

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra biochemických věd

**VYUŽITÍ MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE K DIAGNOSTICE A PROGNÓZE
MDS**

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: prof. PharmDr. Martin Beránek, Ph.D.

Konzultant: doc. MUDr. Anna Jonášová, Ph.D.

Hradec Králové 2019

Zbyněk Husák, DiS.

PROHLÁŠENÍ

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

PODĚKOVÁNÍ

Toto cestou bych rád poděkoval svému vedoucímu práce prof. PharmDr. Martinu Beránkovi, Ph.D. a konzultantce doc. MUDr. Anně Jonášové, Ph.D. za cenné rady a připomínky při psaní bakalářské práce.

Obsah

1	ÚVOD.....	5
2	MYELOUDYSPLASTICKÝ SYNDROM	6
2.1	KLASIFIKACE.....	6
2.2	ETIOLOGIE.....	10
2.3	INCIDENCE.....	10
2.4	KLINICKÝ OBRAZ.....	10
2.5	DIAGNOSTIKA.....	10
2.6	LÉČBA	12
3	TYPY GENOVÝCH MUTACÍ V MDS	13
3.1	SESTRÍHOVÉ FAKTORY	13
3.2	EPIGENETICKÉ FAKTORY	14
3.3	KOHEZNÍ KOMPONENTA	14
3.4	TRANSKRIPČNÍ FAKTORY	15
3.5	TP53	15
4	MOLEKULÁRNĚ BIOLOGICKÉ METODY VYUŽÍVANÉ K DIAGNOSTICE MDS	16
4.1	ACGH	16
4.2	SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM (SNP) ARRAY.....	17
4.3	MULTIPLEX LIGATION-DEPENDENT PROBE AMPLIFICATION (MPLPA)	19
4.4	NEXT GENERATION SEQUENCING (NGS, SEKVENOVÁNÍ NOVÉ GENERACE)	22
4.4.1	<i>Roche 454</i>	22
4.4.2	<i>Illumina – Solexa</i>	23
4.4.3	<i>Life Technologies – SOLiD</i>	24
4.4.4	<i>Life Technologies – Ion Torrent</i>	25
5	DIAGNOSTICKÉ A PROGNOSTICKÉ GENY	27
5.1	SESTRÍHOVÉ FAKTORY	27
5.1.1	<i>SF3B1</i>	27
5.1.2	<i>SRSF2 a ZRSR2</i>	28
5.1.3	<i>U2AF1</i>	28
5.1.4	<i>PRPF8</i>	28
5.2	EPIGENETICKÉ FAKTORY	29
5.2.1	<i>DNMT3A</i>	29
5.2.2	<i>TET2</i>	29
5.2.3	<i>IDH1/2</i>	30
5.3	HISTONOVÉ MODIFIKACE.....	31
5.3.1	<i>EZH2 a PRC2</i>	31
5.3.2	<i>ASXL1</i>	31
5.4	TRANSKRIPČNÍ FAKTORY	33
5.4.1	<i>RUNX1/AML1</i>	33
5.4.2	<i>ETV6</i>	33
5.4.3	<i>TP53</i>	33
5.4.4	<i>NMP1/CEBPA/WT1/GATA1/SPI1</i>	34
6	ZÁVĚR.....	35
7	ZKRATKY.....	36
8	BIBLIOGRAFIE	38

1 Úvod

Termín myelodysplastický syndrom (MDS) byl poprvé popsán na konferenci kooperační francouzsko-americko-britské skupiny (FAB) v roce 1976. (Bennett et al., 1976) Později roku 1982 FAB skupina vytvořila podrobnější rozdělení MDS. (Bennett et al., 1982)

MDS představuje heterogenní skupinu klonálních chorob hematopoetické kmenové buňky, která je charakterizována neefektivní krvetvorbou, rozličnou cytopenií v periferní krvi, morfologickou dysplazií a v určitých případech závažnou transformací do akutní myeloidní leukemie (AML). Onemocnění postihuje nejčastěji osoby staršího věku. Incidence je 35 nemocných na 100 000 osob ve věku nad 70 let, a proto MDS patří mezi nejčastější hematologická onkologická onemocnění v pokročilém věku. (Jonášová, 2013)

Mechanismus vzniku MDS není stále dokonale popsán, ale využitím cytogenetických a molekulárně genetických metod lze získat postupný obraz vzniku a vývoje onemocnění.

2 Myelodysplastický syndrom

MDS patří mezi skupinu onemocnění, která vznikají poškozením hematopoetické pluripotentní kmenové buňky. Charakteristickým rysem onemocnění v důsledku neefektivní hematopoézy je cytopenie v periferní krvi. Oproti tomu kostní dřev (KD) je často buněčně bohatá. Na krvetvorných buňkách jsou patrné typické dysplastické rysy, které reflektují poruchu vyžívání těchto buněk. Porucha regulace krvetvorby vede k poškození diferenciaci, která může mít za následek hromadění nezralých prekurzorů v podobě myeloidních blastů ve dřev. Tak může dojít k progresi onemocnění a transformaci do akutní leukemie (AL). (Visconte et al., 2014)

Předpokladem pro rozvíjení MDS je aktivace řady procesů, mezi které patří poškození hematopoetické kmenové buňky. Poškození může být vyvoláno spontánní mutací či mutagenem, který způsobí imunologickou odpověď, jež zásadně ovlivní růst a vývoj kmenové buňky. (Visconte et al., 2014)

2.1 Klasifikace

Označení dysplazie nebyl tím nejšťastnějším možným termínem, jelikož není zcela přesný, a také se můžeme s tímto termínem setkat například i u onemocnění zvaného myelofibróza. Klasifikace MDS prošla vývojem od FAB klasifikace až po současnou klasifikaci dle Světové zdravotnické organizace (WHO). První FAB klasifikace z roku 1982, která rozdělila MDS do pěti subtypů, je zaměřena na procentuální zastoupení blastů v periferní krvi a v kostní dřev. Na toto rozdělení navazuje klasifikace dle WHO z roku 1999, revidovaná v roce 2008. Nejnovější revize proběhla v roce 2016. Upravuje a řadí refrakterní anémii a refrakterní cytopenii pod souhrnný typ myelodysplastický syndrom s příslušným upřesněním. Kvůli překrývajícím se výsledkům vyšetření byla zavedena kategorie MDS/MPN (myeloproliferativní neoplazie) (Ghosh, 2011). Klasifikace z roku 2016 je uvedena v tabulce 1.

Tab. 1 – WHO klasifikační systém z roku 2016

Název	Dysplastické linie	Cyto- penie ¹	Zastoupení prstenčitých sideroblastů v KD [%]	Blasty v PK [%]	Blasty v KD [%]	Auerovy tyče	Karyotyp
MDS s jednou dysplastickou linií (MDS-SLD)	1	1 - 2	<15%/<5% ²	< 1	< 5	žádné	jakýkoliv, pokud neplatí kritéria pro izolovanou del (5q)
MDS s multilineární dysplazii (MDS-MLD)	2 - 3	1 - 3	<15%/<5% ²	< 1	< 5	žádné	jakýkoliv, pokud neplatí kritéria pro izolovanou del (5q)
MDS s prstenčitými sideroblasty (MDS-RS)							
MDS-RS s jednou dysplastickou linií (MDS-RS-SLD)	1	1 - 2	<15%/<5% ²	< 1	< 5	žádné	jakýkoliv, pokud neplatí kritéria pro izolovanou del (5q)
MDS-RS s multilineární dysplastickou linií (MDS-RS-MLD)	2 - 3	1 - 3	<15%/<5% ²	< 1	< 5	žádné	jakýkoliv, pokud neplatí kritéria pro izolovanou del (5q)
MDS s izolovanou del(5q)	1 - 3	1 - 2	žádné nebo několik	< 1	< 5	žádné	izolovaná del(5q) nebo s přidanou jednou abnormalitou mimo -7 nebo del(7q)
MDS s nadbytkem blastů (MDS-EB)							

MDS-EB-1	0 - 3	1 - 3	žádné nebo několik	2 - 4	5 - 9	žádné	jakýkoliv
MDS-EB-2	0 - 3	1 - 3	žádné nebo několik	5 - 19	10 - 19	ano	jakýkoliv
MDS, neklasifikovaný (MDS-U)							
s 1 % blastů v PK	1 - 3	1 - 3	žádné nebo několik	1	< 5 ⁴	žádné	jakýkoliv
s jednou dysplastickou linií a pancytopenií	1	3	žádné nebo několik	< 1	< 5	žádné	jakýkoliv
definována na základě cytogenetické abnormality	0	1 - 3	<15% ³	< 1	< 5	žádné	MDS-definující abnormality
Dětská refrakterní cytopenie	1 - 3	1 - 3	žádné nebo několik	< 2	< 5		jakýkoliv

- 1) Cytopenie – hemoglobin pod 100 g/l, krevní destičky pod 100 x 10⁹/l, absolutní počet neutrofilů pod 1,8 x 10⁹/l, výjimečně může být MDS prezentováno mírnou anemií, nebo trombocytopenií nad těmito hranicemi, počet monocytů v PK musí být pod 1 x 10⁹/l
- 2) Pokud je přítomna mutace SF3B1
- 3) 1 % blastů v PK musí být přítomno v minimálně 2 případech
- 4) případy s ≥ 15 % prstenčitých sideroblastů mají dle definice signifikantní erytroidní dysplazii a jsou řazeny jako MDS-RS-SLD

Po klasifikaci onemocnění bylo vytvořeno prognostické hodnocení přežití pacientů. International Prognostic Scoring System (IPSS) byl sestaven v roce 1997. IPSS vyhodnocuje délku onemocnění, či riziko přechodu do AML na základě procenta blastů v kostní dřeni, počtu cytopenií a změn v karyotypu. (Viz Tab. 2) Tento skórovací systém má možné uplatnění jen u pacientů s MDS *de novo*. I u tohoto systému byla provedena revize, a to v roce 2012 - Revised International Prognostic Scoring System (IPSS-R). Pro přesnější prognostické vyhodnocení byly přidány další hodnoty, jako je hodnota hemoglobinu, počet krevních destiček, počet neutrofilů v PK a podrobnější cytogenetická vyšetření. IPSS-R rozděluje pacienty do pěti skupin – velmi nízké, nízké, intermediární, vysoké a velmi vysoké riziko. (Viz Tab. 3) V roce 2015 byl vytvořen další prognostický

system WPSS (WHO Classification-Based Prognostic Scoring System). System má také pět skupin od velmi nízké až po velmi vysoké. (Viz Tab. 4) (Ghosh, 2011)

Tab. 2 - Mezinárodní prognostický bodový systém (IPSS)

Prognostická data skórovacího systému		
International Prognostic Scoring System ¹		
IPSS Riziková skupina	Medián přežití [roky]	Čas do rozvinutí AML u 25 % pacientů
Nízké	5,7	9,4
Intermediární - 1	3,5	3,3
Intermediární - 2	1,2	1,1
Vysoké	0,4	0,2

Tab. 3 - Revidovaný mezinárodní prognostický bodový systém (IPSS – R)

Revised International Prognostic Scoring System ²		
IPSS-R Riziková skupina	Medián přežití [roky]	Čas do rozvinutí AML u 25 % pacientů
Velmi nízké	8,8	N/R ^a
Nízké	5,3	10,8
Intermediární	3,0	3,2
Vysoké	1,6	1,4
Velmi vysoké	0,8	0,7

a) Nedosaženo během studie

Tab. 4 - Prognostický skórovací systém na bázi WHO (WPSS)

World Health Organization Prognostic Scoring System ³		
WPSS Kategorie rizika	Medián přežití [roky]	Riziko AML v průběhu 5 let [%]
Velmi nízké	11,8	3
Nízké	5,5	14
Intermediární	4	33
Vysoké	2,2	54
Velmi vysoké	0,75	84

1) (Greenberg et al., 1997)

2) (Greenberg et al., 2012)

3) (Malcovati et al., 2007)

2.2 Etiologie

MDS ve více než 80 % případů vzniká *de novo*. Etiologie vzniku je neznámá, ovšem některé studie naznačují spojení s expozicí benzenu, ředidlům, pesticidům nebo také s kouřením, a označuje se také jako primární MDS. Dalších necelých 20 % případů vzniká druhotně a označuje se jako sekundární MDS. Vzniká na podkladě dřívější léčby – radioterapie či chemoterapie. Dále se předpokládá, že genový polymorfismus společně s faktory životního prostředí také může významně negativně ovlivnit rozvoj tohoto onemocnění. (Ghosh, 2011)

2.3 Incidence

Incidence MDS je kolem 4 případů na 100 000 obyvatel za rok. Při vyšším věku, tedy nad 70 let, se počet nově zjištěných případů zvýší na průměr 35 na 100 000 obyvatel. Každoročně se zvyšující se počet nemocných se dá vysvětlit nejen lepšími diagnostickými prostředky, ale i vyšší dobou dožití. Muži jsou postiženi 1,5krát častěji než ženy, kromě MDS s del(5q), který se naopak vyskytuje častěji u žen. Velmi vzácně MDS postihuje dětské pacienty a vyskytuje se ve 4 % hematologicko-onkologických onemocnění u dětí. (Ghosh, 2011)

2.4 Klinický obraz

Nemocný přichází nejčastěji s anémií či anemickým syndromem (hodnoty hemoglobinu u žen pod 120 g/l a u mužů pod 130 g/l). Ke klinickým projevům anémie patří: únava, slabost, palpitace, dušnost. Jedna čtvrtina nemocných má často leukopenii, která ohrožuje pacienty případnou infekcí. Nemocní, kteří mají trombocytopenii (10 % pacientů), mají krvácivé projevy (snadná tvorba modřin, petechie, sufuze či epistaxe). (Vondráková, 2010)

2.5 Diagnostika

Klinický obraz pro MDS se nedá zcela typizovat, diagnostika může být velmi obtížná a občas zahrnuje nutnost širší diferenciální diagnostiky. Po podrobné anamnéze je základním diagnostickým vyšetřením vyšetření periferní krve, tedy vyšetření krevního obrazu (KO) i s diferenciálním rozpočtem a jeho správná interpretace. V KO se může objevit mono-, bi-, až pancytopenie. Anémie je obvykle makrocytární, ale i normocytární,

normochromní, s anizocytózou a retikulocytopenií. V diferenciálním rozpočtu leukocytů se sleduje vyplavování nezralých granulocytů, převážně myeloblastů, a zda-li jsou přítomny morfologické abnormality (patologická granularita v cytoplazmě, nepravidelné tvary jádra, změny chromatinu či vakuolizace). Při zjištění abnormalit v KO se dále indikuje vyšetření kostní dřeně (KD), které se provádí dvěma způsoby: odběrem z hrudní kosti – sternální punkce nebo biopsií z kosti lopaty kyčelní – trepanobiopsie. U vyšetření KD se provádí diferenciální rozpočet, myelogram, a zkoumají se morfologické změny jako v rozpočtu PK. Další metodou je barvení na železo pro zjištění obsahu a distribuce železa v KD a k vyloučení či průkazu prstenčitých sideroblastů. Je dále možné provádět cytochemická barvení, která jsou v dnešní době spíše na ústupu a jsou nahrazována průtokovou cytometrií (FACS). Vzorek KD je také zasílán na cytogenetická a nově molekulárně biologická vyšetření a v případě trepanobiopsie se vzorek odesílá k histologickému vyšetření (imunohistochemie). (Vondráková, 2010)

V roce 2013 European LeukemiaNet vydal seznam vyšetření, které jsou pro diagnostiku MDS doporučená. (Tab. 5)

Tab. 5 - Doporučená vyšetření u MDS – European LeukemiaNet vydal v roce 2013 seznam doporučených vyšetření.

Vyšetření	Výsledek	Kategorie
Nátěr periferní krve	hodnocení dysplazie v jedné nebo více buněčných liniích, počet blastů	Povinná
Sternální punkce	hodnocení dysplazie v jedné nebo více buněčných liniích, počet blastů, počet prstenčitých sideroblastů	
Biopsie kostní dřeně	posouzení buněčnosti, buňky CD34, stupeň fibrózy	
Cytogenetika	detekce klonálních chromozomálních abnormalit	
FISH	při selhání G-pruhování	Doporučená
Imunofenotypizace	detekce abnormalit v jednotlivých buněčných liniích	
SNP array	detekce chromozomálních aberací	Navrhovaná

Mutační analýza kandidátních genů	detekce somatických mutací	
-----------------------------------	----------------------------	--

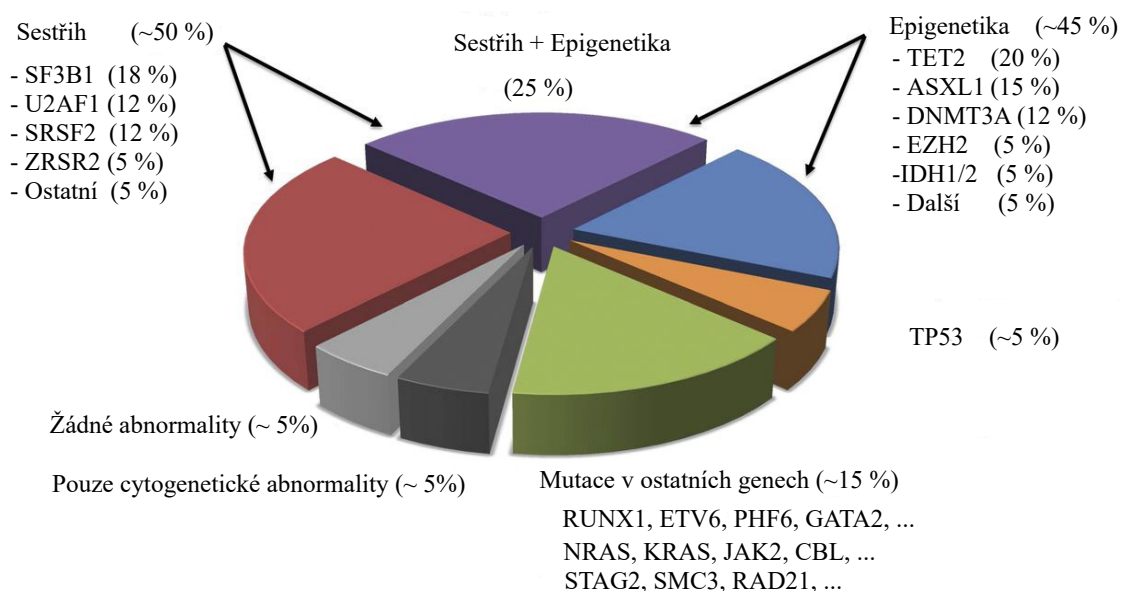
2.6 Léčba

Léčba je založena často na individuálním přístupu, většinou se řídí skórovacím systémem (rozlišení nízkého či vysokého rizika). Pacientům s nižším a středním rizikem se podává podpůrná, stimulační, chelatační, imunosupresivní nebo imunomodulační terapie. Cílem je snaha zlepšit kvalitu života a také jeho prodloužení. Naopak u pacientů s vysokým rizikem se terapie zaměřuje na patologický klon a jeho eliminaci a snahu o odvrácení transformace do AML. (Malcovati, Ambaglio a Elena, 2015)

3 Typy genových mutací v MDS

Detailnější poznání mutací v MDS je otázkou posledních 10 let, a to díky novým metodám jako tzv. SNP – array (DNA mikročipy detekující jednonukleotidové polymorfizmy), celogenomové a celoexomové sekvenování, které pomohly identifikovat často mutované geny u myeloidních malignit. Bylo zjištěno, že se somatické mutace objevují alespoň v jednom genu u 90 % pacientů s MDS. (Kennedy a Ebert, 2017)

Počet řídicích genů v MDS je obrovský. Lze je rozdělit a uspořádat do kategorií, které odpovídají buněčnému procesu: RNA sestřihové faktory, epigenetické regulátory, kohezivní komponenta, transkripční faktory, odpověď na poškozenou DNA a molekuly signální transdukce. (Obr. 1)



Obr. 1 – Rozdělení nejčastěji nalezené mutace u MDS (Bejar a Steensma, 2014)

3.1 Sestřihové faktory

Sestřihové faktory jsou zodpovědné za posttranskripční úpravu mRNA, tedy vystřihávání intronů z pre-mRNA. Tento proces sestřihu “splicing” se provádí v jaderné organelle, ve spliceozomu, který je tvořen malými jadernými RNA a několika proteiny. Mezi zodpovědné geny patří *SF3B1*, *SRSF2*, *U2AF1* a *ZRSE2*, které jsou u pacientů s MDS až v 60 % případů mutované. Tyto mutace se vyskytují jako jednoduché

substituce aminokyselin v definovaném bodě. *SF3B1* byl jako první z rodiny spliceozomu spojen s MDS a bývá až v 80 % mutován spolu s nálezem prstenčitých sideroblastů (MDS-RS). Mutace sestřihových faktorů jsou heterozygotní a navzájem vylučují jedna druhou, tedy dvě mutace se nemohou navzájem tolerovat. Oblast spliceozomu se ukazuje jako možný nový cíl v terapii MDS, AML a CMML; je snaha připravit selektivní inhibitor pro *SF3B1* jako farmaceutický preparát. (Kennedy a Ebert, 2017)

3.2 Epigenetické faktory

Methylace CpG ostrůvků v genech promotorů patří mezi hlavní epigenetické kontrolní mechanismy transkripce, které jsou často deregulovány u nádorů a leukemií. Různé histonové modifikace, které ovlivňují genovou expresi, jsou zde také přítomny. Změny methylace u MDS nemusí ovlivňovat jen geny promotorů v CpG ostrůvcích, ale také u intragenních a intergenních oblastí, které zesilují jejich expresi. Epigenetické abnormality, které jsou často pozorovány u MDS, zahrnují hypermethylaci kontrolních genů pro proliferaci, diferenciaci, adhezi a dalších důležitých faktorů souvisejících se vznikem tohoto onemocnění. Geny, které se podílejí na methylaci (*DNMT3A*, *TET2*, *IDH1/IDH2*) a histonové modifikaci (*ASXL1*, *EZH2*, *UTX*, *SETBP*, *ATRX*), vytvářejí společnou skupinu mutací u MDS. Některé studie naznačují, že by bylo možné využít inhibitory *EZH2*, *IDH2* a *UTX* jako možný terapeutický přípravek. (Kennedy a Ebert, 2017)

3.3 Kohezní komponenta

Mutace opakující se ve složkách kohezinového komplexu, které se podílejí na soudržnosti sesterských chromatid, postreplicačních oprav DNA a transkripční regulace, byly v posledních několika letech pozorovány u myeloidních malignit, ale také i u MDS. Mutace v genu *STAG2* byla zjištěna přibližně u 7 % pacientů s MDS a mutace v genu *RAD21* nebo *SMC3* v 1 % případů. Mutace těchto kohezinových genů se většinou vzájemně vylučují a jsou považovány za funkční ztrátu. Defekty v kohezinových genech jsou spojeny s horším celkovým přežíváním, a to zejména u pacientů s MDS. Mají-li mutaci *STAG2*, mají délku přežití okolo 12 měsíců. Naproti tomu přítomnost kohezinových mutací neovlivňuje podle nedávné studie přežívání pacientu s AML. (Kennedy a Ebert, 2017)

3.4 Transkripční faktory

Mutace genů zapojených do RAS signální dráhy se vyskytují přibližně u 5-10 % pacientů s MDS, přičemž nejčastěji mutovaným genem je NRAS. Některé studie ukazují na špatný prognostický vliv mutací v RAS genech. Kolem 50 % pacientů s MDS/MPN a refrakterní anémií s prstenčitými sideroblasty a trombocytosou (RARS-T) mají diagnostikovanou mutaci *V617F* v genu pro *JAK2*, kódující cytoplasmatickou tyrosinkinázu. Interní tandemové duplikace (ITD) a další aktivující mutace receptoru tyrosinkinázy *FLT3* jsou časté u AML, ale objevují se i u MDS. (Kennedy a Ebert, 2017)

RUNX1 je transkripční faktor a regulátor hematopoézy, který byl původně popsán v rámci translokace t(8;21) u AML. Bodové mutace u tohoto genu se ovšem vyskytují i u MDS, a to se zastoupením okolo 10 %. Dalším transkripčním faktorem je *ETV6*, který je mutovaný přibližně u 2-5 % pacientů s MDS. Mutace *RUNX1* a *ETV6* patří mezi prognostické faktory onemocnění, které negativně ovlivňují vývoj onemocnění. (Kennedy a Ebert, 2017)

3.5 TP53

Do samostatné skupiny jsou zařazeny mutace v tumor supresorovém genu *TP53*, který patří mezi důležité regulační faktory genů ovlivňujících proliferaci, regulaci a reparaci DNA. Mutace tohoto genu bývá detekována u bezmála 10 % pacientů s *de novo* MDS a u 30 % pacientů po předchozí terapii (sekundární MDS). U MDS s del(5q) se mutace *TP53* vyskytuje podstatně častěji. Přítomnost mutací v *TP53* genu významně souvisí s kratším přežíváním pacientů, dále je zde větší riziko leukemické transformace a relapsu onemocnění po různých léčebných terapiích. (Kennedy a Ebert, 2017)

4 Molekulárně biologické metody využívané k diagnostice MDS

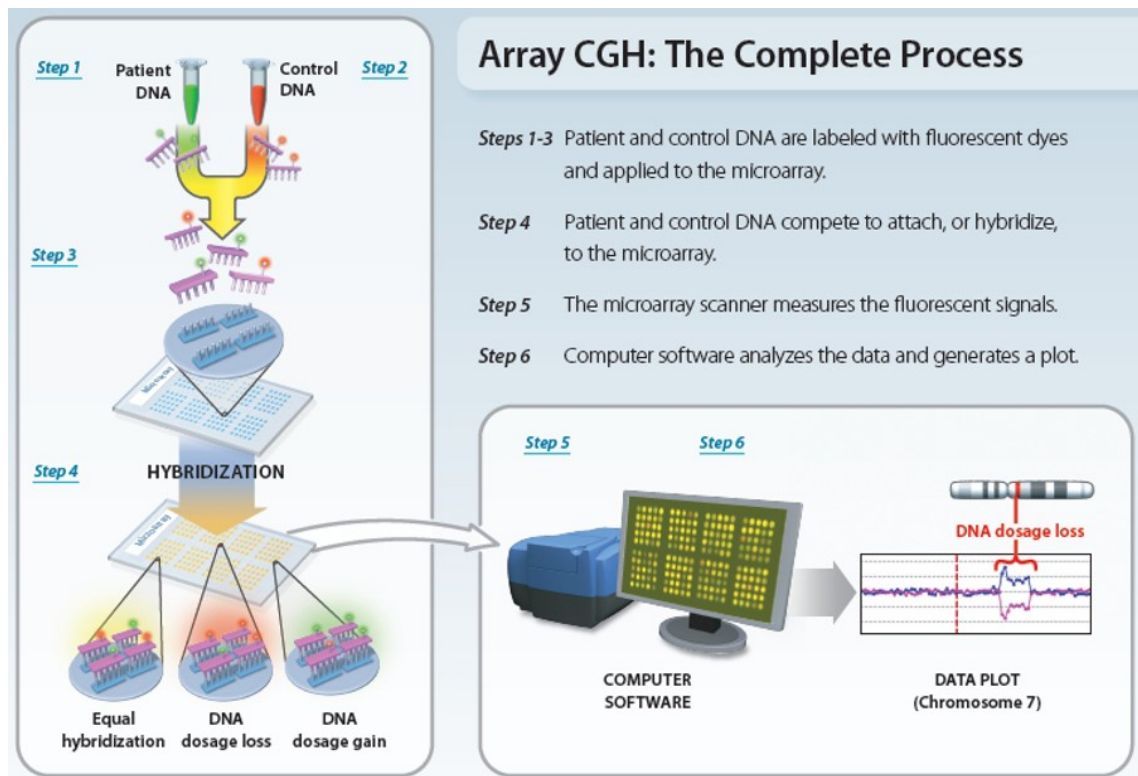
4.1 aCGH

Původní komparativní genomová hybridizace (CGH) je metoda na stanovení nebalancovaných chromozomálních aberací mezi dvěma vzorky DNA (referenční a patientská), které jsou hybridizovány v metafázi chromozomu. Modernější varianta CGH, tedy array-CGH (CGH na čipu), využívá místo metafázních chromozomů oligonukleotidových sond, které jsou ukotveny na čipu. Array-CGH umožňuje detekci tzv. copy number variation (CNV) v celém genomu ve vysokém rozlišení a v současné době je toto vyšetření doporučováno u onemocnění MDS namísto standardní karyotypizace. Komerčně dostupné array platformy mají přibližně 50krát větší rozlišovací schopnost než cytogenetické analytické metody. Ty detekují 15-20 % chromozomových abnormalit na rozdíl ve srovnání se 4 %, které detekuje klasická karyotypizace u stejných pacientů. (Lukackova et al., 2014)

Hlavní výhodou oproti metodě FISH je schopnost detekovat změny počtu kopií v genomu DNA současně na více lokusech. To znamená možnost analyzovat stovky až tisíce genů, které jsou na microarray destičce v jednom experimentu. Získaná DNA od pacienta a kontrolní vzorek se označí různou fluorescenční barvou a hybridizují se na array čip s navázanými oligonukleotidovými nebo BAC (Bacterial Artificial Chromosome) sondami. Přibližně po 24hodinové hybridizaci a promývacích krocích se výsledek skenuje pomocí fluorescenčního skeneru. Poměr fluorescencí mezi referenčním a testovaným vzorkem hybridizačního signálu je determinován na různých pozicích podél genomu a poskytuje informaci o amplifikaci DNA v testovaném vzorku a následné srovnání s normálním diploidním genomem kontrolního vzorku. (Obr. 2) Hlavní výhodou aCGH při genetickém testování MDS je, že nevyžaduje proliferující buňky k úspěšné analýze. Avšak podíl maligních buněk ve vzorku by měl dosahovat detekčního limitu, který je 25-35 %. (Lukackova et al., 2014)

Obecně platí, že balancované přestavby, nízké procento mozaiky a polyploidie není možné pomocí aCGH detekovat. U aCGH byla vyvinuta řada různých postupů, jejichž cílem bylo zvýšit rozlišovací schopnost metody. Rozlišovací schopnost různých typů aCGH je určena velikostí a mezerami mezi DNA sondami. Část aCGH postupu je poloautomatizována a výsledky jsou analyzovány pomocí biostatistického algoritmu. V současné době jsou DNA komerčně dodávány. (Lukackova et al., 2014)

V hematologii lze využít microarray k zpřesnění diagnózy, určení subtypu onemocnění, možné reakci na léčbu a také k identifikaci genů a pochodů spojených s patogenezi této choroby. (Lukackova et al., 2014)



Obr. 2 – Schéma vyšetření metodou aCGH (Theise, 2008)

4.2 Single Nucleotide Polymorphism (SNP) array

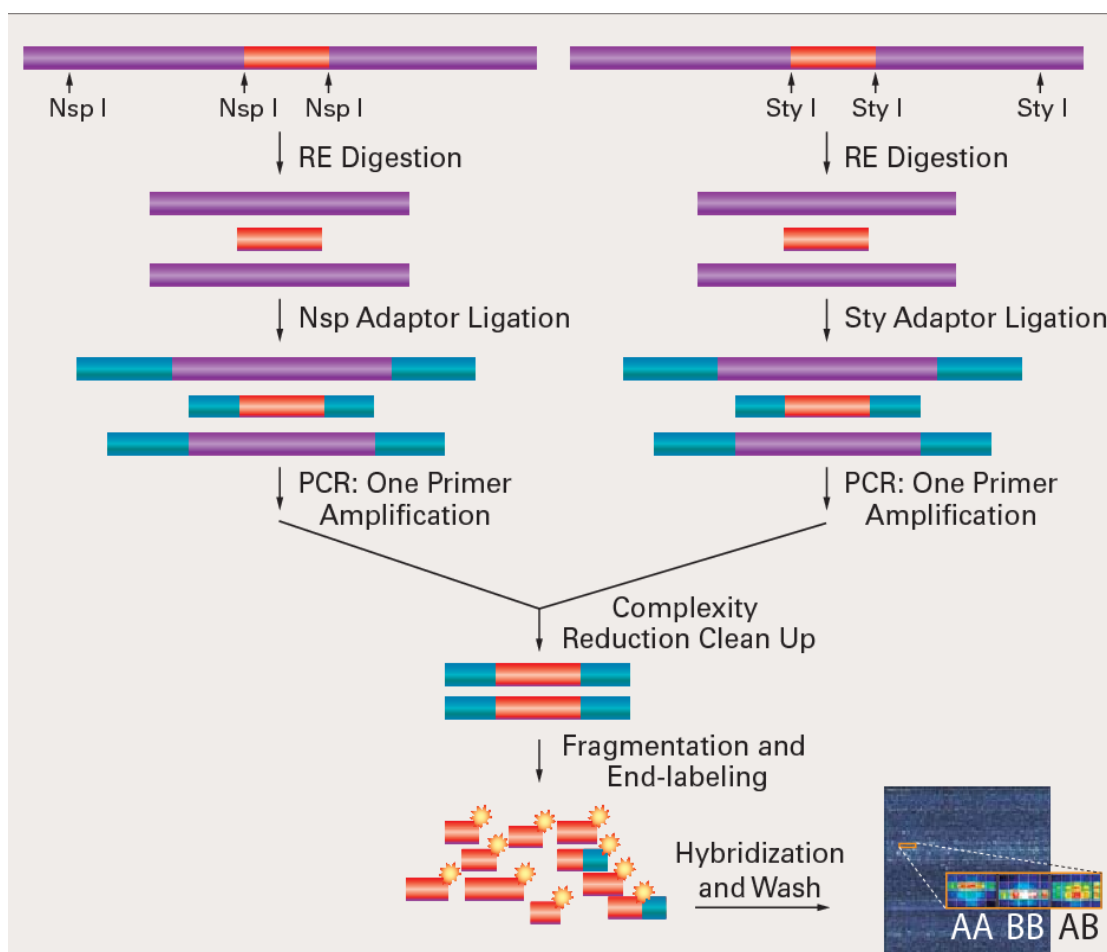
Metoda má velkou rozlišovací schopnost, která je podobná jako u aCGH, ale navíc je možné prokázat ztrátu heterozygoty (LOH) a uniparentální disomii. SNP array ve srovnání s aCGH poskytuje více informací v rámci jednoho vyšetření a podobnou nebo dokonce vyšší citlivost než aCGH. Metoda je založena na vyšetření jednonukleotidových polymorfismů, které jsou v genomu nejvíce variabilní. O SNP se jedná, pokud se jednotlivé nukleotidy A, C, T a G v jednotlivých alelách chromozomu liší. Jedná se například o sekvenci GACCATAAC, kde došlo evolučně k jednobodové mutaci, a tedy k záměně, kde v jedné alele je A a v druhé G. Vzniklá sekvence je tedy GACCGTAAC. Tyto mutace jsou definovány přítomností alespoň v 1 % u minoritní alely u sledované populace. Po celém lidském genomu bylo nalezeno okolo 15 miliónů SNP. (Vosecká, Musil a Vícha, 2014)

Dva hlavní výrobci pro SNP array jsou Affymetrix, Inc. a Illumina, Inc. Využívají stejné biochemické principy, ale používají různé chemikálie k určení počtu kopií. Fragmentovaná a označená DNA pacienta je hybridizována na čipu, který obsahuje množství oligonukleotidových sond, které jsou navrženy tak, aby obsahovaly místo pro SNP. Oligonukleotidy jsou specifické pro každou ze dvou SNP alel (A, B). Fluorescenční signál je získán pro každou alelu v daném místě SNP a intenzita hybridizace poskytuje informace o obou SNP genotypech (A, B nebo AB) a počtu kopií (heterozygotní nebo homozygotní/hemizygotní v důsledku hybridizace genomové DNA na obě nebo jednu variantu sondy) (Obr. 3). (Iacobucci et al., 2013)

Illumina využívá platformu na bázi kuliček, kde je celý genom amplifikován, fragmentován a posléze hybridizován s oligonukleotidovými sondami na kuličkách, které jsou specifické pro každou z alel v SNP lokusu. Následné enzymatické prodloužení (alelově specifický primer nebo jednotlivá báze) a fluorescenční značení umožňuje rozlišení alel. (Iacobucci et al., 2013)

U Affymetrix technologie se DNA naštěpí a následně amplifikuje. Poté se označí a hybridizuje se na čip. Protože jsou sondy lokalizovány na SNP lokusu, je rozlišení arraye úzce spjata s hustotou sond, tedy s rozdělením SNP na každém chromozomu (SNP nejsou rozmístěny rovnoměrně po genomu). Pro překonání tohoto limitu Affymetrix vylepšoval rozlišovací schopnost arraye. Genome-Wide Human SNP Array verze 6.0 se skládá z více jak 900 000 SNP, spolu s více jak 940 000 nepolymorfních markerů k zajištění lepšího pokrytí všech délek chromozomu. CytoScan HD Array obsahuje 2,67 milionů markerů pro analýzu počtu kopií, kolem 750 000 SNP sond a 1,9 milionu nepolymorfních sond pro ucelení celogenomového pokrytí. (Iacobucci et al., 2013)

High-density SNP array umožňují analyzovat a identifikovat oblasti podle původu a zvyšují hladinu detekce u vzorků s nízkou hladinou mozaiky. Další důležitou vlastností SNP array je její senzitivita, která závisí na počtu buněk obsahujících specifické genetické poškození. Tato metoda je schopna detekovat přestavby u větších buněčných klonů (aspoň cca 25 %). Po generovaném fluorescenčním signálu je vzorek skenován a analyzován. Všechny metody podstupují standardizaci jasů na základní úroveň kvůli korekci bias, při porovnávání intenzity všech vzorků. Postupy kontroly kvality umožňují identifikaci vzorků i o horší kvalitě. Pro tyto účely byly vyvinuty v průběhu let různé algoritmy pro specifické arraye. Výstupní data mohou být generována pomocí několika softwarů, založených na různých bioanalytických principech, ale k hodnocení dat obě společnosti poskytují vlastní software. (Iacobucci et al., 2013)



Obr. 3 – Schéma postupu vyšetření metodou SNP array (Teumer et al., 2013)

4.3 Multiplex ligation-dependent probe amplification (MPLPA)

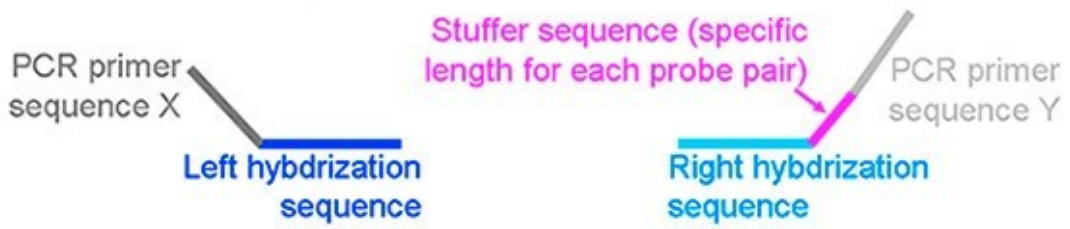
MLPA je jednoduchá a snadno proveditelná metoda s vysokou výtěžností, kterou vyvinula společnost MRC Holland. Tato relativně jednoduchá technika je založena na principu multiplexní polymerázové řetězové reakce (PCR) a následné detekci pomocí kapilární elektroforézy. Metodu lze využít k analýze dosahující až 50 oblastí v jedné reakční směsi a je schopna rozlišit různé sekvence, které se délkově liší i o jeden nukleotid. (MRC Holland, 2019)

MLPA sondy se skládají ze dvou oligonukleotidů, které obsahují hybridizační sekvenci komplementární k hledané sekvenci na DNA. Obě sondy navíc obsahují koncové oblasti pro nasednutí PCR primerů s univerzálními sekvencemi, které je využívány k amplifikaci. Obě sondy, pokud naleznou komplementární sekvenci, ihned hybridizují těsně vedle sebe. Když sondy správně hybridizovaly na cílovou sekvenci, jsou poté enzymaticky spojeny termostabilní ligázou. Dalším krokem je amplifikace pomocí PCR. Zde je využito univerzálních míst pro PCR primery obsažených na MLPA sondách,

na které se váží PCR primery při amplifikaci, kdy jeden z nich je označen fluorescenčním barvivem k vizualizaci produktu. (MRC Holland, 2019)

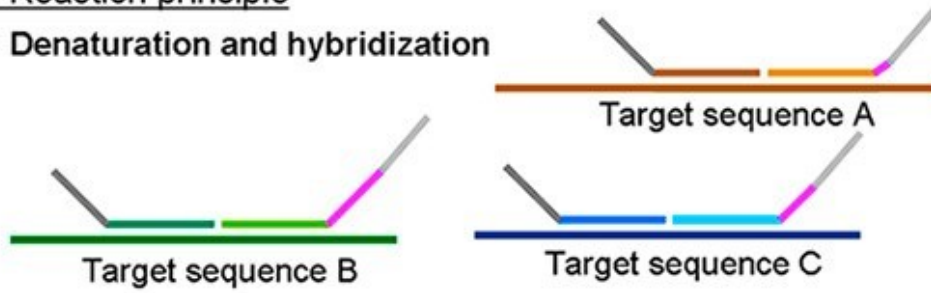
MLPA může být použita bez promývání nenavázaných sond, jelikož tyto sondy nejsou ligovány, jejich amplifikace je zanedbatelná a nevytvářejí vizualizační produkt. Každá sonda má specifickou délku, která je důležitá pro snadnou identifikaci. Tuto rozdílnou délku zajišťuje tzv. stuffer sekvence, která je vložena mezi hybridizační sekvenci a oblast nasednutí PCR primeru na jedné z MLPA sond. Získané produkty jsou za pomoci kapilární elektroforézy rozděleny (Obr. 4). Výsledný elektroforeogram je upraven pomocí softwaru, z kterého je možné následně vyhodnotit, zda je přítomna případná delece či amplifikace. (MRC Holland, 2019)

A: Probe pair design

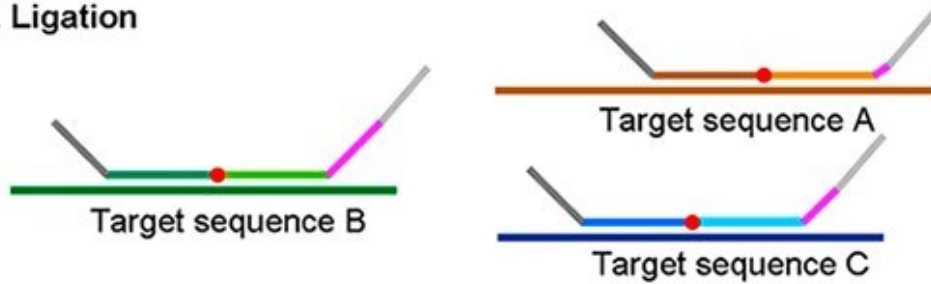


B: Reaction principle

1. Denaturation and hybridization



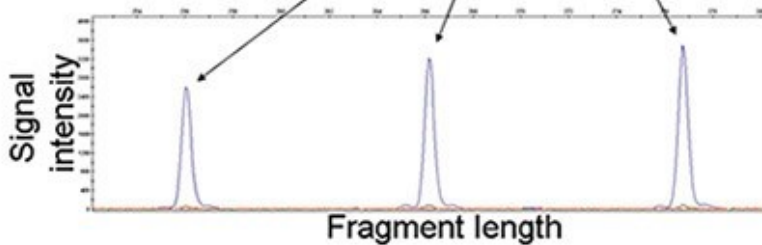
2. Ligation



3. PCR with universal primers X and Y (fluorescently labeled)



4. Fragment analysis



5. Comparison of signals of patients and normal controls

Obr. 4 – Schéma postupu pro vyšetření metodou MLPA (Hänkel a Huber, 2013)

4.4 Next Generation Sequencing (NGS, sekvenování nové generace)

Metoda umožnila rychlejší a ekonomičtější sekvenování lidského genomu. Kompletní lidský genom se díky této metodě podařilo osekvenovat za zlomek ceny i času oproti předchozí Sangerově metodě. Významný pokrok metoda umožnila v oblasti onkologie, kde přispěla k molekulární charakteristice nádorů a jejich vývoje. Nejvyžívanějšími typy NGS (od uvedených výrobců) jsou v současnosti následující čtyři: firma Roche a metoda 454, firma Illumina a metoda Solexa a firma Life technologies, která využívá dvě metody – SOLiD a Ion Torrent. (Koubková, Vojtěšek a Vyzula, 2014)

4.4.1 Roche 454

Firma Roche vytvořila první komerčně vyráběný analyzátor NGS, který byl uveden na trh v roce 2005. Metoda pracuje na principu pyrosekvenování, což lze zjednodušeně popsat jako sled enzymatických reakcí při začleňování bází do vznikající DNA, při němž dochází k emisi světla, jehož intenzita je úměrná počtu začleněných nukleotidů. (Koubková, Vojtěšek a Vyzula, 2014)

Jako první se u NGS musí vytvořit DNA knihovna. Dvouvláknová DNA se naštěpí na fragmenty a následně se na konce těchto fragmentů připojí specifické adaptory (A a B). Tyto adaptory v dalších reakcích slouží k purifikaci, amplifikaci i k samotné sekvenaci. Adaptor B má na svém 5'- konci připojen biotin, který slouží k imobilizaci a přichycení dvouvláknové DNA k magnetické kuličce s navázaným streptavidinem. Po promytí nenavázaných fragmentů DNA se provede denaturace a neoznačené komplementární vlákno, které nese adaptor B, se uvolní. Vytvořené jednořetězcové fragmenty slouží k hybridizaci se speciální DNA kuličkou, která má na svém povrchu komplementární sekvenci DNA, která slouží jako primer pro amplifikaci. Ke klonální amplifikaci se využívá metoda emulzní PCR (emPCR). Metoda je navržena tak, aby se na jednu DNA kuličku navázal právě jeden DNA fragment. Každá kulička je uzavřena v olejové emulzi s vodou, kde probíhá amplifikace jednoho fragmentu. Po skončení emPCR se kuličky s mnohonásobně zmnoženou DNA uvolní z emulze. Následujícím krokem je enrichment, tedy kuličky, které nenesou amplifikovanou DNA, jsou odmyty. Na tyto kuličky, které nesou amplifikované jednořetězcové DNA fragmenty, se přichytí sekvenční primer a tato směs se nanese do jamek pikotitrační destičky. Tyto jamky jsou navrženy tak, že do každé jamky je nanášena jen jedna kulička. Destička je rozdělena do

čtyř vrstev, kam se postupně centrifugací dostávají další druhy kuliček důležité pro pyrosekvenační reakci. V této reakci se využívají enzymy sulfuryláza, luciferáza, apyráza a DNA polymeráza, které reagují s adenosin-5-fosfosulfátem a luciferinem. Nukleotidy putují v pevném pořadí nad pikotitrační destičkou. DNA polymeráza, která zabudovává nukleotidy do nového řetězce, je doprovázena uvolněním pyrofosfátu, který je převeden na ATP pomocí ATP-sulfurylázy za přítomnosti adenosin-5-fosfosulfátu. Takto vzniklé ATP přemění luciferin na oxyluciferin za přítomnosti luciferázy. Tato reakce emituje viditelné světlo, které je pomocí CCD čipu zaznamenáváno. Enzym apyráza degraduje přebytečné nukleotidy a ATP. Sekvence se odečítá z pyrogramu. (Obr. 5) Generovaná data jsou prostřednictvím 454 softwaru analyzována pomocí filtrů, které odstraní data sekvencí o nízké kvalitě nebo obsahují více než jeden iniciální DNA fragment. (Koubková, Vojtěšek a Vyzula, 2014)

Největší nevýhodou sekvenátoru je detekce homopolymerních oblastí DNA. V sekvencích obsahujících více nukleotidů stejného typu za sebou vzniká při emisi světla větší chybovost, tento problém zčásti vylepšil nový program, který dokáže filtrovat tyto chybové sekvence. Mezi další nevýhody této technologie patří relativně velká míra manuální práce a vysoká cena reagensů. Oproti tomu výhodou je rychlost reakce, kde je možné za 10 hodin provést celou analýzu. Využívá se u celogenomového sekvenování a resekvenování. (Koubková, Vojtěšek a Vyzula, 2014)

4.4.2 Illumina – Solexa

Firma Illumina na trh v roce 2007 uvedla sekvenátor, který byl jako první založen na principu bridge amplifikace. V tomto případě se templátová DNA hybridizuje do reakčních jamek (flow cell), které jsou na opticky transparentním a pevném povrchu. Využívá se modifikovaných reverzibilních nukleotidů (Koubková, Vojtěšek a Vyzula, 2014).

Příprava DNA knihovny začíná fragmentací DNA o velikosti do 800 bází. Tyto fragmenty jsou zarovnány a fosforylovány. Na obou koncích jsou připojeny adaptory. Po provedené denuraci jsou jednovláčkové fragmenty hybridizovány v reakční jamce, která má na svém povrchu hustou síť sekvencí komplementárních k adaptorům, které jsou připojeny na konci DNA fragmentů. Na takto ukotvených a imobilizovaných fragmentech proběhne po přidání potřebných reagensů PCR amplifikace. Adaptory na povrchu reakční jamky slouží jako primery pro vytvoření dvouvláčkové DNA. Po vytvoření

dvouvláknové DNA dojde k denaturaci a templátová DNA se odmyje. Zůstává nově syntetizované vlákno DNA, které je kovalentní vazbou drženo v reakční jamce. Toto vlákno se ohne a svým volným koncem hybridizuje k jednomu z dalších adaptorů na reakční komůrce. Následnou PCR se vytvoří “bridge“ s dvouvláknovým fragmentem. Dojde k denaturaci a rozdělení vlákna. K získání dostatečného množství DNA vyžaduje několikanásobné opakování toho procesu. (Koubková, Vojtěšek a Vyzula, 2014)

Posledním krokem je odmytí reverzních řetězců a zůstanou jen tzv. klastry kopií DNA fragmentů, které následně bude možné sekvenovat. Primery pro sekvenaci jsou hybridizovány k adaptorovým sekvencím na volných koncích fragmentů. Následně se přidává polymeráza a nukleotidy, které jsou značeny čtyřmi různými fluorescenčními barvami a také mají inaktivovanou 3'-OH skupinu. Tím je zaručeno, že je při reakci inkorporován jen jeden nukleotid. Po začlenění nukleotidu dojde k přečtení pozice a typu nukleotidu pomocí přítomného fluorescenčního značení. Tuto fluorescenci zachytí CCD kamery. Po přečtení se nukleotid na 3'-konci zbaví fluoroforu a cyklus se opakuje s dalším nukleotidem. Speciální algoritmus generuje sekvence každého klastru, přidává jim určitou hodnotu, ale také dokáže odstranit hodnoty sekvence o nízké kvalitě. (Obr. 5) První sekvenátor této firmy dokázal zajistit výsledek za 2-3 dny u sekvenace o 35 bázích a generovat 1 gigabázi dat v jednom běhu. (Koubková, Vojtěšek a Vyzula, 2014)

Různě velké sekvenátory se využívají pro sekvenování jak jednoho lidského genomu, tak u malých genomů, amplikonového sekvenování či cíleného sekvenování vybraných oblastí genů. Illumina sekvenátory jsou limitovány relativně krátkým sekvenčním čtením, jelikož by jinak vznikala až příliš velká chybovost přístroje a nekompletní prodloužení vlákna. Vyšší chybovostí čtení jsou zatíženy také oblasti s bohatými AT a GC sekvencemi. Sekvenátory od Illumina mají výhodu ve formě většího počtu získaných dat za kratší dobu a za méně peněz ve srovnání se Sangerovou metodou, ale naopak mají větší chybovost při čtení. I s touto nevýhodou, klady ve formě vysoké výkonnosti, kapacity a hospodárnějšího provozu, sekvenátory od Illumina vedou momentálně na trhu. (Koubková, Vojtěšek a Vyzula, 2014)

4.4.3 Life Technologies – SOLiD

Sequencing by oligonucleotide ligation and detection (SOLiD) představila v roce 2007 firma Applied Biosystems (dnešní Life Technologies). Metoda je založena na sekvenování pomocí ligace. DNA knihovna se připraví pomocí emPCR. K DNA

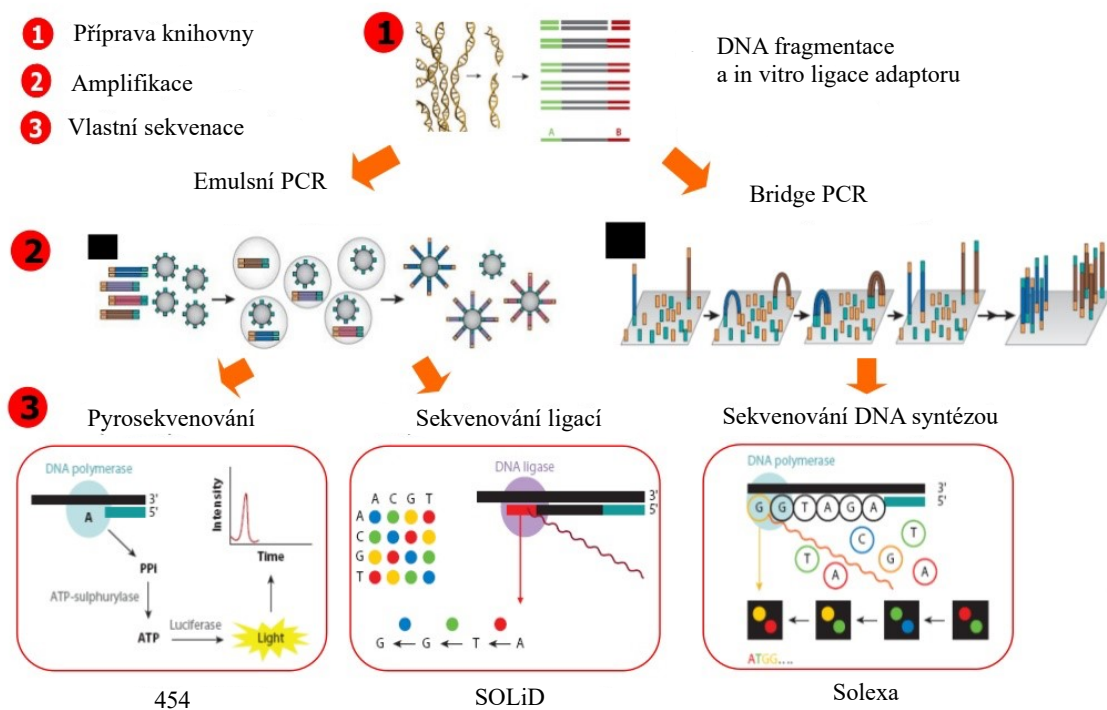
fragmentům se připojí sekvence, které jsou komplementární k adaptorům na magnetických kuličkách. Po amplifikaci jsou kuličky navázány na speciálně upravené sklíčko, které se vkládá do kazety umožňující fluidní průtok. Metoda využívá osmi nukleotidových sond se známou sekvencí prvních dvou bází. SONDY jsou označeny pomocí čtyř fluorescenčních barev. (Obr. 5) SOLiD technologie čte každý nukleotid 2krát, a tím zvyšuje přesnost pořadí nukleotidů, a tedy i přesnost celého vyšetření. (Koubková, Vojtěšek a Vyzula, 2014)

Výraznou výhodou SOLiD systému oproti ostatním sekvenátorům je nižší chybovost. Analyticky se využívá v oblasti celogenomového resekvenování, cíleného resekvenování a epigenomiky. (Koubková, Vojtěšek a Vyzula, 2014)

4.4.4 Life Technologies – Ion Torrent

Opět firma Life Technologies představila nový přístroj Ion Personal Genome Machine (PGM) a to v roce 2010. Byl to první sekvenátor založený na principu přenosu chemického signálu do digitální podoby. Signál detekuje vodíkové protony, které se uvolňují při syntéze nově vznikajícího řetězce DNA za pomoci DNA polymerázy. Reakce probíhá na polovodičovém čipu, který je hustě pokrytý mikrojamkami. Pod jamkami je umístěna vrstva, která je citlivá na ionty. Nukleotidy, které se zabudovávají na nově vzniklé vlákno, způsobují uvolnění vodíkového protonu, který následně změní hodnotu pH, která je zaznamenána detektorem. DNA knihovna se připraví pomocí emPCR a následně kuličky s templátem jsou vkládány na čip s jamkami, kde v každé jamce je opět jen jedna DNA. Přes čip proudí postupně jednotlivé nukleotidy a při začlenění jednoho nukleotidu dojde k vytvoření signálu, při začlenění dvou nukleotidů vznikne signál dvojnásobné intenzity. Naopak když se nukleotid nezačlení, signál je nulový. Tím, že se nevyužívá fluorescenční detekce či jiné standardní metody, se sekvence velice zkrátí, a to na méně než 2 hodiny. Je to velice jednoduchá, rychlá a levná technologie. Množství celkových dat je určeno hustotou jamek na čipu. V roce 2012 byl představen inovovaný sekvenátor, který má dostatečnou kapacitu na sekvenaci lidského genomu. (Koubková, Vojtěšek a Vyzula, 2014)

Sekvenování DNA nové generace



Obr. 5 – Schéma provedení sekvenování nové generace u metod 454, SOLiD a Solexa (Introduction to next generation sequencing, 2011)

5 Diagnostické a prognostické geny

Pomocí výše uvedených molekulárních metod byly identifikovány nejčastější mutace typické pro MDS. (Tab. 6) Tyto geny napomáhají ke stanovení diagnózy a prognózy toho onemocnění.

Tab. 6 – Nejčastěji identifikované mutace u MDS

Časté mutace u MDS			
Gen	Frekvence [%]	Lokace	Funkce
<i>SF3B1</i>	20–30	2q33	RNA sestřih
<i>TET2</i>	20–30	4q24	DNA methylace
<i>ASXL1</i>	15–20	20q11	Histonová modifikace
<i>SRSF2</i>	15	17q25	RNA sestřih
<i>DNMT3A</i>	10	2p23	DNA methylace
<i>RUNX1</i>	10	21q22	Transkripční faktor
<i>TP53</i>	5–10	17p13	Tumorový supresor
<i>U2AF1</i>	5–10	21q22	RNA sestřih
<i>EZH2</i>	5–10	7q36	Histonová modifikace
<i>ZRSR2</i>	5–10	X chromozom	RNA sestřih
<i>STAG2</i>	5–10	X chromozom	Kohezinový faktor
<i>NRAS</i>	5	1p13	Transkripční faktor
<i>CBL</i>	5	11q23	Signální transduktor
<i>IDH1/IDH2</i>	5	2q33/15q26	Buněčný metabolismus DNA methylace
<i>BCOR</i>	5	X chromozom	Transkripční faktor

5.1 Sestřihové faktory

5.1.1 *SF3B1*

Studie u pacientů s nízkým rizikem MDS-RARS identifikovala mutaci v genu *SF3B1* při celogenomové sekvenaci jako jednu z nejčastějších mutací. Mutace byla nalezena u 60-80 % pacientů s MDS-RARS a u 10-20 % pacientů s MDS obecně. (Bejar et al., 2011) Několik studií popisuje pozitivní prognostický význam přítomnosti této mutace. (Malcovati et al., 2011) Heterozygotní mutace v genu *SF3B1* se často vyskytují mezi 622–700 aminokyselinou, nejčastěji K700E. (Ganguly a Kadam, 2016)

SF3B1 mutace jsou silně spjatý s přítomností prstenčitých sideroblastů.18,52 Tyto mutace vedou ke změně místa sestřihu v 3'sestřihové oblasti a aberantnímu sestřihu

důležitých genů, které ovlivňují metabolismus železa. Tento fakt zřejmě souvisí s přítomností prstenčitých sideroblastů. (Conte et al., 2015)

5.1.2 *SRSF2 a ZRSR2*

Mutace v *SRSF2* genu se objevují ve 12-15 % a mutace v genu *ZRSR2* již jen ve 3-11 % případů MDS. Mutace v genu *SRSF2* se častěji vyskytuje u CMML. K heterozygotní mutaci v genu *SRSF2* dochází výhradně v oblasti P95, kde dochází k formování kontaktu s cílovou RNA. Existence mutací v genu *SRSF2* u MDS představují významnou roli při transformaci do AML a predikuje horší přežívání pacientů. Mutace v *SRSF2* genu je asociována s neutropenií a také s trombocytopenií. Mutace v genu *ZRSR2* se objevuje ve 3-11 % případů MDS s izolovanou neutropenií a mutace je bez specifické lokace, podél celého proteinu. (Ganguly a Kadam, 2016)

5.1.3 *U2AF1*

Získané mutace sestřihového faktoru U2AF1 jsou poměrně běžné mezi hematologickými malignitami. Byly popsány u MDS bez prstenčitých sideroblastů, sekundární AML, chronické myelomonocytární leukémie (CMML) či variantní formy vlasatobuněčné leukémie. Mutace v tomto genu byly popsány i u solidních nádorů. U pacientů s MDS byly tyto mutace detekovány v 5–12 % případů. Mutace jsou spojeny s alternativním sestřihem cca 5 % genových transkriptů. K alternativnímu sestřihu dochází zejména díky přeskokování exonů. (Jenkins a Kielkopf, 2017)

Mutace genu U2AF1 nejsou spojeny s žádným morfologickým fenotypem. (Ganguly a Kadam, 2016)

5.1.4 *PRPF8*

Nedávno zjištěné somatické mutace a delece u tohoto sestřihového genu se objevují u MDS, ale také i u AML. Tento gen kóduje největší a evolučně nejzachovalejší protein spliceozomu. Mutace v genu *PRPF8* se objevují u 1-4 % pacientů s MDS a jsou často spojeny s prstenčitými sideroblasty. Mutace v genech *PRPF8* a *SF3B1*, které jsou obě spojeny s výskytem prstenčitých sideroblastů, naznačují společný patogenní mechanismus v rozvoji MDS. Buňky nesoucí mutaci v *PRPF8* genu následně vytvářejí abnormální sestřihy několika transkriptů, které se podílejí na hematopoéze a metabolismu železa v mitochondriích. (Ganguly a Kadam, 2016)

5.2 Epigenetické faktory

5.2.1 DNMT3A

Gen *DNMT3A* kóduje enzym methyltransferázu, která katalyzuje reakci přenosu methylu z S-adenosyl-1-methioninu na pátý uhlík cytosinu v CpG dinukleotidové oblasti DNA. Proto je gen *DNMT3A* důležitou komponentou účinné methylace aktivních chromozomových domén. Frekvence mutací v genu *DNMT3A* je u MDS nízká a převažuje u nemocných ve vyšším věku. Mutace jsou heterozygotní a nejčastěji typu missense nebo nonsense. Mutace v místě argininu (R882) vede k narušení methyltransferázové domény, což vede ke snížení enzymové aktivity. (Challen et al., 2012) Mutace v genu *DNMT3A* jsou častější u AML a výskyt u MDS není tak častý (3-13 %). Tyto mutace nejsou dále blíže spojeny s žádnou cytogenetickou podskupinou, ale je tu korelace s nižším přežíváním pacientů a také časnější transformace do AML. (Ganguly a Kadam, 2016)

5.2.2 TET2

TET proteiny jsou Fe^{2+} a α -ketoglutarát dependentní oxygenázy, které katalyzují hydroxylaci 5-methylcytosinu na hydroxymethylcytosin v DNA. Touto reakcí dochází ke ztrátě methylace DNA. TET proteiny mají významnou roli v methylaci cytosinu a také jsou důležitými epigenetickými genovými regulátory. Gen *TET2* je klíčovým regulátorem hematopoetických kmenových buněk. Mutace v genu *TET2* u MDS mají za následek ztrátu katalytické aktivity. Abnormality v *TET2* genu s poruchou funkce TET se objevují u 15-27 % pacientů s MDS, které zahrnují delece, missense, nonsense a frameshift mutace, což vede k porušení DNA methylace. Podmíněná nebo nepodmíněná delece v *TET2* genu má za následek leukocytózu, monocytózu a výraznou splenomegalii. Toto se objevuje s latencí okolo 3 měsíců od vzniku mutace. (Ganguly a Kadam, 2016)

Somatické mutace v *TET2* genu jsou spojovány s pokročilým věkem, klonální hematopoézou a normální karyotypem. To naznačuje, že mutace v *TET2* genu je spojena se stárnutím hematopoetických buněk. Riziko, které mutace v *TET2* genu představují a související klinické dopady, jsou zatím ve stádiu diskuzí. Mutace v *TET2* genu jsou popisovány s kratším přežíváním u pacientů s MDS po transplantaci krvetvorných buněk (HSCT). Snížená aktivita *TET2* genu u mutovaných kmenových buněk zvyšuje pravděpodobnost transformace do AML. Snížená exprese *TET2* genu v progenitorových

buňkách, prekurzorech červené řady a granulocytech u pacientů s MDS, kde nebyla detekována mutace v genu *TET2*, naznačuje alternativní mechanismus genu *TET2* regulace a upozorňuje na předpokládaný fyziologický význam tumor supresorové funkce *TET2* proteinu. (Ganguly a Kadam, 2016)

Souhrnná data indikují, že mutace, které poškozují 5-hydroxymethylaci představují nový mechanismus v transformaci u myeloidních malignit. Kromě toho je možné, že terapie, které regulují hladiny hydroxymethylace, mohou být přínosem u malignit charakterizovaných ztrátou enzymové funkce TET inhibicí obnovy maligních kmenových buněk. Francouzská studijní skupina MDS ukázala spojitost mezi mutací v genu *TET2* a celkovou odezvou na léčbu AZA (Azacitidin), ale nebyla spojena s dobou trvání léčby a s dobou přežití. (Itzykson et al., 2011) Bylo zjištěno, že přítomnost mutací v metabolických enzymech IDH1 a IDH2 se vzájemně vylučují s mutací v genu *TET2* a produkce 2-hydroxyglutarátu u neomorfních mutovaných IDH1/2 proteinů inhibují katalytickou aktivitu enzymu TET2. Souhrnně publikovaná data ukazují TET2 jako hlavní regulátor normální, ale i maligní hematopoézy. Hypotézy naznačují odlišnou roli genu *TET2* v jiných hematopoetických liniích a možnost jeho přispění k transformaci do lymfoproliferace nebo epiteliálního tumoru. (Ganguly a Kadam, 2016)

5.2.3 *IDH1/2*

Isocitrátdehydrogenáza (IDH) katalyzuje přeměnu izocitrátu na α -ketoglutarát, za pomoci NADP. Tento enzym má 3 izoformy. IDH1 se nachází v cytoplazmě, IDH2 se nachází v mitochondriích a IDH3 je součástí citrátového cyklu. Mutace se vyskytují v aktivním místě IDH1 na pozici R132 a IDH2 na pozicích R140 a R172. Metabolit α -ketoglutarátu, který je vytvářen IDH1/2, reguluje aktivitu TET2. Heterogenní mutace v oblasti R132 (*IDH1*), R140 a R172 (*IDH2*) mají za následek změnu substrátové specifity enzymu. V důsledku výše uvedených mutací mutovaný enzym IDH1/2 není schopen katalyzovat konverzi isocitrátu na α -ketoglutarát, ale místo toho katalyzuje konverzi α -ketoglutarátu na β -hydroxyglutarát za konzumpce NADPH. β -hydroxyglutarát inhibuje TET proteiny přímo a takto spojuje tyto mutace v epigenetickém nástroji skrze hydroxymethylaci u cílových genů. (Ganguly a Kadam, 2016)

Mutace v genu *IDH* inhibují hydroxylaci 5-methylcytosinu, která je katalyzována TET2, a exprese mutace genu *IDH2* potlačuje funkci TET2, což má za následek zhoršení diferenciace hematopoetických buněk *in vitro* se vzrůstající expresí markerů typických

pro mladší hematopoetické buňky. U pacientů nesoucí *IDH1/2* genovou mutaci se zvyšuje koncentrace onkologického metabolitu β -hydroxyglutarátu, který může přímo inhibovat funkci TET2. Mutace v genech *IDH1/2* jsou zaznamenány u 4-12 % pacientů s MDS a u 10-15 % pacientů s AML s nepříznivými klinickými výsledky. Dvě heterozygotní mutace se vzájemně s *TET2* genovou mutací vylučují u pacientů s AML. (Ganguly a Kadam, 2016)

5.3 Histonové modifikace

5.3.1 *EZH2* a *PRC2*

Gen *EZH2* kóduje histonovou methyltransferázu, která je zodpovědná za mono-, di- a trimethylaci lysinu 27 histonu 3. Histonové modifikace jsou asociovány s transkripční represí a rekombinantní enzym s touto bodovou mutací disponuje vyšší katalytickou aktivitou methylační reakce pro H3K27, což má za důsledek dramatické zvýšení trimethylace v maligních buňkách. *EZH2* spolupracuje s DNMT3A, čímž v důsledku ovlivňuje metylaci DNA. Somatické mutace spojené se ztrátou funkce v *EZH2* byly objeveny u 6-12 % pacientů s MDS s kratší dobou přežití a má se za to, že působí jako tumor supresorový gen v myeloidních malignitách. Tyto mutace jsou spojeny s UPD7q a s del(7q) a redukuje expresi genu *EZH2* v CD34 pozitivních buňkách. Nonsense mutace mohou být v jakékoliv části genu, zato missense mutace jsou na C-terminální SET doméně a na doméně bohaté na cystein, která ovlivňuje vazbu dalších komponent na genu *PRC2*. Porušení SET domény snižuje hladinu H3K27 pro dimethylaci a trimethylaci. Mutace v komplexu genu *PRC2* redukuje methyltransferázovou aktivitu a ukazuje význam aktivity *PRC2* v myeloidních malignitách. Mutace v genu *EZH2* spadá podle IPSS-R do skupiny pacientů nízkého rizika MDS a může být benefitem pro dřívější a modifikovanou terapii. Mutace v genu *EZH2* se u *de novo* AML vyskytuje jen velmi zřídka a to naznačuje, že by se mohlo jednat o významný znak při progresi u MDS. (Ganguly a Kadam, 2016)

5.3.2 *ASXL1*

Gen *ASXL1* kóduje chromatin vázající protein epigenetické regulace v hematopoetických buňkách a hraje klíčovou roli v uplatnění *PRC2* na specifické místo. *ASXL1* patří do tříčlenné skupiny stimulujících Trithorax a Polycomb skupiny proteinů (*ASXL1/2/3*), které se podílejí na regulaci aktivace nebo umlčení související s rozvojem

HOX genů u chromatinové remodelace. Mutace v genu *ASXL1* byla poprvé identifikována u MDS s del(20q11). (Gelsi-Boyer et al., 2009) (Ganguly a Kadam, 2016)

Mutace v genu *ASXL1* je typu nonsense a frameshift (inserce nebo delece). Nonsense mutace na 5'- konci 12. exonu genu má za následek ztrátu ASXL1 proteinové exprese. Mutace genu *ASXL1* je u onemocnění MDS běžná a je detekována u 14-21 % pacientů. (Bejar et al., 2011) U chronické myelo-monocytární leukemie (CMML) a MDS/MPN s překrývajícími syndromy je nález mutace u 38-43 % pacientů. (Thol et al., 2011) Mutace je spojena s horším přežíváním u pacientů s MDS, kteří transformují do AML nezávisle na klinických funkcích, věku a cytogenetice. Role mutace v genu *ASXL1* pro vývoj onemocnění a myeloidní transformaci je spojena prostřednictvím genové exprese PRC2. Narušení myeloidní diferenciace hematopoetických buněk prostřednictvím genu *ASXL1* byl pozorován *in vitro*. (Davies et al., 2013) Jsou důkazy, které naznačují, že mutace v genech *DNMT3A*, *ASXL1* a *TET2* jsou nezávisle spojeny s lepší odpovědí na hypomethylační léčbu u MDS. (Ganguly a Kadam, 2016)

Dále je ještě spojení s mutací v *TET2* genu, které reaguje nejvíce na hypomethylační činitele u MDS a bez současné klonální mutace v *ASXL1* genu. (Bejar et al., 2014) Na základě analýzy 40 mutovaných genů od pacientů s MDS léčených hypomethylační léčbou lze předpokládat, že některé individuální mutace mohou sloužit jako znak pro vývoj a odpověď na hypomethylační léčbu. (Bejar et al., 2014) Mutace v genu *TET2* má za následek změnu methylace a může vést k leukemické transformaci v sebeobnově hematopoetických kmenových buněk. Odpověď na hypomethylační léčbu byla pozorována u pacientů s mutacemi, kteří měli špatnou prognózu. Druhotně získaná mutace genu *ASXL1* může vést k větší klonální progresi onemocnění, což může následně způsobit resistenci k hypomethylační léčbě. Je snaha zavést častější hodnocení mutací v průběhu onemocnění a léčby, aby byly identifikovány mutace jak na začátku onemocnění, tak i v průběhu onemocnění. Bylo by tedy vhodné identifikovat mutace spjaté se získanou resistencí nebo relapsem u léčených pacientů. (Ganguly a Kadam, 2016)

5.4 Transkripční faktory

5.4.1 *RUNX1/AML1*

Mutace v genu *RUNX1* byla popsána u různých typů hematologických malignit. Hlavní roli představuje v patogenezi MDS/AML u buněk s CD34 pozitivitou. Mutace typu translokace a amplifikace u genu *RUNX1* (známého také jako *AML1* nebo *CBFA2*) jsou popsány u 10-20 % pacientů, zejména u sekundární MDS a MDS s vysokým rizikem. K mutacím dochází na C-konci proteinu, což má za následek haploinsuficienci genu. Mutace tohoto genu se často vyskytují u monosomie 7/ del(7q), která je spojena s trombocytopenií a má špatnou prognózu. Vysoce konzervovaná doména na N-konci (RUNT doména) *RUNX1* proteinu zapříčiňuje heterodimerizaci s B-podjednotkou CBF a C-koncová transkripční doména reaktivuje transkripční kofaktory. U MDS byla popsána i přestavba *EVII-RUNX1* – t(3;21). K amplifikaci *RUNX1* dochází polysomií 21. chromozomu nebo klasickou amplifikací samotného genu. Funkční důsledky amplifikace genu *RUNX1* na patologii MDS nejsou příliš jasné.

Jedno z familiárních onemocnění destiček, které je také známé jako familiární MDS, je zapříčiněné heterozygotní zárodečnou mutací genu *RUNX1* s predispozicí k AML. (Ganguly a Kadam, 2016)

5.4.2 *ETV6*

Somatické mutace a heterozygotní delece genu *ETV6* se vyskytují u 2-5 % pacientů s MDS. Izolované delece 12p jsou řazeny do dobré cytogenetické prognostické skupiny v IPSS-R. Časté přestavby, zahrnující *ETV6-RUNX1* (*TEL-AML1*) translokace a delece genu *ETV6*, jsou častěji popisovány u akutní lymfoblastické leukemie z B buněk (B-ALL). Gen *ETV6* kóduje transkripční faktor, který je důležitý pro udržení hematopoetické kmenové buňky. Heterozygotní mutace genu *ETV6* postihují homodimerizační nebo DNA-vazebnou doménu, což vede ke zkrácení proteinu nebo k jeho změně. Ten ztrácí schopnost potlačit transkripci, a vykazuje tak dominantně negativní efekt. (Ganguly a Kadam, 2016)

5.4.3 *TP53*

TP53 patří mezi tumor supresorové geny a také mezi transkripční faktory. Je zodpovědný za odpověď na buněčný stres, prostřednictvím aktivace ochranných mechanismů – apoptózy, zastavení buněčného cyklu a opravných mechanismů DNA.

Delece v genu *TP53* má za následek resistenci na apoptózu a jiné mechanismy vyvolávající smrt buňky. Mutace v genu *TP53* je popisována u MDS s vysokým rizikem a častěji se vyskytuje u sekundární MDS. Změny v genu *TP53* byly popsány přibližně u 10 % pacientů s MDS, kde 30-50 % z nich mělo komplexní změny karyotypu. Mutace genu *TP53* je vždy spojena s horší prognózou a relativně vysokým rizikem transformace do AML, a to i po úpravě dalších prognostických faktorů. Mutace u pacientů s MDS s izolovanou del(5q) v raném stádiu onemocnění ovlivňuje výsledek léčby, a to kvůli ztrátě funkce proteinu p53 a predisponuje k rozvoji do AML. Přítomnost mutace genu *TP53* byla popsána u 18 % pacientů s diagnózou MDS s izolovanou del(5q) a <5 % blastů, které byly v malém počtu přítomny v době stanovení diagnózy a dávno před začátkem terapie Lenalidomidem, která vedla k suboptimální odpovědi až resistenci na léčbu. (Jädersten et al., 2011) Pacienti s mutací genu *TP53* neměli přítomny jiné mutace, které jsou často nalézány u myeloidních malignit se špatnou prognózou. (Ganguly a Kadam, 2016)

5.4.4 *NPM1/CEBPA/WT1/GATA1/SPI1*

Mutace v jiných transkripčních faktorech, zahrnující geny *NPM1*, *CEBPA*, *WT1*, *GATA1*, *GATA2* a *SPI1* jsou častěji pozorovány u AML, zatímco u MDS se vyskytují pod 5 % případů. U mutací zárodečné linie genů *RUNX1*, *CEBPA* a *GATA2* jsou spojovány s familiární predispozicí ke vzniku AML a MDS. Současná přítomnost dvou různých mutací v *CEBPA* ukazuje příznivější výsledek u většiny AML, zatímco pouze jedna mutace spolu s jinými genovými mutacemi vykazuje špatnou prognózu u pacientů s MDS. (Ganguly a Kadam, 2016)

6 Závěr

Molekulární metodika zajišťuje v posledních letech významný rozvoj poznatků v oblastech hematonekologie a MDS. Uplatňuje se u klinických aplikací jako je včasnější diagnostika a dále také vylepšuje prognostické rizikové modely. Biologické porozumění mutací a jejich vzájemná interakce u cytogenetického obrazu poskytují zásadní výsledky o onemocnění. Velkým skokem v oblasti diagnostiky je NGS. I když NGS poskytuje výsledky, které by bylo jinak možné získat kombinací několika metod (konvenční cytogenetiky, aCGH, SNP array a MLPA), je její využití v klinické praxi pro rutinní vyšetření stále limitováno časovou a cenovou náročností. Pro využití NGS je potřeba dostatečného množství vzorků za určitou dobu. Cytogenetické metody by mohly být do budoucna upozaděny ve srovnání s možnostmi, které poskytuje NGS. Nicméně v tuto chvíli jsou vzhledem ke své nižší finanční náročnosti stále hojně využívány.

Moderní sekvenační metody by mohly být využity v rámci screeningového vyšetření k detekci somatických mutací spojených s klonální hematopoezou u zdravých lidí s pozitivní rodinnou anamnézou. Bylo by výhodné zjistit mutace před klinickými projevy nebo alespoň identifikovat cíle léčivých přípravků. Znalost individuální genové exprese by mohla vést k tzv. personalizované léčbě, tj. medikaci zohledňující specifické vlastnosti nádoru u konkrétního pacienta.

7 Zkratky

AL	Akutní leukemie
AML	Akutní myeloidní leukemie
B-ALL	Akutní lymfoblastická leukemie z B buněk
BAC	Bacterial Artificial Chromosome
CCD	Charge–Coupled Device
CMML	Chronická myelo-monocytární leukemie
CNV	Copy number variation
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
emPCR	Emulzní polymerázová řetězová reakce
FAB	Francouzsko-Americko-Britská skupina
FACS	Fluorescent Activated Cell Sorting
FISH	Fluorescenční in situ hybridizace
HSCT	Transplantace krvetvorné kmenové buňky
IPSS	International Prognostic Scoring System
IPSS – R	Revidovaný IPSS
ITD	Interní tandemové duplikace
KD	Kostní dřev
KO	Krevní obraz
m-RNA	Mediátorová ribonukleová kyselina
MDS	Myelodysplastický syndrom
MDS – RS	MDS s prstenčitými sideroblasty
MLPA	Multiplex ligation-dependent probe amplification
MPN	Myeloproliferativní neoplázie
NGS	Next generation sequencing
PCR	Polymerázová řetězová reakce
PGM	Personal Genome Machine
PK	Periferní krev
RARS	Refrakterní anémie s prstenčitými sideroblasty
RARS – T	RARS s trombocytozou
RNA	Ribonukleová kyselina
SNP	Jednonukleotidové polymorfismy
SOLiD	Sequencing by oligonucleotide ligation and detection

WHO	Světová zdravotnická organizace
WPSS	WHO Classification-Based Prognostic Scoring System

8 Bibliografie

- BEJAR, R. et al., 2014. TET2 mutations predict response to hypomethylating agents in myelodysplastic syndrome patients. *Blood* [online]. **124**(17), 2705-2712 [cit. 2019-08-28]. DOI: 10.1182/blood-2014-06-582809. ISSN 0006-4971. Dostupné z: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2014-06-582809>
- BEJAR, R. a D. STEENSMA, 2014. Recent developments in myelodysplastic syndromes. *Blood* [online]. **124**(18), 2793-2803 [cit. 2019-08-20]. DOI: 10.1182/blood-2014-04-522136. ISSN 0006-4971. Dostupné z: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2014-04-522136>
- BEJAR, Rafael et al., 2014. Somatic Mutations Predict Poor Outcome in Patients With Myelodysplastic Syndrome After Hematopoietic Stem-Cell Transplantation. *Journal of Clinical Oncology* [online]. **32**(25), 2691-2698 [cit. 2019-08-28]. DOI: 10.1200/JCO.2013.52.3381. ISSN 0732-183X. Dostupné z: <http://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2013.52.3381>
- BEJAR, Rafael et al., 2011. Clinical Effect of Point Mutations in Myelodysplastic Syndromes. *New England Journal of Medicine* [online]. **364**(26), 2496-2506 [cit. 2019-08-28]. DOI: 10.1056/NEJMoa1013343. ISSN 0028-4793. Dostupné z: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa1013343>
- BENNETT, J. et al., 1982. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *British Journal of Haematology* [online]. **51**(2), 189-199 [cit. 2019-08-19]. DOI: 10.1111/j.1365-2141.1982.tb02771.x. ISSN 0007-1048. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2141.1982.tb02771.x>
- BENNETT, J. et al., 1976. Proposals for the Classification of the Acute Leukaemias French-American-British (FAB) Co-operative Group. *British Journal of Haematology* [online]. **33**(4), 451-458 [cit. 2019-08-19]. DOI: 10.1111/j.1365-2141.1976.tb03563.x. ISSN 0007-1048. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2141.1976.tb03563.x>
- CONTE, Simona et al., 2015. Aberrant splicing of genes involved in haemoglobin synthesis and impaired terminal erythroid maturation in SF3B1 mutated refractory anaemia with ring sideroblasts. *British Journal of Haematology* [online]. **171**(4), 478-490 [cit. 2019-08-30]. DOI: 10.1111/bjh.13610. ISSN 00071048. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/bjh.13610>
- DAVIES, Carwyn et al., 2013. Silencing of ASXL1 impairs the granulomonocytic lineage potential of human CD34 + progenitor cells. *British Journal of Haematology* [online]. **160**(6), 842-850 [cit. 2019-08-28]. DOI: 10.1111/bjh.12217. ISSN 00071048. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/bjh.12217>
- GANGULY, Bani a N.N. KADAM, 2016. Mutations of myelodysplastic syndromes (MDS): An update. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* [online]. **769**, 47-62 [cit. 2019-08-19]. DOI: 10.1016/j.mrrev.2016.04.009. ISSN 13835742. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1383574216300047>
- GELSI-BOYER, Véronique et al., 2009. Mutations of polycomb-associated gene ASXL1 in myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukaemia. *British Journal of Haematology* [online]. **145**(6), 788-800 [cit. 2019-08-28]. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2009.07697.x. ISSN 00071048. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2141.2009.07697.x>
- GHOSH, A, 2011. Myelodysplastic syndrome: classification and changing concept. *Journal of Pathology of Nepal* [online]. **1**(2), 142-150 [cit. 2019-08-20]. DOI:

10.3126/jpn.v1i2.5410. ISSN 2091-0908. Dostupné z:
<https://www.nepjol.info/index.php/JPN/article/view/5410>
GREENBERG, P. et al., 2012. Revised International Prognostic Scoring System for Myelodysplastic Syndromes. *Blood* [online]. **120**(12), 2454-2465 [cit. 2019-08-19]. DOI: 10.1182/blood-2012-03-420489. ISSN 0006-4971. Dostupné z:
<http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2012-03-420489>
GREENBERG, Peter et al., 1997. International Scoring System for Evaluating Prognosis in Myelodysplastic Syndromes. *Blood* [online]. **89**(6), 2079-2088 [cit. 2019-08-20]. Dostupné z: <http://www.bloodjournal.org/content/89/6/2079?sso-checked=true>
HÄNKEL, Thomas a Andreas HUBER, 2013. DNA methylation analysis. *Swiss Medical Weekly* [online]. **12**(21-22), 1-16 [cit. 2019-08-20]. DOI: 10.4414/smw.2013.13799. ISSN 1424-7860. Dostupné z: <http://doi.emh.ch/smw.2013.13799>
CHALLEN, Grant A et al., 2012. Dnmt3a is essential for hematopoietic stem cell differentiation. *Nature Genetics* [online]. **44**(1), 23-31 [cit. 2019-08-28]. DOI: 10.1038/ng.1009. ISSN 1061-4036. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/ng.1009>
IACOBUCCI, Ilaria et al., 2013. Use of Single Nucleotide Polymorphism Array Technology to Improve the Identification of Chromosomal Lesions in Leukemia. *Current Cancer Drug Targets* [online]. **13**(7), 791-810 [cit. 2019-08-19]. DOI: 10.2174/15680096113139990089. ISSN 15680096. Dostupné z: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1568-0096&volume=13&issue=7&spage=791>
Introduction to next generation sequencing, 2011. In: *Slide share* [online]. Technology, Business: CC Attribution-ShareAlike License [cit. 2019-08-20]. Dostupné z: <https://www.slideshare.net/ueb52/introduction-to-next-generation-sequencing-v2>
ITZYKSON, R et al., 2011. Impact of TET2 mutations on response rate to azacitidine in myelodysplastic syndromes and low blast count acute myeloid leukemias. *Leukemia* [online]. **25**(7), 1147-1152 [cit. 2019-08-28]. DOI: 10.1038/leu.2011.71. ISSN 0887-6924. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/leu201171>
JÄDERSTEN, Martin et al., 2011. TP53 Mutations in Low-Risk Myelodysplastic Syndromes With del(5q) Predict Disease Progression. *Journal of Clinical Oncology* [online]. **29**(15), 1971-1979 [cit. 2019-08-28]. DOI: 10.1200/JCO.2010.31.8576. ISSN 0732-183X. Dostupné z: <http://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2010.31.8576>
JENKINS, Jermaine L. a Clara L. KIELKOPF, 2017. Splicing Factor Mutations in Myelodysplasias: Insights from Spliceosome Structures. *Trends in Genetics* [online]. **33**(5), 336-348 [cit. 2019-08-30]. DOI: 10.1016/j.tig.2017.03.001. ISSN 01689525. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168952517300355>
JONÁŠOVÁ, Anna, 2013. Myelodysplastický syndrom – pokrok v léčbě v 21. století. *Vnitřní lékařství* [online]. **59**(7), 635-640 [cit. 2019-08-20]. Dostupné z: <https://www.prolekare.cz/casopisy/vnitri-lekarstvi/2013-7/myelodysplasticky-syndrom-pokrok-v-lecbe-v-21-stoleti-41163>
KENNEDY, James a Benjamin EBERT, 2017. Clinical Implications of Genetic Mutations in Myelodysplastic Syndrome. *Journal of Clinical Oncology* [online]. **35**(9), 968-974 [cit. 2019-08-20]. DOI: 10.1200/JCO.2016.71.0806. ISSN 0732-183X. Dostupné z: <http://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2016.71.0806>
KOUBKOVÁ, Lucie, Bořivoj VOJTĚŠEK a Rostislav VYZULA, 2014. Next Generation Sequencing – Application in Clinical Practice. *Klinická onkologie* [online]. **27**(1), 61-68

[cit. 2019-08-20]. DOI: 10.14735/amko20141S61. ISSN 0862495X. Dostupné z: <http://www.linkos.cz/klinicka-onkologie-journal/search-for-articles/skupina/a/zobrazit/ids/4484/>

LUKACKOVA, Renata et al., 2014. Molecular genetic methods in the diagnosis of myelodysplastic syndromes. A review. *Biomedical Papers* [online]. **158**(3), 339-345 [cit. 2019-08-19]. DOI: 10.5507/bp.2013.084. ISSN 12138118. Dostupné z: <http://biomed.papers.upol.cz/doi/10.5507/bp.2013.084.html>

MALCOVATI, L. et al., 2011. Clinical significance of SF3B1 mutations in myelodysplastic syndromes and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Blood* [online]. **118**(24), 6239-6246 [cit. 2019-08-28]. DOI: 10.1182/blood-2011-09-377275. ISSN 0006-4971. Dostupné z: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2011-09-377275>

MALCOVATI, Luca, Ilaria AMBAGLIO a Chiara ELENA, 2015. The genomic landscape of myeloid neoplasms with myelodysplasia and its clinical implications. *Current Opinion in Oncology* [online]. **27**(6), 551-559 [cit. 2019-08-20]. DOI: 10.1097/CCO.0000000000000229. ISSN 1040-8746. Dostupné z: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00001622-201511000-00018>

MALCOVATI, Luca et al., 2007. Time-Dependent Prognostic Scoring System for Predicting Survival and Leukemic Evolution in Myelodysplastic Syndromes. *Journal of Clinical Oncology* [online]. **25**(23), 3503-3510 [cit. 2019-08-19]. DOI: 10.1200/JCO.2006.08.5696. ISSN 0732-183X. Dostupné z: <http://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2006.08.5696>

MRC Holland, 2019. *Www.mlpa.com* [online]. Amsterdam: support.mlpa.com [cit. 2019-08-20]. Dostupné z: <https://support.mlpa.com/kb/articles/what-is-mlpa-and-how-does-it-work>

TEUMER, Alexander et al., 2013. Comparison of genotyping using pooled DNA samples (allelotyping) and individual genotyping using the affymetrix genome-wide human SNP array 6.0. *BMC Genomics* [online]. **14**(1), 1-12 [cit. 2019-08-20]. DOI: 10.1186/1471-2164-14-506. ISSN 1471-2164. Dostupné z: <http://bmcbgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-14-506>

THEISE, Aaron, 2008. Microarray-based Comparative Genomic Hybridization (aCGH). *Nature Education* [online]. **1**(1), 45 [cit. 2019-08-20]. Dostupné z: <https://www.nature.com/scitable/topicpage/microarray-based-comparative-genomic-hybridization-acgh-45432/>

THOL, Felicitas et al., 2011. Prognostic Significance of ASXL1 Mutations in Patients With Myelodysplastic Syndromes. *Journal of Clinical Oncology* [online]. **29**(18), 2499-2506 [cit. 2019-08-28]. DOI: 10.1200/JCO.2010.33.4938. ISSN 0732-183X. Dostupné z: <http://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2010.33.4938>

VISCONTE, Valeria et al., 2014. Molecular Pathogenesis of Myelodysplastic Syndrome. *Translational Medicine@UniSa* [online]. **3**(8), 19-30 [cit. 2019-08-20]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4000460/>

VONDRÁKOVÁ, Jana, 2010. Myelodysplastický syndrom, diagnostika a léčba. *Interní medicína* [online]. **11**(11), 535-539 [cit. 2019-08-20]. Dostupné z: <https://www.internimedicina.cz/pdfs/int/2010/11/03.pdf>

VOSECKÁ, Tatiana, Zdeněk MUSIL a Aleš VÍCHA, 2014. Průkaz chromozomálních změn u nádorových onemocnění pomocí CGH, array-CGH a SNP array. *Česko-slovenská*

patologie [online]. **50**(1), 25-29 [cit. 2019-08-20]. Dostupné z:
<https://www.prolekare.cz/casopisy/cesko-slovenska-patologie/2014-1-3/detection-of-chromosome-changes-by-cgh-array-cgh-and-snp-array-techniques-in-tumours-48155?hl=cs>