

Univerzita Karlova v Praze

3. lékařská fakulta



Autoreferát dizertační práce

**Využití nových molekulárních technologií v identifikaci
unikátních klonálních markerů pro monitorování minimální
reziduální nemoci u akutních leukémií**

Mgr. Tereza JANČUŠKOVÁ

Praha 2015

Doktorské studijní programy v biomedicině

Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky

Obor: Molekulární a buněčná biologie, genetik a virologie

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

Školící pracoviště: synlab genetics s.r.o.

Evropská 176/16, Praha 6

Autor: Mgr. Tereza Jančušková

Školitel: MUDr. Soňa Peková, Ph.D.

Oponenti: prof. RNDr. Mgr. Marie Jarošová, CSc.

doc. MUDr. Daniel Lysák, Ph.D.

Obhajoba se koná dne: 12. 5. 2015 ve 13:30 hod. v seminární místnosti Ústavu biologie a lékařské genetiky 1. LF UK, Albertov 4, Praha 2

S dizertací je možno se seznámit na děkanátě
3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze

Obsah

Souhrn	4
Summary	5
1 Úvod	6
1.1 Akutní myeloidní leukémie (AML).....	6
1.2 Akutní lymfoblastická leukémie (ALL)	7
1.3 Minimální reziduální nemoc (MRN).....	8
2 Cíle práce.....	10
3 Metodika.....	11
3.1 Analyzované vzorky.....	11
3.2 Použité metody.....	11
3.3 Obecný postup.....	11
4 Výsledky.....	13
4.1 Buněčná linie K562.....	13
4.2 Pacienti s AL.....	13
5 Diskuze	15
6 Závěr.....	19
7 Citovaná literatura	20
8 Příloha – prezentace výsledků	23
8.1 Publikace, které jsou podkladem dizertace.....	23
8.2 Prezentace na zahraničních konferencích	23
8.3 Prezentace na tuzemských konferencích	24
8.4 Publikace bez vztahu k tématu dizertace	25

Souhrn

Akutní leukémie (AL) představují heterogenní skupinu maligních onemocnění krvetvorby s různou prognózou. Díky této různorodosti AL nelze s jistotou predikovat odpověď pacienta na léčbu. Proto je velmi důležité sledovat množství zbytkové maligní populace buněk po léčbě, tzv. minimální reziduální nemoc (MRN). K detekci MRN se běžně využívají přestavby těžkého řetězce imunoglobulinu nebo genů pro T-buněčný receptor, rekurentní cytogenetické abnormality a mutace v hematologicky významných genech. Zatímco u naprosté většiny dospělých pacientů s akutní lymfoblastickou leukémií je pomocí rutinního screeningu identifikován cíl pro sledování MRN, u dospělých pacientů s akutní myeloidní leukémií nalezáme vhodný cíl pouze u poloviny případů. Z tohoto důvodu je velmi žádoucí identifikovat nové specifické markery leukemických blastů, které budou sloužit ke sledování MRN u pacientů, u nichž nebyla nalezena žádná ze standardně vyšetřovaných aberací.

Cílem dizertační práce bylo vyvinout novou flexibilní strategii pro mapování zlomů aberovaných chromozomů na nukleotidovou úroveň a navrhnout klonálně specifický PCR test pro sledování MRN u pacientů s AL (resp. s akutní myeloidní leukémií).

Kombinací cytogenetických (pruhování chromozomů, mikrodisekce chromozomů), molekulárně-cytogenetických (mFISH, mBAND) a molekulárně-biologických (sekvenování DNA, long-range PCR, real-time PCR) metod jsme v karyotypu pacientů s AL identifikovali unikátní chromozomové aberace a charakterizovali nukleotidové sekvence zlomových míst těchto aberací. Finálním produktem je molekulární test pro real-time PCR, který umožňuje senzitivně sledovat MRN.

S použitím výše uvedených technik jsme zamapovali chromozomové zlomy u 5 pacientů s diagnózou AL. Příprava testu pro real-time PCR poté umožnila sledovat a kvantifikovat populaci buněk nesoucích chromozomovou aberaci identifikovanou v záchytu onemocnění. Srovnání nově vytvořeného testu se standardním testem využívaným v rutinní praxi ukazuje, že popsáním postupem nalezené molekulární markery mohou být využity ke sledování MRN u pacientů s AL.

Zde popsáný přístup otevírá nové možnosti charakterizace unikátních chromozomových zlomů. Předložená práce jasně ukazuje, že mapování chromozomových aberací až na úroveň nukleotidů je pro vybrané pacienty s AL realizovatelné a vhodné pro standardní klinickou praxi.

Klíčová slova: Akutní leukémie, chromozomová mikrodisekce, molekulární marker, minimální reziduální nemoc, personalizovaná medicína

Summary

Acute leukemias (AL) comprise a heterogeneous group of hematologic malignancies, and individual patient responses to treatment can be difficult to predict. Monitoring of minimal residual disease (MRD) is thus very important and holds great potential for improving treatment strategies. Common MRD targets include immunoglobulin heavy chain or T-cell receptor gene rearrangements, recurrent cytogenetic abnormalities and mutations in important hematological genes. Whereas in the majority of adult acute lymphoblastic leukemia patients a suitable MRD target can be identified, in adult acute myeloid leukemia patients well-characterized targets are found in only half of cases. The identification of new specific molecular markers of leukemic blasts for MRD assessment, particularly in AML patients, is therefore highly desirable.

Our aim was to develop a flexible strategy for mapping of cytogenetically identified unique clone-specific abnormalities down to the single nucleotide level and, based on the sequence, design a specific real-time PCR assay for MRD assessment in AL patients without any previously described MRD marker.

Using a combination of cytogenetic (chromosome banding, chromosome microdissection), molecular cytogenetic (mFISH, mBAND) and molecular biological (next-generation sequencing, long-range PCR, Sanger sequencing, real-time PCR) techniques we were able to characterize the DNA sequence flanking unique chromosomal breakpoints. Finally, we designed a specific real-time PCR assays for sensitive MRD monitoring in AL patients.

With the use of above mentioned techniques, we mapped derivative chromosomes in 5 AL patients and performed real-time PCR quantification of unique MRD markers for each patient. A comparison of these newly-designed assays to a standard assay used in clinical practice shows that our technical approach is suitable for the identification of novel molecular MRD markers in AL patients.

The described approach opens new vistas in the characterization of unique chromosomal breakpoints. Our work clearly shows that moving from the chromosomal level to the nucleotide level is feasible and readily applicable for eligible AL patients.

Keywords: Acute leukemia, chromosome microdissection, molecular marker, minimal residual disease, personalized medicine

1 Úvod

Akutní leukémie (AL) patří do skupiny zhoubných onemocnění krvetvorby vycházejících z hematopoetické kmenové buňky. Vyznačují se nekontrolovanou proliferací leukemických blastů v kostní dřeni. Dle příslušnosti blastů k myeloidní či lymfoidní linii lze akutní leukémie rozdělit na dvě základní skupiny: jedná se o akutní myeloidní leukémii (AML), jejíž buňky odpovídají vývojovým stádiím myeloidní hematopoetické řady a akutní lymfoblastickou leukémií (ALL), jejíž buňky nesou znaky lymfoidní linie. Podrobnější klasifikace je založena na hodnocení imunofenotypu, cytogenetických změn a molekulárně biologického profilu blastů.

Díky velké biologické diverzitě AL nelze zcela predikovat odpověď pacienta na léčbu. Proto je nutné využívat laboratorních technik, které pomocí klonálně specifických znaků umožní správně diagnostikovat a stratifikovat pacienty s AL a současně sledovat množství zbytkové maligní populace buněk po léčbě, tzv. minimální reziduální nemoc (MRN).

1.1 Akutní myeloidní leukémie (AML)

AML představuje heterogenní nádorové onemocnění krvetvorné tkáně, které postihuje buňky myeloidní řady a tvoří přibližně 80 % leukémií dospělého věku.

K základním diagnostickým analýzám patří vyšetření krevního obrazu s mikroskopicky hodnoceným diferenciálním krevním rozpočtem. Obvykle je přítomna leukocytóza výjimečně přesahující $100 \times 10^9/l$, počet leukocytů však může být normální nebo i snížený. Definitivní diagnóza AML je zjištělná cytologickým vyšetřením kostní dřenež získané sternální punkcí. Aspirovaná kostní dřeň je použita nejen na klasické cytologické vyšetření, ale také na další vyšetření vedoucí k upřesnění diagnózy a prognózy (cytogenetické, molekulárně-biologické a imunofenotypizační vyšetření).

Abnormality karyotypu u *de novo* zjištěných AML jsou prokazatelné přibližně u 50 - 60 % dospělých pacientů (Mrózek *et al.* 2004; Gregory *et al.* 2009; Bacher *et al.* 2009) a obvykle jsou reprezentovány chromozomovými translokacemi (např. $t(15;17)$, $t(8;21)$, $t(16;16)$...), monozomií, resp. delecí chromozomů 5 či 7 a trizomií chromozomu 8 (Vardimar *et al.* 2009; Martens *et al.* 2010). Komplexní změny karyotypu (tři a více chromozomových abnormalit) se vyskytují u 10 - 15 % případů (Mrózek 2008).

Přibližně u 40 % dospělých pacientů s AML nalézáme normální karyotyp - 46,XX, resp. 46,XY (Gregory *et al.* 2009; Bacher *et al.* 2009). U těchto pacientů jsou časté mutace v hematologicky významných genech, které identifikujeme pomocí analýz založených na přímém sekvenování. Jedná se např. o mutace genu *NPM1* (nukleofosmin 1), interní tandemovou duplikaci genu *FLT3 (FLT3-ITD)*, mutace postihující gen pro *CEBPA* (CCAAT/enhancer-binding protein alpha) či parciální tandemovou duplikaci genu *KMT2A – KMT2A-PTD* (Baldus *et al.* 2007; Gregory *et al.* 2009).

Výše uvedené chromozomové aberace a genové mutace jsou užitečné zejména pro prognostickou stratifikaci pacientů, a také mají význam jako markery pro sledování MRN.

1.2 Akutní lymfoblastická leukémie (ALL)

Podobně jako AML, je i ALL značně heterogenní onemocnění, které vzniká maligní transformací kmenové hematopoietické buňky. Jsou-li postiženy progenitory B-lymfocytární řady, jedná se o tzv. B-ALL (B-buněčná ALL). ALL vycházející z progenitorů T-lymfocytární řady se nazývá T-ALL (T-buněčná ALL). V dospělosti představuje ALL jen 1 % nádorových onemocnění a tvoří přibližně 20 % všech akutních leukémií (Bassan *et al.* 2011).

Zásadní význam v diagnostice ALL má vyšetření průtokovou cytometrií, které na základě exprese povrchových a cytoplazmatických antigenů umožňuje stanovit diagnózu a typ ALL. Významné je také cytogenetické vyšetření, příp. molekulárně-cytogenetické vyšetření a metody molekulární biologie, které umožňují sledovat MRN.

Konvenční cytogenetické vyšetření a molekulárně-cytogenetické vyšetření pomocí FISH (fluorescenční *in situ* hybridizace) odhalí až u 70 % pacientů patologickou chromozomovou aberaci (Mrózek *et al.* 2004). Nejčastějším a prognosticky nejvýznamnějším nálezem je tzv. filadelfský (Ph) chromozom – resp. derivovaný chromozom 22, který vzniká reciprokou translokací chromozomů 9 a 22 – t(9;22)(q34;q11). Výsledkem translokace je fúzní transkript *BCR-ABL1*, který dává vznik trvale aktivované kináze (Faderl *et al.* 2003). Tato aberace je pozorována přibližně u 25 % dospělých pacientů s B-ALL a je spojena se špatnou prognózou (Moorman *et al.* 2007).

Klíčovou charakteristikou pacientů s ALL je přítomnost specifické klonální přestavby genů pro těžký řetězec imunoglobulinu nebo T-buněčný receptor (IgH/TCR). Tato unikátní sekvence vzniká v průběhu vývoje lymfocytu přeskupováním genových segmentů (tzv. V, D, J segmenty) a je pro každého pacienta specifická (van Dongen a Wolvers-Tettero 1991). Těto charakteristiky se úspěšně využívá k detekci zbytkové populace leukemických buněk a následně kvantifikaci v rámci sledování MRN (Brüggemann *et al.* 2012; Schrappe 2012).

1.3 Minimální reziduální nemoc (MRN)

MRN je definována jako subklinická úroveň nemoci, kdy v průběhu terapie již maligní buňky nejsou běžnými cytologickými metodami detekovány. Pacient je v kompletní hematologické remisi, ale v jeho organismu může být přítomno až 10^{10} maligních buněk. Toto množství je nadále vysoké, a právě tyto přežívající nádorové buňky mohou způsobit relaps onemocnění.

Principem laboratorních technik, kterými je možno detekovat MRN, je nalezení vhodného znaku maligní buňky, který ponese celý klon a bude se jím lišit od zdravých buněk. V současné době jsou preferovány zejména techniky s vysokou senzitivitou, která by měla dosahovat alespoň 10^{-4} , a s možností kvantifikace zbytkové nádorové populace buněk. K těmto technikám patří především techniky založené na PCR a průtokové cytometrii. Uvedené metody umožňují velmi citlivě a specificky monitorovat reziduální leukemickou populaci buněk a patří ke „zlatému standardu“ v rutinní diagnostice AL.

U dospělých pacientů s AML slouží jako cíl ke sledování MRN pomocí PCR chromozomové abnormality (resp. fúzní transkripty, které z nich vznikají) a genové mutace (Kapitola 1.1) (Marcucci *et al.* 2004; Grimwade *et al.* 2010). Jako alternativní cíl pro sledování MRN lze případně využít i změny exprese některých genů - např. *WT1*, *EVII*, *BAALC*... (Cilloni *et al.* 2009; Weisser *et al.* 2007; Weber *et al.* 2014). K detekci MRN u dospělých pacientů s ALL se nejčastěji využívají klonální přestavby genů pro těžký řetězec imunoglobulinu (IgH) a pro T-buněčný receptor (TCR) nebo fúzní transkripty BCR-ABL1 a KMT2A-AFF1 (Brüggemann *et al.* 2012; Schrappe 2012).

Zatímco u naprosté většiny dospělých pacientů s ALL molekulární marker pro sledování MRN identifikujeme (Bacher *et al.* 2009), u dospělých pacientů s AML je

vhodný marker nalezen pouze u poloviny případů (Kern *et al.* 2010; Paietta 2012; Buccisano *et al.*, 2012).

Detekce a kvantifikace MRN je v současné době klíčovým nástrojem ke zhodnocení kvality odpovědi pacienta na léčbu, jelikož umožňuje predikovat její selhání, případně u pacientů po transplantaci kostní dřeně dovoluje včas předpovědět blížící se relaps onemocnění. V případě selhání odpovědi na léčbu se klinik rozhoduje o vhodné úpravě léčebného protokolu. V případě molekulárního relapsu, který předchází plnému klinickému relapsu, klinik dokáže včas terapeuticky intervenovat a zabránit tak plnému rozvinutí relapsu onemocnění. Prognostický význam detekce MRN byl potvrzen mnoha pracemi (Jorgensen a Chen 2011; Abdelhamid *et al.* 2012; Buccisano *et al.*, 2012; Hourigan a Karp 2013; Garand *et al.* 2013).

2 Cíle práce

Moderními molekulárně-biologickými technikami založenými na PCR identifikujeme vhodný molekulární marker pro sledování minimální reziduální nemoci pouze u poloviny dospělých pacientů s AML. Z tohoto důvodu je žádoucí navrhnout unikátní přístup, který by umožnil identifikovat markery i u pacientů, u kterých rutinním screeningem (detekce fúzních transkriptů a genových mutací) žádný cíl pro sledování MRN nenalezneme. Cílem této práce bylo:

- Charakterizovat abnormality karyotypu u dospělých pacientů s nově diagnostikovanou akutní leukémií pomocí cytogenetických a molekulárně-cytogenetických technik
- Pomocí konvenční mikrodisekce izolovat zlomová místa derivovaných chromozomů
- Mapovat zlomová místa až na úroveň jednotlivých nukleotidů pomocí sekvenování nové generace a long-range PCR
- Navrhnout a optimalizovat unikátní pacient-specifické testy založené na real-time PCR pro sledování MRN
- Zhodnotit význam screeningového vyšetření zaměřeného na identifikaci markerů pro senzitivní sledování minimální reziduální nemoci

3 Metodika

3.1 Analyzované vzorky

K návrhu a optimalizaci přístupu k identifikaci nových molekulárních markerů byla použita buněčná linie K562 (American Type Culture Collection, USA).

Po otestování na buněčné linii byl dále analyzován vzorek kostní dřeně pacienta s akutní lymfoblastickou leukémií, u kterého byl pomocí screeningu fúzních transkriptů (AcutePlexX CE; Plachý *et al.* 2011) nalezen cíl pro sledování MRN. Kvantifikace tohoto cíle sloužila jako srovnání s kvantifikacemi nově identifikovaných cílů pomocí optimalizovaného přístupu.

Dále byly analyzovány vzorky kostní dřeně šesti pacientů se stanovenou diagnózou akutní myeloidní leukémie, u kterých nebyl identifikován vhodný cíl pro sledování MRN. Kostní dřeň byla odebírána v záchytu onemocnění a dále v průběhu léčby pacienta. Vzorky byly odebírány na základě informovaného souhlasu pacienta a analyzovány v laboratoři synlab genetics s.r.o., Praha.

Průměrný věk pacientů při stanovení diagnózy AL byl 57 let.

3.2 Použité metody

V dizertační práci byly použity následující metody: kultivace buněk, klasické pruhování chromozomů, mnohobarevná fluorescenční *in situ* hybridizace (mFISH), mnohobarevné pruhování s vysokou rozlišovací schopností (mBAND), chromozomová mikrodisekce, PCR s degenerovanými primery (DOP-PCR), sekvenování nové generace (NGS; GS Junior), izolace DNA a RNA, long-range PCR, Sangerovo sekvenování a real-time PCR.

3.3 Obecný postup

Přístup k identifikaci nových molekulárních markerů pro sledování MRN spočíval v nálezu derivovaného chromozomu v karyotypu pacientů a v následné mikrodisekci zlomových oblastí tohoto chromozomu pomocí skleněné jehly. Takto izolované chromozomové fragmenty byly dále amplifikovány pomocí DOP-PCR a sekvenovány na platformě NGS. Vzniklá čtení byla pomocí počítačového programu BreakLoc (Plachý, nepublikováno) přiřazena k referenčním sekvencím konkrétních chromozomů. Do oblasti posledního mapovaného čtení byla

ekvidistantně (přibližně po 1,5 kbp) navrhnutá sada primerů pro long-range PCR. Vzniklý amplikon byl poté sekvenován z obou stran standardní Sangerovou metodou na kapilárním sekvenátoru. Sekvenační analýza následně identifikovala sekvenci DNA zlomových oblastí konkrétní aberace. Na tuto sekvenci byly dále navrženy primery a sonda pro real-time PCR, čímž bylo umožněno kvantifikovat chromozomovou aberaci nalezenou v záchytu onemocnění.

4 Výsledky

4.1 Buněčná linie K562

Metodami mFISH a mBAND jsme u buněčné linie K562 identifikovali hypotriploidní karyotyp s přítomností derivovaného chromozomu – der(10)t(3;10)(p21;q23). Část derivovaného chromozomu 10 obsahující materiál chromozomů 3 a 10 byla disekována. Celkem bylo disekováno 10 zlomových fragmentů der(10), které byly amplifikovány pomocí DOP-PCR. Pomocí NGS sekvenování bylo získáno 80 789 čtení, která byla přiřazena k referenčním sekvencím chromozomů 3 a 10. Následná long-range PCR vedla k zisku produktu o velikosti ~ 4,5 kbp. Tento amplicon byl poté sekvenován z obou stran standardní Sangerovou metodou a byli identifikováni fúzní partneři, gen *CDC25A* na chromozomu 3 (místo zlomu v intronu 2) a *GRID1* na chromozomu 10 (místo zlomu v intronu 4).

4.2 Pacienti s AL

Pro pacienty s AL byl použit postup optimalizovaný u linie K562. Celkem jsme analyzovali 7 pacientů (1 pacient s ALL, 6 pacientů s AML).

Pacient 1 byl analyzován z důvodu srovnání standardně používaného cíle pro detekci MRN (fúzní transkript *KMT2A-AFF1*) a nově identifikovaných cílů - zlomová místa der(4) a der(11).

Zlomové místo a následné senzitivní (10^{-4} - 10^{-5}) sledování MRN pomocí pacient-specifického testu bylo umožněno u 5 pacientů (pacienti 1-5). U zbylých 2 pacientů (pacienti 6 a 7) nebyla identifikace sekvence DNA chromozomových zlomů možná.

Tabulka shrnuje charakteristiky pacientů a podává přehled o výsledcích jednotlivých analýz, včetně specifikace nově identifikovaných markerů pro sledování MRN.

Pacient	Pohlaví/ Věk	Diagnóza	Karyotyp	Screening ¹⁾	Diskovány chromozom	Nový cíl pro sledování MRN
1	Ž/64	ALL	46,XX,t(X;4;11)(q25;q21;q23)[20] 46,XX,ins(10;11)(p12;q13q23), der(11)t(11;14)(q13;q11),der (14)t(11;14)(q23;q11)[20]	KMT2A-AFF1 ²⁾	der(4); der(11)	LOC392539-AFF1; KMT2A-AFF1
2	M/21	AML	46,XY,der(7)del(7)(p21)del(7) (q21),t(7;8)(q21;q24)[20] 46,XX,t(3;10)(q26;q21) [18]/46,XX[2]	KMT2A-MLLT10 ³⁾	der(10)	KMT2A-MLLT10
3	M/72	AML	46,XX,der(7)del(7)(p21)del(7) (q21),t(7;8)(q21;q24)[20] 46,XX,t(3;10)(q26;q21) [18]/46,XX[2]	negativní	der(8)	CDK6-8q24
4	Ž/57	AML	46,XX,t(3;6)(q26;q25)[20] 46,XY,del(9)(q12q22)[20]	negativní	der(10)	MECOM-C10orf107
5	Ž/67	AML	46,XX,t(3;6)(q26;q25)[20] 46,XY,del(9)(q12q22)[20]	negativní	der(3)	MECOM-LOC101928923
6	M/57	AML	44,XX,der(2)(11pter→11p11::6q 14→6q22::2p11→2q12::2q33→ 2q22::2p16→2p22::11q13→11q 14::5q23→5qter),der(5)(5pter→5 q15::6p24→6p21::6q24→6q25:: 2p23→2pter),-6,del(7)(pter →q22:);-11[20]	negativní	der(9)	neidentifikován
7	Ž/64	AML	44,XX,der(2)(11pter→11p11::6q 14→6q22::2p11→2q12::2q33→ 2q22::2p16→2p22::11q13→11q 14::5q23→5qter),der(5)(5pter→5 q15::6p24→6p21::6q24→6q25:: 2p23→2pter),-6,del(7)(pter →q22:);-11[20]	negativní	der(5)	neidentifikován

Ž – žena; M – muž; uveden věk v době diagnózy leukémie

¹⁾ Screening v době záchytu leukémie zahrnoval:

u AML: detekci fúzních transkriptů (AcutePlexX) a genových mutací (NPM1, FLT3-ITD, KMT2A-PTD, CEBPA, WT1, c-KIT)

u ALL: detekci fúzních transkriptů (AcutePlexX) a genových přestavěb (Igh/TCR)

²⁾ cíl KMT2A-AFF1 byl využit pro srovnání s nově identifikovaným cílem

³⁾ cíl KMT2A-MLLT10 byl nedostatečně exprimován

Tabulka: Přehled výsledků cytogenetických, molekulárně-cytogenetických a molekulárně-biologických vyšetření všech pacientů.

5 Diskuze

Specifické testy k detekci MRN umožňují precizně monitorovat dynamiku maligní populace buněk v průběhu léčby pacienta a vyhodnotit léčebnou odpověď. Proto má sledování MRN v průběhu léčby pacientů s AL nesporný klinický význam (Jorgensen a Chen 2011; Abdelhamid *et al.* 2012; Buccisano *et al.*, 2012; Hourigan a Karp 2013; Garand *et al.* 2013). K detekci MRN se u dospělých pacientů s ALL nejčastěji využívají klonální přestavby genů pro těžký imunoglobulinový řetězec nebo T-buněčný receptor. Dále můžeme MRN detekovat pomocí fúzních transkriptů, např. BCR-ABL1 nebo KMT2A-AFF1 (MLL-AF4). U dospělých pacientů s AML slouží jako cíl pro sledování MRN rekurentní cytogenetické aberace (resp. fúzní transkripty, které z nich vznikají – např. RUNX1-RUNX1T1, PML-RARA...), a také klonálně specifické mutace prognostických markerů asociovaných s leukémiemi (např. *NPM1*, *CEBPA*, *FLT3-ITD*...). V naší laboratoři slouží k detekci fúzních transkriptů unikátní diagnostický systém AcutePlexX CE (Plachý *et al.* 2011), díky kterému jsme schopni detekovat více než 100 známých fúzních transkriptů a jejich sestřihových variant. Mutace genů a genové přestavby detekujeme pomocí konvenční PCR s následným sekvenováním vzniklého produktu. Uvedenými přístupy identifikujeme cíl pro sledování MRN přibližně u 90 % dospělých pacientů s ALL a pouze u 50 % dospělých pacientů s AML.

Nezbytnou součástí vyšetření pacientů s AL je analýza karyotypu. Umožňuje určit, příp. zpřesnit diagnózu a prognózu nemocných. Klasické cytogenetické vyšetření není ale dostatečně senzitivní k detekci zbytkových leukemických buněk, a navíc je ovlivněno ziskem adekvátního počtu analyzovatelných metafází. Molekulárně-cytogenetické vyšetření pomocí FISH je sice citlivější (10^{-2}), nezávislé na proliferčním potenciálu buněk a umožňuje analyzovat větší počet buněk než je tomu u klasické cytogenetiky, nicméně, pro účely stanovení MRN není ani tato senzitivita dostatečná. Nedílnou součástí diagnostického procesu u pacientů s AL je také imunofenotypizační analýza exprese CD antigenů na leukemických blastech. Vyšetření pomocí průtokové cytometrie je důležité nejen při stanovení diagnózy, ale také k monitorování účinnosti léčby a stanovení prognózy onemocnění. Nicméně, pro účely senzitivní detekce MRN může být využití průtokové cytometrie limitováno jednak nestabilitou imunologických profilů leukemických buněk v průběhu léčby, a také nižší senzitivitou (ve srovnání s PCR technikami), která se pohybuje mezi 10^{-3} - 10^{-4} , v závislosti na typu leukémie, použitém přístrojovém vybavení

a detekčním panelu protilátek (Szczepański 2007; Jorgensen a Chen 2011; Brüggemann *et al.* 2012). Z tohoto důvodu je nesrovnatelně vhodnější a citlivější metodika založená na real-time PCR, která obvykle dosahuje senzitivity 10^{-4} - 10^{-6} (Hokland *et al.* 2011; Jorgensen a Chen 2011).

Z uvedených důvodů bylo cílem dizertační práce připravit flexibilní metodiku k identifikaci nových klonálně specifických znaků leukemických buněk, a to zejména pro pacienty s AML, u kterých nelze pomocí běžného screeningového panelu analýz v záchytu onemocnění (fúzní transkripty, genové mutace a přestavby) nalézt molekulární marker pro senzitivní sledování MRN pomocí real-time PCR. S využitím cytogenetických, molekulárně cytogenetických a molekulárně biologických technik (pruhování chromozomů, mFISH a mBAND, mikrodisekce chromozomů, sekvenování nové generace, Sangerovo sekvenování, long-range PCR, real-time PCR) jsme připravili pacient-specifický test pro real-time PCR, který umožňuje monitorovat chromozomovou aberaci diagnostikovanou v záchytu onemocnění s citlivostí až 10^{-5} .

Základním předpokladem k úspěšné identifikaci sekvence DNA chromozomového zlomu je přesná charakterizace derivovaného chromozomu. Klasická karyotypová analýza je limitována morfologií chromozomů a zejména rozlišením, které dosahuje 7-10 Mbp (Bickmore 2001). Proto se nám osvědčilo analyzovat karyotyp, resp. derivovaný chromozom pacientů nejen pomocí klasických pruhovacích technik, ale také pomocí technik molekulární cytogenetiky - mFISH, mBAND, příp. BAC (Bacterial artificial chromosome) FISH, které poskytují rozlišení 2-3 Mbp, resp. 1-1,5 Mbp, resp. ~ 100 kbp (Mundle a Koska 2006). Díky těmto metodám můžeme vyloučit chromozomové aberace, které nejsou vhodné k mikrodisekci. Například, u některých pacientů s AL může dojít k fúzi telomerické oblasti jednoho chromozomu a „non-telomerické“ oblasti druhého chromozomu. Takto vzniklý derivovaný chromozom není vhodné disekovat, protože repetitivní povaha telomery neumožňuje finální návrh testu pro real-time PCR (Jones *et al.* 2012).

V práci byl použit přístup izolace derivovaného chromozomu pomocí mikrodisekce. Tato metodika se běžně využívá k přípravě chromozomově specifických DNA knihoven, malovacích sond, a také k identifikaci marker

chromozomů (Engelen *et al.* 1998; Shim *et al.* 2007). Předpokladem pro úspěšnou disekci je přítomnost dobře rozestoupených metafázních chromozomů a jejich rozlišení na základě klasických barvicích technik (barvení Giemsou, G-pruhování), příp. pomocí fluorescenčních sond (Engelen *et al.* 1998; osobní sdělení - prof. Thomas Liehr, Universitätsklinikum Jena, Německo). Mikrodisekce probíhá na vzorcích nakapaných na krycí skla, která mají jiné vlastnosti než klasická podložní skla používaná pro cytogenetické a molekulárně-cytogenetické techniky. Navíc jsou chromozomy získané ze vzorků kostní dřeně obvykle v horší kvalitě než je tomu u vzorků periferní krve, a proto se na krycích sklech pruhují a rozpoznávají obtížněji než na podložních sklech. Z těchto důvodů jsme aberované chromozomy všech pacientů rozlišovali pomocí fluorescenčních sond, které byly vždy zvoleny tak, abychom byli schopni jasně poznat derivovaný chromozom. Osvědčilo se nám kombinovat komerční centromerické sondy a „MCB“ (multicolor banding) sondy z knihovny prof. Liehra.

Laserová mikrodisekce sice umožňuje rychlou a precizní disekci cílového chromozomu bez kontaminace nebo poškození genetického materiálu, nicméně pro účely izolace intersticiálních částí chromozomu nemusí být příliš vhodná (osobní sdělení - Dr. Anya Hunt, MMI, Švýcarsko). Proto jsme v naší práci zvolili konvenční mikrodisekci s použitím skleněné jehly ovládané elektronicky řízeným mikromanipulátorem. Navíc, ve srovnání s laserovou mikrodisekcí je konvenční mikrodisekce finančně dostupnější pro rutinní využití v laboratorní praxi (Grossmann *et al.* 2010). K izolaci derivovaných chromozomů může být použita i průtoková cytometrie, ale tento přístup je závislý na velikosti chromozomů, a proto nemusí být vždy s úspěchem využit, navíc neumožňuje studium invertovaných chromozomů (Chen *et al.* 2008). Podobně jako při použití laserového mikrodisektoru, průtokovou cytometrií není možné separovat specifické intersticiální fragmenty derivovaných chromozomů. Pořízení průtokového cytometru vybaveného třídícím je velmi nákladnou investicí, což také limituje jeho použití ve standardní laboratoři.

Disekované fragmenty chromozomů byly dále amplifikovány a sekvenovány na platformě GS Junior (Roche). Chen *et al.* ve své studii popisuje použití celogenomového sekvenátoru Illumina 1G (Solexa), který v průběhu jedné analýzy dokáže získat až miliony čtení o průměrné délce ~ 200 bp (Chen *et al.* 2008, Chen *et al.* 2010). Námí použitý systém GS Junior sice poskytuje přibližně sto tisíc čtení, ale

medián jejich délky je ~ 400 bp, což umožňuje preciznější mapování repetitivních sekvencí, čímž stoupá využitelnost jednotlivých čtení.

Možnou limitací zde popsané metody je nedostupnost referenční sekvence (verze sestavení Genome Reference Consortium Human Build 38) v místě přechodu jednotlivých kontigů některých chromozomů, zejména pak v repetitivních oblastech centromer a v heterochromatinových oblastech. To byl případ pacienta 6, u kterého jsme identifikovali intersticiální delecí dlouhého ramene chromozomu 9 – del(9)(q12q22). Místo zlomu v oblasti 9q22 bylo domapováno, ale zlom v heterochromatinové oblasti 9q12, která není pokryta referenčními sekvencemi, nebylo možno pomocí našeho přístupu určit.

Další možnou limitací jsou molekulárně komplikované aberace, např. kryptické inserce nebo některé komplexní přestavby. Komplexní karyotyp jsme našli u pacienta 7, u kterého jsme identifikovali dva derivované chromozomy – der(2) a der(5). Mikrodisekcí jsme izolovali část derivovaného chromozomu 5 (zlom mezi chromozomy 5 a 6). Analýzou dat získaných sekvenací disekvaných fragmentů der(5) byla nalezena čtení nejen z chromozomů 5 a 6, ale také z chromozomu 4. Pravděpodobně tedy došlo ke kryptické inserci materiálu chromozomu 4 na der(5), která neumožňovala určit zlomové místo a navrhnout test pro real-time PCR.

Pomocí nově navrženého přístupu k identifikaci molekulárních markerů bylo umožněno senzitivně (10^{-4} - 10^{-5}) monitorovat MRN u pacientů 1-5. U pacientů 1 a 2 byla tímto způsobem zvýšena senzitivita PCR testů k detekci fúzí KMT2A-AFF1 (MLL-AF4), resp. KMT2A-MLLT10 (MLL-AF10). U pacientů 1, 3-5 jsme identifikovali nové unikátní markery, které umožnily senzitivně sledovat MRN. Navíc jsme u pacientů 4 a 5 popsali dva dosud nepublikované (<http://atlasgeneticsoncology.org>; stav k lednu 2015) fúzní partnery genu *MECOM* (*C10orf107* a *LOC101928923*).

6 Závěr

Předložená práce popisuje zcela unikátní způsob identifikace molekulárního markeru pro sledování MRN u pacientů s AL. Jedná se o laboratorní přístup „šitý na míru“ nemocných s AL, který naplňuje naši představu o personalizované medicíně.

Zde popsaný přístup kombinuje metody cytogenetiky, molekulární cytogenetiky a molekulární biologie a umožňuje identifikovat nukleotidovou sekvenci zlomů derivovaných chromozomů. V případě, že u nemocného nenalezneme vhodný marker pro kvantifikaci MRN, máme k dispozici precizní postup, který umožní dosud nepopsanou chromozomovou aberaci využít k vytvoření specifického PCR testu pro sledování úspěšnosti léčby pacienta.

V optimálním případě je PCR test na podkladě unikátního klonálně specifického znaku leukemické populace připraven již za 6 týdnů od stanovení diagnózy, což je zcela v souladu s potřebami rutinního diagnostického procesu u pacientů s AL, kdy první vzorky ke sledování MRN dostává laboratoř po doznění indukční terapie, což je přibližně 1 měsíc od záchytu onemocnění.

7 Citovaná literatura

- 1 Abdelhamid E, Preudhomme C, Helevaut N, Nibourel O, Gardin C, Rousselot P, Castaigne S, Gruson B, Berthon C, Soua Z, Renneville A. Minimal residual disease monitoring based on FLT3 internal tandem duplication in adult acute myeloid leukemia. *Leuk Res.* 2012; 36(3):316-23.
- 2 Bacher U, Schnittger S, Haferlach C, Haferlach T. Molecular diagnostics in acute leukemias. *Clin Chem Lab Med.* 2009;47(11):1333-41.
- 3 Baldus CD, Mrózek K, Marcucci G, Bloomfield CD. Clinical outcome of de novo acute myeloid leukaemia patients with normal cytogenetics is affected by molecular genetic alterations: a concise review. *Br J Haematol.* 2007;137(5):387-400.
- 4 Bassan R, Hoelzer D. Modern therapy of acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol.* 2011;29(5):532–543.
- 5 Bickmore WA. Karyotype analysis and chromosome banding. 2001; eLS. disease in acute myeloid leukemia. *Cancer* 2008;112: 4-16.
- 6 Brüggemann M, Raff T, Kneba M. Has MRD monitoring superseded other prognostic factors in adult ALL? *Blood.* 2012;120(23):4470-81.
- 7 Buccisano F, Maurillo L, Del Principe MI, Del Poeta G, Sconocchia G, Lo-Coco F, Arcese W, Amadori S, Venditti A. Prognostic and therapeutic implications of minimal residual disease detection in acute myeloid leukemia. *Blood.* 2012;119(2):332-41.
- 8 Cilloni D, Renneville A, Hermitte F, Hills RK, Daly S, Jovanovic JV, Gottardi E, Fava M, Schnittger S, Weiss T, Izzo B, Nomdedeu J, van der Heijden A, van der Reijden BA, Jansen JH, van der Velden VH, Ommen H, Preudhomme C, Saglio G, Grimwade D. Real-time quantitative polymerase chain reaction detection of minimal residual disease by standardized WT1 assay to enhance risk stratification in acute myeloid leukemia: a European LeukemiaNet study. *J Clin Oncol.* 2009;27(31):5195-201.
- 9 Engelen JJ, Albrechts JC, Hamers GJ, Geraedts JP. A simple and efficient method for microdissection and microFISH. *J Med Genet.* 1998;35(4):265-8.
- 10 Chen W, Kalscheuer V, Tzschach A, Menzel C, Ullmann R, Schulz MH, Erdogan F, Li N, Kijas Z, Arkesteijn G, Pajares IL, Goetz-Sothmann M, Heinrich U, Rost I, Dufke A, Grasshoff U, Glaeser B, Vingron M, Ropers HH. Mapping translocation breakpoints by next-generation sequencing. *Genome Res.* 2008;18(7):1143-9.
- 11 Chen W, Ullmann R, Langnick C, Menzel C, Wotschofsky Z, Hu H, Döring A, Hu Y, Kang H, Tzschach A, Hoeltzenbein M, Neitzel H, Markus S, Wiedersberg E, Kistner G, van Ravenswaaij-Arts CM, Kleefstra T, Kalscheuer VM, Ropers HH. Breakpoint analysis of balanced chromosome rearrangements by next-generation paired-end sequencing. *Eur J Hum Genet.* 2010;18(5):539-43.
- 12 Faderl S, Jeha S, Kantarjian HM. The biology and therapy of adult acute lymphoblastic leukemia. *Cancer.* 2003;98(7):1337-54.

- 13 Garand R, Beldjord K, Cavé H, Fossat C, Arnoux I, Asnafi V, Bertrand Y, Boulland ML, Brouzes C, Clappier E, Delabesse E, Fest T, Garnache-Ottou F, Huguet F, Jacob MC, Kuhlein E, Marty-Grès S, Plesa A, Robillard N, Roussel M, Tkaczuk J, Dombret H, Macintyre E, Ifrah N, Béné MC, Baruchel A. Flow cytometry and IG/TCR quantitative PCR for minimal residual disease quantitation in acute lymphoblastic leukemia: a French multicenter prospective study on behalf of the FRALLE, EORTC and GRAALL. *Leukemia*. 2013;27(2):370-6.
- 14 Gregory TK, Wald D, Chen Y, Vermaat JM, Xiong Y, Tse W. Molecular prognostic markers for adult acute myeloid leukemia with normal cytogenetics. *J Hematol Oncol*. 2009;2:23.
- 15 Grimwade D, Vyas P, Freeman S. Assessment of minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *Curr Opin Oncol*, 2010; 22(6):656-63.
- 16 Grossmann V, Höckner M, Karmous-Benailly H, Liang D, Puttinger R, Quadrelli R, Röthlisberger B, Huber A, Wu L, Spreiz A, Fauth C, Erdel M, Zschocke J, Utermann G, Kotzot D. Parental origin of apparently balanced de novo complex chromosomal rearrangements investigated by microdissection, whole genome amplification, and microsatellite-mediated haplotype analysis. *Clin Genet*. 2010;78(6):548-53.
- 17 Hokland P, Ommen HB. Towards individualized follow-up in adult acute myeloid leukemia in remission. *Blood*. 2011;117(9):2577-84.
- 18 Hourigan CS, Karp JE. Minimal residual disease in acute myeloid leukaemia. *Nat Rev Clin Oncol*. 2013;10(8):460-71.
- 19 Jones CH, Pepper C, Baird DM. Telomere dysfunction and its role in haematological cancer. *Br J Haematol*. 2012;156(5):573-87.
- 20 Jorgensen JL, Chen SS. Monitoring of minimal residual disease in acute myeloid leukemia: methods and best applications. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2011; 11 Suppl 1:S49-53.
- 21 Kern W, Bacher U, Haferlach C, Schnittger S, Haferlach T. The role of multiparameter flow cytometry for disease monitoring in AML. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2010;23(3):379-390.
- 22 Marcucci G, Mrózek K, Ruppert AS, Archer KJ, Pettenati MJ, Heerema NA, Carroll AJ, Koduru PR, Kolitz JE, Sterling LJ, Edwards CG, Anastasi J, Larson RA, Bloomfield CD. Abnormal cytogenetics at date of morphologic complete remission predicts short overall and disease-free survival, and higher relapse rate in adult acute myeloid leukemia: results from cancer and leukemia group B study 8461. *J Clin Oncol*. 2004;22(12):2410-2418.
- 23 Martens JHA, Stunnenberg HG: The molecular signature of oncofusion proteins in acute myeloid leukemia. *FEBS Lett* 2010; 584(12):2662-2669.
- 24 Moorman AV, Harrison CJ, Buck GA, Richards SM, Secker-Walker LM, Martineau M, Vance GH, Cherry AM, Higgins RR, Fielding AK, Foroni L, Paietta E, Tallman MS, Litzow MR, Wiernik PH, Rowe JM, Goldstone AH, Dewald GW; Adult Leukaemia Working Party, Medical Research Council/National Cancer Research Institute. Karyotype is an independent prognostic factor in adult acute lymphoblastic leukemia (ALL): analysis

- of cytogenetic data from patients treated on the Medical Research Council (MRC) UKALLXII/Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) 2993 trial. *Blood*. 2007;109(8):3189-97.
- 25 Mrózek K, Heerema NA, Bloomfield CD. Cytogenetics in acute leukemia. *Blood Rev* 2004; 18(2):115-36.
 - 26 Mrózek K. Cytogenetic, molecular genetic, and clinical characteristics of acute myeloid leukemia with a complex karyotype. *Semin Oncol*. 2008;35(4):365-77.
 - 27 Mundle SD, Koska RJ. Fluorescence In Situ Hybridization: A major milestone in luminous cytogenetics. In: Coleman WB, Tsongalis GJ. *Molecular diagnostics for the clinical laboratorian*. 2nd Edition, New Jersey, Humana Press, 2006; 189-201.
 - 28 Paietta E. Minimal residual disease in acute myeloid leukemia: coming of age. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2012;2012:35-42.
 - 29 Plachy R, Zejskova L, Cmejla R, *et al*. Five-color multiplex Real-Time PCR technology to detect over 75 recurrent chromosomal abnormalities in acute myeloid leukemia; benefits for minimal residual disease detection. *Blood* 2011;2526
 - 30 Shim SH, Kyhm JH, Chung SR, Kim SR, Park MI, Lee CH, Cho YH. Generation of FISH probes using laser microbeam microdissection and application to clinical molecular cytogenetics. *J Microbiol Biotechnol*. 2007;17(7):1079-82.
 - 31 Schrappe M. Minimal residual disease: optimal methods, timing, and clinical relevance for an individual patient. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2012;2012:137-42.
 - 32 Szczepański T. Why and how to quantify minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia? *Leukemia*. 2007;21(4):622-6.
 - 33 van Dongen JJ, Wolvers-Tettero IL. Analysis of immunoglobulin and T cell receptor genes. Part I: Basic and technical aspects. *Clin Chim Acta*. 1991;198(1-2):1-91.
 - 34 Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, Harris NL, Le Beau MM, Hellström-Lindberg E, Tefferi A, Bloomfield CD. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 2009; 114(5):937-51.
 - 35 Weber S, Alpermann T, Dicker F, Jeromin S, Nadarajah N, Eder C, Fasan A, Kohlmann A, Meggendorfer M, Haferlach C, Kern W, Haferlach T, Schnittger S. BAALC expression: a suitable marker for prognostic risk stratification and detection of residual disease in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Blood Cancer J*. 2014;4:e173.
 - 36 Weisser M, Haferlach C, Haferlach T, Schnittger S. Feasibility of using the combined MDS-EV11/EV11 gene expression as an alternative molecular marker in acute myeloid leukemia: a report of four cases. *Cancer Genet Cytogenet*. 2007;177(1):64-9.

8 Příloha – prezentace výsledků

8.1 Publikace, které jsou podkladem dizertace

Jancuskova T., Plachy R., Zemankova L., Hardekopf D. W., Stika J., Zejskova L., Praulich I., Kreuzer K.-A., Rothe A., Othman M.A., Kosyakova N., Pekova S. Molecular characterization of the rare translocation t(3;10)(q26;q21) in an acute myeloid leukemia patient. *Mol Cytogenet.* 2014;7:47
IF 2,662

Jancuskova T., Plachy R., Stika J., Zemankova L., Hardekopf D. W., Liehr T., Kosyakova N., Cmejla R., Zejskova L., Kozak T., Zak P., Zavrelova A., Havlikova P., Karas M., Junge A., Ramel C., Pekova S. A method to identify new molecular markers for assessing minimal residual disease in acute leukemia patients. *Leuk Res.* 2013;37(10):1363-73.
IF 2,692

Jančušková T., Plachý R., Štika J., Krutílková L., Hardekopf D. W., Liehr T., Kosyakova N., Čmejla R., Žejšková L., Kozák T., Žák P., Karas M., Peková S. Identifikace nových molekulárních markerů pro sledování minimální reziduální nemoci u akutních leukémií. *Transfuzie Hematol. dnes*, 19, 2013, No. 1, p. 8-21.

8.2 Prezentace na zahraničních konferencích

Jancuskova T., Plachy R., Stika J., Zemankova L., Liehr T., Kosyakova N., Zejskova L., Zak P., Zavrelova A., Havlikova P., Pekova S. A Novel Approach for Unique MRD Markers Identification in Acute Leukemia Patients. 2nd International Conference on Predictive, Preventive and Personalized Medicine & Molecular Diagnostics, Las Vegas, USA 11/2014 – přednáška
Abstrakt: *J Pharmacogenomics Pharmacoproteomics* 2014;5(5):46
IF 1,05

Jancuskova T., Plachy R., Stika J., Hardekopf D. W., Zejskova L., Praulich I., Kreuzer K. A., Kosyakova N., Liehr T., S Pekova S. Characterization of the Rare Translocation t(3;10)(q26;q21) in an Acute Myeloid Leukemia Patient. 19th Congress of European Hematology Association, Milan, Italy, 06/2014 – poster
Abstrakt: *Haematologica* 2014;99(s1):283-284. abstract n. P781
IF 5,868

Jancuskova T., Plachy R., Stika J., Zemankova L., D Hardekopf D., Liehr T., Kosyakova N., Zejskova L., Sedlackova L., Cmejla R., Pekova S. Mapping of Unique Chromosomal Abnormalities as a Tool for Sensitive Minimal Residual Disease Assessment in Acute Leukemia Patients. 18th Congress of European Hematology Association, Stockholm, Sweden, 06/2013 – poster
Abstrakt: *Haematologica* 2013; 98(s1):394-395. abstract n. P953
IF 5,868

Jančuřková T., Plachý R., Hardekopf D. W., Lucie Krutílková L., Štika J., Žejřková L., Sedláčková L., Peková S. Identifikace nových molekulárních markerů pro sledování minimální reziduální nemoci u akutních leukémií. XXIII. Izakovičov memoriál, Bratislava, Slovensko, 09/2012 – přednáška
Abstrakt: Sborník abstrakt 2012:18-19

Jancuskova T., Pekova S, Plachy R., Hardekopf D., Liehr T., Weise A., Kosyakova N., Stika J., L Zejskova L., Sedlackova L., Krutilkova L, Cmejla R. From Cytogenetics to Molecular Biology: Mapping of Unique Chromosomal Abnormalities at the Nucleotide Level. 17th Congress of European Hematology Association, Amsterdam, Netherlands, 06/2012 – poster
Abstrakt: Haematologica 2012;97(s1):279. abstract n. 0684
IF 5,935

8.3 Prezentace na tuzemských konferencích

Jančuřková T., Plachý R., Zemánková L., Štika J., Žejřková L., Mazal O., Kosyakova N., Liehr T., Praulich I., Kreuzer K.-A., Peková S. Mapování chromozomových zlomů jako nástroj k identifikaci unikátních molekulárních markerů pro sledování MRN u pacientů s AML. 47. výroční zasedání Cytogenetické sekce Čs. biologické společnosti, Praha, 09/2014 – přednáška

Jančuřková T., Plachý R., Štika J., Hardekopf D. W., Žejřková L., Praulich I., Kreuzer K. A., Kosyakova N., Liehr T., Peková S. Mapování chromozomového zlomu zahrnutého do unikátní translokace t(3;10)(q26;q21) u pacienta s akutní myeloidní leukémií. XXVIII. Olomoucké hematologické dny, Olomouc 06/2014 – přednáška
Abstrakt: Sborník abstrakt 2014:41-42; č. 2624; ISBN 978-80-244-4099-6

Jančuřková T., Plachý R., Štika J., Zemánková L, Hardekopf D., Žejřková L, Sedláčková L, Peková S. Sledování minimální reziduální nemoci u akutních leukémií pomocí nově identifikovaných molekulárních markerů. 46. výroční konference Cytogenetické sekce Čs. biologické společnosti, Brno, 09/2013 – přednáška

Jančuřková T. Sledování minimální reziduální nemoci u akutních leukémií pomocí nově identifikovaných molekulárních markerů. Studentská vědecká konference 3. lékařské fakulty, Praha, 05/2013 – přednáška
Abstrakt: Sborník abstrakt 2013:31-33; ISBN 978-80-260-4327-0

Jančuřková T., Plachý R., Hardekopf D. W., Lucie Krutílková L., Štika J., Žejřková L., Sedláčková L., Peková S. Od cytogenetiky k molekulární biologii: mapování unikátních chromozomových zlomů na úroveň nukleotidů. 45. výroční cytogenetická konference, Olomouc, 09/2012 – přednáška

Jancuskova T., Plachy R., Hardekopf D. W., Liehr T., Weise A., Kosyakova N., Štika J., Žejškova L., Sedlackova L., Krutilkova L., Cmejla R., Pekova S. From Cytogenetics to Molecular Biology: Mapping of Unique Chromosomal Abnormalities at the Nucleotide Level. XXVI. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí, Olomouc, 06/2012 – přednáška

Abstrakt: Sborník abstrakt 2012; ISBN 978-80-244-3157-4

Jančuškova T., Plachý R., Hardekopf D. W., Liehr T., Weise A., Kosyakova N., Štika J., Žejškova L., Sedláčková L., Krutilková L., Čmejla R., Peková S. Od cytogenetiky k molekulární biologii: mapování unikátních chromozomových zlomů na úroveň nukleotidů. Konference DNA analýza IX, Praha, 06/2012 – přednáška

Jančuškova T., Plachý R., Štika J., Hardekopf D. W., Krutilková L., Liehr T., Žejšková L., Čmejla R., Žák P., Kozák T., Koza V., Peková S. Identifikace nových molekulárních markerů pro sledování minimální reziduální nemoci u akutní myeloidní leukémie. IX. Hradecký cytogenetický den, Hradec Králové, 05/2012 – přednáška

Jančuškova T. Identifikace nových molekulárních markerů pro sledování minimální reziduální nemoci u akutní myeloidní leukémie. Studentská vědecká konference 3. lékařské fakulty, Praha, 05/2012 – přednáška

Abstrakt: Sborník abstrakt 2012:125-126; ISBN 978-80-260-2180-3

- uděleno 3. místo v postgraduální sekci

Jančuškova T., Hardekopf D. W., Krutilková L., Čmejla R., Plachý R., Žejšková L., Vydra J., Karas M., Koza V., Zavřelová A., Peková S. Identifikace nových molekulárních markerů pro sledování minimální reziduální nemoci u akutních leukémií. Celostátní sjezd Společnosti lékařské genetiky ČLS JEP a 44. Výroční cytogenetická konference, Třeboň, 09/2011 – přednáška

Abstrakt: Sborník (nečíslováno); ISBN 978-80-260-0415-8

Jančuškova T., Peková S., Hardekopf D. W., Čmejla R., Žejškova L., Plachý R. Od megabází k bázím, aneb kterak molekulárně uchopit genomové abnormality. Konference DNA analýza VIII, Praha, 06/2011 – přednáška

8.4 Publikace bez vztahu k tématu dizertace

Drabova J., Seemanova E., Hancarova M., Horacek M., **Jancuskova T.**, Pekova S., Novotna D., Sedlacek Z. Long term follow-up in a patient with a de novo microdeletion of 14q11.2 involving CHD8. Am J Med Genet A. – in press
IF 2,048

Pekova S., Vydra J., Kabickova H., Frankova S., Haugvicova R., Mazal O., Cmejla R., Hardekopf D. W, **Jancuskova T.**, Kozak T. Candidatus Neoehrlichia mikurensis infection identified in 2 hematologic patients: benefit of molecular techniques for rare pathogen detection. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2011;69(3):266-70.
IF 2,528

Pekova S., Mazal O., Cmejla R., Hardekopf D.W., Plachy R., Zejskova L., Haugvicova R., **Jancuskova T.**, Karas M., Koza V., Smolej L., Bezdickova L., Kozak T. A comprehensive study of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia: Analysis of 1287 diagnostic and 1148 follow-up CLL samples. *Leuk Res.* 2011;35(7):889-98.
IF 2,923

Zejskova L., **Jancuskova T.**, Kotlabova K., Doucha J., Hromadnikova I. Feasibility of fetal-derived hypermethylated RASSF1A sequence quantification in maternal plasma--next step toward reliable non-invasive prenatal diagnostics. *Exp Mol Pathol.* 2010;89(3):241-7.
IF 2,986

Hromadnikova I., Zejskova L., Kotlabova K., **Jancuskova T.**, Doucha J, Dlouha K, Krofta L, Jirasek JE, Vlk R. Quantification of extracellular DNA using hypermethylated RASSF1A, SRY, and GLO sequences--evaluation of diagnostic possibilities for predicting placental insufficiency. *DNA Cell Biol.* 2010;29(6):295-301.
IF 2,159