

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Genetika, molekulární biologie a virologie



Bc. Nikola Šejgunovová

Aberace chromosomu 5 u dospělých nemocných s myelodysplastickými syndromy (MDS)
Aberrations of chromosome 5 in adult patients with myelodysplastic syndromes (MDS)

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: doc. RNDr. Zuzana Zemanová, CSc.

Odborný konzultant: RNDr. Libuše Lizcová, Ph.D.

Praha, 2021

Prohlášení:

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

V Praze, 11. 8. 2021

Podpis

Ráda bych poděkovala své školitelce doc. RNDr. Zuzaně Zemanové, CSc. za možnost vypracování své diplomové práce v Centru nádorové cytogenomiky, Ústavu lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky, Všeobecné fakultní nemocnice a 1.LF UK v Praze. Dále ji velice děkuji za vedení, cenné rady a podporu během psaní diplomové práce. Děkuji také své konzultantce RNDr. Libuši Lizcové, Ph.D., která mi byla během studia velkou oporou.

Za ochotu a pomoc děkuji i kolektivu Centra nádorové cytogenomiky ÚLBDL, Všeobecné fakultní nemocnice a 1.LF UK v Praze a cytogenetické laboratoře Ústavu hematologie a krevní transfuze. V neposlední řadě děkuji své rodině a přátelům za podporu během celého svého studia.

Diplomová práce vznikla za finanční podpory projektů RVO-VFN64165 a ProgresQ28.

Abstrakt

Myelodysplastické syndromy (MDS) jsou klonální onemocnění krvetvorby vznikající v důsledku poškození kmenové hematopoetické buňky. Nejčastější rekurentní chromosomovou aberací u nemocných s MDS je delece dlouhých ramen chromosomu 5, del(5q). Cílem práce je studovat nebalancované aberace chromosomu 5 u pacientů s MDS, porovnat rozsah delece 5q ve skupinách nemocných s izolovanou del(5q) a s del(5q) v komplexních karyotypech a studovat vliv rozsahu del(5q) na celkové přežití pacientů a prognózu onemocnění. Kombinací cytogenomických metod jsme vyšetřili 88 vzorků kostní dřeně pacientů s MDS a del(5q) potvrzenou na základě konvenčních pruhovacích metod. Del(5q) byla v karyotypu přítomna jako izolovaná aberace u 31 pacientů (35,2 %), v kombinaci s jednou další klonální aberací u 9 pacientů (10,2 %) a jako součást komplexních karyotypů u 48 pacientů (54,6 %). Nemocní s komplexními karyotypy měli nižší dobu celkového přežití než pacienti s izolovanou del(5q). Výskyt komplexních karyotypů byl asociován s velkým rozsahem delece 5q. Při zohlednění výskytu komplexních karyotypů i rozsahu delece 5q má signifikantní vliv na celkové přežití pacientů pouze komplexita karyotypu. Samotný rozsah delece vliv na přežití nemocných nemá. Nelze však vyloučit možnost, že izolované delece 5q velkého rozsahu mohou pro pacienty v budoucnu znamenat zvýšené riziko klonálního vývoje a vzniku komplexních karyotypů.

Klíčová slova: Myelodysplastické syndromy (MDS), chromosom 5, delece 5q, komplexní karyotypy, chromothripsis, FISH, mFISH/mBAND, aCGH

Abstract

Myelodysplastic syndrome (MDS) is a clonal disease of hematopoiesis resulting from damage to hematopoietic stem cells. The most common chromosomal aberration in patients with MDS is deletion of the long arms of chromosome 5, del(5q). The aim of this study is to analyse unbalanced aberrations of chromosome 5 in MDS patients, to compare the extent of 5q deletion in groups of patients with isolated del(5q) and with del(5q) in complex karyotypes, and to study the effect of the extent of del(5q) on overall survival and prognosis of the disease. We combined cytogenomic methods to examine 88 bone marrow samples from patients with MDS and del(5q) confirmed by conventional banding methods. Del(5q) was present in the karyotype as an isolated aberration in 31 patients (35,2%), in combination with one other clonal aberration in 9 patients (10,2%), and as part of complex karyotypes in 48 patients (54,6%). Patients with complex karyotypes had a lower overall survival than patients with isolated del(5q). The occurrence of complex karyotypes was associated with a large extent of 5q deletion. When both the occurrence of complex karyotypes and the extent of 5q deletion were considered, only karyotype complexity had a significant effect on patients' overall survival. The extent of the deletion does not affect patients' survival. We cannot exclude the possibility that isolated large 5q deletions put patients at increased risk of clonal evolution and complex karyotypes.

Key words: Myelodysplastic syndromes (MDS), chromosome 5, deletion of 5q, complex karyotypes, chromothripsis, FISH, mFISH/mBAND, aCGH

Obsah

1	Úvod.....	13
2	Přehled literatury	15
2.1	Klinické a laboratorní znaky MDS.....	15
2.2	Klasifikace MDS	16
2.3	Prognostické skórovací systémy.....	17
2.4	Chromosomové aberace u MDS.....	21
2.4.1	Delece 5q.....	23
2.4.2	Vznik komplexních karyotypů	27
2.5	Patogeneze MDS	28
2.5.1	Molekulární patogeneze delece 5q	28
2.5.2	Další vlivy na patogenezi delece 5q	36
2.6	Léčba	37
2.6.1	Lenalidomid	39
2.6.2	Azacytidin	41
3	Cíle práce.....	42
4	Materiál	43
4.1	Soubor pacientů.....	43
4.2	Použité chemikálie a roztoky	43
4.2.1	Chemikálie	43
4.2.2	Roztoky	45
4.3	Ostatní materiál	46
4.3.1	DNA sondy	46
5	Metody	48
5.1	Konvenční cytogenetická analýza	48
5.1.1	Odběr vzorku.....	48
5.1.2	Kultivace buněk a zpracování buněčných kultur.....	48
5.1.3	Barvení preparátů	49

5.1.4	Mikroskopická analýza a sestavení karyotypu	50
5.2	I-FISH.....	50
5.2.1	Princip metody	50
5.2.2	Laboratorní postup	50
5.3	mFISH, mBAND.....	52
5.3.1	Princip metody	52
5.3.2	Laboratorní postup	53
5.4	aCGH.....	54
5.4.1	Princip metody	54
5.4.2	Laboratorní postup	54
5.5	Statistická analýza	56
6	Výsledky.....	57
6.1	Klasická cytogenetická analýza.....	57
6.2	Molekulárně cytogenetická analýza	59
6.2.1	Velikost patologického klonu s del(5q).....	59
6.2.2	Rozsah delece 5q.....	59
6.3	Analýza přežití a současný klinický stav.....	64
7	Diskuze.....	70
8	Závěr.....	77
9	Seznam použité literatury	78
10	Přílohy	93

Seznam zkratek

aCGH	array comparative genomic hybridization	komparativní genomová hybridizace na čípech
ALT	alternative lengthening of telomeres	alternativní prodlužování telomer
AML	acute myeloid leukemia	akutní myeloidní leukémie
APC	APC regulator of Wnt signaling pathway	APC regulátor Wnt signalační dráhy
APC	antigen presenting cell	antigen prezentující buňka
ASCT	allogenic stem cell transplantation	alogenní transplantace kmenových buněk krvetvorby
AZA	azacitidine	azacytidin
BSA	bovine serum albumin	hovězí sérový albumin
CAPN1	calpain 1	calpain 1
CCD	charge-coupled device	zařízení s vázanými náboji
CD28	cluster designation 28	–
Cdc25C	cell division cycle 25C	cyklus buněčného dělení 25C
CDR	commonly deleted region	společná deletovaná oblast
CEP	chromosome enumeration probes	centromerické sondy
CFU/E	colony forming unit-erythroid	kmenová buňka dávající vznik červené krevní řadě
CK1 α	casein kinase 1 alpha	kasein kináza 1 alfa
CMML	chronic myelomonocytic leukemia	chronická myelomonocytární leukémie
CN-LOH	copy neutral loss of heterozygosity	ztráta heterozygosity bez ztráty genetického materiálu
CRBN	cereblon	cereblon
CRL4 ^{CRBN}	E3 ubiquitin ligase CUL4-RBX1-DDB1-CRBN	E3 ubikvitin ligáza CUL4-RBX1-DDB1-CRBN

CRR	commonly retained region	společná zachovaná oblast
CSNK1A1	casein kinase 1 alpha 1	gen pro kasein kinázu 1 alfa
cT8M	constitutional trisomy 8 mosaicism	mozaiková forma konstituční trisomie 8
CTNNA1	catenin alpha 1	katenin alfa 1
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole	4',6-diamidin-2-fenylindol
DIAPH	diaphanous related formin 1	–
EGR1	early growth response 1	časná růstová odpověď 1
EKLF	Krüppel-like factor 1	erytroidní faktor 1 podobný faktoru Krüppel
ESA	erythropoiesis stimulating factors	faktory stimulujících erytropoézu
FAB	French-American-British co-operative group	francouzsko-americko-britsko kooperativní skupina
FISH	fluorescence <i>in situ</i> hybridization	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
FLI1	Fli-1 proto-oncogene, ETS transcription factor	Fli-1 protoonkogen, ETS transkripční faktor
FOXO1	forkhead Box O1 (forkhead homolog in rhabdomyosarcoma)	–
GATA1	GATA 1 binding protein	GATA 1 vazebný faktor
GPR68	G protein-coupled receptor 68	receptor 68 spřažený s G proteinem
HI-RPM	high revolutions per minute	vysoký počet otáček za minutu
HMA	hypomethylating agent	hypometylační faktory
HSC	hematopoietic stem cell	hematopoetická kmenová buňka
HSPA9	heat shock protein family A member 9	protein teplotního šoku rodiny A člen 9
HSPC	hematopoietic stem and progenitor cells	hematopoetické kmenové a progenitorové buňky
I-FISH	interphase FISH	interfázní FISH
IFN- γ	interferon gamma	interferon gamma

IKZF1	IKAROS family zinc finger 1	zinkový prst 1 z IKAROS rodiny
IL-1	interleukin 1	interleukin 1
IL-10	interleukin 10	interleukin 10
IL-12	interleukin 12	interleukin 12
IL-2	interleukin 2	interleukin 2
IL-6	interleukin 6	interleukin 6
IPSS	international prognostic scoring system	mezinárodní prognostický skórovací systém
IPSS-R	international prognostic scoring system - revised	mezinárodní prognostický skórovací systém - revidovaný
IRAK1	interleukin 1 receptor associated kinase 1	kináza 1 asociovaná s receptorem interleukinu 1
IST	immunosuppressive therapy	imunosupresivní terapie
LOH	loss of heterozygosity	ztráta heterozygosity
LSI	locus-specific identifier probes	lokus-specifické sondy
mBAND	multicolor chromosome banding	metoda mnohobarevného pruhování
mDia1	mammalian diaphanous-related formin 1	–
MDM2	mouse double minute 2, human homolog	MDM2 protoonkogen
MDS	myelodysplastic syndromes	myelodysplastické syndromy
MDS-EB	MDS with excess blasts	MDS s přebytkem blastů
MDS-MLD	MDS with multilineage dysplasia	MDS s multilineární dysplázií
MDS-RS	MDS with ring sideroblasts	MDS s prstenčitými sideroblasty
MDS-SLD	MDS with single lineage dysplasia	MDS s unilineární dysplázií
MDS-U	MDS unclassifiable	MDS neklasifikované
MEP	megakaryocyte-erythroid progenitor cell	megakaryo-erytroidní progenitorová buňka

mFISH	multicolor FISH	mnohobarevná FISH
miR-146a	microRNA 146a	mikroRNA 146a
miR145	microRNA 145	mikroRNA 145
miRNA	microRNA	mikroRNA
MPN	myeloproliferative neoplasms	myeloproliferativní neoplázie
mRNA	messenger RNA	mediátorová RNA
NF- κ B	nuclear factor κ B	nukleární faktor κ B
NK	natural killer	přírození zabijáci
NP-40	nonyl phenoxypolyethoxyethanol 40	nonyl fenoxypolyetoxyletanol 40
NPM1	nucleophosmin 1	nukleofosmin 1
OS	overall survival	celkové přežití
PP2A α	protein phosphatase 2 catalytic subunit alpha	katalytická podjednotka alfa protein fosfatázy 2
pre-rRNA	preribosomal RNA	preribozomální RNA
RA	refractory anemia	refrakterní anémie
RAEB	refractory anemia with excess blasts	refrakterní anémie s přebytkem blastů
RAEB-T	refractory anemia with excess blasts in transformation	refrakterní anémie s přebytkem blastů v transformaci
RCC	refractory cytopenia of childhood	dětská refrakterní cytopenie
RCMD	refractory cytopenia with multilineage dysplasia	refrakterní cytopenie s multilineární dysplázií
RCMD-RC	refractory cytopenia with multilineage dysplasia and ring sideroblasts	refrakterní cytopenie s multilineární dysplázií a prstenčitými sideroblasty
ROS	reactive oxygen species	reaktivní formy kyslíku
RPL11	ribosomal protein L11	ribosomální protein L11
RPS14	ribosomal protein S14	ribosomální protein S14

rRNA	ribosomal RNA	ribosomální RNA
S	Svedberg	Svedberg
SLC7A11	solute carrier family 7 member 11	transportní membránový protein rodiny 7 člen 11
SNP	single nucleotide polymorphism	jednonukleotidový polymorfismus
SPARC	secreted protein acidic and cysteine rich	sekretovaný protein, kyselý a bohatý na cystein
TAE	Tris-acetate-EDTA	Tris-acetát-EDTA
TE	Tris-EDTA	Tris-EDTA
TIFAB	TIFA Inhibitor	inhibitor TIFA
TIRAP	TIR domain containing adaptor protein	adaptorový protein obsahující TIR doménu
TLR	Toll like receptor	recetor podobný Toll
TLR 4	Toll like receptor 4	recetor podobný Toll 4
TNF- α	tumor necrosis factor α	tumor nekrotizující faktor α
TP53	tumor protein p53	tumorový protein p53
TRAF6	TNF receptor associated factor 6	faktor 6 asociovaný s TNF receptorem
VEGF	vascular endothelial growth factor	vaskulární endotelový růstový faktor
VEGF-R	vascular endothelial growth factor receptor	receptor pro vaskulární endotelový růstový faktor
Wnt	Wingless/Int-1 signalling	Wingless/Int-1 signalizace

ISCN nomenklatura

del	deletion	delece
der	derivative chromosome	derivovaný chromosom
dup	duplication	duplikace
i	isochromosome	isochromosom
idem	the stemline karyotype in subclones	označení pro původní karyotyp v příbuzných subklonech
inc	incomplete karyotype	nekompletní karyotyp
ins	insertion	inzerce
inv	inversion	inverze
mar	marker chromosome	marker chromosom
p	short arms	krátká ramena
pter	terminal part of short arms	terminální část krátkých ramen
psu	pseudo	pseudo
q	long arms	dlouhá ramena
qter	terminal part of long arms	terminální část dlouhých ramen
r	ring chromosome	kruhový chromosom
t	translocation	translokace

1 Úvod

Myelodysplastické syndromy (MDS) jsou klonální onemocnění krvetvorby, postihující převážně populaci nad 70 let, které až u 30 % pacientů progreduje v akutní myeloidní leukémii (AML). Etiologie ani patogeneze MDS nebyly i přes rozsáhlý výzkum dosud zcela objasněny. Pravděpodobně se jedná o vícestupňový proces, kdy dochází k hromadění genetických a epigenetických změn v hematopoetické kmenové buňce (HSC), které jí poskytují selekční výhodu oproti zdravým buňkám. Tento vývoj můžeme pozorovat v rozdílech mezi časnou a pozdější fází onemocnění. V časně fázi převažuje zvýšená apoptóza krvetvorných buněk na rozdíl od pozdějších stádií, kdy již dochází ke klonální expanzi, tedy ke zvýšené proliferaci a snížené frekvenci apoptózy (Porwit a Saft, 2011; Venugopal *et al.*, 2021; Williamson *et al.*, 1994).

Důležitým ukazatelem vývoje onemocnění jsou získané cytogenetické abnormality v buňkách kostní dřeně, které se vyskytují u asi 50 % pacientů s primárním MDS a až u 80 % pacientů se sekundárním MDS. Nejčastější a prognosticky nejvýznamnější chromosomovou aberací je intersticiální delece dlouhých ramen chromosomu 5, del(5q). Můžeme ji pozorovat jako samostatnou změnu v karyotypu nebo současně s jednou další aberací nebo jako součást komplexních karyotypů. Nález samostatné del(5q) je spojen s dobrou prognózou, zatímco del(5q) zahrnutá v komplexních karyotypech je asociována s vysokým rizikem transformace do akutní myeloidní leukémie (AML) (Greenberg *et al.*, 2012; Haase *et al.*, 2007).

Rozsah del(5q) u jednotlivých pacientů je vysoce variabilní. Rovněž se ukazuje, že deletovaný chromosom 5 je velmi nestabilní a často vstupuje do dalších strukturních či komplexních aberací. U pacientů s agresivními formami MDS kromě toho často dochází k jeho úplnému nebo částečnému rozpadu (chromothripsis). Zatím není úplně jasné, zda velikost delece chromosomu 5 hraje roli v jeho stabilitě a zda má souvislost se vznikem různých fenotypů u MDS pacientů. V odborné literatuře bylo doposud publikováno pouze několik studií, které zkoumaly vliv rozsahu del(5q) na prognózu nemocných s MDS (Jerez *et al.*, 2012; La Starza *et al.*, 2010; Nofrini *et al.*, 2012; Volkert *et al.*, 2014; Zemanova *et al.*, 2018). Autoři popsali možnou souvislost mezi velkým rozsahem delece 5q, výskytem komplexních karyotypů a špatnou prognózou onemocnění. Nicméně informací o souvislosti mezi velikostí del(5q) a prognózou MDS je stále relativně málo a je proto důležité ji dále studovat.

V Centru nádorové cytogenomiky ÚLBD, Všeobecné fakultní nemocnice a 1.LF UK v Praze, se zabýváme klasickou cytogenetickou a molekulárně cytogenetickou analýzou genomu nádorových buněk u pacientů převážně s hematologickými malignitami, včetně nemocných s MDS. Cílem diplomové práce bylo studovat nebalancované aberace chromosomu 5 v diagnostických vzorcích pacientů s různými subtypy MDS, porovnat rozsah deletovaného segmentu ve skupinách nemocných s izolovanou delecí a s komplexními karyotypy a posoudit možný vliv rozsahu del(5q) na celkové přežití a prognózu pacientů s MDS.

2 Přehled literatury

2.1 Klinické a laboratorní znaky MDS

Myelodysplastické syndromy (MDS) jsou heterogenní skupina klonálních onemocnění krvetvorby. Charakteristickým projevem je neefektivní hematopoéza, která vede u většiny pacientů k hypercelulární a dysplastické kostní dřeni a rozvoji cytopenií v periferní krvi. Cytopenie se může projevit jako anémie, trombocytopenie či leukocytopenie nebo jako jejich kombinace. Klinické projevy MDS jsou převážně spjaty s projevy cytopenií. Jedná se zejména o únavu, bledost, dušnost, náchylnost k infekcím, krvácení či podlitiny. Pacienti s MDS mají zvýšené riziko progresu do akutní myeloidní leukémie (AML), k čemuž dochází až u 30 % z nich. Před definicí MDS jako samostatné skupiny onemocnění v roce 1976 bylo toto onemocnění proto také označováno pojmy jako preleukémie či doutnající leukémie (Bennett *et al.*, 1976; Sperling *et al.*, 2017).

MDS postihuje převážně starší lidi, s mediánem věku při diagnóze udávaným mezi 70 a 76 lety (Greenberg *et al.*, 2012; Ma *et al.*, 2007; Schanz *et al.*, 2012; Sekeres *et al.*, 2008). Incidence MDS se pohybuje mezi 2 - 5 případy na 100 000 obyvatel za rok. V populaci osob starších 80 let MDS vzniká u 36 lidí na 100 000 obyvatel. Podle novějších odhadů jsou tato čísla podhodnocená a incidence MDS by se mohla pohybovat až mezi 5,3 a 13,1 případy na 100 000 obyvatel. V populaci lidí starších 65 let by se nový odhad pohyboval mezi 75 a 162 případy na 100 000 obyvatel (Cogle, 2015; Sekeres, 2010).

MDS se obecně častěji vyskytuje u mužů, s výjimkou podkategorie MDS s izolovanou delecí dlouhých ramen chromosomu 5, del(5q), která je naopak častěji diagnostikována u žen. U 90 % pacientů dochází k rozvoji MDS *de novo*. Tyto případy označujeme jako primární MDS a jejich etiologie dosud není přesně známa. Zbývajících 10 % označujeme jako sekundární MDS, které vznikají v důsledku předchozí léčby chemoterapií či radioterapií, především po použití alkylačních látek a inhibitorů topoizomeráz (Bowen, 2013; Ma *et al.*, 2007; Sekeres *et al.*, 2008).

2.2 Klasifikace MDS

Myelodysplastické syndromy byly jako samostatná skupina onemocnění definovány poprvé diagnostickým systémem FAB (French-American-British Co-operative group) představeném v roce 1976. FAB klasifikace je systém založený zejména na hodnocení morfolgie buněk kostní dřeně a periferní krve u pacientů s MDS. Přihlíží se k počtu blastů v kostní dřeni a v periferní krvi a k tomu, jaké buněčné linie jsou dysplastické. Tento systém klasifikace rozeznává pouze dvě kategorie MDS: refrakterní anémii s přebytkem blastů (RAEB) a chronickou myelomonocytární leukémií (CMML) (Bennett *et al.*, 1976). Podoba FAB klasifikace z roku 1982 definuje kategorií již pět: refrakterní anémii (RA), refrakterní anémii s prstenčitými sideroblasty (RARS), refrakterní anémii s přebytkem blastů (RAEB), RAEB v transformaci (RAEB-T) a chronickou myelomonocytární leukémií (CMML) (tab. 1) (Bennett *et al.*, 1982).

Kategorie	Dysplastická linie	Procento blastů v kostní dřeni	Procento blastů v periferní krvi
Refrakterní anémie	Erytroidní	< 5	< 1
Refrakterní anémie s prstenčitými sideroblasty	Erytroidní	< 5	< 1
Refrakterní anémie s přebytkem blastů	2 nebo více	5 - 20	0 - 4
Refrakterní anémie s přebytkem blastů v transformaci	Obvykle 2 nebo více	21 - 30	≥ 5
Chronická myelomonocytární leukémie	≥ 1 x 10 ⁹ /l monocytů	< 20	–

Tab. 1: Subtypy MDS definované FAB diagnostickým systémem z roku 1982. Převzato a upraveno podle Vardiman (2012).

Z FAB systému vychází klasifikace WHO, která byla poprvé představena v roce 2001. V tomto systému se k morfologii buněk přidávají další diagnostická kritéria. Jednou z hlavních změn oproti FAB je snížení procentuální hranice blastů v kostní dřeni nebo v periferní krvi, která slouží k oddělení akutní myeloidní leukémie (AML) od MDS, z 30 % na 20 %. Touto změnou zanikla kategorie RAEB-T. Mezi další důležité změny patří: rozdělení skupiny RAEB na RAEB-1 a RAEB-2, zúžení definice kategorií RA a RARS a s tím spojené přidání nových kategorií refrakterní cytopenie s multilineární dysplázií (RCMD) a refrakterní cytopenie s multilineární dysplázií a prstenčitými sideroblasty (RCMD-RS), přesunutí CMML do skupiny MDS/myeloproliferativní neoplázie (MPN), vytvoření kategorií MDS

neklasifikované (MDS-U) a MDS asociovaných s izolovanou delecí 5q. Tato kategorie je jako jediná definována specifickou cytogenetickou abnormalitou, a to intersticiální delecí dlouhých ramen chromosomu 5 (Vardiman *et al.*, 2002).

V důsledku rychlého nárůstu nových informací vzniklo v roce 2008 revidované vydání WHO klasifikace. Pro přesnější diagnózu MDS pacientů byla zavedena nová kategorie refrakterní cytopenie s unilineární dysplázií (RCUD). Tato skupina kromě původně samostatné kategorie RA zahrnuje i kategorie refrakterní neutropenie (RN) a refrakterní trombocytopenie (RT), které dříve spadaly do MDS-U. Dalším upřesněním bylo zahrnutí kategorie RCMD-RS do kategorie RCMD. Zavedena byla provizorní skupina dětské refrakterní cytopenie (RCC). Důležitou aktualizací bylo zvýšení diagnostického významu cytogenetických nálezů. V případech, kdy morfologie buněk MDS diagnóze nenasvědčuje, ale jsou přítomné cytopenie a specifické cytogenetické změny, může být diagnostikováno MDS (Vardiman *et al.*, 2009).

Aktuální podobou WHO diagnostického systému je revidovaná verze z roku 2016. Hlavní změnou bylo vyjmutí názvů cytopenií spjatých s MDS z názvů jednotlivých kategorií. Dysplastická linie totiž nemusí vždy odpovídat buněčné linii, která je zasažena cytopenií. Nové a aktuální kategorie jsou: MDS s excesem blastů (MDS-EB), MDS s unilineární dysplázií (MDS-SLD), MDS s multilineární dysplázií (MDS-MLD), MDS s prstenčitými sideroblasty (MDS-RS), MDS s izolovanou delecí 5q a MDS neklasifikované (MDS-U). Provizorní skupina RCC zůstává zachována (tab. 2) (Arber *et al.*, 2016).

2.3 Prognostické skórovací systémy

K určení prognózy onemocnění bylo vytvořeno několik různých skórovacích systémů jako například WHO adaptovaný prognostický skórovací systém (WPSS), Düsseldorf či Lille skóre. Nejvíce používaným prognostickým systémem je mezinárodní prognostický skórovací systém (IPSS) a jeho revidovaná podoba (IPSS-R). IPSS byl poprvé představen v roce 1997 (Greenberg *et al.*, 1997) a jeho revidovaná podoba roku 2012 (Greenberg *et al.*, 2012). Revidovaná forma díky novým poznatkům a větší skupině vyšetřených pacientů umožnila upřesnit již známé prognostické faktory a určit význam nově navržených prognostických faktorů (Greenberg *et al.*, 2012).

Kategorie	Dysplastické linie	Cytopenie *	Prstenčité sideroblasty v kostní dřeni	Blasty v kostní dřeni	Blasty v periferní krvi	Cytogenetický nález
MDS s unilineární dysplázií (MDS-SLD)	1	1 - 2 **	< 15 % / < 5 %	> 5 %	> 1 %	Jakýkoliv, pokud nesplňuje kritéria izolované del(5q)
MDS s multilineární dysplázií (MDS-MLD)	2 - 3	1 - 3 **	< 15 % / < 5 %	> 5 %	> 1 %	Jakýkoliv, pokud nesplňuje kritéria izolované del(5q)
MDS s prstenčitými sideroblasty (MDS-RS)						
MDS-RS s unilineární dysplázií (MDS-RS-SLD)	1	1 - 2 **	≥ 15 % / ≥ 5 %	> 5 %	> 1 %	Jakýkoliv, pokud nesplňuje kritéria izolované del(5q)
MDS-RS s multilineární dysplázií (MDS-RS-MLD)	2 - 3	1 - 3 **	≥ 15 % / ≥ 5 %	> 5 %	> 1 %	Jakýkoliv, pokud nesplňuje kritéria izolované del(5q)
MDS s izolovanou delecí 5q	1 - 3	1 - 2	Žádné nebo jakýkoliv	> 5 %	> 1 %	Izolovaná del(5q) nebo s jednou další aberací kromě -7 či del(7q)
MDS s přebytkem blastů (MDS-EB)						
MDS-EB-1	0 - 3	1 - 3	Žádné nebo jakýkoliv	5 - 9 %	2 - 4 %	Jakýkoliv
MDS-EB-2	0 - 3	1 - 3	Žádné nebo jakýkoliv	10 - 19 %	5 - 19 %	Jakýkoliv
MDS, neklasifikované (MDS-U)						
S 1 % blastů v periferní krvi	1 - 3	1 - 3	Žádné nebo jakýkoliv	< 5 %	= 1 %	Jakýkoliv
S unilineární dysplázií	1	3	Žádné nebo jakýkoliv	< 5 %	< 1 %	Jakýkoliv
Podle definující cytogenetické abnormality	0	1 - 3	< 15 %	< 5 %	< 1 %	MDS definující abnormality
Dětská refrakterní cytopenie	1 - 3	1 - 3	Žádný	< 5 %	< 2 %	Jakýkoliv

Tab. 2: Aktuální klasifikace MDS dle WHO diagnostického systému z roku 2016. Převzato a upraveno podle Arber *et al.* (2016).

* Cytopenie jsou definovány hodnotami: hemoglobin < 10 g/dl, krevní destičky < 100 x 10⁹/l, absolutní počet neutrofilů < 1,8 x 10⁹/l; u lehké anémie či trombocytopenie mohou být výjimečně tyto hodnoty vyšší; počet monocytů v periferní krvi musí být < 1 x 10⁹/l

** Pokud je přítomna mutace genu *SF3B1*

IPSS-R na základě míry rizika transformace do AML a mediánu přežití definuje pět prognostických skupin. Podobně jako IPSS stanovuje prognózu na základě cytogenetického vyšetření kostní dřeně, procentuálního počtu blastů v kostní dřeni a procentu cytopenií (Greenberg *et al.*, 1997, 2012). Z každého vyšetření z výše popsaných prognostických kritérií IPSS-R je pacientovi přidělena hodnota rizika dle bodové škály (tab. 3). Na základě jejich součtu se stanoví finální prognóza pacienta (tab. 4) (Greenberg *et al.*, 2012).

Jako signifikantní proměnné ovlivňující délku přežití, ale ne riziko transformace do AML, byly v IPSS-R definovány věk a celkový stav pacienta, hladina sérového feritinu, laktátdehydrogenázy a β 2-mikroglobulinu. Z těchto kritérií má nejvyšší prognostickou váhu věk, kterým se pomocí vzorce upravuje výsledné skóre. Zbylé kategorie jsou statisticky signifikantní, ale v porovnání s výše zmiňovanými prognostickými kritérii mají na prognózu menší vliv (Greenberg *et al.*, 2012; Schanz *et al.*, 2012).

Hodnota rizika	0	0,5	1	1,5	2	3	4
Cytogenetický nález	Velmi dobrý	–	Dobrý	–	Špatný	Velmi špatný	Velmi špatný
Procento blastů v kostní dřeni	≥ 2	–	$> 2 - < 5$	–	5 - 10	> 10	–
Hemoglobin (g/dl)	≥ 10	–	8 - < 10	< 8	–	–	–
Krevní destičky ($\times 10^9/l$)	≥ 100	50 - < 100	< 50	–	–	–	–
Absolutní počet neutrofilů ($\times 10^9/l$)	$\geq 0,8$	$< 0,8$	–	–	–	–	–

Tab. 3: IPSS-R bodová škála pro výsledky z jednotlivých vyšetření rizikových faktorů. Převzato a upraveno podle Greenberg *et al.* (2012).

Kategorie rizika	Rizikové skóre
Velmi nízké	$\leq 1,5$
Nízké	$> 1,5 - 3$
Střední	$> 3 - 4,5$
Vysoké	$> 4,5 - 6$
Velmi vysoké	> 6

Tab. 4: IPSS-R systém pro finální stanovení prognózy na základě součtu bodů z jednotlivých vyšetření rizikových faktorů. Převzato a upraveno podle Greenberg *et al.* (2012).

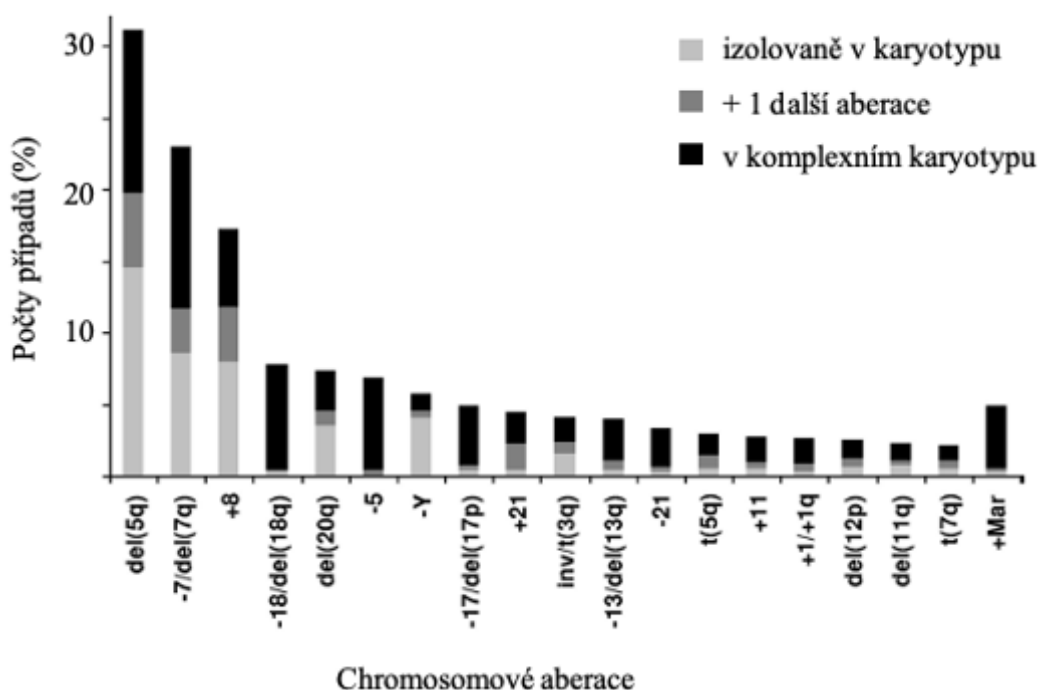
Karyotyp v době stanovení diagnózy je jedním ze základních nálezů nutných ke stanovení finální prognózy dle IPSS-R. IPSS-R na základě cytogenetického nálezu rozlišuje pět skupin: s velmi dobrou, dobrou, střední, špatnou a velmi špatnou prognózou. Mezi nálezy spojené s velmi dobrou prognózou řadíme ztrátu chromosomu Y nebo samostatnou delecí dlouhých ramen chromosomu 11, del(11q). Dobrou prognózu indikuje normální karyotyp, samostatné delecce del(5q), del(12p) a del(20q) nebo del(5q) s jednou další změnou (kromě monosomie chromosomu 7 nebo del(7q)). Střední prognózu mají nemocní s del(7q), trisomií 8, isochromosomem pro dlouhá ramena chromosomu 17, i(17q), a trisomií 19 jako samostatnými změnami v karyotypu a nemocní s jakýmkoliv dalším jedním nebo dvěma nezávislými klony. Špatnou prognózu mají pacienti se samostatnou aberací chromosomu 3, izolovanou monosomií chromosomu 7, se dvěma změnami zahrnujícími monosomii nebo delecí chromosomu 7 a pacienti s komplexním karyotypem se třemi aberacemi. Pacienti s komplexním karyotypem s více než třemi aberacemi jsou řazeni do skupiny s velmi špatnou prognózou (tab. 5) (Greenberg *et al.*, 2012; Schanz *et al.*, 2012).

Prognostická skupina (% pacientů)	Cytogenetické abnormality	Medián přežití v letech
Velmi dobrá (4%)	-Y, del(11q)	5,4
Dobrá (72%)	Normální karyotyp, del(5q), del(12p), del(20q), dvě aberace zahrnující del(5q)	4,8
Střední (13%)	del(7q), +8, +19, i(17q), jakýkoliv další jeden nebo dva nezávislé klony	2,7
Špatná (4%)	-7, inv(3)/t(3q)/del(3q), dvě aberace zahrnující -7/del(7q), komplexní karyotyp s třemi abnormalitami	1,5
Velmi špatná (7%)	Komplexní karyotyp s více než třemi abnormalitami	0,7

Tab. 5: IPSS-R systém pro hodnocení cytogenetických aberací. Převzato a upraveno podle Greenberg *et al.* (2012).

2.4 Chromosomové aberace u MDS

Klonální chromosomové aberace jsou detekovány zhruba u 50 % pacientů s primárním MDS a u 80 % pacientů se sekundárním MDS. Jedná se převážně o nebalancované změny (Haase *et al.*, 2007; Solé *et al.*, 2000). Schanz *et al.* (2012) identifikovali 19 rekurentních cytogenetických abnormalit u MDS pacientů (graf 1). Nejčastější cytogenetickou změnou je intersticiální delece dlouhých ramen chromosomu 5, del(5q), které se podrobněji věnuje následující kapitola (Haase *et al.*, 2007; Jerez *et al.*, 2012; Schanz *et al.*, 2012).



Graf 1.: Frekvence rekurentních aberací u MDS detekovaných samostatně, v kombinaci s jednou další aberací a jako součást komplexního karyotypu. Převzato a upraveno podle Haase *et al.* (2007).

Aberace chromosomu 7, zahrnující monosomii či delecii dlouhých ramen, -7/del(7q), jsou druhou nejčastěji pozorovanou změnou. Zároveň se jedná o nejčastější chromosomovou aberaci u dětské formy MDS. Obecně je její nález spojován se střední prognózou. Monosomie chromosomu 7 je častější a je spojená s horší prognózou než del(7q). Aberace chromosomu 7 se vyskytují přibližně u 10 % *de novo* MDS pacientů a u 50 % pacientů se sekundárním MDS a to buď jako izolované změny, nebo jako součást komplexních karyotypů (Bernasconi *et al.*, 2005; Haase *et al.*, 2007; Hasle, 1994; Hasle *et al.*, 2007; Schanz *et al.*, 2012; Smith *et al.*, 2003).

Další rekurentní aberací je ztráta chromosomu Y, jejíž izolovaný výskyt v karyotypu je spojen s velmi dobrou prognózou. Podle IPSS-R je ztráta chromosomu Y dokonce řazena do lepší prognostické skupiny než normální karyotyp (Greenberg *et al.*, 2012; Nomdedeu *et al.*, 2017; Schanz *et al.*, 2012). Proč tento nález souvisí s lepší prognózou, zatím není objasněno. Ztráta chromosomu Y je spjata i s přirozeným procesem stárnutí a její výskyt stoupá s věkem stejně jako incidence MDS. Proto je obtížné stanovit souvislost mezi ztrátou chromosomu Y a MDS (Stone a Sandberg, 1995; Wiktor *et al.*, 2011).

Poměrně častou změnou je i delece dlouhých ramen chromosomu 20, del(20q). Její výskyt však není omezen pouze na MDS, ale vyskytuje se i u jiných myeloproliferativních onemocnění a AML. Její nález proto sám o sobě nestačí ke stanovení diagnózy MDS. Pokud se del(20q) vyskytuje v karyotypu jako samostatná změna, je tento nález spojován s dobrou prognózou (Braun *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2006; Neukirchen *et al.*, 2017; Ravindran *et al.*, 2020; Schanz *et al.*, 2012).

Nejčastější cytogenetický nález spojený se získáním genetického materiálu je izolovaná trisomie chromosomu 8, kterou pozorujeme asi u 10 % MDS pacientů s abnormálním karyotypem. Jedná se o nález spojený se střední prognózou a pozdější fází onemocnění (Greenberg *et al.*, 2012; Schanz *et al.*, 2011). U hematopoetických buněk s trisomií chromosomu 8 byla pozorována zvýšená exprese anti-apoptotických genů, čímž tento patologický klon získává selekční výhodu oproti zdravým buňkám (Sloand *et al.*, 2007). Podle některých autorů se mozaiková forma trisomie chromosomu 8 může vzácně vyskytovat u zdravých lidí jako vrozená aberace (cT8M). Podle Maserati *et al.* (2002) představuje cT8M asi 15-20 % případů hematologických neoplastických a dysplastických onemocnění s prokázanou trisomií chromosomu 8. Novější studie však ukazují, že je trisomie chromosomu 8 převážně získanou změnou (Saumell *et al.*, 2015).

Mezi další méně časté chromosomové aberace patří delece dlouhých ramen chromosomu 11, delece krátkých ramen chromosomu 12, isochromosom pro dlouhá ramena chromosomu 17, trisomie chromosomu 19 či různé aberace zahrnující chromosom 3. Velmi vzácně pozorujeme také trisomii či ztrátu chromosomu 21, trisomii chromosomu 11 nebo ztrátu chromosomu X (Haase *et al.*, 2007; Schanz *et al.*, 2012).

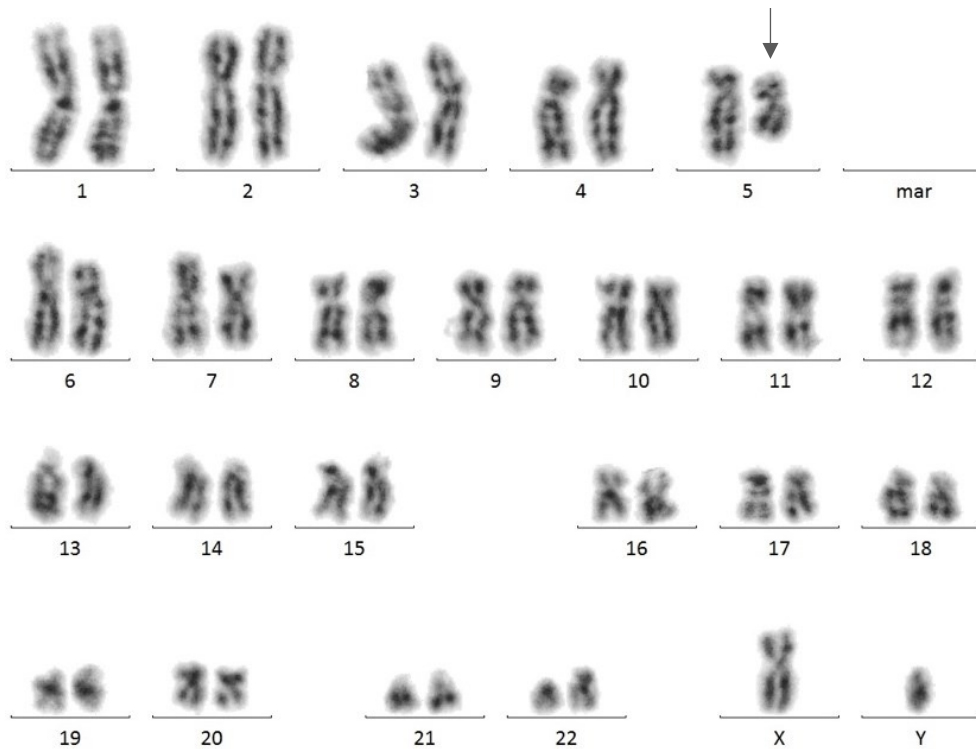
2.4.1 Delece 5q

Intersticiální delece dlouhých ramen chromosomu 5, del(5q), je nejčastější chromosomovou aberací u nemocných s MDS. Tato aberace se vyskytuje u 15 % všech MDS pacientů a u 30 % pacientů s abnormálním karyotypem (Haase *et al.*, 2007; Jerez *et al.*, 2012). V karyotypu se může vyskytovat jako samostatná změna (obr. 1) nebo v kombinaci s dalšími aberacemi (obr. 2, 3). Nález samostatné del(5q) nebo del(5q) spojené s jednou další změnou (mimo monosomii chromosomu 7 nebo del(7q)) je podle WHO 2016 definován jako MDS s izolovanou delecí 5q a je spojován s dobrou prognózou. Nález delece 5q zahrnuté do komplexního karyotypu je spojován s prognózou špatnou (Arber *et al.*, 2016; Greenberg *et al.*, 2012; Schanz *et al.*, 2012).

MDS s izolovanou del(5q) se vyskytuje v 5 % všech MDS případů. Dříve se pro typický soubor klinických projevů spjatých s izolovanou del(5q) používalo také označení 5q- syndrom. Mezi klinické projevy izolované del(5q) v periferní krvi patří vážná makrocytární anémie, kvůli které pacienti musí pravidelně podstupovat transfuzi červených krvinek. Hladina krevních destiček je normální či zvýšená a pozorujeme žádné nebo méně než 1 % blastů. V kostní dřeni je normální či zvýšená hladina megakaryocytů, jejichž jádra jsou však nelobulizovaná a pozorujeme méně než 5 % blastů (Schanz *et al.*, 2012; Vardiman *et al.*, 2009).

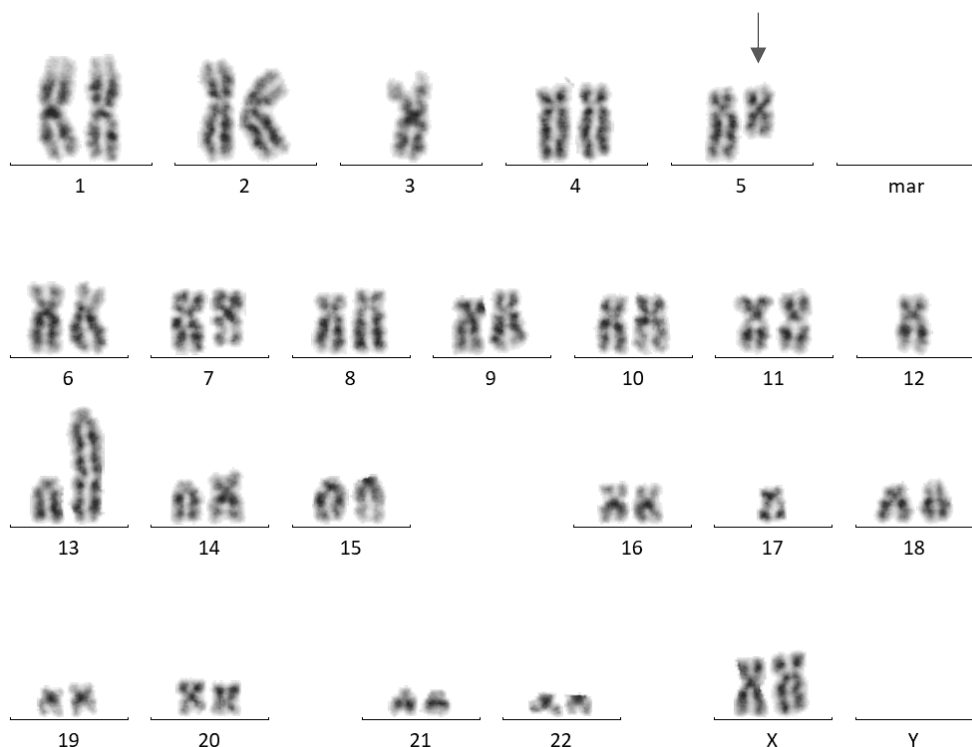
Nález izolované del(5q) je spojován s dobrou prognózou. Oproti jiným subtypům MDS, kdy k transformaci do AML dochází přibližně u 30 % pacientů, u pacientů s izolovanou del(5q) je tomu pouze v 10 % případů (Boulton *et al.*, 2010; Giagounidis *et al.*, 2004; Sperling *et al.*, 2017). Pacienti s izolovanou del(5q) velmi dobře odpovídají na léčbu lenalidomidem, která u velké části z nich vede k nezávislosti na transfuzích červených krvinek. K tomu dochází u 2/3 pacientů a polovina dosahuje kompletní cytogenetické remise (List *et al.*, 2006).

Del(5q) však můžeme nacházet i v kombinaci s dalšími chromosomovými aberacemi. V komplexních karyotypech (tři a více klonálních změn) je del(5q) nejčastěji pozorovanou aberací, která se může vyskytovat až v 95 % případů. Tito pacienti mají o poznání horší prognózu než pacienti s izolovanou del(5q) s vysokou pravděpodobností transformace do AML (Schanz *et al.*, 2012; Sole *et al.*, 2005; Zemanova *et al.*, 2014).

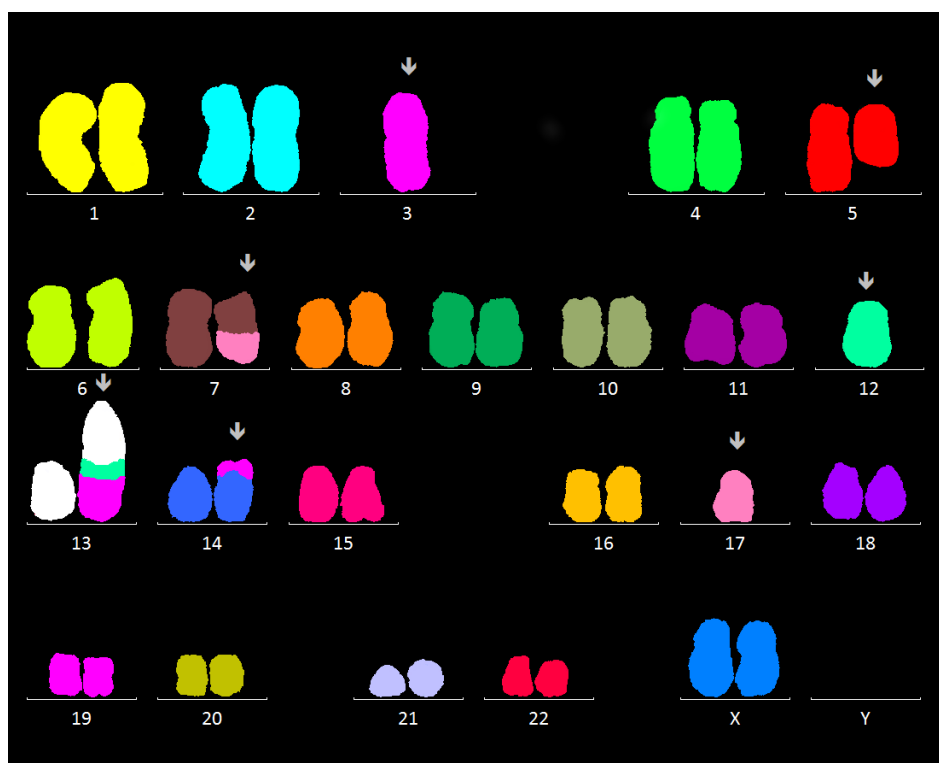


Obr. 1: Izolovaná del(5q) v karyotypu muže na preparátu obarveném metodou konvenčního G-pruhování. Převzato z databáze Centra nádorové cytogenomiky ÚLBLD, VFN a 1.LF UK.

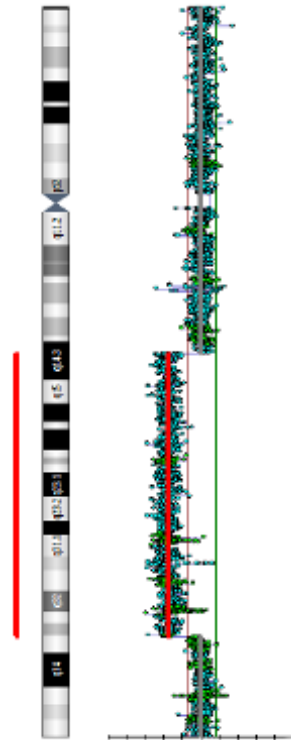
Velmi špatnou prognózu mají pacienti s komplexním karyotypem, u kterých chromosom 5 vstupuje do dalších nebalancovaných přestaveb (inzerce či translokace). Dříve byla u pacientů s MDS popisována monosomie chromosomu 5, která byla spojována s velmi špatnou prognózou. Nové studie založené na využití moderních cytogenomických technik, jako je mnohobarevná FISH (mFISH) nebo komparativní genomová hybridizace na čípech (aCGH) (obr. 4), však prokázaly, že se ve všech případech s předpokládanou monosomií 5 ve skutečnosti jedná o nebalancované přestavby deletovaného chromosomu 5. U pacientů s MDS zůstává část materiálu z chromosomu 5 vždy zachována a v rámci komplexních přestaveb je přemístěna na jiné místo v genomu. Monosomie chromosomu 5 tedy u MDS pacientů jako rekurentní změna neexistuje. Špatná prognóza popisovaná u těchto nemocných souvisí zejména s komplexitou karyotypu. Tento nález je vždy spojen s delecí proximální CDR v pruhu 5q31 (Galván *et al.*, 2010; Herry *et al.*, 2007; Jerez *et al.*, 2012; Zemanova *et al.*, 2014).



Obr. 2: Del(5q) v komplexním karyotypu ženy s MDS detekovaný metodou konvenčního G-pruhování. Převzato z databáze Centra nádorové cytogenomiky ÚLBLD, VFN a I.LF UK.



Obr. 3: Karyotyp ženy s MDS a del(5q) v komplexním karyotypu analyzovaný metodou mFISH. Na základě výsledku mFISH byl karyotyp popsán jako: 43,XX,-3,del(5)(q14.1q33.3), der(7)t(7;17)(q?21;q?11.3),-12,der(13)t(12;13)(?;q34)t(3;12)(?q13;?),der(14)t(3;14)(?;p11.2),-17. Převzato z databáze Centra nádorové cytogenomiky ÚLBLD, VFN a I.LF UK.



Obr. 4: Delece 5q v oblasti 5q14.3-5q33.3 analyzovaná metodou aCGH (SurePrint G3 Cancer CGH+SNP 4x180K, Agilent). Převzato a upraveno podle Zemanova *et al.* (2018).

Na dlouhých ramenu chromosomu 5 byly identifikovány dvě společné deletované oblasti, CDR (commonly deleted region): proximální a distální. Distální CDR je lokalizována v oblasti 5q32-33 a bývá označována jako CDR 1 (Boulwood *et al.*, 1994, 2002). Proximální CDR se nachází v oblasti 5q31 a je označována jako CDR 2 (Horrigan *et al.*, 2000; Lai *et al.*, 2001; Le Beau *et al.*, 1993). Delece distální CDR je spojována s nízkým rizikem pro pacienta. Jedná se o oblast o velikosti 1,5 megabáze, která obsahuje 40 kandidátních genů zapojených v patogenezi MDS s izolovanou del(5q). Obsahuje geny minimálně nutné pro rozvoj projevů MDS (Boulwood *et al.*, 2002). Delece proximální CDR je spojována s pozdějšími fázemi MDS a AML a obecně s vyšším rizikem než delece distální CDR. V této oblasti bylo identifikováno 18 kandidátních genů zapojených v patogenezi delece oblasti 5q31. U převážné většiny pacientů jsou však deletovány obě oblasti (Lai *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 1997).

Na dlouhých ramenu chromosomu 5 byla snaha definovat kromě CDR i společné zachované oblasti, tzv. CRR (commonly retained regions). Jerez *et al.* (2012) u pacientů s 5q- syndromem definovali tyto oblasti dvě: CRR 1 tvořící úsek od centromery k pruhu 5q14.2 a CRR 2 tvořící úsek od pruhu 5q34 k telomeře. CRR u pacientů s del(5q) v komplexních karyotypech byla popsána v oblasti 5p11.1-p14.2 (Zemanova *et al.*, 2014).

Význam práce Jerez *et al.* (2012) spočívá zejména v pozorování vlivu rozsahu delecce 5q na rozvoj komplexních karyotypů. Rozsáhlejší delecce 5q byla asociována s výskytem dalších aberací a horší prognózou. La Starza *et al.* (2010) pozorovali stejnou spojitost u pacientů s haploinsuficiencí genu *NPM1* (v oblasti 5q35). Dle Jerez *et al.* (2012) by se tedy jednalo o delecce oblasti CRR 2. U pacientů s delecí alespoň jedné CRR byla také popsána souvislost s mutací genu *TP53*. Souvislost mezi rozsahem delecce 5q, rozvojem komplexních karyotypů a špatnou prognózou popsali i další autoři (Nofrini *et al.*, 2012; Zemanova *et al.*, 2018). Jiní však korelaci mezi rozsahem del(5q) a mediánem přežití nepotvrdili (Giagounidis *et al.*, 2004; Mallo *et al.*, 2011).

Důvodem horší prognózy u pacientů s rozsáhlou delecí může být buď zvýšená genetická nestabilita v důsledku ztráty velkého množství genetického materiálu nebo delecce genů v postižených oblastech. Vliv zvýšené genetické nestability je podpořen asociací delecce 5q velkého rozsahu s výskytem komplexních karyotypů, klonální evolucí a mutací genu *TP53* (Hosono *et al.*, 2016; Jädersten *et al.*, 2011; Jerez *et al.*, 2012; La Starza *et al.*, 2010; Volkert *et al.*, 2014; Zemanova *et al.*, 2014).

2.4.2 Vznik komplexních karyotypů

Za komplexní karyotyp je považován současný nález tří a více klonálních chromosomových aberací. Komplexní karyotypy se vyskytují zhruba u 10 % MDS pacientů a souvisí s vyšším rizikem transformace do AML (Haase *et al.*, 2007; Jasek *et al.*, 2010). Komplexní karyotypy mohou vznikat dvěma procesy: klonální evolucí nebo v důsledku jevu označovaného jako chromotripsis (Feurstein *et al.*, 2018).

V průběhu klonální evoluce dochází k postupné akumulaci genetických změn v nádorových buňkách (Nowell, 1976). Klonální vývoj probíhá dvěma možnými způsoby: lineárně či divergentně. Při lineární klonální evoluci dochází k zisku nových aberací, čímž vzniká nový klon, který původní klony postupně přeroste a stává se dominantním. Při divergentním klonálním vývoji dochází díky rychlé akumulaci genetických aberací k současnému rozvoji několika příbuzných klonů, které vychází z jednoho původního klonu. V důsledku klonální heterogenity se zvyšuje pravděpodobnost, že se některý z takto vzniklých klonů stane rezistentním vůči zvolené léčbě a následně dojde k relapsu onemocnění (Brychtová *et al.*, 2018).

U nemocných s MDS byl pozorován jak lineární, tak divergentní klonální vývoj (da Silva-Coelho *et al.*, 2017). Klonální evoluce u MDS pacientů je sama o sobě spojena s kratší dobou přežití a rychlejší progresí do AML (Bernasconi *et al.*, 2010; Neukirchen *et al.*, 2017). Druhým mechanismem, který vede ke vzniku komplexních karyotypů, je chromotripsis. Jedná se o proces, při kterém dojde během jediné katastrofické události k rozpadu a následným chaotickým chybným opravám jednoho nebo více chromosomů nebo jejich částí. V důsledku chromotripsis dochází k mnohonásobným delecím a/nebo amplifikacím v zasažených oblastech a vznikají vysoce přestavěné marker chromosomy (Stephens *et al.*, 2011).

U pacientů s izolovanou del(5q) se klonální evoluce uplatňuje zhruba v 10 % případů a častěji u nich dochází k postupné akumulaci dalších aberací v rámci lineárního vývoje než procesem chromotripsis. U pacientů s delecí 5q a jednou další klonální aberací dochází k oběma procesům s podobnou frekvencí. Častými nově získanými změnami v průběhu klonální evoluce jsou zejména trisomie chromosomů 21 a 8. V případě chromotripsis jsou nejčastěji detekovány aberace zahrnující chromosom 7 a dále delece krátkých ramen chromosomu 17, kde se nachází gen *TP53* (Feurstein *et al.*, 2018; Zemanova *et al.*, 2014, Zemanova *et al.*, 2017).

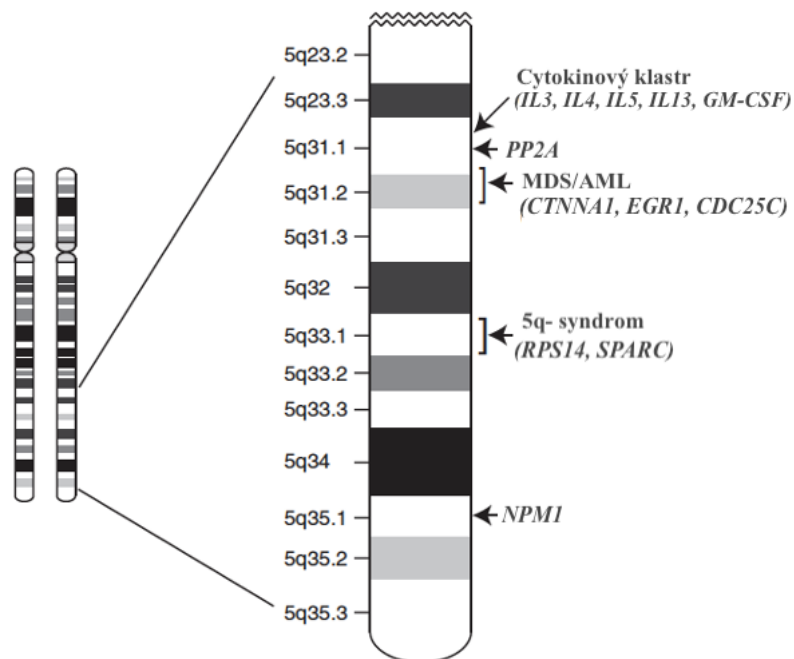
2.5 Patogeneze MDS

Patogeneze MDS doposud není zcela objasněna. Předpokládá se, že podobně jako u jiných nádorových onemocnění, je pacient nositelem ancestrální mutace a v průběhu života u něj následně dojde ke kumulaci dalších mutací, čímž dochází k rozvoji onemocnění. Přesná posloupnost získaných aberací v klonální evoluci MDS však zatím není zcela známa. Rekurentní změny jako je del(5q) napovídají, že se nejedná o náhodné události, ale že tyto aberace reflektují vývoj onemocnění. Některé práce považují del(5q) za primární změnu (Acha *et al.*, 2021; Nilsson *et al.*, 2007; Woll *et al.*, 2014). Jiné práce naopak za primární označují mutaci *TP53* nebo další driver mutace, po kterých posléze dochází ke vzniku del(5q) (Hosono *et al.*, 2016; Mossner *et al.*, 2016).

2.5.1 Molekulární patogeneze delece 5q

U pacientů s del(5q) většinou nebývá mutována druhá alela genů lokalizovaných v deletované oblasti. Pravděpodobně se však mohou uplatňovat epigenetické modifikace těchto alel vedoucí k dalšímu snížení exprese daných genů. Patogeneze del(5q) zřejmě spočívá zejména v haploinsuficienci genů nacházejících se v deletované oblasti na 5q (obr. 5).

Mezi geny nacházejícími se v společné deletované oblasti 5q doposud nebyl identifikován žádný, jehož delece by způsobila celý rozsah pozorovaných klinických projevů u MDS pacientů. Proto se na fenotypu MDS zřejmě uplatňuje haploinsuficience více genů v této oblasti. Dále se na projevu MDS uplatňují faktory jako další cytogenetické aberace, somatické mutace, mikroprostředí kostní dřeně, imunitní systém či délka telomer (Ebert, 2011; Hwang *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2018; Ye *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 1997).



Obr. 5: Schéma umístění hlavních genů uplatňujících se v molekulární patogenezi delece dlouhých ramen chromosomu 5 u myelodysplastických syndromů. Převzato a upraveno podle Ebert (2009).

2.5.1.1 *RPS14*

Za makrocytární anémii, typickou pro pacienty s del(5q), je pravděpodobně zodpovědná zejména delece genu *RPS14*, který se nachází v distální CDR na dlouhých ramenou chromosomu 5 (obr. 5). Protein *RPS14* je složkou 40S ribozomální podjednotky. Při snížení množství proteinu *RPS14* pomocí RNA interference dochází k nahromadění 30S pre-rRNA prekurzoru a ke snížení množství 18S/18SE rRNA. *RPS14* se tedy zřejmě uplatňuje v úpravách pre-rRNA. Tento defekt v biogenezi ribozomů vede ke snížené diferenciaci erytroidní linie, zvýšenému počtu nezralých erytroidních buněk a zvýšené frekvenci apoptózy diferencujících se erytroidních buněk (Ebert *et al.*, 2008).

Narušená biogeneze ribozomů vede k jejich nedostatku a ke zpomalení translace. Tím je zpomalená mimo jiné produkce globinu, což vede k poměrnému zvýšení množství hemu oproti množství globinu v časných protoerytroblastech a CFU/E buňkách. Nedostatkem globinu vzniká volný hem, který je toxický. Jeho toxicita spočívá ve Fentonově reakci, kdy atom železa hemu reaguje s peroxidem vodíku za vzniku hydroxylového radikálu - typu reaktivních forem kyslíku (ROS). Ty ve zvýšené koncentraci mohou poškozovat proteiny, lipidy i nukleové kyseliny, což následně vede ke smrti buňky (Auten a Davis, 2009; Chiabrando *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2016).

Defekt v biogenezi ribozomů dále vede ke zvýšení hladiny proteinu RPL11, který se váže na MDM2, negativní regulátor proteinu p53. Tím způsobená akumulace proteinu p53 vede k zastavení buněčného cyklu a zvýšené frekvenci apoptózy. Tímto mechanismem jsou ovlivněny primárně progenitorové erytroidní buňky, což v konečné fázi vede k makrocytární anémii (obr. 6) (Dutt *et al.*, 2011; Fumagalli *et al.*, 2009).

Propojení mezi těmito dvěma mechanismy spočívá v tom, že protein p53 reprimuje transkripci *SLC7A11*, genu pro cystein-glutamátový antiporter, což ve výsledku vede ke snížení syntézy glutationu – proteinu odstraňujícího ROS. Snížené množství glutationu vede ke zvýšené senzitivě buněk k ferroptóze – typu buněčné smrti způsobené peroxidací lipidů v důsledku zvýšené koncentrace ROS (Dixon *et al.*, 2012; Jiang *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2020). Role zvýšeného množství hemu navíc není pouze v produkci ROS, ale i v represi *SLC7A11*, což umocní výše popsaný mechanismus (Yang *et al.*, 2016). Yang *et al.* (2016) prokázali, že snížením syntézy hemu navozením nedostatku železa nebo zvýšením transportu hemu z buňky, byla erythropoéza obnovena.

Při delecí *RPS14* byla pozorována deregulace vrozené imunitní signalizace projevující se zvýšenou hladinou proteinů S100a9 a S100a8. Jedná se o endogenní aktivátory Toll-like receptoru 4 (TLR4), který mimo jiné aktivuje NF-κB signalizaci vedoucí k produkci prozánětlivých cytokinů. Protein S100a8 se navíc účastní pozitivní regulace p53, jehož zvýšené hladiny v erytroidní linii vedou ke zvýšené apoptóze a vzniku anémie (Kawai a Akira, 2007; Schneider *et al.*, 2016).

Mei *et al.* (2018) pozorovali u myši s knockoutem genů pro miR-146a a mDia1, které se nacházejí v oblasti 5q, neefektivní erythropoézu a na věku závislou anémii. U těchto myši se stárnutím dochází v mikroprostředí kostní dřeně ke zvýšené sekreci prozánětlivých

cytokinů interleukinu 6 (IL-6) a tumor nekrotizujícího faktoru α (TNF- α). IL-6 způsobuje nárůst ROS a následnou apoptózu prostřednictvím kaspázy 3. TNF- α vede k degradaci transkripčního faktoru GATA1, který je nutný pro správnou erythropoézu. Se zvyšujícím se věkem tak v důsledku narušeného mikroprostředí kostní dřeně nedochází k efektivní erythropoéze (Mei *et al.*, 2018).

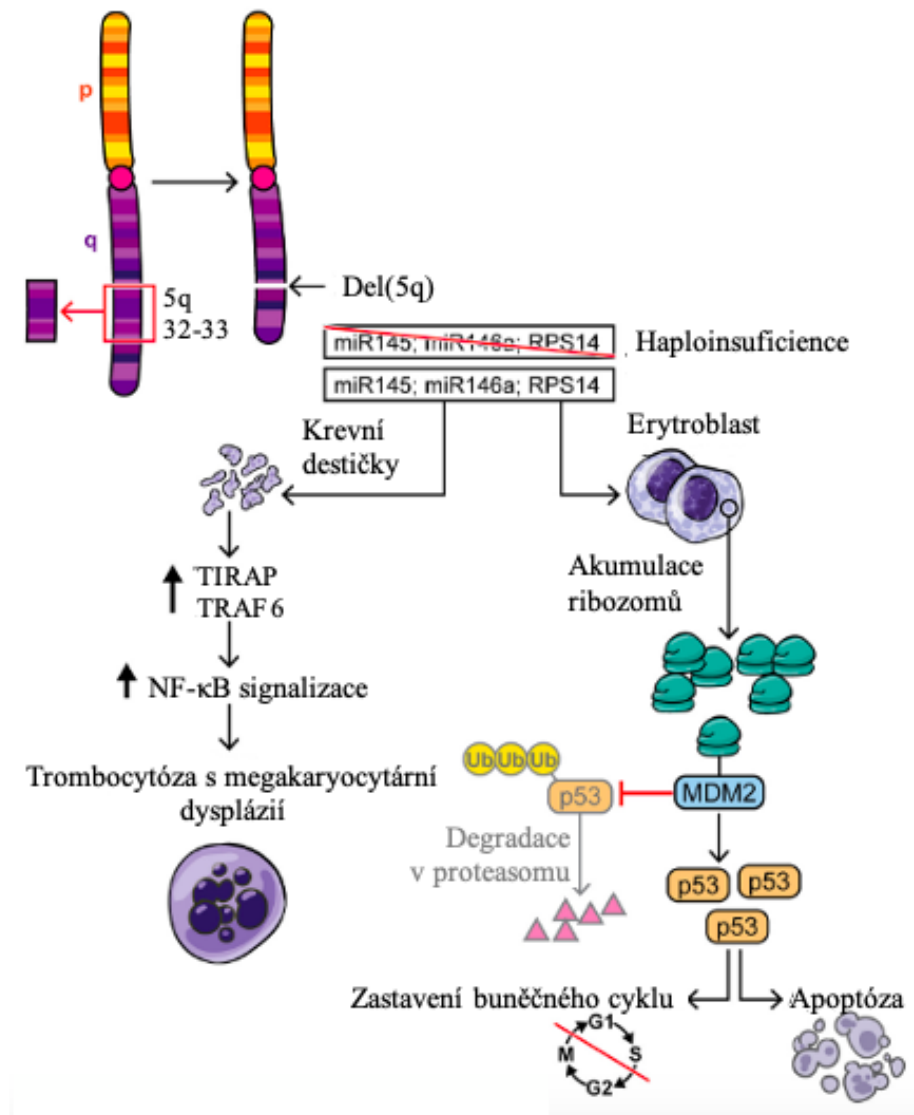
2.5.1.2 *miRNA-145 a miRNA-146a*

Haploinsuficience *RPS14* však kromě anémie nevysvětluje další charakteristické rysy izolované del(5q), jako trombocytózu, megakaryocytární dysplázii, neutropenii či klonální dominanci klonu s del(5q). MikroRNA (miRNA) jsou krátké nekódující RNA, které snižují translaci svých cílových mRNA (Mott a Mohr, 2015). Při delecí 5q dochází ke zdatelnému snížení exprese dvou miRNA: miR145 a miR146a. Jako cíle těchto miRNA byly rozeznány signální molekuly TIRAP a TRAF6, které jsou součástí signalizace pomocí receptorů TLR. Jejich hladiny byly v buňkách kostní dřeně MDS pacientů oproti kontrolám zvýšené. Zvýšená byla i hladina mRNA IL-6 (Starczynowski *et al.*, 2010). IL-6 stimuluje proliferaci megakaryocytů a tvorbu krevních destiček (Kishimoto, 2005). Starczynowski *et al.* (2010) potvrdili, že snížením miR145 a miR146a dochází díky zvýšenému množství TRAF6 ke zvýšení hladiny IL-6, čímž dochází k deregulaci tvorby krevních destiček a megakaryocytů. Při knockdownu *miR145* a *miR146a* či při zvýšení exprese jejich cílových proteinů byla v myších hematopoetických kmenových a progenitorových buňkách (HSPC) opravdu pozorována trombocytóza, megakaryocytární dysplázie i variabilní neutropenie (obr. 6) (Starczynowski *et al.*, 2010).

Jako další cíl miR146a byla určena kináza IRAK1, jejíž hladiny jsou podobně jako TRAF6 u MDS pacientů zvýšené. IRAK1 a TRAF6 spolu interagují, což mimo jiné vede k aktivaci NF- κ B signalizace a k produkci prozánětlivých cytokinů. To spolu s výše popsaným zvýšením hladiny IL-6 ukazuje na možný vliv deregulace vrozené imunitní signalizace na patogenezi MDS (Conze *et al.*, 2008; Rhyasen *et al.*, 2013; Taganov *et al.*, 2006).

Mezi geny nacházejícími se na dlouhých ramenou chromosomu 5 lze pozorovat i epistatické interakce. Delece *miR146a* je u 80 % MDS pacientů přítomna současně s delecí genu *TIFAB*. TIFAB je protein snižující stabilitu TRAF6 (Varney *et al.*, 2015). Myši s knockoutem těchto genů vykazovaly vyšší míru exprese *TRAF6* než myši se samostatným knockoutem *miR146a* nebo *TIFAB*. U těchto myši byl také pozorován rychlejší nástup leukopenie a častěji u nich

docházelo k selhání kostní dřeně. To naznačuje kooperaci miR146a a TIFAB na snižování exprese *TRAF6* (Varney *et al.*, 2017). Myši s knockoutem *TIFAB* vykazovaly vyšší citlivost k signalizaci přes TLR4. To dále ukazuje na vliv deregulace vrozené imunitní signalizace na patogenezi MDS (Varney *et al.*, 2015).



Obr. 6: Schéma molekulární patogeneze delece distální CDR na dlouhých ramenou chromosomu 5. Převzato a upraveno podle Venugopal *et al.* (2021).

Jako další cíl miR145 byl identifikován transkripční faktor Fli1 (Kumar *et al.*, 2011). Megakaryo-erytroidní progenitorová buňka (MEP) je oligopotentní buňka, ze které se diferencují pod vlivem transkripčního faktoru Fli1 megakaryocyty nebo pod vlivem transkripčního faktoru EKLf erytrocyty (Perry a Soreq, 2002). Neuwirtová *et al.* (2013) prokázali, že u pacientů s 5q- syndromem jsou zvýšené hladiny Fli1 mRNA. To by mohlo vést

k posunutí diferenciace MEP směrem k megakaryocytům, což by vysvětlovalo i normální či zvýšenou hladinu krevních destiček u pacientů s izolovanou del(5q). Mimo regulaci pomocí miR145 je exprese *Fli1* dále zvýšena díky IL-6, který je, jak je popsáno výše, deregulovaný delecí *miR146a* (Hodge *et al.*, 2002). Třetím mechanismem zvýšení exprese *Fli1* je pozitivní zpětná smyčka (Svenson *et al.*, 2010).

Vysoké množství *Fli1* poskytuje jedno z možných vysvětlení pro to, proč protein p53 vyvolává apoptózu pouze u erytroidních buněk. *Fli1* vazbou na promotor genu kódujícího MDM2 zvyšuje jeho expresi, čímž nepřímo snižuje množství p53, a to pouze v megakaryocytických buňkách. V erytroidních buňkách je množství p53 zvýšené a tím způsobená vysoká míra apoptózy vede ke vzniku anémie (Truong *et al.*, 2005).

2.5.1.3 *CSNK1A1*

U pacientů s 5q- syndromem byla pozorována snížená exprese *CSNK1A1* genu, který se nachází v distální CDR chromosomu 5. Dále byla zaznamenána s tím spojená deregulace Wnt signalizace (Boulwood *et al.*, 2007). Wnt signalizace se podílí na regulaci mnoha procesů, důležitou roli má zejména v regulaci buněčné proliferace. *CSNK1A1* je tumor supresorový gen, kódující kasein kinázu 1 α (CK1 α), která se účastní kanonické Wnt signalizace. CK1 α je důležitou součástí komplexu degradujícího β -katenin. Tím zabraňuje jeho přesunu do jádra, kde β -katenin reguluje transkripci cílových genů (MacDonald *et al.*, 2009).

Již dříve bylo prokázáno, že kináza CK1 α je negativním regulátorem proteinu p53 (Huart *et al.*, 2009). Homozygotní ztráta *CSNK1A1* vede v důsledku akumulace p53 k rychlé smrti buněk a k selhání kostní dřeně. Schneider *et al.* (2014) na myších modelech ukázali, že haploinsuficience *CSNK1A1* vede k akumulaci β -kateninu a následnému zvýšení množství a funkci HSC, a umožňuje tedy jejich expanzi. Heterozygotní ztráta *CSNK1A1* vedoucí k haploinsuficenci by tudíž mohla být klíčem k vysvětlení klonální dominance del(5q) (Schneider *et al.*, 2014). Podobné nálezy u myši s homozygotní nebo heterozygotní delecí *APC*, genu kódujícího další složku komplexu degradujícího β -katenin, potvrzují vliv deregulované Wnt signalizace na patogenezi del(5q) (Luis *et al.*, 2011; Qian *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2010).

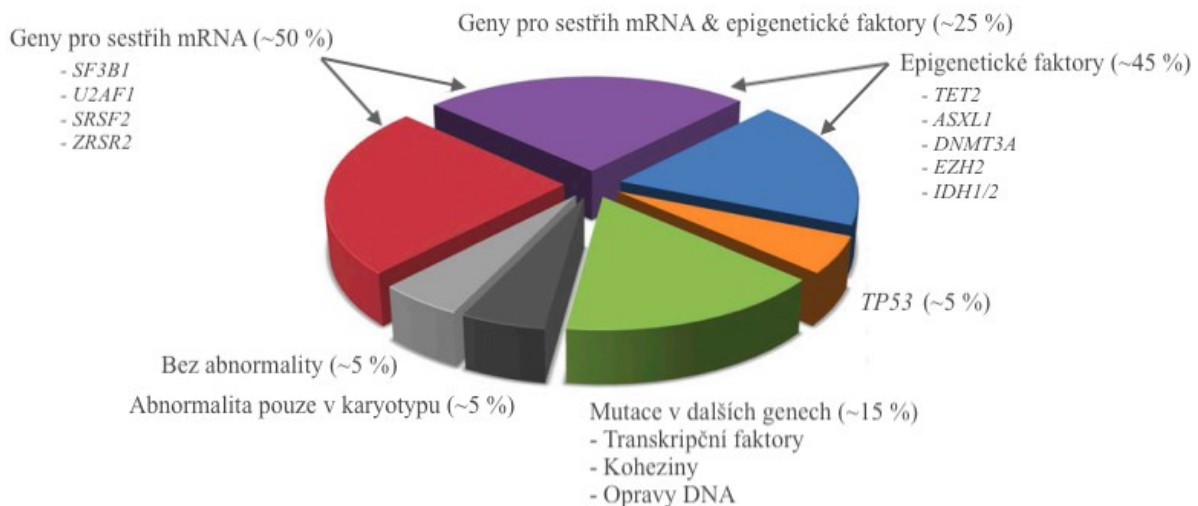
Li *et al.* (2017) prokázali, že heterozygotní delece genu pro β -katenin u myši s haploinsuficiencí *APC* vedla k obnovení správné hematopoézy a zabránila expanzi buněk s delecí *APC*. Při snížení množství β -kateninu v lidských primárních buňkách kostní dřeně s del(5q) došlo

k jejich snížené proliferaci a sníženému přežívání. Tato data naznačují, že by to mohl být právě β -katenin, který je složkou Wnt signalizace zodpovědnou za získání klonální dominance buněk s del(5q) a jejich obnovu. Snížení jeho množství by mohlo být potenciálně velmi dobrou variantou léčby pacientů s del(5q) (Li *et al.*, 2017).

Uvedený přehled se zabývá hlavními geny důležitými pro patogenezi del(5q), na níž se však dále podílí celá řada dalších genů jako např. *EGR1*, *SPARC*, *DIAPH*, *Cdc25C*, *PP2Ac α* , *NPM1*, *CTNNA1* či *HSPA9* (Grisendi *et al.*, 2005; Joslin *et al.*, 2007; Keerthivasan *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2017, 2007; Pellagatti *et al.*, 2007; Wei *et al.*, 2009).

2.5.1.4 Mutace genů lokalizovaných mimo známé CDR

U 80-90 % pacientů s MDS byla detekována ≥ 1 známá rekurentní mutace spojená s MDS (Haferlach *et al.*, 2014; Papaemmanuil *et al.*, 2013). Nejčastěji se jedná o geny pro opravy DNA, DNA metylaci, modifikace chromatinu, signální transdukce, transkripční faktory a RNA splicing (graf 2). Některé mutace se spolu vyskytují ve vyšší či nižší frekvenci, než by odpovídalo jejich náhodné kombinaci. Například mutace v genech pro RNA splicing se spolu zpravidla nevyskytují (Aleshin a Greenberg, 2018).



Graf 2: Zastoupení mutací a genetických změn u pacientů s myelodysplastickými syndromy. Převzato a upraveno podle Bejar a Steensma (2014).

Jedním z nejčastěji mutovaných genů u MDS, a u nádorových onemocnění obecně, je *TP53*. *TP53* je gen kódující protein p53 nacházející se na krátkých ramenou chromosomu 17.

Jedná se o známý tumor supresorový gen. Za fyziologických podmínek se jako transkripční faktor účastní mnoha biologických procesů jako jsou opravy DNA, regulace buněčného cyklu, apoptóza či senescence. Reaguje na poškození DNA a díky této roli je také přezdíván jako strážce genomu (Benchimol *et al.*, 1985; Hafner *et al.*, 2019).

K inaktivaci genu *TP53* je zapotřebí poškození jeho obou alel. Jedná se o tzv. Knudsonovu teorii dvou zásahů. První zásah spočívá v mutaci tumor supresorového genu, přičemž se může jednat o mutaci vrozenou (germinální) či nově vzniklou (somatickou). Druhým zásahem může být buď delece nebo ztráta heterozygotity (LOH) alely druhé (Knudson, 1971; Lipsick, 2020).

U MDS pacientů s mutací *TP53* byla asi v 1/3 případů pozorována mutace pouze jedné alely (monoalelická mutace) a ve 2/3 případů byly inaktivované alely obě. Poškození obou alel *TP53* je spojeno s špatnou prognózou, vysokým rizikem transformace do AML a nižším mediánem přežití. Zároveň tito pacienti hůře odpovídají na léčbu lenalidomidem. U nemocných s monoalelickou mutací nebyl ve srovnání s pacienty s oběma funkčními alelami pozorován rozdíl v přežití, frekvenci progresí do AML ani v reakci na léčbu. U těchto pacientů je však zvýšená pravděpodobnost vzniku bialelické inaktivace v důsledku poškození druhé alely (Bejar *et al.*, 2011; Bernard *et al.*, 2020; Jädersten *et al.*, 2011; Kulasekararaj *et al.*, 2013; Mallo *et al.*, 2013; Saft *et al.*, 2014).

Poškození obou alel *TP53* je aberací pozorovanou převážně v dominantním klonu a s menším počtem dalších somatických mutací. Oproti tomu monoalelická mutace je často doprovázena dalšími mutacemi a vyskytuje se zejména v subklonech (Bernard *et al.*, 2020).

K inaktivaci obou alel *TP53* může docházet několika různými mechanismy. U pacientů s MDS a komplexními karyotypy s del(5q) se mutace *TP53* často vyskytuje spolu s delecí krátkých ramen chromosomu 17, na nichž se gen pro *TP53* nachází. Společně se vyskytují zhruba v 70 % případů. V takovém případě se tedy jedná o kombinaci mutace jedné alely a delece alely druhé. Tento případ byl pozorován u 22 % pacientů s primárním MDS (Bernard *et al.*, 2020; Jasek *et al.*, 2010; Sebaa *et al.*, 2012).

Dále můžeme pozorovat homozygotní mutaci genu *TP53* bez zjevné aberace krátkých ramen chromosomu 17. Tyto případy jsou vysvětlovány mechanismem získané CN-LOH (copy number neutral loss of heterozygosity). V takovém případě nejčastěji dochází k delecí wild-type alely a k následné duplikaci mutované alely, čímž vzniká homozygotní mutace. V tomto případě tedy nedochází ke ztrátě kopie genu. Tímto způsobem dochází k bialelické

inaktivaci u 21 % MDS pacientů (Bernard *et al.*, 2020; Christiansen *et al.*, 2001; Jasek *et al.*, 2010; Svobodova *et al.*, 2016). Třetím dokumentovaným způsobem jsou odlišné mutace obou alel *TP53*, bez delece či LOH. Tento způsob byl pozorován u 24 % MDS pacientů (Bernard *et al.*, 2020).

Kromě samotné mutace hraje významnou roli i její frekvence. Hodnota cut-off, kdy je pozorován rozdíl v přežití pacientů s MDS s mutací *TP53* a bez ní, byla stanovena na 6 %. Pod tuto hodnotu je klon s mutací *TP53* relativně stabilní (Belickova *et al.*, 2016; Jädersten *et al.*, 2011; Sallman *et al.*, 2016).

U MDS se mutace *TP53* vyskytuje zhruba u 10 % pacientů. Mutace *TP53* jsou spojovány s vysoce rizikovými MDS a sekundárními AML s komplexními karyotypy (Fidler *et al.*, 2004; Milosevic *et al.*, 2012; Sebaa *et al.*, 2012). U pacientů s komplexními karyotypy a s mutací *TP53* byla pozorována doba přežití zhruba o polovinu kratší než u pacientů s komplexními karyotypy a nemutovaným *TP53* (Haase *et al.*, 2019). Několik studií však dokázalo, že mutace *TP53* jsou časté i u skupiny pacientů s MDS s nízkým rizikem (Bejar *et al.*, 2011; Belickova *et al.*, 2016; Jädersten *et al.*, 2011; Kulasekararaj *et al.*, 2013; Scharenberg *et al.*, 2017).

Nejčastěji se mutace *TP53* vyskytují u pacientů s del(5q). Kulasekararaj *et al.* (2013) ji pozoroval u 19 % pacientů s izolovanou del(5q) a Belickova *et al.* (2016) u 24 % pacientů s MDS s nízkým rizikem a del(5q). V komplexních karyotypech obsahujících del(5q) byla mutace pozorována u 72 % pacientů (Kulasekararaj *et al.*, 2013). Důvod častého výskytu mutace *TP53* spolu s del(5q) není zcela objasněn, nicméně protein p53 je klíčovým hráčem v molekulární patogenezi del(5q). V případě delece distální CDR, dochází k deleci genu *RPS14*, jeho haploinsuficience způsobuje akumulaci p53 v erytroidní linii. Tím způsobená vysoká frekvence apoptózy vede k anémii. Inhibicí p53 se podařilo obnovit správnou hematopoézu (Barlow *et al.*, 2010; Dutt *et al.*, 2011). Jelikož jsou mutace *TP53* u MDS pacientů spojeny s horší prognózou a odpovědí na léčbu, je jejich včasná detekce zásadní.

2.5.2 Další vlivy na patogenezi delece 5q

S patogenezí MDS je spojována například i délka telomer a mikroprostředí kostní dřeně. Telomery jsou u MDS pacientů výrazně kratší než u zdravých lidí. Zkracování telomer vede ke zvýšené genomové nestabilitě, vzniku komplexních karyotypů a zvýšenému riziku

transformace do AML. Výjimku tvoří pacienti s monosomií chromosomu 7, kteří mají telomery oproti zdravým lidem naopak delší (Hwang *et al.*, 2016; Lange *et al.*, 2010). Autoři předpokládají, že klon s monosomií chromosomu 7 mohl získat mutaci aktivující telomerázu či alternativní prodlužování telomer (ALT). Horší medián přežití byl stanoven u pacientů s více než 80 % buněk se zkrácenými telomerami. Délka telomer navíc u pacientů s del(5q) souvisí s vážností cytopenií a délkou trvání onemocnění. Mohlo by se tak jednat o další signifikantní prognostický faktor (Beier *et al.*, 2015; Hwang *et al.*, 2016; Lange *et al.*, 2010; Siegllová *et al.*, 2004).

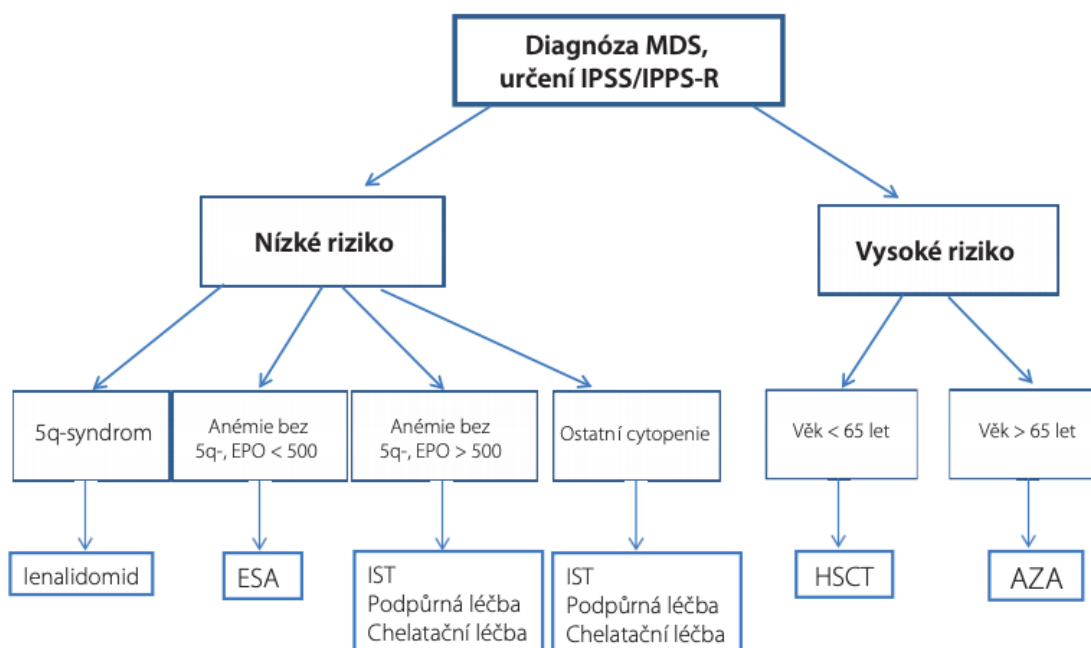
Mikroprostředí kostní dřeně je tvořeno řadou buněk podporujících správnou obnovu a diferenciaci HSC. Patří sem například osteoblasty, osteocyty, endoteliální a perivaskulární buňky (Galán-Díez *et al.*, 2018). Při cíleném poškození osteoprogenitorové buňky u myši docházelo k projevům odpovídajícím MDS u lidí včetně transformace do leukémie. U zdravých myši s transplantovanými HSC z této mutované linie se MDS neprojevovalo. Autoři proto vyvodili, že první změna vedoucí k rozvoji MDS by se mohla odehrávat právě v mikroprostředí kostní dřeně (Raaijmakers *et al.*, 2010). Následující studie potvrdily, že mutací genu pro β -katenin v osteoblastech, která vede k jeho zvýšenému množství, dochází k rozvoji MDS s rychlou progresí do AML. Zároveň byly pozorovány i rekurentní chromosomové aberace. Zvýšením β -kateninu dochází skrze jeho interakci s transkripčním faktorem FOXO1 ke zvýšení exprese genu *Jagged-1*, jehož produkt je ligandem receptoru Notch. Tím dochází ke zvýšení Notch signalizace v HSC progenitorové buňce a klonální expanzi (Kode *et al.*, 2014, 2016). Jiné studie svědčí spíše pro to, že poškozená HSC reprogramuje své okolní prostředí k sekreci cytokinů a dalších molekul, které jí umožní expanzi na úkor zdravých buněk (Medyouf *et al.*, 2014). Nicméně je možné, že se v různých případech uplatňuje jeden nebo druhý z těchto procesů.

2.6 Léčba

Doposud jediným způsobem vyléčení MDS zůstává alogenní transplantace kmenových buněk krvetvorby (ASCT). Další způsoby terapie cílí na zmírnění projevů cytopenií, zvýšení kvality života a oddálení progresse onemocnění. Výběr terapie se odvíjí od rizika onemocnění stanoveného dle IPSS-R. Pacienti s nižším rizikem jsou nejčastěji léčeni pomocí faktorů stimulujících erythropoézu (ESA) a imunomodulační terapií lenalidomidem, který účinkuje hlavně u pacientů s del(5q) (Platzbecker, 2019; Steensma, 2018). K léčbě trombocytopenie

se taktéž využívají růstové faktory. V případě nízké odpovědi na lenalidomid či růstové faktory se přistupuje k léčbě hypometylačními faktory (HMA) nebo imunosupresivní terapii (IST). Pacienti s vyšším rizikem se dělí dle toho, zda jsou vhodnými kandidáty pro ASCT, či nikoliv. Pacienti, kteří nejsou vhodnými kandidáty, jsou primárně léčeni HMA (obr. 7) (Platzbecker, 2019; Steensma, 2018).

Pacientům ve všech stupních rizika je nasazována podpůrná léčba. Běžnou strategií pro snížení symptomů spjatých s anémií a trombocytopenií jsou transfuze červených krvinek a krevních destiček. S dlouhodobými transfuzemi červených krvinek je spojeno riziko zvýšené akumulace železa, v jehož důsledku dochází k tvorbě nadměrného množství ROS, které může vést k poškození orgánů. V některých případech se proto dále nasazuje chelatační léčba. V neposlední řadě se využívá antibiotické a antimykotické léčby k zabránění bakteriálním a plísňovým infekcím (Platzbecker, 2019; Steensma, 2018).



Obr. 7: Postup volby vhodné léčby nemocných s myelodysplastickými syndromy. EPO = endogenní erytropoetin, ESA = erytropoézu stimuluující faktory, IST = imunosupresivní léčba, HSCT = alogenní transplantace krvetvorných kmenových buněk, AZA = azacytidin. Převzato z Bělohlávková (2021).

2.6.1 Lenalidomid

Jednou ze základních možností léčby pro pacienty s MDS s del(5q) v nižších rizikových kategoriích je léčba imunomodulační látkou lenalidomidem. Tato léčba vede k nezávislosti na transfuzích červených krvinek u 2/3 pacientů a až u poloviny ke kompletní cytogenetické remisi (List *et al.*, 2006). Skupina Jonášová *et al.* (2018) zaznamenala nezávislost na transfuzích červených krvinek v odpovědi na léčbu lenalidomidem dokonce u 90 % pacientů. Kromě pacientů s del(5q) v nižších rizikových kategoriích byl pozitivní efekt lenalidomidu pozorován i u pacientů v nižších rizikových kategoriích bez del(5q) a u pacientů ve vyšších rizikových kategoriích s del(5q) (Adès *et al.*, 2009; Santini *et al.*, 2016).

Lenalidomid byl schválen jako vhodná léčba již v roce 2005, přesný mechanismus jeho účinku však dlouho poté nebyl zcela znám. Specifický účinek lenalidomidu na klon s del(5q) spočívá v inhibici fosfatázy PP2A α a Cdc25C, které regulují G2M kontrolní bod. PP2A α defosforyluje Cdc25C, což umožňuje vstup buňky do mitosy. Geny pro PP2A α i Cdc25C se nachází v proximální CDR a u pacientů s del(5q) jsou tedy haplodeficientní. V důsledku haploinsuficience PP2A α a Cdc25C lenalidomid způsobí zastavení buněčného cyklu a následnou apoptózu pouze v buňkách s del(5q), zatímco u buněk bez del(5q) k apoptóze nedochází. Účinek lenalidomidu je tedy závislý na efektu genové dávky, čímž je zapříčiněná cílená apoptóza buněk s del(5q). Při snížení exprese PP2A α a Cdc25C mechanismem RNA interference u buněk bez del(5q) dochází ke zvýšení citlivosti na lenalidomid (Margolis *et al.*, 2006; Wei *et al.*, 2009).

Wei *et al.* (2013) ukázali, že lenalidomid dále stabilizuje MDM2. V důsledku inhibice PP2A α dochází k hyperfosforylaci serinových zbytků 166 a 186 na MDM2. Na MDM2 se potom neváží ribozomální proteiny, které v případě del(5q) způsobují jeho následnou degradaci. Takto dochází k obnovení degradace p53 a následnému obnovení erythropoézy (Wei *et al.*, 2013).

Přílišná exprese PP2A α naopak vede k rezistenci na léčbu lenalidomidem. V důsledku toho byla u pacientů rezistentních vůči léčbě lenalidomidem pozorována i zvýšená hladina p53. Jeho cílenou supresí byla obnovena správná hematopoéza a pacienti na lenalidomid začali odpovídat (Caceres *et al.*, 2013; Wei *et al.*, 2013).

Třetím principem účinku lenalidomidu je indukce ubikvitinaci kinázy CK1 α . Lenalidomid se váže na protein CRBN, který slouží jako adaptorový protein E3 ubikvitin ligázy CRL4^{CRBN}, a tak mění substrátovou specifitu CRL4^{CRBN}. CRL4^{CRBN} ubikvitinuje kinázu CK1 α , což vede k její degradaci v proteasomu. Snížené množství CK1 α negativně ovlivňuje buňky s del(5q), u nichž je množství CK1 α v důsledku delece již snižené, přičemž normální buňky zůstávají nepoškozeny. V důsledku sníženého množství CK1 α dochází ke zvýšení hladiny p53, zastavení buněčného cyklu a apoptóze pouze u buněk s del(5q) (Krönke *et al.*, 2015).

Stejným mechanismem dochází ke snížení hladiny proteinu IKZF1. V důsledku jeho sníženého množství dochází ke zvýšení exprese genu pro receptor GPR68, který se uplatňuje v metabolismu vápníku. Jeho zvýšená exprese vede ke zvýšení množství vápníku v cytosolu a následné aktivaci proteázy CAPN1, což umožní apoptózu. Specifická senzitivita k takto indukované apoptóze klonu s del(5q) je zřejmě způsobena delecí genu pro inhibitor proteázy CAPN1, který se v oblasti del(5q) nachází (Fang *et al.*, 2016; Krönke *et al.*, 2015).

Zatímco buňky s del(5q) na zvýšené množství vápníku odpovídají apoptózou, u T buněk toto zvýšení vede ke zvýšení jejich aktivity (Trebak a Kinet, 2019). Aktivace imunitního systému je klíčová pro rozeznání a eliminaci nádorových buněk. Dalším mechanismem účinku lenalidomidu je tudíž stimulace T buněk. Kromě interakce mezi antigenem na antigen prezentujících buňkách (APC) s receptorem na T buňkách je zapotřebí interakce mezi molekulou B7 na APC a receptorem CD28 na T buňkách (Schildberg *et al.*, 2016). Lenalidomid způsobuje fosforylaci tyrosinu CD28, což posílí signalizaci skrze tento receptor. To vede ke zvýšení sekrece interferonu- γ (IFN- γ) a interleukinu 2 (IL-2). Zvýšená sekrece IFN- γ a IL-2 způsobí zvýšenou proliferaci T buněk a zvýšenou aktivitu NK buněk (Corral *et al.*, 1999; Görgün *et al.*, 2010; LeBlanc *et al.*, 2004).

Lenalidomid navíc inhibuje sekreci prozánětlivých cytokinů IL-6, TNF- α , IL-1, IL-12 a indukuje sekreci protizánětlivých cytokinů jako IL-10 (Corral *et al.*, 1999). Jeho účinek by tak navrch mohl spočívat i v korekci patologického mikroprostředí kostní dřeně.

V neposlední řadě jsou další důležitou charakteristikou lenalidomidu jeho antiangiogenní účinky. U pacientů s MDS je, stejně jako u jiných nádorových onemocnění, neoangiogeneze zvýšená. K tvorbě krevních cév je zapotřebí faktoru VEGF, jehož množství je u pacientů s MDS zvýšené (Aguayo *et al.*, 2000), stejně jako množství jeho receptoru VEGF-R

(Cortelezzi *et al.*, 2005; Kotla *et al.*, 2009). Po léčbě lenalidomidem byla u pacientů s MDS pozorována snížená vaskularita v kostní dřeni, která značí pokles v angiogenezi. Toto snížení nicméně nespočívalo ve snížení exprese VEGF či VEGF-R a účinek lenalidomidu se zřejmě týká složek signální kaskády nacházejících se downstream od VEGF (Dredge *et al.*, 2005; Lu *et al.*, 2009).

2.6.2 Azacytidin

Primární léčbou pro MDS pacienty s vysokým rizikem, kteří nejsou vhodnými kandidáty pro ASCT, jsou HMA. V ČR se jedná zejména o azacytidin (AZA), který na rozdíl od lenalidomidu účinkuje stejně na klony s různými cytogenetickými aberacemi a komplexními karyotypy. Mechanismus účinku léčby azacytidinem není doposud zcela objasněn, což ztěžuje určení specifických znaků u pacientů, kteří na léčbu budou odpovídat. Azacytidin má nicméně pleiotropní funkci a mimo hypometylačních účinků má i imunomodulační efekt (Bontkes *et al.*, 2012; Cervinek, 2015; Steensma, 2018).

Na léčbu azacytidinem odpovídá pouze zhruba polovina pacientů. U těchto nemocných byl pozorován prodloužený medián přežití z 15 na 24 měsíců. Jedná se však o léčbu s přechodným účinkem, jelikož azacytidin neodstraní patologickou hematopoetickou buňku. Neodvratitelně tak nastává relaps onemocnění a medián efektu léčby se pohybuje okolo jednoho roku. Relaps znamená špatnou prognózu, s mediánem přežití pouze 6 měsíců. Ve vývoji je však několik nových léčiv, jako guadecitabin, stejně jako nové kombinace již existujících léčiv (Bewersdorf a Zeidan, 2020; Saygin a Carraway, 2021).

3 Cíle práce

Hlavním cílem diplomové práce bylo studovat vliv rozsahu delecce dlouhých ramen chromosomu 5 na prognózu pacientů s myelodysplastickými syndromy. Analýza probíhala pomocí metod klasické a molekulární cytogenetiky.

Specifické cíle:

- S využitím kombinace cytogenomických metod studovat nebalancované aberace chromosomu 5 v diagnostických vzorcích u pacientů s myelodysplastickými syndromy.
- Porovnat rozsah deletovaného segmentu ve skupinách nemocných s izolovanou delecí a s komplexními karyotypy.
- Posoudit vliv rozsahu del(5q) na prognózu pacientů s myelodysplastickými syndromy.

4 Materiál

4.1 Soubor pacientů

Od 1. 10. 2018 do 28. 2. 2021 jsme v Centru nádorové cytogenomiky Ústavu lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky, Všeobecné fakultní nemocnice a 1.LF UK v Praze a cytogenetické laboratoři Ústavu hematologie a krevní transfuze vyšetřili 88 vzorků kostní dřeně nově diagnostikovaných pacientů s $\text{del}(5q)$ detekovanou metodou konvenčního G-pruhování. Jednalo se o 56 žen (63,6 %) a 32 mužů (36,4 %) s mediánem věku v době stanovení diagnózy 75 let (rozmezí 42 až 95,4 let) (příloha 1). U 79 pacientů (89,8 %) bylo diagnostikováno primární MDS nebo AML se změnami typickými pro MDS (MDS-related changes), devět pacientů (10,2 %) mělo sekundárním MDS.

Vzorky kostní dřeně všech pacientů jsme vyšetřili klasickou cytogenetickou analýzou a delecí oblasti 5q31 a velikost patologického klonu jsme následně ověřili metodou interfázní fluorescenční *in situ* hybridizace (I-FISH). Komplexní karyotypy jsme analyzovali metodou mnohobarevné FISH (mFISH). K přesnému určení zlomových míst na přestavěných chromosomech a rozsahu delece 5q jsme použili metodu mnohobarevného pruhování s vysokým rozlišením (mBAND). U vybraných nemocných jsme rozsah delece upřesnili metodou komparativní genomové hybridizace na mikročipech (aCGH).

4.2 Použité chemikálie a roztoky

4.2.1 Chemikálie

Odběr, kultivace a zpracování vzorků kostní dřeně:

- Heparin
- PBS
- MarrowGrow medium
- Kolcemid
- 0,075 M KCl
- dH_2O
- Metanol
- Kyselina octová

Barvení preparátů:

- 0,2 N HCl
- 2 x SSC
- Wrightovo barvivo
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
- KH_2PO_4
- dH_2O

I-FISH:

- 20 x SSC
- EtOH absolutní
- dH_2O
- Rubbercement
- Antifade/DAPI
- NP-40
- Imerzní olej

mFISH, mBAND:

- 20 x SSC
- EtOH absolutní
- dH_2O
- Rubbercement
- NaOH
- Antifade/DAPI
- Tween 20
- Imerzní olej

aCGH/SNP:

- 1 x PBS
- Proteináza K
- AL pufr
- EtOH absolutní
- AW1 pufr
- AW2 pufr
- AE pufr
- Agaróza
- 1 x TAE pufr
- GelRed
- GeneRuler DNA Ladder
- Nanášecí pufr
- dH_2O

- ddH₂O
- Referenční genomová DNA
- 10 x reakční pufr (pro restrikční enzymy)
- BSA
- Alu I
- RSA I
- Random primer
- 5 x reakční pufr (pro značící polymerázu)
- dNTP
- Cy-3
- Cy-5
- Exo-Klenowův fragment
- TE pufr
- Cot-1 DNA
- 10 x CGH blokující agent
- HI-RPM hybridizačního pufru

4.2.2 Roztoky

- Odběrové médium (400 ml PBS; 4,8 ml heparinu)
- Fixační roztok (metanol a kyselina octová, v poměru 3:1)
- Hypotonický roztok (0,075M KCl: 2,796 g KCl; 500 ml redestilované H₂O)
- Roztok A (5,34 g Na₂HPO₄ · 2 H₂O; 500 ml redestilované H₂O)
- Roztok B (4,05 g KH₂PO₄; 500 ml redestilované H₂O)
- Sörensovův pufr (roztok A a roztok B, v poměru 1:1)
- Barvicí roztok (2,5 g Wrightova barviva; 1000 ml methanolu)
- 70% EtOH (700 ml EtOH; 300 ml redestilované H₂O)
- 85% EtOH (850 ml EtOH; 150 ml redestilované H₂O)
- 96% EtOH (960 ml EtOH; 40 ml redestilované H₂O)
- 0,1 x SSC (2,5 ml 20 x SSC; 497,5 ml redestilované H₂O)
- 0,4 x SSC (10 ml 20 x SSC; 490 ml redestilované H₂O)
- 2 x SSC (50 ml 20 x SSC; 450 ml redestilované H₂O)
- 0,4 x SSC/0,3% NP-40 (10 ml 20 x SSC; 488,5 ml redestilované H₂O; 1,5 ml NP-40)
- 2 x SSC/0,1% NP-40 (50 ml 20 x SSC; 449,5 ml redestilované H₂O; 0,5 ml NP-40)
- 2 x SSC/0,05% Tween 20 (50 ml 20 x SSC; 449,75 ml redestilované H₂O; 0,25 ml Tween 20)
- 0,07 M NaOH (1,4 g NaOH; 500 ml redestilované H₂O)
- 1% agarózový gel (0,9 g agarózy, 90 ml 1 x TAE pufru, 9 µl GelRed)

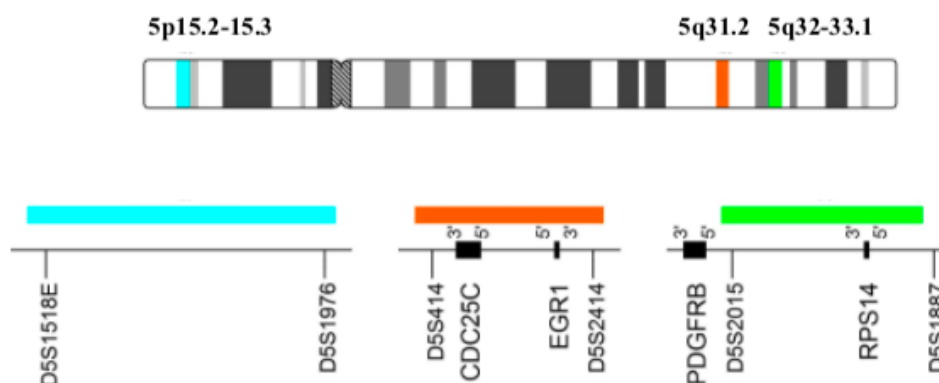
4.3 Ostatní materiál

4.3.1 DNA sondy

Pro detekci nejčastějších a prognosticky nejvýznamnějších aberací u MDS metodou I-FISH jsme použili panel lokus-specifických (LSI) a centromerických (CEP) DNA sond od firem Abbott (USA) a MetaSystems (Německo) (tab. 6, obr. 8).

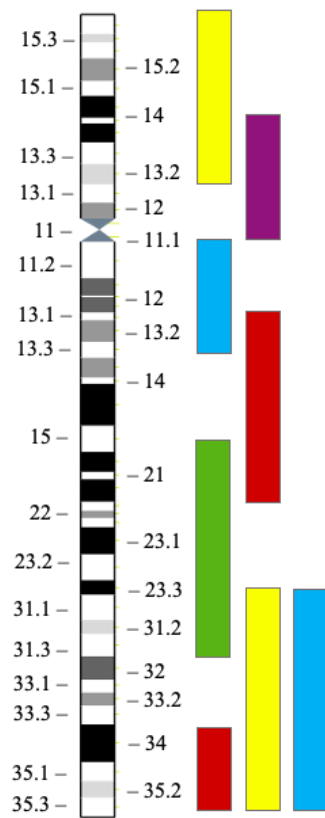
Název DNA sondy	Cílová oblast	Výrobce
XL 5q31/5q33/5p15	5q31, 5q33, 5p15	MetaSystems
XL del(20q) plus	20q12-13.1	MetaSystems
Vysis LSI D7S486 SpectrumOrange/ CEP 7 Spectrum Green	7q31, centromera chromosomu 7	Abbott
Vysis CEP 8 SpectrumOrange	Centromera chromosomu 8	Abbott
Vysis CEP 9 SpectrumGreen	Centromera chromosomu 9	Abbott

Tab. 6: Přehled DNA sond zahrnutých v MDS panelu.



Obr. 8: Schéma lokus-specifické fluorescenční sondy XL 5q31/5q33/5p15 (MetaSystems). Převzato a upraveno podle <https://metasystems-probes.com/en/probes/xl/d-5081-100-tc/>.

Pro analýzu rozsahu del(5q) metodou mBAND jsme použili DNA sondu XCyte 5 od firmy MetaSystems (obr. 9). Pro analýzu komplexních karyotypů metodou mFISH jsme použili DNA sondu 24XCyte (MetaSystems).



Obr. 9: Schéma sondy mBAND pro chromosom 5.

5 Metody

5.1 Konvenční cytogenetická analýza

Konvenční cytogenetická analýza buněk kostní dřeně je jedním ze základních laboratorních vyšetření při stanovení diagnózy MDS. Vyšetření karyotypu slouží ke stanovení diagnózy, upřesnění prognózy, určení klonality a k včasnému záchytu relapsu onemocnění.

5.1.1 Odběr vzorku

Vzorky kostní dřeně byly odebírány do speciálních uzavíratelných odběrových zkumavek s odběrovým médiem, které obsahovalo PBS a heparin. Pro analýzu je potřeba minimálně 1 ml kostní dřeně. Vzorky jsme centrifugovali 5 minut při 2000 rpm. Tím se oddělily leukocyty do samostatné vrstvy, kterou jsme ve sterilním boxu odebrali do předem připravené zkumavky s 5 ml kultivačního média.

5.1.2 Kultivace buněk a zpracování buněčných kultur

Buňky kostní dřeně jsme kultivovali v kultivačním médiu po dobu 24 hodin v termostatu s 5% CO₂ při teplotě 37 °C. Po kultivaci jsme buněčné dělení zastavili tak, že jsme ke vzorkům přidali 100 µl kolcemidu. Kolcemid je vřetenkový jed, který narušuje dělicí vřeténko, čímž zastavuje buněčné dělení ve stádiu metafáze.

Následně jsme kulturu převedli do centrifugačních zkumavek a vložili do sklízecího automatu HANABI-PII Plus Metaphase Chromosome Harvester (ADS Biotec, USA). Hladiny ve zkumavkách jsme dorovnali kultivačním médiem do maximálního objemu 6 ml. V automatu probíhala kultivace s kolcemidem po dobu 1 hodiny. Následně probíhala centrifugace a po odsátí supernatantu bylo k sedimentu přidáno 5 ml hypotonického roztoku (0,075M KCl). Inkubace probíhala po dobu 20 minut. Působením hypotonického roztoku došlo ke zvětšení objemu buněk a ke ztenčení a následnému popraskání buněčných membrán, čímž se uvolnil genetický materiál. Po další centrifugaci bylo k sedimentu přidáno 5 ml směsi hypotonického a fixačního roztoku (metanol a kyselina octová v poměru 3:1). Inkubace probíhala 5 minut a po ní následovala další centrifugace, odsátí supernatantu a opětovné přidání 5 ml fixačního roztoku na dobu 5 minut. Proces fixace a následné

centrifugace byl opakován celkem pětkrát pro úplné odmytí zbytků membrán, cytoplazmy a hemoglobinu. Takto zpracované buněčné kultury jsme uchovávali v lednici do dalšího dne v teplotním rozmezí 4-7 °C.

Následující den jsme vzorky opět centrifugovali 5 minut při 2000 rpm, odebrali větší část supernatantu a zbytek jsme promíchali s peletou. Vzorky jsme doplnili fixačním roztokem - přidané množství se řídilo buněčností suspenze. Výsledkem byla suspenze opaleskující barvy. Suspenzi jsme nakapali na podložní skla pomocí přístroje HANABI PVI Metaphase Spreader (ADS Biotec). Ten zajišťuje optimální a stále podmínky prostředí (teplota, vlhkost) pro ideální rozložení chromosomů v metafázích. Na každé podložní sklo jsme nakapali 100 µl připravené suspenze a nechali v přístroji sušit.

Optimální hustotu jader a množství metafází na preparátu jsme zkontrolovali ve světelném mikroskopu. V případě, že byla hustota jader příliš vysoká, naředili jsme suspenzi přidáním fixačního roztoku. V případě, že hustota jader byla naopak příliš nízká, koncentrovali jsme suspenzi centrifugací a odebráním části supernatantu. Před dalším zpracováním jsme preparáty uchovávali cca 1 týden v krabicích při pokojové teplotě, aby dostatečně vyschly. Nespotřebovaná buněčná suspenze se uchovává v mrazicím boxu při teplotách -15 až -30 °C.

5.1.3 Barvení preparátů

Preparáty jsme barvili cca týden po nakapání. Pokud se jednalo o akutní případ, ostaršili jsme čerstvě nakapaná skla 20 minut na histologické plotýnce vyhřáté na 70 °C. Skla jsme následně vložili do kyvety s 0,2 N roztokem HCl na 5 minut. Poté jsme skla přendali na 20 minut do kyvety s 2xSCC, předehřáté ve vodní lázni na 60 °C.

Každé z takto připravených skel jsme barvili směsí 3 ml Sørensenova pufru a 1 ml Wrightova barviva po dobu mezi 30 vteřinami a 5 minutami, dle účinnosti působení barviva. Po stanoveném čase jsme barvivo ze skla slili a sklo jsme opláchli v nádobě s čistou vodou. Po zaschnutí jsme zkontrolovali kvalitu barvení ve světelném mikroskopu. Pokud byla skla obarvena správně, uchovávali jsme je v krabici při pokojové teplotě. Byla-li skla obarvená nedostatečně, opakovali jsme předchozí krok a prodloužili jsme čas barvení. Přebarvené preparáty jsme odbarvili a znovu provedli barvení při kratším čase.

5.1.4 Mikroskopická analýza a sestavení karyotypu

U každého vzorku jsme hodnotili alespoň 20 metafází, pokud byly na preparátu přítomny. Vybrané čtyři mitosy jsme nasníмали při zvětšení 1000x. Pomocí speciálního počítačového programu Ikaros (MetaSystems) jsme nasnímané mitosy upravili dle potřeby a skládali jsme karyotyp. V případě, že na preparátech bylo méně než 20 mitos, ověřili jsme vždy nález metodou fluorescenční *in situ* hybridizace s využitím specifického panelu DNA sond pro nejčastější a prognosticky nejvýznamnější aberace u MDS.

5.2 I-FISH

5.2.1 Princip metody

Metodu interfázní FISH (I-FISH) jsme využívali k ověření nálezu klasické cytogenetické analýzy a k určení velikosti patologického klonu. Metoda je založená na komplementární vazbě fluorescenčně značené DNA sondy k vyšetřovanému úseku DNA. V prvním kroku dochází díky zvýšené teplotě k denaturaci DNA sondy i vyšetřované DNA chromosomů fixovaných na mikroskopickém preparátu. Následným snížením teploty se DNA sonda váže ke komplementárnímu úseku na chromosomech a probíhá tzv. hybridizace. Fluorescenční signál jsme následně vyhodnocovali ve fluorescenčním mikroskopu. Hodnotili jsme počet signálů, značící duplikaci či delecii cílové oblasti, a procentuální zastoupení patologických jader a mitos.

5.2.2 Laboratorní postup

Preparáty pro FISH analýzu jsme nakapali den před samotnou hybridizací. Pomocí přístroje HANABI PVI Metaphase Spreader (ADS Biotec) jsme na podložní skla nakapali 100 μ l suspenze a preparáty jsme nechali oschnout při pokojové teplotě. Do druhého dne jsme preparáty uchovávali v pokojové teplotě. Následující den jsme skla dali do kyvety s 2xSCC předeřáté ve vodní lázni na 38 °C a inkubovali je 20 minut. Následně jsme skla dehydratovali po 2 minutách ve vzestupné alkoholové řadě (70%, 85% a 96% etanol). Poté jsme skla nechali na vzduchu uschnout.

Hybridizační sondy jsme uchovávali v mrazáku při teplotě -20 °C. K analýze pacientů s MDS jsme použili komerčně připravované lokus-specifické a centromerické DNA sondy od firem

MetaSystems a Abbott Vysis, tzv. MDS panel (tab. 6). Sondy jsme připravili podle pokynů výrobce. Sondy Abbott Vysis bylo před hybridizací nutno smíchat s pufrům Vysis CEP Hybridization Buffer či LSI/WCP Hybridization Buffer (dle použité sondy) a redestilovanou vodou (0,5 µl DNA sondy, 7 µl pufru, 2 µl redestilované vody). Sondy od firmy MetaSystem jsou již naředěné. Fluorescenčně značené sondy jsou fotosenzitivní, a proto je uchováváme ve tmě. Přístupu světla zabráňujeme i u preparátů s nakapanou sondou. Před použitím sondy jsme ji vždy důkladně protřepali na vortexu a krátce stočili v mikrocentrifuze.

Na krycí skla o velikosti 22x22 mm na histologické plotně vyhřáté na 42 °C jsme nakapali výrobcem určené množství hybridizační směsi (sondy Abbott Vysis 9,5 µl a sondy MetaSystems 10 µl), přiklopili jsme podložním sklem a vytlačili případné vzduchové bubliny. Pozici krycího skla jsme označili z obou stran na podložním skle diamantovým popisovačem, což zjednodušilo krok vyhodnocení. Krycí sklo jsme oblepili rubbercementem, což zabránilo vyschnutí hybridizační směsi během následujících kroků.

Takto připravené preparáty jsme vložili do automatického hybridizačního bloku ThermoBrite (Abbott), ve kterém byly předem umístěny navlhčené buničinnové proužky pro udržení požadované vlhkosti. Následná denaturace a hybridizace probíhala automaticky podle příslušného předem nastaveného programu. Čas a teplota denaturace sond MetaSystems byly 2 minuty při 75 °C a následná hybridizace probíhala přes noc při 37 °C. Čas a teplota denaturace sond Abbott Vysis byly 2 minuty při 73 °C, hybridizace probíhala přes noc při 42 °C.

Druhý den jsme z preparátů odstranili rubbercement a krycí skla. Nenavázanou DNA sondu a zbytky hybridizační směsi jsme odmyli v sérii mycích roztoků pomocí automatu VP 2000 Processor (Abbott). V přístroji byly preparáty inkubovány 2 minuty při teplotě 73 °C v roztoku 0,4xSSC/0,3% NP-40. Dále byly na 1 minutu přeneseny do kyvety s roztokem 2xSSC/0,1% NP-40 při pokojové teplotě, a poté postupně do kyvet s 70%, 85% a 96% etanolem vždy po 2 minutách.

Po odmytí jsme nechali preparáty ve tmě uschnout. Po oschnutí jsme na ně na předeřáté plotýnce nanесли 25 µl směsi Antifadu s DAPI a přikryli velkým krycím sklem (22x60 mm). DAPI je fluorescenční barvivo sloužící k vizualizaci chromosomů. Antifade stabilizuje fluorescenci. Ze skel jsme pomocí buničiny odstranili přebytečnou Antifade/DAPI směs.

Skla jsme uložili do tmavých desek a krátce uchovávali v mrazícím boxu. Následně jsme preparáty vyhodnocovali pomocí fluorescenčního mikroskopu Axio Imager 2 (Zeiss, Německo). Přítomnost signálu jsme hodnotili v příslušném optickém filtru odpovídajícím použitému fluorescenčnímu značení dané sondy. Analýzu vždy prováděli alespoň dva nezávislí hodnotitelé. Hodnotili jsme celkem alespoň 10-20 mitos (pokud byly na preparátu přítomny) a 200 interfázních jader za pomoci imerzního objektivu se zvětšením 60x. Případné aberace jsme snímali pomocí chlazené CCD kamery a upravili pomocí speciálního softwaru pro počítačovou analýzu obrazu ISIS (MetaSystems). Po analýze skla dlouhodobě uchováváme v mrazícím boxu při teplotě -20 °C.

5.3 mFISH, mBAND

5.3.1 Princip metody

Metoda mnohobarevné FISH (mFISH) a mnohobarevného pruhování (mBAND) jsou stejně jako výše popsaná metoda I-FISH založeny na principu komplementární vazby fluorescenčně značené DNA sondy a cílové oblasti vyšetřované DNA. V případě metody mFISH jsou v hybridizační směsi obsaženy celochromosomové sondy pro všech 22 párů autosomů a dva pohlavní chromosomy. Sondy jsou značeny pěti různými fluorochromy, jejichž kombinace od sebe umožňuje barevně odlišit všechny chromosomy v karyotypu. Metoda mBAND je založena na použití specifických sond pro oblasti v rámci jednoho chromosomu. DNA pro přípravu mBAND sond se získává nejčastěji mikrodisekcí konkrétního chromosomu přímo z cytogenetického preparátu. Takto získaná DNA je naštěpena na několik fragmentů, které se vzájemně překrývají, a amplifikována. Jednotlivé amplifikované fragmenty jsou následně opět značeny pěti různými fluorochromy. Díky tomu, že se jednotlivé fragmenty překrývají, vzniká dostatečný počet barevných kombinací a na obarveném chromosomu tak vznikají specifické barevné pruhy. Obraz z fluorescenčního mikroskopu je snímán CCD kamerou a dále zpracováván speciálním softwarem pro počítačovou analýzu obrazu ISIS (MetaSystems), který na základě intenzity fluorescenčních signálů přiřadí jednotlivým chromosomům či chromosomovým pruhům tzv. pseudobarvy.

5.3.2 Laboratorní postup

Metoda mFISH a mBAND mají stejný pracovní protokol a liší se pouze typem použité DNA sondy. Preparáty jsme na 30 minut vložili do kyvety s roztokem 2xSSC předehřátým na 70 °C. Následně jsme je ve stejné kyvetě nechali dalších 30 minut při pokojové teplotě. Poté jsme preparáty na 1 minutu přenesli do roztoku 0,1xSSC při pokojové teplotě, a následně je denaturovali 1 minutu v roztoku 0,07 M NaOH při pokojové teplotě a dále inkubovali 1 minutu v 0,1xSSC vychlazeném na 4 °C a 1 minutu v 2xSSC vychlazeném na 4 °C. Poté jsme skla dehydratovali ve vzestupné alkoholové řadě (70%, 96% a 100% etanol) po 1 minutě v každé koncentraci. Po dehydrataci jsme preparáty nechali uschnout při pokojové teplotě ve tmě.

Přenesli jsme 10 µl sondy do mikrozkušavky a denaturovali ve vodní lázni vyhřáté na 75 °C po dobu 5 minut. Poté jsme ji prudce ochladili 1 minutu na ledu. Následně jsme inkubovali 30 minut při teplotě 37 °C. Před nanášením na preparáty jsme hybridizační směs důkladně protřepali a stočili. Denaturovanou hybridizační směs jsme nanášeli na krycí sklo o velikosti 22x22 mm umístěné na histologické plotně vyhřáté na 42 °C a následně přiklopili podložním sklem. Diamantovým popisovačem jsme označili pozici nanášené sondy na podložním skle a krycí sklo jsme oblepili rubbercementem. Hybridizace probíhala ve vlhké komůrce 1-2 dny v termostatu vyhřátém na 37 °C.

Po hybridizaci jsme z preparátů odstranili rubbercement a krycí skla. Preparáty jsme odmyli v sérii mycích roztoků. Preparáty jsme vložili do kyvety s roztokem 0,4xSSC při teplotě 72 °C a nechali inkubovat 2 minuty. Poté jsme preparáty inkubovali 30 vteřin v roztoku 2xSSC/0,05% Tween 20. Preparáty jsme opláchli redestilovanou vodou a nechali ve tmě uschnout.

Na předehřáté plotýnce jsme nanášeli 25 µl směsi DAPI/Antifade a překryli velkým krycím sklem (22x60 mm). Preparáty jsme uložili do tmavých desek a uchovávali je v mrazicím boxu při -20 °C. Následně jsme obraz snímali pomocí fluorescenčního mikroskopu Axio Imager 2 (Zeiss) a CCD kamerou a hodnotili softwarem pro analýzu obrazu ISIS (MetaSystems).

5.4 aCGH

5.4.1 Princip metody

Princip metody komparativní genomové hybridizace na mikročipech (aCGH) spočívá v kompetitivní hybridizaci referenční a vyšetřované DNA k fragmentům genomu umístěným na mikročipu. Referenční a vyšetřovaná DNA jsou značeny odlišnými fluorochromy. Po hybridizaci je mikročip snímán speciálním skenerem, který vyhodnocuje intenzitu obou fluorochromů v jednotlivých bodech. Vyhodnocení spočívá v porovnání intenzit fluorescenčního signálu vyšetřované DNA a referenčního genomu. Zvýšení či snížení intenzity fluorescence vyšetřované DNA v porovnání s referenčním genomem značí duplikaci či delecii. Některé mikročipy kombinují aCGH a tzn. SNP array (single nucleotide polymorphism). Díky takové kombinaci je možné detekovat jednonukleotidové polymorfismy, což umožňuje i detekci oblastí se ztrátou heterozygosity bez ztráty kopií DNA sekvencí (CN-LOH), tzv. uniparentálních disomií (UPD).

5.4.2 Laboratorní postup

DNA jsme izolovali z fixovaných buněk kostní dřeně pomocí kitu QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Německo). Při 12000 rpm jsme centrifugovali 200 μ l buněčné suspenze, supernatant jsme odstranili a peletu resuspendovali v 200 μ l 1xPBS. K vzorku jsem přidal 20 μ l proteinázy K a 200 μ l AL pufru a následně jej inkubovali 10 minut při 56 °C.

Ke vzorku jsme dále přidal 200 μ l 100% EtOH a přenesli jej na sterilní kolonku, ve které jsme 1 minutu centrifugovali při 6000 g. Přidal jsem 500 μ l AW1 pufru a opět centrifugovali 1 minutu při 6000 g. Dále jsme přidal 500 μ l AW2 pufru a centrifugovali 3 minuty při 20000 g a následně 1 minutu při 20000 g na sucho. Dalším krokem byla eluce do čisté mikrozkušavky pomocí 55 μ l AE pufru a následná inkubace po dobu 5 minut při pokojové teplotě. Po inkubaci jsme opět centrifugovali 1 minutu při 6000 g.

Koncentraci a čistotu získané DNA jsme ověřili pomocí přístroje NanoDrop 2000 (ThermoFisher Scientific, USA). K ověření kvality DNA jsme využili gelovou elektroforézu. Na 1% agarózový gel jsme nanесли 80 ng vzorku smíchaného s nanášecím pufrům. Elektroforéza probíhala při napětí 5V/cm.

Množství DNA potřebné pro analýzu pomocí aCGH na mikročipu o formátu 4x180K je 1000 ng. Stejně množství je potřebné pro analyzovaný vzorek i pro referenční DNA. Vzorek DNA jsme doplnili destilovanou vodou na objem 20,2 μ l. Prvním krokem bylo restriční štěpení. Nejprve jsme si připravili Master Mix, který se skládal z 2 μ l ddH₂O, 2,6 μ l 10x reakčního pufru (pro restriční enzymy), 0,2 μ l BSA, 0,5 μ l restriktázy Alu I a 0,5 μ l restriktázy Rsa I (množství na jeden vzorek). Na ledu jsme přidali 5,8 μ l Master Mixu do každé zkumavky. Nechali jsme inkubovat 2 hodiny při 37 °C a následně 20 minut při 65 °C. Poté jsme zchladili v lednici minimálně po dobu 5 minut.

Následně jsme si ověřili výsledek štěpení pomocí gelové elektroforézy. Na 1% agarózový gel jsme nanесли 2 μ l vzorku smíchaného s nanášecím pufrem. Elektroforéza probíhala 5 minut při napětí 50 V a poté 50 minut při napětí 90 V.

Pro značení DNA jsme přidali 5 μ l random primeru do každého vzorku a inkubovali jsme 3 minuty při 98 °C. Dalších 5 minut jsme inkubovali na ledu. Připravili jsme si Master Mix: 2 μ l ddH₂O, 10 μ l 5 x reakční pufr (pro značící polymerázu), 5 μ l dNTP, 3 μ l Cy-3 (vzorek)/Cy-5 (referenční DNA), 1 μ l Exo-Klenowova fragmentu. Ke každému vzorku jsme přidali 21 μ l Master Mixu a inkubovali jsme 2 hodiny při 37 °C a poté 10 minut při 65 °C.

K purifikaci značené DNA jsme využívali SureTag DNA Labeling Kit (Agilent Technologies, USA). Ke všem vzorkům jsme přidali 430 μ l TE pufru a přenesli na kolonku. Centrifugovali jsme 10 minut při 14000 g. Po vylití eluátu jsme přidali 480 μ l TE pufru a centrifugovali jsme 10 minut při 14000 g. Kolonku jsme přenesli dnem vzhůru do nové zkumavky a centrifugovali 1 minutu při 1000 g. Inkorporaci značené DNA jsme měřili spektrofotometricky přístrojem NanoQuant Infinite M200 Microplate Reader (Tecan, Švýcarsko) a určili jsme specifickou aktivitu.

Každý vzorek jsme smíchali s ekvivalentním množstvím příslušného vzorku referenční DNA do výsledného objemu 40 μ l. Do každého vzorku jsme dále postupně přidali 5,5 μ l Cot-1 DNA, 11,5 μ l 10 x aCGH blokující agent a 60 μ l HI-RPM hybridizačního pufru. Inkubovali jsme 3 minuty při 98 °C a dále 30 minut při 37 °C.

Těsnící sklíčko Backing Slide (Agilent Technologies) jsme umístili do hybridizační komůrky Microarray Hybridization Chamber (Agilent Technologies) a do každé ohraničené části jsme napipetovali celý objem vzorku. Na takto připravené těsnící sklíčko jsme přiklopili aktivní

stranou sklíčko mikročipu SurePrint G3 Cancer CGH+SNP Microarray a komůrku jsme uzavřeli. V hybridizační peci Microarray Hybridization Oven (Agilent Technologies) jsme inkubovali 24 hodin při 67° C. Promývací pufr 2 jsme zahřáli na 37° C. Promývací pufr 1 jsme si ve dvou kyvetách v lednici ochladili na 20-22 °C. Pod hladinou promývacího pufru 1 v první kyvetě jsme oddělili těsnící sklo od mikročipu, který jsme následně přenesli do druhé kyvety s promývacím pufrem 1 a inkubovali 5 minut. Následně jsme mikročip přenesli do kyvety s promývacím pufrem 2 a při 37° C inkubovali 1 minutu. Mikročip jsme vytahovali pomalu a plynule a umístili do příslušného držáku. Skenovali jsme pomocí skeneru SureScan Dx Microarray Scanner (Agilent Technologies) a poté vyhodnocovali pomocí programu Agilent Cytogenomics (Agilent Technologies).

5.5 Statistická analýza

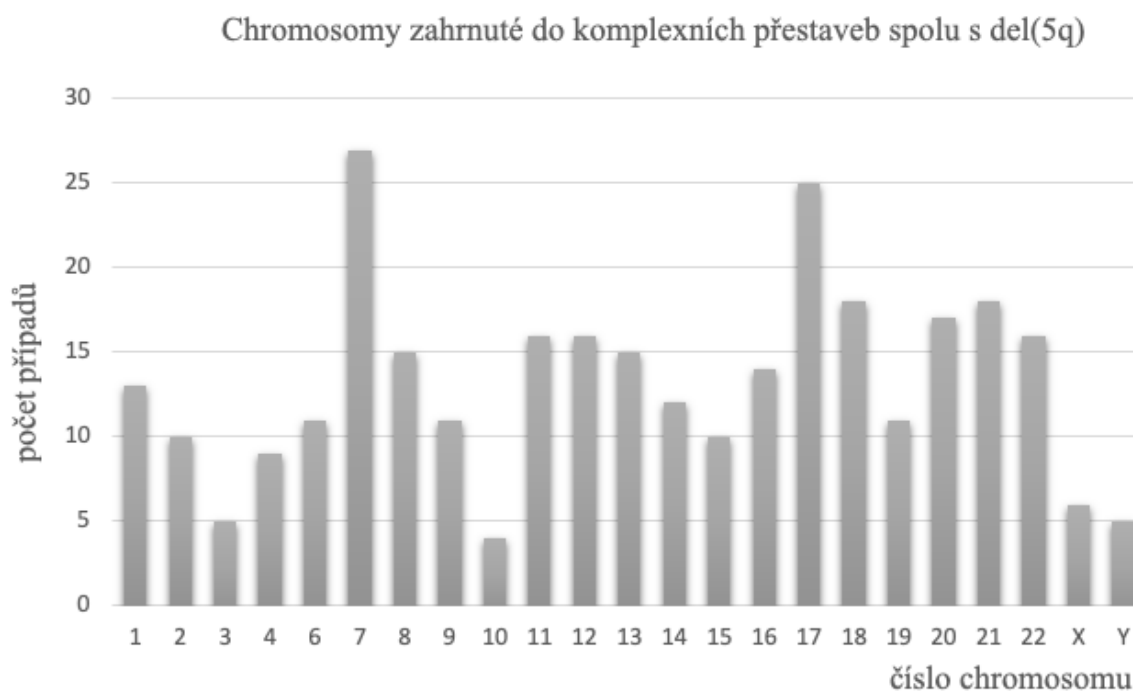
Pro statistické zhodnocení rozdílů v celkovém přežití (OS) mezi definovanými skupinami pacientů jsme použili Kaplan-Meirovu analýzu a Mantel-Haenszelův test. OS jsme definovali jako dobu od diagnózy pacienta do smrti či do poslední kontroly. Následně jsme použili Coxovu vícerozměrnou regresní analýzu ke zhodnocení vlivu jednotlivých faktorů na OS. Statistické hodnocení jsme prováděli pomocí programu RStudio Desktop 1.4.1717. Veškerá testování jsme prováděli na hladině významnosti $p = 0,05$.

6 Výsledky

6.1 Klasická cytogenetická analýza

Deleci dlouhých ramen chromosomu 5 jsme klasickou cytogenetickou analýzou prokázali u všech pacientů. U 31 nemocných se jednalo o izolovanou del(5q), z nich bylo 26 žen (81,2 %) a šest mužů (18,8 %). Deleci 5q v kombinaci s jednou další klonální aberací jsme detekovali u devíti pacientů (šesti žen a tří mužů). Deleci 5q jako součást komplexních karyotypů (tři a více klonálních aberací) jsme del(5q) pozorovali ve 48 případech (24 žen a 23 mužů).

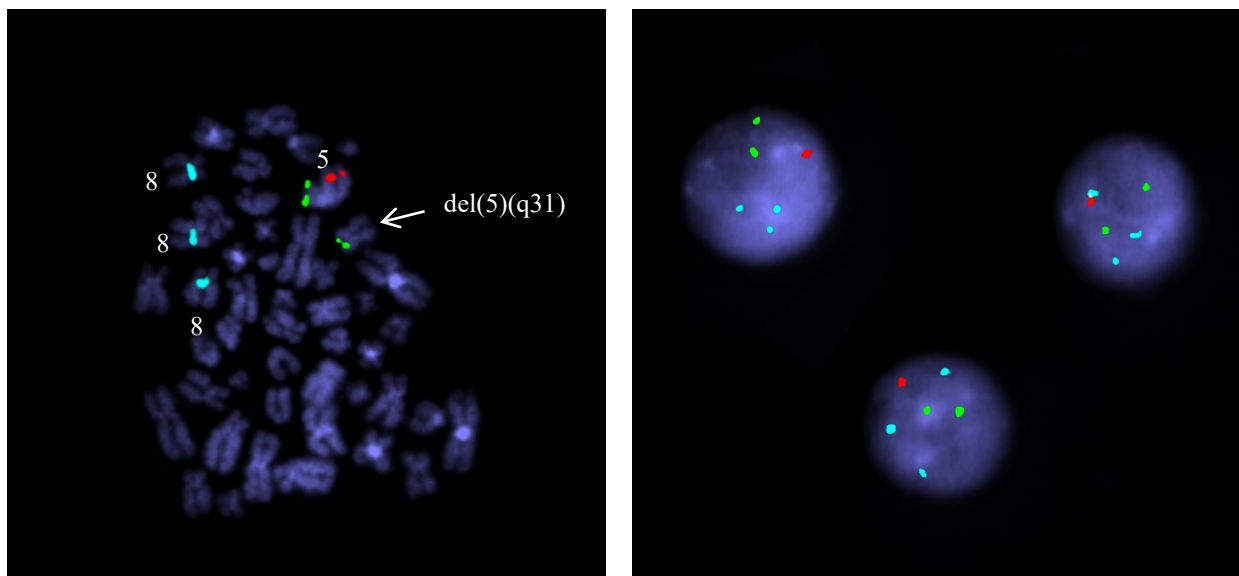
Pokud se delece 5q vyskytovala současně s jednou další aberací, byla doprovázena aberacemi +8 (n=2), -Y (n=1), -X (n=1), +21 (n=1), del(20)(q11q13) (n=1), t(2;6)(p23;q21) (n=1), t(12;22)(q21;q11) (n=1) a der(18)t(1;18)(p22;q23) (n=1). U pacientů s del(5q) zahrnutou v komplexním karyotypu se na chromosomových přestavbách nejčastěji podílely chromosomy 7 (n=27), 17 (n=25), 18 (n=18), 21 (n=18), 12 (n=16) a 11 (n=16) (graf 3). U pacientů s MDS převládaly ztráty celých chromosomů (monosomie) či jejich částí (delece) nad trisomiemi či tetrasomiemi. Naopak u pacientů s AML jsme častěji detekovali trisomie a tetrasomie. Trisomie nejčastěji postihovaly chromosomy 8 (n=10), 22 (n=6), 21 (n=6) a 11 (n=5). Monosomie nejčastěji zahrnovaly chromosomy 7 (n=10), 16 (n=6), 13 (n=5) a 18 (n=5).



Graf 3: Zahrnutí jednotlivých chromosomů v komplexních karyotypech současně s del(5q).

U 24 pacientů jsme v diagnostickém vzorku pozorovali dva a více příbuzných klonů. To znamená, že u nich došlo k divergentnímu klonálnímu vývoji. Komplexní karyotyp jsme detekovali u 21 z nich a tři spadali do kategorie del(5q) s jednou další změnou. U dvou pacientů ze skupiny del(5q) s jednou další aberací byla ve druhém klonu kromě delece 5q detekována trisomie chromosomu 8 (obr. 10) a translokace t(2;6)(p23;q21). U třetího pacienta jsme jako primární změnu v původním klonu detekovali delecí dlouhých ramen chromosomu 20 a ve druhém příbuzném klonu jsme detekovali del(20q) současně s del(5q). U většiny pacientů s komplexním karyotypem a divergentním klonálním vývojem byla del(5q) přítomná již v primárním klonu. Výjimkou byl pouze pacient č. 6, u kterého byla původní aberací samostatná trisomie chromosomu 8 a del(5q) se objevila spolu s ostatními komplexními aberacemi až v dalším heterogenním klonu.

Dva nepříbuzné klony jsme pozorovali pouze u pacientky č. 31. V jednom klonu jsme prokázali izolovanou del(5q) a v druhém samostatnou ztrátu chromosomu X.



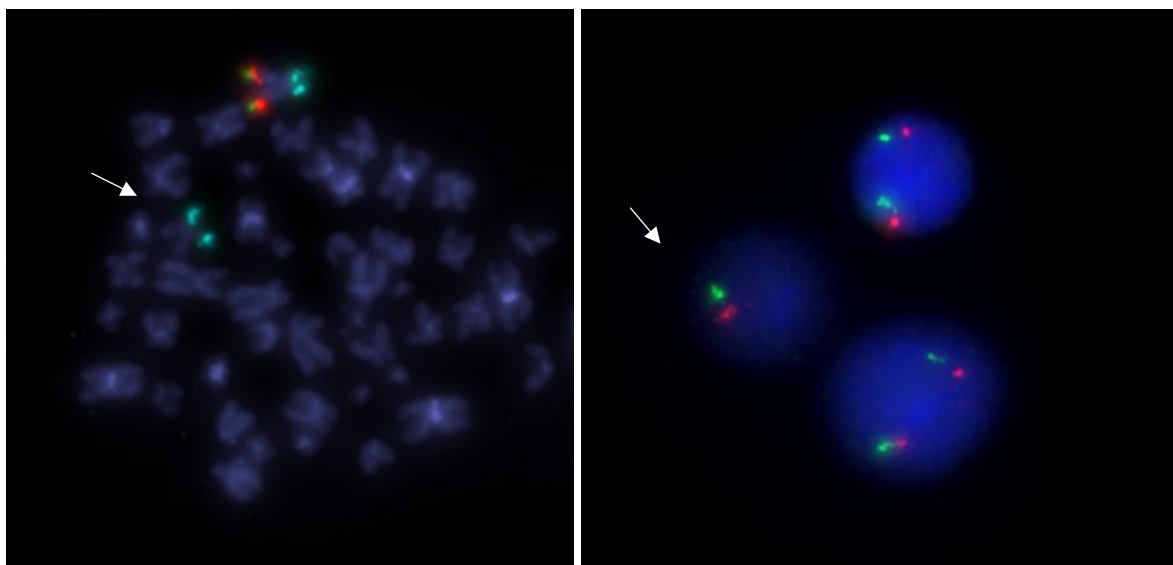
Obr. 10: Delece 5q a trisomie 8 detekovaná metodou tříbarevné I-FISH současně ve stejném klonu. Vlevo metafáze s delecí 5q31 (chybí červený signál) a trisomií 8 (tři modré signály). Vpravo stejný nález v interfázním jádru (sondy Vysis LSI 5q31 a 5p15, CEP 8; Abbott).

V souboru jsme nepozorovali žádný případ monosomie chromosomu 5. U všech pacientů s podezřením na monosomii chromosomu 5 na základě klasické cytogenetické analýzy jsme následně pomocí molekulárně cytogenetických metod prokázali zahrnutí chromosomu 5 v nebalancovaných aberacích (inzerce, translokace). Nejčastější partneři chromosomu 5 v těchto přestavbách byly chromosomy 17 (n=3), 2 (n=3), 4 (n=3), 7 (n=2), 12 (n=2) a 16 (n=2).

6.2 Molekulárně cytogenetická analýza

6.2.1 Velikost patologického klonu s del(5q)

U 84 pacientů jsme přítomnost del(5q) ověřili metodou I-FISH. U čtyř pacientů jsme analýzu I-FISH nemohli provést z důvodu nedostatku materiálu. U 78 pacientů jsme prokázali delecí oblasti 5q31 i oblasti 5q33 (obr. 11). U šesti pacientů byla deletována pouze oblast 5q31. Tato metoda nám zároveň umožnila určit velikost patologického klonu, která se pohybovala v rozmezí od 9 % do 96,5 %.



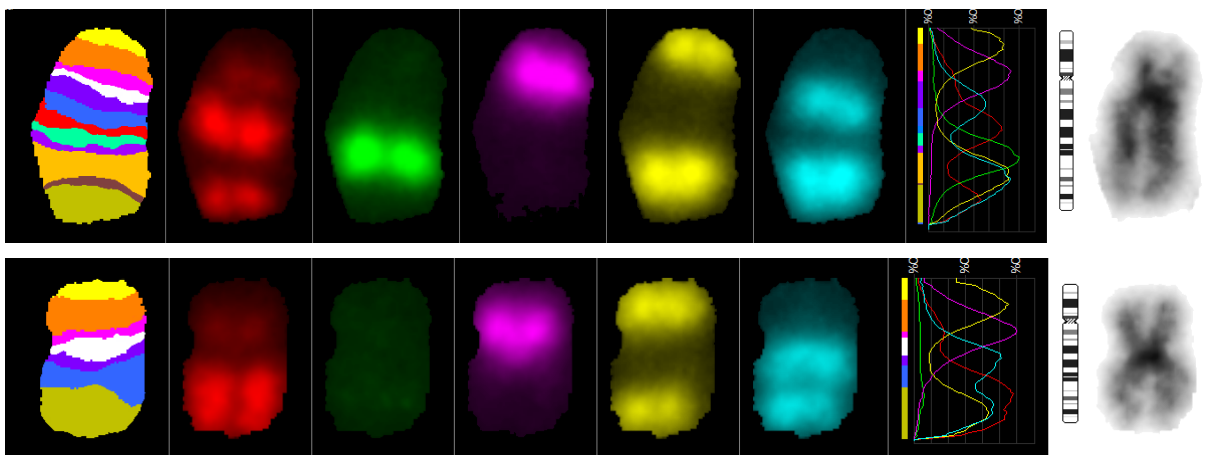
Obr. 11: Delece 5q detekovaná metodou I-FISH. Vlevo metafáze s delecí oblastí 5q31 a 5q33 (chybí červený a zelený signál), oblast 5p15 zůstala zachována (modrý signál). Vpravo interfázni jádro se stejnou delecí oblastí 5q31 a 5q33 (sonda XL 5q31/5q33/5p15; MetaSystems).

6.2.2 Rozsah delecce 5q

Přesná zlomová místa a velikost delecce jsme určili metodou mBAND (obr. 12). U 18 pacientů jsme následně velikost delecce upřesnili metodou aCGH. V pěti případech, kdy měl pacient komplexní karyotyp a neměl dostatek materiálu pro další analýzy, jsme zlomová místa určili na základě metody mFISH a klasické cytogenetické analýzy. Celkově nejčastější rozsah delecce byl v oblasti 5q14.1-5q33.3 (n=19; 21,6 %) odpovídající 83 Mb. Pouze jeden pacient měl delecí na krátkých ramenou chromosomu 5, a to v rozsahu 5p12-5pter. Nejčastější zlomová místa zahrnovala pruhy 5q33.3 (n=34), 5q14.1 (n=32), 5q34 (n=24) a 5q13.3 (n=10). Ve skupině s izolovanou del(5q) byl nejčastějším proximálním zlomovým místem pruh 5q14.1 (n=15)

a nejčastějším distálním zlomovým místem pruh 5q33.3 (n=14). Ve skupině s del(5q) s jednou další aberací docházelo k proximálním zlomům nejčastěji v pruhu 5q14.1 (n=3) a 13.3 (n=3) a k distálním zlomům v pruhu 5q34 (n=3). Ve skupině s del(5q) zahrnutou v komplexním karyotypu nejčastěji docházelo k proximálním zlomům opět v pruhu 5q14.1 (n=13) a k distálním zlomům v pruhu 5q33.3 (n=15).

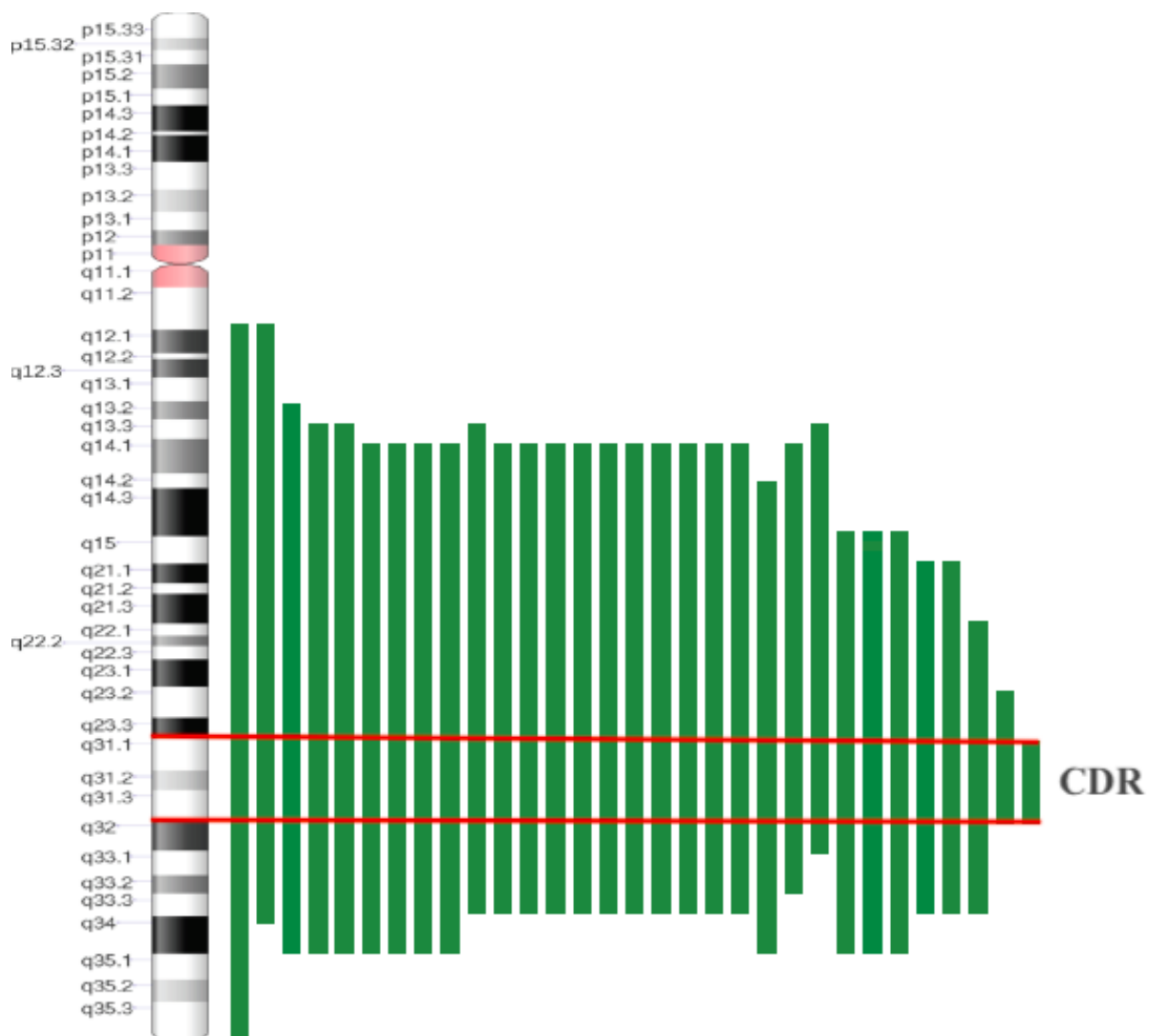
U pacientů s izolovanou del(5q) jsme nejčastěji pozorovali delecii v oblasti 5q14.1-5q33.3 (obr. 12) (n=10; 32,3 %). Minimální společnou deletovanou oblast, CDR, jsme určili jako oblast ohraničenou pruhu 5q31.1 a 5q31.3 o velikosti 13,9 Mb (obr. 13). Tato CDR odpovídá i CDR nalezené u skupiny s del(5q) a jednou další změnou (kromě monosomie 7 a delecce 7q). Stejná je i nejčastěji detekovaná delecce, a to 5q14.1-5q33.3, která se vyskytovala u 20 % (n=2) pacientů z této skupiny (obr. 14). Společná zachovaná oblast, CRR, v obou skupinách odpovídala celému rozsahu p ramen (obr. 13, 14).



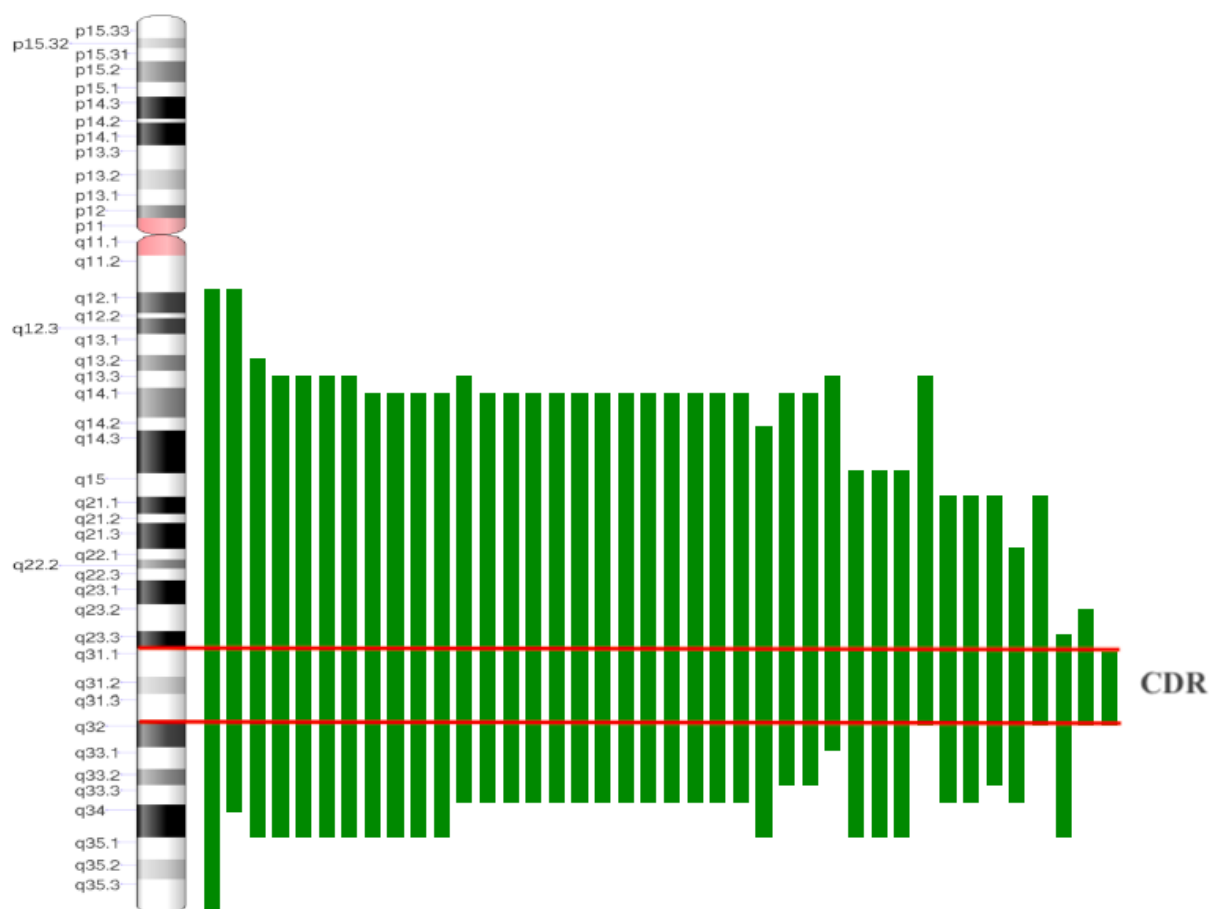
Obr. 12: Analýza del(5q) metodou mBAND. Obrázek nahoře zobrazuje normální chromosom 5 bez delecce. Na obrázek dole je chromosom 5 s nejčastěji deletovanou oblastí 5q14.1-5q33.3.

U pacientů s komplexním karyotypem jsme pozorovali větší rozsah delecí 5q než v ostatních skupinách. Nejčastěji byla opět deletovaná oblast 5q14.1-5q33.3, která byla v této skupině nalezena u 14,6 % pacientů (n=7). Jako CDR jsme určili oblast 5q23.3-5q31.2 o velikosti 18 Mb. Oblast CRR jsme v této skupině nedetekovali (obr. 15).

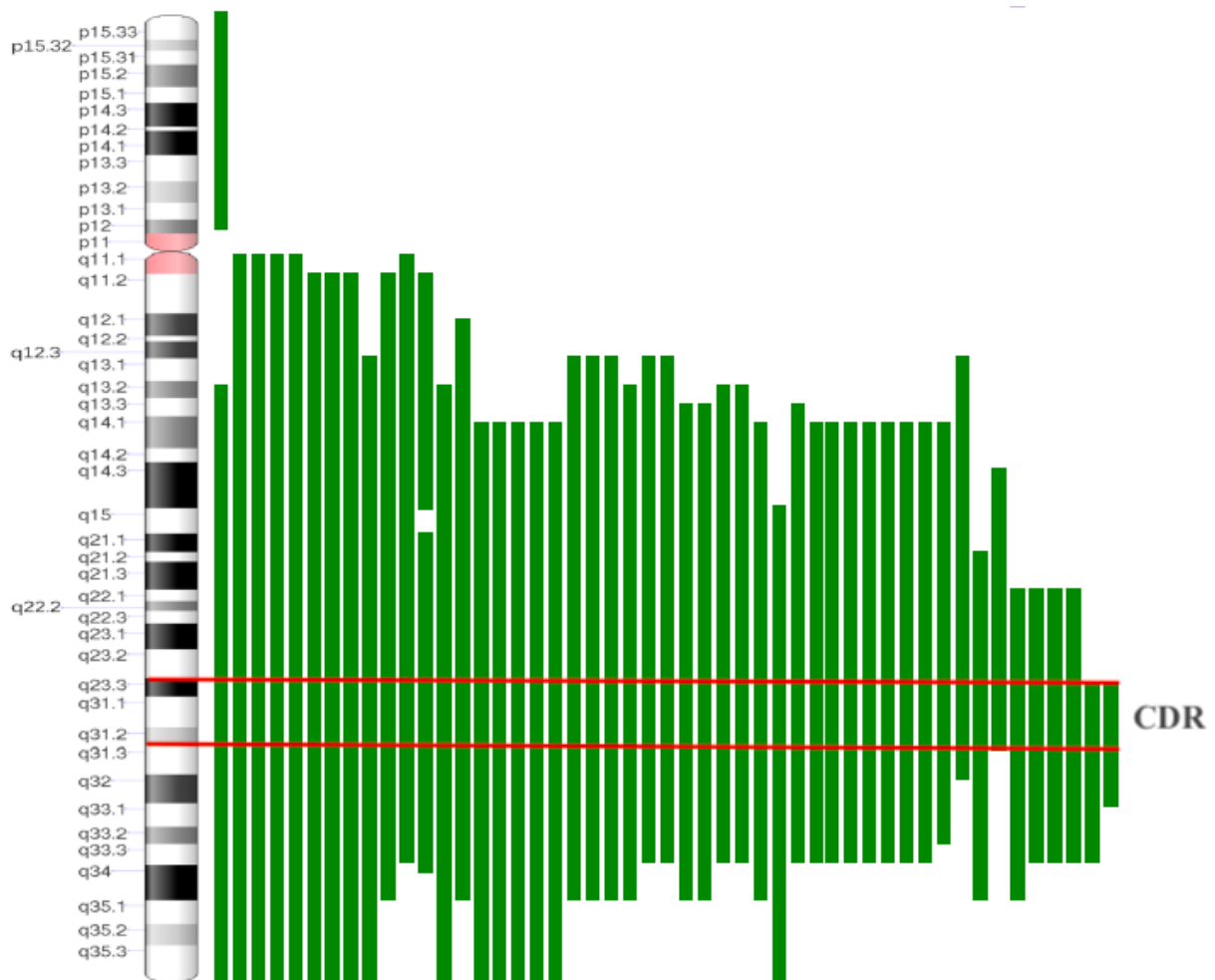
U pacienta č. 13 jsme pozorovali 2 klony s různým rozsahem delecce, a to v oblastech 5q13-5q34 a 5q21.2-5q34. Rozsah delecce v obou klonech byl ověřen metodou aCGH.



Obr. 13: Grafické znázornění rozsahu delecí ve skupině nemocných s izolovanou del(5q) (n=31) s vyznačenou CDR v oblasti 5q31.1-5q31.3. Nejčastější deletovaná oblast byla 5q14.1-5q33.3 (32,3 %, n=10).



Obr. 14: Grafické znázornění rozsahu delecí ve skupině s izolovanou del(5q) a del(5q) s jednou další klonální aberací (kromě monosomie 7/delece 7q) (n=40) s vyznačenou CDR v oblasti 5q31.1-5q31.3. Nejčastější deletovaná oblast byla 5q14.1-5q33.3, která ve skupině s izolovanou del(5q) tvořila 32,3 % případů (n=10) a ve skupině s del(5q) a jednou další změnou 20 % případů (n=2). V obou skupinách tvořila celkem 30 % případů (n=12).

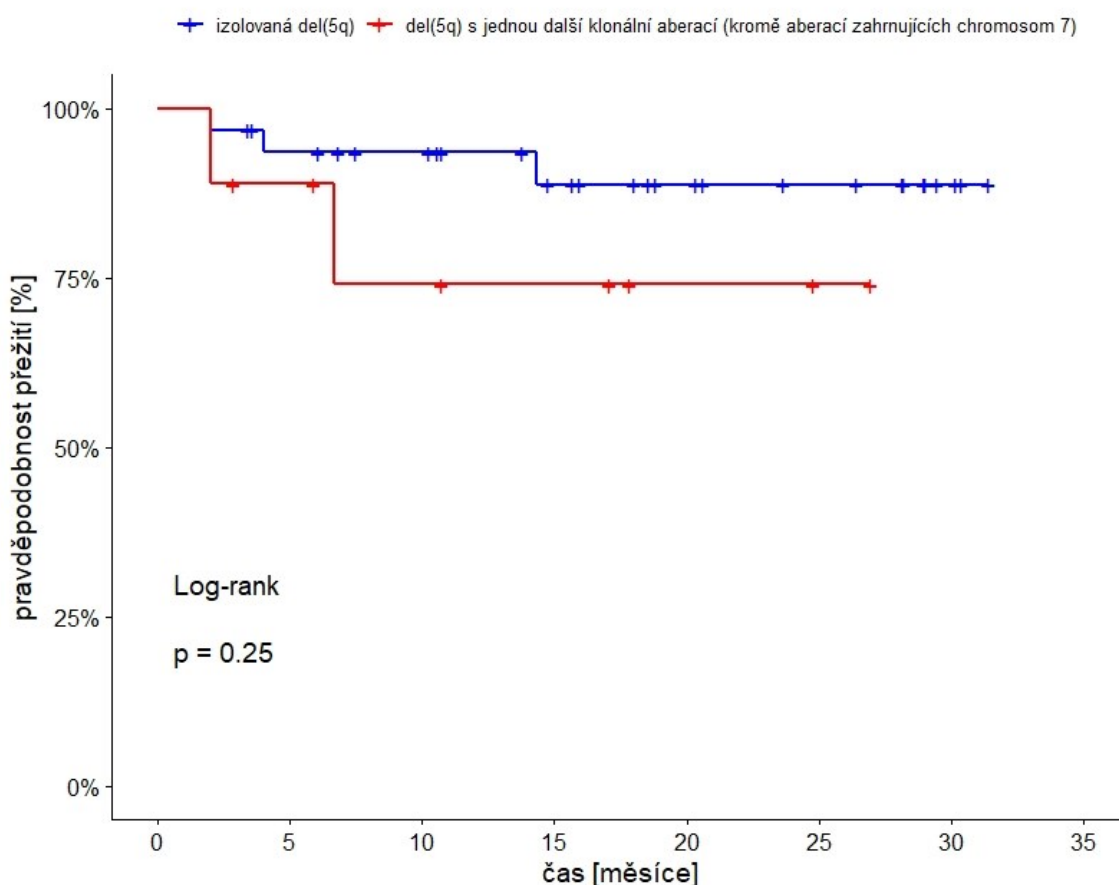


Obr. 15: Rozsahy delecí ve skupině s del(5q) v komplexním karyotypu (n=48). Vyznačená společná deletovaná oblast (CDR) v oblasti 5q23.3-5q31.2. Nejčastější deletovaná oblast byla 5q14.1-5q33.3 (14,6 %). Jako první rozsah je znázorněn jediný pacient v souboru s delecí p ramene, v rozsahu 5p12-5pter.

6.3 Analýza přežití a současný klinický stav

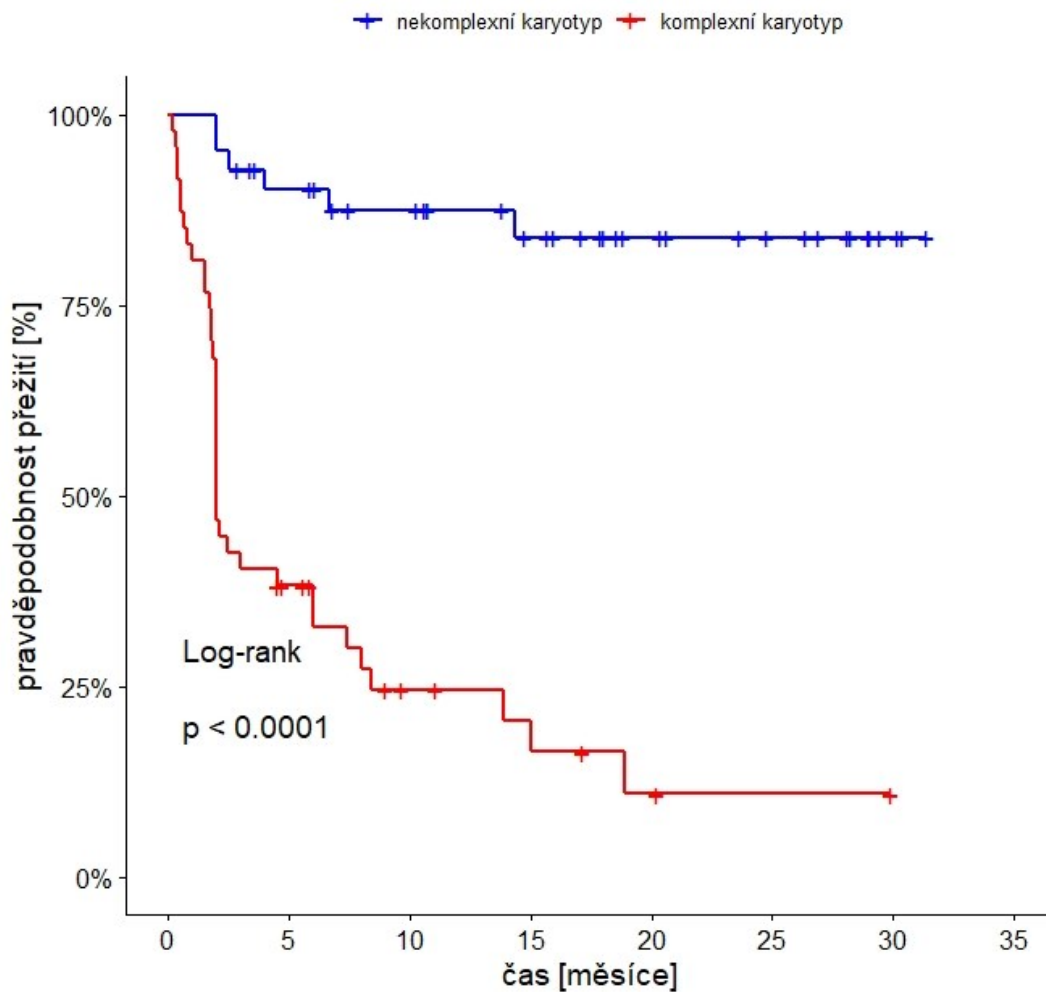
Ke dni 30. 4. 2021 v celém souboru žilo 46 pacientů (52 %), 42 nemocných (48 %) zemřelo. Medián celkového přežití (OS) celé skupiny byl 15 měsíců. Medián délky sledování byl 6,8 měsíců (v rozpětí od 0,2 do 31,4 měsíců).

V první fázi jsme ověřili, zda skupinu nemocných s izolovanou del(5q) můžeme sloučit se skupinou pacientů s jednou další klonální aberací (kromě monosomie 7/delece 7q), jak je popisováno v literatuře. Rozdíl přežití mezi skupinou s izolovanou del(5q) a del(5q) s jednou další aberací vyšel na hladině $p=0,05$ jako nesignifikantní ($p=0,25$) (graf 4). Proto jsme obě skupiny pro další testování sloučili do jedné kategorie izolované del(5q). Medián OS nebyl ani u jedné skupiny dosažen. Průměr OS byl u skupiny s izolovanou del(5q) 21,2 měsíců a u skupiny s jednou další aberací 28,8 měsíců.



Graf 4: Graf celkového přežití skupiny s izolovanou del(5q) (modrá křivka) (n=31) a skupiny s del(5q) a jednou další klonální aberací (kromě aberací zahrnujících chromosom 7) (červená křivka) (n=9). Rozdíl na hladině významnosti $p=0,05$ neprokázán jako statisticky významný ($p=0,25$).

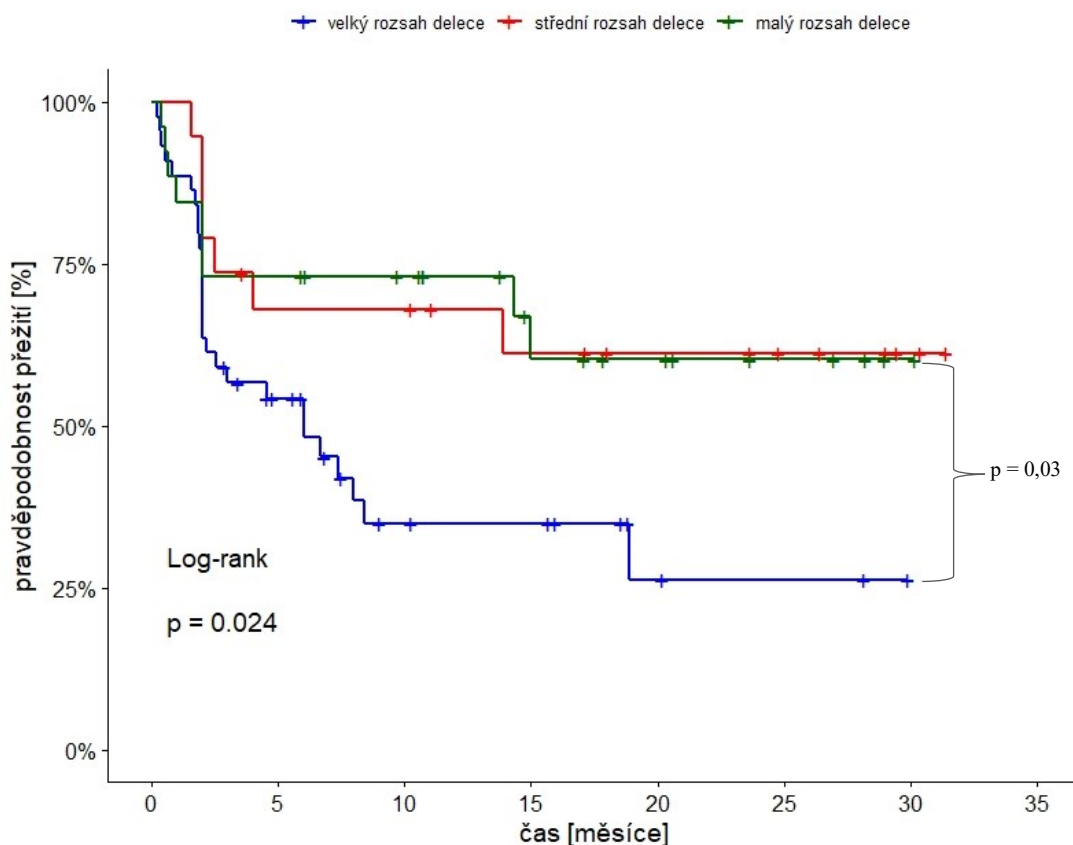
Dále jsme porovnali celkové přežití mezi skupinou s izolovanou del(5q) a del(5q) v komplexních karyotypech. Mezi těmito skupinami jsme na hladině významnosti $p=0,05$ rozdíl prokázali ($p < 0,0001$) (graf 5). Stejně jako v předchozím pozorování nebyl pro skupinu bez komplexního karyotypu dosažen medián OS. Pro skupinu pacientů s komplexním karyotypem byl medián OS dva měsíce. Průměr OS u skupiny bez komplexního karyotypu byl 27,3 měsíce a u skupiny s komplexním karyotypem pouze 7,5 měsíce.



Graf 5: Graf celkového přežití skupiny pacientů s komplexním (červená křivka) ($n=48$) a nekomplexním (modrá křivka) ($n=40$) karyotypem. Rozdíl byl na hladině významnosti $p=0,05$ prokázán jako statisticky významný ($p < 0,0001$).

K další analýze vlivu rozsahu del(5q) na přežití pacientů jsme pozorované rozsahy del(5q) na základě expertního odhadu rozdělili do tří skupin. Do skupiny se středním rozsahem delecí jsme zařadili pacienty s nejčastěji pozorovanou delecí 5q14.1-5q33.3 ($n=19$). Veškerá pozorování s větším rozsahem jsme zařadili do skupiny pacientů s velkým rozsahem delecí ($n=44$), veškerá pozorování s menším rozsahem jsme zařadili do skupiny s malým rozsahem delecí ($n=25$).

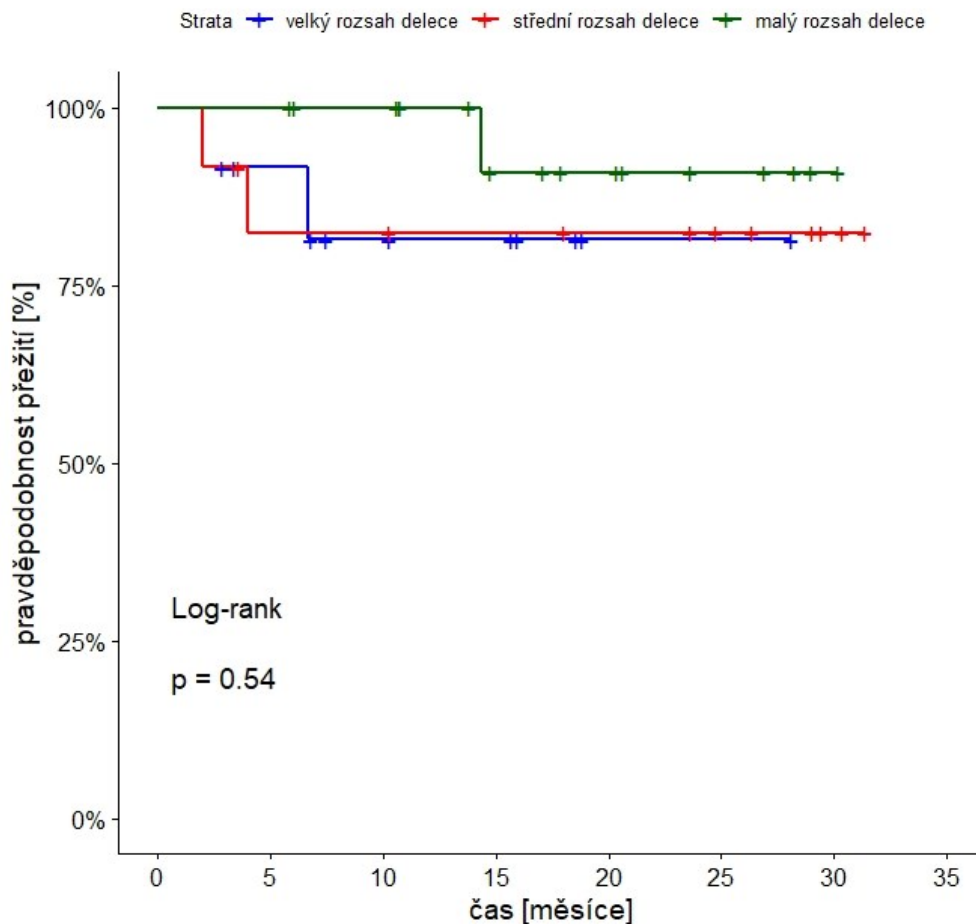
Na hladině $p=0,05$ jsme prokázali statisticky významný rozdíl mezi přežitím skupiny s malým a velkým rozsahem delece 5q ($p=0,03$). Statisticky významný rozdíl v přežití jsme však neprokázali mezi skupinami se středním a malým rozsahem delece ($p=0,99$) a středním a velkým rozsahem delece ($p=0,051$) (graf 6). Medián OS byl dosažen pouze u skupiny s velkým rozsahem del(5q) a rovnal se šesti měsícům. Průměr OS byl u skupiny s velkým rozsahem roven 11,7 měsícům, se středním rozsahem 21 měsícům a s malým rozsahem 20,4 měsícům.



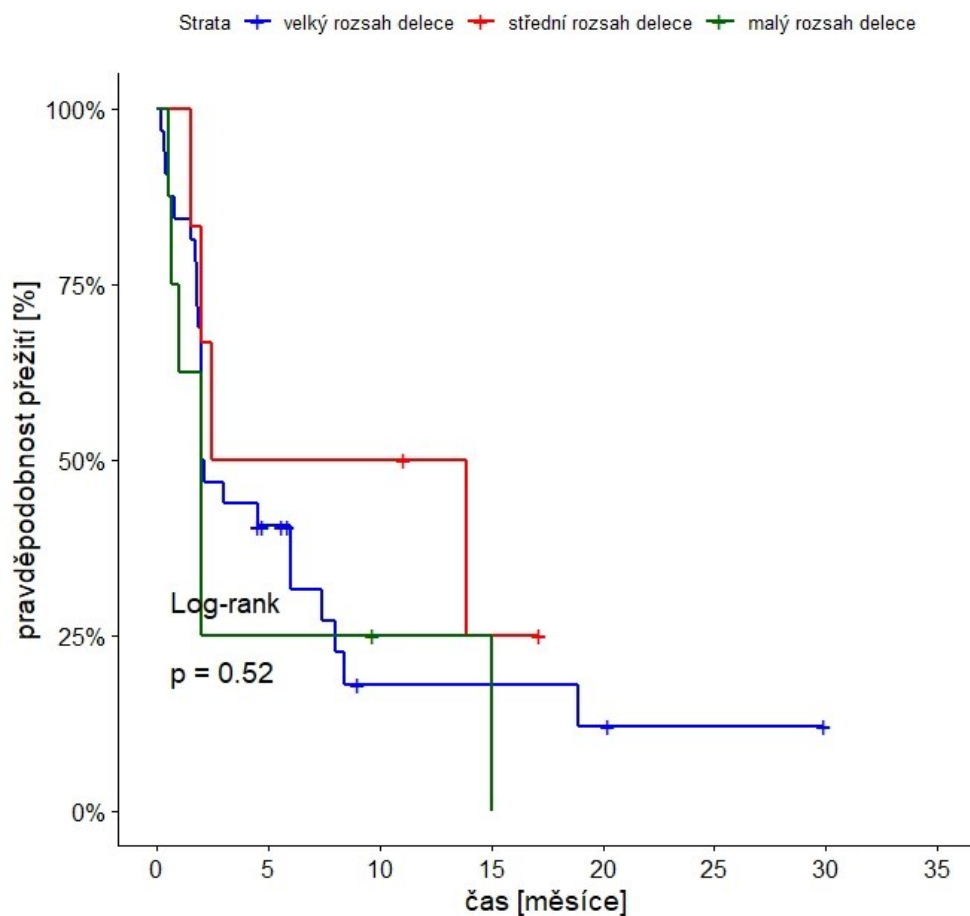
Graf 6: Graf celkového přežití mezi skupinami pacientů s malým (zelená křivka) ($n=25$), středním (červená křivka) ($n=19$) a velkým (modrá křivka) ($n=44$) rozsahem del(5q). Na hladině $p=0,05$ je statisticky významný pouze rozdíl mezi malým a velkým rozsahem del(5q) ($p=0,03$).

Skupina s velkým rozsahem delece tvořila 66,7 % ($n=32$) případů mezi pacienty s komplexním karyotypem, zatímco mezi pacienty s izolovanou del(5q) tvořila pouze 30 % ($n=12$). Naopak delece s malým rozsahem byla častější u pacientů s izolovanou del(5q), kde tvořila 40 % ($n=16$) případů. U pacientů s komplexním karyotypem tvořila pouze 18,8 % ($n=9$). Následnými testy korelace (Cramerovo V, koeficient kontingence) jsme prokázali závislost mezi přítomností komplexního karyotypu a kategorizovaným rozsahem del(5q).

Dále jsme tedy analyzovali vliv rozsahu del(5q) zvláště ve skupině s izolovanou delecí (graf 7) a ve skupině s komplexním karyotypem (graf 8). V žádné ze zkoumaných skupin nebyl vliv rozsahu del(5q) prokázán jako statisticky významný ($p=0,54$; $p=0,52$). Tento závěr jsme ověřili Coxovou vícerozměrnou regresní analýzou. Po vytvoření modelu s faktorem komplexních karyotypů a zároveň s rozsahem del(5q) jsme prokázali, že rozsah del(5q) na OS nemá statisticky významný vliv ($p=0,93$), zatímco nález komplexního karyotypu ano ($p=0,000000284$). Tzn. model pouze s faktorem komplexních karyotypů vysvětluje téměř stejnou míru variability jako model s přidáním faktorem rozsahu del(5q). Rozsah del(5q) tedy v tomto modelu neposkytuje žádné další informace a k analýze přežití stačí znát faktor komplexních karyotypů.

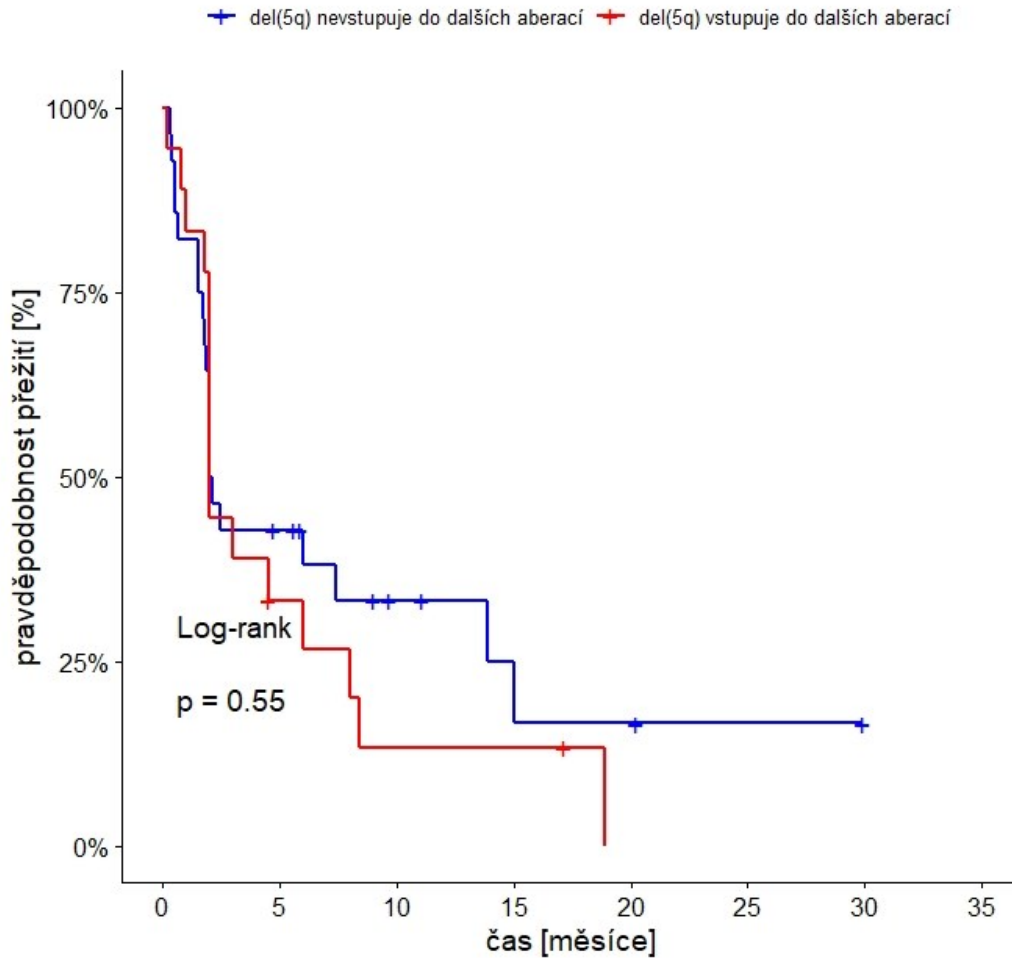


Graf 7: Graf celkového přežití u nemocných s izolovanou del(5q) a/nebo s del(5) a jednou další změnou rozdělených do tří skupin podle rozsahu del(5q). Pacienti s malým rozsahem del(5q) (zelená křivka) ($n=16$), středním rozsahem del(5q) (červená křivka) ($n=12$) a velkým rozsahem del(5q) (modrá křivka) ($n=12$). Rozdíl na hladině významnosti $p=0,05$ neprokázán jako statisticky významný ($p=0,54$).



Graf 8: Graf celkového přežití mezi třemi skupinami s různými rozsahy del(5q) v rámci skupiny s komplexními karyotypy. Pacienti s malým rozsahem del(5q) (zelená křivka) (n=9), středním rozsahem del(5q) (červená křivka) (n=7) a velkým rozsahem del(5q) (modrá křivka) (n=32). Rozdíl na hladině významnosti $p=0,05$ neprokázán jako statisticky významný ($p=0,52$).

Dále jsme testovali rozdíl v OS mezi skupinami nemocných s komplexními karyotypy, u kterých chromosom 5 vstupuje a u kterých nevstupuje do dalších aberací. Na hladině významnosti $p=0,05$ jsme odlišnost v OS nepotvrdili ($p=0,55$) (graf 9). Medián OS byl u obou skupin roven dvěma měsícům. Průměr OS byl ve skupině pacientů, kde chromosom 5 nevstupuje do dalších aberací 8,9 měsíců a ve skupině, kde chromosom 5 do dalších aberací vstupuje 5,3 měsíců.



Graf 9: Graf celkového přežití skupin pacientů s komplexními karyotypy, kde se chromosom 5 účastní (červená křivka) (n=20) a neúčastní (modrá křivka) (n=28) dalších nebalancovaných chromosomových přestaveb. Rozdíl na hladině významnosti $p=0,05$ neprokázán jako statisticky významný ($p=0,55$).

7 Diskuze

Jedním z nejdůležitějších prognostických faktorů u nemocných s myelodysplastickými syndromy (MDS) je karyotyp buněk kostní dřeně v době stanovení diagnózy. Nejčastější rekurentní cytogenetickou změnou pozorovanou u pacientů s MDS je intersticiální delece dlouhých ramen chromosomu 5, del(5q). Tato delece se může v karyotypu vyskytovat jako samostatná aberace nebo jako součást komplexního karyotypu. Dle aktuální WHO klasifikace je delece 5q jedinou aberací definující samostatný subtyp MDS, a to MDS s izolovanou del(5q) (Arber *et al.*, 2016). Nález izolované del(5q) je dle IPSS-R řazen do dobré prognostické kategorie, oproti tomu nález del(5q) v komplexním karyotypu je řazen do skupiny se špatnou prognózou (Greenberg *et al.*, 2012). Cílem předkládané diplomové práce bylo porovnat rozsah delece 5q mezi skupinou s izolovanou del(5q) a skupinou s komplexními karyotypy a zároveň posoudit možný vliv rozsahu delece na prognózu pacientů s MDS.

MDS je onemocnění vyskytující se zejména u starší populace se zvyšující se incidencí s narůstajícím věkem (Williamson *et al.*, 1994). Pacienti starší 60 let v našem souboru tvořili 92 % všech případů. Medián věku při diagnóze MDS je udáván mezi 70 a 76 lety (Greenberg *et al.*, 2012; Ma *et al.*, 2007; Schanz *et al.*, 2012; Sekeres *et al.*, 2008). V souladu s těmito daty jsme v našem souboru 88 pacientů pozorovali medián věku při diagnóze 75 let (v rozpětí od 42 let do 95,4 let). K rozvoji MDS dochází u většiny pacientů *de novo* a příčina rozvoje onemocnění u nich není známa. Takové případy označujeme jako primární MDS. Zhruba u 10 % pacientů dochází k rozvoji MDS v důsledku předchozí léčby – tj. sekundární MDS (Bowen, 2013; Ma *et al.*, 2007; Sekeres *et al.*, 2008). Stejně tak v našem souboru byly primární MDS nebo AML se změnami typickými pro MDS (MDS-related changes) diagnostikovány u 79 pacientů (89,8 %) a sekundární MDS u 9 pacientů (10,2 %).

MDS je obecně častěji diagnostikováno u mužů, výjimku tvoří skupina MDS s izolovanou delecí 5q, která se častěji vyskytuje u žen (Feurstein *et al.*, 2018; Giagounidis *et al.*, 2004; Greenberg *et al.*, 2012; Sekeres *et al.*, 2008). V celém našem souboru bylo celkem 56 žen (63,6 %) a 32 mužů (36,4 %), což vyšší incidenci MDS u mužů neodpovídá. Tento rozdíl je však velmi pravděpodobně způsoben nenáhodným výběrem pacientů v našem souboru, do kterého jsme zařadili pouze nemocné s prokázanou delecí dlouhých ramen chromosomu 5, přičemž u téměř třetiny z nich se del(5q) vyskytovala jako samostatná změna. MDS s izolovanou del(5q) jsme detekovali u 32 pacientů, 26 žen (81,2 %) a 6 mužů (18,8 %).

Izolovaná delece byla tedy v souladu s literárními údaji častěji prokázána u žen, v poměru 4,3:1.

Delece dlouhých ramen chromosomu 5 se v karyotypech vyskytuje buď jako samostatná změna nebo současně s dalšími aberacemi. MDS pacienti s izolovanou delecí 5q tvoří podle platné WHO klasifikace samostatnou klinickou skupinu s velmi dobrou prognózou. Podle literárních údajů mohou být do této kategorie řazeni i nemocní, kteří mají v karyotypu del(5q) a jednu další chromosomovou aberaci (kromě monosomie 7 nebo delece 7q) (Arber *et al.*, 2016). Při analýze celkového přežití v našem souboru jsme mezi pacienty se samostatnou delecí 5q a nemocnými s del(5q) a jednou další změnou nepozorovali statisticky významný rozdíl, proto jsme je v této studii rovněž spojili do jedné kategorie.

V případě detekce tří a více klonálních aberací hovoříme o tzv. komplexním karyotypu. Pacienti s komplexním karyotypem mají významně horší prognózu než pacienti s izolovanou del(5q) (Greenberg *et al.*, 2012; Haase *et al.*, 2007; Schanz *et al.*, 2012). Toto pozorování jsme v našem souboru potvrdili. Medián přežití pacientů s komplexním karyotypem byl pouze dva měsíce, zatímco u pacientů s izolovanou delecí 5q medián přežití nebyl dosažen (průměr přežití 28,8 měsíců).

Delece dlouhých ramen chromosomu 5 je nejčastější aberací pozorovanou v komplexních karyotypech pacientů s MDS. Jako další nejčastější rekurentními změny jsme detekovali aberace chromosomů 7 (n=27), 17 (n=25), 21 (n=18), 18 (n=18), 20 (n=17), 12 (n=16) a 11 (n=16), což je v souladu s daty v dostupné literatuře (Feurstein *et al.*, 2018; Schanz *et al.*, 2012; Zemanova *et al.*, 2014). Pro MDS jsou typické zejména nebalancované změny, jako jsou monosomie celých chromosomů, nebalancované translokace či delece (Haase *et al.*, 2007; Solé *et al.*, 2000). V našem souboru patřily k nejčastějším nebalancovaným aberacím monosomie chromosomů 7 (n=10), 16 (n=6), 13 (n=5) a 18 (n=5). Naopak u nemocných s AML jsou častěji nacházeny balancované přestavby jako jsou translokace, inserce a inverze nebo trisomie celých chromosomů, případně zmnožení celých chromosomových sad (triploidie/tetraploidie). V našem souboru jsme u pacientů, u kterých došlo k progresi MDS do AML, nejčastěji pozorovali trisomie chromosomů 8 (n=10), 22 (n=6), 21 (n=6) a 11 (n=5), což je v souladu s nálezy dalších autorů (Arber *et al.*, 2016; Chilton *et al.*, 2014; Mrózek, 2008).

Ve starších studiích byla u MDS kromě delecí 5q popisována i ztráta (monosomie) celého chromosomu 5. Novější studie využívající metody molekulární cytogenetiky však prokázaly, že pravá monosomie chromosomu 5 u MDS neexistuje (Jerez *et al.*, 2012; Zemanova *et al.*, 2014). Stejný závěr potvrzuje i tato diplomová práce, ve které nebyla monosomie chromosomu 5 detekována ani v jednom případě. U nemocných se suspektní monosomií chromosomu 5 detekovanou na základě konvenčního G-pruhování, jsme molekulárně cytogenetickými metodami prokázali, že část materiálu z deletovaného chromosomu 5 vždy zůstala zachována a v důsledku nebalancovaných translokací nebo inzercí byla přemístěna na jiné místo v genomu. Nepodařilo se nám však potvrdit špatnou prognózu nemocných s takto rozpadlým chromosomem 5, kterou v literatuře popisují někteří autoři (Tasaka *et al.*, 2008; Volkert *et al.*, 2014; Zemanova *et al.*, 2014). Důvodem byl zřejmě nižší počet pacientů s deletovaným chromosomem 5 vstupujícím do dalších přestaveb nebo se suspektní monosomií 5, což jsme v tomto souboru pozorovali pouze u 20 pacientů. Trend horšího celkového přežití těchto nemocných je však z našich dat jasně patrný (18 z 20 pacientů zemřelo). Podle publikovaných údajů do nebalancovaných přestaveb s deletovaným chromosomem 5 nejčastěji vstupují chromosomy 3, 7, 17 a 18 (Zemanova *et al.*, 2014). V našem souboru nebalancované translokace deletovaného chromosomu 5 nejčastěji zahrnovaly kromě výše zmíněných chromosomů 17 (n=3) a 7 (n=2) ještě chromosomy 2 (n=3), 4 (n=3), 12 (n=2) a 16 (n=2). Rozdíly jsou zřejmě opět způsobeny velikostí souboru pacientů.

Přestože mají pacienti s MDS a s izolovanou delecí 5q dobrou prognózu, může i u nich dojít v průběhu onemocnění ke kumulaci dalších genetických aberací, tj. k tzv. klonálnímu vývoji. Klonální vývoj je obvykle spojený s progresí onemocnění a s horší prognózou. Rozlišujeme lineární a divergentní klonální vývoj. V případě divergentního klonálního vývoje dochází k současnému rozvoji několika příbuzných heterogenních klonů různými chromosomovými aberacemi ve stejném vzorku. V této studii jsme divergentní klonální vývoj pozorovali celkem u 24 pacientů (Feurstein *et al.*, 2018; Neukirchen *et al.*, 2017). U většiny pacientů s divergentním klonálním vývojem byla delecce dlouhých ramen chromosomu 5 přítomna již v původním klonu, což je v souladu s názorem, že del(5q) je primární změnou u pacientů s MDS (Acha *et al.*, 2021; Nilsson *et al.*, 2007; Woll *et al.*, 2014). Některé studie však ukázaly, že primární aberací v hematopoetické buňce by mohla být mutace genu *TP53* či dalších genů jako například *DNMT3A* či *SF3B1*. Jelikož jsme neprováděli sekvenování těchto genů, nemůžeme potvrdit ani vyvrátit, že del(5q) je až následnou změnou. Stále se však ukazuje,

že delece 5q je velmi časnou aberací v procesu rozvoje MDS (Hosono *et al.*, 2016; Mossner *et al.*, 2016).

Nález dvou nezávislých klonů je poměrně vzácnou rekurentní změnou v karyotypech MDS pacientů. Tento nález je spojován se střední prognózou (Greenberg *et al.*, 2012). Nejčastějšími aberacemi vyskytujícími se vedle klonu s izolovanou del(5q) jsou trisomie chromosomu 8 či delece dlouhých ramen chromosomu 20, del(20q) (Han *et al.*, 2006). V našem souboru jsme pozorovali pouze jeden případ nezávislých klonů, kdy jsme v druhém klonu detekovali ztrátu chromosomu X.

IPSS-R mezi různými nálezy v nezávislých klonech nestanovuje rozdíl, ale podle práce Neuwirtové *et al.* (2018) je delece 5q spolu s trisomií 8 v nezávislých klonech asociována s velmi dobrou prognózou - podobnou prognóze pacientů s izolovanou del(5q). Oproti tomu nemocní, kteří mají obě aberace ve stejném klonu, a měli by tedy být řazeni do dobré prognostické kategorie izolované del(5q), splňují podle dalších klinických nálezů kritéria pro vysoce rizikové MDS (Neuwirtová *et al.*, 2018). Deleci dlouhých ramen chromosomu 5 současně s trisomií chromosomu 8 jsme ve stejném klonu detekovali u tří pacientů (OS 0,4; 2; 5,9 měsíců). U dvou z těchto pacientů jsme detekovali klonální vývoj, který má negativní vliv na prognózu. Jeden z těchto pacientů měl navíc v dalším klonu komplexní karyotyp, který je taktéž negativním prognostickým faktorem.

Velmi vzácně je v literatuře popisován současný výskyt subklonů s různým rozsahem delece 5q (Kroef *et al.*, 1997). V našem souboru jsme tento jev pozorovali u jednoho pacienta, u kterého jsme potvrdili nezávislé klony s rozsahy delece 5q13-5q34 a 5q21.2-5q34. Klon s větší delecí byl výrazně větší než klon s menším rozsahem delece (81,5 % versus 4,5 %). Menší delece se vyskytovala buď jako izolovaná del(5q) nebo současně s trisomií 8. Deleci s větším rozsahem jsme detekovali v klonu s komplexním karyotypem. Kroef *et al.* (1997) udává dvě možnosti vzniku tohoto jevu. Buď by se mohlo jednat o dvě nezávislé změny v genomu nebo by klon s větším rozsahem delece mohl vzniknout klonálním vývojem z původního klonu, kdy deletovaný chromosom vstupuje do dalších aberací. Výskyt delece většího rozsahu v klonu s komplexním karyotypem v tomto případě podporuje spíše druhou variantu.

Stejný pacient měl v klonu s komplexním karyotypem tetraploidní počet chromosomů. Tento nález jsme detekovali u dalších dvou nemocných. Tetraploidie je u pacientů s MDS

změnou, která je spojována s horší prognózou, kratším přežitím a častějším výskytem mutace genu *TP53* (Iyer *et al.*, 2004; Watanabe *et al.*, 2004). Pacienti jsou standardně řazeni do skupiny s komplexními karyotypy. Nové studie ale ukázaly, že tetraploidie bez aberací spojených se špatnou prognózou znamená lepší prognózu než výskyt komplexního karyotypu. Je tedy nutné přihlížet i k typu přítomných aberací v tetraploidním klonu (Lazarevic *et al.*, 2015; Pang *et al.*, 2015). Pacienti s tetraploidním počtem chromosomů a del(5q), u kterých byly detekovány další aberace, měli velmi krátkou dobu přežití; pouze 0,4 a 1,8 měsíce, což je ještě méně než u skupiny s komplexními karyotypy (kde byl medián přežití dva měsíce). Naopak pacient s tetraploidním nálezem a del(5q) bez dalších aberací měl dobu přežití 28,3 měsíce.

Na dlouhých ramenu chromosomu 5 byly popsány dvě společné deletované oblasti (CDR). Distální CDR 1 v oblasti 5q32-33 a proximální CDR 2 v oblasti 5q31.1-31.2. Delece CDR 1 nese minimální nutné geny pro rozvoj MDS a podle údajů v literatuře bývá spojována s rozvojem MDS s izolovanou del(5q) a s nízkým rizikem. Byla definována na základě konvenčního pruhování u malého počtu pacientů, kteří mají pouze tuto malou delecí. Delece CDR 2 bývá často naopak spojována s vysoce rizikovými MDS a AML. Většina pacientů (~95 %) má však deletované obě oblasti (Boultwood *et al.*, 1994, 2002; Lai *et al.*, 2001; Le Beau *et al.*, 1993; Zhao *et al.*, 1997). Stejně tomu bylo v našem souboru, kde měli obě oblasti deletovány téměř všichni pacienti.

Jerez *et al.* (2012) definoval kromě CDR u skupiny pacientů s 5q- syndromem dvě společně zachované oblasti (CRR). CRR 1 definoval jako oblast od centromery k pruhu 5q14.2 a CRR 2 jako oblast od pruhu 5q34 k telomeře. Prokázal spojitost mezi delecí těchto oblastí (a tedy obecně mezi rozsáhlejší delecí zahrnující krátká i dlouhá ramena chromosomu 5) a výskytem komplexního karyotypu. Pacienti s deletovanými CRR měli horší prognózu a vyšší pravděpodobnost progresu do AML. Dále La Starza *et al.* (2010) pozorovali pacienty s mutací a s haploinsuficiencí genu *NPM1*, který se nachází v terminální oblasti dlouhých ramen chromosomu 5 (pruh 5q35). Tzn. v oblasti CRR 2, jak ji definoval Jerez *et al.* (2012). Pacienti s mutací genu *NPM1* měli významně lepší prognózu než pacienti s jeho haploinsuficiencí. To znamená, že špatná prognóza plyne spíše z delecce terminálních částí chromosomu 5, než ze samotné mutace genu *NPM1*. Volkert *et al.* (2014) dále prokázali, že nebalancované translokace zahrnující chromosom 5, kdy je deletována terminální oblast chromosomu 5, jsou asociovány s komplexním karyotypem, mutací genu *TP53* a špatnou

prognózou. Tyto a další studie (Nofrini *et al.*, 2012; Zemanova *et al.*, 2018) tedy mimo jiné prokázali souvislost mezi velkým rozsahem del(5q), přítomností komplexního karyotypu a horší prognózou onemocnění. Avšak vztahy a posloupnost mezi jednotlivými faktory nejsou zcela upřesněny.

V této studii jsme pozorovali CRR pouze ve skupině s izolovanou del(5q) nebo s delecí 5q a jednou další změnou, kde tato oblast pokrývala celá krátká ramena chromosomu 5. Nemůžeme tak potvrdit nález CRR 1 a 2, definovaných dle Jerez *et al.* (2012). Nepotvrdili jsme ani nález CRR popsán u nemocných s komplexními karyotypy v práci Zemanova *et al.* (2014), kteří detekovali CCR v oblasti 5p11.1–p14.2, protože v našem souboru byl jeden pacient s delecí zahrnující celá krátká ramena chromosomu 5.

Nejčastější zlomová místa zahrnovala pruhy 5q33.3 (n=34), 5q14.1 (n=32), 5q34 (n=24) a 5q13.3 (n=10). Nejčastěji prokázaná delece byla v oblasti 5q14.1-5q33.3 (n=19). Naše nálezy odpovídají předchozím studiím, odchylky ve frekvenci jsou zřejmě způsobeny různým výběrem datasetů a použitím odlišných metod (Bystricka *et al.*, 2012; Mallo *et al.*, 2013; Royer-Pokora *et al.*, 2006; Zemanova *et al.*, 2014, 2018). Dle rozsahu delece jsme skupinu pacientů rozdělili do tří kategorií. Do skupiny s delecí menšího rozsahu jsme zařadili pacienty, kteří měli deletovaný menší segment než u nejčastěji pozorované delece (5q14.1-5q33.3). Pacienti s delecí 5q14.1-5q33.3 tvořili skupinu se středním rozsahem a pacienti s větší delecí tvořili skupinu s velkým rozsahem delece. Jelikož Jerez *et al.* (2012) určil hranici CRR 1 pruhem 5q14.2 a CRR 2 pruhem 5q34, můžeme předpokládat, že se jedná o podobnou skupinu pacientů.

Stejně jako předchozí studie jsme pozorovali vztah mezi rozsahem del(5q) a výskytem komplexního karyotypu. Po rozdělení rozsahů del(5q) na tři skupiny tvořila kategorie s velkým rozsahem delece 69,6 % (n=32) případů s komplexními karyotypy, ale pouze 29,3 % (n=12) případů s izolovanou del(5q). Delece 5q s malým rozsahem tvořila 17,4 % (n=9) případů s komplexními karyotypy a 41,4 % (n=16) případů s izolovanou del(5q). Také statistickými korelačními testy jsme mezi těmito faktory prokázali závislost.

Na základě prokázané závislosti je však nutné dále analyzovat, do jaké míry přispívá ke zhoršené prognóze rozsah delece 5q a do jaké míry výskyt komplexního karyotypu. Když jsme testovali vliv rozsahu delece pouze v rámci skupiny izolované del(5q) a v rámci skupiny s komplexním karyotypem (čímž jsme odstranili faktor komplexity), vliv rozsahu

nebyl statisticky významný. Následné testování Coxovou vícerozměrnou regresní analýzou potvrdilo stejný závěr a jako signifikantní proměnou ovlivňující přežití označilo pouze výskyt komplexního karyotypu.

Z naší studie vyplývá souvislost mezi rozsahem del(5q) a komplexními karyotypy, které jsou hlavním negativním prognostickým faktorem ovlivňujícím celkové přežití pacientů s MDS. Samotný rozsah delecce 5q tak již v těchto případech významně nepřispívá k porozumění celkového stavu a prognózy pacienta. Tím jsme byli schopni objasnit, proč práce, které studovaly pouze skupinu s izolovanou del(5q), vliv rozsahu delecce neprokázaly. A naopak, proč práce pracující se všemi skupinami MDS a s různými rozsahy del(5q) zahrnujícími komplexní i nekomplexní karyotypy, vliv rozsahu del(5q) pozorovaly (Fenaux *et al.*, 2009; Giagounidis *et al.*, 2004; Jerez *et al.*, 2012; Stengel *et al.*, 2016). Objasnění a popsání tohoto vztahu je důležitým přínosem této diplomové práce.

V našem modelu je několik výjimek z pravidla, které je nutno objasnit dalším výzkumem. Ve skupině s izolovanou del(5q) se objevují případy s velkým rozsahem delecce. Otázkou tedy je, proč mají tito pacienti s velkým rozsahem delecce izolovanou del(5q) a ne komplexní karyotyp. Možným vysvětlením je, že u těchto pacientů ještě nedošlo k rozvoji komplexního karyotypu a progresi onemocnění. Tyto pacienty je proto nezbytné nadále sledovat. Druhým možným vysvětlením je přítomnost dalšího faktoru, který ovlivňuje rozvoj komplexních karyotypů. Jejich výskyt byl například opakovaně prokázán ve spojitosti s mutací genu *TP53*. Analýza mutačního stavu genu *TP53* a dalších významných genů u dostatečně velkých souborů s využitím moderních sekvenačních technik je proto pro přesné stanovení prognózy pacientů s MDS velmi důležitá.

Kombinací metod klasické cytogenetické a molekulární cytogenetické analýzy jsme studovali nebalancované aberace chromosomu 5 u rozsáhlého souboru pacientů s MDS. Prokázali jsme souvislost mezi rozsahem delecce dlouhých ramen chromosomu 5 a výskytem komplexních karyotypů a definovali jsme vliv jednotlivých proměnných na celkové přežití nemocných. Tím jsme přispěli k lepšímu pochopení patogeneze MDS.

8 Závěr

Nejčastější chromosomovou změnou v genomu pacientů s myelodysplastickými syndromy (MDS) je delece dlouhých ramen chromosomu 5, del(5q). Jako izolovaná změna v karyotypu je spojována s dobrou prognózou, naopak jako součást komplexního karyotypu je spjata s prognózou špatnou. Mezinárodní prognostický skórovací systém IPSS-R zohledňuje pouze přítomnost dalších změn, ale ne rozsah delece chromosomu 5 (Greenberg *et al.*, 2012). Přesto několik autorů popsalo souvislost mezi velkým rozsahem delece a špatnou prognózou (Jerez *et al.*, 2012; La Starza *et al.*, 2010; Volkert *et al.*, 2014; Zemanova *et al.*, 2018). Cílem této diplomové práce bylo zkoumat nebalancované aberace chromosomu 5, ověřit dříve popsané rozdíly mezi rozsahem delece u skupiny s izolovanou del(5q) a del(5q) v komplexních karyotypech a popsat vliv rozsahu delece na prognózu pacientů.

Deleci 5q jsme studovali u 88 nemocných s MDS. V karyotypech jsme del(5q) nacházeli izolovaně, s jednou další klonální aberací nebo jako součást komplexních karyotypů. Stejně jako další autoři jsme nepozorovali rozdíl v přežití mezi pacienty s izolovanou del(5q) a del(5q) s jednou další aberací (kromě aberací zahrnujících chromosom 7). Proto jsme obě kategorie sloučili. Mezi skupinou s izolovanou delecí 5q a delecí 5q v komplexních karyotypech jsme prokázali statisticky významný rozdíl v celkovém přežití. Mezi skupinami se také lišil rozsah delece 5q - velký rozsah delece byl častější u skupiny pacientů s komplexními karyotypy, malý rozsah delece byl častější u skupiny s izolovanou del(5q). Na základě závislosti mezi rozsahem delece a výskytem komplexního karyotypu jsme zkoumali vliv jednotlivých faktorů na prognózu nemocných. Coxovou vícerozměrnou regresní analýzou, která zahrnovala jak rozsah delece, tak výskyt komplexních karyotypů, jsme prokázali, že téměř veškerou variabilitu v přežití pacientů vysvětluje proměnná komplexních karyotypů.

Výsledky naší studie potvrdily dříve popsanou souvislost mezi rozsahem delece 5q a komplexními karyotypy. Komplexita karyotypu představuje hlavní negativní prognostický faktor ovlivňující celkové přežití pacientů s MDS. Přímý prognostický vliv rozsahu delece 5q jsme neprokázali. Výsledky této práce proto ukazují, že v rámci běžné rutinní diagnostiky nemá v současné době význam analyzovat rozsah delece 5q. Dalším výzkumem však bude nutné objasnit, zda pacienti s izolovanou delecí 5q velkého rozsahu nemají zvýšené riziko klonálního vývoje a vzniku komplexních karyotypů, případně jak toto riziko souvisí s dalšími prognostickými faktory jako např. s mutací genu *TP53* či mutacemi dalších kandidátních genů.

9 Seznam použité literatury

Acha, P., Palomo, L., Fuster-Tormo, F., Xicoy, B., Mallo, M., Manzanares, A., Grau, J., Marcé, S., Granada, I., Rodríguez-Luaces, M., *et al.* (2021). Analysis of Intratumoral Heterogeneity in Myelodysplastic Syndromes with Isolated del(5q) Using a Single Cell Approach. *Cancers* 13, 841.

Adès, L., Boehrer, S., Prebet, T., Beyne-Rauzy, O., Legros, L., Ravoet, C., Dreyfus, F., Stamatoullas, A., Pierre Chaury, M., Delaunay, J., *et al.* (2009). Efficacy and safety of lenalidomide in intermediate-2 or high-risk myelodysplastic syndromes with 5q deletion: results of a phase 2 study. *Blood* 113, 3947–3952.

Aguayo, A., Kantarjian, H., Manshouri, T., Gidel, C., Estey, E., Thomas, D., Koller, C., Estrov, Z., O'Brien, S., Keating, M., *et al.* (2000). Angiogenesis in acute and chronic leukemias and myelodysplastic syndromes. *Blood* 96, 2240–2245.

Aleshin, A., Greenberg, P.L. (2018). Molecular pathophysiology of the myelodysplastic syndromes: insights for targeted therapy. *Blood Adv.* 2, 2787–2797.

Arber, D.A., Orazi, A., Hasserjian, R., Thiele, J., Borowitz, M.J., Le Beau, M.M., Bloomfield, C.D., Cazzola, M., Vardiman, J.W. (2016). The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 127, 2391–2405.

Auten, R.L., Davis, J.M. (2009). Oxygen Toxicity and Reactive Oxygen Species: The Devil Is in the Details. *Pediatr. Res.* 66, 121–127.

Barlow, J.L., Drynan, L.F., Hewett, D.R., Holmes, L.R., Lorenzo-Abalde, S., Lane, A.L., Jolin, H.E., Pannell, R., Middleton, A.J., Wong, S.H., *et al.* (2010). A p53-dependent mechanism underlies macrocytic anemia in a mouse model of human 5q- syndrome. *Nat. Med.* 16, 59–66.

Beier, F., Masouleh, B.K., Buesche, G., Ventura Ferreira, M.S., Schneider, R.K., Ziegler, P., Wilop, S., Vankann, L., Gattermann, N., Platzbecker, U., *et al.* (2015). Telomere dynamics in patients with del (5q) MDS before and under treatment with lenalidomide. *Leuk. Res.* 39, 1292–1298.

Bejar, R., Steensma, D.P. (2014). Recent developments in myelodysplastic syndromes. *Blood* 124, 2793–2803.

Bejar, R., Stevenson, K., Abdel-Wahab, O., Galili, N., Nilsson, B., Garcia-Manero, G., Kantarjian, H., Raza, A., Levine, R.L., Neuberg, D., *et al.* (2011). Clinical Effect of Point Mutations in Myelodysplastic Syndromes. *N. Engl. J. Med.* 364, 2496–2506.

Belickova, M., Vesela, J., Jonasova, A., Pejsova, B., Votavova, H., Merkerova, M.D., Zemanova, Z., Brezinova, J., Mikulenkova, D., Lauermannova, M., *et al.* (2016). TP53 mutation variant allele frequency is a potential predictor for clinical outcome of patients with lower-risk myelodysplastic syndromes. *Oncotarget* 7, 36266–36279.

Bělohávková, P. (2021). Treatment strategies for myelodysplastic syndrome in 2021. *Vnitř. Lékařství* 67, 150–155.

- Benchimol, S., Lamb, P., Crawford, L.V., Sheer, D., Shows, T.B., Bruns, G.A.P., Peacock, J. (1985). Transformation associated p53 protein is encoded by a gene on human chromosome 17. *Somat. Cell Mol. Genet.* *11*, 505–510.
- Bennett, J.M., Catovsky, D., Daniel, M.-T., Flandrin, G., Galton, D. a. G., Gralnick, H.R., Sultan, C. (1976). Proposals for the Classification of the Acute Leukaemias French-American-British (FAB) Co-operative Group. *Br. J. Haematol.* *33*, 451–458.
- Bennett, J.M., Catovsky, D., Daniel, M.T., Flandrin, G., Galton, D. a. G., Gralnick, H.R., Sultan, C. (1982). Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Br. J. Haematol.* *51*, 189–199.
- Bernard, E., Nannya, Y., Hasserjian, R.P., Devlin, S.M., Tuechler, H., Medina-Martinez, J.S., Yoshizato, T., Shiozawa, Y., Saiki, R., Malcovati, L., *et al.* (2020). Implications of TP53 allelic state for genome stability, clinical presentation and outcomes in myelodysplastic syndromes. *Nat. Med.* *26*, 1549–1556.
- Bernasconi, P., Klersy, C., Boni, M., Cavigliano, P.M., Calatroni, S., Giardini, I., Rocca, B., Zappatore, R., Caresana, M., Quarna, J., *et al.* (2005). Incidence and prognostic significance of karyotype abnormalities in de novo primary myelodysplastic syndromes: a study on 331 patients from a single institution. *Leukemia* *19*, 1424–1431.
- Bernasconi, P., Klersy, C., Boni, M., Cavigliano, P.M., Giardini, I., Rocca, B., Zappatore, R., Dambrosio, I., Calvello, C., Caresana, M., *et al.* (2010). Does cytogenetic evolution have any prognostic relevance in myelodysplastic syndromes? A study on 153 patients from a single institution. *Ann. Hematol.* *89*, 545–551.
- Bewersdorf, J.P., Zeidan, A.M. (2020). Management of higher risk myelodysplastic syndromes after hypomethylating agents failure: are we about to exit the black hole? *Expert Rev. Hematol.* *13*, 1131–1142.
- Bontkes, H.J., Ruben, J.M., Alhan, C., Westers, T.M., Ossenkoppele, G.J., van de Loosdrecht, A.A. (2012). Azacitidine differentially affects CD4pos T-cell polarization in vitro and in vivo in high risk myelodysplastic syndromes. *Leuk. Res.* *36*, 921–930.
- Boulwood, J., Fidler, C., Lewis, S., Kelly, S., Sheridan, H., Littlewood, T.J., Buckle, V.J., Wainscoat, J.S. (1994). Molecular Mapping of Uncharacteristically Small 5q Deletions in Two Patients with the 5q- Syndrome: Delineation of the Critical Region on 5q and Identification of a 5q- Breakpoint. *Genomics* *19*, 425–432.
- Boulwood, J., Fidler, C., Strickson, A.J., Watkins, F., Gama, S., Kearney, L., Tosi, S., Kasprzyk, A., Cheng, J.-F., Jaju, R.J., *et al.* (2002). Narrowing and genomic annotation of the commonly deleted region of the 5qX syndrome. *99*, 4.
- Boulwood, J., Pellagatti, A., Cattani, H., Lawrie, C.H., Giagounidis, A., Malcovati, L., Della Porta, M.G., Jädersten, M., Killick, S., Fidler, C., *et al.* (2007). Gene expression profiling of CD34+ cells in patients with the 5q- syndrome. *Br. J. Haematol.* *139*, 578–589.
- Boulwood, J., Pellagatti, A., McKenzie, A.N.J., Wainscoat, J.S. (2010). Advances in the 5q- syndrome. *Blood* *116*, 5803–5811.

- Bowen, D.T. (2013). Occupational and environmental etiology of MDS. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* *26*, 319–326.
- Braun, T., de Botton, S., Taksin, A.-L., Park, S., Beyne-Rauzy, O., Coiteux, V., Sapena, R., Lazareth, A., Leroux, G., Guenda, K., *et al.* (2011). Characteristics and outcome of myelodysplastic syndromes (MDS) with isolated 20q deletion: a report on 62 cases. *Leuk. Res.* *35*, 863–867.
- Brychtová, V., Valík, D., Vojtěšek, B. (2018). Variability of Solid Cancer Cell Population and Its Consequences for Cancer Diagnostics and Treatment. *Klin. Onkol.* *31*, 2S5-2S13.
- Bystricka, D., Sarova, I., Zemanova, Z., Brezinova, J., Lizcova, L., Izakova, S., Merkerova, M.D., Krejčík, Z., Siskova, M., Jonasova, A., *et al.* (2012). Recurrent chromosomal breakpoints in patients with myelodysplastic syndromes and complex karyotype versus fragile sites. *Leuk. Res.* *36*, e125–e127.
- Caceres, G., McGraw, K., Yip, B.H., Pellagatti, A., Johnson, J., Zhang, L., Liu, K., Zhang, L.M., Fulp, W.J., Lee, J.-H., *et al.* (2013). TP53 suppression promotes erythropoiesis in del(5q) MDS, suggesting a targeted therapeutic strategy in lenalidomide-resistant patients. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *110*, 16127–16132.
- Cervinek, L. (2015). Myelodysplasticky syndrom. *Oncology* *9*, 112–118.
- Cogle, C.R. (2015). Incidence and Burden of the Myelodysplastic Syndromes. *Curr. Hematol. Malig. Rep.* *10*, 272–281.
- Conze, D.B., Wu, C.-J., Thomas, J.A., Landstrom, A., Ashwell, J.D. (2008). Lys63-Linked Polyubiquitination of IRAK-1 Is Required for Interleukin-1 Receptor- and Toll-Like Receptor-Mediated NF- κ B Activation. *Mol. Cell. Biol.* *28*, 3538–3547.
- Corral, L.G., Haslett, P.A.J., Muller, G.W., Chen, R., Wong, L.-M., Ocampo, C.J., Patterson, R.T., Stirling, D.I., Kaplan, G. (1999). Differential Cytokine Modulation and T Cell Activation by Two Distinct Classes of Thalidomide Analogues That Are Potent Inhibitors of TNF- α . *J. Immunol.* *163*, 380–386.
- Cortelezzi, A., Fracchiolla, N.S., Mazzeo, L.M., Silvestris, I., Pomati, M., Somalvico, F., Bertolini, F., Mancuso, P., Pruneri, G.C., Gianelli, U., *et al.* (2005). Endothelial precursors and mature endothelial cells are increased in the peripheral blood of myelodysplastic syndromes. *Leuk. Lymphoma* *46*, 1345–1351.
- Da Silva-Coelho, P., Kroeze, L.I., Yoshida, K., Koorenhof-Scheele, T.N., Knops, R., van de Locht, L.T., de Graaf, A.O., Massop, M., Sandmann, S., Dugas, M., *et al.* (2017). Clonal evolution in myelodysplastic syndromes. *Nat. Commun.* *8*, 1-11.
- Dixon, S.J., Lemberg, K.M., Lamprecht, M.R., Skouta, R., Zaitsev, E.M., Gleason, C.E., Patel, D.N., Bauer, A.J., Cantley, A.M., Yang, W.S., *et al.* (2012). Ferroptosis: An Iron-Dependent Form of Non-Apoptotic Cell Death. *Cell* *149*, 1060–1072.
- Dredge, K., Horsfall, R., Robinson, S.P., Zhang, L.-H., Lu, L., Tang, Y., Shirley, M.A., Muller, G., Schafer, P., Stirling, D., *et al.* (2005). Orally administered lenalidomide (CC-5013) is anti-angiogenic in vivo and inhibits endothelial cell migration and Akt phosphorylation in vitro. *Microvasc. Res.* *69*, 56–63.

- Dutt, S., Narla, A., Lin, K., Mullally, A., Abayasekara, N., Megerdichian, C., Wilson, F.H., Currie, T., Khanna-Gupta, A., Berliner, N., *et al.* (2011). Haploinsufficiency for ribosomal protein genes causes selective activation of p53 in human erythroid progenitor cells. *Blood* *117*, 2567–2576.
- Ebert, B.L. (2009). Deletion 5q in myelodysplastic syndrome: a paradigm for the study of hemizygous deletions in cancer. *Leukemia* *23*, 1252–1256.
- Ebert, B.L. (2011). Molecular dissection of the 5q deletion in myelodysplastic syndrome. *Semin. Oncol.* *38*, 621–626.
- Ebert, B.L., Pretz, J., Bosco, J., Chang, C.Y., Tamayo, P., Galili, N., Raza, A., Root, D.E., Attar, E., Ellis, S.R., *et al.* (2008). Identification of RPS14 as a 5q- syndrome gene by RNA interference screen. *Nature* *451*, 335–339.
- Fang, J., Liu, X., Bolanos, L., Barker, B., Rigolino, C., Cortelezzi, A., Oliva, E.N., Cuzzola, M., Grimes, H.L., Fontanillo, C., *et al.* (2016). A calcium- and calpain-dependent pathway determines the response to lenalidomide in myelodysplastic syndromes. *Nat. Med.* *22*, 727–734.
- Fenaux, P., Mufti, G.J., Hellstrom-Lindberg, E., Santini, V., Finelli, C., Giagounidis, A., Schoch, R., Gattermann, N., Sanz, G., List, A., *et al.* (2009). Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomised, open-label, phase III study. *Lancet Oncol.* *10*, 223–232.
- Feurstein, S., Thomay, K., Hofmann, W., Buesche, G., Kreipe, H., Thol, F., Heuser, M., Ganser, A., Schlegelberger, B., Göhring, G. (2018). Routes of Clonal Evolution into Complex Karyotypes in Myelodysplastic Syndrome Patients with 5q Deletion. *Int. J. Mol. Sci.* *19*, 1-10.
- Fidler, C., Watkins, F., Bowen, D., Littlewood, T., Wainscoat, J., Boultonwood, J. (2004). NRAS, FLT3 and TP53 mutations in patients with myelodysplastic syndrome and a del(5q). *Haematologica* *89*, 865–866.
- Fumagalli, S., Di Cara, A., Neb-Gulati, A., Natt, F., Schwemberger, S., Hall, J., Babcock, G.F., Bernardi, R., Pandolfi, P.P., Thomas, G. (2009). Absence of nucleolar disruption after impairment of 40S ribosome biogenesis reveals an rpL11-translation-dependent mechanism of p53 induction. *Nat. Cell Biol.* *11*, 501–508.
- Galán-Díez, M., Cuesta-Domínguez, Á., Kousteni, S. (2018). The Bone Marrow Microenvironment in Health and Myeloid Malignancy. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* *8*, 1-18.
- Galván, A.B., Mallo, M., Arenillas, L., Salido, M., Espinet, B., Pedro, C., Florensa, L., Serrano, S., Solé, F. (2010). Does monosomy 5 really exist in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia? *Leuk. Res.* *34*, 1242–1245.
- Giagounidis, A. a. N., Germing, U., Haase, S., Hildebrandt, B., Schlegelberger, B., Schoch, C., Wilkens, L., Heinsch, M., Willems, H., Aivado, M., *et al.* (2004). Clinical, morphological, cytogenetic, and prognostic features of patients with myelodysplastic syndromes and del(5q) including band q31. *Leukemia* *18*, 113–119.

- Görgün, G., Calabrese, E., Soydan, E., Hideshima, T., Perrone, G., Bandi, M., Cirstea, D., Santo, L., Hu, Y., Tai, Y.-T., *et al.* (2010). Immunomodulatory effects of lenalidomide and pomalidomide on interaction of tumor and bone marrow accessory cells in multiple myeloma. *Blood* *116*, 3227–3237.
- Greenberg, P., Cox, C., LeBeau, M.M., Fenaux, P., Morel, P., Sanz, G., Sanz, M., Vallespi, T., Hamblin, T., Oscier, D., *et al.* (1997). International Scoring System for Evaluating Prognosis in Myelodysplastic Syndromes. *Blood* *89*, 2079–2088.
- Greenberg, P.L., Tuechler, H., Schanz, J., Sanz, G., Garcia-Manero, G., Solé, F., Bennett, J.M., Bowen, D., Fenaux, P., Dreyfus, F., *et al.* (2012). Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood* *120*, 2454–2465.
- Grisendi, S., Bernardi, R., Rossi, M., Cheng, K., Khandker, L., Manova, K., Pandolfi, P.P. (2005). Role of nucleophosmin in embryonic development and tumorigenesis. *Nature* *437*, 147–153.
- Haase, D., Germing, U., Schanz, J., Pfeilstöcker, M., Nösslinger, T., Hildebrandt, B., Kundgen, A., Lübbert, M., Kunzmann, R., Giagounidis, A.A.N., *et al.* (2007). New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: evidence from a core dataset of 2124 patients. *Blood* *110*, 4385–4395.
- Haase, D., Stevenson, K.E., Neuberg, D., Maciejewski, J.P., Nazha, A., Sekeres, M.A., Ebert, B.L., Garcia-Manero, G., Haferlach, C., Haferlach, T., *et al.* (2019). TP53 mutation status divides myelodysplastic syndromes with complex karyotypes into distinct prognostic subgroups. *Leukemia* *33*, 1747–1758.
- Haferlach, T., Nagata, Y., Grossmann, V., Okuno, Y., Bacher, U., Nagae, G., Schnittger, S., Sanada, M., Kon, A., Alpermann, T., *et al.* (2014). Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia* *28*, 241–247.
- Hafner, A., Bulyk, M.L., Jambhekar, A., Lahav, G. (2019). The multiple mechanisms that regulate p53 activity and cell fate. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *20*, 199–210.
- Han, J.-Y., Theil, K.S., Hoeltge, G. (2006). Frequencies and characterization of cytogenetically unrelated clones in various hematologic malignancies: seven years of experiences in a single institution. *Cancer Genet. Cytogenet.* *164*, 128–132.
- Hasle, H. (1994). Myelodysplastic Syndromes in Childhood—Classification, Epidemiology, and Treatment. *Leuk. Lymphoma* *13*, 11–26.
- Hasle, H., Alonzo, T.A., Auvrignon, A., Behar, C., Chang, M., Creutzig, U., Fischer, A., Forestier, E., Fynn, A., Haas, O.A., *et al.* (2007). Monosomy 7 and deletion 7q in children and adolescents with acute myeloid leukemia: an international retrospective study. *Blood* *109*, 4641–4647.
- Herry, A., Douet-Guilbert, N., Morel, F., Le Bris, M.-J., De Braekeleer, M. (2007). Redefining monosomy 5 by molecular cytogenetics in 23 patients with MDS/AML. *Eur. J. Haematol.* *78*, 457–467.
- Hodge, D.R., Li, D., Qi, S.M., Farrar, W.L. (2002). IL-6 Induces Expression of the Fli-1 Proto-oncogene via STAT3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *292*, 287–291.

- Horrigan, S.K., Arbieva, Z.H., Xie, H.Y., Kravarusic, J., Fulton, N.C., Naik, H., Le, T.T., Westbrook, C.A. (2000). Delineation of a minimal interval and identification of 9 candidates for a tumor suppressor gene in malignant myeloid disorders on 5q31. *Blood* 95, 2372–2377.
- Hosono, N., Makishima, H., Mahfouz, R., Przychodzen, B., Yoshida, K., Jerez, A., LaFramboise, T., Polprasert, C., Clemente, M.J., Shiraishi, Y., *et al.* (2016). Recurrent genetic defects on chromosome 5q in myeloid neoplasms. *Oncotarget* 8, 6483–6495.
- Huart, A.-S., MacLaine, N.J., Meek, D.W., Hupp, T.R. (2009). CK1 α Plays a Central Role in Mediating MDM2 Control of p53 and E2F-1 Protein Stability. *J. Biol. Chem.* 284, 32384–32394.
- Hwang, S.M., Kim, S.Y., Kim, J.A., Park, H.-S., Park, S.N., Im, K., Kim, K., Kim, S.-M., Lee, D.S. (2016). Short telomere length and its correlation with gene mutations in myelodysplastic syndrome. *J. Hematol. Oncol.* *J Hematol Oncol* 9, 62.
- Chiabrando, D., Vinchi, F., Fiorito, V., Mercurio, S., Tolosano, E. (2014). Heme in pathophysiology: a matter of scavenging, metabolism and trafficking across cell membranes. *Front. Pharmacol.* 5, 1-24.
- Chilton, L., Hills, R.K., Harrison, C.J., Burnett, A.K., Grimwade, D., Moorman, A.V. (2014). Hyperdiploidy with 49-65 chromosomes represents a heterogeneous cytogenetic subgroup of acute myeloid leukemia with differential outcome. *Leukemia* 28, 321–328.
- Christiansen, D., Andersen, M., Pedersen-Bjergaard, J. (2001). Mutations With Loss of Heterozygosity of p53 Are Common in Therapy-Related Myelodysplasia and Acute Myeloid Leukemia After Exposure to Alkylating Agents and Significantly Associated With Deletion or Loss of 5q, a Complex Karyotype, and a Poor Prognosis. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 19, 1405–1413.
- Iyer, R.V., Sait, S.N.J., Matsui, S.-I., Block, A.W., Barcos, M., Slack, J.L., Wetzler, M., Baer, M.R. (2004). Massive hyperdiploidy and tetraploidy in acute myelocytic leukemia and myelodysplastic syndrome. *Cancer Genet. Cytogenet.* 148, 29–34.
- Jädersten, M., Saft, L., Smith, A., Kulasekararaj, A., Pomplun, S., Göhring, G., Hedlund, A., Hast, R., Schlegelberger, B., Porwit, A., *et al.* (2011). TP53 mutations in low-risk myelodysplastic syndromes with del(5q) predict disease progression. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 29, 1971–1979.
- Jasek, M., Gondek, L.P., Bejanyan, N., Tiu, R., Huh, J., Theil, K.S., O’Keefe, C., McDevitt, M.A., MacLewski, J.P. (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, 216–219.
- Jerez, A., Gondek, L.P., Jankowska, A.M., Makishima, H., Przychodzen, B., Tiu, R.V., O’Keefe, C.L., Mohamedali, A.M., Batista, D., Sekeres, M.A., *et al.* (2012). Topography, Clinical, and Genomic Correlates of 5q Myeloid Malignancies Revisited. *J. Clin. Oncol.* 30, 1343–1349.
- Jiang, L., Kon, N., Li, T., Wang, S., Su, T., Hibshoosh, H., Baer, R., Gu, W. (2015). Ferroptosis as a p53-mediated activity during tumour suppression. *Nature* 520, 57–62.

- Jonasova, A., Neuwirtova, R., Polackova, H., Siskova, M., Stopka, T., Cmunt, E., Belickova, M., Moudra, A., Minarik, L., Fuchs, O., *et al.* (2018). Lenalidomide treatment in lower risk myelodysplastic syndromes-The experience of a Czech hematology center. (Positive effect of erythropoietin ± prednisone addition to lenalidomide in refractory or relapsed patients). *Leuk. Res.* *69*, 12–17.
- Joslin, J.M., Fernald, A.A., Tennant, T.R., Davis, E.M., Kogan, S.C., Anastasi, J., Crispino, J.D., Le Beau, M.M. (2007). Haploinsufficiency of EGR1, a candidate gene in the del(5q), leads to the development of myeloid disorders. *Blood* *110*, 719–726.
- Kawai, T., Akira, S. (2007). TLR signaling. *Semin. Immunol.* *19*, 24–32.
- Keerthivasan, G., Mei, Y., Zhao, B., Zhang, L., Harris, C.E., Gao, J., Basiorka, A.A., Schipma, M.J., McElherne, J., Yang, J., *et al.* (2014). Aberrant overexpression of CD14 on granulocytes sensitizes the innate immune response in mDial heterozygous del(5q) MDS. *Blood* *124*, 780–790.
- Kishimoto, T. (2005). Interleukin-6: from basic science to medicine-40 years in immunology. *Annu. Rev. Immunol.* *23*, 1–21.
- Knudson, A.G. (1971). Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *68*, 820–823.
- Kode, A., Manavalan, J.S., Mosialou, I., Bhagat, G., Rathinam, C.V., Luo, N., Khiabani, H., Lee, A., Vundavalli, M., Friedman, R., *et al.* (2014). Leukemogenesis Induced by an Activating β -catenin mutation in Osteoblasts. *Nature* *506*, 240–244.
- Kode, A., Mosialou, I., Manavalan, S.J., Rathinam, C.V., Friedman, R.A., Teruya-Feldstein, J., Bhagat, G., Berman, E., Kousteni, S. (2016). FoxO1-Dependent Induction of Acute Myeloid Leukemia by Osteoblasts in Mice. *Leukemia* *30*, 1–13.
- Kotla, V., Goel, S., Nischal, S., Heuck, C., Vivek, K., Das, B., Verma, A. (2009). Mechanism of action of lenalidomide in hematological malignancies. *J. Hematol. Oncol.* *2*, 36.
- Kroef, M., Bolk, M., Muus, P., Wessels, J., Beverstock, G., Willemze, R., Landegent, J. (1997). Mosaicism of the 5q deletion as assessed by interphase FISH is a common phenomenon in MDS and restricted to myeloid cells. *Leukemia* *11*, 519–523.
- Krönke, J., Fink, E.C., Hollenbach, P.W., MacBeth, K.J., Hurst, S.N., Udeshi, N.D., Chamberlain, P.P., Mani, D.R., Man, H.W., Gandhi, A.K., *et al.* (2015). Lenalidomide induces ubiquitination and degradation of CK1 α in del(5q) MDS. *Nature* *523*, 183–188.
- Kulasekararaj, A.G., Smith, A.E., Mian, S.A., Mohamedali, A.M., Krishnamurthy, P., Lea, N.C., Gäken, J., Pennaneach, C., Ireland, R., Czepulkowski, B., *et al.* (2013). TP53 mutations in myelodysplastic syndrome are strongly correlated with aberrations of chromosome 5, and correlate with adverse prognosis. *Br. J. Haematol.* *160*, 660–672.
- Kumar, M.S., Narla, A., Nonami, A., Mullally, A., Dimitrova, N., Ball, B., McAuley, J.R., Poveromo, L., Kutok, J.L., Galili, N., *et al.* (2011). Coordinate loss of a microRNA and protein-coding gene cooperate in the pathogenesis of 5q- syndrome. *Blood* *118*, 4666–4673.

- La Starza, R., Matteucci, C., Gorello, P., Brandimarte, L., Pierini, V., Crescenzi, B., Nofrini, V., Rosati, R., Gottardi, E., Saglio, G., *et al.* (2010). NPM1 Deletion Is Associated with Gross Chromosomal Rearrangements in Leukemia. *PLoS ONE* 5, e12855.
- Lai, F., Godley, L.A., Joslin, J., Fernald, A.A., Liu, J., Espinosa, R., Zhao, N., Pamintuan, L., Till, B.G., Larson, R.A., *et al.* (2001). Transcript map and comparative analysis of the 1.5-Mb commonly deleted segment of human 5q31 in malignant myeloid diseases with a del(5q). *Genomics* 71, 235–245.
- Lange, K., Holm, L., Nielsen, K.V., Hahn, A., Hofmann, W., Kreipe, H., Schlegelberger, B., Göhring, G. (2010). Telomere shortening and chromosomal instability in myelodysplastic syndromes. *Genes. Chromosomes Cancer* 49, 260–269.
- Lazarevic, V., Rosso, A., Juliusson, G., Antunovic, P., Rangert-Derolf, Å., Lehmann, S., Möllgård, L., Uggla, B., Wennström, L., Wahlin, A., *et al.* (2015). Prognostic significance of high hyperdiploid and triploid/tetraploid adult acute myeloid leukemia. *Am. J. Hematol.* 90, 800–805.
- Le Beau, M.M., Espinosa, R., Neuman, W.L., Stock, W., Roulston, D., Larson, R.A., Keinanen, M., Westbrook, C.A. (1993). Cytogenetic and molecular delineation of the smallest commonly deleted region of chromosome 5 in malignant myeloid diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 5484–5488.
- LeBlanc, R., Hideshima, T., Catley, L.P., Shringarpure, R., Burger, R., Mitsiades, N., Mitsiades, C., Cheema, P., Chauhan, D., Richardson, P.G., *et al.* (2004). Immunomodulatory drug costimulates T cells via the B7-CD28 pathway. *Blood* 103, 1787–1790.
- Li, J., Cao, F., Yin, H., Huang, Z., Lin, Z., Mao, N., Sun, B., Wang, G. (2020). Ferroptosis: past, present and future. *Cell Death Dis.* 11, 88.
- Li, L., Sheng, Y., Li, W., Hu, C., Mittal, N., Tohyama, K., Seba, A., Zhao, Y.-Y., Ozer, H., Zhu, T., *et al.* (2017). β -Catenin is a candidate therapeutic target for myeloid neoplasms with del(5q). *Cancer Res.* 77, 4116–4126.
- Lipsick, J. (2020). A History of Cancer Research: Tumor Suppressor Genes. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 12, a035907.
- List, A., Dewald, G., Bennett, J., Giagounidis, A., Raza, A., Feldman, E., Powell, B., Greenberg, P., Thomas, D., Stone, R., *et al.* (2006). Lenalidomide in the Myelodysplastic Syndrome with Chromosome 5q Deletion. *N. Engl. J. Med.* 355, 1456–1465.
- Liu, T., Krysiak, K., Shirai, C.L., Kim, S., Shao, J., Ndonwi, M., Walter, M.J. (2017). Knockdown of HSPA9 induces TP53-dependent apoptosis in human hematopoietic progenitor cells. *PLOS ONE* 12, e0170470.
- Liu, T.X., Becker, M.W., Jelinek, J., Wu, W.-S., Deng, M., Mikhailkevich, N., Hsu, K., Bloomfield, C.D., Stone, R.M., DeAngelo, D.J., *et al.* (2007). Chromosome 5q deletion and epigenetic suppression of the gene encoding alpha-catenin (CTNNA1) in myeloid cell transformation. *Nat. Med.* 13, 78–83.

- Liu, Y.-C., Ito, Y., Hsiao, H.-H., Sashida, G., Kodama, A., Ohyashiki, J.H., Ohyashiki, K. (2006). Risk factor analysis in myelodysplastic syndrome patients with del(20q): prognosis revisited. *Cancer Genet. Cytogenet.* *171*, 9–16.
- Lu, L., Payvandi, F., Wu, L., Zhang, L.-H., Hariri, R.J., Man, H.-W., Chen, R.S., Muller, G.W., Hughes, C.C.W., Stirling, D.I., *et al.* (2009). The anti-cancer drug lenalidomide inhibits angiogenesis and metastasis via multiple inhibitory effects on endothelial cell function in normoxic and hypoxic conditions. *Microvasc. Res.* *77*, 78–86.
- Luis, T.C., Naber, B.A.E., Roozen, P.P.C., Brugman, M.H., de Haas, E.F.E., Ghazvini, M., Fibbe, W.E., van Dongen, J.J.M., Fodde, R., Staal, F.J.T. (2011). Canonical Wnt Signaling Regulates Hematopoiesis in a Dosage-Dependent Fashion. *Cell Stem Cell* *9*, 345–356.
- Ma, X., Does, M., Raza, A., Mayne, S.T. (2007). Myelodysplastic syndromes. *Cancer* *109*, 1536–1542.
- MacDonald, B.T., Tamai, K., He, X. (2009). Wnt/ β -catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev. Cell* *17*, 9–26.
- Mallo, M., Cervera, J., Schanz, J., Such, E., García-Manero, G., Luño, E., Steidl, C., Espinet, B., Vallespí, T., Germing, U., *et al.* (2011). Impact of adjunct cytogenetic abnormalities for prognostic stratification in patients with myelodysplastic syndrome and deletion 5q. *Leukemia* *25*, 110–120.
- Mallo, M., Rey, M. del, Ibáñez, M., Calasanz, M.J., Arenillas, L., Larráyoz, M.J., Pedro, C., Jerez, A., Maciejewski, J., Costa, D., *et al.* (2013). Response to lenalidomide in myelodysplastic syndromes with del(5q): influence of cytogenetics and mutations. *Br. J. Haematol.* *162*, 74–86.
- Margolis, S.S., Perry, J.A., Forester, C.M., Nutt, L.K., Guo, Y., Jardim, M.J., Thomenius, M.J., Freel, C.D., Darbandi, R., Ahn, J.-H., *et al.* (2006). Role for the PP2A/B56delta phosphatase in regulating 14-3-3 release from Cdc25 to control mitosis. *Cell* *127*, 759–773.
- Maserati, E., Aprili, F., Vinante, F., Locatelli, F., Amendola, G., Zatterale, A., Milone, G., Minelli, A., Bernardi, F., Lo Curto, F., *et al.* (2002). Trisomy 8 in myelodysplasia and acute leukemia is constitutional in 15-20 % of cases. *Genes. Chromosomes Cancer* *33*, 93–97.
- Medyouf, H., Mossner, M., Jann, J.-C., Nolte, F., Raffel, S., Herrmann, C., Lier, A., Eisen, C., Nowak, V., Zens, B., *et al.* (2014). Myelodysplastic Cells in Patients Reprogram Mesenchymal Stromal Cells to Establish a Transplantable Stem Cell Niche Disease Unit. *Cell Stem Cell* *14*, 824–837.
- Mei, Y., Zhao, B., Basiorka, A.A., Yang, J., Cao, L., Zhang, J., List, A., Ji, P. (2018). Age-related inflammatory bone marrow microenvironment induces ineffective erythropoiesis mimicking del(5q) MDS. *Leukemia* *32*, 1023–1033.
- Milosevic, J.D., Puda, A., Malcovati, L., Berg, T., Hofbauer, M., Stukalov, A., Klampfl, T., Harutyunyan, A.S., Gisslinger, H., Gisslinger, B., *et al.* (2012). Clinical significance of genetic aberrations in secondary acute myeloid leukemia. *Am. J. Hematol.* *87*, 1010–1016.
- Mossner, M., Jann, J.-C., Wittig, J., Nolte, F., Fey, S., Nowak, V., Obländer, J., Pressler, J., Palme, I., Xanthopoulos, C., *et al.* (2016). Mutational hierarchies in myelodysplastic syndromes dynamically adapt and evolve upon therapy response and failure. *Blood* *128*, 1246–1259.

- Mott, J.L., Mohr, A.M. (2015). Overview of MicroRNA Biology. *Semin. Liver Dis.* 35, 3–11.
- Mrózek, K. (2008). Acute Myeloid Leukemia with a Complex Karyotype. *Semin. Oncol.* 35, 365–377.
- Neukirchen, J., Lauseker, M., Hildebrandt, B., Nolting, A.-C., Kaivers, J., Kobbe, G., Gattermann, N., Haas, R., Germing, U. (2017). Cytogenetic clonal evolution in myelodysplastic syndromes is associated with inferior prognosis. *Cancer* 123, 4608–4616.
- Neuwirtová, R., Zemanová, Z., Beličková, M., Březinová, J., Dvořák, P., Oltová, A., Čermák, J., Červinek, L., Vozobulová, V., Mašková, Z., *et al.* (2018). Význam cytogeneticky nepříbuzných buněčných klonů s izolovanou del(5q) a se samostatnou trizomií 8 u nemocných s MDS. *Myelodysplastic Syndrome News* 1, 11-18.
- Neuwirtova, R., Fuchs, O., Holicka, M., Vostry, M., Kostecka, A., Hajkova, H., Jonasova, A., Cermak, J., Cmejla, R., Pospisilova, D., *et al.* (2013). Transcription factors Fli1 and EKLF in the differentiation of megakaryocytic and erythroid progenitor in 5q- syndrome and in Diamond-Blackfan anemia. *Ann. Hematol.* 92, 11–18.
- Nilsson, L., Edén, P., Olsson, E., Månsson, R., Åstrand-Grundström, I., Strömbeck, B., Theilgaard-Mönch, K., Anderson, K., Hast, R., Hellström-Lindberg, E., *et al.* (2007). The molecular signature of MDS stem cells supports a stem-cell origin of 5q- myelodysplastic syndromes. *Blood* 110, 3005–3014.
- Nofrini, V., La Starza, R., Crescenzi, B., Pierini, V., Barba, G., Mecucci, C. (2012). Different boundaries characterize isolated and non-isolated 5q deletions in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemias. *Haematologica* 97, 792–794.
- Nomdedeu, M., Pereira, A., Calvo, X., Colomer, J., Sole, F., Arias, A., Gomez, C., Luño, E., Cervera, J., Arnan, M., *et al.* (2017). Clinical and biological significance of isolated Y chromosome loss in myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukemia. A report from the Spanish MDS Group. *Leuk. Res.* 63, 85–89.
- Nowell, P.C. (1976). The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 194, 23–28.
- Pang, C.S., Pettenati, M.J., Pardee, T.S. (2015). Clinicopathological analysis of near-tetraploidy/tetraploidy acute myeloid leukaemia. *J. Clin. Pathol.* 68, 236–240.
- Papaemmanuil, E., Gerstung, M., Malcovati, L., Tauro, S., Gundem, G., Van Loo, P., Yoon, C.J., Ellis, P., Wedge, D.C., Pellagatti, A., *et al.* (2013). Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. *Blood* 122, 3616–3627.
- Pellagatti, A., Jädersten, M., Forsblom, A.-M., Cattan, H., Christensson, B., Emanuelsson, E.K., Merup, M., Nilsson, L., Samuelsson, J., Sander, B., *et al.* (2007). Lenalidomide inhibits the malignant clone and up-regulates the SPARC gene mapping to the commonly deleted region in 5q- syndrome patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 11406–11411.
- Perry, C., Soreq, H. (2002). Transcriptional regulation of erythropoiesis. *Eur. J. Biochem.* 269, 3607–3618.
- Platzbecker, U. (2019). Treatment of MDS. *Blood* 133, 1096–1107.

- Porwit, A., Saft, L. (2011). The AML–MDS interface—leukemic transformation in myelodysplastic syndromes. *J. Hematop.* *4*, 69–79.
- Qian, Z., Chen, L., Fernald, A.A., Williams, B.O., Le Beau, M.M. (2008). A critical role for Apc in hematopoietic stem and progenitor cell survival. *J. Exp. Med.* *205*, 2163–2175.
- Raaijmakers, M.H.G.P., Mukherjee, S., Guo, S., Zhang, S., Kobayashi, T., Schoonmaker, J.A., Ebert, B.L., Al-Shahrour, F., Hasserjian, R.P., Scadden, E.O., *et al.* (2010). Bone progenitor dysfunction induces myelodysplasia and secondary leukaemia. *Nature* *464*, 852–857.
- Ravindran, A., He, R., Ketterling, R.P., Jawad, M.D., Chen, D., Oliveira, J.L., Nguyen, P.L., Viswanatha, D.S., Reichard, K.K., Hoyer, J.D., *et al.* (2020). The significance of genetic mutations and their prognostic impact on patients with incidental finding of isolated del(20q) in bone marrow without morphologic evidence of a myeloid neoplasm. *Blood Cancer J.* *10*, 7.
- Rhyasen, G.W., Bolanos, L., Fang, J., Jerez, A., Wunderlich, M., Rigolino, C., Mathews, L., Ferrer, M., Southall, N., Guha, R., *et al.* (2013). Targeting IRAK1 as a therapeutic approach for Myelodysplastic Syndrome. *Cancer Cell* *24*, 90–104.
- Royer-Pokora, B., Trost, D., Müller, N., Hildebrandt, B., Germing, U., Beier, M. (2006). Delineation by molecular cytogenetics of 5q deletion breakpoints in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. *Cancer Genet. Cytogenet.* *167*, 66–69.
- Saft, L., Karimi, M., Ghaderi, M., Matolcsy, A., Mufti, G.J., Kulasekararaj, A., Göhring, G., Giagounidis, A., Selleslag, D., Muus, P., *et al.* (2014). p53 protein expression independently predicts outcome in patients with lower-risk myelodysplastic syndromes with del(5q). *Haematologica* *99*, 1041–1049.
- Sallman, D.A., Komrokji, R., Vaupel, C., Cluzeau, T., Geyer, S.M., McGraw, K.L., Al Ali, N.H., Lancet, J., McGinniss, M.J., Nahas, S., *et al.* (2016). Impact of TP53 mutation variant allele frequency on phenotype and outcomes in myelodysplastic syndromes. *Leukemia* *30*, 666–673.
- Santini, V., Almeida, A., Giagounidis, A., Gröpper, S., Jonasova, A., Vey, N., Mufti, G.J., Buckstein, R., Mittelman, M., Platzbecker, U., *et al.* (2016). Randomized Phase III Study of Lenalidomide Versus Placebo in RBC Transfusion-Dependent Patients With Lower-Risk Non-del(5q) Myelodysplastic Syndromes and Ineligible for or Refractory to Erythropoiesis-Stimulating Agents. *J. Clin. Oncol.* *34*, 2988–2996.
- Saumell, S., Solé, F., Arenillas, L., Montoro, J., Valcárcel, D., Pedro, C., Sanzo, C., Luño, E., Giménez, T., Arnan, M., *et al.* (2015). Trisomy 8, a Cytogenetic Abnormality in Myelodysplastic Syndromes, Is Constitutional or Not? *PLoS ONE* *10*.
- Saygin, C., Carraway, H.E. (2021). Current and emerging strategies for management of myelodysplastic syndromes. *Blood Rev.* *48*, 100791.
- Schanz, J., Steidl, C., Fonatsch, C., Pfeilstöcker, M., Nösslinger, T., Tuechler, H., Valent, P., Hildebrandt, B., Giagounidis, A., Aul, C., *et al.* (2011). Coalesced Multicentric Analysis of 2,351 Patients With Myelodysplastic Syndromes Indicates an Underestimation of Poor-Risk Cytogenetics of Myelodysplastic Syndromes in the International Prognostic Scoring System. *J. Clin. Oncol.* *29*, 1963–1970.

- Schanz, J., Tüchler, H., Solé, F., Mallo, M., Luño, E., Cervera, J., Granada, I., Hildebrandt, B., Slovak, M.L., Ohyashiki, K., *et al.* (2012). New Comprehensive Cytogenetic Scoring System for Primary Myelodysplastic Syndromes (MDS) and Oligoblastic Acute Myeloid Leukemia After MDS Derived From an International Database Merge. *J. Clin. Oncol.* *30*, 820–829.
- Scharenberg, C., Giai, V., Pellagatti, A., Saft, L., Dimitriou, M., Jansson, M., Jädersten, M., Grandien, A., Douagi, I., Neuberg, D.S., *et al.* (2017). Progression in patients with low- and intermediate-1-risk del(5q) myelodysplastic syndromes is predicted by a limited subset of mutations. *Haematologica* *102*, 498–508.
- Schildberg, F.A., Klein, S.R., Freeman, G.J., Sharpe, A.H. (2016). Coinhibitory pathways in the B7-CD28 ligand-receptor family. *Immunity* *44*, 955–972.
- Schneider, R.K., Ademà, V., Heckl, D., Järås, M., Mallo, M., Lord, A.M., Chu, L.P., McConkey, M.E., Kramann, R., Mullally, A., *et al.* (2014). Role of casein kinase 1A1 in the biology and targeted therapy of del(5q) MDS. *Cancer Cell* *26*, 509–520.
- Schneider, R.K., Schenone, M., Ferreira, M.V., Kramann, R., Joyce, C.E., Hartigan, C., Beier, F., Brümmendorf, T.H., Germing, U., Platzbecker, U., *et al.* (2016). Rps14 haploinsufficiency causes a block in erythroid differentiation mediated by S100A8 and S100A9. *Nat. Med.* *22*, 288–297.
- Sebaa, A., Ades, L., Baran-Marzack, F., Mozziconacci, M.-J., Penther, D., Dobbelstein, S., Stamatoullas, A., Récher, C., Prebet, T., Moulessehoul, S., *et al.* (2012). Incidence of 17p deletions and TP53 mutation in myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia with 5q deletion. *Genes. Chromosomes Cancer* *51*, 1086–1092.
- Sekeres, M.A. (2010). The Epidemiology of Myelodysplastic Syndromes. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* *24*, 287–294.
- Sekeres, M.A., Schoonen, W.M., Kantarjian, H., List, A., Fryzek, J., Paquette, R., Maciejewski, J.P. (2008). Characteristics of US Patients with Myelodysplastic Syndromes: Results of Six Cross-sectional Physician Surveys. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* *100*, 1542–1551.
- Sieglová, Z., Žilovcová, S., Čermák, J., Říhová, H., Březinová, D., Dvořáková, R., Marková, M., Maaloufova, J., Sajdová, J., Březinová, J., *et al.* (2004). Dynamics of telomere erosion and its association with genome instability in myelodysplastic syndromes (MDS) and acute myelogenous leukemia arising from MDS: a marker of disease prognosis? *Leuk. Res.* *28*, 1013–1021.
- Sloand, E.M., Pfannes, L., Chen, G., Shah, S., Solomou, E.E., Barrett, J., Young, N.S. (2007). CD34 cells from patients with trisomy 8 myelodysplastic syndrome (MDS) express early apoptotic markers but avoid programmed cell death by up-regulation of antiapoptotic proteins. *Blood* *109*, 2399–2405.
- Smith, S.M., Le Beau, M.M., Huo, D., Karrison, T., Sobecks, R.M., Anastasi, J., Vardiman, J.W., Rowley, J.D., Larson, R.A. (2003). Clinical-cytogenetic associations in 306 patients with therapy-related myelodysplasia and myeloid leukemia: the University of Chicago series. *Blood* *102*, 43–52.

- Solé, F., Espinet, B., Sanz, G., Cervera, J., Calasanz, M., Luño, E., Prieto, F., Granada, I., Hernández, J., Cigudosa, J., *et al.* (2000). Incidence, characterization and prognostic significance of chromosomal abnormalities in 640 patients with primary myelodysplastic syndromes. *Br. J. Haematol.* *108*, 346–356.
- Solé, F., Luno, E., Sanzo, C., Espinet, B., Sanz, G.F., Cervera, J., Calasanz, M.J., Cigudosa, J.C., Milla, F., Ribera, J.M., *et al.* (2005). Identification of novel cytogenetic markers with prognostic significance in a series of 968 patients with primary myelodysplastic syndromes. *Haematologica* *90*, 1168–1178.
- Sperling, A.S., Gibson, C.J., Ebert, B.L. (2017). The genetics of myelodysplastic syndrome: from clonal haematopoiesis to secondary leukaemia. *Nat. Rev. Cancer* *17*, 5–19.
- Starczynowski, D.T., Kuchenbauer, F., Argiropoulos, B., Sung, S., Morin, R., Muranyi, A., Hirst, M., Hogge, D., Marra, M., Wells, R.A., *et al.* (2010). Identification of miR-145 and miR-146a as mediators of the 5q– syndrome phenotype. *Nat. Med.* *16*, 49–58.
- Steensma, D.P. (2018). Myelodysplastic syndromes current treatment algorithm 2018. *Blood Cancer J.* *8*, 1–7.
- Stengel, A., Kern, W., Haferlach, T., Meggendorfer, M., Haferlach, C. (2016). The 5q deletion size in myeloid malignancies is correlated to additional chromosomal aberrations and to TP53 mutations. *Genes. Chromosomes Cancer* *55*, 777–785.
- Stephens, P.J., Greenman, C.D., Fu, B., Yang, F., Bignell, G.R., Mudie, L.J., Pleasance, E.D., Lau, K.W., Beare, D., Stebbings, L.A., *et al.* (2011). Massive Genomic Rearrangement Acquired in a Single Catastrophic Event during Cancer Development. *Cell* *144*, 27–40.
- Stone, J.F., Sandberg, A.A. (1995). Sex chromosome aneuploidy and aging. *Mutat. Res.* *338*, 107–113.
- Svenson, J.L., Chike-Harris, K., Amria, M.Y., Nowling, T.K. (2010). The mouse and human Fli1 genes are similarly regulated by Ets factors in T cells. *Genes Immun.* *11*, 161–172.
- Svobodova, K., Zemanova, Z., Lhotska, H., Novakova, M., Podskalska, L., Belickova, M., Brezinova, J., Sarova, I., Izakova, S., Lizcova, L., *et al.* (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. *Leuk. Res.* *42*, 7–12.
- Taganov, K.D., Boldin, M.P., Chang, K.-J., Baltimore, D. (2006). NF-κB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 12481–12486.
- Tasaka, T., Tohyama, K., Kishimoto, M., Ohyashiki, K., Mitani, K., Hotta, T., Kanamaru, A., Okamoto, S., Karasawa, M., Kimura, A., *et al.* (2008). Myelodysplastic syndrome with chromosome 5 abnormalities: a nationwide survey in Japan. *Leukemia* *22*, 1874–1881.
- Trebak, M., Kinet, J.-P. (2019). Calcium signalling in T cells. *Nat. Rev. Immunol.* *19*, 154–169.

- Truong, A.H.L., Cervi, D., Lee, J., Ben-David, Y. (2005). Direct transcriptional regulation of MDM2 by Fli-1. *Oncogene* 24, 962–969.
- Vardiman, J. (2012). The classification of MDS: from FAB to WHO and beyond. *Leuk. Res.* 36, 1453–1458.
- Vardiman, J.W., Harris, N.L., Brunning, R.D. (2002). The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* 100, 2292–2302.
- Vardiman, J.W., Thiele, J., Arber, D.A., Brunning, R.D., Borowitz, M.J., Porwit, A., Harris, N.L., Le Beau, M.M., Hellström-Lindberg, E., Tefferi, A., *et al.* (2009). The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 114, 937–951.
- Varney, M., Choi, K., Bolanos, L., Christie, S., Fang, J., Grimes, L., Maciejewski, J., Inoue, J.-I., Starczynowski, D. (2017). Epistasis between TIFAB and miR-146a: neighboring genes in del(5q) myelodysplastic syndrome. *Leukemia* 31, 491–495.
- Varney, M.E., Niederkorn, M., Konno, H., Matsumura, T., Gohda, J., Yoshida, N., Akiyama, T., Christie, S., Fang, J., Miller, D., *et al.* (2015). Loss of Tifab, a del(5q) MDS gene, alters hematopoiesis through derepression of Toll-like receptor–TRAF6 signaling. *J. Exp. Med.* 212, 1967–1985.
- Venugopal, S., Mascarenhas, J., Steensma, D.P. (2021). Loss of 5q in myeloid malignancies – A gain in understanding of biological and clinical consequences. *Blood Rev.* 46, 100735.
- Volkert, S., Kohlmann, A., Schnittger, S., Kern, W., Haferlach, T., Haferlach, C. (2014). Association of the type of 5q loss with complex karyotype, clonal evolution, TP53 mutation status, and prognosis in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *Genes. Chromosomes Cancer* 53, 402–410.
- Wang, C., Yang, Y., Gao, S., Chen, J., Yu, J., Zhang, H., Li, M., Zhan, X., Li, W. (2018). Immune dysregulation in myelodysplastic syndrome: Clinical features, pathogenesis and therapeutic strategies. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 122, 123–132.
- Wang, J., Fernald, A.A., Anastasi, J., Le Beau, M.M., Qian, Z. (2010). Haploinsufficiency of Apc leads to ineffective hematopoiesis. *Blood* 115, 3481–3488.
- Watanabe, A., Inokuchi, K., Yamaguchi, H., Mizuki, T., Tanosaki, S., Shimada, T., Dan, K. (2004). Near-triploidy and near-tetraploidy in hematological malignancies and mutation of the p53 gene. *Clin. Lab. Haematol.* 26, 25–30.
- Wei, S., Chen, X., Rocha, K., Epling-Burnette, P.K., Djeu, J.Y., Liu, Q., Byrd, J., Sokol, L., Lawrence, N., Pireddu, R., *et al.* (2009). A critical role for phosphatase haplodeficiency in the selective suppression of deletion 5q MDS by lenalidomide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 12974–12979.
- Wei, S., Chen, X., McGraw, K., Zhang, L., Komrokji, R., Clark, J., Caceres, G., Billingsley, D., Sokol, L., Lancet, J., *et al.* (2013). Lenalidomide Promotes p53 Degradation by Inhibiting MDM2 Auto-ubiquitination in Myelodysplastic Syndrome with Chromosome 5q Deletion. *Oncogene* 32, 1110–1120.

- Wiktor, A.E., Van Dyke, D.L., Hodnefield, J.M., Eckel-Passow, J., Hanson, C.A. (2011). The significance of isolated Y chromosome loss in bone marrow metaphase cells from males over age 50 years. *Leuk. Res.* 35, 1297–1300.
- Williamson, P.J., Kruger, A.R., Reynolds, P.J., Hamblin, T.J., Oscier, D.G. (1994). Establishing the incidence of myelodysplastic syndrome. *Br. J. Haematol.* 87, 743–745.
- Woll, P.S., Kjällquist, U., Chowdhury, O., Doolittle, H., Wedge, D.C., Thongjuea, S., Erlandsson, R., Ngara, M., Anderson, K., Deng, Q., *et al.* (2014). Myelodysplastic Syndromes Are Propagated by Rare and Distinct Human Cancer Stem Cells In Vivo. *Cancer Cell* 25, 794–808.
- Yang, Z., Keel, S.B., Shimamura, A., Liu, L., Gerds, A.T., Li, H.Y., Wood, B.L., Scott, B.L., Abkowitz, J.L. (2016). Delayed globin synthesis leads to excess heme and the macrocytic anemia of Diamond Blackfan anemia and del(5q) myelodysplastic syndrome. *Sci. Transl. Med.* 8, 1-19.
- Ye, Y., McDevitt, M.A., Guo, M., Zhang, W., Galm, O., Gore, S.D., Karp, J.E., Maciejewski, J.P., Kowalski, J., Tsai, H.-L., *et al.* (2009). Progressive chromatin repression and promoter methylation of CTNNA1 associated with advanced myeloid malignancies. *Cancer Res.* 69, 8482–8490.
- Zemanova, Z., Michalova, K., Buryova, H., Brezinova, J., Kostylkova, K., Bystricka, D., Novakova, M., Sarova, I., Izakova, S., Lizcova, L., *et al.* (2014). Involvement of deleted chromosome 5 in complex chromosomal aberrations in newly diagnosed myelodysplastic syndromes (MDS) is correlated with extremely adverse prognosis. *Leuk. Res.* 38, 537–544.
- Zemanova, Z., Brezinova, J., Svobodova, K., Lhotska, H., Izakova, S., Sarova, I., Lizcova, L., Ransdorfova, S., Pavlistova, L., Belickova, M., *et al.* (2018). Variability in the extent of del(5q) and its clinical implication in myelodysplastic syndromes (MDS). *J. Clin. Oncol.* 36, e19025–e19025.
- Zhao, N., Stoffel, A., Wang, P.W., Eisenbart, J.D., Espinosa, R., Larson, R.A., Beau, M.M.L. (1997). Molecular delineation of the smallest commonly deleted region of chromosome 5 in malignant myeloid diseases to 1–1.5 Mb and preparation of a PAC-based physical map. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 6948–6953.

10 Přílohy

Příloha 1.

číslo pacienta	pohlaví	věk při diagnóze	karyotyp
1	žena	84,9	46,XX,del(5)(q21.1q33.3)[16]/46,XX[6]
2	žena	70,0	46,XX,del(5)(q13.2q34)[14]/46,XX[8]
3	žena	70,7	46,XX,del(5)(q14q34)[2]/46,XX[18]
4	žena	81,5	46,XX,del(5)(q14q33.3)[3]/57,XX,+X,del(5)(q14q33.3),+del(5)(q14q33.3),+8,+8,+9,+10,+11,+13,+14,+19,+22[12]/46,XX[5]
5	žena	85,9	43~47,XX,del(5)(q13.3q34),der(17)t(17;21)(p11.2;q11.2),del(21)(q11.2)x2[19]/46,XX[1]
6	muž	91,1	47,XY,+8[3]/55~60,XY,+1,+2,der(5)del(5)(q11.2q14)del(5)(q21q33),+6,+8,+9,+11,+13,+14,+16,+19,+20,+21,+der(18)r(18;21)(p10q11.2;p?q?),+r(21)(p?q?),+22,1~4dmin[9]
7	žena	80,2	46,XX,del(5)(q14q33.3)[3]/46,XX[2]
8	žena	73,4	46,XX,del(5)(q15q34)[13]/46,XX[7]
9	muž	83,7	46,XY,del(5)(q14q33.3)[18]/46,XY[4]
10	muž	71,1	45,XY,der(5)del(5)(p12)del(5)(q11.2),t(6;11)(q1?3;p1?1.2),der(7)t(X;7)(?;q11.2),-16,der(18)t(5;18)(p12;q12)[15]/44,XY,-5,t(6;11)(q1?3;p1?1.2),der(7)t(X;7)(?;q11.2),-16,der(18)t(5;18)(p12;q12)[4]/46,XY[3]
11	žena	76,0	46,XX,del(5)(q12q33.3)[15]/46,XX[5]
12	muž	79,8	45,XY,del(5)(q22q33),der(17)t(17;20)(p13;?),dic(18;20)(p10;?q10),der(19)t(19;21)(?p13.3;q21),der(21)t(19;21)(?p13.3;q21)inv(19;21)(p;q?)[20]
13	muž	62,5	46,XY,del(5)(q21.2q34)[2]/47,XY,del(5)(q21.2q34),+8[1]/84~85<4n>,XX,-Y,-Y,-2,del(5)(q13q34)x2,+8,der(9;17)(p10;q10)x2,-12,-14,-16,-21[16]/46,XX[1]
14	žena	71,6	46,XY,del(5)(q14q33.3),del(20)(q11q13)[15]/42~45,idem,der(6)t(6;12)(q?25;p?),der(6)t(6;17)(p21.3;q?21),dic(12;18)(p11.1;p11.1),dic(15;21)(p11.1;p11.1),der(17)t(6;17)(p21.3;?)[11]/42~45,XX,der(4)t(4;17)(q21;q?23),ins(5;4)(q21.1;q?q?),del(5)(q14q33.3),der(7)t(4;7)(q?q;q11.2),del(20)(q11q13)[2]
15	muž	70,8	46,XY,del(5)(q31.1q31.3)[20]

16	žena	42,0	47~50,X,der(X)t(X;?)(?;?),der(1)t(1;11)(p36?;q?21),+5,del(5)(q?13),der(7)t(7;12)(p?12;?),+9,del(9)(q?21),del(12)(q?15),del(13)(q?14),der(14)t(12;14)(?;p11.1)t(7;12)(?;?),der(18)?,+20,+21[10]/46,XX[7]
17	muž	83,0	44,X,der(Y)inv(Y)(p11.3q12)t(Y;22)(q12;q11.1),del(5)(q14.1q33.3),der(7)t(7;21)(q21.11;q21.1),der(9)del(9)(p13.1)del(9)(q21.11),der(18)t(9;18)(p13.2;q22.1)del(18)(q21.2q21.31),dic(20;22)(q11.21;p11.1),-21[9]/46,XY[3]
18	žena	71,2	46,XX,del(5)(q14.1q34)[17]/46,XX[7]
19	muž	76,8	40~43,XY,del(5)(q14qter),del(6)(q?),-7,der(9;17)(p10;p10)ins(17)(q11.1p13.1p13.2),-18[11]/46,XY[12]
20	žena	75,3	46,XX,del(5)(q14q34)[8]/46,XX[12]
21	muž	82,0	45,X,-Y,del(5)(q21.1q33.2)[20]
22	muž	78,9	46,XY,der(5)ins(5;12)(q23.3;q?)del(5)(q23.3q32)ins(5;8)(q32;q?),del(8)(q?),del(12)(q?)[19]/46,XY[2]
23	muž	87,0	46,XY,del(4)(q11q34),del(5)(q14.3q31.2),ins(14;4)(q24;q24q21::q31q33)[19]/46,XY,del(4)(q11q34),t(7;17)(q32;q12),ins(14;4)(q24;q24q21::q31q33),inc[3]
24	žena	78,6	41~45,XX,del(5)(q13.2q33.3),der(6)t(6;17)(q27;?),-13,der(13)t(13;21)(p11.1;q22),-17,der(17)t(13;17)(q?14;p12),der(18;19)(p10;p10),der(19)t(19;20)(?;?),r(21;13)(p11.1;q?),inc[5]/46,XX[5]
25	muž	68,3	47,XY,+2,der(5)t(5;16)(q13.1;?),+11,dic(16;17)(p11.2;p11.2)t(5;16)(q31.3;q13),dic(21;22)(p12;p12)x2,+21,+22[15]/48,idem,+8[2]/46,XY[3]
26	žena	78,8	46,XX,del(5)(q14q33.2)[16]/47,XX,del(5)(q14q33.2),+8[3]/46,XX[1]
27	žena	77,3	46,XX,del(5)(q15.3q34)[5]/46,XX[15]
28	žena	71,7	46,XX,del(5)(q13.3q34)[11]/46,XX[9]
29	muž	67,7	46,XY,del(5)(q13.1q34)[1]/43,XY,-3,der(4)t(4;5)(p11;q34),der(5)del(5)(q13.1q34)t(4;5)(p11;q13.1),-6,-7,del(12)(p12.1p13.3),der(18)r(6;18)(?;p11.3q11.1)[21]/42,X,-Y,-3,der(4)t(4;5)(p11;q34),der(5)del(5)(q13.1q34)t(4;5)(p11;q13.1),-7,del(12)(p12.1p13.3),-18,der(19)t(11;19)(?;p13.1)[1]/46~48,XY,del(1)(q21)x1~2,der(4)t(4;5)(p11;q34),der(5)del(5)(q13.1q34)t(4;5)(p11;q13.1),der(6)t(6;15)(p21;q?15),der(15)t(6;15)(p25;q?15),+17,der(18)r(6;18)(?;p11.3q11.1)[2]/46,XY[1]
30	žena	69,5	46,XX,del(5)(q14q33.3)[6]/46,XX[14]
31	žena	76,0	45,X,-X[7]/46,XX,del(5)(q13.3q34)[7]/46,XX[6]
32	muž	80,0	46,XY,del(5)(q13.2q34)[1]/46,XY,del(5)(q13.2q34),del(7)(q21.1q31.3),der(17)t(1;17)(?;p12)[17]/46,XX[1]
33	muž	80,3	47,XY,del(5)(q2?2q3?3.3),+8,i(11)(q10)[3]/47,idem,der(2)t(2;4)(q?21;q?),der(4)t(2;4)(?;q?),?del(14)(q?),ins(16;2)(p?;?) [5]/46,XY[12]
34	žena	70,2	49~51,XX,+1,del(5)(q13.3q34),+11,+21,+22,+22inc[13]/46,XX[12]
35	žena	67,8	46~50,XX,del(5)(q13.3q33.3),psu dic(21;21)(q22.3;q22.3)x2,+psu dic(21;21)(q22.3;q22.3),+psu dic(21;21)(q22.11;q22.11)x2,+der(21;21)(q10;q10)inv(21)(q11.1q22.2)[24]/46,XX[1]

36	muž	66,8	46~48,XY,der(5)t(5;20)(q14;p?),der(7)t(7;19)(p13;?)t(7;20)(q22;?),der(11)t(11;21)(q23.3;q11),+r(11)(p11q25)x4,-18,del(19)(?),der(20)t(18;20)(?:p?),-21[23]/46,XY[2]
37	žena	74,5	46,XX,del(5)(q13.3q34)[24]/46,XX[1]
38	žena	69,3	42~46,XX,der(3)t(3;22)(q?12q?),der(4)t(4;?)(p?13;?),der(5)t(5;16)(q11.2;?)del(5)(q11.2q34),der(16)t(5;16)(q34;q?24),-7,-9,der(9)t(9;3)(q?12;?)t(3;13)(?:q?),-13,der(13)t(13;13)(p?12;q?)t(13;15)(q?;q?),-15,der(16)t(5;16)(q?;q?24),der(19)(p13)(q13)x3,+19,der(21)t(19;21)(q?;q?21),der(22)t(?:22)(?:p?11.2),-22[7]/46,XX[2]
39	muž	62,5	40~45,XY,der(5;17)ins(5;17)(p?;?)t(5;17)(q11;p11),der(5;17)t(5;17)(q11;p11),-7,psu die(14;19)(p12;q13),-16[24]/46,XY[1]
40	muž	71,4	47~49,XY,del(5)(q23.3q33.3),del(7)(q21),der(8)t(8;16)(p11;p11),+i(8)(q10)x2,-16,r(18)(p11.2q12),+r(18)(p11q11),+22[8]/47,XY,t(1;5)(p22;q34),del(5)(q23.3q33.3),del(7)(q21),der(8)t(8;16)(p11;p11),+i(8)(q10),-16,r(18)(p11.2q12),+22[16]/46,XY[1]
41	žena	78,6	46,XX,del(5)(q14q34)[22]/46,XX[3]
42	žena	80,9	46,XX,del(5)(q13.1q34)[7]/46,XX,del(5)(q13.1q34),del(8)(q11.2q23),der(8)t(8;11)(q23;q13),der(11)ins(11;8)(p?15.5;q11.2q23)t(8;11)(q23;q13)[7]/46,XX,der(4)del(4)(p?15)del(4)(q?13),del(5)(q13.1q34),del(8)(q11.2q23),der(8)t(8;11)(q23;q13),del(9)(q?21q?34),der(11)ins(11;8)(p?15.5;q11.2q23)t(8;11)(q23;q13)[6]/46,XX[3]
43	žena	81,8	46,XX,del(5)(q14q33.2)[16]/46,XX[6]
44	žena	82,8	46,XX,del(5)(q14q33.3)[17]/46,XX[3]
45	žena	64,4	46,XX,del(5)(q14q33.3)[16]/46,XX[6]
46	žena	84,8	46,XX,del(5)(q15q34)[10]/46,XX[13]
47	žena	76,3	46,XX,del(5)(q14q33.3)[2]/46,XX[7]
48	muž	75,7	47,XY,del(5)(q14q33.3),+8[20]
49	žena	77,2	45~46,XX,der(3)t(3;12)(p14.3;p13.31)ins(3;12)(q27.1;p11.1q21.32),der(3)t(3;12)(p14.3;p13.31)ins(3;12)(q27.1;q1?5q21.32),der(5)t(5;12)(q15;p12.2)t(12;12)(p11.22;q23.1),-12,der(12)del(12)(p11.22)del(12)(q13.3)[22]
50	žena	71,4	53,XX,+X,+1,del(5)(q14q33.3)x2,+8,+14,+22[15]/53,idem,der(7)t(7;?)(q31;?)[4]/53,XX,+X,+r(1)(p36.3q11),del(5)(q14q33.3)x2,der(7)t(7;?)(q31;?)+8,+11,+14,+22[1]
51	muž	72,1	46,XY,del(5)(q12q35.3)[7]/46,XY[13]
52	žena	77,6	42~46,XX,del(5)(q12q34),del(7)(q11.2),-13,-18,t(19;19)(q?;q?),del(21)(q?12),+der(21;21)(p10;p10)t(13;21)(q?13;q?12),+r(21)(p?;q?)[20]
53	žena	77,8	46,XX,del(5)(q13.3q33.3)[7]/46,XX[13]
54	žena	83,3	46,XX,del(5)(q14q33.3)[8]/46,XX[12]
55	žena	95,4	46,XX,del(5)(q14q33.3)[4]/46,idem,t(2;6)(p?23;q21)[12]/46,XX[5]

56	žena	77,8	46,XX,der(5)del(5)(q13.2q33.3)t(5;14)(q12;q32),del(10)(q?22),ins(12;10)(q?14;q?),der(14)t(5;14)(q12;q32)[20]/46,XX[1]
57	muž	75,3	46,XY,del(5)(q21q33.3)[14]/46,XY[6]
58	žena	80,0	46,XX,der(3)t(3;11)(p11.2;q14.2)del(11)(p11.11q14.3),der(5)t(3;5)(p12.3;q14),r(11)(p11.11q14.2)[22]
59	muž	76,2	46~50,XY,der(2)t(2;5)(q37;?),del(5)(q?13q?33),+8,t(9;13)(p?22;q?32),-14,der(17)t(14;17)(q11.2;p?12),der(20)t(6;20)(?;q11.2)[5]
60	žena	73,5	46,XX,del(5)(q22q34)[2]/polyploidie[15]/46,XX[16]
61	muž	57,4	46,XY,del(5)(q21q31.3),t(12;22)(q21;q11)[10]/46,XY[15]
62	žena	75,0	44,XX,del(5)(q13.1q33.3),-7,dic(12;20)(p13;?),der(15)r(15,18)(q;q?),del(18)(q?)[24]/88,XXXX,del(5)(q13.1q33.3)x2,-7,-7,dic(12;20)(p13;?)x2,der(15)r(15,18)(q;q?)x2,del(18)(q?)x2[1]
63	žena	78,9	46,XX,del(5)(q13.3q34),der(18)t(1;18)(?p22;q23)[20]
64	žena	79,9	45,XX,der(5)del(5)(q14q33.3)t(5;17)(q33.2;p12),der(11)t(11;13)(q12;?)t(12;13)(q;q?),der(12)t(12;13)(p13;q?)t(11;12)(?;p11.2),-13,der(17)t(5;17)(q33.2;p12),der(18)t(12;18)(?;q22),der(20)t(11;20)(?;p11.2)[20]/45,XX,der(5)del(5)(q14q33.3)t(5;17)(q33.2;p12),der(11)t(11;13)(q12;?)t(12;13)(q;q?),der(12)inv(12)(p11.2q13)t(12;13)(p11.2;p11.2)t(11;12)(?;q?)t(11;13)(?;13)(?;q?),-13,der(17)t(5;17)(q33.2;p12),der(18)t(12;18)(?;q22),der(20)t(11;20)(?;p11.2)[5]
65	žena	74,3	47,XX,del(5)(q13.3q31.3),+21[24]/46,XX[1]
66	muž	80,0	46,XY,r(7)(p11.2q21.1)[10]/44,XY,-7[4]/45,XY,dic(5;17)(q11.1;p11.1),r(7)(p11.2q21.1)[4]/44,XY,dic(5;17)(q11.1;p11.1),-7[2]
67	žena	50,1	45,XX,der(1)t(1;5)(p;q33.3),der(5)del(5)(q22q33.3)t(1;5)(p;q33.3),der(7)del(7)(p12)del(7)(q11.2),der(13)t(7;13)(?;q12),-14,der(16)t(13;17)t(13;16)(q;q11)(q;p11),der(17)t(16;17)(p11;q11),der(18)t(18;20)(p11;q?),der(20)t(14;20)(q;q11.2)[2]/44,XX,der(1)t(1;5)(p;q33.3),der(5)del(5)(q22q33.3)t(1;5)(p;q33.3),dic r(7;22)(?;?),der(13)t(7;13)(?;q12),-14,der(16)t(13;17)t(13;16)(q;q11)(q;p11),der(17)t(16;17)(p11;q11),der(18)t(18;20)(p11;q?),der(20)t(14;20)(q;q11.2),-22[7]/43~45,XX,der(1)t(1;5)(p;q33.3),der(5)del(5)(q22q33.3)t(1;5)(p;q33.3),-7,der(13)t(7;13)(?;q12),-14,der(16)t(13;17)t(13;16)(q;q11)(q;p11),der(17)t(16;17)(p11;q11),der(18)t(18;20)(p11;q?),der(20)t(14;20)(q;q11.2),+22,-22[9]/
68	žena	59,3	46,XX,del(5)(q23.2q31.3)[5]/46,XX[15]
69	muž	70,5	48~49,XY,ins(2;5)(p?13;q23.3q23.3),der(4)t(4;13)(p16;q1?4)del(4)(q?31),der(5;19)(p10;p10),del(13)(q1?4),del(20)(q12),+21,der(20;22)(p10;q10)x2~3[21]
70	žena	72,6	45,XX,der(1)t(1;7)(p?32;p22),del(5)(q14q34),der(7)t(7;11)(p15.3;?)t(1;11)(p?31;?),der(11;17)(q10;q10),t(15;16)(q?23;q?23),der(17)(p10)t(11;17)(q13;11.2)[10]/46,XX[10]
71	muž	72,8	46,XY,-2,del(5)(q14q33.2),der(11)t(2;11)(q12;q12),dic(11;13)(p10;q10),der(2;20)(p10;p10)x2[16]/92,XXYY,idemx2[4]
72	žena	73,4	45~46,XX,+1,der(3)t(3;6)(q2?8;?),del(5)(q14q33.3),der(9)t(9;?11)(q3?3;?),del(11)(p11.2),der(11)t(11;13)(q24;q12),der(11;17)(p11.2;?)t(17;?)(?;?),+i(11)(q10),-13,der(16)t(16;?)(?;?),-17[18]/46,XX[2]

73	muž	66,0	46,XY,der(5)t(5;7)(q14.3;?),der(7)t(7;17)(q11.23;?),der(7)t(7;20)(q11.23;?),der(17)t(17;19)(p13.1;p13.2)t(7;17)(q21.11;q22),del(20)(?q)[15]/46,idem,t(X;8)(p?22.1;q?24.1),der(4)t(4;19)(q35;?)-16,der(19)t(16;19)(?;?),+der(19)del(19)(p12)del(19)(q12)[7]/46,XX[3]
74	muž	65,1	43~45,XY,del(5)(q11.2q35.3),der(7)t(7;12)(q11.2;?)+8,r(12)(?),-16,dic(17;22)(p11.2,p12),-18[7]/46,idem,+6[4]
75	muž	72,9	46,XY,del(5)(q14q33.3)[13]
76	muž	69,2	44,XY,der(1)t(Y;1)(q12;p36.3),dup(3)(q2?6.1q2?6.3),der(5)t(5;7)(q13.2;p13),r(7)(p11.2q21)+8,der(13;21)(p10p10),der(15;17)(p10;p10)[13]/43,XY,der(1)t(Y;1)(q12;p36.3),dup(3)(q2?6.1q2?6.3),der(5)t(5;7)(q13.2;p13),-7,+8,der(13;21)(p10p10),der(15;17)(p10;p10)[3]
77	muž	76,1	46,XY,del(5)(q14.3q34)[11]/46,XX[11]
78	žena	59,6	46,XX,del(20)(q11.1q13)[1]/46,XX,del(5)(q23.3q34),del(20)(q11.1q13)[12]/46,XX[7]
79	žena	77,6	46,XX,der(2)t(2;5)(?p11.2;?)del(2)(?q?31),der(5)t(2;5)(?;q1?2),der(12)t(2;12)(?;q24.3)[8]/45,idem,dic(7;12)(q11.2;p11.2),der(?13)t(12;13)(p13.?1;?) [12]
80	žena	79,2	46,XX,del(5)(q14q33.3)[22]/46,XX[3]
81	žena	65,1	43,XX,-3,del(5)(q14.1q33.3),der(7)t(7;17)(q?21;q?11.3),-12,der(13)t(12;13)(?;q34)t(3;12)(?q13;?),der(14)t(3;14)(?;p11.2),-7[19]/43,X,der(X)del(X)(p?11.4)del(X)(q?13),-3,del(5)(q14.1q33.3),der(7)t(7;17)(q?21;q?11.3),-12,der(13)t(12;13)(?;q34)t(3;12)(?q13;?)-17,der(20)t(X;20)(q?13;p13)[2]/46,XX[1]
82	žena	46,7	45,XX,dic(5;17)(q11.1;p11.2)[2]/44,idem,-7,dic(5;15)(q11.1;p11.1)[8]/45,idem,r(18)(p11.1q21.2)[10]/44,idem,-18[2]/46,XX[11]
83	žena	84,8	46,XX,del(5)(q14q33.3)[19]/46,XX[1]
84	žena	81,3	46,XX,del(5)(q22q33)[14]/46,XX[11]
85	žena	59,0	46,XX,del(5)(q13.3q32)[23]/46,XX[2]
86	žena	68,2	44,XX,ins(3;6)(p11;?),der(5)del(5)(p12)del(5)(q13.2),-6,der(7)del(7)(p12)del(7)(q22),del(13)(q?),dic(12;17)(p11;p11),der(22)t(3;22)(?;q12)[24]/46,XX[1]
87	žena	65,4	46,XX,del(5)(q14q35),der(7)t(7;21)(q22;q?),t(10;17)(q?26;q?22),der(12)t(12;21)(p?13;q?),der(15)t(1;15)(?;p?),del(21)(q21q22)[12]/45,XX,del(5)(q14q35),der(7)t(7;21)(q22;q?),t(10;17)(q?26;q?22),der(12)t(12;21)(p?13;q?),der(15)t(1;15)(?;p?)-21[12]/47,XX,del(5)(q14q35),der(7)t(7;21)(q22;q?),t(10;17)(q?26;q?22),der(12)t(12;21)(p?13;q?),der(15)t(1;15)(?;p?)+del(21)(q21q22)[2]
88	muž	61,4	43,XY,del(1)(p11),t(2;11)(p12;q23),der(4)t(4;5)(q14;?),der(5)(5;7)(q12;?)t(7;17)(?;?)-7,der(7)t(1;7)(p11;p12)dup(1)(p?)ins(1;7)(?;?),del(10)(p11),dic(12;15)(p11;p11),-17,der(20)t(?10;20)(?p11;q11),ins(20;17)(?;?) [12]/46,XY[2]