

**Univerzita Karlova v Praze**

**1. lékařská fakulta**

Autoreferát disertační práce



**Molekulárně genetické změny u akutní myeloidní leukemie**

Ing. Marková Jana

2015

## **Doktorské studijní programy v biomedicině**

*Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky*

Obor: Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie

Předseda oborové rady: Prof. RNDr. Stanislav Zadražil, DrSc.

Školící pracoviště: Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha

Školitel: MUDr. Jiří Schwarz, CSc.

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

# OBSAH

<b>1. ÚVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. CÍL PRÁCE</b> .....	<b>1</b>
<b>3. LITERÁRNÍ PŘEHLED PROBLEMATIKY</b> .....	<b>1</b>
<b>3.1 AKUTNÍ MYELOIDNÍ LEUKEMIE</b> .....	<b>1</b>
<b>3.2 KLASIFIKACE AML</b> .....	<b>2</b>
<b>3.3 AML S PŘÍZNIVOU CYTOGENETICKOU PROGNÓZOU</b> .....	<b>3</b>
<b>3.3.1 AKUTNÍ PROMYELOCYTÁRNÍ LEUKEMIE</b> .....	<b>3</b>
<b>3.3.2 CBF-AML</b> .....	<b>3</b>
<b>3.4 AML SE STŘEDNÍ CYTOGENETICKOU PROGNÓZOU</b> .....	<b>4</b>
<b>3.4.1 MUTACE GENU FLT3</b> .....	<b>5</b>
<b>3.4.2 MUTACE GENU NPM1</b> .....	<b>5</b>
<b>3.4.3 MUTACE GENU CEBPA</b> .....	<b>6</b>
<b>3.4.4 MUTACE GENU DNMT3A</b> .....	<b>6</b>
<b>3.4.5 MUTACE GENU ASXLI</b> .....	<b>6</b>
<b>3.4.6 MUTACE GENŮ IDH1 A IDH2</b> .....	<b>7</b>
<b>3.4.7 ABERACE GENU MLL</b> .....	<b>7</b>
<b>3.5 AML S NEPŘÍZNIVOU CYTOGENETICKOU PROGNÓZOU</b> .....	<b>8</b>
<b>4. PACIENTI A METODY</b> .....	<b>8</b>
<b>4.1 PACIENTI</b> .....	<b>8</b>
<b>4.2 METODY</b> .....	<b>9</b>
<b>4.2.1 SEPARACE BUNĚK</b> .....	<b>9</b>
<b>4.2.2 IZOLACE RNA A DNA, PŘÍPRAVA cDNA</b> .....	<b>9</b>
<b>4.2.3 DETEKCE FÚZNÍHO GENU PML/RAR<math>\alpha</math></b> .....	<b>9</b>
4.2.3.1 Monitorování <i>PML/RAR<math>\alpha</math></i> pomocí kvantitativní PCR.....	<b>9</b>
<b>4.2.4 DETEKCE FÚZNÍCH GENŮ AML1/ETO A CBF<math>\beta</math>/MYH11</b> .....	<b>10</b>
<b>4.2.5 DETEKCE FLT3/ITD</b> .....	<b>10</b>
<b>4.2.6 DETEKCE FLT3/TKD</b> .....	<b>10</b>
<b>4.2.7 DETEKCE C-KIT MUTACÍ</b> .....	<b>11</b>
<b>4.2.8 DETEKCE MUTACÍ K-RAS A N-RAS</b> .....	<b>11</b>
<b>4.2.9 DETEKCE MUTACÍ DNMT3A</b> .....	<b>11</b>

4.2.10	DETEKCE MUTACÍ ASXL1 .....	11
4.2.11	DETEKCE FÚZNÍCH GENŮ SPOJENÝCH S PŘESTAVBAMI GENU MLL .....	11
4.2.12	DETEKCE MUTACÍ TP53.....	12
4.2.13	DETEKCE MUTACÍ NPM1 A CEBPA .....	12
4.2.14	CYTOGENETICKÁ ANALÝZA.....	12
4.2.15	STATISTICKÉ METODY.....	12
5.	VÝSLEDKY .....	13
5.1	AML S PŘÍZNIVOU CYTOGENETICKOU PROGNÓZOU .....	13
5.1.1	APL.....	13
5.1.2	CBF-AML.....	13
5.2	AML SE STŘEDNÍ CYTOGENETICKOU PROGNÓZOU .....	14
5.2.1	FLT3/ITD .....	14
5.2.2	MUTACE FLT3/TKD.....	15
5.2.3	MUTACE DNMT3A.....	15
5.2.4	MUTACE ASXL1 .....	16
5.2.5	TRANSLOKACE GENU MLL.....	16
5.3	AML S NEPŘÍZNIVOU CYTOGENETICKOU PROGNÓZOU .....	17
5.3.1	MUTACE TP53 .....	17
5.4	HODNOCENÍ OS PODLE KRITERIÍ ELN .....	17
6.	DISKUSE .....	18
7.	ZÁVĚR.....	20
8.	LITERATURA .....	22
9.	SEZNAM PUBLIKACÍ .....	28
9.1	PUBLIKACE ZA DOBU STUDIA SE VZTAHEM K PŘEDKLÁDANÉ PRÁCI .....	28
9.2	PUBLIKACE ZA DOBU STUDIA BEZ VZTAHU K PŘEDKLÁDANÉ PRÁCI .....	28
9.3	PUBLIKACE PŘED ZAHÁJENÍM STUDIA .....	29

## 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 sekvenční analýzy, případně restrikčního 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 přeživalo 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 přeživalo pouze 17 % pacientů), bez ohledu na délku a místo inzerce ITD. Mutace genu *ASXL1* neměly na prog-nózu 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

Akutní myeloidní leukemie (AML) je geneticky heterogenní onemocnění, vznikající v důsledku získaných somatických mutací v hematopoetických progenitorových buňkách, narušujících normální průběh diferenciaci, vyžívání a následně i proliferaci. 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 [1,2].

## 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 akutní promyelocytární leukemií (APL)
2. u pacientů s core binding factor AML (CBF-AML)
3. u pacientů se střední cytogenetickou prognózou (význam mutací genu *FLT3* a dalších).

## 3. LITERÁRNÍ PŘEHLED PROBLEMATIKY

### 3.1 AKUTNÍ MYELOIDNÍ LEUKEMIE

AML jsou heterogenní skupinou onemocnění vznikajících maligní transformací hematopoetické kmenové nebo progenitorové buňky, spojené s poruchou diferenciaci a apoptózy při zachování schopnosti proliferace. Akumulace leukemických blastů potlačuje fyziologickou krvetvorbu 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 [3].

AML je nejčastějším typem leukemie u dospělých pacientů a představují 3 % všech maligních nádorů. Věk pacientů je nejvýznamnějším prognostickým faktorem, šance na uzdravení klesá kontinuálně se stoupajícím věkem [3-5].

Diagnostika AML se opírá o morfologické, cytochemické, imunofenotypizační, cytogenetické a molekulárně genetické vyšetření periferní krve a kostní dřeně (KD) [6].

Konvenční cytogenetické vyšetření (doplněné o FISH analýzu) je nezbytné pro diagnostiku chromozomálních aberací. Chromozomální abnormality nacházíme u 55-60 % případů AML [1,2]. 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 [4,7].

Léčba AML má dvě fáze. Cílem první, indukční fáze je navození kompletní remise (CR), charakterizované normalizací hodnot krevního obrazu, druhá fáze, tzv. konsolidační terapie, se zaměřuje na vymizení MRO a docílení molekulární remise [6,8].

### 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 a je založena především na morfologických, event. cytochemických metodách [9].

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. Moderní cytogenetické a molekulárně genetické klasifikace [7,10] založené na analýze karyotypu a jeho vlivu na průběh a prognózu onemocnění u pacientů mladších 60 let, rozdělují pacienty do tří prognostických skupin.



### 3.3 AML S PŘÍZNIVOU CYTOGENETICKOU PROGNÓZOU

#### 3.3.1 AKUTNÍ PROMYELOCYTÁRNÍ LEUKEMIE

APL je samostatnou podskupinou v rámci FAB klasifikace označovanou AML M3 (příp. M3v) a po dlouhou dobu byla spojována s extrémně špatnou prognózou. Tito pacienti představují přibližně 10-15 % nově diagnostikovaných AML. Specifickým znakem APL je t(15;17)(q22;q21) s fúzním genem *PML/RARα*, který je detekován až u 98 % případů. Zbývá 2 % případů, které připadají na vzácné fúze genu *RARα* s různými fúzními partnery.

Ke zlomu v genu *RARα* dochází vždy v intronu 2, místo zlomu v genu *PML* je variabilní. V přibližně 55 % případů dochází ke zlomu v intronu 6 (tzv. bcr1 zlom), u 40 % APL dochází ke zlomu v oblasti intronu 3 *PML* genu (bcr3), vzniklý fúzní transkript je pak kratší. Ve zbylých přibližně 5 % případů je zlom lokalizován v různých místech exonu 6 a výsledný produkt má tedy variabilní délku [11-13].

Při včasné diagnostice a zahájení specifické léčby induktory diferenciacie (tretinoin=ATRA, arsenik) a chemoterapií je APL v současnosti 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 [10,14-16]. K relapsu onemocnění dochází u 5-30 % případů [13,14,16]. OS pacientů s APL se pohybuje mezi 60-80 % [10,14,17,18].

Interní tandemové duplikace genu *FLT3* (*FLT3/ITD*) jsou nejčastější sekundární molekulární aberací u pacientů s APL, nacházejí se u 20-35 % případů [14,19,20]. Přítomnost *FLT3/ITD* vede k vyššímu počtu leukocytů a nižšímu počtu trombocytů v době diagnózy [14,19-21]. Gale *et al.* [19] udávají vyšší riziko úmrtí během indukční terapie a nižší šanci na dosažení CR u pacientů s *FLT3* mutací, patrně v důsledku vyššího počtu leukocytů. Na rozdíl od AML se střední cytogenetickou prognózou, nemají *FLT3/ITD* u APL žádný vliv na výskyt relapsů onemocnění, délku doby přežití bez relapsu (RFS) ani na délku OS [14,19,20,22].

#### 3.3.2 CBF-AML

Druhou podskupinou s příznivou prognózou jsou pacienti s CBF-AML, nesoucí buď t(8;21)(q22;q22) s fúzním genem *AML1/ETO* (pacientů do 60 let bývá přibližně

7 %) nebo inv(16) či t(16;16)(p13;q22) s fúzním genem *CBFβ/MYH11* (cca 5 % nemocných s AML) [10].

Prognóza onemocnění se u pacientů s CBF-AML liší jednak v závislosti na typu translokace, ale zejména v důsledku přítomnosti sekundárních molekulárních aberací (*C-KIT* mutací, *FLT3/ITD*, *FLT3/TKD* a *K-RAS* mutaci). 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 [17,23-25]. Incidence relapsů se pohybuje v rozmezí 25-45 % a OS po 10 letech od diagnózy se pohybuje mezi 55 a 65 % [10,23]. Zásadní roli v predikci relapsů u těchto pacientů hraje monitorování MRO v průběhu léčby i po jejím ukončení [26,27].

Mutace v kodonu Asp816 genu *C-KIT* se vyskytují u 10-18 % nemocných s fúzním genem *AML1/ETO* a u 7-16 % *CBFβ/MYH11* pozitivních pacientů [28-32]. U nemocných s fúzí *AML1/ETO* bývá přítomnost těchto mutací spojena se zvýšeným počtem leukocytů v době diagnózy, zvýšeným rizikem relapsu onemocnění, kratším OS a vyšším výskytem extramedulární leukemie [29,33-36].

Podíl pacientů s mutacemi genů *K-RAS* a *N-RAS* se u CBF-AML pohybuje okolo 27 % a je vyšší u nemocných s fúzním genem *CBFβ/MYH11* [27,37,38]. Přibližně 85 % mutací se u obou genů nachází v kodonech Gly12 a Gly13, zbývající mutace pak v kodonu Gln61 [39]. Někteří autoři uvádějí nižší počet CR u pacientů s těmito mutacemi, zároveň však tyto mutace nemají žádný vliv na riziko relapsu a OS [37].

*FLT3/ITD* se u CBF-AML vyskytují méně často než u ostatních typů AML (okolo 5%) [28,30,40]. Podobně jako u AML se střední cytogenetickou prognózou, také u CBF-AML nepříznivě ovlivňují prognózu onemocnění [37]. Incidence mutací v tyrozinkinázové doméně genu *FLT3* se u CBF-AML pohybuje kolem 10 % a jejich vliv na prognózu onemocnění není zatím zcela zřejmý [34,37,41].

### 3.4 AML SE STŘEDNÍ CYTOGENETICKOU PROGNÓZOU

Nejpočetnější prognostická skupina zahrnuje až 60 % případů s nově diagnostikovanou AML. Tito pacienti nevykazují žádnou cytogenetickou abnormalitu, která by je řadila do skupiny s dobrou, resp. špatnou cytogenetickou prognózou. Největší podskupinu tvoří pacienti s normálním karyotypem, kterých je přibližně 40 % [10]. Průběh onemocnění a jeho prognóza v rámci této skupiny závisí i na přítomnosti různých

ných 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***

U pacientů s AML byly popsány 4 typy mutací genu *FLT3*. Nejčastější jsou ITD (o délce 3 až 400 bp), které se vyskytují přibližně u 24 % pacientů s AML [42]. 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 KD v době diagnózy [43]. *FLT3/ITD* zhoršuje prognózu onemocnění vzhledem k vyššímu výskytu relapsů [44].

*FLT3/TKD*, zejména v pozicích Asp835 a Ile836, jsou popisovány přibližně u 7 % případů AML [45]. Závažnost jejich vlivu na průběh a prognózu onemocnění je méně zřejmá než u *FLT3/ITD*.

ITD lokalizované v TK1 doméně představují 28,7 % ze všech detekovaných *FLT3/ITD* [46]. ITD integrované mimo JM doménu působí jako nepříznivý prognostický faktor způsobující nižší šanci na dosažení CR a kratší RFS i OS [47].

Posledním popsaným typem mutací genu *FLT3*, jsou čtyři různé bodové mutace v JM doméně, zachycené u 2 % pacientů s AML [48,49].

### **3.4.2 MUTACE GENU *NPM1***

Dosud bylo popsáno 17 různých typů mutací *NPM1* genu u pacientů s AML (obvykle čtyřnukleotidových inzercí), nejčastější typ A se nachází přibližně u 75 % pacientů nesoucích mutaci, 10 % pacientů má mutaci typu D a 6 % typ B. Ostatní mutace se vyskytují jen velmi zřídka [50].

Mutace *NPM1* genu jsou detekovány u 35 % pacientů s AML [51] a až u 50 % pacientů s AML s normálním cytogenetickým profilem [50,52]. 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 [7]. Naproti tomu přítomnost obou těchto molekulárních aberací znamená pro pacienty výrazné zhoršení prognózy [50,52-54].

### 3.4.3 MUTACE GENU CEBPA

Mutace *CEBPA* genu jsou popisovány u 7-15 % případů AML, jejich výskyt je vyšší u onemocnění se střední prognózou, téměř se nevyskytují u pacientů s dobrou prognózou [55-59]. Mutace se koncentrují do dvou hlavních oblastí. V N-terminální části se jedná o inserce nebo delece (způsobující změnu čtecího rámce) mezi hlavním iniciačním kodonem a následujícím ATG kodonem. Mutace v C-terminální oblasti jsou obvykle *in-frame* delece/inserce v DNA-vazebné nebo dimerizační doměně [58].

Pacienti mohou mít buď pouze jednu *CEBPA* mutaci (45-50 % pacientů), nebo dvě různé 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 [58].

Někteří autoři udávají nižší šanci na dosažení CR u pacientů s jednou nebo žádnou mutací [57,59]. 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 [55,57-59].

### 3.4.4 MUTACE GENU DNMT3A

Mutace v genu *DNMT3A* byly popsány u 25 % dospělých pacientů s AML [60-62]. Nacházejí v exonech 9-23, jsou téměř výhradně heterozygotní a nejčastěji (až v 50 % případů) postihují kodon Arg882. Pacienti s mutacemi *DNMT3A* mají často normální karyotyp, *FLT3/ITD* a mutace genů *NPML*, *IDH1* a *IDH2*, naopak velmi zřídka se tato mutace vyskytuje společně s příznivými cytogenetickými aberacemi [60,63,64]. Nemocní s mutací *DNMT3A* mívají vyšší počet leukocytů a trombocytů v době diagnózy a vyšší procento blastů v kostní dřeni. Přítomnost této mutace neovlivňuje šanci pacientů na dosažení CR, ale výrazně zkracuje RFS i OS pacientů [64-67].

### 3.4.5 MUTACE GENU ASXL1

Mutace v exonu 12 genu *ASXL1* byly popsány u 10-30 % pacientů s AML. 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 [68-71]. *ASXL1* pozitivní pacienti mají obvykle nižší počet leukocytů v době záchytu onemocnění. Všichni autoři také shodně uvádějí negativní vliv mutací *ASXL1* na dosažení CR a délku OS [68,70,71].

### 3.4.6 MUTACE GENŮ *IDH1* A *IDH2*

Mutace *IDH* genů nacházíme u 15-20 % nemocných s AML, zejména u pacientů se středním cytogenetickým rizikem, u kterých se vyskytují až u 30 % (často jsou spojené s mutacemi *NPM1* a *DNMT3A*) případů [72-75]. Obvykle heterozygotní mutace postihují nejčastěji kodony Arg132 genu *IDH1* a Arg140 a Arg172 genu *IDH2* [76,77].

Nemocní s mutací *IDH* genu mají v době diagnózy vyšší počet leukocytů, trombocytů a vyšší procento blastů v KD [73,74,78]. Prognostický dopad *IDH* mutací do určité míry závisí jednak na přítomnosti dalších molekulárních aberací, zejména *NPM1* mutací a *FLT3/ITD*, jednak na konkrétním typu mutace. 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* [73,74,79]. Kratší OS a vyšší výskyt relapsů u nemocných s normálním cytogenetickým nálezem a mutací *IDH2* uvádějí Boissel *et al.* [74] a pouze u pacientů s *IDH2* Asp140 mutací také Green *et al.* [80].

### 3.4.7 ABERACE GENU *MLL*

U AML jsou popsány 2 typy abnormalit *MLL* genu. Nejčastější jsou balancované translokace vznikající fúzí části *MLL* genu kódující N-terminální konec *MLL* proteinu 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 u 5-12 % AML, nejčastější 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* [81,82]. Pacienti s přestavbami *MLL* genu mají kratší RFS a vyšší riziko relapsu AML 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 pravděpodobnost docílení CR a rovněž dosahují delšího RFS i OS oproti skupině s ostatními *MLL* translokacemi [7,10,83-86].

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 a nemocní s touto aberací mívají kratší RFS i OS v porovnání s negativními pacienty [87-91].

### **3.5 AML S NEPŘÍZŇIVOU CYTOGENETICKOU PROGNOZOU**

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 [10].

Pacienti s komplexním karyotypem tvoří až cca 70 % a méně než polovina jich docílí CR. Téměř 2/3 těchto nemocných mají mutace v genu *TP53*, které dále zhoršují jejich prognózu [7].

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 % [92].

## **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 ÚHK T 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). Medián počtu leukocytů při záchytu AML byl  $12,1 \times 10^9/l$  (0,2-488,0).

## 4.2 METODY

### 4.2.1 SEPARACE BUNĚK

Centrifugací na gradientu Histopaque-1077 byla odseparována mononukleární frakce buněk KD a/nebo periferní krve (PK). Buňky byly lyzovány v roztoku TRIzol Reagent.

### 4.2.2 IZOLACE RNA A DNA, PŘÍPRAVA cDNA

RNA a DNA byly izolovány pomocí TRIzol Reagentu podle přiloženého manuálu. Všechny analýzy byly prováděny na cDNA s použitím reverzní transkriptázy Superscript II, podle návodu výrobce.

### 4.2.3 DETEKCE FÚZNÍHO GENU *PML/RAR $\alpha$*

Přítomnost fúzního genu *PML/RAR $\alpha$*  byla zjišťována pomocí kvalitativní RT-PCR. Zlomy v oblasti bcr1 a bcr2 genu *PML* byly detekovány pomocí stejného páru primerů, pro zlomy v oblasti bcr3 byl použit odlišný reverzní primer.

Kvalita připravené cDNA byla ověřena amplifikací kontrolního genu *ABL*. Výsledné produkty PCR byly vizualizovány pomocí gelové elektroforézy na 2% agarozovém gelu. Pozitivní výsledky se zlomy v oblasti bcr2 byly verifikovány sekvenací s použitím sekvenačního kitu Big Dye Terminator kit v. 3.1.

#### 4.2.3.1 Monitorování *PML/RAR $\alpha$* pomocí kvantitativní PCR

MRO bylo sledováno ve vzorcích KD po každém cyklu chemoterapie a po jejím ukončení v tříměsíčních intervalech pomocí real-time RT-PCR. Pro kvantitativní RT-PCR byly navrženy primery poskytující produkt o délce maximálně 150 bp. Sondy pro všechny sledované geny byly duálně fluorescenčně značené. Vzorky byly analyzovány v tripletu a ke každému byl amplifikován kontrolní gen *ABL*. Pro každý gen byla amplifikována kalibrační křivka sestávající ze 7 bodů, vytvořená ředěním plazmidu se zaklonovaným produktem PCR. Relativní exprese všech sledovaných fúzních genů i bodových mutací 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, FG označuje fúzní gen. Detekční senzitivita metody určená ředěním diagnostických vzorků

pacientů byla pro *PML/RAR $\alpha$*   $10^{-3}$  až  $10^{-4}$ . 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 *CBF $\beta$ /MYH11***

Přítomnost fúzního transkriptu *AML1/ETO* a *CBF $\beta$ /MYH11* v době diagnózy byla testována pomocí kvalitativní RT-PCR. Dva páry primerů byly navrženy pro detekci fúzního genu *CBF $\beta$ /MYH11* tak, aby zachytily všechny popsané zlomy. Pozitivní nálezy s délkou produktu PCR odlišnou od pozitivních kontrol byly verifikovány sekvenací.

Pro sledování MRO byl navržen jeden pár primerů pro fúzi *AML1/ETO*, pacienti s *CBF $\beta$ /MYH11* se zlomy A a D měli shodný forward primer a sondu, reverzní primer byl pro každý typ zlomu specifický. Citlivost detekce se u *AML1/ETO* pohybovala mezi  $10^{-4}$  a  $10^{-5}$ , u obou fúzí *CBF $\beta$ /MYH11* pak byla  $10^{-4}$ .

#### **4.2.5 DETEKCE *FLT3/ITD***

Přítomnost ITD genu *FLT3* byla testována s použitím kvalitativní RT-PCR. Amplifikované produkty PCR byly separovány gelovou elektroforézou na 2% agarozovém gelu. Abnormálně dlouhé produkty PCR byly purifikovány pomocí QIAquick Gel Extraction Kitu a sekvenovány. Získané sekvence byly porovnány s wt sekvencí genu *FLT3*, byla určena délka ITD a její integrační místo. Pro analýzu vlivu délky ITD na prognózu pacientů byla jako hraniční zvolena délka ITD = 39 nt. Procentuální zastoupení mutované alely bylo kvantifikováno semikvantitativně, softwarem Alphaview.

#### **4.2.6 DETEKCE *FLT3/TKD***

K detekci mutací Asp835 a Ile836 byl pomocí RT-PCR amplifikován exon 20. Získané produkty byly štěpeny pomocí restriční endonukleázy EcoR V. Produkty restričního štěpení byly analyzovány na 3% agarozovém gelu. Nerozštěpené produkty byly po purifikaci z gelu sekvenovány, aby mohl být specifikován přesný typ mutace.



#### **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. Získané produkty PCR byly přečištěny pomocí roztoku ExoSAP-IT a poté sekvenovány. Výsledné sekvence byly porovnány s wt sekvencí genu *C-KIT*.

#### **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 pomocí RT-PCR pouze u pacientů s CBF-AML. Výsledné produkty PCR byly po přečištění 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. Amplifikované produkty PCR byly sekvenovány a mutace identifikovány porovnáním s wt sekvencí *DNMT3A*.

Pro monitorování *DNMT3A* pomocí kvantitativní RT-PCR byly navrženy specifické primery pro amplifikaci úseku nesoucího kodon Arg882 a pro dvě pacient-specifické mutace. Pro všechny sledované mutace byly navrženy specifické sondy s LNA (locked nucleic acid) modifikovanými nukleotidy.

#### **4.2.10 DETEKCE MUTACÍ ASXL1**

Pomocí čtyř párů primerů byl amplifikován celý exon 12. Amplifikované produkty PCR byly 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.

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

Na základě výsledků vyšetření karyotypu a FISH byli pacienti testováni pomocí RT-PCR na přítomnost konkrétních fúzních genů vzniklých translokací genu *MLL*. Pro amplifikaci produktů PCR byl použit vždy stejný forward primer pro gen *MLL* a reverz-

ní primer odpovídající fúznímu partnerovi. Získané produkty PCR byly sekvenovány pro určení přesných míst zlomů v obou genech.

Pro monitorování translokací *MLL* genu pomocí kvantitativní RT-PCR byly navrženy 2 různé forward primery pro gen *MLL*, 2 reverzní primery pro geny *AF9* a *ENL* a jeden reverzní primer pro každý z genů *AF10*, *ELL* a *MSF*. Zároveň byly navrženy specifické sondy pro detekci všech těchto fúzních genů. Amplifikace produktů PCR a vyhodnocování výsledků bylo shodné 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 RT-PCR byl amplifikován úsek genu zahrnující exony 3-10. Získané produkty PCR byly sekvenovány a případné mutace identifikovány porovnáním s wt sekvencí genu *TP53*.

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

Vyšetření přítomnosti mutací v genech *NPM1* a *CEBPA* byla provedena na Oddělení molekulární genetiky ÚHKH pod vedením Ing. Oty Fuchse, CSc. Podrobný popis metodiky viz [93,94].

#### **4.2.14 CYTOGENETICKÁ ANALÝZA**

Všechna cytogenetická vyšetření (včetně FISH) potřebná pro zařazení pacientů do prognostických skupin byla prováděna a vyhodnocována na Oddělení cytogenetiky ÚHKH (vedoucí Prof. Ing. Kyra Michalová, DrSc.). Podrobněji popsáno v dizertační práci. Pacienti byli zařazení do prognostických kategorií podle klasifikace publikované Grimwadem *et al.* [10].

#### **4.2.15 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 OS bylo užito Kaplanovy-Mayerovy regresní metody hodnocení křivek přežití, odlišnost křivek byla hodno-

cena 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 byly nalezeny pomocí softwaru GraphPad Prism verze 4.03.

## 5. VÝSLEDKY

### 5.1 AML S PŘÍZNIVOU CYTOGENETICKOU PROGNÓZOU

#### 5.1.1 APL

APL byla diagnostikována u 92 ze 762 (12,1 %) pacientů, medián věku v době diagnózy byl 46,0 let, medián počtu leukocytů  $1,7 \times 10^9/l$ . Pomocí PCR bylo vyšetřeno u 82 pacientů, 47 z nich mělo zlom typu bcr1, 32 mělo bcr3 a zbylí 3 pacienti byli bcr2.

Místo zlomu nemělo vliv na počet leukocytů v době záchytu APL ( $P = 0,147$ ), rozdíl v obou skupinách nebyl ani v pravděpodobnosti docílení CR ( $P = 0,419$ ). Riziko relapsu (molekulárního či klinického) bylo vyšší u nemocných se zlomem bcr3 ( $P = 0,030$ ), vyšší počet relapsů ale nikterak neovlivňoval OS pacientů ( $P = 0,654$ ).

Přítomnost *FLT3/ITD* byla testována u 79 pacientů s APL, u 21 (26,6 %) z nich byla prokázána. Výskyt *FLT3/ITD* byl nevýznamně častější u pacientů se zlomem v oblasti bcr3, ( $P = 0,075$ ). Pacienti s *FLT3/ITD* měli výrazně vyšší počty leukocytů při záchytu APL ( $P < 0,0001$ ). Pozitivita *FLT3/ITD* statisticky nevýznamně snižovala šanci pacientů na docílení CR ( $P = 0,096$ ), a zvyšovala pravděpodobnost relapsu onemocnění ( $P = 0,089$ ), nicméně neměla žádný vliv na délku OS pacientů s APL ( $P = 0,435$ ).

#### 5.1.2 CBF-AML

CBF-AML byla diagnostikována u 49 pacientů ze 762 případů AML (6,4 %). Medián věku pacientů v době diagnózy byl u této skupiny 38,7 let. Fúzní gen *AML1/ETO* mělo 27 nemocných, u 22 byl zachycen fúzní gen *CBFβ/MYH11*, většina z nich měla zlom typu A, u dvou byl zachycen zlom D a u jednoho zlom J. U 46 pacientů byla k dispozici RNA 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. Sekundární aberaci mělo 9 ze 26

(34,6 %) pacientů s fúzí *AML1/ETO*. U pacientů s *CBFβ/MYH11* byly sekundární aberace častější než u nemocných s *AML1/ETO*, vyskytovaly se u 13 ze 20 (65,0 %) pacientů ( $P = 0,020$ ). Nejčastější sekundární aberací byly v obou případech mutace genu *C-KIT*.

Medián počtu leukocytů v době diagnózy byl  $15,8 \times 10^9/l$ . Vyšší počty leukocytů měli pacienti s fúzním genem *CBFβ/MYH11* ( $P = 0,004$ ) a pacienti se sekundární mutací ( $P = 0,010$ ). CR dosáhli všichni pacienti s fúzí *CBFβ/MYH11* a 24 ze 27 (88,9 %) pacientů s *AML1/ETO*. Molekulární remise bylo docíleno u 12 ze 20 (60,0 %) sledovaných pacientů s fúzním genem *AML1/ETO* a u 7 ze 16 (43,8 %) pacientů s *CBFβ/MYH11* ( $P = 0,166$ ). Docílení molekulární remise bylo nepříznivě ovlivněno přítomností sekundární aberace, bez ohledu na typ fúzního genu ( $P = 0,023$ ). RFS byl výrazně delší u pacientů, kteří dosáhli molekulární remise v porovnání s pacienty, u kterých přetrvávalo MRO ( $P < 0,0001$ ), bez ohledu na typ fúzního genu. Výskyt relapsů byl výrazně vyšší ve skupině pacientů s fúzí *CBFβ/MYH11* ( $P = 0,002$ ) a tito pacienti také měli výrazně kratší RFS ( $P = 0,014$ ). Přítomnost sekundární mutace zvyšovala pravděpodobnost relapsu ( $P = 0,055$ ) a zároveň zkracovala RFS ( $P = 0,070$ ) pouze ve skupině pacientů s *CBFβ/MYH11*. Pacienti, kteří docílili molekulární remise měli signifikantně delší OS v porovnání s pacienty, u kterých přetrvávalo MRO ( $P = 0,025$ ). OS nebyl ovlivněn konkrétním typem fúzního genu ( $P = 0,878$ ).

## 5.2 AML SE STŘEDNÍ CYTOGENETICKOU PROGNÓZOU

### 5.2.1 *FLT3/ITD*

Pro vyšetření *FLT3/ITD* byla k dispozici RNA od 297 pacientů se středním cytogenetickým rizikem. Medián věku v době zachytu onemocnění byl 55,1 let, medián počtu leukocytů  $17,9 \times 10^9/l$ . Pozitivní nález byl zjištěn u 84 (28,3 %) nemocných. Délka ITD se pohybovala v rozmezí od 12 do 120 nukleotidů, 56 pacientů mělo ITD integrovanou do JM domény genu *FLT3*, zbylých 18 mělo ITD v TK1 doméně.

Pacienti s *FLT3/ITD* měli výrazně vyšší počty leukocytů v době diagnózy ( $P < 0,0001$ ), délka ITD, ani místo její inserce neměly žádný vliv na počet leukocytů. Pozitivita *FLT3/ITD* neměla žádný vliv na docílení CR ( $P = 0,492$ ). Pacienti s ITD delší než 39 nukleotidů měli vyšší pravděpodobnost dosažení CR ( $P = 0,022$ ). Riziko relapsu bylo vyšší u nemocných s *FLT3/ITD* pozitivitou ( $P = 0,002$ ). Pacienti s ITD

delší než 39 nukleotidů měli nesignifikantně vyšší riziko relapsu onemocnění ( $P = 0,129$ ). Místo inzerce ITD ani procentuální zastoupení mutované alely neměly žádný vliv na pravděpodobnost indukce CR ani na riziko relapsu. OS byl u pacientů s touto mutací výrazně kratší než u ostatních pacientů se středním cytogenetickým rizikem ( $P = 0,0002$ ).

### 5.2.2 MUTACE *FLT3/TKD*

Přítomnost mutací *FLT3/TKD* v kodonech Arg835 a Ile836 byla testována u 292 pacientů se středním cytogenetickým rizikem. Medián věku pacientů v době diagnózy AML byl 54,9 let, medián počtu leukocytů  $18,0 \times 10^9/l$ . *FLT3/TKD* mutace byla zachycena u 19 pacientů. Pouze jeden měl delecii kodonu Ile836, všichni ostatní pacienti měli mutaci postihující kodon Arg835.

Počet leukocytů byl vyšší u pacientů s mutací *FLT3/TKD* ( $P = 0,003$ ). 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 ( $P = 0,153$ ). Riziko relapsu bylo mírně vyšší u pacientů s mutací *FLT3/TKD* ( $P = 0,101$ ). Po vyřazení *FLT3/ITD* pozitivních pacientů z analýzy byl tento rozdíl na úrovni statistického trendu ( $P = 0,075$ ). Přítomnost mutací *FLT3/TKD* neměla žádný vliv na celkové přežití pacientů ( $P = 0,787$ ).

### 5.2.3 MUTACE *DNMT3A*

Přítomnost mutací genu *DNMT3A* byla testována u 226 pacientů se středním cytogenetickým rizikem. Medián věku v době diagnózy byl u této skupiny pacientů 54,9 let, medián počtu leukocytů při záchytu onemocnění byl  $22,5 \times 10^9/l$ . Mutace genu *DNMT3A* byla zachycena u 67 (29,6 %) z 226 pacientů. 41 (61,2 %) z nich mělo bodovou mutaci v kodonu Arg882, 19 pacientů mělo bodovou mutaci v jiném kodonu, 9 mutací bylo typu frameshift.

Pacienti s mutací *DNMT3A* měli nevýznamně vyšší počty leukocytů v době záchytu ( $P = 0,064$ ). Zvýšený počet leukocytů byl ještě více patrný u nemocných s bodovou mutací v kodonu Arg882. Ve skupině *FLT3/ITD* negativních pacientů však nezpůsobovala mutace genu *DNMT3A* vyšší počet leukocytů ( $P = 0,858$ ). Mutovaný gen *DNMT3A* nesnižoval šanci pacientů na docílení CR ( $P = 0,380$ ). Incidence relapsů byla signifikantně vyšší u pacientů s mutací *DNMT3A* ( $P = 0,007$ ). RFS byl signifikantně kratší u pacientů s mutací v porovnání s pacienty s wt *DNMT3A* ( $P = 0,011$ ). OS

nebyl ovlivněn přítomností mutace *DNMT3A* ( $P = 0,251$ ). Po vyřazení pacientů, kteří nedocílili CR, se výrazně prodloužilo přežití nemocných bez mutace ( $P = 0,025$ ).

Přítomnost mutací *DNMT3A* byla často spojena s výskytem *FLT3/ITD* ( $P = 0,003$ ); 30 ze 72 (41,7 %) pacientů s *FLT3/ITD* mělo zároveň mutaci *DNMT3A*. Kombinace těchto dvou aberací zvyšovala riziko relapsu v porovnání s pacienty se samotnou mutací *DNMT3A* ( $P = 0,044$ ), i proti pacientům pouze *FLT3/ITD* pozitivním ( $P = 0,058$ ). Ve skupině pacientů s *FLT3/ITD*, mutace *DNMT3A* nejen nevýznamně zkracovaly OS ( $P = 0,096$ ), ale i přežití pacientů po docílení CR ( $P = 0,012$ ). U *FLT3/ITD* negativních pacientů mutace *DNMT3A* neměly žádný vliv ani na jeden z těchto ukazatelů.

#### 5.2.4 MUTACE *ASXL1*

Pro analýzu mutací *ASXL1* genu byla k dispozici RNA od 226 pacientů, medián věku v době diagnózy byl 55,1 let, medián počtu leukocytů při záchytu onemocnění byl  $23,1 \times 10^9/l$ . Mutace *ASXL1* byla detekována u 26 z 226 (11,5 %) pacientů. Bylo zachyceno 6 různých frameshift a 9 různých bodových mutací.

Pacienti s mutovaným genem *ASXL1* měli signifikantně nižší počty leukocytů při záchytu onemocnění, než pacienti bez mutace ( $P = 0,002$ ). Zároveň měli i nižší procento blastů v KD ( $P = 0,009$ ). Mutovaný gen *ASXL1* statisticky nevýznamně snižoval šanci pacientů na docílení CR ( $P = 0,062$ ). Pozitivita *ASXL1* neměla vliv na incidenci relapsů ( $P = 0,239$ ), ani na délku OS pacientů ( $P = 0,770$ ).

#### 5.2.5 TRANSLOKACE GENU *MLL*

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. Pomocí RT-PCR byly identifikovány konkrétní fúzní geny a přesná místa jejich zlomů celkem u 15 pacientů (u 9 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 v porovnání nemocnými s ostatními translokacemi ( $P = 0,033$ ). 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.

### 5.3 AML S NEPŘÍZNIVOU CYTOGENETICKOU PROGNÓZOU

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

#### 5.3.1 MUTACE TP53

Přítomnost mutací v genu *TP53* byla sledována pouze u pacientů s komplexními změnami karyotypu. Ty byly detekovány u 60 ze 119 (50,4 %) nemocných, přítomnost mutací v genu *TP53* pak byla testována u 26 z nich. Mutace byla zachycena u 17 (65,4 %) nemocných, u 8 pacientů nebyla detekována wt alela a 1 měl 2 různé mutace.

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 transplantaci krvetvorných kmenových buněk (HSCT).

### 5.4 HODNOCENÍ OS PODLE KRITERIÍ ELN

Na závěr bylo zhodnoceno celkové přežití pacientů podle kritérií ELN [7], která rozdělují pacienty s AML do 4 rizikových skupin. Do analýz nejsou zařazeni pacienti s APL. 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. Po podrobnějším rozdělení pacientů do skupin podle jednotlivých fúzních genů a přítomnosti sledovaných mutací, dosahovali nejlepších výsledků pacienti s fúzními geny *AML1/ETO* a *PML/RAR $\alpha$* . V obou těchto skupinách přežívalo tři roky od diagnózy přibližně 70 % pacientů. Přes 60 % pacientů přežívalo ve skupině 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 přežívalo 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.

## 6. DISKUSE

ELN klasifikace rozděluje pacienty s AML do čtyř prognostických kategorií v závislosti na přítomnosti předem definovaných cytogenetických a molekulárně genetikých markerů [7]. 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 [7] jsme nezaznamenali žádný rozdíl v OS pacientů zahrnutých do skupin s nižším středním a vyšším středním rizikem. Tento rozdíl může být způsoben poměrně vysokým počtem starších pacientů v naší analyzované skupině. V podobné práci [92] po rozdělení pacientů do dvou věkových kategorií byl OS skupiny s nižším středním rizikem delší pouze ve skupině pacientů do 60 let. U starších pacientů byla prognóza obou skupin pacientů shodná [92].

Pacienti s fúzí *CBFβ/MYH11* v naší skupině dosahují v rámci CBF-AML o něco horších výsledků. To je v rozporu s některými dříve publikovanými pracemi [95-97], 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 indikovat je k transplantaci, proto rozdíl v OS obou skupin byl 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. Naše výsledky týkající se sledování MRO u pacientů s CBF-AML byly publikovány v časopise *Leukemia and Lymphoma* [36].

Zbýlé 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.

Přítomnost *FLT3*/ITD byla testována celkem u 297 pacientů s AML se středním cytogenetickým rizikem. V souladu s dosud publikovanými výsledky [41,43,98] 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 [98-100]. 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.

Výsledky prací zabývajících se vlivem délky ITD a místa její inserce na prognózu AML jsou zatím značně rozporuplné [99-104]. V našem souboru pacientů se délka ITD pohybovala od 12 do 120 nukleotidů. 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 [101]), nicméně naše výsledky byly značně odlišné. Zatímco Stirewalt *et al.* [101] 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, zároveň však mají tito pacienti vyšší riziko relapsu. Riziko relapsu pac. s ITD<39 nt 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 aktivitou buněk s delší ITD a tudíž jejich lepší odpovědí na indukční léčbu. Na druhou stranu přítomnost ITD vede k dediferenciaci buněk [105] a část buněk proto zůstává v nezralém stavu na úrovni rané progenitorové buňky. Tyto buňky jsou chemorezistentní, 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.

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) [106-109]. 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 [60,61]. V námi analyzované skupině, s vyšším počtem pacientů se středním cytogenetickým rizikem než v těchto 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 [60,64-66,110] 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 [50,52,54,111], přítomnost mutace *DNMT3A* zvyšovala u našich pacientů riziko relapsu i u *FLT3/ITD* negativních případů.

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 těchto 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 [112].

## 7. ZÁVĚR

**Potvrdili jsme významný rozdíl v délce OS v jednotlivých prognostických kategoriích pacientů definovaných dle Grimwada *et al.* [10].** Tři roky od diagnózy přeživalo 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 *CBFβ/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 *CBFβ/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*, ale zejména přetrvávající pozitivita MRO.

**Přítomnost mutací genů *CEBPA* a *NPM1* byla spojena s lepší prognózou pouze při současné nepřítomnosti *FLT3/ITD* a *DNMT3A* mutací.**

**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 přeživalo 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 pozitivivity jsou 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 přídavnou 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.

## 8. LITERATURA

1. Döhner K, Döhner H. Molecular characterization of acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2008; 93: 976-82.
2. Fröhling S, Scholl C, Gilliland DG, *et al.* Genetics of myeloid malignancies: pathogenetic and clinical implications. *J Clin Oncol* 2005; 23: 6285-95.
3. Löwenberg B. Prognostic factors in acute myeloid leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 2001; 14: 65-75.

4. Liersch R, Müller-Tidow C, Berdel WE, *et al.* Prognostic factors for acute myeloid leukaemia in adults - biological significance and clinical use. *Br J Haematol* 2014; 165: 17-38.
5. Deschler B, Lübbert M. Acute myeloid leukemia: epidemiology and etiology. *Cancer* 2006; 107: 2099-107.
6. Adam Z, Doubek M, Penka M, *et al.* 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.
7. Döhner H, Estey EH, Amadori S, *et al.* 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.
8. Indrák K. Léčba akutních leukemií. *Scripta medica (Brno)* 1996: 305-308.
9. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, *et al.* Proposals for the classification of the acute leukaemias. *Br J Haematol* 1976; 33: 451-8.
10. Grimwade D, Hills RK, Moorman AV, *et al.* 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.
11. Schwarz J, Kačírková P, Marková J, *et al.* Urgentní stav v hematologii: akutní promyelocytární leukemie - principy diagnostiky. *Vnitř lék* 2008; 54: 728-44.
12. Grimwade D, Enver T. Acute promyelocytic leukemia: where does it stem from? *Leukemia* 2004; 18: 375-84.
13. Reiter A, Lengfelder E, Grimwade D. Pathogenesis, diagnosis and monitoring of residual disease in acute promyelocytic leukaemia. *Acta Haematol* 2004; 112: 55-67.
14. Schwarz J, Kořistek Z, Starý J, *et al.* Léčba akutní promyelocytární leukemie v Česku: výsledky a analýza prognostických faktorů. *Vnitř lék* 2008; 54: 757-70.
15. Jurcic JG, Nimer SD, Scheinberg DA, *et al.* 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.
16. Fenaux P, Chastang C, Chevret S, *et al.* 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.
17. Grimwade D, Walker H, Oliver F, *et al.* 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.
18. Kühnl A, Grimwade D. Molecular markers in acute myeloid leukaemia. *Int J Hematol* 2012; 96: 153-63.
19. Gale RE, Hills R, Pizzey AR, *et al.* Relationship between *FLT3* mutation status, biologic characteristics, and response to targeted therapy in acute promyelocytic leukemia. *Blood* 2005; 106: 3768-76.
20. Schnittger S, Bacher U, Haferlach C, *et al.* Clinical impact of *FLT3* mutation load in acute promyelocytic leukemia with t(15;17)/PML-RARA. *Haematologica* 2011; 96: 1799-807.
21. Au WY, Fung A, Chim CS, *et al.* *FLT-3* aberrations in acute promyelocytic leukaemia: clinicopathological associations and prognostic impact. *Br J Haematol* 2004; 125: 463-9.
22. Kiyoi H, Naoe T, Yokota S, *et al.* 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.
23. Hoyos M, Nomdedeu JF, Esteve J, *et al.* 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.
24. Langabeer SE, Walker H, Rogers JR, *et al.* Incidence of AML1/ETO fusion transcripts in patients entered into the MRC AML trials. *Br J Haematol* 1997; 99: 925-8.
25. Langabeer SE, Walker H, Gale RE, *et al.* Frequency of CBFβ/MYH11 fusion transcripts in patients entered into the U.K. MRC AML trials. *Br J Haematol* 1997; 96: 736-9.

26. Weisser M, Haferlach C, Hiddemann W, *et al.* 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.
27. Jourdan E, Boissel N, Chevret S, *et al.* Prospective evaluation of gene mutations and minimal residual disease in patients with core binding factor acute myeloid leukemia. *Blood*; 121: 2213-23.
28. Shimada A, Taki T, Tabuchi K, *et al.* *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.
29. Paschka P, Marcucci G, Ruppert AS, *et al.* 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.
30. Care RS, Valk PJ, Goodeve AC, *et al.* Incidence and prognosis of *c-KIT* and *FLT3* mutations in core binding factor (CBF) acute myeloid leukaemias. *Br J Haematol* 2003; 121: 775-7.
31. Shih LY, Liang DC, Huang CF, *et al.* 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.
32. Wang YY, Zhou GB, Yin T, *et al.* *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.
33. Cairoli R, Beghini A, Grillo G, *et al.* Prognostic impact of *c-KIT* mutations in core binding factor leukemias: an Italian retrospective study. *Blood* 2006; 107: 3463-8.
34. Boissel N, Leroy H, Brethon B, *et al.* 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.
35. Beghini A, Ripamonti CB, Cairoli R, *et al.* *KIT* activating mutations: incidence in adult and pediatric acute myeloid leukemia, and identification of an internal tandem duplication. *Haematologica* 2004; 89: 920-5.
36. Marková J, Trnková Z, Michková P, *et al.* 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.
37. Allen C, Hills RK, Lamb K, *et al.* 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.
38. Al-Kali A, Quintas-Cardama A, Luthra R, *et al.* Prognostic impact of *RAS* mutations in patients with myelodysplastic syndrome. *Am J Hematol* 2013; 88: 365-9.
39. Bos JL. ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* 1989; 49: 4682-9.
40. Goemans BF, Zwaan CM, Miller M, *et al.* Mutations in *KIT* and *RAS* are frequent events in pediatric core-binding factor acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2005; 19: 1536-42.
41. Mead AJ, Linch DC, Hills RK, *et al.* *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.
42. Kottaridis PD, Gale RE, Linch DC. *FLT3* mutations and leukaemia. *Br J Haematol* 2003; 122: 523-38.
43. Thiede C, Steudel C, Mohr B, *et al.* 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.
44. Renneville A, Roumier C, Biggio V, *et al.* Cooperating gene mutations in acute myeloid leukemia: a review of the literature. *Leukemia* 2008; 22: 915-31.
45. Bacher U, Haferlach T, Kern W, *et al.* 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.

46. Breitenbuecher F, Schnittger S, Grundler R, *et al.* Identification of a novel type of ITD mutations located in nonjuxtamembrane domains of the FLT3 tyrosine kinase receptor. *Blood* 2009; 113: 4074-7.
47. Kayser S, Schlenk RF, Londono MC, *et al.* 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.
48. Stirewalt DL, Meshinchi S, Kussick SJ, *et al.* Novel *FLT3* point mutations within exon 14 found in patients with acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 2004; 124: 481-4.
49. Reindl C, Bagrintseva K, Vempati S, *et al.* Point mutations in the juxtamembrane domain of FLT3 define a new class of activating mutations in AML. *Blood* 2006; 107: 3700-7.
50. Schnittger S, Schoch C, Kern W, *et al.* Nucleophosmin gene mutations are predictors of favorable prognosis in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *Blood* 2005; 106: 3733-9.
51. Falini B, Bolli N, Liso A, *et al.* Altered nucleophosmin transport in acute myeloid leukaemia with mutated *NPM1*: molecular basis and clinical implications. *Leukemia* 2009; 23: 1731-43.
52. Thiede C, Koch S, Creutzig E, *et al.* Prevalence and prognostic impact of *NPM1* mutations in 1485 adult patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood* 2006; 107: 4011-20.
53. Suzuki T, Kiyoi H, Ozeki K, *et al.* Clinical characteristics and prognostic implications of *NPM1* mutations in acute myeloid leukemia. *Blood* 2005; 106: 2854-61.
54. Döhner K, Schlenk RF, Habdank M, *et al.* 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.
55. Green CL, Koo KK, Hills RK, *et al.* 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.
56. Fröhling S, Schlenk RF, Stolze I, *et al.* *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.
57. Wouters BJ, Lowenberg B, Erpelinck-Verschueren CA, *et al.* 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.
58. Fasan A, Haferlach C, Alpermann T, *et al.* The role of different genetic subtypes of *CEBPA* mutated AML. *Leukemia* 2014; 28: 794-803.
59. Taskesen E, Bullinger L, Corbacioglu A, *et al.* 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.
60. Ley TJ, Ding L, Walter MJ, *et al.* *DNMT3A* mutations in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2010; 363: 2424-33.
61. Yan XJ, Xu J, Gu ZH, *et al.* Exome sequencing identifies somatic mutations of DNA methyltransferase gene *DNMT3A* in acute monocytic leukemia. *Nat Genet* 2011; 43: 309-15.
62. Walter MJ, Ding L, Shen D, *et al.* Recurrent *DNMT3A* mutations in patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 2011; 25: 1153-8.
63. Shah MY, Licht JD. *DNMT3A* mutations in acute myeloid leukemia. *Nat Genet* 2011; 43: 289-90.
64. Thol F, Damm F, Ludeking A, *et al.* Incidence and prognostic influence of *DNMT3A* mutations in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2011; 29: 2889-96.
65. Marcucci G, Metzeler KH, Schwind S, *et al.* 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.
66. Ribeiro AF, Pratorcorona M, Erpelinck-Verschueren C, *et al.* Mutant *DNMT3A*: a marker of poor prognosis in acute myeloid leukemia. *Blood* 2012; 119: 5824-31.

67. Hou HA, Kuo YY, Liu CY, *et al.* DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia: stability during disease evolution and clinical implications. *Blood* 2012; 119: 559-68.
68. Schnittger S, Eder C, Jeromin S, *et al.* 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.
69. Chou WC, Huang HH, Hou HA, *et al.* Distinct clinical and biological features of de novo acute myeloid leukemia with additional sex comb-like 1 (ASXL1) mutations. *Blood* 2010; 116: 4086-94.
70. Metzeler KH, Becker H, Maharry K, *et al.* 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.
71. Pratcorona M, Abbas S, Sanders MA, *et al.* Acquired mutations in ASXL1 in acute myeloid leukemia: prevalence and prognostic value. *Haematologica* 2012; 97: 388-92.
72. Yan H, Parsons DW, Jin G, *et al.* IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med* 2009; 360: 765-73.
73. Paschka P, Schlenk RF, Gaidzik VI, *et al.* 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.
74. Boissel N, Nibourel O, Renneville A, *et al.* 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.
75. Marcucci G, Maharry K, Wu YZ, *et al.* 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.
76. Levis M. Targeting IDH: the next big thing in AML. *Blood* 2013; 122: 2770-1.
77. Im AP, Sehgal AR, Carroll MP, *et al.* DNMT3A and IDH mutations in acute myeloid leukemia and other myeloid malignancies: associations with prognosis and potential treatment strategies. *Leukemia* 2014; 28: 1774-83.
78. Abbas S, Lugthart S, Kavelaars FG, *et al.* 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.
79. Green CL, Evans CM, Hills RK, *et al.* 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.
80. Green CL, Evans CM, Zhao L, *et al.* The prognostic significance of IDH2 mutations in AML depends on the location of the mutation. *Blood* 2011; 118: 409-12.
81. Zhang Y, Chen A, Yan XM, *et al.* Disordered epigenetic regulation in MLL-related leukemia. *Int J Hematol* 2012; 96: 428-37.
82. De Braekeleer M, Morel F, Le Bris MJ, *et al.* The MLL gene and translocations involving chromosomal band 11q23 in acute leukemia. *Anticancer Res* 2005; 25: 1931-44.
83. Byrd JC, Mrózek K, Dodge RK, *et al.* 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.
84. Mrózek K, Heinonen K, Lawrence D, *et al.* 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.
85. Munoz L, Nomdedeu JF, Villamor N, *et al.* 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.
86. Slovak ML, Kopecky KJ, Cassileth PA, *et al.* 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.

87. Döhner K, Tobis K, Ulrich R, *et al.* 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.
88. Schnittger S, Kinkelin U, Schoch C, *et al.* Screening for *MLL* tandem duplication in 387 unselected patients with AML identify a prognostically unfavorable subset of AML. *Leukemia* 2000; 14: 796-804.
89. Steudel C, Wermke M, Schaich M, *et al.* 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.
90. Basecke J, Whelan JT, Griesinger F, *et al.* The *MLL* partial tandem duplication in acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 2006; 135: 438-49.
91. Li Z-Y, Liu D-P, Liang C-C. New insight into the molecular mechanisms of *MLL*-associated leukemia. *Leukemia* 2005; 19: 183-90.
92. Mrózek K, Marcucci G, Nicolet D, *et al.* 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.
93. Fuchs O, Kostečka A, Provazníková D, *et al.* 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.
94. Pitiot AS, Santamaria I, Garcia-Suarez O, *et al.* A new type of *NPM1* gene mutation in AML leading to a C-terminal truncated protein. *Leukemia* 2007; 21: 1564-6.
95. Appelbaum FR, Kopecky KJ, Tallman MS, *et al.* The clinical spectrum of adult acute myeloid leukaemia associated with core binding factor translocations. *Br J Haematol* 2006; 135: 165-73.
96. Schlenk RF, Benner A, Krauter J, *et al.* 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.
97. Marcucci G, Mrózek K, Ruppert AS, *et al.* 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.
98. Kottaridis PD, Gale RE, Frew ME, *et al.* 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.
99. Gale RE, Green C, Allen C, *et al.* 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.
100. Meshinchi S, Stirewalt DL, Alonzo TA, *et al.* Structural and numerical variation of *FLT3*/ITD in pediatric AML. *Blood* 2008; 111: 4930-3.
101. Stirewalt DL, Kopecky KJ, Meshinchi S, *et al.* Size of *FLT3* internal tandem duplication has prognostic significance in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2006; 107: 3724-6.
102. Kusec R, Jaksic O, Ostojic S, *et al.* More on prognostic significance of *FLT3*/ITD size in acute myeloid leukemia (AML). *Blood* 2006; 108: 405-6.
103. Ponziani V, Gianfaldoni G, Mannelli F, *et al.* 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.
104. Chillón MC, Santamaria C, García-Sanz R, *et al.* 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.
105. Pekova S, Ivanek R, Dvorak M, *et al.* 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.



106. Kottaridis PD, Gale RE, Langabeer SE, *et al.* 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.
107. Shih LY, Huang CF, Wu JH, *et al.* 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.
108. Cloos J, Goemans BF, Hess CJ, *et al.* Stability and prognostic influence of *FLT3* mutations in paired initial and relapsed AML samples. *Leukemia* 2006; 20: 1217-20.
109. Tiesmeier J, Muller-Tidow C, Westermann A, *et al.* 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.
110. Renneville A, Boissel N, Nibourel O, *et al.* 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.
111. Marcucci G, Haferlach T, Döhner H. Molecular genetics of adult acute myeloid leukemia: prognostic and therapeutic implications. *J Clin Oncol* 2011; 29: 475-86.
112. Marková J, Michková P, Burčková K, *et al.* Prognostic impact of *DNMT3A* mutations in patients with intermediate cytogenetic risk profile acute myeloid leukemia. *Eur J Haematol* 2012; 88: 128-35.

## 9. SEZNAM PUBLIKACÍ

### 9.1 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)

## 9.2 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., Maalaufová-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, Mikulenkova 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 a 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)

## 9.3 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., Mikulenková D., Čermáková K., Polanská V., Michalová K., Marinov I., Campř V., Ransdorfová Š., **Marková J.**, Pavlišťová L., Březinová J., Sajdová J., Šponerová D., Volková Z., Benešová K., Čermák J., Vítěk 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., Bedřiková 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., Kobyłka P., Cermak J., Brezina 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., Kačirková 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.