

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Genetika, molekulární biologie a virologie

Studijní obor: Molekulární biologie a genetika eukaryot



Bc. Daniela Frolíková

Frekvence a význam aberací chromosomu 17 u dospělých nemocných
s myelodysplastickými syndromy (MDS)

Frequency and relevance of chromosome 17 aberrations in adult patients
with myelodysplastic syndromes (MDS)

Diplomová práce

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

Odborná konzultantka: RNDr. Libuše Lizcová, Ph.D.

Praha, 2024

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem diplomovou 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, 8.8.2024

Bc. Daniela Frolíková

Poděkování

Ráda bych poděkovala své školitelce doc. RNDr. Zuzaně Zemanové, CSc. za možnost vypracovat tuto diplomovou práci v Centru nádorové cytogenomiky, Ústavu lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky, Všeobecné fakultní nemocnice a 1.LF UK v Praze. Děkuji také za odborné vedení a věcné rady při zpracování této diplomové práce. Děkuji též své odborné konzultantce RNDr. Libuši Lizcové, Ph.D. za ochotu a vstřícnost při konzultacích. Mé poděkování patří též kolektivu Centra nádorové cytogenomiky ÚLBD, Všeobecné fakultní nemocnice a 1.LF UK v Praze. Nakonec bych chtěla poděkovat všem svým blízkým za podporu při studiu i vypracovávání této práce.

Abstrakt

Myelodysplastické neoplázie (MDS) jsou heterogenní skupinou klonálních onemocnění krvetvorby. Jedním z cytogenetických nálezů, se kterým se u pacientů s MDS vzácně setkáváme, jsou aberace chromosomu 17. Byla provedena cytogenomická analýza nebalancovaných aberací chromosomu 17 u 37 dospělých pacientů s primárními a sekundárními MDS. Nejčastějším typem změn chromosomu 17 byly nebalancované translokace, ke kterým docházelo s téměř všemi chromosomy. Aberace chromosomu 17 byly u 34 pacientů (91,9 %) součástí komplexního karyotypu. Osm pacientů (21,6 %) mělo změny obou homologních chromosomů 17. Rozdíl v celkovém přežití pacientů s jedním a se dvěma aberovanými chromosomy nebyl statisticky významný. Byl však pozorován trend lepšího přežití pacientů s jednou aberací. U tří pacientů došlo ke klonálnímu zisku aberace chromosomu 17 spolu s delecí oblasti 17p13, kde se nachází gen *TP53*. Delece byla potvrzena celkem u 27 pacientů (72,9 %), včetně všech nemocných se sekundárními MDS, a její zisk neměl vliv na celkové přežití. Mutace *TP53* byla zjištěna u 17 z 21 (80,9 %) vyšetřovaných nemocných. Z toho 12 mělo zároveň delecí 17p13. Čtyři pacienti měli dvě mutace a jeden pacient měl mutaci společně s uniparentální disomií 17p. Tyto nálezy mají velmi špatnou prognózu a medián celkového přežití nemocných byl 2 měsíce.

Klíčová slova: myelodysplastické neoplázie (MDS), chromosomové aberace, chromosom 17, *TP53*

Abstract

Myelodysplastic neoplasias (MDS) are heterogeneous group of clonal hematopoietic disorders. Chromosome 17 aberrations are one of the rare cytogenetic findings in MDS patients. A cytogenomic analysis of unbalanced aberrations of chromosome 17 was performed in 37 adult patients with primary and secondary MDS. The most common change of chromosome 17 was unbalanced translocations, which occurred with almost all chromosomes. Chromosome 17 aberrations were part of the complex karyotype in 34 patients (91.9%). Eight patients (21.6%) had changes of both homologous chromosomes 17. The difference in overall survival of patients with one and two aberrated chromosomes was not statistically significant. However, a trend towards better survival of patients with a single aberration was observed. Three patients had a clonal gain of chromosome 17 aberration as well as a deletion of the 17p13 region where the *TP53* gene is located. The deletion was confirmed in a total of 27 patients (72.9%), including all patients with secondary MDS, and its gain did not affect overall survival. *TP53* mutation was found in 17 out of 21 (80.9%) examined patients. Of these, 12 had a 17p13 deletion at the same time. Four patients had two mutations and one patient had a mutation together with uniparental disomy 17p. These findings have a very poor prognosis and the median overall survival of the patients was 2 months.

Keywords: myelodysplastic neoplasia (MDS), chromosome aberrations, chromosome 17, *TP53*

Obsah

Abstrakt.....	i
Abstract.....	ii
Použité zkratky	vi
1 Úvod	1
2 Přehled literatury	3
2.1 MDS.....	3
2.2 Klasifikace MDS.....	4
2.2.1 FAB klasifikace	4
2.2.2 WHO klasifikace	5
2.3 Mezinárodní prognostický skórovací systém	8
2.4 Nejčastější chromosomové změny u MDS	11
2.4.1 Delece dlouhých ramen chromosomu 5	12
2.4.2 Delece dlouhých ramen chromosomu 7 a monosomie	13
2.4.3 Trisomie chromosomu 8	14
2.4.4 Delece dlouhých ramen chromosomu 20	14
2.4.5 Další chromosomové aberace	15
2.5 Chromosom 17.....	15
2.5.1 Aberace chromosomu 17	16
2.6 Molekulárně genetické změny u MDS.....	18
2.6.1 Mutace genů pro RNA sestřih.....	19
2.6.2 Mutace genů pro metylaci DNA	20
2.6.3 Mutace genů pro histonové modifikace	22
2.6.4 Mutace v dalších genech	23
2.6.5 Protein p53	23
2.7 Léčba.....	25
3 Cíle práce	27

4	Materiál	28
4.1	Soubor pacientů.....	28
4.2	Chemikálie	29
4.3	Roztoky	31
4.4	DNA sondy pro FISH	32
5	Metody	33
5.1	Příprava buněk pro cytogenetická a molekulárně cytogenetická vyšetření	33
5.1.1	Kultivace buněk kostní dřeně	33
5.1.2	Zpracování buněčných kultur	33
5.1.3	Příprava preparátů.....	34
5.2	G-pruhování a analýza karyotypu	34
5.3	Fluorescenční in situ hybridizace	35
5.3.1	Laboratorní postup	36
5.4	mFISH a mBAND.....	37
5.4.1	Laboratorní postup	38
5.5	array CGH a SNP array.....	39
5.5.1	Laboratorní postup	40
5.6	NGS.....	41
5.6.1	Laboratorní postup	42
5.7	Statistická analýza	46
6	Výsledky.....	47
6.1	Analýza karyotypu	47
6.2	Cytogenomická analýza	52
6.3	Analýza přežití	55
7	Diskuse.....	57
8	Závěr	65
9	Seznam použité literatury	66
10	Přílohy.....	76

Použité zkratky

AML	acute myeloid leukemia	akutní myeloidní leukémie
aUPD	acquired uniparental disomy	získaná uniparentální dizomie
array CGH	array comparative genomic hybridization	komparativní genomová hybridizace na čípech
ASXL1	ASXL1 transcriptional regulator 1	ASXL1 transkripční regulátor 1
ATM	ataxia telangiectasia mutated protein kinase	ataxie telangiektázie mutovaná protein kináza
BRCA1	breast cancer 1	gen karcinomu prsu 1
CADM1	cell adhesion molecule 1	
CBL	casitas B-lineage lymphoma	
CCUS	clonal cytopenia of undetermined significance	klonální cytopenie neznámého původu
CDR	commonly deleted region	společná deletovaná oblast
CMML	chronic myelomonocytic leukemia	chronická myelomonocytární leukemie
del	deletion	delece
der	derivative chromosome	derivovaný chromozom
dic	dicentric chromosome	dicentrický chromozom
DNMT3A	DNA methyltransferase 3 alpha	DNA methyltransferáza 3 alfa
EZH2	enhancer of zeste 2 polycomb repressive complex 2 subunit	
FAB	French-American-British co-operative group	Francouzsko-Americko-Britská skupina
FLT3 ^{ITD+TKD}	Fms related receptor tyrosine kinase 3	
i	isochromosome	isochromosom
ICC	International Consensus Classification	Mezinárodní konsenzuální klasifikace
IDH1/2	isocitrate dehydrogenase (NADP(+))1 a isocitrate dehydrogenase (NADP(+)) 2	izocitrát dehydrogenáza (NADP(+))1/ izocitrát dehydrogenáza (NADP(+))2
idic	isodicentric chromosome	Isodicentrický chromosom
I-FISH	Interphase Fluorescence <i>In Situ</i> Hybridization	interfázní fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
inv	inversion	inverze

IPSS	International Prognostic Scoring System	Mezinárodní prognostický skórovací systém
IPSS—M	The International Prognostic Scoring System – Molecular	Mezinárodní prognostický skórovací systém: molekulární varianta
IPSS—R	International Prognostic Scoring System Revised	Mezinárodní prognostický skórovací systém: revidovaná verze
ISCN	International System for Human Cytogenomic Nomenclature	Mezinárodní systém cytogenetické nomenklatury
KD	bone marrow	kostní dřeň
<i>L3MBTL1</i>	lethal(3)malignant brain tumor-like protein 1	
LOH	loss of heterozygosity	ztráta heterozygotnosti
mBAND	multicolor chromosome banding	metoda mnohobarevného pruhování
<i>MDM2</i>	mouse double minute 2 homolog	MDM2 protoonkogen
MDS	myelodysplastic neoplasia	myelodysplastické neoplázie
MDS/MPN	myelodysplastic—myeloproliferative neoplasia	myelodysplasticko—myeloproliferativní neoplázie
MDS-EB	MDS with excess blasts	MDS s přebytkem blastů
MDS-EB 1/2	MDS with excess blasts 1/2	MDS s přebytkem blastů ½
MDS-MLD	MDS with multilineage dysplasia	MDS s multilineární dysplázií
MDS-NOS	MDS nonspecified	MDS nespecifikované
MDS-SF3B1	MDS with <i>SF3B1</i> mutation	MDS s mutací <i>SF3B1</i>
MDS-RS	MDS with ring sideroblasts	MDS s prstenčítým siderolasty
MDS-RS-MLD	MDS-RS with multilineage dysplasia	MDS s multilineární dysplázií
MDS-RS-SLD	MDS and single lineage dysplasia	MDS s dysplázií v jedné řadě
MDS-SLD	MDS with single lineage dysplasia	MDS s dysplázií v jedné řadě
MDS-U	MDS, unclassifiable	MDS neklasifikované
mFISH	multicolor FISH	mnohobarevná FISH
<i>MLL</i>	mixed Lineage Leukemia	leukémie se smíšeným fenotypem
<i>MYBL2</i>	myb-related protein B	
<i>NF1</i>	neurofibromatosis type 1	neurofibromatóza typ 1
NGS	next generation sequencing	sekvenování nové generace

p	short arm	krátké rameno
p21	p21 protein	protein p21
p53	tumor protein P53	nádorový protein p53
PK	peripheral blood	periferní krev
pter	terminal part of short arms	terminální část krátkých ramen
q	long arm	dlouhé rameno
qter	terminal part of long arms	terminální část dlouhých ramen
RA	refractory anemia	refrakterní anémie
RAEB	refractory anemia with excess of blasts	refrakterní anémii s přebytkem blastů
RAEB-t	refractory anemia with excess of blasts in transformation	refrakterní anémie s přebytkem blastů v transformaci
RARS	refractory anemia with ring sideroblasts	refrakterní anémie s prstenčitými sideroblasty
RPS14	ribosomal protein S14	ribosomální protein S14
<i>RUNX1</i>	runt-related transcription factor 1	
<i>SAMD9/SAMD9L</i>	sterile alpha motif domain protein 9/ SAMD9-like	
<i>SF3B1</i>	splicing factor 3b subunit 1	sestřihový faktor 3b podjednotka 1
SNP	single nucleotide polymorphism	jednonukleotidový polymorfismus
snRNP	small nuclear ribonucleoprotein	malý jaderný ribonukleoprotein
<i>SRSF2</i>	serine and arginine rich splicing factor 2	sestřihový faktor 2 bohatý na serin a arginin
t	translocation	translokace
<i>TET2</i>	Tet methylcytosine dioxygenase 2	Tet methylcytosin dioxygenáza 2
<i>TP53</i>	tumor protein 53	tumorový protein p53
<i>U2AF1</i>	U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1	
VAF	variant allele frequency	variantní alelická frekvence
WHO	World Health organisation	Světová zdravotnická organizace
WPSS	WHO Classification-based Prognostic Scoring System	Skórovacím systém založený na WHO klasifikaci

1 Úvod

Myelodysplastické neoplázie (MDS) jsou skupina vysoce heterogenních klonálních onemocnění krvetvorby s nejasnou etiologií a patogenezí, které až u 30 % pacientů přechází do akutní myeloidní leukémie (AML). MDS postihují zejména osoby starší 70 let, lze se s nimi ovšem vzácně setkat u pacientů mladších 40 let a v pediatrické populaci. V těchto případech je předpokládáno, že k rozvoji dochází v důsledku germinální mutace vybraných genů. U části nemocných jsou MDS důsledkem terapie pro jiná onkologická onemocnění či expozice některými látkami. Tyto MDS jsou označovány jako sekundární a prognóza těchto pacientů je ve srovnání s primárními MDS horší (Tria et al., 2022).

MDS se zpravidla projevují cytopenií v jedné nebo více myeloidních krevních řadách. Při dalších vyšetřeních bývá zjištěna hypercelularita a dysplázie kostní dřeně pacientů. Předpokládá se tedy, že za rozvojem MDS stojí selhání krevní kmenové buňky, které je důsledkem genetických a epigenetických změn (Zini, 2017).

Revidovaný mezinárodní prognostický skórovací systém (IPSS-R) a jeho nejnovější molekulární varianta (IPSS-M) jsou klíčovými nástroji pro zhodnocení závažnosti onemocnění a predikci klinického průběhu. Na základě rizikového skóre je rozhodováno o léčebné strategii a toto skóre zároveň poskytuje cenné informace o prognóze pacienta a riziku přechodu onemocnění do AML. V diagnostickém systému IPSS-R je u pacientů hodnoceno procentuální zastoupení blastů v kostní dřeni, počet krevních řad s cytopenií a jejich závažnost a také získané cytogenetické změny (Greenberg et al., 2012a). Ty se vyskytují u 40–50 % pacientů s primárními a 90–95 % pacientů se sekundárními MDS (Leone et al., 2022). Jejich přítomnost a rozsah jsou důležitým ukazatelem vývoje onemocnění. Spektrum získaných chromosomových aberací je velmi široké. Nicméně existují změny, které jsou pro MDS zcela typické. Příkladem může být delece dlouhých ramen chromosomu 5, která je u nemocných nejčastěji detekovanou aberací. Dále se můžeme setkat s delecí dlouhých ramen chromosomu 7 a 20 nebo se ztrátou chromosomu Y (Schanz et al., 2012). Mezi aberacemi zjištěnými u pacientů s MDS jsou také strukturní přestavby a numerické změny chromosomu 17. Ty jsou popisované u 2 % pacientů s primárními a 4,5 % pacientů se sekundárními MDS (Leone et al., 2022). Mezi nejčastěji popisované aberace chromosomu 17 patří jeho monosomie nebo delece oblasti 17p13, které se ovšem zpravidla vyskytují v kontextu komplexního karyotypu (Diamantopoulos et al., 2019; Xu et al., 2010). Isochromosom pro dlouhá ramena je pak jedinou změnou chromosomu 17, která je v izolované podobě hodnocena klasifikací IPSS-R. Jedná se o nález řazený do kategorie středního rizika (Greenberg et al., 2012a).

Tato diplomová práce byla zpracována v Centru nádorové cytogenomiky ÚLBLD, Všeobecné fakultní nemocnice a 1.LF UK v Praze, které se zabývá klasickou cytogenetickou analýzou

a cytogenomickou analýzou převážně hematologických malignit. V diplomové práci byla provedena detailní cytogenetická analýza nebalancovaných aberací chromosomu 17 u dospělých pacientů s MDS. Pro další upřesnění nálezu byly využity cytogenomické metody. U všech pacientů byla ověřena přítomnost delece oblasti 17p13 a velikost patologického klonu. Přesný rozsah deletovaných segmentů na krátkém rameni chromosomu 17 byl určen mikročipovou analýzou. U části pacientů byla dále zjišťována přítomnost mutací genu *TP53*, který se nachází na krátkém rameni chromosomu 17. Byl sledován vliv těchto změn na klonální vývoj, progresi onemocnění a porovnána její frekvence a význam u primárních a sekundárních MDS.

2 Přehled literatury

2.1 MDS

Myelodysplastické neoplázie (MDS) jsou klinicky i biologicky heterogenní skupina klonálních hematologických onemocnění se znaky selhání kostní dřeně. Vznikají v důsledku poškození a následné neefektivní diferenciaci hematopoetické kmenové buňky projevující se cytopenií různého rozsahu v jedné či ve více myeloidních buněčných liniích. Kostní dřeň bývá hypercelulární (ale i normo- nebo hypocelulární) a dysplastická. Pacienti jsou ohroženi zvýšeným rizikem přechodu onemocnění do akutní myeloidní leukémie (AML), ke kterému dochází u 30 % nemocných (Tria et al., 2022; Zini, 2017).

K prvnímu záchytu onemocnění může dojít zcela náhodně při rutinním laboratorním vyšetření krevního obrazu. Nejčastěji je zjištěna anémie, leukopenie či trombocytopenie či jejich vzájemná kombinace. Pacienti ale také mohou přicházet s anemickým syndromem, projevujícím se například bledostí kůže a sliznic, celkovou slabostí a únavou, závratěmi či palpitacemi. V 25–30 % případů jsou pacienti leukopeničtí a přes nespecifický klinický obraz jsou ohroženi závažnými infekcemi z důvodu imunodeficience. U 10 % pacientů se lze setkat s trombocytopenií a s ní spojenou zvýšenou krvácivostí kůže a sliznic. U části pacientů navíc dochází k autoimunitní reakci například v podobě perikarditidy či artritidy (Vondráková, 2010). Potvrzení diagnózy vychází z vyšetření buněk kostní dřeně, které jsou získané aspirací. Je hodnocena jejich morfologie a zastoupení blastů. Celková morfologie a buněčnost kostní dřeně jsou hodnoceny z materiálu získaného biopsií (Červinek, 2013; Zini, 2017)

Etiologie MDS zatím není zcela objasněna. Předpokládá se, že selhání krevní kmenové buňky je důsledkem akumulace mutací v průběhu života, ale i celé řady dalších faktorů (Zini, 2017). MDS se vyskytují zejména ve starší populaci s věkovým mediánem 71 let a s vyšší prevalencí u mužů oproti ženám. U populace starší 70 let je odhadovaný výskyt 75 nemocných na 100 000 obyvatel ročně a incidence onemocnění s věkem dále vzrůstá. Naopak u pacientů mladších 40 let se s MDS setkáváme vzácně – počet pacientů je odhadován na 0,1 případu na 100 000 obyvatel ročně (Nachtkamp et al., 2024).

Přesto, že se MDS týkají zejména dospělé populace, mohou se vyskytnout i u dětí. V pediatrické populaci MDS představují méně než 5 % všech hematologických malignit a předpokládá se, že příčinou je vrozená genetická predispozice (Xie et al., 2023; Zeidan et al., 2019). Mezi geny, které jsou dlouhodobě spojovány s pediatrickými MDS a s MDS u pacientů mladších 40 let, jsou například *SAMD9* a *SAMD9L*. Studie provedená na lidských a myších hematopoetických buňkách zjistila, že exprese mutantního *SAMD9/SAMD9L* vedla k narušení proteosyntézy a buněčného cyklu při současné aktivaci odpovědi na poškození DNA a apoptózy (Thomas et al., 2021).

Zcela oddělenou kategorií nemocných představuje skupina pacientů se sekundárními MDS. Jedná se asi 10 % všech MDS a jejich prognóza je oproti primárním MDS horší. U těchto nemocných došlo k rozvoji MDS v důsledku radioterapie či chemoterapie myeloidních neoplázií a dalších onkologických onemocnění (například rakoviny prsu, vaječníků nebo plic). Zejména po podávání alkylačních činidel nebo inhibitorů topoisomerázy II. Případně mohou být MDS důsledkem expozice některým chemickým látkám (například organickým rozpouštědlům). (Červinek, 2013; Feng et al., 2021)

2.2 Klasifikace MDS

MDS začaly být odbornou veřejností vnímány jakou soubor onemocnění s podobnými znaky zhruba v 50. letech 20. století. Do té doby byly považovány za různé formy preleukémií či sporadické hematologické syndromy, které nereagovaly na klasickou léčbu (Vardiman, 2012).

2.2.1 FAB klasifikace

První terminologické a klinické sjednocení provedla v roce 1976 Francouzsko-Americko-Britská (FAB) skupina pro klasifikaci leukémií. Ve FAB klasifikaci byly rozlišeny akutní leukémie a dysmyelopoetické, respektive myelodysplastické syndromy. Ty byly na rozdíl od leukémií označeny za méně akutní, nevyžadující okamžitou léčbu s výskytem u pacientů ve věku nad 50 let. Myelodysplastické syndromy byly dále rozlišeny na dvě kategorie. A to na refrakterní anémie s přebytkem blastů (RAEB) a chronické myelomonocytární leukémie (CMML) (Bennett et al., 1976).

V diagnostickém systému FAB z roku 1982 došlo k rozdělení MDS do 5 kategorií podle nových diagnostických kritérií. Tentokrát byla brána v potaz zejména přítomnost dyserytropoézy, procentuální zastoupení blastů v periferní krvi (PK) a kostní dřeni (KD). A to společně s morfologickými znaky krevních buněk jako je například výskyt Auerových tyčí v prekurzorech granulocytů. Na základě těchto kritérií byly MDS rozděleny na refrakterní anémie (RA), refrakterní anémie s prstenčitými sideroblasty (RARS), refrakterní anémie s přebytkem blastů (RAEB), RAEB v transformaci (RAEB-t) a CMML (tabulka 1) (Bennett et al., 1982).

Název	blasty v KD (%)	blasty v PK (%)
RA , refrakterní anémie	<5	<1
RARS , refrakterní anémie s prstenčitými sideroblasty	<5	<1
RAEB , refrakterní anémie s přebytkem blastů	5–20	0–4
RAEB-t , RAEB v transformaci	21–30	≥5
CMML , chronické myelomonocytární leukémie	<20	-

Tabulka 1: FAB klasifikace z roku 1982 rozděluje MDS NA základě počtu blastů v periferní krvi (PK) a kostní dřeni (KD). Převzato a upraveno (Bennett et al., 1982)

2.2.2 WHO klasifikace

Zásadní změna v klasifikaci MDS proběhla v roce 1997. Byla provedena Evropskou hematopatologickou asociací ve spolupráci s Americkou hematopatologickou společností a Světovou zdravotnickou organizací (WHO). Nový systém vycházel nejen z morfologických znaků a počtu nezralých krevních buněk, ale bral v potaz klinické, genetické a další údaje za účelem co nejpřesnější diagnostiky a evaluace závažnosti nejen MDS, ale i dalších hematologických a lymfoidních neoplázií (Harris et al., 1999; Vardiman, 2012). WHO klasifikace oproti klasifikaci FAB přeřadila CMML do kategorie smíšených myelodysplasticko-myeloproliferativních syndromů (MDS/MPN). Dále byla vzhledem k podobnosti prognózy pacientů s RAEB-t (definována jako 21-30 % blastů v PK) a pacientů s AML snížena hranice procentuálního zastoupení blastů v PK pro diagnózu AML z 30 % na 20 %. Kategorie RAEB-t tím byla zrušena. Zásadní změnou bylo zavedení samostatné kategorie MDS s cytogenetickou abnormalitou. Jednalo se o MDS s delecí na chromosomu 5 a skupina těchto nálezů byla nazvána jako 5q-syndrom (Harris et al., 1999).

Klasifikační systém WHO prošel a stále prochází revizemi. První z nich proběhla v roce 2001 a další následovala v roce 2008. Ačkoli do současnosti nedošlo k rozšíření diagnostických kategorií o skupinu MDS s další specifickou chromosomovou abnormalitou, jsou od roku 2008 aberace jako -7, del(7q), del(11q), del(9q) (dále viz tabulka 2) považovány za dostatečné pro diagnózu MDS v případě, že není možné u přetrvávající cytopenie nespecifického původu najít dostatečně průkazný morfologický nález v KD (Vardiman et al., 2009).

nebalancované aberace	balancované aberace
-7 or del(7q)	t(11;16)(q23;p13.3)
del(5q)	t(3;21)(q26.2;q22.1)
i(17q) a del(17p)	t(1;3)(p36.3;q21.1)
-13 or del(13q)	t(2;11)(p21;q23)
del(11q)	inv(3)(q21q26.2)
del(12p) or t(12p)	t(6;9)(p23;q34)
del(9q)	
idic(X)(q13)	

Tabulka 2 Chromosomové aberace považované za dostatečný důkaz pro diagnózu MDS v případě neprůkazného morfologického nálezu při cytopenii neznámého původu. Převzato a upraveno (Vardiman et al., 2009)

Další revize WHO klasifikačního systému proběhla v roce 2016. Do diagnostických kritérií byl zařazen cytogenetický nález. Pro stanovení subtypu MDS začal být rozlišován jednak jakýkoli cytogenetický nález kromě delecce 5q, dále nález pouze s delecí 5q, popřípadě výskyt jakékoli aberace včetně delecce 5q. Zůstala zachována kategorie MDS bez dysplázie, jež je definovaná výskytem balancovaných a nebalancovaných chromosomových aberací. Také došlo k upřesnění, že

chromosomové změny musí být potvrzeny klasickou cytogenetickou analýzou, nikoli pouze metodou I-FISH (fluorescenční *in situ* hybridizace v interfázi) (klasifikace podrobněji viz tabulka 3). V této verzi klasifikačního systému byla poprvé zmíněna přítomnost mutací specifických pro MDS identifikovaných sekvenací kandidátních genů. Konkrétně se jednalo o geny *SF3B1*, *TET2*, *SRSF2*, *ASXL1*, *DNMT3A*, *RUNX1*, *U2AF1*, *TP53* a *EZH2*. Přesto, že dle sekvenční analýzy mělo 80–90 % pacient s diagnózou MDS mutantní variantu alespoň jednoho z nich, bylo rozhodnuto, že jejich výskyt s výjimkou *SF3B1* nelze považovat za dostatečný důvod pro stanovení diagnózy ani u pacientů s cytopenií neznámého původu. Patogenní mutace v genu *SF3B1* pak byla ustanovena za dostatečnou pro stanovení diagnózy MDS s prstenčitým siderolasty (MDS-RS) bylo-li v KD maximálně 5% prstenčitých sideroblastů. V klasifikačním systému bylo dále uvedeno, že výskyt některých mutací u pacientů s MDS je silně spjat s prognózou. Například mutace v genu *TP53* byly spojeny s těžkým průběhem onemocnění a patogenní varianta *TP53* u MDS s izolovanou delecí 5q predikovala špatnou odpověď při léčbě lenalidomidem (Arber et al., 2016).

název	dysplázie	cytopenie	prstenčité sideroblasty	blasty KD	blasty PK	cytogenetický nález
MDS-SLD, MDS s dysplázií v jedné řadě	1	1–2	<15 %	<5 %	<1 %	jakýkoli, kromě delece 5q
MDS-MLD, MDS s multilineární dysplázií	2–3	1–3	<15 %	<5 %	<1 %	jakýkoli, kromě delece 5q
MDS-RS, MDS s prstenčitým siderolasty						
MDS-RS-SLD, MDS s dysplázií v jedné řadě	1	1–2	≥15 %	<5 %	<1 %	jakýkoli, kromě delece 5q
MDS-RS-MLD, MDS s multilineární dysplázií	2–3	1–3	≥15 %	<5 %	<1 %	jakýkoli, kromě delece 5q
MDS s izolovanou delecí 5q	–	–	Ne	<5 %	<1 %	izolovaná delece 5q, může být přítomna jedna další aberace kromě -7 nebo del7(q)
MDS-EB, MDS s přebytek blastů						
MDS-EB1	0–3	1–3	Ne	5–9 %	2–4 %	Jakýkoli
MDS-EB2	0–3	1–3	Ne	10–19 %	5–9 %	Jakýkoli
MDS-U, MDS neklasifikovatelný subtyp						
S 1 % blastů v PK	1–3	1–3	Ne	<5 %	0,01 %	Jakýkoli
S unilineární dysplázií	1	3	Ne	<5 %	<1 %	Jakýkoli
Podle definující cytogenetické abnormality	0	1–3	<15 %	<5 %	<1 %	MDS definující abnormality
Refrakterní cytopenie u dětí	1–3	2–3	Ne	<5 %	<2 %	jakýkoli

Tabulka 2: Klasifikace MDS podle WHO klasifikačního systému revidovaného v roce 2016. Dělení vychází ze stupně cytopenie, dysplázie, dále počtu blastů v PK a KD a cytogenetického nálezu. Převzato a upraveno (Arber et al., 2016)

Poslední aktualizace systému dělení MDS proběhlo v roce 2022 a to hned dvakrát. Byla vytvořena pátá aktualizace WHO klasifikačního systému, nicméně poprvé bez spolupráce s European hematological association a American society of Haematology. Z toho důvodu se jmenované organizace spojily a vytvořily Mezinárodní konsenzuální klasifikaci (International Consensus Classification, ICC). V klasifikaci WHO byly provedeny nejen změny v členění MDS, ale také v terminologii. Bylo zavedeno označení myelodysplastická neoplázie, které podle autorů lépe vystihuje neoplastický charakter onemocnění, a zároveň tím došlo ke sjednocení terminologie s myeloproliferativními neopláziemi. MDS byly rozděleny do 2 základních kategorií. A to na MDS definované genetickými abnormalitami a na MDS definované morfologicky. Došlo k úpravě cytogenetických kritérií, kdy se pro určení subtypu MDS stala významná také monosomie chromosomu 7 či delece 7q. Přibyla další kategorie MDS definovaná molekulárně, konkrétně MDS s bialelickou delecí *TP53* (Khoury et al., 2022). ICC klasifikace zcela zrušila kategorii MDS-RS a skupina byla nahrazena MDS s mutací *SF3B1* (MDS-SF3B1). MDS-RS bez mutace v genu *SF3B1* byla přesunuta do kategorie nespecifikovaných MDS (MDS-NOS). Vznikla nová kategorie geneticky definovaných MDS,

a to MDS s mutacemi genu *TP53*. MDS-neklasifikované (MDS-U) a MDS bez dysplázie definovaná genetickými abnormalitami byla redefinována jako klonální cytopenie neznámého původu (CCUS). MDS-EB2 se stala novým subtypem – MDS/AML. MDS-EB1 byla zachována (Arber et al., 2022). Vzhledem k částečně retrospektivnímu charakteru diplomové práce bude v práci používána klasifikace WHO z roku 2016.

2.3 Mezinárodní prognostický skórovací systém

Publikace FAB systému klasifikace MDS vedla nejen k rozvoji na poli studia MDS, ale také ke vzniku systémů pro stanovení jejich závažnosti. Vzhledem k velmi heterogennímu fenotypu onemocnění může být v některých případech dostačující pravidelné sledování stavu pacientů, u jiných může zdravotní stav vyžadovat transfúze s chelatační terapií, chemoterapie či alogenní transplantaci krevních kmenových buněk (Jonas and Greenberg, 2015). Mezinárodní prognostický skórovací systém (International Prognostic Scoring System, IPSS) společně například se skórovacím systémem založeným na WHO klasifikaci (WHO Classification-based Prognostic Scoring, WPSS) byly vytvořeny právě za účelem stanovení závažnosti onemocnění a odhadu prognózy a rizika přechodu onemocnění do AML.

IPSS byl vytvořen Mezinárodní skupinou pro prognózu MDS a publikován v roce 1997. K jeho sestavení došlo na základě klinických, cytogenetických a morfologických dat ze studií zabývajících se léčbou pacientů s primárními MDS. Bylo zjištěno, že procentuální zastoupení blastů v KD, počet krevních řad s cytopenií a cytogenetické změny lze považovat nejen za nejvýznamnější nezávislé proměnné pro stanovení mediánu přežití, ale i ukazatele pravděpodobnosti přechodu do AML. Pacienti byli rozděleni do čtyř kategorií. Kategorie s nízkým rizikem a mediánem přežití 9,5 roku. Dále na kategorii středního rizika-1 a středního rizika-2 s mediány přežití 3,5 roku a 1,2 roku. Poslední kategorií byla skupina s nepříznivou prognózou a mediánem přežití 0,4 roku. Přesto, že v průběhu let došlo k vytvoření dalších prognostických systémů, IPSS se stal standardem v klinické praxi i ve výzkumu. (Greenberg et al., 1997; Vardiman, 2012)

V roce 2012 byla publikována druhá verze IPSS takzvaný Revidovaný mezinárodní prognostický skórovací systém (Revised International Prognostic Scoring System IPSS–R). Nový systém vycházel z dat více než 7 000 pacientů s MDS. Tyto poznatky umožnily nejen upřesnění známých prognostických faktorů, ale i zařazení faktorů nových. Zásadním podnětem pro vytvoření IPSS–R byla publikace studie, ve které byl, po zhodnocení cytogenetického nálezu téměř 3 000 nemocných s MDS, vytvořen nový cytogenetický skórovací systém. Cytogenetické nálezy byly v této studii rozděleny do pěti prognostických kategorií. A to na aberace s velmi dobrou, dobrou, střední, špatnou a velmi špatnou prognózou. Do první skupiny s velmi dobrou prognózou byla zařazena úplná ztráta chromosomu Y a delece dlouhých ramen chromosomu 11. Do kategorie nálezů indikujících dobrou prognózu byla

zařazena delece dlouhých ramen chromosomu 5 a chromosomu 20, delece krátkých ramen chromosomu 12, dvě aberace (z nichž jedna je del(5q)) a normální karyotyp. Delece krátkých ramen chromosomu 7, nadpočetný chromosom 8 nebo 19, isochromosom pro dlouhá ramena chromosomu 17 a jakýkoliv další jeden nebo dva nezávislé klony v karyotypu pacientů byly označeny za nálezy se střední prognózou. Za aberace se špatnou prognózou byla označena monosomie chromosomu 7, aberace chromosomu 3 (inverze, translokace nebo delece dlouhých ramen), dvě změny zahrnující monosomii nebo delecii chromosomu 7 a komplexní karyotyp s třemi abnormalitami. Ukazatelem velmi špatné prognózy byl stanoven komplexní karyotyp s více než třemi abnormalitami. Oproti původnímu dělení cytogenetických změn, které bylo využíváno v IPSS, došlo ke změně klasifikace 13 % pacientů. Z toho se 6 % pacientů posunulo do skupiny s lepší prognózou a 7 % do skupiny s horší prognózou (Schanz et al., 2012). Toto nové rozdělení a rozšíření cytogenetické klasifikace bylo klíčovou součástí IPSS–R (tabulka 4), nicméně v systému byly dále upřesněny další prognostické faktory. Došlo ke změnám při evaluaci procentuálního zastoupení blastů v KD. Pacient nově získal plné skóre již při zjištění >10 % blastů oproti původním 21 %. Byly podrobněji zohledněny cytopenie a v krevním obrazu začaly být kromě jejich počtu sledovány hodnoty hemoglobinu, krevních destiček a absolutní počty neutrofilů. V souhrnu tedy IPSS-R hodnotil cytogenetický nálezy, procentuální zastoupení blastů v KD a cytopenie. V závislosti na výsledcích vyšetření pro zhodnocení těchto faktorů byly pacientům přiřazeny body rizikového skóre. Na základě součtu bodů byli nemocní rozděleni do pěti rizikových skupin (skupina s velmi nízkým rizikem, nízkým, středním, vysokým a velmi vysokým) za účelem stanovení agresivity onemocnění a predikce přežití (Greenberg et al., 2012). Tabulka 5 srovnává IPSS a IPSS–R.

prognostická skupina	cytogenetické abnormality	medián přežití (roky)
velmi dobrá	-Y, del(11q)	5,4
dobrá	normální karyotyp, del(5q), del(12p), del(20q), dvě aberace zahrnující del(5q)	4,8
střední	del(7q), +8, +19, i(17q), jakýkoliv další jeden nebo dva nezávislé klony	2,7
špatná	-7, inv(3)/t(3q)/del(3q), dvě aberace zahrnující -7/del(7q), komplexní karyotyp s třemi aberacemi	1,5
velmi špatná	komplexní karyotyp s více než třemi aberacemi	0,7

Tabulka 3: Prognosticky významné chromosomové aberace u MDS podle IPSS–R. Cytogenetické nálezy pacientů jsou rozděleny do pěti prognostických kategorií podle přežití. Převzato a upraveno (Greenberg et al., 2012a)

IPSS			IPSS-R		
METRIKA		SKÓRE	METRIKA		SKÓRE
BLASTY	<5%	0	BLASTY	≤2%	0
	5-10%	0.5		>2-<5%	0.5
	11-20%	1.5		5-10%	1.5
	21-30%	2		>10%	2
CYTOGENETIKA	Good	0	CYTOGENETIKA	Very good	0
	Intermediate	0.5		Good	0.5
	Poor	2		Intermediate	2
		Poor		3	
CYTOPENIE	Hgb <10 g/dL, PLT <100/μL, ANC <1.5/μL		CYTOPENIE	Very poor	4
	0-1	0		Hgb 8-<10 g/dL	1
	2-3	0.5		Hgb <8 g/dL	1.5
		ANC <0.8/μL		0.5	
RIZIKOVÁ SKUPINA	Low	0	PLT 50-100/μL	0.5	
	INT-1	0.5-1	PLT <50/μL	1	
	INT-2	1.5-2			
	High	≥2.5	RIZIKOVÁ SKUPINA		
			Very low	≤1.5	
		Low	1.5-3		
		Intermediate	3.5-4.5		
		High	5-6		
		Very high	>6		

Tabulka 4: Srovnání kritérií, která jsou hodnocena podle IPSS a IPSS-R při stanovení prognózy pacientů s MDS. Převzato a upraveno (Zeidan et al., 2019)

Celá řada studií dlouhodobě poukazovala na skutečnost, že s MDS jsou spojovány mutace konkrétních genů. Například studie z roku 2014 odhalila, že téměř 90 % všech pacientů mělo mutace alespoň v jednom ze 104 známých nebo suspektních genů spojovaných s patogenezí MDS (Haferlach et al., 2014a). Zároveň bylo prokázáno, že výskyt některých specifických mutací silně koreluje s prognózou pacientů. Tyto znalosti nakonec vyústily ve vytvoření molekulární verze IPSS (Molecular International Prognostic Scoring Systém, IPSS-M), který navíc poprvé zahrnul skupinu pacientů se sekundárními MDS. IPSS-M stratifikuje pacienty na základě blastů v KD, hemoglobinu, počtu krevních destiček, cytogenetického nálezu (při zachování stratifikace z IPSS-R) a výskytu patogenních mutací v 16 genech (tabulka 6), respektive zohledňuje 17 variant mutací. Studie vedoucí k vytvoření IPSS-M zjistila, že molekulární abnormality se vyskytují až u 94 % pacientů s MDS a MDS/MPN. Byla identifikována jasná korelace mezi rostoucím počtem mutací a velmi nepříznivou prognózou. Nález $TP53^{multihit}$ (více než jedna mutace v genu $TP53$ či ztráta heterozygotnosti), $FLT3^{ITD+TKD}$ (interní tandemová duplikace + mutace v tyrosin kinázové doméně) nebo MLL^{PTD} (parciální tandemová duplikace MLL) byl asociován s nejzávažnější prognózou a nejvyšším rizikem transformace do AML (Bernard et al., 2022). Podle IPSS-M je rozlišováno šest rizikových kategorií. Kategorii s velmi nízkým rizikem, nízkým, středně nízkým, středně vysokým, vysokým a velmi vysokým. Mezinárodní skupina pro prognostifikaci MDS navíc uveřejnila online kalkulačku (<https://mds-risk-model.com/>), kterou lze využít pro stratifikaci pacientů.

IPSS-M rizikové skóre sestavené na základě Cox regresní analýzy		
KATEGORIE	POMĚR RIZIK	VÁHOVÝ KOEFICIENT MODELU
Clinical		
Bone marrow blasts — %	1.07 (1.05–1.09)	0.0704
min(Platelets,250) — x10 ⁹ /l	0.998 (0.997–0.999)	-0.00222
Hemoglobin — g/dl	0.84 (0.81–0.88)	-0.171
Cytogenetic		
IPSS-R cytogenetic category	1.33 (1.21–1.47)	0.287
Gene main effects (17 variables, 16 genes)¶		
<i>TP53</i> ^{mut/hiat}	3.27 (2.38–4.48)	1.18
<i>MLL</i> ^{P1D}	2.22 (1.49–3.32)	0.798
<i>FLT3</i> ^{TD+TKD}	2.22 (1.11–4.45)	0.798
<i>SF3B1</i> ^{5a}	1.66 (1.03–2.66)	0.504
<i>NPM1</i>	1.54 (0.78–3.02)	0.430
<i>RUNX1</i>	1.53 (1.23–1.89)	0.423
<i>NRAS</i>	1.52 (1.05–2.20)	0.417
<i>ETV6</i>	1.48 (0.98–2.23)	0.391
<i>IDH2</i>	1.46 (1.05–2.02)	0.379
<i>CBL</i>	1.34 (0.99–1.82)	0.295
<i>EZH2</i>	1.31 (0.98–1.75)	0.270
<i>UZAF1</i>	1.28 (1.01–1.61)	0.247
<i>SRSF2</i>	1.27 (1.03–1.56)	0.239
<i>DNMT3A</i>	1.25 (1.02–1.53)	0.221
<i>ASXL1</i>	1.24 (1.02–1.51)	0.213
<i>KRAS</i>	1.22 (0.84–1.77)	0.202
<i>SF3B1</i> ^a	0.92 (0.74–1.16)	-0.0794
Gene residuals (1 variable, 15 genes; possible values of 0, 1, or 2)		
min(Nres,2)	1.26 (1.12–1.42)	0.231

Tabulka 5: Tabulka shrnuje kritéria hodnocená při stanovení prognózy pacientů s MDS podle IPSS-M. Je zahrnuto všech 16 mutovaných genů respektive 17 variant mutací a uvedeno rizikové skóre přechodu onemocnění do AML a smrti. Převzato a upraveno (Bernard et al., 2022)

Zařazení pacienta do rizikové skupiny je klíčové nejen pro predikci jeho prognózy a rizika přechodu do AML, ale zejména pro volbu vhodného terapeutického přístupu. Poslední verze stratifikačního systému navíc poukazuje na důležitost sekvenační analýzy za účelem identifikace specifických mutací, které mají zásadní vliv na průběh onemocnění. Zahrnutí genových mutací tak přináší do skórovacího systému nový náhled. Nicméně i nadále zůstává nedílnou součástí stratifikace pacientů hodnocení získaných chromosomových aberací.

2.4 Nejčastější chromosomové změny u MDS

Cytogenetický nálezn je klíčový pro stanovení prognózy pacientů s MDS. Chromosomové změny lze pomocí cytogenetických a molekulárně cytogenetických metod detekovat u 40–70 % pacientů s primárními MDS a až 20 % z nich má komplexní karyotyp (3 a více chromosomových aberací). V případě sekundárních MDS je výskyt aberací výrazně častější. U těchto forem MDS se s nimi setkáváme v 90–95 % případů a často navíc v kontextu komplexního karyotypu (Leone et al., 2022)

Zjištěné chromosomové aberace rozdělujeme na numerické a strukturní změny. Ze strukturních změn jsou u MDS nejčastější delece. Zcela typickou delecí u MDS je delece dlouhých ramen chromosomu 5. Dále se setkáváme například s delecí dlouhých ramen chromosomu 7 či 20. Méně častými strukturními změnami u MDS jsou inverze (například chromosomu 3) nebo isochromosomy (například isochromosom pro dlouhá ramena chromosomu 17). Z numerických změn se lze u MDS

setkat s monosomií 7. Chromosomové zisky jsou u těchto onemocnění vzácné a řadíme mezi ně například trisomii chromosomu 8. Spektrum aberací popsaných v patologických klonech může být velmi široké. Během vyšetření je možné detekovat od drobných izolovaných přestaveb po velmi komplexní změny včetně například polyploidii. Zisk nových aberací naznačuje klonální vývoj a je spojen s progresí onemocnění a zhoršující se prognózou (Hoff and Madanat, 2023).

2.4.1 Delece dlouhých ramen chromosomu 5

Vůbec nejčastější chromosomovou změnou u MDS je intersticiální delece dlouhých ramen chromosomu 5. Tato aberace se vyskytuje u více než 25 % pacientů a v kontextu komplexního karyotypu byla popsána v téměř 95 % případů (Zemanova et al., 2014). V karyotypu některých nemocných byla popisována také monosomie chromosomu 5. Studie ovšem naznačují, že o monosomii ve skutečnosti nejde a chromosom 5 je zachován díky kryptickým translokacím malých částí materiálu do jiných chromosomů (Zemanova et al., 2014).

Jedná-li se o delecii chromosomu 5 bez dalších cytogenetických změn, hovoříme o specifickém subtypu MDS tzv. MDS s izolovanou delecí 5q. Tito pacienti mívají makrocytární anémii či další druhy cytopenií, <5 % blastů v KD a častěji se jedná o ženy (Hoff and Madanat, 2023). Podle kritérií IPSS-R je izolovaná del(5q) hodnocena jako nález s dobrou prognózou a mediánem přežití 57 měsíců (Greenberg et al., 2012). Pacienti velmi dobře odpovídají na standardní léčbu imunomodulačním lékem lenalidomidem, který je také používán například k léčbě mnohočetného myelomu. Nicméně studie klonálního vývoje u nemocných s izolovanou delecí 5q poukázala na skutečnost, že po úvodní významné redukci patologického klonu dochází u pacientů léčených lenalidomidem k vzniku nových subklonů s mutacemi spojenými s rezistencí na léčbu (např. v genu *TP53*) (Da Silva-Coelho et al., 2017). Vyskytuje-li se delece dlouhých ramen chromosomu 5 společně s -7/del(7q), více chromosomovými aberacemi nebo >5 % blastů, je u pacientů až 6x vyšší riziko transformace do ALM (Hoff and Madanat 2023). Dále lze pacienty s izolovanou delecí dlouhých ramen chromosomu 5 rozdělit na základě klinicko-onkologického nálezu. A to na ty, kteří mají primární MDS a ty, u kterých došlo k rozvoji onemocnění sekundárně v důsledku cytotoxické terapie nebo radioterapie. U těchto pacientů bylo pozorováno výrazně kratší celkové přežití v délce od 6 do 17 měsíců, 2x vyšší riziko rozvoje AML a zvýšená frekvence mutací v tumor supresorovém genu *TP53* (Komrokji et al., 2013).

Na základě lokalizace zlomových míst na dlouhých ramenech chromosomu 5 rozlišujeme nejméně dvě běžně deletované oblasti (commonly deleted regions, CDR). Proximální CDR je lokalizována v oblasti 5q32—5q33. Jedná se o 1,5 Mbp oblast k jejíž ztrátě dochází zejména MDS s izolovanou delecí 5q. Druhá CDR se nachází v oblasti 5q31.2. S její delecí se častěji setkáváme u sekundárních MDS nebo AML (Boultwood et al., 2002; Komrokji et al., 2013). Nicméně na dlouhém

rameni chromosomu 5 byly popsány delecce ve všech pruzích a zdá se, že jejich rozsah může souviset s celkovým cytogenetickým nálezem. Při srovnání pacientů s izolovanou *del(5q)* a *del(5q)* s komplexním karyotypem byla u pacientů s komplexním karyotypem častěji pozorována delecce celého dlouhého ramene včetně telomerických oblastí (Zemanova et al., 2018).

Na dlouhých ramenech chromosomu 5 je lokalizována řada genů, jejichž ztráta má zásadní vliv na klinický průběh onemocnění. Nachází se zde například gen *RPS14* pro ribozomální protein S14, který je součástí malé 40S ribosomální podjednotky. Monoalelická delecce *RPS14* se podílí na patogenezi MDS s izolovanou delecí 5q v podobě snížené erytroidní diferenciaci. (Ebert et al., 2008; Komrokji et al., 2013). Dále jsou zde geny pro tři microRNA a to pro *miR-143*, *miR-145* a *miR-146* (Komrokji et al., 2013).

2.4.2 Delecce dlouhých ramen chromosomu 7 a monosomie

Druhým nejčastějším patologickým nálezem v karyotypu pacientů s MDS jsou aberace chromosomu 7. Setkáváme se jak s delecí dlouhých ramen, tak s úplnou monosomií. Tyto změny jsou detekovány přibližně u 10 % pacientů s primárními MDS a až u 50 % pacientů se sekundárními MDS (Zahid et al., 2016). V kontextu komplexního karyotypu pak byly úplné ztráty chromosomu 7 popsány u 27 % pacientů (Zemanova et al., 2014). Monosomie chromosomu 7 má vysokou prevalenci u pediatrických MDS, s výskytem až u 40 % nemocných (Cammenga, 2024). Podle IPSS-R je izolovaná *del(7q)* řazena do kategorie středního rizika s mediánem přežití 32 měsíců. Úplná ztráta chromosomu 7 znakem nepříznivé prognózy s mediánem přežití 18 měsíců (Greenberg et al., 2012b).

Přesto, že *del(7q)* a monosomie jsou aberace stejného chromosomu, stojí zpravidla za jejich vznikem různé patofyziologické procesy. Monosomie je důsledkem mitotické nondisjunkce, zatímco k delecí dochází v důsledku chromosomových přestaveb (Hoff and Madanat, 2023). V literatuře je dále popsán ještě jeden možný mechanismus vzniku monosomie chromosomu 7. U sekundárních MDS může být monosomie chromosomu 7 výsledkem postupných strukturních přestaveb v podobně zlomů, které vedou ke ztrátě genetického materiálu a nakonec celého chromosomu (Zemanova et al., 2014; Wyandt et al., 1998).

Na dlouhém rameni chromosomu 7 se nachází několik oblastí s jejichž delecí se lze setkat. Ve směru od centromery k distálnímu konci byly u pacientů s primárními a sekundárními MDS a AML zjištěny následující CDR: 7q22, 7q32—33 a 7q35—36 (Beau et al., 1996). V těchto oblastech bylo sekvenční analýzou identifikováno několik genů, které se podílí na patogenezi MDS. Mezi nimi byl například gen pro histon demethylázu *MLL5* či gen *CUX1*, jehož proteinový produkt p200 CUX1 je transkripční faktor účastnící se oprav DNA mechanismem báze excizní reparace (Hosono, 2019). Na chromosomu 7 se také nachází geny *SAMD9/SAMD9L*. Germinální mutace těchto genů jsou spojovány s pediatrickými MDS s monosomií chromosomu 7 (Cammenga, 2024).

2.4.3 Trisomie chromosomu 8

Další rekurentní chromosomovou aberací, jejíž přítomnost je dle IPSS-R řazena do kategorie středního rizika je trisomie chromosomu 8 (Greenberg et al., 2012). K zisku nadpočetného chromosomu 8 dochází v pozdějších fázích patogeneze MDS a to u 5-10 % pacientů. Tato aberace je jednou z nejčastějších získaných trisomií u MDS (Hoff and Madanat, 2023). Přesto, že se jedná aberaci běžně spojovanou s MDS, její samostatný výskyt bez dalších chromosomových aberací či dysplázie v KD není považován za dostatečný pro stanovení diagnózy. Důvodem je skutečnost, že se s trisomií chromosomu 8 můžeme vzácně setkat ve formě mosaicismu v krevních buňkách zdravých jedinců. Dále také k jejímu zisku může docházet v průběhu klonálního vývoje u jiných myeloidních malignit, například aplastické anémie, AML, CML atd. (Tria et al., 2022)

V CD34+ T-lymfocytech s trisomií chromosomu 8 byla prokázána zvýšená exprese glykoproteinů CD1 a transkripčního faktoru c-myc. Kromě těchto proteinů byla dále zaznamenána zvýšená aktivita antiapoptického proteinu survivinu a při expozici ionizujícímu záření se CD34+ ukázaly méně náchylné k apoptóze (Sloand et al., 2007). V současné době není přesně známo, jakým způsobem tato aberace přispívá k nádorové transformaci. Nicméně u 68 % pacientů s primárními MDS byla zaznamenána velmi dobrá odpověď na terapii imunosupresivy a lze se tedy domnívat, že součástí patofyziologického procesu je právě autoimunitní mechanismus (Sloand et al., 2005). Tuto skutečnost může podpořit studie analyzující expresní profil u pacientů s primárními MDS, kde byla zjištěna nadměrná produkce například TGF- α , receptoru TGF- β , IL-10, IL-7R, které se mimo jiné podílí na procesech regulace imunitního systému (Chen et al., 2004).

2.4.4 Delece dlouhých ramen chromosomu 20

Izolovaná intersticiální delece dlouhých ramen chromosomu 20 je popsána u 5 % pacientů s primárními MDS a buňky nesoucí tuto aberaci zpravidla představují dominantní klon (Campagna et al., 2022). Tento nález je považován za znak dobré prognózy s mediánem přežití 57 měsíců. Přesto, že MDS s izolovanou delecí 20q není specifickým subtypem MDS, nese tento nález u pacientů některé společné charakteristiky. Pacienti jsou převážně muži s nízkým počtem blastů (<5 %) a více než 50 % z nich trpí trombocytopenií (Campagna et al., 2022; Greenberg et al., 2012).

Na q ramenech chromosomu 20 byly identifikovány dvě oblasti CDR. CDR1 o velikosti 2,5 Mbp nacházející se mezi pruhy 20q11.23 a 20q12 a CDR2 o 1,8 Mbp v oblasti 20q13.12. Ačkoli není vzhledem k velikosti chromosomu možné například při karyotypování určit rozsah delece, mikročipová analýza jednonukleotidových polymorfismů (SNP array) potvrdila, že centromera i telemetrická oblast chromosomu zůstávají zachovány (Huh et al., 2010). V současné době není znám mechanismus, kterým

by del(20q) přispívala k patogenezi MDS, nicméně v CDR byly identifikovány transkripční regulátory L3MBTL1 a MYBL2, které by s tímto procesem mohly souviset (Campagna et al., 2022).

2.4.5 Další chromosomové aberace

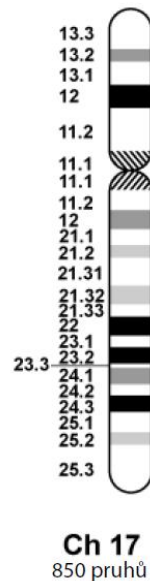
Mezi další chromosomové aberace spojené s MDS, jejichž izolovaný výskyt je hodnocen IPSS-R patří například ztráta pohlavního chromosomu Y. Tento nález, jež je považován za znak velmi dobré prognózy, patří k dlouhodobě diskutovaným (Greenberg et al., 2012). Dosud nebyl v odborných kruzích přijat jednotný konsenzus v otázce, zda má ztráta chromosomu Y skutečně prognostický význam pro patofyziologii MDS, či zda se jedná o aberaci vznikající v souvislosti s procesem stárnutí (Zahid et al., 2016). Další aberací s velmi dobrou prognózou je delece dlouhých ramen chromosomu 11 (Greenberg et al., 2012). Ve studii celkového nálezu u pacientů s del(11q) byla tato abnormalita izolovaným nálezem v karyotypu v téměř 50 % případů. Nejčastěji pak docházelo k deleci v oblasti 11q22—11q23 zahrnující gen *ATM*, *CBL* či *MLL* (Lafage-Pochitaloff et al., 2022). Kromě těchto aberací je dle IPSS-R pro prognózu pacientů relevantní delece krátkých ramen chromosomu 12, které má stejně jako del(11q) dobrou prognózu, dále zisk chromosomu 19 se střední prognózou a přestavby chromosomu 3 se špatnou prognózou (Greenberg et al., 2012).

U 20 % pacientů s primárními MDS a až 90 % pacientů se sekundárními MDS můžeme pozorovat komplexní karyotyp. V obou případech je tento nález spojen s vysokým rizikem transformace onemocnění do AML (Shahjehani et al., 2019). Jedná se o rozsáhlé genetické změny, které kromě balancovaných translokací zahrnují i řadu nebalancovaných přestaveb vedoucích ke ztrátě genetického materiálu. Důsledkem je pak narušení funkce celé řady genů. Podle IPSS-R rozlišujeme komplexní karyotyp se třemi změnami, který má špatnou prognózu a medián přežití 18 měsíců. Dále komplexní karyotyp, ve kterém byly potvrzeny více než tři změny a má tedy velmi špatnou prognózu s mediánem přežití 8,5 měsíce (Greenberg et al., 2012b; Schanz et al., 2012).

2.5 Chromosom 17

Chromosom 17 je malý submetacentrický chromosom řazený do skupiny E. Jeho dlouhé rameno (q) je asi dvakrát delší než rameno krátké (p) a hodnota jeho centromerického indexu leží v rozmezí od 0,34 do 0,45. Jedná se o chromosom s druhou nejvyšší denzitou protein kódujících genů. Na chromosomu 17 je uložena řada genů spojených se zvýšeným rizikem rozvoje malignit či hereditárních nádorových syndromů. Příkladem může být gen *BRCA1* lokalizovaný v oblasti 17q21, jehož patologické mutace jsou spojeny s rozvojem nádoru prsu a vaječníků. Nebo gen *NF1* nacházející se v pruhu 17q11.2, které je mutovaný v zárodečné linii pacientů trpících neurofibromatózou (Zody et al., 2006).

Dále se na krátkém rameni chromosomu 17 v oblasti 17p13.1 nachází tumor supresorový gen *TP53* (obrázek 3), jehož produktem je protein p53.



Obrázek 1: Ideogram chromosomu 17 (850 pruhů). V oblasti 17p13.1 se nachází gen *TP53*. Převzato a upraveno (<https://genetics.pediatrics.med.ufl.edu/teaching-resources/chromosome-ideagrams/>)

2.5.1 Aberace chromosomu 17

Aberace chromosomu 17 jsou popisovány u řady u hematologických malignit jako je například chronická myeloidní leukémie (CML), AML nebo MDS (Sánchez-Castro et al., 2013). V případě MDS se s nimi setkáváme u 2 % pacientů s primárními MDS, a to jak v izolované podobě, tak jako součást komplexního karyotypu (Leone et al., 2022). Cytogenetické změny, které nejčastěji doprovázejí aberace chromosomu 17 se chronologicky dle frekvence výskytu týkají chromosomů 7, 8, 3, 5, a 12 (Diamantopoulos et al., 2019). U pacientů se sekundárními MDS se pak prevalence aberací chromosomu 17 pohybuje okolo 4,5 % (Leone et al., 2022).

Typy změn chromosomu 17 lze rozdělit na dvě skupiny. Rozlišujeme změny strukturní zahrnující translokace (například s chromosomy 11, 19, 21), delecce a duplikace (například zisk oblasti 17p11, delecce 17p13.3) isochromosom (zpravidla pro dlouhá ramena) a dicentrický chromosom. Změny numerické, do kterých řadíme monosomii chromosomu 17 či trisomii chromosomu 17, se kterou se ovšem obvykle nesetkáváme. Aberace chromosomu 17 byly při cytogenetické analýze KD dospělých pacientů s MDS léčených 5-azacytidinem sedmé nejčastější a 75 % z nich bylo zjištěno v komplexním karyotypu (Diamantopoulos et al., 2019).

Nejčastější se u MDS setkáváme se ztrátou druhého homologního chromosomu 17. Pro monosomii není typický izolovaný výskyt v karyotypu, bývá zpravidla součástí komplexního nálezu

(Diamantopoulos et al., 2019; Xu et al., 2010). Podle některých autorů je po provedení přesnějších cytogenetických a molekulárně cytogenetických vyšetření možné detekovat alespoň malou část chybějícího chromosomu 17 a to jako součást některého z derivovaných chromosomů (Schanz et al., 2013). Monosomie chromosomu 17 není IPSS—R hodnocena, a to ani samostatně, ani v kontextu dalších změn (Greenberg et al., 2012a). Nicméně například španělská studie provedla srovnání prognózy pacientů s primárními MDS s monosomií 17 a bez tohoto nálezu. U nemocných s monosomií chromosomu 17 a komplexním karyotypem byla zjištěna horší prognóza oproti pacientům s komplexním karyotypem bez monosomie 17 a to nezávisle na počtu přidružených aberací, které samy o sobě korelují se zhoršující se prognózou (Sánchez-Castro et al., 2013).

Delece na krátkém rameni chromosomu 17 byla zjištěna u 3,7 % pacientů s myeloidními malignitami včetně MDS. SNP array analýzou byla v této studii indentifikována CDR. Jednalo se o 1,25 Mb oblast v pruhu 17p13.1 a pouze u dvou ze 14 pacientů nezahrnovala gen *TP53*. Dále byla u 1,8 % těchto pacientů zjištěna aUPD krátkého ramene chromosomu 17 (Jasek et al., 2010). V kontextu komplexního karyotypu byly aberace chromosomu 17 popsány jako druhé nejčastější a analýza I-FISH potvrdila, že v 53,6 % případů došlo k delecí oblasti 17p13 (Barouk-Simonet et al., 2005).

Isochromosom pro dlouhá ramena chromosomu 17 má v IPSS-R samostatnou kategorii a jeho výskyt v karyotypu je hodnocen jako středně rizikový s mediánem přežití 32 měsíců (Greenberg et al., 2012). Pro isochromosom 17 je charakteristický izolovaný výskyt a zároveň se jedná o nejčastěji vyskytující se typ isochromosomu u hematologických i jiných malignit vůbec (Diamantopoulos et al., 2019; Sánchez-Castro et al., 2013). V hematologické oblasti se s ním, kromě MDS, setkáváme například u CML, AML a Hodgkinova a Non-Hodgkinova lymfomu. Z nehematologických malignit lze jmenovat neuroektodermální nádory a meduloblastomy. U MDS se pak incidence jeho výskytu pohybuje okolo 2,5 % (Diamantopoulos et al., 2019). Pacienti s MDS s izolovaným i(17q) mají specifický klinický nález zahrnující hyperplastickou KD s mikromegakaryocyty a těžkou anémií, zvýšeným počtem leukocytů a výskytem pseudo Pelgerova-Huetovy anomálie v PK (Zahid et al., 2016).

Isochromosom 17 je struktura tvořená dvěma krátkými nebo dvěma dlouhými rameny. Vzniká chybným rozdělením centromery anebo mechanismem U-type strand exchange, a to během mitózy nebo meiózy. Chybné rozdělení centromery nastává v anafázi, pokud je centromera dělena příčně, respektive kolmo na dlouhou osu chromosomu. K chybnému rozdělení častěji dochází přímo v pericentrické oblasti. Vzniklý chromozom je tedy ve skutečnosti izodicentrický se dvěma centromerami velmi blízko sebe. U-type strand exchange mechanismus je při formování isochromosomů častější. Odehrává se v časně anafázi a jedná se o důsledek zlomu a následné fúze sesterských chromatid v pericentrické oblasti. K U-type strand exchange může docházet také u homologních chromozomů, čímž vznikne isochromosom s homologními rameny. (Kaiser-Rogers and Rao, 2013). Místem zlomu na

chromosomu 17 jsou pericentromerické sekvence REPA a REPB v oblasti 17p11.2 na krátkém rameni (Fioretos et al., 1999). Tyto sekvence jsou tvořeny repeticemi s nízkým počtem opakování, jedná se o 240 kb vysoce nestabilní palindromy, které jsou náchylné k různým typům genetických změn a poškození (Barbouti et al., 2004). V důsledku vzniku i(17q) dochází k delecí celého krátkého ramene včetně oblasti 17p13.1, ve které je lokalizován gen *TP53*.

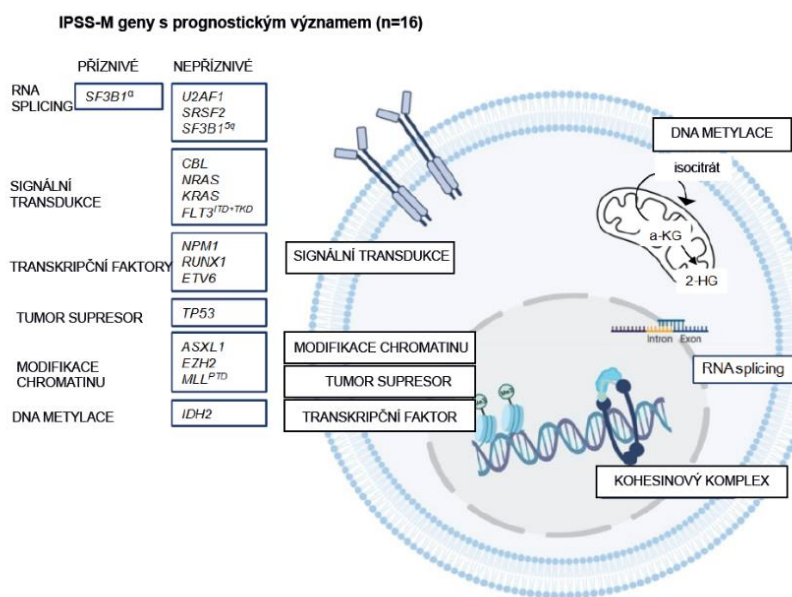
Z dalších aberací chromosomu 17 se lze setkat s balancovanými a nebalancovanými translokacemi. Nebalancované translokace jsou takové přestavby, při kterých není zachováno původní množství genetického materiálu. Podle ISCN nomenklatury (International System for Human Cytogenomic Nomenclature, 2021) jsou takto přestavěné chromosomy označovány jako derivované. U MDS se můžeme setkat s translokacemi všech chromosomů a chromosomy 1, 3, 7, 12 a 17 jsou translokovány nejčastěji. Balancované translokace chromosomu 17 s izolovaným výskytem jsou ovšem u MDS poměrně vzácné. Typicky se setkáváme s nebalancovanými změnami, které jsou součástí komplexního karyotypu. (Mohamed et al., 2020; Xu et al., 2010). Ve studii zabývající se balancovanými a nebalancovanými změnami u MDS byl chromosom 17 součástí translokace v 9,1 % případů a nejčastější zlomovou oblastí byl pruh 17q22. Gen *TP53* tak v přestavbě nebyl zahrnut (Mohamed et al., 2020). Jiná studie identifikovala, že chromosom 17 tvořil translokační pár nejčastěji s chromosomy 4, 7, 11, 19 a 21 (Diamantopoulos et al., 2019). V kontextu komplexního karyotypu byly přestavby chromosomu 17 popisovány v 55,3 % případů a nebalancované translokace byly druhým nejčastějším nálezem aberace chromosomu 17 (Xu et al., 2010). Translokace jsou obecně u pacientů s MDS spojovány s těžším průběhem onemocnění, nicméně příčinou této skutečnosti je fakt, že se zpravidla jedná o přestavby vyskytující se v komplexním karyotypu (Mohamed et al., 2020).

2.6 Molekulárně genetické změny u MDS

Jak již bylo zmíněno, za rozvojem MDS stojí poškození krevní kmenové buňky. Získané aberace vedou k nárůstu nestability genomu, jež má za následek zvýšenou pravděpodobnost vzniku dalších mutací. Onkogenní mutace byly identifikovány u 78 % pacientů s MDS, z toho 43 % pacientů mělo dvě a více mutací spojených s patogenezí tohoto onemocnění a 10 % pacientů pak mělo více než čtyři mutace (Papaemmanuil et al., 2013). Pozdější studie provedená za účelem vytvoření IPSS-M zjistila výskyt molekulárních změn u 94 % pacientů, kdy 53 % z nich mělo zcela normální karyotyp a naopak pouze 4 % měli aberantní karyotyp bez zjištěných mutací. Dále byl porovnán mutační profil pacientů s primárními MDS a sekundárními MDS a kromě zvýšeného výskytu mutací *TP53^{mutihit}*, *PPM1D* a *SETBP1* se tyto dvě skupiny nelišily (Bernard et al., 2022).

U MDS se nejčastěji setkáváme s mutacemi v genech pro komponenty spliceosomálních komplexů, jakou jsou například *SF3B1*, *SRSF2* či *U2AF1*, dále v genech pro proteiny účastnící se

epigenetických modifikací – konkrétně metylací, kterými jsou *DNMT3A* či *IDH1/IDH2* nebo v genech *RUNX1* a *TP53* kódujících transkripční faktory. Často také nacházíme mutace v genech pro komponenty drah signální transdukce a modulace chromatinu (geny shrnuty na obrázku 1) (Bernard et al., 2022, Hoff and Madanat, 2023). Vzhledem k frekvenci výskytu mutací a funkcím zasažených genů je jasné, že genetické defekty hrají zcela zásadní roli v procesu patogeneze MDS. Jejich identifikace a přesná charakterizace jsou klíčové pro správnou klasifikaci a určení prognózy.



Obrázek 2: Prognosticky významné geny a varianty jejich mutací. Geny jsou rozřazeny na základě prognózy a je uvedena funkce proteinů, které kódují, a to včetně jejich lokalizace v buněčných kompartmentech. Převzato a upraveno (Hoff and Madanat, 2023).

2.6.1 Mutace genů pro RNA sestřih

Spliceosomy jsou ribonukleoproteinové komplexy sloužící k posttranslačním modifikacím. Tyto jaderné organely katalyzují sestřih nascentní pre-mRNA, čímž se podílí na jejich úpravách na mRNA a stojí tak na počátku procesu genové exprese. Spliceosomy jsou tvořeny pěti hlavními jadernými ribonukleoproteiny (snRNP). snRNP U1, U2, U4, U5 a U6 interagují s pre-mRNA i spolu navzájem a jsou nezbytné pro přesný a účinný splicing. Spliceosomy jsou kromě snRNP tvořeny celou řadou dalších proteinů důležitých například pro sestavení ribosomu, katalytickou aktivitu či regulaci přesnosti splicingu. Kromě klasického sestřihu intronů umožňují spliceosomy také alternativní sestřih a dávají vzniknout různým variantám mRNA, ze kterých jsou translatovány izoformy proteinů (Wahl et al., 2009).

Spliceosomální mutace vznikají v raném klonálním vývoji a v patogenezi MDS často představují iniciační událost vedoucí k dysfunkci hematopoetické kmenové buňky. Jejich důsledkem je neefektivní sestřih pre-mRNA, přeskokování intronů či splicing exonů (Lee et al., 2016; Yoshida et al., 2011). Prevalence sestřihových mutací je u MDS vysoká. V somatických buňkách se s nimi setkáváme až u 60 % pacientů a nejčastěji se jedná o mutace bodové lokalizované v hot-spot oblastech genů *SF3B1*, *SRSF2*, *U2AF1*, *ZRSR2*, *PRPF40B*, *SF3A1*, *SF1* a *U2AF65* (Hoff and Madanat, 2023; Yoshida et al., 2011). Mezi vůbec nejfrekventovanější spliceosomální mutace patří ty v genech *SF3B1*, *SRSF2*, *U2AF1*.

Gen *SF3B1* je mutován u 20–30 % pacientů a nachází se na krátkém rameni chromosomu 2 (Hosono, 2019). Podle WHO klasifikačního systému tvoří MDS s nízkým počtem blastů a mutací *SF3B1* vlastní subtyp onemocnění zvaný MDS-*SF3B1*, který spadá do kategorie MDS definovaných genetickými abnormalitami. MDS-*SF3B1* představuje více než 90 % případů MDS s ≥ 5 % prstenčitých sideroblastů v KD (Khoury et al., 2022). V minulosti byl nález mutace *SF3B1* asociován s dobrou prognózou, nicméně v klasifikaci IPSS-M bylo poukázáno na skutečnost, že tyto pacienty lze dále dělit do tří kategorií s odlišnou prognózou. Byla rozlišena skupina nemocných s mutací v genu *SF3B1* se současnou izolovanou del(5q). Tato skupina byla označena *SF3B1*^{5q}. Dále byla rozlišena skupina *SF3B1*^β charakteristická mutací genu *SF3B1* a komutacemi v genech *BCOR*, *BCORL1*, *NRAS*, *RUNX1*, *SRSF2* nebo *STAG2*. Poslední identifikovanou skupinou byla *SF3B1*^α. U těchto pacientů byla identifikována mutace *SF3B1* společně s jakoukoli další aberací, kromě výše jmenovaných. Dobrá prognóza dříve obecně asociovaná s mutacemi genu *SF3B1* byla omezena na skupinu *SF3B1*^α, která představovala 78 % případů všech *SF3B1* nálezů. U skupin *SF3B1*^{5q} a *SF3B1*^β dobrá prognóza potvrzena nebyla (Bernard et al., 2022).

Druhým významným sestřihovým genem je *SRSF2*, který se nachází na krátkém rameni chromosomu 17 v oblasti q25. Mutace *SRSF2* se vyskytuje asi u 15 % případů MDS a je často doprovázena dysplastickými změnami vedoucími ke granulocytopenii a trombocytopenii. Celkově je pak nález spojován s horší prognózou a zvýšeným rizikem transformace do AML (Hoff and Madanat, 2023; Thol et al., 2012). Posledním genem je gen *U2AF1*. V IPSS-M je mutace tohoto genu lokalizovaného na chromosomu 22q22 hodnocena jako znak špatné prognózy s vysokým rizikem přechodu do AML. Prevalence této mutace je 10–15 % (Bernard et al., 2022; Thol et al., 2012).

2.6.2 Mutace genů pro metylaci DNA

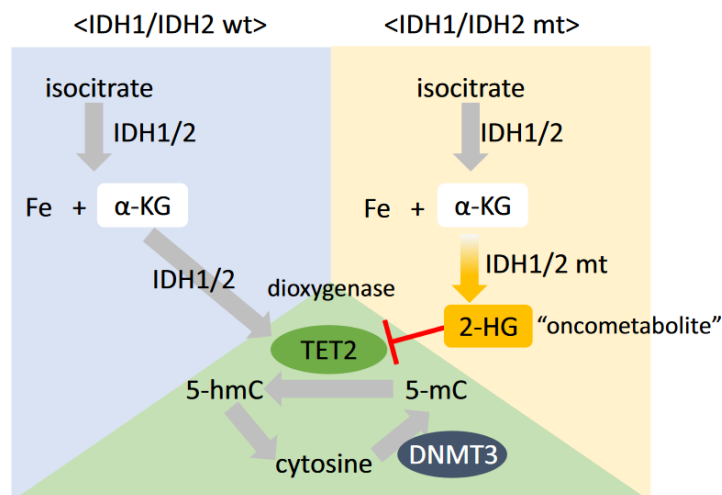
Neefektivní metylace způsobená mutacemi v genech pro epigenetické mechanismy je dnes považována za jednu z hlavních příčin aberantní diferenciaci hematopoetických kmenových buněk, a tedy patogeneze MDS. CpG ostrůvky jsou součástí 60–70 % genových promotorů a změny v jejich metylačním stavu zcela logicky ovlivňují genovou expresi (Hoff and Madanat, 2023). Stejně jako

v případě mutací v sestřihových genech i metylační mutace vznikají v časných fázích onemocnění a pacienti s těmito aberacemi dobře reagují na léčbu hypometylačními činidly jako jsou 5-azacytidin a 5-aza2'deoxyctidine (Aleshin and Greenberg, 2018). Mezi často zasaženými DNA metylačními geny jsou například *TET2*, *DNMT3A* či *IDH1* a *IDH2* (Hoff and Madanat, 2023). V klasifikaci IPSS-M jsou považovány za prognosticky významné geny *DNMT3A* a *IDH2* (Bernard et al., 2022).

DNMT3A je DNA metyltransferáza 3A nacházející se na chromosomu 2 v oblasti p33 (Hosono, 2019). Tento enzym zjišťuje *de novo* metylaci cytosinu v CpG ostrůvcích, je mutován u 8 % pacientů a jedná se o jeden z šesti nejčastěji mutovaných genů u MDS (Haferlach et al., 2014b; Walter et al., 2011). Ačkoli byla napříč celou kódující oblastí genu identifikována řada mutací od různých typů substitucí přes inserce a delece, až 25 % všech nálezů představuje substituce R882H v metyltransferázové doméně, která má za následek utlumení metylační aktivity enzymu (Nguyen et al., 2019; Walter et al., 2011). Mutace v tomto genu nejsou asociovány se specifickým karyotypem a z hlediska prognózy a rizika transformace do AML měli pacienti s mutacemi v *DNMT3A* ve srovnání s pacienty bez aberace kratší dobu přežití a rychlejší transformaci do AML (Jawad et al., 2022).

Naopak mutace genu *TET2* vedou k hypermetylacii. Enzymatickým produktem tohoto genu je metylcytosin dioxygenáza 2, která katalyzuje oxidaci 5-methyl-cytosinu na 5-hydroxymethyl-cytosin a stojí tak za prvním krokem procesu demetylace DNA (Hosono, 2019). *TET2* se nachází se na chromosomu 4 v oblasti q44 a je mutován u více než 20 % pacientů s tím, že výskyt této mutace se vzájemně vylučuje s mutacemi v demetylázách *IDH1/2* (Hosono, 2019; Papaemmanuil et al., 2013). Prognostický význam mutací *TET2* je dlouhodobě podrobně studován vzhledem k frekvenci jejich výskytu nejen u MDS. Závěry jednotlivých studií se významně odlišují a IPSS-M klasifikace tak mutace *TET2* nehodnotí (Bernard et al., 2022; Danishevich et al., 2024).

IDH1/2 kódují isocitrát dehydrogenázy katalyzující například oxidativní dekarboxylaci isocitrátu na α -ketoglutarát. Jedná se o geny klíčové pro buněčný metabolismu a důsledkem jejich mutací je tvorba onkogenního R-2-hydroxyglutarátu. Ten působí jako antagonist α -ketoglutarátu a stojí za inhibicí několika dioxygenáz závislých na α -ketoglutarátu včetně *TET2* (ilustruje obrázek 2). Mutace *IDH1/2* tak nepřímo přispívají k udržování metylovaného stavu (Hosono, 2019). Geny *IDH1/2* se nacházejí v oblastech 2q33 a 15q26 a výskyt jejich mutantních variant se uvádí v rozmezí od 5 % do 12 % případů (DiNardo et al., 2016; Hosono, 2019). Při porovnání klinického nálezu pacientů s mutacemi *IDH1/2* a bez nich bylo pozorováno, že pacienti s *IDH1/2* mutacemi měli závažnější neutropenii a trombocytopenii, a naopak vyšší počet blastů v KD. Jejich cytogenetický nálezn byl řazen do kategorie středního rizika a byl u nich pozorován zvýšený výskyt izolované trisomie chromosomu 8 (DiNardo et al., 2016). Zatímco *IDH2* je v IPSS-M považován za prognostický marker MDS, význam mutace *IDH1* zatím nebyl zcela objasněn (Bernard et al., 2022).



Obrázek 3: Znárodnění rozdílých vlivů normálních a mutantních produktů genů *IDH1/IDH2* na buněčný metabolismus a aktivitu buněčné dioxygenázy TET2. Převzato (Hosono, 2019).

2.6.3 Mutace genů pro histonové modifikace

Úpravy N-terminálních konců histonů se společně s metylací DNA řadí mezi epigenetické modifikace. Vazba metylových, acetylových či například fosfátových skupin na aminokyselinové zbytky histonů ovlivňuje interakce mezi histonovými proteiny a DNA, což umožňuje změny architektury chromatinu a ovlivňuje dostupnost DNA pro transkripci (Hosono, 2019). Geny pro histonové modifikace, které jsou hodnoceny IPSS-M, jsou *ASXL1*, *EZH2* a *MLL^{PTD}* a ve srovnání s geny pro metylaci DNA či spliceosomální podjednotky jsou tyto geny mutovány až v pozdějších fázích klonálního vývoje MDS (Bernard et al., 2022; Papaemmanuil et al., 2013).

ASXL1 kóduje protein, který interaguje s proteiny polycomb komplexu a tím se nepřímo podílí na represii transkripce indukované metylací H3K27 (Hosono, 2019). Gen *ASXL1* se nachází na chromosomu 20 v pruhu q11 nicméně klasická delece 20q se jej týkat nemusí, jelikož se nachází mimo obvykle deletovanou oblast (Martín et al., 2021). Nejčastějším typem aberací *ASXL1* jsou inserce a delece. Jejich důsledkem je posun čtecího rámce v exonu 12, což má za následek změny C-terminální oblasti obsahující PHD doménu, která zřejmě slouží k protein-proteinovým interakcím (Martín et al., 2021). Frekvence výskytu mutací tohoto genu je uváděna v rozmezí 10–20 % a jedná se o třetí nejčastěji mutovaný gen u MDS (Khoury et al., 2022). Sekvence 27 driver genů u osob ve věku ≥ 80 let také zjistila zvýšenou prevalenci této aberace u pacientů, kteří byli během života exponováni látkám poškozujícím DNA, jakou jsou chemoterapeutika, pesticidy či se jednalo o kuřáky. Celkově je pak mutace nebo delece *ASXL1* znakem nepříznivé prognózy, pacienti hůře odpovídají na léčbu azacytidinem a je u nich zvýšené riziko přechodu onemocnění do AML (Bernard et al., 2022; Martín et al., 2021).

Stejně jako u *ASXL1*, tak i v případě *MLL^{PTD}* byl klinický nález u MDS spojen s nepříznivou prognózou a vysokým rizikem transformace do AML. Horší prognóza pro pacienty s *MLL^{PTD}* platila i při srovnání s pacienty s komplexním ovšem bez *MLL^{PTD}* (Choi et al., 2018). Gen *MLL* dnes označovaný *KMT2A*, se nachází v oblasti 11q23 a studie naznačují jeho významnou roli v hematopoéze a myeloidní diferenciaci (Zahid et al., 2016). *MLL^{PTD}* byl zjištěn u 2,5 % pacientů s MDS společně vysokým počtem blastů v KD a dle IPSS-M se tento nález řadí mezi jedny z nejsilnějších molekulárních ukazatelů špatné prognózy (Bernard et al., 2022).

Dalším významným genem pro histonové modifikace je gen *EZH2*, který se nachází v oblasti 7q36.1 (Zahid et al., 2016). *EZH2* se společně s *ASXL1* podílí na procesu metylace histonu H3K27 a jeho mutace, se kterou se setkáváme si v 6 % případů, je znakem nepříznivé prognózy a vysokého rizika transformace do AML stejně jako je tomu v případě *MLL^{PTD}* (Bernard et al., 2022).

2.6.4 Mutace v dalších genech

Transkripční faktory nebo molekuly účastníci se signální transdukce jsou dalšími dvěma skupinami genů, s jejichž mutacemi se u MDS setkáváme. Z klinického hlediska je významný například transkripční faktor *RUNX1*. Mutace tohoto regulátoru diferenciaci hematopoetických kmenových buněk jsou nejen znakem nepříznivé prognózy, ale navíc se s nimi můžeme setkat i v zárodečné linii a stojí za familiárními formami MDS, pro kterou je charakteristická mírná až střední trombocytopenie a abnormální funkce trombocytů (Liew and Owen, 2011). Z hlediska IPSS M je dále velmi významný transkripční faktor p53 kódovaný genem *TP53*, který bude podrobněji rozebrán v následující kapitole. Do skupiny významných transkripčních faktorů řadíme *CBL*, *NRAS*, *KRAS* a *FLT3^{ITD+TKD}*. Všechny jmenované geny se účastní RAS-MAPK signalizace a jsou častěji mutovány u AML než u MDS (Hoff and Madanat, 2023).

2.6.5 Protein p53

Protein p53 je sekvenčně specifický transkripční faktor, který bývá označován jako „strážce genomu“. Toto označení získal proto, že se podílí na regulaci kritických signacích drah jejichž fungování je nezbytné pro procesy, jakými jsou například buněčné dělení, apoptóza, autofágie, imunitní odpověď či udržování genomové stability. Jedním z nejběžnějších negativních regulátorů p53 je *MDM2*. Nejsou-li buňky vystavovány endogennímu či exogennímu stresu, je p53 vázán a značen touto E3 ubikvitin ligázou a následně dochází k jeho proteosomální degradaci. Tímto způsobem je udržována pouze nízká hladina p53 v buňkách. Naopak za nefyziologických podmínek dochází k jeho fosforylaci, což vede k disociaci *MDM2* a p53 se tak stává aktivním (Fuchs et al., 1998; Momand et al., 1997; Shieh et al., 1997).

Aktivní p53 se váže do definovaných oblastí genomu označovaných také jako p53-vazebná místa a aktivuje genovou expresi. Zároveň je také schopen expresi některých genů reprimovat, a to nepřímým mechanismem. Jeho správné fungování brání akumulaci poškození DNA, jejímž důsledkem je genová nestabilita, vedoucí k zisku dalších mutací a k následné nádorové transformaci (Marei et al., 2021; Song et al., 2024).

2.6.5.1 Mutace genu *TP53*

Gen *TP53* je nejčastěji mutovaným genem u všech typů nádorových onemocnění a mutace v něm jsou považovány za klíčové pro jejich rozvoj. V současné době bylo identifikováno přes 1 000 variant mutantních alel (Sabapathy and Lane, 2018). Studie analyzující alelickou frekvenci v tomto tumor supresoru a celkový genomický kontext u pacientů s primárními MDS zjistila, že 78 % všech případů představují substituce, z nichž nejčastější jsou missense mutace. Zbylé změny v nukleotidové sekvenci zahrnovaly nonsense či silent mutace, dále mutace v sestřihovém místě, ale i posuny v čtecím rámci způsobené insercemi a delecemi (Montalban-Bravo et al., 2020).

Z hlediska lokalizace je mutacemi nejčastěji postihovaná sekvence kódující DNA-vazebnou doménu proteinu p53 a mutace v ní můžeme dále rozdělit na 2 typy. Rozlišujeme mutace v aminokyselinách klíčových pro interakci p53 s DNA, konkrétně se jedná například o hotspot mutace R273H a R248Q, a mutace v aminokyselinách konformační domény jako například mutace R175H či R249S. V jejichž důsledku se protein nemůže správně skládat, a tedy ztrácí svou DNA-vazebnou schopnost. (Sabapathy and Lane, 2018). Další mutační hotspoty se nachází v N a C terminálních doménách. V N-terminální doméně se jedná o sekvenci kódující transaktivační doménu a oblast bohatou na prolin. V C-terminální oblasti se mutační hotspoty nacházejí v oligomerizační doméně a doméně pro negativní regulaci (Sabapathy and Lane, 2018).

Mutaci v genu *TP53* má 10–12 % pacientů s primárními MDS a 30 % nemocných se sekundárními MDS, z toho dvě třetiny mají tzv. několik zásahů. Několik zásahů je stav, kdy má gen buď více než jednu mutaci, mutaci a delecí a nebo mutaci se ztrátou heterozygotnosti (LOH) (Bernard et al., 2020; Hosono et al., 2019). LOH, při které byl zachován počet kopií sekvencí DNA je označován jako získaná uniparentální disomie (aUPD). Tento jev je často asociován s homozygotními mutacemi tumor supresorových genů nebo onkogenů (Tuna et al., 2009). Retrospektivní analýza sekvenačních a cytogenetických dat pacientů s diagnózou AML a MDS a současnou aberací chromosomu 17 detekovala patogenní mutaci v tomto tumor supresoru v 70 % případů. Vznikl-li navíc i přes mutaci proteinový produkt, byl pozorován dominantně negativní efekt a aberantní protein interferoval s funkční variantou (Britt et al., 2020a). Společným znakem pacientů v této studii byl také komplexní karyotyp. S mutací *TP53* a třemi a více cytogenetickými změnami se setkáváme až u 55 % pacientů

(Haase et al., 2019). Při porovnání pacientů s komplexním karyotypem s aberantní alelou *TP53* a wild type alelou byla u pacientů s mutací zaznamenána vyšší komplexita karyotypu a častější výskyt monosomií. Tito pacienti měli také vyšší podíl blastů v KD, výraznější trombocytopenii a jejich klinický nálezn byl dle kritérií IPSS-R horší (Haase et al., 2019). Souvislost mezi komplexním karyotypem s mutací *TP53* a klinickým průběhem byla zaznamenána i ve studii analyzující genomický kontext a frekvenci mutantních alel. U pacientů s nižší variantní alelickou frekvencí (VAF) aberantního *TP53* bylo pravděpodobnější, že zareagují na léčbu hypomethylačními činidly. Dále u takových pacientů bylo zjištěno nižší riziko transformace do AML celkově lepší celkové přežití (Montalban-Bravo et al., 2020).

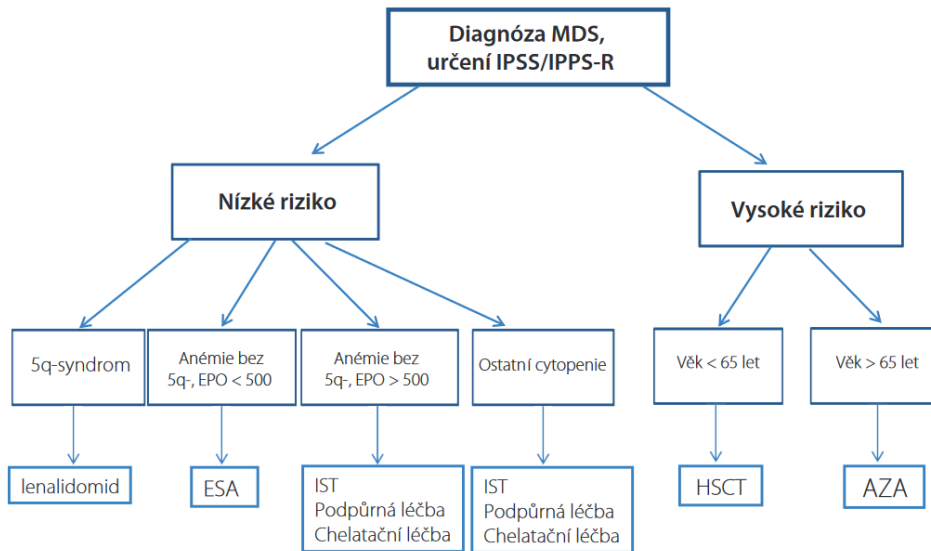
2.7 Léčba

Léčba nemocných s MDS je vždy vysoce individualizovaná. Pacienti jsou na základě stádia onemocnění, IPSS-R a/nebo IPSS-M rizikového skóre děleni na dvě skupiny. Do kategorie s vysokým rizikem spadají pacienti se středním, vysokým a velmi vysokým rizikem (dělení dle IPSS-R) do kategorie nízkého rizika jsou řazeni nemocní s velmi nízkým, nízkým rizikem a část nemocných se středním rizikem, kteří mají $\leq 3,5$ bodu (Bělohávková, 2021).

Část pacientů spadajících do skupiny s nízkým rizikem má v době stanovení diagnózy pouze lehkou cytopenii bez blastů v KD či chromosomových změn. V takovém případě nemocní pouze dochází na pravidelné kontroly a je sledován jejich krevní obraz (Čermák, 2016). Změny zdravotního stavu, závažnější cytopenie nebo aberantní chromosomový nálezn již vyžadují terapeutickou intervenci. Anemickým pacientům jsou podávány krevní transfuze a při nízké hladině endogenního erythropoetinu může být zahájena podpůrná léčba preparáty stimulaujícími erythropézu. Při těžké trombocytopenii mohou být indikovány transfuze krevních destiček a jak anemickým, tak trombocytopenickým pacientům bývá nasazována chelatační léčba k zamezení akumulace železa v organismu (Čermák, 2016; Červinek, 2013). Je-li cytopenie přítomná v dalších krevních řadách může být zahájena imunosupresivní léčba současně s profylaktickým podáváním antibiotik a antimykotik, které mohou být indikovány také u těžké neutropenie. Imunosupresivní terapie je doporučována u nemocných s MDS s izolovanou delecí 5q, kteří na ní dle dat z klinických studií dobře reagují (Bělohávková, 2021).

U nemocných, které řadíme do skupiny s vysokým rizikem, existují dvě hlavní možnosti: terapie hypomethylačními činidly jako je azacitidin anebo alogenní transplantace krevních kmenových buněk. Podávání azacitidinu může vést ke zlepšení krevního obrazu až odstranění závislosti na transfuzích, prodloužení přežití a zejména oddálení přechodu onemocnění do AML. Nicméně medián trvání léčebné odpovědi se pohybuje kolem dvanácti měsíců. (Vondráková, 2010). U pacientů ve věku ≤ 65 let, kteří dle IPSS-R spadají do skupiny s vysokým a velmi vysokým rizikem, může být indikována alogenní transplantace krevních kmenových buněk. V současné době se jedná o jedinou kurativní

metodu léčby MDS. Tento druh terapie není standardně indikován u pacientů ze skupiny nízkého rizika, nicméně může být zvážena u mladších pacientů při selhání první linie léčby. Transplantace je též zvažována u sekundárních MDS po léčbě chemoterapií či radioterapii (Bělohávková, 2021).



Obrázek 4: Schéma terapeutických možností pacientů s MDS. Převzato (Bělohávková, 2021).

3 Cíle práce

Cílem této diplomové práce bylo provést detailní cytogenomickou analýzu nebalancovaných aberací chromosomu 17 u dospělých nemocných s různými subtypy myelodysplastických neoplázií. Sledovat jejich asociaci s delecemi/mutacemi/LOH genu *TP53*, posoudit jejich vliv na klonální vývoj, progresi onemocnění a porovnat její frekvenci a význam u primárních a sekundárních MDS.

4 Materiál

4.1 Soubor pacientů

V období od 1.1.2021 do 31.3.2024 byly 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 vyšetřeny vzorky kostní dřeně 37 pacientů s primárními a sekundárními myelodysplastickými neopláziemi (MDS) a aberacemi chromosomu 17. Jednalo se o změny zjištěné metodou konvenčního G-pruhování. Soubor tvořilo 35 % žen a 65 % mužů. Průměrný věk pacientů byl 68 let a medián věku byl 72 let. Věkové rozmezí nemocných bylo od 37 let do 85 let (příloha 1). U 33 pacientů (89 %) byly diagnostikovány primární MDS a se sekundárními MDS byli diagnostikováni 4 pacienti (11 %).

Vzorky kostní dřeně všech nemocných byly vyšetřeny klasickou cytogenetickou analýzou. V diagnostickém odběru byla metodou interfázní fluorescenční *in situ* hybridizace (I-FISH) ověřena delece oblasti 17p13 a velikost patologického klonu. U pacientů s komplexním karyotypem bylo provedeno vyšetření metodou mnohobarevné FISH (mFISH) za účelem přesné charakterizace přestaveb, do kterých chromosom 17 vstupoval. Pro další upřesnění oblastí zlomu na chromosomu 17 byla použita metoda mnohobarevného pruhování (mBAND). Dále byly u nemocných metodou komparativní genomové hybridizace na mikročipech (aCGH/SNP) upřesněny rozsahy delecí na krátkém rameni chromosomu 17. V případě dostatku biologického materiálu bylo provedeno vyšetření metodou sekvenování nové generace (NGS) za použití genového panelu Archer™ VARIANTPlex™ Myeloid kit k detekci přítomnosti mutací asociovaných s MDS včetně mutací tumorsupresoru *TP53*.

4.2 Chemikálie

Příprava buněk pro cytogenetická a molekulárně cytogenetická vyšetření

- | | |
|----------------------------------------|---------------|
| • Heparin (Heparin natrium 5000 IU/ml) | Zentiva |
| • PBS (Fosfátový pufr) | lékárna VFN |
| • kultivační médium MarrowGrow | Pentagen |
| • Colcemid (Demecolcine solution) | Sigma-Aldrich |
| • 0,075 M KCl | Lékárna VFN |
| • dH ₂ O | |
| • methanol | Penta |
| • kyselina octová | Penta |

G — pruhování

- | | |
|---------------------------------------------------------|---------------|
| • Wrightovo barvivo (eosin, methylenová modř) | Sigma-Aldrich |
| • 0,2 N HCl | lékárna VFN |
| • 2 x SSC | lékárna VFN |
| • NaH ₂ PO ₄ · 2 H ₂ O | Fluka |
| • KH ₂ PO ₄ , | Penta |
| • dH ₂ O | |
| • methanol | Penta |

I-FISH, mFISH/mBAND

- | | |
|-----------------------------------------|------------------------|
| • 20 x SSC | lékárna VFN |
| • absolutní ethanol | Penta |
| • NaOH | lékárna VFN |
| • dH ₂ O | |
| • DAPI/antifade | MetaSystems |
| • FIXOGUM-Rubber cement | Marabu |
| • NP-40 (Nonidet P40) | Glentham Life Sciences |
| • imerzní olej (Immersol) | Carl Zeiss |
| • fluorescenční sondy viz kapitolou 4.4 | |

aCGH

- | | |
|---------------------------------------|----------------|
| • 1x PBS | lékárna VFN |
| • QIAamp DNA Blood Mini Kit | Qiagen |
| • absolutní ethanol | Penta |
| • Agaróza (PCR agarose) | Top-Bio s.r.o. |
| • 1x TAE pufr (Tris-acetát-acid-EDTA) | Sigma |
| • GelRed | Thermo Fisher |
| • GeneRuler DNA Ladder | Thermo Fisher |
| • nanášecí pufr | Thermo Fisher |

- dH2O
- ddH2O
- anotovaná referenční genomová DNA (OneSeq Reference DNA Male or Female) Agilent Technologies
- 10x reakční pufr pro restriční enzymy Agilent Technologies
- BSA
- Alu I Agilent Technologies
- RSA I Agilent Technologies
- random primer Agilent Technologies
- 5x reakční pufr pro značící polymerázu Agilent Technologies
- 10x dNTPs Agilent Technologies
- Cyanine 3-dUTP (Cy-3) Agilent Technologies
- Cyanine 5-dUTP (Cy-5) Agilent Technologies
- Exo-Klenowův fragment Agilent Technologies
- TE pufr (Tris-EDTA) Sigma
- Cot-1 DNA Agilent Technologies
- 10x CGH blokující činidlo Agilent Technologies
- 2x HI-RPM hybridizační pufr Agilent Technologies

NGS

- 1x PBS lékárna VFN
- QIAamp DNA Blood Mini Kit Qiagen
- absolutní ethanol Penta
- Agaróza (PCR agarose) Top-Bio s.r.o.
- 1x TAE pufr (Tris-acetát-acid-EDTA) Sigma
- GelRed Biotium
- GeneRuler DNA Ladder Thermo Fisher
- nanášecí pufr Thermo Fisher
- ddH2O
- Tris-HCl lékárna VFN
- PCR Nuclease-free water Archer
- NaOH Lékárna VFN
- Archer™ VARIANTPlex™ Archer
- Qubit dsDNA HS Assay kit Thermo Fisher
- AMPure XP magnetické kuličky Beckman Coulter
- KAPA Universal Library Quantification Kit Roche
- NextSeq System Mid-Output kit Illumina

4.3 Roztoky

Příprava buněk pro cytogenetická a molekulárně cytogenetická vyšetření

- odběrové médium: 400 ml PBS + 4,8 ml heparinu
- hypotonický roztok: 0,075M KCl (2,796 g KCl + 500 ml dH₂O)
- fixační roztok: metanol + kyselina octová, poměr 3:1

G-pruhování

- 2x SSC: 50 ml 20x SSC + 450 ml dH₂O
- 0,2 N HCl: 7,3 g HCl + 1000 ml dH₂O
- roztok A: 5,34 g Na₂HPO₄ · 2 H₂O + 500 ml dH₂O
- Roztok B: 4,05 g KH₂PO₄ + 500 ml dH₂O
- Sörensenův pufr: roztok A + roztok B v poměru 1:1
- barvicí roztok: 2,5 g Wrightova barviva + 1000 ml methanolu

I-FISH, mFISH/mBAND

- 70% EtOH: 700 ml EtOH + 300 ml dH₂O
- 85% EtOH: 850 ml EtOH + 150 ml dH₂O
- 95% EtOH: 950 ml EtOH + 50 ml dH₂O
- 2x SSC: 50 ml 20x SSC + 450 ml dH₂O
- 0,4x SSC/0,3% NP-40: 10 ml 20x SSC + 488,5 ml dH₂O + 1,5 ml NP-40
- 2x SSC/0,1% NP-40: 50 ml 20x SSC + 9,5 ml dH₂O + 0,5 ml NP-4
- CEP hybridizační pufr: 55% formamid, 1x SSC, 10% dextran sulfát
- LSI/WCP hybridizační pufr: 50% formamid, 2x SSC, 10% dextran sulfát
- 0,07 M NaOH: 1,4 g NaOH + 500 ml dH₂O

aCGH

- 1% agarózový gel: 0,9 g agarózy + 90 ml 1xTAE pufru

NGS

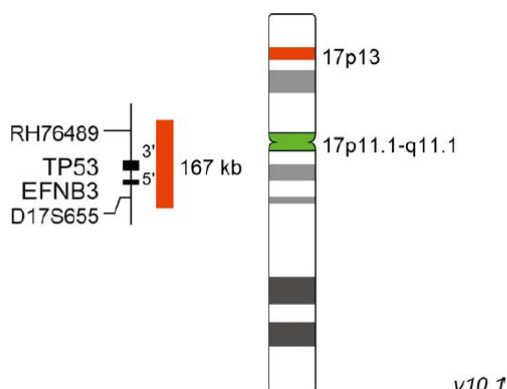
- 1% agarózový gel: 0,9 g agarózy + 90 ml 1xTAE pufru
- 10mM Tris-HCl: 200mM Tris-HCl + 1000 ml dH₂O
- 5mM NaOH: 0,2 NaOH + 1000ml dH₂O
- 70% EtOH: 700 ml EtOH + 300 ml dH₂O
- 80% EtOH: 800 ml EtOH + 200 ml dH₂O

4.4 DNA sondy pro FISH

I-FISH

název sondy	cílová oblast	výrobce
XL 5q31/5q33/5p15 5q31	5q31.2/5q32-33.1/5p15.2—15.3	MetaSystems
XL del(20q) plus	20q12—q13.1	MetaSystems
LSI D7S486 SpectrumOrange/CEP 7 SpectrumGreen	7q31/7p11.1—q11.1	Abbot Molecular
CEP 8 SpectrumOrange	8p11.1—q11.1	Abbot Molecular
CEP 9 SpectrumGreen	9p11.1—q11.1	Abbot Molecular
XL TP53/17cen	17p13/7p11.1—q11.1	MetaSystems
LSI TP53/CEP17	17p13.1/17p11.1—q11.1	Abbot Molecular
TP53 (17p13)/ SE 17	17p13/17p11.1—q11.1	Kreatech

Tabulka 6: Soubor sond používaných při vyšetřování pacientů s MDS.



Obrázek 5: Schéma lokus specifické fluorescenční sondy TP53/17cen od firmy MetaSystems. Oranžově je značena oblast genu *TP53* (17p13), jejíž delece je sledována. Zelený signál patří centromerické oblasti (17p11.1–q11.1) a slouží jako kontrola. Převzato <https://metasystems-probes.com/en/probes/>

mFISH, mBAND

název sondy	výrobce
XCyte 24	MetaSystems
XCyte 17	MetaSystems

Tabulka 7: Sondy pro mFISH/mBAND

5 Metody

5.1 Příprava buněk pro cytogenetická a molekulárně cytogenetická vyšetření

Konvenční cytogenetická analýza je základním vyšetřením v algoritmu cytogenetické a molekulárně cytogenetické diagnostiky MDS. Získané chromosomové změny poskytují cenné informace o závažnosti onemocnění a pravděpodobnosti přechodu do akutní myeloidní leukémie. Cytogenetický nálezný tak napomáhá individualizovat léčebný postup a nastavit co nejvhodnější léčebnou strategii.

5.1.1 Kultivace buněk kostní dřeně

Pro cytogenetickou analýzu byly použity buňky kostní dřeně (KD) získané aspirací ze sternu nebo trepanobiopsií. Dřeň byla lékaři sterilně odebírána do speciálních zkumavek s odběrovým médiem složeným z PBS a heparinu. Po doručení do laboratoře byly vzorky centrifugovány po dobu 5 minut při 2000 rpm. Centrifugací oddělené leukocyty vytvořily na hladině média prstenec, který byl v laminárním boxu přenesen do kultivačních nádobek obsahujících 5 ml kultivačního média Marrowgrow obsahujícího fetální telecí sérum, pH indikátor a antibiotikum gentamicin. Buňky byly následně kultivovány v termostatu s 5 % CO₂ atmosférou při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin.

5.1.2 Zpracování buněčných kultur

Po uplynutí doby kultivace bylo k buňkám přidáno 100 µl kolcemidu. Kolcemid je mitotický jed zastavující buněčné dělení v metafázi vazbou na mikrotubuly dělicího vřeténka. Buňky byly opět kultivovány v termostatu s 5 % CO₂ atmosférou při teplotě 37 °C 1 hodinu. Následně byly buňky přeneseny z kultivačních nádob do centrifugačních zkumavek a médium ve zkumavkách bylo doplněno kultivačním médiem na maximální objem 6 ml. Centrifugační zkumavky se vzorky byly vloženy do automatu HANABI-PII Plus Metaphase Chromosome Harvester (ADS Biotec, Omaha, USA). Buňky byly centrifugovány a byl odsát supernatant. K buněčnému precipitátu bylo přidáno 5 ml hypotonického roztoku a vzorky byly 20 minut inkubovány při pokojové teplotě. Hypotonické prostředí vedlo ke zvětšení objemu buněk a prasknutí buněčných membrán, což způsobilo vylití buněčného obsahu a genetického materiálu. Následně byla vzorky opět centrifugovány a po odsátí supernatantu bylo k buňkám přidáno 5 ml směsi tvořené hypotonickým a fixačním roztokem (methanol a kyselina octová v poměru 3:1). Po 5 minutách inkubace byly vzorky centrifugovány. Buněčný precipitát byl naředěn v 5 ml samotného fixačního roztoku a po 5 minutách opět centrifugován. Tento postup byl zopakován čtyřikrát, čímž bylo dosaženo úplného pročištění od zbytků plazmatické membrány, cytoplazmy a dalších nečistot.

5.1.3 Příprava preparátů

Do přístroje HANABI Metaphase spreader (ADS Biotec, Omaha, USA) byla vložena podložní skla, aby během přípravy vzorku došlo k jejich ohřátí a zvlhčení. Z centrifugačních zkumavek bylo opatrně odsáto co nejvíce fixačního roztoku tak, aby nedošlo k rozvíření precipitátu na dně. Poté byl k precipitátu pomalu přikapáván čerstvý fixační roztok až do dosažení mléčně opaleskujícího zbarvení roztoku. Následně bylo do středu podložních skel přes speciální otvory v přístroji HANABI Metaphase spreader nanášeno 100 µl vzniklé suspenze. Mikroprostředí uvnitř přístroje HANABI Metaphase spreader zajistilo rovnoměrné rozprostření buněčných suspenzí po podložních sklech.

Skla se zaschlou suspenzí byla na závěr zkontrolována ve světelném mikroskopu, aby bylo ověřeno, že suspenze není příliš hustá či řídká a buňky jsou na podložních sklech v optimální hustotě. V případě, že hustota buněk byla příliš nízká, byla připravená suspenze znovu centrifugována, poté byla odebrána část supernatantu, aby došlo ke snížení objemu suspenze a zvýšení její hustoty. V případě příliš vysoké hustoty buněk na podložním skle byla suspenze ve zkumavce naředěna fixačním roztokem.

Následně byla skla uložena do kazet, a to zhruba na dobu jednoho týdne při laboratorní teplotě, aby došlo k jejich kompletnímu proschnutí. Jestliže bylo nutné provést analýzu vzorku urychleně, bylo provedeno „ostaršení“. V takovém případě byly preparáty umístěny na histologickou plotýnku zahřátou na 70 °C.

5.2 G-pruhování a analýza karyotypu

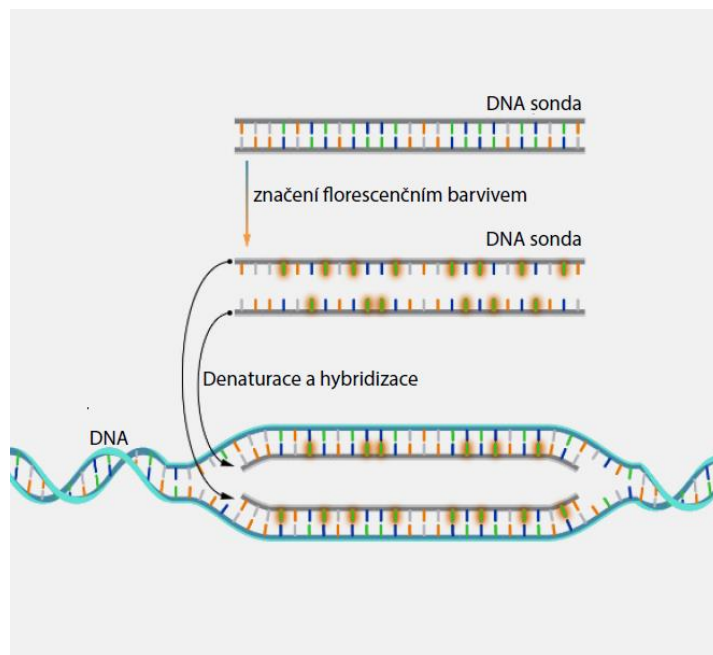
Proschlé nebo „ostaršené“ preparáty byly připraveny na barvení. Před samotným barvením byly preparáty vloženy na 5 minut do kyvety s 0,2 N roztokem HCl, čímž došlo k natrávení chromatinových proteinů a mírnému rozvolnění chromatinu. Následně byla skla na 20 minut umístěna do pufrčního roztoku SSC, který byl předem vytemperován pomocí vodní lázně na 60 °C. Během inkubace bylo připraveno 5 ml barvicího roztoku složeného ze 3 ml Sørensenova pufru a 1 ml Wrightova barviva. Do tohoto roztoku byla skla vložena na 30 sekund až 5 minut podle jeho účinnosti. Poté byla skla opláchnuta destilovanou vodou a ponechána volně oschnout za laboratorní teploty. Nakonec byla provedena kontrola barvení chromosomů ve světelném mikroskopu. Pokud byly chromosomy příliš světlé, bylo sklo znovu vloženo do barvicího roztoku. V případě přebarvení chromosomů bylo provedeno odbarvení v 99,8% roztoku methanolu.

Pomocí mikroskopu AXIOPLAN 2 Imaging (Zeiss, Oberkochen, Německo) a systému Metafer (MetaSystems, Altlußheim, Německo) byly nasnímány metafáze. Právě v tomto stádiu buněčného dělení lze nejlépe zachytit chromosomové aberace, jelikož jsou chromosomy nejvíce kondenzované.

Z nasnímaných fotografií byly vybrány mitózy, které byly pomocí programu Ikaros (MetaSystems, Altlußheim, Německo) upraveny a byly sestaveny karyotypy. Pokud nebylo možné zhodnotit 20 metafází, bylo přistoupeno k molekulárním metodám.

5.3 Fluorescenční *in situ* hybridizace

I-FISH je molekulárně cytogenetická metoda sloužící k vizualizaci specifických nukleotidových sekvencí pomocí fluorescenčně značených oligonukleotidových sond. Podle místa vazby sondy na chromosomu lze sondy rozdělit na satelitní (centromerické a telomerické), lokus specifické a malovací. Díky I-FISH lze cílové sekvence studovat na mikroskopické úrovni při zachování morfologie interfázních jader a mitotických chromosomů. Tato metoda je využívána k ověření nálezu klasické cytogenetické analýzy, oproti které má vyšší citlivost a zároveň nevyžaduje proliferující buňky. Vazba sondy do komplementárních oblastí chromosomů, tedy tzv. hybridizace, probíhá po krátké denaturaci sondy a chromosomové DNA indukované vysokými teplotami. Fluorescenční signály jsou následně hodnoceny ve fluorescenčním mikroskopu. I-FISH umožňuje detekci strukturních či početních změn, mezi které patří například genové fúze, duplikace, amplifikace, delece nebo úplné ztráty chromosomů. Tato metoda také umožňuje hodnotit procentuální zastoupení patologického klonu.



Obrázek 6: Schéma metody I-FISH. Fluorescenčně značená sonda komplementárně páruje s cílovou oblastí DNA. Převzato a upraveno <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Fluorescence-In-Situ-Hybridization>

5.3.1 Laboratorní postup

Na podložní skla byla nanášena buněčná suspenze stejně jako při přípravě preparátů pro klasickou cytogenetickou analýzu. Preparáty byly ponechány schnout za laboratorní teploty. Následujícího dne bylo provedeno „ostaršení“ preparátů v roztoku 2xSSC zahřátého ve vodní lázni na 37 °C. Po 20 minutách v 2xSSC byla vzorky dehydratovány ve vzestupné alkoholové řadě sestávající ze 70%, 85% a 95% roztoku ethanolu. V každém roztoku byly preparáty 2 minuty. Následně byla skla opřena o histologickou plotýnku zahřátou na 42 °C, čímž bylo urychleno jejich oschnutí.

Následovala příprava fluorescenčně značených sond, které byly skladovány v mrazničce při teplotě -20 °C. Při přípravě sond bylo postupováno dle instrukcí výrobce. Použity byly hybridizační sondy od firmy MetaSystems (Altlußheim, Německo), sondy Kreatech (Leica Biosystems, Deer Park, USA), které výrobce dodává předem naředěné. 0,5 µl sondy od firmy Abbott Molecular (Des Plaines, USA) bylo smícháno s 2 µl redestilované vody a 7 µl centromerického pufru (CEP Hybridization Buffer nebo s LSI/WCP pufr podle typu použité sondy). Na podložní skla s fixovanými cytogenetickými preparáty, která byla umístěná na histologické plotýnce předehřáté na 42 °C, bylo nanášeno 4–10 µl sondy. Preparáty byly překryty krycími skly typicky o rozměrech 15 x 15 mm (rozměry se mohly lišit v závislosti na množství biologického materiálu nebo přesném objemu roztoku hybridizační sondy). Pozice krycích skel byla, pro snazší orientaci při hodnocení preparátu, vyznačena z rubové strany pomocí diamantového popisovače. Krycí skla byla oblepena rubbercementem, aby nedocházelo k vysychání sondy během hybridizace a byla umístěna do automatického hybridizačního bloku ThermoBrite (Abbott Molecular, Illinois, USA). Do hybridizačního bloku byly vloženy navlhčené buničtinové pláty pro udržení optimální vlhkosti v průběhu hybridizace. Programy byly nastaveny podle pokynů výrobce dané sondy.

Následující den bylo provedeno odmytí zbytků hybridizačního roztoku a nespecificky navázaných sond pomocí automatu VP 2000 Processor (Abbott Molecular, Illinois, USA). Před umístěním preparátů do stojánu byl odstraněn rubbercement a krycí sklo. Stojánek byl umístěn na pohyblivé rameno, které jej v automatu přenášelo mezi jednotlivými roztoky. Nejprve byly vzorky ponořeny do roztoku 0,4x SSC/0,3% NP-40 při teplotě 72 °C na 2 minuty, poté na 1 minutu do 2x SSC/0,1% NP-40 při laboratorní teplotě. V posledním kroku proběhla dehydratace vzorků ve vzestupné alkoholové řadě (70%, 85%, 95% ethanol) po 2 minutách. Skla byla ponechána oschnout a bylo na ně nanášeno 25 µl směsi DAPI/antifade. Podložní skla s preparáty byla překryta krycími skly o rozměrech 22x60 mm, byly odstraněny vzduchové bubliny a přebytky barvy a vzorky byly uloženy alespoň na několik minut do chladicího boxu. Po celou dobu bylo dbáno na neustálé zakrytí preparátů, aby se tím zabránilo vyzáření fluorescence.

Takto zpracované vzorky byly připraveny k hodnocení ve fluorescenčním mikroskopu Axio Imager 2 (Zeiss, Oberkochen, Německo). Při hodnocení bylo využíváno optických filtrů podle typu použitých fluoresceinů. Nejdříve byly preparáty prohlíženy zvětšením 16x (identifikace mitóz) a poté pod zvětšením 63x s použitím imerzního objektivu (identifikace interfázních jader). Zároveň bylo využíváno CCD kamery připojené na mikroskop. Pořízené snímky byly zpracovávány v počítačovém programu ISIS (MetaSystems, Altlußheim, Německo). Analýza byla prováděna alespoň dvěma pracovníky a bylo hodnoceno 20 mitóz a 200 interfázních jader.

5.4 mFISH a mBAND

Metoda mnohobarevné FISH (mFISH), stejně jako metoda mnohobarevného pruhování (mBAND), umožňuje vizualizaci celých chromosomů a to prostřednictvím vazeb celochromosomových fluorescenčně značených sond komplementárních ke specifickým oblastem chromosomů. Jedná se o metody založené na kombinatoriálním značení.

V případě metody mFISH je sada malovacích sond pro všechny chromosomy v karyotypu značena kombinací 5 různých fluorochromů. Daná kombinace je charakteristická pro konkrétní chromosomový pár. Celkem je tedy používáno 24 kombinací fluorochromů (22 párů autozomů, jedna kombinace pro X chromosomy a jedna pro chromosom Y). Obraz je snímán sadou fluorescenčních filtrů a na základě kombinace fluorochromů jsou ve speciálním software přiřazeny chromosomům pseudobarvy. Metoda mFISH umožňuje komplexní pohled na celý karyotyp při provedení jediné hybridizační reakce. Lze díky ní pozorovat nebalancované chromosomové aberace, komplexní přestavby a také určit původ marker chromosomů. Naopak chromosomové inverze a delece menšího rozsahu pomocí mFISH identifikovat nelze, a je tak nutné využívat i jiných typů vyšetření.

Metoda mBAND slouží k vizualizaci jednotlivých úseků jednoho chromosomu za použití parciálních malovacích sond. Sondy jsou připravovány mikrodisekcí konkrétního chromosomu z cytogenetického preparátu. Získaná DNA je štěpena na vzájemně se překrývající fragmenty o různé velikosti. Získané fragmenty jsou značeny kombinací pěti různých fluorochromů. Po hybridizaci je chromosom snímán sadou fluorescenčních filtrů a na základě kombinace fluorochromů jsou přiřazeny pseudobarvy. Výsledkem je tedy chromosom s různě zbarvenými pruhy, které jsou charakteristické pro konkrétní oblasti. Absence či pruhy navíc značí delece nebo duplikace (amplifikace) chromosomových oblastí. Mezi další chromosomové aberace, které je touto metodou možné detekovat, se řadí inverze. Jedná se o metodou umožňující detekovat pruhy na chromosomech s větší přesností než klasická cytogenetická analýza.

Chr.	aqua	green	orange	red	nir*
1					yellow
2	cyan				
3				magenta	
4		green			
5			orange		
6		green			yellow
7	cyan				
8				magenta	yellow
9			orange		yellow
10	cyan	green			
11		green		magenta	
12			orange		
13	cyan			magenta	
14	cyan		orange		
15				magenta	
16	cyan	green			yellow
17		green		magenta	yellow
18			orange		yellow
19	cyan			magenta	yellow
20	cyan		orange		yellow
21			orange	magenta	yellow
22	cyan	green		magenta	
X		green	orange		
Y	cyan		orange	magenta	

Obrázek 7: Kombinatoriální značení pěti různými fluorochromy používané pro vizualizaci chromosomů metodu mFISH a mBAND. Převzato a upraveno z <https://metasystems-probes.com/en/probes/mfish/d-0125-600-di/>

5.4.1 Laboratorní postup

Kyveta s roztokem 2xSSC byla ve vodní lázni předehřáta na 70 °C a následně do ní byly na dobu 30 minut vloženy preparáty. Po uběhnutí doby inkubace byla kyveta i s preparáty vyjmuta z lázně, aby roztok zchladl po dobu 30 minut za laboratorní teploty. Následně byly preparáty na 1 minutu přeneseny do roztoku 0,1xSSC o laboratorní teplotě a poté byla provedena jejich denaturace v 0,07 N roztoku NaOH opět po dobu 1 minuty. Dále byly preparáty inkubovány v roztoku 0,1xSSC a 2xSSC v obou případech o teplotě 4 °C po dobu 1 minuty. Nakonec byla provedena dehydratace vzorků ve vzestupné alkoholové řadě (70%, 85%, 95% ethanol) po 1 minutě. Preparáty byly opřeny o plotýnku zahřátou na 42 °C, aby došlo k jejich oschnutí od zbytků roztoku ethanolu.

Do mikroskopu bylo přeneseno 8 µl roztoku hybridizační směsi 24Xyte, anebo Xyte17 od firmy MetaSystems (Altlußheim, Německo) a směs byla denaturována po dobu 5 minut ve vodní lázni o teplotě 75 °C. Po denuraci byla směs prudce ochlazená na ledu 1 minutu, promíchána ve vortexu, krátce centrifugována a inkubována 30 minut ve vodní lázni při 37 °C. Takto připravená směs byla nanášena na preparát a překryta krycím sklem o rozměrech 22x60 mm, které bylo oblepeno rubbercementem, aby nedocházelo k vysychání hybridizační směsi. Preparáty byly přeneseny do vlhké komůrky a umístěny do termostatu vyhřátého na 37 °C, ve kterém proběhla hybridizace po dobu 1–2 dnů.

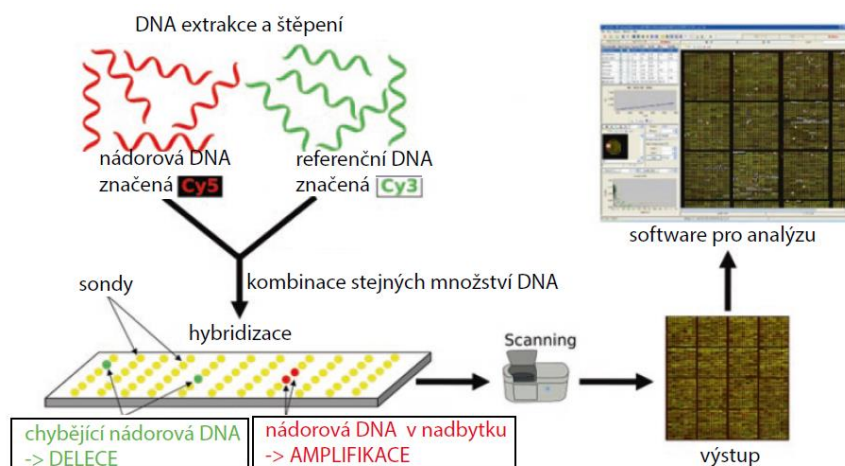
Po uplynutí doby hybridizace byl z preparátů odstraněn rubbercement a krycí skla a byla odmyta v automatu VP 2000 Processor. Odmytí proběhlo za dodržení stejného protokolu jako u I-FISH.

Po oschnutí preparátů bylo nanášeno 25 µl směsi DAPI/antifade 22x60 mm a po odstranění vzduchových bublin a přebytků barviva byly preparáty v kazetě uchovány v mrazničce při -20 °C.

Metafázní chromosomy byly nasnímány pomocí automatického vyhledávače buněk v metafázi Metaferu (MetaSystems, Altlußheim, Německo) v kombinaci s fluorescenčním mikroskopem Axio Imager 2 (Zeiss, Oberkochen, Německo) se speciálními optickými filtry a citlivou CCD kamerou. Pořízené snímky byly upraveny v softwaru pro počítačovou analýzu obrazu ISIS (MetaSystems, Altlußheim, Německo).

5.5 array CGH a SNP array

Array CGH (aCGH) neboli komparativní genomová hybridizace je mikročipová technologie používaná k identifikaci změn počtu kopií DNA a přesnému určení zlomových míst na chromosomech. Její významnou výhodou je skutečnost, že umožňuje identifikovat amplifikace či delecí bez předchozí znalosti cílové oblasti na rozdíl od metod FISH. Metoda aCGH spočívá v hybridizaci fluorescenčně značené DNA vyšetřovaného pacienta a referenční DNA k fragmentům genomu umístěným na čipu. DNA pacienta a referenční DNA jsou značeny různými fluoresceinami. Následně dochází k detekci fluorescence v jednotlivých bodech čipu a porovnání její intenzity. Jestliže převažuje signál referenční DNA, má pacient v dané oblasti delecí. Pokud naopak převládá fluorescenční signál vyšetřované DNA, jedná se o zisk genetického materiálu. Tato metoda nepřináší informace o balancovaných změnách. Pomocí kombinace aCGH a SNP array (umožňuje detekovat jednonukleotidové polymorfizmy) je možné detekovat oblasti ztráty heterozygotnosti bez ztráty počtu kopií tedy oblasti aUPD.



Obrazek 8: Schématické znázornění metody aCGH/SNP. DNA pacienta je značena flurochromem Cy5, kontrolní DNA flurochromem Cy3 a vzorky jsou ponechány hybridizovat s fragmenty genomu na čipu. Následně je pomocí laserového skeneru hodnocena hodnota fluorescence. Převzato a upraveno (Shakoori, 2017).

5.5.1 Laboratorní postup

Izolace DNA z fixované kostní dřeně pacientů byla provedena pomocí QIAamp DNA Blood Mini kitu (Qiagen, Hilden, Německo). Z buněčné suspenze bylo odebráno 200 µl objemu. Ten byl po dobu 3 minut centrifugován na centrifuze MiniSpin (Eppendorf, Hamburk, Německo) při 12 000 rpm a po odebrání supernatantu byl precipitát resuspendován ve 200 µl PBS. Následně bylo přidáno 200 µl AI pufru a 20 µl proteinázy K a vzorek byl inkubován v termobloku při teplotě 56 °C 10 minut. Po uplynutí doby inkubace bylo ke vzorku přidáno 200 µl 96% ethanolu, vzorek byl přenesen na sterilní kolonu a centrifugován 1 minutu při 6 000 rpm. V dalších krocích bylo prováděno čištění vzorku, nejdříve 500 µl AW1 pufru s následnou centrifugací 1 minutu při 6 000 rpm, poté 500 µl AW2 pufru při 20 000 rpm po dobu 3 minut. Proces přečištění byl zakončen centrifugací 1 min při 20 000 rpm na sucho. DNA byla eluována do čisté mikrozkušavky 55 µl AE pufru s inkubací po dobu 5 minut a závěrečnou centrifugací 6 000 rpm/1 minuta. Čistota a koncentrace vzorku byla zjištěna pomocí NanoDrop 2000 (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA).

Pro microarray formátu 4x180K bylo použito 0,5–1,5 µg genomové DNA a referenční DNA. Před restričním štěpením byly vzorky naředěny na objem 20,2 µl. Následně byl připraven Master Mix. Pro jeden vzorek byly použity 2 µl ddH₂O bez nukleáz, 2,6 µl 10x restričního pufru pro štěpící enzymy a 0,2 µl BSA. Restriktázy AluI a RsaI v obou případech o objemu 0,5 µl byly přidány nakonec. Po celou dobu přípravy byl Master Mix udržován na ledu. Do zkumavky se vzorkem bylo přidáno 5,8 µl namíchaného Master Mixu a štěpící reakce byla přenesena do termobloku. Inkubace proběhla nejprve 2 hodiny při 37 °C, poté 20 minut při 65 °C, a nakonec byla reakce přenesena opět na led, a to alespoň na 5 minut. Fragmentace vzorku byla ověřena pomocí agarózové elektroforézy. Na 1% agarózový gel byly nanášeny 2 µl vzorku. Elektroforéza probíhala nejprve 5 minut při napětí 50 V a posléze 50 minut při napětí 90 V.

Dalším krokem bylo fluorescenční značení vzorku. Do každé reakční směsi bylo přidáno 5 µl Random Primeru a proběhla inkubace v termobloku 3 minuty při 98 °C. Poté byly vzorky přeneseny na led. Za stálého udržování na ledu byl připraven značící Master Mix. Na jednu značící reakci bylo použito 2 µl ddH₂O bez nukleáz, 10 µl 5x reakčního pufru, 5 µl 10x dNTPs, 3 µl Cy-3 (pro vyšetřovanou DNA) a 3 µl Cy-5 (pro referenční DNA) a 1 µl Exo-Klenowova fragmentu. Do každého vzorku bylo přidáno 21 µl namíchaného Master Mixu a proběhla inkubace nejprve 2 hodiny při 37 °C, poté 10 minut při 65 °C. Reakční směs byla přenesena na led. Takto naznačená genomová DNA byla přečištěna od zbytků Master Mixu k čemuž byl použit SureTag DNA Labelling Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). Ke každé reakční směsi bylo přidáno 430 µl TE pufru a směs byla přenesena na purifikační kolonu umístěnou v 2 ml sběrné zkumavce. Proběhla centrifugace po dobu 10 minut při 14 000 g za pokojové teploty. Byl odstraněn eluát, na kolonu nanášeno 480 µl TE pufru a opět proběhla centrifugace

za stejných podmínek jako v předchozím kroku. Následně byla kolona dnem vzhůru umístěna do nové sběrné zkumavky a byla provedena centrifugace po dobu 1 minuty při 1 000 rpm. Purifikovaná genomová DNA byla koncentrována ve vakuové odparce na objem 22–24 μl . Míra inkorporace fluorescenčně značené DNA do vzorku ($\text{pmol}/\mu\text{l}$) byla ověřena na spektrofotometru NanoQuant Infinite M200 Microplate (Reader, Tecan, Švýcarsko) a na základě těchto údajů byla vypočtena specifická aktivita vzorků (specifická aktivita = $\text{pmol}/\mu\text{l}$ fluorescenční barvivo/ μg na μl genomové DNA). Posledním krokem bylo smíchání 20 μl fluorescenčně značené DNA vzorku s ekvivalentním množstvím fluorescenčně značené referenční DNA na výsledný objemu 40 μl .

K připraveným vzorkům bylo přidáno 5,5 μl Cot-1 DNA, 11,5 μl 10x aCGH blokovacího činidla a 60 μl 2x HI-RPM hybridizačního pufru. Směs byla inkubována 3 minuty při 98 °C a dalších 30 minut v 37 °C.

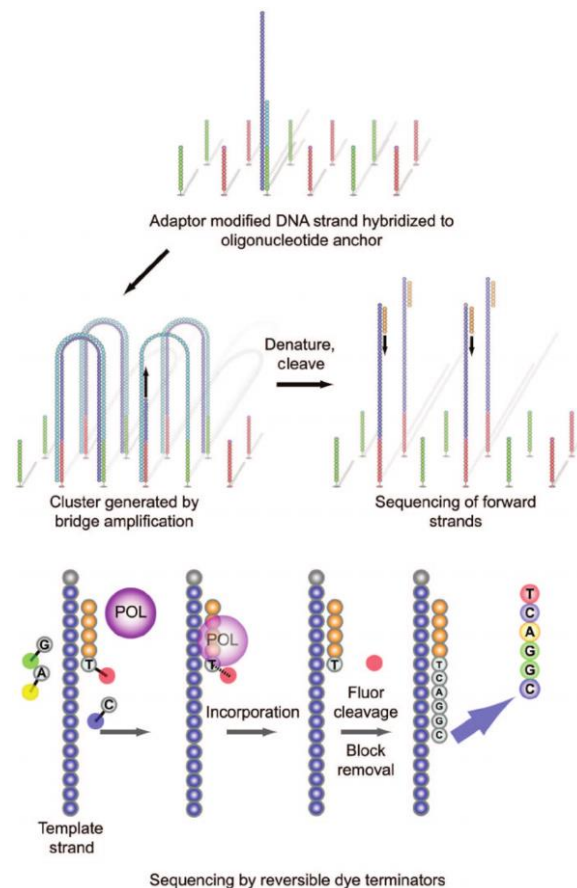
Do hybridizační komůrky Agilent SureHyb (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) bylo umístěno těsnící sklíčko (gasket slide) a do vyznačených oblastí na sklíčku byl aplikován celý objem připravené hybridizační směsi. Těsnící sklíčko bylo přiklopeno aktivní stranou sklíčka mikročipu SurePrint G3 Cancer CGH+SNP Microarray (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) a vše bylo uzavřeno v hybridizační komůrce. Komůrka byla přemístěna do hybridizační pece Microarray Hybridization Oven (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) a rychlost otáčení nastavena na 20 rpm. Mikročipy byly takto ponechány hybridizovat po dobu 16 hodin při 67 °C.

Po hybridizaci byly mikročipy odmyty. Puf 1 byl ve dvou různých kyvetách ochlazen na 20–22 °C a puf 2 byl předehřát na teplotu 37 °C. Pod hladinou pufru 1 byl mikročip sejmut z těsnícího sklíčka a umístěn do druhé kyvety s odmývacím pufrem 1 na dobu 5 minut. Následně byl mikročip přenesen do pufru 2 na 1 minutu a z něj pak pomalu a plynule vytažen, osušen mimo aktivní stranu a uložen do držáku ke skenování. Samotné skenování skenerem SureScan Dx Microarray Scanner (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) bylo provedeno na Ústavu biologie a lékařské genetiky (Purkyňův ústav, Albertov 4, Praha 2) a prostřednictvím programu Agilent Cytogenomics (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) byly vyhodnoceny výsledky.

5.6 NGS

Illumina sekvence je metodou sekvenování nové generace (NGS) určená k identifikaci pořadí nukleotidů v DNA. Při použití kitu Archer™ VARIANTplex™ Myeloid (IDT, Coralville, USA) slouží k rozpoznání mutací 75 genů asociovaných s myeloidními neopláziemi. Princip metody je založen na vysoce paralelní sekvenci klonálně amplifikovaných fragmentů DNA, a to za použití nukleotidů s fluorescenčně značenými reverzibilními terminátory. Fragmentovaná DNA hybridizuje prostřednictvím svých oligonukleotidových adaptérů na oligonukleotidové kotvy ve flow-cell

sekvenátoru. Po připojení fragmentů dochází ke klonální bridge amplifikaci, při níž vznikají kolonie DNA, tedy soubory kopií daného fragmentu. Po amplifikaci následuje syntéza za současné sekvence. K fragmentům ve flow cell jsou komplementárně inkorporovány nukleotidy s fluorescenčně značenými reverzibilními terminátory. Po emisi a detekci fluorescenčního záření dochází k odstranění terminátorů, což umožňuje připojení nového nukleotidu. Získaná data o pořadí nukleotidů jsou dále bioinformaticky zpracována, dochází k mapování na referenční genom a detekci a klasifikaci variant.



Obrázek 9: Schéma průběhu Illumina sekvenace využívané pro detekci genů asociovaných s myeloidními malignitami. Převzato a upraveno (Voelkerding et al., 2009)

5.6.1 Laboratorní postup

Byla provedena izolace DNA z fixované kostní dřeně pacientů pomocí QIAamp DNA Blood Mini kitu (Qiagen, Hilden, Německo). Vyizolovaná DNA o objemu 20-25 μ l byla smíchána s magnetickými kuličkami AMPure XP beads (Beckman Coulter, Brea, USA) v poměru 1:2, směs byla promíchána na vortexu a inkubována 10 minut při pokojové teplotě. Poté byla zkumavka se směsí vložena do magnetického stojánu na 2 minuty a byl odstraněn supernatant. Do zkumavky bylo napipetováno 200 μ l 80 % ethanolu, proběhla inkubace 2 minuty a supernatant byl odstraněn. Tento postup, sloužící k promytí izolované DNA, byl zopakován třikrát. Po třetím promytí byly co nejdůkladněji odstraněny zbytky ethanolu a magnetické kuličky byly vysušeny ve zkumavce

s otevřeným víčkem při pokojové teplotě po dobu maximálně 5 minut. Do zkumavky bylo přidáno 21 μ l 10mM Tris-HCl, kuličky byly důkladně resuspendovány. Směs byla 5 minut inkubována při pokojové teplotě, poté byl vzorek velmi krátce promíchán na vortextu a zkumavka umístěna do magnetického stojánku na přibližně 2 minuty, dokud nezmizel zákal. Supernatant byl přenesen do 1,5ml mikrozkušavky. Koncentrace a čistota přečištěné DNA byla měřena spektrofotometrem NanoDrop 2000 (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) / Qubit (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA). Dále byla DNA naředěna na koncentraci 10 ng/ μ l 10mM pufrém Tris-HCl a opět byla přeměřena její koncentrace přístrojem Qubit. Nakonec byla DNA naředěna 10mM pufrém Tris-HCl na koncentraci 2 ng/ μ l.

Z takto naředěné DNA byla dle protokolu Archer™ VARIANTPlex™ Myeloid kitu (IDT, Coralville, USA) připravena knihovna pro NGS sekvenování vybraných genů v rámci tohoto myeloidního panelu. Do reakční zkumavky, se suchou peletou s enzymy a pufrém pro zajištění enzymatického štěpení DNA, bylo na ledu napipetováno 50 μ l naředěné vstupní DNA. Zkumavka byla umístěna do PCR cykleru GeneAmp PCR System 9700 (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) a inkubována 12 minut při teplotě 37 °C a 20 minut při teplotě 72 °C. Z cykleru byla zkumavka přesunuta na led. Následně byl veškerý objem přenesen do zkumavky označené jako *End repair* a opět inkubován v cykleru 30 minut při teplotě 25 °C, čímž došlo k úpravě konců fragmentované DNA. Poté byla zkumavka krátce centrifugována a přenesena na led. Dalším krokem bylo opětovné přečištění DNA. Do reakční zkumavky byly přidány AMPure XP beads o objemu rovném 2,5x objemu reakční směsi a směs byla velmi pečlivě homogenizována. Po 5minutové inkubaci při pokojové teplotě byla zkumavka krátce centrifugována a vložena do magnetického stojánku na dobu 4 minut a/nebo do úplného projasnění roztoku. Byl odstraněn supernatant a magnetické kuličky 2x promyty 200 μ l 70 % ethanolu s inkubační dobou 30 sekund. Po krátkém vysušení za pokojové teploty byly kuličky resuspendovány ve 20 μ l 10mM Tris-HCl a inkubovány 2 minuty.

Roztok s přečištěnou DNA byl přenesen do zkumavky *Ligation Step 1* na ledu. Vzorek byl inkubován v PCR cykleru 15 minut při teplotě 37 °C. Do zkumavky byly přidány AMPure beads v 2,5x objemu vzorku. Byla provedena purifikace postupem popsáným v předchozím odstavci. DNA byla eluována resuspendováním magnetických kuliček ve 42 μ l 10mM Tris-HCl s inkubační dobou 2 minuty. Reakční zkumavka *MBC Adapter* byla umístěna na led a bylo do ní velmi opatrně přeneseno 40 μ l vzorku tak, aby jeho součástí již nebyly magnetické kuličky. V případě přítomnosti kuliček bylo nutným zkumavku umístit do magnetického stojánku a po 1 minutě opět vzorek přemístit do nových zkumavek. Po krátkém promíchání na vortextu a centrifugaci byl celý objem opět přenesen tentokrát do zkumavky *Ligation Step 2* umístěné na ledu. Zkumavka byla vložena do PCR cykleru a inkubována 5 minut

při teplotě 22 °C. V tomto kroku došlo k ligaci prvního indexu (p5/i5) společně s unikátními Archer MBC adaptéry.

Do čisté 0,2ml PCR zkumavky bylo napipetováno 50 µl *Ligation Cleanup Beads*. Zkumavka byla na 1 minutu umístěna do magnetického stojánu, aby magnetické kuličky vytvořily peletu za projasnění roztoku. Byl odstraněn supernatant a kuličky byly resuspendovány v 50 µl *Ligation Cleanup Buffer*. Do takto připravené zkumavky byl přenesen veškerý objem z *Ligation Step 2* zkumavky. Roztok byl promíchán na vortexu a inkubován 5 minut při pokojové teplotě a tento krok jednou zopakován. Zkumavka byla na 1 minutu a/nebo do projasnění umístěna do magnetického stojánu, odstraněn supernatant a kuličky resuspendovány v 200 µl *Ligation Cleanup Buffer*. Po krátké centrifugaci byla zkumavka na 1 minutu či do projasnění vrácena do stojánu, supernatant byl odstraněn a postup promytí byl jednou opakován. Poté byly magnetické kuličky resuspendovány ve 200 µl *Ultra-Pure Water*, zkumavka umístěna do stojánu a po projasnění byl supernatant odstraněn. Před přesunem do cykleru byly kuličky resuspendovány v 32 µl 5mM NaOH a inkubovány 10 minut při 75 °C. Zkumavka byla přenesena do magnetického stojánu do vytvoření pelety.

První PCR byla na ledu připravena rozpuštěním pelety ve *First PCR HS/HCG* zkumavce tím, že do ní bylo napipetováno 5 µl *GSP1*. Po krátké centrifugaci byl přidán celý objem vzorku. Suspenze byla promíchána, krátce centrifugována a inkubována v PCR cykleru při podmínkách uvedených v tabulce 9. Po proběhnutí PCR reakce byla zkumavka přenesena na led a následovalo přečištění. Ke vzorku bylo napipetováno 0,8x jeho objemu AMPure XP beads a směs byla důkladně homogenizována. Byl zopakován postup purifikace DNA provedený po fragmentaci a úpravě konců DNA s tím rozdílem, že DNA byla eluována do 34 µl 10mM Tis-HCl.

Krok	teplota (°C)	čas	počet
1	95	3 min	1
2	95	30 s	16
3	60	10 s	16
4	62	5 min	16
5	72	3 min	1

Tabulka 8: Podmínky průběhu PCR 1

Druhá PCR reakce byla připravena rozpuštěním pelety s MiSeq Index 1 Illumina (p7/i7) primery v *Second PCR HS/HCG* zkumavce, přidáním celého objemu rozpuštěné DNA z předchozí reakce a 8 µl *GSP2*. Po krátkém promíchání a centrifugaci v mikrocentrifuze MiniSpin (Eppendorf, Hamburk, Německo) byl vzorek umístěn do PCR cykleru a byla spuštěna druhá PCR reakce za podmínek uvedených v tabulce 10. Poté bylo provedeno přečištění vzorku stejným způsobem jako po PCR 1 reakci a DNA byla eluována do 20 µl 10mM Tis-HCl. Z tohoto objemu pak bylo odpipetováno 18 µl do nové PCR zkumavky.

Krok	teplota (°C)	čas	Počet
1	95	3 min	1
2	95	30 s	20
3	60	10 s	20
4	65	5 min	20
5	72	3 min	1

Tabulka 9: Podmínky průběhu PCR 2

Kvantifikace knihovny byla provedena pomocí KAPA Library Quantification Kit for Illumina Platforms – ABI Prism qPCR Master Mix (Roche, Basilej, Švýcarsko) dle protokolu výrobce. Bylo smícháno 200 µl 500mTris-HCl, 9,5 ml vody a 5 µl Tween 20, čímž byl připraven 10mM Tris/Tween pufr. Tímto pufrem byla knihovna ředěna, a to způsobem uvedeným v tabulce 11. Dále byl připraven Master Mix z 6 µl KAPA SYBR FAST qPCR Master Mixu a 2 µl PCR-grade water a do jedné jamky PCR destičky bylo pipetováno 8 µl. Byly přidány 2 µl knihovny ředěné v poměru 1:100 000 a 1:500 000 (v duplikátech/triplikátech), standardy 1-6 (uvedeno v tabulce 12) a negativní kontrola.

	knihovna (µl)	Tris/Tween pufr (µl)
ředění knihovny 1:100	2 µl knihovny	198
ředění knihovny 1:10 00	2 µl knihovny 1:100	198
ředění knihovny 1:100 000	10 µl knihovny 1:10 000	90
ředění knihovny 1:500 000	20 µl knihovny 1:100 000	80

Tabulka 10: Ředění knihovny pro kvantifikaci

	koncentrace (pM)
standard 1	20
standard 2	2
standard 3	0,2
standard 4	0,02
standard 5	0,002
standard 6	0,0002

Tabulka 11: Tabulka koncentrace standardů

Na destičku s jamkami byla nalepena adhezivní fólie, destička byla krátce centrifugována a následně vložena do přístroje pro real-time PCR QuantStudio 3 (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) a inkubována za podmínek uvedených v tabulce 12. Zjištěná koncentrace DNA byla porovnána s koncentrací ověřenou fluorimetricky na Qubitu a hodnota byla převedena z ng/µl na molární koncentraci (nM).

Krok	teplota (°C)	čas	počet cyklů
Počáteční aktivace/denaturace	95	5 min	1
Denaturace	95	30 s	1
Extense	60	45 s	35

Tabulka 12: Podmínky real-time PCR reakce

Dalším krokem bylo smíchání 5 μ l nenaředené knihovny s objem destilované vody bez nukleáz $X \mu$ l H_2O vypočítaným jako: $5x(\text{koncentrace nenaředené knihovny [nM]}/4)-5 = X \mu$ l H_2O . Z takto připravené 4 nM knihovny bylo pipetováno 5 μ l do jedné 1,5 ml zkumavky a byl tak vytvořen 4nM pool. 4nM pool byl ředěn smícháním 10 μ l 0,2N NaOH, vzorek byl promíchán, centrifugován a inkubován 5 minut při pokojové teplotě. Bylo přidáno 10 μ l destilované vody bez nukleáz a 970 μ l HT1 uchovávaného na ledu, vzorek byl promíchán a takto byla připravena 40 pM knihovna. Dále byla ředěna 20 pM PhiX kontrolní knihovna. Nejprve byly 2 μ l 10 nM PhiX knihovny smíchány se 3 μ l destilované vody bez nukleáz. Následně bylo 5 μ l vzniklé 4nM PhiX knihovny smícháno s čerstvě připraveným roztokem 0,2N NaOH. Vzorek byl promíchán na vortexu, krátce centrifugován a inkubován 5 minut při pokojové teplotě. Poté k němu bylo přidáno 995 μ l HT1 uchovávaného na ledu. Nakonec byla 40 pM knihovna ředěna na požadovanou koncentraci podle tabulky 13. Vzorek byl krátce vortexován, centrifugován a sekvenován na sekvenátoru NextSeq 550 (Illumina, San Diego, USA).

požadovaná koncentrace (pM) 40pM knihovny :	1,6
	objem (μ l)
40pM knihovna	52
20pM denaturovaný PhiX	26
HT1	1222
výsledný objem	1300

Tabulka 13: Ředění 40pM knihovny na jednu z požadovaných koncentrací

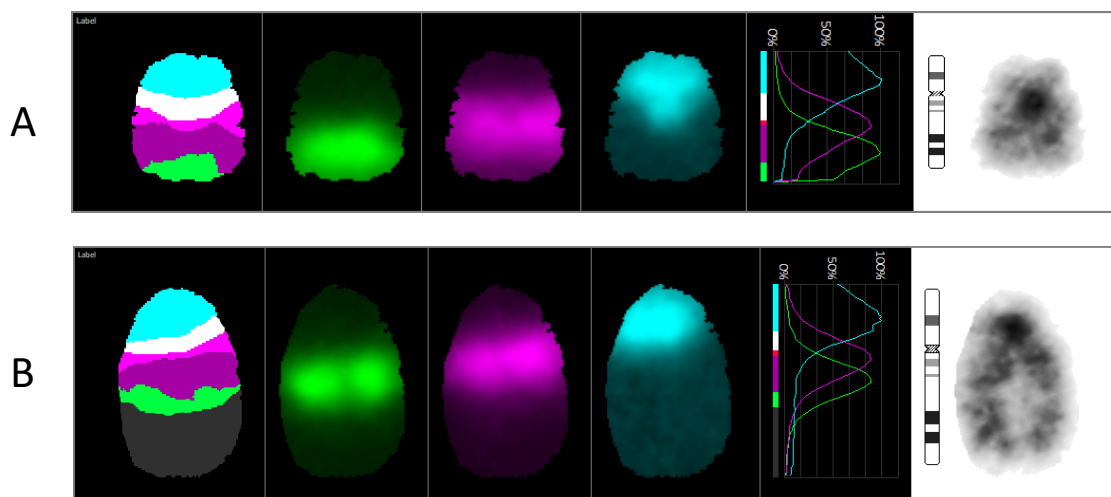
5.7 Statistická analýza

Statistické hodnocení rozdílů v celkovém přežití mezi definovanými skupinami pacientů bylo provedeno Kaplan-Meierovou analýzou. Celkové přežití bylo definováno jako doba od diagnózy pacienta do poslední kontroly či smrti. Hladina významnosti pro hodnocení všech výsledků byla stanovena na $p=0,05$. Statistické hodnocení bylo provedeno pomocí XLSTAT | Statistical Software for Excel (Addinsoft, Paříž, Francie).

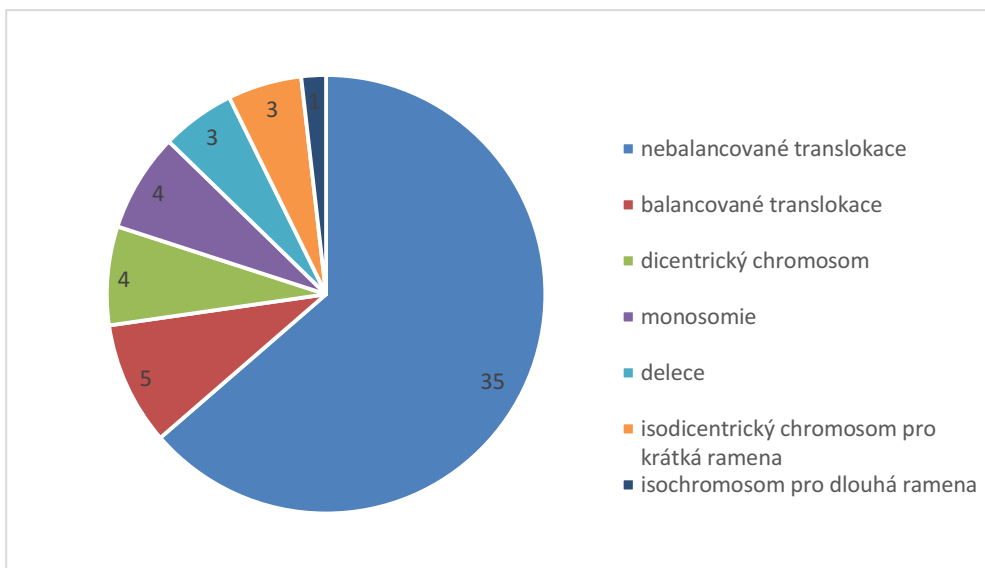
6 Výsledky

6.1 Analýza karyotypu

Aberace chromosomu 17 byly metodou klasického G-pruhování a/nebo mFISH a mBAND (obrázek 10) prokázány u 37 pacientů. Jejich karyotypy jsou uvedeny v příloze 1. Z toho 33 nemocných (89,2 %) mělo primární MDS a čtyři pacienti (10,8 %) měli sekundární MDS po léčbě pro jiná nádorová onemocnění. Aberace chromosomu 17 byly u sekundárních MDS vždy součástí komplexního karyotypu (tři a více aberací). Celkově pak byl komplexní karyotyp s aberací chromosomu 17 v patologickém klonu detekován u 34 pacientů (91,9 %) v souboru. Izolovanou aberaci jsme identifikovali ve třech případech. Jednalo se o isochromosom pro dlouhá ramena i(17)(q10) (pacient č. 4), isodicentrický chromosom idic(17)(p11.1) (pacient č. 30) a balancovanou translokaci chromosomu 10 s chromosomem 17 t(10;17)(p10;q10) (pacient č.33). Dále byly u osmi pacientů (21,6 %) v karyotypu zjištěny aberace obou homologních chromosomů 17. Z toho v šesti případech byla alespoň jednou z aberací translokace (balancovaná nebo nebalancovaná). Součástí souboru byli také tři nemocní (8,1 %), kteří v diagnostickém odběru neměli aberaci chromosomu 17. Její zisk byl popsán až při dalších kontrolách, a to v kontextu komplexního karyotypu. Graf 1 shrnuje počty jednotlivých typů získaných aberací chromosomu 17, které byly v našem souboru detekovány.

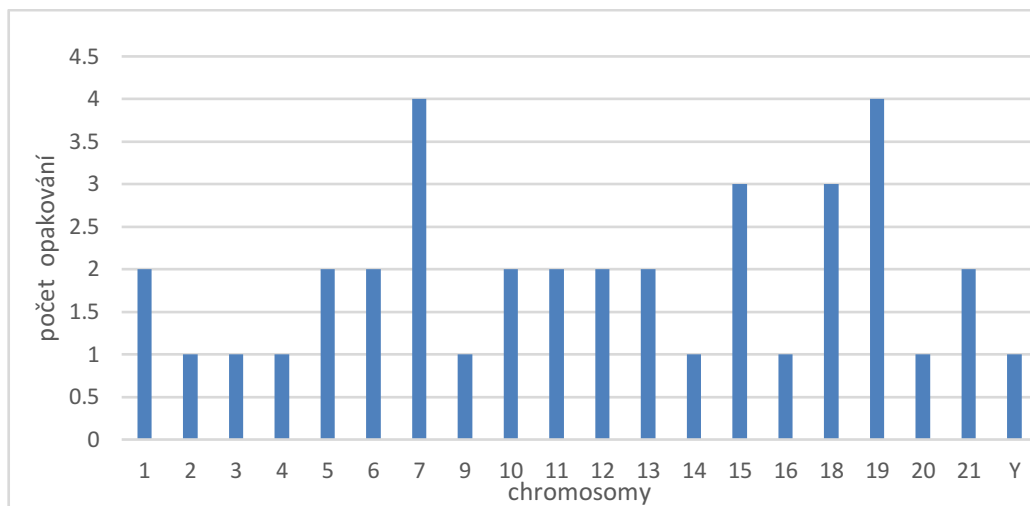


Obrázek 10 mBAND analýza chromosomu 17 u pacienta č. 18. (A) Normální chromosom 17 (B) Derivovaný chromosom 17, jehož součástí je genetický materiál z chromosomů 10 a 16. Zápis: der(17)t(16;17)(q?;q25)t(10;16)(?;q?)



Graf 1: Počty aberací chromosomu 17 u pacientů s MDS v našem souboru.

Nejčastějšími aberacemi chromosomu 17 byly strukturální přestavby v podobě balancovaných a nebalancovaných translokací. Nebalancované translokace byly detekované celkem u 24 pacientů (64,8 %). Balancované translokace byly popsány u čtyř nemocných (10,8 %) a to konkrétně u pacienta č. 5, 8, 10 a 33. Oblastmi zlomu na chromosomu 17 byly pruhy 17q11.1 (n=2), 17q10 (n=1), 17q25 (n=1) a v jednom případě nebylo možné místo zlomu určit. Jeden nemocný z této skupiny (pacient č. 10) měl ve stejném patologickém klonu současně balancovanou přestavbu s chromosomem 19 a Y. V souhrnu pak translokačními partnery chromosomu 17 pro tento typu přetaveb byly chromosomy 4 (n=1), 10 (n=1) a 15 (n=1), 19 (n=1), Y (n=1). Do balancovaných a nebalancovaných translokací s chromosomem 17 vstupovaly téměř všechny chromosomy s výjimkou chromosomů 8, 11 a X. Naopak nejčastějšími translokačními partnery byly chromosomy 7 (n=4) a 9 (n=4). Dále byly popsány translokace s chromosomy 5 (n=3), 15 (n=3), 18 (n=3), 21 (n=3), 6 (n=2), 10 (n=2), 11 (n=2), 12 (n=2), 13 (n=2), 1 (n=1), 2 (n=1), 3 (n=1), 4 (n=1), 9 (n=1), 14 (n=1), 16 (n=1), 20 (n=1), Y (n=1). Zastoupení jednotlivých chromosomů v balancovaných a nebalancovaných translokacích s chromosomem 17 shrnuje graf 2.



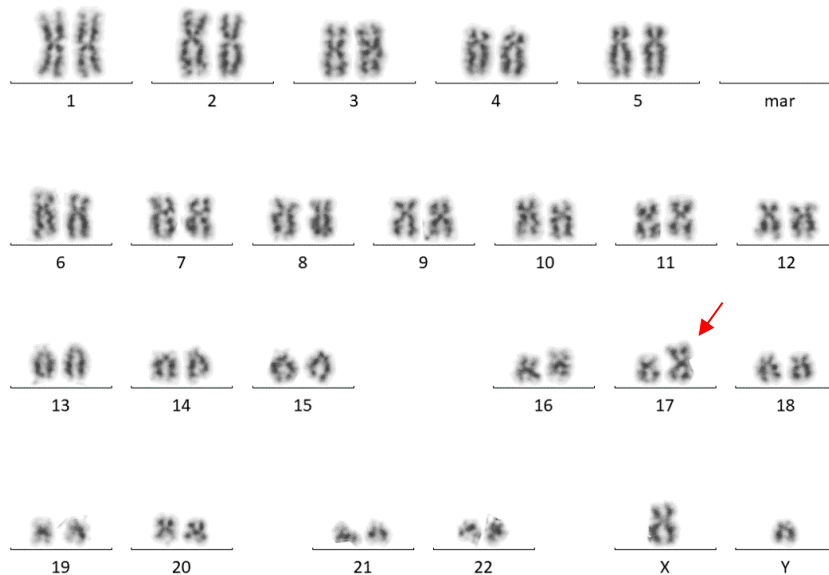
Graf 2: Translokační partneři chromosomu 17 u pacientů s MDS.

Druhým nejčastějším typem aberací chromosomu 17 byly monosomie, které byly popsány v pěti případech (13,5 %). U čtyřech z pěti nemocných došlo současně se ztrátou chromosomu 17 k aberaci druhého homologního chromosomu. V těchto případech se vždy jednalo o translokace, a to tři nebalancované s chromosomy 7, 18, 19 a jeden pacient měl translokaci balancovanou s chromosomem 4. Tito pacienti byli hodnoceni jako samostatná prognostická skupina a jejich nálezy budou v této kapitole podrobněji rozebrány.

Dalšími nebalancovanými změnami chromosomu 17 u nemocných s MDS byly dicentrické chromosomy, které se nacházely v patologickém klonu čtyř nemocných (10,8 % pacientů). U jednoho pacienta (pacient č. 25) byly popsány dva různé dicentrické chromosomy ve dvou různých klonech. Tyto chromosomy vznikly fúzí chromosomu 7 (oblast zlomu 7p11.2) a 17 (oblast zlomu 17p11.1) a chromosomu 17 (oblast zlomu 17p11.1) a 18 (oblast zlomu 18p11.1). Dicentrické chromosomy dále vznikaly fúzí chromosomu 17 (oblasti zlomu 17p11.2, 17p11.2, 17p11.1) s chromosomy 5 (oblast zlomu 5q11.1), 16 (oblast zlomu 16p11.2) a 20 (oblast zlomu 20q11.1). V souhrnu byly oblastmi zlomu a následné fúze na chromosomu 17 pruhy 17p11.1 (n=3) a 17p11.2 (n=2) a ve všech případech tak při formování dicentrických chromosomů došlo ke ztrátě oblasti krátkých ramen chromosomu 17 obsahující lokus genu *TP53*.

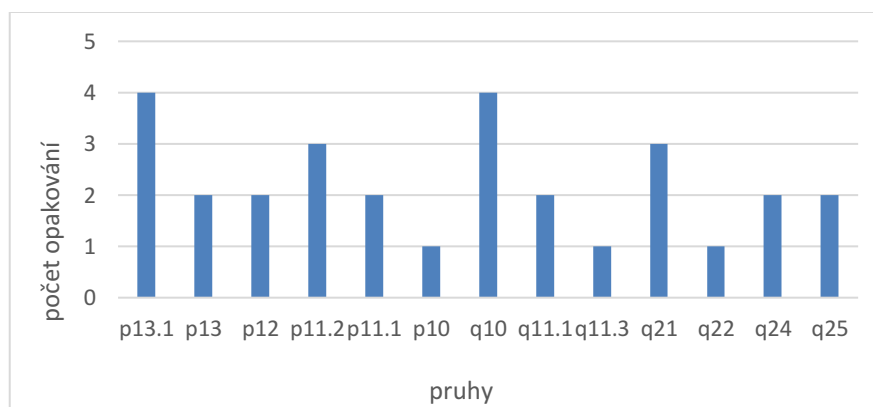
Isodicentrický chromosom 17 byl popsán u jednoho pacienta s primárními a jednoho pacienta se sekundárními MDS (5,4 %). Zlomovými oblastmi byly, stejně jako u dicentrických chromosomů, pruhy 17p11.1 (n=1) a 17p11.2 (n=1). Jednalo se tedy o isodicentrické chromosomy pro dlouhá ramena chromosomu 17 a ve všech případech opět došlo ke ztrátě genu *TP53*. V případě pacienta č. 30 byl *idic(17)(p11.1)* izolovanou aberací v karyotypu. To platilo také pro pacienta č. 4, který měl jako jediný isochromosom a to pro dlouhá ramena chromosomu 17 (obrázek 11). Z charakteru přestavby vyplývá, že u tohoto pacienta došlo k delecí genu *TP53*. Posledním typem aberací byly delece detekované ve

třech případech (8,1 %). Delece zahrnovaly krátká ramena: 17p13.3—17p11.2 (n=1) a 17p13—17pter (n=1), kde je lokalizován gen *TP53*. Jeho ztráta byla potvrzena metodou aCGH/SNP. U jednoho pacienta byla pozorována delece na dlouhých ramenech 17q11—17qter (n=1) a krátkých ramenech 17pter—17p11 (n=1) současně. A to na nadpočetném derivovaném chromosomu 17.



Obrázek 11: Isochromosom 17 v karyotypu pacienta č. 4. Jedná se o vyšetření metodou G-pruhování. U pacienta byl dalšími vyšetřeními potvrzen nález 46,XY,i(17)(q10).

Graf 3 shrnuje zastoupení oblastí zlomu na krátkých a dlouhých ramenech chromosomu 17, které byly zjištěny metodami mFISH a/nebo mBAND u výše popsaných aberací. Ve 12 případech nebylo možné, vzhledem ke komplexitě přestaveb, oblasti zlomu určit. Nejčastěji zjištěnými oblastmi zlomu na krátkých ramenech byly pruhy 17p13.1 (n=4) a 17p11.2 (n=3). Na dlouhých ramenech docházelo nejčastěji ke zlomu v pružích 17q10 (n=4) a 17q21 (n=3). V souhrnu byl pak zlom na krátkém rameni detekován 14x a na krátkém rameni byl zlom zjištěn v 15 případech.



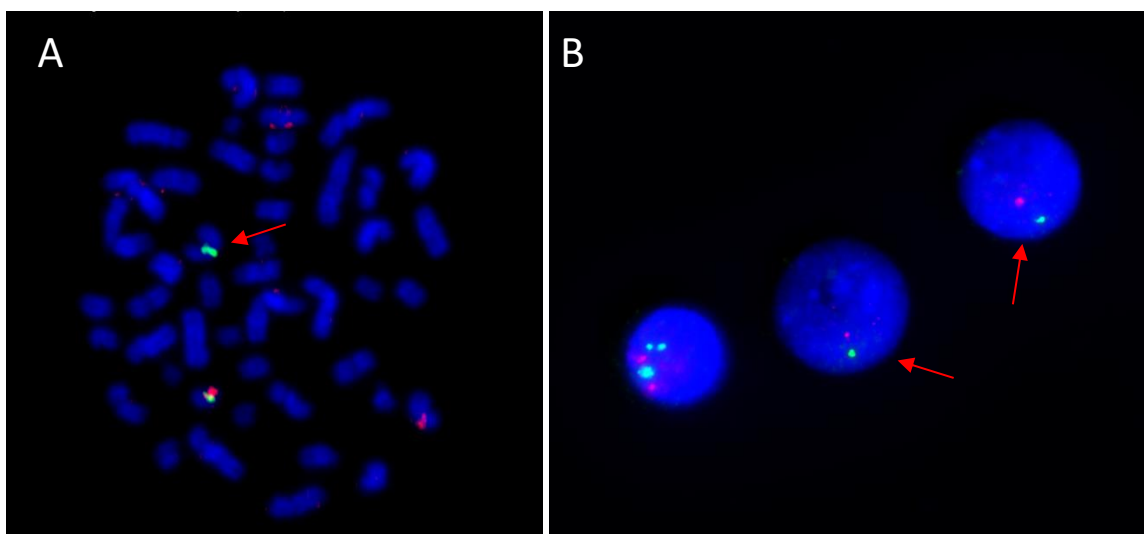
Graf 3 Oblasti zlomu na krátkých a dlouhých ramenech chromosomu 17.

Osm pacientů (21,6 %) mělo aberace obou homologních chromosomů 17. Ve čtyřech případech (pacienti č. 5, 7, 28, 37) byla popsána monosomie chromosomu 17 při současné translokaci druhého homologního chromosomu. Dvakrát se jednalo o nebalancovanou translokaci. V prvním případě dlouhých ramen (oblast zlomu 17q?21) s chromosomem 7 a ve druhém případě došlo ke výměně genetického materiálu s chromosomem 19. Nicméně oblasti zlomu ani ramena chromosomu 17 nebylo možné určit. Dále byla společně s monosomií 17 popsána nebalancovaná translokace krátkých ramen (oblast zlomu 17p10) s chromosomem 18 a balancovaná translokace (oblasti 17q11.1–17qter) s chromosomem 4. U dvou pacientů byly detekované dvě nebalancované translokace homologních chromosomů 17. A to dlouhých ramen (oblasti zlomu 17q?24) s chromosomy 3 a 6 a dlouhých ramen (oblasti zlomu 17q?21) s chromosomy 19 a 21. Pacient č. 10 měl současně tři aberace chromosomů 17. Jednalo se o nebalancovanou translokaci dlouhých ramen (oblast zlomu nebylo možné určit) s chromosomem 6 a dvě balancované translokace dlouhých ramen (oblast 17q11.1–17qter) s chromosomem 19 a chromosomem Y. V souhrnu tedy do translokací ve skupině pacientů s aberacemi obou chromosomů 17 vstupovaly chromosomy 19 (n=3), 6 (n=2), 3 (n=1), 4 (n=1), 7 (n=1), 18 (n=1), 21 (n=1) a Y (n=1). U posledního z pacientů (pacient č.25) ve skupině s přestavbami obou chromosomů 17 byl v karyotypu popsán dicentrický chromosom (oblast zlomu pruh 17p?11.1) vzniklý přestavbou s chromosomem 7 (oblast zlomu p11.2) současně s nadpočetným derivovaným chromosomem 17 u kterého došlo ke ztrátě dlouhých (17q11–17qter) i krátkých ramen (17pter–17p11) a byl tedy deletován gen *TP53*.

Dále byl u pacientů č. 2, 8, 22 (n=3) pozorován klonální vývoj. Při prvním odběru byl vždy zjištěn patologický klon s delecí dlouhých ramen chromosomu 5 oblastí 5q14–5q34 (n=1), 5q14.3–5q33.3 (n=1) a 5q13.3–5q34 (n=1). Při kontrolních odběrech v průběhu onemocnění byl pozorován zisk dalších genetických změn, což vedlo ke vzniku heterogenních klonů. U pacienta č. 2 došlo k delecí krátkých ramen chromosomu 17 v rozsahu 17p13.3–17p11.2. Pacient č. 8 měl balancovanou translokaci dlouhých ramen chromosomu 17 (oblast zlomu 17q25) s dlouhými rameny chromosomu 15 (oblast zlomu 15q25). U pacienta č. 22 byl popsán derivovaný chromosom 12, který byl tvořen materiálem z chromosomu 1 v rozsahu 1p13–1pter a částí chromosomu 17. V případě chromosomu 17 nebylo možné blíže určit původ materiálu. Ve všech případech byla aberace chromosomu 17 součástí komplexního karyotypu a průměrná doba sledování nemocných, než došlo k zisku patologického klonu s komplexním karyotypem zahrnujícím chromosomu 17, byla 79 měsíců (medián 68 měsíců)

6.2 Cytogenomická analýza

U všech pacientů bylo v prvním odběru, provedeno vyšetření metodou I-FISH a/nebo array CGH/SNP. Velikost patologického klonu, stanovená metodou I-FISH, se pohybovala v rozmezí od 1 % do 91,5 %. Pacienti byly rozděleni na dvě skupiny, a to podle toho, zda u nich byla v některém z odběrů detekována delece v oblasti 17p13, která zahrnuje lokus genu *TP53* (obrázek 12). Dále bylo u 21 nemocných (56,7 %) alespoň v jednom odběru provedeno vyšetření metodou NGS za použití genového panelu Archer™ VARIANTPlex™ Myeloid kitu pro detekci mutací a variant 75 genů asociovaných s myeloidními malignitami včetně MDS. U 18 nemocných (47 %) byla zjištěna přítomnosti patogenní/pravděpodobně patogenní mutace genu *TP53*.



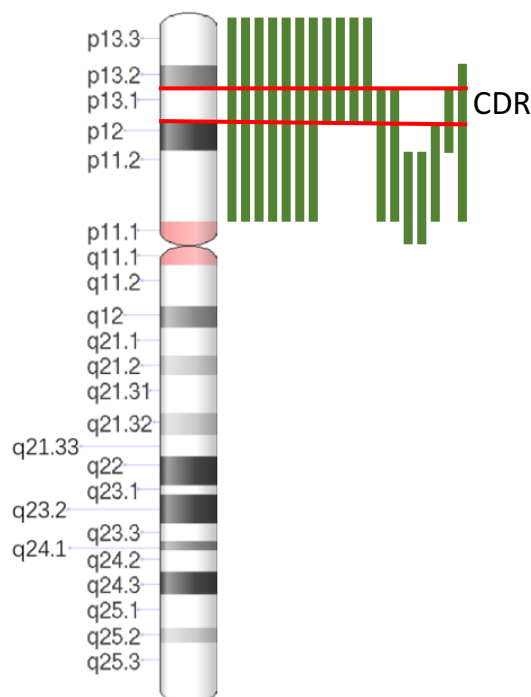
Obrázek 12 Vyšetření metodou I-FISH – detekce delece 17p13 za použití lokus specifické sondy XL TP53/17cen od firmy MetaSystems. (A) Pacient č. 3: chromosomy v metafázi s viditelnou delecí v oblasti 17p13 (chybí druhý červený signál) (B) Pacient č. 5: interfázní jádro s monosomií chromosomu 17 (chybí zelený a červený signál).

Celkem 27 pacientů (72,9 %) mělo metodou I-FISH prokázanou delecí oblasti 17p13, ve které je lokalizována gen *TP53*. U 25 (92,5%) z nich byl popsán komplexní karyotyp a šest nemocných v této skupině (22,2 %) mělo aberace obou homologních chromosomů 17.

Delece byla potvrzena u všech pacientů se sekundárními MDS (n=4) a zastoupení patologického klonu se pohybovalo v rozmezí od 48,5 % do 73,5 %. U 23 nemocných s primárními MDS a delecí 17p13 (69,7 %) byl patologický klon zastoupen v rozsahu od od 1 % do 91,5 %. Do této skupiny patřili všichni pacienti, u kterých byl popsán klonální vývoj (u pacienta č. 2 byla delece potvrzena metodou aCGH/SNP). V případě těchto nemocných došlo k delecí oblasti 17p13 současně se získem aberace chromosomu 17. Dále bylo metodou I-FISH zjištěno, že nárůst patologického klonu s delecí 17p13 nastal u čtyř nemocných (č. 11 28, 34, 35). U pacienta č. 25 až na 91,5 %. Naopak v případě šesti pacientů (pacienti č. 4, 17, 20, 24, 25, 29) bylo možné díky opakovaným odběrům pozorovat pokles

patologického klonu v reakci na léčbu. Z toho čtyři pacienti (č. 4, 17, 24 a 29) podstoupili transplantaci krevní kmenové buňky a u dvou z nich (pacienti č. 24 a 29) došlo společně s úplným vymizením klonu také k normalizaci karyotypu.

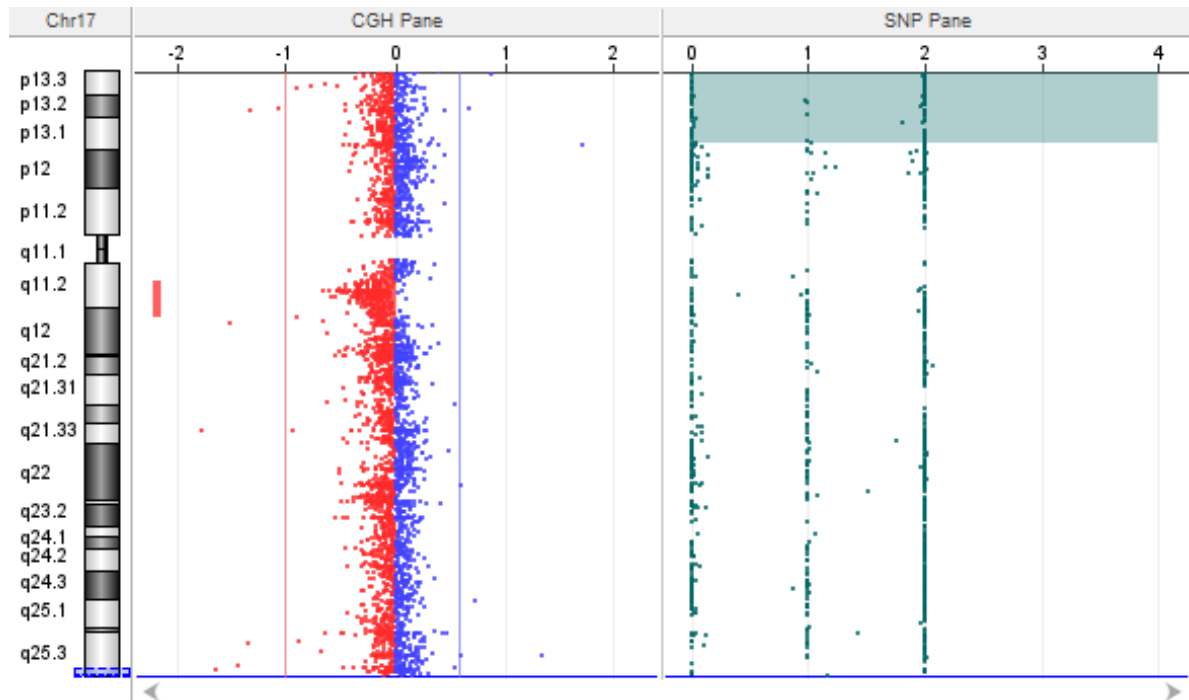
U 18 nemocných s delecí 17p13 bylo provedeno vyšetření metodou array CGH/SNP. Nejčastěji deletovanými oblastmi na krátkém rameni chromosomu 17 byly 17p13.3–17p11.2 (n=7) a 17p13.3–17p13.1 (n=4). Dále byly zaznamenány delece oblastí 17p13.13–17p11.2 (n=2), 17p11.2–17p11.1 (n=2), 17p12p–17p11.2 (n=1), 17p13.1–17p12 (n=1) a 17p13.2–17p11.2 (n=1) (obrázek 13). V 15 případech (83,3 %) tak došlo k deleci oblasti 17p13.1, ve které je lokalizován gen *TP53*. Pruh 17p13.1 jsem tedy stanovili jako společnou deletovanou oblast (CDR). U zbylých nemocných vyšetření nemohlo být provedeno pro nedostatek archivního materiálu.



Obrázek 13: Grafické znázornění rozsahu delecí na krátkém rameni chromosomu 17 zjištěných metodou array CGH/SNP u 18 pacientů. V pruhu 17p13.1 se nachází lokus genu *TP53*.

U celkem 21 pacientů bylo prováděno vyšetření metodou NGS. Z toho u 17 nemocných (80,9 %) byla potvrzena přítomnost patogenní či pravděpodobně patogenní mutace genu *TP53*. Jeden pacient měl mutaci neznámého klinického významu. Dále celkem 12 nemocných (57,1 % z 21 vyšetřovaných pacientů) mělo současně s mutací delecí oblasti 17p13. Variantní alelická frekvence (VAF) (=podíl reads, které mají specifickou genetickou variantu) s detekovanou mutací se pohybovala v rozmezí od 2 % do 91,3 %. Z toho v pěti případech byla mutace pravděpodobně patogenní (VAF od 24,0 % do 97,5 %). Celkem čtyři nemocní v této skupině (19,0 %) měli dvě mutace. A to pacienti č. 1, 6, 10 a 23. U pacienta č. 1 se jednalo o patogenní mutaci (VAF=42,8 %) a pravděpodobně patogenní mutaci

(VAF=41,4 %). Nemocný č. 6 měl patogenní mutaci (VAF=38 %) a mutaci neznámého klinického významu (VAF= 32 %). Pacient č. 10 měl obě mutace patogenní (VAF 33 % a 38 %) a stejně tak pacient č. 23 (VAF 13 % a 56 %). Pacient č. 7 měl společně s pravděpodobně patogenní mutací *TP53* (VAF= 56,9 %) metodou array CGH/SNP potvrzenou získanou UPD oblasti 17p13.3—p13.1 (obrázek 14). Medián celkového přežití uvedených pacientů byl 2 měsíce.



Obrázek 14 Získaná uniparentální disomie (aUPD) na krátkých ramenech chromosomu 17 v oblasti 17p13.3p13.1 detekovaná metodou a CGH/SNP u pacienta č. 7. Modrá barva představuje zisky genetického materiálu, červená ztráty a zeleně jsou označeny sondy pro detekci SNP.

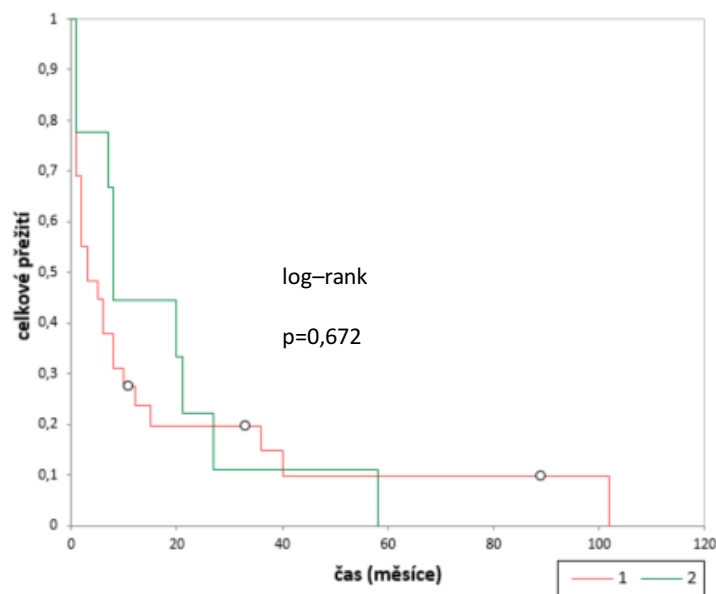
Výsledný popis nálezu dle ISCN:

arr[GRCh37]1p22.3p22.2(87652058_89835311)x1[0.2],1p22.2p22.1(91992730_93512606)x1[0.3],2q12.2q13(1061_071937)4],2q14.1q21.1(114432312_132185774)x1[0.2],2q21.3q22.1(135551908_137082615)x1[0.2],2q33.1q830703(2q032703(07)x1[0,2],3p26.3p26.1(62199_5218766)x1[0,2],3p14.3p14.2(58065292_59908105)x1[0,2],5q11.2q12.1(54011892_61663078)x1[0,4],5q13.2q35.1(72040048_171338748)x1[0.4],6p23p22.3(13826764_17126851)x1[0.2],6p22.3(20229610_24477242)x1[0,2],6p22.2p22.1(26169611_27822448)x1[0.3]?6p12.3p12.2(47262620_52211783)x1[0.1],6q22.31(12355406_9_125643341)x1[0.4],6q22.3q23.3(129737392_137940816)x1[0.4],6q25.2q25.3(154521898_159691782)x1[0.5],7p22.3p21.1(58764_20647522)x1[0,2]7p17.2p14.1(36035548_39988050)x1[0.4],7p14.1(40008451_40426281)x0[1.0],7p14.1(40451874_41512695)x1[0.4],7q36.1(149415472_151059267)x1[0,3],13q14.2(49391460_50073727)x1[0,2],13q14.2q14.3(50106550_51076505)x1[0,5]13q14.3(51097789_52364379)x0[0.3],13q14.3(52392915_53131100)x1[0,4],13q14.3(53173014_53350913)x1[0,1],17p13.3p13.1(72083_9653852)x2mos.hmz.,17q11.2q12(28094309_33031451)x1[0.2],18p11.32p11.21(14316_12816994)x1[0.2],?19q12q13.11(30128930_33233873)x1[0.14],20q11.23q13.33(34536862_60277934)x1[0,2]

6.3 Analýza přežití

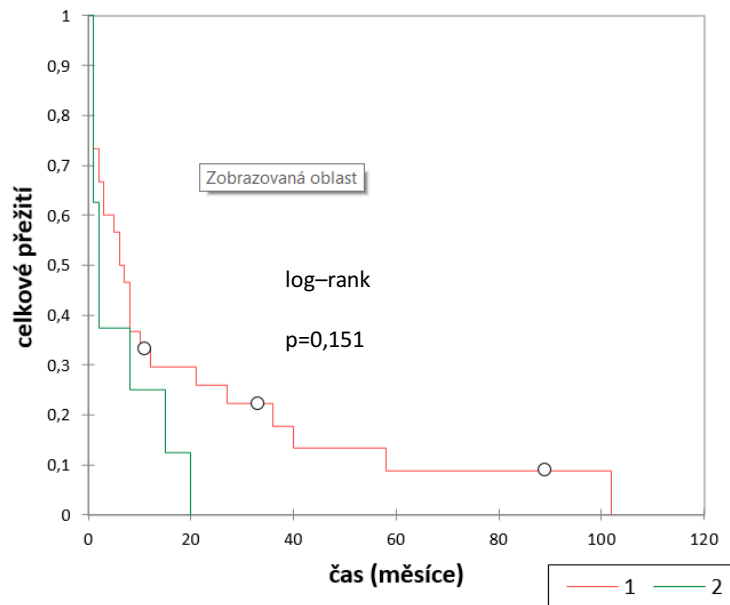
Průměrný věk nemocných s primárními MDS byl v době stanovení diagnózy 68 let (medián 74 let). Medián celkového přežití byl sedm měsíců a medián délky sledování šest a půl měsíce. Průměrný věk nemocných se sekundárními MDS byl 63 let (medián 62 let). Medián celkového přežití byl jeden měsíc a medián délky sledování byl tři a půl měsíce. Z celkového počtu 37 nemocných byly čtyři pacienti (10,8 %) léčeni pro sekundární MDS. K datu 31.3.2024 žili tři pacienti s primárními MDS (9%) a všichni nemocní se sekundárními MDS zemřeli.

Za účelem analýzy přežití byli pacienti (n=37) rozděleni na dvě skupiny podle toho, zda u nich byla alespoň v jednom vyšetřovaném odběru zjištěna delece oblasti 17p13 zahrnující gen *TP53*. V první skupině byli nemocní s prokázanou delecí (n=28) a do druhé skupiny byli zařazeni pacienti bez prokázané delece (n=9). Po provedení Kaplan-Meierovy analýzy nebyl pozorován rozdíl v celkovém přežití mezi stanovenými skupinami ($p=0,672$) (graf 4). Medián celkového přežití první skupiny (skupina s delecí) byl tři měsíce a v případě druhé skupiny (skupina bez delece) byl osm měsíců.



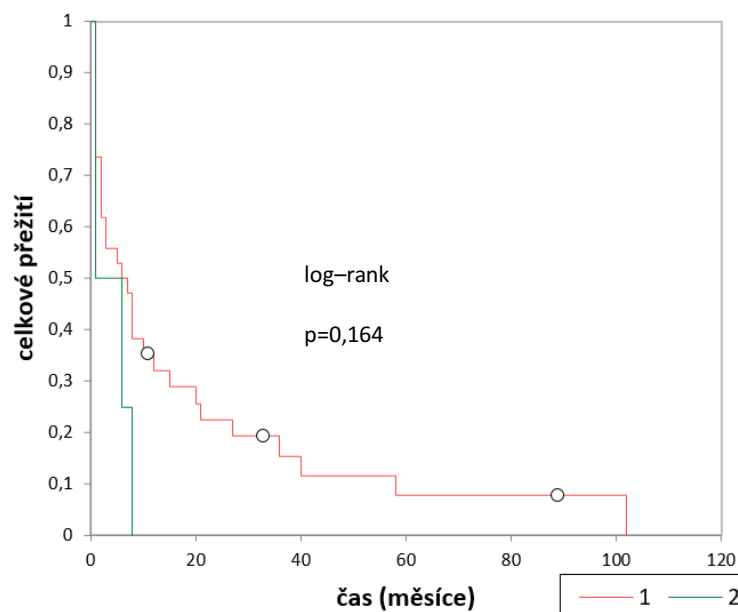
Graf 4 Analýza celkového přežití pacientů s prokázanou delecí oblasti 17p13 (oranžová křivka) a pacientů bez delece (zelená křivka). Rozdíl v přežití skupin nebyl statisticky signifikantní ($p=0,672$).

Dále byli pacienti (n=37) rozděleni na základě toho, zda u nich byla v karyotypu prokázána aberace jednoho či obou chromosomů 17. První skupinu tvořili pacienti s jedním aberovaným chromosomem 17 (n=29). Druhou skupinu tvořili nemocní s oběma aberovanými chromosomy 17 (n=8). Rozdíl v přežití vymezených skupin nebyl statisticky významný ($p=0,151$), nicméně bylo možné pozorovat tendenci k lepšímu přežití ve skupině jedna, ve které byli pacienti s jednou aberací chromosomu 17 (graf 5). Skupina jedna měla medián celkového přežití šest měsíců a druhá skupina dva měsíce.



Graf 5: Analýza celkového přežití pacientů s jednou prokázanou aberací chromosomu 17 (první skupina znázorněná oranžovou křivkou) a nemocných s aberacemi obou chromosomů (druhá skupina znázorněná zelenou křivkou).

Nakonec bylo provedeno srovnání celkového přežití pacientů s aberací chromosomu 17 a primárními MDS (n=33) a pacientů s aberací chromosomu 17 léčených pro sekundární MDS (n=4). Ve skupině jedna byli nemocní s primárními MDS a ve skupině dva byli zařazeni pacienti se sekundárními MDS. Rozdíl v přežití mezi pacienty ze skupiny jedna a dva nebyl statisticky významný ($p=0,164$), nicméně opět bylo možné pozorovat tendenci k lepšímu celkovému přežití ve skupině jedna (graf 6). V případě skupiny jedna byl medián celkového přežití sedm měsíců a skupiny dva jeden měsíc.



Graf 6: Analýza celkového přežití pacientů s primárními MDS (první skupina znázorněná oranžovou křivkou) a nemocných se sekundárními MDS (druhá skupina znázorněná zelenou křivkou).

7 Diskuse

Jedním z klíčových nezávislých prognostických faktorů, u pacientů léčených s myelodysplastickými neopláziemi (MDS), ale i s dalšími hematologickými malignitami, je cytogenetický nálezn v buňkách kostní dřeně. Na základě chromosomových aberací společně s dalšími prognostickými faktory, jako je procentuální zastoupení blastů v kostní dřeni či počet cytopenií myeloidních krevních řad, je pomocí Revidovaného mezinárodního prognostického systému (IPSS-R) stanoveno celkové rizikové skóre pacientů. Z něj pak plyne predikce rizika vážných komplikací včetně transformace do akutní myeloidní leukémie (AML) a odvíjí se od něj indikovaná léčba. Ta u nemocných může zahrnovat pravidelné monitorování stavu a transfuze nebo, v případě nepříznivého stavu pacientů, chemoterapie či transplantaci hematopoetických kmenových buněk.

Cytogenetické změny jsou v systému IPSS-R děleny do pěti prognostických skupin. A to na aberace s velmi dobrou prognózou, dobrou, střední, špatnou a velmi špatnou prognózou. Do kategorie středního rizika je řazen isochromosom pro dlouhá ramena chromosomu 17 (Greenberg et al., 2012a). Chromosom 17 je z hlediska prognózy pacientů významný také proto, že je na jeho krátkých ramenech, konkrétně v oblasti v oblasti 17p13.1, lokalizován tumor supresor *TP53*. Delece či mutace tohoto genu, klíčového v procesech jako je buněčné dělení, apoptóza a udržování genomové stability, mohou mít zcela zásadní vliv na průběh onemocnění. Souvislost se zjištěnou mutací genu *TP53* a prognózou pacientů, včetně rizika rezistence na léčbu, byla popisována dlouhodobě. Podle molekulární verze IPSS-R (IPSS-M) je *TP53^{multihit}* (*TP53* s několika zásahy, což je stav, kdy má gen buď více než jednu mutaci, mutaci a delecí anebo mutaci se ztrátou heterozygotnosti) nejsilnější ukazatel velmi nepříznivé prognózy a vysokého rizika transformace do AML (Bernard et al., 2022; Da Silva-Coelho et al., 2017). Cílem této diplomové práce bylo provést detailní cytogenomickou analýzu nebalancovaných aberací chromosomu 17. Dále sledovat jejich asociaci s delecemi/mutacemi/LOH genu *TP53*, posoudit jejich vliv na klonální vývoj a progresi onemocnění a porovnat jejich frekvenci a význam u primárních a sekundárních MDS.

MDS jsou soubor klonálních onemocnění krvetvorby, se kterými se typicky setkáváme u populace starší 70 let. V této věkové skupině je incidence 75 případů na 100 000 obyvatel a s rostoucím věkem se dále významně zvyšuje. Naopak u pacientů mladších 40 let je odhadována na 0,1 nemocného na 100 000 obyvatel ročně a předpokládá se, že v těchto případech je příčinou germinální mutace v genech klíčových pro hematopoézu. Celkově je pak věkový medián pacientů v době diagnózy 71 let a nemocných mladších 50 let je méně než 10 % (De Roos et al., 2007; Greenberg et al., 2012; Klimek et al., 2012). V našem souboru byl věkový medián všech pacientů při diagnóze 72 let, tedy v souladu s uvedenými daty. Nejstaršímu pacientovi bylo 85 let a nejmladšímu pacientovi

37 let. Mladší 50 let byli tři pacienti, tedy 8,1 %. Z toho dva byli léčeni pro primární MDS a lze se v jejich případě domnívat, že k rozvoji onemocnění došlo na základě genetických predispozic. Dále jsou dle dostupných dat MDS diagnostikovány 1,67x častěji u mužů ve srovnání s ženami (Zeidan et al., 2019). Z celkem 37 pacientů bylo 35 % žen a 65 % mužů, což odpovídá uvedenému poměru.

Aberace chromosomu 17 jsou cytogenetické změny popisované u řady hematologických malignit. V případě MDS jsou detekovány v karyotypu u 2 % pacientů, u sekundárních MDS pak častěji a to ve 4,5 % případů. Jejich výskyt je asociován s komplexním karyotypem. Lze tedy předpokládat, že rozdíl ve výskytu aberací chromosomu 17, mezi primárními a sekundárními MDS, je zapříčiněn rozdílem ve výskytu cytogenetických změn. U nemocných s primárními MDS jsou chromosomové aberace popisovány v 40—50 % případů. U sekundárních MDS v 90—95 %, z čehož až 50 % tvoří nálezy, které jsou podle IPSS-R klasifikovány jako komplexní karyotyp (Greenberg et al., 2012; Leone et al., 2022).

Při rozdělení pacientů na základě skutečnosti, zda se u nich MDS rozvinuly *de novo* nebo sekundárně, v důsledku chemoterapie či radioterapie pro jiná nádorová onemocnění, byl věkový medián nemocných s primárními MDS 74 let. V případě pacientů se sekundárními MDS byl ovšem medián 62 let, tedy již výrazně nižší než hodnota udávaná v literatuře (De Roos et al., 2007b). Příčinou tohoto rozdílu je zřejmě nedostatečně reprezentativní zastoupení pacientů se sekundárním MDS v našem souboru. Medián celkového přežití pacientů s primárními MDS a aberacemi chromosomu 17 byl sedm měsíců. V případě nemocných se sekundárními MDS byl medián celkového přežití jeden měsíc. Analýzou rozdílů přežití uvedených skupin pacientů nebyl zjištěn statisticky signifikantní rozdíl ($p=0,164$) a v odborné literatuře tento typ analýzy dosud nebyl proveden. Mezi uvedenými skupinami pacientů je nicméně možné pozorovat trend delšího celkového přežití pacientů s primárními MDS a výsledky naší analýzy jsou tedy zřejmě důsledkem malého vzorku pacientů. Je tedy nutné dále studovat rozdíly přežití uvedených skupin pacientů a také provést analýzu závislosti přežití na komplexním karyotypu, který je se sekundárními MDS asociován častěji (Moreno Berggren et al., 2023)

Ve španělské studii, analyzující aberace chromosomu 17 u 88 pacientů s primárními MDS, byl chromosom 17 součástí komplexního karyotypu v 70,4 % případů. Izolovaně, či s jednou další abnormalitou, se tedy vyskytoval u 29,6 % pacientů (Sánchez-Castro et al., 2013). V našem souboru byl komplexní karyotyp s alespoň jednou aberací chromosomu 17 popsán u 91,9 % nemocných. Až na jednoho pacienta (pacient č. 12) měli všichni tito pacienti více než 3 změny. Nicméně pacient č. 12 s aberací chromosomu 17 a třemi změnami, měl další dva patologické klony, ve kterých byl již počet změn >3 . Podle kritérií IPSS-R lze tedy cytogenetický nález všech pacientů hodnotit jako velmi špatný (Greenberg et al., 2012a). U třech nemocných byla popsána izolovaná aberace chromosomu 17. Žádný z pacientů neměl aberaci chromosomu 17 doprovázenou jednou další cytogenetickou změnou.

Nejčastěji popisovaným typem přestaveb chromosomu 17 byly translokace (balancované a nebalancované), které byly zjištěny u 28 pacientů (75,6 %). Balancované translokace jsou u MDS obecně považovány za vzácné (Leone et al., 2022). V našem souboru byly balancované translokace detekovány ve čtyřech případech a vždy zahrnovaly dlouhá ramena chromosomu 17. Oblasti zlomu byly pruhy 17q11.1 (n=3), 17q10 (n=1) a 17q25 (n=1). V případě pacienta č. 33 byla balancovaná translokace s chromosomem 10 izolovanou změnou v karyotypu. Z celkového počtu 37 pacientů se tedy balancované translokace vyskytovaly v 10,8 % případů.

V balancovaných a nebalancovaných translokacích byly nejčastějšími translokačními partnery chromosomu 17 chromosomy 7 (n=4) a 9 (n=4). Dále byly popsány translokace s chromosomy 5 (n=3), 15 (n=3), 18 (n=3), 21 (n=3), 6 (n=2), 10 (n=2), 11 (n=2), 12 (n=2), 13 (n=2), 1 (n=1), 2 (n=1), 3 (n=1), 4 (n=1), 9 (n=1), 14 (n=1), 16 (n=1), 20 (n=1), Y (n=1). Naopak chromosomy 8, 11 a X v translokacích s chromosomem 17 zjištěny nebyly. V literatuře byly například popsány translokace chromosomu 17 s chromosomy 4, 7, 11, 19 a 21 (Diamantopoulos et al., 2019). Zemanova et al. (2014) zjistili, že u pacientů s komplexním karyotypem byl chromosom 17 čtvrtým nejčastějším translokačním partnerem chromosomu 5. Jak již bylo uvedeno, v našem souboru byly translokace nejčastějším typem přestaveb chromosomu 17. V literatuře jsou tyto změny popisovány jako druhý nejčastější typ aberací u pacientů s MDS (Britt et al., 2020; Diamantopoulos et al., 2019). Nicméně starší studie, ve kterých byla prováděna mFISH analýza chromosomových přestaveb u pacientů s MDS a AML a komplexním karyotypem, identifikovaly translokace chromosomu 17 jako vůbec nejčastější typ jeho změn (Barouk-Simonet et al., 2005; Xu et al., 2010). A podle těchto studií tvořily nebalancované translokace až 57 % z přestaveb tohoto chromosomu a vyskytovaly se dvakrát častěji než jeho monosomie (Xu et al., 2010). Studie pacientů pouze s AML pak například popsala nebalancované translokace vedoucí k ztrátě 17p v 68 % případů (Schoch et al., 2002). Rozdíly ve frekvenci výskytu translokací a v zastoupení translokačních partnerů chromosomu 17 tedy nejsou zcela v souladu s předchozím výzkumem. Nicméně i v literatuře existují rozpory. Příčinnou může být velikost sledovaných skupin a nenáhodný výběr pacientů, rozdíly v souborech vybraných pacientů a použité metody.

Nejčastěji typem aberace chromosomu 17 v karyotypu pacientů s MDS jsou podle literatury jeho monosomie (Britt et al., 2020; Diamantopoulos et al., 2019; Sánchez-Castro et al., 2013). Zemanová et al. (2014) dále uvádějí, že monosomie chromosomu 17 byla třetí nejčastěji pozorovanou monosomií u pacientů s komplexním karyotypem. V našem souboru byla úplná ztráta druhého homologního chromosomu 17 zaznamenána u 13,5 % pacientů a jednalo se o druhou nejčastěji popisovanou změnu, což se shoduje se starší literaturou (Barouk-Simonet et al., 2005). Pouze u jednoho pacienta byla detekována monosomie chromosomu 17 bez aberací i druhého homologního chromosomu. Ve čtyřech případech se v karyotypu pacientů vyskytovala společně s monosomií

translokace druhého homologního chromosomu 17. Tři z translokací byly nebalancované (translokace s chromosomy 7, 18, 19) a jedna balancovaná (s chromosomem 4). Také je popisován výskyt translokace chromosomu 17 za současné monosomie druhého homologu v páru (Diamantopoulos et al., 2019; Sánchez-Castro et al., 2013).

Aberace obou homologních chromosomů 17 byly celkově detekovány u osmi pacientů. Čtyři případy těchto cytogenetických změn byly popsány v předchozím odstavci. Dále byly ve dvou případech popsány nebalancované translokace obou homologních chromosomů 17, a to s chromosomy 3, 6, 19 a 21. U pacienta č. 10 byly popsány translokace tři. Z toho dvě balancované s chromosomy Y a 19 a jedna nebalancovaná s chromosomem 6. V souhrnu tedy, do translokací ve skupině pacientů s aberacemi obou chromosomů 17, vstupovaly chromosomy 19 (n=3), 6 (n=2), 3 (n=1), 4 (n=1), 7 (n=1), 18 (n=1), 21 (n=1) a Y (n=1). Poslední pacient (č. 25) v této skupině měl zcela odlišný typ nálezu. U pacienta č. 25 byl detekován dicentrický chromosom pro dlouhá ramena chromosomu 17, který vznikl přestavbou s chromosomem 7 a současně nadpočetný derivovaný chromosom 17, u kterého došlo k delecí dlouhých i krátkých ramen (oblasti zlomu 17q11 a 17p11). V literatuře bylo nalezeno pouze omezené množství informací k tomuto tématu. Konkrétně se o něm v případě tří nemocných zmiňuje starší studie, ve které byli kromě pacientů s MDS také zahrnuti nemocní s AML (Barouk-Simonet et al., 2005) Dále bylo provedeno srovnání celkového přežití pacientů s jedním aberovaným chromosomem 17 a pacientů s aberacemi obou homologů v páru. Skupina s jedním aberovaným chromosomem 17 měla medián celkového přežití šest měsíců a druhá skupina dva měsíce. Rozdíl v přežití vymezených skupin pacientů nebyl statisticky významný ($p=0,151$), nicméně bylo možné pozorovat tendenci k lepšímu přežití ve skupině pacientů, kteří měli pouze jednu aberaci chromosomu 17. Pro objasnění významu jedné a dvou aberací chromosomu 17 pro prognózu pacientů bude nutné provést rozsáhlejší analýzu těchto dvou skupin nemocných.

Dalším typem cytogenetického nálezu chromosomu 17 v souboru pacientů byly dicentrické a isodicentrické chromosomy. Jedná se o sporadicky popisované nálezy a v našem souboru byly zastoupeny v 10,8 % a 5,4 % případů (Britt et al., 2020; Diamantopoulos et al., 2019). Zajímavé je, že ve studii analyzující karyotyp pacientů s AML, byl dicentrický chromosom 17 popsán v 8,8 % případů (Schoch et al., 2002). V námi studovaném souboru pacientů dicentrické chromosomy vždy vznikaly z dlouhých ramen chromosomu 17 a to s chromosomy 5, 7, 16, 18, 20. Oblastmi zlomu na chromosomu 17 byly pruhy 17p11.1 (n=3) a 17p11.2 (n=2). V karyotypu pacienta č. 25 byly detekovány dva různé dicentrické chromosomy 17. Ve všech případech, vzhledem k povaze přestavby, došlo ke ztrátě genu *TP53*, který se nachází na krátkých ramenech chromosomu 17. Tato skutečnost byla potvrzena vyšetřením metodou I-FISH. Dále byly ve dvou případech popsány isodicentrické chromosomy pro

dlouhá ramena chromosomu 17. Zlomové oblasti byly 17p11.1 (n=1) a 17p11.2 (n=1), tedy stejné pruhy jako v případě dicentrických chromosomů.

Isochromosom pro dlouhá ramena chromosomu 17 je jako izolovaný nález řazen v prognostickém systému IPSS-R do kategorie středního rizika s mediánem přežití 32 měsíců (Greenberg et al., 2012). i(17q) je aberace, která je v karyotypu pacientů popisovaná převážně bez dalších chromosomových aberací a její výskyt u pacientů s MDS je udáván v rozmezí od 1 % do 33% (Britt et al., 2020b; Diamantopoulos et al., 2019; Sánchez-Castro et al., 2013). V námi studovaném souboru pacientů byl isochromosom pro dlouhá ramena chromosomu 17 popsán jednou (pacient č. 4). Jednalo se o izolovanou aberaci a zastoupení patologického klonu se v kontrolních odběrech pohybovalo v rozmezí 87–91 %. Vzhledem k povaze přestavby došlo ke ztrátě krátkých ramen, na kterých se nachází lokus genu *TP53*.

U tří pacientů (8,1 %) byla metodou mFISH zjištěna delece na chromosomu 17. Jeden pacient měl dvě delece současně. A to na dlouhém i krátkém rameni nadpočetného chromosomu 17. V souhrnu pak byly na krátkých ramenech zjištěny delece oblastí 17p13.3–17p11.2 (n=1) 17p13–17pter (n=1). V obou případech došlo ke ztrátě oblasti 17p13.3, kde se nachází gen *TP53*, což bylo potvrzeno metodou aCGH/SNP. V jednom případě byla popsána delece na dlouhých ramenech 17q11–17qter i krátkých ramenech 17p11–17pter.

Analýzou zlomových oblastí na chromosomu 17 u výše popsaných změn bylo metodami mFISH/mBAND zjištěno, že na krátkých ramenech docházelo ke zlomům v pruzích 17p13.1 (n=4) a 17p11.2 (n=3) a na dlouhých ramenech v pruzích 17q10 (n=4) a 17q21 (n=3). Dále se oblasti zlomu nacházely v pruzích 17p12 (n=2), 17p11.1 (n=2), 17p10 (n=1), 17q11.1 (n=2), 17q11.3 (n=1), 17q22 (n=1), 17q24 (n=2), 17q25 (n=2). Zlom byl tedy detekován v téměř všech pruzích chromosomu 17 a nejčastěji pak v oblasti lokalizace genu *TP53*. V případě 12 pacientů v našem souboru nebylo možné zlomové oblasti vzhledem ke komplexitě přestaveb blíže určit. Naše zjištění odpovídají údajům v literatuře (Alvarez and Cigudosa, 2005; Barouk-Simonet et al., 2005; Zemanova et al., 2014).

Ke klonálnímu vývoji častěji dochází u pacientů, kteří mají cytogenetický nález již v diagnostickém vyšetření kostní dřeně. Je uváděno, že se jedná o 12–20 % nemocných s MDS, a při prvním vyšetření je u nich nejčastěji detekována delece dlouhých ramen chromosomu 5. del(5q) je pak obecně častěji zjištěna u pacientů s klonálním vývojem ve srovnání s pacienty, u kterých k dalšímu klonálnímu vývoji nedošlo. U nemocných s klonálním vývojem existuje, ve srovnání s pacienty bez něj, zvýšené riziko transformace do AML (Schanz et al., 2018; Wang et al., 2010). Wang et al. (2010) dále popsali, že ke klonálnímu zisku delece 17p došlo u 2,2 % pacientů. Nemocní s delecí krátkých ramen chromosomu 17 měli kratší celkové přežití ve srovnání s pacienty, u kterých k del(17p) nedošlo (Wang

et al., 2010). Ve skupině našich pacientů byl klonální vývoj, spojený se získáním aberace chromosomu 17 společně s delecí oblasti 17p13, zjištěn u třech nemocných (8,1 %). U těchto pacientů byl nejprve v diagnostickém odběru popsán patologický klon s delecí dlouhých ramen chromosomu 5. V následných vyšetřeních byl detekován získání komplexního karyotypu, který zahrnoval aberaci chromosomu 17. Jednalo se o balancovanou translokaci, nebalancovanou translokaci a delecii na krátkém rameni. Medián doby sledování nemocných, než došlo k získání popsáných změn, byl 68 měsíců. Medián celkového přežití byl 89 měsíců.

U všech pacientů v souboru bylo provedeno vyšetření metodou I-FISH pro potvrzení delece tumor supresorového genu *TP53*, jehož lokus se nachází v pruhu 17p13.3. Celkem 27 nemocných (72,9 %) mělo alespoň v jednom vyšetřovaném odběru prokázanou delecii oblasti 17p13. Delece byla detekována u všech pacientů se sekundárními MDS a u 23 nemocných (69,7 %) s primárními MDS. Dále celkem šest (22,2 %) pacientů z této skupiny mělo aberaci obou homologních chromosomů 17 a delece byla prokázána u všech pacientů s klonálním vývojem (u pacienta č. 2 byla potvrzena metodou aCGH/SNP). Zastoupení patologického klonu s delecí 17p13 se u pacientů v našem souboru pohybovalo v rozmezí od 1 % do 91,5 %. U čtyř nemocných byl pozorován jeho nárůst a u šesti nemocných naopak jeho pokles v reakci na léčbu. U dvou pacientů (pacienti č. 24 a 29), kteří podstoupili transplantaci hematopoetických kmenových buněk, došlo společně s vymizením patologického klonu k normalizaci karyotypu. Medián celkového přežití pacientů s delecí 17p13.3 byl tři měsíce, v případě skupiny bez delece pak 8 měsíců. Analýzou, srovnávající přežití těchto dvou skupin, nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl ($p=0,672$). Britt et al. (2020) popsali delecii 17p13 pouze u 6 % s MDS a AML, což je nález, se kterým se naše zjištění neshodují. Nicméně v současné době existuje malé množství aktuálních dat o delecii oblasti 17p13 u pacientů s MDS a prokázanými aberacemi chromosomu 17. Sánchez-Castro et al. (2015) například provedli I-FISH analýzu ztráty zmíněné oblasti, nicméně hlavním zaměřením studie bylo prokázat delecii u pacientů bez zjištěných aberací chromosomu 17 (u 2,6 % nemocných byla delece skutečně detekována). V souboru byla pouze malá podskupina 6 pacientů, kteří měli aberaci chromosomu 17 beze změn krátkého ramene. V této skupině byla delece zjištěna u 50 % nemocných (Sánchez-Castro et al., 2015).

Jasek et al. (2010) definovali společnou deletovanou oblast (CDR) na chromosomu 17 na krátkém rameni v pruhu 17p13.1. Tato 1,25 Mb oblast obsahující gen *TP53*, byla deletována u 85,7 % pacientů s MDS. V námi studovaném souboru pacientů u 18 z nich bylo provedeno vyšetření metodou aCGH/SNP a byly analyzovány lokalizace a rozsah oblastí delece na krátkém rameni chromosomu 17. A to včetně těch, kde se nachází gen *TP53*. Nejčastěji byla zjištěna delece 17p13.3–17p11.2 a to v sedmi případech (38,8 % vyšetřovaných pacientů). Druhou nejčastěji deletovanou oblastí byly pruhy 17p13.3–17p13.1 a to ve čtyřech případech (22,2 % vyšetřovaných pacientů). Dále byly zaznamenány

delece oblastí 17p13.13–17p11.2 (n=2), 17p11.2–17p11.1 (n=2), 17p12p–17p11.2 (n=1), 17p13.1–17p12 (n=1), 17p13.2–17p11.2 (n=1). U 83,3 % případů skutečně došlo k deleci v popisované CDR a naše data tady souhlasí s uvedenou literaturou. U pacientů s MDS je získaná uniparentální disomie (aUPD) nejčastěji popisována na krátkém rameni chromosomu 17. Tato změna, při které dochází ke ztrátě heterozygotnosti při zachování počtu kopií, je nejčastěji detekována v oblasti 17p13.1–17p13.2 (rozsah 8.2–20.8 Mb) a vždy tedy zahrnuje gen *TP53* (Jasek et al. 2010; Svobodova et al., 2016). V námi vyšetřovaném souboru nemocných byla aUPD zjištěna u pacienta č. 7. Jednalo se o oblast 17p13.3–p13.1 a nález tak odpovídal popisované oblasti. Dále byla u pacienta detekována pravděpodobně patogenní mutace *TP53* (VAF= 56,9 %).

Mutace v genu *TP53* jsou zjištěny u 10–12 % pacientů s primárními MDS a 30 % pacientů se sekundárními MDS. Jejich nález je významně asociován s komplexním karyotypem (Bernard et al., 2020; Hosono et al., 2019; Svobodova et al., 2016). U nemocných s různými aberacemi chromosomu 17 s MDS a AML je pak mutace detekována v 31 % případů (Britt et al., 2020). V roce 2022 byla publikována molekulární verze prognostického skórovacího systému IPSS-M. V IPSS-M je již hodnocena přítomnost mutací, a to v 16 genech, včetně genu *TP53* (Bernard et al., 2022). *TP53^{multihit}* je považován za nejsilnější ukazatel velmi nepříznivé prognózy a vysokého rizika transformace do AML (Bernard et al., 2020; Bernard et al., 2022). V námi studovaném souboru pacientů byla u 17 z 21 vyšetřovaných (80,9 %) potvrzena patogenní nebo pravděpodobně patogenní mutace tohoto tumor supresoru. Tedy výrazně častěji než v uvedené literatuře. Rozdíl je zřejmě důsledkem malého vzorku pacientů, jejich nenáhodným výběrem a také zahrnutím pacientů s AML v uvedené studii. Všichni vyšetřovaní nemocní měli komplexní karyotyp. Variantní alelická frekvence (VAF) (=podíl reads, které mají specifickou genetickou variantu) se pohybovala v rozmezí od 2 % do 91,3 %. V případě jednoho nemocného byla zjištěna mutace neznámého klinického významu. U 12 (z 21 pacientů, tedy 57,1 %) nemocných byla zjištěna současná delece oblasti 17p13, potvrzená metodou I-FISH, a mutace. Ve studii pacientů léčených s MDS a AML byla současná mutace a delece zjištěna u 69,2 % nemocných, ve studii pacientů pouze s AML pak v 62,5 % (Becker et al., 2020; Britt et al., 2020). Pro upřesnění dat bude nutné provést analýzu pacientů léčených pouze s MDS. Dále celkem čtyři nemocní měli současně dvě potvrzené mutace. Tento nález byl hodnocen jako *TP53^{multihit}*. Jelikož podle kritérií IPSS-M je do kategorie *TP53^{multihit}* řazen i současný nález mutace a LOH, patřil do skupiny nemocných s velmi špatnou prognózou také pacient č. 7. Medián celkového přežití těchto nemocných byl dva měsíce.

Byla provedena detailní cytogenetická analýza nebalancovaných aberací chromosomu 17 u dospělých pacientů s primárními a sekundárními MDS. Delece oblasti 17p13 byla metodou I-FISH zjištěna u 72,9 % z nich. Cytogenomickými metodami byla potvrzena lokalizace CDR na krátkém rameni chromosomu 17 popisovaná v literatuře. Bylo provedeno srovnání přežití pacientů s jednou a se dvěma

aberracemi chromosomu 17 a dále pacientů s primárními a sekundárními MDS. Statistickou analýzou nebyla u uvedených skupin prokázána souvislost s celkovým přežitím. Nicméně bylo možné pozorovat trend lepšího přežití u pacientů s jednou aberací chromosomu 17 a u pacientů s primárními MDS. Bude tedy nutné provést další studii většího souboru pacientů. Analýza mutací genu *TP53* identifikovala jejich přítomnost u 80,9 % vyšetřovaných a z toho 57,1 % pacientů mělo delecii oblasti 17p13 a mutaci. Celkem čtyři pacienti měli *TP53*^{mutihit}.

8 Závěr

Byla provedena detailní cytogenomická analýza aberací chromosomu 17 u 37 dospělých pacientů s primárními a sekundárními MDS. Nejčastěji detekovaným typem přestaveb chromosomu 17 byly nebalancované translokace. Typicky například s chromosomy 7, 15, 18 a 19. Tyto aberace byly zjištěny u 24 pacientů (64,8 %). Druhou nejčastějším typem aberací chromosomu 17 byly jeho monosomie zjištěné u 5 nemocných (13,5 %). Dále byl detekován výskyt dicentrických chromosomů, isodicentrických chromosomů a balancovaných translokací. Isochromosom pro dlouhá ramena chromosomu 17 byl zjištěn v jednom případě a jednalo se o izolovanou aberaci. Tato cytogenetická změna je zároveň jedinou aberací chromosomu 17, která je hodnocena prognostickým systémem IPSS-R (Greenberg et al., 2012). Její izolovaný výskyt v karyotypu pacientů je považován za středně rizikový s mediánem přežití 32 měsíců. Celkově byla izolovaná aberace chromosomu 17 popsána u tří pacientů a komplexní karyotyp s aberací chromosomu 17 byl tedy zjištěn u 34 nemocných (89,2 %).

U osmi pacientů (21,6 %) byly detekovány aberace obou homologních chromosomů 17. V pěti případech se jednalo o monosomii jednoho a translokaci druhého chromosomu 17. Dvakrát byly popsány dvě translokace a u jednoho pacienta byly zjištěny translokace tři. Poslední z této skupiny nemocných měl dicentrický chromosom pro dlouhá ramena chromosomu 17 současně s nadpočetným derivovaným chromosomem 17, u kterého došlo k delecí na dlouhých i krátkých ramenech. Analýzou celkového přežití pacientů s jednou a se dvěma aberacemi chromosomu 17 nebyl mezi těmito skupinami prokázán statisticky významný rozdíl. Nicméně bylo možné pozorovat trend delšího přežití u pacientů s jednou aberací.

Dále bylo možné díky opakovaným kontrolním odběrům pozorovat u 3 pacientů (8,1 %) klonální získ aberace chromosomu 17, která byla vždy součástí komplexního karyotypu. K získu aberace došlo společně s delecí oblasti 17p13. Delece oblasti 17p13, ve které se nachází tumor supresorový gen *TP53*, byla detekována u 27 pacientů (72,9 %) a do této skupiny patřili všichni nemocní se sekundárními MDS. Statistická analýza neprokázala signifikantní rozdíl v délce přežití pacientů s delecí a bez ní. Zároveň nebyl prokázán významný rozdíl v délce přežití nemocných s primárními a sekundárními MDS, ačkoli bylo možné pozorovat trend delšího přežití nemocných s primárními MDS.

Molekulárně cytogenetickými metodami byla potvrzena CDR na krátkém rameni chromosomu 17. Celkem 12 (57,1 %) pacientů vyšetřovaných pro přítomnost mutace genu *TP53* mělo současně prokázanou delecí oblasti 17p13. U čtyř nemocných byly zjištěny dvě mutace tohoto tumor supresoru a v případě jednoho pacienta byla prokázána mutace a aUPD na krátkém rameni chromosomu 17.

9 Seznam použité literatury

Aleshin, A., Greenberg, P.L., 2018. Molecular pathophysiology of the myelodysplastic syndromes: insights for targeted therapy. *Blood Advances* 2, 2787–2797. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2018015834>

Alvarez, S., Cigudosa, J.C., 2005. Gains, losses and complex karyotypes in myeloid disorders: a light at the end of the tunnel. *Hematol. Oncol.* 23, 18–25. <https://doi.org/10.1002/hon.744>

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. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-03-643544>

Arber, D.A., Orazi, A., Hasserjian, R.P., Borowitz, M.J., Calvo, K.R., Kvasnicka, H.-M., Wang, S.A., Bagg, A., Barbui, T., Branford, S., Bueso-Ramos, C.E., Cortes, J.E., Dal Cin, P., DiNardo, C.D., Dombret, H., Duncavage, E.J., Ebert, B.L., Estey, E.H., Facchetti, F., Foucar, K., Gangat, N., Gianelli, U., Godley, L.A., Gökbüget, N., Gotlib, J., Hellström-Lindberg, E., Hobbs, G.S., Hoffman, R., Jabbour, E.J., Kiladjian, J.-J., Larson, R.A., Le Beau, M.M., Loh, M.L.-C., Löwenberg, B., Macintyre, E., Malcovati, L., Mullighan, C.G., Niemeyer, C., Odenike, O.M., Ogawa, S., Orfao, A., Papaemmanuil, E., Passamonti, F., Porkka, K., Pui, C.-H., Radich, J.P., Reiter, A., Rozman, M., Rudelius, M., Savona, M.R., Schiffer, C.A., Schmitt-Graeff, A., Shimamura, A., Sierra, J., Stock, W.A., Stone, R.M., Tallman, M.S., Thiele, J., Tien, H.-F., Tzankov, A., Vannucchi, A.M., Vyas, P., Wei, A.H., Weinberg, O.K., Wierzbowska, A., Cazzola, M., Döhner, H., Tefferi, A., 2022. International Consensus Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemias: integrating morphologic, clinical, and genomic data. *Blood* 140, 1200–1228. <https://doi.org/10.1182/blood.2022015850>

Barbouti, A., Stankiewicz, P., Nusbaum, C., Cuomo, C., Cook, A., Höglund, M., Johansson, B., Hagemeijer, A., Park, S.-S., Mitelman, F., Lupski, J.R., Fioretos, T., 2004. The Breakpoint Region of the Most Common Isochromosome, i(17q), in Human Neoplasia Is Characterized by a Complex Genomic Architecture with Large, Palindromic, Low-Copy Repeats. *The American Journal of Human Genetics* 74, 1–10. <https://doi.org/10.1086/380648>

Barouk-Simonet, E., Soenen-Cornu, V., Roumier, C., Cosson, A., Laï, J.-L., Fenaux, P., Preudhomme, C., 2005. Role of multiplex FISH in identifying chromosome involvement in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemias with complex karyotypes: a report on 28 cases. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 157, 118–126. <https://doi.org/10.1016/j.cancergencyto.2004.06.012>

Beau, M.M.L., Espinosa, R., Davis, E.M., Eisenbart, J.D., Larson, R.A., 1996. Cytogenetic and Molecular Delineation of a Region of Chromosome 7 Commonly Deleted in Malignant Myeloid Diseases.

Becker, H., Pfeifer, D., Ihorst, G., Pantic, M., Wehrle, J., Rüter, B.H., Bullinger, L., Hackanson, B., Germing, U., Kuendgen, A., Platzbecker, U., Döhner, K., Ganser, A., Hagemeijer, A., Wijermans, P.W., Döhner, H., Duyster, J., Lübbert, M., 2020. Monosomal karyotype and chromosome 17p loss or TP53 mutations in decitabine-treated patients with acute myeloid leukemia. *Ann Hematol* 99, 1551–1560. <https://doi.org/10.1007/s00277-020-04082-7>

Bělohávková, P., 2021. Treatment strategies for myelodysplastic syndrome in 2021. *Vnitřní Lékařství* 67, 150–155. <https://doi.org/10.36290/vnl.2021.036>

Bennett, J.M., Catovsky, D., Daniel, M., 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. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1976.tb03563.x>

Bennett, J.M.B., Catovskym, D., Flandrin, G., Sultan, C., 1982. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Myelodysplastic Syndromes* 1982.

Bernard, E., Nannya, Y., Hasserjian, R.P., Devlin, S.M., Tuechler, H., Medina-Martinez, J.S., Yoshizato, T., Shiozawa, Y., Saiki, R., Malcovati, L., Levine, M.F., Arango, J.E., Zhou, Y., Solé, F., Cargo, C.A., Haase, D., Creignou, M., Germing, U., Zhang, Y., Gundem, G., Sarian, A., Van De Loosdrecht, A.A., Jädersten, M., Tobiasson, M., Kosmider, O., Follo, M.Y., Thol, F., Pinheiro, R.F., Santini, V., Kotsianidis, I., Boulwood, J., Santos, F.P.S., Schanz, J., Kasahara, S., Ishikawa, T., Tsurumi, H., Takaori-Kondo, A., Kiguchi, T., Polprasert, C., Bennett, J.M., Klimek, V.M., Savona, M.R., Belickova, M., Ganster, C., Palomo, L., Sanz, G., Ades, L., Della Porta, M.G., Elias, H.K., Smith, A.G., Werner, Y., Patel, M., Viale, A., Vanness, K., Neuberg, D.S., Stevenson, K.E., Menghrajani, K., Bolton, K.L., Fenaux, P., Pellagatti, A., Platzbecker, U., Heuser, M., Valent, P., Chiba, S., Miyazaki, Y., Finelli, C., Voso, M.T., Shih, L.-Y., Fontenay, M., Jansen, J.H., Cervera, J., Atsuta, Y., Gattermann, N., Ebert, B.L., Bejar, R., Greenberg, P.L., Cazzola, M., Hellström-Lindberg, E., Ogawa, S., Papaemmanuil, E., 2020. Implications of TP53 allelic state for genome stability, clinical presentation and outcomes in myelodysplastic syndromes. *Nat Med* 26, 1549–1556. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-1008-z>

Bernard, E., Tuechler, H., Greenberg, P.L., Hasserjian, R.P., Arango Ossa, J.E., Nannya, Y., Devlin, S.M., Creignou, M., Pinel, P., Monnier, L., Gundem, G., Medina-Martinez, J.S., Domenico, D., Jädersten, M., Germing, U., Sanz, G., Van De Loosdrecht, A.A., Kosmider, O., Follo, M.Y., Thol, F., Zamora, L., Pinheiro, R.F., Pellagatti, A., Elias, H.K., Haase, D., Ganster, C., Ades, L., Tobiasson, M., Palomo, L., Della Porta, M.G., Takaori-Kondo, A., Ishikawa, T., Chiba, S., Kasahara, S., Miyazaki, Y., Viale, A., Huberman, K., Fenaux, P., Belickova, M., Savona, M.R., Klimek, V.M., Santos, F.P.S., Boulwood, J., Kotsianidis, I., Santini, V., Solé, F., Platzbecker, U., Heuser, M., Valent, P., Ohyashiki, K., Finelli, C., Voso, M.T., Shih, L.-Y., Fontenay, M., Jansen, J.H., Cervera, J., Gattermann, N., Ebert, B.L., Bejar, R., Malcovati, L., Cazzola, M., Ogawa, S., Hellström-Lindberg, E., Papaemmanuil, E., 2022. Molecular International Prognostic Scoring System for Myelodysplastic Syndromes. *NEJM Evidence* 1. <https://doi.org/10.1056/EVIDoa2200008>

Boulwood, J., Fidler, C., Strickson, A.J., Watkins, F., Gama, S., Kearney, L., Tosi, S., Kasprzyk, A., Cheng, J.-F., Jaju, R.J., Wainscoat, J.S., 2002. Narrowing and genomic annotation of the commonly deleted region of the 5q- syndrome. *Blood* 99, 4638–4641. <https://doi.org/10.1182/blood.V99.12.4638>

Britt, A., Mohyuddin, G.R., McClune, B., Singh, A., Lin, T., Ganguly, S., Abhyankar, S., Shune, L., McGuirk, J., Skikne, B., Godwin, A., Pessetto, Z., Golem, S., Divine, C., Dias, A., 2020a. Acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndrome with chromosome 17 abnormalities and long-term outcomes with or without hematopoietic stem cell transplantation. *Leukemia Research* 95, 106402. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2020.106402>

Cammenga, J., 2024. Of gains and losses: SAMD9/SAMD9L and monosomy 7 in myelodysplastic syndrome. *Experimental Hematology* 134, 104217. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2024.104217>

Campagna, A., De Benedittis, D., Fianchi, L., Scalzulli, E., Rizzo, L., Niscola, P., Piccioni, A.L., Di Veroli, A., Mancini, S., Villivà, N., Martini, T., Mohamed, S., Carmosino, I., Criscuolo, M., Fenu, S., Aloe Spiriti, M.A., Buccisano, F., Mancini, M., Tafuri, A., Breccia, M., Poloni, A., Latagliata, R., 2022. Myelodysplastic Syndromes with Isolated 20q Deletion: A New Clinical–Biological Entity? *JCM* 11, 2596. <https://doi.org/10.3390/jcm11092596>

Čermák, J., 2016. Myelodysplastic syndromes in 2016. *Onkologie* 10, 114–119. <https://doi.org/10.36290/xon.2016.025>

Červinek, L., 2013. Myelodysplastický syndrom, *Onkologie* 2015; 9(3): 112–118

Chen, G., Zeng, W., Miyazato, A., Billings, E., Maciejewski, J.P., Kajigaya, S., Sloand, E.M., Young, N.S., 2004. Distinctive gene expression profiles of CD34 cells from patients with myelodysplastic syndrome characterized by specific chromosomal abnormalities. *Blood* 104, 4210–4218. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-01-0103>

Choi, S.M., Dewar, R., Burke, P.W., Shao, L., 2018. Partial tandem duplication of *KMT2A (MLL)* may predict a subset of myelodysplastic syndrome with unique characteristics and poor outcome. *Haematologica* 103, e131–e134. <https://doi.org/10.3324/haematol.2017.185249>

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., Stevens-Kroef, M.J., Cermak, J., Shiraishi, Y., Chiba, K., Tanaka, H., Miyano, S., De Witte, T., Blijlevens, N.M.A., Muus, P., Huls, G., Van Der Reijden, B.A., Ogawa, S., Jansen, J.H., 2017. Clonal evolution in myelodysplastic syndromes. *Nat Commun* 8, 15099. <https://doi.org/10.1038/ncomms15099>

Danishvich, A., Chegodar, A., Bodunova, N., Konovalov, F., Nefedova, M., Kremneva, N., Kurbanov, N., Bilyalov, A., Nikolaev, S., Khatkov, I., Dudina, G., 2024. Myelodysplastic Syndrome: Clinical Characteristics and Significance of Preclinically Detecting Biallelic Mutations in the TET2 Gene. *Life* 14, 637. <https://doi.org/10.3390/life14050637>

De Roos, A.J., Deeg, H.J., Davis, S., 2007a. A population-based study of survival in patients with secondary myelodysplastic syndromes (MDS): impact of type and treatment of primary cancers. *Cancer Causes Control* 18, 1199–1208. <https://doi.org/10.1007/s10552-007-9060-2>

De Roos, A.J., Deeg, H.J., Davis, S., 2007b. A population-based study of survival in patients with secondary myelodysplastic syndromes (MDS): impact of type and treatment of primary cancers. *Cancer Causes Control* 18, 1199–1208. <https://doi.org/10.1007/s10552-007-9060-2>

Diamantopoulos, P., Koumbi, D., Kotsianidis, I., Pappa, V., Symeonidis, A., Galanopoulos, A., Zikos, P., Papadaki, H.A., Panayiotidis, P., Dimou, M., Hatzimichael, E., Vassilopoulos, G., Delimpasis, S., Mparmparousi, D., Papageorgiou, S., Variami, E., Kyrtsonis, M., Megalakaki, A., Kotsopoulou, M., Repousis, P., Adamopoulos, I., Kontopidou, F., Christoulas, D., Kourakli, A., Tsokanas, D., Konstantinos Papoutselis, M., Kyriakakis, G., Viniou, N., the Hellenic MDS study group, 2019. The prognostic significance of chromosome 17 abnormalities in patients with myelodysplastic syndrome treated with 5-azacytidine: Results from the Hellenic 5-azacytidine registry. *Cancer Med* 8, 2056–2063. <https://doi.org/10.1002/cam4.2090>

DiNardo, C.D., Jabbour, E., Ravandi, F., Takahashi, K., Daver, N., Routbort, M., Patel, K.P., Brandt, M., Pierce, S., Kantarjian, H., Garcia-Manero, G., 2016. IDH1 and IDH2 mutations in myelodysplastic syndromes and role in disease progression. *Leukemia* 30, 980–984. <https://doi.org/10.1038/leu.2015.211>

Ebert, B.L., Pretz, J., Bosco, J., Chang, C.Y., Tamayo, P., Galili, N., Raza, A., Root, D.E., Attar, E., Ellis, S.R., Golub, T.R., 2008. Identification of RPS14 as a 5q- syndrome gene by RNA interference screen. *Nature* 451, 335–339. <https://doi.org/10.1038/nature06494>

Feng, Y., Chen, X., Jiang, K., Zhang, D., Tao, F., Ni, D., Zhang, J., Wu, L., Cai, J., Jiang, L., Yu, G., Shi, L., 2021. Secondary myelodysplastic syndromes identified via next-generation sequencing in a non-small cell lung cancer patient. *BMC Med Genomics* 14, 299. <https://doi.org/10.1186/s12920-021-01147-y>

Fioretos, T., Strömbeck, B., Sandberg, T., Johansson, B., Billström, R., Borg, Å., Nilsson, P.-G., Van Den Berghe, H., Hagemeijer, A., Mitelman, F., Höglund, M., 1999. Isochromosome 17q in Blast Crisis of Chronic Myeloid Leukemia and in Other Hematologic Malignancies Is the Result of Clustered Breakpoints in 17p11 and Is Not Associated With Coding TP53 Mutations. *Blood* 94, 225–232. https://doi.org/10.1182/blood.V94.1.225.413k24_225_232

Fuchs, S.Y., Adler, V., Buschmann, T., Wu, X., Ronai, Z., 1998. Mdm2 association with p53 targets its ubiquitination. *Oncogene* 17, 2543–2547. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202200>

Greenberg, P., Cox, C., LeBeau, M.M., Fenaux, P., Morel, P., Sanz, G., Sanz, M., Vallespi, T., Hamblin, T., Oscier, D., Ohyashiki, K., Toyama, K., Aul, C., Mufti, G., Bennett, J., 1997. International Scoring System for Evaluating Prognosis in Myelodysplastic Syndromes. *Blood* 89, 2079–2088. <https://doi.org/10.1182/blood.V89.6.2079>

Greenberg, P.L., Tuechler, H., Schanz, J., Sanz, G., Garcia-Manero, G., Solé, F., Bennett, J.M., Bowen, D., Fenaux, P., Dreyfus, F., Kantarjian, H., Kuendgen, A., Levis, A., Malcovati, L., Cazzola, M., Cermak, J., Fonatsch, C., Le Beau, M.M., Slovak, M.L., Krieger, O., Luebbert, M., Maciejewski, J., Magalhaes, S.M.M., Miyazaki, Y., Pfeilstöcker, M., Sekeres, M., Sperr, W.R., Stauder, R., Tauro, S., Valent, P., Vallespi, T., van de Loosdrecht, A.A., Germing, U., Haase, D., 2012a. Revised International Prognostic Scoring System for Myelodysplastic Syndromes. *Blood* 120, 2454–2465. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-03-420489>

Greenberg, P.L., Tuechler, H., Schanz, J., Sanz, G., Garcia-Manero, G., Solé, F., Bennett, J.M., Bowen, D., Fenaux, P., Dreyfus, F., Kantarjian, H., Kuendgen, A., Levis, A., Malcovati, L., Cazzola, M., Cermak, J., Fonatsch, C., Le Beau, M.M., Slovak, M.L., Krieger, O., Luebbert, M., Maciejewski, J., Magalhaes, S.M.M., Miyazaki, Y., Pfeilstöcker, M., Sekeres, M., Sperr, W.R., Stauder, R., Tauro, S., Valent, P., Vallespi, T., Van De Loosdrecht, A.A., Germing, U., Haase, D., 2012b. Revised International Prognostic Scoring System for Myelodysplastic Syndromes. *Blood* 120, 2454–2465. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-03-420489>

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., Kern, W., Ogawa, S., Nagata, Y., Yoshida, K., Graubert, T.A., Walter, M.J., List, A.F., Komrokji, R.S., Padron, E., Sallman, D., Papaemmanuil, E., Campbell, P.J., Savona, M.R., Seegmiller, A., Adès, L., Fenaux, P., Shih, L.-Y., Bowen, D., Groves, M.J., Tauro, S., Fontenay, M., Kosmider, O., Bar-Natan, M., Steensma, D., Stone, R., Heuser, M., Thol, F., Cazzola, M., Malcovati, L., Karsan, A., Ganster, C., Hellström-Lindberg, E., Boultonwood, J., Pellagatti, A., Santini, V., Quek, L., Vyas, P., Tüchler, H., Greenberg, P.L., Bejar, R., 2019. TP53 mutation status divides myelodysplastic syndromes with complex karyotypes into distinct prognostic subgroups. *Leukemia* 33, 1747–1758. <https://doi.org/10.1038/s41375-018-0351-2>

Haferlach, T., Nagata, Y., Grossmann, V., Okuno, Y., Bacher, U., Nagae, G., Schnittger, S., Sanada, M., Kon, A., Alpermann, T., Yoshida, K., Roller, A., Nadarajah, N., Shiraishi, Y., Shiozawa, Y., Chiba, K., Tanaka, H., Koeffler, H.P., Klein, H.-U., Dugas, M., Aburatani, H., Kohlmann, A., Miyano, S., Haferlach, C., Kern, W., Ogawa, S., 2014. Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 28, 241–247. <https://doi.org/10.1038/leu.2013.336>

Haferlach, T., Nagata, Y., Grossmann, V., Okuno, Y., Bacher, U., Nagae, G., Schnittger, S., Sanada, M., Kon, A., Alpermann, T., Yoshida, K., Roller, A., Nadarajah, N., Shiraishi, Y., Shiozawa, Y., Chiba, K.,

Tanaka, H., Koeffler, H.P., Klein, H.-U., Dugas, M., Aburatani, H., Kohlmann, A., Miyano, S., Haferlach, C., Kern, W., Ogawa, S., 2014b. Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 28, 241–247. <https://doi.org/10.1038/leu.2013.336>

Harris, N.L., Jaffe, E.S., Diebold, J., Flandrin, G., Muller-Hermelink, H.K., Vardiman, J., Lister, T.A., Bloomfield, C.D., 1999. The World Health Organization Classification of Neoplastic Diseases of the Hematopoietic and Lymphoid Tissues. *Annals of Oncology* 10, 1419–1432. <https://doi.org/10.1023/A:1008375931236>

Hoff, F.W., Madanat, Y.F., 2023. Molecular Drivers of Myelodysplastic Neoplasms (MDS)—Classification and Prognostic Relevance. *Cells* 12, 627. <https://doi.org/10.3390/cells12040627>

Hosono, N., 2019. Genetic abnormalities and pathophysiology of MDS. *Int J Clin Oncol* 24, 885–892. <https://doi.org/10.1007/s10147-019-01462-6>

Huh, J., Tiu, R.V., Gondek, L.P., O’Keefe, C.L., Jasek, M., Makishima, H., Jankowska, A.M., Jiang, Y., Verma, A., Theil, K.S., McDevitt, M.A., Maciejewski, J.P., 2010. Characterization of chromosome arm 20q abnormalities in myeloid malignancies using genome-wide single nucleotide polymorphism array analysis. *Genes Chromosomes & Cancer* 49, 390–399. <https://doi.org/10.1002/gcc.20748>

Jasek, M., Gondek, L.P., Bejanyan, N., Tiu, R., Huh, J., Theil, K.S., O’Keefe, C., McDevitt, M.A., Maciejewski, 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. <https://doi.org/10.1038/leu.2009.189>

Jawad, M., Afkhami, M., Ding, Y., Zhang, X., Li, P., Young, K., Xu, M.L., Cui, W., Zhao, Y., Halene, S., Al-Kali, A., Viswanatha, D., Chen, D., He, R., Zheng, G., 2022. DNMT3A R882 Mutations Confer Unique Clinicopathologic Features in MDS Including a High Risk of AML Transformation. *Front. Oncol.* 12, 849376. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.849376>

Jonas, B.A., Greenberg, P.L., 2015. MDS prognostic scoring systems – Past, present, and future. *Best Practice & Research Clinical Haematology* 28, 3–13. <https://doi.org/10.1016/j.beha.2014.11.001>

Kaiser-Rogers, K., Rao, K.W., 2013. Structural Chromosome Rearrangements, in: Gersen, S.L., Keagle, M.B. (Eds.), *The Principles of Clinical Cytogenetics*. Springer New York, New York, NY, pp. 139–174. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1688-4_9

Khoury, J.D., Solary, E., Abla, O., Akkari, Y., Alaggio, R., Apperley, J.F., Bejar, R., Berti, E., Busque, L., Chan, J.K.C., Chen, W., Chen, X., Chng, W.-J., Choi, J.K., Colmenero, I., Coupland, S.E., Cross, N.C.P., De Jong, D., Elghetany, M.T., Takahashi, E., Emile, J.-F., Ferry, J., Fogelstrand, L., Fontenay, M., Germing, U., Gujral, S., Haferlach, T., Harrison, C., Hodge, J.C., Hu, S., Jansen, J.H., Kanagal-Shamanna, R., Kantarjian, H.M., Kratz, C.P., Li, X.-Q., Lim, M.S., Loeb, K., Loghavi, S., Marcogliese, A., Meshinchi, S., Michaels, P., Naresh, K.N., Natkunam, Y., Nejati, R., Ott, G., Padron, E., Patel, K.P., Patkar, N., Picarsic, J., Platzbecker, U., Roberts, I., Schuh, A., Sewell, W., Siebert, R., Tembhare, P., Tyner, J., Verstovsek, S., Wang, W., Wood, B., Xiao, W., Yeung, C., Hochhaus, A., 2022. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. *Leukemia* 36, 1703–1719. <https://doi.org/10.1038/s41375-022-01613-1>

Klimek, V.M., Dolezal, E.K., Tees, M.T., Devlin, S.M., Stein, K., Romero, A., Nimer, S.D., 2012. Efficacy of hypomethylating agents in therapy-related myelodysplastic syndromes. *Leukemia Research* 36, 1093–1097. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2012.04.025>

Komrokji, R.S., Padron, E., Ebert, B.L., List, A.F., 2013. Deletion 5q MDS: Molecular and therapeutic implications. *Best Practice & Research Clinical Haematology* 26, 365–375. <https://doi.org/10.1016/j.beha.2013.10.013>

Lafage-Pochitaloff, M., Gerby, B., Baccini, V., Largeaud, L., Fregona, V., Prade, N., Juvin, P.-Y., Jamrog, L., Bories, P., Hébrard, S., Lagarde, S., Mansat-De Mas, V., Dovey, O.M., Yusa, K., Vassiliou, G.S., Jansen, J.H., Tekath, T., Rombaut, D., Ameye, G., Barin, C., Bidet, A., Boudjarane, J., Collonge-Rame, M.-A., Gervais, C., Ittel, A., Lefebvre, C., Luquet, I., Michaux, L., Nadal, N., Poirel, H.A., Radford-Weiss, I., Ribourtout, B., Richebourg, S., Struski, S., Terré, C., Tigaud, I., Penther, D., Eclache, V., Fontenay, M., Broccardo, C., Delabesse, E., 2022. The *CADM1* tumor suppressor gene is a major candidate gene in MDS with deletion of the long arm of chromosome 11. *Blood Advances* 6, 386–398. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2021005311>

Lee, S.C.-W., Dvinge, H., Kim, E., Cho, H., Micol, J.-B., Chung, Y.R., Durham, B.H., Yoshimi, A., Kim, Y.J., Thomas, M., Lobry, C., Chen, C.-W., Pastore, A., Taylor, J., Wang, X., Krivtsov, A., Armstrong, S.A., Palacino, J., Buonamici, S., Smith, P.G., Bradley, R.K., Abdel-Wahab, O., 2016. Modulation of splicing catalysis for therapeutic targeting of leukemia with mutations in genes encoding spliceosomal proteins. *Nat Med* 22, 672–678. <https://doi.org/10.1038/nm.4097>

Leone, Emiliano Fabiani, Maria Teresa Voso, 2022. De Novo and Therapy-Related Myelodysplastic Syndromes: Analogies and Differences. *Medit J Hematol Infect Dis*. <https://doi.org/10.4084/MJHID.2022.030>

Liew, E., Owen, C., 2011. Familial myelodysplastic syndromes: a review of the literature. *Haematologica* 96, 1536–1542. <https://doi.org/10.3324/haematol.2011.043422>

Marei, H.E., Althani, A., Afifi, N., Hasan, A., Caceci, T., Pozzoli, G., Morrione, A., Giordano, A., Cenciarelli, C., 2021. p53 signaling in cancer progression and therapy. *Cancer Cell Int* 21, 703. <https://doi.org/10.1186/s12935-021-02396-8>

Martín, I., Villamón, E., Abellán, R., Calasanz, M.J., Irigoyen, A., Sanz, G., Such, E., Mora, E., Gutiérrez, M., Collado, R., García-Serra, R., Vara, M., Blanco, M.L., Oíartzabal, I., Álvarez, S., Bernal, T., Granada, I., Xicoy, B., Jerez, A., Calabuig, M., Diez, R., Gil, Á., Díez-Campelo, M., Solano, C., Tormo, M., the Spanish Group of Myelodysplastic Syndromes (GESMD), 2021. Myelodysplastic syndromes with 20q deletion: incidence, prognostic value and impact on response to azacitidine of *ASXL1* chromosomal deletion and genetic mutations. *Br J Haematol* 194, 708–717. <https://doi.org/10.1111/bjh.17675>

Mohamed, S., Latagliata, R., Limongi, M.Z., Nigro, S., Sangiorgi, E., Nanni, M., Piccioni, A., Campagna, A., Spiriti, M.A.A., Carmosino, I., Molica, M., Marigliò, E., Rosati, S., Colafigli, G., Fazio, F., Luca, M.L.D., Benedittis, D.D., Scalzulli, E., Breccia, M., Mancini, M., 2020. Balanced and unbalanced chromosomal translocations in myelodysplastic syndromes: clinical and prognostic significance. *Leukemia & Lymphoma* 61, 3476–3483. <https://doi.org/10.1080/10428194.2020.1811861>

Momand, J., Zambetti, P., Olson, D.C., George, D., Levine, J., n.d. The mdm-2 Oncogene Product Forms a Complex with the ~53 Protein and Inhibits p53-Mediated Transactivation.

Montalban-Bravo, G., Kanagal-Shamanna, R., Benton, C.B., Class, C.A., Chien, K.S., Sasaki, K., Naqvi, K., Alvarado, Y., Kadia, T.M., Ravandi, F., Daver, N., Takahashi, K., Jabbour, E., Borthakur, G., Pemmaraju, N., Konopleva, M., Soltysiak, K.A., Pierce, S.R., Bueso-Ramos, C.E., Patel, K.P., Kantarjian, H., Garcia-Manero, G., 2020. Genomic context and TP53 allele frequency define clinical outcomes in TP53-mutated myelodysplastic syndromes. *Blood Advances* 4, 482–495. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2019001101>

Moreno Berggren, D., Garelius, H., Willner Hjelm, P., Nilsson, L., Rasmussen, B., Weibull, C.E., Lambe, M., Lehmann, S., Hellström-Lindberg, E., Jädersten, M., Ejerblad, E., 2023. Therapy-related MDS dissected based on primary disease and treatment—a nationwide perspective. *Leukemia* 37, 1103–1112. <https://doi.org/10.1038/s41375-023-01864-6>

Nachtkamp, K., Strupp, C., Vukelja, M., Kasprzak, A., Haase, D., Ganster, C., Hildebrandt, B., Betz, B., Giagounidis, A., Aul, C., Blum, S., Hofmann, W.K., Pfeilstöcker, M., Valent, P., Lübbert, M., Seidl, M., Rudelius, M., Stauder, R., Krieger, O., Götze, K.S., Bobak, J., Kündgen, A., Schulz, F., Dietrich, S., Kobbe, G., Gattermann, N., Germing, U., 2024. The new WHO 2022 and ICC proposals for the classification of myelodysplastic neoplasms. Validation based on the Düsseldorf MDS Registry and proposals for a merged classification. *Leukemia* 38, 442–445. <https://doi.org/10.1038/s41375-024-02157-2>

Nguyen, T.-V., Yao, S., Wang, Y., Rolfe, A., Selvaraj, A., Darman, R., Ke, J., Warmuth, M., Smith, P.G., Larsen, N.A., Yu, L., Zhu, P., Fekkes, P., Vaillancourt, F.H., Bolduc, D.M., 2019. The R882H DNMT3A hot spot mutation stabilizes the formation of large DNMT3A oligomers with low DNA methyltransferase activity. *Journal of Biological Chemistry* 294, 16966–16977. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.010126>

Papaemmanuil, E., Gerstung, M., Malcovati, L., Tauro, S., Gundem, G., Van Loo, P., Yoon, C.J., Ellis, P., Wedge, D.C., Pellagatti, A., Shlien, A., Groves, M.J., Forbes, S.A., Raine, K., Hinton, J., Mudie, L.J., McLaren, S., Hardy, C., Latimer, C., Della Porta, M.G., O'Meara, S., Ambaglio, I., Galli, A., Butler, A.P., Walldin, G., Teague, J.W., Quek, L., Sternberg, A., Gambacorti-Passerini, C., Cross, N.C.P., Green, A.R., Boulton, J., Vyas, P., Hellstrom-Lindberg, E., Bowen, D., Cazzola, M., Stratton, M.R., Campbell, P.J., 2013. Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. *Blood* 122, 3616–3627. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-08-518886>

Sabapathy, K., Lane, D.P., 2018. Therapeutic targeting of p53: all mutants are equal, but some mutants are more equal than others. *Nat Rev Clin Oncol* 15, 13–30. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2017.151>

Sánchez-Castro, J., Marco-Betés, V., Gómez-Arbonés, X., Arenillas, L., Valcarcel, D., Vallespí, T., Costa, D., Nomdedeu, B., Jimenez, M.J., Granada, I., Grau, J., Ardanaz, M.T., de la Serna, J., Carbonell, F., Cervera, J., Sierra, A., Luño, E., Cervero, C.J., Falantes, J., Calasanz, M.J., González-Porrás, J.R., Bailén, A., Amigo, M.L., Sanz, G., Solé, F., 2013. Characterization and prognostic implication of 17 chromosome abnormalities in myelodysplastic syndrome. *Leukemia Research* 37, 769–776. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2013.04.010>

Sánchez-Castro, J., Marco-Betés, V., Gómez-Arbonés, X., García-Cerecedo, T., López, R., Talavera, E., Fernández-Ruiz, S., Ademà, V., Marugan, I., Luño, E., Sanzo, C., Vallespí, T., Arenillas, L., Marco Buades, J., Batlle, A., Buño, I., Martín Ramos, M.L., Blázquez Rios, B., Collado Nieto, R., Vargas, M.T., González Martínez, T., Sanz, G., Solé, F., for the Spanish Group for Mds Study (GESMD) and the Spanish Group for Clinical Cytogenetics (Gcecgh), 2015. Fluorescence *in situ* hybridization of *TP53* for the detection of chromosome 17 abnormalities in myelodysplastic syndromes. *Leukemia & Lymphoma* 56, 3183–3188. <https://doi.org/10.3109/10428194.2015.1028053>

Schanz, J., Cevik, N., Fonatsch, C., Bräulke, F., Shirneshan, K., Bacher, U., Haase, D., 2018. Detailed analysis of clonal evolution and cytogenetic evolution patterns in patients with myelodysplastic syndromes (MDS) and related myeloid disorders. *Blood Cancer Journal* 8, 28. <https://doi.org/10.1038/s41408-018-0061-z>

Schanz, J., Tüchler, H., Solé, F., Mallo, M., Luño, E., Cervera, J., Granada, I., Hildebrandt, B., Slovak, M.L., Ohyashiki, K., Steidl, C., Fonatsch, C., Pfeilstöcker, M., Nösslinger, T., Valent, P., Giagounidis, A., Aul, C., Lübbert, M., Stauder, R., Krieger, O., Garcia-Manero, G., Faderl, S., Pierce, S., Le Beau, M.M., Bennett, J.M., Greenberg, P., Germing, U., Haase, D., 2012. New Comprehensive Cytogenetic Scoring System for

Primary Myelodysplastic Syndromes (MDS) and Oligoblastic Acute Myeloid Leukemia After MDS Derived From an International Database Merge. *JCO* 30, 820–829. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.35.6394>

Schanz, J., Tüchler, H., Solé, F., Mallo, M., Luño, E., Cervera, J., Grau, J., Hildebrandt, B., Slovak, M.L., Ohyashiki, K., Steidl, C., Fonatsch, C., Pfeilstöcker, M., Nösslinger, T., Valent, P., Giagounidis, A., Aul, C., Lübbert, M., Stauder, R., Krieger, O., Le Beau, M.M., Bennett, J.M., Greenberg, P., Germing, U., Haase, D., 2013. Monosomal karyotype in MDS: explaining the poor prognosis? *Leukemia* 27, 1988–1995. <https://doi.org/10.1038/leu.2013.187>

Schoch, C., Haferlach, T., Bursch, S., Gerstner, D., Schnittger, S., Dugas, M., Kern, W., Löffler, H., Hiddemann, W., 2002. Loss of genetic material is more common than gain in acute myeloid leukemia with complex aberrant karyotype: A detailed analysis of 125 cases using conventional chromosome analysis and fluorescence in situ hybridization including 24-color FISH. *Genes Chromosomes & Cancer* 35, 20–29. <https://doi.org/10.1002/gcc.10088>

Shahjahani, M., Hadad, E.H., Azizidoost, S., Chenani Nezhad, K., Shahrabi, S., 2019. Complex karyotype in myelodysplastic syndromes: Diagnostic procedure and prognostic susceptibility. *Oncol Rev* 13. <https://doi.org/10.4081/oncol.2019.389>

Shakoori, A.R., 2017. Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) and Its Applications, in: Bhat, T.A., Wani, A.A. (Eds.), *Chromosome Structure and Aberrations*. Springer India, New Delhi, pp. 343–367. https://doi.org/10.1007/978-81-322-3673-3_16

Shieh, S.-Y., Ikeda, M., Taya, Y., Prives, C., 1997. DNA Damage-Induced Phosphorylation of p53 Alleviates Inhibition by MDM2. *Cell* 91, 325–334. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80416-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80416-X)

Sloand, E.M., Mainwaring, L., Fuhrer, M., Ramkissoon, S., Risitano, A.M., Keyvanafar, K., Lu, J., Basu, A., Barrett, A.J., Young, N.S., 2005. Preferential suppression of trisomy 8 compared with normal hematopoietic cell growth by autologous lymphocytes in patients with trisomy 8 myelodysplastic syndrome. *Blood* 106, 841–851. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-05-2017>

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. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-01-030643>

Song, B., Yang, P., Zhang, S., 2024. Cell fate regulation governed by p53: Friends or reversible foes in cancer therapy. *Cancer Communications* 44, 297–360. <https://doi.org/10.1002/cac2.12520>

Svobodova, K., Zemanova, Z., Lhotska, H., Novakova, M., Podskalska, L., Belickova, M., Brezinova, J., Sarova, I., Izakova, S., Lizcova, L., Berkova, A., Siskova, M., Jonasova, A., Cermak, J., Michalova, K., 2016a. Copy number neutral loss of heterozygosity at 17p and homozygous mutations of TP53 are associated with complex chromosomal aberrations in patients newly diagnosed with myelodysplastic syndromes. *Leukemia Research* 42, 7–12. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2016.01.009>

Thol, F., Kade, S., Schlarman, C., 2012. Frequency and prognostic impact of mutations in SRSF2, U2AF1, and ZRSR2 in patients with myelodysplastic syndromes 119.

Thomas, M.E., Abdelhamed, S., Hiltenbrand, R., Schwartz, J.R., Sakurada, S.M., Walsh, M., Song, G., Ma, J., Pruett-Miller, S.M., Klco, J.M., 2021. Pediatric MDS and bone marrow failure-associated germline mutations in SAMD9 and SAMD9L impair multiple pathways in primary hematopoietic cells. *Leukemia* 35, 3232–3244. <https://doi.org/10.1038/s41375-021-01212-6>

- Tria, F.P., Ang, D.C., Fan, G., 2022. Myelodysplastic Syndrome: Diagnosis and Screening. *Diagnostics* 12, 1581. <https://doi.org/10.3390/diagnostics12071581>
- Tuna, M., Knuutila, S., Mills, G.B., 2009. Uniparental disomy in cancer. *Trends in Molecular Medicine* 15, 120–128. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2009.01.005>
- 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., Bloomfield, C.D., 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. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-03-209262>
- Voelkerding, K.V., Dames, S.A., Durtschi, J.D., 2009. Next-Generation Sequencing: From Basic Research to Diagnostics. *Clinical Chemistry* 55, 641–658. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112789>
- Vondráková, Mud.J., 2010. Myelodysplastický syndrom, diagnostika a léčba, *Interní Med.* 2010; 12(11): 535–539
- Wahl, M.C., Will, C.L., Lührmann, R., 2009. The Spliceosome: Design Principles of a Dynamic RNP Machine. *Cell* 136, 701–718. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.02.009>
- Walter, M.J., Ding, L., Shen, D., Shao, J., Grillot, M., McLellan, M., Fulton, R., Schmidt, H., Kalicki-Veizer, J., O’Laughlin, M., Kandoth, C., Baty, J., Westervelt, P., DiPersio, J.F., Mardis, E.R., Wilson, R.K., Ley, T.J., Graubert, T.A., 2011. Recurrent DNMT3A mutations in patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 25, 1153–1158. <https://doi.org/10.1038/leu.2011.44>
- Wang, H., Wang, X.-Q., Xu, X.-P., Lin, G.-W., 2010. Cytogenetic evolution correlates with poor prognosis in myelodysplastic syndrome. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 196, 159–166. <https://doi.org/10.1016/j.cancergencyto.2009.09.015>
- Wyandt, H.E., Chinnappan, D., Ioannidou, S., Salama, M., O’Hara, C., 1998. Fluorescence In Situ Hybridization to Assess Aneuploidy for Chromosomes 7 and 8 in Hematologic Disorders. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 102, 114–124. [https://doi.org/10.1016/S0165-4608\(97\)00355-5](https://doi.org/10.1016/S0165-4608(97)00355-5)
- Xie, Z., Chen, E.C., Stahl, M., Zeidan, A.M., 2023. Prognostication in myelodysplastic syndromes (neoplasms): Molecular risk stratification finally coming of age. *Blood Reviews* 59, 101033. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2022.101033>
- Xu, W., Li, J. -Y., Liu, Q., Zhu, Y., Pan, J. -L., Qiu, H. -R., Xue, Y. -Q., 2010. Multiplex fluorescence *in situ* hybridization in identifying chromosome involvement of complex karyotypes in *de novo* myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. *Int J Lab Hematology* 32. <https://doi.org/10.1111/j.1751-553X.2008.01101.x>
- Yoshida, K., Sanada, M., Shiraishi, Y., Nowak, D., Nagata, Y., Yamamoto, R., Sato, Y., Sato-Otsubo, A., Kon, A., Nagasaki, M., Chalkidis, G., Suzuki, Y., Shiosaka, M., Kawahata, R., Yamaguchi, T., Otsu, M., Obara, N., Sakata-Yanagimoto, M., Ishiyama, K., Mori, H., Nolte, F., Hofmann, W.-K., Miyawaki, S., Sugano, S., Haferlach, C., Koefler, H.P., Shih, L.-Y., Haferlach, T., Chiba, S., Nakauchi, H., Miyano, S., Ogawa, S., 2011. Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature* 478, 64–69. <https://doi.org/10.1038/nature10496>
- Zahid, M.F., Malik, U.A., Sohail, M., Hassan, I.N., Ali, S., Shaukat, H.S., 2016. Cytogenetic Abnormalities in Myelodysplastic Syndromes: An Overview. . Volume 11.

Zeidan, A.M., Shallis, R.M., Wang, R., Davidoff, A., Ma, X., 2019. Epidemiology of myelodysplastic syndromes: Why characterizing the beast is a prerequisite to taming it. *Blood Reviews* 34, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2018.09.001>

Zemanova, Z., Brezinova, J., Svobodova, K., Lhotska, H., Izakova, S., Sarova, I., Lizcova, L., Ransdorfova, S., Pavlistova, L., Belickova, M., 2018. Variability in the extent of del(5q) and its clinical implication in myelodysplastic syndromes (MDS). *J. Clin. Oncol.* 36, e19025–e19025. https://doi.org/10.1200/JCO.2018.36.15_suppl.e19025

Zemanova, Z., Michalova, K., Buryova, H., Brezinova, J., Kostylkova, K., Bystricka, D., Novakova, M., Sarova, I., Izakova, S., Lizcova, L., Ransdorfova, S., Krejcik, Z., Merkerova, M.D., Dohnalova, A., Siskova, M., Jonasova, A., Neuwirtova, R., Cermak, J., 2014. Involvement of deleted chromosome 5 in complex chromosomal aberrations in newly diagnosed myelodysplastic syndromes (MDS) is correlated with extremely adverse prognosis. *Leukemia Research* 38, 537–544. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2014.01.012>

Zini, G., 2017. Diagnostics and Prognostication of Myelodysplastic Syndromes. *Ann Lab Med* 37, 465–474. <https://doi.org/10.3343/alm.2017.37.6.465>

Zody, M.C., Garber, M., Adams, D.J., Sharpe, T., Harrow, J., Lupski, J.R., Nicholson, C., Searle, S.M., Wilming, L., Young, S.K., Abouelleil, A., Allen, N.R., Bi, W., Bloom, T., Borowsky, M.L., Bugalter, B.E., Butler, J., Chang, J.L., Chen, C.-K., Cook, A., Corum, B., Cuomo, C.A., De Jong, P.J., DeCaprio, D., Dewar, K., FitzGerald, M., Gilbert, J., Gibson, R., Gnerre, S., Goldstein, S., Grafham, D.V., Grocock, R., Hafez, N., Hagopian, D.S., Hart, E., Norman, C.H., Humphray, S., Jaffe, D.B., Jones, M., Kamal, M., Khodiyar, V.K., LaButti, K., Laird, G., Lehoczy, J., Liu, X., Lokyitsang, T., Loveland, J., Lui, A., Macdonald, P., Major, J.E., Matthews, L., Mauceli, E., McCarroll, S.A., Mihalev, A.H., Mudge, J., Nguyen, C., Nicol, R., O’Leary, S.B., Osoegawa, K., Schwartz, D.C., Shaw-Smith, C., Stankiewicz, P., Steward, C., Swarbreck, D., Venkataraman, V., Whittaker, C.A., Yang, X., Zimmer, A.R., Bradley, A., Hubbard, T., Birren, B.W., Rogers, J., Lander, E.S., Nusbaum, C., 2006. DNA sequence of human chromosome 17 and analysis of rearrangement in the human lineage. *Nature* 440, 1045–1049. <https://doi.org/10.1038/nature04689>

10 Přílohy

Příloha 1 Karyotypy pacientů stanovené na základě klasické cytogenetické analýzy a vyšetření metodami mFISH a mBAND

č. p. – číslo pacienta; dg. – diagnóza,

č.p.	pohlaví	věk při dg.	delece TP53 [%]	mutace TP53 VAF [%]	karyotyp
1	žena	79	NE	ANO 42,5; 41,4	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)[25]/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)[8]/45,idem,-13[9]
			NE	ND	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)[22]
			ND	ND	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)[13]/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)[3]/45,XX,der(5)del(5)(q14q33.3)t(5;17)(q33.2;p12),del(11)(q?),der(12)t(12;13)(p13;q?)-13,der(17)t(5;17)(q33.2;p12),der(18)t(12;18)(?;q22),der(20)t(11;20)(?;p11.2)[4]/46,XX[1]
2	žena	68	NE	NE	46,XX,del(5)(q13.3q34)[6]
			ND	ND	46,XX,del(5)(q13.3q34)[6]/46,XX[16]
			ND	ND	46,XX,del(5)(q13.3q34)[1]/46,XX[17]
			ND	ND	46,XX[12]/46,XX,del(5)(q13.3q34)[10]
			ND	ND	46,XX,del(5)(q13.3q34)[16]/46,XX[6]
			ND	ND	46,XX,del(5)(q13.3q34)[22]

			ND	ND	46,XX,del(5)(q13.3q34)[20]/46,XX[2]
			ND	ND	46,XX,del(5)(q13.3q34)[16]/47,XX,+X[1]/46,XX[10]
			ANO	ANO 97,3	46,XY,del(5)(q14.3q34),del(12)(p13.3p12.3),del(17)(p13.3p11.2)[7]/45,idem,der(3;13)(q10;q10)del(3)(p26.1p24.3)del(3)(p24.3p12.1)del(3)(q11.1q21.3)[11]/45,idem,ins(1;3)(p?;p24.3p24.3),der(3)t(3;6)(12.1;q?)ins(3;6)(q11.1;?),-6[13]
3	muž	68	ANO 74,0	ND	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]
4	muž	68	ANO 91,0	NE	46,XY,i(17)(q10)[20]/46,XY[2]
			ANO 87,5	ND	46,XY,i(17)(q10)[17][17]/46,XY[1]
			ANO 85,0	ND	46,XY,i(17)(q10)[18]/46,XY[2]
			NE	ND	45,X,-Y[2]/46,XY[18]
5	muž	74	ANO 18,5	ND	44,XY,-3,t(4;17)(q12;q11.1),der(5)t(5;13)(q11.1;q?),+der(8)del(8)(p11.1pter)t(3;8)(q11.2;q11.2),del(12)(q13),-13,-17,der(21)t(3;21)(p11.1;11.1)[6]/46,XY[18]
6	žena	74	ND	ANO 32,0; 38,0	44,XX,del(5)(q13.3q33.3),-7,del(13)(q?14),der(17)t(13;17)(q?14;q?21),-18[16]/45,XX,del(5)(q13.3q33.3),-7,+8,del(13)(q?14),der(17)t(13;17)(q?14;q?21),-18[13]/47,XX,del(5)(q13.3q33.3),-7,+8,del(13)(q?14)x2,der(17)t(13;17)(q?14;q?21)[8]/46,XX[5]
7	muž	63	NE	ANO 56,9	43~45,XY,der(3)t(3;13)(?;q?14),der(5)del(5)(q11.1q35)ins(5;6)(q11.1;?),der(6)t(6;13)(p21;q?),der(6)del(6)(p12)del(6)(q13),der(7)t(6;7)(?;p13)t(6;13)(?;q?),der(7)inv(7)(p?q?)ins(7;6)(q?;?),del(12)(q?12)13,der(13;14)(p10;p10),der(15)t(2;15)(?;p11),-17,der(18)t(17;18)(q?;p10),der(19)t(5;19)(q35;p12),der(20)t(12;20)(?;q?12)[5]/45,idem,del(12)(q?12),der(20)t(12;20)(?;q?12)[3]/43~45,XY,der(5)del(5)(q11.1q35)ins(5;6)(q11.1;?),der(6)t(6;13)(p21;q?),der(6)del(6)(p12)del(6)(q13),der(7)inv(7)(p?q?)ins(7;6)(q?;?),der(13;14)(p10;p10),der(15)t(2;15)(?;p11),-17,der(18)t(17;18)(q?;p10),der(19)t(5;19)(q35;p12),2mar[5]/46,XY[5]
			ND	ND	0 mitos

8	žena	45	NE	ND	46,XX,del(5)(q14.3q33.3)[10]/46,XX[12]
			NE	ND	45,XX,del(5)(q14.3q33.3),-18[15]/45,XX,del(5)(q14.3q33.3),del(12)(p11.2p13.2),del(13)(q21.2q32),der(15;21)(p10;p10)[8] 46,XX,del(5)(q14.3q33.3),ider(9)del(9)(q10),+r(9)(q?),del(12)(p11.2p13.2),del(13)(q21.2q32),der(15;21)(p10;p10)[8]/46,XX, del(5)(q14.3q33.3),ider(9)del(9)(q10),+r(9)(q?),del(12)(p11.2p13.2),del(13)(q21.2q32),der(15;21)(p10;p10),t(15;17)(q25;q25),d er(19)t(9;19)(?;?p13),ider(21)t(9;21)(?;q22.3)[4]/46,XX[9]
			ND	ND	0 mitos
			ND	ND	0 mitos
			ND	ND	0 mitos
9	žena	79	ANO 68,0	ANO 65,2	46,XX,del(5)(q13.3q34)[13]/44~45,XX,del(5)(q13.3q34),der(10)t(10;18)(p10;?),der(11)hsr(11)(q22q23.3)t(11;21)(q23.3;q21),der (17)t(10;17)(p10;p10),-18,-21,+22[27]/45,XX,del(5)(q13.3q34)ins(5;12)(q13.3;q13q24.3),del(12)(q13q24.3),- 14,der(17)t(14;17)(q?;p13)[2]/46,XX[1]
10	muž	74	ANO 9,5	ND	46,XY,del(5)(q13.3q34)[20]/41~46,XY,del(5)(q13.3q34),der(7)r(7;12)(p11.1q11;p13.1p22.3),t(X;9)(p22.2;p24),der(12)t(7;12)(p1 1.1;p13.1),?del(17)(p13)[28]/42,X,t(Y;17)(q11.21;q11),del(5)(q13.3q34),der(5)t(1;5)(?;q35),der(6)t(6;17)(q12;q?),-7,-8,-9, der(14;19)(p10;p10),t(16;20)(p11.1;p11.1),t(17;19)(q11.1;p11)[2]/46,XY[4]
			ND	ANO 33,0; 38,0	41~46,XY,del(5)(q13.3q34),der(7)r(7;12)(p11.1q11;p13.1p22.3),t(X;9)(p22.2;p24),der(12)t(7;12)(p11.1;p13.1),?del(17)(p13)[20] /38~42,X,t(Y;17)(q11.21;q11),del(5)(q13.3q34),der(5)t(1;5)(?;q35),der(6)t(6;17)(q12;q?),-7,-8,-9,der(14;19)(p10;p10),-16, t(16;20)(p11.1;p11.1),t(17;19)(q11.1;p11),+19[10]/ 46,XY,del(5)(q13.3q34)[1]/46,XY[1]
11	muž	66	ANO 82,5	ND	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)[26]/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)[13]/ 92,idem x2,t(X;8)(p?22.1;q?24.1)x2,der(4)t(4;19)(q35;?)x2,-16,-16,der(19)t(16;19)(?;?)x2,+der(19)del(19)(p12) del(19)(q12)x2[2]/46,XY[4]
			ANO 89,0	ND	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)[10]/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)[10]
12	žena	55	ANO 89,5	ND	46,XX,del(5)(q13.3q33.3),?idic(11)(p11.1),der(17)t(11;17)(p11.1;p?11.2)[15]/45,XX,del(5)(q13.3q33.3),der(6)t(6;15)(q?;q?), 11,der(15)t(6;15)(q?;q?),der(16)t(16;21)(p13;q?),der(17)t(11;17)(p11.1;p?11.2),der(18)t(11;18)(?;q?22)[14]/46,idem,del(4)(q?) [1]

13	muž	82	NE	ANO 82,0	44,XY,-3,der(5)t(3;5)(q?;q?12),-9,der(12)t(9q12)(?;p?13),der(17)t(17;21)(p?13;q?)[19]/90<4n>,XXYY,-3,-3,der(5)t(3;5)(q?;q?12)x2,-9,-9,der(12)t(9q12)(?;p?13)x2,der(17)t(17;21)(p?13;q?)x2,+21,+21[3]/45,idem,+21[10]/46,XX[1]
14	muž	80	ANO 77,0	ND	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?)[40]
15	muž	65	ANO 10,0	ND	42~45,XY,-2,-5,dic(5;16)(q11.2;q13),t(6;10)(q25;q25),der(11)t(11;13)(p15;q?),r(13)(?)x2,-14,der(16)t(5;16)(q34;q13)t(5;16)(p11;q24),der(17)t(2;17)(q11.2;p13)inv(2)(q?q?)t(13;17)(q?;q21)[10]/46,XY[35]
			ND	ANO 24,0	42~45,XY,-2,-5,dic(5;16)(q11.2;q13),t(6;10)(q25;q25),der(11)t(11;13)(p15;q?),r(13)(?)x2,-14,der(16)t(5;16)(q34;q13)t(5;16)(p11;q24),der(17)t(2;17)(q11.2;p13)inv(2)(q?q?)t(13;17)(q?;q21)[7]/46,XY[18]
16	muž	62	ANO 88,0	ANO 87,6	84~85<4n>,XX,-Y,-Y,-2,del(5)(q13q34)x2,+8,der(9;17)(p10;q10)x2,-12,-14,-16,-21[37]/46,XY,del(5)(q21.2q34)[2]/47,XY,del(5)(q21.2q34),+8[1]/46,XY[2]
17	muž	59	ANO 65,0	ND	38~40,XY,-1,der(4)t(4;5)(q?31;q?23.3)t(5;12)(q?35.2;?)t(1;12)(?;?),-5,der(6)t(1;6)(?;q12),-7,-12,-17,-18[19]/46,XY[9]/40,XY,-1,der(4)t(4;5)(q?31;q?23.3)t(5;12)(q?35.2;?)t(1;12)(?;?),-5,der(6)t(1;6)(?;q12),-7,-12,-17,-18[15]
			ND	ANO 47,0	40,XY,-1,der(4)t(4;5)(q?31;q?23.3)t(5;12)(q?35.2;?)t(1;12)(?;?),-5,der(6)t(1;6)(?;q12),-7,-12,-17,-18[39]/46,XY[2]
			ANO 36,0	ND	40,XY,-1,der(4)t(4;5)(q?31;q?23.3)t(5;12)(q?35.2;?)t(1;12)(?;?),-5,der(6)t(1;6)(?;q12),-7,-12,-17,-18[4]/46,XY[26]
			ANO 1,0	ND	40,XY,-1,der(4)t(4;5)(q?31;q?23.3)t(5;12)(q?35.2;?)t(1;12)(?;?),-5,der(6)t(1;6)(?;q12),-7,-12,-17,-18[1]/46,XY[23]
			ANO 3,5	ANO 2,0	40,XY,-1,der(4)t(4;5)(q?31;q?23.3)t(5;12)(q?35.2;?)t(1;12)(?;?),-5,der(6)t(1;6)(?;q12),-7,-12,-17,-18[5]/46,XY[23]
18	žena	74	NE	ND	43,XX,t(1;9)(p36;p22),der(4;7)(p10;p10)del(7)(p11.1p14),del(5)(q13.3q33.3),dic(12;18)(p11.1;p11.1),der(16)t(10;16)(?;p11.1),der(17)t(16;17)(q?;q25)t(10;16)(?;q?),der(10;20)(p10;p10)[31]/46,XX,del(5)(q13.3q33.3)[5]/46,XX[5]

19	muž	69	NE	ND	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)[30]/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)[6]
			ND	ND	0 mitos
20	žena	54	ANO 21,5	ND	0 mitos
			ANO 36,0	ND	45,XX,der(5)del(5)(q14q33.3)inv(5)(p15.3q33.3)del(5)(p15.2p15.3),dic(17;20)(p11.1;q11.1)[18]/46,XX[16]
			ANO 21,5	ND	45,XX,der(5)del(5)(q14q33.3)inv(5)(p15.3q33.3)del(5)(p15.2p15.3),dic(17;20)(p11.1;q11.1)[10]/46,XX[10]
			ANO 14,0	ND	45,XX,der(5)del(5)(q14q33.3)inv(5)(p15.3q33.3)del(5)(p15.2p15.3),dic(17;20)(p11.1;q11.1)[1]/46,XX[8]
21	muž	77	ANO 51,5	ANO 37,6	41~43,XY,del(5)(q15q34),-9,der(12)t(12;16)(q24.?1+?),ins(12;18)(p?12;q?),-16,der(17)t(12;17)(?;p?13),-18,der(18)del(18)(p?)del(18)(q?)[24]/46,XY,del(5)(q14q34)[1]/46,XX[5]
22	muž	71	NE	ND	46,XY,del(5)(q14q34)[12]/46,XY[10]
			ND	ND	46,XY[22]
			ND	ND	47,XY,+8[7]/46,XY,del(5)(q14q34)[10]/46,XY[3]
			ANO 48,5	ND	46,XY,del(5)(q14q34)[6]/45~46,XY,der(1)t(1;12)(p13;q24.?),t(4;7)(p14;q36),del(5)(q14q34),?amp(11)(q?),der(12)t12;17)(q24.?2;?)t(1;17)(p13;q?),der(21;22)(p10;p10)x1~2[15]/47,XY,+8[9]/46,XY[9]
			ND	ND	45~46,XY,der(1)t(1;12)(p13;q24.?),t(4;7)(p14;q36),del(5)(q14q34),?amp(11)(q?),der(12)t12;17)(q24.?2;?)t(1;17)(p13;q?),der(21;22)(p10;p10)x1~2[6]/46,XY,del(5)(q14q34)[6]/47,XY,+8[6]/46,XY[2]
			ND	NE	0 mitos
			ND	ND	0 mitos

23	muž	79	ANO 67,0	ANO 13,0; 56,0	45,XY,r(5)(p13.1q23.1),7,der(7)t(5;7)(p12;p22)t(7;12)(q11.22;p13.3)del(7)(q11.22),der(10)t(10;13)(q?23;q?13),der(12)t(7;12)(q?32;p13.3),der(12)t(10;12)(q?23;p?13),del(13)(q?13),der(18)t(18;20)(q?11.2;?),der(20)t(7;20)(p21;q?),der(22)t(7;22)(q21.2;q?1.2)[21]/44,idem,der(17)t(17;21)(q?21;q?),der(19)t(17;19)(q?21;q?13),-21[16]/44,idem,-5[3]/46,XY[1]
24	muž	79	ANO 85,0	ANO 17,1	42,XY,der(5)t(5;21)(q12;q?22),del(7)(q22),der(7)t(7;?)(p14;?),der(12)del(12)(p10)del(12)(q10),der(13)t(13;12)(q?34;?)-15,16,der(17)t(15;17)(q11.2;p11.2),-18,-21[26]/42,idem,r(16)(p?12q?21)[9]/46,XY[7]
			ANO 10,5	ND	46,XY[25]
			NE	ND	46,XY[13]
25	žena	37	ANO 91,5	ANO 83,0	44,XX,der(3)t(3;18)(p13;q?),der(5)del(5)(q13.3q33.3)ins(5;18)(q13.3;q?q?),dic(6;22)(p?21;q?),dic(7;17)(p11.2;p?11.1),+der(17)del(17)(p11)del(17)q(11),-18[19]/44,XX,der(5)del(5)(q13.3q33.3)ins(5;18)(q13.3;q?q?), dic(3;7)(p11.1;p11.2), dic(17;18)(p?11.1;p?11.1)[19]
			ANO 66,0	ANO 67,0	44,XX,der(5)del(5)(q13.3q33.3)ins(5;18)(q13.3;q?q?),dic(3;7)(p11.1;p11.2),del(6)(q?25),dic(17;18)(p?11.1;p?11.1),del(18)(q?12)[8]/44,XX,der(5)del(5)(q13.3q33.3)ins(5;18)(q13.3;q?q?),dic(3;7)(p11.1;p11.2),del(6)(q?25),dic(17;18)(p?11.1;p?11.1),del(18)(q?12),+mar[2]/44,XX,der(3)t(3;18)(p13;q?),der(5)del(5)(q13.3q33.3)ins(5;18)(q13.3;q?q?),dic(6;22)(p11.2;p11.2),dic(7;17)(p11.2;p?11.1),+der(17)del(17)(p11)del(17)q(11),-18[10]/46,XY[7]
26	muž	81	NE	ND	43~46,XY,der(1)t(1;3;12)(p12;?;p13),der(3)t(1;3)(p12;q?13)t(3;17)(p?12;q?24),der(6)inv(6)(q14q23.2)t(3;6)(?;q23.2),der(11)del(11)(q?13q?)t(11;18)(q?13;p11.1),der(12)t(3;12)(?;p13),der(17)t(6;17)(q23.2;q?24),der(18)t(11;18)(q?;p11.1)[12]/ 46,XY[8]
			ND	NE	43~46,XY,der(1)t(1;3;12)(p12;?;p13),der(3)t(1;3)(p12;q?13)t(3;17)(p?12;q?24),der(6)inv(6)(q14q23.2)t(3;6)(?;q23.2),der(11)del(11)(q?13q?)t(11;18)(q?13;p11.1),der(12)t(3;12)(?;p13),der(17)t(6;17)(q23.2;q?24),der(18)t(11;18)(q?;p11.1)[11]/ 46,XY[3]
			ND	ND	43~46,XY,der(1)t(1;3;12)(p12;?;p13),der(3)t(1;3)(p12;q?13)t(3;17)(p?12;q?24),der(6)inv(6)(q14q23.2)t(3;6)(?;q23.2),der(11)del(11)(q?13q?)t(11;18)(q?13;p11.1),der(12)t(3;12)(?;p13),der(17)t(6;17)(q23.2;q?24),der(18)t(11;18)(q?;p11.1)[17]/ 46,XY[3]
			ND	ND	43~46,XY,der(1)t(1;3;12)(p12;?;p13),der(3)t(1;3)(p12;q?13)t(3;17)(p?12;q?24),der(6)inv(6)(q14q23.2)t(3;6)(?;q23.2),der(11)del(11)(q?13q?)t(11;18)(q?13;p11.1),der(12)t(3;12)(?;p13),der(17)t(6;17)(q23.2;q?24),der(18)t(11;18)(q?;p11.1)[17]/ 46,XY[3]
27	74	muž	NE	ND	46,XY,der(2)t(2;11)(q37;q12),del(7)(q22.2),der(8)t(7;8)(q22.2;q12),del(11)(q12),der(11)t(8;11)(q12;q12),der(17)t(11;17)(q12;q25)inv(11)(q12q21)[35]/46,XY[5]
			ND	ANO	53~56,XY,+1,+2,der(2)t(2;5)(q31;q12)t(5;9)(q13.1;?)t(5;9)(q35.3;?),der(5)t(5;9)(q11.2;?),+der(5)t(5;9)(q11.2;?),+8,+8,+9,+der(?)x2~3,+15,+22[18]/53,XY,+1,+2,der(2)t(2;5)(q31;q12)t(5;9)(q13.1;?)t(5;9)(q35.3;?),der(5)t(5;9)(q11.2;?),+8,+8,+15,+22[4]/54,ide

				89,2	m,+der(5)t(5;9)(q11.2;?) [9]/55,idem,+Y,+der(5)t(5;9)(q11.2;?) [2]/56,idem,+9,+der(9)(?)x3 [3]/45,XY,t(4;12)(q35;?) del(8)(q?),-16 [4]
			ND	ANO 23,7	0 mitos
28	žena	65	ANO 75,0	ND	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;?)-17 [43]/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) [5]46,XX [3]
			ND	ND	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;?)-17 [7]/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 [10]
			ANO 91,5	ND	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;?)-17 [17]/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) [5]
29	muž	80	ANO 81,5	ND	46,XY,del(5)(q13.2q34),del(7)(q21.1q31.3),der(17)t(1;17)(?;p12) [34]/46,XY,del(5)(q13.2q34) [1]/46,XY [4]
			NE	ND	45,X,-Y [4]/46,XY [16]
			NE	ND	47,XY,del(5)(q13.2q34),del(7)(q21.1q31.3),der(17)t(1;17)(?;p12),+22 [7]/46,XY,del(5)(q13.2q34) [2]/46,XY [10]
30	muž	75	ANO 34,5	ND	46,XY,idic(17)(p11.1) [5]/45,idem,t(3;22)(p24.2;q11),-7 [6]/45,idem,-3,t(3;22)(p24.2;q11),+der(3)t(3;22) [3]/46,XY [28]
31	muž	74	ANO 73,0	ANO 60,9	44,X,Y,der(5)del(5)(q11.2q15)t(5;13)(p15.3;q?)t(8;13)(p21.1;q?)t(5;17)(q21.1;?),der(7)ins(7;5)(p14;q11.2q11.2)t(5;7)(q35.3;p22),der(7)t(7;12)(q33;q14.3),der(8)t(8;13)(p11.2;q31),r(9)(p24.3p22.2),+r(9)(p24.3p21.1::q33.2q34.3),der(12)t(2;12)(p15;q14.3),-13,der(17)r(17;21)(p?q;q23.3q23.3,-18,der(22)t(9;22)(?;p11.1) [36]/46,XY [1]
32	muž	75	ANO 29,0	ANO 39,0	46,XY,der(4)t(4;9)(p?13;?),del(5)(q13.3q33.3),r(7)(p22q31.3),+8,-9,der(17)t(17;18)(p?13;?)t(17;18)(q;?),der(18)t(17;18)(?;q?12),del(20)(q12q13.12) [18]/45,XY,der(4)t(4;9)(p?13;?),del(5)(q13.3q33.3),-7,+8,9,der(17)t(17;18)(p?13;?)t(17;18)(q;?),der(18)t(17;18)(?;q?12),del(20)(q12q13.12) [3]/46,XY [13]
33	muž	75	NE	ND	45,X,-Y [17]/46,XY,t(10;17)(p10;q10) [10]/44,X,-Y,der(5)t(5;19)(q12;?),der(7)del(7)(p?)del(7)(q?),-18 [4]/46,XY [11]

34	žena	54	ANO 37,5	NE	46,X,idic(X)(q13.?)1,idic(17)(p11.2)[22]/46,XX,del(5)(q1?4q3?4)[1]/46,XX[20]
			ANO 48,5	ND	46,X,idic(X)(q13.?)1,idic(17)(p11.2)[3]/46,XX[16]
35	žena	46	ANO 62,5	ND	45,XX,dic(5;17)(q11.1;p11.2)[5]/44,idem,-7,dic(5;15)(q11.1;p11.1)[16]/45,idem,r(18)(p11.1q21.2)[12]/44,idem,-18[2]/46,XX[15]
			ANO 77,0	ND	0 mitos
36	muž	70	ANO 68,5	ND	46~47,XY,del(3)(p?21.3),der(5)inv(5)(p13.1q13.2)t(5;12)(q13.2;?)-7,+12,der(12)r(5;12)(p15p12;?)x2,der(17)t(7;17)(p?;p?13),+21[26]/45,XY,der(5)inv(5)(p13.1q13.2)t(5;12)(q13.2;?)-7,der(8)dup(8)(q?q?),der(12)r(5;12)(p15p12;?)-16,der(17)t(7;17)(p?;p?13),+21[10]/47,XY,del(3)(p?21.3),der(5)inv(5)(p13.1q13.2)t(5;12)(q13.2;?)-7,+8,der(11)dup(11)(q?q?),der(12)r(5;12)(p15p12;?),der(17)t(7;17)(p?;p?13)[6]/46,XY[3]
37	žena	85	ANO 73,5	ND	42~45,XX,der(3)t(3;19)(q22;?),der(3)t(3;5)(q13.3;q35.3)t(5;7)(q32;?)t(7;3)(?;q26.3)t(3;5)(q21;p14),-5,der(7)del(7)(p12)del(7)(q11.2),der(12)t(3;12)(q22;p13),-17,der(19)t(17;19)(?;?),der(21)dup(21)(q?)+ider(21)dup(21)(q?)[28]/46,XX[1]