

**Univerzita Karlova v Praze**

**1. lékařská fakulta**

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie



**Ing. Jana Marková**

Molekulárně genetické změny u akutní myeloidní leukemie

*Molecular genetic alterations in acute myeloid leukemia*

Dizertační práce

Školitel: MUDr. Jiří Schwarz, CSc.

Praha, 2015

**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, 15.01.2015

Ing. Jana Marková

Podpis

## **Poděkování:**

Na prvním místě bych chtěla poděkovat svému školiteli MUDr. Jiřímu Schwarzovi, CSc. za odborné vedení, cenné rady, podporu a trpělivost při vypracovávání dizertační práce.

Dále bych ráda poděkovala pracovníkům Oddělení cytogenetiky ÚHKT pod vedením Prof. Ing. Kyry Michalové, DrSc., zejména pak RNDr. Janě Březinové, Ph.D., za poskytnutí výsledků cytogenetických analýz a za pomoc při jejich interpretaci.

Pracovníkům Oddělení molekulární genetiky ÚHKT pod vedením Ing. Oty Fuchse, CSc. děkuji za poskytnutí výsledků sekvenčních analýz mutací genů *NPM1* a *CEBPA*.

Rovněž bych chtěla poděkovat svým spolupracovníkům z Laboratoře PCR diagnostiky leukemií, zejména Petře Michkové, za pomoc při provádění sekvenčních analýz.

RNDr. Cedriku Haškovi, CSc. a MUDr. Mgr. Cyrilu Šálkovi, Ph.D. děkuji za pečlivé přečtení práce a cenné připomínky k textu.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat všem lékařům Klinického úseku ÚHKT za poskytnutí patientských vzorků a klinických údajů, nezbytných pro zpracování analýz.

Prof. MUDr. Petru Cetkovskému, Ph.D., MBA děkuji za možnost pracovat v Laboratoři PCR diagnostiky leukemií Klinického úseku ÚHKT a za všestrannou podporu.

**Identifikační záznam:**

MARKOVÁ, Jana. *Molekulárně genetické změny u akutní myeloidní leukemie. [Molecular genetic alterations in acute myeloid leukemia]*. Praha, 2014. 127 s., 4 příl. Dizertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Ústav hematologie a krevní transfuze. Školitel: Schwarz, Jiří

## OBSAH

<b>1. ÚVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. CÍL PRÁCE</b> .....	<b>3</b>
<b>3. LITERÁRNÍ PŘEHLED PROBLEMATIKY</b> .....	<b>4</b>
<b>3.1 AKUTNÍ MYELOIDNÍ LEUKEMIE</b> .....	<b>4</b>
<b>3.2 KLASIFIKACE AML</b> .....	<b>5</b>
<b>3.3 AML S PŘÍZNIVOU CYTOGENETICKOU PROGNÓZOU</b> .....	<b>9</b>
<b>3.3.1 AKUTNÍ PROMYELOCYTÁRNÍ LEUKEMIE</b> .....	<b>9</b>
3.3.1.1 Mutace genu <i>FLT3</i> u APL .....	11
<b>3.3.2 CBF-AML</b> .....	<b>12</b>
3.3.2.1 Mutace genu <i>C-KIT</i> u CBF-AML .....	15
3.3.2.2 Mutace genu <i>K-RAS</i> u CBF-AML .....	16
3.3.2.3 Mutace genu <i>FLT3</i> u CBF-AML .....	17
<b>3.4 AML SE STŘEDNÍ CYTOGENETICKOU PROGNÓZOU</b> .....	<b>17</b>
<b>3.4.1 MUTACE GENU <i>FLT3</i></b> .....	<b>18</b>
<b>3.4.2 MUTACE GENU <i>NPM1</i></b> .....	<b>20</b>
<b>3.4.3 MUTACE GENU <i>CEBPA</i></b> .....	<b>21</b>
<b>3.4.4 MUTACE GENU <i>DNMT3A</i></b> .....	<b>22</b>
<b>3.4.5 MUTACE GENU <i>ASXL1</i></b> .....	<b>24</b>
<b>3.4.6 MUTACE GENŮ <i>IDH1</i> A <i>IDH2</i></b> .....	<b>25</b>
<b>3.4.7 ABERACE GENU <i>MLL</i></b> .....	<b>26</b>
<b>3.5 AML S NEPŘÍZNIVOU CYTOGENETICKOU PROGNÓZOU</b> .....	<b>27</b>
<b>4. PACIENTI A METODY</b> .....	<b>29</b>
<b>4.1 PACIENTI</b> .....	<b>29</b>
<b>4.2 METODY</b> .....	<b>29</b>
<b>4.2.1 SEPARACE BUNĚK</b> .....	<b>29</b>
<b>4.2.2 IZOLACE RNA A DNA, PŘÍPRAVA <i>cDNA</i></b> .....	<b>30</b>
<b>4.2.3 DETEKCE FÚZNÍHO GENU <i>PML/RAR<math>\alpha</math></i></b> .....	<b>30</b>
4.2.3.1 Monitorování <i>PML/RAR<math>\alpha</math></i> pomocí kvantitativní PCR .....	34
<b>4.2.4 DETEKCE FÚZNÍCH GENŮ <i>AML1/ETO</i> A <i>CBF<math>\beta</math>/MYH11</i></b> .....	<b>34</b>
4.2.4.1 Monitorování <i>AML1/ETO</i> a <i>CBF<math>\beta</math>/MYH11</i> pomocí kvantitativní PCR .....	35
<b>4.2.5 DETEKCE <i>FLT3/ITD</i></b> .....	<b>36</b>
<b>4.2.6 DETEKCE <i>FLT3/TKD</i></b> .....	<b>37</b>
<b>4.2.7 DETEKCE <i>C-KIT</i> MUTACÍ</b> .....	<b>38</b>
<b>4.2.8 DETEKCE MUTACÍ <i>K-RAS</i> A <i>N-RAS</i></b> .....	<b>38</b>

<b>4.2.9 DETEKCE MUTACÍ DNMT3A</b> .....	<b>38</b>
4.2.9.1 Monitorování <i>DNMT3A</i> pomocí kvantitativní PCR .....	38
<b>4.2.10 DETEKCE MUTACÍ ASXL1</b> .....	<b>39</b>
<b>4.2.11 DETEKCE FÚZNÍCH GENŮ SPOJENÝCH S TRANSLOKACEMI GENU</b>	
<b><i>MLL</i></b> .....	<b>40</b>
4.2.11.1 Monitorování translokací <i>MLL</i> genu pomocí kvantitativní PCR.....	40
<b>4.2.12 DETEKCE MUTACÍ TP53</b> .....	<b>40</b>
<b>4.2.13 DETEKCE MUTACÍ NPM1 A CEBPA</b> .....	<b>41</b>
<b>4.2.14 KLASICKÁ CYTOGENETICKÁ ANALÝZA</b> .....	<b>41</b>
<b>4.2.15 FISH ANALÝZA</b> .....	<b>41</b>
<b>4.2.16 STATISTICKÉ METODY</b> .....	<b>42</b>
<b>5. VÝSLEDKY</b> .....	<b>43</b>
<b>5.1 AML S PŘÍZNIVOU CYTOGENETICKOU PROGNÓZOU</b> .....	<b>43</b>
<b>5.1.1 APL</b> .....	<b>43</b>
5.1.1.1 Charakteristika pacientů .....	43
5.1.1.2 Zlomové místo a jeho vliv na prognózu onemocnění .....	44
5.1.1.3 APL a <i>FLT3/ITD</i> .....	44
<b>5.1.2 CBF-AML</b> .....	<b>46</b>
5.1.2.1 Charakteristika pacientů .....	46
5.1.2.2 Přítomnost sekundárních molekulárních aberací .....	46
5.1.2.3 Počet leukocytů v době diagnózy .....	48
5.1.2.4 CR a molekulární remise .....	49
5.1.2.5 Relapsy a RFS.....	49
5.1.2.6 Celkové přežití pacientů .....	50
<b>5.2 AML SE STŘEDNÍ CYTOGENETICKOU PROGNÓZOU</b> .....	<b>51</b>
<b>5.2.1 <i>FLT3/ITD</i></b> .....	<b>51</b>
5.2.1.1 Charakteristika pacientů .....	51
5.2.1.2 Přehled zachycených ITD .....	51
5.2.1.3 <i>FLT3/ITD</i> a počet leukocytů v době diagnózy .....	52
5.2.1.4 <i>FLT3/ITD</i> a CR.....	53
5.2.1.5 <i>FLT3/ITD</i> a relapsy .....	53
5.2.1.6 <i>FLT3/ITD</i> a OS pacientů .....	54
<b>5.2.2 MUTACE <i>FLT3/TKD</i></b> .....	<b>55</b>
5.2.2.1 Charakteristika pacientů .....	55
5.2.2.2 Přehled zachycených mutací.....	55
5.2.2.3 Mutace <i>FLT3/TKD</i> a počet leukocytů v době diagnózy .....	55
5.2.2.4 Mutace <i>FLT3/TKD</i> a CR .....	56

5.2.2.5 Mutace <i>FLT3</i> /TKD a relapsy .....	56
5.2.2.5 Mutace <i>FLT3</i> /TKD a OS pacientů .....	56
<b>5.2.3 MUTACE <i>DNMT3A</i>.....</b>	<b>56</b>
5.2.3.1 Charakteristika pacientů .....	56
5.2.3.2 Přehled zachycených mutací .....	57
5.2.3.3 Mutace <i>DNMT3A</i> a počet leukocytů v době diagnózy .....	58
5.2.3.4 Mutace <i>DNMT3A</i> a CR.....	58
5.2.3.5 Mutace <i>DNMT3A</i> a relapsy.....	58
5.2.3.6 Mutace <i>DNMT3A</i> a OS .....	59
5.2.3.7 Mutace <i>DNMT3A</i> a <i>FLT3</i> /ITD.....	59
5.2.3.8 Sledování MRO pomocí monitorace mutací <i>DNMT3A</i> .....	61
<b>5.2.4 MUTACE <i>ASXL1</i>.....</b>	<b>61</b>
5.2.4.1 Charakteristika pacientů .....	61
5.2.4.2 Přehled zachycených mutací.....	61
5.2.4.3 Mutace <i>ASXL1</i> a počet leukocytů v době diagnózy .....	61
5.2.4.4 Mutace <i>ASXL1</i> , CR, relapsy a OS pacientů .....	62
<b>5.2.5 TRANSLOKACE GENU <i>MLL</i> .....</b>	<b>62</b>
5.2.5.1 Charakteristika pacientů .....	62
5.2.5.2 Přehled zachycených translokací <i>MLL</i> genu a OS pacientů .....	63
5.2.5.3 Sledování MRO pomocí translokací <i>MLL</i> genu .....	63
<b>5.3 AML S NEPŘÍZNIVOU CYTOGENETICKOU PROGNOZOU .....</b>	<b>64</b>
5.3.1 CHARAKTERISTIKA PACIENTŮ .....	64
5.3.2 MUTACE <i>TP53</i> .....	64
<b>5.4 HODNOCENÍ OS PODLE KRITERIÍ ELN .....</b>	<b>64</b>
<b>6. DISKUSE .....</b>	<b>67</b>
<b>7. ZÁVĚR.....</b>	<b>71</b>
<b>8. LITERATURA .....</b>	<b>73</b>
<b>9. SEZNAM ZKRATEK.....</b>	<b>84</b>
<b>10. SEZNAM TABULEK .....</b>	<b>87</b>
<b>11. SEZNAM OBRÁZKŮ.....</b>	<b>88</b>
<b>12. SEZNAM PUBLIKACÍ .....</b>	<b>91</b>
12.1 PUBLIKACE ZA DOBU STUDIA SE VZTAHEM K PŘEDKLÁDANÉ PRÁCI.....	91
12.2 PUBLIKACE ZA DOBU STUDIA BEZ VZTAHU K PŘEDKLÁDANÉ PRÁCI.....	91
12.3 PUBLIKACE PŘED ZAHÁJENÍM STUDIA .....	92
<b>13. SEZNAM PŘÍLOH .....</b>	<b>94</b>
13.1 PŘÍLOHA 1.....	95

<b>13.2 PŘÍLOHA 2.....</b>	<b>109</b>
<b>13.3 PŘÍLOHA 3.....</b>	<b>118</b>
<b>13.4 PŘÍLOHA 4.....</b>	<b>125</b>
<b>13.5 PŘÍLOHA 5.....</b>	<b>128</b>



## ABSTRAKT

Molekulárně genetická analýza patří mezi základní vyšetření nezbytná k přesnému určení diagnózy, prognózy a léčby pacientů s AML. Vyšetření karyotypu umožňuje zařazení pacientů do základních rizikových skupin, molekulárně genetické metody jednak poskytují možnost další stratifikace pacientů v rámci jednotlivých podskupin, ale také umožňují (pomocí kvantitativní PCR) sledovat průběh minimálního reziduálního onemocnění (MRO) a s předstihem předvídat případný relaps onemocnění.

Cílem této práce bylo zhodnotit prognostický význam nových molekulárně genetických markerů u pacientů s AML, zejména u nemocných s příznivou (akutní promyelocytární leukemie (APL), CBF-AML) a střední (vliv přítomnosti mutací *FLT3* a dalších) cytogenetickou prognózou.

Pomocí kvalitativní PCR byla testována přítomnost fúzních genů *PML/RAR $\alpha$* , *AML1/ETO* a *CBF $\beta$ /MYH11*. Pacienti s fúzními geny *AML1/ETO* nebo *CBF $\beta$ /MYH11* (CBF-AML) byli dále testováni pomocí sekvenační analýzy, případně restriktivního štěpení, na přítomnost sekundárních mutací genů *C-KIT*, *K-RAS*, *N-RAS* a *FLT3*. U pacientů se středním prognostickým rizikem byla sledována přítomnost interních tandemových duplikací genu *FLT3* (*FLT3/ITD*), mutací v tyrozinkinázové doméně tohoto genu (*FLT3/TKD*) a dále mutací genů *DNMT3A*, *ASXL1*. U pacientů s komplexními změnami karyotypu přítomnost mutací genu *TP53*. MRO bylo sledováno pomocí kvantitativní real time PCR. Následně byl analyzován vliv těchto molekulárních aberací na průběh a prognózu onemocnění u jednotlivých rizikových skupin pacientů.

Z celkem 654 nemocných byl u 141 (21,6 %) detekován některý z prognosticky příznivých fúzních genů: *PML/RAR $\alpha$*  (u 92 pacientů), *AML1/ETO* (27) a *CBF $\beta$ /MYH11* (22). Pacienti s fúzními geny *PML/RAR $\alpha$*  a *AML1/ETO* měli výrazně nižší riziko relapsu onemocnění a téměř 70 % z nich přežilo 3 roky od diagnózy AML. Šanci na docílení CR u pacientů s fúzí *PML/RAR $\alpha$*  snižovala přítomnost *FLT3/ITD*. U pacientů s fúzí *CBF $\beta$ /MYH11* byla pravděpodobnost relapsu vyšší a dlouhodobé přežití těchto pacientů bylo přibližně 60 %. Incidenci relapsů u pacientů s CBF-AML zvyšovala jednak přítomnost sekundárních mutací genů *C-KIT*, *K-RAS* a *FLT3/TKD*, ale i přetrvávající pozitivita MRO.

Do skupiny se střední cytogenetickou prognózou bylo na základě vyšetření karyotypu zařazeno 394 (60,2 %) pacientů. Mutace genů *FLT3* (*FLT3/ITD*, *FLT3/TKD*) a *DNMT3A* výrazně zvyšovaly pravděpodobnost relapsu onemocnění u této skupiny pacientů. Pacienti s *FLT3/ITD* dosahovali výrazně kratšího OS (3 roky po diagnóze přežilo pouze 17 % pacientů), bez ohledu na délku a místo inzerce ITD. Mutace genu *ASXL1* neměly na prognózu onemocnění žádný výrazný vliv.

Do skupiny s nepříznivou prognózou bylo zařazeno 119 (18,2 %) pacientů, u 60 z nich byly detekovány komplexní změny karyotypu. OS po 3 letech od diagnózy byl u těchto pacientů pod 10%.

V této práci byl potvrzen nepříznivý vliv přítomnosti *FLT3/ITD* (nicméně nebyl prokázán žádný dodatečný vliv její délky, místa inzerce ani procentuálního zastoupení mutované alely) a mutací *DNMT3A* genu na prognózu onemocnění AML. Dále byl prokázán negativní vliv sekundárních mutací na incidenci relapsů u pacientů s CBF-AML. Byla zavedena a optimalizována metodika pro sledování MRO u pacientů s nejčastějšími typy mutací genu *DNMT3A*.

**Klíčová slova:** akutní myeloidní leukemie – akutní promyelocytární leukemie – core binding factor AML – *FLT3/ITD* – *FLT3/TKD* – *DNMT3A* – *ASXL1* – mutace – prognóza.

## ABSTRACT

Cytogenetic and molecular genetic analyses are necessary for precise assessment of diagnosis, prognosis and treatment of patients with AML. The karyotypic analysis allows the distribution of patients into the basic risk groups, while the methods of molecular biology offer further possibilities to stratify patients within particular risk subgroups. Moreover, using quantitative PCR, they enable to follow the course of minimal residual disease (MRD) and foresee the eventual relapse of the disease.

The aim of this thesis was to analyse the prognostic impact of new molecular markers in patients with AML, particularly in those with favourable (acute promyelocytic leukemia (APL), CBF-AML) and intermediate (influence of *FLT3* mutations and others) cytogenetic profiles.

The presence of fusion genes *PML/RAR $\alpha$* , *AML1/ETO* and *CBF $\beta$ /MYH11* was tested by qualitative PCR. Patients harbouring fusion genes *AML1/ETO* or *CBF $\beta$ /MYH11* (CBF-AML) were further analysed using either sequencing or restriction digest analysis, for the presence of *C-KIT*, *K-RAS*, *N-RAS* and *FLT3* mutations. Patients with intermediate cytogenetic risk were tested for presence of internal tandem duplications of *FLT3* (*FLT3/ITD*), mutations in tyrosine kinase domain of *FLT3* (*FLT3/TKD*), *DNMT3A* and *ASXL1* mutations. Cases with a complex karyotype were screened for *TP53* mutations. Real time PCR was used for monitoring of MRD. The impact of these aberrations on disease progression and prognosis in particular risk groups of patients was analysed.

Out of 654 patients, in 141 (21.6%) one of the prognostically favourable fusion genes were detected: *PML/RAR $\alpha$*  (92 patients), *AML1/ETO* (27) and *CBF $\beta$ /MYH11* (22). Patients carrying the fusion genes *PML/RAR $\alpha$*  or *AML1/ETO* had a lower risk of relapse and almost 70% of them were alive 3 years after the diagnosis of AML. The chance to reach CR in cases with *PML/RAR $\alpha$*  was diminished by the presence of *FLT3/ITD*. Patients harbouring *CBF $\beta$ /MYH11* fusion had a higher incidence of relapse and overall survival (OS) of these patients was around 60%. The relapse rate in patients with CBF-AML was increased by *C-KIT*, *K-RAS* and *FLT3/TKD* mutations, as well as by the persisting positivity of MRD.

According to the results of karyotypic analysis, 394 (60.2%) patients were included within the intermediate cytogenetic risk group. Both *FLT3* (*FLT3/ITD*, *FLT3/TKD*) and *DNMT3A* mutations had a strong adverse impact on the relapse rate in these patients. Those carrying *FLT3/ITD* had a much shorter OS (3 years after the diagnosis, only 17% of patients were alive), regardless of the ITD length and insertion site. *ASXL1* mutations had no impact on prognosis of AML.

119 patients (18.2%) were assigned into the unfavorable risk group. In 60 of them, complex karyotypic changes were shown. OS after 3 years within this group was below 10%.

This study confirmed the unfavorable prognostic impact of *FLT3/ITD* (but no additional impact of its length, insertion site and mutated allele burden was demonstrated) and *DNMT3A* mutations. The adverse impact of *C-KIT*, *FLT3/TKD* and *K-RAS* mutations on the relapse rate of CBF-AML patients was demonstrated. The methods for MRD monitoring were developed for cases with the most frequent types of *DNMT3A* mutations.

**Keywords:** acute myeloid leukemia – acute promyelocytic leukemia – core binding factor AML – *FLT3/ITD* – *FLT3/TKD* – *DNMT3A* – *ASXL1* – mutation – prognosis.

## 1. ÚVOD

Pojem leukemie je souhrnným názvem pro skupinu onemocnění, charakteristických nádorovým zmnožením bílých krvinek v kostní dřeni. První popisy nemocných s nahromaděním bílých krvinek v krvi pocházejí z poloviny 19. století, kdy francouzský lékař A. F. Donné a skotský patolog J. H. Bennett pozorovali obraz podobný hnisání, avšak bez nálezu hnisavého ložiska. Termín leukemie, vycházející z řeckých slov leukos (bílý) a haima (krev), byl poprvé použit v roce 1847 německým patologem R. Virchowem, který ve světelném mikroskopu pozoroval výrazné zmnožení bílých krvinek a správně usoudil, že nejde o hnisání, ale o samostatné onemocnění. V roce 1877 německý lékař P. Ehrlich vyvinul metodu barvení krevních nátěrů, která mu umožnila detailně popsat normální a patologické bílé krvinky. Do roku 1889, kdy německý lékař W. Ebstein poprvé použil termín akutní leukemie k odlišení rychle progredující formy onemocnění s fatálními následky od formy s pomalejším průběhem, bylo onemocnění považováno za chronické. V roce 1868 německý patolog E. Neumann popsal změny v kostní dřeni pacientů a prokázal jejich souvislost se vznikem leukemie. V roce 1900 švýcarský hematolog O. Naegeli popsal nové buňky v myeloidní buněčné řadě, které nazval myeloblasty. Od té doby jsou leukemie rozdělovány na myeloidní a lymfoblastové. V roce 1913 byly klasifikovány čtyři základní typy leukemií, jak je známe nyní: chronická lymfatická leukemie (CLL), chronická myeloidní leukemie (CML), akutní lymfoblastová leukemie (ALL) a akutní myeloidní leukemie (AML) [1-4].

Objev struktury a funkce DNA dvěma vědci z Cambridge J. D. Watsonem a F. Crickem v roce 1953 a následně rozvoj cytogenetických a posléze molekulárně genetických metod hrál zásadní roli v možnostech diagnostiky a léčby leukemií. V roce 1960 popsali američtí vědci P. C. Nowell a D. Hungerford první rekurentně se objevující chromozomální abnormalitu spojenou s nádorovým onemocněním, malý specifický chromozom přítomný u pacientů s CML, který byl pojmenován filadelfský chromozom. Později, v roce 1973, americká genetička J. D. Rowley pomocí nové cytogenetické techniky, G-pruhování, upřesnila, že tento chromozom vzniká specifickou translokací mezi chromozomy 9 a 22 [5]. Tatáž genetička o 4 roky později se svými spolupracovníky popsala i balancovanou translokaci t(15;17) charakteristickou pro pacienty s akutní promyelocytární leukemií (APL) [6]. V roce 1979 pak J. M. Trujillo detekoval translokaci t(8;21) u 32 z 546 pacientů s AML [7].

V roce 1976 byla Francouzsko-Americko-Britskou skupinou 7 hematologů publikována první klasifikace akutních leukemií. Tato tzv. FAB klasifikace rozděluje akutní leukemie výhradně na základě morfologického a cytochemického vyšetření a rozlišuje 3 subtypy ALL (L1-L3) a 8 subtypů AML (M0-M7) [8]. Světová zdravotnická organizace (WHO) sestavila v roce 2001 první klasifikaci AML, která bere v potaz kromě morfologických nálezů i výsledky cytogenetického vyšetření [9]. Tato klasifikace byla následně revidována v roce 2008.

Výhradně na cytogenetických a molekulárně genetických nálezech jsou pak založeny některé novější prognostické stratifikace AML publikované Grimwadem *et al.* [10,11] a nejnovější podle Evropské leukemické sítě (ELN) z roku 2010 [12].

AML je geneticky heterogenní onemocnění, vznikající v důsledku získaných somatických mutací v hematopoetických progenitorových buňkách, narušujících normální průběh diferenciace, vyžívání a následně i proliferace. Chromozomové aberace (balancované translokace, inverze, delece, inzerce, monosomie a trisomie) bývají detekovány přibližně u 55 % pacientů. S rozvojem nových molekulárně genetických metod byla popsána celá řada různých genových mutací a aberantně exprimovaných genů, což umožňuje další stratifikaci velké skupiny pacientů s normálním karyotypem. Význam těchto nově identifikovaných mutací, jejich dopad na prognózu onemocnění a jejich využití jako genetických markerů pro sledování minimálního reziduálního onemocnění (MRO) je zatím předmětem výzkumu. Některé z těchto mutací se zdají být důležitými prognostickými a prediktivními markery, některé molekulární změny mohou být cílem specifické terapie [13,14].

## 2. CÍL PRÁCE

Cílem předkládané dizertační práce bylo zhodnotit prognostický význam nových molekulárně genetických markerů u pacientů s AML, zejména u nemocných s příznivou a střední cytogenetickou prognózou:

1. u pacientů s APL
2. u pacientů s CBF-AML
3. u pacientů se střední cytogenetickou prognózou (význam mutací genu *FLT3* a dalších).

### 3. LITERÁRNÍ PŘEHLED PROBLEMATIKY

#### 3.1 AKUTNÍ MYELOIDNÍ LEUKEMIE

Akutní myeloidní leukemie (AML) jsou heterogenní skupinou onemocnění vznikajících maligní transformací hematopoetické kmenové nebo progenitorové buňky, spojené s poruchou diferenciací a apoptózy při zachování schopnosti proliferace. Akumulace leukemických blastů potlačuje fyziologickou krevetvorbu a vede k anémii, neutropenii a trombocytopenii. Buněčné stadium, ve kterém k transformaci dojde, a omezená schopnost vyzrávání u těchto buněk do značné míry ovlivňují fenotypovou variabilitu onemocnění [15].

AML je nejčastějším typem leukemie u dospělých pacientů a představuje 3 % ze všech maligních nádorů. Její incidence je největší v USA, Austrálii a západní Evropě, kde dosahuje 3-4 nemocných na 100 000 obyvatel za rok a s věkem stoupá až na 15-17/100 000 ve skupině nad 65 let. Neléčená má fatální průběh, s mediánem přežití 11-20 týdnů. Pacienti umírají v důsledku selhání kostní dřeně (infekce, krvácení) [16].

Věk pacientů je nejvýznamnějším prognostickým faktorem u AML. Šance na uzdravení klesá kontinuálně se stoupajícím věkem, ve skupině do 60 let dosáhne kompletní remise (CR) přibližně 75 % pacientů a 35-40 % z nich přežívá 5 a více let, nad 60 let je CR indukována u 45-55 % případů a méně než 10 % nemocných přežívá minimálně 5 let. To je způsobeno zejména vyšší frekvencí komorbidit a kontraindikací intenzivní cytotoxické terapie, vyšší incidencí sekundárních AML vzniklých transformací z myelodysplastického syndromu (MDS) a vyšší frekvencí nepříznivých cytogenetických abnormalit u starších pacientů [15,17].

Diagnostika AML se opírá o morfologické, cytochemické, imunofenotypizační, cytogenetické a molekulárně genetické vyšetření periferní krve a kostní dřeně. Prvním vyšetřením obvykle bývá stanovení rozpočtu leukocytů z krevního obrazu. Diagnostická je přítomnost leukemických myeloidních blastů, menší počet zralých neutrofilů a absence středních vývojových forem (tzv. hiatus leukemicus). Počet leukocytů v periferní krvi bývá obvykle zvýšený, ale může být normální i snížený. K definitivnímu stanovení diagnózy AML je nutné vyšetření kostní dřeně. Pro diagnózu AML svědčí přítomnost blastů v kostní dřeni dosahující > 20 % z celkového počtu jaderných buněk [18]. O klasifikaci AML pojednává kap. 3.2.

Konvenční cytogenetické vyšetření (doplněné o FISH analýzu) je nezbytné pro diagnostiku chromozomálních aberací. Chromozomální abnormality nacházíme u 55-60 % případů AML. Genové mutace identifikované u AML můžeme rozdělit do dvou skupin. První skupinu tvoří tzv. „gain of function“ mutace, které aktivují signální dráhy vedoucí ke zvýšené proliferaci a zároveň prodlouženému přežití leukemických progenitorových buněk. Sem patří např. mutace genů *RAS*,

*C-KIT* a *FLT3*. Druhá skupina zahrnuje mutace postihující transkripční faktory a komponenty transkripčních koaktivačních komplexů. Příkladem těchto mutací jsou zejména fúzní geny *PML/RAR $\alpha$* , *AML1/ETO* a *CBF $\beta$ /MYH11*, dále pak mutace genů *CEBPA*, *NPM1* a translokace genu *MLL* [13,14].

Molekulárně genetické vyšetření pomocí PCR umožňuje rozpoznat pacienty s prognosticky příznivými fúzními geny *PML/RAR $\alpha$* , *AML1/ETO* a *CBF $\beta$ /MYH11*. Zejména průkaz fúzního genu *PML/RAR $\alpha$*  je nutný pro přesnou a včasnou diagnózu pacientů s APL. Stanovení dalších molekulárně genetických aberací, jako interních tandemových duplikací genu *FLT3* (*FLT3/ITD*), mutací genů *NPM1*, *CEBPA*, *DNMT3A* a dalších jednak pomůže blíže určit rizikovou skupinu pacientů a za druhé, v případě pozitivního nálezu, umožňuje pomocí kvantitativní PCR sledovat průběh MRO a účinnost léčby, popřípadě s předstihem předvídat relaps onemocnění [12,17].

Léčba AML má dvě hlavní fáze. Cílem první, indukční fáze je navození CR, která je charakterizována normalizací hodnot krevního obrazu, vymizením nezralých leukemických buněk pod hranici morfologické detekce a poklesem blastů v kostní dřeni pod 5 %. CR se pomocí indukční terapie podaří dosáhnout u 50-80 % pacientů s AML. Druhá fáze, tzv. konsolidační terapie, se zaměřuje na vymizení MRO a docílení molekulární remise. Tato fáze zahrnuje několik odlišných léčebných postupů, od intenzivní chemoterapie až po autologní nebo alogenní transplantaci krvetvorných kmenových buněk (HSCT) [18,19]. Úspěšná indukce a poremisní léčba dává naději na vyléčení 30-40 % pacientů s AML (s výjimkou APL, kde je vyšší). Zásadní úlohu v léčbě AML hraje monitorování MRO v kostní dřeni a/nebo v periferní krvi, jednak pomocí multiparametrální průtokové cytometrie, ale zejména pomocí molekulárně genetických metod. Použití kvantitativní real-time RT-PCR umožňuje sledovat MRO s citlivostí  $10^{-4}$  až  $10^{-6}$  a s předstihem až 3 měsíců detekovat molekulární relaps onemocnění a včasným zahájením léčby předejít relapsu hematologickému. K monitorování MRO lze využít některé specifické translokace a mutace detekované při záchytu onemocnění. U velké části pacientů bez specifického markeru lze sledovat MRO pomocí exprese genu *WT1*, která bývá u většiny nemocných zvýšená jak v době diagnózy, tak i v případě relapsu onemocnění [20-22].

### **3.2 KLASIFIKACE AML**

Nejstarší a do nedávna nejpoužívanější klasifikací AML je tzv. Francouzsko-Americko-Britská (FAB) klasifikace, jejíž první verze byla publikována v roce 1976 [8]. Je založena především na morfologických, event. cytochemických metodách a definuje subtypy M0-M7:

**Tab. 1:** Morfologická FAB klasifikace AML a výskyt specifických chromozomálních translokací u jednotlivých subtypů [8,23,24].

FAB subtyp	Morfologie	Cytogenetika
M0	Nediferencovaná AML	
M1	AML s minimální myeloidní diferenciací	
M2	AML s vyzráváním	t(8;21)(q22;q22)
M3 M3v	Akutní promyelocytární leukemie s hypergranulárními promyelocyty Akutní promyelocytární leukemie s hypogranulárními promyelocyty	t(15;17)(q22;q21)
M4 M4eo	Akutní myelomonocytární leukemie Akutní myelomonocytární leukemie s eozinofilií	inv(16)/t(16;16)(p13;q22)
M5a M5b	Akutní monoblastová leukemie bez vyzrávání Akutní monoblastová leukemie s vyzráváním	Častěji translokace <i>MLL</i> genu, např. t(9;11)(p21-22;q23)
M6	Erytroleukemie	Změny podobné MDS
M7	Akutní megakaryoblastová leukemie	

S rozvojem nových cytogenetických a především molekulárně genetických diagnostických metod se klasifikace AML čím dál více opírají o různé molekulárně genetické nálezy a jejich dopad na průběh a prognózu onemocnění. Běžné vyšetření karyotypu je jedním z nejdůležitějších prognostických ukazatelů u AML. Cytogenetické abnormality se vyskytují přibližně u 55-60 % případů AML a mají vysokou prediktivní hodnotu co se týká odpovědi pacientů na léčbu, možného výskytu relapsu onemocnění a celkového přežití (OS), nicméně význam některých méně častých aberací zůstává stále nejasný [15].

V roce 2000 publikovali Slovak *et al.* výsledky studie Southwest Oncology Group/Eastern Cooperative Oncology Group (SWOG/ECOG), která analyzovala vliv jednotlivých chromozomálních abnormalit na docílení CR, délku OS a přežití po dosažení CR u skupiny 609 pacientů s AML mladších než 56 let [25]. Na základě výsledků byla vytvořena klasifikace, která rozdělila pacienty do čtyř kategorií podle prognostického rizika.

Ve skupině s příznivým prognostickým rizikem bylo 121 pacientů (20 %), se středním rizikem 278 (46 %), 184 (30 %) mělo nepříznivou prognózu a zbylých 26 pacientů (4 %) se zřídka se vyskytujícími chromozomálními abnormalitami nebylo zařazeno do žádné prognostické kategorie. Mezi skupinami byl signifikantní rozdíl v pravděpodobnosti docílení CR i v délce OS [25].



**Tab. 2:** Klasifikace AML podle cytogenetického nálezu podle SWOG/ECOG; Slovak *et al.* [25].

<b>Prognostická kategorie</b>	<b>Cytogenetická abnormalita</b>
Příznivá	t(15;17)(q22;q21) inv(16)(p13q22)/t(16;16)(p13;q22) t(8;21)(q22;q22) s výjimkou pac. s del(9q) a pac. s komplexním karyotypem
Střední	normální karyotyp +8, -Y, +6, del(12p)
Nepříznivá	t(8;21)(q22;q22) s del(9q) -5/del(5q) -7/del(7q) inv(3q) abn 11q, 20q, 21q, 17p del(9q) t(6;9) t(9;22) komplexní karyotyp (3 a více změn)
Neznámé riziko	pac. s chromozomálními aberacemi s nízkou četností

O dva roky později publikovali Byrd *et al.* [26] výsledky studie Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461) zahrnující 1213 dospělých pacientů s AML, s výjimkou pacientů s translokacemi t(15;17) a t(9;22), kteří jsou léčeni specifickou terapií. Také zde jsou pacienti rozděleni do tří prognostických skupin podle délky OS v závislosti na přítomnosti jednotlivých chromozomálních aberací:

**Tab. 3:** Klasifikace AML podle cytogenetického nálezu podle CALGB 8461; Byrd *et al.* [26]:

<b>Prognostické kategorie</b>	<b>Cytogenetická abnormalita</b>
Příznivá	t(8;21)(q22;q22) inv(16)(p13q22)/t(16;16)(p13;q22) del(9q)
Střední	normální karyotyp -Y, +13, +21 t(9;11), +11, del(11q) del(5q) abn(12p) del(20q)
Nepříznivá	komplexní karyotyp (3 a více změn) t(6;9) t(6;11), t(11;19) inv(3)/t(3;3) -7 +8 jako samostatná aberace, nebo s jednou jinou abnormalitou

Nejnovější cytogenetická klasifikace podle Grimwada *et al.* [11] z roku 2010, založená na analýze karyotypu a jeho vlivu na průběh a prognózu onemocnění u 5876 pacientů mladších 60 let, rozděluje pacienty do tří prognostických skupin:

**Tab. 4:** Klasifikace AML podle cytogenetického nálezu; Grimwade *et al.* [11].

Prognostická skupina	Cytogenetická abnormalita
Příznivá	t(15;17)(q22;q21) t(8;21)(q22;q22) inv(16)(p13q22)/t(16;16)(p13;q22)
Střední	normální karyotyp nálezy neřazené do dobré ani špatné prognostické skupiny
Nepříznivá	abnormality 3q [s výjimkou t(3;5)(q21-25;q31-35)] inv(3)(q21q26)/t(3;3)(q21;q26) add(5q), del(5q), -5 -7, add(7q)/del(7q) t(11q23) [s výjimkou t(9;11)(p21-22;q23) a t(11;19)(q23;p13)] t(9;22)(q34;q11) -17/abnormality 17p komplexní karyotyp ( $\geq 4$ abnormality)

Nejpočetnější skupinu tvoří pacienti s normálním karyotypem a pacienti bez přítomnosti prognosticky příznivých nebo nepříznivých aberací, kterých bývá okolo 60 %. Ve snaze o další stratifikaci této skupiny pacientů a vymezení jejich rizikových faktorů, byla Evropskou leukemickou sítí (ELN) navržena klasifikace, která bere v potaz další molekulárně genetické aberace, nedetekovatelné běžnou cytogenetickou analýzou a rozděluje pacienty se střední prognózou na dvě podskupiny [12]:

**Tab. 5:** Rizikové skupiny AML podle cytogenetického a molekulárně genetického nálezu podle ELN [12].

Riziko	Cytogenetický/molekulárně genetický nález
Nízké	t(8;21)(q22;q22)/ <i>AML1/ETO</i> inv(16)(p13;q22) nebo t(16;16)(p13;q22)/ <i>CBF<math>\beta</math>/MYH11</i> normální karyotyp s mutací <i>NPM1</i> bez <i>FLT3/ITD</i> normální karyotyp s mutací <i>CEBPA</i>
Střední -I	normální karyotyp s mutací <i>NPM1</i> a <i>FLT3/ITD</i> normální karyotyp bez mutace <i>NPM1</i> a bez <i>FLT3/ITD</i> normální karyotyp bez mutace <i>NPM1</i> s <i>FLT3/ITD</i>
Střední -II	t(9;11)(p22;q23)/ <i>MLL/AF9</i> nálezy neřazené do dobré ani špatné prognostické skupiny
Vysoké	inv(3)(q21;q26) nebo t(3;3)(q21;q26)/ <i>RPN1/EV11</i> t(6;9)(p23;q34)/ <i>DEK/CAN</i> translokace lokusu 11q23/fúze genu <i>MLL</i> (s výjimkou t(9;11)/ <i>MLL/AF9</i> ) -5 nebo del(5q); -7; abnormality 17p komplexní karyotyp ( $\geq 4$ abnormality)

### 3.3 AML S PŘÍZŇIVOU CYTOGENETICKOU PROGNÓZOU

Do skupiny AML s příznivou prognózou na základě cytogenetického nálezu patří pacienti s APL s průkazem t(15;17) a fúzního genu *PML/RARα*. Tito pacienti představují přibližně 10-15 % nově diagnostikovaných AML. Druhou podskupinou s dobrou prognózou jsou pacienti s tzv. core binding factor AML (CBF-AML) nesoucí buď t(8;21) s fúzním genem *AML1/ETO* (v klinických studiích zahrnujících pouze pacienty do 60 let bývá těchto pacientů přibližně 7 %) nebo inv(16) či t(16;16) s fúzním genem *CBFβ/MYH11* (cca 5 % pacientů s AML). Dohromady tyto pacienti tvoří přibližně 25 % nově diagnostikovaných AML [11].

#### 3.3.1 AKUTNÍ PROMYELOCYTÁRNÍ LEUKEMIE

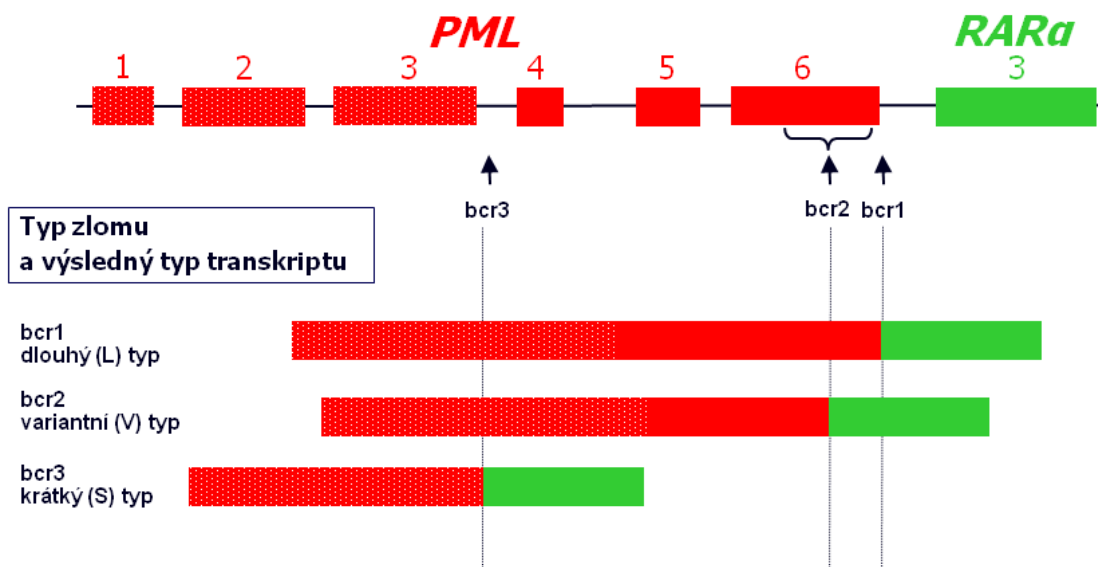
APL je samostatnou podskupinou v rámci AML FAB klasifikace označovanou AML M3 (příp. M3v). Jako zvláštní podskupina byla poprvé popsána v roce 1957 a po dlouhou dobu byla spojena s extrémně špatnou prognózou [27]. Incidence APL se pohybuje od 5-10 % v USA a severní Evropě, přes 15-25 % v Evropě střední a jižní až do 30 % v Latinské Americe [28,29]. Specifickým znakem APL je t(15;17)(q22;q21) s fúzním genem *PML/RARα*, který bývá detekován až u 98 % případů APL. Zbývá 2 % připadají na vzácné fúze *PLZF/RARα* t(11;17)(q23;q21) (asi 1 % případů), *NPM1/RARα* t(5;17)(q35;q21) (0,5 % APL) a ojediněle popsané *NuMA/RARα* t(11;17)(q13;q21), *STAT5b/RARα* t(17;17)(q11;q21) [30,31], *PRKARIA/RARα* t(17;17)(q24;q21) [32], *FIP1L1/RARα* t(4;17)(q12;q21) [33], *BCOR/RARα* t(X;17)(p11;q21) [34] a *OBFC2A/RARα* t(2;17)(q32;q21) [35].

Gen *RARα* (retinoic acid receptor α) se nachází v chromozomálním pruhu 17q21.2, je tvořen 9 exony, kóduje protein o délce 462 aminokyselin a je zahrnut ve všech dosud známých představách u APL. *RARα* patří do rodiny jaderných receptorů kyseliny retinové (společně s *RARβ* a *RARγ*) a hraje důležitou roli v kontrole proliferace a diferenciaci hematopoetických prekurzorových buněk. Je tvořen vysoce konzervovanou, sekvenčně specifickou, DNA-vazebnou doménou typu zinc finger a komplexní ligand-vazebnou doménou, která je zodpovědná za heterodimerizaci a transkripční aktivaci. Protein *RARα* vytváří heterodimery se členy druhé rodiny jaderných receptorů retinoidů RXR (retinoid X receptors), což umožňuje jejich efektivnější vazbu k DNA. Prostřednictvím specifické sekvence DNA-vazebné domény se heterodimer *RARα/RXR* váže k RARE (retinoic acid response elements), lokalizovaným v promotorových oblastech *RARα*-specifických cílových genů. Komplex *RARα/RXR* funguje jako univerzální přepínač schopný buď aktivovat, nebo potlačovat transkripci. V nepřítomnosti ligandu váže korepresory transkripce, po vazbě ligandu dochází k navázání koaktivátorů a stimulaci genové exprese [36,37].

Gen *PML* je lokalizován v chromozomálním pruhu 15q24.1, skládá se z 9 exonů, kóduje protein o délce 560 aminokyselin a je nejčastějším fúzním partnerem genu *RARα* u APL. Protein PML je zapojen do mnoha různých buněčných procesů včetně apoptózy, buněčného stárnutí, regulace růstu, regulace transkripce a kontroly genové stability. Specifická posttranslační modifikace - sumoylace - PML proteinu určuje jeho lokalizaci v charakteristických jaderných strukturách zvaných nukleární tělíska, společně s řadou dalších proteinů [37,38]. PML protein je tvořen několika důležitými funkčními doménami. Konzervovaná N-terminální část zahrnuje oblast bohatou na prolinové zbytky, dále tzv. RING (really interesting new gene) finger doménu zprostředkovávající interakce mezi proteiny, následovanou dvěma na cystein a histidin bohatými B-boxy a  $\alpha$ -helikální coiled-coil doménou podílející se na heterodimerizaci a multimerizaci PML. C-terminální část proteinu obsahuje signál pro jadernou lokalizaci a na serin a prolin bohatou oblast s fosforylačními místy. C-konec PML proteinu je co do délky značně variabilní v důsledku alternativního sestřihu [36,38].

Ve fúzním proteinu PML/RAR $\alpha$  zůstávají zachovány všechny důležité funkční domény obou proteinů. N-terminální část PML s RING finger doménou, oběma B-boxy a  $\alpha$ -helikální coiled-coil doménou je spojena s DNA-vazebnou doménou a C-terminální doménou (zprostředkovávající interakci s ligandem a vazbu RXR) genu *RARα*. Aberantní protein PML/RAR $\alpha$  váže korepresor (histondeacetylázový komplex - HDAC) s vyšší afinitou než normální *RARα*, což vede ke změně v acetylaci chromatinu a alternativní konformaci chromatinu, která inhibuje transkripci genů regulovaných normálním proteinem *RARα*. Tím je blokována buněčná diferenciacce a dochází k akumulaci abnormálních promyelocytů. Specifická léčba APL, která činí z historicky nejnepříznivějšího typu AML jeden z nejpříznivějších, spočívá v podávání terapeutických dávek kyseliny transretinové (ATRA). Ta mění konformaci proteinu PML/RAR $\alpha$  a uvolňuje vazbu HDAC komplexu, čímž umožňuje transkripční aktivaci cílových genů. Navíc indukuje proteolýzu proteinu PML/RAR $\alpha$  a tím vede k obnovení diferenciacce leukemických blastů [27].

Ke zlomu v genu *RARα* dochází vždy v intronu 2, výsledný produkt tedy vždy zahrnuje exony 3-9 tohoto genu. Místo zlomu v genu *PML* je variabilní a může být lokalizováno ve třech různých oblastech. V přibližně 55 % případů dochází ke zlomu v intronu 6 (tzv. bcr1 zlom), výsledný fúzní gen pak vzniká spojením 6. exonu genu *PML* se 3. exonem genu *RARα*. U 40 % APL dochází ke zlomu v oblasti intronu 3 *PML* genu (bcr3), vzniklý fúzní transkript je pak kratší a vzniká spojením 3. exonu *PML* se 3. exonem *RARα*. Ve zbylých přibližně 5 % případů je zlom lokalizován v různých místech exonu 6 a výsledný produkt má potom variabilní délku (obr. 1) [29,39,40].



**Obr. 1:** Schematické zobrazení různých zlomových míst genu *PML* a výsledných fúzních produktů *PML/RARα* [29].

Při včasné diagnostice a zahájení specifické léčby induktory diferenciacce (ATRA, arsenik) a chemoterapií je APL v současné době nejpříznivějším typem AML s vysokou pravděpodobností dlouhodobého přežití. CR dosahuje 70-90 % pacientů, menší šance na docílení CR je u pacientů s vyšším počtem leukocytů v době diagnózy [11,41-43]. K relapsu onemocnění dochází u 5-30 % případů [40,41,43]. Důležitou úlohu v predikci relapsů a ve vymezení pacientů s větší pravděpodobností relapsu onemocnění hraje sledování MRO pomocí real-time PCR v průběhu léčby i po jejím ukončení [44-46]. Grimwade a Lo Coco pozorovali signifikantně vyšší riziko relapsu onemocnění u pacientů s pozitivním nálezem fúzního transkriptu po třetí konsolidační kúře [44]. Dlouhodobé celkové přežití pacientů s APL se pohybuje mezi 60-80 % [10,11,41,47].

### 3.3.1.1 Mutace genu *FLT3* u APL

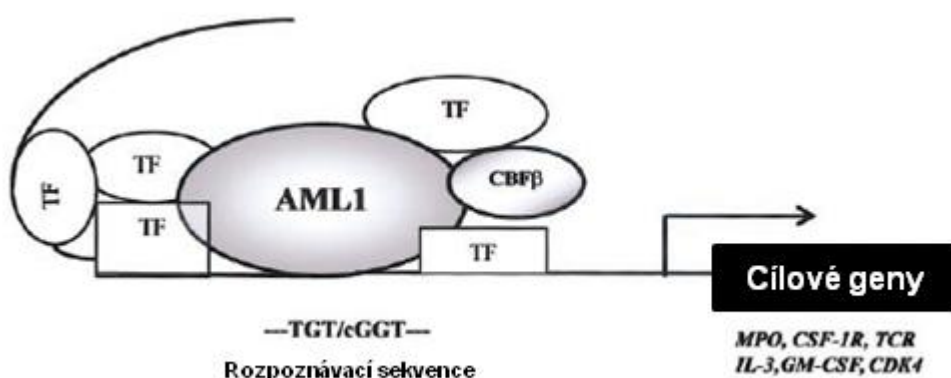
Interní tandemové duplikace a bodové mutace v tyrozinkinázové doméně 1 genu *FLT3* (*FLT3/TKD*; podrobněji viz kap. 3.4.1) jsou nejčastějšími sekundárními molekulárními aberacemi u pacientů s APL. *FLT3/ITD* se nachází u 20-35 % případů, častější jsou u pacientů s subtypem M3v a u nemocných se zlomem bcr3 [41,48,49]. Incidence *FLT3/TKD* mutací je nižší, jsou detekovány jen u 9-20 % APL. Přítomnost těchto aberací je nezávislá na věku a pohlaví pacientů. Oba typy mutací vedou k vyššímu počtu leukocytů a nižšímu počtu trombocytů v době diagnózy [41,48-50]. Gale *et al.* [48] udávají vyšší riziko úmrtí během indukční terapie a nižší šanci na dosažení CR u pacientů s *FLT3* mutací, patrně v důsledku vyššího počtu leukocytů. Ostatní autoři nepozorovali významný vliv těchto aberací na pravděpodobnost docílení CR [41,49,50]. *FLT3/ITD* ani *FLT3/TKD* nemají žádný vliv

na výskyt relapsů onemocnění, délku doby přežití bez relapsu (RFS) ani na OS pacientů s APL [41,48,49,51].

### 3.3.2 CBF-AML

Přítomnost t(8;21) s průkazem fúzního genu *AML1/ETO* (dle WHO 2008 nazývaného *RUNX1/RUNX1T1*) nebo inv(16) či t(16;16) s fúzí *CBFβ/MYH11* je spojena s příznivou prognózou onemocnění. Ta se však i v rámci této skupiny může lišit jednak v závislosti na typu translokace, ale zejména v důsledku přítomnosti sekundárních molekulárních aberací (*C-KIT* mutací, *FLT3/ITD*, *FLT3/TKD* a *K-RAS* mutací).

CBF je heterodimerický transkripční komplex složený z podjednotek  $\alpha$  a  $\beta$ , který je nepostradatelný pro normální hematopoézu. Tři geny kódují podjednotku  $\alpha$ : *AML1* (také nazývaný *CBF $\alpha$ 2*, *RUNX1*, *PEBP2 $\alpha$ B*), *AML2* (*CBF $\alpha$ 3*, *RUNX3*, *PEBP2 $\alpha$ C*) a *AML3* (*CBF $\alpha$ 1*, *RUNX2*, *PEBP2 $\alpha$ A*, *Osf2*),  $\beta$  podjednotka je kódována jen jedním genem: *CBFβ* (*PEBP2β*). *CBF $\alpha$*  podjednotka se váže přímo na DNA, zatímco *CBFβ* stabilizuje její vazbu k DNA bez přímého kontaktu s DNA (obr. 2). Dimerizace s *CBFβ* zároveň chrání *CBF $\alpha$*  podjednotku před degradací prostřednictvím ubikvitin-proteazomové dráhy. *CBF $\alpha$ 2* (AML) rozeznává a váže se k sekvenci TGT/cGGT, která je jako regulační element přítomna v promotorových oblastech řady specifických genů transkribovaných v hematopoetických buňkách, např. genů kódujících interleukin-3 (IL-3), granulocyto-makrofágový kolonie-stimulující faktor (GM-CSF), receptor pro kolonie-stimulující faktor 1 (CSF1/M-CSF), geny pro receptory antigenů T-buněk (TCRs) atd. (obr. 2) [52-55].



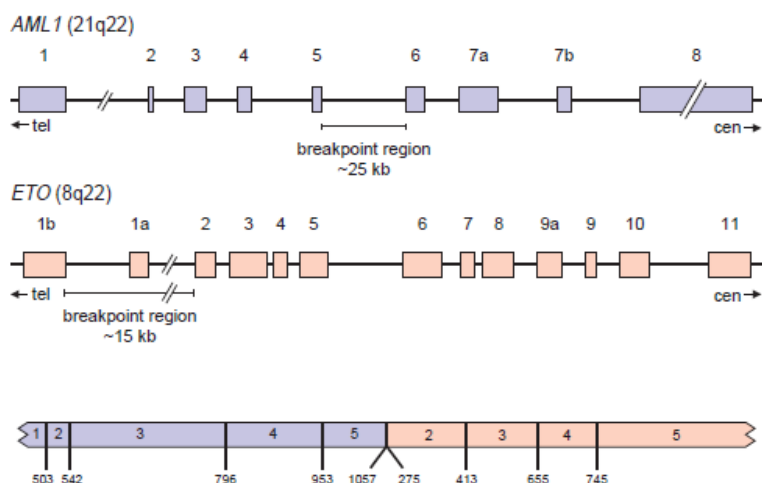
**Obr. 2:** Schematické znázornění transkripčního komplexu CBF. CBF interaguje s dalšími specifickými transkripčními faktory (TF). Vazba komplexu AML1/CBFβ k DNA vede k aktivaci transkripce cílových genů [55].

Gen *AML1* ležící v chromozomálním pruhu 21q22.12 je tvořen 9 exony a alternativním sestřihem vznikají 3 formy AML1 proteinu o délce 480, 453 a 250 aminokyselin. Dvě izoformy, AML1b a AML1c, jsou složené z RHD oblasti (runt homology domain) a C-terminální transkripčně aktivační domény. RHD je DNA-vazebnou doménou a zároveň obsahuje heterodimerizační doménu pro vazbu CBF $\beta$  podjednotky. Třetí AML1a izoforma má pouze RHD oblast, vykazuje vysokou DNA-vazebnou afinitu, ale není schopna aktivovat transkripci [52].

Gen *CBF $\beta$*  je lokalizován v chromozomálním pruhu 16q22.1 a skládá se ze 6 exonů. N-terminální část CBF $\beta$  proteinu je tvořena heterodimerizační doménou, která umožňuje vazbu k AML1 podjednotce transkripčního faktoru.

Nejčastější translokace postihující geny pro CBF transkripční komplex jsou: t(8;21)(q22;q22) a inv(16) nebo t(16;16)(p13;q22) u pacientů s AML, t(12;21)(p13;q22) u dětské B-ALL a t(3;21)(q26;q21) u MDS [56-58].

Fúzní gen *AML1/ETO* bývá detekován u 5-10 % pacientů s AML (nejčastěji u subtypu FAB M2, méně často u M1 a M4) a vzniká spojením prvních 5 exonů genu *AML1* s téměř celým (575 z 604 aminokyselin) genem *ETO* (obr. 3). Gen *ETO* (*RUNX1T1*, *MTG8*, *CDR*) leží v chromozomálním pruhu 8q21.3, je tvořen 12 exony a je exprimován zejména v mozkových buňkách a kóduje jaderný fosfoprotein působící jako transkripční regulátor [52,59]. Protein AML1/ETO má vyšší afinitu k vazebným místům DNA než normální AML1 protein, čímž potlačuje jeho transkripční aktivitu a inhibuje diferenciaci buněk [60].

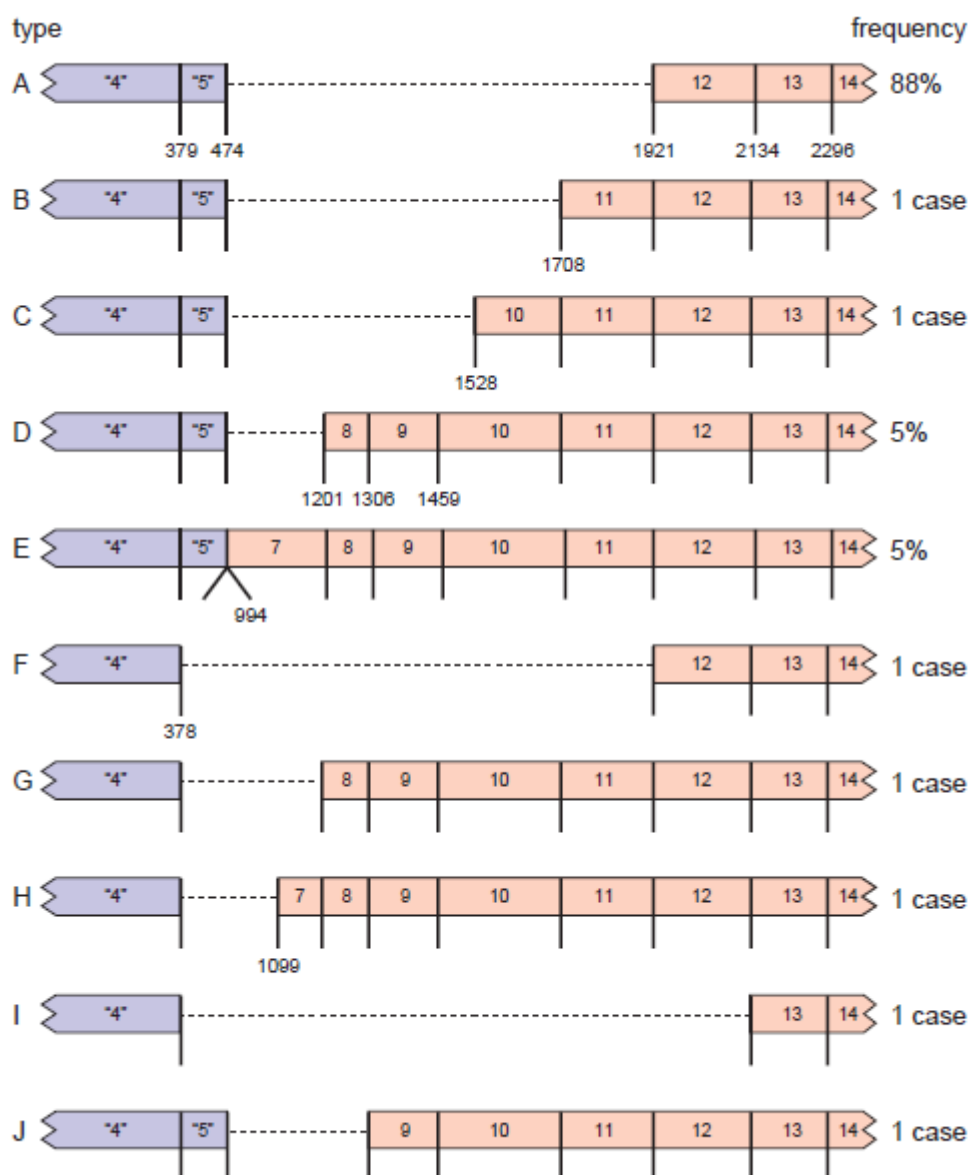


**Obr. 3:** Grafické znázornění exon/intronové struktury genů *AML1* a *ETO* a fúzního transkriptu *AML1/ETO* [61].

Fúze *CBF $\beta$ /MYH11* se vyskytuje u 5-8 % pacientů s AML, nejčastěji u subtypu FAB M4Eo, zřídka u M2 a M1. Fúzní gen *CBF $\beta$ /MYH11* je obvykle (85-90 % případů) tvořen spojením prvních

5 exonů genu *CBFβ* s exony 12-41 genu *MYH11*. Zbýlých 10-15 % fúzí vzniká méně častými zlomy v jiných částech obou genů (obr. 4).

Gen *MYH11* (*SMMHC*) leží na chromozomu 16p13.11, tvoří ho 41 exonů a kóduje myozinové těžké řetězce hladkého svalu. Protein MYH11 je podjednotkou hexamerického proteinu složeného ze dvou těžkých řetězců a dvou párů neidentických lehkých řetězců. MYH11 má  $\alpha$ -helikální strukturu, přičemž jedna strana  $\alpha$ -helixu je hydrofobní a umožňuje dimerizaci, druhá strana je hydrofilní a zprostředkovává tvorbu multimerů. Fúzní protein CBF $\beta$ /MYH11 blokuje vazbu normálního CBF na DNA tvorbou multimerů, které izolují CBF $\alpha$  podjednotku v nefunkčním komplexu [52].



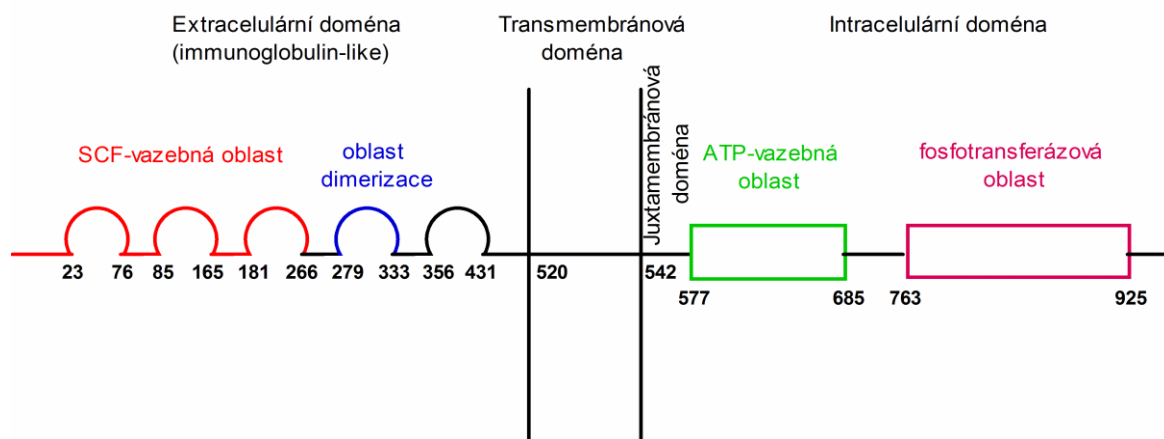
**Obr. 4:** Schematické znázornění fúzního genu *CBFβ/MYH11* a 10 známých typů zlomových míst. Fúzní transkripty A, D a E tvoří přibližně 98 % případů *CBFβ/MYH11* [61].



Prognóza onemocnění je u pacientů s CBF-AML příznivější než u ostatních AML a je ovlivněna jednak věkem pacientů, ale do určité míry i typem fúzního genu a zejména přítomností sekundárních molekulárních aberací. CR dosahuje 85-95 % pacientů s fúzním genem *AML1/ETO* a 80-90 % s *CBFβ/MYH11*, nižší šance na docílení CR je u pacientů starších než 60 let [10,59,62,63]. Incidence relapsů se pohybuje v rozmezí 25-45 % a OS po 10 letech od diagnózy se pohybuje mezi 55 a 65 % [11,62]. Zásadní roli v predikci relapsů u těchto pacientů hraje monitorování MRO v průběhu léčby i po jejím ukončení. Pokles fúzního transkriptu ve vzorcích kostní dřeně pacientů po konsolidační terapii o 4 řády výrazně snižuje pravděpodobnost relapsu onemocnění a prodlužuje RFS i OS [64,65]. Nižší pokles MRO bývá často spojený s přítomností sekundárních mutací genu *C-KIT* [65]. MRO je možné sledovat ve vzorcích kostní dřeně, periferní krve, popřípadě i v izolovaných CD34<sup>+</sup> buňkách. Sensitivita vyšetření bývá vyšší v CD34<sup>+</sup> buňkách a v kostní dřeni ve srovnání se vzorky periferní krve. Naopak, výhoda vzorků periferní krve spočívá v menší zátěži pacienta při odběrech, což umožňuje kratší intervaly monitorace [21,66-69]. Objeví-li se pozitivita exprese fúzního genu po předchozím dosažení molekulární negativity, nebo dojde-li k nárůstu exprese fúzního transkriptu o 1 řád u pacientů, kteří nedosáhli molekulární remise, je možné včasnou terapií předejít hematologickému relapsu onemocnění. Doba mezi molekulárním a hematologickým relapsem se pohybuje od dvou týdnů až do 3 měsíců, kratší je u fúzního genu *AML1/ETO* [21,70,71].

### 3.3.2.1 Mutace genu *C-KIT* u CBF-AML

Protoonkogen *C-KIT* (*SCFR*) kóduje receptor pro stem cell faktor (SCF) a patří do 3. třídy receptorových tyrozinkináz. Tyrozinkinázy této třídy jsou charakteristické přítomností 5 imunoglobulinu-podobných domén v extracelulární části, jednou transmembránovou doménou, juxtamembránovou doménou a intracelulární tyrozinkinázovou doménou, která je rozdělena kinázovým inzertem na ATP-vazebnou a fosfotransferázovou oblast (obr. 5) [72].



**Obr. 5:** Schematické znázornění receptorové tyrozinkinázy *C-KIT* (podle Boissana *et al.* [73])

Gen *C-KIT* je lokalizován na chromozomovém pruhu 4q12, je tvořen 21 exony a kóduje transmembránový protein o délce 976 aminokyselin. Protein C-KIT je exprimován na povrchu mnoha typů buněk: mastocytů, melanocytů a kmenových buněk bílé i červené krevní řady. Po vazbě ligandu (SCF) receptor dimerizuje, fosforyluje se a aktivuje signální dráhy, které hrají zásadní roli v proliferaci, diferenciaci a přežití hematopoetických kmenových buněk [72,73]. Ligand-independentní aktivace C-KITu může být způsobena aktivačními (gain-of-function) mutacemi, které byly popsány u pacientů s různými hematologickými onemocněními [73,74]. U nemocných s CBF-AML se vyskytují zejména bodové mutace (nejčastěji v exonech 17 a 18, až 85 % mutací v pozici Asp816), krátké in-frame delece a inserce (obvykle v exonu 8, v 90 % případů postihují kodon Asp419) a méně často interní tandemové duplikace (v exonech 10 a 11). Mutace v exonu 8 jsou silně asociovány s přítomností fúzního genu *CBFβ/MYH11*, nacházíme je u 15-40 % těchto pacientů, výjimečně u nemocných s fúzí *AML1/ETO* (2-4 %) a téměř nikdy se nevyskytují u ostatních typů AML [72,75]. Někteří autoři uvádějí, že přítomnost mutace v exonu 8 zvyšuje pravděpodobnost relapsu onemocnění u pacientů s fúzním genem *CBFβ/MYH11* [75,76], ostatní neprokázali žádný prognostický dopad těchto mutací [77,78]. Bodové mutace v kodonu Asp816 byly poprvé popsány u pacientů se systémovou mastocytózou [79]. U AML bývá nejčastěji detekována mutace Asp816Val (85 % případů), Asp816Tyr (8 %) a Asp816His (4 %), jen zřídka Asp816Ile a Asp816Phe [80]. Mutace v kodonu Asp816 se vyskytují u 10-18 % nemocných s fúzním genem *AML1/ETO* a u 7-16 % *CBFβ/MYH11* pozitivních pacientů. Některé další bodové mutace v exonu 17 (Asn822Lys, Tyr823Asp, Val825Ile, Ala814Ser) byly popsány u jednotlivých pacientů [75,76,81-83]. U nemocných s fúzí *AML1/ETO* bývá přítomnost bodové mutace v pozici Asp816 spojena se zvýšeným počtem leukocytů v době diagnózy, zvýšeným rizikem relapsu onemocnění, kratším OS a vyšším výskytem extramedulární leukemie [67,75,77,78,84]. Allen *et al.* uvádějí výrazně horší prognózu onemocnění u pacientů s vysokým poměrným zastoupením mutované alely *C-KIT* genu bez ohledu na typ fúzního genu [85].

### 3.3.2.2 Mutace genu *K-RAS* u CBF-AML

Ras rodina protoonkogenů zahrnuje 3 funkční geny: *K-RAS*, *N-RAS* a *H-RAS*, které kódují příbuzné, vysoce homologní proteiny lokalizované na vnitřní straně plazmatické membrány. Tyto proteiny se podílejí na přenosu extracelulárních signálů indukovaných růstovými faktory nebo faktory zapojenými v procesu buněčné diferenciace do cytoplazmy [86]. Proteiny savčí podrodiny RAS jsou vysoce evolučně konzervované a hrají zásadní roli v mnoha buněčných procesech, včetně proliferace, diferenciace a buněčné smrti [87]. RAS proteiny jsou charakteristické GTPázovou aktivitou, v neaktivní formě váží GDP a interagují s neaktivovaným receptorem. Vazbou signální molekuly dochází k aktivaci receptoru, která vede ke konformačním změnám proteinu a výměně GDP za GTP,

čímž je protein aktivován, předává signál dál do buňky a po té dochází k jeho inaktivaci [88]. V důsledku některých mutací dochází k permanentní aktivaci RAS proteinu, a tedy k neustálé stimulaci růstu a proliferace nezávisle na vlivu extracelulárních signálů. Tyto mutace se vyskytují až u 90 % pacientů s adenokarcinomem pankreatu, u 50 % pacientů s kolorektálním karcinomem, u 30 % nemocných s karcinomem plic a až u 30 % AML. U pacientů s CBF-AML se podíl pacientů s RAS mutacemi pohybuje okolo 27 % a je vyšší u nemocných s fúzním genem *CBFβ/MYH11*. U nemocných s AML se mutace nejčastěji vyskytují v genech *N-RAS* a *K-RAS*, zatímco gen *H-RAS* bývá u AML mutovaný jen zřídka [65,85,89]. Přibližně 85 % těchto mutací se u všech tří genů nachází v kodonech Gly12 a Gly13, zbývající mutace nejčastěji v kodonu Gln61 [86]. Někteří autoři pozorovali u AML s RAS mutací nižší procento blastů v kostní dřeni v době diagnózy [90,91], jiní nezjistili žádný vliv RAS mutací na prognózu onemocnění [78,92]. Allen *et al.* [85] uvádějí nižší počet CR u pacientů s vysokým procentuálním zastoupením mutované alely RAS oproti pacientům bez mutace nebo s nižším zastoupením mutace, ale žádný vliv mutací na riziko relapsu a OS [85].

### 3.3.2.3 Mutace genu *FLT3* u CBF-AML

*FLT3/ITD* se u CBF-AML vyskytují méně často než u ostatních typů AML. Bývají detekovány častěji u pacientů s fúzním genem *AML1/ETO* než u *CBFβ/MYH11* a celková incidence se pohybuje okolo 5 % [76,81,92]. Podobně jako u AML se střední cytogenetickou prognózou, také u CBF-AML nepříznivě ovlivňují prognózu onemocnění. Podle Allena *et al.*, zejména při vyšším poměrném zastoupení mutované alely může být vyšší pravděpodobnost relapsu a kratší OS [85].

Naproti tomu mutace v tyrozinkinázové doméně genu *FLT3* (viz kap. 3.4.1) jsou u CBF-AML častější než u nemocných se středním cytogenetickým rizikem. Jejich incidence se pohybuje kolem 10 % a častěji se vyskytují u pacientů s fúzí *CBFβ/MYH11* [78,85,93]. Jejich vliv na prognózu onemocnění není zcela zřejmý, Allen *et al.* pozorovali nesignifikantně lepší OS u pacientů s vyšším zastoupením mutované alely [85].

V roce 2013 popsali Opatz *et al.* novou mutaci genu *FLT3* Asn676Lys u 6 % pacientů s fúzním genem *AML1/ETO* a u 3 % *CBFβ/MYH11*. Pacienti s touto mutací měli vyšší počet leukocytů v době diagnózy a hůře dosahovali CR, než pacienti bez mutace [94].

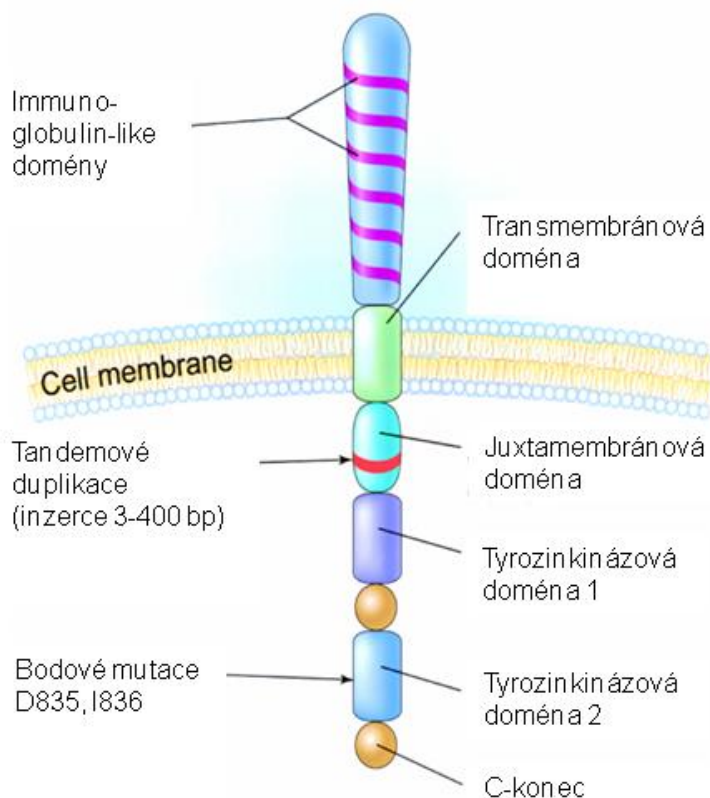
## 3.4 AML SE STŘEDNÍ CYTOGENETICKOU PROGNÓZOU

Nejpočetnější prognostická skupina zahrnuje přibližně 60 % případů s nově diagnostikovanou AML. Tito pacienti nevykazují žádnou cytogenetickou abnormalitu, která by je řadila do skupiny s dobrou, respektive špatnou cytogenetickou prognózou. Největší podskupinu tvoří pacienti

s normálním karyotypem, kterých je přibližně 40 % [11]. Průběh onemocnění a jeho prognóza v rámci této skupiny závisí i na přítomnosti různých molekulárně genetických aberací (*FLT3/ITD*, *FLT3/TKD*, mutací genů *NPM1*, *CEBPA*, *DNMT3A* a dalších) detekovatelných pomocí metod molekulární biologie.

### 3.4.1 MUTACE GENU *FLT3*

FMS-like tyrosine kinase 3 (*FLT3*) patří do třetí třídy receptorových tyrozinových kináz společně s receptorem stem cell faktoru KIT, receptorem faktoru stimulujícího kolonie CSF1R a růstovými faktory produkovanými destičkami PDGFR $\alpha$  a PDGFR $\beta$ . *FLT3* je tvořen 5 imunoglobulinu-podobnými doménami v extracelulární části, jednou transmembránovou doménou, juxtamembránovou (JM) doménou a intracelulární tyrozin kinázovou (TK) doménou, která je rozdělena na dvě části specifickým kinázovým inzertem (obr. 6) [95-98].



**Obr. 6:** Grafické znázornění receptorové tyrozin kinázy *FLT3* a míst podléhajících mutacím [98].

Lidský gen *FLT3* je lokalizován v chromozomálním pruhu 13q12, je tvořen 24 exony a kóduje transmembránový protein o délce 993 aminokyselin. Protein *FLT3* je exprimován hematopoetickými kmenovými buňkami, buňkami mozku, placenty a jater [95,99,100].

U pacientů s AML byly popsány 4 typy mutací genu *FLT3*. Nejčastější jsou ITD, které se vyskytují přibližně u 24 % pacientů s AML [101]. Nacházíme je zejména u pacientů s cytogeneticky

normálním nálezem, ale také u nemocných s APL. Tyto mutace bývají spojeny se zvýšeným počtem leukocytů a vyšším procentem blastů v kostní dřeni v době diagnózy [102]. *FLT3/ITD* zhoršuje prognózu onemocnění vzhledem k vyššímu výskytu relapsů, kratšímu RFS a zkrácenému OS [103]. Ačkoli se délka duplikované oblasti liší od 3 až do 400 bp a mutace může též obsahovat různý počet náhodně vložených nukleotidů, výsledný transkript je vždy *in-frame* [104]. Výsledky týkající se vlivu délky, počtu různých ITD a místa jejich inserce na prognózu AML se zatím různí. V zatím největší studii zahrnující 354 *FLT3/ITD* pozitivních pacientů neprokázali Gale *et al.* [105] žádný statisticky významný rozdíl v incidenci relapsů ani v délce OS v závislosti na počtu duplikovaných nukleotidů, podobně jako dříve Ponziani *et al.* [106]. Pouze mírný trend ke snazšímu dosažení CR pozorovali u pacientů s kratší duplikací [105]. Ve shodě s touto prací Meshinchi *et al.* [107] a Stirewalt *et al.* [108] udávají (u celkem 77, resp. 48 *FLT3/ITD* pozitivních pacientů) snižující se pravděpodobnost dosažení CR, kratší RFS a horší OS s prodlužující se délkou ITD [107,108]. Jiná studie (ale celkem pouze s 18 *FLT3/ITD* pozitivními pacienty) tvrdí opak: delší OS u skupiny pacientů s delší ITD [109]. Zatím nejnovější práce ukazuje nejkratší RFS i OS u pacientů se střední délkou ITD (48-60 bp), zatímco prognóza u nemocných s duplikací kratší než 48 nebo delší než 60 bp je signifikantně lepší [110]. Také počet různých ITD u jednotlivých pacientů se může lišit: od jedné (nejčastěji) až ke čtyřem různým ITD [104,111]. Kottaridis *et al.* ve své práci udávají kratší OS u pacientů s více než jednou ITD [111], zatímco další skupiny neprokázaly žádný dopad různého počtu duplikací na průběh onemocnění [105,107].

*FLT3/TKD*, zejména v pozicích Asp835 a Ile836, jsou popisovány přibližně u 7 % případů AML [112]. Závažnost jejich vlivu na průběh a prognózu onemocnění je méně zřejmá než u *FLT3/ITD*, což může být částečně dáno jejich relativně nižším výskytem. Některé práce ukazují horší prognózu u nemocných s mutací [113-115], další naopak udávají příznivější průběh onemocnění u mutovaných pacientů [93] nebo vůbec žádný dopad přítomnosti mutace na vývoj AML [116,117].

ITD lokalizované v TK1 doméně tvoří 28,7 % ze všechdetekovaných *FLT3/ITD* [118]. Podle Kaysera *et al.* [119] působí ITD integrované mimo JM doménu jako nepříznivý prognostický faktor způsobující nižší šanci na dosažení CR a kratší RFS i OS [119]. Naproti tomu v novější práci Blau *et al.* [120] nezjistili výrazný vliv integračního místa ITD na prognózu onemocnění.

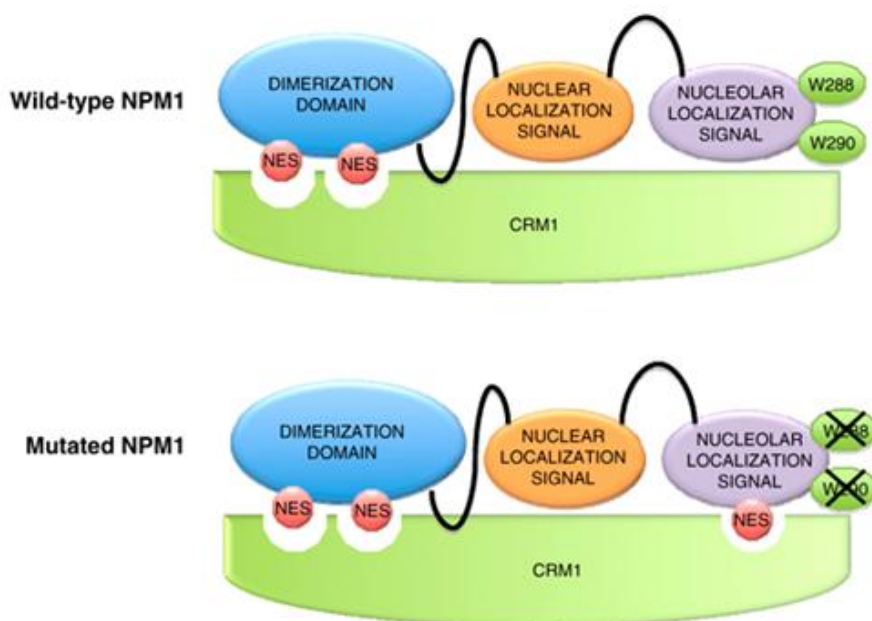
Posledním popsáním typem mutací genu *FLT3*, jsou čtyři různé bodové mutace v JM doméně, zachycené u 2 % pacientů s AML [121,122]. Vzhledem k nízkému počtu pacientů nesoucích tyto mutace zůstává jejich možný dopad na průběh onemocnění zatím nejasný.

Využití mutací genu *FLT3* pro sledování MRO během léčby a pro predikci možného relapsu je dosti diskutabilní, vzhledem k jejich potenciaální nestabilitě v průběhu onemocnění. Přibližně u 10-20 % pacientů s pozitivním záchytem *FLT3/ITD* nebo *FLT3/TKD* mutací při diagnóze nacházíme v době relapsu onemocnění úplně jinou ITD (s jiným inserčním místem i odlišnou délkou)

nebo TKD mutaci [123-126], což limituje využití senzitivnějších technik pro sledování MRO založených na použití mutačně specifických primerů. Navíc dalších 20 % původně pozitivních pacientů ztrácí tuto aberaci v době relapsu úplně, takže ani v případě negativního nálezu MRO nelze opětovnou přítomnost onemocnění zcela vyloučit. Klinicky významným je tedy pouze pozitivní průkaz *FLT3/ITD* (příp. TKD), který značí molekulární či hematologický relaps onemocnění [123,127].

### 3.4.2 MUTACE GENU *NPM1*

*NPM1* je multifunkční fosfoprotein lokalizovaný převážně v buněčném jádře, jeho hlavní funkce spočívá v transportu ribozomálních proteinů přes jadernou membránu [128]. Dále se vazbou na tumor supresorový protein p53 podílí na regulaci jeho stability a transkripční aktivity, reguluje duplikaci centrozomů a ovlivňuje i funkci ribozomů [129,130]. Transportní funkce je umožněna třemi funkčními motivy: dimerizační doménou v N-terminální oblasti, nesoucí dva na leucin bohaté jaderné exportní signály (NES), jaderným lokalizačním signálem složeným ze dvou částí (NLS) a C-terminální oblastí obsahující dva tryptofanové zbytky v pozicích 288 a 290 (obr. 7) [131].



**Obr. 7:** Struktura *NPM1* proteinu a vliv somatických mutací na jeho funkci [131]. NES - jaderný exportní signál, CRM1 - evolučně konzervovaný exportní receptor.

Gen *NPM1* je lokalizován v chromozomálním pruhu 5q35.1, skládá se ze 12 exonů a kóduje protein o délce 294 aminokyselin. Dosud bylo popsáno 17 různých typů mutací (obvykle čtyřnukleotidových inzercí buď mezi nukleotidy 960-961, nebo 964-965) *NPM1* genu u pacientů

s AML, nejčastější typ A (inzerce TCTG mezi nukleotidy 960 a 961) se nachází přibližně u 75 % pacientů nesoucích mutaci, 10 % pacientů má mutaci typu D (inzerce CCTG ve stejné pozici) a 6 % typ B (inzerce CATG, také mezi nukleotidy 960 a 961). Ostatní mutace se vyskytují jen velmi zřídka [132]. Většina mutací vzniká delecí nebo inzerací 4 párů bází v exonu 12 v C-terminální oblasti proteinu vedoucí ke ztrátě obou tryptofanových zbytků nebo pouze tryptofanu v pozici 290, čímž vzniká nová exportní signální sekvence. V důsledku toho dochází k aberantní lokalizaci NPM1 proteinu v cytoplazmě leukemických buněk [131,133].

Mutace *NPM1* genu jsou detekovány u 35 % pacientů s AML [131] a až u 50 % pacientů s AML s normálním cytogenetickým nálezem [130,132]. Často se vyskytují u pacientů se střední cytogenetickou prognózou společně s *FLT3/ITD*, *DNMT3A*, *IDH1* a *IDH2* mutacemi, pouze zřídka s mutacemi jiných genů. Pacienti s mutovaným *NPM1* genem snáze dosahují kompletní remise onemocnění [132,134]. V kombinaci s negativitou *FLT3/ITD* dosahují pacienti s *NPM1* mutací signifikantně delšího RFS i OS, což je řadí na úroveň pacientů s CBF-AML, tj. mezi AML s dobrou prognózou dle klasifikace ELN [12]. Naproti tomu přítomnost obou těchto molekulárních aberací znamená pro pacienty výrazné zhoršení prognózy [130,132,134,135].

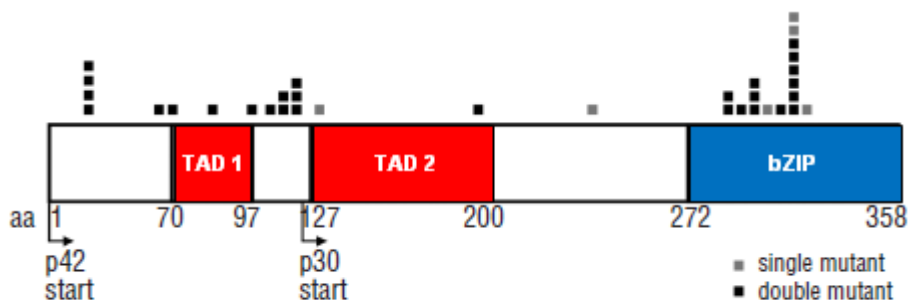
Mutace *NPM1* genu jsou vhodným markerem ke sledování MRO, jednak proto, že jsou v průběhu onemocnění stabilnější než *FLT3/ITD* (jen okolo 10 % pacientů ztrácí mutaci při relapsu onemocnění, zbytek pacientů nese v době relapsu stejný typ *NPM1* mutace) [136-138] a za druhé proto, že 3 nejčastější typy mutací (A, B a D) nacházíme u 95 % pacientů s mutací, proto víceméně odpadá nutnost navrhovat individuální specifické primery a sondy pro jednotlivé pacienty.

### **3.4.3 MUTACE GENU CEBPA**

CEBPA protein je transkripční faktor typu leucinového zipu, zodpovědný za tkáňově specifickou regulaci genové exprese, proliferaci a v případě krvetvorných buněk za myelopoézu. Je tvořen vysoce konzervovanou C-terminální DNA-vazebnou a dimerizační doménou a dvěma méně konzervovanými N-terminálními transaktivačními doménami (obr. 8) [139-141].

Gen *CEBPA* je lokalizován v chromozomálním pruhu 19q13.1 a je tvořen pouze jedním exonem, který kóduje protein o délce 358 aminokyselin. Mutace *CEBPA* genu jsou popisovány u 7-15 % případů AML, jejich výskyt je vyšší u onemocnění se střední prognózou podle cytogenetiky, naopak se téměř nevyskytují u pacientů s dobrou cytogenetickou prognózou [139,141-144]. Mutace se nacházejí v průběhu celého genu, ale koncentrují se do dvou hlavních oblastí. V N-terminální oblasti se jedná o inzerce nebo delece (způsobující změnu čtecího rámce) mezi hlavním iniciačním kodonem a následujícím ATG kodonem. Tyto mutace vedou k vytvoření předčasného stop kodonu a tím ke vzniku kratší p30 izofomy proteinu, který dominantně negativním mechanismem inhibuje funkci

proteinu s normální délkou (p42). Mutace v C-terminální oblasti jsou obvykle *in-frame* delece/inzerce v DNA-vazebné nebo dimerizační doméně bránící vazbě DNA, případně dimerizaci (obr. 8) [139].



**Obr. 8:** Schematické znázornění *CEBPA* genu s místy výskytu mutací (černé čtverečky). TAD 1 - transkripční doména 1, TAD 2 - transkripční doména 2, bZIP - DNA vazebná a dimerizační doména [145].

Pacienti mohou mít pouze jednu *CEBPA* mutaci (45-50 % pacientů), tito pacienti tvoří i protein s normální délkou (produkt druhé, nemutované alely), jeho funkce je ale inhibována kratším aberantním proteinem. Druhá skupina pacientů nese dvě mutace, jednu v N-terminální oblasti a druhou v C-terminální oblasti. Tyto mutace jsou obvykle bialelické, proto tito pacienti neexprimují žádný *CEBPA* protein normální délky. Výjimečně jsou diagnostikováni pacienti s homozygotní *CEBPA* mutací následkem ztráty heterozygoty [139].

Pacienti s bialelickou mutací mají současně častěji mutovaný gen *NPM1*, naopak méně často se u nich vyskytuje *FLT3/ITD* v porovnání s nemocnými s pouze jednou nebo žádnou *CEBPA* mutací [142,144]. Podle některých autorů nemá přítomnost *CEBPA* mutace vliv na dosažení CR [142], naproti tomu jiní udávají nižší šanci na dosažení CR u pacientů s jednou nebo žádnou mutací [143,144]. Nemocní s bialelickou mutací dosahují delšího OS i RFS a zároveň u nich méně často dochází k relapsům onemocnění v porovnání s pacienty s pouze jednou *CEBPA* mutací i s pacienty bez mutace [139,142-144]. Prognóza onemocnění u pacientů s bialelickou mutací je podobná jako u nemocných s mutací genu *NPM1* a zároveň *FLT3/ITD* negativních [146]. Klasifikace ELN je tedy řadí k AML s příznivou prognózou [12].

### 3.4.4 MUTACE GENU *DNMT3A*

Geny *DNMT1*, *DNMT3A* a *DNMT3B* kódují DNA metyltransferázy, enzymy katalyzující přeměnu cytozinu na 5-metylcytozin. DNMT1 jsou zodpovědné za udržování úplné metylace DNA v průběhu buněčného dělení. Naproti tomu DNMT3A a DNMT3B jsou považovány za hlavní *de novo* metyltransferázy, které vytvářejí hemimetylované CpG dinukleotidy v dvojvláknové DNA, čímž udávají základní předlohu metylace DNA (obr. 9A) [147]. Úroveň metylace DNA je jedním ze zásadních regulačních mechanismů genové transkripce, geny hypermetylované v promotorové oblasti





karyotyp, *FLT3/ITD* a mutace genů *NPM1*, *IDH1* a *IDH2*, naopak velmi zřídka se tato mutace vyskytuje u pacientů s příznivými cytogenetickými aberacemi [149,153,154]. Nemocní s mutací *DNMT3A* mívají vyšší počet leukocytů a destiček v době diagnózy a vyšší procento blastů v kostní dřeni. Přítomnost mutace neovlivňuje šanci pacientů na dosažení CR, ale výrazně zkracuje RFS i OS pacientů [154-157].

Využití *DNMT3A* mutací pro sledování MRO zatím není dostatečně prostudováno, Hou *et al.* ve své práci uvádějí, že 29 pacientů ze 34 ztratilo původní mutaci při dosažení CR. U 12 ze 13 pacientů, u kterých došlo k relapsu onemocnění, byla detekována stejná mutace jako v době záchytu onemocnění [157]. Wakita *et al.* udávají přítomnost shodné mutace v době diagnózy a při relapsu onemocnění u 7 ze 7 sledovaných pacientů [158].

### 3.4.5 MUTACE GENU *ASXL1*

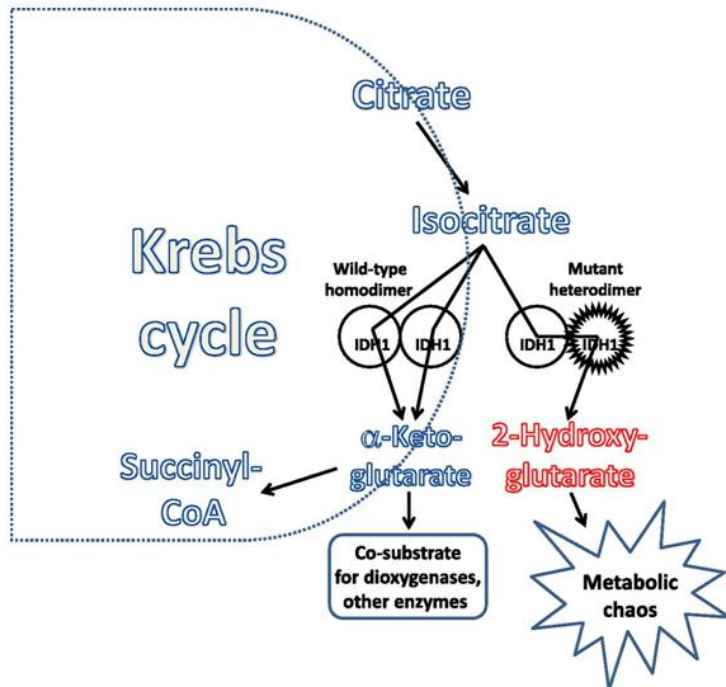
*ASXL1* je vysoce konzervovaný, v jádře lokalizovaný protein, patřící do rodiny ETP (enhancer of trithorax and polycomb) proteinů působících jako epigenetické regulátory genové transkripce prostřednictvím změn ve struktuře chromatinu [159]. PcG (polycomb group) proteiny asociují s histondeacetylázami, čímž umlčují expresi genů, naproti tomu trxG (trithorax group) proteiny asociují s histon acetylázami a fungují jako zesilovače transkripce. Protein *ASXL1* se skládá ze dvou domén: N-terminální ASX domény a C-terminální PHD (plain homeodomain zinc finger region) domény [160].

Gen *ASXL1*, lokalizovaný v chromozomálním pruhu 20q11.21, je tvořen 12 exony a kóduje protein o délce 1541 aminokyselin. Mutace v exonu 12 tohoto genu byly popsány u 10 % případů MDS [161], 10 % pacientů s esenciální trombocytemií a primární myelofibrózou [162] a u 10-30 % pacientů s AML. Častěji se vyskytují u nemocných s AML s aberantním cytogenetickým nálezem (ve srovnání s AML s normálním karyotypem). Mutace *ASXL1* se proto pouze zřídka nacházejí u pacientů s mutacemi *NPM1*, *DNMT3A*, *FLT3/TKD* a *FLT3/ITD*, které jsou charakteristické pro onemocnění s normálním cytogenetickým nálezem. Většina (až 80 %) popsaných mutací jsou frameshift mutace (nejčastěji inserce G v pozici 646), méně je nonsense mutací a jen výjimečně jde o missense mutace. Mutace *ASXL1* byly častěji zachyceny u starších pacientů (>60 let) a u mužů [163-166]. *ASXL1* pozitivní pacienti mají obvykle nižší počet leukocytů v době záchytu onemocnění [163,165,166], naproti tomu Chou *et al.* [164] nezjistili žádný vliv přítomnosti mutace na počet leukocytů. Všichni autoři shodně uvádějí negativní vliv mutací *ASXL1* na dosažení CR a délku OS, Metzeler *et al.* [165] a Schnittgerová *et al.* [163] zjistili zároveň i kratší RFS u pacientů s mutací. Jiní autoři [164,166] nepozorovali žádný vliv mutací na RFS a incidenci relapsů onemocnění.

Použitelnost *ASXL1* mutací pro sledování MRO byla dosud testována pouze na malém počtu pacientů v práci Schnittgerové *et al.* [163], kde autoři udávají znovuobjevení mutace u všech 16 sledovaných pacientů s relapsem onemocnění.

### 3.4.6 MUTACE GENŮ *IDH1* A *IDH2*

Geny izocitrátdehydrogenáz *IDH1* (v chromozomálním pruhu 2q33.3) a *IDH2* (15q26.1) kódují enzymy katalyzující oxidativní dekarboxylaci izocitrátu na  $\alpha$ -ketoglutarát v průběhu citrátového cyklu (obr. 10). *IDH1* je lokalizován v cytoplazmě a peroxizomech, *IDH2* v mitochondriích. Oba enzymy využívají nikotinamid adenin dinukleotid fosfát (NADP) jako kofaktor pro tvorbu NADPH, který má důležitou roli při ochraně buňky před oxidativním stresem [167,168]. Obvykle heterozygotní mutace postihují nejčastěji kodony Arg132 genu *IDH1* a Arg140 a Arg172 genu *IDH2* v aktivním místě enzymu, čímž znemožňují vazbu kofaktoru NADP. Tím je jednak výrazně omezena jeho normální katalytická funkce, a navíc enzym získává novou funkci, která mu umožňuje měnit  $\alpha$ -ketoglutarát na 2-hydroxyglutarát. Tím je narušena energetická rovnováha buňky a její metabolické funkce. Toto je nejvýraznější právě v případě heterozygotních mutací, kdy divoká forma enzymu produkuje  $\alpha$ -ketoglutarát, který je mutovaným enzymem konvertován na 2-hydroxyglutarát (obr. 10) [169,170].



**Obr. 10:** Vliv mutací genů *IDH1,2* na funkci IDH enzymů v průběhu Krebsova cyklu. Mutované IDH enzymy konvertují  $\alpha$ -ketoglutarát na 2-hydroxyglutarát.  $\alpha$ -ketoglutarát slouží jako substrát nezbytný pro mnoho metabolických funkcí. Na jeho dostatečné produkci je závislá normální funkce různých dioxygenáz včetně TET2 a histondemetyláz, podílejících se na epigenetické regulaci genové exprese [169].

*IDH* mutace byly prvně popsány u pacientů s gliomy a nacházíme je i u 15-20 % nemocných s AML, zejména u pacientů se středním cytogenetickým rizikem, u kterých se vyskytují až u 30 % případů. Pouze výjimečně jsou tyto mutace detekovány u pacientů s příznivou cytogenetickou aberací [167,171-173]. U pacientů s normálním cytogenetickým nálezem jsou *IDH* mutace často spojeny s přítomností mutace *NPM1* a *DNMT3A*, naopak téměř nikdy se nevyskytují společně s mutací *CEBPA* genu. Nemocní s mutací *IDH* genu mají v době diagnózy vyšší počet leukocytů, trombocytů a vyšší procento blastů v kostní dřeni [167,172,174]. Prognostický dopad *IDH* mutací podle dosud publikovaných studií do určité míry závisí jednak na přítomnosti dalších molekulárních aberací, zejména *NPM1* mutací a *FLT3/ITD*, jednak na typu mutace. Mutace genu *IDH1* neměla vliv na dosažení CR v žádné publikované práci [167,173-175], menší šanci na dosažení CR u pacientů s *IDH2* mutací prokázali Boissel *et al.* [172] a u *IDH2* Asp172 také Green *et al.* [176] a Marcucci *et al.* [173]. Nepříznivý vliv mutací *IDH1* a *IDH2* na incidenci relapsů a OS byl prokázán u skupiny pacientů, kteří měli zároveň mutaci genu *NPM1* v kombinaci s negativitou *FLT3/ITD* [167,172,175]. Kratší OS a vyšší výskyt relapsů u nemocných s normálním cytogenetickým nálezem a mutací *IDH2* uvádějí Boissel *et al.* [172] a pouze u pacientů s *IDH2* Asp140 mutací také Green *et al.* [176].

Podobně jako mutace u ostatních genů zapojených v epigenetické regulaci genové exprese (*DNMT3A*, *ASXL1*, *TET2*) by i *IDH1* a *IDH2* mutace mohly být vhodným cílem pro monitorování MRO, ačkoliv se zatím příliš nevyužívají a jejich použitelnost nebyla dosud testována na větším souboru pacientů. V jediné publikované práci byla u 4 ze 4 pacientů s mutací *IDH1/2* v době diagnózy tato mutace prokázána i při relapsu onemocnění [158].

### 3.4.7 ABERACE GENU *MLL*

Protein *MLL* je v jádře lokalizovaný transkripční regulační faktor, který hraje zásadní roli v regulaci genové exprese v průběhu raného vývoje a hematopoézy. Jeho N-terminální konec je tvořen DNA vazebnou doménou s motivem 3 AT háčků umožňujících vazbu do malého žlábků dvojšroubovice DNA, dvěma jadernými lokalizačními signály a metyltransferázovou doménou. Prostřední část tvoří 4 PHD (plant homeodomain) domény, bromodoména a transaktivační doména, která váže histonacetyltransferázu nezbytnou pro aktivaci *MLL* cílových genů. C-terminální konec tvoří SET (Su(var)3-9, Enhancer of zeste, Trithorax protein D. melanogaster) doména zodpovědná za histonmethyltransferázovou aktivitu [177,178].

Gen *MLL* (*KMT2A*, *ALL1*, *HRX*, *TRX1*) je lokalizován v chromozomálním pruhu 11q23.3, je tvořen 37 exony a kóduje protein o délce 3969 aminokyselin. U AML jsou popsány 2 typy abnormalit *MLL* genu. Nejčastější jsou balancované translokace vznikající fúzí části *MLL* genu kódující N-terminální konec *MLL* proteinu (ke zlomům v genu *MLL* dochází téměř výhradně v oblasti mezi exony 5 a 11) se sekvencí kódující C-terminální konec jiného proteinu. V současnosti je popsáno

téměř 100 fúzních partnerů genu *MLL* a více než 70 z nich je charakterizováno na molekulární úrovni. Translokace genu *MLL* se vyskytují až u 22 % pacientů s ALL a u 5-12 % AML, nejvyšší výskyt je v obou případech u dětských pacientů do jednoho roku. U ALL jsou nejčastějšími translokacemi  $t(4;11)(q21;q23)$  s fúzí genů *MLL/AF4* a  $t(11;19)(q23;p13)$  s fúzním genem *MLL/ENL*. Nejčastější translokace u AML jsou  $t(6;11)(q27;q23)$  vedoucí ke vzniku fúzního genu *MLL/AF6*,  $t(9;11)(p21;q23)$  dávající fúzní gen *MLL/AF9*,  $t(10;11)(p12;q23)$  s fúzním genem *MLL/AF10* a  $t(11;19)(q23;p13)$  vedoucí ke vzniku fúzních genů *MLL/ENL* nebo *MLL/ELL*. Translokace *MLL* genu (zejména  $t(9;11)$ ) se nejvíce vyskytují u AML se subtypem M5 a M4 podle FAB klasifikace, naopak nikdy se nevyskytují u pacientů s APL [179,180]. Pacienti s přestavbami *MLL* genu mají kratší RFS a vyšší riziko relapsu onemocnění v porovnání s nemocnými bez těchto translokací, nicméně prognóza onemocnění se do určité míry liší v závislosti na konkrétním fúzním partnerovi genu *MLL*. Pacienti s fúzním genem *MLL/AF9* mají vyšší šanci na docílení CR a rovněž dosahují delšího RFS i OS oproti skupině s ostatními *MLL* translokacemi. Z tohoto důvodu jsou ve většině klasifikací řazeni do skupiny AML se středním rizikem, zatímco pacienti s ostatními *MLL* přestavbami spadají do kategorie AML s vysokým rizikem [11,12,25,26,181,182].

Druhou abnormalitou *MLL* genu jsou interní parciální tandemové duplikace (*MLL/PTD*) zahrnující nejčastěji exony 2-6 nebo 2-8). *MLL/PTD* se vyskytují u 3-5 % AML, zejména u pacientů s normálním karyotypem (až 7,5 % těchto pacientů má *MLL/PTD*) a až u 90 % případů s trizomií 11 jako samostatnou chromozomální aberací. Často se vyskytují společně s *FLT3/ITD* a *FLT3/TKD* mutacemi, naopak nebyly zachyceny u pacientů s prognosticky příznivými fúzními geny *PML/RAR $\alpha$* , *AML1/ETO*, *CBF $\beta$ /MYH11*. Nemocní s *MLL/PTD* mívají kratší RFS i OS v porovnání s negativními pacienty [177,183-186].

### 3.5 AML S NEPŘÍZNIVOU CYTOGENETICKOU PROGNÓZOU

Do této prognostické skupiny patří zbývajících přibližně 20 % pacientů nesoucích některou z těchto cytogenetických abnormalit: ztráta chromozomů 5, 7 nebo 17, abnormality 3q, 5q, 7q nebo 17p, *inv(3)* nebo  $t(3;3)$ ,  $t(9;22)$ , a  $t(11q23)$  s výjimkou translokací  $t(9;11)$  a  $t(11;19)$ , které jsou zařazeny mezi AML se středním cytogenetickým rizikem, a dále pacienti s komplexním karyotypem (4 a více abnormalit; tab. 2) [11].

V této skupině jsou zahrnuti pacienti s cytogenetickými aberacemi charakteristickými pro MDS, jako jsou ztráty celých chromozomů 5 nebo 7 a delece dlouhých ramének 5 a 7 (dle koncepce Heada *et al.* [187] jsou tyto AML nazývány „MDS-related AML“). Tyto abnormality se vyskytují zejména u AML s předchozím výskytem MDS a také u starších pacientů (jejich výskyt roste exponenciálně s věkem nemocných). AML nesoucí tyto změny bývají obvykle chemorezistentní, nedostatečně odpovídají na léčbu a jsou charakteristické časnými relapsy onemocnění [187].

Další podskupinu v rámci této prognostické kategorie tvoří pacienti s komplexním karyotypem, jichž může být až cca 70 % a méně než polovina jich docílí CR. Téměř 2/3 nemocných s komplexním karyotypem mají mutace v genu *TP53*, které dále zhoršují jejich prognózu [12].

Největší šanci na docílení CR v rámci této prognostické skupiny mají pacienti s přestavbou genu *MLL* t(11q23) a zároveň mladší než 60 let (až 80 % jich dosáhne CR). Naopak méně než 20 % nemocných s inv(3)/t(3;3) a del(5q) se dostane do CR.

Hodnoty RFS a OS po 5 letech od diagnózy u nemocných s nepříznivým cytogenetickým nálezem jsou pod 10 % [188].

## 4. PACIENTI A METODY

### 4.1 PACIENTI

K analýzám byly použity vzorky kostní dřeně a/nebo periferní krve pacientů s AML diagnostikovaných a/nebo léčených v ÚHKT v letech 1991 až 2012. Celkem bylo zachyceno 762 případů AML, 392 mužů a 370 žen, medián věku pacientů v době diagnózy byl 54,5 let (rozmezí 16,0-90,1). Vzhledem k tomu, že mutační analýzy byly zpracovávány v průběhu 5 let a ke každé z analýz byla použita mírně odlišná skupina pacientů (u některých již nebyl k dispozici materiál pro další analýzy a naopak, přibyli nově diagnostikovaní pacienti) bude podrobná charakteristika testovaných pacientů uvedena vždy v rámci výsledků konkrétní analýzy. Pacienti ve všech případech podepsali informovaný souhlas v době diagnózy onemocnění v souladu s Helsinskou deklarací.

### 4.2 METODY

#### 4.2.1 SEPARACE BUNĚK

Buňky kostní dřeně a/nebo periferní krve byly separovány centrifugací na gradientu Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Byla odebrána mononukleární frakce buněk (prsteneček), dvakrát promyta roztokem PBS (tab. 6) a případné kontaminující erytrocyty byly odstraněny lyzací pomocí lyzačního roztoku (tab. 6). Buňky byly spočítány a alikvotovány po maximálně 10 milionech. Separované buňky byly ihned lyzovány v roztoku TRIzol Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) a lyzáty zamrazeny při -20 °C.

**Tab. 6:** Složení roztoků pro separaci buněk.

Roztok	Složky	Vlastnosti	Množství
PBS (Phosphate buffered saline), pH 7,4 (5 l) autoklávovaný 20 min. při 100 °C	NaCl KCl Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> HCl (titr.)	1 M	40 g 1 g 5,75 g 1 g
Lyzační roztok na erytrocyty 10x konc. (1 l) sterilizovaný přes filtr Stericup 0,22 µm	NH <sub>4</sub> Cl NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> EDTA		82,9 g 7,9 g 0,37 g
Tris/EDTA (TE) pufr (100 ml)	EDTA TrisCl	0,5M, pH 8,0 1 M	200 µl 1 ml
EDTA (500 ml)	Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O NaOH (titr.)	10 M	93 g

#### 4.2.2 IZOLACE RNA A DNA, PŘÍPRAVA cDNA

RNA a DNA byly izolovány pomocí TRIzol Reagentu podle přiloženého manuálu. RNA byla rozpuštěna v TE pufru (tab. 6), v množství 5 µl na 1 milion buněk. RNA byla zamražena a skladována při -70 °C, DNA při 4 °C. Všechny analýzy byly prováděny na cDNA, která byla připravena z 1 µg celkové RNA. Ta byla inkubována s 25 pmol náhodných hexamerů (Invitrogen) při 65 °C po dobu 10 minut. Po zchlazení na 4 °C byla přidána reakční směs obsahující 200 µmol dNTPs, 10 mmol dithiothreitolu, 1x First Strand Buffer, 100 U Superscriptu II (Invitrogen), 10 U RNasinu (Promega, Madison, WI, USA) a sterilní vodu do konečného objemu 10 µl. Reakční směs byla inkubována při 42 °C po dobu 1 hodiny a poté 2 minuty denaturována při 95 °C. Připravená cDNA byla skladována při -20 °C.

Při záchytu onemocnění byli všichni pacienti testováni na přítomnost prognosticky příznivých molekulárních markerů (tj. fúzních genů *PML/RARα*, *AML1/ETO* a *CBFβ/MYH11*), a dále byl zjišťován výskyt *FLT3/ITD*.

#### 4.2.3 DETEKCE FÚZNÍHO GENU *PML/RARα*

Přítomnost fúzního genu *PML/RARα* byla zjišťována pomocí jedнокrokové kvalitativní RT-PCR. Zlomy v oblasti bcr1 a bcr2 genu *PML* byly detekovány pomocí primerů M2 a R8, pro zlomy v oblasti bcr3 byl použit primer M4 společně s R8 (tab. 7).

**Tab. 7:** Přehled použitých primerů. Sondy použité pro real time PCR byly duálně fluorescenčně značené 6-FAM na 5'-konci a BHQ-1 na 3'-konci. Nukleotidy s LNA modifikací jsou vyznačeny červeně.

(Fúzní) gen	název primeru	sekvence 5' - 3'	citace
<i>PML/RARα</i> - záchyt	M2	AGTGTACGCCTTCTCCATCA	[189]
	M4	AGCTGCTGGAGGCTGTGGACGCGCGGTACC	[189]
	R8	AGA ACTGCTGCTCTGGGTCTCAAT	[189]
<i>PML/RARα</i> - MRO	Q1,2	GTCTTCCTGCCCAACAGCAACC	[190]
	Q3	AGCTCTTGCATCACCCAGGGGA	[190]
	R5	CCCCATAGTGGTAGCCTGAGGACT	[189]
	sonda	CAGCCCTCCCTCGCCACCCCTCTA	[190]
<i>AML1/ETO</i> - záchyt	AM	ACCTCAGGTTTGTCTCGGTCG	[191]
	ET	ATTAGTTAACGTTGTCTCGGTG	[191]
<i>AML1/ETO</i> - MRO	QAM	AATCACAGTGGATGGGCC	[192]
	QET	TGCGTCTTCACATCCACA	[192]
	sonda	CTGAGAAGCACTCCACAATGC	[192]
<i>CBFβ/MYH11</i> - záchyt	pr1	CAGGCAAGGTATATTTGAAGG	[193]
	pr2	CTCCTCTTCTCCTCATTCTGCTC	[193]



**Tab. 7:** Přehled použitých primerů (pokračování).

(Fúzní) gen	název primeru	sekvence 5' - 3'	citace
<i>CBFβ/MYH11</i> - záchyt (pokračování)	pr3	GTCTGTGTTATCTGGAAAGGC	[193]
	pr4	CGTATCGCTGGGTGAGGTTCT	[193]
<i>CBFβ/MYH11</i> - MRO	QFi	AGCACACCCGAATTTGAA	[194]
	QRiA	TGGACTTCTCCAGCTCATGGA	[194]
	QRiD	TGTGACGCTCTCAACTTCAT	[198]
	sonda	AGACAGGTCTCATCGGGAGGAAATGGAG	[194]
<i>ABL</i> - záchyt	ABL-F	CGTCCTCCAGCTGTTATCTGG	[198]
	ABL-R	CTCAGCCAGTAGCATCTGAC	[198]
<i>ABL</i> - záchyt	QABL-F	TCCTCCAGCTGTTATCTGGAA	[198]
	QABL-R	TGGGTCCAGCGAGAAGGTT	[198]
	sonda	CCAGTAGCATCTGACTTTGAGCCTCAGGG	[195]
<i>FLT3</i>	835 for	CCGCCAGGAACGTGCTTG	[113]
	835 rev	GCAGACGGGCATTGCCCC	[113]
	R5	TGTCGAGCAGTACTCTAAACA	[96]
	R6	ATCCTAGTACCTTCCAAACTC	[96]
<i>C-KIT</i>	E8-9 for	ACCGAAGGAGGCACTTACAC	[81]
	E8-9 rev	TACATTCAACCGTGCCATTG	[81]
	E10-11 for	AAACTCATCTGGGCCACCGTTT	[198]
	E10-11 rev	CACTCGGCTTGAGCATCTTT	[81]
	E17,18 for	CCGACAAAAGGAGATCTGTG	[81]
	E17,18 rev	GACCGGCATTCCAGGATAG	[81]
<i>K-RAS</i>	K-for	CATTTCCGACTGGGAGCGAG	[198]
	K-rev	CTATAATGGTGAATATCTTCAA	[198]
<i>N-RAS</i>	N-for	CTGTGGTCCTAAATCTGTCC	[198]
	N-rev	CAGTGCAGCTTGAAAGTGG	[198]
<i>DNMT3A</i> - záchyt	DNMT3A for1	GGAGCTGGTGTGGGGGAAACT	[196]
	DNMT3A rev1	TGGTAGCCGTCGTCGTCGTA	[196]
	DNMT3A for2	ACTGCAAGAACTGCTTTCTGGA	[196]
	DNMT3A rev2	CAGAAGAAGGGGCGATCATCT	[196]
	DNMT3A for3	TACCGCCTCCTGCATGATGC	[196]
	DNMT3A rev3	TGTTTAACTTTGTGTCGCTA	[196]
<i>DNMT3A</i> - MRO	P843 for	GCACTGAAATGGAAAGGGTA	[198]
	P843 rev	GGTGGCGGATGACTGGCA	[198]
	sonda P843	ATGAG <b>CCACTT</b> G	[198]
	R167 for	TGCTGTCTCTTTGATGGA	[198]
	R167 rev	ACCATGCCACCGTGAT	[198]
	sonda R167	TGGG <b>CA</b> GT <b>CAG</b>	[198]
	P638 for	TTCTTCTGGCTCTTTGAGAA	[198]
	P638 rev	CCTGTGTGCAGCTGACA	[198]
	sonda P638	ACAT <b>CTCGCA</b> TTTCT	[198]
sonda P288	AT <b>GAGCT</b> GCTT	[198]	
<i>ASXL1</i>	ASXL1 for1	ATTCAACTTTCACGTATCA	[198]
	ASXL1 rev1	TTGGCCAGTTCCTTTCTCT	[198]

**Tab. 7:** Přehled použitých primerů (pokračování).

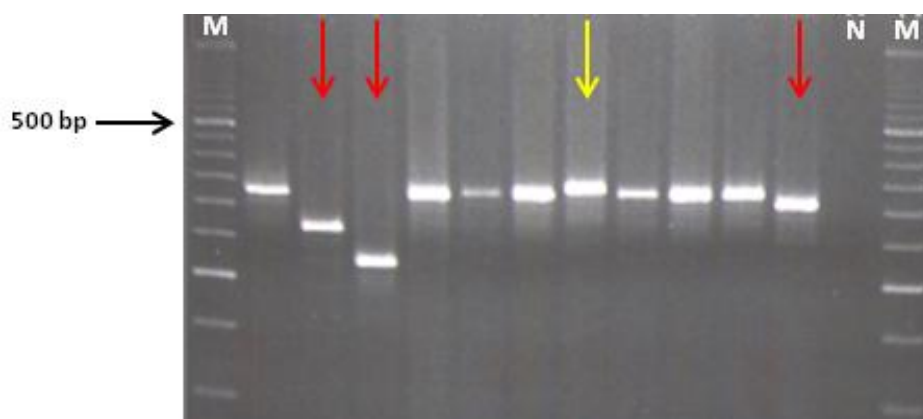
(Fúzní) gen	název primeru	sekvence 5' - 3'	citace
<i>ASXL1</i> (pokračování)	ASXL1 for2	AGCAAGGACCCACCGTTCCTG	[198]
	ASXL1 rev2	TGCAGCAACTGCATCACAA	[198]
	ASXL1 for3	AGATTCCCTACTGCTGGCCA	[198]
	ASXL1 rev3	CCAGTCTTCCCTTGGAGTCT	[198]
	ASXL1 for4	TGAGATCCCTCCAGTTTTTC	[198]
	ASXL1 rev4	AATACACAGAGCTTTGAGG	[198]
<i>MLL</i> translokace - záchyt	MLL for	CTCAGCCACCTACTACAGGAC	[199]
	AF9 rev1	AGCGAGCAAAGATCAAAATC	[199]
	AF9 rev2	GATTTGCTTTGCTTTATTGG	[199]
	AF10 rev1	CCTGGAAATTTGCATTTGTAA	[199]
	ELL rev	CCGATGTTGGAGAGGTAGAA	[199]
	ENL rev1	GGACAAACACCATCCAGTC	[199]
	ENL rev2	GCGCTGTTGTCACTCTC	[199]
	ENL rev3	TTGAAGGTGAGCTTCTCGCA	[198]
	ENL rev4	GTGCTCCTTGGTCACCTTGT	[198]
	MSF rev	GCGCCAGGTCCTGGAATTT	[198]
<i>MLL</i> translokace - MRO	QMLL for1	GCAAACAGAAAAAAGTG	[198]
	QMLL for2	TGCTTTCTCTGTGCCAGTA	[198]
	QAF rev1	GATTTGCTTTGCTTTATTGG	[198]
	QAF rev2	TTGTTGCCTGGTGTGGGATGG	[198]
	QAF10 rev	TTCTGTAGTAACAGTCAAGGA	[198]
	QENLrev1	ATGCCCCAGCTCTTAACCTCA	[198]
	QENLrev2	TTGGCTGTGGTTCTGGGAT	[198]
	QMSF rev	GACCTCCTCGACCTCAAAA	[198]
	sonda MLL	CTCCCCGCCCAAGTATCCCTGTAAAA	[198]
	sonda AF9	AGCTGGCAGGACTGGGTT	[198]
	sonda AF10	AGGTGATGGTTCTGGCTGCT	[198]
	sonda ENL	TCAGACTCCAGCTCAGACT	[198]
	sonda ELL	TGGCCTCAGTGAAACAGAAT	[198]
<i>TP53</i>	P2	CCCCTCTGAGTCAGGAAACA	[197]
	P18	GCCCATGCAGGAACTGTTA	[197]
	P4	ACCCTTTTTGGACTTCAGGTG	[197]
	P16	GCGATGGTCTGGCCCCTCCTC	[197]

Kvalita izolované RNA a z ní připravené cDNA byla ověřena amplifikací kontrolního genu *ABL* za použití primerů ABL-F a ABL-R (tab. 7). Reakční mixy pro *PML/RARα* bcr1,2, bcr3 a kontrolní gen *ABL* byly složeny vždy z 1 μl vzorku cDNA, 250 nmol obou primerů (Invitrogen), 200 μmol dNTPs, 1x PCR reaction buffer, 1 mmol MgCl<sub>2</sub>, 1 U Platinum Taq DNA polymerázy (Invitrogen) a sterilní vody do konečného objemu 25 μl. Pro amplifikaci byl použit PCR program záchyt AML (tab. 8).

**Tab. 8:** Přehled použitých programů PCR.

program	úvodní denaturace	denaturace	primer annealing	elongace	měření fluorescence	počet cyklů
záchyt AML	95 °C; 5 min.	95 °C; 10s	58 °C; 30s	72 °C; 30s	x	40
FLT3/ITD	95 °C; 5 min.	95 °C; 10s	56 °C; 30s	72 °C; 45s	x	10
		95 °C; 10s	52 °C; 30s	72 °C; 45s	x	30
rez 60	95 °C; 5 min.	95 °C; 10s	60 °C; 30s	72 °C; 30s	FAM	50
rez 53	95 °C; 5 min.	95 °C; 10s	53 °C; 30s	72 °C; 30s	FAM	50
DNMT3A 62	95 °C; 5 min.	95 °C; 10s	62 °C; 30s	72 °C; 30s	FAM	50
DNMT3A 66	95 °C; 5 min.	95 °C; 10s	66 °C; 30s	72 °C; 30s	FAM	50

Pro ověření správnosti přípravy mixu a průběhu PCR byla pro každou reakci udělána též pozitivní kontrola s využitím plazmidu se zaklonovaným úsekem sledovaného fúzního, resp. kontrolního genu. Pro vyloučení falešné pozitivitu způsobené kontaminací PCR, byla též amplifikována negativní kontrola s přidáním 1 µl sterilní vody místo vzorku cDNA. Výsledné produkty PCR byly vizualizovány pomocí gelové elektroforézy na 2% agarozovém gelu s ethidium bromidem. Pozitivní výsledky se zlomy v oblasti *bcr2* (dávají různě dlouhé produkty PCR, viz obr. 11) byly verifikovány pomocí přímé sekvenace s použitím sekvenačního kitu Big Dye Terminator kit v. 3.1 (Applied Biosystems, Branchburg, NJ, USA).



**Obr. 11:** Odlišení zlomů v oblasti *bcr1*, resp. *bcr2* genu *PML*, u pacientů s fúzním genem *PML/RARα*. Zatímco pacienti se zlomem *bcr1* mají produkt PCR o fixní délce 326 bp (pruhy neoznačené šipkami), pacienti se zlomem *bcr2* mají různě dlouhé produkty PCR (obvykle kratší než u zlomu *bcr1*), v závislosti na přesné lokalizaci zlomu v rámci exonu 6 (viz obr. 1 na str. 11), a jsou označeni šipkami. Žlutou šipkou je zvýrazněn produkt PCR pacienta se zlomem *bcr2*, jehož produkt PCR je delší v důsledku inserce 12 nukleotidů z intronu 2 genu *RARα*. M - marker, N - negativní kontrola.

#### 4.2.3.1 Monitorování *PML/RARα* pomocí kvantitativní PCR

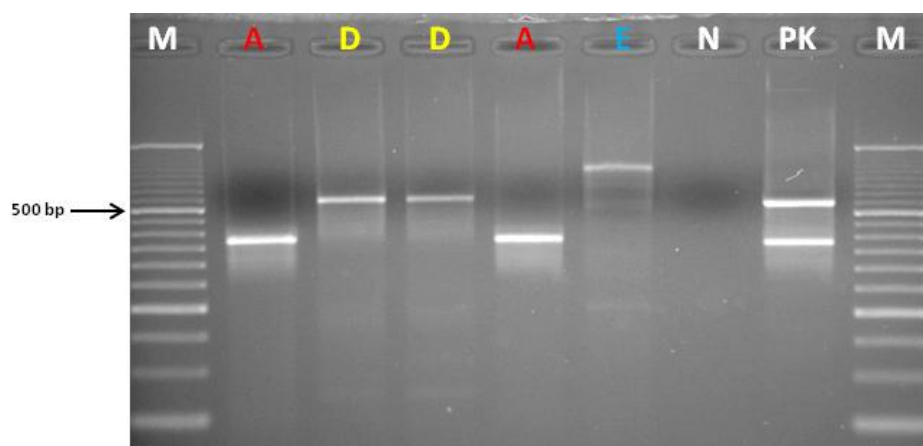
MRO bylo sledováno ve vzorcích kostní dřeně po každém cyklu chemoterapie a po jejím ukončení v tříměsíčních intervalech pomocí real-time RT-PCR na přístroji RotorGene 3000A real time PCR cycler (Corbett Research, Sydney, NSW, Australia). Pro kvantitativní detekci MRO byly navrženy primery poskytující PCR produkt o délce maximálně 150 bp. Sondy pro všechny sledované geny byly duálně fluorescenčně značené 6-FAM na 5'-konci a BHQ-1 na 3'-konci. Pro každý ze zlomů *bcr1*, resp. *bcr3* byl navržen specifický přední (forward) primer (Q1,2, resp. Q3), zatímco reverzní primer (R5) a fluorescenčně značená sonda (tab. 7) byly pro oba zlomy společné. Reakční směs obsahovala: 1 μl vzorku cDNA, 500 nmol obou primerů, 250 nmol sondy, 200 μmol dNTPs, 1x PCR reaction buffer, 3 mmol MgCl<sub>2</sub>, 1 U AmpliTaq Gold polymerázy (Applied Biosystems) a sterilní vodu do konečného objemu 20 μl. Pro reakci detekující zlom *bcr1* byl použit program rez 60, pro *bcr3* rez 53 (tab. 8). Všechny vzorky byly analyzovány v tripletu, aby bylo omezeno riziko pipetovací chyby. Ke každému vzorku byl amplifikován kontrolní gen *ABL* se stejným reakčním mixem (s výjimkou primerů a sondy), k amplifikaci byl využit též program rez 60. Pro každý fúzní i kontrolní gen byla amplifikována kalibrační křivka sestávající ze 7 bodů (v duplikátech), vytvořená ředěním plazmidu se zaklonovaným fúzním, resp. kontrolním genem v ředění od 1 ng do 1 fg. Relativní exprese sledovaného fúzního genu byla vypočtena podle vzorce:  $\text{rel. exprese} = 2^{(Ct_{ABL} - Ct_{FG})}$ , kde Ct označuje pořadí cyklu PCR, ve kterém exprese genu dosáhla stanoveného prahu. Je uváděn průměr ze tří hodnot každého tripletu, FG označuje fúzní gen. Detekční senzitivita metody určená ředěním diagnostických vzorků pacientů byla pro *PML/RARα* v rozmezí 10<sup>-3</sup> až 10<sup>-4</sup>. Molekulární remise byla definována jako negativita MRO nejméně ve dvou po sobě následujících vzorků, za molekulární relaps byly považovány dva pozitivní vzorky v řadě po předchozí molekulární remisi.

#### 4.2.4 DETEKCE FÚZNÍCH GENŮ *AML1/ETO A CBFβ/MYH11*

Přítomnost fúzního transkriptu *AML1/ETO* a *CBFβ/MYH11* v době diagnózy byla testována pomocí kvalitativní RT-PCR. Reakční mix pro fúzní gen *AML1/ETO* obsahoval 1 μl vzorku cDNA, 250 nmol primerů AM a ET (tab. 7), 200 μmol dNTPs, 1x PCR reaction buffer, 2 mmol MgCl<sub>2</sub>, 1 U Platinum Taq DNA polymerázy a sterilní vodu do konečného objemu 25 μl. K amplifikaci produktů PCR byl využit program záchyt AML (tab. 8). Současně byla připravena pozitivní a negativní kontrola se zaklonovaným PCR produktem, resp. sterilní vodou.

Dva páry primerů byly navrženy pro detekci fúzního genu *CBFβ/MYH11* tak, aby zachytily všechny dosud popsané zlomy. Primery pr1, pr2, pr3 a pr4 (tab. 7) byly použity společně v jednom reakčním mixu s následujícím složením: 1 μl vzorku cDNA, 250 nmol všech primerů, 200 μmol dNTPs, 1x PCR reaction buffer, 1,5 mmol MgCl<sub>2</sub>, 1 U Platinum Taq DNA polymerázy a sterilní voda

do konečného objemu 25  $\mu$ l. Pozitivní kontrola obsahovala 2 plazmidy se zaklonovanými produkty PCR s nejčastějšími typy zlomů, tj. A a D. PCR program se stejným teplotním profilem jako u předchozích fúzních genů byl použit k amplifikaci a výsledné produkty PCR byly separovány pomocí gelové elektroforézy. Případné pozitivní nálezy s délkou produktu PCR odlišnou od obou pozitivních kontrol byly verifikovány pomocí přímé sekvenace (obr. 12).



**Obr. 12:** Gelová elektroforéza *CBFβ/MYH11* pozitivních pacientů s různými místy zlomu v genu *MYH11*.

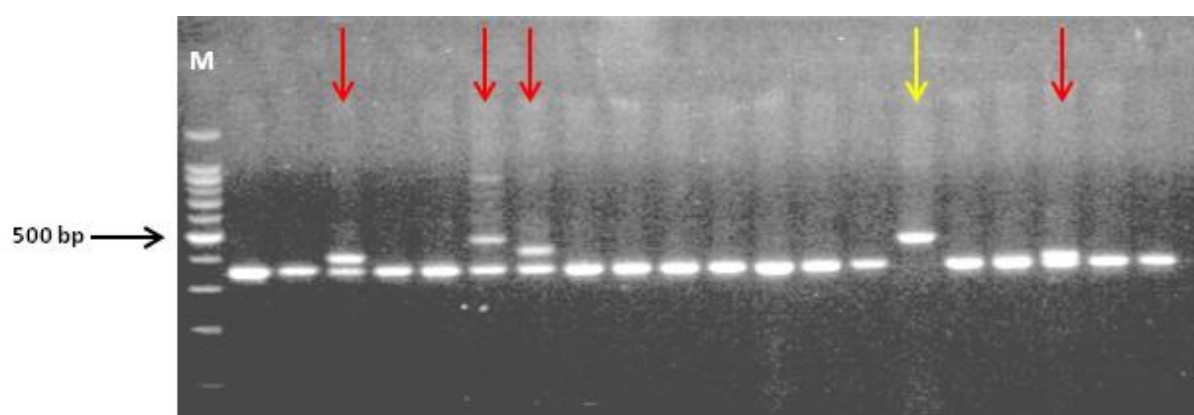
A - pacienti s nejčastějším typem zlomu A; D - pacienti se zlomem D; E - pacienti se zlomem E (viz obr. 4, str. 13); M – marker; N - negativní kontrola; PK - pozitivní kontrola s plazmidy se zaklonovaným A, resp. D produktem PCR.

#### 4.2.4.1 Monitorování *AML1/ETO* a *CBFβ/MYH11* pomocí kvantitativní PCR

Podobně jako u pacientů s APL bylo i u nemocných s fúzemi *AML1/ETO* a *CBFβ/MYH11* sledováno MRO po každém cyklu léčby a po jejím ukončení v tříměsíčních intervalech. Jeden pár primerů byl navržen pro fúzi *AML1/ETO*, pacienti s *CBFβ/MYH11* se zlomy A a D sledování v našem souboru měli shodný přední primer a fluorescenční sondu, reverzní primer byl pro každý typ zlomu specifický (tab. 7). Reakční mix byl s výjimkou primerů a sondy shodný pro fúzní gen *AML1/ETO* i pro oba zlomy fúzního genu *CBFβ/MYH11* a obsahoval 1  $\mu$ l vzorku cDNA, 500 nmol obou primerů, 250 nmol fluorescenčně značené sondy, 200  $\mu$ mol dNTPs, 1x PCR reaction buffer, 4 mmol  $MgCl_2$ , 1 U AmpliTaq Gold polymerázy a sterilní vodu do celkového objemu 20  $\mu$ l. Pro amplifikaci byl použit program rez 60 (tab. 8). Citlivost detekce testovaná ředěním záchytových vzorků pacientů se u fúzního genu *AML1/ETO* pohybovala mezi  $10^{-4}$  a  $10^{-5}$ , u obou fúzí *CBFβ/MYH11* pak byla  $10^{-4}$ . Zároveň byla porovnávána citlivost detekce MRO ve vzorcích kostní dřeně a periferní krve odebraných ve stejný čas u stejných pacientů. Definice molekulární remise i molekulárního relapsu byly totožné jako u pacientů s APL.

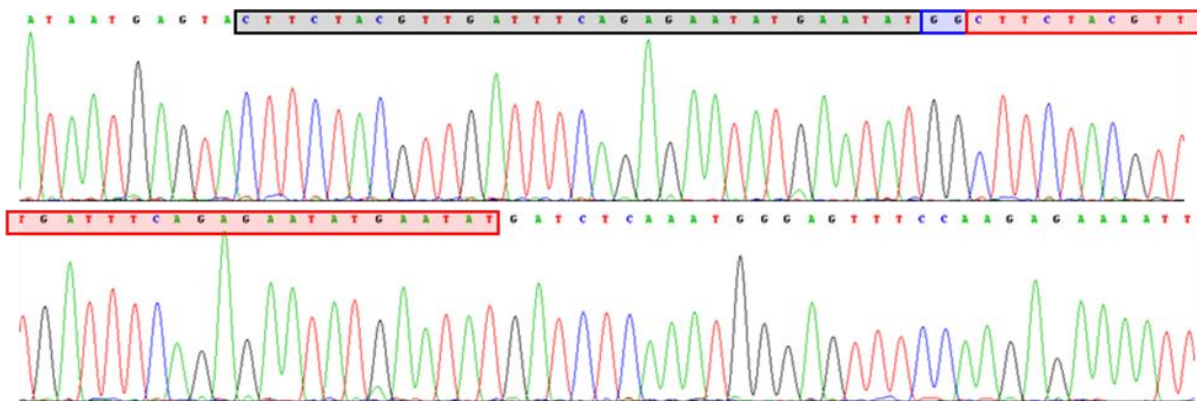
#### 4.2.5 DETEKCE *FLT3/ITD*

Přítomnost ITD v JM a TK doménách (exony 12-14) genu *FLT3* byla testována pomocí kvalitativní RT-PCR za použití primerů R5-*FLT3* a R6 (tab. 7). Reakční směs obsahovala 1 µl vzorku cDNA, 500 nmol každého primeru, 200 µmol dNTPs, 1x PCR reaction buffer, 2 mmol MgCl<sub>2</sub>, 1 U Platinum Taq DNA polymerázy a sterilní vodu do konečného objemu 25 µl. Pro amplifikaci byl použit PCR program *FLT3/ITD* (tab. 8, str. 33). Amplifikované produkty PCR byly separovány pomocí gelové elektroforézy na 2% agarozovém gelu. Pozitivní pacienti byli identifikováni podle abnormálně dlouhých produktů PCR (obr. 13).



**Obr. 13:** Výsledek gelové elektroforézy *FLT3/ITD*. Pacienti s duplikací jsou označeni šipkami, žlutá šipka ukazuje pacienta se ztrátou nemutované - wt alely *FLT3*. M - marker.

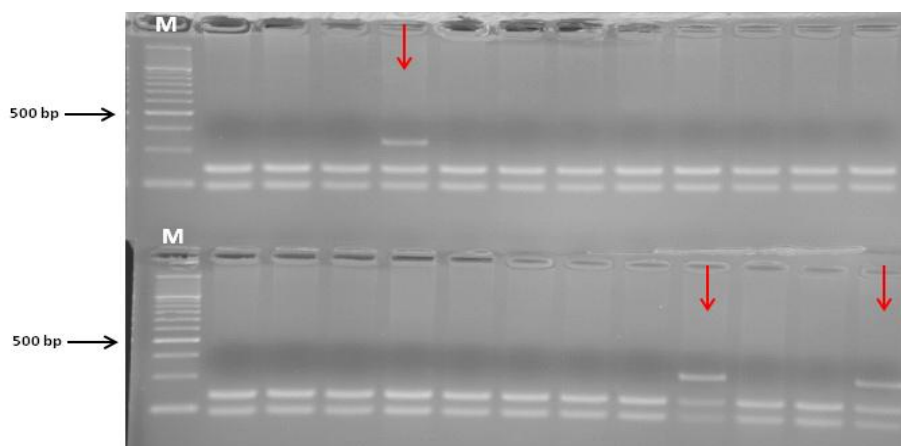
Abnormálně dlouhé produkty PCR byly purifikovány z gelu pomocí purifikačního kitu QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Německo) a následně sekvenovány při použití sekvenačního kitu Big Dye Terminator kit v. 3.1. Získané sekvence byly porovnány s nemutovanou sekvencí genu *FLT3* pomocí <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, byla určena délka ITD a její integrační místo (JM vs. TK doména) (obr. 14). Pro analýzu vlivu délky ITD na prognózu pacientů byla jako hraniční zvolena délka ITD = 39 nukleotidů v souladu s dříve publikovanou prací Stirewalta *et al.* [108]. Procentuální zastoupení mutované alely bylo kvantifikováno semikvantitativně pomocí softwaru Alphaview (ProteinSimple, Santa Clara, CA, USA).



**Obr. 14:** Sekvence *FLT3*/ITD a její vyhodnocení. Černý rámeček - zduplikovaná oblast, modrý rámeček - dvounukleotidová inserce, červený rámeček - ITD.

#### 4.2.6 DETEKCE *FLT3*/TKD

K detekci mutací v kodonech Asp835 a Ile836 byl amplifikován exon 20 pomocí kvalitativní RT-PCR s použitím primerů 835for a 835rev (tab. 7). Reakční směs byla připravena z 1  $\mu$ l vzorku cDNA, 250 nmol každého primeru, 200  $\mu$ mol dNTPs, 1x PCR reaction buffer, 2 mmol  $MgCl_2$ , 1 U Platinum Taq DNA polymerázy a sterilní vody do konečného objemu 25  $\mu$ l. Pro amplifikaci byl použit amplifikační program záchyt AML (tab. 8). Výsledné produkty PCR byly štěpeny pomocí restriční endonukleázy EcoR V (New England BioLabs, Beverly, MA, USA). Reakční směs obsahovala 15  $\mu$ l produktu PCR, 1,5  $\mu$ l pufru NEB3, 1,5  $\mu$ l BSA a 0,45  $\mu$ l EcoR V. Štěpení probíhalo přes noc, při teplotě 37  $^{\circ}C$ . Produkty restričního štěpení byly analyzovány na 3% agarozovém gelu. Restriční místo, rozpoznávané použitou restriktázou, nese nemutovaná (wt) alela. Proto byly vyříznuty nerozštěpené produkty, které byly po purifikaci z gelu sekvenovány, aby mohl být specifikován přesný typ mutace (obr. 15).



**Obr. 15:** Výsledek gelové elektroforézy štěpení *FLT3*/TKD. Nalezené mutace jsou označeny šipkami. M - marker.

#### **4.2.7 DETEKCE C-KIT MUTACÍ**

Mutace v genu *C-KIT* byly vyšetřovány pouze u pacientů s CBF-AML. Pomocí tří RT-PCR byly amplifikovány exony 8, 9, 10, 11, 17 a 18, ve kterých jsou mutace popisovány nejčastěji. Reakční mixy byly napipetovány stejně jako pro *FLT3/TKD* (viz kap. 4.2.6) s výjimkou primerů. Exony 8 a 9 byly amplifikovány pomocí primerů E8-9for/E8-9rev, exony 10 a 11 s použitím primerů E10-11for/E10-11rev a exony 17 a 18 s primery E17-18for/E17-18rev (tab. 7, str. 30-32). Pro všechny tři reakční mixy byl použit PCR program záchyt AML (tab. 8, str. 33). Získané produkty PCR byly přečištěny pomocí roztoku ExoSAP-IT (USB Corporation, Cleveland, Ohio, USA) podle instrukcí v manuálu, a poté sekvenovány. Výsledné sekvence byly porovnány s wt sekvencí genu *C-KIT*. Přítomnost mutací Asp816Val a Asp820Gly byla navíc verifikována restričním štěpením pomocí restriční endonukleázy Hinf I (New England BioLabs), aby byly zachyceny případné mutace s nízkým procentuálním zastoupením, které nebylo možno detekovat pomocí sekvenační analýzy.

#### **4.2.8 DETEKCE MUTACÍ K-RAS A N-RAS**

Přítomnost mutací v kodonech Gly12, Gly13 a Gln61 genů *K-RAS* a *N-RAS* byla testována také pouze u pacientů s CBF-AML. Dva PCR mixy s primery K-for/K-rev a N-for/N-rev (tab. 7) byly připraveny pro každého pacienta. Reakční podmínky (PCR mix i amplifikační program) byly stejné jako při detekci *C-KIT* mutací (viz kap. 4.2.7). Výsledné produkty PCR byly přečištěny pomocí roztoku ExoSAP-IT, sekvenovány a mutace identifikovány porovnáním s wt sekvencemi.

#### **4.2.9 DETEKCE MUTACÍ DNMT3A**

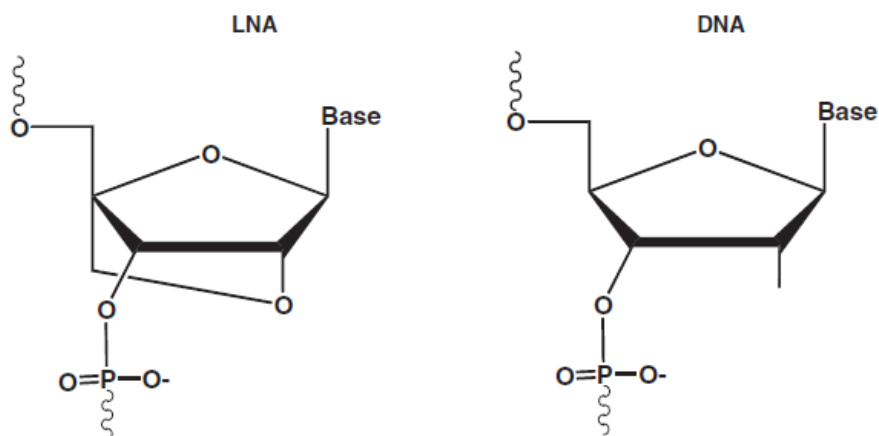
Vyšetření mutací v genu *DNMT3A* bylo prováděno u pacientů se středním cytogenetickým rizikem. Pro detekci mutací byly navrženy tři páry primerů, pokrývající oblast exonů 11-23, které byly použity v kombinacích DNMT3A for1/DNMT3A rev1, DNMT3A for2/DNMT3A rev2 a DNMT3A for3/DNMT3A rev3 (tab. 7). Příprava reakčních mixů i teplotní podmínky reakce byly stejné jako při vyšetření *C-KIT* mutací (viz kap. 4.2.7). Amplifikované produkty PCR byly přečištěny pomocí roztoku ExoSAP-IT, sekvenovány a mutace identifikovány porovnáním s wt sekvencí *DNMT3A*.

##### **4.2.9.1 Monitorování DNMT3A pomocí kvantitativní PCR**

Časové schéma odběrů vzorků pro sledování MRO bylo stejné jako u pacientů monitorovaných pomocí fúzních genů. Specifické primery byly navrženy pro amplifikaci úseku nesoucího kodon Arg882, který je nejčastěji mutovaným místem *DNMT3A* genu a dále pro dvě pacient-specifické



mutace u nemocných, u kterých nebylo možné sledovat MRO pomocí jiného molekulárního markeru. Pro všechny sledované mutace byly navrženy specifické duálně fluorescenčně značené sondy s LNA (locked nucleic acid) modifikovanými nukleotidy, které umožňují detekci jednonukleotidových záměn. LNA je analogem nukleové kyseliny nesoucím methylenový můstek mezi 2'-O a 4'-C. Tato bicyklická struktura uzavírá ribozovou skupinu do C3'-endo konformace (obr. 16). Použití LNA monomerů v oligonukleotidech zvyšuje termální stabilitu heteroduplexů o 3 až 8 °C s každou zařazenou modifikací, čímž je výrazně zvýšena specifita alelické diskriminace [200,201].



**Obr. 16:** Rozdíl ve struktuře LNA a DNA nukleotidů [201].

Sondy byly fluorescenčně značeny 6-FAM na 5'-konci, na 3'-konec byl připojen zhášeč BHQ-1. Reakční směs pro PCR byla připravena z 1 µl vzorku cDNA, 250 nmol každého primeru, 250 nmol fluorescenčně značené LNA sondy, 200 µmol dNTPs, 1x PCR reaction bufferu, 5 mmol MgCl<sub>2</sub>, 1 U Platinum Taq DNA polymerázy a sterilní vody do konečného objemu 20 µl. Podle typu sledované mutace byl pro amplifikaci použit buď program DNMT3A 62 nebo DNMT3A 66 (tab. 8). Všechny vzorky byly amplifikovány v tripletu a byla sestrojena kalibrační křivka. Pro všechny vzorky byl amplifikován také kontrolní gen *ABL* a relativní exprese mutované alely byla vypočtena podle stejných pravidel jako u fúzních genů.

#### 4.2.10 DETEKCE MUTACÍ *ASXL1*

Vyšetření mutací v genu *ASXL1* bylo prováděno rovněž pouze u pacientů se středním cytogenetickým rizikem. Pomocí čtyř párů primerů v kombinacích *ASXL1* for1/*ASXL1* rev1, *ASXL1* for2/*ASXL1* rev2, *ASXL1* for3/*ASXL1* rev3 a *ASXL1* for4/*ASXL1* rev4 (tab. 7) byl amplifikován celý exon 12. Příprava reakčních mixů i teplotní podmínky reakce byly stejné jako při vyšetření *C-KIT* mutací (viz kap. 4.2.7). Amplifikované produkty PCR byly přečištěny pomocí roztoku ExoSAP-IT,

sekvenovány a mutace identifikovány porovnáním s wt sekvencí *ASXL1*. Případné polymorfismy byly vyloučeny buď vyšetřením vzorku z CR, případně analýzou DNA izolované z nehtů pacientů. Ty byly přes noc inkubovány v 0,1 M roztoku dithiothreitolu při teplotě 65 °C. K izolaci DNA byl použit QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen) a izolace byla provedena podle manuálu výrobce.

#### **4.2.11 DETEKCE FÚZNÍCH GENŮ SPOJENÝCH S TRANSLOKACEMI GENU *MLL***

Na základě výsledků vyšetření karyotypu a FISH se sondou pro detekci přestaveb *MLL* genu byli pacienti testováni pomocí RT-PCR na přítomnost konkrétních fúzních genů vzniklých translokací genu *MLL*. Pro amplifikaci produktů PCR byl použit vždy stejný přední primer pro gen *MLL* a reverzní primer odpovídající fúznímu partnerovi (tab. 7, str. 30-32) určenému pomocí analýzy karyotypu a následné FISH. Reakční podmínky (PCR mix i amplifikační program) byly stejné jako při detekci *C-KIT* mutací (viz kap. 4.2.7). Získané produkty PCR byly separovány pomocí gelové elektroforézy, po vyříznutí z gelu purifikovány a sekvenovány pro určení přesných míst zlomů v obou genech (*MLL* i jeho fúzního partnera), aby bylo možné navrhnout specifické primery pro sledování MRO v průběhu léčby.

##### **4.2.11.1 Monitorování translokací *MLL* genu pomocí kvantitativní PCR**

Časové schéma odběrů vzorků pro sledování MRO bylo stejné jako u pacientů monitorovaných pomocí fúzních genů *AML1/ETO* a *CBFβ/MYH11*. Byly navrženy 2 různé přední primery pro gen *MLL*, 2 reverzní primery pro geny *AF9* a *ENL* a jeden reverzní primer pro každý z genů *AF10*, *ELL* a *MSF* (tab. 7), v závislosti na identifikovaných místech zlomů těchto genů u našich pacientů. Zároveň byly navrženy specifické sondy pro detekci všech těchto fúzních genů (tab. 7, str. 30-32). Reakční směs byla připravena stejně jako pro fúzní geny *AML1/ETO* a *CBFβ/MYH11* (viz kap. 4.2.4.1) a pro amplifikaci produktů PCR byl použit program rez 53 (tab. 8, str. 33). Všechny vzorky byly amplifikovány v tripletu a byla sestrojena kalibrační křivka. Pro všechny vzorky byl amplifikován kontrolní gen *ABL* a relativní exprese fúzního genu byla vypočtena podle stejných pravidel jako u ostatních fúzních genů.

#### **4.2.12 DETEKCE MUTACÍ *TP53***

Přítomnost mutací v genu *TP53* byla testována pouze u pacientů s nepříznivým cytogenetickým nálezem a zároveň s komplexním karyotypem. Pomocí dvou párů primerů (tab. 7) byl amplifikován úsek genu zahrnující exony 3-10. Reakční podmínky (PCR mix i amplifikační program) byly stejné

jako při detekci *C-KIT* mutací (viz kap. 4.2.7). Získané produkty PCR byly separovány pomocí gelové elektroforézy, po vyříznutí z gelu purifikovány a sekvenovány. Případné mutace byly identifikovány porovnáním s wt sekvencí genu *TP53*.

#### **4.2.13 DETEKCE MUTACÍ *NPM1* A *CEBPA***

Vyšetření přítomnosti mutací v genech *NPM1* a *CEBPA* byla provedena na Oddělení molekulární genetiky ÚHKT pod vedením Ing. Oty Fuchse, CSc. Pro vyšetření mutací genu *NPM1* byl pomocí RT-PCR amplifikován úsek zahrnující exony 11 a 12, získané produkty byly sekvenovány. Gen *CEBPA* byl amplifikován ve dvou samostatných reakcích a případné mutace byly detekovány pomocí přímé sekvenace. Podrobný popis metodiky viz citace [202,203].

#### **4.2.14 KLASICKÁ CYTOGENETICKÁ ANALÝZA**

Všechna cytogenetická vyšetření (včetně FISH) potřebná pro zařazení pacientů do prognostických skupin byla prováděna a vyhodnocována na Oddělení cytogenetiky ÚHKT (vedoucí Prof. Ing. Kyra Michalová, DrSc.). Cytogenetické analýzy byly prováděny na buňkách kostní dřeně, kultivovaných 24 hodin v RPMI 1640 mediu s 10% fetálním telecím sérem, bez stimulace jinými cytokiny. Chromozomální preparáty byly připraveny standardní technikou s použitím kolcemidu a hypotonického roztoku. Po fixaci preparátů methanolem a kyselinou octovou bylo provedeno G-pruhování barvením dle Wrighta. Mitózy byly analyzovány pomocí softwaru IKAROS imaging system for karyotyping (MetaSystems, Altlußheim, Germany). Získané karyotypy byly popsány podle mezinárodní nomenklatury (International System of Human Cytogenetic Nomenclature - ISCN 2013) [204]. Výsledky analýzy karyotypu byly použity k rozdělení pacientů do prognostických skupin, použita byla klasifikace podle Grimwada *et al.* z roku 2010 [11].

#### **4.2.15 FISH ANALÝZA**

FISH analýza byla prováděna na základě výsledků G-pruhování s použitím komerčně dostupných sond, podle doporučení výrobce. Pro detekci početních změn, fúzních genů, chromozomálních přestaveb a delecí, inzercí nebo amplifikací specifických chromozomových oblastí byly použity chromozomální DNA sondy hybridizující se specifickými sekvencemi v oblasti centromer (Chromosome enumeration DNA probes) či lokus-specifické DNA sondy (Abbott Molecular, Des Plaines, IL, USA a Kreatech Diagnostics, Amsterdam, Holandsko). Přesnější definici strukturních přestaveb umožnily celochromozomové „malovací“ sondy (CAMBIO, Cambridge, UK). Komplexní aberace byly detekovány pomocí mnohobarevné FISH (multicolor FISH - mFISH) a mnohobarevného

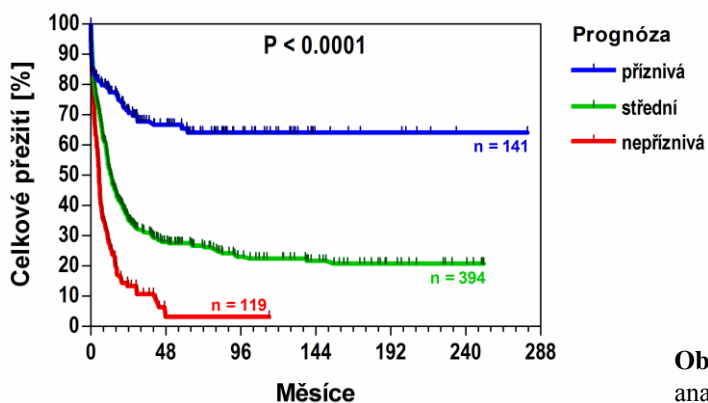
pruhování (multicolor banding - mBAND) s použitím kitů 24Xyte color kit a Xyte color kit (MetaSystems). FISH analýzy byly prováděny podle protokolů dodaných výrobcem s použitím softwaru ISIS (MetaSystems). Pravidelně byly metodou FISH vyšetřeny chromozomy 5, 7, 8, 9 a 11.

#### ***4.2.16 STATISTICKÉ METODY***

Vztahy mezi naměřenými parametry v kontingenční tabulce byly analyzovány pomocí  $\chi^2$  testu. Pro hodnocení kvantitativních dat ve 2 skupinách byly zjištěny mediány naměřených hodnot a statistická analýza byla provedena pomocí neparametrického dvoustranného Mann-Whitneyho testu. Pro hodnocení celkového přežití (OS) a přežití bez relapsu (RFS) bylo užito Kaplanovy-Mayerovy regresní metody hodnocení křivek přežití, odlišnost křivek byla hodnocena pomocí log-rank testu Mantela-Haenschelové. Pro analýzu přežití ve věkových skupinách byl použit log-rank test na trend. Všechny statistické testy byly provedeny na úrovni 95% intervalu spolehlivosti a příslušné hodnoty P (odpovídající možnosti chybného odmítnutí nulové hypotézy) byly nalezeny pomocí softwaru GraphPad Prism verze 4.03 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

## 5. VÝSLEDKY

V letech 1991-2012 bylo diagnostikováno 762 pacientů s AML, 392 bylo mužů, 370 žen. Medián věku v době diagnózy byl 54,5 let (16,0-90,1). Medián počtu leukocytů při záchytu AML byl  $12,1 \times 10^9/l$  (0,2-488,0). Pro zařazení pacientů do prognostických skupin byly použity výsledky analýzy karyotypu poskytnuté Oddělením cytogenetiky ÚHKKT, event. pozitivní záchyt fúzního genu u pacientů s příznivou prognózou. Rozdělení do jednotlivých kategorií bylo provedeno podle klasifikace publikované Grimwadem *et al.* [11] v roce 2010. Tyto výsledky byly k dispozici od 654 nemocných, u některých pacientů (s nálezem 0 mitóz v karyotypu) nebylo možné přesné zařazení do prognostické skupiny. 141 (21,6 %) pacientů mělo příznivou cytogenetickou aberaci, 394 (60,2 %) bylo zařazeno do skupiny se střední cytogenetickou prognózou a 119 (18,2 %) mělo nepříznivý karyotyp (obr. 17).



Obr. 17: OS pacientů v závislosti na výsledku analýzy karyotypu.

### 5.1 AML S PŘÍZNVOU CYTOGENETICKOU PROGNÓZOU

#### 5.1.1 APL

##### 5.1.1.1 Charakteristika pacientů

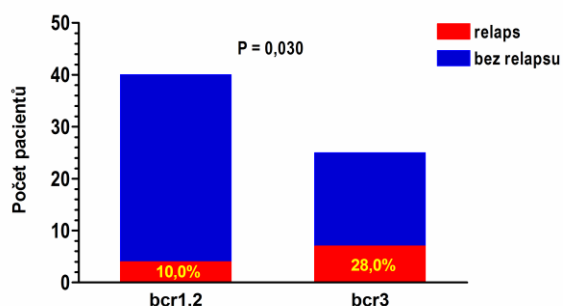
APL byla diagnostikována u 92 ze 762 (12,1 %) pacientů, z nich bylo 49 mužů a 43 žen. Medián věku v době záchytu APL byl 46,0 let (17,3-86,6), medián počtu leukocytů  $1,7 \times 10^9/l$  (0,2-114,0). Medián sledování pacientů byl 30,4 měsíců. Vyšetření RT-PCR genu *PML/RAR $\alpha$*  bylo provedeno u 82. Medián věku pacientů se zlomy v oblasti bcr1 a 2 byl 41,0 let, ve skupině se zlomem bcr3 pak 51,3 let. RNA pro vyšetření *FLT3/ITD* byla k dispozici u 79 nemocných.

### 5.1.1.2 Zlomové místo a jeho vliv na prognózu onemocnění

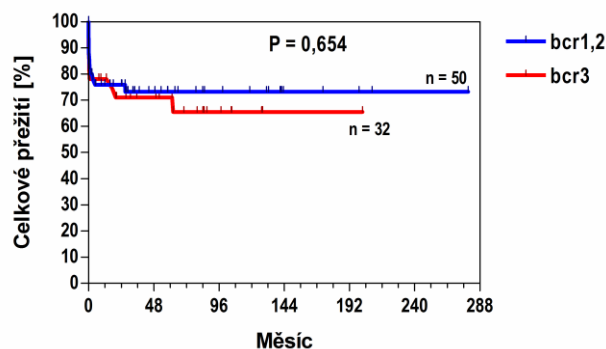
Vzhledem k nízkému počtu nemocných se zlomem genu *PML* v oblasti bcr2, byli tito pacienti analyzováni v jedné skupině s pacienty s bcr1. Pomocí RT-PCR bylo vyšetřeno 82 pacientů, 47 z nich mělo zlomové místo typu bcr1, 32 mělo bcr3 a zbylí 3 pacienti byli bcr2.

CR dosáhlo 65 z 82 (79,3 %) pacientů s APL. Místo zlomu nemělo žádný vliv na počet leukocytů v době diagnózy APL, medián počtu leukocytů byl u pacientů se zlomy bcr1 a bcr2  $1,4 \times 10^9/l$ , u bcr3 pozitivních  $2,4 \times 10^9/l$  ( $P = 0,147$ ). Rozdíl v obou skupinách nebyl ani v pravděpodobnosti docílení CR. CR dosáhlo 40 z 50 (80,0 %) pacientů se zlomy bcr1,2 a 25 ze 32 (78,2 %;  $P = 0,419$ ) pacientů s bcr3.

Ze 65 pacientů, kteří docílili CR, byl celkem u 11 (16,9 %) zachycen relaps (molekulární či klinický) onemocnění. Pravděpodobnost relapsu byla vyšší ve skupině nemocných se zlomem bcr3, relaps byl diagnostikován u 7 z 25 (28,0 %) pacientů, kteří předtím docílili molekulární remise. Ve skupině bcr1,2 byl relaps onemocnění zachycen pouze u 4 pacientů ze 40 (10,0 %;  $P = 0,030$ ) (obr. 18). Vyšší počet relapsů ale významně neovlivňoval OS pacientů ( $P = 0,654$ ) (obr. 19).



**Obr. 18:** Vliv místa zlomu genu *PML* (bcr1,2, resp. bcr3) na incidenci relapsů (molekulárních či klinických).

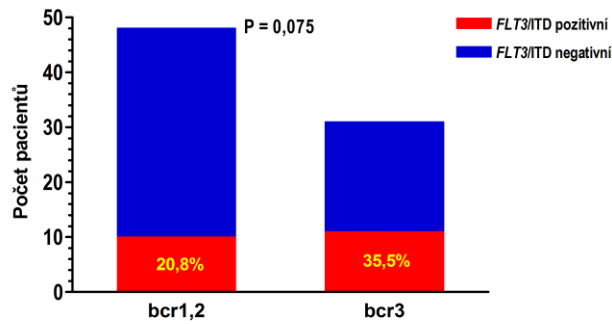


**Obr. 19** Vliv místa zlomu genu *PML* (bcr1,2, resp. bcr3) na OS pacientů.

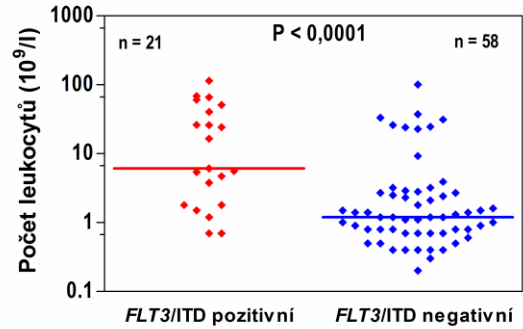
### 5.1.1.3 APL a *FLT3/ITD*

Prítomnost *FLT3/ITD* byla testována u 79 pacientů, u 21 (26,6 %) z nich byla prokázána. Výskyt *FLT3/ITD* byl nesignifikantně častější u pacientů se zlomem v oblasti bcr3, 11 ze 31 (35,5 %) pacientů v této skupině bylo pozitivních oproti 10 ze 48 (20,8 %) nemocných s bcr1,2 ( $P = 0,075$ ) (obr. 20).

Pacienti s APL nesoucí *FLT3/ITD* měli výrazně vyšší počty leukocytů při záchytu onemocnění (medián  $6,1$  oproti  $1,2 \times 10^9/l$  u negativních;  $P < 0,0001$ ) (obr. 21).

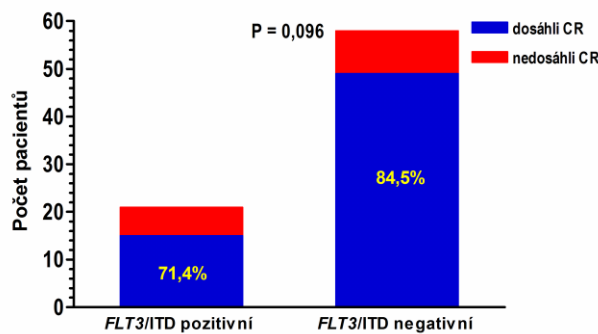


**Obr. 20:** Vliv místa zlomu genu *PML* na výskyt *FLT3/ITD*.

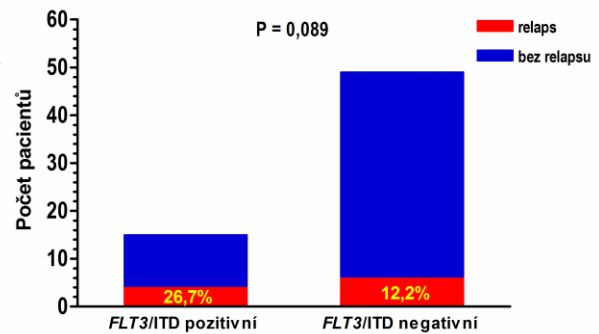


**Obr. 21:** Vliv pozitivity *FLT3/ITD* na počet leukocytů při diagnóze APL.

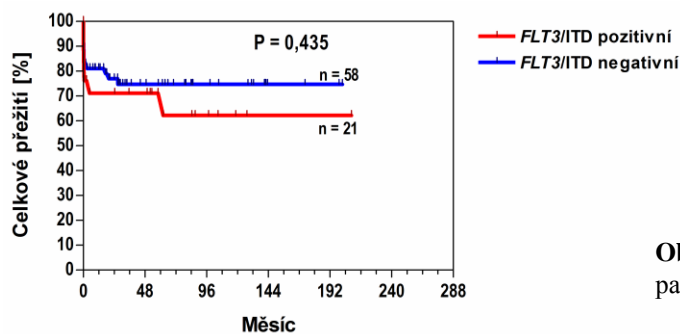
Positivita *FLT3/ITD* nepříznivě ovlivňovala jak šanci pacientů na docílení CR, tak i pravděpodobnost relapsu onemocnění, nicméně tyto rozdíly nedosáhly statistické significance. CR dosáhlo 15 z 21 (71,4 %) pacientů s *FLT3/ITD* a 49 z 58 (84,4 %) nemocných bez této aberace ( $P = 0,096$ ) (obr. 22). Molekulární či klinický relaps APL byl detekován u 4 z 15 (26,7 %) pacientů s *FLT3/ITD*, kteří docílili CR, a pouze u 6 ze 49 (12,2 %) nemocných bez pozitivity *FLT3/ITD* ( $P = 0,089$ ) (obr. 23). *FLT3/ITD* pozitivita neměla u pacientů s APL vliv na délku OS ( $P = 0,435$ ; obr. 24).



**Obr. 22:** Vliv pozitivity *FLT3/ITD* na docílení CR.



**Obr. 23:** Vliv pozitivity *FLT3/ITD* na incidenci relapsů (molekulárních či klinických).



**Obr. 24:** Vliv pozitivity *FLT3/ITD* na OS pacientů.

## 5.1.2 CBF-AML

### 5.1.2.1 Charakteristika pacientů

CBF-AML byla diagnostikována u 49 pacientů ze 762 nových případů AML (6,4 %). Medián věku pacientů v době diagnózy byl u této skupiny 38,7 let (18,5-70,6), poměr mužů a žen byl 34:15. Převaha mužů byla patrná zejména ve skupině *AML1/ETO* pozitivních pacientů (22 mužů, 5 žen), u *CBFβ/MYH11* byl poměr pohlaví vyrovnanější (12 mužů, 10 žen;  $P = 0,021$ ). Medián sledování pacientů byl 38,1 měsíců. Fúzní gen *AML1/ETO* mělo 27 nemocných, u 22 byl zachycen fúzní gen *CBFβ/MYH11*. Většina pacientů měla zlom typu A, pouze u dvou byl zachycen zlom D a u jednoho zlom J (viz obr. 4, str. 14). U 46 pacientů byla k dispozici RNA z doby diagnózy pro detekci sekundárních molekulárních aberací (*FLT3/ITD*, *FLT3/TKD*, mutace genů *C-KIT*, *K-RAS*). MRO pomocí kvantitativní RT-PCR bylo sledováno celkem u 39 pacientů.

### 5.1.2.2 Přítomnost sekundárních molekulárních aberací

Sekundární aberaci mělo 9 ze 26 (34,6 %) pacientů s fúzí *AML1/ETO*. Nejčastější sekundární aberací byly mutace genu *C-KIT*, zachycené ve 4 případech. U 2 pacientů byla zachycena *FLT3/ITD*, rovněž u 2 *FLT3/TKD*, mutace *K-RAS* byla detekována v jednom případě (tab. 9).

U pacientů s fúzí *CBFβ/MYH11* byly sekundární aberace častější, než u pacientů s *AML1/ETO*. Vyskytovaly se u 13 ze 20 (65,0 %) pacientů ( $P = 0,020$ ). Také u této skupiny byla nejčastější sekundární aberací mutace genu *C-KIT*, mělo ji 7 pacientů (u 6 z nich to byly delece/inzerce v exonu 10). U 2 pacientů byla zachycena *FLT3/ITD*, v 5 případech byla detekována mutace *FLT3/TKD* a ve 2 *K-RAS* mutace. Dva pacienti měli více než jednu sekundární aberaci (tab. 10).



**Tab. 9:** Charakteristika pacientů s fúzním genem *AML1/ETO* a přehled sekundárních mutací. NT - nebylo testováno, NA - nebylo analyzováno (u pacientů, kteří nedosáhli CR). 1 = ano, 0 = ne.

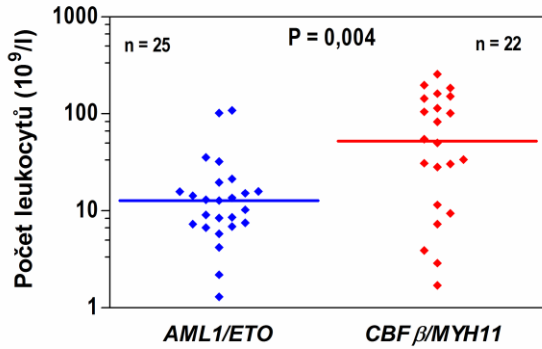
Pacient	Věk při dg.	Pohlaví	Leuko- [10 <sup>9</sup> /l]	FLT3/ITD	FLT3TKD	mutace C-KIT	mutace K-RAS	CR	Relaps
1	28,37	Ž	6,7	0	0	0	0	1	0
2	18,47	M	12,8	0	0	0	0	1	0
3	30,87	M	6,9	0	0	0	0	1	0
4	32,12	M	10,29	0	0	0	0	1	0
5	36,32	M	13,0	0	0	0	0	1	0
6	34,80	M	4,2	0	0	0	0	1	0
7	41,20	M	21,3	0	0	0	0	1	0
8	54,33	Ž	2,2	0	0	0	0	1	0
9	43,40	Ž	13,6	0	0	0	0	1	0
10	25,05	Ž	1,3	0	0	0	0	1	0
11	54,50	M	109,0	0	0	0	0	1	0
12	31,58	M	8,44	0	0	0	0	1	0
13	47,84	M	5,8	0	0	0	0	1	0
14	37,19	M	15,8	0	0	0	0	1	1
15	37,48	M	8,6	0	0	0	0	1	1
16	38,70	M	NT	0	0	0	0	1	1
17	67,10	M	35,5	0	0	0	0	0	NA
18	45,22	M	14,3	1	0	0	0	1	0
19	66,54	M	15,16	0	0	0	1	1	0
20	40,52	Ž	9,1	0	0	del. 816 GAC, inz. 816 GGG CCA	0	1	0
21	37,45	M	7,3	0	835 GAT-GAG	0	0	1	0
22	21,92	M	19,7	0	0	820 GAT-GGT	0	1	0
23	20,42	M	NT	0	0	816 GAC-CAC	0	1	1
24	42,51	M	32,3	0	835 GAT-GAG	0	0	1	1
25	40,53	M	102,0	1	0	0	0	0	NA
26	54,31	M	15,9	0	0	ITD 573-585 (39 nt)	0	0	NA
27	43,06	M	7,5	NT	NT	NT	NT	1	0

**Tab. 10:** Charakteristika pacientů s fúzním genem *CBFβ/MYH11* a přehled sekundárních mutací. NT - nebylo testováno. 1 = ano, 0 = ne.

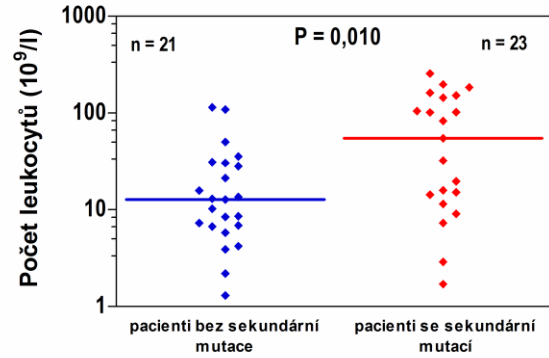
Pacient	Věk při dg.	Pohlaví	Leuko- [ $10^9/l$ ]	Typ zlomu	FLT3/ITD	FLT3TKD	Mutace C-KIT	Mutace K-RAS	CR	Relaps
28	66,2	Ž	28,2	D	0	0	0	0	1	0
29	36,8	M	7,3	A	0	0	0	0	1	0
30	38,3	M	50,2	A	0	0	0	0	1	0
31	37,4	Ž	114,6	D	0	0	0	0	1	0
32	23,4	M	3,9	A	0	0	0	0	1	0
33	29,1	M	30,5	A	0	0	0	0	1	1
34	29,7	M	31,0	A	0	0	0	0	1	1
35	22,3	Ž	54,7	A	0	835 GAT-TAT	0	0	1	0
36	58,3	M	1,7	A	0	836 del. ATC	0	0	1	0
37	52,6	Ž	11,5	A	0	0	del. 418-419 TAC GAC	0	1	0
38	56,2	M	82,9	A	0	0	0	1	1	1
39	29,6	M	101,7	A	0	835 GAT-GAA	0	0	1	1
40	30,4	M	105,3	A	0	0	del. 418 TAC, inz. 418 GGG TTT TTC	0	1	1
41	46,5	Ž	185,0	A	0	0	inz. 419 TTT TTC	0	1	1
42	58,8	M	161,4	A	0	0	0	1	1	1
43	37,2	Ž	144,5	A	1	0	0	0	1	1
44	58,4	Ž	198,0	A	0	835 GAT-GAG	del. 419-422 GAC AGG CTC GTG, inz. 419 TAC TCT CCG	0	1	1
45	30,9	M	256,1	A	0	0	inz. 419 TTC CTC	0	1	1
46	36,7	M	151,8	A	1	835 GAT-TAT	del. 416-419 CTG ACT TAC GAC, inz. CTC CTC	0	1	1
47	58,5	Ž	2,9	A	0	0	816 GAC-GTC	NT	1	1
48	70,6	Ž	9,4	J	0	NT	0	0	1	1
49	67,0	Ž	33,8	A	0	0	0	0	1	1

### 5.1.2.3 Počet leukocytů v době diagnózy

Medián počtu leukocytů v době diagnózy byl  $15,8 \times 10^9/l$  a výrazně se lišil jednak v závislosti na typu fúzního genu (obr. 25), jednak v závislosti na přítomnosti sekundární aberace (obr. 26). Vyšší počty leukocytů měli pacienti s fúzním genem *CBFβ/MYH11* ( $P = 0,004$ ) a pacienti se sekundární mutací ( $P = 0,010$ ).



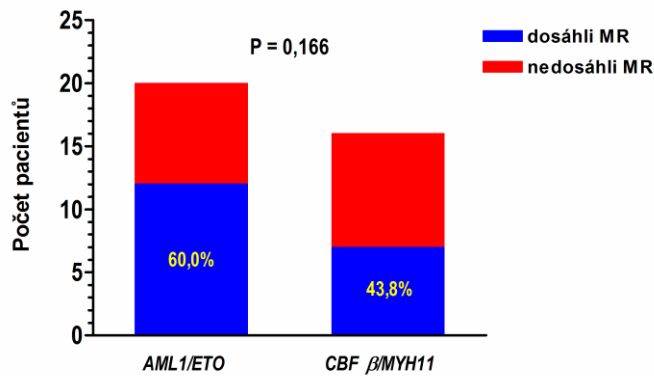
**Obr. 25:** Vliv typu fúzního genu na počet leukocytů v době diagnózy.



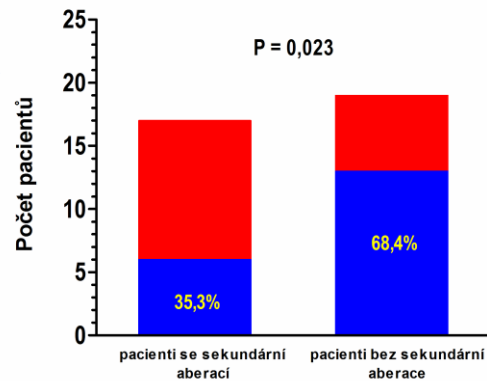
**Obr. 26** Vliv přítomnosti sekundární mutace na počet leukocytů v době diagnózy.

#### 5.1.2.4 CR a molekulární remise

CR dosáhli všichni pacienti s pozitivitou *CBFβ/MYH11* a 24 ze 27 (88,9 %) pacientů s *AML1/ETO*. Molekulární remise (molekulární negativita alespoň u dvou po sobě následujících odběrů kostní dřeně s minimálním intervalem 2 měsíců) bylo docíleno u 12 ze 20 (60,0 %) sledovaných pacientů s fúzním genem *AML1/ETO* a u 7 ze 16 (43,8 %) pacientů s fúzí *CBFβ/MYH11* ( $P = 0,166$ ) (obr. 27). Docílení molekulární remise bylo nepříznivě ovlivněno přítomností jakékoli ze sledovaných sekundárních aberací, bez ohledu na typ fúzního genu ( $P = 0,023$ ; obr. 28).



**Obr. 27:** Vliv typu fúzního genu na docílení molekulární remise.

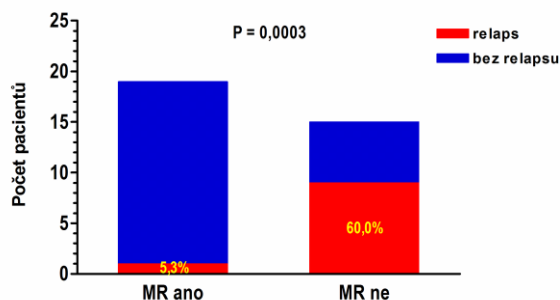


**Obr. 28** Vliv přítomnosti sekundární mutace na docílení molekulární remise.

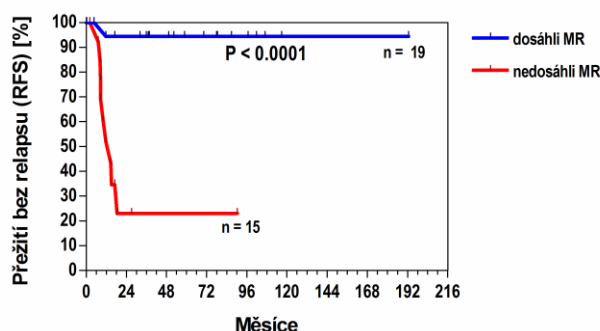
#### 5.1.2.5 Relapsy a RFS

Molekulární i klinický relaps byl později detekován pouze u 1 z 19 (5,3 %) pacientů, kteří docílili molekulární remise, zatímco ve skupině 15 pacientů, kteří molekulární remise nedocílili, došlo k 9 (60,0 %) relapsům onemocnění ( $P = 0,0003$ ) (obr. 29). RFS byl výrazně delší u pacientů s CBF-AML,

kteří dosáhli molekulární remise v porovnání s pacienty, u kterých přetrvávalo MRO ( $P < 0,0001$ ) (obr. 30).

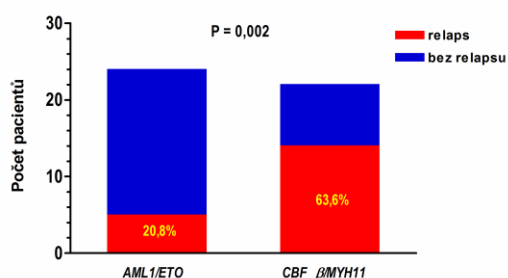


**Obr. 29:** Vliv dosažení molekulární remise (MR) na incidenci relapsů (molekulárních či klinických).

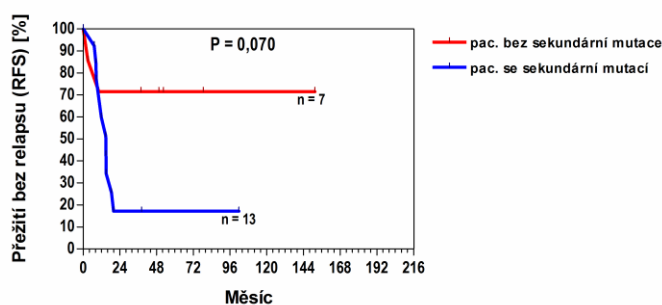


**Obr. 30:** Vliv dosažení molekulární remise (MR) na RFS pacientů.

Výskyt relapsů (molekulárních či klinických) byl výrazně vyšší ve skupině pacientů s fúzním genem *CBFβ/MYH11* (u 14 z 22 pacientů byl zachycen relaps onemocnění; 63,6 %) oproti *AML1/ETO* pozitivní skupině (5/24; 20,8 %;  $P = 0,002$ ) (obr. 31) a tyto pacienti také měli výrazně kratší RFS ( $P = 0,014$ ). Přítomnost sekundární mutace statisticky nevýznamně zvyšovala pravděpodobnost relapsu a zároveň zkracovala RFS pouze ve skupině pacientů s fúzí *CBFβ/MYH11* ( $P = 0,055$ , resp.  $P = 0,070$ ) (obr. 32). V případě nemocných s pozitivitou *AML1/ETO* neměly sekundární mutace žádný vliv ani na incidenci relapsů ani na RFS ( $P = 0,300$ , resp.  $P = 0,603$ ).



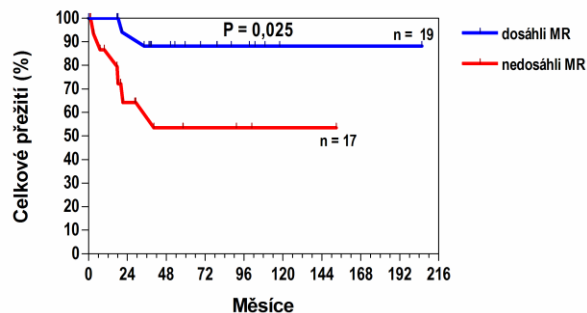
**Obr. 31:** Vliv typu fúzního genu na incidenci relapsů (molekulárních či klinických).



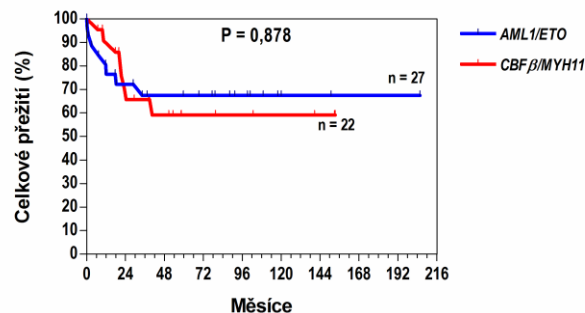
**Obr. 32:** Vliv přítomnosti sekundární mutace na RFS u pacientů s *CBFβ/MYH11*.

### 5.1.2.6 Celkové přežití pacientů

Pacienti, kteří docílili molekulární remise měli signifikantně delší OS v porovnání s těmi, u kterých přetrvávalo MRO ( $P = 0,025$ ) (obr. 33). OS nebyl ovlivněn konkrétním typem fúzního genu ( $P = 0,878$ ) (obr. 34).



**Obr. 33:** Vliv docílení molekulární remise (MR) na OS pacientů.



**Obr. 34:** Vliv typu fúzního genu na OS pacientů.

## 5.2 AML SE STŘEDNÍ CYTOGENETICKOU PROGNÓZOU

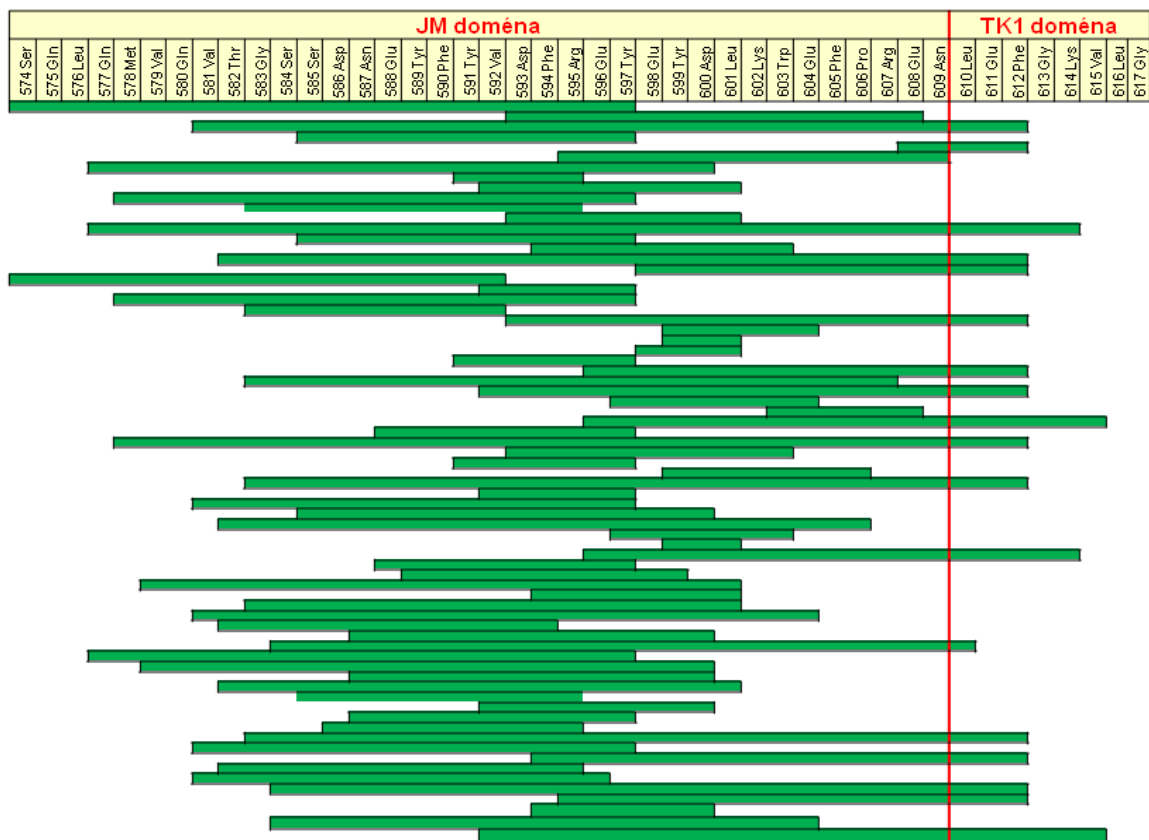
### 5.2.1 *FLT3/ITD*

#### 5.2.1.1 Charakteristika pacientů

Pro vyšetření *FLT3/ITD* byla k dispozici RNA od 297 pacientů se středním cytogenetickým rizikem. Ve skupině bylo přibližně stejně mužů i žen (146 : 151). Medián věku v době záchytu onemocnění byl 55,1 let (16,0-81,7), medián počtu leukocytů  $17,9 \times 10^9/l$  (0,4-483,7). Medián sledování pacientů byl 11,2 měsíce. Pozitivní nález byl zjištěn u 84 (28,3 %) nemocných. Pozitivita *FLT3/ITD* byla častější u nemocných mladších než 55 let ( $P = 0,028$ ) a nezávislá na pohlaví pacientů. *FLT3/ITD* byly nejčastější u morfologického subtypu FAB M4 (23 ze 46 pacientů; 50,0 %) a M1 (17 ze 49; 34,7 %).

#### 5.2.1.2 Přehled zachycených ITD

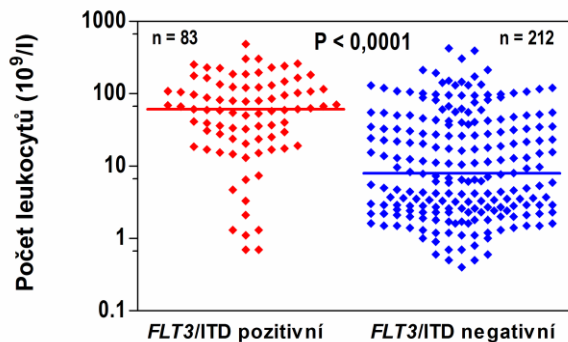
*FLT3/ITD* byla zachycena u 84 (28,3 %) z 297 pacientů, 9 pacientů mělo dvě a jeden tři různé ITD. Sedm pacientů expimovalo pouze mutovanou alelu. Délka interní tandemové duplikace (ITD) se pohybovala v rozmezí od 12 do 120 nukleotidů, medián délky byl 54 nukleotidů. 56 pacientů (ze 74 s pouze jednou ITD) mělo ITD integrovanou do JM domény (mezi kodony 572-609) genu *FLT3*, zbylých 18 (24,3 %) mělo ITD v TK1 doméně. ITD integrované v TK1 doméně byly u 17 z 18 pacientů delší než 39 nukleotidů. Nejčastěji duplikovanými aminokyselinami byly Arg v pozici 595 u 56 pacientů, Phe594 a Tyr597 u 55 a Glu596 u 54 nemocných (obr. 35).



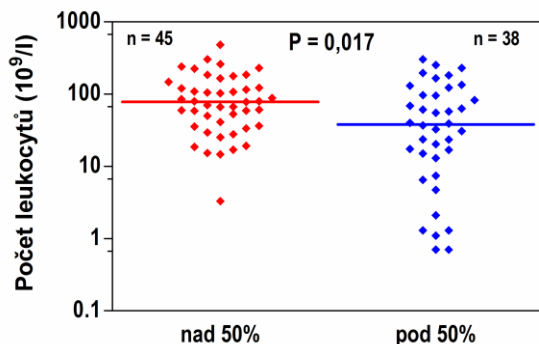
Obr. 35: Přehled délky zachycených ITD a zastoupení jednotlivých aminokyselin.

### 5.2.1.3 FLT3/ITD a počet leukocytů v době diagnózy

Pacienti s *FLT3*/ITD měli výrazně vyšší počty leukocytů v době diagnózy, mediány 60,2 vs. 7,8 x 10<sup>9</sup>/l u negativních ( $P < 0,0001$ ) (obr. 36). Procentuální zastoupení blastů v kostní dřeni bylo nevýznamně vyšší u nemocných s *FLT3*/ITD pozitivitou ( $P = 0,112$ ). Ani délka ITD, ani místo její inserce v JM doméně nebo TK1 doméně neměly žádný vliv na počet leukocytů ( $P = 0,524$ , resp.  $P = 0,463$ ). Pacienti s více než 50% zastoupením mutované alely měli vyšší počet leukocytů než nemocní s nižší alelickou náloží ( $P = 0,017$ ) (obr. 37).



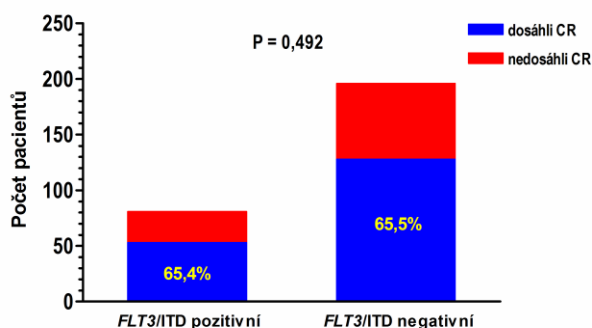
Obr. 36: Vliv *FLT3*/ITD pozitivity na počet leukocytů v době záchytu onemocnění.



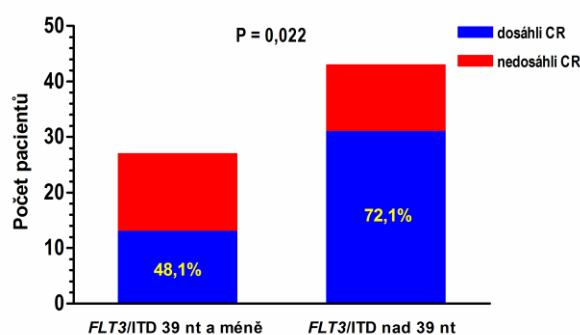
Obr. 37: Vliv procentuálního zastoupení mutované alely *FLT3*/ITD na počet leukocytů v době záchytu onemocnění.

### 5.2.1.4 *FLT3/ITD* a CR

Celkem 277 pacientů z 297 bylo léčeno indukční chemoterapií (1 nebo 2 cykly), CR dosáhlo 181 (65,3 %) z nich. Pozitivita *FLT3/ITD* neměla žádný vliv na docílení CR; CR dosáhlo 53 z 81 (65,4 %) pacientů s mutací stejně jako 128 ze 196 (65,3 %) nemocných bez této aberace ( $P = 0,492$ ) (obr. 38). Pacienti s ITD delší než 39 nukleotidů měli vyšší pravděpodobnost dosažení CR (CR dosáhlo 31 ze 43; 72,1 % těchto pacientů) v porovnání s nemocnými s ITD délkou 39 nukleotidů a kratší (pouze 13/28; 46,4 % jich docílilo CR;  $P = 0,022$ ) (obr. 39). Místo inserce ITD v JM nebo TK1 doméně, ani procentuální zastoupení mutované alely neměly žádný vliv na pravděpodobnost indukce CR ( $P = 0,428$ , resp.  $P = 0,478$ ).



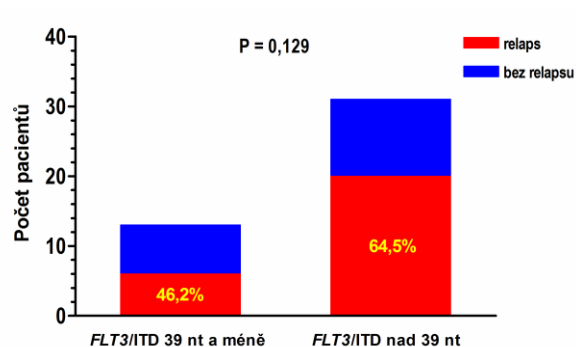
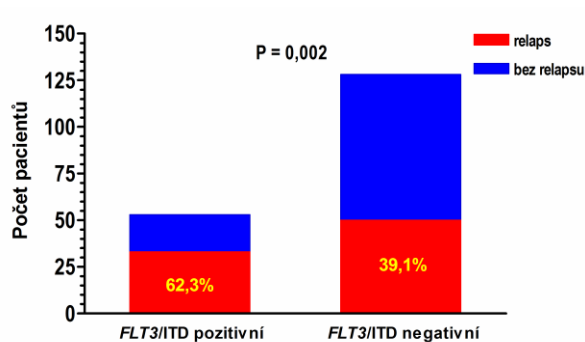
Obr. 38: Vliv *FLT3/ITD* na dosažení CR.



Obr. 39: Vliv délky ITD na dosažení CR.

### 5.2.1.5 *FLT3/ITD* a relapsy

Relaps byl diagnostikován celkem u 83 pacientů ze 181 (45,9 %), kteří dosáhli CR. Riziko relapsu bylo vyšší u nemocných s *FLT3/ITD* pozitivitou (zrelabovalo jich 33 z 53; 62,3 %) než u *FLT3/ITD* negativních pacientů (50/128; 39,1 %;  $P = 0,002$ ) (obr. 40). Pacienti s ITD delší než 39 nukleotidů měli statisticky nesignifikantně vyšší riziko relapsu onemocnění (u 20 ze 31; 64,5 % pacientů došlo k relapsu) v porovnání s nemocnými s ITD dlouhou 39 nukleotidů a kratší (6 ze 13; 46,2 %;  $P = 0,129$ ) (obr. 41).

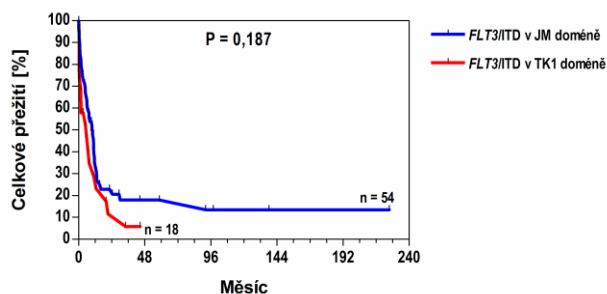
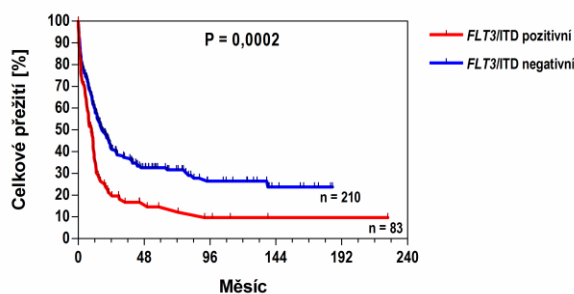


**Obr. 40:** Vliv *FLT3/ITD* na riziko relapsu onemocnění. **Obr. 41:** Vliv délky ITD na riziko relapsu onemocnění.

Místo inserce ITD v genu *FLT3* nemělo žádný vliv na pravděpodobnost relapsu onemocnění ( $P = 0,361$ ). Relaps byl detekován u 18 ze 28 (64,3 %) pacientů s vyšším než 50% zastoupením mutované alely v porovnání s 15 ze 25 (60,0 %) nemocnými s nižší než 50% alelickou náloží *FLT3/ITD* ( $P = 0,374$ ).

### 5.2.1.6 *FLT3/ITD* a OS pacientů

Celkové přežití ve skupině pacientů s intermediární cytogenetickou prognózou bylo výrazně kratší u pacientů s *FLT3/ITD* (9,7 oproti 17,5 měsíce u nemocných bez *FLT3/ITD*;  $P = 0,0002$ ) (obr. 42). Délka ITD ani procentuální zastoupení mutované alely neměly vliv na celkové přežití pacientů ( $P = 0,983$ , resp.  $0,575$ ). Pacienti s ITD integrovanou v TK1 doméně měli kratší OS (5,8 měsíce) v porovnání s pacienty s ITD v JM doméně (9,7 měsíce), nicméně tento rozdíl nebyl statisticky významný ( $P = 0,187$ ) (obr. 43).



**Obr. 42:** Vliv pozitivivity *FLT3/ITD* na OS pacientů.

**Obr. 43:** Vliv místa inserce ITD na OS pacientů.



## 5.2.2 MUTACE *FLT3/TKD*

### 5.2.2.1 Charakteristika pacientů

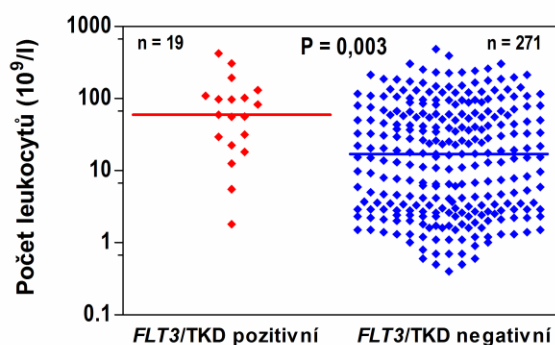
Přítomnost mutací *FLT3/TKD* v kodonech Arg835 a Ile836 byla testována u 292 pacientů se středním cytogenetickým rizikem. Mužů bylo 147, žen 145. Medián věku pacientů v době diagnózy AML byl 54,9 let (16,0-81,7), medián počtu leukocytů  $18,0 \times 10^9/l$  (0,4-483,7). Medián sledování byl 11,4 měsíce. 83 pacientů mělo *FLT3/ITD*. Mutace v TKD byla zachycena u 19 pacientů (6,5 %) a byla častější u žen (12 žen a 7 mužů s mutací). Její výskyt byl nezávislý na věku pacientů. *FLT3/TKD* mutace byly nejčastější u morfologického subtypu FAB M5 (3 ze 17 pacientů; 17,6 %) a M1 (3 z 51; 5,9 %).

### 5.2.2.2 Přehled zachycených mutací

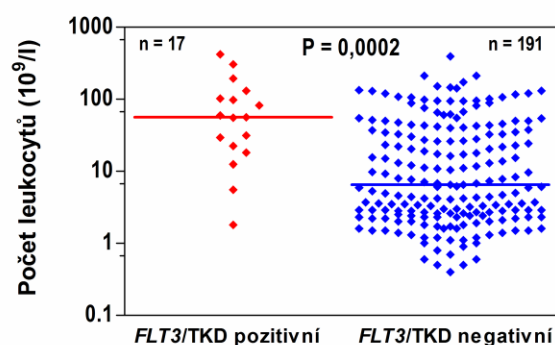
Pouze u jednoho pacienta byla zachycena delece kodonu Ile836, všichni ostatní měli mutaci postihující kodon Arg835. Nejčastější byla záměna Arg835Tyr zachycená u 8 z 19 pacientů, 4 pacienti měli mutaci Arg835Val a 3 Arg835His. Ostatní mutace byly detekovány vždy v jednom případě. Dva pacienti měli mutaci *FLT3/TKD* společně s *FLT3/ITD*.

### 5.2.2.3 Mutace *FLT3/TKD* a počet leukocytů v době diagnózy

Počet leukocytů byl vyšší u pacientů s *FLT3/TKD* pozitivitou ( $59,7$  vs.  $16,3 \times 10^9/l$ ;  $P = 0,003$ ) (obr. 44). Tento rozdíl byl ještě patrnější po vyřazení pacientů s *FLT3/ITD* ( $55,9$  vs.  $6,3 \times 10^9/l$ ;  $P = 0,0002$ ) (obr. 45). Nemocní s mutací *FLT3/TKD* měli nevýznamně vyšší procentuální zastoupení blastů v kostní dřeni ( $P = 0,108$ ), po vyřazení pacientů s pozitivitou *FLT3/ITD* byl tento rozdíl již na hranici statistického trendu ( $P = 0,068$ ).



**Obr. 44:** Vliv mutací *FLT3/TKD* na počet leukocytů v době záchytu onemocnění.



**Obr. 45:** Vliv mutací *FLT3/TKD* na počet leukocytů v době záchytu onemocnění, po vyřazení pacientů s *FLT3/ITD*.

#### 5.2.2.4 Mutace *FLT3*/TKD a CR

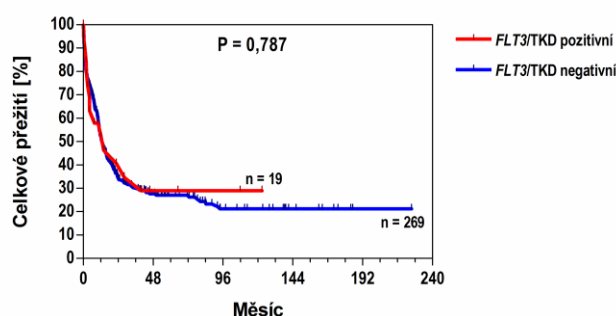
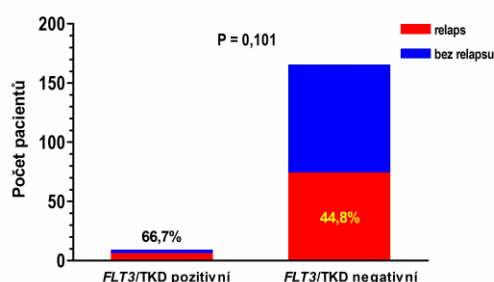
Indukční terapie s cílem dosáhnout CR byla podána celkem 270 ze 292 pacientů. CR dosáhlo 174 (64,4 %) z nich. CR bylo docíleno u 9 ze 17 (52,9 %) pacientů s mutací *FLT3*/TKD a u 165 z 253 (65,2 %) nemocných bez této aberace ( $P = 0,153$ ). Vyřazení pacientů s *FLT3*/ITD pozitivitou nemělo na výsledek analýzy žádný vliv ( $P = 0,184$ ).

#### 5.2.2.5 Mutace *FLT3*/TKD a relapsy

Relaps onemocnění byl diagnostikován u 80 (46,0 %) pacientů ze 174, u kterých bylo docíleno CR. Riziko relapsu bylo nesignifikantně vyšší u pacientů s mutací *FLT3*/TKD, relaps byl detekován u 6 z 9 (66,7 %) nemocných s mutací *FLT3*/TKD, ale jen u 74 ze 165 (44,8 %) pacientů bez této mutace ( $P = 0,101$ ) (obr. 46). Po vyřazení pacientů s *FLT3*/ITD z analýzy byl tento rozdíl na úrovni statistického trendu ( $P = 0,075$ ).

#### 5.2.2.6 Mutace *FLT3*/TKD a OS pacientů

Přítomnost mutací *FLT3*/TKD neměla žádný vliv na celkové přežití pacientů (13,9 měsíce u pozitivních v porovnání s 12,9 měsíce u negativních;  $P = 0,787$ ) (obr. 47), ani po vyloučení nemocných s *FLT3*/ITD z analýzy ( $P = 0,781$ ).



Obr. 46: Vliv mutací *FLT3*/TKD na incidenci relapsů. Obr. 47: Vliv mutací *FLT3*/TKD na OS pacientů.

### 5.2.3 MUTACE *DNMT3A*

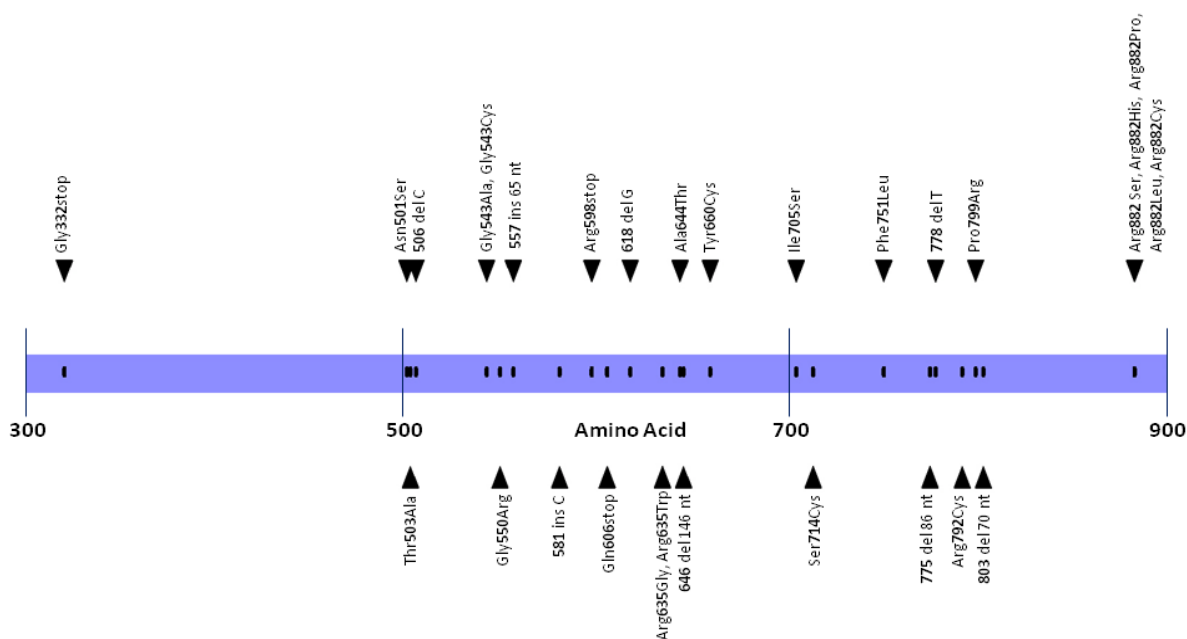
#### 5.2.3.1 Charakteristika pacientů

Přítomnost mutací genu *DNMT3A* byla testována u 226 pacientů se středním cytogenetickým rizikem, u kterých byl dostupný vzorek RNA. Medián věku v době diagnózy byl u této skupiny

pacientů 54,9 let (18,2-81,7), ve skupině bylo 107 mužů a 119 žen. Medián počtu leukocytů při záchytu onemocnění byl  $22,5 \times 10^9/l$  (0,5-483,7). Medián sledování byl 11,6 měsíce.

### 5.2.3.2 Přehled zachycených mutací

Celkem byla mutace genu *DNMT3A* zachycena u 67 (29,6 %) z 226 pacientů. 41 (61,2 %) z nich mělo bodovou mutaci v kodonu Arg882, nejčastější byla záměna Arg882His, detekovaná ve 30 případech, dále Arg882Cys u 8 nemocných a po jednom případě se záměnou Arg882Ser, Arg882Pro a Arg882Leu. 19 pacientů mělo bodovou mutaci v jiném kodonu. 9 mutací bylo typu frameshift, 3 z nich byly delece 1 nukleotidu, jeden pacient měl jednonukleotidovou inserci. Zbývajících 5 frameshift mutací bylo způsobeno bodovou mutací v exon/intron sestřihovém místě a vedly u dvou pacientů k deleci celého exonu 21, u jednoho pacienta k deleci exonu 20 a u dalšího k deleci exonu 17. Zbývající pacient měl naopak inserci části intronu 14, způsobenou také jednonukleotidovou záměnou v sestřihové oblasti (obr. 48). Dva pacienti měli dvě různé mutace a u jednoho byly zachyceny dokonce tři různé změny.

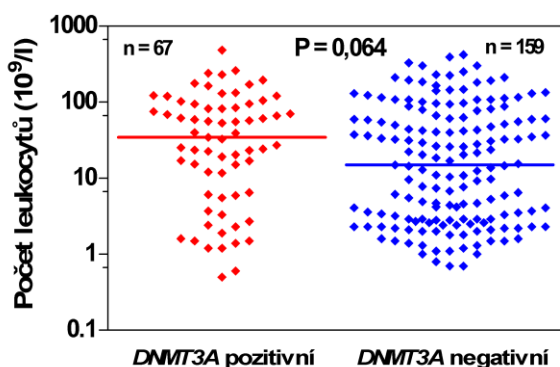


Obr. 48: Přehled zachycených mutací *DNMT3A*.

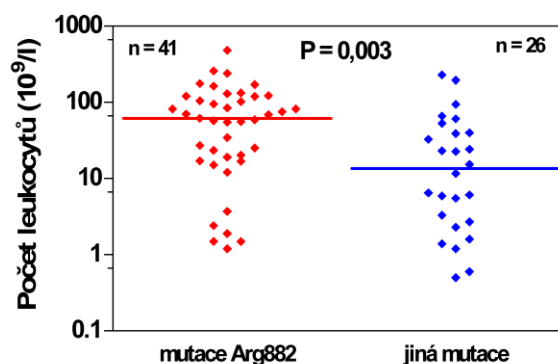
Výskyt mutací byl vyšší u žen (35,3 %) než u mužů (23,6 %;  $P = 0,027$ ) a byl nezávislý na věku pacientů. Mutace *DNMT3A* se nejčastěji vyskytovaly u FAB subtypu M1 (18 ze 47; 38,3 % těchto pacientů mělo mutaci) a M4 (17/50; 34,0 %). Pozitivita *DNMT3A* byla často spojena s přítomností *FLT3/ITD* ( $P = 0,003$ ): 30 ze 67 nemocných s mutací *DNMT3A* mělo zároveň *FLT3/ITD*.

### 5.2.3.3 Mutace *DNMT3A* a počet leukocytů v době diagnózy

Pacienti s mutací *DNMT3A* měli nevýznamně vyšší počty leukocytů v době záchytu AML (medián 34,5 oproti 15,0 x 10<sup>9</sup>/l u nemutovaných pacientů; P = 0,064) (obr. 49). Zvýšený počet leukocytů byl ještě více patrný u nemocných s bodovou mutací v kodonu Arg882, nejen v porovnání s pacienty bez mutace (62,0 vs. 15,0 x 10<sup>9</sup>/l; P = 0,002), ale i v porovnání s pacienty s mutacemi *DNMT3A* v jiných pozicích (P = 0,003) (obr. 50). Ve skupině *FLT3*/ITD negativních pacientů nezpůsobovala mutace genu *DNMT3A* vyšší počet leukocytů (P = 0,858).



Obr. 49: Vliv přítomnosti mutace *DNMT3A* na počet leukocytů v době diagnózy.



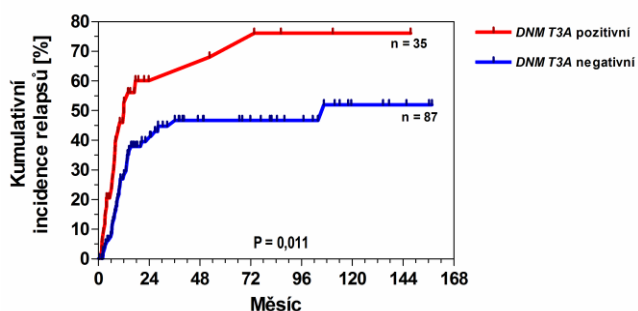
Obr. 50: Vliv typu mutace *DNMT3A* na počet leukocytů v době diagnózy.

### 5.2.3.4 Mutace *DNMT3A* a CR

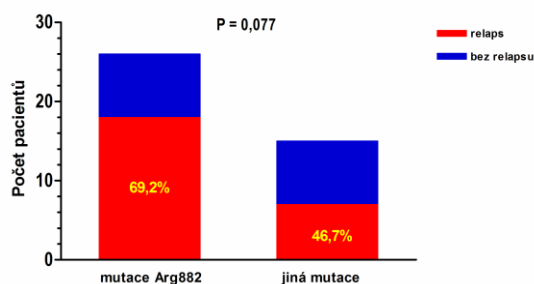
Mutovaný gen *DNMT3A* nesnižoval šanci pacientů na docílení CR. CR docílilo 41 ze 67 (61,2 %) nemocných s mutací, stejně jako 95 ze 161 (61,2 %) pacientů bez mutace (P = 0,380). Po vyloučení pacientů, kteří byli léčeni pouze paliativní léčbou, byl patrný mírný trend ke snazšímu dosažení CR ve skupině pacientů s mutací *DNMT3A*. CR dosáhlo 70,7 % těchto pacientů v porovnání s 61,6 % pacientů bez mutace (P = 0,112). Pozice mutace neměla žádný vliv na docílení CR (63,4 % případů s mutací Arg882 docílilo CR, stejně jako 57,7 % těch s mutací v jiné pozici; P = 0,320).

### 5.2.3.5 Mutace *DNMT3A* a relapsy

Incidence relapsů byla signifikantně vyšší u pacientů s mutací *DNMT3A*, relaps onemocnění byl diagnostikován u 25 ze 41 (61,0 %) mutovaných pacientů oproti 36 z 95 (37,9 %) pacientů bez této mutace (P = 0,007). RFS byl signifikantně kratší u pacientů s mutací v porovnání s pacienty s wt *DNMT3A* (P = 0,011) (obr. 51). Ve skupině nemocných s mutací *DNMT3A* častěji relabovali pacienti s mutací v pozici Arg882 (69,2 % vs. 46,7 %; P = 0,077), nicméně tento rozdíl nedosáhl statistické signifikance (obr. 52).



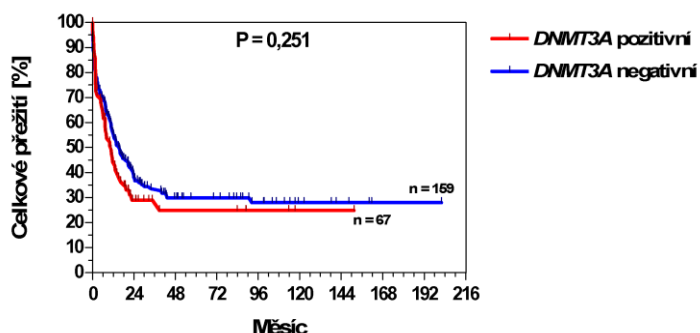
**Obr. 51:** Kumulativní incidence relapsů *DNMT3A* mutovaných a nemutovaných pacientů.



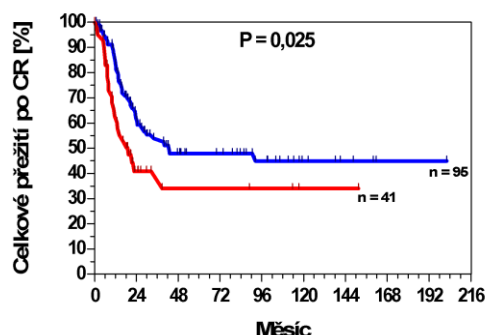
**Obr. 52:** Vliv typu mutace *DNMT3A* na incidenci relapsů.

### 5.2.3.6 Mutace *DNMT3A* a OS

OS nebyl ovlivněn přítomností mutace *DNMT3A* při analýze celé skupiny pacientů se středním cytogenetickým rizikem, medián přežití byl 15,4 měsíce u pacientů bez mutace a 10,9 u nemocných s mutací ( $P = 0,251$ ) (obr. 53). Rovněž nebyl žádný rozdíl v délce OS v závislosti na pozici mutace ( $P = 0,739$ ). Po vyřazení pacientů, kteří nedocílili CR, se výrazně zkrátilo přežití nemocných s mutací (19,5 vs. 42,8 měsíce,  $P = 0,025$ ) (obr. 54).



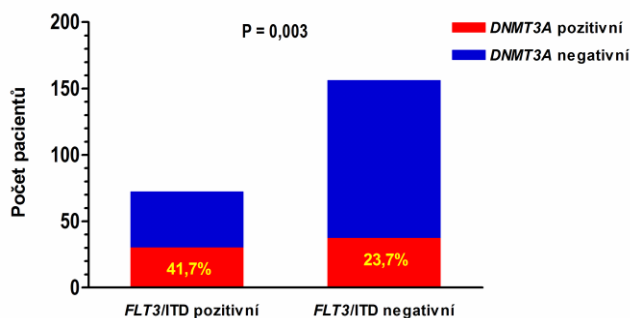
**Obr. 53:** Vliv mutace *DNMT3A* na OS pacientů.



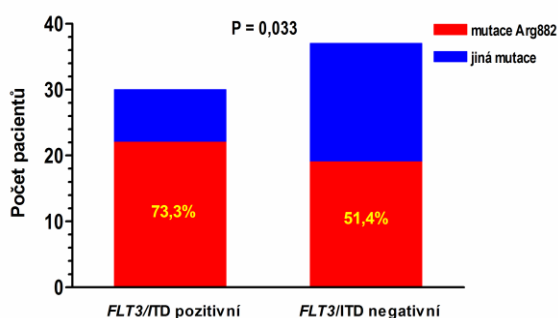
**Obr. 54:** Vliv mutace *DNMT3A* na přežití pacientů po dosažení CR.

### 5.2.3.7 Mutace *DNMT3A* a *FLT3/ITD*

Přítomnost mutací *DNMT3A* byla často spojena s pozitivitou *FLT3/ITD*; 30 ze 72 (41,7 %) pacientů s *FLT3/ITD* mělo zároveň mutaci *DNMT3A*, naopak ve skupině 156 pacientů s wt *FLT3* bylo pouze 37 (23,7 %) jedinců s mutací *DNMT3A* ( $P = 0,003$ ) (obr. 55). *FLT3/ITD* pozitivní pacienti měli častěji mutaci v kodonu Arg882 ( $P = 0,033$ ) (obr. 56).



**Obr. 55:** Korelace výskytu mutace *DNMT3A* a *FLT3/ITD*.

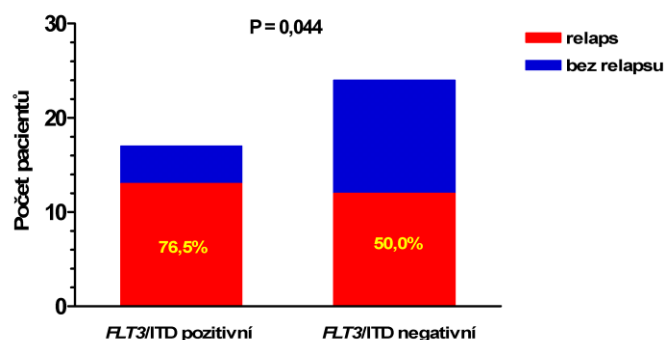


**Obr. 56:** Typ mutace *DNMT3A* v závislosti na přítomnosti *FLT3/ITD*.

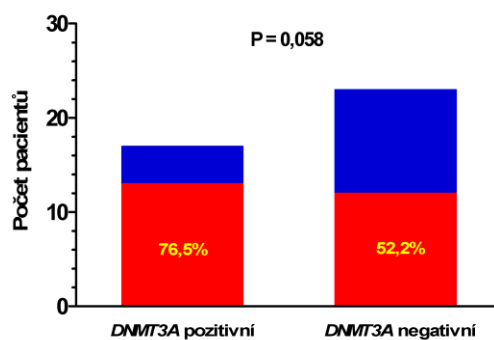
Pravděpodobnost docílení CR u skupiny *DNMT3A* mutovaných pacientů nebyla zásadně ovlivněna přítomností *FLT3/ITD*; CR dosáhlo 56,7 % pacientů s oběma aberacemi a 64,9 % pacientů se samotnou mutací *DNMT3A* ( $P = 0,247$ ).

Kombinace těchto dvou aberací zvyšovala riziko relapsu jak v porovnání s pacienty se samotnou mutací *DNMT3A* (k relapsu došlo u 13 ze 17 pacientů s oběma aberacemi (76,5 %) vs. u 12 ze 24 pacientů se samotnou mutací *DNMT3A* (50,0 %);  $P = 0,044$ ) (obr. 57), tak i ve srovnání s pacienty s pouze *FLT3/ITD* (76,5 % vs. 12 ze 23 pacientů se samostatnou *FLT3/ITD* (52,2 %;  $P = 0,058$ ) (obr. 58). Ve skupině pacientů bez *FLT3/ITD* častěji relabovali pacienti s mutací *DNMT3A* (50,0 % vs. 33,3 % bez *DNMT3A* mutace;  $P = 0,072$ ), tento rozdíl však již nedosáhl statistické signifikance.

Ve skupině *FLT3/ITD* pozitivních pacientů mutace *DNMT3A* nejen nevýznamně zkracovaly OS (6,09 vs. 9,70 měsíců;  $P = 0,096$ ), ale i přežití pacientů po docílení CR (11,0 vs. 19,1;  $P = 0,012$ ). U *FLT3/ITD* negativních pacientů mutace *DNMT3A* neměly žádný vliv ani na jeden z těchto ukazatelů.



**Obr. 57:** Vliv *FLT3/ITD* na výskyt relapsů u pacientů s *DNMT3A* mutací.



**Obr. 58:** Vliv *DNMT3A* mutace na výskyt relapsů u pacientů s *FLT3/ITD*.

U pacientů s mutací *DNMT3A* přítomnost *FLT3/ITD* významně zkracovala OS (6,1 oproti 19,5 měsíce u nemocných bez *FLT3/ITD*;  $P = 0,001$ ). Ze 30 pacientů s oběma uvedenými aberacemi přežívají pouze 3, všichni po HSCT.

#### **5.2.3.8 Sledování MRO pomocí monitorace mutací *DNMT3A***

MRO je pomocí mutací *DNMT3A* sledováno prozatím u 5 pacientů, 3 z nich mají dvě různé mutace v kodonu Arg882 (Arg882His a Arg882Cys), zbývající dva mají každý specifickou mutaci (Ile655Ser a Arg771Gln). Všichni pacienti docílili molekulární remise, ale medián sledování je u nich zatím krátký (4,8 měsíce).

#### **5.2.4 MUTACE *ASXL1***

##### **5.2.4.1 Charakteristika pacientů**

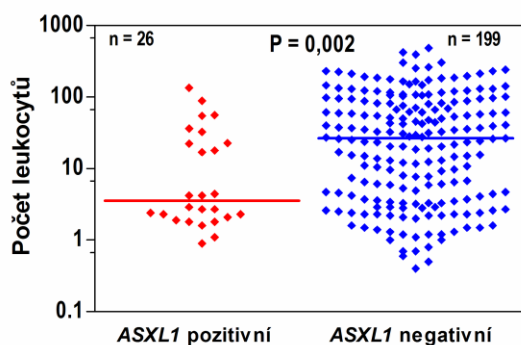
Pro analýzu mutací *ASXL1* genu byla k dispozici RNA od 226 pacientů se střední cytogenetickou prognózou. Poměr mužů a žen byl 109 : 117, medián věku pacientů v době diagnózy AML byl 55,1 let (18,1-81,7). Medián počtu leukocytů při záchytu onemocnění byl  $23,1 \times 10^9/l$  (0,4-483,7) a medián délky sledování pacientů 13,0 měsíců.

##### **5.2.4.2 Přehled zachycených mutací**

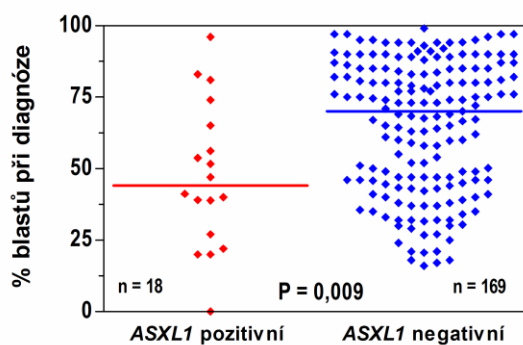
Mutace *ASXL1* byla detekována u 26 z 226 (11,5 %) pacientů. Bylo zachyceno 6 různých frameshift a 9 různých bodových mutací, z nichž 5 byly nonsense mutace, vedoucí k vytvoření předčasného stop kodonu, a 4 mutace byly typu missense. Jeden pacient měl dvě různé mutace. Další 5 různých missense záměn byly polymorfismy. Přítomnost mutace *ASXL1* byla jen výjimečně spojena s pozitivitou *FLT3/ITD* (4 ze 26 pacientů;  $P = 0,028$ ) a byla nezávislá na mutačním stavu *DNMT3A* genu.

##### **5.2.4.3 Mutace *ASXL1* a počet leukocytů v době diagnózy**

Pacienti s mutovaným genem *ASXL1* měli významně nižší počty leukocytů při záchytu onemocnění, než pacienti bez mutace (mediány  $3,5$  vs.  $26,4 \times 10^9/l$ ;  $P = 0,002$ ) (obr. 59). Zároveň měli i nižší procento blastů v kostní dřeni (44,1 % oproti 70,0 % u nemocných s wt *ASXL1*;  $P = 0,009$ ) (obr. 60).



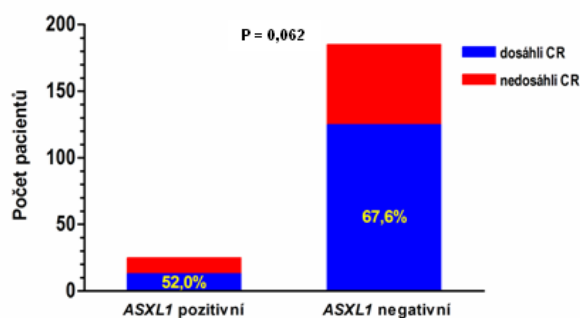
**Obr. 59:** Vliv mutace *ASXL1* na počet leukocytů v době diagnózy.



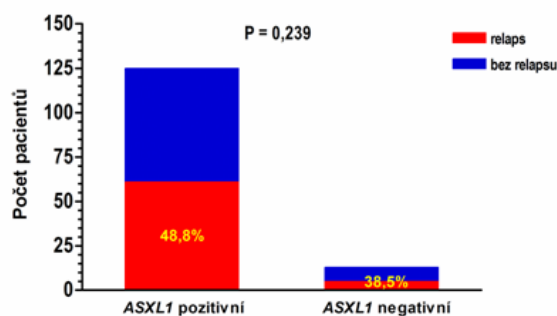
**Obr. 60:** Vliv mutace *ASXL1* na procentuální zastoupení blastů v KD v době diagnózy.

#### 5.2.4.4 Mutace *ASXL1*, CR, relapsy a OS pacientů

Mutovaný gen *ASXL1* statisticky nevýznamně snižoval šanci pacientů na docílení CR. Pouze 13 ze 25 (52,0 %) pacientů s mutací *ASXL1*, kteří byli léčeni standardní indukční terapií dosáhlo CR, v porovnání s 67,6 % (125/185) nemocných s wt genem *ASXL1* ( $P = 0,062$ ) (obr. 61). Pozitivita *ASXL1* neměla vliv ani na incidenci relapsů (zrelabovalo 38,5 % pacientů s mutací, stejně jako 48,8 % pacientů bez mutace;  $P = 0,239$ ) (obr. 62), ani na délku RFS ( $P = 0,670$ ). Přítomnost *ASXL1* mutace neměla žádný vliv na OS pacientů ( $P = 0,770$ ).



**Obr. 61:** Vliv mutace *ASXL1* na docílení CR.



**Obr. 62:** Vliv mutace *ASXL1* na incidenci relapsů.

#### 5.2.5 TRANSLOKACE GENU *MLL*

##### 5.2.5.1 Charakteristika pacientů

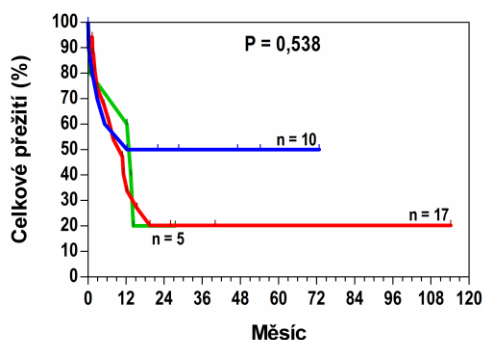
Celkem bylo pomocí analýzy karyotypu a FISH identifikováno 32 z 694 (5,5 %) pacientů s přestavbou genu *MLL*. Medián věku při diagnóze byl 49,0 let (19,2-67,9), 14 bylo mužů, 18 žen.



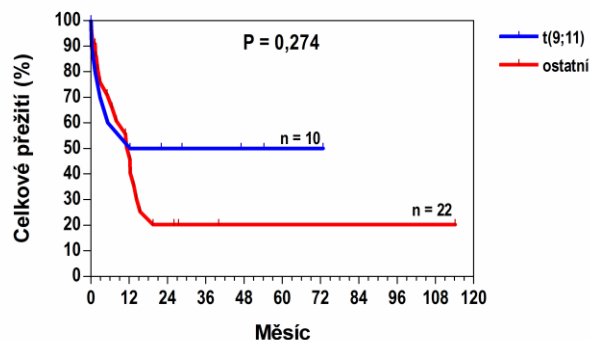
Šestnáct pacientů mělo translokace t(9;11) nebo t(11;19) a byli tedy zařazeni do skupiny se středním cytogenetickým rizikem podle Grimwada *et al.* [11]. Zbýlých 16 pacientů patřilo do skupiny s nepříznivým rizikem.

### 5.2.5.2 Přehled zachycených translokací *MLL* genu a OS pacientů

Pomocí RT-PCR byly identifikovány konkrétní fúzní geny a přesná místa jejich zlomů celkem u 16 pacientů (u 10 pac. byl zachycen fúzní gen *MLL/AF9*, po dvou nemocných mělo fúzi *MLL/ELL*, resp. *MLL/ENL*, 1 pac. byl *MLL/AF10* a 1 *MLL/MSF* pozitivní). Pacienti s translokacemi t(9;11) a t(11;19), zařazení do skupiny se střední prognózou, byli v době diagnózy mladší, medián věku u nich byl 42,6 let v porovnání s 53,7 lety u pacientů s ostatními translokacemi ( $P = 0,033$ ). CR docílilo 12 ze 14 (85,7 %) pacientů s translokacemi t(9;11) a t(11;19) a 9 ze 13 (69,9 %,  $P = 0,152$ ) nemocných s ostatními translokacemi *MLL* genu. Tři roky od diagnózy byl OS pacientů s t(9;11) 45,5 %, zatímco ve skupině s t(11;19) to bylo pouze 20 %, podobně jako u pacientů s ostatními *MLL* translokacemi. Počet pacientů v jednotlivých hodnocených skupinách byl však poměrně nízký (obr. 63, 64).



**Obr. 63:** Vliv translokací *MLL* genu na OS pacientů.



**Obr. 64:** Srovnání OS pacientů s t(9;11) se skupinou pacientů s ostatními translokacemi *MLL* genu.

### 5.2.5.3 Sledování MRO pomocí translokací *MLL* genu

MRO pomocí real time RT-PCR bylo sledováno u všech 15 pacientů, u kterých byl identifikován konkrétní fúzní gen. Molekulární remise dosáhlo 12 pacientů, 5 z nich později zrelabovalo. Další 3 pacienti zemřeli v molekulární remisi v důsledku potransplantačních komplikací.

## 5.3 AML S NEPŘÍZNIVOU CYTOGENETICKOU PROGNÓZOU

### 5.3.1 CHARAKTERISTIKA PACIENTŮ

Do skupiny s nepříznivou cytogenetickou prognózou bylo na základě vyšetření karyotypu zařazeno 119 pacientů (58 mužů, 61 žen). Medián věku pacientů v době diagnózy byl 58,4 let (18,7-78,2), medián počtu leukocytů  $9,2 \times 10^9/l$  (0,7-231,4). 30 nemocných mělo sekundární AML, nejčastěji po předcházejícím MDS. Medián sledování pacientů byl 5,2 měsíce. Ze 106 pacientů, u kterých byly údaje k dispozici, 42 (39,6 %) dosáhlo CR, u 21 z nich byl později diagnostikován relaps onemocnění.

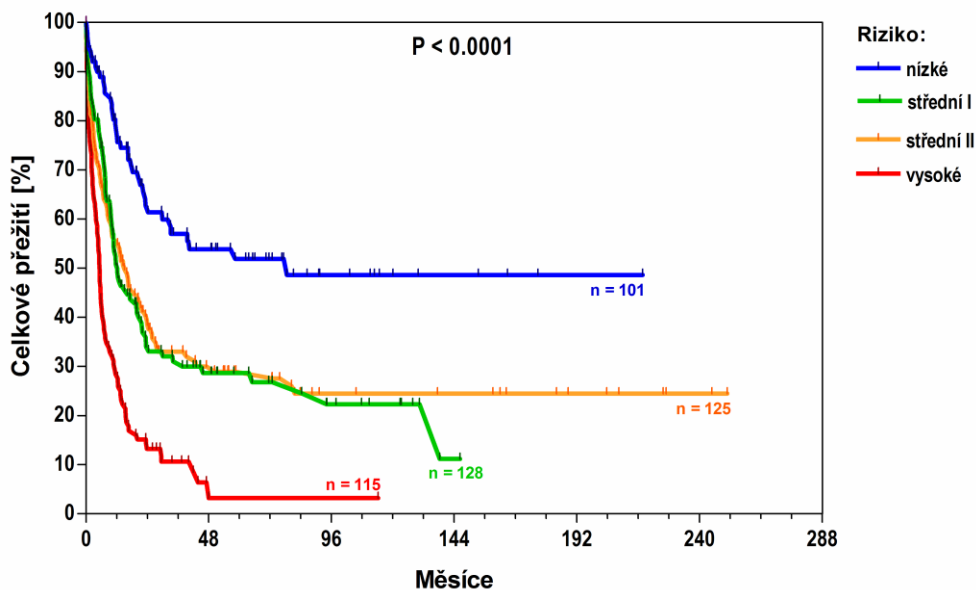
### 5.3.2 MUTACE TP53

Přítomnost mutací v genu *TP53* je nejčastěji popisována u pacientů s komplexními změnami karyotypu (4 a více abnormalit) [12], proto byli na její přítomnost testováni pouze tito pacienti. Komplexní změny karyotypu byly detekovány u 60 ze 119 (50,4 %) nemocných, přítomnost mutací v genu *TP53* byla testována u 26 z nich. Mutace byla zachycena u 17 (65,4 %) nemocných, u 8 pacientů nebyla detekována wt alela a jeden pacient měl dvě různé mutace. 13 mutací bylo typu missense, zbylé čtyři byly frameshift delece 1-14 nukleotidů.

CR docílilo 6 ze 17 (35,3 %) pacientů s mutací *TP53*, u 4 z nich byl později detekován relaps AML. Přežívá pouze jedna pacientka po HSCT.

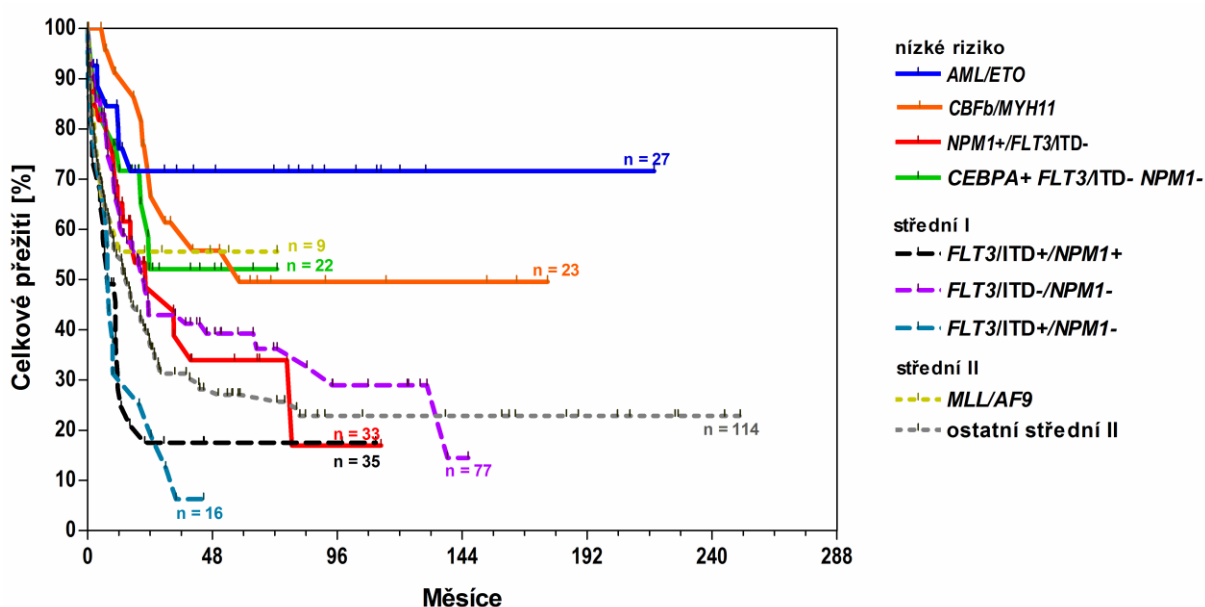
## 5.4 HODNOCENÍ OS PODLE KRITERIÍ ELN

Na závěr bylo zhodnoceno celkové přežití pacientů podle kritérií ELN [12], která rozdělují pacienty s AML do 4 rizikových skupin. Do analýz nejsou zařazeni pacienti s APL. Pro rozdělení pacientů do rizikových skupin byly použity výsledky mutačních analýz genů *NPM1* a *CEBPA* poskytnuté oddělením molekulární genetiky ÚHK. Tři roky od diagnózy přežívalo 57,0 % pacientů s aberacemi s nízkým rizikem a 10,6 % pacientů ve skupině s vysokým rizikem. Mezi pacienty zařazenými do skupin se středním rizikem I a středním rizikem II nebyl patrný výrazný rozdíl v OS, tři roky po diagnóze AML přežívalo 30,1 % resp. 33,0 % těchto pacientů (obr. 65).

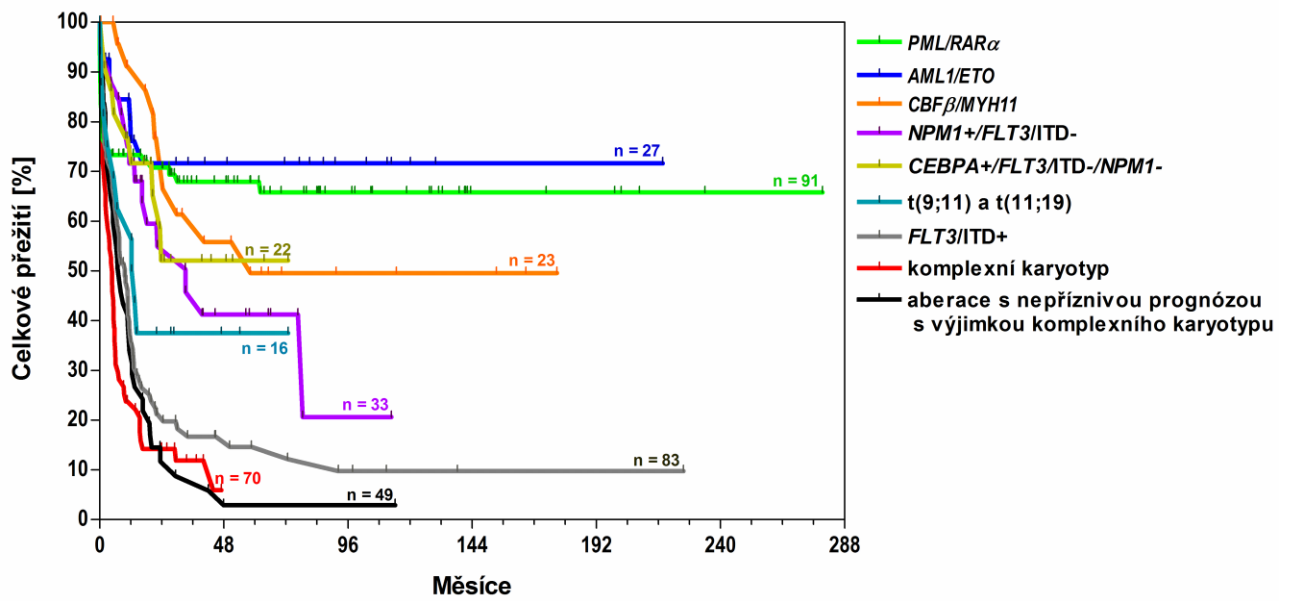


Obr. 65: OS pacientů podle kriterií ELN.

Po podrobnějším rozdělení pacientů do skupin podle jednotlivých fúzních genů (včetně pacientů s APL) a přítomnosti sledovaných mutací, dosahovali nejlepších výsledků pacienti s fúzními geny *AML1/ETO* a *PML/RAR $\alpha$* . V obou těchto skupinách přeživalo tři roky od diagnózy přibližně 70 % pacientů. Přes 60 % pacientů přeživalo ve skupině nemocných s fúzním genem *CBF $\beta$ /MYH11*, o něco hůře na tom byli pacienti s mutací genu *CEBPA* (bez současně se vyskytující *FLT3/ITD* a mutace *NPM1* genu) a pacienti s fúzním genem *MLL/AF9*. Tři roky od diagnózy přeživalo pouze přibližně 40 % pacientů s mutací *NPM1* a zároveň *FLT3/ITD* negativních. Nejhorších výsledků dosahovali pacienti s ITD genu *FLT3* a podle očekávání také pacienti s komplexním karyotypem a ostatními prognosticky nepříznivými aberacemi (obr. 66, 67).



Obr. 66: OS pacientů s non-APL AML podle kriterií ELN; rozdělení podskupin v závislosti na přítomnosti jednotlivých molekulárních a cytogenetických aberací.



**Obr. 67:** OS pacientů v závislosti na přítomnosti jednotlivých molekulárních a cytogenetických aberací.

## 6. DISKUSE

Stanovení diagnózy, prognózy a léčby AML se odvíjí od morfologického, cytogenetického a molekulárně genetického vyšetření vzorku kostní dřeně a/nebo periferní krve. Na základě vyšetření karyotypu jsou pacienti rozděleni do základních prognostických kategorií. V ÚHKT je používána britská klasifikace cytogenetických aberací u AML podle Grimwada *et al.* z roku 2010 [11], která dělí pacienty do tří skupin. Pomocí vyšetření RT-PCR jsou zachyceni všichni pacienti s fúzními geny *PML/RAR $\alpha$*  (kteří jsou léčeni specifickou terapií), *AML1/ETO* a *CBF $\beta$ /MYH11*, které vznikají při prognosticky příznivých translokacích t(15;17), t(8;21) a t(16;16)/inv16. Pacienti se středním cytogenetickým rizikem jsou dále vyšetřováni na přítomnost *FLT3/ITD*, jejíž pozitivita je nepříznivým prognostickým markerem v rámci této skupiny a pacienti jsou po dosažení 1. CR indikováni k transplantaci. Dále jsme u skupiny pacientů s intermediární cytogenetickou prognózou testovali přítomnost mutací v genech *DNMT3A*, *NPM1*, *CEBPA*, *ASXL1* a mutací v TKD genu *FLT3*, ve snaze zjistit jejich prognostický význam v rámci této skupiny.

Hlavním cílem této práce bylo zhodnotit vliv přítomnosti *FLT3/ITD* (včetně vlivu její délky, místa inserce a procentuálního zastoupení mutované alely) a dalších výše uvedených mutací na vývoj a prognózu onemocnění u pacientů s AML se středním cytogenetickým rizikem, diagnostikovaných v ÚHKT. Dále byl analyzován vliv sekundárních molekulárních aberací (*FLT3/TKD*, *C-KIT* a *RAS* mutací) na prognózu pacientů s prognosticky příznivými fúzními geny *AML1/ETO* a *CBF $\beta$ /MYH11*.

ELN klasifikace rozděluje pacienty s AML (s výjimkou APL pacientů) do čtyř prognostických kategorií v závislosti na přítomnosti předem definovaných cytogenetických a molekulárně genetických markerů [12]. Při použití těchto kritérií v našem souboru pacientů bylo do skupiny s nízkým rizikem zařazeno 101 pacientů, 128 pacientů bylo ve skupině s nižším středním rizikem, 125 s vyšším středním rizikem a zbývajících 115 pacientů patřilo do skupiny s vysokým rizikem. V porovnání s původní prací ELN [12] jsme nezaznamenali žádný rozdíl v OS mezi pacienty zahrnutými do skupin s nižším středním (pacienti s normálním karyotypem) a vyšším středním rizikem. Tento rozdíl může být způsoben poměrně vysokým počtem starších pacientů v naší analyzované skupině. V podobné práci [188] po rozdělení pacientů do dvou věkových kategorií (při hranici 60 let) byl OS skupiny s nižším středním rizikem delší pouze ve skupině pacientů do 60 let. U starších pacientů byla prognóza obou skupin pacientů shodná [188].

Po podrobnějším rozdělení pacientů do podskupin podle jednotlivých námi sledovaných molekulárně genetických aberací nejlépe přežívají pacienti s fúzními geny *PML/RAR $\alpha$*  a *AML1/ETO*, s pravděpodobností přežití tří let od diagnózy přibližně 70 %. U pacientů s APL je po dosažení CR riziko relapsu v porovnání s ostatními AML velmi nízké. V naší skupině pacientů s APL došlo k molekulárnímu či klinickému relapsu pouze u 17 % pacientů, přičemž vyšší počet relapsů byl ve skupině pacientů se zlomem *PML* genu v oblasti bcr3, přestože tito pacienti byli v době diagnózy

mladší, než pacienti se zlomem bcr1 nebo 2. Vyšší incidence relapsů byla spojena s častější pozitivitou *FLT3/ITD* u této podskupiny pacientů. Příčinu těchto pozorování a zmíněné asociace nedokážeme vysvětlit.

Pacienti s fúzí *CBFβ/MYH11* dosahují v rámci CBF-AML o něco horších výsledků, než pacienti s fúzí *AML1/ETO*. To je v rozporu s některými dříve publikovanými pracemi [205-207], kde autoři uvádějí kratší OS u pacientů s *AML1/ETO* oproti nemocným s fúzním genem *CBFβ/MYH11*, při stejné incidenci relapsů v obou skupinách. V našem souboru měli pacienti s fúzním genem *CBFβ/MYH11* výrazně vyšší výskyt relapsů oproti nemocným s *AML1/ETO*. U většiny pacientů se však obvykle podaří úspěšně navodit druhou CR a zachránit je k transplantaci, proto rozdíl v OS obou skupin nebyl statisticky významný.

Příčinou vyšší incidence relapsů u pacientů s fúzí *CBFβ/MYH11* může být jednak častější přítomnost sekundárních molekulárních aberací, jako jsou mutace genů *C-KIT*, *K-RAS* nebo *FLT3*, ale také častější dlouhodobé přetrvávání pozitivivity MRO u těchto pacientů při stejné léčbě (navzdory nižší senzitivitě real time RT-PCR pro detekci fúzního genu *CBFβ/MYH11*). Naše výsledky týkající se sledování MRO u pacientů s CBF-AML byly publikovány v časopise *Leukemia and Lymphoma* [67].

Zbylé dvě podskupiny pacientů, spadající podle ELN kritérií do nízkého rizika, dosahují OS po třech letech od diagnózy přibližně 50 %. Horší výsledek ve skupině *NPM1* pozitivních/*FLT3/ITD* negativních pacientů může být způsoben současnou přítomností mutací genu *DNMT3A* a *IDH2*, které jsou často asociovány nejen s *FLT3/ITD*, ale i se samotnou mutací *NPM1* genu a mohou tak zhoršovat prognózu pacientů s jinak nízkým rizikem. Přítomnost mutací *CEBPA* genu byla v naší skupině spojena s lepší prognózou pouze při současné negativitě *FLT3/ITD* i *NPM1* mutací (*CEBPA* mutace se jen výjimečně vyskytují společně s prognosticky méně příznivými mutacemi *DNMT3A* a *IDH2*). Naopak OS pacientů s *FLT3/ITD* (bez ohledu na přítomnost dalších mutací) byl téměř na úrovni skupiny s vysokým rizikem dle ELN kritérií.

Přítomnost *FLT3/ITD* byla testována celkem u 297 pacientů s AML se středním cytogenetickým rizikem. V souladu s dosud publikovanými výsledky [93,102,111] byla *FLT3/ITD* pozitivita detekována u 84 (28,3 %) pacientů. U jedné pacientky byla navíc zachycena netypická inserce 3 nukleotidů v transmembránové doméně genu *FLT3*. Mutace v této doméně ani jejich vliv na průběh onemocnění nebyly dosud popsány. Pouze 10 z 84 (11,9 %) *FLT3/ITD* pozitivních pacientů mělo více než jednu ITD, což je asi o 10 % méně než udávají dříve publikované práce [105,107,111]. Tento rozdíl může být způsoben použitím méně citlivé metody (gelová elektroforéza) v porovnání s výsledky získanými fragmentační analýzou, která dokáže zachytit i ITD s velmi nízkým procentuálním zastoupením.

Pacienti s *FLT3/ITD* měli výrazně vyšší počty leukocytů i vyšší procentuální zastoupení blastů v kostní dřeni, jak v případě nemocných se střední cytogenetickou prognózou, tak v případě pacientů s APL. *FLT3/ITD* pozitivní pacienti měli v obou skupinách také vyšší riziko relapsu onemocnění. OS pacientů zhoršovala přítomnost *FLT3/ITD* pouze u pacientů se středním cytogenetickým rizikem, nikoliv u nemocných s APL, což odpovídá dosud publikovaným výsledkům [103].

Výsledky prací zabývajících se vlivem délky ITD a místa její inserce na prognózu AML jsou zatím značně rozporuplné [105-109,208]. V našem souboru pacientů se délka ITD pohybovala od 12 do 120 nukleotidů (medián 54 nt). Pro analýzu jejího vlivu na prognózu *FLT3/ITD* pozitivních pacientů byla zvolena délka ITD 39 nukleotidů (podobně jako v první publikované práci na toto téma [108]), nicméně naše výsledky byly značně odlišné. Zatímco Stirewalt *et al.* [108] udávají horší prognózu onemocnění u pacientů s delší ITD ve všech hodnocených parametrech (CR, RFS i OS), naše výsledky ukazují výrazně vyšší šanci na docílení CR (pod 50 %) u pacientů s delší ITD, ale zároveň mají tito pacienti vyšší riziko relapsu. Riziko relapsu u pacientů s ITD < 39 nukleotidů je srovnatelné s *FLT3/ITD* negativními pacienty. Skutečnost, že pacienti s delší ITD mají větší šanci na dosažení CR (nad 70 % jich docílí CR, což je více než u *FLT3/ITD* negativních pacientů), ale zároveň také častěji relabují, může být dána vyšší proliferací buněk s delší ITD a tudíž jejich lepší odpovědí na indukční léčbu cytostatiky se specifickým zásahem v buněčném cyklu. Na druhou stranu přítomnost ITD vede k dediferenciaci buněk [209] a část buněk proto zůstává v nezralém stavu na úrovni rané progenitorové buňky. Tyto buňky jsou chemorezistentní (patrně následkem exprese P-glykoproteinu), neodpovídají na léčbu a mohou být zdrojem pozdějších relapsů. Zvýšená proliferací aktivita může být důsledkem jednak vyššího počtu zduplikovaných nukleotidů, ale také zastoupením konkrétních aminokyselin (tyrozinu) ve zduplikované oblasti.

V rozporu s dříve publikovanými pracemi [105,119,120,210] se nám nepodařilo prokázat žádný vliv integračního místa ITD (JM doména vs. TK doména), ani procentuálního zastoupení mutované alely na průběh a prognózu AML. To může být způsobeno jednak nižším počtem analyzovaných *FLT3/ITD* pozitivních pacientů, ale také metodou použitou pro kvantifikaci mutované alely, která umožňuje pouze semikvantitativní stanovení procentuálního zastoupení mutované alely pomocí softwarového porovnání intenzity pruhů na gelové elektroforéze.

Vzhledem k tomu, že se mutace genu *FLT3* vyskytují u 25-30 % pacientů s AML, zejména u nemocných s normálním cytogenetickým nálezem, zdály by se být dobrým cílem pro monitorování MRO. Délka i místo inserce ITD jsou však u každého pacienta odlišné a pro dostatečně senzitivní stanovení MRO by tedy bylo nezbytné navrhnout specifické primery. Problémem navíc je, že část pacientů (10-20 %) může nést v době relapsu jinou ITD nebo ji dokonce mohou ztratit úplně (až 20 % původně *FLT3/ITD* pozitivních pacientů) [123-126]. U těchto pacientů je potom negativní výsledek získaný pomocí pacient-specifických primerů zavádějící a obecně proto má výpovědní hodnotu pouze výsledek pozitivní, znamenající jistý relaps onemocnění.

Mutace genu *DNMT3A* byly u pacientů s AML popsány v roce 2010 dvěma skupinami autorů [149,150]. V námi analyzované skupině, s vyšším počtem pacientů se středním cytogenetickým rizikem než v těchto citovaných pracích, jsme tyto mutace zachytili u 67 z 226 pacientů (29,6 %). Pacienti nesoucí mutaci *DNMT3A* měli vyšší počet leukocytů v době diagnózy AML, což bylo ale pravděpodobně způsobeno současným výskytem *FLT3/ITD* u těchto pacientů. Ve skupině *FLT3/ITD* negativních pacientů totiž nebyl vliv *DNMT3A* mutace na počet leukocytů patrný.

Pacienti s mutací genu *DNMT3A* měli výrazně vyšší riziko relapsu, než pacienti bez této mutace, bez ohledu na přítomnost *FLT3/ITD*. V rozporu s publikovanými pracemi [149,154-156,211] však *DNMT3A* pozitivita nezkracovala OS pacientů v našem souboru. Na rozdíl od mutací genů *NPM1* a *CEBPA*, které mají příznivý vliv na prognózu onemocnění u *FLT3/ITD* negativních pacientů [130,132,135,212], přítomnost mutace *DNMT3A* zvyšovala v našem souboru pacientů riziko relapsu i u *FLT3/ITD* negativních pacientů.

Výskyt mutací *DNMT3A* (zejména bodových záměn v kodonu Arg882) silně koreloval s *FLT3/ITD* pozitivitou. Přítomnost obou těchto mutací výrazně zhoršovala prognózu nemocných: z celkem 30 pacientů jich pouze 17 (43,3 %) dosáhlo CR a přežívají pouze tři z nich, všichni po HSCT. Tyto naše výsledky byly publikovány v časopise *European Journal of Hematology* v roce 2012 [196].



## 7. ZÁVĚR

Celkem bylo analyzováno 654 nemocných s AML, největší skupinu (60 %) tvořili pacienti se středním cytogenetickým rizikem, 21 % pacientů mělo prognosticky příznivé onemocnění s fúzními geny *PML/RAR $\alpha$* , *AML1/ETO* nebo *CBF $\beta$ /MYH11*. U zbylých 19 % pacientů byly zachyceny prognosticky nepříznivé cytogenetické aberace, polovina z nich měla komplexní změny karyotypu.

**Potvrdili jsme významný rozdíl v délce OS v jednotlivých prognostických kategoriích pacientů definovaných dle Grimwada *et al.* [11].** Tři roky od diagnózy přežívalo 65 % pacientů ve skupině s nízkým rizikem, 30 % ve skupině s intermediárním rizikem a méně než 10 % pacientů s vysokým rizikem. Nezaznamenali jsme však žádný rozdíl v délce OS mezi pacienty s vyšším středním a nižším středním rizikem podle kritérií ELN.

**Pacienti s fúzním genem *CBF $\beta$ /MYH11* měli výrazně vyšší riziko relapsu v rámci skupiny CBF-AML.** V rozporu s některými dříve publikovanými pracemi udávajícími lepší prognózu (delší OS) u pacientů s fúzním genem *CBF $\beta$ /MYH11* jsme v našem souboru u těchto pacientů zaznamenali výrazně vyšší incidenci relapsů. U většiny z nich však byla úspěšně navozena druhá CR a byli indikováni k transplantaci, proto rozdíl v OS obou skupin nebyl statisticky významný. Incidenci relapsů u pacientů s CBF-AML zvyšovala jednak přítomnost sekundárních mutací genů *C-KIT*, *K-RAS* a *FLT3/TKD*, a jednak přetrvávající pozitivita MRO.

**Přítomnost mutací genu *CEBPA* a *NPM1* byla spojena s lepší prognózou pouze při současné nepřítomnosti *FLT3/ITD* i *DNMT3A* mutací.** Pacienti s mutovaným genem *CEBPA* jsou podle kritérií ELN řazeni do skupiny s nízkým rizikem. Některé publikace udávají příznivou prognózu onemocnění pouze u pacientů s bialelickou formou mutace, v naší skupině pacientů přežívalo 3 roky od diagnózy více než 50 % pacientů s touto mutací (bez přítomnosti *FLT3/ITD* či *NPM1* mutací) bez ohledu na to, zda mutace *CEBPA* genu byla bialelická nebo monoalelická.

**Pozitivita *FLT3/ITD* u pacientů se středním cytogenetickým rizikem je výrazným nepříznivým prognostickým faktorem ve všech sledovaných parametrech (počet leukocytů, incidence relapsů i OS).** Tři roky od diagnózy AML přežívalo pouze 17 % *FLT3/ITD* pozitivních pacientů. To je zcela v souladu s dosud publikovanými výsledky, přítomnost *FLT3/ITD* je považována za významný negativní prognostický faktor, na základě její positivity jsou již pacienti indikováni k HSCT.

**Nebyl prokázán žádný vliv místa inserce ITD genu *FLT3*, ani procentuálního zastoupení mutované alely na průběh a prognózu onemocnění.** Dosud publikované výsledky analýz hodnotících vliv délky, místa inserce ITD a procentuálního zastoupení mutované alely na prognózu AML zatím poskytovaly velmi různorodé výsledky. V naší skupině pacientů se středním cytogenetickým rizikem žádný z těchto parametrů nehrál zásadní přídatnou roli v nepříznivé prognóze *FLT3/ITD* pozitivních pacientů.

**Mutace genu *DNMT3A* zvyšovaly riziko relapsu onemocnění (bez ohledu na přítomnost *FLT3/ITD*). Na rozdíl od původně publikované práce na toto téma však u našich pacientů zkracovaly OS pouze u pacientů se současným výskytem *FLT3/ITD*.**

**Byla zavedena a optimalizována metodika pro sledování MRO u pacientů s nejčastějšími typy mutací genu *DNMT3A*. Pomocí těchto mutací je zatím MRO sledováno u 5 pacientů, kteří všichni docílili molekulární remise. Doba sledování je však u těchto pacientů zatím příliš krátká pro posouzení vhodnosti tohoto markeru pro sledování MRO.**

**Incidence *FLT3/TKD* i *ASXL1* mutací se pohybovala kolem 10 % a tyto mutace neměly na prognózu onemocnění žádný zásadní vliv.**

## 8. LITERATURA

1. Tallman MS. Acute myeloid leukemia; decided victories, disappointments, and detente: an historical perspective. *Hematology Am Soc Hematol Educ Progr* 2008; 390.
2. Mayer J. Historie poznání a léčby leukemií. In: Mayer J, Starý J, ed., *Leukemie*, Grada, Praha 2002, s. 19-21.
3. Kampen KR. The discovery and early understanding of leukemia. *Leuk Res* 2012; 36: 6-13.
4. Piller G. Leukaemia - a brief historical review from ancient times to 1950. *Br J Haematol* 2001; 112: 282-92.
5. Lobo I. Chromosome abnormalities and cancer cytogenetics. *Nat. Educ.* 2008; 1: 68.
6. Rowley JD, Golomb HM, Dougherty C. 15/17 translocation, a consistent chromosomal change in acute promyelocytic leukaemia. *Lancet* 1977; 1: 549-50.
7. Trujillo JM, Cork A, Ahearn MJ, Youness EL, McCredie KB. Hematologic and cytologic characterization of 8/21 translocation acute granulocytic leukemia. *Blood* 1979; 53: 695-706.
8. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C. Proposals for the classification of the acute leukaemias. *Br J Haematol* 1976; 33: 451-8.
9. Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* 2002; 100: 2292-302.
10. Grimwade D, Walker H, Oliver F, Wheatley K, Harrison C, Harrison G, Rees J, Hann I, Stevens R, Burnett A, Goldstone A. The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. *Blood* 1998; 92: 2322-33.
11. Grimwade D, Hills RK, Moorman AV, Walker H, Chatters S, Goldstone AH, Wheatley K, Harrison CJ, Burnett AK. Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. *Blood* 2010; 116: 354-65.
12. Döhner H, Estey EH, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, Burnett AK, Dombret H, Fenaux P, Grimwade D, Larson RA, Lo-Coco F, Naoe T, Niederwieser D, Ossenkoppele GJ, Sanz MA, Sierra J, Tallman MS, Löwenberg B, Bloomfield CD. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* 2010; 115: 453-74.
13. Döhner K, Döhner H. Molecular characterization of acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2008; 93: 976-82.
14. Fröhling S, Scholl C, Gilliland DG, Levine RL. Genetics of myeloid malignancies: pathogenetic and clinical implications. *J Clin Oncol* 2005; 23: 6285-95.
15. Löwenberg B. Prognostic factors in acute myeloid leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 2001; 14: 65-75.
16. Deschler B, Lübbert M. Acute myeloid leukemia: epidemiology and etiology. *Cancer* 2006; 107: 2099-107.
17. Liersch R, Müller-Tidow C, Berdel WE, Krug U. Prognostic factors for acute myeloid leukaemia in adults - biological significance and clinical use. *Br J Haematol* 2014; 165: 17-38.
18. Adam Z, Doubek M, Penka M, Tomiška M. Akutní myeloidní leukemie. In: Adam Z, Vorlíček J, ed., *Hematologie II. Přehled maligních hematologických onemocnění*, Grada Publishing, spol. s r.o., Praha 2001, s. 38-42.
19. Indrák K. Léčba akutních leukemií. *Scripta medica (Brno)* 1996: 305-308.
20. Kern W, Schoch C, Haferlach T, Schnittger S. Monitoring of minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *Crit Rev Oncol Hematol* 2005; 56: 283-309.
21. Doubek M, Palasek I, Pospisil Z, Borsky M, Klabusay M, Brychtova Y, Jurcek T, Jeziskova I, Krejci M, Dvorakova D, Mayer J. Detection and treatment of molecular relapse in acute myeloid leukemia with *RUNX1 (AML1)*, *CBFB*, or *MLL* gene translocations: frequent quantitative monitoring of molecular markers in different compartments and correlation with *WT1* gene expression. *Exp Hematol* 2009; 37: 659-72.
22. Polak J, Hajkova H, Haskovec C, Cechova H, Marinov I, Mikulenkova D, Markova J, Markova M, Vitek A, Valkova V. Quantitative monitoring of WT1 expression in peripheral blood before and after allogeneic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia - a useful tool for early detection of minimal residual disease. *Neoplasma* 2013; 60: 74-82.
23. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C. A variant form of hypergranular promyelocytic leukaemia (M3). *Br J Haematol* 1980; 44: 169-70.

24. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med* 1985; 103: 620-5.
25. Slovak ML, Kopecky KJ, Cassileth PA, Harrington DH, Theil KS, Mohamed A, Paietta E, Willman CL, Head DR, Rowe JM, Forman SJ, Appelbaum FR. Karyotypic analysis predicts outcome of preremission and postremission therapy in adult acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group/Eastern Cooperative Oncology Group Study. *Blood* 2000; 96: 4075-83.
26. Byrd JC, Mrózek K, Dodge RK, Carroll AJ, Edwards CG, Arthur DC, Pettenati MJ, Patil SR, Rao KW, Watson MS, Koduru PR, Moore JO, Stone RM, Mayer RJ, Feldman EJ, Davey FR, Schiffer CA, Larson RA, Bloomfield CD. Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). *Blood* 2002; 100: 4325-36.
27. Mrózek K, Bloomfield CD. Clinical significance of the most common chromosome translocations in adult acute myeloid leukemia. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2008; 39: 52-7.
28. Melo RA, de Vasconcellos JF, Melo FC, Machado CG, Lacerda TM, Souto FR. PML-RAR $\alpha$  fusion gene transcripts and biological features in acute promyelocytic leukemia patients. *Clin Lab Haematol* 2006; 28: 126-9.
29. Schwarz J, Kačírková P, Marková J, Mikulenková D, Marinov I, Ballingová I, Michalová K. Urgentní stav v hematologii: akutní promyelocytární leukemie - principy diagnostiky. *Vnitř lék* 2008; 54: 728-44.
30. Grimwade D, Biondi A, Mozziconacci MJ, Hagemijer A, Berger R, Neat M, Howe K, Dastugue N, Jansen J, Radford-Weiss I, Lo Coco F, Lessard M, Hernandez JM, Delabesse E, Head D, Liso V, Sainty D, Flandrin G, Solomon E, Birg F, Lafage-Pochitaloff M. Characterization of acute promyelocytic leukemia cases lacking the classic t(15;17): results of the European Working Party. *Blood* 2000; 96: 1297-308.
31. Zelent A, Guidez F, Melnick A, Waxman S, Licht JD. Translocations of the RAR $\alpha$  gene in acute promyelocytic leukemia. *Oncogene* 2001; 20: 7186-203.
32. Catalano A, Dawson MA, Somana K, Opat S, Schwarzer A, Campbell LJ, Iland H. The PRKARIA gene is fused to RARA in a new variant acute promyelocytic leukemia. *Blood* 2007; 110: 4073-6.
33. Kondo T, Mori A, Darmanin S, Hashino S, Tanaka J, Asaka M. The seventh pathogenic fusion gene FIPILI-RARA was isolated from a t(4;17)-positive acute promyelocytic leukemia. *Haematologica* 2008; 93: 1414-6.
34. Yamamoto Y, Tsuzuki S, Tsuzuki M, Handa K, Inaguma Y, Emi N. BCOR as a novel fusion partner of retinoic acid receptor alpha in a t(X;17)(p11;q12) variant of acute promyelocytic leukemia. *Blood* 2010; 116: 4274-83.
35. Won D, Shin SY, Park CJ, Jang S, Chi HS, Lee KH, Lee JO, Seo EJ. OBFC2A/RARA: a novel fusion gene in variant acute promyelocytic leukemia. *Blood* 2013; 121: 1432-5.
36. Mistry AR, Pedersen EW, Solomon E, Grimwade D. The molecular pathogenesis of acute promyelocytic leukaemia: implications for the clinical management of the disease. *Blood Rev* 2003; 17: 71-97.
37. Ablain J, Lallemand-Breitenbach V, de Thé H. PML/RARA as the master driver of acute promyelocytic leukemia pathogenesis and basis for therapy response. *Hematology (EHA Educ Progr)* 2013; 7: 49-56.
38. Ruggero D, Wang ZG, Pandolfi PP. The puzzling multiple lives of PML and its role in the genesis of cancer. *Bioessays* 2000; 22: 827-35.
39. Grimwade D, Enver T. Acute promyelocytic leukemia: where does it stem from? *Leukemia* 2004; 18: 375-84.
40. Reiter A, Lengfelder E, Grimwade D. Pathogenesis, diagnosis and monitoring of residual disease in acute promyelocytic leukaemia. *Acta Haematol* 2004; 112: 55-67.
41. Schwarz J, Kořístek Z, Starý J, Žák P, Kozák T, Marková J, Michalová K, Dvořáková D, Mayer J, Cetkovský P. Léčba akutní promyelocytární leukemie v Česku: výsledky a analýza prognostických faktorů. *Vnitř lék* 2008; 54: 757-70.
42. Jurcic JG, Nimer SD, Scheinberg DA, DeBlasio T, Warrell RP, Jr., Miller WH, Jr. Prognostic significance of minimal residual disease detection and PML/RAR-alpha isoform type: long-term follow-up in acute promyelocytic leukemia. *Blood* 2001; 98: 2651-6.
43. Fenaux P, Chastang C, Chevret S, Sanz M, Dombret H, Archimbaud E, Fey M, Rayon C, Huguet F, Sotto JJ, Gardin C, Makhoul PC, Travade P, Solary E, Fegueux N, Bordessoule D, Miguel JS, Link H, Desablens B, Stamatoullas A, Deconinck E, Maloisel F, Castaigne S, Preudhomme C, Degos L. A randomized comparison of all *trans* retinoic acid (ATRA) followed by chemotherapy and ATRA plus chemotherapy and the role of maintenance therapy in newly diagnosed acute promyelocytic leukemia. *Blood* 1999; 94: 1192-200.

44. Grimwade D, Lo Coco F. Acute promyelocytic leukemia: a model for the role of molecular diagnosis and residual disease monitoring in directing treatment approach in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2002; 16: 1959-73.
45. Gallagher RE, Yeap BY, Bi W, Livak KJ, Beaubier N, Rao S, Bloomfield CD, Appelbaum FR, Tallman MS, Slack JL, Willman CL. Quantitative real-time RT-PCR analysis of PML-RAR alpha mRNA in acute promyelocytic leukemia: assessment of prognostic significance in adult patients from intergroup protocol 0129. *Blood* 2003; 101: 2521-8.
46. Schnittger S, Weissner M, Schoch C, Hiddemann W, Haferlach T, Kern W. New score predicting for prognosis in PML-RARA+, AML1-ETO+, or CBFB-MYH11+ acute myeloid leukemia based on quantification of fusion transcripts. *Blood* 2003; 102: 2746-55.
47. Kühnl A, Grimwade D. Molecular markers in acute myeloid leukaemia. *Int J Hematol* 2012; 96: 153-63.
48. Gale RE, Hills R, Pizzey AR, Kottaridis PD, Swirsky D, Gilkes AF, Nugent E, Mills KI, Wheatley K, Solomon E, Burnett AK, Linch DC, Grimwade D. Relationship between FLT3 mutation status, biologic characteristics, and response to targeted therapy in acute promyelocytic leukemia. *Blood* 2005; 106: 3768-76.
49. Schnittger S, Bacher U, Haferlach C, Kern W, Alpermann T, Haferlach T. Clinical impact of FLT3 mutation load in acute promyelocytic leukemia with t(15;17)/PML-RARA. *Haematologica* 2011; 96: 1799-807.
50. Au WY, Fung A, Chim CS, Lie AK, Liang R, Ma ES, Chan CH, Wong KF, Kwong YL. FLT-3 aberrations in acute promyelocytic leukaemia: clinicopathological associations and prognostic impact. *Br J Haematol* 2004; 125: 463-9.
51. Kiyoi H, Naoe T, Yokota S, Nakao M, Minami S, Kuriyama K, Takeshita A, Saito K, Hasegawa S, Shimodaira S, Tamura J, Shimazaki C, Matsue K, Kobayashi H, Arima N, Suzuki R, Morishita H, Saito H, Ueda R, Ohno R. Internal tandem duplication of FLT3 associated with leukocytosis in acute promyelocytic leukemia. Leukemia Study Group of the Ministry of Health and Welfare (Kohseisho). *Leukemia* 1997; 11: 1447-52.
52. Hart SM, Foroni L. Core binding factor genes and human leukemia. *Haematologica* 2002; 87: 1307-23.
53. Speck NA, Stacy T, Wang Q, North T, Gu TL, Miller J, Binder M, Marin-Padilla M. Core-binding factor: a central player in hematopoiesis and leukemia. *Cancer Res* 1999; 59: 1789s-1793s.
54. Levanon D, Negreanu V, Bernstein Y, Bar-Am I, Avivi L, Groner Y. AML1, AML2, and AML3, the human members of the runt domain gene-family: cDNA structure, expression, and chromosomal localization. *Genomics* 1994; 23: 425-32.
55. Moldenhauer A, Frank RC, Pinilla-Ibarz J, Holland G, Boccuni P, Scheinberg DA, Salama A, Seeger K, Moore MA, Nimer SD. Histone deacetylase inhibition improves dendritic cell differentiation of leukemic blasts with AML1-containing fusion proteins. *J Leukoc Biol* 2004; 76: 623-33.
56. Golub TR, Barker GF, Bohlander SK, Hiebert SW, Ward DC, Bray-Ward P, Morgan E, Raimondi SC, Rowley JD, Gilliland DG. Fusion of the TEL gene on 12p13 to the AML1 gene on 21q22 in acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 4917-21.
57. Miyoshi H, Shimizu K, Kozu T, Maseki N, Kaneko Y, Ohki M. t(8;21) breakpoints on chromosome 21 in acute myeloid leukemia are clustered within a limited region of a single gene, AML1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 10431-4.
58. Nucifora G, Begy CR, Kobayashi H, Roulston D, Claxton D, Pedersen-Bjergaard J, Parganas E, Ihle JN, Rowley JD. Consistent intergenic splicing and production of multiple transcripts between AML1 at 21q22 and unrelated genes at 3q26 in (3;21)(q26;q22) translocations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 4004-8.
59. Langabeer SE, Walker H, Rogers JR, Burnett AK, Wheatley K, Swirsky D, Goldstone AH, Linch DC. Incidence of AML1/ETO fusion transcripts in patients entered into the MRC AML trials. *Br J Haematol* 1997; 99: 925-8.
60. Nucifora G, Rowley JD. AML1 and the 8;21 and 3;21 translocations in acute and chronic myeloid leukemia. *Blood* 1995; 86: 1-14.
61. van Dongen JJM, Macintyre EA, Gabert JA, Delabesse E, Rossi V, Saglio G, Gottardi E, Rambaldi A, Dotti G, Griesinger F, Parreira A, Gameiro P, Díaz MG, Malec M, Langerak AW, San Miguel JF, Biondi A. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia* 1999; 13: 1901-28.
62. Hoyos M, Nomdedeu JF, Esteve J, Duarte R, Ribera JM, Llorente A, Escoda L, Bueno J, Tormo M, Gallardo D, de Llano MP, Martí JM, Aventín A, Mangues R, Brunet S, Sierra J. Core binding factor acute myeloid leukemia: the impact of age, leukocyte count, molecular findings, and minimal residual disease. *Eur J Haematol* 2013; 91: 209-18.

63. Langabeer SE, Walker H, Gale RE, Wheatley K, Burnett AK, Goldstone AH, Linch DC. Frequency of CBF $\beta$ /MYH11 fusion transcripts in patients entered into the U.K. MRC AML trials. *Br J Haematol* 1997; 96: 736-9.
64. Weisser M, Haferlach C, Hiddemann W, Schnittger S. The quality of molecular response to chemotherapy is predictive for the outcome of *AML1-ETO*-positive AML and is independent of pretreatment risk factors. *Leukemia* 2007; 21: 1177-82.
65. Jourdan E, Boissel N, Chevret S, Delabesse E, Renneville A, Cornillet P, Blanchet O, Cayuela JM, Recher C, Raffoux E, Delaunay J, Pigneux A, Bulabois CE, Berthon C, Pautas C, Vey N, Lioure B, Thomas X, Luquet I, Terré C, Guardiola P, Béné MC, Preudhomme C, Ifrah N, Dombret H. Prospective evaluation of gene mutations and minimal residual disease in patients with core binding factor acute myeloid leukemia. *Blood*; 121: 2213-23.
66. Maurillo L, Buccisano F, Spagnoli A, Del Poeta G, Panetta P, Neri B, Del Principe MI, Mazzone C, Consalvo MI, Tamburini A, Ottaviani L, Fraboni D, Sarlo C, De Fabritiis P, Amadori S, Venditti A. Monitoring of minimal residual disease in adult acute myeloid leukemia using peripheral blood as an alternative source to bone marrow. *Haematologica* 2007; 92: 605-11.
67. Marková J, Trnková Z, Michková P, Maaloufová J, Starý J, Cetkovský P, Schwarz J. Monitoring of minimal residual disease in patients with core binding factor acute myeloid leukemia and the impact of *C-KIT*, *FLT3*, and *JAK2* mutations on clinical outcome. *Leuk Lymphoma* 2009; 50: 1448-1460.
68. Stentoft J, Hokland P, Ostergaard M, Hasle H, Nyvold CG. Minimal residual core binding factor AMLs by real time quantitative PCR--initial response to chemotherapy predicts event free survival and close monitoring of peripheral blood unravels the kinetics of relapse. *Leuk Res* 2006; 30: 389-95.
69. Leroy H, de Botton S, Grardel-Duflos N, Darre S, Leleu X, Roumier C, Morschhauser F, Lai JL, Bauters F, Fenaux P, Preudhomme C. Prognostic value of real-time quantitative PCR (RQ-PCR) in AML with t(8;21). *Leukemia* 2005; 19: 367-72.
70. Lane S, Saal R, Mollee P, Jones M, Grigg A, Taylor K, Seymour J, Kennedy G, Williams B, Grimmett K, Griffiths V, Gill D, Hourigan M, Marlton P. A  $\geq 1$  log rise in RQ-PCR transcript levels defines molecular relapse in core binding factor acute myeloid leukemia and predicts subsequent morphologic relapse. *Leuk Lymphoma* 2008; 49: 517-23.
71. Ommen HB, Schnittger S, Jovanovic JV, Ommen IB, Hasle H, Ostergaard M, Grimwade D, Hokland P. Strikingly different molecular relapse kinetics in *NPM1c*, *PML-RARA*, *RUNX1-RUNX1T1*, and *CBFB-MYH11* acute myeloid leukemias. *Blood* 2010; 115: 198-205.
72. Gari M, Goodeve A, Wilson G, Winship P, Langabeer S, Linch D, Vandenberghe E, Peake I, Reilly J. c-kit proto-oncogene exon 8 in-frame deletion plus insertion mutations in acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 1999; 105: 894-900.
73. Boissan M, Feger F, Guillosson JJ, Arock M. c-Kit and c-kit mutations in mastocytosis and other hematological diseases. *J Leukoc Biol* 2000; 67: 135-48.
74. Nagata H, Worobec AS, Oh CK, Chowdhury BA, Tannenbaum S, Suzuki Y, Metcalfe DD. Identification of a point mutation in the catalytic domain of the protooncogene *c-kit* in peripheral blood mononuclear cells of patients who have mastocytosis with an associated hematologic disorder. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 10560-4.
75. Paschka P, Marcucci G, Ruppert AS, Mrozek K, Chen H, Kittles RA, Vukosavljevic T, Perrotti D, Vardiman JW, Carroll AJ, Kolitz JE, Larson RA, Bloomfield CD. Adverse prognostic significance of *KIT* mutations in adult acute myeloid leukemia with inv(16) and t(8;21): a Cancer and Leukemia Group B Study. *J Clin Oncol* 2006; 24: 3904-11.
76. Care RS, Valk PJ, Goodeve AC, Abu-Duhier FM, Geertsma-Kleinekoort WM, Wilson GA, Gari MA, Peake IR, Lowenberg B, Reilly JT. Incidence and prognosis of c-KIT and FLT3 mutations in core binding factor (CBF) acute myeloid leukaemias. *Br J Haematol* 2003; 121: 775-7.
77. Cairoli R, Beghini A, Grillo G, Nadali G, Elice F, Ripamonti CB, Colapietro P, Nichelatti M, Pezzetti L, Lunghi M, Cuneo A, Viola A, Ferrara F, Lazzarino M, Rodeghiero F, Pizzolo G, Larizza L, Morra E. Prognostic impact of *c-KIT* mutations in core binding factor leukemias: an Italian retrospective study. *Blood* 2006; 107: 3463-8.
78. Boissel N, Leroy H, Brethon B, Philippe N, de Botton S, Auvrignon A, Raffoux E, Leblanc T, Thomas X, Hermine O, Quesnel B, Baruchel A, Leverger G, Dombret H, Preudhomme C. Incidence and prognostic impact of *c-Kit*, *FLT3*, and *Ras* gene mutations in core binding factor acute myeloid leukemia (CBF-AML). *Leukemia* 2006; 20: 965-70.
79. Pignon JM, Giraudier S, Duquesnoy P, Jouault H, Imbert M, Vainchenker W, Vernant JP, Tulliez M. A new *c-kit* mutation in a case of aggressive mast cell disease. *Br J Haematol* 1997; 96: 374-6.
80. Schnittger S, Kohl TM, Haferlach T, Kern W, Hiddemann W, Spiekermann K, Schoch C. *KIT*-D816 mutations in *AML1-ETO*-positive AML are associated with impaired event-free and overall survival. *Blood* 2006; 107: 1791-9.

81. Shimada A, Taki T, Tabuchi K, Tawa A, Horibe K, Tsuchida M, Hanada R, Tsukimoto I, Hayashi Y. *KIT* mutations, and not *FLT3* internal tandem duplication, are strongly associated with a poor prognosis in pediatric acute myeloid leukemia with t(8;21): a study of the Japanese Childhood AML Cooperative Study Group. *Blood* 2006; 107: 1806-9.
82. Shih LY, Liang DC, Huang CF, Chang YT, Lai CL, Lin TH, Yang CP, Hung IJ, Liu HC, Jaing TH, Wang LY, Yeh TC. Cooperating mutations of receptor tyrosine kinases and Ras genes in childhood core-binding factor acute myeloid leukemia and a comparative analysis on paired diagnosis and relapse samples. *Leukemia* 2008; 22: 303-7.
83. Wang YY, Zhou GB, Yin T, Chen B, Shi JY, Liang WX, Jin XL, You JH, Yang G, Shen ZX, Chen J, Xiong SM, Chen GQ, Xu F, Liu YW, Chen Z, Chen SJ. *AML1-ETO* and *C-KIT* mutation/overexpression in t(8;21) leukemia: implication in stepwise leukemogenesis and response to Gleevec. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 1104-9.
84. Beghini A, Ripamonti CB, Cairoli R, Cazzaniga G, Colapietro P, Elice F, Nadali G, Grillo G, Haas OA, Biondi A, Morra E, Larizza L. *KIT* activating mutations: incidence in adult and pediatric acute myeloid leukemia, and identification of an internal tandem duplication. *Haematologica* 2004; 89: 920-5.
85. Allen C, Hills RK, Lamb K, Evans C, Tinsley S, Sellar R, O'Brien M, Yin JL, Burnett AK, Linch DC, Gale RE. The importance of relative mutant level for evaluating impact on outcome of *KIT*, *FLT3* and *CBL* mutations in core-binding factor acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2013; 27: 1891-901.
86. Bos JL. ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* 1989; 49: 4682-9.
87. Castellano E, Santos E. Functional specificity of ras isoforms: so similar but so different. *Genes Cancer* 2011; 2: 216-31.
88. Kmínková J, Trbušek M. Buněčný cyklus a jeho regulace, buněčná signalizace, apoptóza. In: Pospíšilová Š, Dvořáková J, Mayer J, ed., *Molekulární hematologie*, Galén, Praha 2013, s. 43-57.
89. Al-Kali A, Quintas-Cardama A, Luthra R, Bueso-Ramos C, Pierce S, Kadia T, Borthakur G, Estrov Z, Jabbour E, Faderl S, Ravandi F, Cortes J, Tefferi A, Kantarjian H, Garcia-Manero G. Prognostic impact of *RAS* mutations in patients with myelodysplastic syndrome. *Am J Hematol* 2013; 88: 365-9.
90. Neubauer A, Dodge RK, George SL, Davey FR, Silver RT, Schiffer CA, Mayer RJ, Ball ED, Wurster-Hill D, Bloomfield CD, et al. Prognostic importance of mutations in the *ras* proto-oncogenes in de novo acute myeloid leukemia. *Blood* 1994; 83: 1603-11.
91. Stirewalt DL, Kopecky KJ, Meshinchi S, Appelbaum FR, Slovak ML, Willman CL, Radich JP. *FLT3*, *RAS*, and *TP53* mutations in elderly patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2001; 97: 3589-95.
92. Goemans BF, Zwaan CM, Miller M, Zimmermann M, Harlow A, Meshinchi S, Loonen AH, Hahlen K, Reinhardt D, Creutzig U, Kaspers GJ, Heinrich MC. Mutations in *KIT* and *RAS* are frequent events in pediatric core-binding factor acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2005; 19: 1536-42.
93. Mead AJ, Linch DC, Hills RK, Wheatley K, Burnett AK, Gale RE. *FLT3* tyrosine kinase domain mutations are biologically distinct from and have a significantly more favorable prognosis than *FLT3* internal tandem duplications in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2007; 110: 1262-70.
94. Opatz S, Polzer H, Herold T, Konstandin NP, Ksienzyk B, Zellmeier E, Vosberg S, Graf A, Krebs S, Blum H, Hopfner KP, Kakadia PM, Schneider S, Dufour A, Braess J, Sauerland MC, Berdel WE, Büchner T, Woermann BJ, Hiddemann W, Spiekermann K, Bohlander SK, Greif PA. Exome sequencing identifies recurring *FLT3* N676K mutations in core-binding factor leukemia. *Blood* 2013; 122: 1761-9.
95. Stirewalt DL, Radich JP. The role of *FLT3* in haematopoietic malignancies. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 650-65.
96. Xu F, Taki T, Yang HW, Hanada R, Hongo T, Ohnishi H, Kobayashi M, Bessho F, Yanagisawa M, Hayashi Y. Tandem duplication of the *FLT3* gene is found in acute lymphoblastic leukaemia as well as acute myeloid leukaemia but not in myelodysplastic syndrome or juvenile chronic myelogenous leukaemia in children. *Br J Haematol* 1999; 105: 155-62.
97. Gilliland DG, Griffin JD. The roles of *FLT3* in hematopoiesis and leukemia. *Blood* 2002; 100: 1532-42.
98. Litzow MR. More flitting about *FLT3*. *Blood* 2005; 106: 3331-3332.
99. Kiyoi H, Naoe T. *FLT3* in human hematologic malignancies. *Leuk Lymphoma* 2002; 43: 1541-7.
100. Nakao M, Yokota S, Iwai T, Kaneko H, Horiike S, Kashima K, Sonoda Y, Fujimoto T, Misawa S. Internal tandem duplication of the *flt3* gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1996; 10: 1911-8.
101. Kottaridis PD, Gale RE, Linch DC. *FLT3* mutations and leukaemia. *Br J Haematol* 2003; 122: 523-38.
102. Thiede C, Steudel C, Mohr B, Schaich M, Schakel U, Platzbecker U, Wermke M, Bornhauser M, Ritter M, Neubauer A, Ehninger G, Illmer T. Analysis of *FLT3*-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. *Blood* 2002; 99: 4326-35.
103. Renneville A, Roumier C, Biggio V, Nibourel O, Boissel N, Fenaux P, Preudhomme C. Cooperating gene mutations in acute myeloid leukemia: a review of the literature. *Leukemia* 2008; 22: 915-31.

104. Schnittger S, Schoch C, Dugas M, Kern W, Staib P, Wuchter C, Loffler H, Sauerland CM, Serve H, Buchner T, Haferlach T, Hiddemann W. Analysis of *FLT3* length mutations in 1003 patients with acute myeloid leukemia: correlation to cytogenetics, FAB subtype, and prognosis in the AMLCG study and usefulness as a marker for the detection of minimal residual disease. *Blood* 2002; 100: 59-66.
105. Gale RE, Green C, Allen C, Mead AJ, Burnett AK, Hills RK, Linch DC. The impact of *FLT3* internal tandem duplication mutant level, number, size, and interaction with *NPM1* mutations in a large cohort of young adult patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2008; 111: 2776-84.
106. Ponziani V, Gianfaldoni G, Mannelli F, Leoni F, Ciolli S, Guglielmelli P, Antonioli E, Longo G, Bosi A, Vannucchi AM. The size of duplication does not add to the prognostic significance of *FLT3* internal tandem duplication in acute myeloid leukemia patients. *Leukemia* 2006; 20: 2074-6.
107. Meshinchi S, Stirewalt DL, Alonzo TA, Boggon TJ, Gerbing RB, Rocnik JL, Lange BJ, Gilliland DG, Radich JP. Structural and numerical variation of *FLT3*/ITD in pediatric AML. *Blood* 2008; 111: 4930-3.
108. Stirewalt DL, Kopecky KJ, Meshinchi S, Engel JH, Pogossova-Agadjanyan EL, Linsley J, Slovak ML, Willman CL, Radich JP. Size of *FLT3* internal tandem duplication has prognostic significance in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2006; 107: 3724-6.
109. Kusec R, Jaksic O, Ostojic S, Kardum-Skelin I, Vrhovac R, Jaksic B. More on prognostic significance of *FLT3*/ITD size in acute myeloid leukemia (AML). *Blood* 2006; 108: 405-6.
110. Koszarska M, Meggyesi N, Bors A, Batai A, Csacsovszki O, Lehoczky E, Adam E, Kozma A, Lovas N, Sipos A, Kraehling T, Dolgos J, Remenyi P, Fekete S, Masszi T, Tordai A, Andrikovics H. Medium-sized *FLT3* internal tandem duplications confer worse prognosis than short and long duplications in a non-elderly acute myeloid leukemia cohort. *Leuk Lymphoma* 2013.
111. Kottaridis PD, Gale RE, Frew ME, Harrison G, Langabeer SE, Belton AA, Walker H, Wheatley K, Bowen DT, Burnett AK, Goldstone AH, Linch DC. The presence of a *FLT3* internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of chemotherapy: analysis of 854 patients from the United Kingdom Medical Research Council AML 10 and 12 trials. *Blood* 2001; 98: 1752-9.
112. Bacher U, Haferlach T, Kern W, Haferlach C, Schnittger S. A comparative study of molecular mutations in 381 patients with myelodysplastic syndrome and in 4130 patients with acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2007; 92: 744-52.
113. Yamamoto Y, Kiyoi H, Nakano Y, Suzuki R, Kodera Y, Miyawaki S, Asou N, Kuriyama K, Yagasaki F, Shimazaki C, Akiyama H, Saito K, Nishimura M, Motoji T, Shinagawa K, Takeshita A, Saito H, Ueda R, Ohno R, Naoe T. Activating mutation of D835 within the activation loop of *FLT3* in human hematologic malignancies. *Blood* 2001; 97: 2434-9.
114. Whitman SP, Ruppert AS, Radmacher MD, Mrozek K, Paschka P, Langer C, Baldus CD, Wen J, Racke F, Powell BL, Kolitz JE, Larson RA, Caligiuri MA, Marcucci G, Bloomfield CD. *FLT3* D835/I836 mutations are associated with poor disease-free survival and a distinct gene-expression signature among younger adults with de novo cytogenetically normal acute myeloid leukemia lacking *FLT3* internal tandem duplications. *Blood* 2008; 111: 1552-9.
115. Moreno I, Martin G, Bolufer P, Barragan E, Rueda E, Román J, Fernandez P, Leon P, Mena A, Cervera J, Torres A, Sanz MA. Incidence and prognostic value of *FLT3* internal tandem duplication and D835 mutations in acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2003; 88: 19-24.
116. Abu-Duhier FM, Goodeve AC, Wilson GA, Care RS, Peake IR, Reilly JT. Identification of novel *FLT3*-3 Asp835 mutations in adult acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 2001; 113: 983-8.
117. Sheikha MH, Awan A, Tobal K, Liu Yin JA. Prognostic significance of *FLT3* ITD and D835 mutations in AML patients. *Hematol J* 2003; 4: 41-6.
118. Breitenbuecher F, Schnittger S, Grundler R, Markova B, Carius B, Brecht A, Duyster J, Haferlach T, Huber C, Fischer T. Identification of a novel type of ITD mutations located in nonjuxtamembrane domains of the *FLT3* tyrosine kinase receptor. *Blood* 2009; 113: 4074-7.
119. Kayser S, Schlenk RF, Londono MC, Breitenbuecher F, Wittke K, Du J, Groner S, Späth D, Krauter J, Ganser A, Döhner H, Fischer T, Döhner K. Insertion of *FLT3* internal tandem duplication in the tyrosine kinase domain-1 is associated with resistance to chemotherapy and inferior outcome. *Blood* 2009; 114: 2386-92.
120. Blau O, Berenstein R, Sindram A, Blau IW. Molecular analysis of different *FLT3*-ITD mutations in acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma* 2013; 54: 145-152.
121. Stirewalt DL, Meshinchi S, Kussick SJ, Sheets KM, Pogossova-Agadjanyan E, Willman CL, Radich JP. Novel *FLT3* point mutations within exon 14 found in patients with acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 2004; 124: 481-4.
122. Reindl C, Bagrintseva K, Vempati S, Schnittger S, Ellwart JW, Wenig K, Hopfner KP, Hiddemann W, Spiekermann K. Point mutations in the juxtamembrane domain of *FLT3* define a new class of activating mutations in AML. *Blood* 2006; 107: 3700-7.



123. Cloos J, Goemans BF, Hess CJ, van Oostveen JW, Waisfisz Q, Corthals S, de Lange D, Boeckx N, Hählen K, Reinhardt D, Creutzig U, Schuurhuis GJ, Zwaan Ch M, Kaspers GJ. Stability and prognostic influence of FLT3 mutations in paired initial and relapsed AML samples. *Leukemia* 2006; 20: 1217-20.
124. Kottaridis PD, Gale RE, Langabeer SE, Frew ME, Bowen DT, Linch DC. Studies of FLT3 mutations in paired presentation and relapse samples from patients with acute myeloid leukemia: implications for the role of FLT3 mutations in leukemogenesis, minimal residual disease detection, and possible therapy with FLT3 inhibitors. *Blood* 2002; 100: 2393-8.
125. Shih LY, Huang CF, Wu JH, Lin TL, Dunn P, Wang PN, Kuo MC, Lai CL, Hsu HC. Internal tandem duplication of FLT3 in relapsed acute myeloid leukemia: a comparative analysis of bone marrow samples from 108 adult patients at diagnosis and relapse. *Blood* 2002; 100: 2387-92.
126. Tiesmeier J, Muller-Tidow C, Westermann A, Czwalinna A, Hoffmann M, Krauter J, Heil G, Ganser A, Serve H, Verbeek W. Evolution of FLT3-ITD and D835 activating point mutations in relapsing acute myeloid leukemia and response to salvage therapy. *Leuk Res* 2004; 28: 1069-74.
127. McCormick SR, McCormick MJ, Grutkoski PS, Ducker GS, Banerji N, Higgins RR, Mendiola JR, Reinartz JJ. FLT3 mutations at diagnosis and relapse in acute myeloid leukemia: cytogenetic and pathologic correlations, including cuplike blast morphology. *Arch Pathol Lab Med* 2010; 134: 1143-51.
128. Verhaak RG, Goudswaard CS, van Putten W, Bijl MA, Sanders MA, Hugens W, Uitterlinden AG, Erpelinck CA, Delwel R, Lowenberg B, Valk PJ. Mutations in nucleophosmin (NPM1) in acute myeloid leukemia (AML): association with other gene abnormalities and previously established gene expression signatures and their favorable prognostic significance. *Blood* 2005; 106: 3747-54.
129. Colombo E, Marine JC, Danovi D, Falini B, Pelicci PG. Nucleophosmin regulates the stability and transcriptional activity of p53. *Nat Cell Biol* 2002; 4: 529-33.
130. Thiede C, Koch S, Creutzig E, Steudel C, Illmer T, Schaich M, Ehninger G. Prevalence and prognostic impact of NPM1 mutations in 1485 adult patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood* 2006; 107: 4011-20.
131. Falini B, Bolli N, Liso A, Martelli MP, Mannucci R, Pileri S, Nicoletti I. Altered nucleophosmin transport in acute myeloid leukaemia with mutated NPM1: molecular basis and clinical implications. *Leukemia* 2009; 23: 1731-43.
132. Schnittger S, Schoch C, Kern W, Mecucci C, Tschulik C, Martelli MF, Haferlach T, Hiddemann W, Falini B. Nucleophosmin gene mutations are predictors of favorable prognosis in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *Blood* 2005; 106: 3733-9.
133. Grummitt CG, Townsley FM, Johnson CM, Warren AJ, Bycroft M. Structural consequences of nucleophosmin mutations in acute myeloid leukemia. *J Biol Chem* 2008; 283: 23326-32.
134. Suzuki T, Kiyoi H, Ozeki K, Tomita A, Yamaji S, Suzuki R, Kodera Y, Miyawaki S, Asou N, Kuriyama K, Yagasaki F, Shimazaki C, Akiyama H, Nishimura M, Motoji T, Shinagawa K, Takeshita A, Ueda R, Kinoshita T, Emi N, Naoe T. Clinical characteristics and prognostic implications of NPM1 mutations in acute myeloid leukemia. *Blood* 2005; 106: 2854-61.
135. Döhner K, Schlenk RF, Habdank M, Scholl C, Rucker FG, Corbacioglu A, Bullinger L, Frohling S, Döhner H. Mutant nucleophosmin (NPM1) predicts favorable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: interaction with other gene mutations. *Blood* 2005; 106: 3740-6.
136. Kristensen T, Moller MB, Friis L, Bergmann OJ, Preiss B. NPM1 mutation is a stable marker for minimal residual disease monitoring in acute myeloid leukaemia patients with increased sensitivity compared to WT1 expression. *Eur J Haematol* 2011; 87: 400-8.
137. Papadaki C, Dufour A, Seibl M, Schneider S, Bohlander SK, Zellmeier E, Mellert G, Hiddemann W, Spiekermann K. Monitoring minimal residual disease in acute myeloid leukaemia with NPM1 mutations by quantitative PCR: clonal evolution is a limiting factor. *Br J Haematol* 2009; 144: 517-23.
138. Jain P, Kantarjian H, Patel K, Faderl S, Garcia-Manero G, Benjamini O, Borthakur G, Pemmaraju N, Kadia T, Daver N, Nazha A, Luthra R, Pierce S, Cortes J, Ravandi F. Mutated NPM1 in patients with acute myeloid leukemia in remission and relapse. *Leuk Lymphoma* 2013; 55: 1337-44.
139. Fasan A, Haferlach C, Alpermann T, Jeromin S, Grossmann V, Eder C, Weissmann S, Dicker F, Kohlmann A, Schindela S, Kern W, Haferlach T, Schnittger S. The role of different genetic subtypes of CEBPA mutated AML. *Leukemia* 2014; 28: 794-803.
140. Kato N, Kitaura J, Doki N, Komeno Y, Watanabe-Okochi N, Togami K, Nakahara F, Oki T, Enomoto Y, Fukuchi Y, Nakajima H, Harada Y, Harada H, Kitamura T. Two types of C/EBPalpha mutations play distinct but collaborative roles in leukemogenesis: lessons from clinical data and BMT models. *Blood* 2011; 117: 221-33.
141. Fröhling S, Schlenk RF, Stolze I, Bihlmayr J, Benner A, Kreitmeier S, Tobis K, Döhner H, Döhner K. CEBPA mutations in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: prognostic relevance and analysis of cooperating mutations. *J Clin Oncol* 2004; 22: 624-33.

142. Green CL, Koo KK, Hills RK, Burnett AK, Linch DC, Gale RE. Prognostic significance of *CEBPA* mutations in a large cohort of younger adult patients with acute myeloid leukemia: impact of double *CEBPA* mutations and the interaction with *FLT3* and *NPM1* mutations. *J Clin Oncol* 2010; 28: 2739-47.
143. Wouters BJ, Lowenberg B, Erpelinck-Verschueren CA, van Putten WL, Valk PJ, Delwel R. Double *CEBPA* mutations, but not single *CEBPA* mutations, define a subgroup of acute myeloid leukemia with a distinctive gene expression profile that is uniquely associated with a favorable outcome. *Blood* 2009; 113: 3088-91.
144. Taskesen E, Bullinger L, Corbacioglu A, Sanders MA, Erpelinck CA, Wouters BJ, van der Poel-van de Luytgaarde SC, Damm F, Krauter J, Ganser A, Schlenk RF, Löwenberg B, Delwel R, Döhner H, Valk PJ, Döhner K. Prognostic impact, concurrent genetic mutations, and gene expression features of AML with *CEBPA* mutations in a cohort of 1182 cytogenetically normal AML patients: further evidence for *CEBPA* double mutant AML as a distinctive disease entity. *Blood* 2011; 117: 2469-75.
145. Hollink IHIM, van den Heuvel-Eibrink MM, Arentsen-Peters STCJM, Zimmermann M, Peeters JK, Valk PJM, Balgobind BV, Sonneveld E, Kaspers GJL, de Bont ESJM, Trka J, Baruchel A, Creutzig U, Pieters R, Reinhardt D, Zwaan CM. Characterization of *CEBPA* mutations and promoter hypermethylation in pediatric acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2011; 96: 384-392.
146. Martelli MP, Sportoletti P, Tiacci E, Martelli MF, Falini B. Mutational landscape of AML with normal cytogenetics: biological and clinical implications. *Blood Rev* 2013; 27: 13-22.
147. Li KK, Luo LF, Shen Y, Xu J, Chen Z, Chen SJ. DNA methyltransferases in hematologic malignancies. *Semin Hematol* 2013; 50: 48-60.
148. Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer. *Cell* 2007; 128: 683-92.
149. Ley TJ, Ding L, Walter MJ, McLellan MD, Lamprecht T, Larson DE, Kandoth C, Payton JE, Baty J, Welch J, Harris CC, Lichti CF, Townsend RR, Fulton RS, Dooling DJ, Koboldt DC, Schmidt H, Zhang Q, Osborne JR, Lin L, O'Laughlin M, McMichael JF, Delehaunty KD, McGrath SD, Fulton LA, Magrini VJ, Vickery TL, Hundal J, Cook LL, Conyers JJ, Swift GW, Reed JP, Alldredge PA, Wylie T, Walker J, Kalicki J, Watson MA, Heath S, Shannon WD, Varghese N, Nagarajan R, Westervelt P, Tomasson MH, Link DC, Graubert TA, DiPersio JF, Mardis ER, Wilson RK. *DNMT3A* mutations in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2010; 363: 2424-33.
150. Yan XJ, Xu J, Gu ZH, Pan CM, Lu G, Shen Y, Shi JY, Zhu YM, Tang L, Zhang XW, Liang WX, Mi JQ, Song HD, Li KQ, Chen Z, Chen SJ. Exome sequencing identifies somatic mutations of DNA methyltransferase gene *DNMT3A* in acute monocytic leukemia. *Nat Genet* 2011; 43: 309-15.
151. Walter MJ, Ding L, Shen D, Shao J, Grillot M, McLellan M, Fulton R, Schmidt H, Kalicki-Veizer J, O'Laughlin M, Kandoth C, Baty J, Westervelt P, DiPersio JF, Mardis ER, Wilson RK, Ley TJ, Graubert TA. Recurrent *DNMT3A* mutations in patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 2011; 25: 1153-8.
152. Stegelmann F, Bullinger L, Schlenk RF, Paschka P, Griesshammer M, Blersch C, Kuhn S, Schauer S, Döhner H, Döhner K. *DNMT3A* mutations in myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* 2011; 25: 1217-9.
153. Shah MY, Licht JD. *DNMT3A* mutations in acute myeloid leukemia. *Nat Genet* 2011; 43: 289-90.
154. Thol F, Damm F, Ludeking A, Winschel C, Wagner K, Morgan M, Yun H, Gohring G, Schlegelberger B, Hoelzer D, Lubbert M, Kanz L, Fiedler W, Kirchner H, Heil G, Krauter J, Ganser A, Heuser M. Incidence and prognostic influence of *DNMT3A* mutations in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2011; 29: 2889-96.
155. Marcucci G, Metzeler KH, Schwind S, Becker H, Maharry K, Mrozek K, Radmacher MD, Kohlschmidt J, Nicolet D, Whitman SP, Wu YZ, Powell BL, Carter TH, Kolitz JE, Wetzler M, Carroll AJ, Baer MR, Moore JO, Caligiuri MA, Larson RA, Bloomfield CD. Age-related prognostic impact of different types of *DNMT3A* mutations in adults with primary cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2012; 30: 742-50.
156. Ribeiro AF, Pratorcorona M, Erpelinck-Verschueren C, Rockova V, Sanders M, Abbas S, Figueroa ME, Zeilemaker A, Melnick A, Löwenberg B, Valk PJ, Delwel R. Mutant *DNMT3A*: a marker of poor prognosis in acute myeloid leukemia. *Blood* 2012; 119: 5824-31.
157. Hou HA, Kuo YY, Liu CY, Chou WC, Lee MC, Chen CY, Lin LI, Tseng MH, Huang CF, Chiang YC, Lee FY, Liu MC, Liu CW, Tang JL, Yao M, Huang SY, Ko BS, Hsu SC, Wu SJ, Tsay W, Chen YC, Tien HF. *DNMT3A* mutations in acute myeloid leukemia: stability during disease evolution and clinical implications. *Blood* 2012; 119: 559-68.
158. Wakita S, Yamaguchi H, Omori I, Terada K, Ueda T, Manabe E, Kurosawa S, Iida S, Ibaraki T, Sato Y, Todoroki T, Hirakawa T, Ryotokuji T, Arai K, Kitano T, Mitamura Y, Kosaka F, Dan K, Inokuchi K. Mutations of the epigenetics-modifying gene (*DNMT3a*, *TET2*, *IDH1/2*) at diagnosis may induce *FLT3*-ITD at relapse in de novo acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2013; 27: 1044-52.
159. Fisher CL, Randazzo F, Humphries RK, Brock HW. Characterization of *Asx11*, a murine homolog of *Additional sex combs*, and analysis of the *Asx*-like gene family. *Gene* 2006; 369: 109-18.

160. Fisher CL, Berger J, Randazzo F, Brock HW. A human homolog of *Additional sex combs*, *ADDITIONAL SEX COMBS-LIKE 1*, maps to chromosome 20q11. *Gene* 2003; 306: 115-26.
161. Gelsi-Boyer V, Trouplin V, Adelaide J, Bonansea J, Cervera N, Carbuccia N, Lagarde A, Prebet T, Nezri M, Sainty D, Olschwang S, Xerri L, Chaffanet M, Mozziconacci MJ, Vey N, Birnbaum D. Mutations of polycomb-associated gene *ASXL1* in myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2009; 145: 788-800.
162. Carbuccia N, Murati A, Trouplin V, Brecqueville M, Adélaide J, Rey J, Vainchenker W, Bernard OA, Chaffanet M, Vey N, Birnbaum D, Mozziconacci MJ. Mutations of *ASXL1* gene in myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* 2009; 23: 2183-6.
163. Schnittger S, Eder C, Jeromin S, Alpermann T, Fasan A, Grossmann V, Kohlmann A, Illig T, Klopp N, Wichmann HE, Kreuzer KA, Schmid C, Staib P, Peceny R, Schmitz N, Kern W, Haferlach C, Haferlach T. *ASXL1* exon 12 mutations are frequent in AML with intermediate risk karyotype and are independently associated with an adverse outcome. *Leukemia* 2013; 27: 82-91.
164. Chou WC, Huang HH, Hou HA, Chen CY, Tang JL, Yao M, Tsay W, Ko BS, Wu SJ, Huang SY, Hsu SC, Chen YC, Huang YN, Chang YC, Lee FY, Liu MC, Liu CW, Tseng MH, Huang CF, Tien HF. Distinct clinical and biological features of de novo acute myeloid leukemia with additional sex comb-like 1 (*ASXL1*) mutations. *Blood* 2010; 116: 4086-94.
165. Metzeler KH, Becker H, Maharry K, Radmacher MD, Kohlschmidt J, Mrózek K, Nicolet D, Whitman SP, Wu YZ, Schwind S, Powell BL, Carter TH, Wetzler M, Moore JO, Kolitz JE, Baer MR, Carroll AJ, Larson RA, Caligiuri MA, Marcucci G, Bloomfield CD. *ASXL1* mutations identify a high-risk subgroup of older patients with primary cytogenetically normal AML within the ELN Favorable genetic category. *Blood* 2011; 118: 6920-9.
166. Pratcorona M, Abbas S, Sanders MA, Koenders JE, Kavelaars FG, Erpelinck-Verschueren CA, Zeilemakers A, Lowenberg B, Valk PJ. Acquired mutations in *ASXL1* in acute myeloid leukemia: prevalence and prognostic value. *Haematologica* 2012; 97: 388-92.
167. Paschka P, Schlenk RF, Gaidzik VI, Habdank M, Krönke J, Bullinger L, Späth D, Kayser S, Zucknick M, Götze K, Horst HA, Germing U, Döhner H, Döhner K. *IDH1* and *IDH2* mutations are frequent genetic alterations in acute myeloid leukemia and confer adverse prognosis in cytogenetically normal acute myeloid leukemia with *NPM1* mutation without *FLT3* internal tandem duplication. *J Clin Oncol* 2010; 28: 3636-43.
168. Tefferi A, Lasho TL, Abdel-Wahab O, Guglielmelli P, Patel J, Caramazza D, Pieri L, Finke CM, Kilpivaara O, Wadleigh M, Mai M, McClure RF, Gilliland DG, Levine RL, Pardanani A, Vannucchi AM. *IDH1* and *IDH2* mutation studies in 1473 patients with chronic-, fibrotic- or blast-phase essential thrombocythemia, polycythemia vera or myelofibrosis. *Leukemia* 2010; 24: 1302-9.
169. Levis M. Targeting IDH: the next big thing in AML. *Blood* 2013; 122: 2770-1.
170. Im AP, Sehgal AR, Carroll MP, Smith BD, Tefferi A, Johnson DE, Boyiadzis M. *DNMT3A* and *IDH* mutations in acute myeloid leukemia and other myeloid malignancies: associations with prognosis and potential treatment strategies. *Leukemia* 2014; 28: 1774-83.
171. Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, Yuan W, Kos I, Batinic-Haberle I, Jones S, Riggins GJ, Friedman H, Friedman A, Reardon D, Herndon J, Kinzler KW, Velculescu VE, Vogelstein B, Bigner DD. *IDH1* and *IDH2* mutations in gliomas. *N Engl J Med* 2009; 360: 765-73.
172. Boissel N, Nibourel O, Renneville A, Gardin C, Reman O, Contentin N, Bordessoule D, Pautas C, de Revel T, Quesnel B, Huchette P, Philippe N, Geffroy S, Terre C, Thomas X, Castaigne S, Dombret H, Preudhomme C. Prognostic impact of isocitrate dehydrogenase enzyme isoforms 1 and 2 mutations in acute myeloid leukemia: a study by the Acute Leukemia French Association group. *J Clin Oncol* 2010; 28: 3717-23.
173. Marcucci G, Maharry K, Wu YZ, Radmacher MD, Mrózek K, Margeson D, Holland KB, Whitman SP, Becker H, Schwind S, Metzeler KH, Powell BL, Carter TH, Kolitz JE, Wetzler M, Carroll AJ, Baer MR, Caligiuri MA, Larson RA, Bloomfield CD. *IDH1* and *IDH2* gene mutations identify novel molecular subsets within de novo cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study. *J Clin Oncol* 2010; 28: 2348-55.
174. Abbas S, Lugthart S, Kavelaars FG, Schelen A, Koenders JE, Zeilemaker A, van Putten WJ, Rijneveld AW, Löwenberg B, Valk PJ. Acquired mutations in the genes encoding *IDH1* and *IDH2* both are recurrent aberrations in acute myeloid leukemia: prevalence and prognostic value. *Blood* 2010; 116: 2122-6.
175. Green CL, Evans CM, Hills RK, Burnett AK, Linch DC, Gale RE. The prognostic significance of *IDH1* mutations in younger adult patients with acute myeloid leukemia is dependent on *FLT3*/ITD status. *Blood* 2010; 116: 2779-82.
176. Green CL, Evans CM, Zhao L, Hills RK, Burnett AK, Linch DC, Gale RE. The prognostic significance of *IDH2* mutations in AML depends on the location of the mutation. *Blood* 2011; 118: 409-12.

177. Basecke J, Whelan JT, Griesinger F, Bertrand FE. The *MLL* partial tandem duplication in acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 2006; 135: 438-49.
178. Mitterbauer-Hohendanner G, Mannhalter C. The biological and clinical significance of *MLL* abnormalities in haematological malignancies. *Eur J Clin Invest* 2004; 34 Suppl 2: 12-24.
179. Zhang Y, Chen A, Yan XM, Huang G. Disordered epigenetic regulation in *MLL*-related leukemia. *Int J Hematol* 2012; 96: 428-37.
180. De Braekeleer M, Morel F, Le Bris MJ, Herry A, Douet-Guilbert N. The *MLL* gene and translocations involving chromosomal band 11q23 in acute leukemia. *Anticancer Res* 2005; 25: 1931-44.
181. Mrózek K, Heinonen K, Lawrence D, Carroll AJ, Koduru PR, Rao KW, Strout MP, Hutchison RE, Moore JO, Mayer RJ, Schiffer CA, Bloomfield CD. Adult patients with de novo acute myeloid leukemia and t(9; 11)(p22; q23) have a superior outcome to patients with other translocations involving band 11q23: a cancer and leukemia group B study. *Blood* 1997; 90: 4532-8.
182. Munoz L, Nomdedeu JF, Villamor N, Guardia R, Colomer D, Ribera JM, Torres JP, Berlanga JJ, Fernández C, Llorente A, Queipo de Llano MP, Sánchez JM, Brunet S, Sierra J. Acute myeloid leukemia with *MLL* rearrangements: clinicobiological features, prognostic impact and value of flow cytometry in the detection of residual leukemic cells. *Leukemia* 2003; 17: 76-82.
183. Döhner K, Tobis K, Ulrich R, Fröhling S, Benner A, Schlenk RF, Döhner H. Prognostic significance of partial tandem duplications of the *MLL* gene in adult patients 16 to 60 years old with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: a study of the Acute Myeloid Leukemia Study Group Ulm. *J Clin Oncol* 2002; 20: 3254-61.
184. Schnittger S, Kinkelin U, Schoch C, Heinecke A, Haase D, Haferlach T, Buchner T, Wormann B, Hiddemann W, Griesinger F. Screening for *MLL* tandem duplication in 387 unselected patients with AML identify a prognostically unfavorable subset of AML. *Leukemia* 2000; 14: 796-804.
185. Steudel C, Wermke M, Schaich M, Schakel U, Illmer T, Ehninger G, Thiede C. Comparative analysis of *MLL* partial tandem duplication and *FLT3* internal tandem duplication mutations in 956 adult patients with acute myeloid leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 2003; 37: 237-51.
186. Li Z-Y, Liu D-P, Liang C-C. New insight into the molecular mechanisms of *MLL*-associated leukemia. *Leukemia* 2005; 19: 183-90.
187. Head DR. Revised classification of acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1996; 10: 1826-31.
188. Mrózek K, Marcucci G, Nicolet D, Maharry KS, Becker H, Whitman SP, Metzeler KH, Schwind S, Wu YZ, Kohlschmidt J, Pettenati MJ, Heerema NA, Block AW, Patil SR, Baer MR, Koltz JE, Moore JO, Carroll AJ, Stone RM, Larson RA, Bloomfield CD. Prognostic significance of the European LeukemiaNet standardized system for reporting cytogenetic and molecular alterations in adults with acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2012; 30: 4515-23.
189. Biondi A, Rambaldi A, Pandolfi PP, Rossi V, Giudici G, Alcalay M, Lo Coco F, Diverio D, Pogliani EM, Lanzi EM, et al. Molecular monitoring of the myl/retinoic acid receptor-alpha fusion gene in acute promyelocytic leukemia by polymerase chain reaction. *Blood* 1992; 80: 492-7.
190. Cassinat B, Zassadowski F, Balitrand N, Barbey C, Rain JD, Fenaux P, Degos L, Vidaud M, Chomienne C. Quantitation of minimal residual disease in acute promyelocytic leukemia patients with t(15;17) translocation using real-time RT-PCR. *Leukemia* 2000; 14: 324-8.
191. Smetsers TF, Stevens EH, van de Locht LT, Mensink EJ. Freezing of PCR master mixture retains full amplification activity and facilitates PCR standardisation for molecular diagnostics and real-time quantitative PCR. *Leukemia* 1998; 12: 1324-5.
192. Wattjes MP, Krauter J, Nagel S, Heidenreich O, Ganser A, Heil G. Comparison of nested competitive RT-PCR and real-time RT-PCR for the detection and quantification of AML1/MTG8 fusion transcripts in t(8;21) positive acute myelogenous leukemia. *Leukemia* 2000; 14: 329-35.
193. Claxton DF, Liu P, Hsu HB, Marlton P, Hester J, Collins F, Deisseroth AB, Rowley JD, Siciliano MJ. Detection of fusion transcripts generated by the inversion 16 chromosome in acute myelogenous leukemia. *Blood* 1994; 83: 1750-6.
194. Marcucci G, Caligiuri MA, Döhner H, Archer KJ, Schlenk RF, Döhner K, Maghaby EA, Bloomfield CD. Quantification of *CBFβ/MYH11* fusion transcript by real time RT-PCR in patients with INV(16) acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2001; 15: 1072-80.
195. Visani G, Buonamici S, Malagola M, Isidori A, Piccaluga PP, Martinelli G, Ottaviani E, Grafone T, Baccarani M, Tura S. Pulsed ATRA as single therapy restores long-term remission in PML-RARα-positive acute promyelocytic leukemia patients: real time quantification of minimal residual disease. A pilot study. *Leukemia* 2001; 15: 1696-700.
196. Marková J, Michková P, Burčková K, Březinová J, Michalová K, Dohnalová A, Soukupová Maaloufová J, Soukup P, Vitek A, Cetkovský P, Schwarz J. Prognostic impact of *DNMT3A* mutations in patients with intermediate cytogenetic risk profile acute myeloid leukemia. *Eur J Haematol* 2012; 88: 128-35.

197. Flaman JM, Frebourg T, Moreau V, Charbonnier F, Martin C, Chappuis P, Sappino AP, Limacher IM, Bron L, Benhattar J, et al. A simple p53 functional assay for screening cell lines, blood, and tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 3963-7.
198. Marková J. Nepublikováno.
199. Andersson A, Höglund M, Johansson B, Lassen C, Billström R, Garwicz S, Nilsson PG, Mitelman F, Fioretos T. Paired multiplex reverse-transcriptase polymerase chain reaction (PMRT-PCR) analysis as a rapid and accurate diagnostic tool for the detection of *MLL* fusion genes in hematologic malignancies. *Leukemia* 2001; 15: 1293-300.
200. Livak KJ. Allelic discrimination using fluorogenic probes and the 5' nuclease assay. *Genet Anal* 1999; 14: 143-9.
201. Latorra D, Campbell K, Wolter A, Hurley JM. Enhanced allele-specific PCR discrimination in SNP genotyping using 3' locked nucleic acid (LNA) primers. *Hum Mutat* 2003; 22: 79-85.
202. Fuchs O, Kostěčka A, Provazníková D, Krásná B, Kotlín R, Staňková M, Kobylka P, Dostálová G, Zeman M, Chochola M. CCAAT/enhancer-binding protein  $\alpha$  (*CEBPA*) polymorphisms and mutations in healthy individuals and in patients with peripheral artery disease, ischaemic heart disease and hyperlipidaemia. *Folia Biol (Praha)* 2010; 56: 51-7.
203. Pitiot AS, Santamaria I, Garcia-Suarez O, Centeno I, Astudillo A, Rayon C, Balbin M. A new type of NPM1 gene mutation in AML leading to a C-terminal truncated protein. *Leukemia* 2007; 21: 1564-6.
204. Shaffer LG, McGowan-Jordan J, Schmidt M. *An International System for Human Cytogenetic Nomenclature*. Karger, Basel 2013.
205. Appelbaum FR, Kopecky KJ, Tallman MS, Slovak ML, Gundacker HM, Kim HT, Dewald GW, Kantarjian HM, Pierce SR, Estey EH. The clinical spectrum of adult acute myeloid leukaemia associated with core binding factor translocations. *Br J Haematol* 2006; 135: 165-73.
206. Schlenk RF, Benner A, Krauter J, Büchner T, Sauerland C, Ehninger G, Schaich M, Mohr B, Niederwieser D, Krahl R, Pasold R, Döhner K, Ganser A, Döhner H, Heil G. Individual patient data-based meta-analysis of patients aged 16 to 60 years with core binding factor acute myeloid leukemia: a survey of the German Acute Myeloid Leukemia Intergroup. *J Clin Oncol* 2004; 22: 3741-50.
207. Marcucci G, Mrózek K, Ruppert AS, Maharry K, Kollitz JE, Moore JO, Mayer RJ, Pettenati MJ, Powell BL, Edwards CG, Sterling LJ, Vardiman JW, Schiffer CA, Carroll AJ, Larson RA, Bloomfield CD. Prognostic factors and outcome of core binding factor acute myeloid leukemia patients with t(8;21) differ from those of patients with inv(16): a Cancer and Leukemia Group B study. *J Clin Oncol* 2005; 23: 5705-17.
208. Chillón MC, Santamaría C, García-Sanz R, Balanzategui A, Sarasquete ME, Alcoceba M, Marín L, Caballero MD, Vidriales MB, Ramos F, Bernal T, Diaz-Mediavilla J, de Coca AG, Penarrubia MJ, Queizan JA, Giraldo P, San Miguel JF, Gonzalez M. Long *FLT3* internal tandem duplications and reduced *PML-RAR $\alpha$*  expression at diagnosis characterize a high-risk subgroup of acute promyelocytic leukemia patients. *Haematologica* 2010; 95: 745-51.
209. Pekova S, Ivanek R, Dvorak M, Rueggeberg S, Leicht S, Li X, Franz T, Kozak T, Vrba J, Koza V, Karas M, Schwarz J, Cetkovsky P, Prucha M. Molecular variability of *FLT3*/ITD mutants and their impact on the differentiation program of 32D cells: implications for the biological properties of AML blasts. *Leuk Res* 2009; 33: 1409-16.
210. Schnittger S, Bacher U, Haferlach C, Alpermann T, Kern W, Haferlach T. Diversity of the juxtamembrane and TKD1 mutations (exons 13-15) in the *FLT3* gene with regards to mutant load, sequence, length, localization, and correlation with biological data. *Genes Chromosomes Cancer* 2012; 51: 910-24.
211. Renneville A, Boissel N, Nibourel O, Berthon C, Helevaut N, Gardin C, Cayuela JM, Hayette S, Reman O, Contentin N, Bordessoule D, Pautas C, Botton S, Revel T, Terre C, Fenaux P, Thomas X, Castaigne S, Dombret H, Preudhomme C. Prognostic significance of DNA methyltransferase 3A mutations in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a study by the Acute Leukemia French Association. *Leukemia* 2012; 26: 1247-54.
212. Marcucci G, Haferlach T, Döhner H. Molecular genetics of adult acute myeloid leukemia: prognostic and therapeutic implications. *J Clin Oncol* 2011; 29: 475-86.

## 9. SEZNAM ZKRATEK

abn	abnormalita
add	addition
ALL	akutní lymfoidní leukemie
AML	akutní myeloidní leukemie
APL	akutní promyelocytární leukemie
ATP	adenozin trifosfát
ATRA	all-trans-retinová kyselina
bcr	breakpoint cluster region
BSA	bovine serum albumin
CALGB 8461	Cancer and Leukemia Group B
CBF-AML	core binding factor AML
CLL	chronická lymfoidní leukemie
CML	chronická myeloidní leukemie
CR	kompletní remise
CSF1/M-CSF	colony stimulating factor 1/macrophage colony-stimulating factor
del	delece
dNTP	deoxyribonucleotides
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
ELN	Evropská leukemická síť
ETP	enhancer of trithorax and polycomb
FAB klasifikace	Francouzsko-Americko-Britská klasifikace
FISH	fluorescenční <i>in-situ</i> hybridizace
GDP	guanozin difosfát
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
GTP	guanozin trifosfát
HDAC	histodeacetylázový komplex
HSCT	transplantace krvetvorných kmenových buněk
IL-3	interleukin 3
inv	inverze
ITD	interní tandemová duplikace
JM doména	juxtamembránová doména
LNA	locked nucleic acid
MDS	myelodysplastický syndrom
MRO	minimální reziduální onemocnění
NADP	nikotinamid adenin nukleotid fosfát
NES	jaderný exportní signál
NLS	jaderný lokalizační signál
OS	overall survival
PBS	phosphat buffered saline
PcG	polycomb group
PCR	polymerázová řetězová reakce
PHD	plain homeodomain
RARE	retinoic acid response elements
RFS	relapse free survival

RHD	runt homology domain
RING	really interesting gene
RXR	retinoid X receptors
SCF	stem cell factor
SWOG/ECOG	Southwest Oncology Group/Eastern Cooperative Oncology Group
TCR	T-cell receptors
TE pufr	trisCl/EDTA pufr
TKD	tyrozinkinázová doména
trxG	trithorax group
ÚHKT	Ústav hematologie a krevní transfuze

**Geny:**

<i>ABL</i>	Abelson murine leukemia viral oncogene homolog
<i>AF6</i>	ALL1 fused gene from chromosome 6
<i>AF9</i>	ALL1 fused gene from chromosome 9
<i>AF10</i>	ALL1 fused gene from chromosome 10
<i>AML1</i>	acute myeloid leukemia 1
<i>AML2</i>	acute myeloid leukemia 2
<i>AML3</i>	acute myeloid leukemia 3
<i>ASXL1</i>	additional sex combs like 1
<i>BCOR</i>	BCL6 corepressor
<i>CAN</i>	nucleoporin
<i>CBF<math>\alpha</math></i>	core binding factor $\alpha$
<i>CBF<math>\beta</math></i>	core binding factor $\beta$
<i>CEBPA</i>	CCAAT enhancer binding protein alpha
<i>C-KIT</i>	Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene
<i>DEK</i>	DEK oncogene
<i>DNMT3A</i>	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 alpha
<i>ELL</i>	eleven nineteen lysin rich leukemia gene
<i>ENL</i>	eleven nineteen leukemia
<i>ETO</i>	eigth twenty one
<i>FIP1L1</i>	factor interacting with PAPOLA and CPSF1
<i>FLT3</i>	FMS-like tyrosine kinase 3
<i>H-RAS</i>	Harvey rat sarcoma viral oncogene
<i>IDH1</i>	isocitrate dehydrogenase 1
<i>IDH2</i>	isocitrate dehydrogenase 2
<i>K-RAS</i>	Kirsten rat sarcoma 2 viral oncogene
<i>MLL</i>	myeloid/lymphoid or mixed lineage leukemia
<i>MYH11</i>	myosin heavy chain 11
<i>NPM1</i>	nucleophosmin 1
<i>N-RAS</i>	neuroblastoma RAS viral oncogene
<i>NuMA</i>	nuclear mitotic apparatus protein
<i>OBFC2A</i>	oligonucleotide/oligosaccharide-binding fold containing 2A
<i>PDGFR<math>\alpha</math></i>	platelet-derived growth factor receptor $\alpha$
<i>PDGFR<math>\beta</math></i>	platelet-derived growth factor receptor $\beta$

<i>PLZF</i>	promyelocytic leukemia zinc finger
<i>PML</i>	promyelocytic leukemia gene
<i>PRKARIA</i>	protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type I, alpha
<i>RAR<math>\alpha</math></i>	retinoic acid receptor $\alpha$
<i>RAR<math>\beta</math></i>	retinoic acid receptor $\beta$
<i>RAR<math>\gamma</math></i>	retinoic acid receptor $\gamma$
<i>STAT5b</i>	signal transducer and activator of transcription 5b
<i>TET2</i>	Ten-Eleven Translocation-2
<i>WT1</i>	Wilms' tumor suppressor gene



## 10. SEZNAM TABULEK

<b>Tab. 1:</b> Morfologická FAB klasifikace AML.....	6
<b>Tab. 2:</b> Klasifikace AML podle cytogenetického nálezu podle SWOG/ECOG.....	7
<b>Tab. 3:</b> Klasifikace AML podle cytogenetického nálezu podle CALGB 8461 .....	7
<b>Tab. 4:</b> Klasifikace AML podle cytogenetického nálezu podle Grimwada .....	8
<b>Tab. 5:</b> Rizikové skupiny AML podle cytogenetického a molekulárně genetického nálezu podle ELN .....	8
<b>Tab. 6:</b> Složení roztoků pro separaci buněk .....	29
<b>Tab. 7:</b> Přehled použitých primerů a sond.....	30
<b>Tab. 8:</b> Přehled použitých PCR programů.....	33
<b>Tab. 9:</b> Charakteristika pacientů s fúzním genem <i>AML1/ETO</i> a přehled sekundárních mutací.....	47
<b>Tab. 10:</b> Charakteristika pacientů s fúzním genem <i>CBFβ/MYH11</i> a přehled sekundárních mutací ..	48

## 11. SEZNAM OBRÁZKŮ

<b>Obr. 1:</b> Schematické zobrazení různých zlomových míst genu <i>PML</i> a výsledných fúzních produktů <i>PML/RAR<math>\alpha</math></i> .....	11
<b>Obr. 2:</b> Schematické znázornění transkripčního komplexu CBF .....	12
<b>Obr. 3:</b> Grafické znázornění exon/intronové struktury genů <i>AML1</i> a <i>ETO</i> .....	13
<b>Obr. 4:</b> Schematické znázornění fúzního genu <i>CBF<math>\beta</math>/MYH11</i> a 10 známých typů zlomových míst.....	14
<b>Obr. 5:</b> Schematické znázornění receptorové tyrozinkinázy C-KIT .....	15
<b>Obr. 6:</b> Schematické znázornění receptorové tyrozinkinázy FLT3 a míst podléhajících mutacím .....	18
<b>Obr. 7:</b> Struktura NPM1 proteinu a vliv somatických mutací na jeho funkci.....	20
<b>Obr. 8:</b> Schematické znázornění <i>CEBPA</i> genu s místy výskytu mutací .....	22
<b>Obr. 9:</b> Struktura a funkce DNA metyltransferáz .....	23
<b>Obr. 10:</b> Vliv mutací genů <i>IDH1,2</i> na funkci IDH enzymů v průběhu Krebsova cyklu.....	25
<b>Obr. 11:</b> Odlišení pacientů se zlomy v oblasti bcr1, resp. bcr2 genu <i>PML</i> .....	33
<b>Obr. 12:</b> Gelová elektroforéza <i>CBF<math>\beta</math>/MYH11</i> pozitivních pacientů s různými místy zlomu v genu <i>MYH11</i> .....	35
<b>Obr. 13:</b> Výsledek gelové elektroforézy <i>FLT3/ITD</i> .....	36
<b>Obr. 14:</b> Sekvence <i>FLT3/ITD</i> .....	37
<b>Obr. 15:</b> Výsledek gelové elektroforézy štěpení <i>FLT3/TKD</i> .....	37
<b>Obr. 16:</b> Rozdíl ve struktuře LNA a DNA nukleotidů .....	39
<b>Obr. 17:</b> OS pacientů v závislosti na výsledku analýzy karyotypu .....	43
<b>Obr. 18:</b> Vliv místa zlomu genu <i>PML</i> na incidenci relapsů (molekulárních či klinických) .....	44
<b>Obr. 19:</b> Vliv místa zlomu genu <i>PML</i> na OS pacientů.....	44
<b>Obr. 20:</b> Vliv místa zlomu genu <i>PML</i> na výskyt <i>FLT3/ITD</i> .....	45
<b>Obr. 21:</b> Vliv pozitivivity <i>FLT3/ITD</i> na počet leukocytů při diagnóze APL .....	45
<b>Obr. 22:</b> Vliv pozitivivity <i>FLT3/ITD</i> na docílení CR .....	45
<b>Obr. 23:</b> Vliv pozitivivity <i>FLT3/ITD</i> na incidenci relapsů (molekulárních či klinických) .....	45
<b>Obr. 24:</b> Vliv pozitivivity <i>FLT3/ITD</i> na OS pacientů .....	45
<b>Obr. 25:</b> Vliv typu fúzního genu na počet leukocytů v době diagnózy .....	49
<b>Obr. 26:</b> Vliv přítomnosti sekundární mutace na počet leukocytů v době diagnózy .....	49
<b>Obr. 27:</b> Vliv typu fúzního genu na docílení molekulární remise.....	49
<b>Obr. 28:</b> Vliv přítomnosti sekundární mutace na docílení molekulární remise .....	49
<b>Obr. 29:</b> Vliv dosažení molekulární remise na incidenci relapsů (molekulárních či klinických) .....	50
<b>Obr. 30:</b> Vliv dosažení molekulární remise na RFS pacientů .....	50
<b>Obr. 31:</b> Vliv typu fúzního genu na incidenci relapsů (molekulárních či klinických).....	50

<b>Obr. 32:</b> Vliv přítomnosti sekundární mutace na RFS u pacientů s <i>CBFβ/MYH11</i> .....	50
<b>Obr. 33:</b> Vliv docílení molekulární remise na OS pacientů .....	51
<b>Obr. 34:</b> Vliv typu fúzního genu na OS pacientů .....	51
<b>Obr. 35:</b> Přehled délky zachycených ITD a zastoupení jednotlivých aminokyselin .....	52
<b>Obr. 36:</b> Vliv <i>FLT3</i> /ITD pozitivitu na počet leukocytů v době záchytu onemocnění .....	52
<b>Obr. 37:</b> Vliv procentuálního zastoupení mutované alely <i>FLT3</i> /ITD na počet leukocytů v době záchytu onemocnění .....	52
<b>Obr. 38:</b> Vliv <i>FLT3</i> /ITD na dosažení CR .....	53
<b>Obr. 39:</b> Vliv délky ITD na dosažení CR .....	53
<b>Obr. 40:</b> Vliv <i>FLT3</i> /ITD na riziko relapsu onemocnění .....	54
<b>Obr. 41:</b> Vliv délky ITD na riziko relapsu onemocnění .....	54
<b>Obr. 42:</b> Vliv pozitivitu <i>FLT3</i> /ITD na OS pacientů .....	54
<b>Obr. 43:</b> Vliv místa inserce ITD na OS pacientů .....	54
<b>Obr. 44:</b> Vliv mutací <i>FLT3</i> /TKD na počet leukocytů v době záchytu onemocnění .....	55
<b>Obr. 45:</b> Vliv mutací <i>FLT3</i> /TKD na počet leukocytů v době záchytu onemocnění, po vyřazení pacientů s <i>FLT3</i> /ITD .....	55
<b>Obr. 46:</b> Vliv mutací <i>FLT3</i> /TKD na incidenci relapsů .....	56
<b>Obr. 47:</b> Vliv mutací <i>FLT3</i> /TKD na OS pacientů .....	56
<b>Obr. 48:</b> Přehled zachycených mutací <i>DNMT3A</i> .....	57
<b>Obr. 49:</b> Vliv přítomnosti mutace <i>DNMT3A</i> na počet leukocytů v době diagnózy .....	58
<b>Obr. 50:</b> Vliv typu mutace <i>DNMT3A</i> na počet leukocytů v době diagnózy .....	58
<b>Obr. 51:</b> Kumulativní incidence relapsů <i>DNMT3A</i> mutovaných a nemutovaných pacientů .....	59
<b>Obr. 52:</b> Vliv typu mutace <i>DNMT3A</i> na incidenci relapsů .....	59
<b>Obr. 53:</b> Vliv mutace <i>DNMT3A</i> na OS pacientů .....	59
<b>Obr. 54:</b> Vliv mutace <i>DNMT3A</i> na přežití pacientů po dosažení CR .....	59
<b>Obr. 55:</b> Korelace výskytu mutace <i>DNMT3A</i> a <i>FLT3</i> /ITD .....	60
<b>Obr. 56:</b> Typ mutace <i>DNMT3A</i> v závislosti na přítomnosti <i>FLT3</i> /ITD .....	60
<b>Obr. 57:</b> Vliv <i>FLT3</i> /ITD na výskyt relapsů u pacientů s <i>DNMT3A</i> mutací .....	60
<b>Obr. 58:</b> Vliv <i>DNMT3A</i> mutace na výskyt relapsů u pacientů s <i>FLT3</i> /ITD .....	60
<b>Obr. 59:</b> Vliv mutace <i>ASXL1</i> na počet leukocytů v době diagnózy .....	62
<b>Obr. 60:</b> Vliv mutace <i>ASXL1</i> na procentuální zastoupení blastů v KD v době diagnózy .....	62
<b>Obr. 61:</b> Vliv mutace <i>ASXL1</i> na docílení CR .....	62
<b>Obr. 62:</b> Vliv mutace <i>ASXL1</i> na incidenci relapsů .....	62
<b>Obr. 63:</b> Vliv translokací <i>MLL</i> genu na OS pacientů .....	63
<b>Obr. 64:</b> Srovnání OS pacientů s t(9;11) se skupinou pacientů s ostatními translokacemi <i>MLL</i> genu .....	63
<b>Obr. 65:</b> OS pacientů podle kritérií ELN .....	65

<b>Obr. 66:</b> OS pacientů podle kritérií ELN; rozdělení podskupin v závislosti na přítomnosti jednotlivých molekulárních a cytogenetických aberací .....	65
<b>Obr. 67:</b> OS pacientů v závislosti na přítomnosti jednotlivých molekulárních a cytogenetických aberací .....	66

## 12. SEZNAM PUBLIKACÍ

### 12.1 PUBLIKACE ZA DOBU STUDIA SE VZTAHEM K PŘEDKLÁDANÉ PRÁCI

**Marková J.**, Michková P., Burčková K., Březinová J., Michalová K., Dohnalová A., Soukupová Maaloufová J., Soukup P., Vitek A., Cetkovský P., Schwarz J.: Prognostic impact of *DNMT3A* mutations in patients with intermediate cytogenetic risk profile acute myeloid leukemia. *Eur. J. Haematol.* 88, (2), 128-135, 2012. (IF 2,414)

Hájková H., **Marková J.**, Haškovec C., Šárová I., Fuchs O., Kostečka A., Cetkovský P., Michalová K., Schwarz J.: Decreased DNA methylation in acute myeloid leukemia patients with *DNMT3A* mutations and prognostic implications of DNA methylation. *Leuk. Res.* 36, (9), 1128-1133, 2012. (IF 2,692)

Schwarz J., **Marková J.**: *DNMT3A* mutations in AML: A new prognostic factor? *Leuk. Res.* 37, (11), 1432-3, 2013. (IF 2,692)

Hájková H., Hsi-Yang Fritz M., Haškovec C., Schwarz J., Šálek C., **Marková J.**, Krejčík Z., Dostálová Merkerová M., Kostečka A., Vostrý M., Fuchs O., Michalová K., Cetkovský P., Beneš V.: *CBFβ-MYH11* hypomethylation signature and *PBX3* differential methylation revealed by targeted bisulfite sequencing in patients with acute myeloid leukemia. *J. Hematol. Oncol.* 7, (1), 66, 2014. (IF 4,930)

### 12.2 PUBLIKACE ZA DOBU STUDIA BEZ VZTAHU K PŘEDKLÁDANÉ PRÁCI

Lemež P., Klamová H., Zemanová Z., Marinov I., Fuchs O., Schwarz J., Březinová J., Provazníková D., Kostečka A., **Marková J.**, Michalová K., Jelínek J.: Unusually long survival of a 67-year-old patient with near-tetraploid acute myeloid leukemia M0 without erythroblastic and megakaryocytic dysplasia. *Acta Hematol.* 126, (3), 129-134, 2011. (IF 0,890)

Polák J., Hájková H., Maaloufová-Soukupová J., **Marková J.**, Šálek C., Schwarz J., and Haškovec C.: Estimation of molecular upper remission limit for monitoring minimal residual disease in peripheral blood of acute myeloid leukemia patients by WT1 expression. *Exp. Ther. Med.* 3, (1), 129-133, 2012. (IF 0,941)

Polak J, Hajkova H, Haskovec C, Cechova H, Marinov I, Mikulenкова D, **Markova J**, Vitek A, Valkova V: Quantitative monitoring of WT1 expression in peripheral blood before and after

allogeneic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia an useful tool for early detection of minimal residual disease. *Neoplasma* 60, (1), 74-82, 2013. (IF 1,642)

Brezinova J., Sarova I., Buryova H., **Markova J.**, Ransdorfova S., Izakova S., Kostylkova K., Soukupova J., Zemanova Z., Michalova K.: Fusion of the additional sex combs like 1 and teashirt zinc finger homeobox 2 genes resulting from ider(20q) aberration in a patient with myelodysplastic syndrome. *Br. J. Haematol.* 164, 153-155, 2014. (IF 4,959)

### 12.3 PUBLIKACE PŘED ZAHÁJENÍM STUDIA

Schwarz J., **Marková J.**, Peková S., Trnková Z., Šponerová D., Cetkovský P.: A single administration of gemtuzumab ozogamicin for molecular relapse of acute promyelocytic leukemia. *Hematol. J.* 5, (3), 279-280, 2004. (IF 1,189)

Peková S., **Marková J.**, Pajer P., Dvořák M., Cetkovský P., Schwarz J.: Touch-down reverse transcriptase-PCR detection of *IgV<sub>H</sub>* rearrangement and Sybr-Green-based real time RT-PCR quantitation of minimal residual disease in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Mol. Diagn.* 9, (1), 23-34, 2005.

Polák J., **Marková J.**, Schwarz J., Maaloufová J., Volková Z., Čermák J., Haškovec C.: Užití kvantitativního stanovení exprese genu Wilmsova tumoru 1 pro monitorování reziduální nemoci pacientů s akutní myeloidní leukemií. *Čas. lék. čes.* 145, (1), 36-42, 2006.

Schwarz J., Mikulenkova D., Čermáková K., Polanská V., Michalová K., Marinov I., Campr V., Ransdorfova Š., **Marková J.**, Pavlišťová L., Březinová J., Sajdová J., Šponerová D., Volková Z., Benešová K., Čermák J., Vitek A., Cetkovský P.: Prognostic relevance of the FAB morphological criteria in chronic lymphocytic leukemia: correlations with *IgV<sub>H</sub>* gene mutational status and other prognostic markers. *Neoplasma* 53, (3), 219-225, 2006. (IF 1,642)

**Marková J.**, Průková D., Volková Z., Schwarz J.: A new allelic discrimination assay using locked nucleic acid-modified nucleotides (LNA) probes for detection of *JAK2* V617F mutation. *Leuk. Lymphoma* 48, (3), 638-641, 2007. (IF 2,605)

Trnková Z., Bedrlíková R., **Marková J.**, Michalová K., Stöckbauer P., Schwarz J.: Semiquantitative RT-PCR evaluation of the *MDR1* gene expression in patients with acute myeloid leukemia. *Neoplasma* 54, (5), 383-390, 2007. (IF 1,642)

Fuchs O., Provaznikova D., Kocova M., Kostecka A., Cvekova P., Neuwirtova R., Kobylka P., Cermak J., Brezinova J., Schwarz J., **Markova J.**, Salaj P., Klamova H., Maaloufova J., Lemez P., Novakova L., Benesova K.: CEBPA polymorphisms and mutations in patients with acute myeloid leukemia, myelodysplastic syndrome, multiple myeloma and non-Hodgkin's lymphoma. *Blood Cell Molec Dis* 40, (3), 401-405, 2008. (IF 2,331)

Schwarz, J.; **Marková, J.**; Fuchs, O.; Polák, J.; Haškovec, C.; Cetkovský, P.: Význam mutací genu *FLT3* a dalších molekulárních markerů pro prognózu a léčebný přístup u akutní myeloidní leukémie. *Trans. Hemat. dnes* 14, 116-122, 2008.

Schwarz J., Kačírková P., **Marková J.**, Mikulenková D., Marinov I., Ballingová I., Michalová K.: Urgentní stav v hematologii: akutní promyelocytární leukemie – principy diagnostiky. *Vnitř. lék.* 54, (7-8), 728-744, 2008.

Schwarz J., Kořístek Z., Starý J., Žák P., Kozák T., **Marková J.**, Michalová K., Dvořáková D., Mayer J., Cetkovský P.: Léčba akutní promyelocytární leukemie v Česku: výsledky a analýza prognostických faktorů. *Vnitř. lék.* 54, (7-8), 757-770, 2008.

Fuchs O., Kostecka A., Provaznikova D., Krasna B., Brezinova J., Filkukova J., Kotlin R., Kouba M., Kobylka P., Neuwirtova R., Jonasova A., Caniga M., Schwarz J., **Markova J.**, Maaloufova J., Sponerova D., Novakova L., Cermak J.: Nature of frequent deletions in *CEBPA*. *Blood Cell Molec Dis* 43, (3), 260-263, 2009. (IF 2,331)

**Marková J.**, Trnková Z., Michková P., Maaloufová J., Starý J., Cetkovský P., Schwarz J.: Monitoring of minimal residual disease in patients with core binding factor acute myeloid leukemia and the impact of *C-KIT*, *FLT3* and *JAK2* mutations on clinical outcome. *Leuk Lymphoma* 50, (9), 1448-1460, 2009. (IF 2,605)

Hodnota IF byla určena ke 25.09.2014.

### 13. SEZNAM PŘÍLOH

- P1. Marková J., Trnková Z., Michková P., Maaloufová J., Starý J., Cetkovský P., Schwarz J.: Monitoring of minimal residual disease in patients with core binding factor acute myeloid leukemia and the impact of *C-KIT*, *FLT3* and *JAK2* mutations on clinical outcome. *Leuk Lymphoma* 50, (9), 1448-1460, 2009.
- P2. Marková J., Michková P., Burčková K., Březinová J., Michalová K., Dohnalová A., Soukupová Maaloufová J., Soukup P., Vitek A., Cetkovský P., Schwarz J.: Prognostic impact of *DNMT3A* mutations in patients with intermediate cytogenetic risk profile acute myeloid leukemia. *Eur. J. Haematol.* 88, (2), 128-135, 2012.
- P3. Hájková H., Marková J., Haškovec C., Šárová I., Fuchs O., Kostečka A., Cetkovský P., Michalová K., Schwarz J.: Decreased DNA methylation in acute myeloid leukemia patients with *DNMT3A* mutations and prognostic implications of DNA methylation. *Leuk. Res.* 36, (9), 1128-1133, 2012.
- P4. Schwarz J., Marková J.: *DNMT3A* mutations in AML: A new prognostic factor? *Leuk. Res.* 37, (11), 1432-3, 2013.
- P5. Hájková H., Hsi-Yang Fritz M., Haškovec C., Schwarz J., Šálek C., **Marková J.**, Krejčík Z., Dostálová Merkerová M., Kostečka A., Vostrý M., Fuchs O., Michalová K., Cetkovský P., Beneš V.: *CBFβ-MYH11* hypomethylation signature and *PBX3* differential methylation revealed by targeted bisulfite sequencing in patients with acute myeloid leukemia. *J. Hematol. Oncol.* 7, (1), 66, 2014.