

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Autoreferát disertační práce



Analýza strukturních chromosomových přestaveb
u hematologických neoplázií

*Studium strukturních chromosomových aberací
buněk chronické lymfatické leukemie po DSP30/IL2
stimulované kultivaci*

Mgr. Martina Hrubá

2013

Doktorské studijní programy v biomedicíně

Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky

Obor: Molekulární a buněčná biologie, genetik a virologie

Předseda oborové rady:

prof. RNDr. Stanislav Zadražil, DrSc.

Školící pracoviště:

Ústav lékařské biochemie a laboratorní
diagnostiky 1. LF UK a VFN

Ústav lékařské genetiky LF UK
a FN Plzeň (experimentální část práce)

Školitel:

prof. Ing. Kyra Michalová, DrSc.

Disertační práce bude nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněna k nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky Děkanátu 1. lékařské fakulty.

Obsah

1	Úvod	6
2	Cíl práce	10
3	Metodika	11
4	Výsledky	12
	4.1 Cytogenetická analýza CLL buněk po DSP30/IL2 stimulované kultivaci	12
	4.2 Studium rekurentních strukturních aberací	14
5	Diskuse	18
6	Závěry	24
7	Literatura	26
	Příloha 1 – Seznam vlastních publikací a prezentací	32
	1. Publikace, které jsou podkladem disertace	32
	2. Publikace bez vztahu k tématu disertace	33

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

1 Úvod

Chronická lymfatická leukemie (CLL) je maligní lymfoproliferativní onemocnění ze skupiny B-nehodgkinských lymfomů. Diagnóza CLL je stanovena při přetrvávajícím zvýšeném počtu zralých, dlouho žijících B lymfocytů s charakteristickým imunofenotypem (Matutes et al. 1994) v kostní dřeni a periferní krvi. Přesná příčina vzniku CLL není známa, na její patogenезi se však zřejmě podílejí kromě genetických či epigenetických faktorů i antigenní stimulace a nádorové mikroprostředí. CLL je nejčastěji diagnostikovanou leukémií dospělých v zemích Evropy a Severní Ameriky; udává se, že zde tvoří asi 25-30% všech leukémií s incidencí 3/100000 obyvatel (Adam et al. 2001).

Přes přehlednou diagnostiku zůstává CLL heterogenní skupinou onemocnění s velmi rozdílným klinickým průběhem u jednotlivých pacientů. Jednoznačně prokázaným nepříznivým prognostickým faktorem je přítomnost nemutované sekvence variabilní části genu pro těžký řetězec imunoglobulinu (IGVH) (Oscier et al. 2002). Významný vliv na prognózu onemocnění mají také mutace genů TP53 a ATM a cytogenetické aberace.

Cytogenetické vyšetření buněk CLL je komplikováno jejich nízkou proliferační aktivitou, pro získání dostatku mitóz ke klasickému chromosomovému vyšetření je proto nutná stimulace jejich buněčného dělení. Díky prvním stimulovaným kultivacím s různými B-buněčnými mitogeny (TPA, EBV, LPS E.C., příp. PKW) byly určeny 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 i první hodnocení jejich prognostického vlivu a jednoznačně byla prokázána nepříznivá prognóza spojená s přítomností komplexních změn karyotypu (Juliusson, Gahrton 1990, Juliusson et al. 1990). Zpřesnění prevalence těchto aberací (resp. delece 13q14, delece 11q22-23, delece 17p13, trisomie 12, delece 6q21) a jejich vlivu na prognózu onemocnění bylo dosaženo molekulárně-cytogenetickým vyšetřením interfázních 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). Vyšetření 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.

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-q23	15-18%	Nepříznivá
Delece 17p13 (TP53)	7-8%	Velmi nepříznivá
Delece 6q21-23	≤7%	---

Lepší možnosti provedení klasické cytogenetické analýzy přinesly nové techniky imunostimulovaných kultivací 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) a podobně vysokého záchytu patologických klonů bylo dosaženo i stimulací CLL buněk CpG oligonukleotidem DSP30 společně s interleukinem 2 (Dicker et al. 2006, Haferlach et al. 2007).

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). 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).

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 15-43% případů CLL (Juliussen et al. 1988, Finn et al. 1998, Van Den Neste et al. 2007). Klonální vývoj v průběhu onemocnění byl také studován vyšetřením rekurentních aberací metodou FISH (delece 13q14, delece 11q22-23, trisomie 12, delece 17p13/TP53) s nálezem nových aberací u 11-26% pacientů (Shanafelt et al. 2006a, Stilgenbauer et al. 2007, Berkova et al. 2009, Loscertales et al. 2010). Mezi klonálním vývojem a nemutovaným stavem IGVH byla prokázána pozitivní korelace a zároveň byl klonální vývoj identifikován jako nezávislý prognostický faktor zkrácené doby přežití (Stilgenbauer et al. 2007).

Nejčastěji prokazovanou aberací u CLL je delece 13q14, nacházená FISH u více než poloviny pacientů. Přes variabilitu rozsahu delece (až desítek Mb) bylo možné aCGH stanovit nejčastěji se vyskytující „minimální“ deletovaný region (MDR) o velikosti cca 900 kb, nacházený v 50-60% případů delece (Ouillette et al. 2008, Parker et al. 2011). Tento ~900 kb MDR zahrnuje RNA genový shluk DLEU1/DLEU2, obsahující sekvence pro miRNA15a, miRNA16-1, a protein kódující gen DLEU7. U všech těchto genů je předpokládáno jejich tumor supresorové působení (Cimmino et al. 2005, Palamarchuk et al. 2010). Delece většího rozsahu než MDR zahrnuje obvykle i RB1 gen a je významně častěji nacházena u progredujících pacientů (Ouillette et al. 2008, Parker et al. 2011). Význam, resp. nepříznivý vliv, rozsáhlé delece 13q14 byl dále zesílen její asociací se zvýšenou genomickou komplexitou (Ouillette et al. 2010). Ke ztrátě 13q14 dochází nejčastěji intersticiální delecí, 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). Delece 13q14 je ve 20-40% případů nacházena i v bialeické formě (Chena et al. 2008, Haferlach et al. 2007, Van Dyke et al. 2010, Dewald et al. 2003).

Delece 11q je variabilního rozsahu (7-42 Mb), ale vždy zahrnuje tumor supresorový gen ATM v pruhu 11q22.3 (Tyybakinoja et al. 2007). Ztráta ATM genu je způsobena převážně intersticiální či terminální delecí, v části případů je popisována i v důsledku nebalancované translokace (Herholz et

al. 2007, Haferlach et al. 2007). Pouze část pacientů s delecí ATM genu (36%) má inaktivovanou druhou alelu genu somatickou mutací (Austen et al. 2007).

Geny, které přispívají k patogenezi CLL v důsledku trisomie 12, nejsou dosud známy.

Nejvýznamnějším cytogenetickým prognostickým faktorem u CLL je delece tumor supresorového genu TP53 v pruhu 17p13.1, která je spojena s rezistencí na léčbu purinovými analogy (Dohner et al. 1995, el Rouby et al. 1993, Wattel et al. 1994). 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). Delece TP53 je provázena v 80-90% případů somatickou mutací druhé alely genu (Zenz et al. 2010, Zenz et al. 2009).

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, např. geny FOXO3 a SEC63 (Urbankova et al. 2012). Menší část případů ztrát 6q vzniká nebalancovanou translokací (Haferlach et al. 2007).

Translokace genu (resp. genového shluku) IGH@ pro těžký řetězec imunoglobulinu (v pruhu 14q32), jsou nacházeny pouze u 7-8% pacientů s CLL (Cavazzini et al. 2008, Berkova et al. 2008). 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% (Reindl et al. 2010). Je zajímavé, že většina rekurentních aberací chromosomu 14 je významně asociována 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).

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

Vyšetřeno bylo celkem 391 vzorků kostní dřeně či periferní krve od 337 pacientů s diagnózou CLL. Jednalo se o vzorky postupně přicházející v období 1/2008 – 12/2012 do Genetické laboratoře Ústavu lékařské genetiky LF UK a FN Plzeň.

Vzorky byly kultivovány 72 hodin za přítomnosti DSP30 a interleukinu 2 dle (Dicker et al. 2006). U všech vzorků byla provedena cytogenetická analýza karyotypu G-pruhováním a molekulárně cytogenetické vyšetření fluorescenční *in situ* hybridizací (FISH) se sondami pro zjištění delece 13q14, delece genu ATM (11q22.3), delece TP53 (17p13.1) a trisomie 12. Použity byly 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).

Přítomnost translokací IGH@ byla ověřována 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). V případě nálezu delece 6q v karyotypu nebo naopak při normálním karyotypu i všech provedených FISH (včetně analýzy mitóz) bylo doplněno vyšetření sondou ON 6q21 / SE6 (Kreatech).

U pacientů s multiklonální delecí 13q14 byly provedeny další FISH analýzy deletované oblasti 13q14 se sondami pro lokus DLEU1 (viz výše), RP11-305D15 v oblasti RB1 genu a RP11-327P2 (obě BlueGnome). Pro doplňkové vyšetření klonálního vývoje u jednoho z pacientů s multiklonální delecí 13q14 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)).

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 přidatné 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

Cytogenetické vyšetření metafázních chromosomů CLL buněk po DSP30/IL2 stimulované kultivaci bylo úspěšně provedeno u 96% vzorků (375/391). Analýzou karyotypu G-pruhováním byl prokázán patologický klon u 65% vzorků (254/391). 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.

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).

Porovnáním s výsledky FISH pro rekurentní aberace lze dále konstatovat, že analýzou karyotypu byly u 44% (171/391) vyšetřených vzorků nalezeny další jiné aberace.

Klonální vývoj

Alespoň dva subklony přítomné současně v daném vyšetřovaném vzorku byly při analýze karyotypu a/nebo FISH nalezeny celkem u 34% (133/391) vzorků.

Nové přidatné změny v průběhu onemocnění byly nalezeny celkem ve 46 vyšetřených vzorcích 43 pacientů, což je 23% všech vzorků vyšetřených mimo prvozáchyt onemocnění (46/193), resp. 29% pacientů (43/149). U části vzorků mohlo být provedeno hodnocení pouze přidatných rekurentních změn (v porovnání oproti předchozím vyšetřením interfázickou FISH), nový klonální vývoj byl takto stanoven u 18% (25/139) vzorků, resp. u 23% (25/108) pacientů. Opakovaným vyšetřením po stimulované kultivaci

(tj. s možností hodnocení karyotypu i FISH) byl klonální vývoj konstatován u 39% vzorků (21/54), resp. u 44% pacientů (18/41).

Přítomnost více subklonů ve vzorku byla nacházena častěji ve skupině vzorků vyšetřených v progresi před léčbou, v progresi či relapsu po léčbě, případně u rezistentního onemocnění ve srovnání se vzorky z prvozáchytu onemocnění nebo stabilní choroby bez léčby (P 0,05). Nový klonální vývoj v průběhu onemocnění byl obdobně častěji nalezen u vzorků progresivních onemocnění ve srovnání s opakovaným vyšetřením stabilních onemocnění (P 0,05). 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).

Komplexní změny, chromosomové translokace

Komplexní změny, definované jako přítomnost alespoň 3 aberací, byly nalezeny u 28% vzorků (111/391). V převaze případů byly stanoveny analýzou karyotypu (82/391; 21%), u části vzorků (29/391; 7%) byly nalezeny kombinací nálezů v karyotypu a FISH pro delecí 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). Častěji ve srovnání s celým souborem byla také ve skupině vzorků s komplexními změnami nacházena delecce ATM genu (53/107; 50% vs. 92/387; 24%, P 0,0000006) a delecce 6q (20/111; 18% vs. 33/391; 8%, P 0,008).

Chromosomové translokace byly prokázány u 37% (144/391) vyšetřených vzorků. 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). 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). 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). 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 třech dalších případech (3/33) o předpokládanou translokaci IGK@, resp. IGL@. Celkově byla tedy nalezena translokace imunoglobulinových genů u 3,5% (12/337) pacientů, resp. u 4% všech vyšetřených vzorků (16/391).

Chromosomové translokace i komplexní změny karyotypu byly statisticky významně častěji nacházeny ve skupině vzorků vyšetřených v progresi před léčbou, v progresi či relapsu po léčbě, případně u rezistentního onemocnění ve srovnání se vzorky z prvozáhytu onemocnění nebo stabilní choroby bez léčby (P 0,000003 pro translokace, P 0,00001 pro komplexní změny nalezené pouze analýzou karyotypu, P 0,0002 pro komplexní změny se zahrnutím kryptických změn 13q14 zjištěných pouze FISH).

4.2 Studium rekurentních strukturních aberací

Delece 13q14

Delece 13q14 byla prokázána celkem u 62% (235/386) vzorků, resp. 61% (209/336) pacientů. 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.

Ve skupině vzorků s rozsáhlejší intersticiální delecí 13q14 či s jinou přestavbou chromosomu 13 spojenou se ztrátou 13q14, 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 byly také, oproti delecím kryptickým, 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).

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.

Hodnocením mitóz bylo možné stanovit formu delece, v převaze případů delece (191/235; 81%) se jednalo o delecii intersticiální, v 7% (16/235) případů delece byla nalezena translokace 13q14 s průkazem (monoalelické) delece v místě translokačního zlomu reciproké translokace, v 1% (2/235) vzorků s delecí byla prokázána translokace 13q14 s delecí v místě zlomu s delecí druhé alely kryptickou intersticiální delecí, u dalších celkem 3% (7/235) případů byla nalezena koexistence klonů s intersticiální delecí a klonů s delecí v místě translokačního zlomu, v 1% (2/235) byla nalezena monosomie 13 a ve zbývajících 7% (17/235) nebylo možné formu delece určit (byla stanovena pouze interfázickou FISH).

Celkem bylo nalezeno 24 translokací 13q14 s delecí v místě translokačního zlomu s 29 zjištěnými zlomy 13q (v 25 vzorcích). 20 translokací bylo popsáno s jedním zlomem na jednom partnerském chromosomu a 4 translokace s komplexní přestavbou s více zlomy mezi více než dvěma chromosomy. Nejčastějším translokačním partnerem byl chromosom 11 (5x zlom 11q; z toho 2x translokace vedla zároveň ke ztrátě ATM genu) 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%).

4 pacienti s koexistencí klonů s delecí 13q14 v místě translokačního zlomu a s intersticiální delecí 13q14 byli dále vyšetřeni dvěma BAC sondami mimo MDR (RP11-305D15, RP11-327P2). Celkem bylo u těchto 4 pacientů

nalezeno 13 klonů s různými formami delece 13q14 (8 klonů s monoalelickou a 5 s bialelickou delecí). V popisovaných 13 klonech bylo nalezeno celkem 6 translokací 13q14 s delecí v místě zlomu a 8 intersticiálních delecí. U jednoho z těchto pacientů byla díky vhodnému klonálnímu vývoji společnou hybridizací sond pro detekci delece 14q (RP11-316E14 / RP11-101G24) a delece 13q14 13q14 (ON DLEU1 / 13qter) prokázána na sobě nezávislá přítomnost klonů s oběma formami delece 13q14 svědčící pro nezávislý vznik obou typů delece. U dalších dvou pacientů byl prokázán nezávislý vznik intersticiálních delecí 2. alel (vždy v klonu s jednoalelickou delecí v místě translokačního zlomu a paralelně v klonu s jednolalelickou intersticiální delecí).

Další příklad multiklonality delece 13q14 byl nalezen u časné progredujícího pacienta se třemi klony s různě rozsáhlými intersticiálními delecemi 13q14 (zjištěnými vyšetřeními se sondami v MDR i RP11-305D15 a RP11-327P2 mimo MDR). Klonální vývoj v tomto případě jasně ukázal nezávislý vznik jedné z těchto delecí na obou zbývajících. Retrospektivní vyšetření navíc potvrdilo přítomnost všech tří delecí již v době záchytu onemocnění.

Další rekurentní aberace

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 ztráty 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 nebylo možné formu delece určit (stanovena pouze interfázickou FISH). Určenými translokačními partnery u nebalancovaných translokací vedoucích k delecí 11q byly chromosomy 13 (13q 2x), 6 (6q 1x) a 7 (7q 1x), ve zbývajících případech (4x) nebyl translokační partner určen.

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

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, 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. V dalších 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 (vedlejší klonu) nalezena terminální delece 17p (resp. centrický fragment chromosomu 17, viz výše), v dalším případě nebalancovaná translokace se zlomem v 17p11 (viz také výše). Translokačními partnery těchto nebalancovaných translokací 17q11 spojených se ztrátou centromerické oblasti i 17p byly chromosomy 3 (3q 1x), 4 (4p 1x, 4q 1x) a 6 (6p 1x).

Delece 6q 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 či terminální, u 18% (6/33) o ztrátu v důsledku nebalancované translokace (celkem 5 translokací, translokační partneři byli chromosom 2 (2p 1x, 2q 1x), 18 (18q 1x) a ve dvou případech nebyl translokační partner určen).

Intersticiální delece 14q byla nalezena u 7 vzorků od 7 pacientů (7/391; 2%, resp. 7/337; 2%).

5 Diskuse

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 delecii menší než 1Mb (Ouillette et al. 2008, Parker et al. 2011), je spíše pravděpodobný její obtížný nález analýzou karyotypu a naopak vyšší záchyt pouze FISH vyšetřením, tedy ve shodě s výsledky prezentovanými v této práci.

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). 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 tedy kombinací FISH vyšetření a analýzy karyotypu po stimulované kultivaci byl nalezen patologický klon u 89% vzorků (348/391), 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, u 44% (171/391) vyšetřených vzorků byla zjištěna i přítomnost jiných chromosomových přestaveb než rekurentních aberací vyšetřovaných zároveň i FISH.

Klonální vývoj

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 prvozáchyt onemocnění, resp. u 29% (43/149) pacientů. U části vzorků, porovnávaných s dřívějším FISH vyšetřením na buňkách nestimulované kultivace, byly hodnocením pouze rekurentních aberací (delece 13q14, delece 11q22-23, delece 17p13, trisomie 12) stanoveny přidatné změny v 18% (25/139) vzorků, resp. u 23% (25/108) pacientů, ve shodě s 11-26% udávanými v literárních zdrojích (Shanafelt et al. 2006b, Stilgenbauer et al. 2007, Berkova et al. 2009, Loscertales et al. 2010). 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 stanovené FISH metodou. Míra cytogenetické evoluce karyotypu CLL buněk není v odborné literatuře příliš uváděna, dle omezených údajů je referována v obdobné výši 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 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). Klonální vývoj, jak ve formě přítomnosti subklonů „*in situ*“ tak i nových změn získaných v průběhu onemocnění, se častěji vyskytoval ve skupině pacientů s progresivním onemocněním oproti pacientům vyšetřeným při záchytu onemocnění či se stabilním průběhem (P 0,05 pro klonální vývoj

„*in situ*“, $P 0,05$, resp. $P 0,04$ pro klonální vývoj v průběhu onemocnění). Získané výsledky 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 spojení klonálního vývoje s progresivitou onemocnění je ve shodě s udávanou zhoršenou prognózou pacientů se zachyceným klonálním vývojem (Stilgenbauer et al. 2007).

Komplexní změny, chromosomové translokace

Zevrubnou analýzou mitóz byly nalezeny komplexní změny v 28% vzorků, 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. Významně častější výskyt komplexních změn karyotypu ve skupině pacientů s progresivním onemocněním oproti pacientům vyšetřeným při záchytu onemocnění či se stabilním průběhem ($P 0,00001$ pro komplexní změny zjištěné pouze analýzou karyotypu, $P 0,0002$ pro komplexní změny se zahrnutím kryptických změn 13q14) je v souladu s udávanou špatnou prognózou spojenou s komplexními změnami (Juliusson, Gahrton 1990, Juliusson et al. 1990, Koski et al. 2000).

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). 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. Další informace o charakteru delece 13q14 přineslo provedení analýzy mitóz po stimulované kultivaci metodou FISH a vyšetřením karyotypu. Submikroskopická delece, kryptická pro analýzu karyotypu G-pruhováním a detekovaná pouze FISH, byla nalezena v 66% (154/235) případů delece. Tento nálezný 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 karyopu (≥ 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.

V 11% (25/235) případů delecí 13q14 byla prokázána přítomnost reciproké translokace s delecí v místě translokačního zlomu jako mechanismu vzniku

delece jedné (24x) či obou alel (1x). Translokace 13q14 s delecí v místě translokačního zlomu jako minoritní forma delece 13q14 u CLL, resp. u 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. 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, významnou četnost komplexních translokací 13q14 (4/24 translokací) a častou koexistenci s klonem s intersticiální delecí 13q14 (7/25; 28%). 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.

Doplňujícím vyšetřením 4 pacientů s koexistencí klonů s delecí v místě translokačního zlomu a s intersticiální delecí byl u dvou pacientů prokázán nezávislý vznik (v různých paralelních klonech) delecí 2. alel 13q14 a u jednoho pacienta se, díky vhodnému klonálnímu vývoji, podařilo prokázat nezávislý vznik delece v místě translokačního zlomu na delecí intersticiální. Je možné se proto domnívat, že nezávisle na klonu s intersticiální delecí vznikají translokace 13q14 s delecí v místě zlomu i ve všech ostatních případech a nejedná se tedy o postupný klonální vývoj (např. klonu s delecí v místě translokačního zlomu z klonu s intersticiální delecí). Obdobně 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). Možným mechanismem pro jednokrokový

vznik translokace s delecí v místě translokačního zlomu se zdá být mikrohomologii zprostředkovaná, zlomem indukovaná replikace (MMBIR), recentně navržená pro vznik reciprokých translokací s duplikacemi v místech zlomů v nádorových buňkách (Howarth et al. 2011).

Nejen tyto případy koexistence obou typů delece 13q14, ale i případ pacienta se třemi různě rozsáhlými intersticiálními delecemi 13q14 ve třech různých klonech ukazuje na důležitost provádění cytogenetické analýzy po stimulované kultivaci. U tohoto pacienta byla v době záchytu onemocnění 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 $t(14;18)(q32;q21)$ (Put et al. 2009), 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.

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 bialelické delece.

Přítomnost více klonů s několika nezávislými zlomovými událostmi v oblasti 13q14 („hot spot“) 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.

6 Závěry

Zhodnocení DSP30/IL2 stimulované kultivace

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 prokázaná 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 0,00003, resp. P 0,0002).

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 progresu onemocnění než u vzorků ze záchyty či stabilního onemocnění (P 0,05, resp. P 0,04).

Studium rekurentních strukturních aberací

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 spojenou s těmito aberacemi.

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, 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.

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. 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 bíaleické delece. Ke zlepšení zachytu 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. 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.

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.

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.

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. 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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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. 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.

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.

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.

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.

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. 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.

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.

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. 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.

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.

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.

SHANAFELT, T. D., et al. Cytogenetic Abnormalities can Change during the Course of the Disease Process in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2006a, vol. 24, no. 19, s. 3218-9; author reply 3219-20. ISSN 1527-7755; 0732-183X.

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*. 2006b, vol. 24, no. 28, s. 4634-4641. ISSN 1527-7755; 0732-183X.

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., 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.

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.

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.

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*. 2009, vol. 114, no. 13, s. 2589-2597. 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, Subrt 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, Subrt 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. Multiclonality 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 delecce 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

d) Články v odborných časopisech s IF

Dvorak P, Lysak D, Vokurka S, Michalova K, Sarova I, Jonasova A, **Hrubá M**, Rykovska 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, Kaisarova P, Oltova A, Filkova H, Holzerova M, Balcarikova 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, **Hruba 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**

a) 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.

b) 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**, Ryksovská 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, **Hruba 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, **Hruba 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, **Hruba 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**

c) Prezentace na mezinárodních konferencích (bez IF)

Zemanova Z, Michalova K, Babicka L, Oltova A, Jarosova M, **Hruba 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, **Hruba 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.

d) 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 mikroleuce 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, Študla 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, Mužíková 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 subteleromických 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, Mužíková K, Formánková R, Sedláček P, Vrzalová A, Štěrba J, Mihál V, Černá Z, Starý J. Frekvence a klinický význam komplexních chromozomových 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 prvozáchyťů MM za rok 2004 v ÚLG v Plzni. Zasedání České myelomové skupiny, Čejkovice, 4/2005