

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Doktorské studijní programy v biomedicině

studijní obor

MOLEKULÁRNÍ A BUNĚČNÁ BIOLOGIE, GENETIKA A VIROLOGIE



Mgr. Halka Lhotská

NEBALANCOVANÉ ZMĚNY V GENOMU NÁDOROVÝCH BUNĚK A JEJICH
ÚLOHA V PATOGENEZI ONEMOCNĚNÍ

UNBALANCED CHANGES IN CANCER CELLS GENOME AND ITS ROLE IN
CANCER PATHOGENESIS

Disertační práce

Vedoucí práce:

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.

Tato práce byla vypracována za podpory grantů IGA MZ ČR č. NT/13212-4, PRVOUK-P27/LF1/1, RVO-VFN64165.

V Praze dne 17.10.2017

Poděkování

Velice ráda bych na tomto místě poděkovala své školitelce Doc. RNDr. Zuzaně Zemanové, CSc. za celkovou podporu, trpělivost a odborné vedení nejen při přípravě disertační práce. Také velmi děkuji vedoucí Centra nádorové cytogenetiky, ÚLBLD VFN a 1. LF UK prof. Ing. Kyře Michalové, DrSc. za možnost stát se členem této laboratoře, za její odborné vedení a cenné rady poskytnuté při řešení daných témat. Dále děkuji celému kolektivu laboratoří Centra nádorové cytogenetiky, ÚLBLD VFN a 1. LF UK a cytogenetické laboratoře ÚHKT. Tato práce by nemohla vzniknout bez podpory kolegyně z obou těchto pracovišť, která rutinně ale i pro výzkumné účely zpracovávají a vyšetřují vzorky kostní dřeně nemocných s hematologickými onemocněními a vzorky mozkové tkáně pacientů s mozkovými nádory. Analýza těchto vzorků se pak stala podkladem pro veškeré publikační výstupy.

Také děkuji všem spolupracujícím lékařům a laboratořím za poskytnutí klinických údajů a vstřícnou spolupráci týkající se našich společných pacientů. Též bych ráda poděkovala kolegům z oddělení Molekulární genetiky ÚHKT (zejména Mgr. Hance Čechové a Ing. Zdeňku Krejčíkovi, PhD) za spolupráci v oblasti analýzy vzorků od pacientů s mozkovými nádory.

V neposlední řadě bych ráda poděkovala celé své rodině, zejména svému manželovi a dceři za jejich podporu a trpělivost, bez kterých by tato práce nemohla vzniknout.

Abstrakt

Genomová nestabilita projevující se mimo jiné přítomností nebalancovaných změn je charakteristickým rysem maligní transformace buňky. Metodami I-FISH, mFISH, mBAND, CGH array, SNP array, MLPA, MS-MLPA a MS-PCR jsme analyzovali genomové aberace, metylační a mutační stav některých klinicky významných genů. Zaměřili jsme se na dvě skupiny nemocných, u kterých se často setkáváme s nebalancovanými změnami – pacienty s maligními mozkovými nádory (gliomy) a nemocné s myelodysplastickými syndromy (MDS).

U pacientů s nízkostupňovými gliomy (WHO grade I-II) patřila k nejčastějším nálezům kodelece 1p/19q (82,6 % nemocných s oligodendrogliomy a oligoastrocytomy), mutace *IDH1/IDH2* genů (87 % s WHO grade I-II gliomy), získaná UPD 17p (72,2 % pacientů s astrocytomy) a obecně vyšší výskyt nebalancovaných změn u nemocných s astrocytomy. Popsali jsme dosud nepublikovanou metylaci promotoru genu *MLH3* u 60,9 % nemocných s oligodendrogliomy a 27,3 % pacientů s astrocytomy. Rovněž jsme sledovali zisk chromosomových aberací u nemocných s recidivujícími nádory.

V souboru nemocných s MDS a komplexním karyotypem jsme studovali přestavby deletovaného chromosomu 5 a popsali jsme jeho nejčastější translokační partnery. U 49 % pacientů z tohoto souboru jsme pozorovali znaky chromotripsis spojené s vysokým počtem delecí/ amplifikací, s četným výskytem aberací krátkých ramen chromosomu 17, velmi špatnou prognózou a vysokým rizikem transformace do akutní myeloidní leukémie (AML). Za použití kombinace CGH array, I-FISH a sekvenačních technik jsme popsali dosud neznámý fúzní gen *ASXLI-TSHZ2* u pacienta s MDS a s isoderivatívním chromosomem 20 - ider(20q).

Tyto nálezy přispívají nejen k přesnému určení subtypu onemocnění nebo ke stanovení jeho prognózy, ale v budoucnu mohou přispět také k lepšímu pochopení patogeneze hematologických malignit a solidních nádorů a tím i k vývoji nových léčebných přístupů cílených na konkrétní genetický profil nádorových buněk.

Klíčová slova: molekulární analýza, cytogenetická analýza, maligní mozkové nádory, myelodysplastické syndromy

Abstract

Malignant transformation of cell is characterized by genomic instability that involves unbalanced changes besides other things. We analyzed genomic aberrations, promoter methylation and mutations of several clinically relevant genes using I-FISH, mFISH, mBAND, CGH array, SNP array, MLPA, MS-MLPA and MS-PCR methods. We focused on two groups of patients well known for frequent appearance of unbalanced changes – patients with malignant brain tumors (gliomas) and patients with myelodysplastic syndromes (MDS).

In patients with low grade glioma (WHO grade I – II), the codeletion of 1p/19q (82,6% oligodendrogliomas and oligoastrocytomas), mutation of *IDH1/IDH2* genes (87% WHO grade I-II gliomas), copy neutral loss of heterozygosity of 17p (72,2% astrocytomas) and higher presence of unbalanced aberration in astrocytomas belongs to the most frequent findings. We described yet unpublished methylation of *MLH3* gene promoter in 60,9% oligodendrogliomas and in 27,3% astrocytomas. We also observed clonal evolution in patients with recurrent tumors.

We studied secondary rearrangements of deleted chromosome 5 in patients with MDS and complex karyotype and we described its most recurrent translocation partners and breakpoints. We observed chromothripsis in 49% of these patients and it was frequently associated with high number of deletions/ amplifications, aberrations of short arm of chromosome 17, poor prognosis and higher risk of transformation to acute myeloid leukemia (AML). We also described a new fusion gene *ASXLI-TSHZ2* in patient with MDS and isoderivative chromosome 20 [ider(20q)] using CGH array, I-FISH and sequencing methods.

These findings contribute to early and specific classification of cancer subtype as well as to determination of patient's prognosis. They may also help better understanding of hematologic malignancies or solid tumor pathogenesis and therefore assist in the development of new therapeutic approaches targeted to the particular genetic profile of cancer cells.

Key words: molecular analysis, cytogenetic analysis, malignant brain tumor, myelodysplastic syndromes

Obsah

ABSTRAKT	7
ABSTRACT.....	8
OBSAH.....	9
SEZNAM ZKRATEK.....	11
ÚVOD.....	15
CÍLE PRÁCE	17
SOUČASNÉ POZNATKY O NESTABILITĚ GENOMU NÁDOROVÝCH BUNĚK A JEJÍ ROLI V PATOGENEZI ONEMOCNĚNÍ	18
SHRNUTÍ VÝSLEDKŮ NA ZÁKLADĚ PUBLIKAČNÍCH VÝSTUPŮ	24
1. ANALÝZA GENETICKÝCH A EPIGENETICKÝCH ZMĚN V GENOMU NÁDOROVÝCH BUNĚK NEMOCNÝCH S MALIGNÍMI MOZKOVÝMI GLIOMY	24
2. ANALÝZA NEBALANCOVANÝCH ZMĚN A KOMPLEXNÍCH KARYOTYPŮ U NEMOCNÝCH S MYELOYDYSPLASTICKÝMI SYNDROMY	34
ZÁVĚR.....	43
SEZNAM PŘÍLOH	45
CITACE POUŽITÉ V DOPROVODNÉM TEXTU	57

Seznam zkratek

<i>ABL1</i>	Abelson urine leukemia viral oncogene homolog 1
α -KG	alpha ketoglutarate (α -ketoglutarát)
AML	acute myeloid leukemia (akutní myeloidní leukémie)
<i>ASXL1</i>	additional sex combs like 1
<i>ATRX</i>	ATRX, chromatin remodeler
BAC	bacterial artificial chromosome
<i>BCR</i>	breakpoint cluster region protein
CCR	commonly conserved region (společná zachovaná oblast)
<i>CDKN2A</i>	cyclin dependent kinase inhibitor 2A
<i>CDKN2B</i>	cyclin dependent kinase inhibitor 2B
CDR	commonly deleted region (společná deletovaná oblast)
<i>CEBPA</i>	encoding CCAAT-enhancer binding protein α
C-GIMP	CpG island methylator phenotype
CGH	comparative genomic hybridization (komparativní genomová hybridizace)
CML	chronic myeloid leukemia (chronická myeloidní leukémie)
CLL	chronic lymphocytic leukemia (chronická lymfatická leukémie)
D-2-HG	D-2-hydroxyglutarate (D(R)-2-hydroxyglutarát)
dmin	double minute
DNA	deoxyribonucleic acid (deoxyribonukleová kyselina)
<i>EGF</i>	epidermal growth factor (epidermální růstový faktor)
<i>EGFR</i>	epidermal growth factor receptor (receptor pro epidermální růstový faktor)
EORTC	European Organization for Research and Treatment of Cancer (Evropská organizace pro výzkum a léčbu rakoviny)
FISH	fluorescence <i>in situ</i> hybridization (fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace)
HIF	hypoxia-inducible factor (hypoxie – inducibilního faktoru)
hsr	homogenously staining region (homogenně se barvící oblast)
<i>GATA2</i>	GATA binding protein 2
<i>IDH</i>	isocitrate dehydrogenase
I-FISH	interphase FISH (interfázni FISH)

IPSS-R	revised interantional prognostic scoring system (revidovaný mezinárodní skórovací systém)
KD	kostní dřev
mBAND	multicolor banding (mnohobarevné pruhování)
MDS	myelodysplastic syndromes (myelodysplastické syndromy)
MDS-RS	MDS with ring sideroblasts (MDS s prstenčitými sideroblasty)
mFISH	multicolor FISH (mnohobarevná FISH)
<i>MGMT</i>	O-6-methylguanine-DNA methyltransferase
miRNA	micro RNA
<i>MLH3</i>	mutL homolog 3
MLPA	multiplex ligation-dependent probe amplification
MMBIR	microhomology-mediated break-induced replication (mikrohomologií zprostředkované spojování volných konců)
MMR	mismatch repair
MRI	magnetic resonance imaging (magnetická rezonance)
<i>MSH6</i>	mutS homolog 6
MS-MLPA	methylation-specific MLPA (metylačně specifická MLPA)
MS-PCR	methylation-specific polymerase chain reaction (metylačně specifická polymerázová řetězová reakce)
<i>MYC</i>	MYC proto-oncogene
NADP+	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (nikotinadenindinukleotidfosfát)
NCIC	National Cancer Institute of Canada (Kanadského národního ústavu pro nádorová onemocnění)
NOS	not otherwise specified
OS	overall survival (celkové přežití)
PK	periferní krev
<i>PTEN</i>	phosphatase and tensin homolog
<i>RBI</i>	retinoblastoma transcriptional corepressor 1
<i>RUNX1</i>	Runt-related transcription factor 1
<i>TP53</i>	tumor protein p53
RNA	ribonucleic acid (ribonukleová kyselina)
RTK	receptor tyrosine kinase (receptor tyrosin kináza)
SHH	sonic hedgehog

SNP	single nucleotide polymorphism (jednonukleotidový polymorfismus)
<i>TSHZ2</i>	teashirt zing finger homeobox 2
UPD	uniparental disomy (uniparentální disomie)
WHO	World Health Organization (Světová zdravotnická organizace)

ÚVOD

Analýza genomu nádorových buněk za využití cytogenetických a molekulárně genetických metod patří k základním vyšetřením nemocných s nádorovým onemocněním. Tyto přístupy jsou potřebné nejen ke stanovení diagnózy, ale také k určení velikosti nádorového klonu, stanovení prognózy, detekce remise, či relapsu a sledování úspěšnosti léčby. Výzkum genetických a epigenetických změn v nádorově transformovaných buňkách rozvíjí naše znalosti o vzniku, vývoji a metabolismu nádorů, přispívá k pochopení molekulárních mechanismů tumorigeneze a umožňuje vývoj nových léčebných strategií.

V nádorových buňkách dochází k celé řadě náhodných i nenáhodných genetických změn. Mnoho z nich hraje důležitou roli při vzniku a progresi neoplázií. Během minulých desetiletí byly u většiny nádorových onemocnění popsány chromosomové aberace, které jsou specifické pro konkrétní typ a maligní stupeň nádoru. Množství a charakter změn odráží celkovou nestabilitu genomu nádorových buněk. Velká míra genomové nestability se na chromosomové úrovni projevuje vznikem komplexních změn karyotypu často provázených přítomností nebalancovaných změn a obvykle je spojena s agresivními formami nádorů a s vysokým stupněm nádorové transformace.

V rámci předkládané disertační práce jsme analyzovali nebalancované přestavby genomu, vybrané genové mutace a metylační stav genových promotorů u nemocných s různými typy maligních a premaligních onemocnění. Zaměřili jsme se zejména na dvě skupiny onemocnění, které jsou známé častým výskytem nebalancovaných genomových změn – pacienti s maligními mozkovými nádory a nemocné s MDS (myelodysplastickými syndromy). K přesné detekci chromosomových aberací jsme využívali konvenční a molekulárně cytogenetické metody, především metody založené na fluorescenční *in situ* hybridizaci (FISH) – I-FISH (interfázni FISH), mFISH (mnohobarevnou FISH) a mBAND (mnohobarevné pruhování s vysokou rozlišovací schopností). Dále jsme chromosomové změny analyzovali pomocí čipových technologií (array) využívajících princip CGH (komparativní genomové hybridizace) a SNP (jednonukleotidových polymorfismů). Genové mutace a metylace promotorových oblastí jsme detekovali pomocí metody MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification) a MS-MLPA (metylačně specifické MLPA). Výsledky z metody MS-

MLPA jsme následně ověřovali pomocí MS-PCR (metylačně specifické polymerázové řetězové reakce).

V první části disertační práce jsou shrnuty současné poznatky o balancovaných a nebalancovaných změnách v genomu nádorových buněk a jejich úloze v patogenezi onemocnění. Druhá část obsahuje soubor publikovaných prací opatřených komentářem k vlastním výsledkům.

Cíle práce

1. Analýza genetických a epigenetických změn v genomu nádorových buněk nemocných s maligními mozkovými gliomy

Molekulárně cytogenetická analýza genomu nádorových buněk dospělých nemocných s vybranými maligními mozkovými nádory – astrocytomy, oligodendrogliomy, oligoastrocytomy a glioblastomy; detekce rekurentních aberací; analýza metylace promotorových oblastí vybraných genů; popis získaných aberací u pacientů s relabujícími difúzními mozkovými gliomy; zhodnocení vlivu nalezených změn na diagnózu a prognózu nemocných; sestavení panelu metod pro detekci specifických změn a jejich zavedení do rutinní diagnostiky difúzních gliomů.

2. Analýza nebalancovaných změn a komplexních karyotypů v buňkách kostní dřeně u nemocných s myelodysplastickými syndromy

Cytogenetická a molekulárně cytogenetická analýza buněk kostní dřeně nemocných s MDS; detekce rekurentních chromosomových aberací; zjištění nejčastějších zlomových míst na chromosomech zahrnutých do komplexních přestaveb; analýza zlomových míst na úrovni vybraných genů; popis frekvence chromotripsis a jejího prognostického významu pro nemocné; zhodnocení vlivu popsanych změn na diagnózu a prognózu onemocnění.

Současné poznatky o nestabilitě genomu nádorových buněk a její roli v patogenezi onemocnění

Mitotické chromosomy slouží především k přenosu a zachování genetické informace během buněčného cyklu. Stabilita chromosomů během tohoto procesu je nezbytná pro normální fungování somatických buněk, a proto byla v průběhu evoluce vyvinuta řada kontrolních a reparačních mechanismů zajišťujících tuto funkci (Ye, et al. 2007). Přesto není genom lidských somatických buněk stabilní. Replikační proces není absolutně spolehlivý a dochází i k chybám v segregaci chromosomů během mitózy. Chemické změny, virové nákazy a ionizační záření způsobují celou řadu změn ve struktuře DNA. Tyto změny zahrnují například substituce jednotlivých bází, strukturní přestavby genomu, zvýšení počtu kopií jednotlivých genů, chromosomů či celých chromosomových sad nebo naopak jejich ztráty. Poškozené buňky jsou průběžně nahrazovány novými, které jsou generovány z kmenových buněk dané tkáně. Celková kontrola těchto dějů na buněčné úrovni je tedy dynamický proces s mnoha kontrolními body (Bernheim 2010).

První hypotézu zabývající se původem nádorového bujení formuloval Boveri již v roce 1914 (Boveri 1914). Tato teorie předpokládala, že: (1) maligní buňky pochází z normálních somatických buněk; (2) příčina abnormálního chování nádoru je způsobena nádorem samotným, a ne jeho okolím; (3) nádorové buňky ztratily vlastnosti normálních somatických buněk; (4) každý nádor má obvykle původ v jediné somatické buňce; a že (5) nádorové buňky mají abnormální chromatinový obsah (Hsu 1987). Vzhledem k omezeným možnostem vyšetřovacích metod používaných v té době k analýze chromosomů v somatických buňkách však nebylo možné dlouho tuto hypotézu experimentálně prokázat. Teprve v roce 1956 Tjio a Levan popsali přesný počet chromozomů (46) v lidských somatických buňkách (Tjio and Levan 1956) a jejich závěry byly rychle potvrzeny i studiemi Forda a Hamertona (Ford and Hamerton 1956). Tyto práce stimulovaly zájem vědců o lidskou nádorovou cytogenetiku a vedly k potvrzení některých předpokladů Boveriho teorie.

Aktuální hypotéza tumorigeneze je založena na předpokladu, že mutace (včetně chromozomových přestaveb) umožní dělicí se buňce získat selektivní výhodu (Schvartzman, et al. 2010). V průběhu dalších dělení je pak zajištěna jejich stabilita v genomu buňky a v novém kole klonální selekce může docházet k zisku dalších

mutací. Tento mnoha-krokový proces vyústí ve vznik nádoru, který může tvořit metastázy, být klinicky agresivní a expandovat do okolních tkání (Greaves and Maley 2012).

Na chromosomové úrovni se nádorová buňka projevuje vznikem numerických a/nebo strukturních aberací, které lze detekovat pomocí různých cytogenetických a molekulárně genetických technik. Numerické aberace zahrnují případy, při kterých dochází ke změně počtu chromosomů či celých chromosomových sad. Vznikají nejčastěji v důsledku chyb v buněčném cyklu a v segregaci chromosomů během mitózy (Gollin 2005). Do této skupiny patří polyploidie (zmnožení celých chromosomových sad) a aneuploidie, při kterých jeden nebo více chromosomů chybí (monosomie) či jsou přítomny v nadpočetných kopiích (trisomie, tetrasomie atd.).

Strukturní chromosomové aberace představují skupinu s abnormální stavbou chromosomu, přičemž původní množství genetického materiálu může, ale nemusí být zachováno. Vznikají nejčastěji v důsledku dvouřetězcových zlomů DNA, které nejsou opraveny reparačními buněčnými mechanismy, nebo vlivem ztráty telomerické integrity. Dělíme je na balancované (původní množství genetického materiálu zůstává zachováno) a nebalancované (část genetického materiálu chybí či je zmnožena). Balancované změny zahrnují chromosomové translokace, které jsou popisovány jako reciproká výměna genetického materiálu mezi dvěma chromosomy. Translokace často zahrnují geny pro transkripční faktory či protein kinázy. Dále sem řadíme chromosomové inserce, při kterých dochází k přesunu chromosomového fragmentu z jednoho chromosomu na druhý, a inverze, která vzniká jako důsledek dvou zlomů na jednom chromosomu a následného otočení uvolněného fragmentu do invertované (opačné) polohy. Strukturní aberace vedou k nádorové transformaci buňky různými mechanismy. Může při nich například dojít ke zlomům v různých genech, což následně vede k jejich fúzi za vzniku nového hybridního genu, který kóduje nový chimerický protein. Ten pak může hrát zcela novou roli ve fyziologii buňky. Příkladem tohoto typu strukturní přestavby je fúzní gen *BCR-ABL*, který vzniká na tzv. Ph-chromosomu u nemocných s CML (chronickou myeloidní leukémií) v důsledku translokace $t(9;22)(q34;q11)$ (Nowell and Hungerford 1960). Dalším mechanismem může být deregulace normální funkce genu tzv. pozičním efektem. Jako příklad může sloužit translokace $t(8;14)(q24;q32)$ u nemocných s Burkittovým lymfomen, při které je *MYC* gen, normálně lokalizovaný v oblasti 8q24, přemístěn do blízkosti zesilovače (enhanceru) těžkého řetězce imunoglobulinového genu lokalizovaného v oblasti 14q32,

čímž dochází k jeho deregulaci (Toujani, et al. 2009).

Mezi nebalancované změny patří aberace, při kterých dochází ke ztrátě nebo zisku jednoho či více genů nebo chromosomových segmentů. Ziskem (amplifikací) genetického materiálu dochází ke zvýšení genové dávky a amplifikovaná oblast velice často zahrnuje některý z protoonkogenů (např. *EGFR*, *MYC*, apod.). Specifickou variantou amplifikace je tzv. „hsr“ (homogenně se barvící oblast, homogenously staining region). V tomto případě vlivem opakovaného procesu zlomů a fúzí dochází ke vložení mnoha kopií určitého genu či genů do chromosomu ve formě bloků či opakovaných amplikonů. hsr vždy zahrnuje oblast nesoucí protoonkogen. Další variantou jsou tzv. „dmin“ (double minute). Jedná se o extrachromozomální kruhové prstence, které se obvykle prvně objeví v metafázi, a posléze je možné je najít i v profázních jádrech. dmin se mohou v buňce vyskytovat ve vysokém počtu a jejich množství se může mezi jednotlivými buňkami lišit. V některých případech může dojít k vypuzení dmin z jádra a dokonce i z cytoplasmu buňky (Valent, et al. 2001).

Další skupinu nebalancovaných změn představují delece. Jsou spojené se ztrátou genetického materiálu a často zahrnují tumor-supresorové geny (např. *RBI*, *TP53*, *CDKN2A*, apod.), reparační geny a geny pro miRNA.

Chromosomové aberace lze v nádorových buňkách nalézt samostatně či v různých kombinacích. Přítomnost řady různých chromosomových aberací a jejich kombinací je typickým projevem genové nestability nádorových buněk. Pokud dochází ke kumulaci více změn v jedné buňce, označujeme takový nález jako komplexní karyotyp. Definice komplexního karyotypu se mezi jednotlivými autory liší (Breems, et al. 2008). Nejčastěji jsou komplexní karyotypy popisovány jako změny, které zahrnují 3 a více chromosomů anebo takové změny, kde došlo ke třem a více zlomům na chromosomech (Schoch, et al. 2001).

Nedávný rozvoj metod sekvenování nové generace v kombinaci se SNP array odhalila v genomu nádorových buněk přítomnost velkého množství kryptických intra- i inter- chromosomových přestaveb, které jsou natolik složité, že pravděpodobně nemohly vzniknout postupně a nezávisle na sobě. Tento jev byl označen jako *chromotripsis* (Stephens, et al. 2011). Stěžejním znakem chromotripsis je vznik desítek či stovek DNA zlomů lokalizovaných na jednotlivých chromosomech nebo jejich částech (zlomové clustery). Na těchto chromosomech lze pozorovat charakteristický vzor zahrnující kolísání mezi jednou až mnoha kopiemi DNA sekvencí. (Maher and Wilson 2012; Stephens, et al. 2011).

V důsledku chromotripsis vznikají masivní přestavby genomu, při kterých může dojít ke ztrátě tumor supresorových genů, genovým fúzím či genovým deregulacím. To může mít významný vliv na buněčnou transformaci. Molekulární mechanizmy a příčiny tohoto jevu doposud nejsou zcela objasněny. Model chromotripsis navržený v původní práci Stephense a kol. předpokládá, že postižený chromosom je během jediné katastrofické události fragmentován a následně jsou jednotlivé fragmenty bez jakékoliv sekvenční homologie nahodile znovu spojeny do vysoce přestavěných marker chromosomů a jiné jsou naopak ztraceny (Stephens, et al. 2011). V současnosti nejvíce přijímanou teorií je hypotéza, která navrhuje fyzické oddělení chromosomů v cytoplasmatické organele označované jako mikrojádru (micronucleus). Mikrojádru jsou běžným důsledkem defektů hromadících se během mnoha buněčných dělení, včetně chyb v mitóze či při DNA replikaci (Terradas, et al. 2010). DNA v mikrojádře nepodléhá žádné kontrole a proto je více náchylná k poškození (Terradas, et al. 2009). Takto poškozená DNA pak může být následně opravena opakovanými cykly mechanismu označovaného jako MMBIR (mikrohomologií zprostředkované spojování volných konců) (Zhang, et al. 2015). Tento proces spočívá v kopírování distálních sekvencí do míst kolapsu replikační vidličky (Liu, et al. 2012). Mikrojádru umožňuje zajistit přechodné podmínky pro izolaci chromosomů během interfáze (Zhang, et al. 2015). Následně během téhož buněčného cyklu mohou být přestavěné chromosomy z mikrojádru integrovány zpět do dceřiného jádra, obzvláště pokud obsahují centromeru (Crasta, et al. 2012; Huang, et al. 2012). Přestože se teorie mikrojader jeví jako nejpravděpodobnější, není jediným modelem, který by mohl vysvětlit vznik chromotripsis. Dalšími faktory, které se mohou podílet na vzniku tohoto jevu, jsou například předčasná kondenzace chromosomů, ionizační záření, přerušení apoptózy, zkracování telomer či breakage-fusion-bridge cyklus (Rode, et al. 2016).

Chromotripsis byla poprvé popsána u pacientky s CLL (chronickou lymfocytární leukemií) (Stephens, et al. 2011) a doposud byla pozorována u velkého množství různých typů hematologických malignit i solidních nádorů. Frekvence chromotripsis se mezi jednotlivými typy nádorů velmi liší, od téměř nulového až do stoprocentního výskytu, jako bylo například popsáno u SHH (Sonic Hedgehog) meduloblastomu s mutovaným *TP53* (Rode, et al. 2016). Tento rozdíl může být způsobený odlišnou mírou genomové nestability různých nádorových subtypů. Je velmi pravděpodobné, že nádory s vysokou genomovou nestabilitou, které postupně kumulují mnoho změn, mohou být více náchylné k této katastrofické události. Také použití odlišných

metodologií k detekci chromotripsis a různých definicí tohoto jevu může činit stanovení frekvence chromotripsis obtížným.

K analýze genomových změn v nádorových buňkách je používána kombinace různých metod, zahrnujících nejen klasickou cytogenetickou analýzu, ale i molekulárně cytogenetické a molekulárně genetické metody. Řada z nich je založena na hybridizaci tzv. DNA sond ke specifickým sekvencím DNA. Velký význam pro studium těchto změn získaly metody umožňující analýzu vybraných aberací či celého genomu v jednom experimentu. Z hlediska molekulární cytogenetiky se zejména jedná o metody mFISH, mBAND, CGH array, SNP array a MLPA. Tyto metody jsou v současné době již součástí rutinního provozu cytogenetických laboratoří. Možnosti a limitace jejich využití jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1: Srovnání cytogenetických metod využívaných pro detekci chromosomových aberací a genových mutací. Převzato a upraveno z (Speicher and Carter 2005).

Technika		Klasické pruhování chromosomů	I-FISH	mFISH/ mBAND	CGH array	SNP array	MLPA
Přibližné rozlišení		> 5 Mb	> 50 Kb	> 5 Mb	≥ 50 Kb*	≥ 50 Kb*	až 50 b
Typ aberace	Polyploidie	+	+	+	-	-	-
	Aneuploidie	+	+	+	+	+	+
	Balancovaná translokace	+	+	+	-	-	-
	Nebalancovaná translokace	+	+	+	+	+	+
	Amplifikace (dmin či hsr)	+	+	+	+	+	+
	UPD	-	-	-	-	+	-
	Mutace genu	-	-	-	-	-	+
Intercelulární heterogenita		+	+	+	-	-	-
Potřeba mitózy		+	-	+	-	-	-

* Rozlišovací schopnost CGH array a SNP array se odvíjí od konkrétního rozložení hybridizačních prob.

Nebalancované změny karyotypu lze nalézt v nádorových buňkách nemocných s hematologickými malignitami i solidními nádory. Tyto změny často nalézáme během prvního cytogenetického vyšetření při stanovení diagnózy. Řada těchto změn je specifická pro určitý subtyp malignit či premaligních stavů z čehož vychází aktuální WHO (World Health Organisation) klasifikace nádorových onemocnění. Nemocní jsou dle laboratorních nálezů řazeni do prognostických skupin. Kromě klinického významu hraje výzkum chromosomových aberací nespornou úlohu v pochopení nádorové transformace buněk a jejich významu pro patogenezi nádorového onemocnění. Důsledná analýza rekurentních zlomových míst a změn může vést k odhalení příčin vzniku nádorových onemocnění a může pomoci odhalit aberace, které mohou hrát důležitou roli v raných i pozdních stádiích tumorigeneze.

Shrnutí výsledků na základě publikačních výstupů

1. Analýza genetických a epigenetických změn v genomu nádorových buněk nemocných s maligními mozkovými gliomy

Gliomy jsou primární mozkové nádory vznikající z buněk podpůrné mozkové tkáně (neuroglií) a tvoří 44 % všech nádorů centrální nervové soustavy. Jejich roční výskyt v evropské populaci činí 5,6 nových případů na 100 000 osob (Darlix, et al. 2016). Z hlediska klasifikace, která se donedávna zakládala pouze na histopatologických rysech nádoru, představují difúzní gliomy velmi heterogenní skupinu benigních i maligních tumorů, jež se od sebe navzájem liší prognózou, celkovou dobou přežití i odpovědí na léčbu.

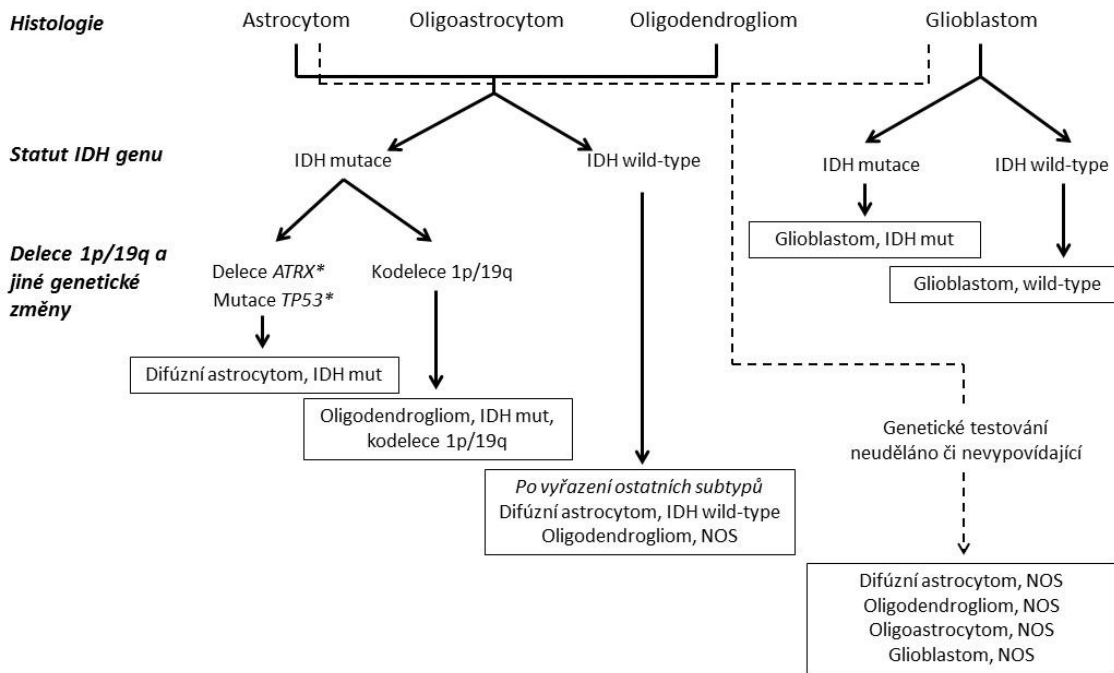
Gliomy jsou pomalu, ale kontinuálně rostoucí léze, u nichž lze předpokládat čtyř-krokový proces vzniku. 1) Okultní stádium – tedy biologický vznik gliomu, při kterém dochází k maligní transformaci iniciujících gliových buněk. Tato transformace nezpůsobuje žádné fyziologické symptomy a událost zůstává nedetekována, protože je pod detekčním limitem magnetické rezonance (MRI). 2) Po určité době růstu gliomu začíná být tento útvar viditelný při použití MRI, avšak prozatím nezpůsobuje žádné klinické symptomy. Je označován jako klinicky dormantní stádium. 3) Symptomatické stádium, kdy gliom začíná způsobovat klinické symptomy, obvykle se jedná o epileptické záchvaty. 4) V určitém stádiu růstu gliomu dochází k tzv. maligní transformaci, tedy náhlému přesmyku doposud netečně se chovající léze k agresivnímu růstu a expanzi nádoru do okolních tkání (Lima, et al. 2016).

Současná WHO klasifikace rozděluje difúzní gliomy nejen podle jejich fenotypu, ale také dle specifických genetických změn. Nádory jsou děleny do čtyř stupňů (WHO grade I-IV) podle stupně malignity. Mezi nejčastější subtypy patří astrocytomy (grade II a III), oligodendrogliomy (grade II a III), oligoastrocytomy (grade II a III) a glioblastomy (grade IV) (Louis, et al. 2016).

Jednou ze specifických genetických změn jsou mutace v genech kódujících *IDH1* (isocitrát dehydrogenázu 1) – R132H a *IDH2* (isocitrát dehydrogenázu 2) – R172M. Nemutovaný protein IDH katalyzuje oxidativní karboxylaci isocitrátu na α -KG (α -ketoglutarát), čímž současně dochází k redukci NADP+

(nikotinadeninnukleotidfosfátu) na NADPH. Mutovaná forma IDH může redukovat α -KG na D-2-HG (D(R)-2-hydroxyglutarát), čímž dochází ke spotřebě NADPH (Dang, et al. 2009). Zvýšená produkce D-2-HG redukuje množství HIF (hypoxie – inducibilního faktoru), což zvyšuje proliferační schopnosti gliových buněk (Koivunen, et al. 2012) a vyvolává oxidativní stres, který napomáhá tumorigenezi, avšak zároveň činí nádor citlivý k chemo- či radioterapii (Molenaar, et al. 2014). Mutovaný IDH protein také inhibuje α -KG dependentní dioxygenázy, a tím způsobuje epigenetickou deregulaci mnoha genů (Guo, et al. 2011), popisovanou jako C-GIMP (CpG island methylator phenotype) (Noushmehr, et al. 2010).

Mutace v *IDH* genu dělí gliomy na dvě genotypově odlišné skupiny (obr 1.), *IDH*-mutované a *IDH*-wildtype. Nedávno publikovaná WHO klasifikace rozděluje astrocytomy, oligodendrogliomy a oligoastrocytomy na *IDH*-mutované, *IDH*-wildtype a NOS kategorie (NOS = not otherwise specified). Do NOS kategorie spadají nádory, u kterých nemohlo být provedeno stanovení *IDH* mutace. Glioblastomy jsou pak děleny na (1) glioblastomy, *IDH*-wildtype (90% případů), které odpovídají klinicky definovaným primárním glioblastomům a vyskytují se u pacientů starších 55 let; (2) glioblastomy, *IDH*-mutované, které odpovídají takzvaným sekundárním glioblastomům a nacházejí se u pacientů mladšího věku s historií nízkostupňového gliomu (grade II) a (3) blíže nespecifikované glioblastomy NOS (Louis, et al. 2016).



Obrázek 1: Zjednodušené schéma klasifikace difúzních mozkových nádorů, založené na histologických a genetických změnách. * - Tato aberace se charakteristicky vyskytuje u zmíněného typu gliomu, avšak není nezbytná pro jeho diagnózu. NOS – not otherwise specified. Převzato a upraveno z (Louis, et al. 2016).

Z důvodu četného výskytu u všech typů nízkostupňových gliomů a rozsáhlého dopadu na fenotyp buňky jsou mutace *IDH* považovány za jednu z nejranějších událostí v tumorigenezi difúzních gliomů (Watanabe, et al. 2009). Z hlediska klinického významu mají pacienti s mutací v *IDH* genu lepší prognózu a celkovou dobu přežití (Houillier, et al. 2010).

Další rekurentní aberací je kombinovaná delece 1p a 19q, která se vyskytuje výhradně u nádorů obsahujících buňky oligodendrocytárního původu, tedy u oligodendrogliomů a oligoastrocytomů. Kombinovaná delece 1p/19q vzniká nejčastěji v důsledku pericentrické fúze za vzniku dvou derivovaných chromosomů $der(1;19)(p10;q10)$ a $der(1;19)(q10;p10)$ a následnou ztrátou prvního z nich (Griffin, et al. 2006; Jenkins, et al. 2006). Podle řady autorů přítomnost této aberace znamená pro pacienty obvykle dobrou prognózu, zejména díky pomalejšímu růstu nádoru a dobré odpovědi na chemo- a radio- terapii (Cairncross, et al. 2013).

Další genetické změny, které napomáhají vzniku a růstu gliomů, se týkají genů patřících mezi základní buněčné signalizační kaskády: p53 a *RBI* (retinoblastoma) (Brennan, et al. 2013). Receptor pro *EGF* (epidermální růstový faktor) může sloužit jako jeden z příkladů. Amplifikace tohoto genu se často vyskytuje u glioblastomu a

anaplastického astrocytumu, *IDH*-wildtype a polovina případů je provázána přítomností variantní formy tohoto genu *EGFRvIII* (Wong, et al. 1992). Tato konstitutivně aktivní forma *EGFR* aktivuje onkogenní transkripční faktor c-Myc, který vede k přeprogramování buněčného metabolismu, a tak usnadňuje proliferaci nádoru (Babic, et al. 2013; Masui, et al. 2013).

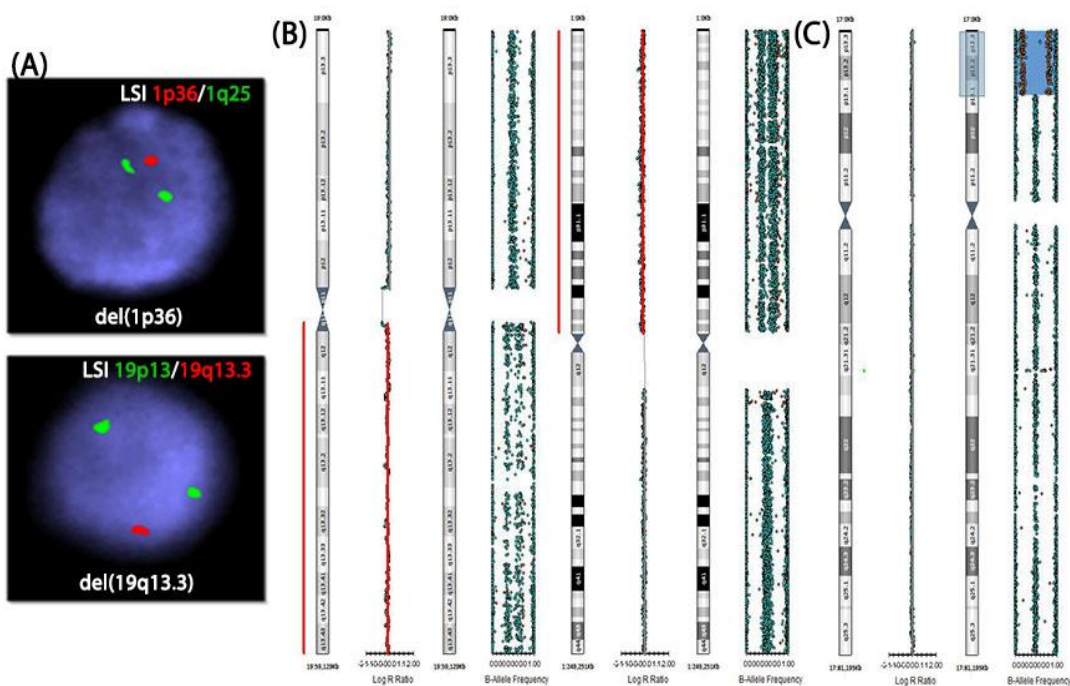
Epigenetické změny, jakým je například hypermetylace promotoru genu *MGMT* (O-6-metylguanin-DNA-metyltransferázy) či metylace promotoru MMR (mismatch repair) genů, se mohou také podílet na charakterizaci nádoru. Hypermetylace *MGMT* promotoru je spojena se sníženou expresí tohoto genu (Esteller and Herman 2004) a hraje stěžejní roli při stanovení léčby maligních gliomů. Nádory s hypermetylovaným *MGMT* promotorem jsou dle klinických studií Evropské organizace pro výzkum a léčbu rakoviny (European Organization for Research and Treatment of Cancer, EORTC) a Kanadského národního ústavu pro nádorová onemocnění (National Cancer Institute of Canada, NCIC) obvykle citlivější k alkylačním činidlům, jako je například preparát temozolomid (Hegi, et al. 2005). Léčba temozolomidem vede k delšímu přežití nemocných a je tedy první volbou u pacientů s glioblastomem a s metylovaným *MGMT* promotorem. (Everhard, et al. 2009; Houillier, et al. 2010).

Ve spolupráci s Neurochirurgickou klinikou Ústřední vojenské nemocnice v Praze a Národní referenční laboratoří pro DNA diagnostiku Ústavu hematologie a krevní transfuze v Praze na našem pracovišti provádíme molekulárně cytogenetickou a epigenetickou analýzu genomu nádorových buněk u nemocných s difúzními gliomy. K detekci vybraných specifických aberací u různých histologických subtypů nádoru používáme I-FISH s panelem lokus-specifických a/ nebo centromerických sond. Konkrétně vyšetřujeme delece tumor supresorových genů *TP53*, *PTEN*, *RB1*, *CDNK2A*, *CDNK2B*, delece chromosomových oblastí 1p36 a 19q13, monosomii chromosomu 10, amplifikaci *EGFR* genu a/nebo trisomii chromosomu 7. Další nebalancované aberace v gliových buňkách detekujeme prostřednictvím SNP array. Mutace *IDH1* a *IDH2* genu vyšetřujeme pomocí metody MLPA. Metylace *MGMT* promotoru a promotorů MMR genů vyšetřujeme prostřednictvím metody MS-MLPA. Pozitivní nález metylace promotoru MMR genů ověřujeme metodou MS-PCR.

V letech 2012 – 2015 jsme retrospektivně či prospektivně vyšetřili celkem 126 pacientů (57 žen a 69 mužů, medián věku 40,5 let) s difúzními gliomy. Nemocné jsme rozdělili do dvou skupin na nízkostupňové gliomy – WHO grade I a II (76 pacientů) a vysokostupňové gliomy – WHO grade III a IV (50 pacientů). Molekulárně

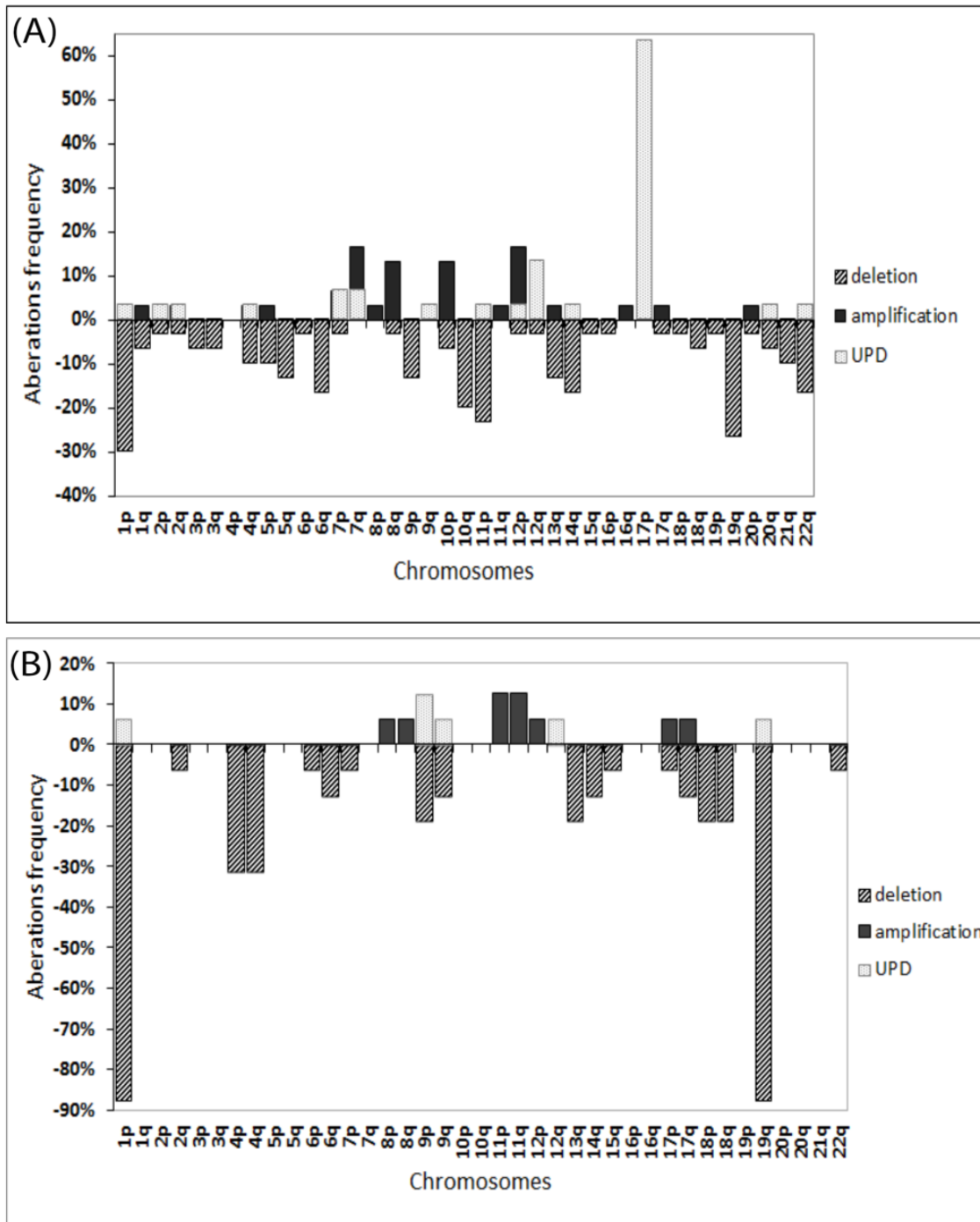
cytogenetickou analýzou jsme v 95 % případů potvrdili původní histologickou diagnózu. Ve zbylých případech pak byl histologický nález upřesněn.

V naší studii jsme se především zaměřili na skupinu nemocných s nízkostupňovými gliomy. Celogenomovou analýzou jsme u této skupiny mozkových nádorů potvrdili výskyt mutací *IDH1* či *IDH2* genu v 87 % všech histologicky definovaných nízkostupňových gliomech. Pro nemocné s nízkostupňovým oligodendrogliomem byl, v souladu s odbornou literaturou, specifický nález 1p/19q kodelece (83% pacientů). Dále jsme pozorovali získanou uniparentální disomii (UPD) na krátkých ramenech chromosomu 17, která je spojována s mutacemi v genu *TP53* (obr. 2) (Suzuki, et al. 2015). Tuto aberaci jsme detekovali u 73 % pacientů s astrocytomem, avšak u žádného pacienta s oligodendrogliomem (příloha 1, příloha 2) (Lhotska, et al. 2015; Lhotská, et al. 2014). O klinickém významu výše zmíněných aberací svědčí skutečnost, že byly zahrnuty do nedávno revidované WHO klasifikace mozkových nádorů (Louis, et al. 2016). Rovněž na našem pracovišti jsme již analýzu aberací metodou I-FISH a detekci mutací genů *IDH1* a *IDH2* metodou MLPA zavedli do rutinní praxe.



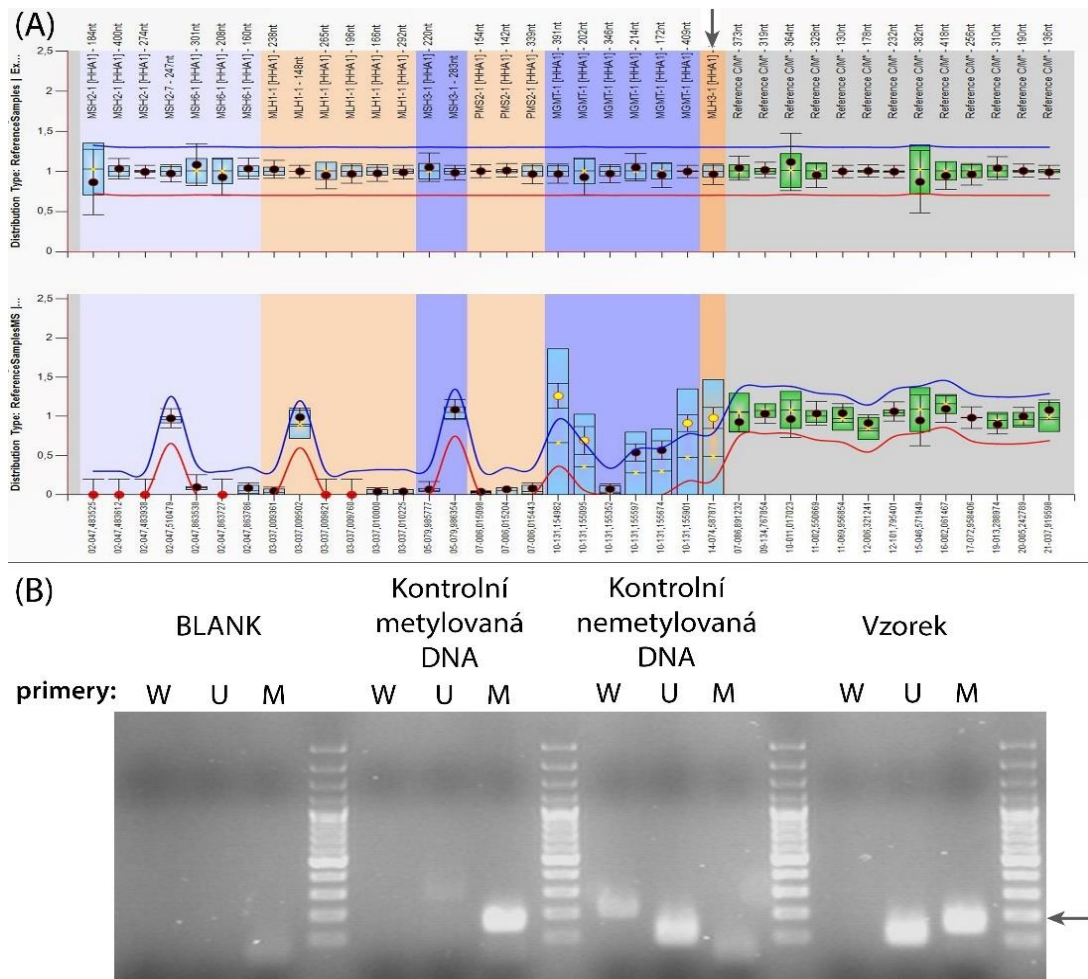
Obrázek 2: Přehled nejčtenějších aberací u astrocytomů a oligodendrogliomů. (A) Kombinovaná delece 1p/19q prokázaná metodou I-FISH u nemocného s oligodendrogliomem. (B) Kombinovaná delece 1p/19q detekovaná metodou SNP array u pacienta s oligodendrogliomem. Rozsah delece je vyznačen červeně. (C) Získaná UPD na 17p detekovaná metodou SNP array u pacienta s astrocytomem. Rozsah získané UPD je vyznačen šedým boxem.

Použitím t-testu pro 2 nezávislé výběry jsme zjistili, že průměrná hodnota chromosomových aberací pozorovaných u pacientů s nízkostupňovými astrocytomy byla statisticky významně vyšší, na hladině významnosti $p=0,001$, než u nemocných s oligodendrogliomy. Medián u astrocytomů byl 6,9 a u oligodendrogliomů 3,5 změn (obr. 3) (příloha 2). Právě vyšší výskyt aberací v buňkách astrocytomů může být jednou z příčin horší prognózy u těchto pacientů.



Obrázek 3: Frekvence aberací detekovaných metodou SNP array u nemocných s astrocytomy (A) a oligodendrogliomy (B). Krátká ramena jsou označena jako p, dlouhá jako q. Ve spodní části grafu jsou znázorněny delece (záporná procentuální hodnota). Amplifikace a získaná UPD jsou umístěny v horní části grafu. Převzato z (Lhotska, et al. 2015)

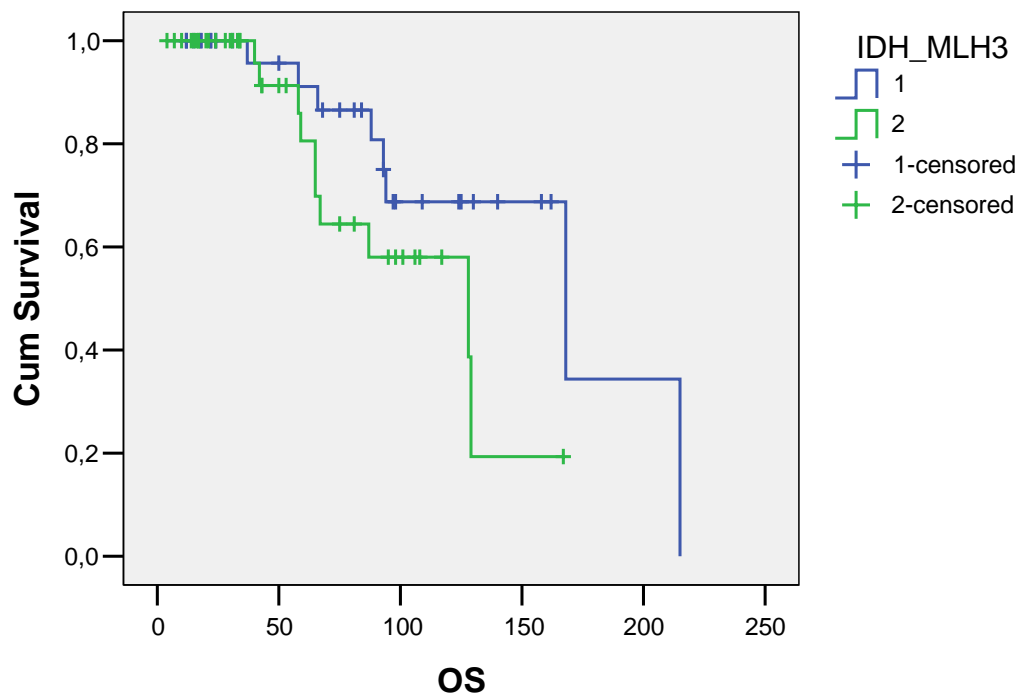
Metylace *MGMT* promotoru jsme pozorovali u 56 % nemocných s nízkostupňovými astrocytomy a u 81 % nemocných s nízkostupňovými oligodendrogliomy. Rovněž inaktivace dalších genů podílejících se na opravách DNA, ke kterým patří i MMR geny, může hrát roli v patogenezi gliomů. V naší pilotní studii (příloha 2) jsme za použití metod MS-MLPA a MS-PCR detekovali metylaci *MLH3* (MutL homologu 3) promotoru u 27 % difúzních astrocytomů a 61 % oligodendrogliomů (obr. 4) (Lhotska, et al. 2015).



Obrázek 4: Metylace *MGMT* a *MLH3* promotoru. Výsledek metody MS-MLPA (A). Metylace *MLH3* promotoru je označena černou šipkou. Kontrola výsledku nálezu z MS-MLPA metodu MS-PCR (B). Navrhli jsme tři sady primerů. První z nich je označený jako W a rozpoznává nekonvertovanou DNA, U primery detekují konvertovanou nemetylovanou DNA a M primery rozeznávají konvertovanou metylovanou DNA.

MLH3 protein je součástí MutLy komplexu, který je hlavní komponentou meiotického aparátu (Lipkin, et al. 2002), avšak hraje roli i v nestabilitě mikrosatelitů (Lipkin, et al. 2000) a je kritickým genetickým modifikátorem CAG expanzivních repetit u Huntingtonovy choroby (Pinto, et al. 2013). V somatických buňkách je *MLH3* nejspíš lokalizován na centrozomech, kde kontroluje jejich množství (Roesner,

et al. 2014). Mutace či ztráta exprese *MLH3* genu byla vyšetřována u hereditárního i sporadického kolorektálního karcinomu (Wu, et al. 2001) a pravděpodobně hraje roli i v tumorigenezi endometriálních a thyroideálních nádorů (Kunstman, et al. 2015; Taylor, et al. 2006). Metylace promotoru může být v některých případech nedostačující ke snížení proteinové exprese. Avšak v případě *MLH3* genu Jiang a kol. popsali jeho statisticky významně sníženou expresi u nízkostupňových astrocytomů (Jiang, et al. 2006). Celkově tyto nálezy naznačují, že změny v expresi *MLH3* mohou ovlivňovat stabilitu genomu, a tím i karcinogenezi gliomů. Následnou analýzou větší skupiny nízkostupňových gliomů jsme mohli srovnat celkové přežití (OS) u nemocných s kombinovaným nálezem mutace *IDH* genu a metylace promotoru *MLH3* genu a pacientů s mutací *IDH* genu bez metylace promotoru *MLH3* (graf 1). Pacienti s kombinovaným nálezem mutace *IDH*/methylace *MLH3* mají statisticky delší OS na hladině významnosti $p = 0,1$ ($p = 0,089$).



Graf 1: Kaplan-Meierova analýza přežití ve skupinách nemocných s mutací *IDH* genu/ metylací promotoru *MLH3* genu (1) a pacientů s mutací *IDH* genu/ bez metylace *MLH3* promotoru (2). OS – overall survival, celkové přežití. Je uvedeno v měsících.

Řada relabujících gliomů je charakterizována sdíleným souborem mutovaných genů a chromosomových aberací, které s největší pravděpodobností pochází z jedné prekursorové buňky (Lass, et al. 2012; Suzuki, et al. 2015). Z tohoto důvodu je léčebná terapie zaměřena na molekulární markery definované u prvotní léze. Avšak i přes cílenou léčbu a radikální resekci nádoru, po určité asymptomatické fázi vždy dochází u velké většiny pacientů k progresi nádoru. V naší studii jsme na dvou konkrétních případech potvrdili, že každý z gliomů je unikátní entitou, která obsahuje velké spektrum různých chromosomových změn (příloha 3) (Lhotska, et al. 2016). Výskyt nových aberací, ať už získaných vlivem selekčního tlaku vzniklého léčbou, nebo jako náhodná změna zafixovaná klonální evolucí v průběhu onemocnění, pak může ovlivnit pacientovu odpověď na léčbu. Jako konkrétní případ může sloužit mutace v *MSH6* (MutS homologu 6), ke které dochází v glioblastomových buňkách jako odpověď na léčbu temozolomidem, a která způsobuje rezistenci buněk k tomuto chemoterapeutiku (Yip, et al. 2009).

Závěr – cíl 1.:

Nejčastějšími nálezy byly v souladu s literaturou kodelece 1p/19q u nemocných s oligodendrogliomy, mutace v *IDH* genech a dále získané UPD na 17p u nemocných s astrocytomy. Některé z těchto změn jsou v současné době již zahrnuty do revidované WHO klasifikace difúzních nádorů. U nemocných s astrocytomy jsme pozorovali vyšší komplexitu nebalancovaných přestaveb v gliomových buňkách, která by mohla souviset s obecně horší prognózou u těchto pacientů. Dále jsme v naší studii prvně popsali metylaci promotoru genu *MLH3* u nízkostupňových difúzních gliomů. Vzhledem k absenci metylace promotoru ostatních MMR genů je možné, že metylace *MLH3* promotoru hraje významnou roli v tumorigenezi gliomů a může představovat další potenciální terapeutický cíl. Také jsme poukázali na to, že každý z gliomů je jedinečná entita, která se v průběhu času vyvíjí, ať už vlivem klonálního vývoje, či selekce způsobené léčbou. Z tohoto důvodu je komplexní analýza genomu i epigenomu diagnostických, ale i následujících vzorků maligních mozkových gliomů velmi přínosným přístupem k případné modifikaci léčebné terapie.

2. Analýza nebalancovaných změn a komplexních karyotypů u nemocných s myelodysplastickými syndromy

Myelodysplastické syndromy (MDS) představují skupinu klonálních onemocnění kostní dřeně, která jsou obvykle asociovaná s morfoloickou dysplázií hematopoetických buněk, cytopeniemi v periferní krvi, neefektivní hematopoézou a s rizikem progresu do akutní myeloidní leukémie (AML) (Cazzola and Malcovati 2005; Vardiman 2003). Roční incidence MDS činí okolo čtyř nemocných na 100 000 obyvatel (Ades, et al. 2014). Toto onemocnění většinou vzniká sporadicky, výjimečně se může objevit jako důsledek různých dědičných predispozic, jako je např. Fanconiho anémie (Ades, et al. 2014; West, et al. 2014) či mutace v některých predispozičních genech (např. *RUNX1* - Runt-related transcription factor 1, *CEBPA* - encoding CCAAT-enhancer binding protein α , *GATA2* - GATA binding protein 2, atd.) (Hahn, et al. 2011; Owen, et al. 2008). Většina nemocných je diagnostikována v pozdějším věku, (mediánem věku při primární diagnóze 65 let, méně než 10 % nemocných je mladších padesáti let). Tato skutečnost může naznačovat, že se jedná o onemocnění vznikající jako důsledek akumulace neopravených chyb v DNA, ke kterým dochází během normálních fyziologických procesů buňky (Behrens, et al. 2014; Ghosal and Chen 2013).

Typické morfoloické znaky MDS mimo jiné zahrnují defekty v maturaci buněk myeloidní linie či přítomnost prstenčitých sideroblastů. Dle WHO klasifikace se pak myelodysplastické syndromy dělí na jednotlivé subtypy hlavně na základě míry dysplázie myeloidních buněk, počtu blastů v periferní krvi i kostní dřeni a cytogenetického nálezu (tabulka 2) (Arber, et al. 2016). K dysplázii buněk kostní dřeně může nicméně dojít u některých zdravých jedinců, anebo i u jiných klinických stavů, jako jsou například nutriční deficity (nedostatek vitamínu B12), infekce nebo kongenitální poruchy kostní dřeně. Navíc identifikace dysplázie nemusí být reprodukovatelná ani mezi zkušenými hematology (Parmentier, et al. 2012). Často také dochází k tomu, že v jednotlivých případech nemusí korelovat manifestace dysplázie se specifickou cytopenií (Germin, et al. 2012; Verburch, et al. 2007). Klonální chromosomové aberace jsou popisovány u ~50 % nemocných s *de novo* MDS a až ~80 % nemocných se sekundárními MDS. U ostatních 20-50 % nemocných s normálním karyotypem můžeme pozorovat submikroskopické genetické změny (bodové mutace, mikrodelece, mikroamplifikace, epigenetické změny, CN LOH,

aUPD). Vyšetření genomu buněk kostní dřeně u nemocných s MDS je proto velmi důležité nejen pro přesné stanovení diagnózy a prognózy onemocnění, ale i pro následné monitorování v průběhu léčby.

Tabulka 2: WHO klasifikace myelodysplastických syndromů. Převzato a upraveno z (Arber, et al. 2016).

Subtyp	Dysplastické linie	Cytopenie*	prstenčité sideroblasty v KD	Blasty v KD a PK	Cytogenetický nálezn (konvenční karyotyp)
MDS s dysplázií v jedné řadě (MDS-SLD)	1	1 či 2	<15%/<5%**	KD<5%, PK<1%	jakýkoliv pokud nesplňuje kritéria pro MDS s izolovanou del(5q)
MDS s víceliniovou dysplázií (MDS-MLD)	2 nebo 3	1 – 3	<15%/<5%**	KD<5%, PK<1%	jakýkoliv pokud nesplňuje kritéria pro MDS s izolovanou del(5q)
MDS s prstenčitým sideroblasty (MDS-RS)					
MDS-RS s dysplázií v jedné řadě (MDS-RS-SLD)	1	1 či 2	≥15%/≥5%**	KD<5%, PK<1%	jakýkoliv pokud nesplňuje kritéria pro MDS s izolovanou del(5q)
MDS-RS s víceliniovou dysplázií (MDS-RS-MLD)	2 nebo 3	1 – 3	≥15%/≥5%**	KD<5%, PK<1%	jakýkoliv pokud nesplňuje kritéria pro MDS s izolovanou del(5q)
MDS s izolovanou del(5q)	1 – 3	1 – 2	žádné či cokoliv	KD<5%, PK<1%	del(5q) samotná či s jednou další aberací [s výjimkou del(7q), -7]
MDS s přebytkem blastů (MDS-EB)					
MDS-EB-1	0 – 3	1 – 3	žádné či cokoliv	KD 5-9%, či PK 2-4%	jakýkoliv
MDS-EB-2	0 – 3	1 – 3	žádné či cokoliv	KD 10-19%, či PK 5-19%	jakýkoliv
MDS, neklasifikovaná (MDS-U)					
s 1% blastů KD	1 – 3	1 – 3	žádné či cokoliv	KD<5%, PK=1%	jakýkoliv
s dysplázií v jedné řadě a pancytopení v závislosti na definující cytogenetické aberaci	1	3	žádné či cokoliv	KD<5%, PK<1%	jakýkoliv
refrakterní cytopenie u dětí	0	1 – 3	<15%+	KD<5%, PK<1%	jakýkoliv
refrakterní cytopenie u dětí	1 – 3	1 – 3	žádné či cokoliv	KD<5%, PK<2%	jakýkoliv

* Cytopenie je definovaná jako: hemoglobin, < 10 g/dl; množství krevních destiček, < 100x10⁹ l; množství neutrofilů, 1.8x10⁹ l. Některé MDS se mohou vzácně projevovat mírnými anemiemi či trombocytopeniemi, které mají vyšší hodnoty. Množství monocytů izolovaných z periferní krve musí být 1x10⁹ l.

** Musí být přítomná mutace *SF3B1*.

+ Nemocní s ≥ 15% prstenčitých sideroblastů jsou podle definice klasifikováni jako MDS-RS-SLD.

Myelodysplastické syndromy se obecně vyznačují charakteristickým genetickým profilem zahrnujícím převážně nebalancované změny. Většinou jsou pozorovány ztráty genetického materiálu ve formě delecí či monosomií. Zisk genetického materiálu (parciální nebo kompletní trisomie) a balancované translokace jsou méně časté. Mezi prognosticky významné a tedy nejlépe prostudované cytogenetické změny u MDS patří izolovaná delece dlouhých ramen chromosomu 5 [del(5q)], ztráta celého chromosomu 7 nebo delece jeho dlouhých ramen [del(7q)], a dále delece krátkých ramen chromosomu 17 [del(17p)], která je spojovaná s mutacemi genu *TP53*. Dalšími významnými nálezy jsou trisomie chromosomu 8, delece dlouhých ramen chromosomu 20 [del(20p)], delece dlouhých ramen chromosomu 11 [del(11q)] atd. (Haase 2008; Sperling, et al. 2017).

Delece 5q se vyskytuje u přibližně 30 % abnormálních karyotypů, ať už jako jediná změna, či v kombinaci s dalšími aberacemi. Rozsah delece 5q se mezi jednotlivými nemocnými liší, nicméně na základě několika studií byly stanoveny dvě společné deletované oblasti (common deleted regions, CDR) (Boultonwood, et al. 2010; Jaju, et al. 1998; Westbrook, et al. 2000). Proximální CDR je popisována v oblasti 5q31.1-5q31.2. Tato oblast může být ve vzácných případech u atypických delecí zachována (Brezinova, et al. 2012). Distální oblast zahrnuje pruhy 5q32 – 5q33 a předpokládá se, že je spojena s patogenezí 5q⁻ syndromu (Boultonwood, et al. 2010).

Prognóza nemocných se mezi jednotlivými aberacemi liší, avšak jakýkoliv zisk dalších aberací během vývoje onemocnění či výskyt komplexního karyotypu znamená zhoršení prognózy (Wang, et al. 2010). Revidovaný mezinárodní skórovací systém (IPSS-R) shrnuje tyto nálezy a jejich dopad na prognózu nemocných (tabulka 3).

Tabulka 3: Revidovaný mezinárodní skórovací systém (IPSS-R). Převzato a upraveno z (Greenberg, et al. 2012).

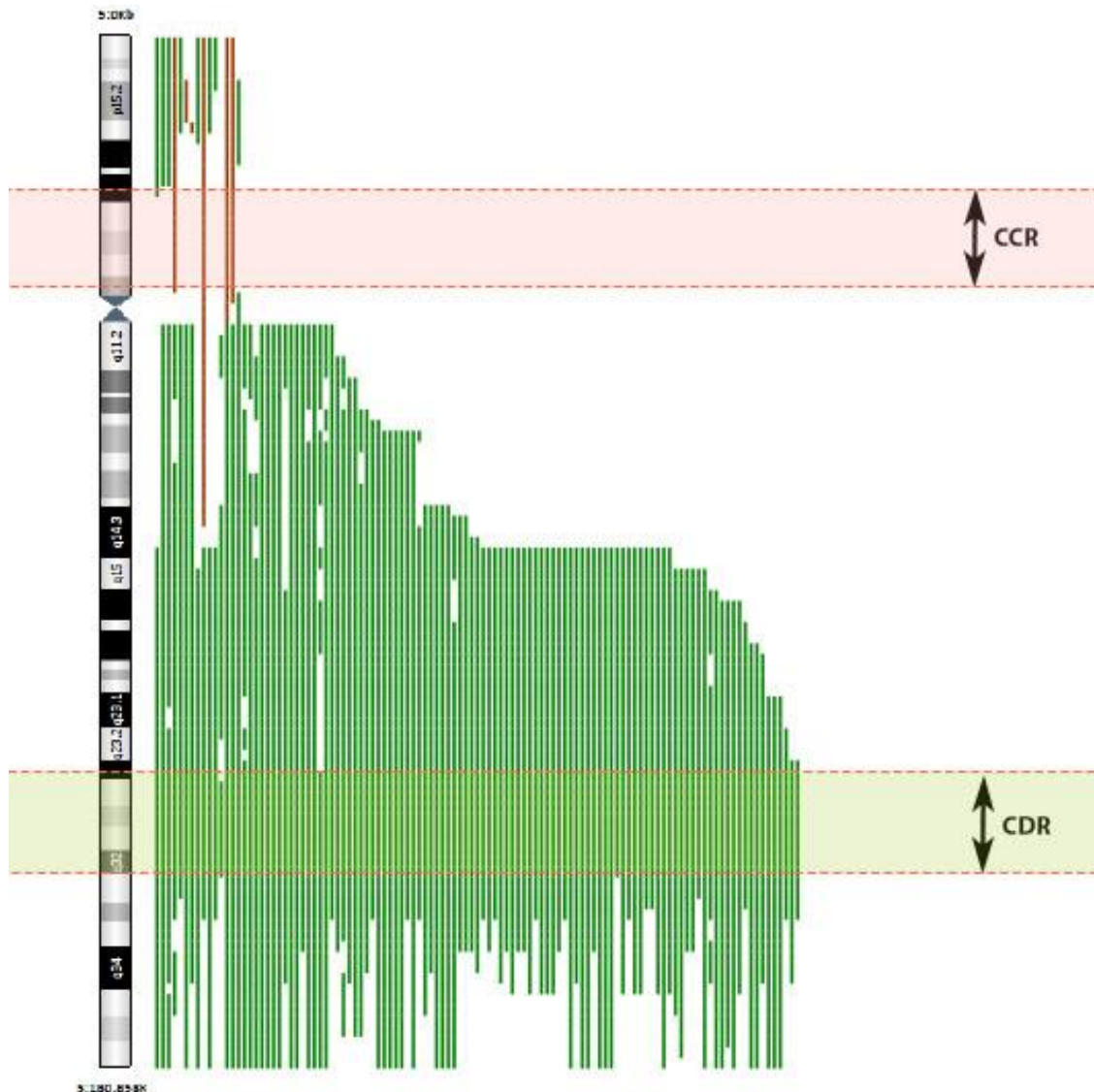
Prognóza dle IPSS-R	Cytogenetické aberace	Medián přežití [r]
Velmi dobrá	-Y, del(11q)	5,4
Dobrá	Normální nález, del(5q), del(12p), del(20q), del(5q) a jedna další aberace	4,8
Střední	del(7q), +8, +9, i(17q), jakýkoliv nezávislý klon obsahující jednu či dvě aberace	2,7
Špatná	-7, inv(3)/t(3q)/del(3q), klon s del(7q)/-7 a jednou další aberací, komplexní karyotyp zahrnující tři aberace	1,5
Velmi špatná	Komplexní karyotyp s více než třemi aberacemi	0,7

V letech 2002 až 2016 jsme na našem pracovišti rektrospektivně i prospektivně vyšetřili v rámci grantových projektů nemocné s MDS kombinací metod konvenční cytogenetiky, mFISH, mBAND, I-FISH a CGH/SNP array. Získaná data jsme pak využili pro sepsání několika publikací.

Analyzovali jsme skupinu 148 nemocných s komplexním karyotypem a intersticiální delecí dlouhých ramen chromosomu 5 s cílem zjistit, které chromosomy nebo chromosomové oblasti vstupují nejčastěji do komplexních přestaveb, lokalizovat přesná zlomová místa na přestavěných chromosomech a identifikovat nebalancované genomové změny, které mohou hrát významnou úlohu v progresi onemocnění (příloha 4) (Zemanova, et al. 2014).

Komplexní karyotyp jsme definovali jako numerické a strukturní změny, které zahrnovaly tři a více chromosomů, a/nebo strukturní přestavby, u kterých došlo ke třem a více zlomům na chromosomech. Balancované přestavby (např. reciproké translokace, inserce), zisk či ztrátu celého chromosomu, či ring chromosom tvořený materiálem z jednoho chromosomu jsme počítali jako jednu změnu. Nebalancované změny vedoucí k přestavbě dvou či více chromosomů a invertované duplikace byly počítány jako dvě a více změn (podle počtu zahrnutých chromosomů).

V této studii jsme nejčastější zlomy pozorovali v oblastech 5q14.3, 5q34, 5q33.3, 5q11.2 a 5q13.2 (viz obr. 6). Fragментy chromosomu 5 pak byly často translokovány na jiné chromosomy, konkrétně se jednalo o chromosomy 17, 3, 7 a 18 (seřazeno dle četnosti výskytu).



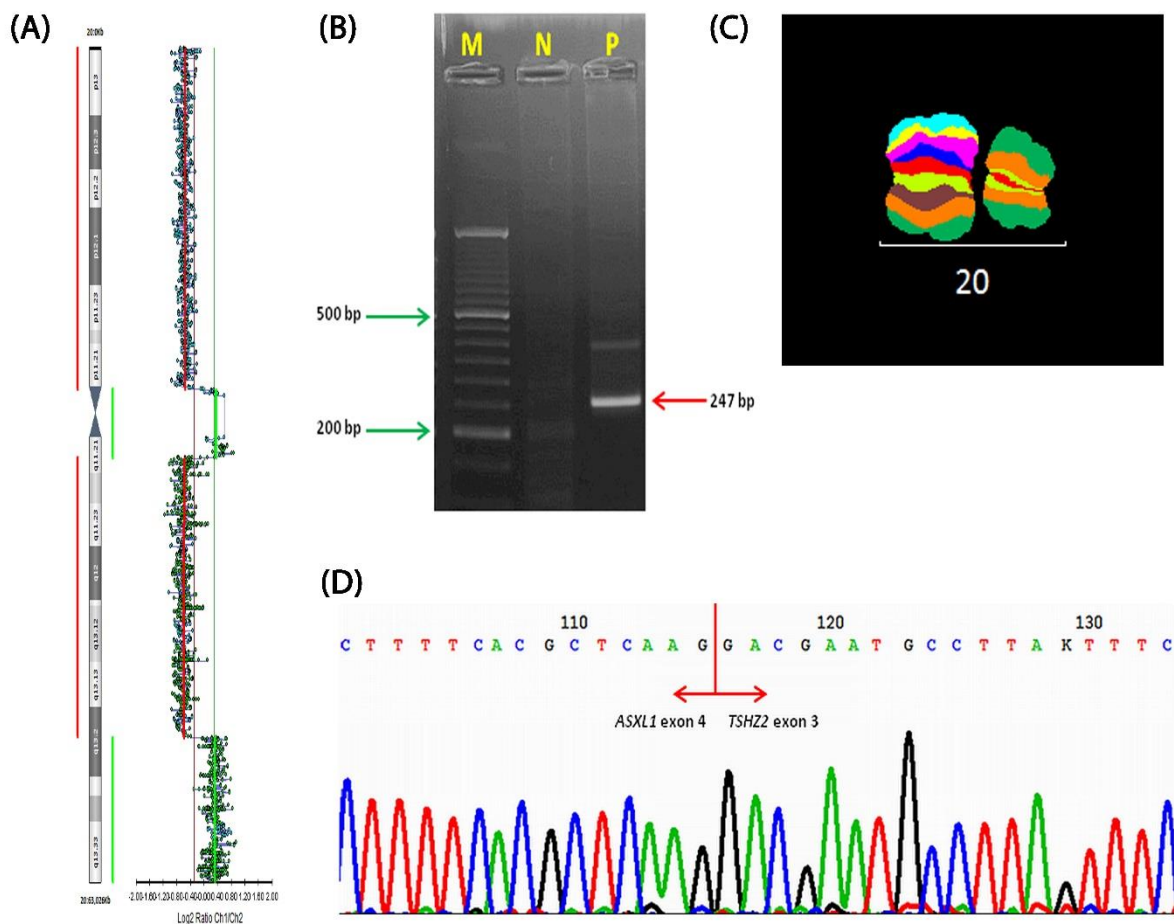
Obrázek 6: Rozsah delecí a amplifikací na chromosomu 5 detekovaných metodou array CGH. Deletované oblasti jsou zeleně značené a amplifikované oblasti červeně. CCR – společná zachovaná oblast (5p11.1- p14:2), CDR – společná deletovaná oblast (5q31.1 – 5q32). Převzato z (Zemanova, et al. 2014).

Kromě delecí chromosomu 5 jsme často pozorovali delecce či monosomie chromosomů 3, 7, 16, 17 a 18. Amplifikace či trisomie/tetrasomie se v našem souboru v souladu s literaturou vyskytovaly s nižší četností. Nejčastěji postihovaly chromosomy 8, 21, 22, 11, 13, a 9. Komplexní karyotyp ve většině případů (89,2 %) obsahoval více než pět chromosomových změn. U nemocných s více než pěti aberacemi jsme prokázali

statisticky horší celkové přežití ($p = 0,004$), které pravděpodobně souvisí s vysokou genomovou nestabilitou studovaných buněk.

Analýza genomu pomocí DNA mikročipů u 49 % nemocných s komplexním karyotypem odhalila změny, skládající se z velkého množství ztrát či zisků genetického materiálu v rámci ohraničeného úseku chromosomu. Rozpad chromosomů na malé kousky nejspíše vznikl jako důsledek chromotripsis. V našem souboru byly nejčastěji zasaženy chromosomy 5, 7, 12 a 17. Celkové přežití pacientů se nijak nelišilo od ostatních nemocných s komplexním karyotypem (medián OS pro obě skupiny byl 4 měsíce, $p = 0,224$). V další studii jsme na větším souboru vyšetřených pacientů (222 pacientů s MDS a komplexním karyotypem) popsali vyšší frekvenci ztráty hererozygoty či získanou uniparentální disomii na krátkých ramenech chromosomu 17 u nemocných s výskytem chromotripsis ($p = 0,05$) (Zemanova, et al. 2016). Právě oblast 17p je spojována s mutacemi v genu *TP53*, jehož ztráta exprese může vyústit v tak rozsáhlé a katastrofické přestavby jako je zmiňovaná chromotripsis (Jasek, et al. 2010).

V další práci jsme se u nemocného s refraktorní anémií s prstenčitými sideroblasty (MDS-RARS dle WHO klasifikace 2008) zaměřili na analýzu isochromosomu 20 se ztrátou intersticiální části 20q [ider(20q)] (příloha 5) (Brezinova, et al. 2014). Pomocí FISH s lokus specifickými sondami jsme potvrdili delecii oblasti 20q11/20q12. Metodou mBAND jsme přesně popsali ider(20)(q10)del(20)(q11.1q13.1). Metoda CGH array potvrdila dvě amplifikované oblasti add(20)(p11q11.21) a add(20)(q13.2q13.33), a dvě deletované oblasti, první zahrnující krátká ramena chromosomu 20 del(20)(pterp11.2) a druhou del(20)(q11.21q13.2). Prokázali jsme, že se jedná dicentrický chromosom a že ke zlomu došlo za 4. exonem *ASXLI* (Additional Sex Comb Like 1) genu a před 3. exonem *TSHZ2* (Teashirt Zing Finger Homeobox 2) genu. Pomocí šesti bacterial artificial chromosome (BAC) sond jsme potvrdili místa zlomu zahrnující proximálně gen *ASXLI* a distálně gen *TSHZ2*. Vznikl tak nový fúzní gen, který jsme ověřili sekvenováním na mRNA úrovni (obr. 7). Na rozdíl od samotné delecce 20q, která pro nemocného znamená dobrou prognózu, mutace *ASXLI* genu, především zahrnující exon 12, má nepříznivý vliv na vývoj onemocnění (Baker, et al. 2008).



Obrázek 7: Výsledek molekulárně cytogenetických a genetických analýz mapujících aberaci na chromosomu 20. (A) Výsledek CGH array. Deletované oblasti jsou vyznačeny červeně. Zeleně jsou značeny amplifikované části chromosomu 20. (B) Agarosový gen dokumentující 247kb velký PCR produkt pocházející z *ASXL1/TSHZ2* fúzního genu. M, 50bp DNA žebříček; N kontrola bez templátu; P, pacientův vzorek. Sekvenční analýza slabého produktu nalézající ho se mezi 350 – 400bp odhalila nespecifický amplifikační produkt. (C) Metoda mBAND potvrdila isochromosom dlouhých ramen chromosomu 20. (D) Sekvence identifikovala fúzi mezi čtvrtým exonem *ASXL1* a třetím exonem *TSHZ2*. Převzato z (Brezinova, et al. 2014)

Zaměřili jsme se rovněž na detailní analýzu delecí *ASXL1* genu (Brezinova, et al. 2016). V souboru 32 nemocných se samostatnou delecí 20q jsme popsali parciální delecí *ASXL1* genu u 24 % nemocných, delecí celého genu u 32 % pacientů. Metoda CGH/SNP array prokázala jako nejčastější, avšak ne výlučné zlomové místo 4. exon *ASXL1* genu (pět nemocných), dvanáctý exon byl deletován u všech pacientů. V této skupině doposud přežívá 47 % nemocných, ve skupině bez delecce *ASXL1* přežívá 67 % pacientů. Pozorujeme tedy mírný nepříznivý trend u pacientů s delecí, nicméně vzhledem k nízké frekvenci výskytu této aberace, a tedy i malému počtu pacientů, jsme jej prozatím nemohli statisticky potvrdit. Naše studie však naznačuje, že nejen mutace genu *ASXL1*, ale také jeho parciální či totální delecce může mít nepříznivý vliv na prognózu nemocných s MDS.

Závěr – cíl 2.:

Kombinací molekulárně cytogenetických a molekulárně genetických metod jsme analyzovali nebalancované chromosomové změny v genomu preleukemických buněk nemocných s myelodysplastickými syndromy. Popsali jsme nejčastější rekurentní zlomová místa na deletovaném chromosomu 5. Zjistili jsme, že do přestaveb s deletovaným chromosomem 5 nejčastěji vstupovaly chromosomy 17, 3, 7, a 18. U 49 % nemocných s MDS a komplexním karyotypem jsme pozorovali rozpad některých chromosomů nebo jejich částí, v literatuře popisovaný jako chromotripsis. Současně s tímto jevem jsme pozorovali četný výskyt aberací krátkých ramen chromosomu 17, zahrnujících tumor supresorový gen *TP53*. Za použití kombinace metod CGH/SNP array a I-FISH jsme přesně určili zlomové místo na derivovaném isochromosomu 20 u nemocného s MDS-RARS a popsali jsme nový, dosud neznámý fúzní gen *ASXLI-THSZ2*. Naše výsledky ukazují, že kombinace molekulárně cytogenetických metod umožňuje nejen přesně popsat chromosomové přestavby, ztráty či zisky chromosomového materiálu, ale také identifikovat unikátní jevy (např. chromotripsis) či nové fúzní geny.

Závěr

Charakteristickým rysem maligního procesu je vysoká nestabilita genomu nádorových buněk. Příčinou tohoto jevu může být hromadění poškození DNA, selhání buněčných reparačních mechanismů, poruchy v regulaci buněčného cyklu či epigenetické změny. Genomová nestabilita hraje důležitou roli při vzniku a progresi maligních onemocnění a projevuje se zvýšenou frekvencí genových mutací a nebalancovaných chromosomových aberací. V jejich důsledku dochází nejen ke vzniku nových fúzních genů, ale také k amplifikaci a delecí jednotlivých genů nebo celých genomových oblastí. Příмым dopadem nebalancovaných aberací jsou ztráty či inaktivace tumor supresorových genů a/nebo amplifikace onkogenů, které vedou k dalším poruchám regulace buněčného cyklu.

Ve studiu úlohy nebalancovaných změn v patogenezi nádorových onemocnění jsme se zaměřili na dvě skupiny – nemocné s MDS a pacienty s difúzními mozkovými gliomy. Obě skupiny jsou charakteristické vysokým výskytem nebalancovaných aberací v karyotypu nádorových buněk. U těchto onemocnění jsme detailně popsali nejčastější chromosomové aberace a určili jsme jejich frekvenci u jednotlivých subtypů (specifický výskyt 1p/19q kodelece u nemocných s oligodendrogliomy, apod.). Detailně jsme prostudovali rekurentní zlomová místa na přestavěných chromosomech. Například u nemocných s MDS na chromosomu 5 jsme nejčastěji pozorovali chromosomové zlomy v oblastech 5q14.3, 5q34, 5q33.3, 5q11.2 a 5q13.2. Zjistili jsme, že k interakcím mezi některými chromosomy docházelo s vyšší frekvencí než v ostatních případech. Domníváme se tedy, že se pravděpodobně nejedná o nahodilý děj.

Na unikátních souborech nemocných jsme potvrdili, že s vyšší mírou komplexity přestaveb genomu, a tedy i vyšší frekvencí nebalancovaných změn se zhoršuje prognóza nemocných (např. statisticky potvrzený vyšší výskyt nebalancovaných chromozomových změn u nemocných s astrocytomy či horší OS u nemocných s MDS a komplexním karyotypem zahrnujícím více jak pět změn). V některých případech pak může dojít k rozpadu jednoho či více chromozomů v jeden kritický okamžik (chromotripsis). V našich studiích byl výskyt chromotripsis často asociovaný se ztrátou heterozygoty krátkých ramen chromosomu 17 a mutacemi *TP53* genu. Chromotripsis lze na chromosomové úrovni odhalit prostřednictvím CGH/SNP array, mFISH či sekvenováním nové generace. Vzhledem k tomu, že tento jev hraje pravděpodobně

významnou úlohu v progresi nádorových onemocnění, může být jeho včasné odhalení velmi důležité pro volbu odpovídajícího léčebného přístupu.

Kombinace molekulárně cytogenetických a molekulárně genetických metod umožňuje detailně analyzovat stav genomu nádorových buněk, tj. nejen detekovat balancované či nebalancovaná změny, ale také zachytit některé nové jevy (např. chromotripsis), nové fúzní geny, či dosud nepopsané metylace genových promotorů. Tyto nové nálezy pak mohou hrát roli při určení subtypu onemocnění nebo stanovení prognózy nemocných a některé z nich mohou být následně využity jako vhodné cíle pro budoucí terapii. Z těchto důvodů jsou cytogenetické a molekulárně cytogenetické metody i v době sekvenování nové generace stále významnou součástí vyšetření nemocných s různými typy nádorových onemocnění, a to jak v době stanovení diagnózy, tak i při monitorování léčebné odpovědi a sledování klonálního vývoje či relapsu/rekurence onemocnění.

Seznam příloh

Příloha 1: Lhotská H, Zemanová Z, Kramář F, Lizcová L, Svobodová K, Ransdorfová Š, Bystřická D, Krejčík Z, Hrabal P, Dohnalová A, Kaiser M, Michalová K. 2014. Molekulárně cytogenetická analýza chromozomových aberací v buňkách nízkostupňových gliomů a její přínos pro klasifikaci nádorů. *Klinická Onkologie* 27(3):183-191.

Příloha 2: Lhotska H, Zemanova Z, Cechova H, Ransdorfova S, Lizcova L, Kramar F, Krejcik Z, Svobodova K, Bystricka D, Hrabal P, Dohnalova A, Michalova K. 2015. Genetic and epigenetic characterization of low-grade gliomas reveals frequent methylation of the MLH3 gene. *Genes Chromosomes & Cancer* 54(11):655-667.

Příloha 3: Lhotska H, Zemanova Z, Cechova H, Ransdorfova S, Svobodova K, Kramar F, Krejcik Z, Michalova K. 2016. Primary and recurrent diffuse astrocytomas: genomic profile comparison reveals acquisition of biologically relevant aberrations. *Molecular Cytogenetics* 9:13.

Příloha 4: Zemanova Z, Michalova K, Buryova H, Brezinova J, Kostylkova K, Bystricka D, Novakova M, Sarova I, Izakova S, Lizcova L, Ransdorfova S, Krejcik Z, Merkerova MD, Dohnalova A, Siskova M, Jonasova A, Neuwirtova R, Cermak J. 2014. Involvement of deleted chromosome 5 in complex chromosomal aberrations in newly diagnosed myelodysplastic syndromes (MDS) is correlated with extremely adverse prognosis. *Leukemia Research* 38(5):537-544.

Příloha 5: Brezinova J, Sarova I, Buryova H, Markova J, Ransdorfova S, Izakova S, Kostylkova K, Soukupova J, Zemanova Z, Michalova K. 2014. Fusion of the additional sex combs like 1 and teashirt zinc finger homeobox 2 genes resulting from ider(20q) aberration in a patient with myelodysplastic syndrome. *British Journal of Haematology* 164(1):153-155.

Příloha 1: Molekulárně cytogenetická analýza chromozomových aberací v buňkách nízkostupňových gliomů a její přínos pro klasifikaci nádorů.

Lhotská H, Zemanová Z, Kramář F, Lizcová L, Svobodová K, Ransdorfová Š, Bystřická D, Krejčík Z, Hrabal P, Dohnalová A, Kaiser M, Michalová K.

Klinická Onkologie 27(3):183-191, 2014.

Podíl na práci:

Interpretace a příprava dat k sepsání rukopisu, napsání publikace, izolace genomové DNA z periferie a nádorové tkáně, analýzy SNP array.

Příloha 2: Genetic and epigenetic characterization of low-grade gliomas reveals frequent methylation of the MLH3 gene

Lhotska H, Zemanova Z, Cechova H, Ransdorfova S, Lizcova L, Kramar F, Krejcik Z, Svobodova K, Bystricka D, Hrabal P, Dohnalova A, Michalova K.

Genes Chromosomes & Cancer 54(11):655-667, 2015.

IF = 3,696

Podíl na práci:

Sepsání rukopisu, interpretace a příprava dat ke statistické analýze a k napsání publikace, izolace genomové DNA z periferie a nádorové tkáně, příprava a vyhodnocení SNP array, interpretace dat z MLPA a MS-MLPA, návrh primerů pro detekci metylace promotoru *MHL3* genu metodou MS-PCR, příprava bisulfidové konverze nezbytné k metodě MS-PCR, příprava a vyhodnocení MS-PCR.

Příloha 3: Primary and recurrent diffuse astrocytomas: genomic profile comparison reveals acquisition of biologically relevant aberrations

Lhotska H, Zemanova Z, Cechova H, Ransdorfova S, Svobodova K, Kramar F, Krejcik Z, Michalova K.

Molecular Cytogenetics 9:13, 2016.

IF = 1,455

Podíl na práci:

Sepsání rukopisu, interpretace a příprava dat k napsání publikace, izolace genomové DNA z periferie a nádorové tkáně, analýzy SNP array, interpretace dat z MLPA a MS-MLPA, příprava bisulfidové konverze nezbytné k metodě MS-PCR, příprava a vyhodnocení MS-PCR.

Příloha 4: Involvement of deleted chromosome 5 in complex chromosomal aberrations in newly diagnosed myelodysplastic syndromes (MDS) is correlated with extremely adverse prognosis

Zemanova Z, Michalova K, **Buryova H**, Brezinova J, Kostylkova K, Bystricka D, Novakova M, Sarova I, Izakova S, Lizcova L, Ransdorfova S, Krejcik Z, Merkerova MD, Dohnalova A, Siskova M, Jonasova A, Neuwirtova R, Cermak J.

Leukemia Research 38(5):537-544, 2014.

IF = 2,5

Podíl na práci:

Podíl na přípravě dat k sepsání publikace, podíl na přípravě obrázků, izolace genomové DNA z kostní dřeně, příprava a vyhodnocování CGH/SNP array či CGH array.

Příloha 5: Fusion of the additional sex combs like 1 and teashirt zinc finger homeobox 2 genes resulting from ider(20q) aberration in a patient with myelodysplastic syndrome.

Brezinova J, Sarova I, **Buryova H**, Markova J, Ransdorfova S, Izakova S, Kostylkova K, Soukupova J, Zemanova Z, Michalova K.

British Journal of Haematology 164(1):153-155, 2014.

IF = 5,67

Podíl na práci:

Podíl na přípravě dat k sepsání publikace, podíl na přípravě obrázků, izolace genomové DNA z kostní dřeně, analýzy CGH/SNP array či CGH array.

Citace použité v doprovodném textu

- Ades L, Itzykson R, Fenaux P. 2014. Myelodysplastic syndromes. *Lancet* 383(9936):2239-2252.
- Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, Bloomfield CD, Cazzola M, Vardiman JW. 2016. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 127(20):2391-2405.
- Babic I, Anderson ES, Tanaka K, Guo DL, Masui K, Li B, Zhu SJ, Gu YC, Villa GR, Akhavan D, Nathanson D, Gini B, Mareninov S, Li R, Camacho CE, Kurdistani SK, Eskin A, Nelson SF, Yong WH, Cavenee WK, Cloughesy TF, Christofk HR, Black DL, Mische PS. 2013. EGFR Mutation-Induced Alternative Splicing of Max Contributes to Growth of Glycolytic Tumors in Brain Cancer. *Cell Metabolism* 17(6):1000-1008.
- Baker LA, Allis CD, Wang GG. 2008. PHD fingers in human diseases: Disorders arising from misinterpreting epigenetic marks. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 647(1-2):3-12.
- Behrens A, van Deursen JM, Rudolph KL, Schumacher B. 2014. Impact of genomic damage and ageing on stem cell function. *Nature Cell Biology* 16(3):201-207.
- Bernheim A. 2010. Cytogenomics of cancers: From chromosome to sequence. *Molecular Oncology* 4(4):309-322.
- Boulwood J, Pellagatti A, McKenzie ANJ, Wainscoat JS. 2010. Advances in the 5q-syndrome. *Blood* 116(26):5803-5811.
- Boveri T. 1914. Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren. Jena: Gustav Fisher. p 1-64.
- Breems DA, Van Putten WLJ, De Greef GE, Van Zelder-Bhola SL, Gerssen-Schoorl KBJ, Mellink CHM, Nieuwint A, Jotterand M, Hagemeyer A, Beverloo HB, Lowenberg B. 2008. Monosomal karyotype in acute myeloid leukemia: A better indicator of poor prognosis than a complex karyotype. *Journal of Clinical Oncology* 26(29):4791-4797.
- Brennan CW, Verhaak RGW, McKenna A, Campos B, Nounmehr H, Salama SR, Zheng SY, Chakravarty D, Sanborn JZ, Berman SH, Beroukhi R, Bernard B, Wu CJ, Genovese G, Shmulevich I, Barnholtz-Sloan J, Zou LH, Vegesna R, Shukla SA, Ciriello G, Yung WK, Zhang W, Sougnez C, Mikkelsen T, Aldape K, Bigner DD, Van Meir EG, Prados M, Sloan A, Black KL, Eschbacher J, Finocchiaro G, Friedman W, Andrews DW, Guha A, Iacocca M, O'Neill BP, Foltz G, Myers J, Weisenberger DJ, Penny R, Kucherlapati R, Perou CM, Hayes DN, Gibbs R, Marra M, Mills GB, Lander E, Spellman P, Wilson R, Sander C, Weinstein J, Meyerson M, Gabriel S, Laird PW, Haussler D, Getz G, Chin L, Network TR. 2013. The Somatic Genomic Landscape of Glioblastoma. *Cell* 155(2):462-477.
- Brezinova J, Sarova I, Buryova H, Markova J, Ransdorfova S, Izakova S, Kostylkova K, Soukupova J, Zemanova Z, Michalova K. 2014. Fusion of the additional sex combs like 1 and teashirt zinc finger homeobox 2 genes resulting from ider(20q) aberration in a patient with myelodysplastic syndrome. *British Journal of Haematology* 164(1):153-155.
- Brezinova J, Sarova I, Lhotska H, Ransdorfova S, Izakova S, Svobodova K, Podskalska L, Markova J, Zemanova Z, Cermak J, Jonasova A, Michalova K. 2016. The *asxl1* gene alterations in bone marrow cells of patients with deletion 20q and

- myeloid disorders. *Haematologica* 101:767-768.
- Brezinova J, Zemanova Z, Bystricka D, Sarova I, Lizcova L, Malinova E, Izakova S, Sajdova J, Sponerova D, Jonasova A, Cermak J, Michalova K. 2012. Deletion of the long arm but not the 5q31 region of chromosome 5 in myeloid malignancies. *Leukemia Research* 36(3):E43-E45.
- Cairncross G, Wang MH, Shaw E, Jenkins R, Brachman D, Buckner J, Fink K, Souhami L, Laperriere N, Curran W, Mehta M. 2013. Phase III Trial of Chemoradiotherapy for Anaplastic Oligodendroglioma: Long-Term Results of RTOG 9402. *Journal of Clinical Oncology* 31(3):337-343.
- Cazzola M, Malcovati L. 2005. Myelodysplastic syndromes - Coping with ineffective hematopoiesis. *New England Journal of Medicine* 352(6):536-538.
- Crasta K, Ganem NJ, Dagher R, Lantermann AB, Ivanova EV, Pan YF, Nezi L, Protopopov A, Chowdhury D, Pellman D. 2012. DNA breaks and chromosome pulverization from errors in mitosis. *Nature* 482(7383):53-U70.
- Dang L, White DW, Gross S, Bennett BD, Bittinger MA, Driggers EM, Fantin VR, Jang HG, Jin S, Keenan MC, Marks KM, Prins RM, Ward PS, Yen KE, Liao LM, Rabinowitz JD, Cantley LC, Thompson CB, Heiden MG, Su SM. 2009. Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature* 462(7274):739-U752.
- Darlax A, Zouaoui S, Rigau V, Bessaoud F, Figarella-Branger D, Mathieu-Daude H, Tretarre B, Bauchet F, Duffau H, Taillandier L, Bauchet L. 2017. Epidemiology for primary brain tumors: a nationwide population-based study. *J Neurooncol. United States*. 131(3):525-546.
- Esteller M, Herman JG. 2004. Generating mutations but providing chemosensitivity: the role of O-6-methylguanine DNA methyltransferase in human cancer. *Oncogene* 23(1):1-8.
- Everhard S, Tost J, El Abdalaoui H, Criniere E, Busato F, Marie Y, Gut IG, Sanson M, Mokhtari K, Laigle-Donadey F, Hoang-Xuan K, Delattre JY, Thillet J. 2009. Identification of regions correlating MGMT promoter methylation and gene expression in glioblastomas. *Neuro-Oncology* 11(4):348-356.
- Ford CE, Hamerton JL. 1956. Chromosomes of man. *Nature* 178(4541):1020-1023.
- Germing U, Strupp C, Giagounidis A, Haas R, Gattermann N, Starke C, Aul C. 2012. Evaluation of dysplasia through detailed cytomorphology in 3156 patients from the Dusseldorf Registry on myelodysplastic syndromes. *Leukemia Research* 36(6):727-734.
- Ghosal G, Chen JJ. 2013. DNA damage tolerance: a double-edged sword guarding the genome. *Translational Cancer Research* 2(3):107-129.
- Greaves M, Maley CC. 2012. Clonal evolution in cancer. *Nature* 481(7381):306-313.
- Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, Sanz G, Garcia-Manero G, Sole F, Bennett JM, Bowen D, Fenaux P, Dreyfus F, Kantarjian H, Kuendgen A, Levis A, Malcovati L, Cazzola M, Cermak J, Fonatsch C, Le Beau MM, Slovak ML, Krieger O, Luebbert M, Maciejewski J, Magalhaes SMM, Miyazaki Y, Pfeilstocker M, Sekeres M, Sperr WR, Stauder R, Tauro S, Valent P, Vallespi T, van de Loosdrecht AA, Germing U, Haase D. 2012. Revised International Prognostic Scoring System for Myelodysplastic Syndromes. *Blood* 120(12):2454-2465.
- Griffin CA, Burger P, Morsberger L, Yonescu R, Swierczynski S, Weingart JD, Murphy KM. 2006. Identification of der(1;19)(q10;p10) in five oligodendrogliomas suggests mechanism of concurrent 1p and 19q loss. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 65(10):988-994.
- Guo CC, Pirozzi CJ, Lopez GY, Yan H. 2011. Isocitrate dehydrogenase mutations in

- gliomas: mechanisms, biomarkers and therapeutic target. *Current Opinion in Neurology* 24(6):648-652.
- Haase D. 2008. Cytogenetic features in myelodysplastic syndromes. *Annals of Hematology* 87(7):515-526.
- Hahn CN, Chong CE, Carmichael CL, Wilkins EJ, Brautigan PJ, Li XC, Babic M, Lin M, Carmagnac A, Lee YK, Kok CH, Gagliardi L, Friend KL, Ekert PG, Butcher CM, Brown AL, Lewis ID, To LB, Timms AE, Storek J, Moore S, Altree M, Escher R, Bardy PG, Suthers GK, D'Andrea RJ, Horwitz MS, Scott HS. 2011. Heritable GATA2 mutations associated with familial myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. *Nature Genetics* 43(10):1012-U1130.
- Hegi ME, Diserens A, Gorlia T, Hamou M, de Tribolet N, Weller M, Kros JM, Hainfellner JA, Mason W, Mariani L, Bromberg JEC, Hau P, Mirimanoff RO, Cairncross JG, Janzer RC, Stupp R. 2005. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *New England Journal of Medicine* 352(10):997-1003.
- Houillier C, Wang X, Kaloshi G, Mokhtari K, Guillevin R, Laffaire J, Paris S, Boisselier B, Idbaih A, Laigle-Donadey F, Hoang-Xuan K, Sanson M, Delattre JY. 2010. IDH1 or IDH2 mutations predict longer survival and response to temozolomide in low-grade gliomas. *Neurology* 75(17):1560-1566.
- Hsu TC. 1987. A historical outline of the development of cancer cytogenetics. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 28(1):5-26.
- Huang Y, Jiang L, Yi QY, Lv L, Wang Z, Zhao XY, Zhong LW, Jiang HW, Rasool S, Hao QM, Guo ZY, Cooke HJ, Fenech M, Shi QH. 2012. Lagging chromosomes entrapped in micronuclei are not 'lost' by cells. *Cell Research* 22(5):932-935.
- Jaju RJ, Boultonwood J, Oliver FJ, Kostrzewa M, Fidler C, Parker N, McPherson JD, Morris SW, Muller U, Wainscoat JS, Kearney L. 1998. Molecular cytogenetic delineation of the critical deleted region in the 5q- syndrome. *Genes Chromosomes & Cancer* 22(3):251-256.
- Jasek M, Gondek LP, Bejanyan N, Tiu R, Huh J, Theil KS, O'Keefe C, McDevitt MA, Maciejewski JP. 2010. TP53 mutations in myeloid malignancies are either homozygous or hemizygous due to copy number-neutral loss of heterozygosity or deletion of 17p. *Leukemia* 24(1):216-219.
- Jenkins RB, Blair H, Ballman KV, Giannini C, Arusell RM, Law M, Flynn H, Passe S, Felten S, Brown PD, Shaw EG, Buckner JC. 2006. A t(1;19)(q10;p10) mediates the combined deletions of 1p and 19q and predicts a better prognosis of patients with oligodendroglioma. *Cancer Research* 66(20):9852-9861.
- Jiang Z, Hu J, Li XG, Jiang Y, Zhou W, Lu D. 2006. Expression analyses of 27 DNA repair genes in astrocytoma by TaqMan low-density array. *Neuroscience Letters* 409(2):112-117.
- Koivunen P, Lee S, Duncan CG, Lopez G, Lu G, Ramkissoon S, Losman JA, Joensuu P, Bergmann U, Gross S, Travins J, Weiss S, Looper R, Ligon KL, Verhaak RGW, Yan H, Kaelin WG. 2012. Transformation by the (R)-enantiomer of 2-hydroxyglutarate linked to EGLN activation. *Nature* 483(7390):485-U144.
- Kunstman JW, Juhlin CC, Goh G, Brown TC, Stenman A, Healy JM, Rubinstein JC, Choi M, Kiss N, Nelson-Williams C, Mane S, Rimm DL, Prasad ML, Hoog A, Zedenius J, Larsson C, Korah R, Lifton RP, Carling T. 2015. Characterization of the mutational landscape of anaplastic thyroid cancer via whole-exome sequencing. *Human Molecular Genetics* 24(8):2318-2329.
- Lass U, Numann A, von Eckardstein K, Kiwit J, Stockhammer F, Horaczek JA, Veelken J, Herold-Mende C, Jeuken J, von Deimling A, Mueller W. 2012.

- Clonal Analysis in Recurrent Astrocytic, Oligoastrocytic and Oligodendroglial Tumors Implicates IDH1- Mutation as Common Tumor Initiating Event. *Plos One* 7(7):14.
- Lhotska H, Zemanova Z, Cechova H, Ransdorfova S, Lizcova L, Kramar F, Krejcik Z, Svobodova K, Bystricka D, Hrabal P, Dohnalova A, Michalova K. 2015. Genetic and epigenetic characterization of low-grade gliomas reveals frequent methylation of the MLH3 gene. *Genes Chromosomes & Cancer* 54(11):655-667.
- Lhotska H, Zemanova Z, Cechova H, Ransdorfova S, Svobodova K, Kramar F, Krejcik Z, Michalova K. 2016. Primary and recurrent diffuse astrocytomas: genomic profile comparison reveals acquisition of biologically relevant aberrations. *Molecular Cytogenetics* 9:13.
- Lhotská H, Zemanová Z, Kramář F, Lizcová L, Svobodová K, Ransdorfová Š, Bystrická D, Krejčík Z, Hrabal P, Dohnalová A, Kaiser M, Michalová K. 2014. Molekulárně cytogenetická analýza chromozomových aberací v buňkách nízkostupňových gliomů a její přínos pro klasifikaci nádorů. *Klinicka Onkologie* 27(3):183-191.
- Lima GLD, Zanello M, Mandonnet E, Taillandier L, Pallud J, Duffau H. 2016. Incidental diffuse low-grade gliomas: from early detection to preventive neuro-oncological surgery. *Neurosurgical Review* 39(3):377-383.
- Lipkin SM, Moens PB, Wang V, Lenzi M, Shanmugarajah D, Gilgeous A, Thomas J, Cheng J, Touchman JW, Green ED, Schwartzberg P, Collins FS, Cohen PE. 2002. Meiotic arrest and aneuploidy in MLH3-deficient mice. *Nature Genetics* 31(4):385-390.
- Lipkin SM, Wang V, Jacoby R, Banerjee-Basu S, Baxevanis AD, Lynch HT, Elliott RM, Collins FS. 2000. MLH3: a DNA mismatch repair gene associated with mammalian microsatellite instability. *Nature Genetics* 24(1):27-35.
- Liu PF, Carvalho CMB, Hastings PJ, Lupski JR. 2012. Mechanisms for recurrent and complex human genomic rearrangements. *Current Opinion in Genetics & Development* 22(3):211-220.
- Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, Ohgaki H, Wiestler OD, Kleihues P, Ellison DW. 2016. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathologica* 131(6):803-820.
- Maher CA, Wilson RK. 2012. Chromothripsis and Human Disease: Piecing Together the Shattering Process. *Cell* 148(1-2):29-32.
- Masui K, Tanaka K, Akhavan D, Babic I, Gini B, Matsutani T, Iwanami A, Liu F, Villa GR, Gu YC, Campos C, Zhu SJ, Yang HJ, Yong WH, Cloughesy TF, Mellinghoff IK, Cavenee WK, Shaw RJ, Mischel PS. 2013. mTOR Complex 2 Controls Glycolytic Metabolism in Glioblastoma through FoxO Acetylation and Upregulation of c-Myc. *Cell Metabolism* 18(5):726-739.
- Molenaar RJ, Radivoyevitch T, Maciejewski JP, van Noorden CJF, Bleeker FE. 2014. The driver and passenger effects of isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations in oncogenesis and survival prolongation. *Biochimica Et Biophysica Acta- Reviews on Cancer* 1846(2):326-341.
- Noushmehr H, Weisenberger DJ, Diefes K, Phillips HS, Pujara K, Berman BP, Pan F, Pelloski CE, Sulman EP, Bhat KP, Verhaak RGW, Hoadley KA, Hayes DN, Perou CM, Schmidt HK, Ding L, Wilson RK, Van Den Berg D, Shen H, Bengtsson H, Neuvial P, Cope LM, Buckley J, Herman JG, Baylin SB, Laird PW, Aldape K, Canc Genome Atlas Res N. 2010. Identification of a CpG Island Methylator Phenotype that Defines a Distinct Subgroup of Glioma. *Cancer Cell*

- 17(5):510-522.
- Nowell PC, Hungerford DA. 1960. Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. *Journal of the National Cancer Institute* 25(1):85-109.
- Owen C, Barnett M, Fitzgibbon J. 2008. Familial myelodysplasia and acute myeloid leukaemia - a review. *British Journal of Haematology* 140(2):123-132.
- Parmentier S, Schetelig J, Lorenz K, Kramer M, Ireland R, Schuler U, Ordemann R, Rall G, Schaich M, Bornhauser M, Ehninger G, Kroschinsky F. 2012. Assessment of dysplastic hematopoiesis: lessons from healthy bone marrow donors. *Haematologica-the Hematology Journal* 97(5):723-730.
- Pinto RM, Dragileva E, Kirby A, Lloret A, Lopez E, St Claire J, Panigrahi GB, Hou CX, Holloway K, Gillis T, Guide JR, Cohen PE, Li GM, Pearson CE, Daly MJ, Wheeler VC. 2013. Mismatch Repair Genes Mlh1 and Mlh3 Modify CAG Instability in Huntington's Disease Mice: Genome-Wide and Candidate Approaches. *Plos Genetics* 9(10).
- Rode A, Maass KK, Willmund KV, Lichter P, Ernst A. 2016. Chromothripsis in cancer cells: An update. *International Journal of Cancer* 138(10):2322-2333.
- Roesner LM, Mielke C, Faehnrich S, Merkhoffer Y, Dittmar KEJ, Drexler HG, Dirks WG. 2014. Localization of MLH3 at the Centrosomes. *International Journal of Molecular Sciences* 15(8):13932-13937.
- Schoch C, Haferlach T, Haase D, Fonatsch C, Loffler H, Schlegelberger B, Staib P, Sauerland MC, Heinecke A, Buchner T, Hiddemann W, German AMLCSG. 2001. Patients with de novo acute myeloid leukaemia and complex karyotype aberrations show a poor prognosis despite intensive treatment: a study of 90 patients. *British Journal of Haematology* 112(1):118-126.
- Schwartzman JM, Sotillo R, Benezra R. 2010. Mitotic chromosomal instability and cancer: mouse modelling of the human disease. *Nature Reviews Cancer* 10(2):102-115.
- Speicher MR, Carter NP. 2005. The new cytogenetics: Blurring the boundaries with molecular biology. *Nature Reviews Genetics* 6(10):782-792.
- Sperling AS, Gibson CJ, Ebert BL. 2017. The genetics of myelodysplastic syndrome: from clonal haematopoiesis to secondary leukaemia. *Nature Reviews Cancer* 17(1):5-19.
- Stephens PJ, Greenman CD, Fu BY, Yang FT, Bignell GR, Mudie LJ, Pleasance ED, Lau KW, Beare D, Stebbings LA, McLaren S, Lin ML, McBride DJ, Varela I, Nik-Zainal S, Leroy C, Jia MM, Menzies A, Butler AP, Teague JW, Quail MA, Burton J, Swerdlow H, Carter NP, Morsberger LA, Iacobuzio-Donahue C, Follows GA, Green AR, Flanagan AM, Stratton MR, Futreal PA, Campbell PJ. 2011. Massive Genomic Rearrangement Acquired in a Single Catastrophic Event during Cancer Development. *Cell* 144(1):27-40.
- Suzuki H, Aoki K, Chiba K, Sato Y, Shiozawa Y, Shiraishi Y, Shimamura T, Niida A, Motomura K, Ohka F, Yamamoto T, Tanahashi K, Ranjit M, Wakabayashi T, Yoshizato T, Kataoka K, Yoshida K, Nagata Y, Sato-Otsubo A, Tanaka H, Sanada M, Kondo Y, Nakamura H, Mizoguchi M, Abe T, Muragaki Y, Watanabe R, Ito I, Miyano S, Natsume A, Ogawa S. 2015. Mutational landscape and clonal architecture in grade II and III gliomas. *Nat Genet. United States*. 47(5):458-68.
- Taylor NP, Powell MA, Gibb RK, Rader JS, Huettner PC, Thibodeau SN, Mutch DG, Goodfellow PJ. 2006. MLH3 mutation in endometrial cancer. *Cancer Research* 66(15):7502-7508.
- Terradas M, Martin M, Tusell L, Genesca A. 2009. DNA lesions sequestered in

- micronuclei induce a local defective-damage response. *DNA Repair* 8(10):1225-1234.
- Terradas M, Martin M, Tusell L, Genesca A. 2010. Genetic activities in micronuclei: Is the DNA entrapped in micronuclei lost for the cell? *Mutation Research-Reviews in Mutation Research* 705(1):60-67.
- Tjio JH, Levan A. 1956. The chromosome number of man. *Hereditas* 42(1-2):U1-6.
- Toujani S, Dessen P, Ithzar N, Danglot G, Richon C, Vassetzky Y, Robert T, Lazar V, Bosq J, Da Costa L, Perot C, Ribrag V, Patte C, Wiels J, Bernheim A. 2009. High Resolution Genome-Wide Analysis of Chromosomal Alterations in Burkitt's Lymphoma. *Plos One* 4(9).
- Valent A, Venuat AM, Danglot G, Da Silva J, Duarte N, Bernheim A, Benard J. 2001. Stromal cells and human malignant neuroblasts derived from bone marrow metastasis may share common karyotypic abnormalities: The case of the IGR-N-91 cell line. *Medical and Pediatric Oncology* 36(1):100-103.
- Vardiman JW. 2003. Myelodysplastic syndromes, chronic myeloproliferative diseases, atypical diseases. *Seminars in Diagnostic Pathology* 20(3):154-179.
- Verburgh E, Achten R, Louw VJ, Brusselmans C, Delforge M, Boogaerts M, Hagemeyer A, Vandenberghe P, Verhoef G. 2007. A new disease categorization of low-grade myelodysplastic syndromes based on the expression of cytopenia and dysplasia in one versus more than one lineage improves on the WHO classification. *Leukemia* 21(4):668-677.
- Wang H, Wang XQ, Xu XP, Lin GW. 2010. Cytogenetic evolution correlates with poor prognosis in myelodysplastic syndrome. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 196(2):159-166.
- Watanabe T, Nobusawa S, Kleihues P, Ohgaki H. 2009. IDH1 Mutations Are Early Events in the Development of Astrocytomas and Oligodendrogliomas. *American Journal of Pathology* 174(4):1149-1153.
- West AH, Godley LA, Churpek JE. 2014. Familial myelodysplastic syndrome/acute leukemia syndromes: a review and utility for translational investigations. *Bone Marrow Niche, Stem Cells, and Leukemia: Impact of Drugs, Chemicals, and the Environment* 1310:111-118.
- Westbrook CA, Hsu WT, Chyna B, Litvak D, Raza A, Horrigan SK. 2000. Cytogenetic and molecular diagnosis of chromosome 5 deletions in myelodysplasia. *British Journal of Haematology* 110(4):847-855.
- Wong AJ, Ruppert JM, Bigner SH, Grzeschik CH, Humphrey PA, Bigner DS, Vogelstein B. 1992. Structural alterations of the epidermal growth-factor receptor gene in human gliomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89(7):2965-2969.
- Wu Y, Berends MJW, Sijmons RH, Mensink RGJ, Verlind E, Kooi KA, van der Sluis T, Kempinga C, van der Zee AGJ, Hollema H, Buys C, Kleibeuker JH, Hofstra RMW. 2001. A role for MLH3 in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Nature Genetics* 29(2):137-138.
- Ye CJ, Liu G, Bremer SW, Heng HHQ. 2007. The dynamics of cancer chromosomes and genomes. *Cytogenetic and Genome Research* 118(2-4):237-246.
- Yip S, Miao JY, Cahill DP, Iafrate AJ, Aldape K, Nutt CL, Louis DN. 2009. MSH6 Mutations Arise in Glioblastomas during Temozolomide Therapy and Mediate Temozolomide Resistance. *Clinical Cancer Research* 15(14):4622-4629.
- Zemanova Z, Michalova K, Brezinova J, Lhotska H, Svobodova K, Sarova I, Lizcova L, Izakova S, Ransdorfova S, Zdenek K, Belickova M, Jonasova A, Siskova M, Neuwirtova R, Cermak J. 2016. The incidence and clinical implications of

chromothripsis in bone marrow cells of patients with myelodysplastic syndromes (mds). *Haematologica* 101:69-70.

- Zemanova Z, Michalova K, Buryova H, Brezinova J, Kostylkova K, Bystricka D, Novakova M, Sarova I, Izakova S, Lizcova L, Ransdorfova S, Krejcik Z, Merkerova MD, Dohnalova A, Siskova M, Jonasova A, Neuwirtova R, Cermak J. 2014. Involvement of deleted chromosome 5 in complex chromosomal aberrations in newly diagnosed myelodysplastic syndromes (MDS) is correlated with extremely adverse prognosis. *Leukemia Research* 38(5):537-544.
- Zhang CZ, Spektor A, Cornils H, Francis JM, Jackson EK, Liu SW, Meyerson M, Pellman D. 2015. Chromothripsis from DNA damage in micronuclei. *Nature* 522(7555):179-84

