaves, a kol. „In utero origin of t(8;21) AML1-ETO translocations in childhood acute myeloid leukemia.“ *Blood*, 2002: 99(10):3801-5.
- Wiemels, JL, AM Ford, ER Van Wering, A Postma, a M Greaves. „Protracted and variable latency of acute lymphoblastic leukemia after TEL-AML1 gene fusion in utero.“ *Blood*, 1999: 1057-1062.
- Zemanová, Z, K Michalová, J Březinová, L Šindelářová, Š Kurková, P Smíšek, J Zuna, J Trka, J Starý. „FISH v diagnostice dětských akutních lymfatických leukemií (ALL).“ *Časopis Lékařů českých*, 2001: 519-524.
- Zhao, X, C Li, JG Paez, K Chin, PA Jänne, TH Chen, L Girard, J Minna, D Christiani, C Leo, JW Gray, WR Sellers, M Meyerson. „An integrated view of copy number and allelic alterations in the cancer genome using single nucleotide polymorphism arrays.“ *Cancer Res*, 2004: 64(9):3060-71.
- Zuna, J, AM Ford, M Peham, a kol. „TEL deletion analysis supports a novel view of relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia.“ *Clin Cancer Res*, 2004: 10(16):5355-5360.
- Zwaan, CM, GJ Kaspers, R Pieters, a kol. „Cellular drug resistance in childhood acute myeloid leukemia is related to chromosomal abnormalities.“ *Blood*, 2002: 100: 3352-3360.

## **Knižní zdroje**

- Michalová, K. *Úvod do lidské cytogenetiky*. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví v Brně, 1999.
- Nussbaum, R, H Willard, a R Mcinnes. *Klinická genetika*. Praha: Thompson & Thompson. 1. vyd. Praha : Triton, 2004.
- Sverre, H, a F Mitelman. *Cancer cytogenetics*. Hoboken, New Jersey: Wiley-Blackwell, 2009.
- Zemanová, Z. *Molekulárně cytogenetická analýza nádorových buněk a její význam v diagnostice vybraných hematologických malignit*. Praha: Habilitační práce, 2007.