

Univerzita Karlova v Praze
1. lékařská fakulta

Autoreferát disertační práce



**Přínos molekulárně genetických a cytogenetických analýz k diagnostice
a predikci léčebné odpovědi u pacientů s non-Hodgkinskými lymfomy**

**The role of molecular genetic and cytogenetic analyses in the diagnosis and
prediction of treatment response in patients with non-Hodgkin lymphomas**

MUDr. Adéla Berková

2014

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: Centrum nádorové cytogenetiky ÚLBDL VFN a 1.LF UK v Praze

Školitelé: Doc. RNDr. Zuzana Zemanová, CSc.

Prof. MUDr. Marek Trněný, 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

Abstrakt	4
Abstract	5
1. <u>Úvod</u>	6
1.1. CLL/SLL	6
2. <u>Cíle práce</u>	7
3. <u>Materiál a metodika</u>	8
4. <u>Výsledky a diskuse</u>	9
4.1. Molekulárně biologická a molekulárně cytogenetická analýza u nemocných s CLL ..	9
4.2. Klonální vývoj u CLL/SLL	11
4.2.1. Závislost KV na sledovaných parametrech	11
4.2.2. Vliv KV na celkové přežití.....	12
4.3. Význam délky telomér u CLL	12
4.4. Význam cytogenetických analýz u NHL	13
5. <u>Závěry</u>	15
6. <u>Použitá literatura</u>	16
7. <u>Publikace</u>	18

Abstrakt

Maligní lymfoproliferace zahrnují vysoce heterogenní skupinu nádorů vycházejících z lymfocytů, tj. lymfomů (Non-Hodgkinových – NHL, i Hodgkinova), leukémií, mnohočetného myelomu a dalších. V současnosti je známa řada chromosomových aberací jak s diagnostickým, tak prognostickým významem, což zařadilo molekulárně cytogenetické analýzy genomu nádorových buněk mezi důležitá vyšetření. Disertace se věnuje především chronické lymfocytární leukémii (CLL), která patří mezi periferní B lymfoproliferace a je nejčastějším typem leukémie. Metodou fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) jsme vyšetřovali přítomnost čtyř nejčastějších aberací (delece 13q14, delece genu *ATM* a *TP53* a trisomie 12), doplněnou u části pacientů o detekci aberací genu *IgH*, a porovnali jsme nálezy s dalšími faktory a klinickými charakteristikami.

Práce ukazuje, že vyšetření klasického karyotypu je relativně málo relevantní. Metoda FISH byla pro záchyt aberací u CLL mnohem přínosnější. Přítomnost žádné ze čtyř zmíněných aberací není pro CLL specifická, má však prognostický význam, zejména delece *TP53*. Detekce některých translokací *IgH* genu je nepostradatelná v diferenciální diagnostice CLL a dalších NHL (velkobuněčného, folikulárního, Burkittova lymfomu, lymfomu z buněk plášťové zóny).

Věnovali jsme se potvrzení významu jednotlivých aberací u CLL a naše výsledky potvrdily význam prognostických hierarchických skupin. Příznivou prognózu dle hodnocení celkového přežití měly normální nálezy a záchyt delece 13q (bez jiné aberace), střední trisomie 12, a nejhorší prognózu delece genů *ATM* a *TP53*.

Velká část disertace je věnována klonálnímu vývoji (KV) u CLL, studovaná v souboru 292 nemocných s opakovanými vyšetřeními pomocí FISH. Byly hledány rizikové faktory pro získání jednotlivých aberací a jejich vliv na přežití. Pro deleci 13q a 11q byl nalezen jediný faktor, a to doba mezi prvním vyšetřením a vyšetřením zachycujícím KV. Prognosticky nejhorší možný KV – získání delece *TP53* výrazně zkrátil celkové přežití, byl spojen s nemutovaným stavem *IgVH* genů, pozitivitou exprese CD38 a ZAP-70, a s předchozím podáním chemoterapie.

Disertační práce zahrnuje jak komentáře k vlastním publikačním výstupům bezprostředně související s tématem, tak výsledky rozšířených souborů dosud nepublikovaných.

Abstract

Malignant lymphoproliferative disorders include highly heterogeneous entities, i.e. lymphomas (Non-Hodgkin – NHL, as well Hodgkin's lymphoma), lymphoid leukemias, multiple myeloma and others. As currently many chromosomal aberrations with diagnostic and prognostic significance are known, molecular cytogenetic analyses of tumor cell genome has become a substantial examination also in lymphoproliferative disorders. This thesis focuses primarily on chronic lymphocytic leukemia (CLL), which is one of the mature B-cell neoplasms and represents the most common type of leukemia. We analyzed four most frequently found aberrations (13q14 deletion, *ATM* and *TP53* gene deletion, and trisomy 12) by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) and also *IgH* gene aberrations in some patients. We compared the findings with other factors and clinical characteristics.

This work shows that the conventional G-banding is analysis relatively little relevant. FISH was more effective in detecting aberrations in CLL. Although none of the four aforementioned changes is specific to CLL, the prognostic impact is significant, particularly that of *TP53* deletion. Next, detection of some *IgH* gene translocations is essential in differential diagnosis of CLL and other NHL (follicular, mantle cell, diffuse large B cell, Burkitt's lymphomas).

We attempted to confirm the impact of individual CLL aberrations. Our results verified the prognostic relevance of hierarchical categories. According to overall survival data, the best outcome was found in normal finding and 13q deletion subgroups, whereas it was intermediate in trisomy 12 and an inferior in *ATM* and *TP53* gene deletion categories.

The major part of the thesis deals with clonal evolution (CE) in CLL, studied in a cohort of 292 of patients subsequently analyzed by FISH. We investigated which risk factors relate to each type of CE and their influence on survival. In case of CE 13q and CE 11q, the only factor was found, namely the duration of follow-up. Prognostically the worst possible CE, the occurrence of *TP53* deletion, significantly shortened overall survival and was associated with unmutated *IgVH* gene status, positive of CD38 and ZAP-70 expression, and previous chemotherapy.

The Ph.D. thesis comprises comments on own published papers directly related to objectives as well as research results yet unpublished.

1. Úvod

Jako nádorové lymfoproliferace označujeme v širším smyslu slova nádory vycházející z lymfocytů. Současná klasifikace lymfoidních malignit vychází z posledního vydání WHO klasifikace 2008 (Swerdlow S.H. *et al.*, 2008) a základem je dělení na tři hlavní kategorie: B-lymfoidní malignity, T/NK malignity (díky společným funkčním a imunofenotypovým znakům jsou zařazeny do jedné skupiny), a Hodgkinův lymfom. Z historických důvodů se používá také dělení na lymfomy Hodgkinovy a non-Hodkinovy (NHL). Jednotlivé typy pak zahrnují jak lymfom, tak lymfoidní leukémii, u kategorií B a T/NK dále rozlišujeme dvě hlavní skupiny - prekurzorové leukémie/lymfomy a malignity ze zralých buněk (též periferní). Přes 90 % NHL patří mezi periferní B lymfoproliferace a v mnoha ohledech napodobují stádia diferenciaci normálních B lymfocytů. Právě tato podobnost je základem jejich klasifikace a nomenklatury (Anon, Blood 1997; Anon, Journal of Clinical Oncology 1998). Až 50 % NHL tvoří dva nejčastější typy, a to difusní velkobuněčný B-lymfom (DLBCL) a folikulární B-lymfom (FL), například v České republice jsou to až dvě třetiny pacientů (Trněný M. *et al.*, 2007; Pytlík R. *et al.*, 2013). Na druhou stranu, nejčastější formou diseminované neoplázie B řady je chronická lymfocytární leukémie (Trněný M. *et al.*, 2011).

1.1. CLL/SLL

Chronická lymfatická leukémie (CLL) / lymfom z malých lymfocytů (SLL) je nádorové onemocnění, pro které je charakteristická akumulace klonu morfologicky zralých lymfocytů v kostní dřeni, periferní krvi a lymfatických tkáních. Jde o 2 klinické formy téhož onemocnění (Jaffe E.S. *et al.*, 2001). Medián věku v době diagnózy je kolem 65 let (Rozman C., Montserrat E., 1995), v ČR je to 70 let (Trněný M. *et al.*, 2007).

Průběh onemocnění je značně heterogenní - od agresivní až po indolentní chorobu, s níž nemocní nikdy nedospějí k potřebě antileukemické terapie (Dighiero G. *et al.*, 1991). Léčba chemoimunoterapií s sebou nese nezanedbatelnou toxicitu, proto rozhodnutí koho léčit a kdy se stává tím nejzásadnějším (Bazargan A. *et al.*, 2012). Průběh lze většinou dopředu odhadnout podle prognostických faktorů - exprese CD38 a ZAP-70 (Hamblin T.J. *et al.*, 2002), a zejména mutačního stavu *IgVH* genů (Hamblin T.J. *et al.*, 1999) a cytogenetických aberací zjištěných metodou fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) (Döhner H. *et al.*, 2000).

2. Cíle práce

1. Určit frekvenci cytogenetických a molekulárně cytogenetických aberací v souboru nemocných s CLL/SLL; porovnat nálezy s výsledky prognostických markerů a s klinickým průběhem nemoci; určit klinický význam nálezu aberací *IgH* genu; vyhodnotit, zda nálezy interfázni fluorescenční *in situ* hybridizace z periferní krve mají dostačující výpovědní hodnotu ve srovnání s nálezy karyotypu kostní dřeně konvenční cytogenetickou analýzou.

Hypotéza: Výsledky molekulárně cytogenetické metody FISH s panelem sond zaměřeným na čtyři nejčastější aberace u CLL a aberace genu *IgH* poskytují více informací než konvenční cytogenetika, ať již kvůli kryptickému charakteru aberací nebo skutečnosti, že se buňky nádorových lymfoproliferací ve standardních cytogenetických kultivacích většinou nedělí.

2. Posoudit význam klonálního vývoje u CLL.

Hypotéza: U opakovaných odběrů nemocných v průběhu choroby nezdědka dochází ke vzniku dalších aberací. Názory v literatuře se různí, proto jsme se zabývali otázkou, zda lze klonální vývoj očekávat u nemocných s určitým rizikovým profilem a jaký má dopad na celkové přežití.

3. Sledovat délku telomér a aktivitu telomerázy u CLL a posoudit jejich význam.

Hypotéza: Pro CLL je charakteristická akumulace klonu morfologicky zralých lymfocytů. V literatuře se uvádí, že délka telomér je ukazatel buněčného obratu a aktivita telomerázy je ve zralých buňkách velmi nízká. Analyzovali jsme tudíž, zda lze tyto dva parametry zařadit mezi prognostické faktory u CLL.

4. Ověřit význam molekulárně cytogenetických metod u dalších jednotek NHL.

Hypotéza: Nálezy chromosomových aberací mají význam pro diagnózu, diferenciální diagnostiku a prognózu.

3. Materiál a metodika

Soubor pacientů: Celkem bylo na našem pracovišti vyšetřeno 1686 pacientů s diagnózou suspektní CLL/B-NHL. Včetně opakovaných odběrů jsme provedli celkem 2370 cytogenetických a/nebo molekulárně cytogenetických analýz. V předkládané práci jsme hodnotili v průběhu času různé soubory nemocných.

Klasická cytogenetická analýza: Vzorky kostní dřeně (KD) byly zpracovány podle standardních cytogenetických postupů po 24 hodinové kultivaci v médiu RPMI 1640 s přidavkem 10% fetálního telecího séra bez použití mitogenu.

FISH: U preparátů KD byla provedena i FISH, u nátěrů periferní krve (PK) byla provedena pouze FISH (odběry PK krve zpracováváme bez kultivace, v suspenzích tedy nejsou mitosy). U NHL jsme také zavedli metodu FISH na bioptickém materiálu fixovaném ve formalinu a zalitém do parafinu. Tenké řezy (tloušťka okolo 5 μ m) byly po pretreatmentu natráveny proteázou. Metodou FISH za použití panelu komerčně dostupných DNA sond (CEP12, LSI D13S319/LSI 13q34, TP53, ATM, IgH BA, BCL6 BA, MYC BA, BCL2/IGH DF, CCND1/IGH DF, MYC/IGH DF; Abbott Molecular), byla analyzována přítomnost trisomie 12, delece oblasti 13q14.3 a delece genů *TP53* a *ATM* (dále „CLL FISH panel“), eventuálně zlomů genů *IgH*, *BCL6* a *MYC*, a translokací t(14;18)(q32;q21), t(11;14)(q13;q32) a t(8;14)(q24;q32). Při FISH analýzách jsme postupovali podle návodů doporučených výrobcem DNA sond. Cut off pro pozitivní hodnoty byla stanovena na 5 % u delecí a 2,5 % u trisomií, zlomů a translokací. Při hodnocení FISH v parafinových preparátech je klíčové najít patologem popsaný infiltrát.

Stanovení mutace *IgVH* genů: bylo prováděno v Laboratoři PCR diagnostiky leukémií ÚHK. Práh 2 % mutací byl zvolen k odlišení mutovaného a nemutovaného *IgVH* genu.

Analýzy délky telomér a detekce telomerázové aktivity: byly prováděny ve spolupráci s Oddělením molekulární genetiky ÚHK.

Imunofenotypizace: byla prováděna ve FACS laboratoři ÚLBLD VFN a 1.LF UK. Za pozitivní expresi CD38 byl považován výsledek nad 30 % a ZAP-70 nad 20 % lymfocytů.

Statistické analýzy: Pro analýzu kategorických dat byl použit χ^2 nebo Fisherův test pro malé četnosti. Pro testování různých prognostických skupin byl zvolen Mann-Whitney test. Byla provedena Kaplan-Meierova analýza přežívání a Mantel-Coxův test rovností funkcí přežívání. Pro multivariantní analýzu byl použit vícerozměrný Coxův regresní model.

4. Výsledky a diskuse

4.1. Molekulárně biologická a molekulárně cytogenetická analýza u nemocných s CLL

V retrospektivní studii zahrnující 146 pacientů s CLL byla cílem analýza chromosomových aberací, vyhodnocení jejich prognostického významu a korelace s expresí ZAP-70 a mutačním stavem *IgVH* genů. Neprokázali jsme prognostický význam nálezu trisomie 12, přítomné u 12 % nemocných, naopak delece genů *TP53* (17 % nemocných) a *ATM* (15 % nemocných) byly potvrzeny jako nepříznivý prognostický ukazatel (high-risk delece), a to především ve spojení s nemutovaným stavem *IgVH* genů. Z našich výsledků rovněž vyplynulo, že pravděpodobnost progresu onemocnění byla výrazně vyšší ($p=0,05$) u pacientů s vyšším Rai stadiem, s přítomností delece *ATM* a *TP53* genu, pozitivitou ZAP-70 a nemutovaným stavem *IgVH* genů, příznivým prognostickým faktorem byla naopak přítomnost delece 13q. Věnovali jsme se i otázce významu nálezu parciálních nebo úplných delecí variabilního segmentu *IgH* genu, které jsme detekovali u 29/146 pacientů (20 %), u nichž jsme z mutační analýzy *IgVH* znali i vybraný *VH* gen. Vzhledem k prokázané korelaci distální hranice delece *IgVH* a mutační analýzou zjištěné lokalizace *VH* segmentu v zárodečné linii CLL klonu se jedná o průvodní „fyziologický“ jev provázející somatickou rekombinací *V-D-J* úseků bez jakéhokoli vlivu na pacientovu prognózu (Berková A. *et al.*, 2008).

V průběhu doby jsme rozšířili soubor nemocných a zaznamenávali jsme výsledky získané jak konvenční cytogenetickou analýzou, tak metodou FISH. Karyotyp jsme vyšetřili u 794 pacientů s diagnózou B-NHL a suspektní CLL, s opakovanými odběry KD jsme provedli celkem 979 cytogenetických analýz (zároveň bylo u všech odběrů KD provedeno i vyšetření CLL FISH panelem). U 18 % vzorků nebyly nalezeny žádné hodnotitelné mitosy. Celkem v 806 případech jsme získali informativní výsledky, z toho jsme v 85 % prokázali normální karyotyp. V 6,7 % karyotypů jsme našli stejnou aberaci jako ve FISH. Komplexní změny karyotypu jsme prokázali u 20 pacientů (2,5 %). V době cytogenetického nálezu komplexního karyotypu však byl histologickým vyšetřením diagnostikován sekundární myelodysplastický syndrom (sMDS z útlumu krvetvorby po léčbě) v 7 případech, u jednoho pacienta Burkittův lymfom (BL), a u jednoho nemocného nádorová duplicita s infiltrací KD agresivním anaplastickým velkobuněčným T-lymfomem (CLL v remisi). V souvislosti s CLL byl prokázán Richterův syndrom s transformací do DLBCL ve 3 případech (jednou s delecí *TP53*, dvakrát s delecí genu *TP53* i *ATM*). U zbylých 8 nálezů komplexního karyotypu s diagnózou

CLL byla metodou FISH prokázána delece genu *TP53* v 6 případech, delece genu *ATM* u 1 a delece *ATM* i *TP53* také u 1 pacienta. Tedy ve všech případech souvisejících s CLL byly komplexní změny karyotypu určeny ve FISH kategorii high-risk, u všech pacientů (kromě jednoho) s delecí genu *TP53*.

Vyšetření CLL FISH panelem bylo provedeno u 1686 nemocných s diagnózou suspektní CLL/SLL. Včetně opakovaných odběrů u již vyšetřených pacientů jsme provedli celkem 2370 FISH analýz. V 1700 případech (72 %) byla metodou FISH detekována minimálně jedna ze čtyř nejčastějších aberací u CLL. Metodou FISH jsme také detekovali několik pro CLL/SLL netypických nálezů (celkem u 38 pacientů), tedy jiných, než je intersticiální mono-/bialelická delece 13q14.3 a trisomie 12. Konkrétně šlo o monosomii chromosomu 13 u 25 pacientů, delecí oblasti 13q34 (se zachováním oblasti 13q14.3) u 10 pacientů a monosomii chromosomu 12 u 3 pacientů z 1686. Díky imunohistochemické pozitivitě cyklinu D1 a prokázané translokaci t(11;14)(q13;q32) byla diagnóza reklasifikována na MCL u 30/38 nemocných. U dvou šlo o diagnózu DLBCL, u jednoho pacienta o FL.

Pro detekci přítomnosti translokací *IgH* genu jsme FISH se sondou *IgH* break-apart (která umožňuje zjistit účast *IgH* v translokaci bez informace o translokačním partnerském genu) provedli celkem u 979 pacientů a translokaci *IgH* jsme zjistili u 89 z nich (9 %). U 24 (27 %) se nám nepodařilo druhý partnerský gen zahrnutý v translokaci najít (hledány translokační geny *CCND1*, *BCL2*, *BCL6* a *MYC*). Translokaci t(8;14)(q24;q32) jsme prokázali u 3 pacientů, avšak u jedné nemocné nešlo o gen *MYC* (diagnóza CLL, bez aberací v CLL FISH panelu), u zbylých dvou ano, což vedlo ke změně diagnózy na BL. U 7 z 89 (7,7 %) jsme určili translokaci t(14;18)(q32;q21). V těchto případech je rozhodující imunohistochemický nález v histologickém vyšetření, který je hodnocen v závislosti na počtu typických znaků (atypická CLL s translokací *IgH/BCL2* versus atypický folikulární lymfom - FL). Jiná situace je u lymfomu z buněk pláště (MCL), kde je translokace t(11;14)(q13;q32) považována za primární genetickou událost vedoucí k overexpresi cyklinu D1. Díky imunofenotypové i cytologické podobnosti s CLL byla leukemizovaná varianta MCL detekována až metodou FISH průkazem translokace t(11;14)(q13;q32) u 55 pacientů se suspektní CLL (62 %). Protože se léčebné postupy u MCL a CLL liší, je odlišení těchto dvou onemocnění jedním z nejdůležitějších cytogenetických úkolů v diferenciální diagnostice B-NHL.

4.2. Klonální vývoj u CLL/SLL

V roce 2009 jsme publikovali práci, v níž jsme shrnuli výsledky opakovaných analýz u nemocných s CLL (Berková A. *et al.*, 2009). Ve studii bylo zahrnuto 97 nemocných s CLL, u kterých byla FISH analýza chromosomových aberací provedena opakovaně dva a vícekrát, s minimálním časovým odstupem 5 měsíců, což byl nejkratší interval detekce nové aberace. U 63 nemocných (65 %) byly chromosomové aberace nalezeny při prvním vyšetření. Klonální vývoj (KV) byl prokázán u 25 nemocných (26 %), nejčastější nově detekovaná aberace byla delece 13q14.3 (monoalelická i bialelická, celkem 16 nemocných). Neproklázali jsme statisticky významnou závislost mezi souhrnným klonálním vývojem a jednotlivými prognostickými parametry s výjimkou těch nemocných, u nichž byly detekovány všechny tři sledované faktory spojené s negativní prognózou. U nemocných s mutovaným stavem *IgVH* genů jsme v klonálním vývoji (kromě jednoho nemocného) vždy proklázali přítomnost aberace s příznivou prognózou (monoalelická/bialelická delece 13q14.3).

V dalším postupu jsme rozšířili soubor na celkem 292 nemocných a podle zisku dané aberace jsme hodnotili každou kategorii KV zvlášť. U 79/292 pacientů (27 %) jsme zaznamenali klonální vývoj (KV), medián doby do KV byl 35 měsíců. Kombinace sledovaných nálezů z CLL FISH panelu – monoalelická a bialelická delece 13q14, trisomie 12, delece *ATM* a delece *TP53* - byla zaznamenávána podle hierarchického modelu.

Pro statistické analýzy jsme nově zavedli pojem FISH stabilní přežití (FSS), který vystihuje dynamiku CLL klonu (tj. KV). FSS jsme tedy definovali jako 1) celkové přežití podle vstupní FISH, pokud nedošlo ke KV, přičemž bod 0 na časové ose bylo datum vstupní FISH a konec určovalo buď datum ukončení sledování, nebo datum úmrtí, 2) při KV byla časovým bodem 0 poslední zachycená změna, konec byl definován stejně jako v bodu 1.

KV jsme hodnotili jak souhrnně, tak odděleně pro jednotlivé aberace. Pro zhodnocení vlivu chemoterapie na selekci preexistujících, obtížně detekovatelných klonů s *TP53* delecí, jsme testovali také vliv terapie.

4.2.1. Závislost KV na sledovaných parametrech

K zisku trisomie 12 došlo v našem souboru pouze dvakrát, proto výsledky považujeme za nehodnotitelné. Deleci 13q14.3 získalo v průběhu onemocnění 38/292 pacientů a ze všech proměnných závisel zisk delece 13q14.3 pouze na době sledování, stejně jako v případě zisku delece genu *ATM* (23 nemocných). K zisku delece genu *TP53* došlo v hodnoceném souboru u

16 pacientů. KV *TP53* nezávisí na jediném parametru, a to na době CG sledování. Statisticky významně však závisí na všech negativních prognostických faktorech – na CD38 a ZAP-70 pozitivitě, na nemutovaném stavu *IgVH*, a také na předchozí chemoterapii.

4.2.2. Vliv KV na celkové přežití

Statisticky významný rozdíl v přežívání podle FSS byl prokázán u pacientů s detekovanou delecí *TP53* ve vstupní FISH (n=17, medián přežití 65 měsíců), kteří žili déle než ti, co delecí *TP53* získali v průběhu nemoci (n=16, medián přežití 26 měsíců). U zisku delece 13q14.3 a delece *ATM* nebyl podle doby detekce aberace (ve vstupní versus následné FISH) tento rozdíl prokázán.

V multivariantní analýze byly jako významné negativní prediktory délky FSS v prvním vícerozměrném modelu identifikovány KV, nemutované *IgVH*, terapie a delece genu *TP53* (17p13.1) ve FISH podle KV. CD38 a ZAP-70 pozitivita nebyla statisticky významná.

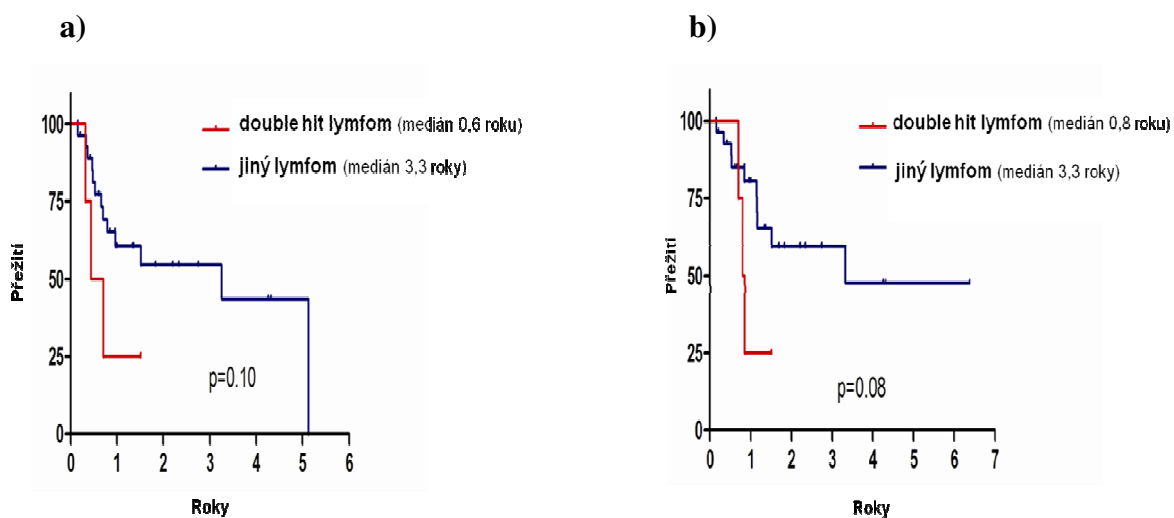
4.3. Význam délky telomér u CLL

U MDS, MM a akutní myeloidní leukémie byla v literatuře popsána souvislost mezi počtem genetických aberací a délkou telomér ve smyslu čím více aberací, tím kratší teloméry (Wu K.D. *et al.*, 2003; Swiggers S.J. *et al.*, 2006; Siegllová Z. *et al.*, 2004). Jen několik studií na toto téma se věnuje CLL. Zatímco Roos G. *et al.* (2008) popsali u 152 nemocných statisticky významnou korelaci krátkých telomér a delece 11q/17p (a naopak dlouhých telomér u delece 13q), jiná práce asociaci krátkých telomér a nepříznivého cytogenetického nálezu neprokázala (Ricca I. *et al.*, 2007). Ve studii publikované v roce 2010 (Březinová J. *et al.*, 2010) jsme se proto rovněž zabývali vztahem délky telomér a prognostických faktorů u nemocných s CLL. Metodou Terminal Repeat Fragment (TRF) jsme stanovili délku telomér v souboru 66 nemocných s CLL bez předchozí léčby a vyhodnotili jsme závislost mezi délkou telomér a ostatními prognostickými parametry – chromosomovými aberacemi, telomerázovou aktivitou, mutačním stavem *IgVH* genů, expresí ZAP-70 a CD38. Zkrácené teloméry jsme detekovali u pacientů s nemutovaným stavem *IgVH* (p=0,01), ZAP-70 pozitivních (p=0,01), CD38 pozitivních (p=0,05) a rovněž u pacientů s pozitivní telomerázovou aktivitou (p=0,05). Chromosomové aberace byly přítomny u 48 nemocných (73 %), ale statistický významný rozdíl v délce telomér mezi jednotlivými skupinami nebyl prokázán.

4.4. Význam cytogenetických analýz u NHL

V recentně publikované kazuistice (Sarova I. *et al.*, 2014) jsme popsali komplexní karyotyp nemocného s Burkittovým lymfomem/leukémií (BL) s translokací t(2;8)(p12;q24) (*IgLκ/MYC*), zahrnující dva vzácné cytogenetické jevy – chromotripsis a jumping-like translokaci. Chromotripsis a chromoanasyntesa (rozpad a znovu-seskupení chromosomu nebo jeho částí) je hypotetické vysvětlení vzniku komplexních přestaveb, ke kterému došlo při jediné katastrofické události (Stephens P.J. *et al.*, 2011; Liu G. *et al.*, 2014). Jumping translokace (JT) jsou nebalancované chromosomové přestavby, při kterých je stejná část donorového chromosomu translokována na dva a více různých recipientních chromosomů v různých buňkách u stejného nemocného. Obvykle vede k duplikaci donorového chromosomového segmentu a částečné delecii recipientního chromosomu (Jamet D. *et al.*, 2005). V tomto případě šlo zaprvé o chromotripsis chromosomu 15, maskovanou zdánlivě balancovanou reciprokou translokací t(11;15)(p11.2;q21). Druhou změnou je zvláštní typ jumping translokace, tzv. jumping translokace „naruby“, postihující dlouhé rameno chromosomu 13 (recipient) a množství různých donorových chromosomových segmentů. Vzhledem k přítomnosti translokace t(11;15)(p11.2;q21) ve všech vyšetřovaných mitosách předpokládáme, že chromotripsis vznikla v časném stádiu onemocnění a mohla tak zásadně přispět k leukemické transformaci Burkittova lymfomu. Jumping translokace „naruby“, přítomná pouze v některých vyšetřovaných mitosách, velmi pravděpodobně svědčí o prohlubování progresu nemoci.

Zabýváme se rovněž detekcí vysoce agresivních, vzácných double hit lymfomů – podle klasifikace WHO 2008 spadajících do kategorie „Neklasifikovatelný B-lymfom, se znaky mezi DLBCL a Burkittovým lymfomem“ a nesoucích translokaci *MYC* genu společně s translokací genu *BCL2* nebo translokací genu *BCL6*. Celkem bylo vyšetřeno 33 nemocných s podezřením na double hit lymfom a diagnózou difúzního velkobuněčného lymfomu (DLBCL) nebo lymfomu s rysy DLBCL a Burkittova lymfomu (BL). Double hit lymfom byl prokázán ve 4 případech. V souboru pacientů nebyly nalezeny významné klinické rozdíly, kromě bulky adenopatie (tumor větší než 10 cm), přítomné u všech nemocných s double hit lymfomem. Rozdíly ve standardních parametrech přežívání - přežití bez progresu (PFS) a celkového přežití (OS) jsou patrné z křivek na **obrázku 1**. Rozdíly byly statisticky hraničně významné vzhledem k malému počtu hodnocení.



Obrázek 1a) analýza PFS, **b)** analýza OS.

V současné době provádíme vyšetření dalších nemocných a nemocných s folikulárními lymfomy. Optimalizace léčby je předmětem výzkumu.

U NHL se dále věnujeme diagnóze lymfomu z buněk pláště (MCL), který podobně jako CLL, klinicky probíhá značně heterogenně. Metodou FISH v interfázních jádrech vyšetřujeme každého nemocného na přítomnost rekurentních diagnostických a potenciálně prognostických aberací sondami detekujícími translokaci $t(11;14)(q13;q32)$ (jež vede k overexpresi cyklinu D1 přemístěním genu *CCND1* pod vliv promotoru *IgH* genu), delecí *ATM* a *TP53* genu, a delecí genu pro cyklin-dependentní kinázu 2a (*CDKN2A*). Tímto panelem sond jsme již vyšetřili 95 pacientů s MCL a výsledky zpracováváme.

5. Závěry

V hodnoceném souboru nemocných s CLL bylo celkové přežití shodně s literaturou ovlivněno negativně delecí *ATM* a *TP53*, a naopak příznivě delecí oblasti 13q14. Prokázali jsme, že zatímco delece *IgVH* je průvodní jevem monoklonality a nemá vliv na pacientovu prognózu, translokace *IgH* genu zásadně závisí na druhém translokačním genu. Po vyloučení diagnostických translokací lze říci, že translokace genu *IgH* se u CLL vyskytují vzácně.

Potvrdili jsme, že nálezy FISH z PK i KD mají u CLL relevantní vypovídající hodnotou a poskytují prognosticky důležité informace.

Zabývali jsme se také významem vývoje klonu u CLL. Hodnocením každé kategorie KV zvlášť jsme došli k výsledkům závislosti KV na sledovaných parametrech a významu pro celkové přežití. Zisk delece 13q14.3 a *ATM* v rámci KV souvisí pouze s dobou trvání choroby, ve smyslu čím déle pacient žije s CLL, tím má větší pravděpodobnost zisku těchto aberací, avšak na jeho přežití tyto dva typy KV dopad nemají. U zisku delece genu *TP53* v rámci KV je situace opačná. Tato kategorie KV závisí jak na negativních prognostických faktorech (nemutovaný status *IgVH*, CD38 a ZAP-70 pozitivita), tak na předchozí léčbě a znamená pro pacienta špatnou prognózu. V multivariantní analýze jsme prognostický vliv zisku delece *TP53* potvrdili.

Významnou souvislost délky telomér s cytogenetickými aberacemi jsme u nemocných s CLL neprokázali. Kratší teloméry byly detekovány u nemocných s negativními prognostickými ukazateli.

Nezastupitelnost molekulárně cytogenetických metod (zejména FISH) v diferenciální diagnostice a v prognostice NHL byla dokumentována - vzhledem k provázanosti problematiky, v celé práci. Zavedením metodiky FISH na histologických řezech v parafinu jsme zpřístupnili FISH analýzy všem typům biologického materiálu včetně archivních vzorků.

6. Použitá literatura

1. Anon. A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma (1997): The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *Blood*, 89(11):3909-18.
2. Anon. National Cancer Institute sponsored study of classifications of non-Hodgkin's lymphomas: summary and description of a working formulation for clinical usage (1982): The Non-Hodgkin's Lymphoma Pathologic Classification Project. *Cancer*, 49(10):2112-35.
3. Bazargan A, Tam CS, Keating MJ (2012): Predicting survival in chronic lymphocytic leukemia. *Expert Rev Anticancer Ther*, 12(3):393-403.
4. Berková A, Pavlišťová L, Babická L, Houšková L, Tajtlová J, Baláži P, Cmunt E, Schwarz J, Karban J, Trněný M, Březinová J, Zemanová Z, Michalová K (2008): Combined molecular biological and molecular cytogenetic analysis of genomic changes in 146 patients with B-CLL. *Neoplasma*, 55(5):400-8.
5. Berková A, Zemanová Z, Trněný M, Schwarz J, Karban J, Cmunt E, Pavlišťová L, Březinová J, Michalová K (2009): Clonal evolution in chronic lymphocytic leukemia studied by interphase fluorescence in-situ hybridization. *Neoplasma*, 56(5):455-8.
6. Březinová J, Berková A, Včelíková S, Zemanová Z, Izáková S, Šárová I, Čechová H, Tajtlová J, Grosová L, Lizcová L, Malinová E, Zemanová M, Cmunt E, Karban J, Trněný M, Schwarz J, Michalová K (2010): Telomere length, molecular cytogenetic findings, and immunophenotypic features in previously untreated patients with B-chronic lymphocytic leukemia. *Neoplasma*, 57(3):215-21.
7. Dighiero G, Travade P, Chevret S, Fenaux P, Chastang C, Binet JL (1991): B-cell chronic lymphocytic leukemia: present status and future directions. French Cooperative Group on CLL. *Blood*, 78(8):1901-14.
8. Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Kröber A, Bullinger L, Döhner K, Bentz M, Lichter P (2000): Genomic Aberrations and Survival in Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med*, 343(26):1910-6.
9. Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK (1999): Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 94(6):1848-54.
10. Hamblin TJ, Orchard JA, Ibbotson RE, Davis Z, Thomas PW, Stevenson FK, Oscier DG (2002): CD38 expression and immunoglobulin variable region mutations are independent prognostic variables in chronic lymphocytic leukemia, but CD38 expression may vary during the course of the disease. *Blood*, 99(3):1023-9.
11. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman (Eds.) (2001): WHO Classification of Tumours: Pathology & Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. IARC Press: Lyon
12. Jamet D, Marzin Y, Douet-Guilbert N, Morel F, Le Bris MJ, Herry A, Banzakour S, Bourquard P, Morice P, Abgrall JF, Berthou C, De Braekeleer M (2005): Jumping translocations in multiple myeloma. *Cancer Genet Cytogenet*, 161(2):159-63.
13. Liu G, Stevens JB, Horne SD, Abdallah BY, Ye KJ, Bremer SW, Ye CJ, Chen DJ, Heng HH (2014): Genome chaos: survival strategy during crisis. *Cell Cycle*, 13(4):528-37.

14. Pytlík R, Berková A, Ptáčník V (2013): Moderní diagnostika a léčba ne Hodgkinských lymfomů. *Interní Med*, 15(3–4):105–109.
15. Rozman C, Montserrat E (1995): Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*, 333(16):1052-7.
16. Sarova I, Brezinova J, Lhotska H, Berkova A, Ransdorfova S, Zemanova Z, Soukupova J, Michalova K (2014): Jumping-like translocation-a rare chromosomal rearrangement in a patient with Burkitt lymphoma/leukemia. *Cancer Genet*, 207(5):221-5.
17. Sieglová Z, Zilovcová S, Cermák J, Ríhová H, Brezinová D, Dvoráková R, Marková M, Maaloufová J, Sajdová J, Brezinová J, Zemanová Z, Michalová K (2004): Dynamics of telomere erosion and its association with genome instability in myelodysplastic syndromes (MDS) and acute myelogenous leukemia arising from MDS: a marker of disease prognosis? *Leuk Res*, 28(10):1013-21.
18. Stephens PJ, Greenman CD, Fu B, Yang F, Bignell GR, Mudie LJ, Pleasance ED, Lau KW, Beare D, Stebbings LA, McLaren S, Lin ML, McBride DJ, Varela I, Nik-Zainal S, Leroy C, Jia M, Menzies A, Butler AP, Teague JW, Quail MA, Burton J, Swerdlow H, Carter NP, Morsberger LA, Jacobuzio-Donahue C, Follows GA, Green AR, Flanagan AM, Stratton MR, Futreal PA, Campbell PJ (2011): Massive genomic rearrangement acquired in a single catastrophic event during cancer development. *Cell*, 144(1):27-40.
19. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW (Eds.) (2008): WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. IARC, Lyon
20. Swiggers SJ, Kuijpers MA, de Cort MJ, Beverloo HB, Zijlmans JM (2006): Critically short telomeres in acute myeloid leukemia with loss or gain of parts of chromosomes. *Genes Chromosomes Cancer*, 45(3):247-56.
21. Trnėny M, Obrtlíkova P, Schwarz J, Pavlík T, Muzík J, Dusek L (2011): Improving Survival in Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia - Population Based Study. *Blood*, 118(21):1230-1230.
22. Trnėný M, Vášova I, Pytlík R, Belada D, Jankovská M, Kubáčeková K, Šalkova J, Koleškova E, Hofmanova Ž, Hrabětova Š, Kajaba V, Sykorova A, Pirnos J, Přebilova J, Švecova J, Čiberova J, Bolomská I, Skacelíkova E, Brejcha M, Adamova D (2007): Distribuce podtypů non-Hodgkinského lymfomu v České republice a jejich přežití. *Klinická onkologie*, 20(5):341-348.
23. Wu KD, Orme LM, Shaughnessy J Jr, Jacobson J, Barlogie B, Moore MA (2003): Telomerase and telomere length in multiple myeloma: correlations with disease heterogeneity, cytogenetic status, and overall survival. *Blood*, 101(12):4982-9.

7. Publikace

Publikace přímo související s tématem disertační práce

Berková A, Pavlišťová L, Babická L, Houšková L, Tajtlová J, Baláži P, Cmunt E, Schwarz J, Karban J, Trněný M, Březinová J, Zemanová Z, Michalová K: Combined molecular biological and molecular cytogenetic analysis of genomic changes in 146 patients with B-CLL.

Neoplasma 2008;55(5):400-8. **IF 1.179**

Berková A, Zemanová Z, Trněný M, Schwarz J, Karban J, Cmunt E, Pavlišťová L, Březinová J, Michalová K: Clonal evolution in chronic lymphocytic leukemia studied by interphase fluorescence in-situ hybridization.

Neoplasma 2009;56(5):455-8. **IF 1.192**

Berková A, Michalová K. Cytogenetika u CLL. Kapitola v Suplementu o CLL – Projekt CELL a České skupiny pro CLL.

Transfuzie a hematologie dnes 2010;16(s1):52-5.

Březinová J, Berková A, Včelíková S, Zemanová Z, Izáková S, Šárová I, Čechová H, Tajtlová J, Grosová L, Lizcová L, Malinová E, Zemanová M, Cmunt E, Karban J, Trněný M, Schwarz J, Michalová K: Telomere length, molecular cytogenetic findings, and immunophenotypic features in previously untreated patients with B-chronic lymphocytic leukemia.

Neoplasma 2010;57(3):215-21. **IF 1.449**

Gančarčíková M, Zemanová Z, Březinová J, Včelíková S, Berková A, Šmigová J, Michalová K: The role of telomeres and telomerase complex in haematological neoplasia: The length of telomeres as a marker of carcinogenesis and prognosis of disease.

Prague Medical Report 2010;111(2):91-105.

Vargova K, Curik N, Burda P, Basova P, Kulvait V, Pospisil V, Savvulidi F, Kokavec J, Necas E, Berkova A, Obrtlíkova P, Karban J, Mraz M, Pospisilova S, Mayer J, Trneny M, Zavadil J, Stopka T: MYB transcriptionally regulates the miR-155 host gene in chronic lymphocytic leukemia. Blood 2011;117(14):3816-25. **IF 10.558**

Pytlík R, Berková A, Ptáčník V: Moderní diagnostika a léčba ne Hodgkinských lymfomů. Interní Med 2013;15(3-4):105-9.

Sarova I, Brezinova J, Lhotska H, Berkova A, Ransdorfova S, Zemanova Z, Soukupova J, Michalova K: Jumping-like translocation-a rare chromosomal rearrangement in a patient with Burkitt lymphoma/leukemia.

Cancer Genet 2014; 207(5):221-5. **IF13 2.417**

Pytlík R, Belada D, Kubáčková K, Vášová I, Kozák T, Pirnos J, Bolomská I, Matuška M, Přibyllová J, Campr V, Burešová L, Sýkorová A, Berková A, Klener P, Trněný M: Treatment of high-risk aggressive B-cell non-Hodgkin lymphomas with rituximab, intensive induction and high-dose consolidation: long-term analysis of the R-MegaCHOP-ESHAP-BEAM Trial. Leuk Lymphoma 2014 [Epub ahead of print] **IF13 2.605**

Publikace bez vztahu k tématu disertace

Berková A, Dundr P, Povýšil C, Melčáková S, Tvrdík D: A comparison of RT-PCR and FISH techniques in molecular diagnosis of Ewing's sarcoma in paraffin-embedded tissue. *Cesk Patol.* 2008;44(3):67-70.

Šárová I, Březinová J, Zemanová Z, Lizcová L, Berková A, Izáková S, Malinová E, Fuchs O, Kostečka A, Provazníková D, Filkuková J, Maaloufová J, Starý J, Michalová K: A partial nontandem duplication of the MLL gene in four patients with acute myeloid leukemia. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 2009;195(2):150-6. **IF 1.537**

Dundr P, Fischerová D, Povýšil C, Berková A, Bauerová L, Cibula D: Uterine Tumors with Neuroectodermal Differentiation. A Report of 4 Cases. *Pathol Oncol Res* 2010 Dec;16(4):601-8. **IF 1.483**

Šárová I, Březinová J, Zemanová Z, Izáková S, Lizcová L, Malinová E, Berková A, Čermák J, Maaloufová J, Nováková L, Michalová K: Cytogenetic manifestation of the chromosome 11 duplication/amplification in acute myeloid leukemia. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 2010;199(2):121-7. **IF 1.551**

Bystřická D, Zemanová Z, Březinová J, Gančarčíková M, Grosová L, Šárová I, Izáková S, Berková A, Michalová K: The assessment of array comparative hybridization in complex karyotype analyses. *FOLIA BIOLOGICA* 2010;56(5):223-30. **IF 0.729**

Tvrđik D, Skalova H, Dundr P, Povysil C, Velenska Z, Berkova A, Stanek L, Petruzelka L: Apoptosis - associated genes and their role in predicting responses to neoadjuvant breast cancer treatment. *Med Sci Monit* 2012;18(1):BR60-67. **IF 1.358**

Pavlistova L, Zemanova Z, Sarova I, Lhotska H, Berkova A, Spicka I, Michalova K: Change in ploidy status from hyperdiploidy to near-tetraploidy in multiple myeloma associated with bortezomib/lenalidomid resistance. *Cancer Genet* 2014 [In press] **IF13 2.417**