

**Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta**



Autoreferát disertační práce

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

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

Mgr. Halka Lhotská

Praha, 2017

Doktorské studijní programy v biomedicině

*Univerzita Karlova v Praze
a Akademie věd České republiky*

Obor: molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie

Předseda oborové rady: prof. RNDr. Stanislav Zadražil, DrSc.

Školící pracoviště: Centrum nádorové cytogenetiky, ÚLBDL VFN a 1.LF UK v Praze

Autor: Mgr. Halka Lhotská

Školitel: Doc. RNDr. Zuzana Zemanová, CSc.

S disertací je možno se seznámit v příslušných knihovnách Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy.

Obsah

Abstrakt	5
Abstract	6
Úvod	7
Cíle práce.....	8
Současné poznatky o nestabilitě genomu nádorových buněk a její roli v patogenezi onemocnění	9
Shrnutí výsledků na základě publikační aktivity	11
1. Analýza genetických a epigenetických změn v genomu nádorových buněk nemocných s maligními mozkovými gliomy	11
2. Analýza nebalancovaných změn a komplexních karyotypů u nemocných s myelodysplastickými syndromy	13
Závěry.....	16
Seznam publikací	17
Profesní životopis	17
Introduction	20
Aims of the study	21
Current knowledge on cancer genome instability and its role in cancer pathogenesis	22
Summary of results from publications	24
1. Analysis of genetic and epigenetics changes in cancer cells genome of patients with malignant brain tumors.....	24
2. Analysis of unbalanced changes and complex karyotypes in bone marrow cells of patients with myelodysplastic syndromes.....	26
Conclusions	29
Seznam literatury / References.....	31

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 představby 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 heterozygozity 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 that 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

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.

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 – pacienty s maligními mozkovými nádory a nemocné s MDS (myelodysplastickými syndromy). K přesné detekci změn v genomu nádorových buněk jsme využívali konvenční a molekulárně cytogenetické metody, I-FISH, mFISH, mBAND, CGH array, SNP array, MLPA, MS-MLPA a MS-PCR.

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.

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 (I-FISH, mFISH, mBAND, CGH array, SNP array a MLPA). Numerické aberace zahrnují případy, při kterých dochází ke změně počtu chromosomů (aneuploidie, monosomie - jeden nebo více chromosomů chybí, trisomie či tetrasomie atd. - chromosomy přítomny v nadpočetných kopiích) či celých chromosomových sad (polyploidie).

Strukturní chromosomové aberace představují skupinu s abnormální stavbou chromosomu, přičemž původní množství genetického materiálu může, ale nemusí být zachováno. Dělíme je na balancované (původní množství genetického materiálu zůstává zachováno) a nebalancované (část genetického materiálu chybí či je zmnožena). Ziskem (amplifikací) genetického materiálu dochází ke zvýšení genové dávky a amplifikovaná oblast velice často zahrnuje některý z protoonkogenů (např. *EGFR*, *MYC*, apod.). 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. 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 interchromosomových 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) (Maher and Wilson 2012; Stephens, et al. 2011).

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).

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 nemaligních 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 publikační aktivity

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

Gliomy jsou primární mozkové nádory vznikající z buněk podpurné 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). 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. Mutace v *IDH* genu dělí gliomy na dvě genotypově odlišné skupiny, *IDH*-mutované a *IDH*-wildtype. 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 delecce 1p a 19q, která se vyskytuje výhradně u nádorů obsahujících buňky oligodendrocytárního původu, tedy u oligodendrogliomů a oligoastrocytomů. 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).

Epigenetické změny, jakým je například hypermethylace promotoru genu *MGMT* (O-6-metylguanin-DNA-metyltransferázy) či methylace promotoru MMR (mismatch repair) genů, se mohou také podílet na charakterizaci nádoru. Nádory s hypermetylovaným *MGMT* promotorem jsou 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 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. 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).

V naší studii jsme se především zaměřili na skupinu nemocných s nízkostupňovými gliomy. Potvrdili jsme 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* (Suzuki, et al. 2015). Tuto aberaci jsme detekovali u 73 % pacientů s astrocytomem, avšak u žádného pacienta s oligodendrogliomem (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.

Počet chromosomových aberací u nízkostupňových astrocytomů se statisticky lišil od počtu aberací pozorovaných u nemocných s oligodendrogliomy ($p=0,0001$). Medián u astrocytomů byl 6,9 a u oligodendrogliomů 3,5 změn (Lhotska, et al. 2015). Právě vyšší výskyt aberací v buňkách astrocytomů může být jednou z příčin horší prognózy u těchto pacientů.

Metylací *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 jsme za použití metod MS-MLPA a MS-PCR detekovali metylaci *MLH3* (MutL homologu 3) promotoru u 27 % difúzních astrocytomů a 61 % oligodendrogliomů (Lhotska, et al. 2015). Metylace promotoru může být v některých

případech nedostačující ke snížení proteinové exprese. Avšak v případě *MLH3* genu Jiang a kol. popsali jeho statisticky signifikantně sníženou expresi u nízkostupňových astrocytomů (Jiang, et al. 2006). Následnou analýzou větší skupiny nízkostupňových gliomů jsme mohli srovnat OS u nemocných s kombinovaným nálezem mutace *IDH* genu a metylace *MLH3* a pacientů s mutací *IDH* bez metylace *MLH3*. Pacienti s kombinovaným nálezem mutace *IDH*/metylace *MLH3* mají statisticky delší OS na hladině významnosti $p = 0,1$ ($p = 0,089$).

Řada relabujících gliomů je charakterizována sdíleným souborem mutovaných genů a chromosomových aberací, které s největší pravděpodobností pochází z jedné prekurzorové 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 (Lhotska, et al. 2016).

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 morfoloogickou dysplázií hematopoetických buněk, cytopeniemi v periferní krvi, neefektivní hematopoézou a s rizikem progresse 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). Většina nemocných je diagnostikována v pozdějším věku, (mediánem věku při primární diagnóze 65 let, méně než 10 % nemocných je mladších padesáti let).

Typické morfoloogické 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 (Arber, et al. 2016). 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).

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). 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).

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 (Zemanova, et al. 2014).

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

Kromě delece chromosomu 5 jsme často pozorovali delece 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 array 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 (OS) pacientů se nijak nelišilo od ostatních nemocných s komplexním karyotypem (medián OS pro obě skupiny byl 4 měsíce, $p = 0,024$). V další studii jsme na větším souboru vyšetřených pacientů (222 pacientů s MDS a komplexním karyotypem) popsali vyšší frekvenci ztráty heterozygoty 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)] (Brezinova, et al. 2014). Pomocí FISH s lokus specifickými sondami jsme potvrdili delecí 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, del(20)(pterp11.2) a del(20)(q11.21q13.2). Pomocí šesti bacterial artificial chromosome (BAC) sond jsme potvrdili místa zlomu zahrnující proximálně gen *ASXLI* (Additional Sex Comb Like 1) a distálně gen *TSHZ2* (Teashirt Zing Finger Homeobox 2). Vznikl tak nový fúzní gen, který jsme ověřili sekvenováním na mRNA úrovni. Prokázali jsme, že se jedná dicentrický chromosom a že ke zlomu došlo za 4. exonem *ASXLI* genu a před 3. exonem *TSHZ2* genu. 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).

Zaměřili jsme se rovněž na detailní analýzu delecí *ASXLI* genu (Brezinova, et al. 2016). V souboru 32 nemocných se samostatnou delecí 20q jsme popsali parciální delecí *ASXLI* genu u 24 % nemocných, delecí celého genu u 32 % pacientů. Metoda CGH/SNP array prokázala jako nejčastější, avšak ne výlučné zlomové místo 4. exon *ASXLI* genu (pět nemocných), dvanáctý exon byl deletován u všech pacientů. Pozorujeme 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 *ASXLI*, ale také jeho parciální či totální delecce může mít nepříznivý vliv na prognózu nemocných s MDS.

Závěry

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.

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.

Seznam publikací

Publikace, které jsou podkladem disertační práce:

A) s IF

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. **IF = 5,67**

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. **IF = 2,5**

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. **IF = 3,696**

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. **IF = 1,455**

B) bez IF

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. Molecular cytogenetic analysis of chromosomal aberrations in cells of low grade gliomas and its contribution for tumour classification. *Klinická Onkologie* 27(3):183-191.

Publikace bez vztahu k tématu disertační práce:

A) s IF

Reiss K, Meyer-Hoffert U, Fischer J, Sperrhacker M, Wu ZH, Dimitrieva O, Krenek P, Suchanova S, **Buryova H**, Brauer R, Sedlacek R. 2011. Expression and regulation of murine SPINK12, a potential orthologue of human LEKTI2. *Experimental Dermatology* 20(11):905-910. **IF = 2,532**

Kaspárek P, Krenek P, **Buryova H**, Suchanova S, Beck IM, Sedlacek R. 2012. Transgenic mouse model expressing tdTomato under involucrin promoter as a tool for

analysis of epidermal differentiation and wound healing. *Transgenic Research* 21(3):683-689. **IF = 2,341**

Buryova H, Chalupsky K, Zbodakova O, Kanchev I, Jirouskova M, Gregor M, Sedlacek R. 2013. Liver protective effect of ursodeoxycholic acid includes regulation of ADAM17 activity. *Bmc Gastroenterology* 13. **IF = 2,212**

Chalupsky K, Kanchev I, Zbodakova O, **Buryova H**, Jirouskova M, Korinek V, Gregor M, Sedlacek R. 2013. ADAM10/17-Dependent Release of Soluble c-Met Correlates with Hepatocellular Damage. *Folia Biologica* 59(2):76-86. **IF = 0,939**

Sarova I, Brezinova J, **Lhotska H**, Berkova A, Ransdorfova S, Zemanova Z, Soukupova J, Michalova K. 2014. Jumping-like translocation-a rare chromosomal rearrangement in a patient with Burkitt lymphoma/leukemia. *Cancer Genetics* 207(5):221-225. **IF = 1,93**

Lizcova L, Zemanova Z, **Lhotska H**, Zuna J, Hovorkova L, Mejstrikova E, Malinova E, Rabasova J, Raska I, Sramkova L, Stary J, Michalova K. 2014. An unusual case of high hyperdiploid childhood ALL with cryptic BCR/ABL1 rearrangement. *Molecular Cytogenetics* 7:72. **IF = 1,455**

Pavlistova L, Zemanova Z, Sarova I, **Lhotska H**, Berkova A, Spicka I, Michalova K. 2014. Change in ploidy status from hyperdiploid to near-tetraploid in multiple myeloma associated with bortezomib/lenalidomide resistance. *Cancer Genetics* 207(7-8):326-331. **IF = 1,93**

Svobodova K, Zemanova Z, **Lhotska H**, Novakova M, Podskalska L, Belickova M, Brezinova J, Sarova I, Izakova S, Lizcova L, Berkova A, Siskova M, Jonasova A, Cermak J, Michalova K. 2016. Copy number neutral loss of heterozygosity at 17p and homozygous mutations of TP53 are associated with complex chromosomal aberrations in patients newly diagnosed with myelodysplastic syndromes. *Leukemia Research* 42:7-12. **IF = 2,501**

Klener P, Fronkova E, Berkova A, Jaksa R, **Lhotska H**, Forsterova K, Soukup J, Kulvait V, Vargova J, Fiser K, Prukova D, Alam M, Maswabi BCL, Michalova K, Zemanova Z, Jancuskova T, Pekova S, Trneny M. 2016. Mantle cell lymphoma-variant Richter syndrome: Detailed molecular-cytogenetic and backtracking analysis reveals slow evolution of a pre-MCL clone in parallel with CLL over several years. *International Journal of Cancer* 139(10):2252-2260. **IF = 6,513**

B) bez IF

Svobodová K, Zemanová Z, **Lhotská H**, Nováková M, Březinová J, Běličková M, Berková A, Šarová I, Lizcová L, Izáková S, Jonášová A, Čermák J, Michalová K. 2015. Získaná uniparentální disomie v buňkách kostní dřeně nemocných s myelodysplastickými syndromy a komplexním karyotypem. *Transfúze a hematologie dnes* 3.

Profesní životopis

Jméno a příjmení: Halka Lhotská (roz. Buryová)

Datum a místo narození: 3. 7. 1986, Brno (Česká republika)

Vzdělání:

2011 – doposud: *Ph.D. program*, Přírodovědecká fakulta, Karlova univerzita, Praha
Specializace: Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie

2009 – 2011: *Magisterský program*, Přírodovědecká fakulta, Karlova univerzita, Praha
Specializace: Imunologie
Téma diplomové práce: Charakterizace role SPINK6 v epidermis za použití transgenních modelů

2006 – 2009: *Bakalářský program*, Přírodovědecká fakulta, Karlova univerzita, Praha
Specializace: Molekulární biologie a biochemie organismů
Téma bakalářské práce: Lymfo-epiteliální inhibitory kazálního typu (LEKTI) v epidermis a jejich interakce s kalikreiny

Pracovní zkušenosti:

2012 – doposud: Centrum nádorové cytogenetiky, ÚLBLD VFN and 1. LF UK, Praha
Pracovní pozice: výzkumný a vývojový pracovník, od 2013 Ph.D. student

2008 – 2012: Ústav molekulární genetiky, AV ČR, Praha
Pracovní pozice: magisterský student, 2011 - 2012 Ph.D. student

Kurzy:

- Osvědčení o odborné způsobilosti k řízení, provádění a kontrole pokusů na zvířatech podle §17 odst. 1 zákona č. 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání ve znění pozdějších předpisů (2010)
- Akreditovaný kvalifikační kurz Odborné zdravotnické laboratorní metody (2012)

Introduction

Cancer cells genome analysis using cytogenetic and molecular genetic methods belongs to the basic examination of patients with malignant diseases. These approaches are required for patient's diagnosis and prognosis, determination of cancer clone size, detection of patient's remission or relapse and monitoring of success rate of treatment.

We analyzed unbalanced genome changes, mutations and promotor methylation of several clinically relevant genes in patients with malignant and premalignant diseases in presented PhD. thesis. We focused on characterization of two patients' cohorts – patients with malignant brain tumors and patients with MDS (myelodysplastic syndromes) that are very often associated with high incidence of unbalanced aberrations. We used conventional and molecular cytogenetic approaches such as I-FISH, mFISH, mBAND, CGH array, SNP array, MLPA, MS-MLPA and MS-PCR for detection of changes in cancer cell genomes.

Current knowledge on balanced and unbalanced changes in cancer cell genome and their role in cancer pathogenesis are summarized in first part of dissertation. Second part of dissertation includes published papers with commentary our results.

Aims of the study

1. Analysis of genetic and epigenetics changes in cancer cell genomes in patients with malignant brain tumors

Molecular cytogenetic analysis of cancer cell genome in patients with selected malignant brain tumors – astrocytomas, oligodendrogliomas, oligoastrocytomas and glioblastomas; detection of recurrent aberrations; analysis of promoter methylation of selected genes; description of acquired aberrations in patients with recurrent relapses of diffuse brain gliomas; evaluation of the impact of observed changes on patients' diagnosis and prognosis; compilation of methodologic panel for detection of specific aberrations and their introduction to the routine diagnosis of diffuse gliomas.

2. Analysis of unbalanced changes and complex karyotypes in bone marrow cells in patients with myelodysplastic syndromes

Cytogenetic and molecular cytogenetic analysis of bone marrow cells of patients with MDS; detection of recurrent chromosomal aberrations; detection of the most frequent chromosomal breakpoints involved in complex translocations; breakpoint analysis of the chosen genes; description of chromothripsis frequency and its prognostic significance for patients; evaluation of impact of observed changes on patients' diagnosis and prognosis.

Current knowledge on cancer genome instability and its role in cancer pathogenesis

Mitotic chromosomes mainly serve to transfer and maintain the intact genetic information during cell cycle. Chromosomal stability during mitosis is one of the most important conditions for normal functioning of somatic cells therefore a vast number of cells' checkpoints and repair mechanisms emerged during evolution (Ye, et al. 2007). Despite all the precautions the genome of human somatic cells is not stable.

The actual hypothesis of tumorigenesis is a mutation (including chromosomal rearrangements) that confers a selective advantage on a dividing cell (Schvartzman, et al. 2010). The mutation will be stabilized during monoclonal proliferation and the cell will be exposed to new mutations with a new round of selection. The multi-stage process will culminate with a significant tumor that will exhibit invasive and metastatic properties and often considerable clinical aggressiveness (Greaves and Maley 2012).

Cancer cell is characterized by numerical and/or structural changes on chromosomal level that are detected by various cytogenetic and molecular genetic methods (I-FISH, mFISH, mBAND, CGH array, SNP array and MLPA). Numerical aberrations represent changes in chromosome number (aneuploidy, monosomy - missing one or more chromosomes, trisomy or tetrasomy etc. - more than two chromosomes of a pair) or complete set of chromosomes (polyploidy).

Structural chromosomal abnormalities represent chromosomes with atypical structure where complete genetic material may or may not be preserved. In reciprocal (balanced) aberrations the complete genetic material is maintained whereas in unbalanced changes, part of the genetic material is lost or amplified. Duplications or amplifications result in gain of extra genetic material of part of the chromosome. Amplified region very often involves protooncogenes (e.g. *EGFR*, *MYC*). Deletions are associated with loss of genetic material and may include tumor suppressor genes (e.g. *RBI*, *TP53*, *CDKN2A*), reparatory genes or miRNA genes.

The cancer cells contain a single chromosomal aberration or diverse number of chromosomal changes. Higher amount of chromosomal changes misbalance cancer cell genome and cause cumulation of additional chromosomal aberrations known as complex chromosomal rearrangements (CCR). CCR are defined as those involving more than three chromosomes and/or more than three breakpoints (Schoch, et al. 2001).

Next generation sequencing approach in combination with SNP arrays recently discovered vast amount of intra- and inter-chromosomal cryptic aberrations in genome of cancer cells. The rearrangements (known under the term chromothripsis) were highly

complex and they were probably created during one catastrophic event (Stephens, et al. 2011). Typical feature of chromothripsis is presence of hundreds or thousands clustered breakpoints in localized regions of single chromosomes or chromosome arms (Maher and Wilson 2012; Stephens, et al. 2011).

Chromothripsis was first observed in sequencing the genome of a patient with CLL (chronic lymphocytic leukemia) (Stephens, et al. 2011) and was described in large range of human hematologic malignancies or solid tumors. Chromothripsis prevalence across different types of tumor entities varies from almost non-appearance to one hundred percent presence as was described for SHH (Sonic Hedgehog) medulloblastoma with mutant *TP53* (Rode, et al. 2016).

Unbalanced changes are found in cancer cells of patients with hematologic malignancies or solid tumors and are frequently observed in primary lesions when the patient is diagnosed. Many of the unbalanced aberrations are characteristic for specific type of malignancy or premalignancy according to WHO (World Health Organization) classification of cancer diseases. Patients are separated into prognostic groups according to laboratory findings. Scientific investigation of chromosomal aberrations plays a key role in clinical research as well as in our understanding of cancer cells transformation and cancer pathogenesis. Consistent analysis of recurrent breakpoints and aberrations may reveal the cause of cancer origin and may help detection of changes playing key role in early or late stages of tumorigenesis.

Summary of results from publications

1. Analysis of genetic and epigenetics changes in cancer cells genome of patients with malignant brain tumors

Gliomas are primary brain tumors arising from supportive cells of the nervous system (neuroglial cells) and account for 44% of all intracranial tumors. The incidence of primary brain tumors in the Europe population is estimated to be 5.6 new adult cases per 100 000 persons per year (Darlix, et al. 2016). The gliomas are divided based on their histological phenotype and specific genetic changes according current WHO classification. These brain tumors are graded on scale from I – IV where grade IV tumors carry the worst prognosis. The most common subtypes in adults are astrocytomas (WHO grade II and III), oligodendrogliomas (WHO grade II and III) and glioblastomas (WHO grade IV) (Louis, et al. 2016).

One of the most specific genetic changes are mutations in genes for *IDH1* (isocitrate dehydrogenase 1) – R132H and *IDH2* (isocitrate dehydrogenase 2) – R172M. Mutations in *IDH* genes divide gliomas into two genetically distinct groups, *IDH*-mutated and *IDH*-wildtype. *IDH* mutations are frequently observed in all low-grade gliomas (LGG) and they play a key role in induction of cancer cell phenotype therefore mutation of *IDH* genes are considered the earliest event in LGG tumorigenesis (Watanabe, et al. 2009). Moreover, the patients with mutation in one of *IDH* genes have better prognosis and longer overall survival (OS) (Houillier, et al. 2010).

Combined deletion of 1p/19q also belongs to recurrent aberrations exclusively found in gliomas derived from oligodendrocytes – oligodendrogliomas and oligoastrocytomas. The patients with codeletion have good prognosis especially due to slower tumor growth and good response to chemo- or radio-therapy (Cairncross, et al. 2013).

Epigenetic changes such as hypermethylation of *MGMT* (O-6-methylguanine-DNA methyltransferase) promoter or methylation of MMR (mismatch repair) genes promoters are also involved in brain tumor characterization. Gliomas with hypermethylated *MGMT* promoter are more prone to alkylating agents such as temozolomide (Hegi, et al. 2005). Patients treated with temozolomide have longer OS and the reagent is first therapeutic choice for patients with glioblastoma (Everhard, et al. 2009; Houillier, et al. 2010).

We performed molecular cytogenetic and epigenetic analysis of cancer cells genomes derived from patients with brain tumors in cooperation with the Department of Neurosurgery, Central Military Hospital and 1st Faculty of Medicine, Charles University in Prague and

National Reference Laboratory for DNA Diagnostics, Institute of Hematology and Blood Transfusion. Dual-color I-FISH with LSI and/or CEP DNA probes was used for detection of selected specific aberrations in wide range of gliomas subtypes. Unbalanced changes were detected using SNP array. MLPA approach was used for confirmation of *IDH1* or *IDH2* mutations. Methylation of *MGMT* promoter and MMR genes promoters was observed using MS-MLPA. Positive finding of MMR gene's promoter methylation was confirmed using MS-PCR.

Between years 2012-2015, we retrospectively or prospectively studied 126 patients (57 women and 69 men, median age 40.5 years) with diffuse gliomas. The patients were divided into two groups: low-grade gliomas - WHO grade I and II (76 patients) and high-grade gliomas - WHO grade III and IV (50 patients).

We mainly focused on a group of patients with LGG in our studies. We confirmed the occurrence of *IDH1* or *IDH2* gene mutations in 87% in all histologically defined LGG. The most specific finding of 1p/19q codeletion (83% of patients) was observed in patients with low-grade oligodendroglioma as was described in the literature. We also observed acquired uniparental disomy (aUPD) on short arm of chromosome 17, which is associated with mutations in the *TP53* gene (Suzuki, et al. 2015). We detected this aberration in 73% of patients with astrocytoma but in no oligodendroglioma patient (Lhotska, et al. 2015; Lhotská, et al. 2014). These aberrations were included in the recently revised WHO classification of brain tumors (Louis, et al. 2016) as their clinical significance is unquestionable. We therefore introduced an I-FISH analysis of these aberrations and detection of *IDH1* and *IDH2* mutations by the MLPA method to our routine laboratory practice.

The number of chromosome aberrations in low-grade astrocytomas differed statistically from the number of aberrations observed in oligodendroglioma patients ($p = 0.0001$). Median of observed chromosomal changes was 6.9 in astrocytomas and 3.5 in oligodendrogliomas (Lhotska, et al. 2015). The higher incidence of aberrations in astrocytoma cells may be the reason for worse prognosis, described in these patients.

Methylation of the *MGMT* promoter was observed in 56% of patients with low-grade astrocytomas and in 81% of patients with low-grade oligodendrogliomas. Also, inactivation of other genes involved in DNA repair, such as MMR genes, may play a role in the pathogenesis of gliomas. In our pilot study, we detected methylation of *MLH3* (MutL homolog 3) promoter in 27% diffusion astrocytomas and 61% oligodendrogliomas (Lhotska, et al. 2015) using the MS-MLPA and MS-PCR methods. Promoter methylation may be insufficient to reduce protein expression in some cases. However, in the case of the *MLH3*

gene Jiang et al. described its statistically significantly decreased expression in low-grade astrocytomas (Jiang, et al. 2006). Subsequent analysis of a larger group of LGG comparing OS of patients with mutation in *IDH* gene/methylation of *MLH3* to patients with *IDH* mutation without methylation of *MLH3* revealed that patients with a combined finding *IDH* mutation/*MLH3* methylation have a statistically longer OS at the significance level $p = 0.1$ ($p = 0.089$).

Many recurrent gliomas are characterized by a shared set of mutated genes and chromosomal aberrations, most likely derived from one precursor cell (Lass, et al. 2012; Suzuki, et al. 2015). For that reason, therapeutic approaches are focused on the molecular markers defined in the primary lesion. However, despite the targeted treatment and radical tumor resection, after a certain asymptomatic phase, tumor progression is always present in the clear majority of patients. In our study, we have confirmed in two specific cases that each of the gliomas is a unique entity that contains a wide spectrum of different chromosome changes that are mainly acquired by one-step like mechanism during tumor evolution (Lhotska, et al. 2016).

2. Analysis of unbalanced changes and complex karyotypes in bone marrow cells of patients with myelodysplastic syndromes

Myelodysplastic syndromes (MDS) is a group of clonal bone marrow diseases that are usually associated with hematopoietic cells morphological dysplasia, peripheral blood cytopenias, ineffective hematopoiesis, and the risk of progression to acute myeloid leukemia (AML) (Cazzola and Malcovati 2005; Vardiman 2003). The incidence of MDS is estimated to be four patients per 100,000 populations (Ades, et al., 2014). Most patients are diagnosed at higher age (median age at primary diagnosis is 65 years, less than 10% of patients are younger than 50 years).

Typical morphological features of MDS include defects in maturation of myeloid cell lines or presence of ring sideroblasts. Myelodysplastic syndromes are divided into individual subtypes based on myeloid cell dysplasia, peripheral blood and bone marrow blasts and cytogenetic findings according to the revised WHO classification (Arber, et al., 2016). Clonal chromosome aberrations are reported in ~ 50% of de novo MDS patients and up to 80% of patients with secondary MDS. We observe submicroscopic genetic changes (point mutations, microdeletions, microamplification, epigenetic changes, aUPD) in the other 20-50% of patients with normal karyotype.

Myelodysplastic syndromes are defined by a characteristic genetic profile predominantly involving unbalanced changes. Generally, losses of genetic material in the form of deletions or monosomies are observed. The gain of genetic material (partial or complete trisomy) and balancing translocations are uncommon. The cytogenetic aberrations with clinical significance in MDS that are therefore well studied include isolated deletion of long arm of chromosome 5 [del(5q)], monosomy of chromosome 7 or deletion of its long arm [del(7q)], and deletion of short arm of chromosome 17 [del(17p)] that is associated with mutations in *TP53* gene. Other significant findings are trisomy of chromosome 8, deletion of long arm of chromosome 20 [del(20p)], deletion of long arms of chromosome 11 del(11q), etc. (Haase 2008; Sperling, et al., 2017). The prognosis of patients differs among aberrations, but any additional gain of aberrations during the development of the disease or the occurrence of a complex karyotype implies worse prognosis (Wang, et al., 2010).

From 2002 to 2016, we retrospectively and prospectively examined patients with MDS using a combination of conventional cytogenetics, mFISH, mBAND, I-FISH and CGH / SNP array. We used these data to write several publications.

We analyzed a group of 148 patients with complex karyotype and interstitial deletion of the long arms of chromosome 5 to find out which chromosomes or chromosomes most frequently enter complex rearrangements, location of exact breakpoints on translocated chromosomes and identify unbalanced genomic changes that can play a significant role in disease progression (Zemanova et al., 2014).

The recurrent breakpoints were observed in 5q14.3, 5q34, 5q33.3, 5q11.2 and 5q13.2 in the study. Chromosome 5 fragments were translocated to other chromosomes, specifically chromosomes 17, 3, 7 and 18 (sorted by frequency).

Besides the deletion of chromosome 5, deletions or monosomies of chromosomes 3, 7, 16, 17 and 18 were often observed, Amplification or trisomy / tetrasomy was detected in lower frequency as was consistent with the literature and they mainly involved chromosomes 8, 21, 22, 11, 13, and 9. Complex karyotype in most cases (89.2%) consists of more than five chromosome changes. In patients with more than five aberrations, we demonstrated statistically worse overall survival ($p = 0.004$), which is probably related to the high genomic instability of the studied cells.

Genomic analysis using the DNA array revealed changes consisting of clustered losses or gains within short region of chromosome in 49% of patients with complex karyotype. The breakdown of chromosomes into small pieces was probably due to chromotripsis. In our group chromosomes 5, 7, 12 and 17 were most frequently affected. OS of patients with

chromotripsis did not differ from other patients with complex karyotype (median OS for both groups was 4 months, $p = 0.024$). Later, in larger study of patients (222 MDS and complex karyotype patients), we connected presence of chromotripsis with higher rate of loss or aUPD of chromosome 17 ($p = 0.05$) (Zemanova, et al. 2016). The 17p region is associated with mutations in the *TP53* gene whose loss of expression may result in such extensive and catastrophic event as chromotripsis (Jasek, et al., 2010).

In the next work, we analyzed an isochromosome 20 with loss of interstitial region of 20q [ider(20q)] (Brezinova, et al., 2014) in a patient with refractory anemia with ring sideroblasts (MDS-RARS according to WHO classification 2008). Using FISH with locus specific probes, we confirmed the deletion of the 20q11/20q12. Subsequently, we specified our finding as ider(20)(q10)del(20)(q11.1q13.1) using mBAND method. The CGH array method confirmed two amplified regions on chromosome 20 - add(20)(p11q11.21) and add(20)(q13.2q13.33), and two deleted regions, the first del(20)(pterp11.2) and the second del(20)(q11.21q13.2). We confirmed breakpoints on chromosome 20 including the proximal gene *ASXL1* (Additional Sex Comb Like 1) and the distal *TSHZ2* (Teashirt Zing Finger Homeobox 2) gene using six bacterial artificial chromosome (BAC) probes. This resulted in a new fusion gene that we verified by sequencing at the mRNA level. We confirmed dicentric chromosome 20 and we find out that breakpoints occurred within the fourth exon of *ASXL1* gene and the third exon of the *TSHZ2* gene. Unlike the deletion 20q, which is a good prognosis for the patient, the mutation of the *ASXL1* gene, including exon 12, means unfavorable outcome for patients (Baker, et al., 2008).

We focused on a detailed analysis of deletions of the *ASXL1* gene (Brezinova, et al., 2016). We described the partial deletion of the *ASXL1* gene in 24% of patients and deletion of the entire gene in 32% of patients in a group of 32 patients with a deletion of 20q as sole aberration. The most recurrent, but not the exclusive, breakpoint was at fourth exon of the *ASXL1* gene (five patients) as CGH/SNP array method proved. The twelfth exon was deleted in all patients. We observed a moderate adverse trend in patients with deletion, however, given the low incidence of this aberration, and therefore a small number of patients, we have not been able to confirm it for the time being. Our study suggests that not only the mutation of the *ASXL1* gene but also its partial or total deletion may have an adverse effect on the prognosis of MDS patients.

Conclusions

Conclusion – 1. Aim:

The most common findings were the 1p/19q codeletion in oligodendroglioma patients, mutations in IDH genes (in accordance with the literature) and UPD on 17p in patients with astrocytomas. Some of these changes are currently included in the revised WHO classification of diffuse tumors. We observed a higher complexity of unbalanced changes in glioma cells in patients with astrocytomas which could be related to their worse prognosis. Furthermore, we described yet unknown methylation of the *MLH3* gene promoter in low-grade diffusion gliomas. Due to the lack of other MMR genes promoter methylation, methylation of the *MLH3* promoter may play a significant role in tumorigenesis of gliomas and may represent another potential therapeutic target. We have also pointed out that each of the gliomas is a unique entity that evolves over time, whether due to clonal evolution or treatment-induced selections. For this reason, complex analysis of both the genome and the epigenome in the diagnostic sample but also in the following samples of malignant brain gliomas is a very beneficial approach to possible therapy modification.

Conclusion – 2. Aim:

We analyzed unbalanced chromosome changes in the genome of preleukemic cells in patients with myelodysplastic syndromes using molecular cytogenetic and molecular genetics methods. We found the most recurrent breakpoints on the deleted chromosome 5. We found that chromosomes 17, 3, 7, and 18 were frequently involved in chromosome 5 translocations. We observed the clustered unbalanced changes on restricted regions of chromosomes that are described as chromotripsis, in 49% of patients with MDS and complex karyotype. At the same time, we observed a high occurrence of aberrations on the short arm of chromosome 17, including the tumor suppressor gene *TP53*. Using a combination of CGH/SNP array and I-FISH methods, we have accurately identified the isochromosome 20-derived breakpoint in the MDS-RARS patient, and we have described a new, yet unknown, *ASXL1-THSZ2* fusion gene. Our results show that the combination of molecular cytogenetic methods allows not only accurately describing chromosomal rearrangements, losses or gains of chromosomal material but also allows the identification of the unique phenomena (e.g. chromotripsis) or new fusion genes.

Curriculum Vitae

Name and surname: Halka Lhotska (birth name Buryova)

Date and place of Birth: 3. 7. 1986, Brno (Czech Republic)

Education:

2011 – up today: *Ph.D. studies*, Faculty of Science, Charles University, Prague
Study programme: Molecular and Cellular Biology, Genetics and Virology

2009 – 2011: *Master studies*, Faculty of Science, Charles University, Prague
Study programme: Immunology
Title of Diploma thesis: Characterization of the role of SPINK 6 in the epidermis
using transgenic models

2006 – 2009: *Bachelor studies*, Faculty of Science, Charles University, Prague
Study programme: Molecular Biology and Biochemistry of Organisms
Title of Bachelor's thesis: Lympho-epithelial kazal type inhibitors (LEKTI) in epidermis and
their interaction with kallikreins

Employment history:

2012 – up today: Center of Oncocytogenetics, Institute of Medical Biochemistry and
Laboratory Diagnostics of the
General University Hospital and of The First Faculty of Medicine of Charles
University, Prague
Position: researcher, since 2013 Ph.D. student

2008 – 2012: Institute of Molecular Genetics, ASCR, Prague
Position: undergraduate student, 2011 - 2012 Ph.D. student

Additional training:

- Certificate of professional competence for the management, implementation and control of animal experiments according to §Article 17 (1) of Act No. 246/1992 Coll., On the Protection of Animals Against Torture, as amended regulations (2010)
- Accredited Qualification Course: Professional Medical Laboratory Methods (2012)

Seznam literatury / References

- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Darlix A, Zouaoui S, Rigau V, Bessaoud F, Figarella-Branger D, Mathieu-Daude H, Tretarre B, Bauchet F, Duffau H, Taillandier L, Bauchet L. 2016. Epidemiology for primary brain tumors: a nationwide population-based study. *J Neurooncol. United States*.
- 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.
- Greaves M, Maley CC. 2012. Clonal evolution in cancer. *Nature* 481(7381):306-313.
- Haase D. 2008. Cytogenetic features in myelodysplastic syndromes. *Annals of Hematology* 87(7):515-526.
- 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, Idbah 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.
- 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.
- 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.

- 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* 9:10.
- 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. Molecular cytogenetic analysis of chromosomal aberrations in cells of low grade gliomas and its contribution for tumour classification. *Klinická Onkologie* 27(3):183-191.
- 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.
- 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.
- 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.
- Schvartzman JM, Sotillo R, Benezra R. 2010. Mitotic chromosomal instability and cancer: mouse modelling of the human disease. *Nature Reviews Cancer* 10(2):102-115.
- 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, Jacobuzio-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*. p 458-468.
- Vardiman JW. 2003. Myelodysplastic syndromes, chronic myeloproliferative diseases, ative diseases. *Seminars in Diagnostic Pathology* 20(3):154-179.
- 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.
- 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.
- 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.