

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Studijní program: Doktorské studijní programy v biomedicině

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie



Mgr. Martina Hrubá

Analýza strukturních chromosomových přestaveb u hematologických neoplázií

Studium strukturních chromosomových aberací

buněk chronické lymfatické leukemie po DSP30/IL2 stimulované kultivaci

Analysis of structural chromosomal rearrangements in hematological neoplasias

Study of structural chromosomal rearrangements

of cells of chronic lymphocytic leukemia after DSP30/IL2 stimulated cultivation

Disertační práce

Vedoucí závěrečné práce/Školitel:

Prof. Ing. Kyra Michalová, DrSc.

Praha, 2013

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, dne 5. 12. 2013

Martina Hrubá

Identifikační záznam:

HRUBÁ, Martina. *Analýza strukturních chromosomových přestaveb u hematologických neoplázií; Studium strukturních chromosomových aberací buněk chronické lymfatické leukemie po DSP30/IL2 stimulované kultivaci. [Analysis of structural chromosomal rearrangements in hematological neoplasias; Study of structural chromosomal rearrangements of cells of chronic lymphocytic leukemia after DSP30/IL2 stimulated cultivation]*. Praha, 2013. 105 stran, 1 příloha. Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky 1. LF UK a VFN, Ústav lékařské genetiky LF UK a FN Plzeň. Vedoucí závěrečné práce Michalová, Kyra.

Poděkování:

Na prvním místě bych ráda poděkovala za vstřícné a inspirující odborné vedení své školitelce prof. Ing. Kyře Michalové, DrSc.

Přednostovi Ústavu lékařské genetiky LF UK a FN Plzeň MUDr. Ivanovi Šubrtovi děkuji za umožnění provedení experimentální části práce v Genetické laboratoři ÚLG.

Svým kolegům z onkocytogenetické části Genetické laboratoře ÚLG, zejména p. Ladislavě Harmáčkové a Ing. Anně Rykovské, děkuji za přátelskou a podnětnou spolupráci při náročných analýzách leukemických chromosomů.

Rodině a dalším blízkým děkuji za pochopení a trvalou podporu, které si velmi vážím.

Abstrakt:

Cytogenetické vyšetření buněk chronické lymfatické leukemie (CLL) je obtížné pro jejich nízkou proliferační aktivitu. Pro získání dostatku mitóz k provedení chromosomové analýzy je proto nutná vhodná *in vitro* stimulace jejich buněčného dělení. S využitím DSP30/IL2 stimulované kultivace bylo v období 5 let vyšetřeno 391 vzorků CLL. Byla zjištěna vysoká úspěšnost této kultivace (96%; 375/391) s vysokým zachytem patologických klonů vyšetřením karyotypu a analýzou mitóz fluorescenční *in situ* hybridizací (FISH) (u 84% vzorků; 329/391). U téměř poloviny vzorků (44%; 171/391) byly nalezeny i jiné změny než aberace rekurentně vyšetřované FISH (delece 13q14, trisomie 12, delece genů ATM a TP53). Byla také zjištěna vysoká četnost translokací (37%; 144/391), komplexních změn karyotypu (28%; 111/391) a klonálního vývoje, který byl zachycen ve třetině vzorků (34% vzorků s přítomností více než dvou klonů; 133/391) a nově v průběhu onemocnění dokonce ještě častěji (u 39% vzorků opakovaně vyšetřených po stimulované kultivaci; 21/54). Výskyt chromosomových translokací, komplexních změn karyotypu i klonálního vývoje byl statisticky významně asociován s progredujícími onemocněními (P 0,000003, resp. P 0,0002 a P 0,05/P 0,04). U rekurentních delecí podrobná analýza metafázních chromosomů ukázala jako běžný mechanismus ztráty dané oblasti také nebalancované translokace, u delecí 13q14 byla navíc prokázána, a poprvé v odborné literatuře popsána, přítomnost více klonů s nezávisle vzniklými delecemi 13q14. Významný klonální vývoj, včetně multiklonality 13q14, svědčí o značné heterogenitě buněk nádorové populace CLL. Prezentované výsledky souhrnně ukazují přínos cytogenetické analýzy CLL buněk po stimulované kultivaci.

Klíčová slova: cytogenetická analýza, komplexní změny karyotypu, klonální vývoj, multiklonalita, chronická lymfatická leukemie, stimulovaná kultivace

Abstract:

Cytogenetic analysis of cells of chronic lymphocytic leukemia (CLL) is difficult because of their low proliferative activity. To obtain sufficient number of mitoses for performing chromosomal analysis a suitable stimulation of cell division is needed. Using DSP30/IL2 stimulated cultivation 391 CLL samples were investigated in 5 years' period. The cultivation was showed to have high success rate (96%; 375/391) with also high rate of detection of pathological clones by both karyotype and metaphase FISH analyses (in 84% of samples; 329/391). Almost in half of samples (44%; 171/391) other aberrations than recurrent FISH (i.e. 13q14 deletion, trisomy 12, TP53, ATM genes deletions) were found. Also high frequency of translocations (37%; 144/391), complex karyotypes (28%; 111/391) and clonal evolution, which was detected in one third of all samples (34% of samples with presence of more than two clones; 133/391) and like a new event in disease duration even more frequently (in 39% of samples repeatedly investigated after stimulated cultivation; 21/54), was revealed. The presence of translocations, complex karyotypes and clonal evolution was associated with progressive form of disease (P 0,000003, resp. P 0,0002 and P 0,05/P 0,04). In cases of the recurrent deletions the detailed analysis of metaphase chromosomes showed unbalanced translocation to be an alternative mechanism of the losses. Moreover, for 13q14 deletion a coexistence of more clones with independent deletions was proved and for the first time described in the literature. Significant clonal evolution, including multiclonality of 13q14, manifests considerable heterogeneity of tumor cell population in CLL. The presented results give evidence of importance of cytogenetic analysis of CLL cells after stimulated cultivation.

Keywords: cytogenetic analysis, complex karyotype, clonal evolution, multiclonality, chronic lymphocytic leukemia, stimulated cultivation

Obsah

<i>Seznam tabulek</i>	8
<i>Seznam vyobrazení</i>	9
<i>Seznam grafů</i>	9
<i>Zkratky</i>	10
1 Úvod	13
1.1 Chronická lymfatická leukemie (CLL)	14
1.2 Prognostické faktory	14
1.3 Rekurentní chromosomové aberace u CLL a jejich prognostický význam	15
1.4 Princip imunostimulace CLL buněk CD40L a CpG oligonukleotidem s interleukinem 2	16
1.5 Komplexní změny karyotypu a výskyt translokací u CLL	17
1.6 Klonální vývoj u CLL	18
1.7 ArrayCGH u CLL	18
1.8 Delece 13q14.....	20
1.9 Delece 11q (ATM genu)	24
1.10 Trisomie chromosomu 12	25
1.11 Delece 17p (TP53 genu).....	25
1.12 Delece 6q.....	26
1.13 Aberace 14q	27
2 Cíl práce.....	29
3 Metodika.....	30
4 Výsledky.....	34
4.1 Cytogenetická analýza CLL buněk po DSP30/IL2 stimulované kultivaci	34
4.1.1 Pilotní porovnání s nestimulovanou kultivací	34
4.1.2 Celková úspěšnost DSP30/IL2 stimulované kultivace.....	35
4.1.3 Porovnání s detekcí rekurentních aberací metodou FISH	36
4.1.4 Klonální vývoj	38
4.1.5 Komplexní změny	44
4.1.6 Chromosomové translokace	45

4.1.7	Souvislost s progresivitou onemocnění (komplexní změny, klonální vývoj, chromosomové translokace).....	48
4.2	Studium rekurentních strukturních aberací	50
4.2.1	Delece 13q14	50
4.2.2	Delece 11q (ATM genu).....	67
4.2.3	Trisomie 12.....	68
4.2.4	Delece 17p (TP53 genu).....	68
4.2.5	Delece 6q	69
4.2.6	Aberace 14q.....	70
5	Diskuse	71
6	Závěry.....	87
7	Literatura	90
	Příloha 1 – Seznam vlastních publikací a prezentací.....	100
	1. Publikace, které jsou podkladem disertace	100
	2. Publikace bez vztahu k tématu disertace.....	101

Seznam tabulek

Tabulka 1.1	<i>Frekvence a prognóza cytogenetických aberací</i>	16
Tabulka 4.1	<i>Srovnání výsledků DSP30/IL2 stimulované a nestimulované kultivace</i>	34
Tabulka 4.2	<i>Přehled nálezů rekurentních aberací dle metod detekce</i>	37
Tabulka 4.3	<i>Klonální vývoj v průběhu onemocnění</i>	40
Tabulka 4.4	<i>Translokace imunoglobulinových genů</i>	47
Tabulka 4.5	<i>Souvislost nalezených změn s progresivitou onemocnění.....</i>	48
Tabulka 4.6	<i>Translokace 13q14 s delecí v místě zlomu – přehled nálezů</i>	54
Tabulka 4.7	<i>Přehled výsledků podrobných FISH vyšetření u koexistence klonů s delecí 13q14 v místě translokačního zlomu a s intersticiální delecí</i>	57
Tabulka 4.8	<i>Multiklonální intersticiální delece 13q14- shrnutí cytogenetických dat.....</i>	65

Seznam vyobrazení

Obrázek 1.1 Schéma MDR u delece 13q14.....	21
Obrázek 1.2 Kooperace působení tumor supresorových genů v MDR 13q14.....	22
Obrázek 3.1 FISH sondy pro vyšetření základních prognostických aberací.....	32
Obrázek 3.2 FISH sondy pro podrobné vyšetření delece 13q14	32
Obrázek 4.1 Variabilita rozsahu delece 13q14	50
Obrázek 4.2 Koexistence různých forem delece 13q14 – vyšetření karyotypu a kombinované FISH vyšetření se sondami pro DLEU1 a RP11-305D15 (část A, B)	58
Obrázek 4.3 FISH s kombinací sond pro detekci delece 13q14 a intersticiální delece 14q – průkaz nezávislé koexistence klonů s různými formami delece 13q14	60
Obrázek 4.4 Schéma klonálního vývoje u pacienta s nezávislou koexistencí klonů s delecí 13q14 v místě translokačního zlomu a s intersticiální delecí 13q14.....	61
Obrázek 4.5 Schémata klonálního vývoje u dalších pacientů s koexistencí klonů s delecí 13q14 v místě translokačního zlomu a s intersticiální delecí 13q14 (část A, B, C)	62
Obrázek 4.6 Multiklonální intersticiální delece 13q14 – vyšetření karyotypu a kombinované FISH vyšetření se sondami pro DLEU1 a RP11-305D15 a DLEU1 a RP11-327P2.....	66
Obrázek 4.7 Schéma klonálního vývoje u pacienta s multiklonální intersticiální delecí 13q14	67
Obrázek 5.1 MMBIR (mikrohomologií zprostředkovaná, zlomem indukovaná replikace)	81

Seznam grafů

Graf 3.1 Soubor vyšetřených vzorků – rozdělení dle klinického stavu onemocnění	30
Graf 4.1 Celková úspěšnost DSP30/IL2 stimulované kultivace.....	35
Graf 4.2 Klonální vývoj „in-situ“	38
Graf 4.3 Příklad klonálního vývoje v průběhu onemocnění	44
Graf 4.4 Přítomnost translokací	45
Graf 4.5 Četnost translokačních zlomů.....	46
Graf 4.6 Delece 13q14 dle metody detekce.....	51
Graf 4.7 Delece 13q14 dle formy (mechanismu vzniku).....	53

Zkratky

ABL1	c-abl oncogene 1, non-receptor tyrosine kinase (název genu)
alloHSCT	transplantace hematopoetických buněk od nepříbuzného dárce
arrayCGH (resp. aCGH)	komparativní genomová hybridizace provedená na mikročipech
ATM	ataxia telangiectasia mutated (název genu)
BAC	bacterial artificial chromosome
b (kb, Mb)	base pair (pár bází/nukleotidů DNA/RNA, jednotka velikosti nukleových kyselin)
BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2 (název genu)
bcl-2	produkt genu BCL2 (protein)
BCL3	B-cell CLL/lymphoma 3 (název genu)
BCR	breakpoint cluster region 1/ název genu v oblasti 22q11 2/ obecné označení oblasti se zvýšenou frekvencí zlomů DNA
BIRC3	baculoviral IAP repeat containing 3 (název genu)
CCND1	cyclin D1 (název genu)
CD	cluster of differentiation
CDK4	cyclin-dependent kinase 4 (název genu)
CDK6	cyclin-dependent kinase 6 (název genu)
CGH	komparativní genomová hybridizace (comparative genomic hybridization)
CLL	chronická lymfatická leukemie
DLEU1	deleted in lymphocytic leukemia 1 (non-protein coding) (název genu)
DLEU2	deleted in lymphocytic leukemia 2 (non-protein coding) (název genu)
DLEU7	deleted in lymphocytic leukemia, 7 (název genu)
DNA	deoxyribonukleotidová kyselina
EBV	Epstein–Barr virus
E.C.	Escherichia coli
ER	endoplazmatické retikulum
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FCR	kombinovaná chemoterapie fludarabin/cyklofosfamid/rituximab
FISH	fluorescenční in-situ hybridizace

FOXO3	forkhead box O3 (název genu)
GUCY1B2	guanylate cyclase 1, soluble, beta 2 (pseudogene) (název genu)
CHK2	checkpoint kinase 2 (název genu)
Ig	imunoglobulin
IGH@	imunoglobulin heavy locus (název genové skupiny)
IGK@	imunoglobulin kappa locus (název genové skupiny)
IGL@	imunoglobulin lambda locus (název genové skupiny)
IGVH	imunoglobulin heavy chain variable region genes
IL2	interleukin 2
ISCN	international system for human cytogenetic nomenclature
KCNRG	potassium channel regulator (název genu)
L1	nejrozšířenější typ repetitivní LINE
LAMP1	lysosomal-associated membrane protein 1 (název genu)
LINE	long interspersed nuclear elements
LPS	lipopolysacharid
Mdm2	mouse double minute 2 homolog (E3 ubiquitin-protein ligase Mdm2; název proteinu kódovaného genem MDM2)
MDR	minimální deletovaná oblast (minimal deleted region)
miRNA	microRNA
MMBIR	microhomology mediated break induced replication
MYC	v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog (název genu)
NF-κB	nuclear factor of kappa light chain enhancer of activated B cells (transkripční faktor regulující imunitní odpověď B buněk; proteinový komplex kódovaný geny NFKB1, NFKB2, RELA, RELB, REL)
NOTCH1	notch1 (název genu)
PHF11	PHD (plant homeo domain) finger protein 11 (název genu)
PKW	lektin „pokeweed“ izolovaný z <i>Phytolacca americana</i>
PML	promyelocytic leukemia (název genu)
RARA	retinoic acid receptor, alpha (název genu)
RB1	retinoblastoma 1 (název genu)
RCBTB1	regulator of chromosome condensation (RCC1) and BTB (POZ) domain containing protein 1 (název genu)
RNA	ribonukleová kyselina

RNASEH2B	ribonuclease H2, subunit B (název genu)
RUNX1	runt-related transcription factor 1 (název genu)
RUNX1T1	runt-related transcription factor 1; translocated to, 1 (cyclin D-related) (název genu)
SETDB2	SET domain, bifurcated 2 (název genu)
SF3B1	splicing factor 3b, subunit 1 (název genu)
SINE	short interspersed nuclear elements
SNP	jednonukleotidový polymorfismus (single nucleotide polymorphism)
SPRYD7	SPRY (sprouty) domain containing 7 (název genu)
TNF	tumor necrosis factor (cytokin)
TNFRSF13B (TACI)	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 13B (název genu)
TNFRSF17 (BCMA)	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 17 (název genu)
TP53	tumor protein p53 (název genu)
TPA	12- <i>O</i> -tetradecanoylphorbol-13-acetate
TRAF3	TNF receptor-associated factor 3 (název genu)
TRIM13	tripartite motif containing 13 (název genu)
ZAP70	zeta-chain-associated protein kinase 70

1 Úvod

Přítomnost strukturních chromosomových přestaveb má u některých hematologických neoplázií zásadní diagnostický význam. Nejznámější je tzv. Ph chromosom (resp. translokace $t(9;22)(q34;q11)$), jehož přítomnost potvrzuje diagnózu chronické myeloidní leukemie, ale patří sem i charakteristické chromosomové přestavby u jednotlivých podtypů akutní myeloidní leukemie nebo B-nehodgkinských lymfomů. Jedná se převážně o balancované přestavby se vznikajícím transkripčně aktivním fúzním genem (BCR/ABL1, RUNX1/RUNX1T1, PML/RARA apod.) nebo o přestavby vedoucí ke zvýšené expresi onkogenu (např. obecně translokace IGH@, IGK@, IGL@ genů). Tyto diagnostické jednotky jsou pak vždy spojeny s určitou prognózou, v některých případech pak i specifickou léčbou.

I přestavby bez přímého diagnostického významu však mají u hematologických malignit důležitou roli, a to jako prognostické faktory. V těchto případech se často jedná o nebalancované změny, které jsou nacházeny jak při záchytu onemocnění, tak i jako přídatné změny při progresi nebo relapsu onemocnění. Až na výjimky to nejsou markery příznivé prognózy, ale především přestavby spojené s nepříznivou prognózou (např. přestavby chrom. 3, 5, 7, 20 u myeloidních dysplázií nebo delece chromosomů 11 a 17 u B-nehodgkinských lymfomů). Rovněž detekce komplexních strukturních změn karyotypu (nejčastěji charakterizovaných jako přítomnost 3 nebo více aberací) a/nebo klonálního vývoje, vyjadřujících zvýšenou chromosomovou nestabilitu, předznamenává nepříznivý klinický vývoj onemocnění.

Strukturní chromosomové aberace jsou z těchto důvodů předmětem intenzivního cytogenetického a molekulárně - cytogenetického výzkumu, jehož cílem je popsat nové rekurentní aberace, mechanismy jejich vzniku, určení přesného místa chromosomových zlomů a rozsahu ztrát či zisků genetického materiálu v případě nebalancovaných aberací. Snahou je vytipovat geny, nacházející se ve sledované oblasti, které mohou být spojeny s patogenezí onemocnění a být podrobeny dalšímu výzkumu. Současná korelace s klinickými daty může stanovit diagnostický či prognostický význam sledované aberace.

Pro celkový přehled základních cytogenetických aberací v nádorových buňkách kostní dřeně viz (Michalova 1999).

1.1 Chronická lymfatická leukemie (CLL)

Chronická lymfatická leukemie je maligní lymfoproliferativní onemocnění ze skupiny B-nehodgkinských lymfomů. Je charakterizované kumulací zralých, dlouho žijících B lymfocytů s nízkým proliferačním potenciálem v kostní dřeni a periferní krvi. Přesná příčina vzniku CLL není známa, na její patogenezi se však zřejmě podílejí kromě genetických či epigenetických faktorů i antigenní stimulace a nádorové mikroprostředí.

CLL je nejčastěji diagnostikovanou leukemií dospělých v zemích Evropy a Severní Ameriky; udává se, že zde tvoří asi 25-30% všech leukemií s incidencí 3/100000 obyvatel (Adam et al. 2001), dle údajů z registru nádorů v ČR z let 1977-1996 dokonce 38,7% všech leukemií, s incidencí 4,4 na 100000 obyvatel u mužů a 2,8 na 100000 obyvatel u žen (Geryk, Kolcová 2002).

Diagnóza CLL je stanovena při přetrvávajícím zvýšeném počtu lymfocytů v periferní krvi ($> 5 \cdot 10^9/l$), jejichž morfologie odpovídá zralým uniformním lymfocytům a které nesou typický imunofenotyp. CLL buňky exprimují specificky znaky CD5, CD23 a mírně povrchový imunoglobulin (sIg) (Matutes et al. 1994) zároveň s expresí společných B buněčných znaků, jako je např. přítomnost CD19 a slabá exprese CD20.

1.2 Prognostické faktory

Přes přehlednou diagnostiku zůstává CLL heterogenní skupinou onemocnění s velmi rozdílným klinickým průběhem u jednotlivých pacientů. Je známo, že prognózu a průběh onemocnění ovlivňuje množství faktorů (věk, pohlaví, klinické stádium dle Raiovy či Binetovy klasifikace (Rai et al. 1975, Binet et al. 1981), atypický cytologický nález apod.), dále však jsou hledány podstatné biologické odlišnosti CLL buněk, které by pomohly lépe charakterizovat podskupiny onemocnění ve vazbě na odlišný průběh nemoci, včetně odpovědi na léčbu.

Jednoznačně prokázaným nezávislým prognostickým faktorem u CLL je mutační status variabilní části genu pro těžký řetězec imunoglobulinu (IGVH); nemutovaná sekvence (vykazující $> 98\%$ homologii k původní sekvenci), odpovídající naivní buňce bez kontaktu s antigenem a tedy bez proběhlé somatické hypermutace, je považována za faktor nepříznivé prognózy (Oscier et al. 2002). Dalším faktorem zhoršené prognózy je zvýšená exprese proteinu ZAP70, fyziologicky přítomného v T lymfocytech a NK buňkách (Rassenti et al. 2004, Orchard et al. 2004). Rovněž je za znak zhoršené

prognózy považována zvýšená exprese transmembránového glykoproteinu CD38 (Ibrahim et al. 2001).

Významný vliv na prognózu onemocnění mají cytogenetické aberace a mutace genů TP53 a ATM, jejichž význam bude podrobněji popsán dále.

Je nutné zmínit i nově referované výsledky celogenomového sekvenování, prokazující např. nepříznivý vliv aktivační mutace genu NOTCH1 nacházené u ~12% pacientů a spojené s rychlejší Richterovou transformací a zkrácenou dobou přežití (Rossi et al. 2012b, Puente et al. 2011). 90% NOTCH1 mutací bylo prokázáno ve skupině bez mutace/delece TP53 (Rossi et al. 2012b), může se tedy jednat o alternativní mechanismus přispívající k chemorezistenci onemocnění a špatné prognóze. Gen NOTCH1 kóduje transmembránový receptor, hrající zásadní úlohu v „notch“ buněčné signální dráze. Dalšími nepříznivými faktory jsou mutace genů SF3B1 a BIRC3, nacházené při diagnóze pouze u 4-5% pacientů, avšak ve zvýšené míře (17%, resp. 24%) ve skupině pacientů s chemorezistentním onemocněním, opět téměř výlučně s intaktním genem TP53 (Rossi et al. 2011, Rossi et al. 2012a). Významný nepříznivý vliv na prognózu je přisuzován zejména mutacím genu BIRC3 (Rossi et al. 2013). SF3B1 kóduje podjednotku sestříhového faktoru 3b, produkt genu BIRC3 je negativním regulátorem dráhy NF- κ B.

1.3 Rekurentní chromosomové aberace u CLL a jejich prognostický význam

Cytogenetické vyšetření CLL buněk je komplikováno jejich nízkou proliferační aktivitou; pro získání mitóz ke klasickému chromosomovému vyšetření je nutná stimulace buněčného dělení. První cytogenetická vyšetření CLL buněk byla proto provedena po stimulaci různými B-buněčnými mitogeny, především karcinogenem TPA, případně EBV či lipopolysacharidem E.C. nebo mitogenem PKW. Přes poměrně nízké procento zachycených abnormálních karyotypů (pouze u 40-50% pacientů) byly nalezeny nejčastěji se vyskytující aberace – trisomie chromosomu 12, delece dlouhých ramen chromosomů 6, 11, 13 a přestavby dlouhých ramen chromosomu 14 (Gahrton et al. 1987, Juliusson, Gahrton 1990). Zároveň bylo provedeno první hodnocení jejich prognostického vlivu a jednoznačně byla prokázána nepříznivá prognóza komplexních změn karyotypu (Juliusson, Gahrton 1990, Juliusson et al. 1990).

Zpřesnění prevalence těchto nejčastějších aberací (resp. delece 13q14, delece 11q22-23, delece 17p13, trisomie 12, delece 6q21) a jejich vlivu na prognózu

onemocnění bylo dosaženo molekulárně-cytogenetickým vyšetřením interfázických jader fluorescenční *in-situ* hybridizací (FISH) (Dohner et al. 1999, Dohner et al. 2000, Dewald et al. 2003), viz tabulka 1.1. Alespoň jedna z uvedených aberací byla prokázána u přibližně 80% pacientů (Dohner et al. 1999, Dohner et al. 2000, Dewald et al. 2003).

Tabulka 1.1 *Frekvence a prognóza cytogenetických aberací*
zpracováno dle (Dohner et al. 1999, Dohner et al. 2000, Dewald et al. 2003)

Aberace	Výskyt (% pacientů)	Prognóza
Delece 13q14	55 - 64%	Příznivá (samostatná delece 13q14)
Trisomie 12 (resp. 12q13)	16-25%	Střední
Delece 11q22-23	15-18%	Nepříznivá
Delece 17p13 (TP53)	7-8%	Velmi nepříznivá
Delece 6q21-23	≤7%	---

Vyšetření těchto rekurentních aberací interfázickou FISH se stalo běžnou součástí vyšetření pacientů s diagnózou CLL, jak pro stratifikaci rizik při záchytu onemocnění, tak i při monitoraci úspěšnosti léčby.

1.4 Princip imunostimulace CLL buněk CD40L a CpG oligonukleotidem s interleukinem 2

Pro nezpochybnitelný význam klasické metafázní cytogenetické analýzy umožňující vyšetření celého karyotypu, a tedy přinášející podstatně více informací než FISH screening vytipovaných aberací, byly hledány dále nové možnosti stimulace CLL buněk. Přítomnost patologického klonu až u 80% pacientů ukázala v roce 2002 stimulace buněčného cyklu CLL buněk indukcí CD40 ligandem (Buhmann et al. 2002). Princip stimulace je založen na interakci CD40/CD40L, běžně probíhající mezi B a Th2 lymfocyty, a spočívá ve společné kultivaci separovaných CLL buněk, nesoucích stejně jako zdravé B lymfocyty transmembránový receptor CD40, s CD40L transfekovanými fibroblasty.

Podobně vysokého záchytu patologických klonů bylo dosaženo stimulací CLL buněk CpG oligonukleotidem DSP30 společně s interleukinem 2 (Dicker et al. 2006, Haferlach et al. 2007). Syntetické fosforothiátové CpG oligonukleotidy obsahují CpG

nemethylovaný motiv, typický pro prokaryotickou DNA, a mají silný stimulační efekt na zdravé B lymfocyty i CLL buňky (Liang et al. 1996, Decker et al. 2000b, Decker, Peschel 2001). Aktivace buněk je zprostředkována rozpoznáním nemethylovaných CpG motivů TLR9 receptorem z rodiny „toll-like“ receptorů. Tyto receptory jsou exprimovány na B lymfocytech i CLL buňkách (Bourke et al. 2003, Grandjennette et al. 2007) a mají zásadní význam pro kontrolu B buněčné imunitní odpovědi (Pasare, Medzhitov 2005). DSP30, jeden z těchto prorůstově působících CpG oligonukleotidů, zároveň významně silněji indukuje syntézu alfa řetězce receptoru pro IL2 v CLL buňkách než ve zdravých B lymfocytech (Decker et al. 2000a); je proto vhodný v kombinaci s interleukinem 2 k selektivní stimulaci CLL buněk bez nutnosti jejich předchozí separace ze vzorku plné kostní dřeně či periferní krve.

1.5 Komplexní změny karyotypu a výskyt translokací u CLL

Podrobné analýzy karyotypů po nových stimulovaných kultivacích potvrdily u pacientů s CLL častý výskyt komplexních změn karyotypu (≥ 3 aberace) s jejich nálezem u 24%, resp. 16% pacientů (Dicker et al. 2006, Haferlach et al. 2007). Přítomnost komplexních změn byla asociována s nemutovaným stavem IGVH a zvýšenou expresí CD38 a bylo také prokázáno vyšší zastoupení delecí TP53 ve skupině pacientů s komplexními změnami (28%) oproti ostatním pacientům (1,3%) (Haferlach et al. 2007). Přítomnost komplexních změn karyotypu byla již dříve spojena s rezistencí CLL buněk na chemoterapii (Koski et al. 2000).

Vysoký je u CLL také výskyt translokací, převážně nebalancovaných, které byly popsány u 33% pacientů, s rozdílným zastoupením u neléčených pacientů (20%) a u pacientů po léčbě (54%) (Mayr et al. 2006). Nalezené translokace v naprosté většině nejsou rekurentní, opakují se však místa zlomů v již dříve popisovaných oblastech spojených s delecemi (13q14, 11q21-11q25, 17p) (Mayr et al. 2006). Přítomnost translokací byla spojena s významně kratší dobou do zahájení léčby i se zhoršeným celkovým přežitím, a to i v případě jedné translokace ve skupině dosud neléčených pacientů (Mayr et al. 2006).

Obdobná incidence translokací byla potvrzena i po stimulaci TPA (42% pacientů s translokací, resp. 29% ve skupině bez léčby, 53% po léčbě), s průkazem kratší doby do zahájení léčby i celkového přežití pro skupinu pacientů s nebalancovanými translokacemi a s komplexními změnami karyotypu (Van Den Neste et al. 2007).

1.6 Klonální vývoj u CLL

Původně bylo postulováno, že karyotyp CLL buněk je v průběhu nemoci spíše stabilní, bez významného klonálního vývoje (Nowell et al. 1988). Následující studie provedené klasickou analýzou karyotypu však vznik nových subklonů v průběhu onemocnění prokázaly u značného počtu pacientů, resp. u 15-43% případů CLL (Juliussen et al. 1988, Finn et al. 1998, Van Den Neste et al. 2007). Uvedené poměrně široké rozpětí je zřejmě způsobeno užitím různých stimulačních technik v jednotlivých citovaných pracech (s různou úspěšností zisku mitóz patologických klonů), omezenými soubory vyšetřených pacientů (n=41-53), případně různým zastoupením již léčených progredujících pacientů, u nichž lze předpokládat častější vznik subklonů s novými aberacemi. Nejčastěji uváděné přídatné aberace jsou přestavby s rekurentními místy zlomů (13q, 11q, 14q, 17p a 6q) (Van Den Neste et al. 2007, Finn et al. 1998).

Klonální vývoj v průběhu onemocnění byl také studován vyšetřením rekurentních aberací metodou FISH (delece 13q14, delece 11q22-23, trisomie 12, delece 17p13/TP53). Na souboru 159 neléčených pacientů vyšetřených opakovaně s minimálně 2letým odstupem od předchozího vyšetření byly nové aberace nalezeny u 11% pacientů (Shanafelt et al. 2006). Tento nálezn byl potvrzen dalšími studii s rozpětím nacházeného klonálního vývoje u 17-26% pacientů (Stilgenbauer et al. 2007, Berkova et al. 2009, Loscertales et al. 2010).

Mezi klonálním vývojem a nemutovaným stavem IGVH byla prokázána pozitivní korelace a rovněž byl klonální vývoj identifikován jako nezávislý prognostický faktor zkrácené doby přežití (Stilgenbauer et al. 2007). Klonální vývoj je také častěji prokazován ve skupině pacientů se zvýšenou expresí ZAP70 (Shanafelt et al. 2006).

1.7 ArrayCGH u CLL

Nové možnosti poznání chromosomových změn nádorových buněk přineslo zavedení metody komparativní genomové hybridizace na mikročipech (arrayCGH/aCGH). V jednom experimentu lze aCGH detekovat nebalancované změny celého genomu, a to ve velmi vysokém rozlišení (dle typu čipu jsou nejmenší nalezené změny v řádu desítek kb až jednotek Mb). Na speciálních typech čipů rozpoznávajících SNP polymorfismy (včetně platform kombinujících klasickou aCGH s SNP polymorfismy citlivými k určitému restričnímu enzymu), je možné zároveň se změnami počtu kopií určit i oblasti se ztrátou heterozygosity (uniparentální isodisomie) a tak objasnit např. mechanismus inaktivace druhých alel tumorsupresorových genů.

Přínos aCGH je daný její vysokou rozlišovací schopností a spočívá zejména v nalezení nových rekurentních aberací menšího rozsahu a v podrobné charakterizaci známých rekurentních změn, např. v přesném určení minimální deletované oblasti a stanovení postižených genů. aCGH také umožňuje podrobnější analýzu komplexních změn a tím i zevrubné studium vlivu genomové komplexity na průběh onemocnění.

Omezením metody je potřeba dostatečně vysoké infiltrace vzorku kostní dřeně či periferní krve leukemickými buňkami ($\geq 20\%$) či nutnost provedení analýzy ze separovaných nádorových buněk. S tím také souvisí obtížnější zachycení aberací v malých subklonech v porovnání s klasickou cytogenetikou či analýzou mitóz FISH.

Metodou arrayCGH byly v CLL buňkách objeveny tyto nové rekurentní delece či zisky genetického materiálu:

- zisk 2p spojený se zhoršenou prognózu onemocnění, asociovaný s nemutovaným stavem IGVH a dalšími aberacemi (Jarosova et al. 2010, Chapiro et al. 2010),
- zisk 20q13.12 (Rodriguez et al. 2012),
- delece 22q11 (Tyybakinoja et al. 2007, Gunn et al. 2009),
- další změny (zisky/delece) na 3p, 7p, 8p, 8q, 9q, 10q, 14q, 17q, 18p a 18q, 19q (Tyybakinoja et al. 2007, Kay et al. 2010, Ouillette et al. 2011, Urbankova et al. 2012).

Vliv zvyšující se komplexity karyotypu, zjištěné aCGH, na zhoršení prognózy pacienta, resp. na zkrácení doby do zahájení léčby a celkového přežití, byl jednoznačně prokázán jak pro neléčené pacienty, tak i pro pacienty progredující po léčbě (Kujawski et al. 2008, Kay et al. 2010, Ouillette et al. 2011). Jasně byl také prokázán nepříznivý vliv celkového vyššího rozsahu ztráty genetického materiálu (≥ 66 Mb) (Kay et al. 2010). Více než 3 změny jsou nacházeny u ~15-40% pacientů (Ouillette et al. 2011, Parker et al. 2011, Kujawski et al. 2008); značný rozptyl je způsobený zřejmě závislostí na složení souboru pacientů, resp. na poměru neléčení pacientů vs. relabující/progredující po léčbě, kdy u neléčených byly ≥ 3 změny nalezeny v 16% případů a u progredujících po léčbě v 33% (Ouillette et al. 2011). Opakovaně byla prokázána korelace komplexních změn karyotypu, nalezených aCGH, s přítomností delece/mutace TP53 (Ouillette et al. 2011, Kay et al. 2010). Zajímavý je rovněž nález komplexních změn karyotypu u pacientů se zdánlivě samostatnou delecí 13q14, tj. řazených dle interfázické FISH do skupiny s nízkým rizikem (Kay et al. 2010).

1.8 Delece 13q14

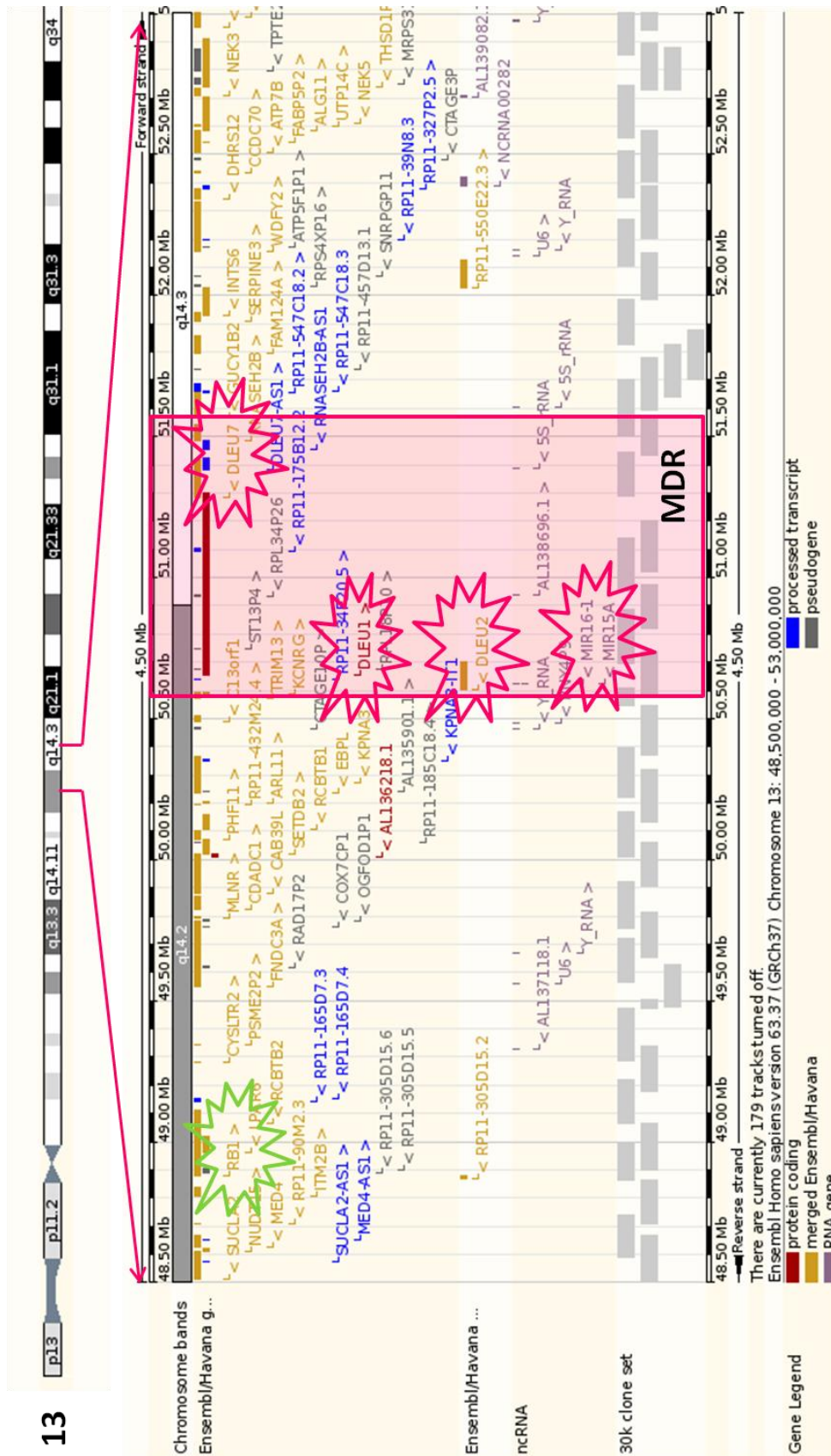
Delece 13q14 je nejčastěji prokazovanou aberací u CLL, nacházenou FISH u více než poloviny pacientů; jako samostatná změna karyotypu je spojována s příznivou prognózou onemocnění (Dohner et al. 1999, Dohner et al. 2000, Dewald et al. 2003).

Původní práce, mapující minimální velikost delece, ukázaly na ztrátu 10-30 kb v oblasti genového shluku („cluster“) DLEU1/DLEU2 (Liu et al. 1997, Calin et al. 2002). Podrobnými vyšetřeními arrayCGH bylo zjištěno, že tato minimální ztráta je větší, a to v rozsahu ~140-150 kb (Parker et al. 2011, Tyybakinoja et al. 2007).

Přes variabilitu rozsahu delece (až desítek Mb) bylo možné aCGH stanovit nejčastěji se vyskytující „minimální“ deletovaný region (MDR) o velikosti cca 900 kb, nacházený u 50-60% případů delece, viz obrázek 1.1 (Ouillette et al. 2008, Parker et al. 2011). Tento ~900 kb MDR zahrnuje zmiňovaný RNA genový shluk DLEU1/DLEU2, obsahující sekvence pro miRNA15a, miRNA16-1, a protein kódující gen DLEU7. Zlomová místa MDR nejsou zcela uniformní, jedná se o oblasti se zvýšenou frekvencí zlomů (tzv. breakpoint cluster regions, BCRs) s vysokým obsahem repetitivních sekvencí. V proximálním BCR v blízkosti DLEU2 genu v oblasti genů TRIM13, KCNRG, SPRYD7 je zvýšený počet repetitivních SINE, v distálním BCR v blízkosti DLEU7 v oblasti genu RNASEH2B a pseudogenu GUCY1B2 je vysoké zastoupení repetitivních LINE/L1 (Parker et al. 2011).

Delecí 13q14 dochází k prokazatelnému snížení exprese miRNA15, miRNA16-1 (Calin et al. 2002). Snížení exprese miRNA15, miRNA16-1 v důsledku jiných mechanismů nebylo prokázáno, bodové mutace v sekvenci těchto genů se zdají být velmi vzácné a bez vlivu na úroveň exprese a ani hypermetylace promotorových oblastí nebyly nalezeny (Calin et al. 2002).

Patogenní význam ztráty miRNA15, miRNA16-1 byl ověřen na myších modelech, kdy myši deficitní pro miRNA15, miRNA16-1 v krátké době vyvinuly indolentní klonální B buněčnou lymfoproliferaci (Klein et al. 2010), která může předcházet vzniku CLL. Dalším studiem byla prokázána inverzní korelace úrovně exprese miRNA15, miRNA16-1 a BCL2 genu (Cimmino et al. 2005). BCL2 je genem pro protein mitochondriální membrány bcl-2 s antiapoptotickým působením, který je v buňkách CLL vysoce exprimován (Hanada et al. 1993, Gottardi et al. 1996, Kitada et al. 1998).



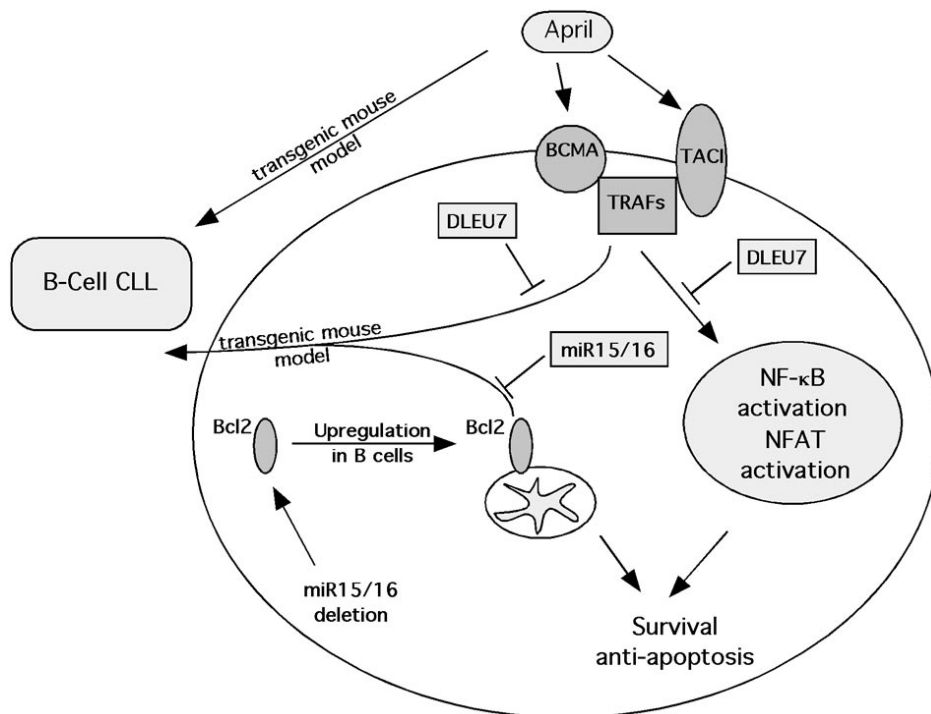
Obrázek 1.1 *Schéma MDR u delece 13q14*

zpracováno dle (Ouillette et al. 2008, Parker et al. 2011) s využitím podkladů genomového prohlížeče Ensembl (GRCh37)

(http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Location/Overview?r=13%3A48500000-53000000)

Lze tedy předpokládat, že miRNA15/miRNA16-1 regulují na posttranskripční úrovni expresi bcl-2 proteinu a že snížená exprese miRNA15, miRNA16-1 v důsledku delece 13q14 přispívá k vysoké expresi bcl-2 jako pravděpodobné příčině dlouhověkosti CLL buněk.

DLEU7, jediný protein kódující gen v MDR, je silným inhibítorem rodiny TNF receptorů (TACI a BCMA, resp. TNFRSF13B a TNFRSF17), tedy i inhibítorem NF-κB signální dráhy (Palamarchuk et al. 2010). Ztrátou inhibičního působení DLEU7 v důsledku delece 13q14 je proto aktivována signální dráha transkripčního faktoru NF-κB a v kooperaci se ztrátou tumor supresorového působení miRNA15a/miRNA16-1 tak dále přispívá k patogenezi CLL. Model spolupůsobení tumor supresorových genů lokalizovaných v MDR 13q14 je znázorněn schematicky na obrázku 1.2.



Obrázek 1.2 *Kooperace působení tumor supresorových genů v MDR 13q14*
převzato z (Palamarchuk et al. 2010)

Rozsah delece 13q14 má prognostický význam. Delece většího rozsahu než obvyklý MDR zahrnuje většinou i RB1 gen ležící ve vzdálenosti cca 1Mb centromerickým směrem od MDR a je významně častěji nacházena ve skupině pacientů v relapsu/progresi po léčbě ve srovnání se skupinou neléčených pacientů (Ouillet et al. 2008), příp. u progredujících pacientů (před léčbou nebo po léčbě) ve srovnání se

skupinou pacientů se stabilním onemocněním (Parker et al. 2011). Asociace většího rozsahu delece 13q14 s progresí onemocnění je nezávislá na dalších prognostických faktorech (ZAP70, IGVH, del17p) (Parker et al. 2011).

RB1 je prvním rozpoznaným tumor supresorovým genem, jehož proteinový produkt reguluje buněčný cyklus; inaktivace RB1 podporuje genomickou nestabilitu a tím možnou progresi nádorových onemocnění (Hernando et al. 2004). 1Mb oblast mezi MDR a RB1 genem obsahuje dalších 14 genů (včetně SETDB2, PHF11, RCBTB1) (Parker et al. 2011), jejichž delece může také přispívat k progresi onemocnění.

Význam, resp. nepříznivý vliv, rozsáhlé delece 13q14 byl dále zesílen její asociací se zvýšenou genomickou komplexitou (Ouillette et al. 2010).

Delece 13q14 je v části případů (20-40% pacientů s prokázanou delecí) nacházena i v bialelické formě (Chena et al. 2008, Haferlach et al. 2007, Van Dyke et al. 2010, Dewald et al. 2003). V některých studiích bylo prokázáno zhoršení prognózy (zkrácení času do zahájení léčby) u pacientů s bialelickou formou delece (Chena et al. 2008), v jiných nikoli (Van Dyke et al. 2010). Nepříznivý vliv na prognózu může mít rovněž vyšší zastoupení patologického klonu s delecí 13q14 ve vzorku plné periferní krve ($\geq 66\%$) (Van Dyke et al. 2010).

Delece 13q14 je nacházena ve většině případů ve formě intersticiální delece, ale byla popsána i ve spojení s reciprokou translokací s delecí v místě translokačního zlomu (Gardiner et al. 1997, Dicker et al. 2006, Haferlach et al. 2007, Struski et al. 2007, Herholz et al. 2007).

Význam delece 13q14 pro patogenezi CLL je nesporný, význam prognostický však není jednoduše posouditelný vzhledem k jeho ovlivnění rozsahem delece, formou delece (intersticiální delece vs. delece v místě translokačního zlomu), mono či bialelickým výskytem, závislostí na přítomnosti dalších aberací atd.

1.9 Delece 11q (ATM genu)

Delece oblasti 11q22-11q23, vyskytující se přibližně u 20 % pacientů s CLL, je spojena s nepříznivou prognózou (Dohner et al. 2000, Dohner et al. 1999, Dewald et al. 2003, Dohner et al. 1997). Delece je variabilního rozsahu (7-42 Mb) a, kromě jiných, zahrnuje především tumor supresorový gen ATM v pruhu 11q22.3 (Tyybakinoja et al. 2007).

Produktem ATM genu je kinázový protein, který je důležitou součástí systému regulace buněčného cyklu. Pokud je přítomno zvýšené množství dvouvláknových zlomů DNA, ATM-kináza řídí, prostřednictvím fosforylace p53 a CHEK2-proteinu, zástavu buněčného cyklu.

Germinální mutace v tomto genu jsou příčinou autosomálně recesivního onemocnění ataxia telangiectasia, spojeného se zvýšenou tvorbou chromosomových zlomů a silnou predispozicí k hemato-onkologickým onemocněním.

Inaktivace ATM genu somatickou mutací je prokazována u 12-14% pacientů s CLL (Austen et al. 2005, Guarini et al. 2012) a je také spojena se špatnou prognózou (zkrácením doby do zahájení léčby a doby celkového přežití) (Austen et al. 2005).

Pouze část pacientů s delecí ATM genu (36%) má inaktivovanou druhou alelu genu somatickou mutací (Austen et al. 2007). Vyšší frekvence mutace u pacientů s delecí 11q22-23 (36% vs. 12-14% u neselektovaných pacientů) může znamenat, že heterozygtní status je rizikovým faktorem pro ztrátu i druhé alely. Bylo také prokázáno, že k mutaci druhé alely může dojít až v průběhu onemocnění s následnou expanzí patologického klonu (Austen et al. 2007). Pacienti s homozygotní ztrátou ATM genu vykazují další zhoršení klinické prognózy a defektní odpověď na chemoterapii *in vitro* (Austen et al. 2007).

Možným vysvětlením faktu, že k významnému vlivu na patogenezi či progresi onemocnění stačí i heterozygotní inaktivace ATM genu (delecí či mutací), je kromě haploinsuficience ATM *in vivo* také možný vliv dalších genů deletovaných společně s ATM či epigenetické umlčení genové exprese zbývajících alely.

Delece ATM genu je způsobena převážně intersticiální či terminální delecí 11q, ale v části případů je popisována rovněž v důsledku nebalancované translokace (Herholz et al. 2007, Haferlach et al. 2007).

Nepříznivá prognóza pacientů s delecí 11q může být překonána současným chemoterapeutickým standardem kombinované léčby fludarabinem, cyklofosfamidem a

monoklonální protilátkou antiCD20 (rituximabem) (Tsimberidou et al. 2009) nebo v budoucnu nízkomolekulárními léky zvyšujícími hladinu proteinu p53 inhibováním vazby Mdm2 na p53 (nutliny).

1.10 Trisomie chromosomu 12

Trisomie chromosomu 12 se vyskytuje u přibližně 20% pacientů s CLL a dle původních FISH studií jí byla přiřazena střední prognóza (Dewald et al. 2003, Dohner et al. 1999, Dohner et al. 2000). CLL s trisomií 12 je spojována s atypickou morfologií CLL buněk a rychlejším nástupem progresu onemocnění (ve srovnání s normálním karyotypem či samostatnou delecí 13q14) (Matutes et al. 1996). Tito pacienti však v současnosti zásadně profitují z kombinované léčby zahrnující rituximab (antiCD20) (Hallek et al. 2010), pravděpodobně v důsledku zvýšené exprese CD20 prokazované na CLL buňkách s trisomií 12 (Tam et al. 2008).

Geny, které v důsledku trisomie 12 přispívají k patogenezi CLL, nejsou známy. Zajímavá data přinesly výsledky sekvenování nové generace, na jejichž základě byly ve skupině pacientů s prognosticky nepříznivou formou trisomie 12 (s nemutovaným stavem IGVH a zvýšenou expresí ZAP70) prokázány časté mutace genu NOTCH1 (42% pacientů) (Balatti et al. 2012).

Zvláštní skupinu pacientů s trisomií 12 tvoří pacienti se současnou trisomií chromosomu 19 (a často i s trisomií 18), asociovanou s mutovanou formou IGVH a vzácnou povrchovou expresí IgG (Ibbotson et al. 2012).

1.11 Delece 17p (TP53 genu)

Nejvýznamnějším cytogenetickým prognostickým faktorem u CLL je delece tumor supresorového genu TP53 v pruhu 17p13.1, která je nacházena u 7-8% pacientů (Dohner et al. 1999, Dohner et al. 2000, Dewald et al. 2003) a je spojena s velmi nepříznivou prognózou (Oscier et al. 2002, Dohner et al. 1995, Dohner et al. 2000).

Ztráta TP53 je přítomna v menší části případů v důsledku monosomie 17, nejčastěji je však způsobena strukturní aberací (nebalancovanou translokací, terminální delecí, event. tvorbou isochromosomu 17q) vedoucí ke ztrátě téměř celých krátkých ramen chromosomu 17 (Haferlach et al. 2007, Fink et al. 2006). Ke zlomu dochází v pericentromerické oblasti 17p10-17p12 v místech „low-copy“ repetit DNA (Fink et al. 2006).

TP53 je genem kódujícím transkripční faktor p53, který řídí odpověď na buněčný stres regulací transkripce cílových proteinů s cílem buď zástavy buněčného cyklu a zahájení reparace DNA nebo indukce apoptózy. Transkripce některých proteinů (p21, Puma, Bax) je regulována přímo proteinem p53, resp. jeho vazbou v promotorové oblasti těchto genů, zatímco exprese části cílových proteinů (CDK4, CDK6, CCND1, BCL2 aj.) je proteinem p53 ovlivňována nepřímo prostřednictvím postranskripčního působení miR-34a, jejíž úroveň exprese je řízena p53. Protein p53 se vyskytuje v 9 variantních formách díky alternativním promotorům a sestřihovým místům. V klidovém stavu je v buňce pouze v nízké hladině, zajišťované vazbou s negativním regulátorem Mdm2.

Heterozygotní germinální mutace genu TP53 způsobuje Li-Fraumeniho syndrom, hereditární syndrom vážné predispozice k nádorovým onemocněním.

Delece TP53 je u CLL provázena v 80-90% případů somatickou mutací druhé alely genu (Zenz et al. 2010, Zenz et al. 2009a). Samostatná mutace (bez současné delece zbývající alely) je prokazována asi u 5% pacientů s CLL (Zenz et al. 2010), u části z nich (~50%) dochází k inaktivaci druhé alely v důsledku uniparentální isodisomie (Zenz et al. 2009a).

Průkaz přítomnosti delece či mutace TP53 predikuje rezistenci na léčbu purinovými analogy (Dohner et al. 1995, el Rouby et al. 1993, Wattel et al. 1994). Tito pacienti neprofitují ani ze současného standardu kombinované léčby fludarabinu s cyklofosfamidem a monoklonální protilátkou antiCD20 (rituximabem) (Hallek et al. 2010). Kromě alogenní transplantace hematopoetických buněk (Dreger et al. 2010, Schetelig et al. 2008) je možným příslibem léčba monoklonální protilátkou antiCD52 (Stilgenbauer, Dohner 2002, Stilgenbauer et al. 2009) nebo v budoucnosti terapie na dráze p53 nezávislými novými léčivy.

Pacienti s prokázanou delecí či mutací TP53 tvoří asi polovinu všech chemorezistentních CLL (Zenz et al. 2009a). Zajímavé je, že chemorezistence je spojena s nízkou úrovní exprese miRNA34a i v případech bez mutace či delece TP53 (Zenz et al. 2009b).

1.12 Delece 6q

Delece dlouhých ramen chromosomu 6 je nacházena u 5-7% pacientů (Dewald et al. 2003, Haferlach et al. 2007, Cuneo et al. 2004, Stilgenbauer et al. 1999). Její prognostický význam lze obtížně posoudit vzhledem k nízké incidenci a častému

výskytu delece 6q jako sekundární aberace (Finn et al. 1998). Prognóza je uváděna v rozmezí střední až zhoršená, nejčastěji je delece 6q spojována se střední prognózou se zkráceným časem do zahájení léčby a zvětšenou tumorovou masou ve srovnání s prognosticky příznivými skupinami pacientů (Cuneo et al. 2004, Stilgenbauer et al. 1999). Méně příznivé prognóze odpovídá i pozitivní korelace s přítomností delece 17p (Haferlach et al. 2007).

Delece 6q je velmi variabilního rozsahu, minimální deletovaná oblast a geny zodpovědné za její patogenní význam nejsou zatím jednoznačně identifikovány. Nejčastěji deletovanou oblastí je pruh 6q21 (Stilgenbauer et al. 1999, Zhang et al. 2000). Recentně byl v tomto pruhu navržen minimální deletovaný region o velikosti 1,4 Mb zahrnující několik genů (včetně 9 protein kódujících), např. geny FOXO3 a SEC63 (Urbankova et al. 2012). Gen FOXO3 kóduje transkripční faktor s proapoptotickým působením, proteinový produkt genu SEC63 je součástí membrány endoplazmatického retikula s možným vlivem na posttranslační transport proteinů do ER.

Menší část delecí 6q (26%) vzniká v důsledku nebalancované translokace (Haferlach et al. 2007).

1.13 Aberace 14q

Přestavby dlouhých ramen chromosomu 14 jsou uváděny již v prvních studiích referujících o častých cytogenetických aberacích u CLL (Gahrton et al. 1987, Juliusson, Gahrton 1990, Juliusson et al. 1990).

Translokace genu (resp. genového shluku) IGH@, nacházejícího se v subtelomerické oblasti 14q v pruhu 14q32 a kódujícího těžký řetězec imunoglobulinu, jsou u CLL nacházeny vzácně (v 7-8% případů) (Cavazzini et al. 2008, Berkova et al. 2008). Původně předpokládaný vyšší výskyt translokací 14q mohl být způsoben zahrnutím případů mantle-cell lymfomu s rekurentní translokací t(11;14)(q13;q32) do skupiny vyšetřovaných CLL díky neúplné diferenciální diagnostice (Nowakowski et al. 2005). Ačkoli se translokací IGH@ genu účastní různí translokační partneři, souhrnně byly tyto translokace u CLL spojeny se špatnou prognózou onemocnění (Cavazzini et al. 2008).

Z translokací IGH@ genu je u CLL nejčastější t(14;18)(q32;q21) vedoucí k overexpresi BCL2 genu, typická pro folikulární lymfom. Tato translokace se při samostatném posouzení zdá být asociována s prognosticky příznivým mutovaným

stavem IGVH a i přes možnou přítomnost přídatných aberací nevede k progresivní formě CLL (Put et al. 2009).

Méně často je nacházena translokace t(14;19)(q32;q13) způsobující overexpresi BCL3 genu, která vymezuje podskupinu atypických CLL s agresivním průběhem onemocnění (Huh et al. 2007, Martin-Subero et al. 2007, Chapiro et al. 2008, Huh et al. 2011), asociovaných s nemutovaným stavem IGVH (Martin-Subero et al. 2007, Chapiro et al. 2008, Huh et al. 2011). BCL3 je gen kódující transkripční koaktivátor NF- κ B.

Velmi vzácná je u CLL translokace t(8;14)(q24;q32), typicky nacházená u Burkitt-like lymfomů, spojená se zlomem v oblasti MYC genu a vedoucí k jeho overexpresi. Také translokace MYC genu tvoří samostatnou podskupinu atypických CLL s vysokým zastoupením prolymfocytů a špatnou prognózou (Huh et al. 2008). Gen MYC kóduje transkripční faktor regulující transkripci genů zúčastněných v řízení buněčného cyklu, apoptóze a buněčné transformaci.

Variantou translokací IGH@ jsou translokace genů (genových shluků) IGK@ (2p12) a IGL@ (22q11) pro lehké řetězce imunoglobulinů.

Další vzácnou rekurentní strukturní přestavbou chromosomu 14 u CLL je intersticiální delece 14q s incidencí 2% (u prolymfocytární leukemie 9%) (Reindl et al. 2010). Rozsah delece sice může být variabilní, nejčastěji jsou však zlomy situovány do zlomových oblastí 14q24.1 (proximální) a 14q32.3 (distální, zasahující do IGH@ genového shluku) (Reindl et al. 2010, Pospisilova et al. 2007). Ve srovnání se skupinou pacientů bez delece bylo u pacientů s delecí 14q prokázáno významné zkrácení doby do zahájení léčby a asociace s nemutovanou formou IGVH (Reindl et al. 2010). Patogenní působení delece 14q může spočívat ve ztrátě tumor supresorového genu (např. TRAF3 (Reindl et al. 2010)) nebo aktivaci možného proto-onkogenu ležícího v oblasti 14q24.1 (Pospisilova et al. 2007).

Je zajímavé, že většina popisovaných rekurentních aberací chromosomu 14 (resp. translokace t(14;18)(q32;q21), t(14;19)(q32;q13) i delece 14q) jsou významně asociovány s trisomií chromosomu 12 (Reindl et al. 2010, Put et al. 2009, Huh et al. 2007, Huh et al. 2011, Chapiro et al. 2008, Martin-Subero et al. 2007).

Při analýze FISH se sondami pro IGH@ gen (obvykle typu "break-apart") je u poměrně velké skupiny pacientů (20-25%) nacházena klonální kryptická delece variabilní části IGH@ genu (Wlodarska et al. 2007, Berkova et al. 2008), jednoznačně však byla prokázána její souvislost s fyziologickým procesem V-D-J rekombinace proběhlým v dané B buňce před vznikem nádorových změn (Wlodarska et al. 2007).

2 Cíl práce

Na základě studia recentních zdrojů byly stanoveny pro tuto disertační práci následující cíle:

1. Zhodnotit celkový přínos DSP30/IL2 stimulované kultivace CLL buněk pro jejich cytogenetickou analýzu ve srovnání s vyšetřením nestimulovaných buněk interfázickou FISH a vyhodnotit souvislost nalezených změn s progresivitou onemocnění.
2. Podrobně studovat rekurentní strukturní změny v návaznosti na očekávané rozšířené možnosti chromosomové analýzy po stimulované kultivaci CLL buněk, včetně sledování mechanismu vzniku těchto aberací, jejich vlivu na progresivitu onemocnění a souvislosti s klonálním vývojem.

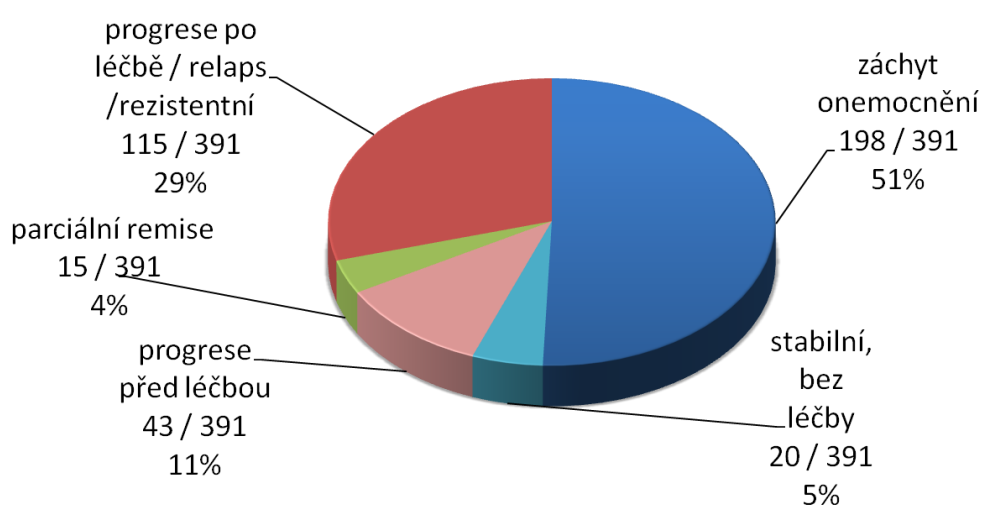
Součástí cílů bylo zavedení stimulované kultivace CLL buněk do běžné laboratorní praxe Genetické laboratoře Ústavu lékařské genetiky LF UK a FN Plzeň a průběžná publikační aktivita.

3 Metodika

Vyšetřený soubor

Vyšetřovány byly vzorky plné kostní dřeně nebo periferní krve pacientů splňujících diagnostická imunofenotypická kritéria chronické lymfatické leukemie (Matutes et al. 1994). Jednalo se o vzorky s 2-95% infiltrací leukemickými buňkami dle FACS (s mediánem infiltrace 60%), postupně přicházející v období 1/2008 – 12/2012 do Genetické laboratoře Ústavu lékařské genetiky LF UK a FN Plzeň.

Vyšetřeno bylo celkem 391 vzorků od 337 pacientů (medián věku při prvním vyšetření 64 let, 67% mužů, 33% žen), z toho 383 vzorků kostní dřeně a 8 vzorků periferní krve. Nejvíce vyšetřených vzorků (198/391; 51%) bylo odebráno v době záchytu onemocnění, druhá největší kohorta byly vzorky pacientů v progresi po léčbě, relapsu nebo rezistentních na léčbu (115/391; 29%). Vzorků odebraných v progresi před léčbou bylo 43/391 (11%), ve stádiu sledování bez léčby 20/391 (5%) a v parciální remisi 15/391 (4%); celkové složení vyšetřeného souboru viz graf 3.1.



Graf 3.1 *Soubor vyšetřených vzorků – rozdělení dle klinického stavu onemocnění*

První vyšetření pacientů byla provedena v 59% (198/337) případů při záchytu onemocnění, v 6% (20/337) případů ve stádiu sledování bez léčby, v 11% (36/337) v progresi před zahájením léčby, v 23% (79/337) v progresi po léčbě či relapsu nebo při rezistentním onemocnění a v 1% (4/337) případů v parciální remisi.

Kultivace CLL buněk

Vzorky kostní dřeně (příp. periferní krve) byly kultivovány 72 hodin v kompletním médiu MarrowGrow Medium (Cytogen) nebo BoneMarrow Karyotyping Medium (Biological Industries). $5 \cdot 10^6$ jaderných buněk / ml média bylo kultivováno optimálně v 5 ml média. Kultivace probíhala s přidavkem DSP30, jednovláknového syntetického fosforothiátovou vazbou stabilizového DNA oligonukleotidu se třemi CpG (o sekvenci TCGTCGCTGTCTCCGCTTCTTCTTGCC, výsledná koncentrace $2 \mu\text{M}$, TibMolBiol), a interleukinu 2 (výsledná koncentrace 200U/ml, Peprotech) (Dicker et al. 2006). V rámci pilotního posouzení byla prováděna paralelní běžná 24 hodinová cytogenetická kultivace ($5 \cdot 10^6$ jaderných buněk / ml média v optimálně 5 ml kompletního média MarrowGrow Medium (Cytogen)).

Analýza karyotypu

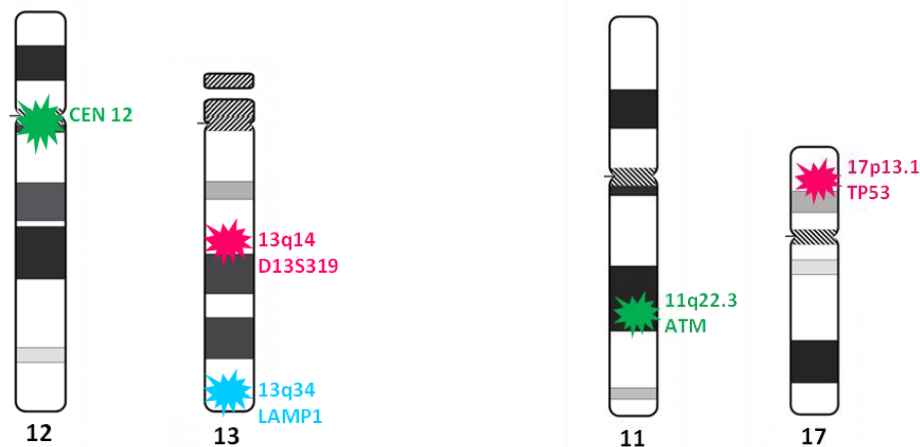
G-pruhováním bylo plně karyotypováno, s pomocí elektronické obrazové dokumentace, alespoň 15 mitóz. Kultivace, ze kterých bylo hodnoceno méně než 10 mitóz bez nálezu patologického klonu, byly považovány za neúspěšné.

Chromosomové aberace byly popisovány dle platné cytogenetické nomenklatury (Shaffer 2009). Za patologický nález byly považovány pouze klonální aberace dle definice ISCN (tj. alespoň dvě mitózy se shodnou strukturní aberací či nadpočetným chromosomem a tři mitózy s chybějícím chromosomem).

Analýza FISH

Základní FISH analýza pro běžné prognostické aberace (dle (Dohner et al. 2000)) byla prováděna u všech pacientů (limitující byl dostatek buněčné suspenze). Screening pro zjištění delece 13q14, delece genu ATM (11q22.3), delece TP53 (17p13.1) a trisomie 12 byl proveden u 386, resp. 387, 384, 385 vzorků (336, resp. 337, 335, 337 pacientů). Použity byly převážně sondy LSI D13S319 / LSI LAMP1 / cep12, LSI ATM / LSI TP53 (obě Abbott-Vysis, viz obrázek 3.1), příp. ON DLEU1 / 13qter (Kreatech), cep12, LSI TP53 / cep17 a LSI ATM / cep11 (všechny Abbott-Vysis). Hodnoceno bylo vždy minimálně 100 interfázních jader a, v případě úspěšné kultivace, 15 mitóz.

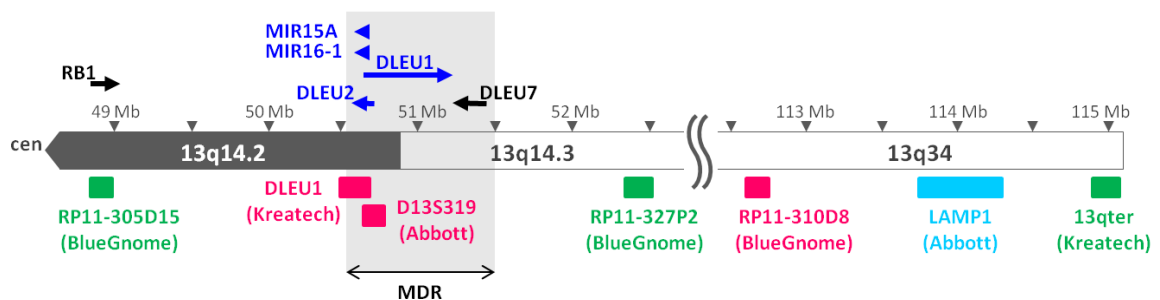
Ověření přítomnosti translokací IGH@ bylo provedeno sondou LSI IGH Dual Color, Break Apart Rearrangement Probe, příp. sondami LSI IGH / MYC / CEP 8 Tri-Color DF FISH Probe Kit nebo LSI IGH / CCND1 XT DF FISH Probe Kit (všechny Abbott-Vysis).



Obrázek 3.1 *FISH sondy pro vyšetření základních prognostických aberací LSI D13S319 / LSI LAMP1 / cep12 a LSI ATM / LSI TP53 (obě sady sond Abbott-Vysis)*

V případě nálezu delecce 6q v karyotypu nebo naopak při normálním karyotypu i všech provedených FISH (včetně analýzy mitóz) bylo doplněno vyšetření sondou ON 6q21 / SE6 (Kreatech).

U 5 pacientů s multiklonální delecí 13q14 (pac. č. 94, 131, 204, 222 a 219) byly provedeny další FISH analýzy deletované oblasti 13q14 se sondou pro lokus DLEU1 (s kontrolou v 13qter, Kreatech, viz výše), ležící v MDR, a se dvěma sondami mimo MDR - RP11-305D15 (RB1 gen) a RP11-327P2 (obě BlueGnome). Jako další kontrolní byla použita sonda RP11-310D8 (BlueGnome) pro subtelomerickou oblast. Přehled všech sond použitých pro vyšetření delecce 13q14 je uveden na obrázku 3.2.



Obrázek 3.2 *FISH sondy pro podrobné vyšetření delecce 13q14*

Nejprve byla provedena hybridizace s kombinací sond ležících v MDR a mimo MDR, tj. společná hybridizace sondy pro lokus DLEU1 buď se sondou RP11-305D15 nebo RP11-327P2 a s příslušnými subtelomerickými kontrolami; hodnoceno bylo u každého vzorku minimálně 12 mitóz. Pokud byly prokázány delecce lokusů mimo MDR nebo deleční zlom mezi sondami pro D13S319 a DLEU1 byla pro možnost

hodnocení zastoupení klonů i na interfázních jádrech doplněna pro příslušné sondy samostatná FISH vyšetření; hodnoceno pak bylo minimálně 100 interfázních jader a 25 mitóz.

Všechny nalezené translokace 13q14 byly ověřeny FISH s celochromosomovými sondami.

Pro doplňkové vyšetření klonálního vývoje u jednoho z pacientů s multiklonální delecí 13q14 (pac. č. 204) bylo provedeno FISH vyšetření s kombinací sond pro čtyři lokusy na chromosomech 13 a 14 (RP11-316E14 (14q24), RP11-101G24 (14q32) (BlueGnome), ON DLEU1 / 13qter (Kreatech)). Hodnoceno bylo celkem 50 mitóz.

Hodnocení, Statistické metody

Hodnocení úspěšnosti kultivace bylo prováděno na celkovém souboru vyšetřených vzorků. Stejně bylo postupováno i u sledování přítomnosti jednotlivých rekurentních aberací, translokací, komplexních změn apod., včetně zhodnocení jejich souvislosti s progresivitou onemocnění, vzhledem k možnému prvnímu výskytu dané aberace jako nové přídatné změny až v následných vyšetřeních stejných pacientů. Kde je to relevantní, jsou uváděny i výsledky vztažené na počet pacientů, příp. na první vyšetření všech pacientů. Pro statistickou analýzu byl využit Fisherův exaktní test.

4 Výsledky

4.1 Cytogenetická analýza CLL buněk po DSP30/IL2 stimulované kultivaci

4.1.1 Pilotní porovnání s nestimulovanou kultivací

U prvních 23 vzorků, resp. 23 pacientů, z vyšetřeného souboru byla zároveň s DSP30/IL2 stimulovanou kultivací provedena standardní nestimulovaná cytogenetická kultivace. Obě kultivace byly zhodnoceny vyšetřením karyotypu i FISH pro rekurentní aberace. Souhrn výsledných dat je uveden v tabulce 4.1.

Tabulka 4.1 *Srovnání výsledků DSP30/IL2 stimulované a nestimulované kultivace*

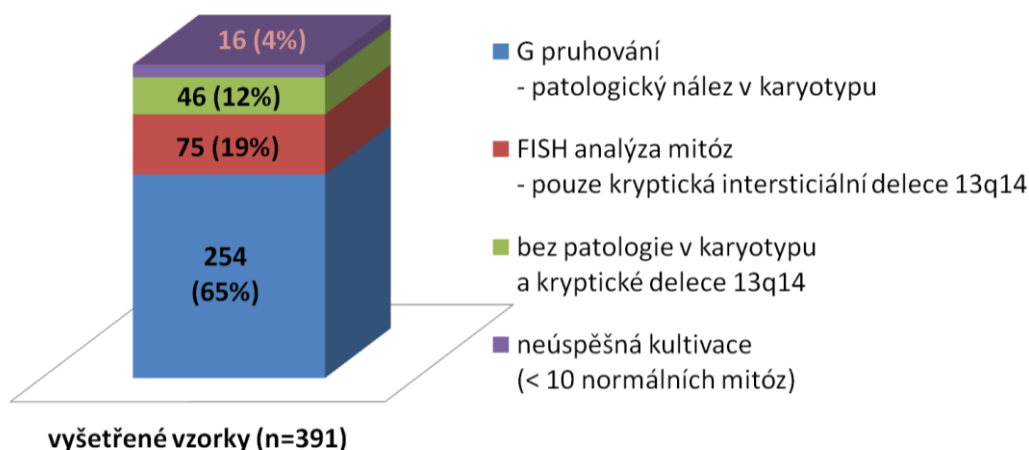
Hodnocené parametry pro paralelní kultivace (n=23 vzorků)	72 hod. DSP30/IL2 stimulovaná kultivace	24 hod. standardní kultivace bez stimulans
Úspěšnost kultivace (v % vzorků s možným hodnocením mitóz)	91% (21/23) hodnoceno ≥ 15 mitóz při analýze karyotypu	70% (16/23) hodnoceno ≥ 10 mitóz při analýze karyotypu
<u>Analýza karyotypu G-pruhováním</u>		
1/ záchyt patologických klonů (v % vzorků s klonálním nálezem)	65% (15/23)	13% (3/23)
2/ medián velikosti klonů (resp. medián podílu aberantních mitóz v jednotlivých vzorcích, v %)	67%	13%
<u>FISH analýza mitóz</u>		
1/ záchyt patologických klonů (v % vzorků s klonálním nálezem)	78% (18/23)	13% (3/23)
2/ medián velikosti klonů (resp. medián podílu aberantních mitóz v jednotlivých vzorcích, v %)	74%	20%
<u>Interfázická FISH</u>		
1/ záchyt patologických klonů (v % vzorků s klonálním nálezem)	87% (20/23)	87% (20/23)
2/ medián velikosti klonů (resp. medián podílu jader s patologickým nálezem v jednotlivých vzorcích, v %)	67%	67%

Dosažené výsledky ukázaly vyšší úspěšnost kultivace stimulované oproti nestimulované (91% vs. 70% vzorků se získáním dostatečného počtu mitóz pro provedení analýzy karyotypu). Po stimulované kultivaci byl prokázán výrazně vyšší záchyt patologických klonů hodnocením mitóz (při vyšetření karyotypu G-pruhováním 65% vzorků s klonálním nálezem oproti 13% u nestimulované kultivace; při FISH 78% vs. 13%). Zásadně vyšší ve stimulovaných kultivacích byl také podíl patologických mitóz (medián při vyšetření karyotypu G-pruhováním 67% vs. 13% u nestimulovaných kultivací, medián při vyšetření FISH 74% vs. 20%). Naproti tomu na stejné úrovni byl v obou kultivacích prokázán záchyt patologických klonů FISH vyšetřením interfázních jader (87% vzorků s patologickým klonem), stejně tak medián podílů jader s patologickým klonem byl v obou kultivacích shodný (medián velikostí klonů 67%).

4.1.2 Celková úspěšnost DSP30/IL2 stimulované kultivace

V celém vyšetřeném souboru byla analýza mitóz CLL buněk po DSP30/IL2 stimulované kultivaci úspěšně provedena u 96% vzorků (375/391), zbylé 4% (16/391) kultivací nebylo úspěšných (zhodnocení ≤ 10 mitóz bez nálezu patologického klonu).

Analýzou karyotypu G-pruhováním byl prokázán patologický klon u 65% vzorků (254/391) s mediánem počtu hodnocených mitóz 15 a s mediánem velikosti patologických klonů (resp. podílu patologických mitóz) 87%. U dalších 19% vzorků (75/391) byla při normálním karyotypu nalezena FISH analýzou mitóz kryptická intersticiální delece 13q14 jako jediná prokázaná aberace. U zbylých 12% úspěšně kultivovaných vzorků (46/391) byl karyotyp bez aberací a bez samostatné kryptické intersticiální delece 13q14. Pro přehled uvedených výsledků viz graf 4.1.



Graf 4.1 Celková úspěšnost DSP30/IL2 stimulované kultivace

Téměř shodná data ukázalo zhodnocení pouze prvních vyšetření všech pacientů, tj. s vyloučením opakovaných vyšetření provedených s časovým odstupem. Celkem bylo vyšetřeno 337 pacientů, z toho u 63% pacientů (213/337) byl nalezen patologický klon G-pruhováním, u 20% (67/337) pacientů samostatná kryptická intersticiální delece 13q14 zjištěná pouze FISH, včetně analýzy mitóz, a u 13% (44/337) pacientů nebyly prokázány žádné aberace v karyotypu ani samostatná delece 13q14. U 4% (13/337) pacientů stimulovaná kultivace nebyla úspěšná a analýzu mitóz nebylo možné provést.

4.1.3 Porovnání s detekcí rekurentních aberací metodou FISH

FISH analýzou interfázních jader pro rutinně vyšetřované aberace (delece 13q14, delece 11q22-23, delece 17p13, trisomie 12) byla alespoň jedna z těchto aberací nalezena v 83% (325/391) vzorků. Ze zbylých 17% (66/391) vzorků s normálním nálezem pro všechny vyšetřované lokusy byl ve 23 případech (23/66; 35%) nalezen patologický klon s jinými aberacemi analýzou karyotypu G-pruhováním, tj. byly přineseny informace o aberantní výbavě leukemických buněk pro dalších 6% (23/391) případů. Celkově tedy byl kombinací všech vyšetření patologický klon prokázán u 89% vyšetřených vzorků (348/391).

Hodnocením pouze prvních vyšetření všech pacientů byly zjištěny velmi obdobné výsledky: alespoň jedna z uvedených rekurentních aberací byla interfázickou FISH zjištěna u 82% (278/337) pacientů a u dalších 5% (17/337) pacientů s normálním nálezem pro všechna FISH vyšetření byl zjištěn patologický klon analýzou karyotypu G-pruhováním. Celkový podíl pacientů se zachyceným patologickým klonem v prvním vyšetření byl tedy 87% (295/337).

Porovnáním s výsledky FISH pro rekurentní aberace lze dále konstatovat, že analýzou karyotypu byly u 44% (171/391) vyšetřených vzorků nalezeny další jiné aberace (při zhodnocení pouze prvních vyšetření všech pacientů se jednalo o 40% (135/337) pacientů).

Delece 11q/ATM genu, trisomie 12 a delece 17p/TP53 genu byly nalezeny analýzou karyotypu v 92,5%, 97%, resp. 70% případů s průkazem dané aberace metodou FISH, viz tabulka 4.2. V ostatních případech, kdy daná aberace byla detekována pouze interfázickou FISH, se jednalo buď o případy neúspěšné kultivace nebo o menší subklony, které nebyly analýzou karyotypu zachyceny náhodně (podrobněji viz kapitoly 4.2.2, 4.2.3, 4.2.4).

Tabulka 4.2 *Přehled nálezů rekurentních aberací dle metod detekce*

Aberace [počet vzorků s danou aberací / počet všech vyšetřených vzorků]	Celkem	Detekce analýzou karyotypu (potvrzeno FISH)	Detekce FISH na mitózách (kryptická změna, vč. iFISH)	Detekce pouze interfázickou FISH (neúsp. kult., malý subklon apod.)
Delece 13q14	235 / 386 (62%)	64 / 235 (27%)	152 / 235 (66%)	17 / 235 (7%)
Delece 11q / ATM genu	92 / 387 (24%)	85 / 92 (92,5 %)	---	7 / 92 (7,5%)
Trisomie 12	70 / 385 (18%)	68 / 70 (97%)	---	2 / 70 (3%)
Delece 17p / TP53 genu	27 / 384 (7%)	19 / 27 (70%)	---	8 / 27 (30%)

Jiná situace byla u delece 13q14, která byla analýzou karyotypu nalezena pouze ve 27% (64/235) případů s průkazem delece FISH metodou, viz také tabulka 4.2. Převaha nalezených delecí 13q14 (152/235; 66%) byla totiž pro analýzu karyotypu G-pruhováním kryptická, bylo však možné je prokázat FISH analýzou mitóz. V dalších 7% případů delecí byly tyto stanoveny pouze interfázickou FISH, z obdobných důvodů jako u ostatních aberací (viz také kap. 4.2.1).

U celkem 8 vzorků s normálním nálezem při hodnocení mitóz analýzou karyotypu i všemi FISH byl prokázán diskordantně patologický klon vyšetřením interfázických jader. Jednalo se opět buď o velmi málo zastoupené klony (9-14% zastoupení klonu na interfázických jádrech), které nebyly náhodně zachyceny při analýze mitóz ani vyšetřením karyotypu ani příslušnou FISH (3x delece ATM genu, 2x delece 13q14) nebo o případy více zastoupených klonů se submikroskopickou změnou, které nebylo možno při dané FISH hodnotit na dostatečném počtu mitóz (2x delece 13q14, 1x trisomie ATM genu). Z celkového počtu vyšetřených (resp. úspěšně vyšetřených) vzorků jde však pouze o 2% případů (8/391, resp. 8/375).

4.1.4 Klonální vývoj

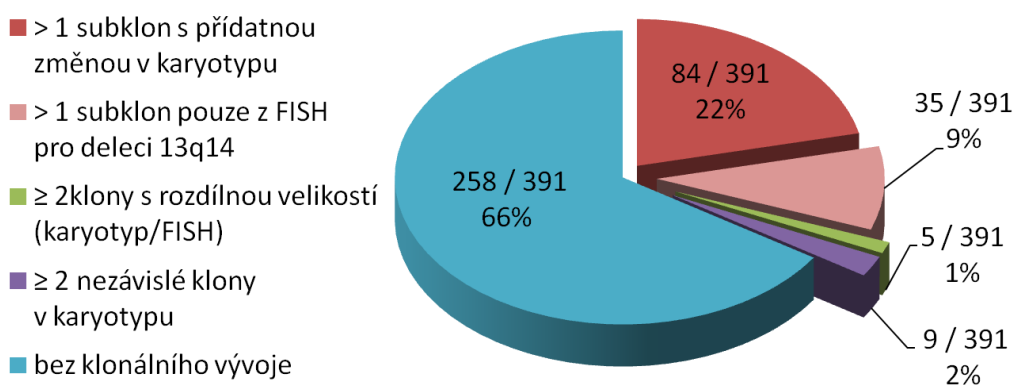
Klonální vývoj zachycený v daném vyšetření

Alespoň dva subklony přítomné současně v daném vyšetřovaném vzorku byly při analýze karyotypu a/nebo FISH nalezeny celkem u 34% (133/391) vzorků. (Pozn.: U prvních vyšetřeních všech pacientů se jednalo o 33% (112/337) vzorků). Celkový souhrn výsledků je uveden v grafu 4.2.

Největší část vzorků s přítomností více klonů (84/391; 22%) představovala postupný klonální vývoj zjištěný analýzou karyotypu s alespoň jednou společnou aberací ve dvou klonech a další přídatnou změnou v subklonu (příp. subklonech); z toho v 17 případech byl klonální vývoj detekován souběžně i sondou pro delecí 13q14.

V další části vzorků (35/391; 9%) nebyl klonální vývoj zachycen v karyotypu, ale byl prokázán pouze FISH se sondou pro delecí 13q14, tj. jednalo se buď o kryptické změny nebo malé subklony náhodně zachycené analýzou mitóz FISH metodou. 29x byly nalezeny klony s monoalelickou i bialelickou delecí 13q14 a 6x různé klony s pouze monoalelickou delecí 13q14, kdy se jednalo buď o klony s kryptickou intersticiální delecí (a) vedle klonu s translokací 13q14 s delecí v místě translokačního zlomu - 1x, (b) vedle klonu s další translokací již deletovaného chromosomu - 2x, (c) vedle klonu s rozsáhlejší intersticiální delecí - 1x a (d) jako subklon klonu s derivovaným chromosomem 12 - 1x nebo o klon s delecí 13q14 v místě translokačního zlomu se subklonem s translokací druhého homologu chromosomu 13 bez delecí 13q14 - 1x.

Minoritně (9/391 vzorků; 2%) byla zaznamenána analýzou karyotypu přítomnost alespoň dvou nezávislých klonů bez společné aberace.



Graf 4.2 *Klonální vývoj „in-situ“*

Velmi malá část případů klonálního vývoje (5/391 vzorků; 1%) byla předpokládána díky významně odlišným velikostem klonů zachycených v karyotypu a sondou pro delecí 13q14 (4x), resp. sondami pro 13q14 a ATM (1x).

Klonální vývoj v průběhu onemocnění

Nové přídavné změny v průběhu onemocnění byly nalezeny ve 46 vyšetřených vzorcích 43 pacientů, což je 23% všech vzorků vyšetřených mimo prvozáchyt onemocnění (46/193), resp. 29% pacientů (43/149).

U většiny vzorků s nově detekovaným klonálním vývojem (37/46; 80%) se jednalo o vyšetření v progresi/relapsu po léčbě, u menší části (7/46; 15%) o vyšetření v progresi před první léčbou, minoritně pak o vyšetření v parciální remisi (1/46; 2%) a při sledování bez léčby u stabilního onemocnění (1/46; 2%).

25 vzorků (25/46), resp. 25 pacientů (25/43) s nově nalezeným klonálním vývojem bylo porovnáváno oproti předchozím vyšetřením provedeným pouze interfázickou FISH (tj. oproti vyšetřením provedeným před rokem 2008; n=139 vzorků, resp. 108 pacientů), z pohledu klonálního vývoje tedy u nich mohly být posouzeny pouze přídavné rekurentní aberace stanovené opět FISH, a nikoli změny nalezené analýzou karyotypu. Nový klonální vývoj byl takto stanoven u 18% (25/139) vzorků, resp. u 23% (25/108) pacientů. U 22 vzorků (22/25) byly nalezeny tyto nově získané změny, resp. subklony s těmito změnami: delecí 13q14 (9x), delecí 2. alely 13q14 (1x), delecí ATM (6x), delecí 6q (2x), delecí TP53 (2x), delecí 2. alely 13q14 a delecí ATM (1x), trisomie ATM (1x). U zbylých 3 vzorků (3/25, všechny z progresu po léčbě) došlo ke ztrátě původně prokazované aberace/subklonu: ztráta delecí 13q14 (1x), ztráta delecí 13q14 a ATM (1x), ztráta delecí 13q14, ATM a trisomie 12 (1x).

U dalších 21 vzorků (21/46) s nově získaným klonálním vývojem, resp. u 18 pacientů (18/43, u pac. č. 113, 191, 228 byl nalezen různý klonální vývoj ve dvou následných vyšetřeních), mohlo být provedeno komplexní hodnocení nových změn FISH i vyšetřením karyotypu, neboť se jednalo o vzorky vyšetřené opakovaně ve sledovaném období (1/2008-12/2012) po stimulované kultivaci DSP30/IL2. V tomto období bylo provedeno celkem 54 opakovaných vyšetření u 41 pacientů, klonální vývoj v průběhu onemocnění byl tedy konstatován u 39% vzorků (21/54), resp. u 44% pacientů (18/41). Analýzou karyotypu byl klonální vývoj nalezen 10x (10/21), analýzou karyotypu i FISH 5x (5/21), pouze FISH (kryptické změny 13q14) 6x (6/21); pokud by tedy bylo provedeno hodnocení pouze FISH, byly by nové změny v této skupině nalezeny pouze u 20% (11/54) vzorků, resp. 24% (10/41) pacientů. Znamky

nalezeného klonálního vývoje byly rozděleny do 3 skupin: nové přídatné změny/subklony k původnímu nálezu (13x, viz tabulka 4.3, část A), vymizení jednoho ze subklonů (6x, viz tabulka 4.3, část B) a nové změny společně se ztrátou předchozích (2x, viz tabulka 4.3, část C).

Tabulka 4.3 *Klonální vývoj v průběhu onemocnění*

č. pac.	Karyotyp dle ISCN, včetně krypt. změn stanovených pouze FISH	Infiltr. dle FACS	Karyotyp dle ISCN, včetně krypt. změn stanovených pouze FISH	Infiltr. dle FACS	Odstup mezi vyšetř.
A /	Původní nález		Nález s novou přídatnou změnou		
11	46,XY[15]	70% progrese po léčbě	46,XY,der(6)t(2;6) (p13;q25-27)[15] . ish del(13)(q14q?14) (D13S319-,LAMP1+)[3/15]	81% progrese po léčbě	45 měs. (mezi vyš. další léčba)
20	46,XY,del(11)(q21q23), del(13)(q12q14)[10] /46,XY[5]	35% záchyt	46,XY,del(11)(q21q23), del(13)(q12q14)[1] /46,idem,del(18)(p?11.1)[6] /46,idem,der(18)t(2;18) (?p11.2;p?11.?) [12]/46,XY[1]	70% progrese před léčbou	50 měs. (bez léčby)
23	46,XY[15] . ish del(13)(q14q?14) (D13S319-,LAMP1+)[13/15]	93% progrese po léčbě	46,XY,add(1)(p32)[5] /46,XY[2] . ish del(13)(q14q?14) (D13S319-,LAMP1+)[1/6]	60% rezistentní na léčbu	12 měs. (bez nové léčby)
26	46,XY,del(6)(q14q22)[6] /46,XY,del(6)(q14q24)[4] /46,XY[5] . ish(ATMx2,TP53x1) [2/26]**	57% progrese před léčbou	46,XY,t(10;11)(q26;q21)[14] /46,XY[6] . nuc ish(D6Z1x2,SEC63x1) [65/100],(ATMx2,TP53x1) [11/100]**	80% progrese po léčbě	36 měs. (mezi vyš. zahájena léčba)
29	45,XY,del(8)(p?21), der(17;18)(q10;q10)[4] /46,XY[11]	24% záchyt	45,XY,del(8)(p?21), der(17;18)(q10;q10)[12] /45,X,-Y,del(3)(q13),del(8) (p?21),der(9)t(3;9)(p21;p13), del(17)(p11)[3]	66% progrese po léčbě	46 měs. (mezi vyš. zahájena léčba)
87	46,XX,der(1)t(1;13) (q25;q33),der(13)t(1;13) (q25;q13)[15]. ish der(1)t(1;13)(D13S319-, LAMP1+)[19/20]	57% progrese po léčbě	46,XX,der(1)t(1;13)(q25;q33), der(13)t(1;13)(q25;q13)[13] /46,idem,del(13)(q?14q21)[2] . ish der(1)t(1;13)(D13S319-, LAMP1+)[17/20]/idem,del(13) (q?14q21)(D13S319-, LAMP1+)[2/20]	90% progrese po léčbě	38 měs. (bez nové léčby)

Tabulka 4.3 – pokračování

99	46,XY,del(11)(q21q23)[4] /46,XY[2] .ish del(13)(q14q14) (D13S319-,LAMP1+)[10/11]	43% progrese po léčbě	46,XY,del(11)(q14q24)[4] /43-45,idem,-1,-3,add(4) (p?10),add(5)(q?ter),?del(6) (q13),-10,-14,-17, +1-3mar[cp9]/46,XY[2] .ish del(13)(q14q14) (D13S319-,LAMP1+)[13/15]	65% progrese po léčbě	18 měs. (bez nové léčby)
113	46,XY[15].ish del(13)(q14q?14)(D13S319-, LAMP1+)[5/15]	35% parciální remise	46,XY,del(1)(?p34),der(11) t(1;11)(?p34;p15)[3] /46,XY[14] .ish del(13)(q14q?14) (D13S319-,LAMP1+)[7/15]	90% progrese po léčbě	18 měs. (bez nové léčby)
130	46,XY,del(6)(q13)[21] /46,XY[1]	53% záchyt	46,XY,del(6)(q13)[17] /46,idem,add(16)(qter)[3]	80% progrese před léčb.	20 měs. (bez léčby)
191	46,XY,der(3)t(3;8)(p22;q21), der(11)t(11;14)(q12;q32), der(14)t(11;14)(q12;q32)del (11)(q22q23)[cp13]/46,XY[7]	20% relaps	46,XY,der(3)t(3;8)(p22;q21), der(11)t(11;14)(q12;q32), der(14)t(11;14)(q12;q32) del(11)(q22q23)[10]/45,idem, add(8)(p10),-13[4]/46,XY[1] .ish (D13S319x1,LAMP1x1) [4/16]/del(13)(q14q?14) (D13S319-,LAMP1+)[4/16]	48% relaps	9 měs. (bez nové léčby)
213	47,XY,+12[3]/46,XY,der(1) del(1)(p3?)t(1;8)(q41;?), der(8)?del(8)(p?)t(8;11) (q24;q?)-11,+der(12)ins (12;1)(q24;p?)t(1;11) (p?;?)[12]/46,XY[2] .ish del(13)(q?14q14) (D13S319-,LAMP1+)[5/10]	90% progrese po léčbě	48,XY,der(1)del(1)(p3?)t(1;8) (q41;?),+der(1)del(1)(p21)ins (1;4)(q13;q12q26-28),der(4) t(1;4)(?p34;q13),der(8)del(8) (p?)t(8;11)(q24;q?)-11, +der(12)ins(12;1)(q24;p?) t(1;11)(p?;?),+mar[5] /48,idem,del(13)(q13q22)[7] /46,XY,der(1)del(1)(p3?)t(1;8) (q41;?),+der(1)del(1)(p3?) t(1;8)(q41;?),?-5,der(8)del(8) (p?)t(8;11)(q24;q?)-11, +der(12)ins(12;1)(q24;p?) t(1;11)(p?;?) [2] .ish del(13)(q?14q14) (D13S319-,LAMP1+)[1/2]	74% progrese po léčbě	12 měs. (bez nové léčby)
228	46,XY[17] .ish del(13)(q14?q14) (D13S319-,LAMP1+)[12/15]	90% progrese po léčbě	46,XY,der(1)(1pter→1p36.1: :1q22-24→1p31::1q4? →1qter),der(16)(16pter→ 16qter::1q?32→1q22-24: :1p36.1→1p31:)[17]/46,XY[2] .ish del(13)(q14?q14) (D13S319-,LAMP1+)[4/15]	70% rezistentní na léčbu	13 měs. (bez nové léčby)

Tabulka 4.3 – pokračování

259	46,XY,del(11)(q14)[4] /46,sl,der(12)t(12;?)(p13;?) [1]/45,sd1,-6,del(6) (q21q25),der(8)t(6;8) (q13;p12)[3] /46,sl,del(6)(q13)[3] /46,sl,-6,der(?8)t(?8;10) (?q22;q23),der(10)t(?8;10) (?q22;q2?1),+mar[2] /46,XY[6]	75% záchyt progrese po léčbě	46,XY,del(11)(q14)[6] /45,sl,-6,del(6)(q21q25), der(8)t(6;8)(q13;p12), der(12)t(12;?)(p13;?) [2] /46,sl,del(6)(q13)[4] /?46,sl,-6,der(?8)t(?8;10) (?q22;q23),der(10)t(?8;10) (?q22;q2?1),?+mar[2] /46,XY[9].ish der(?)t(13;?) (D13S319-,LAMP1+)[4/20]	51% progrese po léčbě	7 měs. (mezi vyš. zahájena léčba)
B /	Původní nález		Nový nález bez původní změny		
16	49,XY,+12,+18,+19[20] .ish del(13)(q14q?14) (D13S319-,LAMP1+)[2/30]	63% progrese po léčbě	49,XY,+12,+18,+19[15]	50% progrese po léčbě	7 měs. (bez nové léčby)
28	46,XY,del(11)(q22q23)[13] /46,XY[2] .ish del(13)(q?14q14) (D13S319-,LAMP1+)[4/40]	90% progrese před léčbou	46,XY,del(11)(q22q23)[17] /46,XY[3]	68% progrese po léčbě	37 měs. (mezi vyš. zahájena léčba)
113 / II	46,XY, del(1)(?p34),der(11) t(1;11)(?p34;p15)[3] /46,XY[14] .ish del(13)(q14q?14) (D13S319-,LAMP1+)[7/15]	90% progrese po léčbě	46,XY[15] .ish del(13)(q14q?14) (D13S319-,LAMP1+)[9/15]	58% parciální remise	7 měs. (mezi vyš. další léčba)
129	40-45,XY,der(4)t(4;6) (q3?5;q2?1),-6,del(7) (q32),der(17)t(6;17)(?;p11), +1-5mar[cp14]/46,XY[6] .ish del(13)(q?14q14) (D13S319-,LAMP1+)[12/15] /+13(D13S319+,LAMP1+), del(13)(q?14q14)(D13S319-, LAMP1+)x2,+12(D12Z1+)x2 [3/15].nuc ish(ATMx2, TP53x1)[85/100]/ (ATMx4, TP53x2)[6/100],(D13S319x1 ,LAMP1x2)[84/100] /(D12Z1x4,D13S319x2, LAMP1x4)[5/100]**	60% progrese po léčbě	44,XX,der(4)t(4;6)(q3?5;q2?1), -6,der(17)t(6;17)(?;p11), inc[cp11]/46,XY[3] .ish del(13)(q14q14) (D13S319-,LAMP1+)[8/15]	25% progrese po léčbě	12 měs. (mezi vyš. další léčba)
191 / II	46,XY,der(3)t(3;8)(p22;q21), der(11)t(11;14)(q12;q32), der(14)t(11;14)(q12;q32)del (11)(q22q23)[10]/45,idem, add(8)(p10),-13[4]/46,XY[1] .ish del(13)(q14q?14) (D13S319-,LAMP1+)[4/16]	48% relaps	46,XY,der(3)t(3;8)(p22;q21), der(11)t(11;14)(q12;q32), der(14)t(11;14)(q12;q32) del(11)(q22q23)[6]/45,idem, add(8)(p10),-13[7]/46,XY[7]	40% relaps	13 měs. (mezi vyš. další léčba)

Tabulka 4.3 – pokračování

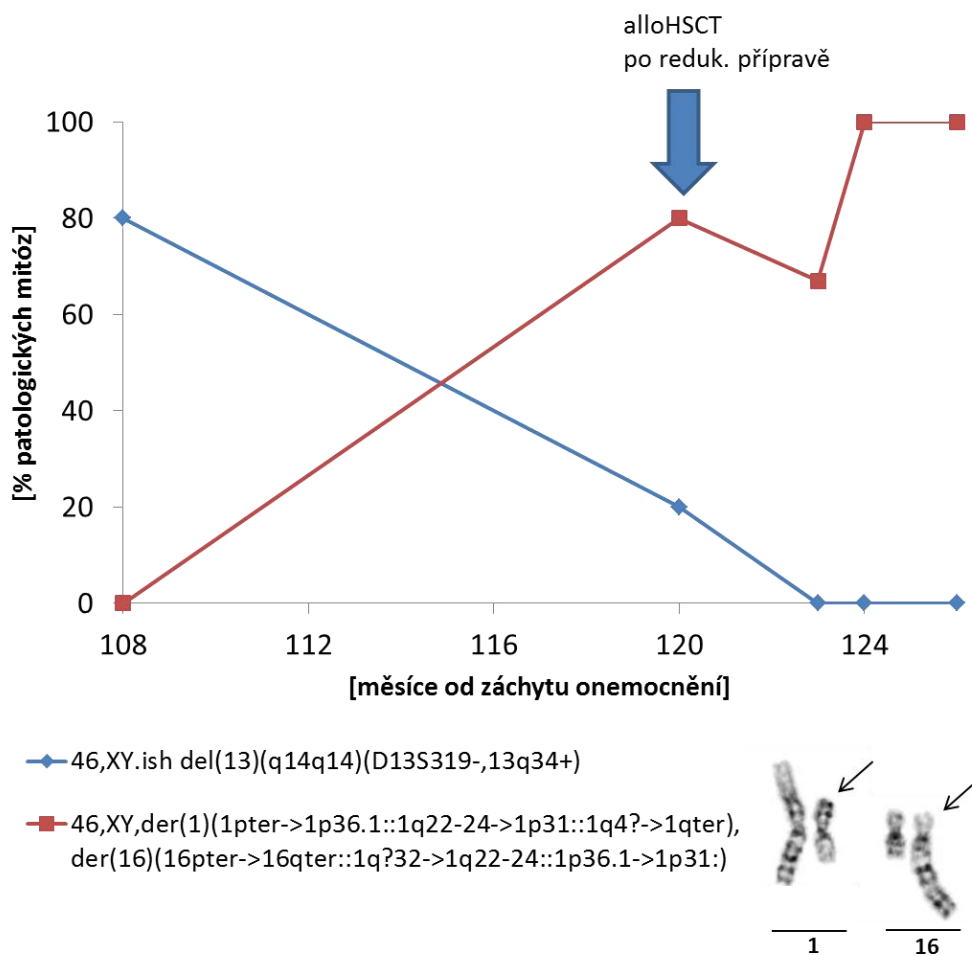
228 / II	46,XY,der(1)(1pter→1p36.1: :1q22-24→1p31: :1q4? →1qter), der(16)(16pter→16qter: :1q?32→1q22-24: :1p36.1→1p31:)[17] /46,XY[2].ish del(13)(q14?q14) (D13S319-,LAMP1+)[4/15]	70% rezistentní na léčbu	46,XY,der(1)(1pter→1p36.1: :1q22-24→1p31::1q4? →1qter), der(16)(16pter→16qter: :1q?32→1q22-24: :1p36.1→1p31:)[12] /46,XY[6]	30%* progrese po léčbě	3 měs. (mezi vyš. další léčba)
C /	Původní nález		Nový nález bez původní změny a s novými změnami		
53	46,XX, der(11)del(11)(p11) t(11;13)(q21;q14),der(13) t(11;13)(q21;q14)[5] /46,XX[15] .ish der(11)t(11;13)del(11) (D13S319-,LAMP1+)[4/41]	36% progrese před léčbou	45,XX, der(17;18)(q10;q10)[7] /45,XX, der(4)t(4;17) (p16;q11),-17[4]/46,XX[10]	48% progrese po léčbě	43 měs. (mezi vyš. zahájena léčba)
136	46,XY,der(9)t(2;9)(p11;q34), t(13;14)(q14;q32)[11] /46,idem, del(11)(q14q22) [4] .ish der(14)t(13;14) (D13S319-,LAMP1+)[15]	86% progrese po léčbě	46,XY,der(9)t(2;9)(p11;q34), t(13;14)(q14;q32)[11] /46,idem,?add(6)(qter)***, inc[10] .ish der(14)t(13;14)(D13S319- LAMP1+)[15/17] /idem, del(13)(q14q?14) (D13S319-,LAMP1+)[2/17]	90% progrese po léčbě	30 měs. (mezi vyš. další léčba)

* delece 13q14 nezachycena ani v následných vyšetřeních s infiltrační 36%, resp. 85%, viz také graf 4.3

** u kryptických změn TP53 (resp. v karyotypu nezachycených subklonů) je u FISH dále uveden výsledek i pro gen ATM (zde jako kontrolní sonda)

*** derivovaný chromosom 6 nebyl jednoznačně prokázán

Příkladem různého klonálního vývoje nalezeného v následných vyšetřeních je pac. č. 228, u kterého byl zpočátku prokazován normální karyotyp CLL buněk s kryptickou intersticiální delecí 13q14. První známkou klonálního vývoje byla přítomnost nového (sub)klonu s derivovanými chromosomy 1 a 16 vedle stávajícího (sub)klonu s kryptickou delecí 13q14. V následných vyšetřeních došlo k vymizení subklonu s delecí 13q14 a expanzi klonu s derivovanými chromosomy 1 a 16 – viz graf 4.3.



Graf 4.3 *Příklad klonálního vývoje v průběhu onemocnění*

Výsledky vyšetření celkem 5 následných vyšetření u pacienta č. 228 (po 108, resp. 120, 123, 124 a 126 měs. od diagnózy). Před zde uvedeným prvním vyšetřením (ve 108 měs.) pacient absolvoval léčbu FCR, v průběhu sledovaného období pak alloHSCT po redukované přípravě (označena šipkou). Ve všech vyš. byla bez ohledu na léčbu přetrvávající infiltrace kostní dřeně CLL buňkami 30% - 90% dle FACS.

4.1.5 Komplexní změny

Komplexní změny, definované jako přítomnost alespoň 3 aberací, byly nalezeny u 28% vzorků (111/391). (Pozn.: Mezi prvními vyšetřeními všech pacientů byly komplexní změny nalezeny v 27% (90/337) vzorků).

V převaze případů byly komplexní změny stanoveny analýzou karyotypu (82/391; 21%), u části vzorků (29/391;7%) byly nalezeny kombinací nálezů v karyotypu a FISH pro delecii 13q14.

Ztráta TP53 genu byla nalezena u 18% (19 z 107 vyšetřených vč. FISH) vzorků s komplexními změnami; oproti tomu v celém souboru byla ztráta TP53 detekována pouze v 7% vzorků (27 z 384 vyšetřených vč. FISH, P 0,002; viz také kap. 4.2.4)

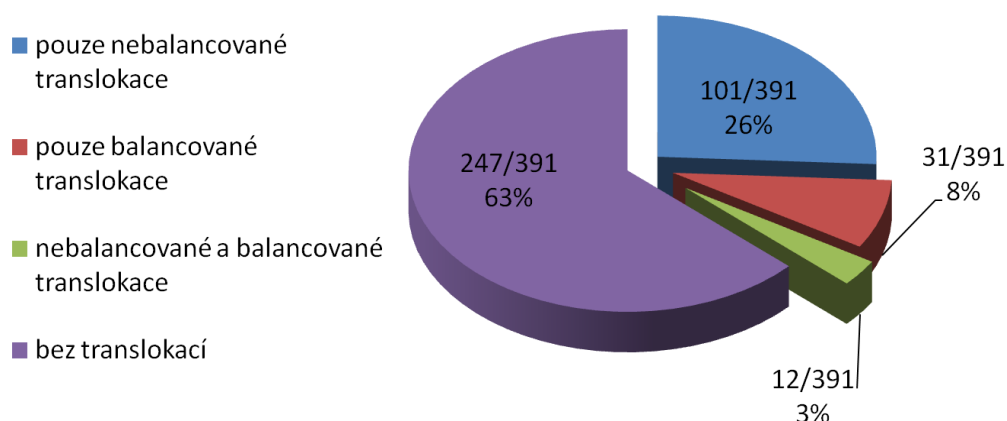
Častěji ve srovnání s celým souborem byla také ve skupině vzorků s komplexními změnami nacházena delece ATM genu (53/107; 50% vs. 92/387; 24%, P 0,0000006) a delece 6q (20/111; 18% vs. 33/391; 8%, P 0,008); viz také kap. 4.2.2. resp. 4.2.5.

Trisomie 12 byla ve vzorcích s komplexními změnami nacházena ve srovnatelné míře s celým vyšetřeným souborem (22/107; 21% vs. 70/385; 18%, P 0,89); viz také kap. 4.2.3.

Delece 13q14 byla ve vzorcích s komplexními změnami, včetně zahrnutí nálezů FISH pro 13q14, nacházena ve zvýšené míře než v celém vyšetřeném souboru (83/109; 76% vs. 235/386; 62%, P 0,002), což je však ovlivněno právě zahrnutím i nálezů FISH pro 13q14 (zde 29/29 vzorků je zároveň s komplexními změnami i s delecí 13q14). Ve skupině komplexních změn stanovených (pouze) analýzou karyotypu nebyl prokázán významný rozdíl v zastoupení delecí 13q14 (54/80; 67% vs. 235/386; 62%, P 0,31). Pro další hodnocení souvislosti delece 13q14 (vč. jejího rozsahu) a komplexních změn viz také kap. 4.2.1.

4.1.6 Chromosomové translokace

Chromosomové translokace byly prokázány u 37% (144/391) vyšetřených vzorků. Převahu detekovaných translokací tvořily translokace nebalancované, které byly nalezeny v 26% (101/391) vzorků a v dalších 3% vzorků (12/391) současně s balancovanými translokacemi. Samotné balancované translokace byly nalezeny v 8% (31/391) vzorků, viz graf 4.4.



Graf 4.4 *Přítomnost translokací*

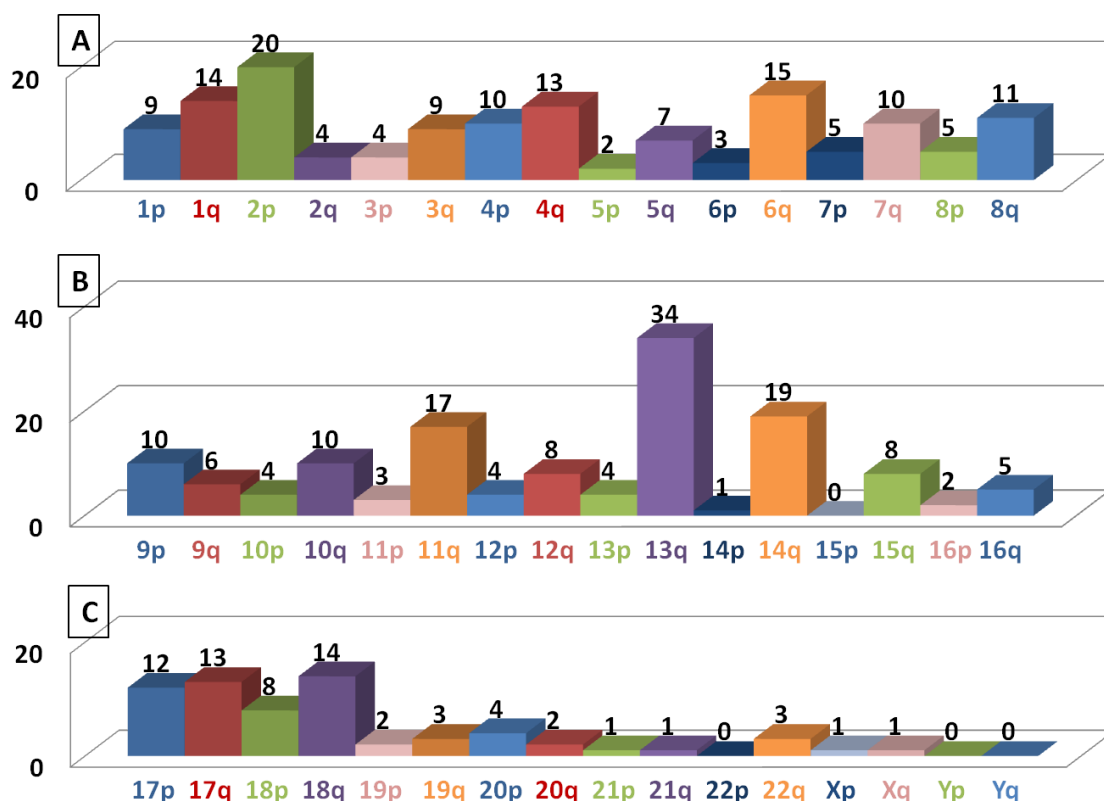
Podíl vzorků s pouze nebalancovanými translokacemi tedy činil 70% (101/144) ze vzorků s prokázanými translokacemi, podíl balancovaných translokací 22% (31/144), podíl vzorků s balancovanými i nebalancovanými translokacemi 8% (12/144).

Celkem bylo ve všech vyšetřených vzorcích nalezeno 263 translokací s průměrem 1,83 translokace/vzorek (263/144).

Po vyloučení duplicit u opakovaných vyšetření bylo nalezeno 218 translokací u 121 pacientů, tj. translokace byly nalezeny u 36% (121/337) pacientů s průměrem 1,80 translokace/pacienta (218/121). Z uvedeného počtu 121 pacientů byly u 6 pacientů v opakovaných vyšetření nalezeny nové přídatné translokace k translokacím prokázaným v předcházejících vyšetřeních. Pro srovnání, mezi pouze prvními vyšetřeními pacientů byly translokace nalezeny v 33% (112/337) vzorků.

Pouze nebalancované translokace byly nalezeny u 74% pacientů s prokázanými translokacemi (89/121), pouze balancované u 19% pacientů (23/121), balancované i nebalancované u 9 pacientů (7%), tj. obdobně jako pro celý soubor vzorků (viz výše).

U nalezených 218 translokací bylo určeno 341 míst translokačních zlomů. Více než 10x byly zlomy prokázány na 13q (34x), 2p (20x), 14q (19x), 11q (17x), 6q (15x), 1q (14x), 18q (14x), 4q (13x), 17q (13x), 17p (12x), 8q (11x), 4p (10x), 7q (10x), 9p (10x), 10q (10x), podrobné výsledky viz graf 4.5.



Graf 4.5 Četnost translokačních zlomů

Nebalancovaných translokací bylo nalezeno celkem 185 (185/218; 85%). Nebyly nacházeny jako opakující se přestavby, velmi často se však jednalo o translokace se zlomy v místech rekurentních delecí (13q, 11q, 6q, 17p) s různými translokačními partnery. Zatímco nalezené translokace (resp. translokační zlomy) 11q a 6q byly spojeny s rekurentní delecí v méně než polovině případů (8/17 u translokace 11q, 5/15 u translokace 6q), u translokací 13q a translokací 17p to bylo naopak v převaze zachycených případů (29/34 zlomů u translokace 13q, 9/12 u translokace 17p). K dalším případům ztráty 17p (TP53) došlo u většiny translokací se zlomy popisovanými v 17q (8/13; 4x centrická fúze, 4x nebalancovaná translokace 17q11 se ztrátou 17p i centromery). Podrobné výsledky pro nalezené nebalancované translokace spojené s rekurentními delecemi viz kapitoly 4.2.1., 4.2.2., 4.2.4. a 4.2.5.

20x byla nalezena translokace 2p, z toho 15x (15/391; 4%) se jednalo o nebalancovanou translokaci vedoucí k zisku (trisomii) rozsáhlé oblasti 2p (se zlomy v oblasti 2p11-2p13, tj. zisk 2p11/2p13 → 2pter).

Balancovaných translokací bylo nalezeno 33 (33/218; 15%); v téměř jedné třetině z nich (9/33; 27%) se jednalo o translokace s průkazem FISH zlomu IGH@ genového shluku, ve dvou dalších případech (2/33) o předpokládanou translokaci IGK@ a v jednom případě (1/33) o předpokládanou translokaci IGL@, konkrétní údaje viz tabulka 4.4. Celkově byla tedy nalezena translokace imunoglobulinových genů u 3,5% (12/337) pacientů, resp. u 4% všech vyšetřených vzorků (16/391).

Tabulka 4.4 *Translokace imunoglobulinových genů*

Nalezená translokace	Četnost	Typ Ig genu	Partnerský gen
t(8;14)(q24;q32)	3x	IGH@ (potvrzeno FISH)	MYC (potvrzeno FISH)
t(14;18)(q32;q21)	2x	IGH@ (potvrzeno FISH)	BCL2
t(2;14)(p13;q32)	1x	IGH@ (potvrzeno FISH)	?
t(11;14)(q13;q32)	1x	IGH@ (potvrzeno FISH)	CCND1 (potvrzeno FISH)
t(14;19)(q32;q13)	1x	IGH@ (potvrzeno FISH)	BCL3
t(14;22)(q32;q11)	1x	IGH@ (potvrzeno FISH)	?
t(2;18)(p12;q21)	2x	IGK@	BCL2
t(19;22)(q13;q11)	1x	IGL@	BCL3

4.1.7 Souvislost s progresivitou onemocnění

(komplexní změny, klonální vývoj, chromosomové translokace)

Ve skupině vzorků vyšetřených v progresi před léčbou, v parciální remisi nebo v progresi či relapsu po léčbě, případně u rezistentního onemocnění (n=173) byly ve srovnání se vzorky z prvozáhytu onemocnění nebo stabilní choroby bez léčby (n=218) statisticky významně častěji prokazovány translokace (P 0,000003) a komplexní změny nalezené pouze analýzou karyotypu (P 0,00001). Komplexní změny se zahrnutím kryptických změn 13q14 zjištěných FISH byly u vzorků z progredujících onemocnění rovněž nacházeny významně častěji (P 0,0002). Také přítomnost více subklonů ve vzorku byla nacházena u progresivních onemocnění častěji (P 0,05), podrobné údaje viz tabulka 4.5, část A.

Při vyloučení opakovaných vyšetření a zhodnocení pouze prvních vyšetření všech pacientů (celkem n=337, v záhytu či bez léčby n=218, v progresi, relapsu, rezistentních n=119) je souvislost přítomnosti translokací a komplexních změn s progresivitou onemocnění stále velmi významná: pro translokace 58/218 vs. 54/119, P 0,0007, pro komplexní změny se zahrnutím kryptické delecce 13q14 45/218 vs. 45/119, P 0,0008, pro komplexní změny nalezené pouze v karyotypu 28/218 vs. 36/119, P 0,0001. Klonální vývoj nalezený „*in situ*“ je pak u progresivních onemocnění nacházen sice častěji, avšak bez statisticky jednoznačného průkazu (65/218 vs. 47/119, P 0,09).

Tabulka 4.5 *Souvislost nalezených změn s progresivitou onemocnění*

A / Celkem vyšetřené vzorky (n=391)	záhyt / bez léčby (n=218)	progrese / relaps / PR / rezistentní (n=173)	P Fisherův exaktní test
Translokace (≥ 1; nebalanc./balanc., n=144)	58 / 218	86 / 173	P 0,000003
Komplexní změny celkem (≥ 3 aberace vč. FISH 13q14, n=111)	45 / 218	66 / 173	P 0,0002
Komplexní změny v karyotypu (≥ 3 aberace, n=82)	28 / 218	54 / 173	P 0,00001
Klonální vývoj „<i>in situ</i>“ (≥ 2 subklony)	65 / 218	68 / 173	P 0,05

Tabulka 4.5 – pokračování

B / Vzorky vyšetřené mimo prvozáchyt (n=193)	bez léčby (n=20)	progrese / relaps / PR / rezistentní (n=173)	P Fisherův exaktní test
Klonální vývoj během onemocnění (≥ 1 klonální změna FISH od předchozího vyš., n=46)	1 / 20	45 / 173	P 0,05
C / Vzorky pacientů vyšetřených opakovaně po stimulované kultivaci (n=54)	parciální remise (n=11)	progrese / relaps / rezistentní (n=43)	P Fisherův exaktní test
Klonální vývoj během onemocnění (≥ 1 klonální změna od předchozího vyš., n=21)	1 / 11	20 / 43	P 0,04

Nový klonální vývoj v průběhu onemocnění byl obdobně častěji nalezen u vzorků progresivních onemocnění ve srovnání s opakovaným vyšetřením stabilních onemocnění (P 0,05; celkem 193 vyšetření mimo prvozáchyt onemocnění, z toho stabilní onemocnění bez léčby n=20, progrese před léčbou/po léčbě/relaps/rezistentní onemocnění, příp. PR n=173), viz tabulka 4.5, část B.

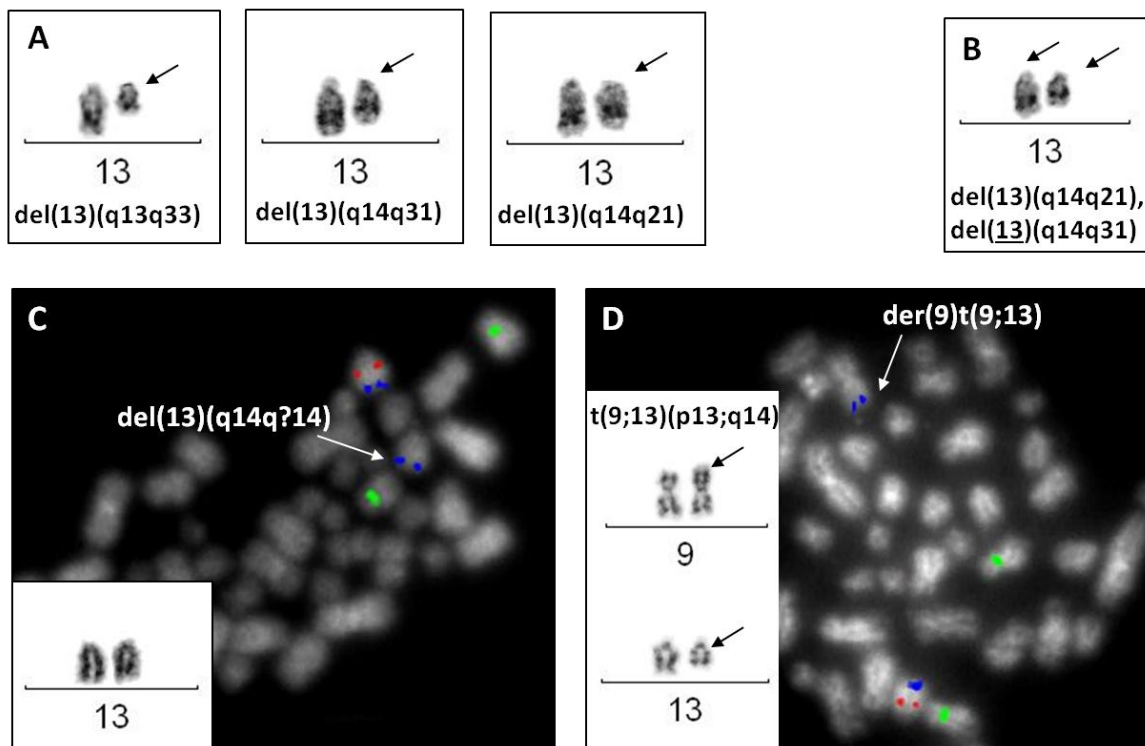
I v opakovaných vyšetřeních pacientů po stimulované kultivaci (ve sledovaném období 1/2008-12/2012) byl prokázán nový klonální vývoj významně častěji ve vzorcích progredujících onemocnění než u vzorků odebraných v parciální remisi (P 0,04; celkem 54 vyšetření, z toho v parciální remisi n=11, v progresi/relapsu /rezistentní n=43), viz tabulka 4.5, část C.

4.2 Studium rekurentních strukturních aberací

4.2.1 Delece 13q14

Přehled nálezů vyšetřením karyotypu a základním vyšetřením FISH (D13S319)

Delece 13q14 byla prokázána celkem u 62% (235/386) vzorků, resp. u 61% (209/336) pacientů (včetně případů delece 13q14 jako nové změny v opakovaných vyšetřeních). Byla nacházena velká variabilita rozsahu delece 13q14, viz obrázek 4.1.

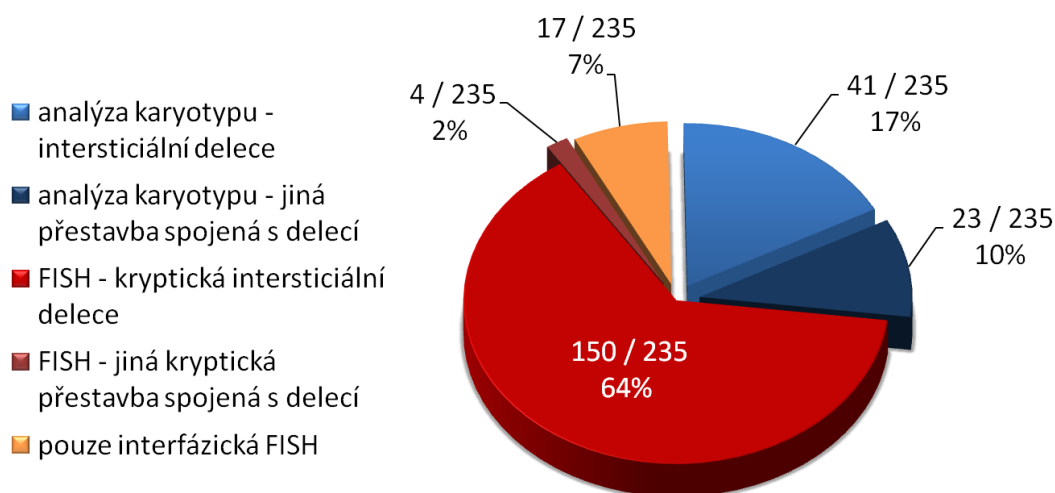


Obrázek 4.1 Variabilita rozsahu delece 13q14

A různé rozsahy monoalelické intersticiální delece, **B** bialelická intersticiální delece (A i B detekce vyšetřením karyotypu), **C** kryptická monoalelická intersticiální delece (karyotyp s normálním nálezem, FISH se ztrátou jednoho červeného signálu pro lokus D13S319 a se zachováním modrého kontrolního signálu v oblasti 13qter), **D** monoalelická delece v místě translokačního zlomu reciproké translokace (karyotyp se zdánlivě balancovanou reciprokou translokací, FISH se ztrátou jednoho červeného signálu pro lokus D13S319 a přesunem kontrolního modrého signálu pro 13qter na translokačního partnera); zelený signál značí v rámci zvoleného vyšetřovacího kitu centromeru chromosomu 12

Analýzou karyotypu (potvrzenou i FISH sondou pro D13S319 v MDR) byla nalezena intersticiální delece většího rozsahu u 17% (41/235) vzorků s delecí 13q14 a jiná přestavba chromosomu 13 spojená se ztrátou 13q14 (translokace s delecí v místě zlomu, monosomie 13) u 10% (23/235) vzorků s delecí. Kryptická intersticiální delece detekovaná pouze FISH byla zjištěna u 64% (150/235) vzorků, u 2% (4/235) vzorků jiná kryptická přestavba 13q14 spojená se ztrátou 13q14 a u zbývajících 7% (17/235) vzorků byla nalezena delece 13q14 pouze interfázickou FISH bez možnosti posouzení

na mitózách (6x neúspěšná kultivace, 11x nedostatek mitóz při FISH analýze/malý subklon). Pro přehled uvedených výsledků viz graf 4.6.



Graf 4.6 *Delece 13q14 dle metody detekce*

Komplexní změny karyotypu (≥ 3 aberace zjištěné analýzou karyotypu a FISH pro 13q14) byly nalezeny u 35% vzorků (83/235) s delecí 13q14, resp. (≥ 3 aberace zjištěné pouze analýzou karyotypu) u 23% vzorků (54/235).

Samostatná delece 13q14

Samostatná intersticiální delece 13q14 jako jediná změna karyotypu byla nalezena u 39% (91/235) vzorků s prokázanou delecí 13q14, resp. u 24% (91/387) všech vyšetřených vzorků; z toho 16x byla zjištěna analýzou karyotypu a 75x pouze FISH při normálním karyotypu. Ve skupině samostatných delecí 13q14 byly, ve srovnání se skupinou všech zjištěných delecí 13q14, významně častěji zastoupeny vzorky odebrané v prvozáchytu či při stabilním průběhu onemocnění (65/91, 71% vs. 133/235, 57%, $P 0,02$); ještě významnější rozdíl byl nalezen při srovnání se skupinou delecí 13q14 v rámci komplexních změn karyotypu (65/91, 71% vs. 34/83, 41%, $P 0,0006$).

Rozsáhlá vs. kryptická delece 13q14 – posouzení souvislosti s progresivitou

Ve skupině vzorků s rozsáhlejší intersticiální delecí 13q14 či s jinou přestavbou chromosomu 13 spojenou se ztrátou 13q14 (s translokací s delecí v místě zlomu, s monosomií 13), detekovanými analýzou karyotypu, byly v porovnání se skupinou kryptických delecí, stanovených FISH, nacházeny statisticky významně častěji komplexní změny karyotypu (24/64; 37% vs. 26/154; 17%, $P 0,001$), u komplexity zjištěné kombinací analýzy karyotypu a kryptických změn pro FISH 13q14 se jednalo pouze o trend (29/64; 45% vs 48/154; 31%, $P 0,06$).

Ve skupině rozsáhlejších delecí 13q14 (detekovaných analýzou karyotypu) byly, oproti delecím kryptickým, také mírně častěji zastoupeny vzorky progredujících onemocnění (vzorky z progresu před zahájením léčby, z progresu po léčbě, relapsu či rezistentního onemocnění) (34/64; 53% vs. 60/154; 39%, P 0,07).

Různé formy delece 13q14

U 77% (182/235) vzorků s delecí 13q14 byla prokázána delece pouze jedné alely, u 16% (37/235) vzorků současná přítomnost klonů s mono i bialelickou delecí a u 7% (16/235) vzorků delece bialelická.

Podrobnou analýzou mitóz (karyotypu a FISH pro 13q14) byla sledována různá forma výskytu delece 13q14, pro celkový přehled viz graf 4.7.

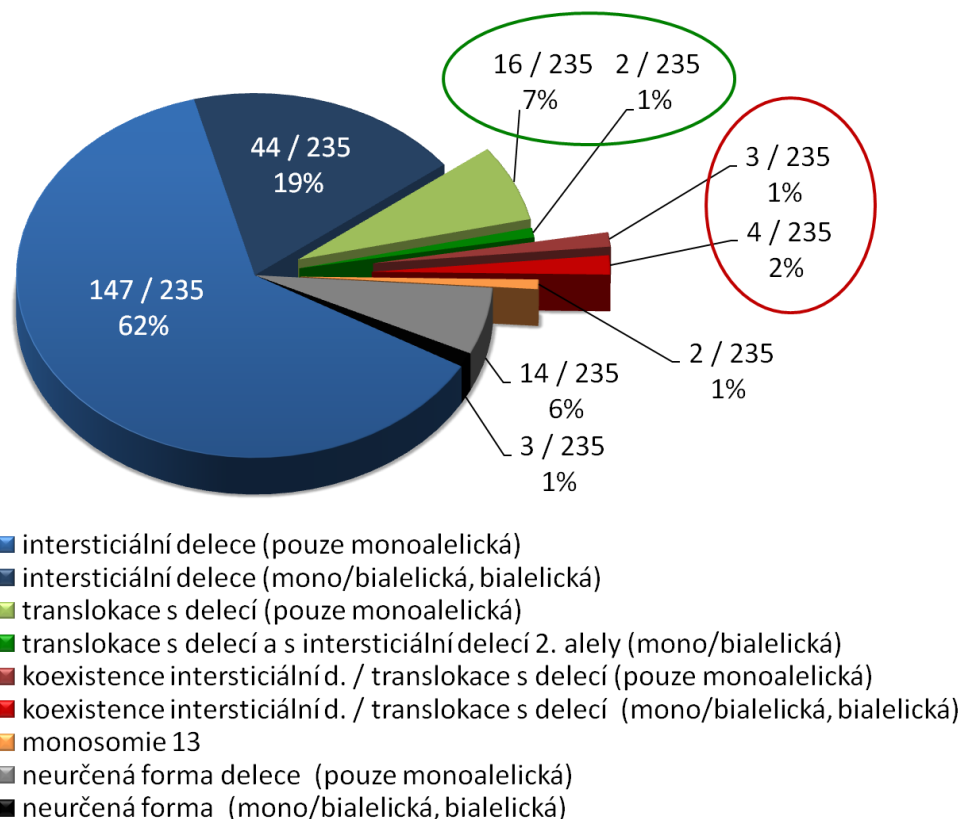
V převaze případů delece (191/235; 81%) byla nalezena delece intersticiální (monoalelická 147x, mono/bialelická či bialelická 44x).

V 7% (16/235) případů ztráty 13q14 byla nalezena translokace 13q14 s průkazem (monoalelické) delece v místě translokačního zlomu reciproké translokace. 7x se jednalo o reciprokou translokaci zdánlivě balancovanou dle karyotypu s průkazem delece v místě zlomu FISH (viz tabulka 4.6, část A, pac. č. 5, 53, 93, 136, 225, 240, 330), 5x o přestavbu se 3 a více zlomy i dle karyotypu (pac. č. 58, 87, 97, 252, 257), 4x o kryptickou translokaci detekovanou pouze FISH (pac. č. 277, 259, 307, 326). V dalším 1% (2/235) případů byla prokázána translokace 13q14 s delecí v místě zlomu s delecí druhé alely kryptickou intersticiální delecí, v obou nalezených případech se jednalo o opakovaná vyšetření výše uvedených pacientů s nově detekovanou delecí druhé alely (pac. č. 87/II, 136/II). V grafu 4.7 jsou příslušná data zvýrazněna v zeleném oválu, pro přehled všech konkrétních nálezů dle ISCN viz tabulka 4.6, část A.

U dalších celkem 3% (7/235) vzorků s delecí 13q14 byla nalezena koexistence klonů s intersticiální delecí a klonů s delecí v místě translokačního zlomu (3x pouze na monoalelické úrovni - v tabulce 4.6, část B pac. č. 62, 204, 260, 4x na mono/bialelické úrovni – pac. č. 94, 131, 219, 335). V šesti vzorcích (6/7) se jednalo o reciproké translokace (celkem 7 translokací, u pac. č. 94 nalezeny 2 translokace) zdánlivě balancované dle karyotypu s průkazem delece v místě zlomu FISH, v jednom případě (1/7) došlo ke ztrátě derivovaného chromosomu 13 (pac. č. 219). V grafu 4.7 jsou data týkající se koexistence obou forem delece zvýrazněna v červeném oválu; pro přehled všech nálezů vyšetřením karyotypu a základním vyšetřením FISH pro 13q14 (lokus D13S319) viz tabulka 4.6, část B.

V 1% (2/235) případů se ztrátou 13q14 byla nalezena monosomie 13.

U zbývajících 7% (17/235) vzorků s delecí nebylo možné formu delece určit (delece byla detekována pouze interfázickou FISH, 14x monoalelická, 3x mono/bialelická či bialelická).



Graf 4.7 Delece 13q14 dle formy (mechanismu vzniku)

Celkem bylo nalezeno 24 translokací 13q14 s delecí v místě translokačního zlomu (tabulka 4.6) s 29 zjištěnými zlomy 13q (25x analýzou karyotypu, 4x pouze FISH). 20 translokací bylo popsáno s jedním zlomem na jednom partnerském chromosomu (vč. pac. 87 se dvěma zlomy na 13q; tj. 20 partnerských zlomů a 21 zlomů 13q) a 4 translokace s komplexní přestavbou s více zlomy mezi více než dvěma chromosomy (celkem 10 zlomů na partnerských chromosomech a 8 zlomů 13q). Nejčastějším translokačním partnerem byl chromosom 11 (5x zlom 11q; z toho 2x translokace vedla zároveň ke ztrátě ATM genu, pac. č. 58 a 97) a chromosom 1 (4x zlom 1q, 3x 1p; 6 z těchto 7 zlomů popsáno v rámci vícečetných komplexních přestaveb). Další určené partnerské zlomy: 2x chromosom 7 (2x 7p), 9 (1x 9p, 1x 9q), 1x chromosomy 3 (3p), 4 (4p), 6 (6q), 8 (8p), 10 (10p), 14 (14q), 17 (17p, bez současné ztráty TP53), 18 (18q) a 20 (20q). 5x translokační partnerský zlom nebyl určen.

Translokace 13q14 s delecí v místě zlomu byly často nacházeny v rámci komplexních změn karyotypu (14/25; 56%) a klonálního vývoje (17/25; 68%).

Tabulka 4.6 *Translokace 13q14 s delecí v místě zlomu – přehled nálezů*

č. pac.	Karyotyp	FISH pro 13q14 (hodnocení mitóz)
A / Delece v místě translokačního zlomu		
5	46,XX,t(11;13)(q12;q14)[7]/46,XX[8]	.ish der(11)t(11;13)(D13S319-,LAMP1+ [14/18]/idem,t(13;?)(D13S319+, LAMP1-;D13S319-,LAMP1+)[4/18]
53	46,XX,der(11)del(11)(p11)t(11;13)(q21;q14), der(13)t(11;13)(q21;q14)[5]/46,XX[15]	.ish der(11)t(11;13)del(11)(D13S319-, LAMP1+)[4/41]
58	47,XY,der(1)ins(1;13)(p13;?q14q31-33)t(1;11)(q42;?p15),der(11)del(11)(p15)t(11;13)(q22;q31-33),+12,der(13)t(11;13)(q22;q11)[14]/47,idem,-8,dup(11)(p?p)der(?)t(3;?)(;q12;?)[4]	.ish der(11)t(11;13)del(11)(D13S319-, LAMP1+),+12(D12Z3+)[18]
87	46,XX,der(1)t(1;13)(q25;q33),der(13)t(1;13)(q25;q13)[15]	.ish der(1)t(1;13)(D13S319-,LAMP1+ [19/20]
93	46,XX,t(7;13)(p15;q14)[8]/46,XX[12]	.ish der(7)t(7;13)(D13S319-,LAMP1+ [2/4]
97	45,XY,-8,der(11)inv(p11q21)t(11;13)(q21;q21), add(13)(q14),der(19)t(11;19)(?;p13)[cp3]/46,idem,add(14)(p11),+mar[cp5]/46,idem,add(1)(q41),add(14)(p11),del(17)(q23),+mar[cp3]/46,idem,del(2)(q?11.2q21),+mar[cp3]/46,XY[1]	.ish der(11)inv(11)t(11;13)(D13S319-, LAMP1+)[19/20]
136	46,XY,der(9)t(2;9)(p11;q34),t(13;14)(q14;q32)[11]/46,idem,del(11)(q14q22)[4]	.ish der(14)t(13;14)(D13S319-,LAMP1+ [15]
225	46,XX,t(9;13)(q22;q14)[20]	.ish t(9;13)(DLEU1-,LAMP1+ [15]
240	45,XY,-6,t(9;13)(p13;q14), der(11)t(6;11)(q21;q22)[20]	.ish der(9)t(9;13)(D13S319-,LAMP1+)[15]
252	46,XY,del(11)(q21q23)[1]/46,sl,der(1)(1pter->1p31::1p13->1q11:),der(13)(13pter->13q14::1?->1?::1q12->1q43-44::13q33->13qter)[6]/46,sdl1,del(6)(q13q21)[17]	.ish der(13)ins(13;1)(D13S319-,LAMP1+ [16]
257	46,XY,der(1)t(1;?)(q21;?),del(6)(q21),der(8)t(8;13)(p11;q21),der(13)t(1;13)(q21;q13)[13]/46,XY[6]	.ish der(8)t(8;13)(D13S319-,LAMP1+)[7]
277	46,XX,del(11)(q21)[16]/46,XX[4]	.ish der(?)t(13;?)(D13S319-,LAMP1+ [4/30]
259	46,XY,del(11)(q14)[6]/46,sl,del(6)(q13)[4]/45,sl,-6,del(6)(q21q25),der(8)t(6;8)(q13;p12), der(12)t(12;?)(p13;?)[2]/45,sl,-6,der(?8)t(?8;10)(?q22;q23),der(10)t(?8;10)(?q22;q2?1)[2]/46,XY[9]	.ish der(?)t(13;?)(D13S319-,LAMP1+ [4/20]
87 /II	46,XX,der(1)t(1;13)(q25;q33),der(13)t(1;13)(q25;q13)[13]/46,idem,del(13)(q?14q21)[2]	.ish der(1)t(1;13)(D13S319-,LAMP1+ [17/20]/idem,del(13)(q?14q21)(D13S319-,LAMP1+)[2/20]

Tabulka 4.6 – pokračování

136	46,XY,der(9)t(2;9)(p11;q34),t(13;14)(q14;q32)[11] /11 /46,idem,add(6)(qter),inc[10]	.ish der(14)t(13;14)(D13S319-,q34+) [15/17]/idem,del(13)(q14q14) (D13S319-,LAMP1+)[2/17]
307	46,XX,del(11)(q21)[18]/46,XX[1]	.ish der(?)t(13;?)(D13S319-,LAMP1+) [3/15]
326	46,XX,del(14)(q24q32)[3]/45,idem,-9,der(17) t(9;17)(q12;p11.?) [5]/47,idem,+12[3]/46,idem, del(3)(p1?4)[2]/46,idem,del(17)(p11.?) [2] /46,XX[4]	.ish +12(D12Z3+)[4/30] / der(?)t(13;?)(D13S319-,LAMP1+) [4/30]
330	46,XY,t(13;20)(q14;q11.2-13.1)[19]/46,XY[1]	.ish der(20)t(13;20)(D13S319-,LAMP1+) [14/15]
B / Koexistence klonů s delecí v místě translokačního zlomu a s intersticiální delecí		
62	46,XX,t(3;13)(p26;q14)[4] /46,XX[16]	.ish der(3)t(3;13)(D13S319-,LAMP1+)[4/20] / del(13)(q14q14) (D13S319-,LAMP1+)[4/20]
94	46,XX,t(6;13)(q23;q14)[1]* /46,XX,idem,t(13;18)(q13;q21)[4] /46,XX[11]	.ish der(6)t(6;13)(D13S319-,LAMP1+), der(18)t(13;18)(D13S319 dim,LAMP1+)[8/20] / del(13)(q14q?14) (D13S319-,LAMP1+)[4/20] **
131	47,XY,t(10;13)(p13;q14),+mar[cp8] /47,XY,idem,t(7;?)(q11;?) [cp8] /46,XY,t(2;18)(p12;q21)[cp5]/46,XY[3]	.ish der(10)t(10;13)(D13S319-,LAMP1+), del(13)(q14q14)(D13S319-,LAMP1+)[14/23] / del(13)(q14q14) (D13S319-,LAMP1+) x2 [3/23]**
204	49,XY,+12,+18,+19[8] /49,sl,del(14)(q24q32)[2] /49,sdl1,t(7;13)(p22;q14)[9] /46,XY[1]	.ish +12(D12Z3+)[4/26]/idem,der(7)t(7;13) (D13S319-,LAMP1+)[14/26]/idem, del(13)(q14q14) (D13S319-,LAMP1+)[7/26]
219	45,XY,der(4)t(4;13)(p14;q1?4), -13[11]/46,XY[9]	.ish der(4)t(4;13)(D13S319-,LAMP1+),del(13) (q14q14)(D13S319-,LAMP1+)[16/20]/ ?del(13)(q14q14) (D13S319 dim,LAMP1+), del(13)(q1?3q14) (D13S319-,LAMP1+)[4/20] **
260	46,XX,del(11)(q22q23)[8]/46,idem, t(13;17)(q14;p11)[4]/46,XX[3]	.ish der(17)t(13;17)(D13S319-,LAMP1+)[5/8] / del(13)(q14q14) (D13S319-,LAMP1+)[2/8]
335	47,XX,+12[2] /47,idem,t(11;13)(q14-22;q14)[13]	.ish +12(D12Z3+),der(11)t(11;13)(D13S319-, LAMP1+),del(13)(q14q?14)(D13S319-, LAMP1+)[12/15] /+12(D12Z3+), del(13)(q14q?14) (D13S319-, LAMP1+) x2 [2/15]

* klonální nález potvrzen dalším podrobným vyšetřením, viz tabulka 4.7

** dalším hodnocením většího počtu mitóz při podrobných vyšetřeních dalšími sondami pro 13q14 byla prokázána existence dalších, méně zastoupených, klonů s delecí 13q14, viz tabulka 4.7

Koexistence klonů s delecí 13q14 v místě translokačního zlomu a s intersticiální delecí 13q14 – podrobné vyšetření FISH

4 vzorky/pacienti (pac. č. 94, 131, 204 a 219) s koexistencí klonů s delecí v místě translokačního zlomu a s intersticiální delecí byli dále vyšetřeni dvěma analýzami mitóz kombinovanými FISH s BAC sondami mimo MDR (RP11-305D15 centromerickým směrem od MDR v oblasti RB1 genu a RP11-327P2 telomerickým směrem od MDR), sondou pro DLEU1 v MDR a dvěma kontrolními sondami pro 13qter. Hodnoceno bylo minimálně 12 mitóz, s mediánem 26, resp. 31 hodnocených mitóz.

Výsledky obou provedených analýz jsou shrnuty v tabulce 4.7. Celkem bylo u těchto 4 pacientů nalezeno, při respektování pravidel ISCN pro definici patologického klonu, 13 klonů s různými formami delecce 13q14 (8 klonů s monoalelickou a 5 s bialelickou delecí). U všech 4 pacientů byl nalezen klon s monoalelickou delecí 13q14 v místě translokačního zlomu (u pac. 94 klon A a klon C se dvěma rozdílnými translokacemi, u pac. 131 klon A, u pac. 204 klon A a u pac. 219 klon A), z toho u 3 z nich (pac. č. 94, 204 a 219) byl doprovázen přítomností klonu s monoalelickou intersticiální delecí (94/klon D, 204/klon B a 219/klon C), u 1 pacienta (č. 131) s přítomností klonu s bialelickou intersticiální delecí (131/klon C) současně s klonem s delecí jedné alely v důsledku delecce v místě translokačního zlomu a druhé alely intersticiální delecí (131/klonB). Ztráta druhé alely byla prokázána i u dalších dvou pacientů (pac. č. 94, 219), z toho v jednom případě (pac. č. 94) další delecí v místě translokačního zlomu (94/klon B), v druhém případě (pac. č. 219) delecí intersticiální, avšak vývojem v obou přítomných klonech s oběma formami monoalelické delecce (219/klon B a klon D).

Ztráty lokusů mimo MDR či průkaz delečního zlomu mezi sondami pro D13S319 a DLEU1 byly ověřeny i samostatnými FISH analýzami, dovolujícími hodnocení interfázických jader, jejichž výsledky byly plně konzistentní s nálezy uvedených kombinovaných vyšetření mitóz; pro výsledky interfázické FISH viz rovněž tabulka 4.7.

Kombinované FISH vyšetření se sondami pro DLEU1 a RP11-305D15 (RB1) pro všechny klony zastoupené více než v 10% hodnocených mitóz je dokumentováno na obrázku 4.2.

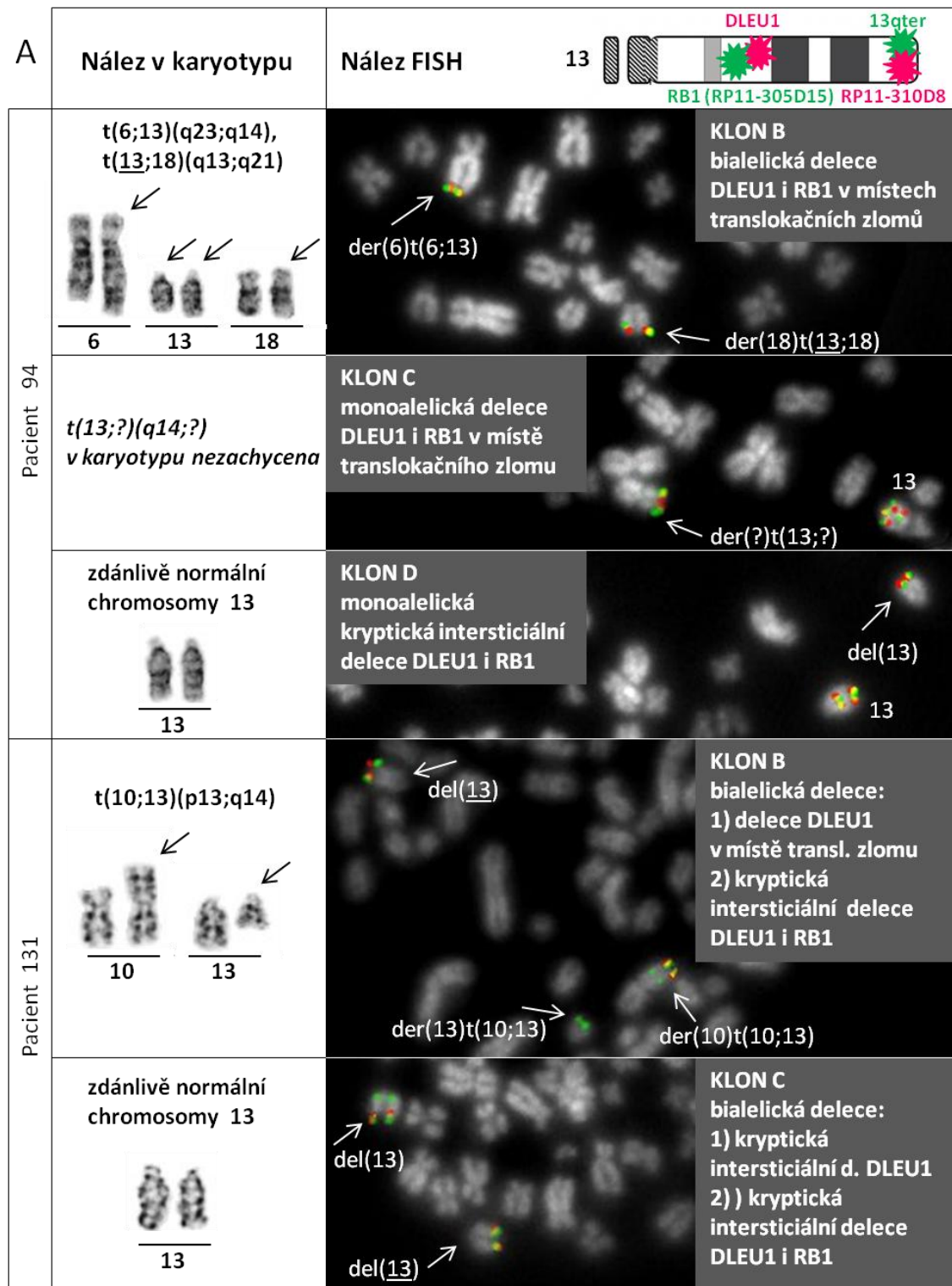
č. pacienta	Výsledky FISH analýzy mitóz				Výsledky interfázické FISH								
	Výsledek dle ISCN 2013 (pro sondu 13qter (Kreatech) používán zkrácený zápis „13qter“ místo „LSI13qter“)	Označení klonu Velikost klonu [% patol. mitóz]*	Forma delece	Forma / č. delece (t...translokační, i...intersticiální)	Vyšetřované lokusy (x... ztráta lokusu)				Vyšetřované lokusy				
					RP11-305D15	DLEU1	D13S319	RP11-327P2	RP11-305D15 (RB1)	DLEU1	D13S319	RP11-327P2	
94	ish der(6)t(6;13)(RP11-305D15-,DLEU1-,D13S319-,RP11-327P2+,RP11-310D8+,LAMP1+,13qter+)	A 2%	monoalelická: t(6;13) s delecí v místě zlomu	t/I	x	x	x		18% monoalelická ztráta (klony A, C, D) 22% bialelická ztráta (klon B) 40% monoalelická ztráta (A, B, C, D)	--			
	ish der(6)t(6;13)(RP11-305D15-,DLEU1-,D13S319-,RP11-327P2+,RP11-310D8+,LAMP1+,13qter+), der(18)t(13;18)(RP11-305D15-,DLEU1-,D13S319 dim,RP11-327P2+, RP11-310D8+,LAMP1+,13qter+)	B 26%	bialelická: 1. alela - t(6;13) s delecí v místě zlomu 2. alela - t(13;18) s delecí v místě zlomu	t/II	x	x							
	ish der(?)t(13;?)(RP11-305D15-,DLEU1-,D13S319-,RP11-327P2+,RP11-310D8+,LAMP1+,13qter+)	C 10%	monoalelická: t(13;?) s delecí v místě zlomu	t/III	x	x	x						
	ish del(13)(q14q14)(RP11-305D15-,DLEU1-,D13S319-,RP11-327P2+,RP11-310D8+,LAMP1+,13qter+)	D 15%	monoalelická: intersticiální	i/I	x	x	x						
131	ish t(10;13)(RP11-305D15 dim,DLEU1-,D13S319-,RP11-327P2+,RP11-310D8+,LAMP1+,13qter+; RP11-305D15+,DLEU1-,D13S319-,RP11-327P2-,RP11-310D8-,LAMP1-,13qter-)	A 2%	monoalelická: t(10;13) s delecí v místě zlomu	t/IV		x	x	17% monoalelická ztráta (klon C)**	2% monoalelická ztráta (klon A) 37% bialelická ztráta (klony B, C)	---			
	ish t(10;13)(RP11-305D15 dim,DLEU1-,D13S319-,RP11-327P2+,RP11-310D8+,LAMP1+,13qter+; RP11-305D15+,DLEU1-,D13S319-,RP11-327P2-,RP11-310D8-,LAMP1-,13qter-), del(13)(q14q14)(RP11-305D15-,DLEU1-,D13S319-,RP11-327P2+,RP11-310D8+,LAMP1+,13qter+)	B 58%	bialelická: 1. alela - t(10;13) s delecí v místě zlomu 2. alela - intersticiální	i/II	x	x	x						
	ish del(13)(q14q14)(RP11-305D15+,DLEU1-,D13S319-,RP11-327P2+,RP11-310D8+,LAMP1+,13qter+), del(13)(q14q14)(RP11-305D15-,DLEU1-,D13S319-,RP11-327P2+,RP11-310D8+,LAMP1+,13qter+)	C 16%	bialelická: 1. alela - intersticiální 2. alela - intersticiální	i/III		x	x						
				i/IV	x	x	x						
204	ish t(7;13)(RP11-305D15-,DLEU1-,D13S319-,RP11-327P2+,RP11-310D8+,LAMP1+,13qter+; RP11-305D15+,DLEU1-,D13S319-,RP11-327P2-,RP11-310D8-,LAMP1-,13qter-)	A 46%	monoalelická: t(7;13) s delecí v místě zlomu	t/V		x	x	---	70% monoalelická ztráta (A, B)	---			
	ish del(13)(q14q14)(RP11-305D15+,DLEU1-,D13S319-,RP11-327P2+,RP11-310D8+,LAMP1+,13qter+)	B 36%	monoalelická: intersticiální	i/V		x	x						
219	ish der(4)t(4;13)(RP11-305D15-,DLEU1-,D13S319-,RP11-327P2-,RP11-310D8+,LAMP1+,13qter+)	A 2%	monoalelická: t(4;13) s delecí v místě zlomu	t/VI	x	x	x	x	63% monoalelická ztráta (klony A, B) 65% bialelická ztráta (klony B, D) 63% monoalelická ztráta (klony A, B)				
	ish der(4)t(4;13)(RP11-305D15-,DLEU1-,D13S319-,RP11-327P2-,RP11-310D8+,LAMP1+,13qter+), del(13)(q14q14)(RP11-305D15+,DLEU1-,D13S319-,RP11-327P2+,RP11-310D8+,LAMP1+,13qter+)	B 45%	bialelická: 1. alela - t(4;13) s delecí v místě zlomu 2. alela - intersticiální	i/VI		x	x						
	ish del(13)(q14q14)(RP11-305D15+,DLEU1-,D13S319-,RP11-327P2+,RP11-310D8+,LAMP1+,13qter+), 13(RP11-305D15+,DLEU1+,D13S319 dim,RP11-327P2+,RP11-310D8+,LAMP1+,13qter+)	C 41%	monoalelická: intersticiální	i/VII		x	x						
	ish del(13)(q14q14)(RP11-305D15+,DLEU1-,D13S319-,RP11-327P2+,RP11-310D8+,LAMP1+,13qter+), del(13)(q14q14)(RP11-305D15+,DLEU1-,D13S319-,RP11-327P2+,RP11-310D8+,LAMP1+,13qter+)	D 3%	bialelická: 1. alela – intersticiální 2. alela – intersticiální	i/VIII		x	x						

* velikost klonu stanovena jako podíl mitóz daného klonu z celkového součtu mitóz hodnocených ve všech vyšetřeních, ve kterých mohly být rozlišeny všechny přítomné klony (pro jednotliv. pac. tento součet činil 160, 140, 140 a 111 mit.)

** ztráta RB1 v klonu B v důsledku intersticiální delece 2. alely (i/III) je maskována rozdělením signálu odpovídajícího 1. alele na dva signály (přítomných na der(10) i der(13) v důsledku t/IV)


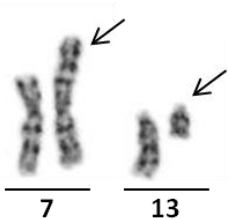
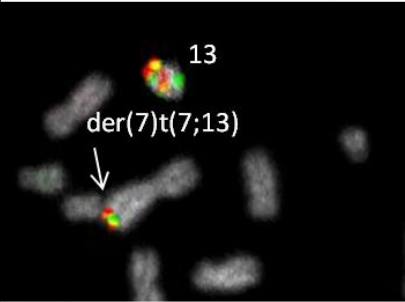


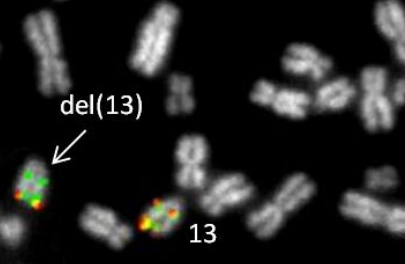
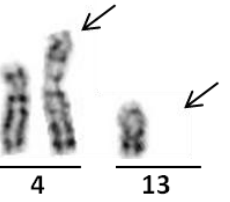
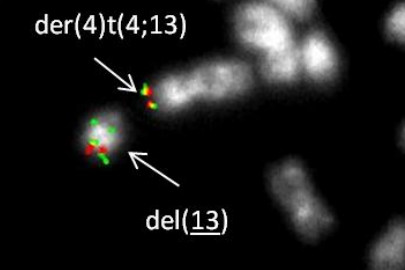

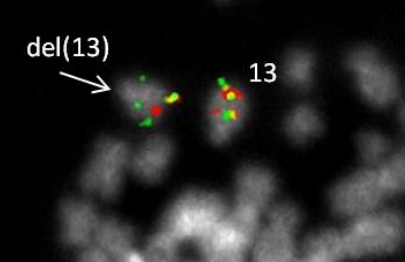
*** možná parciální delece 2.alely 13q14, resp. signálu pro D13S319; jednoznačně neprokázána

Tabulka 4.7 Přehled výsledků podrobných FISH vyšetření u koexistence klonů s delecí 13q14 v místě translokačního zlomu a s intersticiální delecí



Obrázek 4.2 *Koexistence různých forem delece 13q14 – vyšetření karyotypu a kombinované FISH vyšetření se sondami pro DLEU1 a RP11-305D15 (část A, B)*

Uvedeny jsou pouze klony s více než 10% zastoupením; označení klonů je konzistentní s označením v tabulce 4.7. Ztráta červeného signálu pro DLEU1 indikuje delecii 13q14, ztráta sousedícího zeleného signálu ztrátu RB1 genu (RP11-305D15), resp. delecii 13q14 většího rozsahu. Pokud při ztrátě signálu pro DLEU1, příp. i pro RB1, zůstávají zachovány kontrolní signály (červený/zelený) v telomerické oblasti akrocentrického chromosomu 13 jedná se o intersticiální delecii 13q14, přemístění kontrolních signálů potvrzuje translokaci s delecí v místě translokačního zlomu.

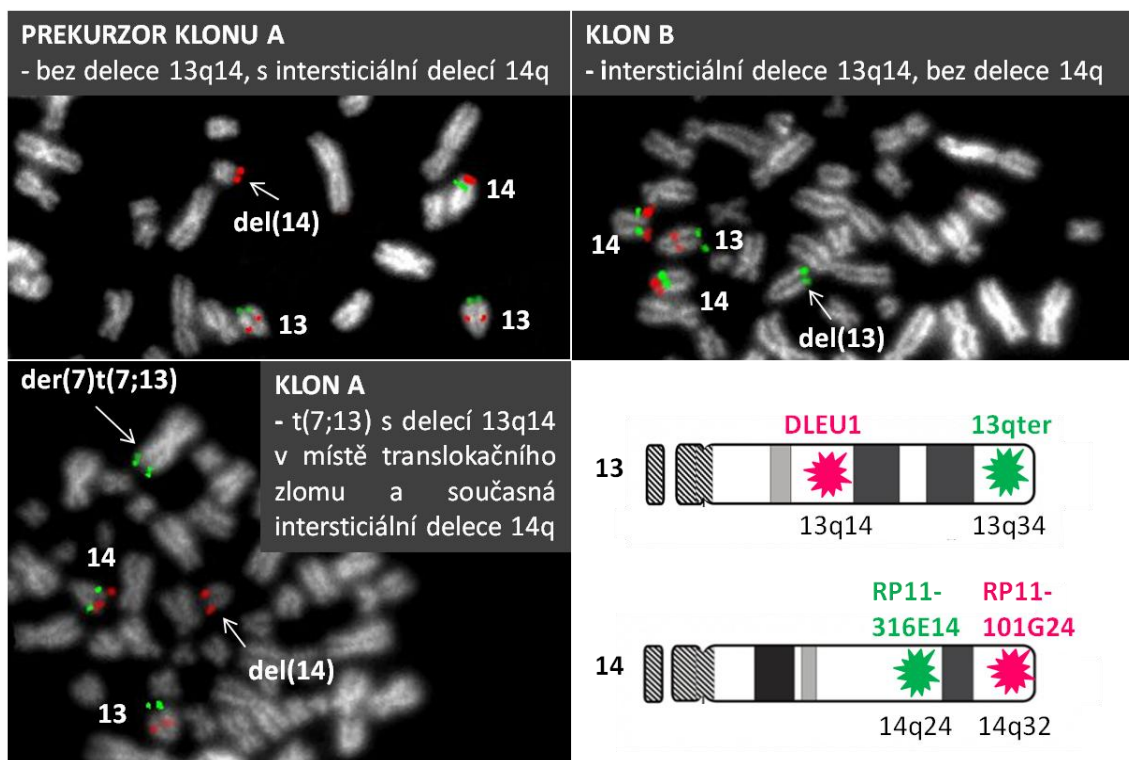
B	Nález v karyotypu	Nález FISH	
Pacient 204	t(7;13)(p22;q14) 		KLON A monoalelická delece DLEU1 v místě translokačního zlomu 
	zdánlivě normální chromosomy 13 		KLON B monoalelická kryptická intersticiální delece DLEU1
Pacient 219	der(4)t(4;13)(p13;q14),-13 		KLON B bialelická delece: 1) delece DLEU1 i RB1 v místě translokačního zlomu 2) kryptická intersticiální delece DLEU1
	zdánlivě normální chromosomy 13 		KLON C monoalelická kryptická intersticiální delece DLEU1

Obrázek 4.2 – pokračování (část B)

V popisovaných 13 klonech bylo nalezeno celkem 6 translokací (t/I – t/VI, viz tabulka 4.7) a 8 intersticiálních delecí (i/I – i/VIII). Delece v místě translokačního zlomu zahrnovaly i RB1 gen v 4 případech ze 6 (z toho u t/VI nejspíše v důsledku ztráty reciprokého produktu translokace, tj. der(13)), v jednom případě (opět t/VI) dále se ztrátou i oblasti položené telomericky k MDR (RP11-327P2). Oproti tomu intersticiální delece zahrnovala RB1 gen pouze ve 3 případech z uvedených 8 a delece RP11-327P2 nebyla detekována. Zajímavý nález byl u translokace t/II, kde k distálnímu zlomu došlo v MDR: sonda pro DLEU1 ukazovala delecii tohoto lokusu, sonda pro D13S319 hybridizovala se sníženou intenzitou na partnerském chromosomu.

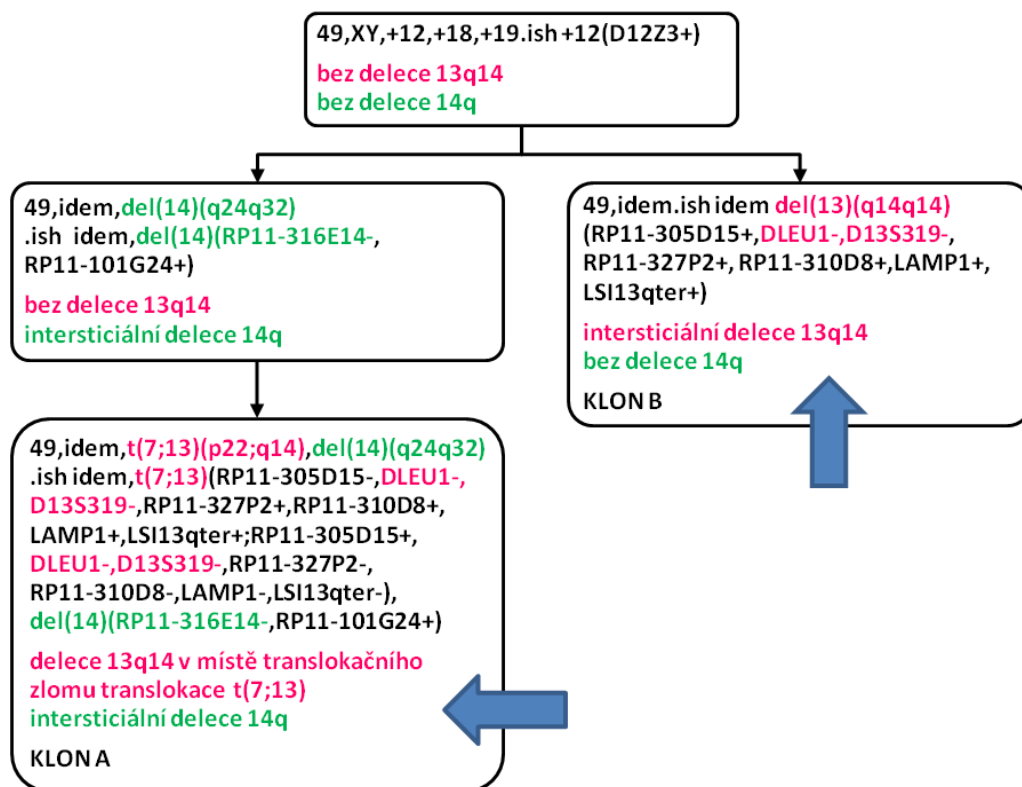
Průkaz nezávislého vzniku klonů s delecí 13q14 v místě translokačního zlomu a s intersticiální delecí 13q14

U jednoho z pacientů s koexistencí subklonů s oběma formami delece 13q14 (pac. č. 204, klon A s delecí v místě translokačního zlomu t(7;13), klon B s intersticiální delecí, popis v tabulce 4.7) byla vyšetřením karyotypu, kromě základního klonu s nadpočetnými chromosomy 12, 18 a 19 (viz také tabulka 4.6), detekována přítomnost přídatné intersticiální delece 14q v subklonu s t(7;13) (klon A) a zároveň i v subklonu bez znatelné přestavby chromosomu 13 (prekurzor klonu A). Pro zjištění, zda v prekurzorovém subklonu je přítomna zároveň i kryptická intersticiální delece 13q14 (tj. zda prekurzor klonu A je roven klonu B) nebo zda se subklon s intersticiální delecí 13q14 (klon B) vyvinul nezávisle, byla dále provedena kombinovaná hybridizace se sondami pro stanovení delece 13q14 (DLEU1 / 13qter) a intersticiální delece 14q (RP11-316E14 / RP11-101G24). Výsledek hybridizace dokumentuje obrázek 4.3.



Obrázek 4.3 *FISH s kombinací sond pro detekci delece 13q14 a intersticiální delece 14q – průkaz nezávislé koexistence klonů s různými formami delece 13q14*

Vyšetření pac. č. 204. Ztráta červeného signálu pro DLEU1 na chromosomu 13 indikuje delecí 13q14, ztráta zeleného signálu na chromosomu 14 (RP11-316E14) intersticiální delecí 14q. Zachování kontrolních signálů (zelený pro 13qter, červený pro 14qter) v telomerických oblastech akrocentrických chromosomů značí intersticiální delecí (intersticiální delecí 14q v prekurzoru klonu A a klonu A, resp. intersticiální delecí 13q14 v klonu B), přemístění kontrolního signálu pro 13qter potvrzuje translokaci s delecí v místě translokačního zlomu (klon A).

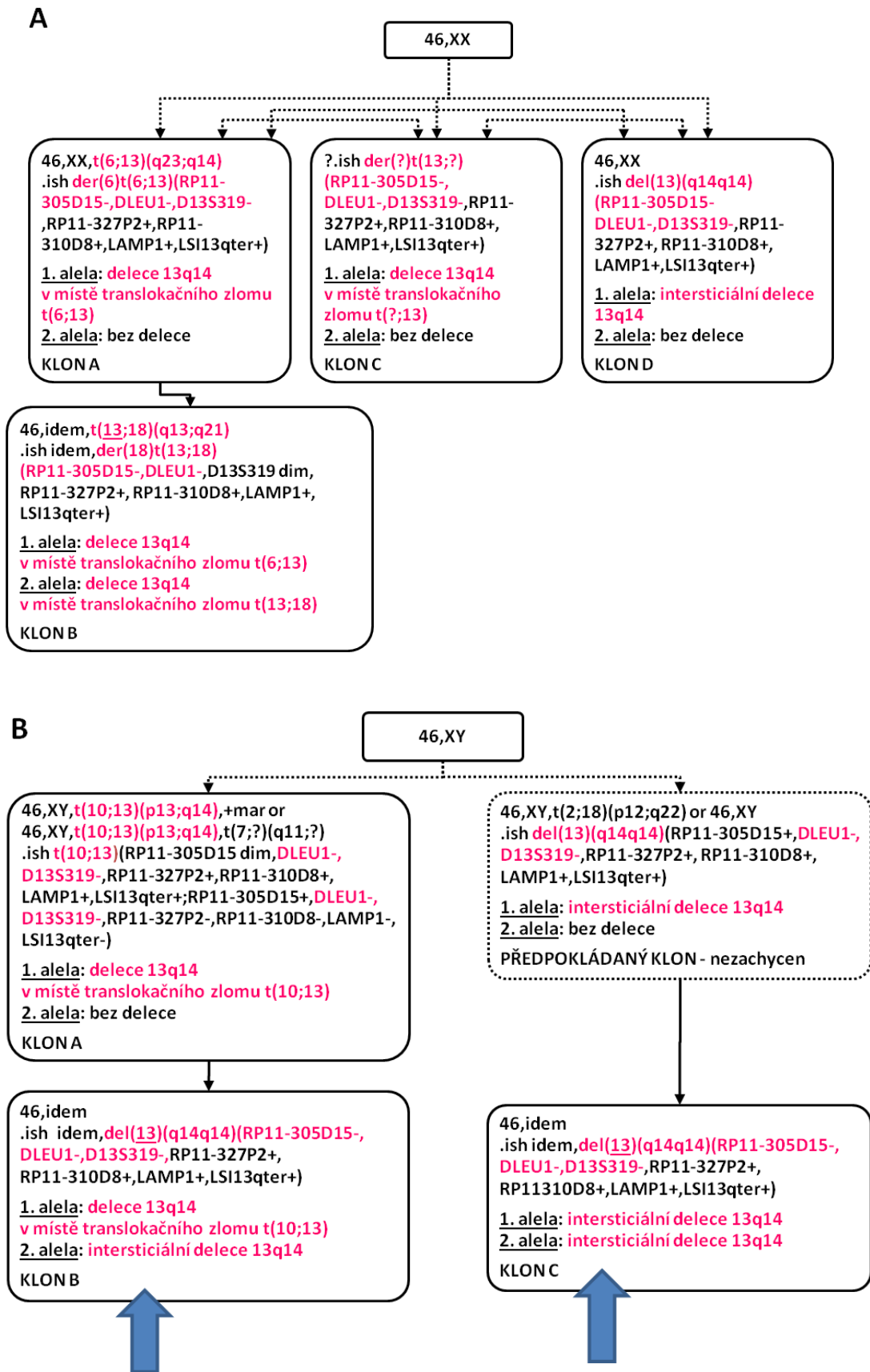


Obrázek 4.4 Schéma klonálního vývoje u pacienta s nezávislou koexistencí klonů s delecí 13q14 v místě translokačního zlomu a s intersticiální delecí 13q14

Schéma klonální evoluce u pac. č. 204 se zahrnutím výsledků karyotypu a relevantních FISH nálezů, nezávisle vzniklé klony s různými formami delece 13q14 jsou označeny šipkami (klon A, klon B).

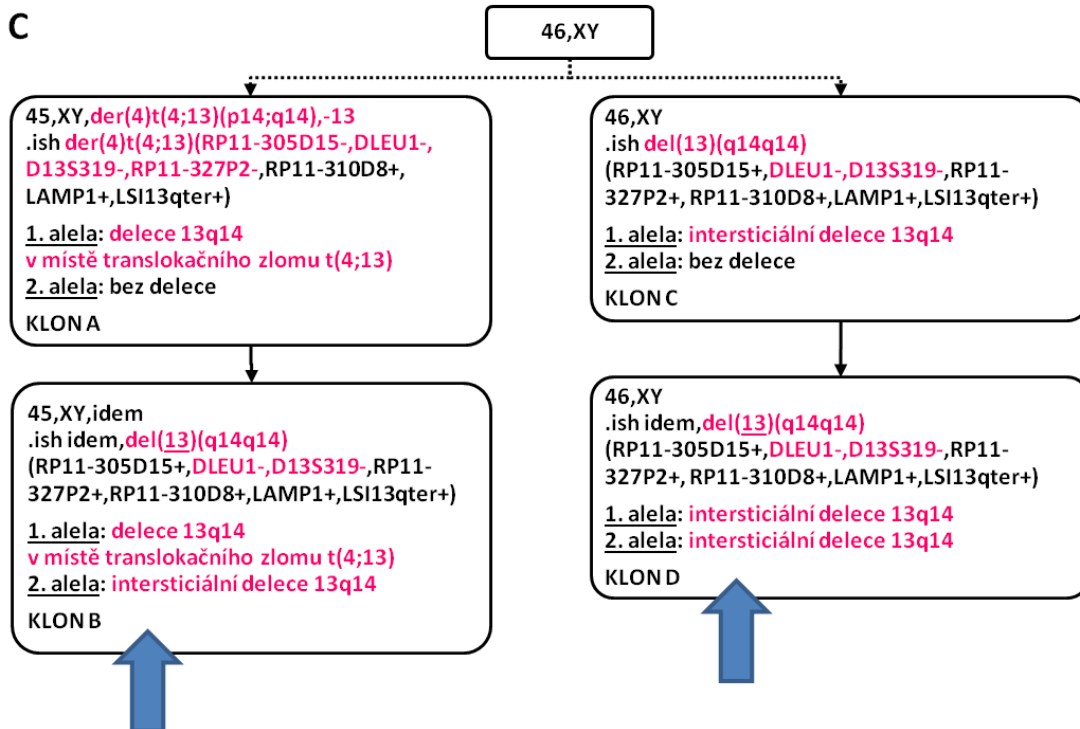
Nepřítomnost intersticiální delece 13q14 v klonu s intersticiální delecí 14q (prekurzoru klonu A) prokazuje na sobě nezávislou přítomnost klonů s oběma formami delece 13q14 v různých subklonech (klon A, B), tj. svědčí i pro nezávislý vznik obou forem delece. Kompletní schéma klonálního vývoje u pacienta č. 204 je znázorněno na obrázku 4.4.

Pro další pacienty s koexistencí obou forem delece 13q14 podrobně vyšetřené všemi FISH sondami pro 13q14 (pac. č. 94, 131, 219, viz tabulka 4.7) byla rovněž sestavena schémata klonálního vývoje (viz obrázek 4.5, část A, B, C). Z nich je patrný nezávislý vznik intersticiálních delecí druhých alel 13q14 u pacientů č. 131 (schéma B) a č. 219 (schéma C). U koexistujících klonů s různými formami delece první alely nelze v těchto případech rozhodnout, zda vznikly postupným klonálním vývojem nebo paralelně a tedy nezávisle na sobě. Také u pac. č. 94 (schéma A) nelze na základě dostupných vyšetření rozhodnout zda se jedná o nezávislý vznik několika delecí 13q14.



Obrázek 4.5 Schémata klonálního vývoje u dalších pacientů s koexistencí klonů s delecí 13q14 v místě translokačního zlomu a s interstiální delecí 13q14 (část A, B, C)

A – pac. 94, B- pac. 131, C – pac. 219. Zahrnutý výsledek karyotypu a relevantních FISH nálezů, nezávisle vzniklé klony s delecemi druhých alel 13q14 jsou označeny šipkami.



Obrázek 4.5 – pokračování (část C)

Multiklonální intersticiální delece 13q14

U jednoho pacienta (pac. č. 222) byla ve vzorku z progresivního onemocnění po léčbě FCR vyšetřením karyotypu a FISH zjištěna přítomnost tří klonů s monoalelickou intersticiální delecí 13q14 různého rozsahu. Retrospektivní FISH nestimulovaného vzorku ze zachytu onemocnění prokázala shodný nález již v době diagnózy. Výsledky všech provedených vyšetření jsou shrnuty v tabulce 4.8.

V karyotypu byly nalezeny 2 klony: v základním klonu byla zjištěna rekurentní translokace $t(14;18)(q32;q21)$ a derivovaný chromosom $der(13;15)$ vzniklý celoraménkovou translokací a centrický fragment z chromosomu 13 (potvrzeno FISH s centromerickou sondou), v subklonu pak dále rozsáhlá delece druhého (netranslokovaného) homologu chromosomu 13 (klon D, viz níže).

Základním FISH hodnocením mitóz pro lokus D13S319 byly dále prokázány, vedle přítomnosti základního klonu s $der(13;15)$ bez jakékoli delece 13q14 (klon A), dva subklony s kryptickou intersticiální delecí 13q14 (klony B, C). V jednom subklonu (klon B) se jednalo o kryptickou delecí $der(13;15)$ a v druhém o kryptickou delecí druhého chromosomu 13 (klon C).

Vzorek byl dále vyšetřen, obdobně jako vzorky s koexistencí klonů s různými formami delece 13q14, dvěma FISH analýzami na mitózách s kombinací BAC sond mimo MDR (RP11-305D15 centromerickým směrem od MDR v oblasti RB1 genu a RP11-327P2 telomerickým směrem od MDR), sondou pro DLEU1 v MDR a dvěma kontrolními sondami pro 13qter. Výsledek obou těchto vyšetření pro všechny popisované subklony je dokumentován na obrázku 4.6. Obě vyšetření prokázala rozdílný rozsah obou kryptických delecí – v případě deletovaného $der(13;15)$ zahrnovala delece rovněž lokus RB1 genu mimo MDR (klon B), delece druhého chromosomu 13 pouze lokus DLEU1, resp. D13S319, v MDR (klon C). U rozsáhlé delece 13q v subklonu zjištěném i v karyotypu (klon D) byla potvrzena ztráta obou vyšetřovaných lokusů mimo MDR (tj. i RP11-327P2).

Hodnocení samostatných interfázických FISH pro jednotlivé sondy, v souladu s nálezem výše popsaných vyšetření mitóz, ukázalo ztrátu D13S319/DLEU1 v 54-57% jader, delecí RB1 genu v 28% jader a delecí RP11-327P2 v 19% jader.

Uvedená vyšetření ukazují na vznik intersticiální delece v klonu B nezávisle na intersticiálních delecích v klonech C a D. V případě delecí v klonech C a D nelze určit zda se jedná také o jejich nezávislý vznik či postupný klonální vývoj klonu D z klonu C. Zjištěný klonální vývoj u pac. č. 222 je shrnutý v schématu na obrázku 4.7.

V době diagnózy byla provedena pouze základní vyšetření interfázickou FISH (z nestimulované kultivace) s nálezem monoalelické delece 13q14 (D13S319) ve 43% jader. Retrospektivní FISH analýza se všemi použitými sondami prokázala podobný nález jako vzorek v progresi (tj. 49% jader se ztrátou DLEU1, 20% jader se ztrátou RB1 genu a 9% jader s delecí lokusu pro RP11-327P2), tedy svědčí pro přítomnost stejného klonálního vývoje, resp. multiklonální intersticiální delece 13q14, již při záchytu onemocnění.

Tabulka 4.8 Multiklonální intersticiální delece 13q14 - shrnutí cytogenetických dat

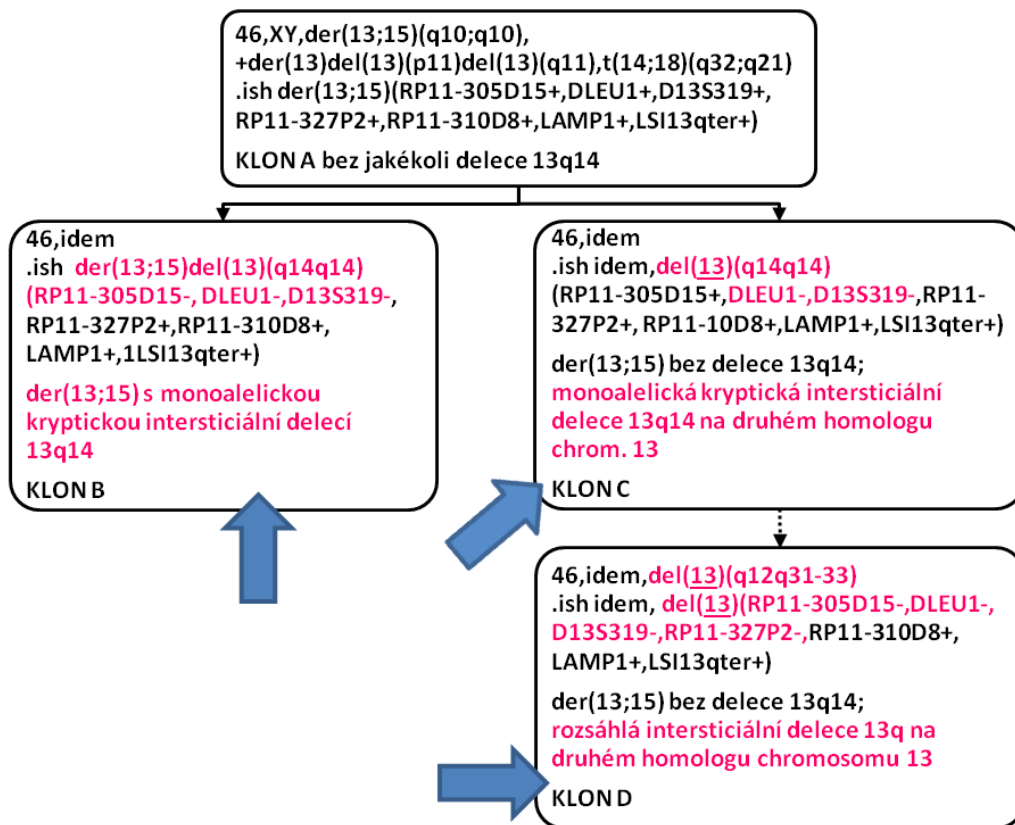
A / Srovnání dostupných nálezů při záchytu a v progresi onemocnění (pac. č. 222)				
	Záchyt onemocnění (2004)	Progrese po léčbě FCR* (2011)		
Stádium dle Raie	I	III		
Karyotyp				
	nd (nestimulovaná kultivace)	46,XY,der(13;15)(q10;q10),+der(13)del(13)(p11)del(13)(q11),t(14;18)(q32;q21)[11]/46,idem,del(13)(q12q31-33)[4]		
Výsledky interfázických FISH pro sondy pro detekci delece 13q14				
RP11-305D15 (RB1) [% jader]	20% monoalelická delece (odpovídá klonům B, D – viz část B této tabulky)	28% monoalelická delece		
DLEU1 [% jader]	49% monoalelická delece	54% monoalelická delece (odpovídá klonům B, C, D)		
D13S319 [% jader]	43% monoalelická delece	57% monoalelická delece (odpovídá klonům B, C, D)		
RP11-327P2 [% jader]	9% monoalelická delece	19% monoalelická delece (odpovídá klonu D)		
Výsledky ostatních interfázických FISH				
IGH@ [% jader]	74% translokace IGH@	77% translokace IGH@		
del TP53, ATM, +12	neg.	neg.		
B / Charakteristika nalezených klonů FISH se sondami pro 13q14 (pac. č. 222)				
Vyšetření v progresi onemocnění (celkem hodnoceno 184 mitóz)				
KLON	A	B	C	D
	bez jakékoli delece 13q14; der(13;15) přítomen	der(13;15) s monoalelickou kryptickou intersticiální delecí	monoalelická kryptická intersticiální delece druhého chromosomu 13	monoalelická rozsáhlá intersticiální delece druhého chromosomu 13
Velikost klonu [% patol. mitóz]	29% (54/184)	24% (44/184)	25% (46/184)	17% (31/184)
RP11-305D15 (RB1)		ztráta		ztráta
DLEU1		ztráta	ztráta	ztráta
D13S319		ztráta	ztráta	ztráta
RP11-327P2				ztráta

*léčba FCR v roce 2005, s odstupem 16 měsíců od diagnózy

Nález v karyotypu	Nález FISH	
	<p>DLEU1 13qter RB1 RP11-305D15 RP11-310D8</p>	<p>DLEU1 13qter RP11-327P2 RP11-310D8</p>
<p>der(13;15)(q10;q10), +der(13)del(13) (p11)del(13)(q11)</p> <p>13</p>	<p>KLON A – bez jakékoli delece 13q14; der(13;15) přítomen</p>	
	<p>KLON B - der(13;15) s monoalelickou krypt. intersticiální d. DLEU1 i RB1</p>	
	<p>KLON C - der(13;15) bez delece; monoalelická kryptická intersticiální delece DLEU1 na druhém homologu chromosomu 13</p>	
	<p>KLON D - der(13;15) bez delece; monoalelická rozsáhlá delece RB1, DLEU1, RP11-327DP2 na druhém homologu chromosomu 13</p>	

Obrázek 4.6 *Multiklonální intersticiální delece 13q14 – vyšetření karyotypu a kombinované FISH vyšetření se sondami pro DLEU1 a RP11-305D15 a DLEU1 a RP11-327P2*

Vyšetření u pacienta č. 222. Ztráta červeného signálu pro DLEU1 v obou sloupcích indikuje deleci 13q14. Ztráta sousedícího zeleného signálu v levém sloupci značí ztrátu RB1 genu (RP11-305D15), ztráta sousedícího zeleného signálu v pravém sloupci pak ztrátu lokusu pro RP11-327P2, tj. obě zelené sondy detekují delece 13q14 většího rozsahu. Kontrolní signály (červený/zelený) v telomerické oblasti akrocentrického chromosomu 13 nebo der(13;15) zůstávají zachovány, ve všech případech se tedy jedná se o intersticiální deleci 13q14.



Obrázek 4.7 *Schéma klonálního vývoje u pacienta s multiklonální intersticiální delecí 13q14*

Schéma klonální evoluce u pac. č. 222 se zahrnutím výsledků karyotypu a relevantních FISH nálezů demonstrující přítomnost více klonů s různými intersticiálními delecemi 13q14 (klony B, C, D; označeny šipkami) a nezávislou přítomností klonu B na klonech C, D.

4.2.2 Delece 11q (ATM genu)

Delece ATM genu, odpovídající parciální delecí dlouhých ramen chromosomu 11, byla prokázána u 24% (92/387) vyšetřených vzorků, resp. u 24% (81/337) pacientů. Ve všech nalezených případech se jednalo o delecí pouze jedné alely.

V převaze případů se ztrátou ATM byly nalezeny intersticiální nebo terminální delece, tvořily 84% (77/92) všech delecí 11q, u dalších 8,5% (8/92) delecí se jednalo o ztrátu v důsledku nebalancované translokace a ve zbývajících 7,5% (7/92) případů byla delece stanovena pouze interfázickým FISH vyšetřením, tj. formu delece nebylo možné určit (4x malý subklon nezachycený náhodně při analýze karyotypu, 3x neúspěšná kultivace).

Intersticiální delece byla nalezena 59x (59/77), terminální delece 18x (18/77). Delece byla ve všech těchto případech popsána dle vyšetření karyotypu, jednalo se tedy vždy o delecí většího rozsahu. Komplexní změny karyotypu (≥ 3 aberace zjištěné

kombinací nálezů analýzou karyotypu a kryptických změn 13q14 zjištěných FISH) byly nalezeny v 57% (44/77) případů s intersticiální či terminální delecí 11q.

Oproti tomu všechny nebalancované translokace vedoucí ke ztrátě 11q se vždy vyskytovaly jako součást komplexních změn karyotypu (8/8; 100%). Určenými translokačními partnery byly chromosomy 13 (13q 2x), 6 (6q 1x) a 7 (7q 1x), ve zbývajících případech nebyl translokační partner určen.

Celkem byly komplexní změny karyotypu nalezeny v 58% (53/92) vzorků s prokázanou delecí 11q/ATM genu.

4.2.3 Trisomie 12

Trisomie chromosomu 12 byla nalezena v 18% (70/385) vyšetřených vzorků, resp. u 17,5% (59/337) pacientů.

Celkem 4x (4/70; 6%) byla prokázána další přestavba nadpočetného chromosomu 12 – 1x delece dlouhých ramen a 3x komplexní přestavba s dalšími dvěma chromosomy na pozadí dalších (komplexních) změn karyotypu (2x se jednalo o opakované vyšetření téhož pacienta). Ve dvou těchto vzorcích byl subklon s derivovaným nadpočetným chromosomem 12 nalezen vedle základního klonu s „čistou“ trisomií 12.

V převaze vzorků s trisomií 12, v 91% (64/70), byla prokázána nadpočetná kopie dále nederivovaného chromosomu 12.

Ve dvou vzorcích (2/70; 3%) nebylo možné trisomii 12 hodnotit analýzou mitóz a byla stanovena pouze interfázickou FISH (neúspěšná kultivace).

Komplexní změny karyotypu (≥ 3 aberace zjištěné kombinací nálezů analýzou karyotypu a kryptických změn 13q14 zjištěných FISH) byly nalezeny v 31% (22/70) vzorků s trisomií chromosomu 12.

4.2.4 Delece 17p (TP53 genu)

Delece genu TP53, resp. krátkých ramen chromosomu 17, byla nalezena u 7% (27/384) vyšetřených vzorků, což odpovídá 6,5% pacientů (22/335). Ve všech případech se jednalo o delecí jedné alely genu.

Terminální delece 17p byla nalezena celkem v 6 vzorcích (6/27; 22%) 6 pacientů, z toho 4x však paralelně s druhým subklonem s nebalancovanou translokací chromosomu 17 vedoucí ke ztrátě 17p a 1x s druhým klonem se ztrátou centromerické oblasti 17 (resp. monosomií 17). Zlomy u 6 nalezených terminálních delecí byly popsány do 17p10 (1x), 17p11 (3x) a 17p11.2 (1x).

Ztráta TP53 v důsledku nebalancované translokace 17p či centrické fúze 17q10 byla nalezena celkem v 15 (15/27; 56%) vzorcích 13 pacientů (2 pacienti byli vyšetřeni opakovaně), z toho 4x paralelně s klonem s delecí (viz výše) a 1x také s klonem se ztrátou centromerické oblasti (monosomií 17). Celkem bylo nalezeno 13 translokací s těmito translokačními zlomy: 17q10 4x (centrické fúze s jiným chromosomem vedoucí k celoraménkové translokaci 17q a současné ztrátě 17p) a 17p11 9x. Z určených translokačních partnerů byl nejčastěji zastoupen chromosom 18 (18q 3x), dále byla zaznamenána translokace s chromosomy 2 (1x), 4 (4q 1x), 6 (6q 1x), 9 (9q 1x), 14 (14q 2x) a 15 (15q 2x); 2x translokační partner nebyl určen.

Ve 4 vzorcích (4/27; 15%) 4 pacientů (4/22) byla detekována monosomie chromosomu 17, resp. ztráta krátkých ramen a centromery s translokací dlouhých ramen na jiný derivovaný chromosom se zlomem popisovaným vždy do 17q11; v jednom z těchto případů byla v subklonu (vedlejším klonu) nalezena terminální delece 17p (resp. centrický fragment chromosomu 17), v dalším případě nebalancovaná translokace se zlomem v 17p11 (viz také výše). Translokačními partnery těchto nebalancovaných translokací 17q11 spojených se ztrátou centromerické oblasti a 17p byly chromosomy 3 (3q 1x), 4 (4p 1x, 4q 1x) a 6 (6p 1x).

Všechny popisované terminální delece nebo nebalancované translokace bylo možné rozpoznat vyšetřením karyotypu, nejednalo se tedy o kryptické změny malého rozsahu detekovatelné pouze cíleným FISH vyšetřením.

U zbývajících 8 (8/27) vzorků s delecí (7/22 pacientů) byla delece stanovena pouze interfázickou FISH bez možnosti hodnotit mitózy (3x v malém subklonu susp. nezachyceném analýzou mitóz, 2x na pozadí rozsáhlých komplexních změn karyotypu, 3x neúspěšná kultivace).

V 70% (19/27) případů s delecí TP53 byly detekovány komplexní změny (≥ 3 aberace; zde všechny zjištěny analýzou karyotypu).

4.2.5 Delece 6q

Delece dlouhých ramen chromosomu 6 byla prokázána v 8% (33/391) vyšetřených vzorků, resp. u 8% pacientů (28/337). Kromě jednoho případu všechny delece zahrnovaly pruh 6q21, resp. ztrátu lokusu pro gen SEC63. Všechny prokázané ztráty 6q21 byly monoalelické.

U 67% (22/33) vzorků s delecí (u 20 pacientů) se jednalo o delecí intersticiální (14x) či terminální (8x).

Nebalancované translokace vedoucí ke ztrátě 6q byly prokázány v části vzorků (6/33; 18%), ve všech případech na pozadí komplexních změn karyotypu. Jednalo se celkem o 5 translokací (1 pacient byl vyšetřen opakovaně); translokační partneři byli chromosom 2 (2p 1x, 2q 1x), 18 (18q 1x) a ve dvou případech nebyl translokační partner určen.

2x (2/33) byla nalezena ztráta centromerické oblasti jednoho chromosomu 6 s translokací části materiálu tohoto chromosomu na partnerské chromosomy. V dalších 2 (2/33) vzorcích (opakovaně vyšetřeného stejného pacienta) byl obdobný nález s vedlejším subklonem s terminální delecí 6q. Rovněž u těchto vzorků byly vždy nalezeny komplexní změny karyotypu.

Všechny výše popisované nalezené delece, terminální i intersticiální, a nebalancované translokace bylo možné detekovat vyšetřením karyotypu. Pouze 1x (1/33) nebyla delece 6q zachycena vyšetřením mitóz, ale jenom interfázickou FISH (jednalo se o opakované vyšetření pacienta s dříve prokázanou intersticiální delecí 6q).

U převahy vzorků s prokázanou delecí 6q, resp. u 61% (20/33) vzorků s delecí 6q, byly nalezeny komplexní změny karyotypu.

4.2.6 Aberace 14q

Celkem bylo nalezeno 7 vzorků od 7 pacientů (7/391; 2%, resp. 7/337; 2%) s intersticiální delecí 14q. Ve více než polovině případů (4/7) byla delece 14q součástí komplexních změn karyotypu. V jednom z těchto případů byla delece 14q detekována v subklonu vedle rekurentní translokace t(14;18) se zlomem IGH@ genu druhého homologu chromosomu 14.

Translokací 14q bylo nalezeno 19, z toho v 9 (9/19) případech byla prokázána balancovaná translokace IGH@ genu (podrobné výsledky společně pro všechny Ig geny v tabulce 4.4 v kap. 4.1.6).

Dalších 10 (10/19) translokací rovněž nevedlo k nebalancovaným změnám chromosomu 14 a s výjimkou jednoho případu ani k nebalancovaným změnám translokačního partnera. Zlomy chromosomu 14 v těchto případech byly popisovány do 14q10 (4x, centrické fúze), 14q24 (2x), 14q31 (1x) a 14q32 (3x). Partnerských translokačních zlomů bylo nalezeno 11 (v jednom případě se jednalo o translokaci mezi třemi chromosomy). Translokačním partnerem byl nejčastěji chromosom 17 (17q 3x), dále pak chromosomy 11 (11q 2x), 12 (12p 1x, 12q 1x), 13 (13q 1x), 15 (15q 1x) a 18 (18q 1x), v jednom případě translokační partner nebyl určen.

5 Diskuse

Pilotní porovnání DSP30/IL2 stimulované a nestimulované kultivace

Pilotní duplicitní posouzení 23 vzorků, paralelně kultivovaných jak standardní 24 hod. nestimulovanou kultivací tak i 72 hod. DSP30/IL2 stimulovanou kultivací, ukázalo vysokou úspěšnost stimulované kultivace. Po stimulované kultivaci byl v 91% (21/23) vzorků nalezen dostatek mitóz pro následnou analýzu karyotypu, oproti tomu po kultivaci nestimulované pouze v 70% (16/23) vzorků. Ještě výraznější rozdíl při porovnání obou kultivací byl v záchytu patologických klonů. Analýzou karyotypu v buňkách po stimulované kultivaci byl patologický klon nalezen v 65% (15/23) vzorků, po kultivaci nestimulované pouze v 13% (3/23) vzorků. Stejně tak i velikost patologického klonu (resp. podíl patologických mitóz) byla prokázána výrazně vyšší ve stimulovaných kulturách oproti nestimulovaným (medián velikosti klonů 67% vs. 13%).

Vyšetřením interfázních jader metodou FISH naopak byly patologické klony nalezeny vždy shodně v obou kulturách (v 87% vzorků; 20/23). Také velikost patologických klonů (podíl jader s prokázanou abnormalitou) byla v obou kultivacích obdobná (medián velikosti klonů z obou kultivací = 67%). Stejný nálezn při hodnocení interfázních jader v buňkách po nestimulované kultivaci je důkazem, že v průběhu stimulované kultivace nedochází k nárůstu podílu patologických jader (buněk), a že tedy hodnocené patologické mitózy velmi pravděpodobně pocházejí z prvního dělení CLL buněk *in vitro* a jedná se skutečně o změny spojené s leukemickými buňkami *in vivo*, nikoli o možné kultivační artefakty.

Celková úspěšnost DSP30/IL2 stimulované kultivace

Celková míra záchytu patologických klonů analýzou mitóz buněk CLL po DSP30/IL2 stimulované kultivaci dosahovala ve vyšetřeném souboru vzorků 84% (329/391) při úspěšnosti kultivace 96% (375/391 úspěšně vyšetřených vzorků). U 65% (254/391) vzorků byl nalezen patologický klon analýzou karyotypu, u dalších 19% (75/391) vzorků pak kryptická intersticiální delece 13q14 (detekovaná FISH hodnocením mitóz) jako jediná změna karyotypu.

Dosažená úspěšnost kultivace (96%) je srovnatelná s údaji publikovanými dalšími autory (Dicker et al. 2006, Haferlach et al. 2007), avšak v našem souboru je v mnohem menší míře detekován patologický klon analýzou karyotypu G-pruhováním (65% vs. 78%, resp. 83%) (Dicker et al. 2006, Haferlach et al. 2007). Rozdíl je zřejmě způsoben

různým podílem vzorků se samostatnou kryptickou intersticiální delecí 13q14, zjištěnou pouze FISH hodnocením mitóz při normálním nálezu v karyotypu, který v našem souboru činí 19% (75/391) oproti pouze 1% (5/508) uváděnému v rozsáhlejší z obou citovaných studií (Haferlach et al. 2007). Celkové zastoupení delece 13q14 jako samostatné změny karyotypu nalezené jakoukoli metodou je přitom obdobné (24%; 91/387 v prezentovaném souboru vs. 25%; 125/508 v Haferlach et al.). Vzhledem k tomu, že u více než poloviny případů delece 13q14 se jedná o delecí menší než 1Mb (Ouilllette et al. 2008, Parker et al. 2011), je spíše pravděpodobný její obtížný nálezný analýzou karyotypu a naopak vyšší záchyt pouze FISH vyšetřením, tedy ve shodě s výsledky prezentovanými v této práci.

Vyšetření většího souboru stimulovaných CLL vzorků také potvrdilo pilotní příznivý nálezný vysokého podílu patologických mitóz ve vzorcích (medián velikosti patologických klonů při analýze karyotypu byl 87% při mediánu infiltrace CLL buňkami dle FACS 60%).

Porovnání s detekcí rekurentních aberací FISH vyšetřením interfázických jader

Výše uvedená míra záchytu aberantních klonů analýzou mitóz (vyšetřením karyotypu a/nebo FISH), tj. 84% (329/391) vzorků s patologickým klonem, je obdobná jako míra záchytu alespoň jedné z rekurentních aberací (delece 13q14, delece 11q22-23, delece 17p13, trisomie 12) interfázickým FISH vyšetřením, která je v literatuře udávaná ve výši ~80% (Dohner et al. 1999, Dohner et al. 2000, Dewald et al. 2003) a v prezentovaném souboru činí 83% (325/391).

Delece 11q/ATM, delece 17p/TP53 a trisomie 12 byly až na výjimky neúspěšných kultivací či malých (sub)klonů hodnotitelné vždy i analýzou karyotypu. Oproti tomu delece 13q14 byla v převaze případů pro analýzu G-pruhováním kryptická, tj. nebyla nalezena ani při úspěšné kultivaci a vysokém zastoupení patologického klonu (66% všech delecí 13q14, resp. 152/235, bylo stanoveno pouze FISH metodou, včetně analýzy mitóz).

Analýzou karyotypu však byla zjištěna i přítomnost jiných chromosomových aberací než uvedených rekurentních, vyšetřovaných zároveň i FISH, a to u 44% (171/391) vyšetřených vzorků.

Ze vzorků s normálním nálezem FISH pro všechny rekurentní aberace (17% vzorků; 66/391) byly zjištěny jiné aberace v karyotypu ve více než jedné třetině případů (23/66; 35%).

Souhrnně lze konstatovat, že kombinací FISH vyšetření a analýzy karyotypu po stimulované kultivaci byl nalezen patologický klon u 89% vzorků (348/391), tedy ve srovnatelné míře s publikovanými údaji (85% v (Haferlach et al. 2007)). Provedení analýzy karyotypu však zásadně navyšuje množství získaných informací o chromosomových abnormalitách leukemických buněk.

Klonální vývoj

Hodnocení klonálního vývoje ve vyšetřovaném souboru bylo provedeno ve dvou rovinách. Byla hodnocena přítomnost více klonů ve vyšetřovaném vzorku, klonální vývoj „*in situ*“, a pak klonální vývoj v průběhu onemocnění u opakovaných vyšetření stejných pacientů.

Přítomnost více (sub)klonů ve vyšetřovaném vzorku, detekovaná analýzou karyotypu a/nebo FISH, byla zjištěna v 34% (133/391) vzorků; pouze analýzou karyotypu byla stanovena v 24% (93/391) vzorků ve shodě s 27% uváděnými v (Haferlach et al. 2007).

Nový klonální vývoj v průběhu onemocnění byl nalezen celkem u 23% (46/193) vzorků vyšetřených mimo prvozácht onemocnění, resp. u 29% (43/149) pacientů.

U 139 vzorků (108 pacientů), porovnávaných s dřívějším FISH vyšetřením na buňkách nestimulované kultivace, byly hodnoceny pouze přídatné změny rekurentních aberací (delece 13q14, delece 11q22-23, delece 17p13, trisomie 12). Takto byly stanoveny změny v 18% (25/139) vzorků, resp. u 23% (25/108) pacientů, ve shodě s 11-26% udávanými v literárních zdrojích (Shanafelt et al. 2006, Stilgenbauer et al. 2007, Berkova et al. 2009, Loscertales et al. 2010). Nejčastěji byly zastoupeny přídatné delece 13q14 (11x) a delece 11q (7x).

Hodnocením opakovaných vyšetření po stimulované kultivaci byl zachycen klonální vývoj v podstatně vyšší míře, a to v 39% (21/54) vzorků, resp. u 44% (18/41) pacientů. Rozdíl je způsoben možností hodnotit i další změny karyotypu než pouze zmiňované rekurentní aberace stanovované FISH metodou; hodnocení pouze FISH by u této skupiny přineslo informace o novém klonální vývoji u 20% (11/54) vzorků, resp. u 24% (10/41) pacientů, tj. obdobně jako ve skupině 139 vyšetření uvedených v předchozím odstavci. Míra cytogenetické evoluce karyotypu CLL buněk není v recentní literatuře příliš uváděna, dle omezených údajů je referována v míře obdobné jako v prezentovaných datech, 36% (Van Den Neste et al. 2007), příp. 43% (Finn et al. 1998).

Kromě nově zachycených (sub)klonálních aberací také bylo zaznamenáno vymizení původně prokazovaných klonů, celkem 11x (11/46). S výjimkou jednoho případu parciální remise (s přetrvávající ~60% infiltrací CLL buňkami dle FACS) se jednalo o vyšetření při klinickém stavu pacienta hodnoceném jako progresse po léčbě (9x), příp. relaps (1x), vždy s infiltrací dle FACS více než 25% (s mediánem infiltrace 60%). Tento jev není v cytogenetických studiích věnovaných CLL dosud zmiňován, avšak je popisován v recentní práci sledující klonální vývoj u CLL celoexomovým sekvenováním, kde vymizení (resp. významná redukce) jednoho ze subklonů po léčbě je spojeno s expanzí klonu obsahující silně „proliferativní“ aberaci nebo mutaci (silný „driver“) (Landau et al. 2013). Tomuto modelu odpovídá i příklad pac. č. 228 uvedený v grafu 4.3. s postupným zánikem subklonu s delecí 13q14 a současnou expanzí subklonu s derivovanými chromosomy 1 a 16 (komplexní přestavba s vícečetnými zlomy chromosomu 1 dle vyšetření karyotypu, může se jednat o chromothripsi chrom. 1) a pac. č. 53 se zánikem subklonu s translokací t(11;13) spojenou s delecí 13q14 a nálezem nových dvou subklonů obsahujících delecí TP53 na základě dvou nebalancovaných translokací. Nepříznivý vliv ztráty TP53 spojený s chemorezistencí onemocnění je nesporný (Oscier et al. 2002, Dohner et al. 2000, Dohner et al. 1995, el Rouby et al. 1993, Wattel et al. 1994), nově je popisován její zisk v průběhu klonálního vývoje s následnou expanzí tohoto nového subklonu (Landau et al. 2013) vedoucí k progresi onemocnění. Chromothripsis, poprvé nalezená u pacienta s CLL (Stephens et al. 2011), je v patogenezi nádorových onemocnění nově popisovaný jev, předpokládáně rovněž spojovaný s progresivními formami onemocnění (viz review (Forment et al. 2012)).

Klonální vývoj karyotypu (≥ 2 přítomné klony v daném vyšetření) se častěji vyskytoval ve skupině pacientů s progresivním onemocněním (v progresi před/po léčbě, v relapsu či s rezistentním onemocněním) oproti pacientům vyšetřeným při záchytu onemocnění či se stabilním průběhem, statisticky na hranici významnosti (P 0,05).

Obdobné pozorování bylo učiněno pro klonální vývoj v průběhu onemocnění (≥ 1 klonální změna od předchozího vyš.), kdy u vzorků vyšetřených mimo prvozáchyt onemocnění se vyskytoval klonální vývoj častěji ve skupině progresivních onemocnění oproti stabilním CLL nevyžadujícím zahájení léčby (P 0,05).

Hodnocení klonálního vývoje v průběhu onemocnění (≥ 1 klonální změna od předchozího vyš.) u pacientů vyšetřených opakovaně po stimulované kultivaci opět

ukázalo častější výskyt klonálního vývoje u vzorků progredujících onemocnění (P 0,04).

Výsledky analýzy klonálního vývoje v prezentovaném souboru, a to jak klonálního vývoje „*in situ*“ tak především získaných změn v průběhu onemocnění, podporují hypotézu výskytu poměrně častých klonálních změn v buňkách CLL (Juliusson et al. 1988, Finn et al. 1998, Van Den Neste et al. 2007) a naznačené spojení klonálního vývoje s progresivitou onemocnění je ve shodě s udávanou zhoršenou prognózou pacientů se zachyceným klonálním vývojem (Stilgenbauer et al. 2007).

Komplexní změny

Zevrubnou analýzou mitóz byly nalezeny komplexní změny karyotypu v 28% vzorků (resp. u 27% pacientů), v souladu s publikovanými údaji, uvádějícími 24%, resp. 16% pacientů s komplexními změnami (Dicker et al. 2006, Haferlach et al. 2007). Ve shodě s literaturou (Haferlach et al. 2007) byla také ve skupině komplexních změn oproti celému souboru významně častěji nacházena ztráta genu TP53 (18% vs. 7%, P 0,002). Rovněž delece ATM genu a delece 6q byla ve skupině komplexních změn nacházena častěji (50% vs. 24% P 0,0000006, resp. 18% vs. 8%, P 0,008), což může svědčit také pro zvýšenou chromosomovou nestabilitu spojenou s těmito aberacemi, dále přispívající ke zhoršené prognóze onemocnění.

Komplexní změny karyotypu (≥ 3 aberace) se významně častěji (P 0,00001) vyskytovaly ve skupině pacientů s progresivním onemocněním (v progresi před/po léčbě, v relapsu či s rezistentním onemocněním) oproti pacientům vyšetřeným při zachytu onemocnění či se stabilním průběhem. Pokud byly do hodnocení komplexních změn zahrnuty rovněž kryptické změny na chromosomu 13 detekované FISH, byla asociace s progresivním onemocněním slabší, nicméně statisticky stále velmi významná (P 0,0002). Tato zjištění jsou v souladu s udávanou špatnou prognózou spojenou s komplexními změnami (Juliusson, Gahrton 1990, Juliusson et al. 1990, Koski et al. 2000).

Chromosomové translokace

Chromosomové translokace byly nalezeny v 37% (144/391) vzorků, resp. u 36% (121/337) pacientů, obdobně jako u 33%, resp. 42% uváděných v odborné literatuře (Mayr et al. 2006, Van Den Neste et al. 2007). Detekováno bylo celkem 218 translokací, převážně nebalancovaných (85%; 185/218). Nebyly nalezeny opakovaně se vyskytující nebalancované translokace, ale často byly prokázány zlomy v místech

rekurentních delecí (13q, 11q, 17p, 6q), jak již bylo dříve popsáno (Mayr et al. 2006). Tyto nebalancované translokace jsou diskutovány samostatně níže.

Poměrně frekventně (15/391 pacientů; 4%) byla také prokazována nebalancovaná translokace chromosomu 2 vedoucí k rozsáhlému zmnožení 2p, přesto však byla v tomto souboru nacházena v nižším zastoupení, než je uváděno v literatuře při detekci metodou aCGH (8% (16/200) u neselektovaných pacientů v (Jarosova et al. 2010), příp. 28% (22/78) neléčených pacientů ve stádiu B/C dle Bineta v (Chapiro et al. 2010)). Frekvence zmnožení 2p sice může být ve zde prezentovaných datech díky vyšetření většího množství pacientů stanovena přesněji, ale na druhou stranu je také zřejmě ovlivněna (snížena) nižší rozlišovací schopností analýzy karyotypu oproti aCGH.

Balancovaných translokací bylo popsáno 33 (33/217; 15%) a prevalentně byly nacházeny na chromosomu 14 (18/33), v polovině těchto případů (9/33) se pak jednalo o rekurentní translokaci IGH@ genu. Se započtením translokací genů IGL@ a IGK@ (celkem 3x) byly translokace imunoglobulinových genů nalezeny u 3,5% (12/337) pacientů, resp. v 4% (16/391) vzorků. Nalezený podíl vzorků s těmito translokacemi je nižší než 7-8% uváděných v literatuře (Cavazzini et al. 2008, Berkova et al. 2008). Může se sice jednat pouze o chybu malých čísel, avšak vzhledem k téměř kryptickému charakteru některých těchto translokací při nižší kvalitě chromosomů a k jejich prognostickému významu (zejména translokace t(8;14), t(14;19) a t(19;22)) je vhodné do panelu základních FISH vyšetření připojit analýzu se sondou pro detekci zlomu IGH@ genu.

Chromosomové translokace se také významně častěji, statisticky nejprůkazněji ze všech sledovaných skupin aberací, vyskytovaly ve skupině pacientů s progresivním onemocněním (v progresi před/po léčbě, v relapsu či s rezistentním onemocněním) oproti pacientům vyšetřeným při záchytu onemocnění či se stabilním průběhem (P 0,000003); toto pozorování je ve shodě s údaji v dostupných publikacích na toto téma (Mayr et al. 2006, Van Den Neste et al. 2007).

Delece 13q14

Delece 13q14 je nacházena FISH vyšetřením interfázních jader u 55-64% pacientů s CLL (Dohner et al. 1999, Dohner et al. 2000, Dewald et al. 2003), v prezentovaném souboru byla prokázána FISH celkem v 62% (235/386) vzorků, resp. u 61% (209/336) pacientů. 77% (182/235) detekovaných delecí bylo monoalelických, v 16% (37/235) případů delece byla prokázána současná přítomnost monoleické a bialeické delece, v 7% (16/235) pouze delece bialeická.

Další informace o charakteru delece 13q14 přineslo provedení analýzy mitóz metodou FISH a vyšetřením karyotypu po stimulované kultivaci. Submikroskopická delece, kryptická pro analýzu karyotypu G-pruhováním a detekovaná pouze FISH, byla nalezena v 66% (154/235) případů delece (z toho se v naprosté převaze, v 150/154 případech, jednalo o intersticiální delecí). Tento nálezn zřejmě odpovídá delecí obvyklého ~900 kb minimálního deletovaného regionu, která je dle výsledků aCGH přítomna u více než poloviny případů delece (Ouillette et al. 2008, Parker et al. 2011). Rozsáhlejší intersticiální delece 13q14 detekovaná i analýzou karyotypu byla zjištěna u 17% (41/235) prokázaných delecí a u dalších 10% (23/235) případů delece byla v karyotypu nalezena jiná přestavba chromosomu 13 spojená se ztrátou 13q14.

Ve skupině rozsáhlých intersticiálních delecí a jiných přestaveb chromosomu 13 byly častěji nacházeny komplexní změny karyotypu (≥ 3 aberace zjištěné pouze analýzou karyotypu) oproti skupině kryptických delecí stanovených pouze FISH (24/64; 37% vs. 26/154; 17%, $P 0,001$). Ve skupině delecí nalezených analýzou karyotypu byly také mírně častěji zastoupeny vzorky odebrané ve stádiu progresu onemocnění (před léčbou, po léčbě, v relapsu či u rezistentních onemocnění) oproti vzorkům s kryptickou delecí (34/64; 53% vs. 60/154; 39%, $P 0,07$). Tato zjištění by mohla odpovídat v literatuře uváděné horší prognóze delece 13q14 většího rozsahu (Ouillette et al. 2008, Parker et al. 2011) a její asociaci se zvýšenou genomickou komplexitou (Ouillette et al. 2010).

Pro přesnější určení výskytu delecí 13q14 většího rozsahu a jejich vlivu na prognózu onemocnění, by bylo vhodné všechny vzorky s prokázanou delecí 13q14 vyšetřit dále FISH se sondou mimo MDR, např. se sondou pro oblast genu RB1, která je u většiny větších delecí také deletována (Ouillette et al. 2008). Zdá se být zřejmé, že jednoznačné stanovení delecí 13q14 většího rozsahu by navíc přineslo nové prognostické informace v individuálních případech onemocnění.

Intersticiální delece 13q14 jako samostatná změna karyotypu (kryptická i detekovaná analýzou karyotypu) byla nalezena pouze v 39% (91/235) případů delece. Ve skupině samostatných intersticiálních delecí 13q14 byly významně častěji zastoupeny vzorky z prvozáhytu či stabilního onemocnění ve srovnání jak se všemi případy delece 13q14 (65/91, 71% vs. 133/235, 57%, $P 0,02$) tak i ve srovnání s delecemi 13q14 jako součástmi komplexních změn karyotypu (65/91, 71% vs. 34/83, 41%, $P 0,0006$). Tato zjištění odpovídají dlouho známé predikci samostatné delece 13q14 jako příznivého prognostického faktoru (Dohner et al. 1999, Dohner et al. 2000, Dewald et al. 2003). Zda se i ve skupině samostatných delecí 13q14 projevuje

nepříznivý vliv rozsáhlejší delece 13q14 bude jistě předmětem dalšího zpřesňujícího studia.

Translokace 13q14 s delecí v místě translokačního zlomu

Podrobná analýza mitóz vyšetřením karyotypu a FISH umožnila také studium formy výskytu delece 13q14, resp. mechanismu vzniku této delece. V převaze vzorků s delecí (81%; 191/235) byla prokázána delece intersticiální, ať již se jednalo o delecí jedné alely či obou. V 11% (25/235) případů delecí byla prokázána přítomnost reciproké translokace s delecí v místě translokačního zlomu jako mechanismu vzniku delece jedné (24x) či obou alel (1x). V dalším 1% (2/235) vzorků byla nalezena monosomie 13 a ve zbývajících 7% vzorků (17/235) nebylo možné analýzou mitóz formu delece spolehlivě určit a byla stanovena pouze interfázickou FISH.

Translokace 13q14 s delecí v místě translokačního zlomu jako minoritní forma delece 13q14 u CLL, resp. B-NHL, byla v odborné literatuře již opakovaně popsána (Gardiner et al. 1997, Haferlach et al. 2007, Struski et al. 2007, Herholz et al. 2007). V jedné z citovaných studií (Haferlach et al. 2007) je uveden podíl této formy delece na celkovém počtu delecí 13q14 u CLL ve výši 13% a v další (Struski et al. 2007) ve výši 10% obecně u B-NHL, tj. obdobně jako v prezentovaném souboru. V (Struski et al. 2007) je zároveň ovšem zmiňováno navíc stejné zastoupení (~10%) translokací 13q bez delece 13q14. V prezentovaných datech byl nalezen zlom 13q bez současné ztráty 13q14 (FISH sondou pro D13S319) pouze 5x (5/34; 15% všech nalezených zlomů 13q) oproti 29 zlomům (29/34; 85%) souvisejících s translokací s delecí v místě zlomu. 2x (2/5) se jednalo o centrickou fúzi (zlom 13q10) a pouze ve zbylých 3 (3/5) případech o zlom v oblasti 13q12-13q14. Vzhledem k nálezům u pac. č. 94 (s koexistencí různých forem delece 13q14), kde sice nebyla v t/II jednoznačně prokázána ztráta D13S319, ale delece DLEU1 a RB1 ano (viz tabulka 4.7), není vyloučeno, že i v těchto 3 případech může být delece v místě translokačního zlomu přítomna, avšak mimo zvolený základní vyšetřovaný lokus (D13S319). Na základě předkládaných výsledků se lze tedy domnívat, že translokace 13q je u CLL v naprosté převaze případů spojena s delecí oblasti 13q14 v místě translokačního zlomu.

Celkem bylo hodnoceno 24 translokací 13q14 s delecí v místě translokačního zlomu (v 25 vyšetřeních u 23 pacientů, 2 pacienti byli vyšetřeni opakovaně). U 20 translokací se jednalo o translokaci s jedním zjištěným partnerským zlomem a 4x o komplexní přestavbu mezi více než dvěma chromosomy. Translokační partneři byli různí, ve shodě s nálezy dalších studií (Struski et al. 2007, Gardiner et al. 1997).

Nejčastěji se opakujícím partnerem byl chromosom 11 (5x 11q), ve dvou případech translokace vedla zároveň i k delecí 11q, resp. ztrátě ATM genu. Zajímavý je poměrně vysoký podíl (17%; 4/24) komplexních přestaveb mezi více chromosomy, opět již dříve u translokací 13q referovaný (Gardiner et al. 1997).

U 15 pacientů/vzorků (15/25) byla nalezena translokace s delecí v místě translokačního zlomu jako příčina monoalelické delecce 13q14. U dvou dalších vzorků (2/25) opakovaných vyšetření byl zachycen klonální vývoj – ztráta druhé alely intersticiální delecí v subklonu. U 7 zbývajících pacientů (7/25; 17%) byla nalezena současná přítomnost i klonu s intersticiální delecí (viz diskuse níže), u jednoho z těchto pacientů (pac. č. 94) byl zachycen klon se dvěma translokacemi 13q14 s delecí v místě zlomu vedoucími k bialelické delecí. Případy translokace 13q14 se ztrátou druhé alely intersticiální delecí byly již referovány (Gardiner et al. 1997), rovněž tak i kazuistika dvou translokací vedoucí k bialelické ztrátě (Herholz et al. 2007).

Vzhledem k různým translokačním partnerům a chybějícím důkazům o ovlivnění genové exprese na partnerském chromosomu (např. aktivaci onkogenu) je možné předpokládat, že přímý leukemický efekt translokace 13q14 spočívá (pouze) ve ztrátě tumorsupresorových genů v MDR, příp. mimo něj. Na rozdíl od samostatných delecí 13q14 je však přítomnost jakékoli, byť jediné, translokace v karyotypu buněk CLL spojována se zhoršenou prognózou (Mayr et al. 2006, Van Den Neste et al. 2007). Při posouzení vlivu translokací 13q14 na prognózu onemocnění je nutné vzít v úvahu častou přítomnost komplexních změn karyotypu (14/25; 56%) a klonálního vývoje (17/25; 68%) v případech zjištěných translokací 13q14, výše uvedenou významnou četnost komplexních translokací 13q14 (4/24 translokací), častou koexistenci s klonu s intersticiální delecí 13q14 (7/25; 28%) a také častější přítomnost ztrát většího rozsahu, resp. oblasti genu RB1, u delecí v místě translokačního zlomu než u intersticiálních delecí (4/6 vs. 3/8 v prezentovaných případech koexistence, viz tab. 4.7).

Na základě těchto nálezů lze přítomnost translokace 13q14 považovat za znak zvýšené chromosomové nestability, která souvisí se zhoršenou prognózou onemocnění. Toto konstatování je nicméně provedeno na základě hodnocení malého souboru dat a bude nutné jej ověřit na větší kohortě vzorků.

Nezávislá koexistence klonů s různými formami delecce 13q14

Pečlivou analýzou mitóz při hodnocení FISH se sondou D13S319 v MDR (v kombinaci s vyšetřením karyotypu) byly nalezeny u 7 pacientů současně přítomné

klony s oběma nejčastějšími formami delecí 13q14, tj. s intersticiální delecí a s delecí v místě translokačního zlomu (tab. 4.6, část B). Obdobný případ byl v odborné literatuře dosud zaznamenán pouze jednou, bez bližší diskuse či podrobného vyšetření FISH metodou (Gardiner et al. 1997).

Ve třech případech (3/7, pac. č. 62, 204, 260) byly nalezeny současně dva klony s monoalelickou delecí – jeden s intersticiální kryptickou delecí, druhý s delecí v místě translokačního zlomu odpovídající nálezu zdánlivě balancované translokace v karyotypu. Tři další případy (3/7, pac. č. 131, 219, 335) ukázaly složitější klonální vývoj se zachycením obdobné koexistence na bialeické úrovni, resp. jednoho klonu s bialeickou intersticiální delecí a druhého klonu s delecí jedné alely v místě translokačního zlomu a s intersticiální delecí alely druhé. Zbývající případ (1/7, pac. č. 94) spočíval v koexistenci klonu s monoalelickou intersticiální delecí a klonu s bialeickou delecí v důsledku dvou různých translokací 13q14.

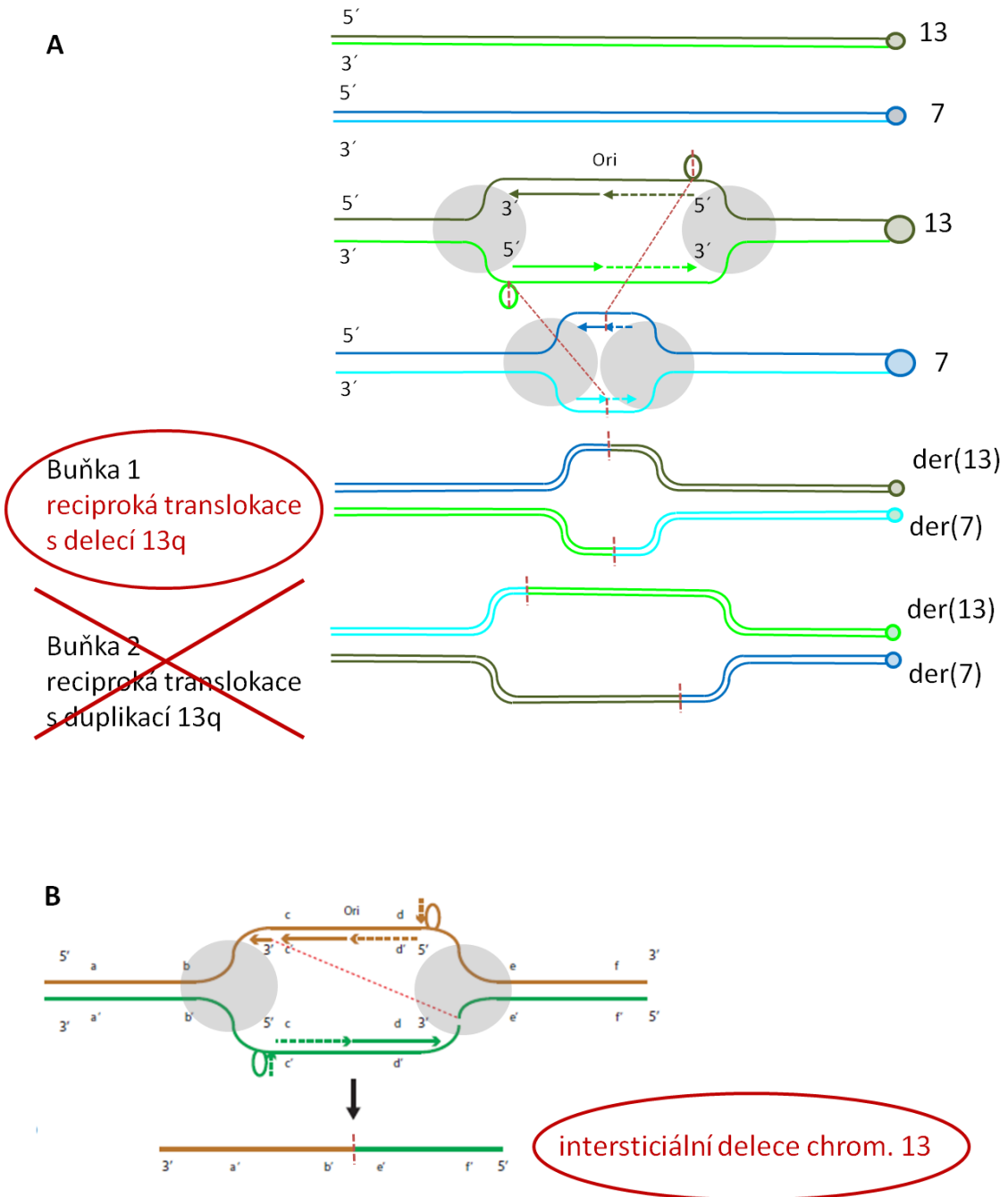
Čtyři pacienti z výše uvedených sedmi (pac. č. 94, 131, 204, 219) byli dále vyšetřeni FISH sondami mimo MDR, s podrobnou analýzou mitóz i interfázních jader, umožňující další zpřesnění nálezů (viz tabulka 4.7, obrázek 4.2 a (Hruba et al. 2012)). Ve třech případech (všechny kromě pac. č. 204) byly nalezeny další, méně zastoupené klony. Ve dvou případech (pac. č. 131 a 219) byl tímto vyšetřením prokázán nezávislý (paralelní) vznik intersticiálních delecí druhých alel v klonu se ztrátou první alely intersticiální delecí a v klonu s delecí první alely v důsledku translokace 13q14 (viz obr. 4.5, část B,C).

U pacienta č. 204 s vhodným klonálním vývojem umožňujícím provedení důkazu nezávislosti vzniku obou forem delecí 13q14 byla provedena další hybridizace současně se sondami detekujícími intersticiální delecí 14q a delecí 13q14 (viz obr. 4.3). Výsledky této hybridizace jednoznačně prokázaly, že v tomto případě je přítomnost klonu s intersticiální delecí 13q14 a klonu s delecí v místě translokačního zlomu na sobě nezávislá (viz schéma na obr. 4.4). Příčinou takového obrazu klonálního vývoje mohl být pouze rovněž nezávislý vznik obou forem delecí.

Na základě těchto výsledků se lze domnívat, že nezávisle na klonu s intersticiální delecí vznikají i translokace 13q14 s delecí v místě zlomu ve všech ostatních případech. Nejedná se tedy o postupný klonální vývoj (např. klonu s delecí v místě translokačního zlomu z klonu s intersticiální delecí). Obdobné tvrzení může navíc platit i pro další B-NHL, vzhledem k tomu, že translokace 13q14 s delecí v místě zlomu jsou zde rovněž rekurentně nacházeny (Struski et al. 2007).

Mechanismus vzniku delece v místě translokačního zlomu

Vhodným mechanismem pro jednokrokový vznik translokace s delecí v místě translokačního zlomu může být mikrohomologií zprostředkovaná, zlomem indukovaná replikace (MMBIR), viz obr. 5.1, část A.



Obrázek 5.1 *MMBIR (mikrohomologií zprostředkovaná, zlomem indukovaná replikace)*

A – schéma vzniku reciproké translokace $t(7;13)$ s delecí 13q v místě zlomu, partnerský chromosom 7 v tomto případě bez zisku či ztráty v místě zlomu; **B** – obdobně vznik interstiální delece
Zpracováno dle (Howarth et al. 2011)

MMBIR je jedním z mechanismů pro opravu zlomů DNA způsobujících zástavu replikační vidlice. Recentně byla tato replikační oprava navržena i pro vznik recipročných translokací s duplikacemi v místech zlomů v nádorových buňkách (Howarth et al. 2011). Vedle duplikace může tento mechanismus vést (v druhé dceřinné buňce) v místě translokačního zlomu i k delecí a navíc by také vysvětloval pozorované delece v místě zlomu translokačního partnera (v prezentovaných datech 2x ztráta ATM genu na chromosomu 11). Prostřednictvím MMBIR také mohou vznikat intersticiální delece (Howarth et al. 2011), viz obrázek 5.1, část B.

Nicméně, případ t/IV se zachovaným signálem pro lokus RB1 genu na obou derivovaných chromosomech (pac. č. 131, viz tabulka 4.7, obrázek 4.2) může naznačovat i jiný, více komplikovaný, mechanismus vzniku těchto translokací.

Multiklonální intersticiální delece 13q14

U jednoho pacienta (č. 222) byly ve vzorku z progresse onemocnění nalezeny, kombinací analýzy karyotypu a FISH pro lokus D13S319 v MDR, tři klony s různými monoalelickými intersticiálními delecemi 13q14. Dalším vyšetřením FISH se sondami mimo MDR byl stanoven různý rozsah každé z těchto tří delecí. Doplněné retrospektivní vyšetření navíc prokázalo shodný nález i v době záchytu onemocnění (viz tabulka 4.8, obrázek 4.6 a schéma na obrázku 4.7). Jedná se o první publikovaný případ v odborné literatuře (Hruba, Subrt 2013).

Tento případ názorně dokumentuje nutnost analýzy CLL buněk po stimulované kultivaci, neboť v době záchytu onemocnění (r. 2005, tj. před zavedením stimulované kultivace) byla prokázána FISH vyšetřením interfázních jader z buněk nestimulované kultivace pouze delece 13q14, další změny včetně multiklonality delece 13q14 zůstaly skryty, a cytogenetické vyšetření predikovalo příznivou prognózu. Onemocnění však progredovalo s nutností zahájení léčby 16 měsíců od diagnózy. Pokud je vzat v úvahu neutrální vliv na prognózu přítomné rekurentní translokace t(14;18)(q32;q21), je možné se domnívat, že multiklonalita delece 13q14 jako projev chromosomové nestability mohla předznamenat rychlou progresi onemocnění.

Lze také předpokládat, že obdobná skrytá multiklonalita se může vyskytovat i u jiných případů intersticiální delece 13q14. Odhalení dalších případů může napomoci důsledná chromosomová analýza CLL buněk po jejich vhodné stimulaci *in vitro*, zahrnující kromě vyšetření karyotypu i FISH s více různými sondami pro oblast 13q14 pro detekci (sub)klonů s různými rozsahy delece 13q14. Skutečnou četnost těchto multiklonálních delecí lze ale obtížně určit, neboť i při provedení všech zmiňovaných

analýz zůstanou neodhaleny případy s obdobnou velikostí delece či s cytogeneticky nerozlišitelnými homology chromosomu 13 (resp. bez jiných aberací či polymorfismů).

Multiklonalita delece 13q14

Zjištěné případy koexistence klonů s různými formami delece 13q14 a předpoklad, že i (některé) intersticiální delece mohou být multiklonální, vedou k hypotéze, že frekvence vzniku delecí 13q14 může být výrazně vyšší než je maximum dvou událostí na pacienta v případě bialecké delece. Významné frekvenci událostí v oblasti 13q14 u CLL samozřejmě odpovídá vysoký podíl pacientů s delecí 13q14 a její rozpoznáný příspěvek k patogenezi CLL (viz kap. 1.8), ale také poměrně častý vznik i zánik (sub)klonů s delecí 13q14 v průběhu onemocnění (viz kap. 4.1.4 a diskuse ke klonálnímu vývoji výše).

Prezentované případy multiklonality (koexistence klonů s různými formami delece a kazuistika multiklonální intersticiální delece) vyšetřené i sondami mimo MDR navíc v převaze (4/5) obsahovaly i subklon(y) s delecí RB1 genu, tj. s delecí 13q14 většího rozsahu asociovanou s větší genomovou komplexitou (Ouillette et al. 2010) a zhoršenou prognózou (Ouillette et al. 2008, Parker et al. 2011).

Přítomnost více klonů s několika nezávislými zlomovými událostmi v oblasti 13q14 („hot spotu“) je vyjádřením chromosomové nestability způsobené doposud nerozpoznanou příčinou. V určité části případů zřejmě může být nestabilita genomu u CLL, alespoň na cytogenetické či molekulárně-cytogenetické úrovni, vyjádřena pouze multiklonalitou tohoto jednoho lokusu a i tyto případy mohou být asociovány s rychlejší progresí onemocnění. Multiklonalita 13q14 proto může být novým prognostickým faktorem důležitým zejména v případech „samostatných“ delecí 13q14.

Delece 11q

Delece ATM genu byla nalezena FISH v 24% (92/387) vzorků, resp. u 24% (81/337) pacientů, což je mírně vyšší zastoupení než jinými autory referovaných 15-18% (Dohner et al. 1999, Dohner et al. 2000, Dewald et al. 2003).

V převaze případů ztrát ATM byla nalezena v karyotypu delece 11q (77/92; 84%), většinou popisovaná jako intersticiální (59x), v části vzorků jako terminální (18x). Nebalancovaná translokace vedoucí ke ztrátě 11q byla prokázána analýzou karyotypu v 8,5% (8/92) vzorků. Kryptické delece 11q nebyly detekovány. Nalezená četnost nebalancovaných translokací odpovídá hodnotě 7% uváděných v dostupné literatuře (Haferlach et al. 2007).

Delece 11q byla často (53/92; 58%) nacházena v rámci komplexních změn karyotypu (≥ 3 aberace zjištěné analýzou karyotypu v kombinaci s kryptickými nálezy FISH pro 13q14), nebalancované translokace 11q pak byly součástí komplexního karyotypu ve všech (8/8) analyzovaných případech. Tato hodnota je postatně vyšší než 30% referovaných v (Haferlach et al. 2007), což je dáno zejména zahrnutím kryptických nálezů 13q14 do hodnocení komplexních změn (pokud tyto jsou vyloučeny, podíl vzorků s delecí 11q a komplexními změnami činí pouze 43%; 40/92). Zahrnutí kryptických změn 13q14 do hodnocení komplexních změn však lépe odráží genomovou komplexitu než pouze samotné výsledky analýzy karyotypu a v případě delece 11q dokumentuje zřejmou, dříve opakovaně publikovanou, souvislost se zhoršenou prognózou (Dohner et al. 1999, Dohner et al. 2000, Dewald et al. 2003, Dohner et al. 1997). Dalším faktorem ovlivňujícím rozdíl v zastoupení komplexních změn u vzorků s delecí 11q ve srovnávaných souborech je jistě také velikost a složení jednotlivých hodnocených souborů.

Trisomie 12

Trisomie 12 byla nalezena v 18% (70/385) vzorků, resp. 17,5% (59/337) pacientů, odpovídajících přesně dříve publikovaným hodnotám (Dohner et al. 1999, Dohner et al. 2000, Dewald et al. 2003).

Neočekávaně byla v 6% (4/70) vzorků s trisomií chromosomu 12 prokázána analýzou karyotypu další přestavba nadpočetného chromosomu 12. Většinou (3/4 případů) se jednalo o součást komplexních změn karyotypu, v části případů (2/4) s pozorovaným klonálním vývojem z klonu se samostatnou trisomií 12. Význam samotné další přestavby nadpočetného chromosomu 12 je zřejmě okrajový oproti zjištěné přítomnosti komplexních změn karyotypu.

Komplexní změny karyotypu (≥ 3 aberace zjištěné analýzou karyotypu v kombinaci s kryptickými nálezy FISH pro 13q14) byly nalezeny v 31% (22/70) vzorků s trisomií 12, tj. na úrovni mírně vyšší než bylo dříve publikováno (23%) (Haferlach et al. 2007). Rozdíl je způsoben zahrnutím kryptických změn 13q14 do hodnocení komplexních změn karyotypu (pokud by nebyly zahrnuty, zastoupení komplexních karyotypů u vzorků s trisomií 12 by činilo 23%; 16/70; viz také výše obdobně diskutovaný rozdíl v zastoupení komplexních karyotypů u delecí 11q).

Delece 17p

Delece genu TP53 byla nalezena u 7% (27/384) vzorků, resp. 6,5% (22/385) pacientů, tj. v očekávané míře dle dříve publikovaných údajů (Dohner et al. 1999, Dohner et al. 2000, Dewald et al. 2003).

Ztráty 17p byly, na rozdíl od ostatních sledovaných aberací, v převaze případů nacházeny jako důsledek nebalancovaných translokací chromosomu 17 (19/27; 71%). Nejčastěji se jednalo o zlomy 17p, dále pak o centrické fúze nebo o translokace se zlomy 17q se ztrátou krátkých ramen i centromerické oblasti chromosomu 17. Obdobně vysoké zastoupení ztráty 17p v důsledku nebalancované translokace (u 66% případů delece) bylo již dříve referováno (Haferlach et al. 2007).

Terminální delece 17p se vyskytovaly méně (pouze 6x), navíc většinou v subklonu k nebalancované translokaci (5/6 případů).

Komplexní změny karyotypu (≥ 3 aberace zjištěné analýzou karyotypu v kombinaci s kryptickými nálezy FISH pro 13q14) byly u vzorků se ztrátou 17p nacházeny nejčastěji ze všech hodnocených skupin aberací, v 70% (19/27) případů. Hranice komplexity navíc byla vždy dosažena již hodnocením karyotypu bez ohledu na případnou přítomnost kryptických změn 13q14.

Vysoká četnost nacházených komplexních změn karyotypu ve vzorcích s delecí 17p je v souladu s údaji publikovanými v (Haferlach et al. 2007), kde komplexní změny karyotypu byly nalezeny u 66% delecí 17p. Souvislost delece 17p s komplexními změnami karyotypu zcela odpovídá nepříznivé prognóze delecí 17p/genu TP53 u CLL (Oscier et al. 2002, Dohner et al. 2000, Dohner et al. 1995).

Delece 6q

Delece 6q byla nalezena v 8% (33/391) vzorků, resp. u 8% (28/337) pacientů, tedy srovnatelně s dříve publikovanou četností delecí 6q (Stilgenbauer et al. 1999, Dewald et al. 2003, Cuneo et al. 2004, Haferlach et al. 2007).

V určité části případů (10/33; 30%) byly opět nacházeny ztráty 6q v důsledku nebalancované translokace chromosomu 6, včetně případů se ztrátou i centromerické oblasti chromosomu 6 (4x). Převahu případů (22/33; 67%) pak tvořily delece, většinou popisované jako intersticiální (14x), méně často jako terminální (8x). Podíl nalezených nebalancovaných translokací 6q na celkovém počtu ztrát 6q potvrzuje jejich dříve uváděnou četnost ve výši 26% (Haferlach et al. 2007).

U více než poloviny vzorků s delecí 6q (20/33; 61%) byly nalezeny komplexní změny karyotypu a, podobně jako u ztrát 11q, všechny nalezené nebalancované

translokace vedoucí ke ztrátě 6q byly součástí komplexních změn karyotypu (6x). Tento výsledek by mohl naznačovat spojení delece 6q se spíše zhoršenou prognózou onemocnění, jak bylo již dříve navrhováno (Cuneo et al. 2004, Stilgenbauer et al. 1999).

Intersticiální delece 14q

Intersticiální delece 14q byla nalezena pouze v 2% (7/391) vzorků, z toho ve více než polovině případů v rámci komplexních změn karyotypu (4/7). Vzhledem k velmi nízkým počtům zachycených případů však nelze posuzovat případnou souvislost s genomovou komplexitou, resp. progresivitou onemocnění. Dle publikovaných dat je při srovnatelné frekvenci záhytu predikována zhoršená prognóza (Pospisilova et al. 2007).

6 Závěry

V rámci prezentované disertační práce byla v Genetické laboratoři Ústavu lékařské genetiky LF UK a FN Plzeň zavedena DSP30/IL2 stimulovaná kultivace buněk chronické lymfatické leukemie. V období 1/2008 – 12/2012 bylo vyšetřeno 391 vzorků kostní dřeně nebo periferní krve pacientů s potvrzenou diagnózou CLL při záchytu nebo v průběhu onemocnění.

DSP30/IL2 kultivace ukázala vysokou úspěšnost stimulace buněčného dělení CLL buněk *in vitro* a umožnila u 96% (375/391) vyšetřených vzorků úspěšné cytogenetické vyšetření na mitózách. V 65% (254/391) vzorků byl nalezen patologický klon analýzou karyotypu G-pruhováním a v dalších 19% (75/391) vzorků kryptická intersticiální delece 13q14 prokázána při normálním karyotypu hodnocením mitóz metodou FISH. Celkem byly tedy chromosomové abnormality analýzou mitóz odhaleny u 84% (329/391) vzorků.

Analýza karyotypu přinesla u 44% (171/391) vzorků další informace o chromosomových změnách CLL buněk v porovnání s běžně prováděnou diagnostikou rekurentních aberací (delece 13q14, trisomie chromosomu 12, delece 11q/genu ATM, delece 17p/genuTP53) metodou interfázické FISH.

Chromosomové translokace byly nalezeny u 37% (144/391) vzorků a komplexní změny karyotypu (≥ 3 aberace stanovené analýzou karyotypu v kombinaci s kryptickými změnami 13q14 zjištěnými FISH) u 28% (111/391) vzorků. Byla prokázána jejich silná asociace s progresivní formou onemocnění, resp. jejich častější výskyt u vzorků z progresu onemocnění ve srovnání se vzorky ze záchyty či stabilního onemocnění (P 0,000003, resp. P 0,0002).

Podrobně byl studován klonální vývoj jak v rámci jednotlivých vyšetření („*in situ*“), tak i v průběhu onemocnění u opakovaných vyšetření stejných pacientů. Přítomnost alespoň dvou klonů v daném vyšetření byla zjištěna v 34% (133/391) vzorků. V průběhu onemocnění byl opakovanou analýzou mitóz po stimulované kultivaci prokázán klonální vývoj u 39% (21/54) vzorků, resp. u 41% (18/41) pacientů. Kromě vzniku nových subklonů byl opakovaně u pacientů v progresi po léčbě pozorován i zánik stávajících subklonů se současnou expanzí jiných klonů obsahujících aberace s progresivnějším potenciálem. Klonální vývoj, jak „*in situ*“, tak i detekovaný

v průběhu onemocnění, byl také významně častěji nacházen u vzorků z progresse onemocnění než u vzorků ze záchytu či stabilního onemocnění (P 0,05, resp. P 0,04).

Detailní analýza karyotypu i hodnocení mitóz metodou FISH přinesly nové informace i o běžně vyšetřovaných rekurentních aberacích, především o formě jejich výskytu, resp. mechanismu vzniku. U všech sledovaných delecí (13q14, 11q, 17p i 6q) byl nalezen opakující se mechanismus ztráty dané oblasti v důsledku nebalancované translokace. U delece 17p se dokonce jednalo o převažující mechanismus ztráty, detekovaný u 71% (19/27) případů delece, u delecí 6q, 13q14 a 11q pak došlo k této ztrátě v důsledku nebalancované translokace v 30% (10/33), resp. 11% (25/235) a 8,5% (8/92) případů těchto delecí.

Přítomnost delecí 11q, 17p a 6q byla významně zvýšena ve skupině komplexních změn karyotypu ve srovnání s celým vyšetřeným souborem (P 0,00000006, resp. P 0,002, P 0,008), což koresponduje se zhoršenou prognózou spojovanou s těmito aberacemi.

U nejčastější aberace u CLL, delece 13q14, byla nalezena ztráta této oblasti v důsledku translokace u 11% (25/235) vzorků, resp. 11% (23/209) pacientů. V převaze těchto případů (20 z 24 nalezených translokací) vedla ke ztrátě reciproká translokace mezi dvěma chromosomy s delecí 13q14 v místě translokačního zlomu, z menší části (4/24) komplexní přestavba mezi více chromosomy. Translokace 13q14 se současnou delecí v místě zlomu byly často nacházeny v rámci komplexních změn karyotypu (14/25; 56%) a klonálního vývoje (17/25; 68%).

Důležitým nálezem, poprvé podrobně popsáným v odborné literatuře, byla současná přítomnost klonů s delecí 13q14 v místě translokačního zlomu a klonů s intersticiální delecí 13q14. Tato koexistence byla nalezena u 28% (7/25) případů translokací 13q14. U jednoho z pacientů byl, díky vhodnému klonálnímu vývoji, prokázán nezávislý vznik obou koexistujících forem delecí. Samostatný paralelní a na sobě nezávislý vznik intersticiální delece a delece v místě translokačního zlomu je možné předpokládat i u dalších případů koexistence obou forem delece. Možným jednodukovým mechanismem pro vznik reciproké translokace s delecí v místě zlomu, ale i intersticiální delece, je model mikrohomologií zprostředkované, zlomem indukované replikace (MMBIR).

U jednoho z pacientů s progresivním onemocněním byla navíc prokázána i současná přítomnost tří klonů s různě rozsáhlou intersticiální delecí 13q14 s jasným průkazem nezávislého vzniku jedné z těchto delecí na dvou ostatních. Tento případ

multiklonální intersticiální delece 13q14 byl prvním publikovaným případem v odborné literatuře.

Stávajícími metodami obtížná detekce multiklonality 13q14 znamená její možnou skrytou přítomnost i v dalších případech delecí 13q14, což by předpokládalo vyšší frekvenci událostí v oblasti 13q14 než odpovídá maximu pouhých dvou událostí na pacienta v případě vzniku bialelické delece. Ke zlepšení záchytu víceklonální delece 13q14 může zásadně přispět důsledné provádění analýzy mitóz po stimulované kultivaci a rozšíření panelu FISH vyšetření o další sondy v oblasti delece 13q14, např. pro RB1 gen.

Multiklonalita 13q14, ať již vyjádřená koexistencí klonů s různými formami delece či více klony s nezávislými intersticiálními delecemi, je znakem chromosomové nestability a jako taková může být prognostickým faktorem zvýšené progresivity onemocnění.

7 Literatura

ADAM, Z.; VORLÍČEK, J.; DOUBEK, M. Chronická B lymfocytární leukemie. In: Z. ADAM; and J. VORLÍČEK (editors). *Hematologie II, Přehled maligních hematologických nemocí*. Praha : GRADA Publishing s.r.o., 2001. s. 311. ISBN 80-247-0116-2.

AUSTEN, B., et al. Mutations in the ATM Gene Lead to Impaired overall and Treatment-Free Survival that is Independent of IGVH Mutation Status in Patients with B-CLL. *Blood*. 2005, vol. 106, no. 9, s. 3175-3182. ISSN 0006-4971; 0006-4971.

AUSTEN, B., et al. Mutation Status of the Residual ATM Allele is an Important Determinant of the Cellular Response to Chemotherapy and Survival in Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia Containing an 11q Deletion. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2007, vol. 25, no. 34, s. 5448-5457. ISSN 1527-7755; 0732-183X.

BALATTI, V., et al. NOTCH1 Mutations in CLL Associated with Trisomy 12. *Blood*. 2012, vol. 119, no. 2, s. 329-331. ISSN 1528-0020; 0006-4971.

BERKOVA, A., et al. Combined Molecular Biological and Molecular Cytogenetic Analysis of Genomic Changes in 146 Patients with B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia. *Neoplasma*. 2008, vol. 55, no. 5, s. 400-408. ISSN 0028-2685; 0028-2685.

BERKOVA, A., et al. Clonal Evolution in Chronic Lymphocytic Leukemia Studied by Interphase Fluorescence in-Situ Hybridization. *Neoplasma*. 2009, vol. 56, no. 5, s. 455-458. ISSN 0028-2685; 0028-2685.

BINET, J. L., et al. A New Prognostic Classification of Chronic Lymphocytic Leukemia Derived from a Multivariate Survival Analysis. *Cancer*. 1981, vol. 48, no. 1, s. 198-206. ISSN 0008-543X; 0008-543X.

BOURKE, E., et al. The Toll-Like Receptor Repertoire of Human B Lymphocytes: Inducible and Selective Expression of TLR9 and TLR10 in Normal and Transformed Cells. *Blood*. 2003, vol. 102, no. 3, s. 956-963. ISSN 0006-4971; 0006-4971.

BUHMANN, R., et al. CD40L Stimulation Enhances the Ability of Conventional Metaphase Cytogenetics to Detect Chromosome Aberrations in B-Cell Chronic Lymphocytic Leukaemia Cells. *British Journal of Haematology*. 2002, vol. 118, no. 4, s. 968-975. ISSN 0007-1048; 0007-1048.

CALIN, G. A., et al. Frequent Deletions and Down-Regulation of Micro- RNA Genes miR15 and miR16 at 13q14 in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002, vol. 99, no. 24, s. 15524-15529. ISSN 0027-8424; 0027-8424.

CAVAZZINI, F., et al. Chromosome 14q32 Translocations Involving the Immunoglobulin Heavy Chain Locus in Chronic Lymphocytic Leukaemia Identify a Disease Subset with Poor Prognosis. *British Journal of Haematology*. 2008, vol. 142, no. 4, s. 529-537. ISSN 1365-2141; 0007-1048.

CHAPIRO, E., et al. Gain of the Short Arm of Chromosome 2 (2p) is a Frequent Recurring Chromosome Aberration in Untreated Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) at Advanced Stages. *Leukemia Research*. 2010, vol. 34, no. 1, s. 63-68. ISSN 1873-5835; 0145-2126.

CHAPIRO, E., et al. The most Frequent T(14;19)(q32;q13)-Positive B-Cell Malignancy Corresponds to an Aggressive Subgroup of Atypical Chronic Lymphocytic Leukemia. *Leukemia*. 2008, vol. 22, no. 11, s. 2123-2127. ISSN 1476-5551; 0887-6924.

CHENA, C., et al. Biallelic Deletion 13q14.3 in Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia: Cytogenetic, FISH and Clinical Studies. *European Journal of Haematology*. 2008, vol. 81, no. 2, s. 94-99. ISSN 1600-0609; 0902-4441.

CIMMINO, A., et al. miR-15 and miR-16 Induce Apoptosis by Targeting BCL2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005, vol. 102, no. 39, s. 13944-13949. ISSN 0027-8424; 0027-8424.

CUNEO, A., et al. Chronic Lymphocytic Leukemia with 6q- shows Distinct Hematological Features and Intermediate Prognosis. *Leukemia*. 2004, vol. 18, no. 3, s. 476-483. ISSN 0887-6924; 0887-6924.

DECKER, T.; PESCHEL, C. Effect of Immunostimulatory CpG-Oligonucleotides in Chronic Lymphocytic Leukemia B Cells. *Leukemia & Lymphoma*. 2001, vol. 42, no. 3, s. 301-307. ISSN 1042-8194; 1026-8022.

DECKER, T., et al. Immunostimulatory CpG-Oligonucleotides Induce Functional High Affinity IL-2 Receptors on B-CLL Cells: Costimulation with IL-2 Results in a Highly Immunogenic Phenotype. *Experimental Hematology*. 2000a, vol. 28, no. 5, s. 558-568. ISSN 0301-472X; 0301-472X.

DECKER, T., et al. Immunostimulatory CpG-Oligonucleotides Cause Proliferation, Cytokine Production, and an Immunogenic Phenotype in Chronic Lymphocytic Leukemia B Cells. *Blood*. 2000b, vol. 95, no. 3, s. 999-1006. ISSN 0006-4971; 0006-4971.

DEWALD, G. W., et al. Chromosome Anomalies Detected by Interphase Fluorescence in Situ Hybridization: Correlation with Significant Biological Features of B-Cell Chronic Lymphocytic Leukaemia. *British Journal of Haematology*. 2003, vol. 121, no. 2, s. 287-295. ISSN 0007-1048; 0007-1048.

DICKER, F., et al. Immunostimulatory Oligonucleotide-Induced Metaphase Cytogenetics Detect Chromosomal Aberrations in 80% of CLL Patients: A Study of 132 CLL Cases with Correlation to FISH, IgVH Status, and CD38 Expression. *Blood*. 2006, vol. 108, no. 9, s. 3152-3160. ISSN 0006-4971; 0006-4971.

DOHNER, H., et al. p53 Gene Deletion Predicts for Poor Survival and Non-Response to Therapy with Purine Analogs in Chronic B-Cell Leukemias. *Blood*. 1995, vol. 85, no. 6, s. 1580-1589. ISSN 0006-4971; 0006-4971.

DOHNER, H., et al. Genomic Aberrations and Survival in Chronic Lymphocytic Leukemia. *The New England Journal of Medicine*. 2000, vol. 343, no. 26, s. 1910-1916. ISSN 0028-4793; 0028-4793.

DOHNER, H., et al. Chromosome Aberrations in B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia: Reassessment Based on Molecular Cytogenetic Analysis. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*. 1999, vol. 77, no. 2, s. 266-281. ISSN 0946-2716; 0946-2716.

DOHNER, H., et al. 11q Deletions Identify a New Subset of B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia Characterized by Extensive Nodal Involvement and Inferior Prognosis. *Blood*. 1997, vol. 89, no. 7, s. 2516-2522. ISSN 0006-4971; 0006-4971.

DREGER, P., et al. Allogeneic Stem Cell Transplantation Provides Durable Disease Control in Poor-Risk Chronic Lymphocytic Leukemia: Long-Term Clinical and MRD Results of the German CLL Study Group CLL3X Trial. *Blood*. 2010, vol. 116, no. 14, s. 2438-2447. ISSN 1528-0020; 0006-4971.

EL ROUBY, S., et al. p53 Gene Mutation in B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia is Associated with Drug Resistance and is Independent of MDR1/MDR3 Gene Expression. *Blood*. 1993, vol. 82, no. 11, s. 3452-3459. ISSN 0006-4971; 0006-4971.

FINK, S. R., et al. Loss of TP53 is due to Rearrangements Involving Chromosome Region 17p10 Approximately p12 in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancer Genetics and Cytogenetics*. 2006, vol. 167, no. 2, s. 177-181. ISSN 0165-4608; 0165-4608.

FINN, W. G., et al. Secondary Abnormalities of Chromosome 6q in B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia: A Sequential Study of Karyotypic Instability in 51 Patients. *American Journal of Hematology*. 1998, vol. 59, no. 3, s. 223-229. ISSN 0361-8609; 0361-8609.

FORMENT, J. V.; KAIDI, A.; JACKSON, S. P. Chromothripsis and Cancer: Causes and Consequences of Chromosome Shattering. *Nature Reviews.Cancer*. 2012, vol. 12, no. 10, s. 663-670. ISSN 1474-1768; 1474-175X.

GAHRTON, G., et al. Role of Chromosomal Abnormalities in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood Reviews*. 1987, vol. 1, no. 3, s. 183-192. ISSN 0268-960X; 0268-960X.

GARDINER, A. C.; CORCORAN, M. M.; OSCIER, D. G. Cytogenetic, Fluorescence in Situ Hybridisation, and Clinical Evaluation of Translocations with Concomitant Deletion at 13q14 in Chronic Lymphocytic Leukaemia. *Genes, Chromosomes & Cancer*. 1997, vol. 20, no. 1, s. 73-81. ISSN 1045-2257; 1045-2257.

GERYK, E.; KOLCOVÁ, V. Epidemiologie. In: J. MAYER; and J. STARÝ (editors). *Leukemie*. Praha : GRADA Publishing s.r.o., 2002 s. 31. ISBN 80-7169-991-8.

GOTTARDI, D., et al. In Leukaemic CD5+ B Cells the Expression of BCL-2 Gene Family is Shifted Toward Protection from Apoptosis. *British Journal of Haematology*. 1996, vol. 94, no. 4, s. 612-618. ISSN 0007-1048; 0007-1048.

GRANDJENETTE, C., et al. Expression of Functional Toll-Like Receptors by B-Chronic Lymphocytic Leukemia Cells. *Haematologica*. 2007, vol. 92, no. 9, s. 1279-1281. ISSN 1592-8721; 0390-6078.

GUARINI, A., et al. ATM Gene Alterations in Chronic Lymphocytic Leukemia Patients Induce a Distinct Gene Expression Profile and Predict Disease Progression. *Haematologica*. 2012, vol. 97, no. 1, s. 47-55. ISSN 1592-8721; 0390-6078.

GUNN, S. R., et al. Array CGH Analysis of Chronic Lymphocytic Leukemia Reveals Frequent Cryptic Monoallelic and Biallelic Deletions of Chromosome 22q11 that Include the PRAME Gene. *Leukemia Research*. 2009, vol. 33, no. 9, s. 1276-1281. ISSN 1873-5835; 0145-2126.

HAFERLACH, C., et al. Comprehensive Genetic Characterization of CLL: A Study on 506 Cases Analysed with Chromosome Banding Analysis, Interphase FISH, IgV(H) Status and Immunophenotyping. *Leukemia : Official Journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.* 2007, vol. 21, no. 12, s. 2442-2451. ISSN 1476-5551; 0887-6924.

HALLEK, M., et al. Addition of Rituximab to Fludarabine and Cyclophosphamide in Patients with Chronic Lymphocytic Leukaemia: A Randomised, Open-Label, Phase 3 Trial. *Lancet*. 2010, vol. 376, no. 9747, s. 1164-1174. ISSN 1474-547X; 0140-6736.

HANADA, M., et al. Bcl-2 Gene Hypomethylation and High-Level Expression in B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood*. 1993, vol. 82, no. 6, s. 1820-1828. ISSN 0006-4971; 0006-4971.

HERHOLZ, H., et al. Translocations as a Mechanism for Homozygous Deletion of 13q14 and Loss of the ATM Gene in a Patient with B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancer Genetics and Cytogenetics*. 2007, vol. 174, no. 1, s. 57-60. ISSN 0165-4608; 0165-4608.

HERNANDO, E., et al. Rb Inactivation Promotes Genomic Instability by Uncoupling Cell Cycle Progression from Mitotic Control. *Nature*. 2004, vol. 430, no. 7001, s. 797-802. ISSN 1476-4687; 0028-0836.

HOWARTH, K. D., et al. Large Duplications at Reciprocal Translocation Breakpoints that might be the Counterpart of Large Deletions and could Arise from Stalled Replication Bubbles. *Genome Research*. 2011, vol. 21, no. 4, s. 525-534. ISSN 1549-5469; 1088-9051.

HRUBA, M., et al. Independent Coexistence of Clones with 13q14 Deletion at Reciprocal Translocation Breakpoint and 13q14 Interstitial Deletion in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Leukemia & Lymphoma*. 2012, vol. 53, no. 10, s. 2054-2062. ISSN 1029-2403; 1026-8022.

- HRUBA, M.; SUBRT, I. Multiclonal Monoallelic 13q14 Interstitial Deletion in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Leukemia & Lymphoma*. 2013, vol. 54, no. 2, s. 413-416. ISSN 1029-2403; 1026-8022.
- HUH, Y. O., et al. The T(14;19)(q32;q13)-Positive Small B-Cell Leukaemia: A Clinicopathologic and Cytogenetic Study of Seven Cases. *British Journal of Haematology*. 2007, vol. 136, no. 2, s. 220-228. ISSN 0007-1048; 0007-1048.
- HUH, Y. O., et al. MYC Translocation in Chronic Lymphocytic Leukaemia is Associated with Increased Prolymphocytes and a Poor Prognosis. *British Journal of Haematology*. 2008, vol. 142, no. 1, s. 36-44. ISSN 1365-2141; 0007-1048.
- HUH, Y. O., et al. Chronic Lymphocytic Leukemia with T(14;19)(q32;q13) is Characterized by Atypical Morphologic and Immunophenotypic Features and Distinctive Genetic Features. *American Journal of Clinical Pathology*. 2011, vol. 135, no. 5, s. 686-696. ISSN 1943-7722; 0002-9173.
- IBBOTSON, R., et al. Coexistence of Trisomies of Chromosomes 12 and 19 in Chronic Lymphocytic Leukemia Occurs Exclusively in the Rare IgG-Positive Variant. *Leukemia : Official Journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.* 2012, vol. 26, no. 1, s. 170-172. ISSN 1476-5551; 0887-6924.
- IBRAHIM, S., et al. CD38 Expression as an Important Prognostic Factor in B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood*. 2001, vol. 98, no. 1, s. 181-186. ISSN 0006-4971; 0006-4971.
- JAROSOVA, M., et al. Gain of Chromosome 2p in Chronic Lymphocytic Leukemia: Significant Heterogeneity and a New Recurrent Dicentric Rearrangement. *Leukemia & Lymphoma*. 2010, vol. 51, no. 2, s. 304-313. ISSN 1029-2403; 1026-8022.
- JULIUSSON, G.; FRIBERG, K.; GAHRTON, G. Consistency of Chromosomal Aberrations in Chronic B-Lymphocytic Leukemia. A Longitudinal Cytogenetic Study of 41 Patients. *Cancer*. 1988, vol. 62, no. 3, s. 500-506. ISSN 0008-543X; 0008-543X.
- JULIUSSON, G.; GAHRTON, G. Chromosome Aberrations in B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia. Pathogenetic and Clinical Implications. *Cancer Genetics and Cytogenetics*. 1990, vol. 45, no. 2, s. 143-160. ISSN 0165-4608; 0165-4608.
- JULIUSSON, G., et al. Prognostic Subgroups in B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia Defined by Specific Chromosomal Abnormalities. *The New England Journal of Medicine*. 1990, vol. 323, no. 11, s. 720-724. ISSN 0028-4793; 0028-4793.
- KAY, N. E., et al. Progressive but Previously Untreated CLL Patients with Greater Array CGH Complexity Exhibit a Less Durable Response to Chemoimmunotherapy. *Cancer Genetics and Cytogenetics*. 2010, vol. 203, no. 2, s. 161-168. ISSN 1873-4456; 0165-4608.
- KITADA, S., et al. Expression of Apoptosis-Regulating Proteins in Chronic Lymphocytic Leukemia: Correlations with in Vitro and in Vivo Chemoresponses. *Blood*. 1998, vol. 91, no. 9, s. 3379-3389. ISSN 0006-4971; 0006-4971.

KLEIN, U., et al. The DLEU2/miR-15a/16-1 Cluster Controls B Cell Proliferation and its Deletion Leads to Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancer Cell*. 2010, vol. 17, no. 1, s. 28-40. ISSN 1878-3686; 1535-6108.

KOSKI, T., et al. Complex Chromosomal Aberrations in Chronic Lymphocytic Leukemia are Associated with Cellular Drug and Irradiation Resistance. *European Journal of Haematology*. 2000, vol. 65, no. 1, s. 32-39. ISSN 0902-4441; 0902-4441.

KUJAWSKI, L., et al. Genomic Complexity Identifies Patients with Aggressive Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood*. 2008, vol. 112, no. 5, s. 1993-2003. ISSN 1528-0020; 0006-4971.

LANDAU, D. A., et al. Evolution and Impact of Subclonal Mutations in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cell*. 2013, vol. 152, no. 4, s. 714-726. ISSN 1097-4172; 0092-8674.

LIANG, H., et al. Activation of Human B Cells by Phosphorothioate Oligodeoxynucleotides. *The Journal of Clinical Investigation*. 1996, vol. 98, no. 5, s. 1119-1129. ISSN 0021-9738; 0021-9738.

LIU, Y., et al. Cloning of Two Candidate Tumor Suppressor Genes within a 10 Kb Region on Chromosome 13q14, Frequently Deleted in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Oncogene*. 1997, vol. 15, no. 20, s. 2463-2473. ISSN 0950-9232; 0950-9232.

LOSCERTALES, J., et al. Clonal Evolution in Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia. *Leukemia & Lymphoma*. 2010, vol. 51, no. 6, s. 1142-1143. ISSN 1029-2403; 1026-8022.

MARTIN-SUBERO, J. I., et al. A Comprehensive Genetic and Histopathologic Analysis Identifies Two Subgroups of B-Cell Malignancies Carrying a T(14;19)(q32;q13) Or Variant BCL3-Translocation. *Leukemia*. 2007, vol. 21, no. 7, s. 1532-1544. ISSN 0887-6924; 0887-6924.

MATUTES, E., et al. Trisomy 12 Defines a Group of CLL with Atypical Morphology: Correlation between Cytogenetic, Clinical and Laboratory Features in 544 Patients. *British Journal of Haematology*. 1996, vol. 92, no. 2, s. 382-388. ISSN 0007-1048; 0007-1048.

MATUTES, E., et al. The Immunological Profile of B-Cell Disorders and Proposal of a Scoring System for the Diagnosis of CLL. *Leukemia*. 1994, vol. 8, no. 10, s. 1640-1645. ISSN 0887-6924; 0887-6924.

MAYR, C., et al. Chromosomal Translocations are Associated with Poor Prognosis in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood*. 2006, vol. 107, no. 2, s. 742-751. ISSN 0006-4971; 0006-4971.

MICHALOVA, K. *Úvod do lidské cytogenetiky*. Brno : IDV PZ, 1999. 172 s. ISBN 80-7013-281-7.

NOWAKOWSKI, G. S., et al. Interphase Fluorescence in Situ Hybridization with an IGH Probe is Important in the Evaluation of Patients with a Clinical Diagnosis of Chronic Lymphocytic Leukaemia. *British Journal of Haematology*. 2005, vol. 130, no. 1, s. 36-42. ISSN 0007-1048; 0007-1048.

NOWELL, P. C., et al. Karyotypic Stability in Chronic B-Cell Leukemia. *Cancer Genetics and Cytogenetics*. 1988, vol. 33, no. 2, s. 155-160. ISSN 0165-4608; 0165-4608.

ORCHARD, J. A., et al. ZAP-70 Expression and Prognosis in Chronic Lymphocytic Leukaemia. *Lancet*. 2004, vol. 363, no. 9403, s. 105-111. ISSN 1474-547X; 0140-6736.

OSCIER, D. G., et al. Multivariate Analysis of Prognostic Factors in CLL: Clinical Stage, IGVH Gene Mutational Status, and Loss Or Mutation of the p53 Gene are Independent Prognostic Factors. *Blood*. 2002, vol. 100, no. 4, s. 1177-1184. ISSN 0006-4971; 0006-4971.

OUILLETTE, P., et al. Acquired Genomic Copy Number Aberrations and Survival in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood*. 2011, vol. 118, no. 11, s. 3051-3061. ISSN 1528-0020; 0006-4971.

OUILLETTE, P., et al. Integrated Genomic Profiling of Chronic Lymphocytic Leukemia Identifies Subtypes of Deletion 13q14. *Cancer Research*. 2008, vol. 68, no. 4, s. 1012-1021. ISSN 1538-7445; 0008-5472.

OUILLETTE, P., et al. Aggressive Chronic Lymphocytic Leukemia with Elevated Genomic Complexity is Associated with Multiple Gene Defects in the Response to DNA Double-Strand Breaks. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*. 2010, vol. 16, no. 3, s. 835-847. ISSN 1078-0432; 1078-0432.

PALAMARCHUK, A., et al. 13q14 Deletions in CLL Involve Cooperating Tumor Suppressors. *Blood*. 2010, vol. 115, no. 19, s. 3916-3922. ISSN 1528-0020; 0006-4971.

PARKER, H., et al. 13q Deletion Anatomy and Disease Progression in Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia. *Leukemia : Official Journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.* 2011, vol. 25, no. 3, s. 489-497. ISSN 1476-5551; 0887-6924.

PASARE, C.; MEDZHITOV, R. Control of B-Cell Responses by Toll-Like Receptors. *Nature*. 2005, vol. 438, no. 7066, s. 364-368. ISSN 1476-4687; 0028-0836.

POSPISILOVA, H., et al. Interstitial Del(14)(Q) Involving IGH: A Novel Recurrent Aberration in B-NHL. *Leukemia*. 2007, vol. 21, no. 9, s. 2079-2083. ISSN 0887-6924; 0887-6924.

PUENTE, X. S., et al. Whole-Genome Sequencing Identifies Recurrent Mutations in Chronic Lymphocytic Leukaemia. *Nature*. 2011, vol. 475, no. 7354, s. 101-105. ISSN 1476-4687; 0028-0836.

PUT, N., et al. Translocation T(14;18) is Not Associated with Inferior Outcome in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Leukemia : Official Journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.* 2009, vol. 23, no. 6, s. 1201-1204. ISSN 1476-5551; 0887-6924.

RAI, K. R., et al. Clinical Staging of Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood.* 1975, vol. 46, no. 2, s. 219-234. ISSN 0006-4971; 0006-4971.

RASSENTI, L. Z., et al. ZAP-70 Compared with Immunoglobulin Heavy-Chain Gene Mutation Status as a Predictor of Disease Progression in Chronic Lymphocytic Leukemia. *The New England Journal of Medicine.* 2004, vol. 351, no. 9, s. 893-901. ISSN 1533-4406; 0028-4793.

REINDL, L., et al. Biological and Clinical Characterization of Recurrent 14q Deletions in CLL and Other Mature B-Cell Neoplasms. *British Journal of Haematology.* 2010, vol. 151, no. 1, s. 25-36. ISSN 1365-2141; 0007-1048.

RODRIGUEZ, A. E., et al. Identification of a Novel Recurrent Gain on 20q13 in Chronic Lymphocytic Leukemia by Array CGH and Gene Expression Profiling. *Annals of Oncology : Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO.* 2012, vol. 23, no. 8, s. 2138-2146. ISSN 1569-8041; 0923-7534.

ROSSI, D., et al. Mutations of the SF3B1 Splicing Factor in Chronic Lymphocytic Leukemia: Association with Progression and Fludarabine-Refractoriness. *Blood.* 2011, vol. 118, no. 26, s. 6904-6908. ISSN 1528-0020; 0006-4971.

ROSSI, D., et al. Disruption of BIRC3 Associates with Fludarabine Chemorefractoriness in TP53 Wild-Type Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood.* 2012a, vol. 119, no. 12, s. 2854-2862. ISSN 1528-0020; 0006-4971.

ROSSI, D., et al. Mutations of NOTCH1 are an Independent Predictor of Survival in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood.* 2012b, vol. 119, no. 2, s. 521-529. ISSN 1528-0020; 0006-4971.

ROSSI, D., et al. Integrated Mutational and Cytogenetic Analysis Identifies New Prognostic Subgroups in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood.* 2013, vol. 121, no. 8, s. 1403-1412. ISSN 1528-0020; 0006-4971.

SCHETELIG, J., et al. Allogeneic Hematopoietic Stem-Cell Transplantation for Chronic Lymphocytic Leukemia with 17p Deletion: A Retrospective European Group for Blood and Marrow Transplantation Analysis. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology.* 2008, vol. 26, no. 31, s. 5094-5100. ISSN 1527-7755; 0732-183X.

SHAFFER, LG., et al. *ISCN 2009: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (2009)*. 1. vyd. S. Karger Publishing, 2009. 138 s. ISBN 3805589859.

SHANAFELT, T. D., et al. Prospective Evaluation of Clonal Evolution during Long-Term Follow-Up of Patients with Untreated Early-Stage Chronic Lymphocytic Leukemia. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2006, vol. 24, no. 28, s. 4634-4641. ISSN 1527-7755; 0732-183X.

STEPHENS, P. J., et al. Massive Genomic Rearrangement Acquired in a Single Catastrophic Event during Cancer Development. *Cell*. 2011, vol. 144, no. 1, s. 27-40. ISSN 1097-4172; 0092-8674.

STILGENBAUER, S., et al. Incidence and Clinical Significance of 6q Deletions in B Cell Chronic Lymphocytic Leukemia. *Leukemia*. 1999, vol. 13, no. 9, s. 1331-1334. ISSN 0887-6924; 0887-6924.

STILGENBAUER, S.; DOHNER, H. Campath-1H-Induced Complete Remission of Chronic Lymphocytic Leukemia Despite p53 Gene Mutation and Resistance to Chemotherapy. *The New England Journal of Medicine*. 2002, vol. 347, no. 6, s. 452-453. ISSN 1533-4406; 0028-4793.

STILGENBAUER, S., et al. Clonal Evolution in Chronic Lymphocytic Leukemia: Acquisition of High-Risk Genomic Aberrations Associated with Unmutated VH, Resistance to Therapy, and Short Survival. *Haematologica*. 2007, vol. 92, no. 9, s. 1242-1245. ISSN 1592-8721; 0390-6078.

STILGENBAUER, S., et al. Subcutaneous Alemtuzumab in Fludarabine-Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia: Clinical Results and Prognostic Marker Analyses from the CLL2H Study of the German Chronic Lymphocytic Leukemia Study Group. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009, vol. 27, no. 24, s. 3994-4001. ISSN 1527-7755; 0732-183X.

STRUSKI, S., et al. 13q Deletions in B-Cell Lymphoproliferative Disorders: Frequent Association with Translocation. *Cancer Genetics and Cytogenetics*. 2007, vol. 174, no. 2, s. 151-160. ISSN 0165-4608; 0165-4608.

TAM, C. S., et al. Chronic Lymphocytic Leukaemia CD20 Expression is Dependent on the Genetic Subtype: A Study of Quantitative Flow Cytometry and Fluorescent in-Situ Hybridization in 510 Patients. *British Journal of Haematology*. 2008, vol. 141, no. 1, s. 36-40. ISSN 1365-2141; 0007-1048.

TSIMBERIDOU, A. M., et al. Chemoimmunotherapy may Overcome the Adverse Prognostic Significance of 11q Deletion in Previously Untreated Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancer*. 2009, vol. 115, no. 2, s. 373-380. ISSN 0008-543X; 0008-543X.

TYYBAKINOJA, A.; VILPO, J.; KNUUTILA, S. High-Resolution Oligonucleotide Array-CGH Pinpoints Genes Involved in Cryptic Losses in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cytogenetic and Genome Research*. 2007, vol. 118, no. 1, s. 8-12. ISSN 1424-859X; 1424-8581.

URBANKOVA, H., et al. Array-Based Karyotyping in Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) Detects New Unbalanced Abnormalities that Escape Conventional Cytogenetics and CLL FISH Panel. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia*. 2012. ISSN 1213-8118; 1213-8118.

VAN DEN NESTE, E., et al. Chromosomal Translocations Independently Predict Treatment Failure, Treatment-Free Survival and overall Survival in B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia Patients Treated with Cladribine. *Leukemia : Official Journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.* 2007, vol. 21, no. 8, s. 1715-1722. ISSN 0887-6924; 0887-6924.

VAN DYKE, D. L., et al. A Comprehensive Evaluation of the Prognostic Significance of 13q Deletions in Patients with B-Chronic Lymphocytic Leukaemia. *British Journal of Haematology*. 2010, vol. 148, no. 4, s. 544-550. ISSN 1365-2141; 0007-1048.

WATTEL, E., et al. P53 Mutations are Associated with Resistance to Chemotherapy and Short Survival in Hematologic Malignancies. *Blood*. 1994, vol. 84, no. 9, s. 3148-3157. ISSN 0006-4971; 0006-4971.

WLODARSKA, I., et al. Telomeric IGH Losses Detectable by Fluorescence in Situ Hybridization in Chronic Lymphocytic Leukemia Reflect Somatic VH Recombination Events. *The Journal of Molecular Diagnostics : JMD*. 2007, vol. 9, no. 1, s. 47-54. ISSN 1525-1578; 1525-1578.

ZENZ, T., et al. TP53 Mutation and Survival in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2010, vol. 28, no. 29, s. 4473-4479. ISSN 1527-7755; 0732-183X.

ZENZ, T., et al. Detailed Analysis of p53 Pathway Defects in Fludarabine-Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL): Dissecting the Contribution of 17p Deletion, TP53 Mutation, p53-p21 Dysfunction, and miR34a in a Prospective Clinical Trial. *Blood*. 2009a, vol. 114, no. 13, s. 2589-2597. ISSN 1528-0020; 0006-4971.

ZENZ, T., et al. miR-34a as Part of the Resistance Network in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood*. 2009b, vol. 113, no. 16, s. 3801-3808. ISSN 1528-0020; 0006-4971.

ZHANG, Y., et al. A 3-cM Commonly Deleted Region in 6q21 in Leukemias and Lymphomas Delineated by Fluorescence in Situ Hybridization. *Genes, Chromosomes & Cancer*. 2000, vol. 27, no. 1, s. 52-58. ISSN 1045-2257; 1045-2257.

Příloha 1 – Seznam vlastních publikací a prezentací

1. Publikace, které jsou podkladem disertace

a) Články v odborných časopisech s IF

Hrubá M, Šubrt I. Multiclonal monoallelic 13q14 interstitial deletion in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2013 Feb;54(2):413-6. Epub 2012 Jul 9. **IF (2011) 2,58**

Hrubá M, Dvorak P, Weberova L, Šubrt I. Independent coexistence of clones with 13q14 deletion at reciprocal translocation breakpoint and 13q14 interstitial deletion in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2012 Oct;53(10):2054-62. Epub 2012 Apr 19. **IF (2011) 2,58**

b) Prezentace na mezinárodních konferencích s publikací abstrakt v odborných časopisech s IF

Hrubá M, Dvořák P, Rykovská A, Šubrt I. Multiclinality of 13q14 deletion in chronic lymphocytic leukemia. 9th European Cytogenetics Conference, Dublin, Ireland, 6/2013 – poster, abstrakt: *CHROMOSOME RES*. 2013 Jun;21(S1):85. **IF (2012) 2,847**

Hrubá M, Dvořák P, Weberová L, Šubrt I. Independent coexistence of clones with 13q14 deletion at reciprocal translocation breakpoint and 13q14 interstitial deletion in chronic lymphocytic leukemia (CLL). European Human Genetics Conference, Nürnberg, Germany, 6/2012 – poster, abstrakt: *EUR J HUM GENET*. 2012 Jun;20(S1):203. **IF (2011) 4,4**

c) Prezentace na českých konferencích (bez IF)

Hrubá M, Dvořák P, Weberová L, Šubrt I. Reciprocal translocation as recurrent form of 13q14 deletion in chronic lymphocytic leukemia. XX. Biologické dny, Plzeň, 10/2011 - poster, abstrakt: v konferenčním sborníku s. 45; ISBN 978-80-260-0849-1

Hrubá M, Dvořák P, Weberová L, Šubrt I. Současná přítomnost více klonů s různou formou delece 13q14 u B-CLL – důsledek postupného klonálního vývoje nebo paralelních nezávislých událostí? Celostátní sjezd Společnosti lékařské genetiky ČLS JEP a 44. Výroční cytogenetická konference, Třeboň, 9/2011, abstrakt: v konferenčním sborníku (nečíslováno); ISBN 978-80-260-0415-8

Hrubá M, Dvořák P, Weberová L, Šubrt I. Reciproká translokace s delecí v místě zlomu jako jeden z častých mechanismů vzniku rekurentní delece 13q14 u B-CLL. 43. Cytogenetická konference, Ostravice, 9/2010, abstrakt: v konferenčním sborníku (nečíslováno; el. forma).

Hrubá M, Dvořák P, Čechová L, Šubrt I. Výskyt chromozomových translokací u B-CLL. 42. Výroční zasedání cytogenetické sekce, Brno, 9/2009

Hrubá M, Dvořák P, Harmáčková L, Pittrová M, Čechová L, Šubrt I. Cytogenetická metafázní analýza B-CLL buněk po imunostimulaci CpG oligonukleotidem a interleukinem 2. XXIII. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí, Olomouc, 6/2009, abstrakt: Transfuz Hemat dnes. 2009;15(S1):26.

Hrubá M, Harmáčková L, Pittrová M, Dvořák P, Šubrt I. Chromozomová analýza B-CLL buněk po imunostimulaci CpG oligonukleotidem a IL2. 41. Výroční zasedání cytogenetické sekce, Olomouc, 9/2008

Dvořák P, **Hrubá M**, Šubrt I, Jaklová R, Harmáčková L, Pittrová M. Komplexní změny karyotypu u nemocných s B-CLL. Celostátní sjezd Společnosti lékařské genetiky ČLS JEP a 40. Výroční cytogenetická konference, Praha, 9/2007 – poster

Hrubá M, Skuhrovcová J, Fischlová H. Výsledky vyšetření buněk kostní dřenež metodou FISH u pacientů s B-CLL (2001-2003); korelace s průběhem onemocnění a CD38 pozitivitou. 37. zasedání Cytogenetické sekce, Olomouc, 9/2004

2. Publikace bez vztahu k tématu disertace

a) Články v odborných časopisech s IF

Dvorak P, Lysak D, Vokurka S, Michalova K, Sarova I, Jonasova A, **Hrubá M**, Rykowska A, Subrt I. The translocation t(2;11)(p21;q23) without MLL gene rearrangement-a possible marker of good prognosis in myelodysplastic syndrome patients. Hematol Oncol. 2013 Aug 16. [Epub ahead of print] **IF (2012) 2,084**

Nemec P, Zemanova Z, Kuglik P, Michalova K, Tajtlova J, Kaiserova P, Oltova A, Filkova H, Holzerova M, Balcarkova J, Jarosova M, Rabasova J, **Hrubá M**, Spicka I, Gregora E, Adam Z, Scudla V, Maisnar V, Schutzova M, Hajek R. Complex karyotype and translocation t(4;14) define patients with high-risk newly diagnosed multiple myeloma: results of CMG2002 trial. Leuk Lymphoma. 2012 May;53(5):920-7. Epub 2011 Dec 13. **IF (2010) 2,492**

Dvorak P, **Hrubá M**, Subrt I. Development of acute myeloid leukemia associated with Ph-negative clone with inv(3)(q21q26) during imatinib therapy for chronic myeloid leukemia. Leuk Res. 2009 Jun;33(6):860-1. Epub 2008 Nov 1. **IF (2008) 2,39**

b) Články v odborných časopisech bez IF

Zemanová Z, Michalová K, Tajtlová J, Pavlišťová L, Oltová A, Filková H, Kuglík P, Němec P, Holzerová M, Balcárková J, Jarošová M, Rabasová J, **Hrubá M**, Fischlová H, Špička I, Gregora E, Adam Z, Ščudla V, Maisnar V, Schützová M, Králová D, Hájek R. Výsledky molekulárně cytogenetické analýzy imunofluorescenčně značených plasmatických buněk u pacientů s mnohočetným myelomem zařazených ve studii CMG 2002. Klin Onkol. 2008 Sep, 21(S1):204 – 206.

c) Prezentace na mezinárodních konferencích s publikací abstrakt v odborných časopisech s IF

Dvořák P, Lysák D, Vokurka S, Michalová K, Šárová I, Jonasová A, **Hrubá M**, Rykovská A, Šubrt I. The t(2;11)(p21;q23) without MLL rearrangement - a possible marker of good prognosis in MDS patients. European Human Genetics Conference, Paris, France, 6/2013 – poster, abstrakt: EUR J HUM GENET. 2013 Jun;21(S2):312. **IF (2012) 4,319**

Zemanova Z, Michalova K, Tajtlova J, Pavlistova L, Oltova A, Filkova H, Kuglik J, Němec P, Kralova D, Holzerova M, Balcarkova J, Jarošova M, Rabasova J, **Hrubá M**, Fischlova H, Špička I, Gregora E, Adam Z, Ščudla V, Maisnar V, Schutzova M, Hajek R. Molecular cytogenetic study of immunofluorescently labelled plasma cells and prognostic significance of clonal chromosomal aberrations in 208 patients with multiple myeloma. 13th Congress of the European Hematology Association, Copenhagen, Denmark, 6/2008 – poster, abstrakt: Haematol-Hematol J. 2008 Jul;93(S1):66-67. **IF 5,978**

Zemanova Z, Michalova K, Babicka L, Jarosova M, Holzerova M, Oltova A, **Hrubá M**, Muzikova K, Zuna J, Trka J, Mihal V, Sterba J, Formankova R, Sedlacek P, Vrzalova A, Sary J. Frequency and clinical implications of additional chromosomal aberrations in ETV6/RUNX1 positive childhood ALL. 12th Congress of The European Hematology Association, Vienna, AUSTRIA, 6/2007 – poster, abstrakt: Haematol-Hematol J. 2007 Jun;92(S1):48. **IF 5,032**

Zemanova Z, Michalova K, Babicka L, Pavlistova L, Jarosova M, Holzerova M, Oltova A, **Hrubá M**, Muzikova K, Zuna J, Trka J, Mihal V, Sterba J, Formankova R, Sedlacek P, Vrzalova A, Sary J. Clinical Relevance of Complex Chromosomal Aberrations in Bone Marrow Cells of 107 Children with ETV6/RUNX1 Positive Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL). 48th Annual Meeting of The American Society of Hematology, Orlando, USA, 12/2006 – poster, abstrakt: Blood (ASH Annual Meeting Abstracts). 2006 Nov;108 (11):2278. **IF 10,131**

d) Prezentace na mezinárodních konferencích (bez IF)

Zemanova Z, Michalova K, Babicka L, Oltova A, Jarosova M, **Hrubá M**, Muzikova J, Sterba J, Mihal V, Sary J.: Clinical relevance of additional chromosomal aberrations in bone marrow cell of 94 children with ETV6/AML1 positive acute lymphocytic leukemia. 5th Bi-annual Symposium on Childhood Leukemia, Noordwijkerhout, The Netherlands, 4/2006, abstrakt v konferenčním sborníku: s. 66.

Zemanova Z, Babicka L, Michalova K, Pavlistova L., Oltova A, Mentzlova D, Jarosova M, Holzerova M, **Hrubá M**, Skuhrovcova J., Muzikova K, Formankova R, Sedlacek P, Vrzalova A, Sary J. Incidence and clinical relevance of complex chromosomal aberrations in a series of 88 children with ETV6-AML1 positive acute lymphoblastic leukemia. XXXth World Congress of The International Society of Hematology, Istanbul, Turkey, 9/2005, abstrakt: Turk J Hematol. 2005;22(S3):52.

e) Prezentace na českých konferencích (bez IF)

Hrubá M, Brotanová D, Pittrová M, Nováková P, Hradecký L, Zech N, Šubrt I. ArrayCGH jako metoda preimplantačního genetického vyšetření - zkušenosti se zavedením do klinické praxe. 46. výroční cytogenetická konference, Brno, 9/2013

Dvořák P, Lysák D, Vokurka S, Michalová K, Šárová I, Jonášová A, **Hrubá M**, Rykovská A, Šubrt I. Translokace t(2;11)(p21;q23) bez přestavby MLL genu je pravděpodobně spojena s dobrou prognózou u pacientů s MDS. XXVII. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí 5/2013, abstrakt: v konferenčním sborníku s. 71; ISBN 978-80-244-3480-3

Hrubá M. Poznámky k akreditaci CYTOGENETICKÝCH LABORATOŘÍ dle ČSN EN ISO 15189; Cytogenetická vyšetření mnohočetného myelomu v roce 2012 – Plzeň. XI. národní workshop Mnohočetný myelom, Mikulov 4/2013

Dvořák P, **Hrubá M**, Vokurka S, Rykovská A, Šubrt I. Vzácné rekurentní aberace chromosomů u myelodysplastických syndromů. 45. výroční cytogenetická konference, Olomouc, 9/2012

Rykovská A, **Hrubá M**, Dvořák P, Šubrt I. Evoluce klonů s odlišnými cytogenetickými aberacemi u akutní myeloidní leukemie. 45. výroční cytogenetická konference, Olomouc, 9/2012

Hrubá M. Cytogenetická vyšetření mnohočetného myelomu v roce 2011 – Plzeň. X. Národní workshop MM, Mikulov, 4/2012

Vohradská P, **Hrubá M**, Šubrt I. Light and fluorescent microscopy as principal method of cytogenetic diagnostics. XX. Biologické dny, Plzeň, 10/2011, abstrakt: v konferenčním sborníku s. 42; ISBN 978-80-260-0849-1

Vohradská P, Jaklová R, **Hrubá M**, Pomahačová R, Šubrt I. Nebalancované translokace X;autosom se vznikem derivovaného chromosomu X u žen a jejich vliv na fenotyp. Celostátní sjezd Společnosti lékařské genetiky ČLS JEP a 44. Výroční cytogenetická konference, Třeboň, 9/2011, abstrakt: v konferenčním sborníku (nečíslováno); ISBN 978-80-260-0415-8

Hrubá M. Cytogenetická vyšetření mnohočetného myelomu v roce 2010 – Plzeň. IX. Národní workshop MM, Mikulov, 4/2011

Vohradská P, **Hrubá M**, Dvořák P, Jaklová R, Šubrt I. Familiární výskyt translokační formy mikrodelece 22q11.2 – kazuistika. 42. Výroční zasedání cytogenetické sekce, Brno, 9/2009

Dvořák P, **Hrubá M**, Šubrt I. Přetrvávající cytogenetické klony po chemoterapeutické léčbě u pacientů s akutní myeloidní leukémií. XXIII. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí, Olomouc, 6/2009 – poster, abstrakt: Transfuz Hemat dnes. 2009;15(S1):78.

Hrubá M, Dvořák P, Šubrt I. Cytogenetická vyšetření dětských B-ALL v ÚLG LF UK a FN v Plzni (1998-2008). 18. konference dětských hematologů a onkologů České a Slovenské republiky, Plzeň, 11/2008, abstrakt: v konferenčním sborníku s. 66; ISBN 978-80-7177-009-1

Zemanová Z, Michalová K, Tajtlová J, Pavlišťová L, Oltová A, Filková H, Kuglík P, Němec P, Holzerová M, Balcárková J, Jarošová M, Rabasová J, **Hrubá M**, Fischlová H, Špička I, Gregora E, Adam Z, Ščudla V, Maisnar V, Schützová M, Králová D, Hájek R. Molekulárně cytogenetická analýza imunofluorescenčně značených plasmatických buněk u pacientů s mnohočetným myelomem ve studii CMG 2002. XV. ČESKO-SLOVENSKÝ HEMATOLOGICKÝ A TRANSFUZIOLOGICKÝ SJEZD, Špindlerův Mlýn, 9/2008, abstrakt: Transfuz Hemat dnes. 2008;14(S2):69.

Zemanová Z, Michalová K, Babická L, Jarošová M, Holzerová M, Oltová A, **Hrubá M**, Smíšek P, Muřiková K, Zuna J, Trka J, Mihál V, Štěrba J, Černá Z, Sedláček P, Starý J. Frekvence a klinický význam komplexních chromozomových aberací v souboru 127 dětí s TEL/AML1 pozitivní akutní lymfoblastickou leukémií (ALL). XV. ČESKO-SLOVENSKÝ HEMATOLOGICKÝ A TRANSFUZIOLOGICKÝ SJEZD, Špindlerův Mlýn, 9/2008, abstrakt: Transfuz Hemat dnes. 2008;14(S2):74-75.

Hrubá M, Šubrt I, Schützová M, Stránská R. Výsledky FISH analýzy plazmocytů u pacientů s mnohočetným myelomem (v rámci grantu IGA MZ NR/8183-4). XXI. Olomoucké hematologické dny, Olomouc, 6/2007 – poster, abstrakt: v konferenčním sborníku s. 74; ISBN 978-80-7346-078-5

Jaklová R, Šubrt I, **Hrubá M**. Fenotyp dítěte s nevyváženou translokací subtelomerických oblastí chromosomů 17 a 22 – varianta syndromu delece 22q13.3. Celostátní sjezd Společnosti lékařské genetiky ČLS JEP a 40. Výroční cytogenetická konference, Praha, 9/2007 – poster

Hrubá M, Zavřelová M, Harmáčková L, Šubrt I. Výsledky I-FISH analýzy plazmocytů u pacientů s mnohočetným myelomem v ÚLG FN Plzeň v rámci grantu IGA MZ NR/8183-4. 39. Výroční zasedání cytogenetické sekce, České Budějovice, 9/2006, abstrakt: v konferenčním sborníku (nečíslováno; el. forma).

Zemanová Z, Michalová K, Babická L, Pavlišťová L, Oltová A, Mentolová D, Jarošová M, Holzerová M, **Hrubá M**, Skuhrovcová J, Muťíková K, Formánková R, Sedláček P, Vrzalová A, Štěrbá J, Mihál V, Černá Z, Starý J. Frekvence a klinický význam komplexních chromosomových aberací v souboru 88 dětí s TEL/AML1 pozitivní akutní lymfoblastickou leukémií (ALL). 15. konference dětských hematologů a onkologů ČR a SR, České Budějovice, 11/2005, abstrakt: v konferenčním sborníku s. 30; ISBN 80-7232-264-8

Skuhrovcová J, **Hrubá M**, Fischlová H, Harmáčková L, Zavřelová M, Polatová H. Cytogenetická a FISH vyšetření prvozáhytů MM za rok 2004 v ÚLG v Plzni. Zasedání České myelomové skupiny, Čejkovice, 4/2005