

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2012

Zuzana Staníčková

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie a genetiky



**Cytogenetika a molekulární cytogenetika akutních
myeloidních leukemií**

Bakalářská práce

Zuzana Staničková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2012

Vedoucí práce: Prof. RNDr. Mgr. Marie Jarošová, CSc.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně v průběhu bakalářského studia pod vedením Prof. RNDr. Mgr. Marie Jarošové, CSc. s použitím uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci dne 23.4.2012

.....

Souhrn

Akutní myeloidní leukemie (AML) jsou hematologická nádorová onemocnění, která jsou výsledkem kumulace mutací v hematopoetické kmenové buňce. Vzniklé mutace způsobují zástavu diferenciaci, zvýšené přežití a proliferaci buněk, což vede ke vzniku leukemického klonu.

Jednoznačná příčina vzniku akutních myeloidních leukemií není dosud známa, ale jsou studovány faktory, podílející se na jejím vzniku. Diagnostika akutních leukemií se opírá kromě klinických nálezů také o nálezy cytogenetické a molekulárně genetické.

Některé typy AML jsou charakterizovány přítomností specifických a nenáhodných chromosomových změn. Tyto chromosomové změny jsou diagnostickým a prognostickým markrem a slouží ke sledování úspěšnosti léčby pacienta.

Práce shrnuje současné literární poznatky o diagnostice a prognostické klasifikaci vybraných typů AML, na které navazují praktické laboratorní zkušenosti s klasickou cytogenetikou a metodou fluorescenční *in situ* hybridizace na vzorcích pacientů.

Summary

Acute myeloid leukemia (AML) is hematological malignancies that results from accumulation of mutations in hematopoietic stem cell. The resulting mutations cause arrest of differentiation increased survival and proliferation of cells, leading to the emergence of leukemic clone.

A clear cause of acute myeloid leukemia is not known yet, but there are studied factors involved in pathogenesis of leukemia. Diagnosis of acute leukemia is based not only on the clinical findings but on findings of cytogenetics and molecular genetics as well.

Some types of AML are characterized by the presence of specific chromosomal and non-random chromosomal changes. These chromosomal changes are a diagnostic and prognostic marker and are used to monitor the patient's treatment success.

The thesis summarizes the current literature findings on the diagnosis and prognostic classification of selected types of AML and on practical laboratory experiences with conventinal cytogenetics and the method of fluorescence *in situ* hybridization on patients samples.

Poděkování

Ráda bych tímto poděkovala vedoucí mé bakalářské práce Prof. RNDr. Mgr. Marii Jarošové, CSc., za její trpělivost i čas, který mi během psaní věnovala, za její odbornou pomoc, věcné připomínky a motivaci pro mé další studium. Také bych chtěla poděkovat RNDr. Mileně Holzerové, Ph.D. za její pomoc v řešení praktické části a kolegům v laboratoři cytogenetiky za jejich cenné rady.

Obsah

1	Úvod	9
2	Cíle práce	10
3	Současný stav řešené problematiky	11
3.1	Hematopoéza	11
3.2	Leukemie	14
3.3	WHO klasifikace.....	15
3.4	Přehled vybraných typů AML	16
3.4.1	Akutní myeloidní leukemie s t(8;21) a fúzí genů <i>RUNX1-RUNX1T</i>	16
3.4.2	Akutní leukemie s inv(16) nebo t(16;16) a fúzí genu <i>CBFβ-MYH11</i>	18
3.4.3	Akutní promyelocytární leukemie s t(15;17)(q22;q21) a fúzí genu <i>PML/RARα</i>	20
3.4.4	Akutní myeloidní leukemie se změnami genu <i>MLL</i>	22
3.4.5	Akutní myeloidní leukemie s t(6;9) a fúzí genu <i>DEK/NUP214</i>	25
3.4.6	Akutní myeloidní leukemie s inv(3) nebo t(3;3) a fúzí genu <i>RPNI-EVII</i>	26
3.5	Cytogenetika nádorů	27
3.5.1	Chromosomové změny	29
3.6	Cytogenetické metody	34
3.6.1	Klasická cytogenetika.....	34
3.6.2	Molekulární cytogenetika	36
4	Materiál a metody	38
4.1	Materiál.....	38

4.1.1	Biologický materiál	38
4.1.2	Použité chemikálie.....	38
4.1.3	Použité roztoky	39
4.1.4	Laboratorní přístroje a pomůcky	40
4.1.5	Laboratorní sklo.....	41
4.1.6	Spotřební materiál	42
4.2	Metody	42
4.2.1	Kultivace buněk kostní dřeně (KD) pro cytogenetické a molekulárně - cytogenetické vyšetření	42
4.2.2	Zpracování BM pro cytogenetické a molekulárně-cytogenetické vyšetření	44
4.2.3	Příprava a barvení cytogenetických preparátů, G-pruhováním a karyotypování.....	45
4.2.4	FISH s celochromosomovými sondami Cambio nebo <i>MetaSystems</i>	46
4.2.5	FISH s lokus specifickými (LSI) a centromerickými (CEP) sondami Abbott	48
5	Výsledky.....	49
6	Diskuse	52
7	Závěr.....	53
8	Seznam použitých zkratk a symbolů	54
9	Použitá literatura.....	56

1 Úvod

Rakovina je onemocnění, při kterém dochází k nekontrolovatelnému růstu buněk. Existuje více než 100 různých typů nádorů. Jednu skupinu nádorových onemocnění tvoří hematologické malignity, z nichž jednou podskupinou jsou leukemie.

Leukemie je nádorové onemocnění krvetvorných buněk, které je spojeno s proliferací buněk, které se vymkly kontrole růstu a vyzrání (Mayer a kol., 2002). Leukemie dělíme na akutní a chronické. Akutní leukemie představují heterogenní skupinu zhoubných onemocnění krvetvorby, která vzniká maligní transformací hematopoetické kmenové buňky. Jedná se o vícestupňový proces, při kterém může být zahájena transformace jedné, ale nejvýše několika hematopoetických kmenových buněk. Defektem patologické buněčné populace je maturační a diferenační porucha a zvýšená proliferační aktivita.

Příčina vzniku akutní leukemie není dosud známa, má pravděpodobně komplexní povahu a na vzniku této malignity se podílejí vnitřní (reparační schopnost DNA, imunitní mechanismy) i vnější (viry, ionizační záření, kancerogeny) faktory.

Pojem leukémie použil jako první v roce 1849 Virchow, který ji označoval „bílou krví“ a popsal poprvé jako samostatné onemocnění (Mayer a kol., 2002). Postupné poznání zákonitostí krvetvorby člověka a onemocnění s ní spojených rozdělila velkou skupinu leukémií na chronické a akutní, myeloidní a lymfoidní. Předmětem mé bakalářské práce jsou akutní myeloidní leukemie.

Akutní myeloidní leukemie (AML) představuje heterogenní skupinu maligních nemocí krvetvorby, pro něž je charakteristická proliferace a akumulace nezralých myeloidních hematopoetických buněk v kostní dřeni a jejich následné vyplavování do periferní krve.

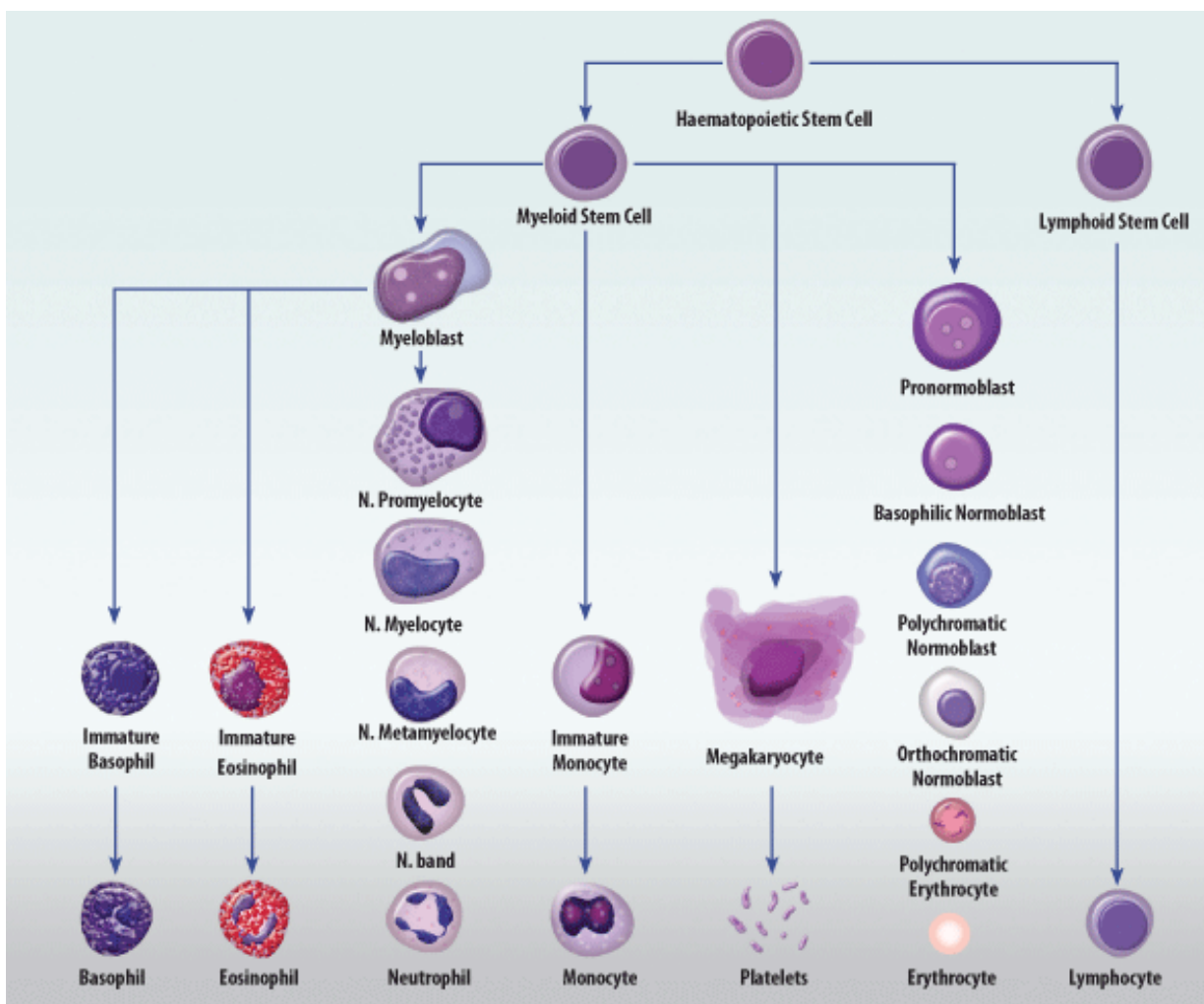
2 Cíle práce

1. Vypracování rešerše o současném stavu problematiky vybraných akutních myeloidních leukemií (AML).
2. Práce v laboratoři cytogenetiky a molekulární cytogenetiky, sestavování karyotypů a použití metody FISH.

3 Současný stav řešené problematiky

3.1 Hematopoéza

Hematopoéza (krvetvorba) znamená proces, při kterém se hematopoetická kmenová buňka diferencuje do mnoha typů hematopoetických buněk (Obr. 1).



Obr. 1 Hematopoéza.

Převzato z http://www.bpac.org.nz/resources/campaign/cbc/cbc_poem.asp?page=2

Normální krvetvorba je charakterizována určitou stálostí buněčných systémů (určitá část buněk zaniká a určitá část se jich tvoří) a je to jediný vývojový proces, který probíhá po celý život člověka. Klíčovou roli v krvetvorbě hraje pluripotentní kmenová buňka.

Kmenová buňka je obecným označením pro buňku, ze které se vytváří buněčný klon - tedy skupina buněk odvozená od jediné kmenové buňky. Krvetvorba probíhá klonálním způsobem, a to tak, že z hematopoetické kmenové buňky (Hemopoetic Stem Cells – HSC) vzniká po řadě dělení a vývojových stádií buňka efektorová. Vlastní krvetvorná kmenová buňka – totipotentní kmenová buňka (tj. buňka schopná dát vznik všem krevním elementům) je definovaná svou funkcí. Její základní vlastností je schopnost sebeobnovy a pluripotence. Sebeobnova umožňuje, že při každém buněčném dělení opět vzniká nová kmenová buňka. Pluripotence je schopnost diferenciaci, tedy přeměny v jeden nebo více odvozených buněčných typů, které se mohou lišit funkčně i morfologicky (Lexová, 2000).

Proliferace a diferenciaci pluripotentní kmenové buňky vyžaduje kromě působení růstových faktorů (hormony a cytokiny) také jiné fyzikální interakce s podpůrnými stromálními buňkami a chemické interakce se sérovými faktory.

V průběhu nitroděložního života se krvetvorba plodu odlišuje od krvetvorby v poporodním období, a to místem vzniku krevních elementů a svým složením. Krvetvorba je v průběhu vývoje organismu rozdělena na tři období.

V prvním období mezoblastovém (embryonálním) se tvoří krevní elementy ve žlutkovém vaku a v oblasti aorta-gonády-mesonefros, tzv. AGM region. V období hepatolienálním (fetálním) dochází ke tvorbě krevních buněk převážně v játrech a v období medulárním krvetvorba převažuje v kostní dřeni.

Všechny krvinky v obvodové krvi mají po narození i v dospělosti jedince jedinou společnou hemopoetickou, tzv. pluripotentní, kmenovou buňku, která se v rámci hemopoézy může vyvíjet jakýmkoli směrem, tj. v mateřské buňky: červených krvinek, bílých krvinek a krevních destiček. Z kmenové pluripotentní buňky vznikají v průběhu několika prvních dělení první buňky, které jsou schopny se množit in vitro a dát vznik dlouhodobé kultuře krvetvorných buněk, tzv. LTC-IC (Long- Term Culture-Initiating Cell). Dalšími děleními a diferenciací vznikají z těchto buněk progenitorové buňky. Část kmenových buněk se podle potřeby diferencuje – vznikají progenitorové (multipotentní, unipotentní) kmenové buňky, část zachovává pool kmenových buněk.

Progenitorová kmenová buňka (Colony Forming Unit – CFU) je schopna se diferencovat do jedné nebo více krevních řad, nemá schopnost sebeobnovy a je citlivá na růstové faktory. Progenitorové buňky jsou již určené buď pro více, nebo jen jeden buněčný typ (Pecka, 2002). Rozeznáváme CFU-NM granulocyto-makrofágový progenitor, CFU-G granulocytový progenitor, CFU-M monocytový progenitor, CFU-Eo eozinofilní progenitor, CFU-Ba bazofilní progenitor, CFU-Meg progenitor pro megakaryocyty, BFU-E burst forming unit erythroid a CFU-E erytroidní progenitor.

Protože jedna kmenová buňka se může stát zdrojem všech buněčných typů krevních buněk produkovaných v potřebném množství a vzájemných poměrech, můžeme se setkat se stavy tzv. monoklonální krvetvorby. Většinou se však v těchto případech jedná o patologickou krvetvorbu. Normální krvetvorba je polyklonální, a to znamená, že v určitém stádiu časně embryogeneze vznikne paralelně několik krvetvorných kmenových buněk, od kterých se poté, po celý zbytek života, odvíjí krvetvorba. Každá z těchto kmenových buněk představuje specifický klon. Ne všechny tyto klony jsou stále aktivní při produkci funkčních krevních buněk a ne všechny klony musí nezbytně existovat po celou dobu života organismu. Početní zastoupení kmenových buněk v krvetvorné tkáni je malé, je jich méně než 0,01 %. Jejich podoba není dostatečně známa a je stále předmětem intenzivních vědeckých studií (Nečas a kol., 2009).

Krvetvorba je neustálý, plynulý a rovnoměrný děj (Pecka, 2002). V kostní dřeni je krvetvorba řízena koordinovanou expresí mnoha cytokinů, označovaných jako hematopoetické růstové faktory (hematopoetiny) (Nečas a kol., 2009). Hematopoetické růstové faktory představují skupinu glykosylovaných polypeptidů. Působením těchto růstových faktorů se zahájí diferenciaci do příslušné krvetvorné řady (Pecka, 2002). Dosud bylo popsáno několik desítek cytokinů, které se podílejí na stimulaci nebo inhibici dělení krvetvorných buněk, jejich migrace, indukce jejich diferenciaci, případně urychlení jejich funkčního vyzrání. Tyto růstové faktory jsou produkovány různými typy buněk stromatu krvetvorné tkáně. K hematopoetickým růstovým faktorům patří tzv. kolonie stimulující faktory (CSF), interleukiny, chemokiny a další. Kmenové a progenitorové buňky jsou závislé na stálé přítomnosti některých růstových faktorů, které často působí antiapopticky. Při delší absenci těchto faktorů dochází k aktivaci apoptického procesu a zániku buňky. Na druhé straně může pravděpodobně stimulace růstovým faktorem zvyšovat odolnost příslušných buněk k vyvolání apoptózy jinými faktory, např. cytostatiky (Nečas a kol., 2009).

3.2 Leukemie

Nádor definujeme jako genetické onemocnění, které je výsledkem kumulace řady genetických změn. Hematologická maligní onemocnění jsou nádory postihující krvetvorné buňky. Leukemie jsou maligní onemocnění postihující hematopoetický systém. Etiologie leukemií jednoznačně neurčila příčinu vzniku leukemií, ale jsou studovány faktory, které se na jejich vzniku mohou podílet. Patří k nim především chromosomové změny a genové mutace, genetické predispozice, ionizující záření, strava, životní styl nebo průmyslová expozice.

U leukemie převládá tvorba a hromadění leukemických buněk nad jejich zánikem. Generační čas nádorové buňky, tj. časový interval mezi dvěma mitózami, je oproti času normální buňky prodloužen.

Leukemie vzniká důsledkem nahromadění několika následných genetických mutací v genomu kmenových nebo progenitorových buněk hematopoézy. Vzniklé mutace přeměňují protoonkogeny na onkogeny, např. *PML/RAR α* , *AML1/ETO*, *CBF β /MYH11*, nebo mutace poškozují tumor supresorové geny, např. p53. Tak vytvářejí pro leukemické buňky selekční výhodu. Tato výhoda spočívá ve ztrátě schopnosti diferenciaci při zachování proliferace, ve snížení apoptózy a v nezávislosti leukemických buněk na regulačních mechanismech. Dnes už víme, že tyto změny nejsou náhodné. Jsou součástí procesu maligní transformace (Indrák a kol., 2006).

Leukemické buňky nacházíme ve zvýšené míře v kostní dřeni, periferní krvi, kde způsobují potlačení normální krvetvorby. Leukemické buňky dále infiltrují do některých, především hematopoetických orgánů, jako je slezina a játra (Pecka, 2006).

Chromosomové změny jsou integrální součástí procesu maligní transformace. Obor, který studuje chromosomové změny u nádorů, se jmenuje nádorová cytogenetika nebo onkocytogenetika.

3.3 WHO klasifikace

Pro stanovení prognózy a postupu léčby je důležitá klasifikace leukemií. Akutní myeloidní leukemie se dle starší francouzsko–americko-britské (FAB) klasifikace, založené na morfologii, dělila do 7 typů – a ty byly označeny M0 až M7 AML.

WHO (World Health Organization) klasifikace používaná od roku 2001 rozlišuje mnohem více faktorů. WHO klasifikace akutních myeloidních leukemií (AML) vychází ze všech dostupných informací klasických cytochemických a imunofenotypických znaků a je doplněna o znaky cytogenetické a molekulárně genetické (Vardiman a kol., 2009).

Tab. I Tabulka prognostické stratifikace AML zahrnující klinická, cytogenetická a molekulárně genetická data (převzato Döhner a kol., 2010).

Genetic group	Subsets
Favorable	t(8;21)(q22;q22); RUNX1-RUNX1T1 inv(16)(p13.1q22) or t(16;16)(p13.1;q22); CBFβ-MYH11 Mutated NPM1 without FLT3-ITD (normal karyotype) Mutated CEBPA (normal karyotype)
Intermediate - I	Mutated NPM1 and FLT3-ITD (normal karyotype) Wild-type NPM1 and FLT3-ITD (normal karyotype) Wild-type NPM1 without FLT3-ITD (normal karyotype)
Intermediate - II	t(9;11)(p22;q23); MLLT3-MLL Cytogenetic abnormalities not classified as favorable or adverse
Adverse	inv(3)(q21q26.2) or t(3;3)(q21;q26.2); RPN1-EVI1 t(6;9)(p23;q34); DEK-NUP214 t(v;11)(v;q23); MLL rearranged -5 or del(5q); -7; abn(17p); complex karyotype

3.4 Přehled vybraných typů AML

3.4.1 Akutní myeloidní leukemie s t(8;21) a fúzí genů *RUNX1-RUNX1T1*

Asi 5 % všech AML jsou leukemie s translokací t(8;21)(q22;q22) (Swerdlow a kol., 2008), při které vzniká fúzní gen *RUNX1-RUNX1T1* (dříve *AML1/ETO*) (Miyoshi a kol., 1995).

„Runt“, doména transkripčního faktoru *RUNX1* (*AML1*) je nezbytná pro diferenciaci hematopoetických kmenových buněk. Translokace t(8;21) generuje fúzní protein *RUNX1-RUNX1T1* (*AML1-ETO*), který funguje jako transkripční represor a inhibuje expresi genů reagujících s *AML1*. To způsobuje blok v diferenciaci hematopoetických kmenových buněk, které ve spojení s dalšími genetickými událostmi způsobují transformaci normálních buněk na buňky leukemické (Asou, 2003; Tenen, 2003).

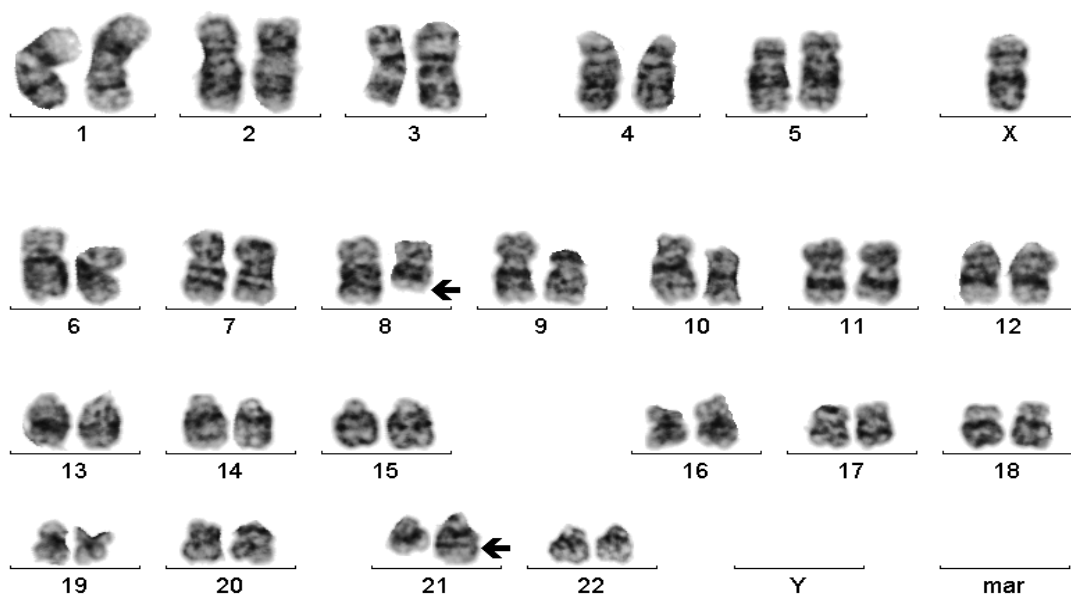
Translokace je výsledkem fúze dvou genů, fúzního proteinu N-terminální domény z genu *RUNX1* a čtyř C-terminálních domén z genu *RUNX1T1*. Tento protein má vliv na regulaci proliferace, diferenciaci a životaschopnost leukemických buněk (Reikvam a kol., 2011). Exprese fúzního proteinu *RUNX1-RUNX1T1* sama o sobě nestačí k vyvolání leukemie, ale úloha dalších genetických změn není přesně známá. *RUNX1-RUNX1T1* reguluje geny, které se účastní na opravě DNA, a zvyšuje frekvenci mutací in vivo. *RUNX1-RUNX1T1*, poškozující DNA buňky, mají aktivovanou signální dráhu p53. To má za následek zvýšení bazální apoptózy a zvýšení citlivosti agens na poškození DNA. Vzorky pacientů s t(8;21) ukazují sníženou expresi genů pro opravu DNA a zvýšenou expresi genů p53. Je možné, že *RUNX1-RUNX1T1* může usnadnit hromadění genetických změn tím, že potlačí endogenní opravu DNA (Krejci a kol., 2008).

U 90 % pacientů je t(8;21) spojena s inhibicí granulocytární diferenciaci. Nemocní s touto chromosomovou změnou jsou řazeni do skupiny s dobrou prognózou. Translokace t(8;21)(q22;q22) byla podle FAB klasifikace označována AML M2 (Tonks a kol., 2007).

Kromě primární translokace t(8;21) jsou u 15%-30% nemocných pozorovány přídavné chromosomové změny. Tyto přídavné chromosomové změny byly často považovány za změny zhoršující prognózu nemocných. Studie velkých souborů nemocných však ukázaly, že tyto změny prognózu nezhoršují (Marcucci a kol., 2009). Nejčastěji se vyskytující přídavnou chromosomovou změnou je delece dlouhých ramen chromosomu 9, del(9q) (Kuchenbauer a

kol., 2006). Deletovaná oblast zahrnuje pruhy 9q21-22, a to asi u 90 % případů (Reikvam a kol., 2011). Prognostický význam této změny nebyl potvrzený. Další nenáhodnou změnou vyskytující se společně s translokací je chybění pohlavních chromosomů. Prognostický význam výskytu této přídavné změny nebyl také prokázán (Marcucci a kol., 2009).

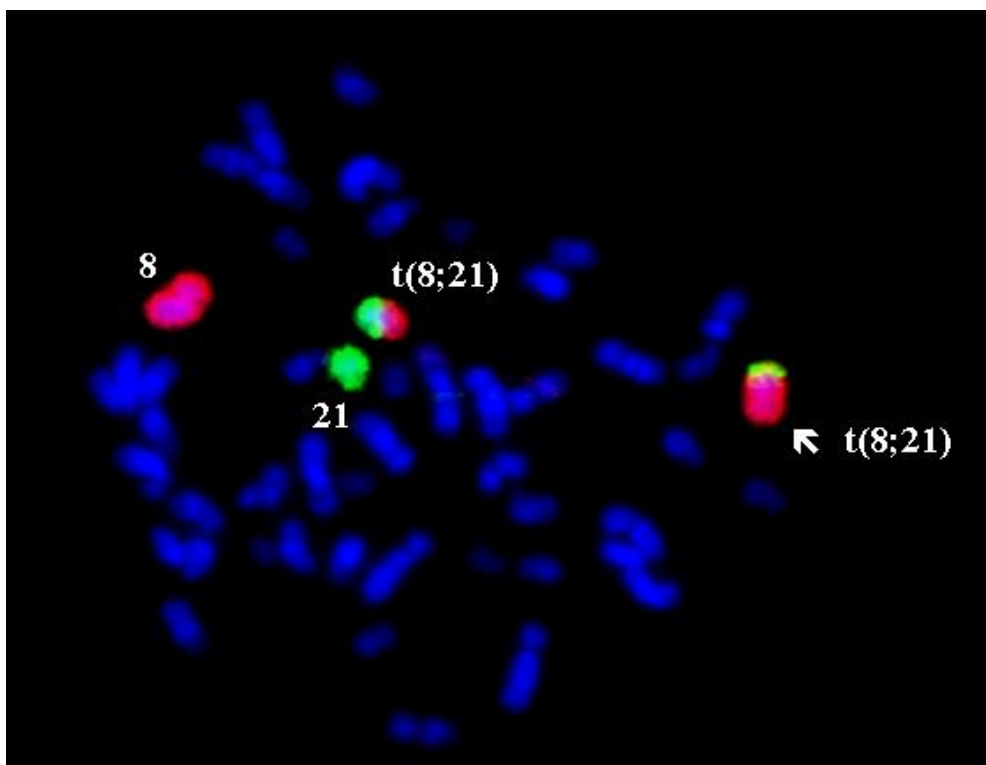
K dalším pozorovaným přídavným chromosomovým změnám patří např. trisomie chromosomu 8, monosomie chromosomu 5 nebo 7. Ani tyto změny nemají prokázanou statistickou významnost týkající se prognózy nemocných. Přesto je mezi nemocnými s t(8;21) heterogenita jak v průběhu onemocnění, tak v léčebné odpovědi. Proto se hledaly další molekulární markery, které by prognózu nemocných mohly ovlivnit. Molekulárně genetické studie prokázaly, že se ve 20-25 % případů s t(8;21) vyskytuje mutace genu KIT. A že tento nález je spojen s nepříznivou prognosou, ale nebyla to jediná nepříznivě působící mutace u těchto nemocných (Sheeja a kol., 2009). U 4% - 12% pacientů je přítomna mutace FLT3 (Boissel a kol., 2006).



Obr. 2 Karyotyp nemocného s t(8;21). Derivované chromosomy jsou označeny šipkou (karyotyp sestaven v Cytogenetické laboratoři HOK, Olomouc).

Translokace t(8;21) je určitelná klasickou cytogenetickou analýzou kostní dřeně. Fúzi genu *RUNX1-RUNX1T1* je možné potvrdit metodou polymerázové řetězové reakce (RT-PCR)

nebo molekulárně cytogenetickou metodou fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH), a to jak s celochromosomovými sondami, tak s lokusově specifickou sondou (Obr. 3). Přidatné chromosomové změny lze určit cytogeneticky nebo metodou FISH.



Obr. 3 FISH s celochromosomovou sondou chromosomu 8 (červený fluorochrom) a 21 (zelený fluorochrom) (obrázek FISH poskytl Cytogenetická laboratoř HOK, Olomouc).

3.4.2 Akutní leukemie s *inv(16)* nebo *t(16;16)* a fúzí genu *CBFβ-MYH11*

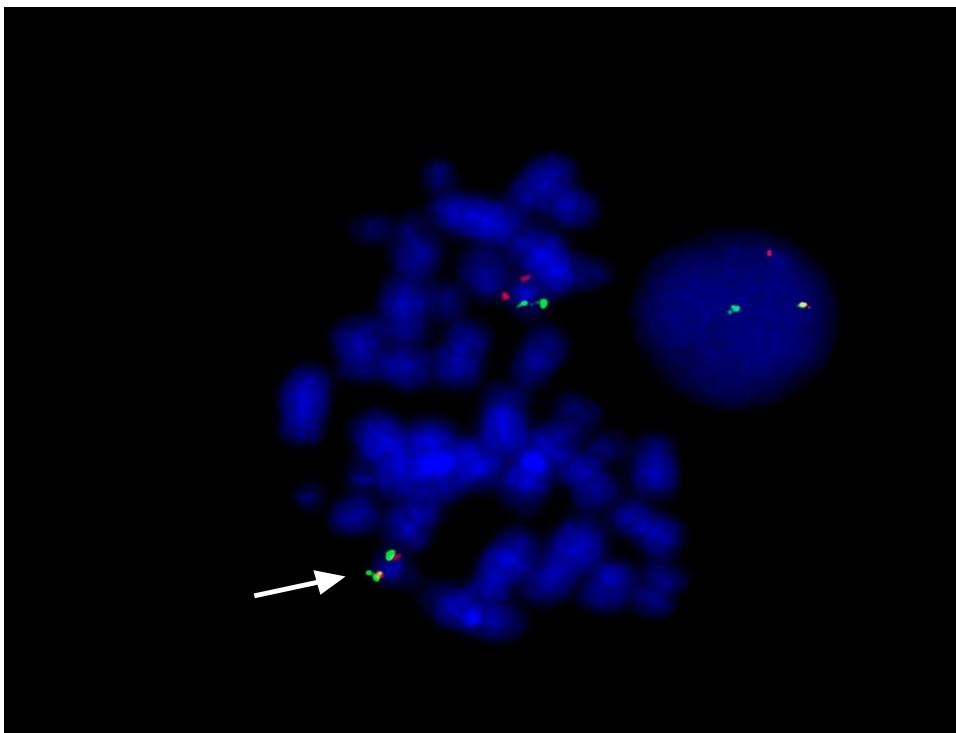
Fúzní gen *CBFβ-MYH11* (*CBF* = „core binding factor beta“, *MYH11* = „smooth muscle myosin heavy chain 11“) vzniká obvykle inverzí *inv(16)(p13q22)* nebo translokací *t(16;16)(p13q22)* (Liu a kol., 1993, Huang a kol., 2004).

Pericentrická inverze *inv(16)(p13q22)* je charakteristickou abnormalitou spojenou s AML, podtypem M4Eo podle klasifikace FAB (Liu a kol., 1993). *CBFβ* je transkripční faktor, který se přímo neváže na DNA, ale spolupracuje s DNA vazebným („DNA-binding,“) transkripčním faktorem *RUNX1*, aby zvýšil svou schopnost vázat se na DNA a regulovat transkripci (Lutterbach a kol., 1999).

Na krátkém raménku chromosomu 16 v oblasti genu *MYH11* dochází ke zlomu a na dlouhém raménku chromosomu 16 dochází k inverzi na konci kódující oblasti *CBF-beta*, známá také jako *PEBP2-beta* podjednotka heterodimerického transkripčního faktoru, regulující genovou expresi v T buňkách (Liu a kol., 1993).

Podle WHO klasifikace je AML s *inv(16)/t(16;16)*, stejně jako AML s *t(8;21)*, považována za onemocnění spojené s dobrou prognosou a jsou podle literatury také stejně léčené (Schlenk a kol., 2003). U nemocných je často pozorována pouze aberace chromosomu 16, ale pokud se vyskytnou přídatné chromosomové změny, pak se nejčastěji jedná o trisomii chromosomu 22, 8 a 21 (Marccucci a kol., 2005). Dále bylo pozorováno, že nemocní s trisomií chromosomu 22 mají poněkud lepší prognosu, protože u nich méně často docházelo k relapsu onemocnění, ve srovnání s nemocnými s pouze *inv(16)* nebo *t(16;16)*. Pro ostatní přídatné chromosomové změny nebyla potvrzena prognostická významnost.

Určení této změny je možné pomocí klasické cytogenetiky, ale v rutinní praxi tuto změnu obvykle potvrzujeme molekulárně geneticky a nebo metodou FISH (Obr. 4).



Obr. 4 FISH s lokus specifickou sondou potvrzující *inv(16)* (označeno šipkou) (obrázek FISH získán z Cytogenetické laboratoře HOK, Olomouc).

3.4.3 Akutní promyelocytární leukemie s t(15;17)(q22;q21) a fúzí genu *PML/RAR α*

Fúzní gen *PML/RAR α* je výsledkem fúze genu receptoru pro retinovou kyselinu (*RAR α*) na chromosomu 17 s tumor supresorovým genem *PML* (ProMyelotic Leukemia) na chromosomu 15. Exprimovaný protein z takto vzniklého fúzního genu *PML/RAR α* má za následek poruchu transkripce a zástavu vyzrávání myeloidních prekurzorů na úrovni promyelocytu (Indrák a kol., 2006). Tato fúze genu, spojená s reciprokou translokací t(15;17)(q22;q21), byla poprvé popsána v roce 1977. Termín akutní promyelocytární leukemie poprvé použil v roce 1957 Leif Hillestad (Bennett a kol., 1985).

Dlouhou dobu se jednalo o jednu z prognosticky nejhorších subtypů akutní leukemie. Vyšší procento kompletních remisí přineslo zařazení léku daunorubicinu, ale většina pacientů relabovala. V 80. letech 20. století došlo k revoluci léčby tohoto onemocnění díky objevu účinků retinoidů na buňky APL (Szotkowski a kol., 2008). Deriváty kyseliny retinové za normálních okolností hrají velmi důležitou roli v regulaci růstu a diferenciaci. (Mayer a kol., 2002). APL je tak první akutní leukemií, u které se docílilo necytostatické léčby právě pomocí all-trans-retinové kyseliny (ATRA) (Indrák a kol., 2006).

APL je charakterizována, včetně specifické chromosomální translokace t(15;17)(q22;q21), přítomností akumulace abnormálních promyelocytů, výskytem fibrinogenopenie a rozšířenou intravaskulární koagulací (Chen a kol., 2003; Bennett a kol., 1985).

Chromosomová změna t(15;17) je v současnosti spojena s dobrou prognosou, protože je možné dosáhnout kompletní remise u pacientů léčených all-transretinovou kyselinou.

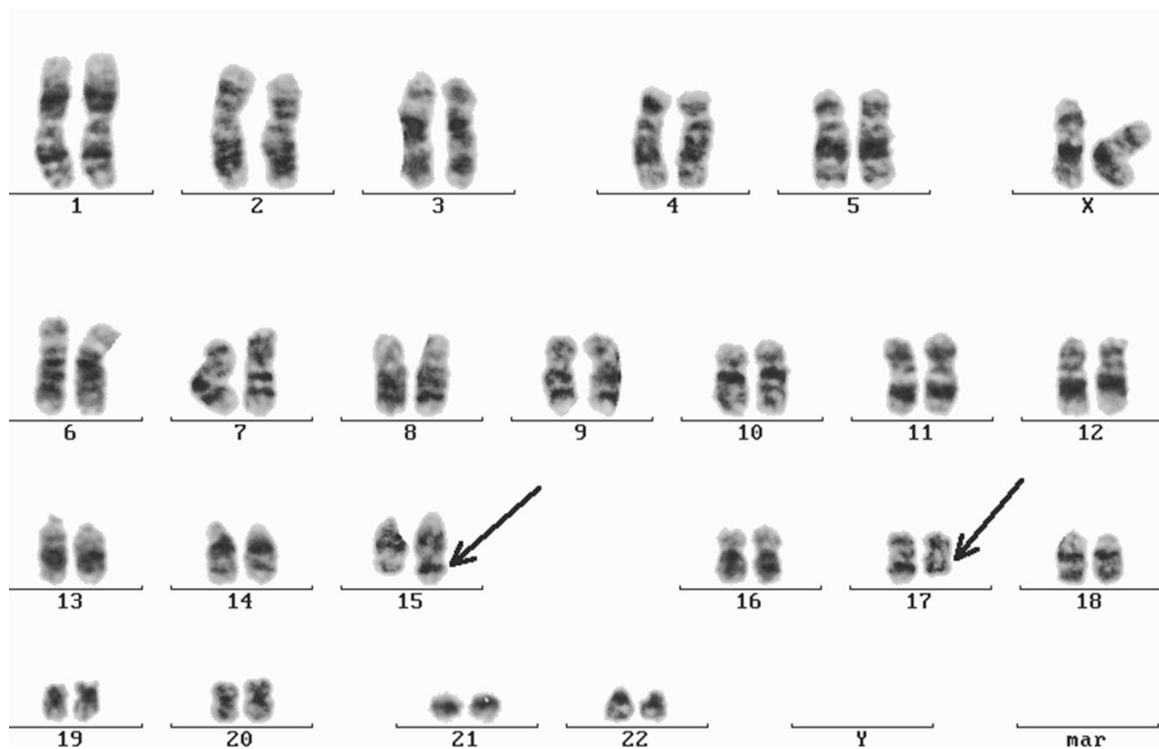
Translokace t(15;17) je určitelná klasickou cytogenetickou analýzou kostní dřeně (Obr. 5).

Fúze genu *PML/RAR α* je možné detekovat jak molekulárně genetickou metodou PCR, tak i metodou FISH (Obr. 6) (Lexová a kol., 2000).

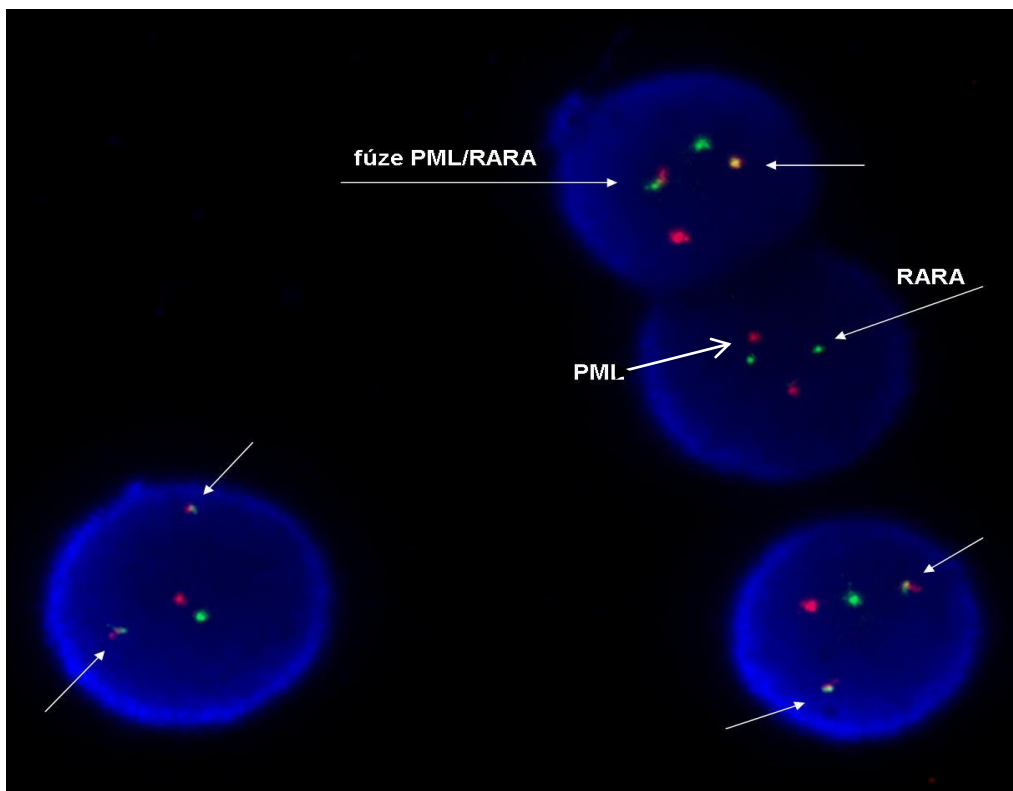
Někdy dochází ke vzniku tzv. variantních translokací a fúzi genu *RAR α* s jinými fúzními partnery než *PML*. Jedná se o translokaci t(11;17)(q23;q21) se vznikem fúzního genu *PLZF/RAR α* (Promyelotic Leukemia Zinc Finger), dále translokaci t(11;17)(q13;q21) se vznikem fúzního genu *NuMA/RAR α* (Nuclear Mitotic Apparatus protein), translokaci t(5;17)(q35;q21) se vznikem fúze *NPM/RAR α* (NucleoPhosMin), translokaci t(17;17)(q21.1;q21.2) s genem *STAT5b/RAR α* (Signal Transducer and Activator of Transcription 5b) a recentně byl popsán fúzní gen *PRKARIA/RAR α* jako výsledek translokace t(17;17)(q22;q21). Významné bylo dále zjištění, že buňky nesoucí fúzní gen *PLZF/RAR α* a

STAT5b/RAR α jsou k účinkům ATRA rezistentní. Prognosa onemocnění je tedy výrazně horší.

Přidatné chromosomové změny u APL mají nejasný význam. Ve vztahu k prognose pacientů jsou zanedbatelné (Szotkowski a kol., 2008).



Obr. 5 Karyotyp pacienta s AML s t(15;17) (karyotyp sestaven v Cytogenetické laboratoři HOK, Olomouc).



Obr. 6 FISH s lokus specifickou sondou LSI PML/RARA Dual Color, Dual Fusion Translocation Probe Abbott Molecular, spectrum green (RARA), spectrum orange (PML) (obrázek FISH získán z Cytogenetické laboratoře HOK, Olomouc).

3.4.4 Akutní myeloidní leukemie se změnami genu *MLL*

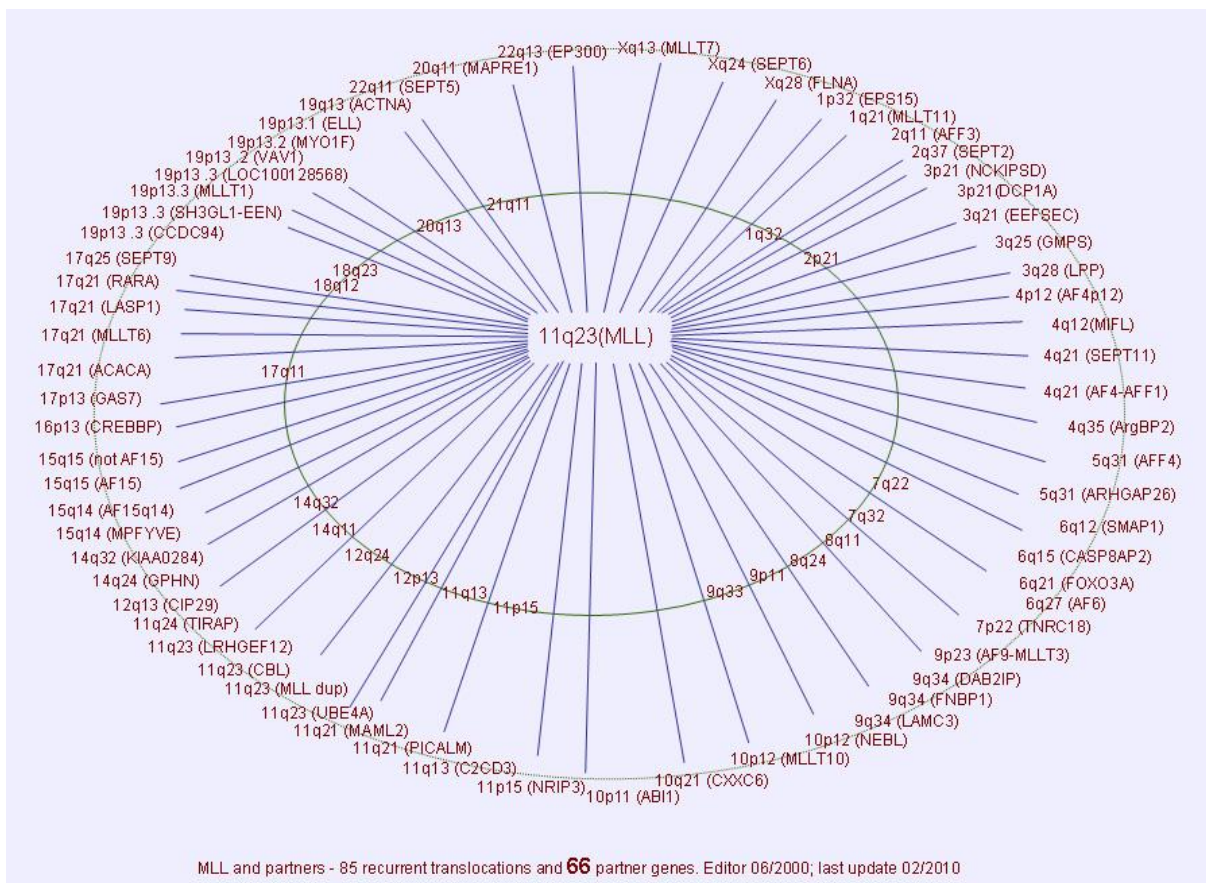
Přestavba genu *MLL* je pozorována asi u 10% akutních leukemií. Jsou to jak akutní myeloidní leukemie (AML), tak akutní lymfoblastické leukemie (ALL) i u dětí a je také pozorován u pacientů dříve léčených terapií inhibitory topoizomerázy II (Thirman a kol., 1993).

MLL (Mixed Lineage Leukemia) gen je lokalizován na 11. chromosomu v oblasti 11q23 (Ziemin-van der Poel a kol., 1991). Chromosomové aberace postihující gen *MLL* (známý také jako *HRX* nebo *ALL-1*) jsou spojovány s agresivními typy akutních leukemií. Mutace genu *MLL* je doprovázena, kromě častých translokací, i inverzí, duplikací, delecí a ve vzácných případech i genovou amplifikací (Takáčová a kol., 2007).

Reciproké translokace se vyskytují jak u AML, ALL, tak i u tzv. biofenotypické leukemie (ABL) (Krivtsov a Armstrong, 2007). Výsledkem reciproké translokace je vznik

chimerických onkoproteinů vyznačujících se vysokým transformačním potenciálem v porovnání s cytoplazmatickými partnery, u kterých N-terminální konec MLL proteinu je fúzovaný s C-terminálním koncem partnerského proteinu. Zlom v genu *MLL* nejčastěji nastává v oblasti exonu 8-14. Tato oblast se nazývá breakpoint cluster region (BCR) (Takáčová a kol., 2007).

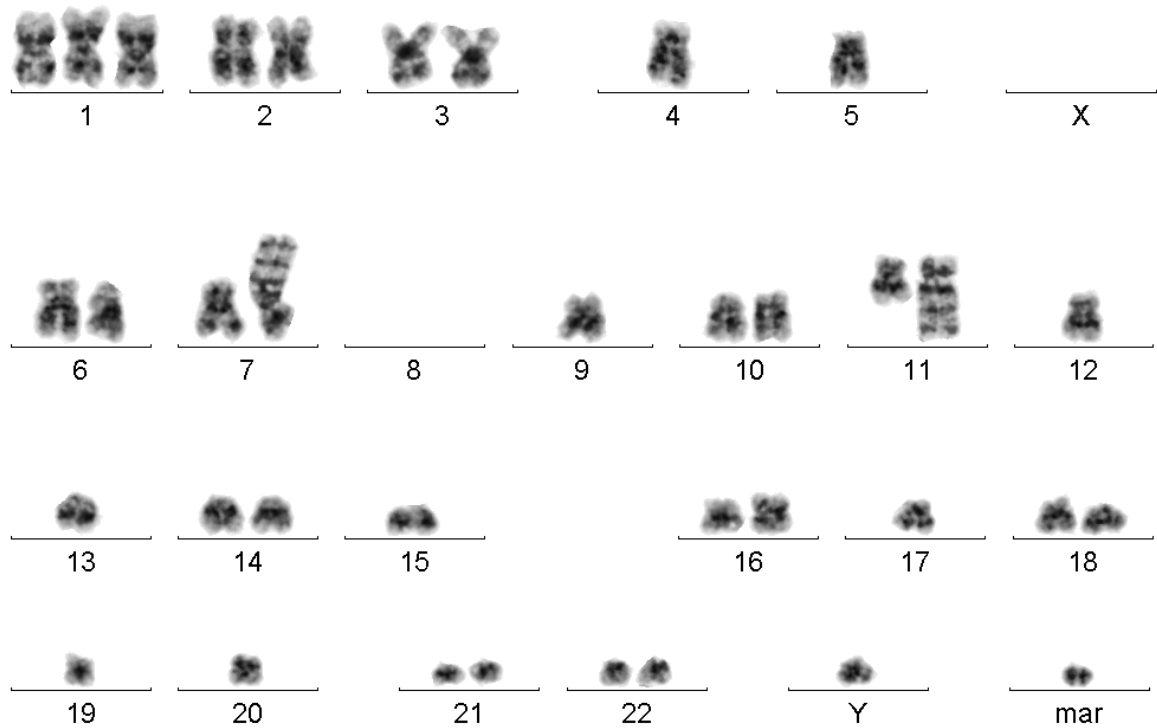
Partnerské geny *MLL* translokace se vyznačují velkou heterogenitou. Bylo popsáno více než 60 partnerských genových lokusů. Translokace *MLL* genu tvoří 10% všech mutací u AML. Translokace t(9;11) kóduje fúzní produkt *MLL-AF9*, a t(6;11), kóduje *MLL-AF6*. Jiné fúzní geny, jako například *MLL-ENL1*, se vyskytují u AML, ALL i ABL (Takáčová a kol., 2007). Změnu v oblasti 11q23 je možné detekovat jak klasickou cytogenetikou (Obr. 8), tak metodou FISH pomocí lokus specifické sondy (Obr. 9) (Lexova a kol., 2000).



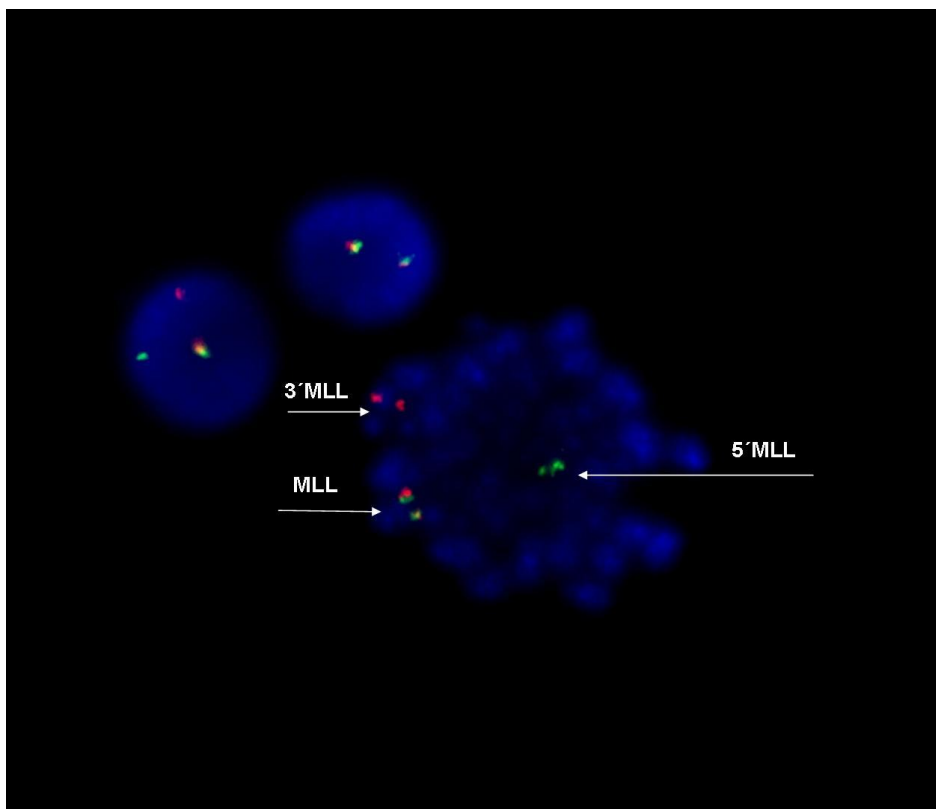
Obr. 7 Schematické znázornění dosud pozorovaných fúzních partnerů genu *MLL*.

Převzato z <http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/MLL.html>

U některých pacientů může docházet k tandemové duplikaci genu *MLL* v oblasti exonů 2 až 6 (Schichman a kol., 1994). Kromě translokací a duplikací je možné detekovat trisomii chromosomu 11 (+11) (Baffa a kol., 1995).



Obr. 8 Karyotyp pacienta s potvrzenou *MLL* amplifikací (karyotyp sestaven v Cytogenetické laboratoři HOK, Olomouc).



Obr. 9 FISH s lokus specifickou sondou LSI MLL Dual Color, Break Apart Rearrangement Abbott Molecular, spectrum green (5' MLL), spectrum orange (3' MLL) (obrázek FISH získán z Cytogenetické laboratoře HOK, Olomouc).

3.4.5 Akutní myeloidní leukemie s t(6;9) a fúzí genu *DEK/NUP214*

Fúzní gen *DEK/NUP214* se vyskytuje u AML s t(6;9)(p23;q34). Tato translokace u AML je relativně velmi vzácná a poprvé byla identifikovaná v roce 1992 (Von Lindern a kol., 1992).

Výsledkem translokace je fúze *DEK* genu na chromosomu 6 v oblasti 6p32, s *NUP214* (dříve označován jako *CAN*) na chromosomu 9 v oblasti 9q34, za vzniku fúzního genu *DEK/NUP214*.

AML s touto přestavbou postihuje převážně mladší dospělé pacienty a je spojena se špatnou prognózou. Fúzní gen, který je výsledkem chromosomové translokace, narušuje regulační mechanismy kontrolující růst, diferenciaci a přežití normálních kmenových buněk (Ageberg a kol., 2008).

Translokace se vyskytuje de novo, sekundárně po předchozím myelodysplastickém syndromu (MDS) nebo po předešlé léčbě chemoterapií (Slovak a kol., 2006).

3.4.6 Akutní myeloidní leukemie s *inv(3)* nebo *t(3;3)* a fúzí genu *RPNI-EVII*

Jedná se o AML s trombocytózou a změnou chromosomu 3. Tato změna se může vyskytovat u AML typu M2, M4, M7 podle starší klasifikace FAB. Je také pozorována i u MDS a sekundárních AML (Lexová a kol., 2000).

U pacientů s AML se znaky myelodysplastického syndromu (MDS) a abnormitami megakaryopoesy se často vyskytují cytogenetické aberace v oblastech na chromosomu 3q21 a 3q26. Tyto aberace souvisí s paracentrickou inversí *inv(3)(q21q26.2)* nebo reciproknou translokací *t(3;3)(q21;q26.2)* (Martinelli a kol., 2003).

Prognóza nemocných s aberacemi chromosomu 3 je špatná. Změna se může vyskytovat jako solo aberace, ale i jako součást komplexních karyotypů a vždy je spojena s nepříznivou prognosou.

3.5 Cytogenetika nádorů

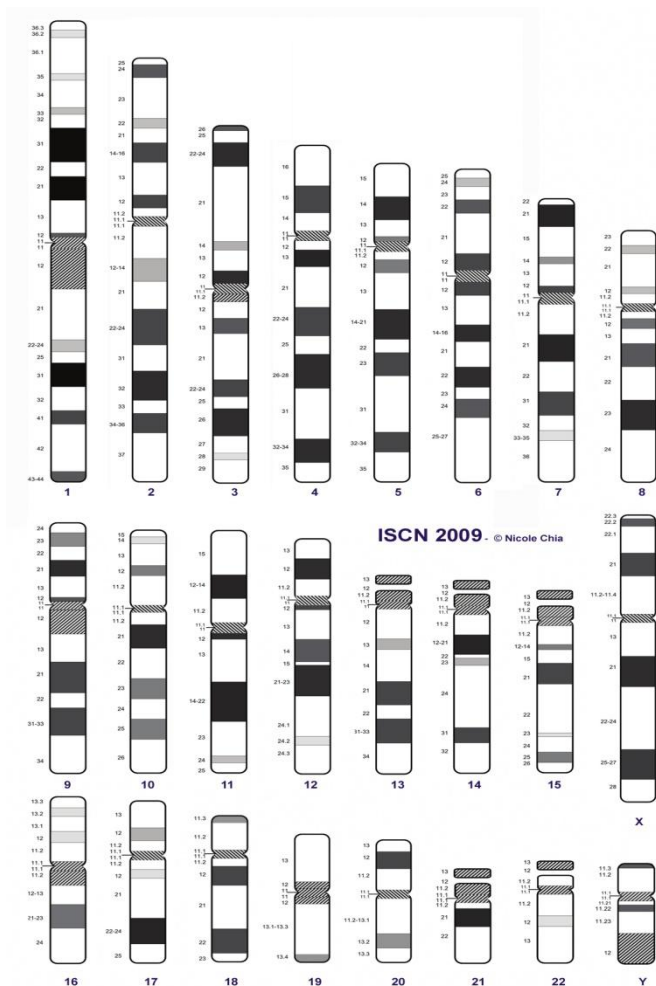
Nádorová cytogenetika, která má dnes své pevné a nezastupitelné místo v hemat-onkologii, se začala rozvíjet po historickém objevu první specifické chromosomové změny u lidského nádoru. Bylo to v roce 1960, kdy Nowel a Hungerford objevili „Philadelphia chromosome“ u nemocných s chronickou myeloidní leukémií (CML) (Nowel a Hungerford, 1960). Velký rozvoj onkocytogenetiky byl spojen s objevem pruhovacích technik. Chromosomy byly nejprve barveny Giemsou (Obr. 10) a měly jednotnou barvu. V normální buňce byl počet 46 chromosomů sestavován do karyotypu podle velikosti a polohy centromery. Určit chromosomovou změnu z takto obarvených chromosomů bylo velmi obtížné a takový chromosom mohl být zařazený pouze do podskupiny.



Obr. 10 Chromosomy v metafázi barvené Giemsou.

Převzato z databáze Cytogenetické laboratoře HOK, Olomouc.

Pokrokem bylo zavedení pruhovacích technik v roce 1969 a 1970. Byly objeveny dvě pruhovací techniky: Q-pruhování, využívající fluorochromu quinacrine a hodnocení ve fluorescenčním mikroskopu (Casperson a kol, 1969), a metoda G-pruhování (Seabright, 1971) s hodnocením ve světelném mikroskopu. Sjednotit hodnocení pruhovaných chromosomů bylo základem pro správné určení chromosomových aberací jak vrozených, tak získaných. Již v roce 1971 se cytogenetici na setkání v Paříži dohodli na jednotném systému hodnocení pruhovaných chromosomů (Obr. 11) a vznikla ISCN nomenklatura – An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Systém prošel řadou úprav a v současnosti platí ISCN 2009 (Shaffer a kol., 2009).



Obr. 11 Ideogram haploidní sady lidských chromosomů (ISCN 2009).

Převzato z <http://atlasgeneticsoncology.org/ISCN09/ISCN09.html>

Na základě této nomenklatury je chromosom popsán takto:

Na chromosomu rozlišujeme krátké rameno, označené p, a dlouhé rameno, označené jako q. Pruhy na ramenech chromosomů jsou označeny čísly, stejně jako podpruhy a číslování začíná od centromery a končí telomerou chromosomu.

Metacentrický chromosom se skládá ze dvou ramen, rozdělených primární konstrikcí. Tato primární konstriktce je místem centromery, která je zodpovědná za segregaci chromosomů v mitóze a meióze.

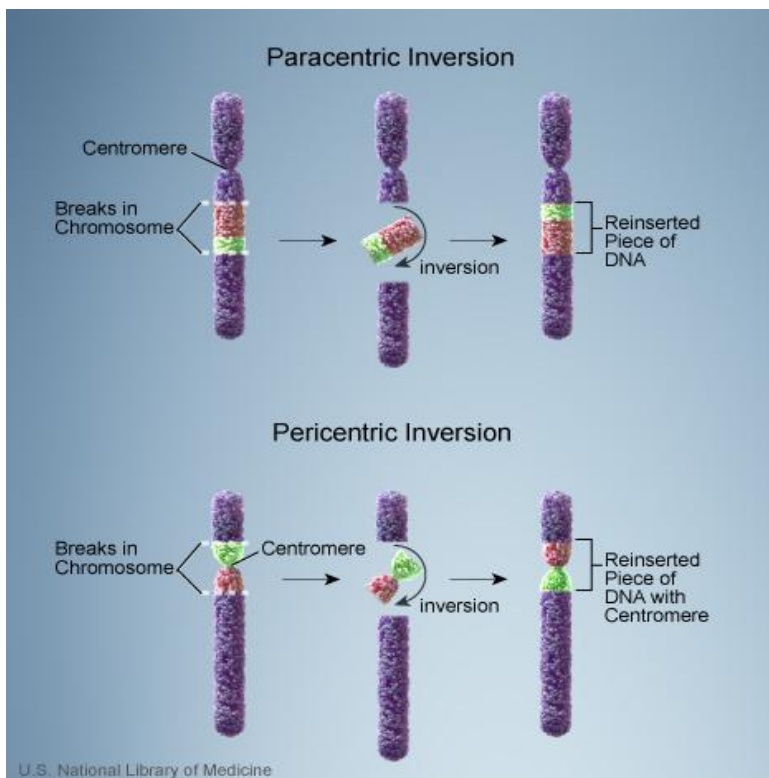
Chromosom je zde složen ze dvou sesterských chromatid, které se separují v mitotické anafázi. Základem každé chromatidy je dvojí šroubovice DNA (Michalová, 2000).

3.5.1 Chromosomové změny

I v nádorové cytogenetice platí, že pozorované chromosomové změny můžeme rozdělit na chromosomové změny početní nebo strukturní.

3.5.1.1 *Strukturní změny chromosomů*

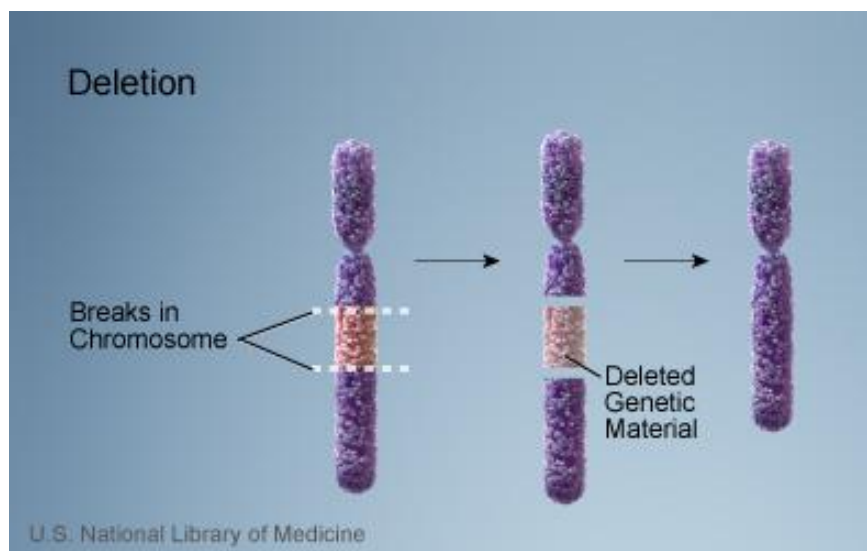
Mezi strukturní chromosomové změny vyskytující se u leukemií patří např. inverze, delece a translokace. Inverze (Obr. 12) může být pericentrická, při které se mění poloha centromery, nebo paracentrická, kdy se nemusí měnit poměr ramen a poloha centromery.



Obr. 12 Schéma paracentrické a pericentrické inverze.

Převzato z http://drugster.info/img/term/pericentric-chromosome-inversion-11428_0.jpg

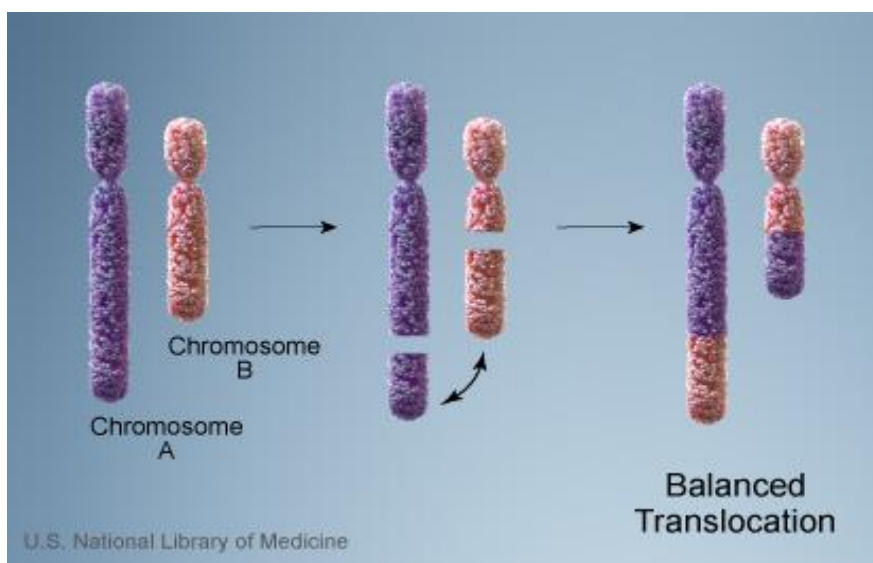
Při delecí dochází ke ztrátě části genetického materiálu na chromosomu, která vede k odpovídající ztrátě genů (Simmons a Snustad, 2009). U delecí (Obr. 13) se vyskytuje buď jeden zlom (terminální delecce), nebo dva zlomy (intersticiální delecce). Naproti tomu při inzerci jsou nezbytné nejméně tři zlomy a zasažen může být jeden nebo dva chromosomy (Michalová, 2000).



Obr. 13 Schéma intersticiální delecce chromosomu.

Převzato z <http://ghr.nlm.nih.gov/handbook/illustrations/chromosomaldeletion>

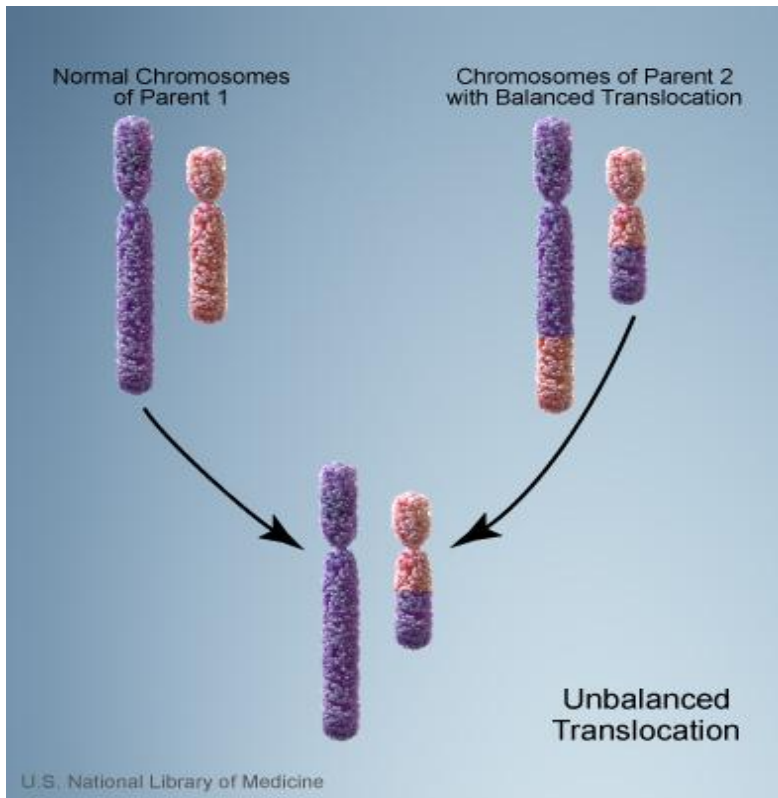
Nejčastější strukturní změnou u leukemií jsou translokace (obr. 14) (Sandberg a Meloni-Ehrig, 2010). Translokace jsou jednou z nejdůležitějších změn v karyotypu nádorových buněk převažující u hematologických malignit. Jedná se o translokace reciproké, při kterých dochází k vzájemné výměně částí dvou nebo více nehomologních chromosomů. Doposud je známo více než 500 různých typů rekurentních balancovaných translokací u nádorů (Adam a kol., 2008).



Obr. 14 Schematické znázornění balancované translokace.

Převzato z <http://ghr.nlm.nih.gov/handbook/illustrations/balancedtranslocation>

Translokace nebalancované jsou častější chromosomovou změnou u nádorů než translokace balancované. Nebalancovaná translokace (obr. 15) nastává, pokud není původní množství genetického materiálu v buňce zachováno a dochází ke ztrátě nebo zisku genetického materiálu.



Obr. 15 Schematické znázornění nebalancované translokace.

Převzato z <http://ghr.nlm.nih.gov/handbook/illustrations/unbalancedtranslocation>

Strukturní změnu chromosomu představují také kruhové chromosomy (z anglického ring chromosomes). Kruhový chromosom vzniká, pokud dojde ke zlomu na obou chromatidách a k jejich opětovnému spojení.

U nádorových buněk je velmi častou změnou duplikace celých chromosomů nebo jejich částí, a to svědčí o postupu nádorového procesu. Jsou známy dvě chromosomové změny, které se sice častěji vyskytují u solidních nádorů, ale byly pozorovány i u leukemií. Jedná se o velmi malé mikroskopicky detekovatelné částice chromatinu, bez centromery, známé jako double minutes (DMs). DMs vznikají rozpadem tzv. homogenně se barvících oblastí (homogenously staining regions – HSR). DMs a HSR jsou tvořeny amplifikovanými geny, nejčastěji onkogeny (Michalová, 2000).

3.5.1.2 Početní změny chromosomů

Změnu v počtu chromosomů označujeme jako aneuploidii, která představuje trisomii, zmnožení jednotlivých chromosomů chromosomové sady ($n+1$), tedy existenci tří kopií téhož chromosomu v karyotypu. Ztrátu jednotlivých chromosomů označujeme jako monosomii ($n-1$). Změny týkající se celé chromosomové sady označujeme jako euploidii (Lexová a kol., 2000; Simmons a Snustad, 2009). Změny v počtu chromosomů v jednotlivých ploidních sadách jsou klasifikovány podle ISCN 2009 (obr. 16).

Near-haploidy (23 ±)	≤ 34	Near-pentaploidy (115 ±)	104–126
Hypohaploidy	<23	Hypopentaploidy	104–114
Hyperhaploidy	24–34	Hyperpentaploidy	116–126
Near-diploidy (46 ±)	35–57	Near-hexaploidy (138 ±)	127–149
Hypodiploidy	35–45	Hypoheptaploidy	127–137
Hyperdiploidy	47–57	Hyperheptaploidy	139–149
Near-triploidy (69 ±)	58–80	Near-heptaploidy (161 ±)	150–172
Hypotriploidy	58–68	Hypoheptaploidy	150–160
Hypertriploidy	70–80	Hyperheptaploidy	162–172
Near-tetraploidy (92 ±)	81–103	Near-octaploidy (184 ±)	173–195
Hypotetraploidy	81–91	Hypoheptaploidy	173–183
Hypertetraploidy	93–103	Hyperheptaploidy	185–195

Obr. 16 Klasifikace ploidií podle ISCN 2009.

(Převzato z ISCN 2009)

U leukemií se mohou vyskytovat všechny typy dosud popsáných strukturních a početních změn.

3.6 Cytogenetické metody

Cytogenetické studie hrají důležitou roli v identifikaci opakujících se chromosomových abnormalit, které jsou pozorovány u různých druhů rakovin, včetně leukemie. Některé změny jsou zcela specifické (Sandberg a Meloni-Ehrig, 2010). Cytogenetické metody proto hrají nezastupitelnou roli při diagnostice leukemií. Cytogenetická diagnostika je založena na vyšetření početních i strukturních chromosomových změn v nádorových buňkách a jejich využití pro potvrzení klinické diagnózy, stanovení léčebné strategie, kontrolu účinnosti léčby a detekci minimální zbytkové choroby. Na základě cytogenetických, molekulárně cytogenetických a klinických údajů je možné zařadit pacienta do prognostických podskupin a umožnit tak cílenější terapii (Adam a kol., 2008).

Klasické cytogenetické vyšetření je založeno na přítomnosti dělicích se buněk ve stádiu metafáze (Sandberg a Meloni-Ehrig, 2010).

3.6.1 Klasická cytogenetika

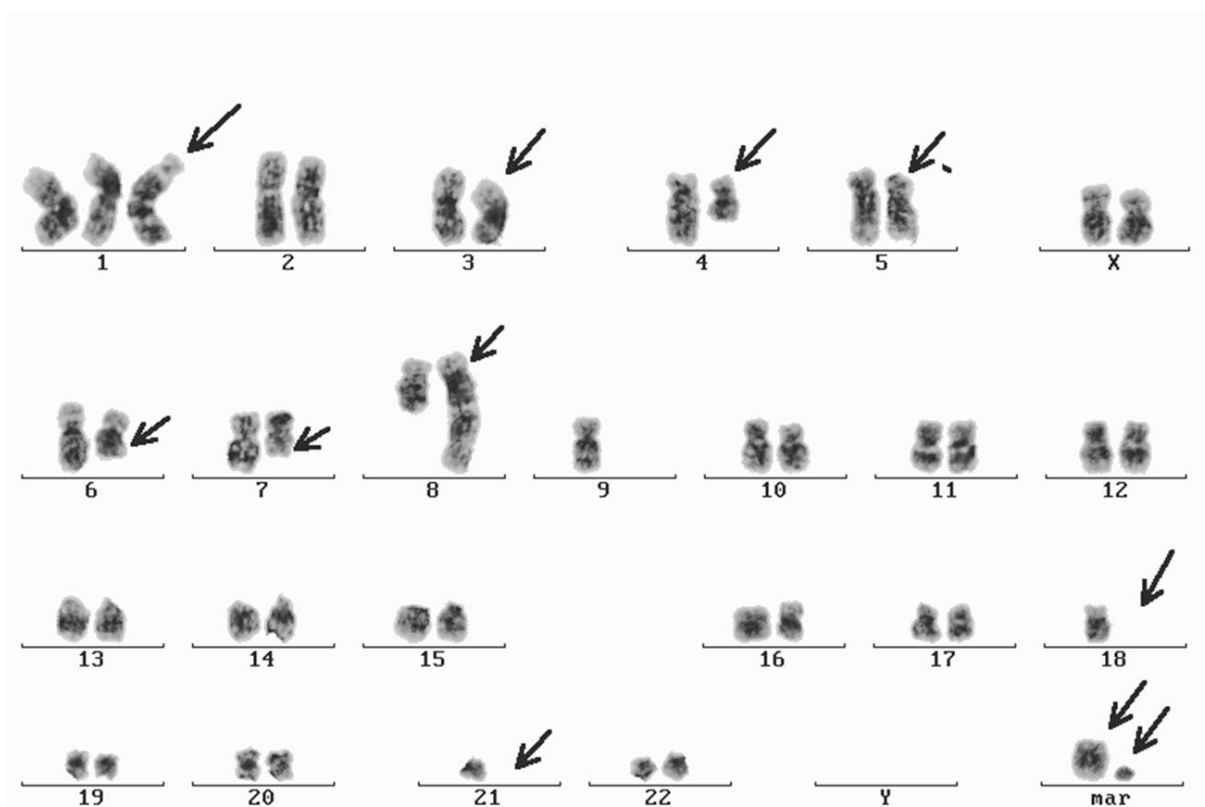
V roce 1956 Tijo a Levan (Tijo a Levan, 1956) stanovili přesný počet 46 lidských chromosomů a jejich karyotyp v somatických buňkách. Během několika let došlo k objevu prvních významných chromosomových změn. Díky novým metodám, zvětšení rozlišovací schopnosti vizualizace mikroskopu, se přispělo k rozšíření znalostí a uznání změn karyotypů (Sandberg a Meloni-Ehrig, 2010).

Identifikace chromosomových změn u hematologických malignit byla v minulosti založena na analýze karyotypu prostřednictvím pruhovacích technik, tzv. Giemsa pruhování. Dodnes je G-pruhování považováno za základní cytogenetickou metodu.

U hematologických onemocnění je materiálem ke stanovení karyotypu zejména kostní dřeň (KD) pacienta. Méně často jsou cytogenetická vyšetření prováděna z periferní krve nebo lymfatických uzlin.

Výsledkem zpracovaného materiálu je získání karyotypu a následný popis chromosomových abnormalit podle mezinárodně platné cytogenetické nomenklatury ISCN. Hodnotí se nejméně 20 metafází a 10 z nich se karyotypuje. Pro karyotypování jsou vyvinuty a používají se zcela rutinně systémy pro automatickou analýzu obrazu.

Výsledný karyotyp zahrnuje jak klonální změny, tak i nálezy náhodných nebo neklonálních změn. Jako klon definujeme nálezy jedné metafáze s normálním karyotypem, dvou shodných metafází s translokací nebo zmnožením stejného chromosomu nebo genetického materiálu na chromosomu nebo 3 a více metafází se ztrátou genetického materiálu. Komplexní karyotyp definujeme jako nálezy 3 a více změn v karyotypu nemocného (obr. 17).



Obr. 17 Komplexní karyotyp u nemocné s AML (karyotyp sestaven v Cytogenetické laboratoři HOK, Olomouc).

3.6.2 Molekulární cytogenetika

Klasické cytogenetické vyšetření je dnes v onkohematologii doplňováno vyšetřovacími metodami molekulární cytogenetiky, které pomáhají upřesnit cytogenetický nálezn. Hlavní výhodou molekulárně cytogenetických metod je možnost studovat chromosomové abnormality i v interfázních jádrech jednotlivých nádorových buněk.

Základní metodou molekulární cytogenetiky je *in situ* hybridizace (ISH). ISH umožňuje zviditelnit sekvence nukleových kyselin na mikroskopických preparátech, které obsahují fixované a morfologicky zachovalé chromosomy, jádra nebo tkáňové řezy. Metoda je založena na použití fluorescenčně značené jednořetězcové hybridizační sondy, tj. krátkého úseku DNA. Sonda se v důsledku komplementarity bází po denaturaci váže k cílové sekvenci DNA buněk nacházející se na mikroskopickém preparátu. V současnosti se používají DNA sondy konjugované s některými z fluorochromů, proto se tato metoda označuje jako fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH). Existuje několik druhů sond, které mohou být specifické pro jednotlivé chromosomy, jejich části, jako ramena, centromery, telomery nebo i jednotlivé geny. Místo, na které se naváže sonda, můžeme pozorovat pomocí fluorescenčního mikroskopu. Pomocí počtu a poloh jednotlivých fluorescenčních signálů lze zjistit početní i strukturní změny chromosomu.

Například analýza translokací v případě dostatečného počtu mitóz na metafázních chromosomech se provádí pomocí dvou celochromosomových DNA sond značených odlišnými fluorochromy (tzv. dvoubarevná FISH). Pro identifikaci translokací v interfázních jádrech se využívá tzv. interfázní FISH (I-FISH), která je založena na hybridizaci lokusově specifických DNA nebo centromerických sond značených odlišnými fluorochromy.

Použití lokus specifických sond je využíváno především pro určení translokací. Tyto DNA sondy hybridizují v těsné blízkosti z obou stran zlomu na chromosomu a detekují zlom, tedy i proběhlou translokaci, na základě rozdělení původního fluorescenčního signálu.

Pokud se přestaveb účastní více chromosomů, je vhodnější použít metodu mnohobarevné FISH (M-FISH). Princip této metody je shodný s obecným principem FISH a pro hybridizaci je použita sada celochromosomových sond pro jednotlivé chromosomové páry, které jsou značeny kombinací celkem 5 fluorochromů. Pomocí fluorescenčního mikroskopu a speciálního softwarového programu jsou pak barevně nasnímané chromosomy

s odlišnou intenzitou fluorochromů přebarveny na pseudobarvy, které lépe dovolují určit chromosomové přestavby.

Pro detailní mapování chromosomových oblastí můžeme využít ještě metodu mnohobarevného pruhování. Ta je také založena na hybridizaci se sondou pro jednotlivé chromosomy, která je obvykle připravena mikrodisekcí chromosomových oblastí a jejich označením kombinací fluorochromů a následným zpracováním pomocí softwarového programu s pseudobarvami (Adam a kol., 2008).

4 Materiál a metody

4.1 Materiál

4.1.1 Biologický materiál

Aspirát kostní dřeně pacienta vyšetřovaného v Cytogenetické a molekulárně cytogenetické laboratoři Hemato-onkologické kliniky FN v Olomouci.

4.1.2 Použité chemikálie

Antibiotic Antimycotic solution (ATB = penicilin, streptomycin, amphotericin)(SIGMA)

BM médium (bone marrow karyotyping medium) (BI BIOLOGICAL INDUSTRIES)

DAPI (abbott molecular)

Destilovaná voda (MILLIPORE S.A.S.)

Dodekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$) (lach:ner)

EBSS – oplachovací roztok (Earle's Balanced Salt Solution) (GIBCO)

Ethanol 70%, 80%, 90% a 96%

Fluorescenčně značená sonda (Cambio, *Metasystems*)

Fluorescenčně značená sonda (Vysis)

Giemsa KaryoMAX (GIBCO)

Heparin (heparinum natricum) (Zentiva, K.S.)

Chlorid draselný (lékárna)

Karyomax Colcemid (GIBCO)

Kyselina citronová (lach:ner)

Kyselina octová ledová (lach:ner)

Leishmann's stain (SIGMA)

Methanol (lach:ner)

NP40 (Abbott molecular)

PBS pufr pH 7,4 (lékárna, Mgr. Rolin)

RPMI-1640 (sterilní kultivační médium) (SIGMA)

20xSSC (abbott moleculare)

Telecí sérum (GIBCO)

Trypsin (SIGMA/ALORICH)

Tween20 (Serva)

Ultrapure formamid (Q-BIO gene)

0,075 M pufovaný roztok chloridu draselného (lékárna)

4.1.3 Použité roztoky

Fixační roztok (Carnoye):

Methanol a kyselina octová ledová v poměru 3:1.

30 ml methanolu

10 ml kyseliny octové ledové

Roztok 20xSSC:

132 g 20xSSC

500 ml destilované vody

pH 7

uchovávat při laboratorní teplotě

Denaturační roztok:

2 ml 20xSSC

4 ml destilované vody

14 ml formamidu

Gurrův roztok (Gurr's buffer solution pH 6,8) (GIBCO)

Tablety se rozpustí v 1 l vody

Barvicí roztoky:

Roztok 0,14 M Na₂HPO₄:

25g Na₂HPO₄ x 12H₂O

500 ml destilované vody

Kyselina citronová:

10,5 ml kyseliny citronové

500 ml destilované vody

Leishmannovo činidlo:

0,6 g Leishmann's stain

400 ml methanolu

Roztok trypsinu:

0,04 g trypsinu

1 ml PBS

Zásobní mycí roztoky:

2xSSC/0,1% NP40:

100 ml 20xSSC

850 ml injekční vody

1 ml NP40

pH 7-8

doplnění do 1 l vodou

uchovává se při laboratorní teplotě

0,4SSC/0,3% NP40:

20 ml 20xSSC

950 ml injekční vody

3 ml NP40

pH 7-7,5

doplnění do 1 l vodou

uchovává se při laboratorní teplotě

4.1.4 Laboratorní přístroje a pomůcky

CCD kamera (MetaSystems)

Centrifuga (Centrifuga Rotina 420R – Schoeller)

Digestoř

Flowbox (flowbox HERAsafe[®], Heraeus Holding GmbH)

Fluorescenční lampa U-RFL-T (Olympus)
Fluorescenční mikroskop (Olympus)
CO₂ inkubátor Function Line (Heraeus Holding GmbH)
Kahan
Laboratorní váhy Scaltec (Scaltec Instruments)
Lednička
Magnetická míchačka (Schott Instruments)
Mraznička
pH metr Beckman (Beckman Instruments)
Pipety (Gilson)
Topná a sušicí deska Medax (Nagel)
Počítač a karyotypovací software Ikaros (MetaSystems)
Počítač a software ISIS (MetaSystems)
Stolní minicentrifuga Labnet (Labnet International)
Světelný mikroskop Olympus BX41 (Olympus)
Třepačka Heidolph Reax top (Heidolph)
Vodní lázeň Thermomix BM (B. Braun Biotech International)

4.1.5 Laboratorní sklo

Odměrný válec (50 ml, 100 ml)
Skleněná kádinka (100 ml)
Skleněné koplíny (25-30 ml)
Skleněné koplíny (100 ml)
Skleněná odměrná baňka (100 ml)
Skleněná odměrná baňka (500 ml)
Skleněná tyčinka

4.1.6 Spotřební materiál

Imerzní olej (Olympus)

Injekční jehly sterilní (B. Braun)

Krycí skla (22x22 mm, 24x24 mm) (Menzel-Gläser)

Pasteurovy pipety (10 ml) (Biosigma)

Plastové mikrozkušavky (1,5 ml; 2 ml) (Eppendorf)

Plastové kultivační láhve (40 ml) (Nunclon TM Δ Surface, Thermo Fisher Scientific)

Zkušavky Falcon (15ml) (Thermo Fisher Scientific)

Centrifugační zkumavky Falcon (50 ml) (TPP[®])

Podložní skla SuperFrost[®] (Thermo Fisher Scientific)

Rubber cement (Fixo gum) (Marabu)

Špičky (Gilson)

4.2 Metody

4.2.1 Kultivace buněk kostní dřeně (KD) pro cytogenetické a molekulárně - cytogenetické vyšetření

Pro cytogenetické a molekulárně-cytogenetické vyšetření jsou používány buňky kostní dřeně (KD) pacienta, které se kultivují in vitro, v kultivačním médiu (Tab. II). Materiál se odebírá do připravené zkumavky s malým množstvím heparinu. Při odběru je nutné dodržovat sterilitu.

Tyto podmínky jsou zásadní, protože se jedná o kultivační metodu.

Kultivace probíhá nejčastěji v médiu RPMI v termostatu při 37 °C. Doba kultivace se může lišit podle typu vyšetření a diagnózy. Obvyklá doba kultivace bývá 24 hodin.

Tab. II příprava kultivačních médií pro KD dospělých pacientů (převzato Current protocols in human genetics, 1999).

<i>Normál (N) pro přímé zpracování</i>	<i>Heparin (H)</i>	<i>Kultivace (K) BM</i>
<i>10 ml RPMI-1640 média</i>	<i>10 ml RPMI-1640 média</i>	<i>12 ml BM média</i>
<i>2 kapky heparinu</i>	<i>2 kapky heparinu</i>	
<i>2,4 ml telecího séra</i>		

RPMI-1640 (sterilní kultivační médium)

BM (buněčný materiál)

Médium normál (N) se používá pro přímé zpracování, do kterého přidáme 2 kapky kolchicinu na dobu 30 minut k zastavení dělicích se buněk v metafázi. Poté ihned zpracováváme. Po zpracování buněčného materiálu (BM) následuje cytogenetické barvení Giemsovým barvivem. Tentýž den hodnotíme počet mitóz. Pokud není nalezen dostatečný počet mitóz (alespoň 5 mitóz na jeden cytogenetický preparát), přidáme do médií určených pro 24hodinovou kultivaci 2 kapky kolchicinu (ke zvýšení počtu mitóz).

Kultury, které jsou určené k 24hodinové kultivaci, odebrány do média H, přelijeme z plastových kultivačních nádob do 15ml zkumavek Falcon. Materiál zcentrifugujeme, 1 000 otáček / 37 °C / 10 min, vzniklý supernatant slijeme a buněčnou suspenzi přepipetujeme do plastových kultivačních nádob s připraveným médiem K.

Buněčnou suspenzi v kultivační nádobě s médiem K inkubujeme při 37 °C po dobu 24 hodin. Druhý den přidáme 2 kapky kolchicinu na dobu 30 minut – pouze pokud nebyl přidán předchozí den vzhledem k nedostatečnému počtu mitóz. Poté ihned zpracováváme (Current protocols in human genetics, 1998).

Cílem kultivace je získat co největší množství dělicích se buněk pro následující cytogenetické a molekulárně cytogenetické vyšetření (Adam a kol., 2008).

Hodnocení kvality kultivace je hodnoceno podle počtu nalezených mitóz po zpracování BM a cytogenetickém barvení Giemsovým barvivem. Kultivaci můžeme vyhodnotit jako úspěšnou, pokud jsou nalezeny cytogeneticky hodnotitelné mitózy. Jako

neúspěšná je kultivace hodnocena, pokud nejsou nalezeny cytogeneticky hodnotitelné mitózy, ale kultury lze použít pro interfázní FISH. Pokud nejsou nalezeny mitózy ani interfázní buňky, jedná se o neúspěšný odběr a cytogenetické ani molekulárně cytogenetické vyšetření není možné provést, a proto je nutné odběr opakovat (Current protocols in human genetics, 1998).

4.2.2 Zpracování BM pro cytogenetické a molekulárně-cytogenetické vyšetření

Princip zpracování BM, odebraného od pacienta, spočívá v izolaci a fixaci interfázních jader a metafází buněk kostní dřeně, periferní krve nebo tkání. Materiál je uchováván pouze krátkodobě.

Ke zpracování BM pro cytogenetické a molekulárně-cytogenetické vyšetření je postupováno takto:

Připravíme fixační roztok Carnoye, smísením metanolu a kyseliny octové ledové v poměru 3:1. Obsah kultivačních nádob přelijeme do řádně označených plastových zkumavek Falcon 15 ml a centrifugujeme 10 minut při 1000 rpm a 37 °C. Vzniklý supernatant odstraníme a přidáme 10 ml 0,075 M roztoku chloridu draselného vytemperovaného na 37 °C. Materiál inkubujeme po dobu 25 minut při 37 °C. Poté přidáme 1 kapku fixačního roztoku Carnoye a promícháme.

Znovu centrifugujeme 10 minut při 1000 rpm a 37 °C. Vzniklý supernatant odstraníme a přidáme 10 ml fixačního roztoku Carnoye vychlazeného na 20 °C. První mililitr přidáváme pomalu po kapkách, obsah zkumavky promícháme pomocí vortexu.

Materiál inkubujeme po dobu 30 minut při pokojové teplotě. Opět centrifugujeme 10 minut při 1000 rpm a 4 °C. Odstraníme supernatant a přidáme 10 ml fixačního roztoku Carnoye, promícháme pomocí vortexu. Centrifugaci a následné odstranění supernatantu provádíme, dokud nemá výsledná buněčná suspenze mléčně opaleskující zbarvení.

Takto zpracovaná suspenze buněk je uchovávána v ledničce k dalšímu použití po dobu několika týdnů.

Buněčnou suspenzi vyhodnocujeme nakapáním na podložní sklo a obarvením pomocí roztoku Giemsky. Na takto připraveném preparátu kontrolujeme přítomnost mitóz (Current protocols in human genetics, 1999).

4.2.3 Příprava a barvení cytogenetických preparátů, G-pruhováním a karyotypováním

G-pruhování chromosomů je založeno na působení proteolytického enzymu trypsinu a barvení barvivem Giemsa-Romanowski. Jakým způsobem stabilní pruhy touto technikou vznikají, není dostatečně objasněno a kvalita takto obarvených preparátů závisí na mnoha laboratorních podmínkách (Adam a kol., 2008).

G-pruhování umožňuje rozlišení jednotlivých chromosomových párů (kondenzované metafázní chromosomy) podle specifických G-pruhů.

Hodnocením takto obarvených preparátů v mikroskopu při procházejícím světle lze (za pomoci počítačových programů sloužících k analýze obrazu) sestavit karyotyp, a tak případně odhalit strukturální i numerické abnormality chromosomů.

A. Příprava cytogenetických preparátů a G-pruhování

Do první skleněné kopoliny připravíme barvicí roztok I. smícháním:

- 75 ml 0,14 M Na_2HPO_4
- 20 ml kyseliny citronové
- 0,32 ml Giemsa Karyomax
- 0,5 ml roztoku trypsinu v PBS

Do druhé skleněné kopoliny připravíme barvicí roztok II. smísením:

- 15 ml Leishmanova činidla
- 45 ml Gurruova roztoku

Na nadýchnuté podložní sklo nakapeme z výšky cca 50 cm 2-3 kapky zpracované buněčné suspenze (v digestoři), nakapané sklo protáhneme nad plamenem a necháme uschnout při laboratorní teplotě. Takto připravíme sadu 5 skel pro každého pacienta a každou kultivaci.

V kopolině s barvicím roztokem I. inkubujeme po dobu 2 minut při laboratorní teplotě po jednom skle z každé sady.

Poté sklo opláchneme v kopolině s roztokem EBSS a přeneseme do kopoliny s barvicím roztokem II., kde sklo inkubujeme po dobu 3 minut.

Sklo opláchneme v kopolině s destilovanou vodou a necháme uschnout při pokojové teplotě.

Následuje mikroskopické hodnocení obarvení cytogenetického preparátu při procházejícím světle. Pokud je obarvení vyhovující pro karyotypování, obarvíme stejným způsobem zbývající 4 skla v sadě a následuje karyotypování. Pokud obarvení není pro karyotypování vyhovující, upravíme časy inkubace v barvicích roztocích (např.: při příliš tmavém obarvení zkrátíme dobu inkubace v barvicím roztoku II., při příliš světlém obarvení prodloužíme dobu inkubace v barvicím roztoku II., při nedostatečně výrazném pruhování chromozomů prodloužíme dobu inkubace v barvicím roztoku I., při chromosomech příliš narušených působením trypsinu zkrátíme dobu inkubace v barvicím roztoku I.). Nově obarvené preparáty opět mikroskopicky vyhodnotíme.

B. Karyotypování

Pomocí světelného mikroskopu vyhledáváme a hodnotíme 20 mitóz u každého pacienta, z 10 z nich sestavíme karyotyp za pomoci softwaru Ikaros (MetaSystems) a vyhodnotíme počet a strukturu chromosomů (Current protocols in human genetics, 1999; Shaffer a kol., 2009).

4.2.4 FISH s celochromosomovými sondami Cambio nebo MetaSystems

FISH (fluorescenční *in-situ* hybridizace) je založená na principu schopnosti jednořetězcové DNA sondy vázat se s komplementárními úseky vyšetřované DNA pacienta (interfázní jádra buněk a mitózy). Takto navázané fluorescenčně značené sondy detekujeme pomocí fluorescenčního mikroskopu.

A. Příprava preparátu:

Preparát připravíme nakapáním 2 až 3 kapek buněčné suspenze na nadechnuté sklo, které necháme volně uschnout. Správné množství mitóz na preparátu zkontrolujeme pod světelným mikroskopem, pokud je mitóz nedostatek, přikápneme na sklo dle potřeby další kapky buněčné suspenze. Pokud je ale na preparátu nadbytek buněk, je nutné buněčnou suspenzi naředit fixačním roztokem Carnoe a poté nakapat preparát nový.

Připravíme si do plastové falkonky 50 ml roztok 2xSSC, a to naředěním zásobního roztoku 20xSSC. Roztok 2xSSC přelijeme do skleněné koplínky, kde připravený preparát inkubujeme 20 minut při pokojové teplotě.

Poté provádíme odvodnění skla promýváním ve vzestupné ledové alkoholové řadě, která je uchovávána při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Sklo inkubujeme 2 minuty v 70%, 80%, 90% a 96% ethanolu.

Takto odvodněné sklo přeneseme na plotýnku, vytemperovanou na 45 °C, a necháme uschnout.

Příslušnou sondu vybíráme podle chromosomové změny, kterou má metoda FISH prokázat. Sondu připravujeme vždy podle návodu výrobce, zvortexujeme a rychle stočíme na stolní centrifuze. Poté sondu 10 minut denaturujeme ve vodní lázni při teplotě 70 °C. Sondu přeneseme do vodní lázně o teplotě 37 °C a inkubujeme ji 20 minut až 1 hodinu.

Sklo denaturujeme tak, že ho vložíme do vytemperovaného denaturačního roztoku: 70% formamid/2xSSC na dobu 2 minut ve vodní lázni při teplotě 73 °C. Znovu provádíme odvodnění skla promýváním ve vzestupné alkoholové řadě: 2 minuty v 70%, 80%, 90% a 96% ethanolu. Poté přeneseme na plotýnku, která je vytemperována na 45 °C, a preparát necháme uschnout.

B. Hybridizace:

Denaturovanou sondu napipetujeme na denaturovaný preparát a překryjeme krycím sklíčkem, velikost krycího sklíčka závisí na množství sondy. Okraje krycího sklíčka oblepíme rubber-cementem, ten zabraňuje vysychání sondy během hybridizace, a sklo vložíme do hybridizační komůrky s teplotou 37 °C na 24 hodin.

Po 24 hodinách pomocí pinzety odstraníme krycí sklíčko a odmyjeme zbytek nenavázané sondy inkubací skla v mycích roztocích: 0,4xSSC/0,3% NP40 ve vodní lázni při teplotě 73 °C po dobu 2 minut a ve 2xSSC/0,1% NP40 při laboratorní teplotě také po dobu 2 minut.

Po omytí skla preparát zamontujeme a podbarvíme na skle interfázní jádra a mitózy. Napipetování 10 µl DAPI, které překryjeme krycím sklíčkem (24x24 mm).

Takto připravený preparát hodnotíme ve fluorescenčním mikroskopu za použití příslušných fluorescenčních filtrů. Reprezentativní počet mitóz je snímán pomocí CCD kamery a ukládán v systému ISIS.

Hodnocení a popis výsledku provádíme podle platných pravidel cytogenetické nomenklatury ISCN 2009. Některé nalezené chromosomové abnormality můžeme ověřit pomocí jiných molekulárně cytogenetických a molekulárních metod jako M-FISH, CGH, aCGH a PCR (Current protocols in human genetics, 1999; Shaffer a kol., 2009).

4.2.5 FISH s lokus specifickými (LSI) a centromerickými (CEP) sondami Abbott

A. Příprava preparátu

Postup přípravy preparátu je stejný u všech typů sond. Také provádíme odvodnění skla promýváním ve vzestupné ledové alkoholové řadě a denuraci skla ve vytemperovaném denaturačním roztoku.

B. Příprava sondy

Podle chromosomové změny, kterou má metoda FISH prokázat, vybereme příslušnou sondu. Sondy jsou naředěny výrobcem, nebo je sami naředíme do eppendorfky podle návodu výrobce smícháním 7 μ l hybridizačního pufru, 2 μ l injekční vody a 1 μ l sondy. Zvortexujeme a rychle stočíme na stolní centrifuze. Sondu poté denaturujeme v lázni při 73 °C po dobu 5 minut.

C. Hybridizace

Denaturovanou sondu napipetujeme na denaturovaný preparát a překryjeme krycím sklíčkem, velikost krycího sklíčka závisí na množství sondy. Okraje krycího sklíčka oblepíme rubber-cementem, ten zabraňuje vysychání sondy během hybridizace, a sklo vložíme do hybridizační komůrky s 37 °C na 24 hodin.

Po 24 hodinách odkryjeme krycí sklíčko a odmyjeme zbytek nenavázané sondy inkubací skla v mycích roztocích: 0,4xSSC/0,3% NP40 ve vodní lázni při teplotě 73 °C po dobu 2 minut a ve 2xSSC/0,1% NP40 při laboratorní teplotě také po dobu 2 minut.

Po omytí skla preparát zamontujeme a podbarvíme na skle interfázní jádra a mitózy. Na sklo napipetujeme 10 μ l DAPI a překryjeme ho krycím sklíčkem (24x24 mm).

Takto připravený preparát hodnotíme ve fluorescenčním mikroskopu za použití příslušných fluorescenčních filtrů. Hodnotíme vždy minimálně 300 jader interfázních buněk, obraz je snímán za pomoci CCD kamery a ukládán v systému ISIS (MetaSystems). Hodnocení a popis výsledku provádíme podle platných pravidel cytogenetické nomenklatury ISCN 2009 (Current protocols in human genetics, 1998; Shaffer a kol., 2009).

5 Výsledky

Na Hemato-onkologické klinice FN LF UP v Olomouci jsem sestavovala karyotypy již dříve vyšetřených pacientů s AML z aspirátu kostní dřeně. Preparáty pro karyotypování byly připravené podle postupů, které shrnuje kapitola Materiál a metody. Přípravu takového preparátu jsem si také vyzkoušela.

Karyotyp jsem sestavila celkem u 10 pacientů. U 8 pacientů se jednalo o normální karyotyp. U 2 pacientů byla přítomna chromosomová změna. Jako příklad uvádím translokaci t(11;17) u prvního pacienta s klinickou diagnosou AML. U pacienta jsem hodnotila jak klonální změny, tak nález neklonálních změn, jak ukazuje tabulka III.

Tab. III Soubor vyšetřených nemocných.

Pacient	Dg.	Celkem hodnoceno mitóz	Z toho s přestavbou	Výsledný karyotyp
1.	AML	20	6	46,XY,t(11;17)
			2	45,XY,-8
			1	44,XY,-6,-10
2.	AML	13	2	45,XY,-16
			1	46,XY,-13,-17,+mar,+mar
3.	AML	4	0	46,XY
		1		45,XY,-10
4.	AML	2	0	44,XX,-16,-18
		3		46,XX
5.	AML	5	0	46,XY
6.	AML	3	0	46,XX
7.	AML	5	0	46,XY
8.	AML	6	0	46,XX
9.	AML	5	0	46,XX
10.	AML	5	0	46,XX

Prakticky jsem si vyzkoušela také metodu FISH u pacientů s již dříve diagnostikovanou CML, kteří docházejí na pravidelné kontroly na hemato-onkologickou kliniku. Metodu jsem si vyzkoušela na pacientech s CML z toho důvodu, že v době práce na

mé experimentální části bylo pacientů s AML málo a základní princip metody je stejný u obou typů těchto myeloidních leukemií. Metoda přípravy preparátu pro metodu FISH a její princip je popsán v kapitole Materiál a metody.

Metodou FISH jsem vyšetřila 5 pacientů, 3 s diagnosou chronická myeloidní leukemie (CML) a 1 pacienta s akutní leukemií. U pátého pacienta jsem pouze vyhodnocovala výsledek FISH (tab. IV).

Tab. IV Soubor nemocných vyšetřených metodou FISH.

Pacient	Diagnosa	Pohlaví/věk	Vyšetřován na	Přestavba	Sonda	Výsledek
1.	ALL	Dítě/5	fúzi <i>TEL/AML1</i>	t(12;21)	LSI TEL/AML1 DC DF Abbott Molecular	pozitivní
2.	CML	Muž/54	gen <i>EVI</i>	t(3;21)	LSI <i>EVI</i> Kreatech	pozitivní
3.	CML	Žena/74	<i>BCR/ABL1</i>	del 9q/del 22q	LSI BCR/ABL1 DC DF Abbott Molecular	pozitivní
4.	CML	Muž/58	<i>BCR/ABL1</i>	t(9;22)	LSI BCR/ABL1 DC DF Abbott Molecular	negativní
			trisomie 8	(+8)	CEP 8SG/9SO Abbott Molecular	negativní
5.	alogenní transplantace	Muž/-	Přítomnost druhého chromosomu X			pozitivní

V prvním případě se jednalo o dítě narozené v roce 2007. Pacient byl vyšetřován na podezření ALL. V cytogenetice byl nalezen normální karyotyp. U dětí s ALL je nejčastěji přítomna kryptická translokace t(12;21), na chromosomu 12 v oblasti 12p13 se nachází gen *TEL* a na chromosomu 21 v oblasti 21q22 gen *AML1*. Pacient byl proto vyšetřen na fúzi genu *TEL/AML1*. Použita byla lokus specifická sonda LSI TEL/AML1 Dual Color (DC), Dual

Fusion (DF) firmy Abbott Molecular. Hodnoceno bylo 300 buněk, z toho 260 buněk s fúzí, to je 86,6 %, a u 40 buněk, to je 13,4 %, nebyla fúze přítomna. U pacienta byla potvrzena diagnosa ALL.

V případě pacienta druhého se jednalo o muže, ročník 1957. Vyšetření bylo provedeno z kostní dřeně K24 (24hodinová kultivace) 8.3.2012. V době diagnosy byla v karyotypu translokace t(3;21). Těto translokace se účastní gen *EVI*, lokalizovaný na chromosomu 3, proto byla pro potvrzení translokace použita sonda LSI ON *EVI* firmy Kreatech. Hodnoceno bylo 307 buněk. U 8 buněk, to je 2,6 %, byla přítomna přestavba. U zbývajících 299 buněk, to je 97,4 %, nebyla fúze přítomna. Jedná se o přítomnost minimální residuální nemoci po léčbě nemocného.

U třetího pacienta, ženy, ročník 1938, byla vyšetřována fúze genu *BCR/ABL1*. Použita byla sonda LSI *BCR/ABL* DC DF firmy Abbott Molecular. Hodnoceno bylo 301 buněk, z toho u 251 buněk, to je 83,4 %, byla potvrzena přestavba, a u zbývajících 50 buněk, to je 16,6 %, nebyla fúze genu *BCR/ABL* potvrzena. Zjištěná přestavba, kterou zapisujeme, má obraz dvou fúzních signálů, jednoho samostatného zeleného a samostatného červeného signálu v interfázních jádrech (2F1G1R). U nemocné však byl zjištěn pouze jeden fúzní signál (1F1G1R), což je typický obraz přítomnosti delece 9q/del 22q.

U posledního pacienta, muže, se jednalo o pacienta s CML v pokročilé fázi s přídatnými chromosomovými změnami s akcelerací do ALL, která je spojena s nepříznivou prognózou. V karyotypu, 47,XY,t(9;22)(+8), byla zjištěna přítomnost translokace t(9;22) (Ph chromosom) a trisomie chromosomu 8 (+8). Pacient byl vyšetřen na přítomnost fúze *BCR/ABL1*. Použita byla sonda LSI *BCR/ABL* DC DF firmy Abbott Molecular. Hodnoceno bylo 400 buněk, z toho u 4 buněk, to je 1%, byla potvrzena fúze genu *BCR/ABL*. U zbývajících 399 buněk, to je 99%, nebyla fúze přítomna. Pro stanovení přítomnosti trisomie 8 byla použita centromerická sonda (CEP) na centromeru chromosomu 8 a jako kontrola byla použita sonda pro centromeru chromosomu 9. Hodnoceno bylo 400 buněk, u kterých se trisomie chromosomu 8 vyskytovala také pouze v 1%.

Možnost využití této metody jsem si také ověřila u pacienta, který byl 3 měsíce po alogenní transplantaci, jednalo se o muže, jehož dárce kostní dřeně byla žena, a u kterého byla zjišťována přítomnost kompletní dárcovské krvetvorby. V interfázních jádrech byla již ve všech buňkách přítomna dárcovská krvetvorba, kdy nesvítil signál pro chromosom Y, ale pouze signály pro chromosom X, což potvrzuje přítomnost kompletní dárcovské krvetvorby.

6 Diskuse

Cytogenetika a molekulární cytogenetika se stala nedílnou součástí vyšetření hematologických malignit. Význam cytogenetiky akutních leukemií byl potvrzen i tím, že se cytogenetické a molekulárně genetické změny staly součástí WHO klasifikace akutních leukemií. Chromosomové změny u akutních myeloidních leukemií dnes charakterizují jednotlivé subtypy AML, některé změny jsou zcela specifické. Příkladem je translokace t(15;17) u akutní promyelocytární leukemie (APL), která potvrzuje klinickou diagnosu, ale zároveň určuje prognózu a léčbu těchto nemocných. Určení změny a poznání molekulární podstaty vedlo k objevu cílené terapie těchto nemocných.

Právě chromosomové translokace jsou nenáhodné i u ostatních typů AML, a proto jejich určení je klinicky velmi významné.

Úkolem mé bakalářské práce bylo naučit se základní cytogenetické metody v Cytogenetické a molekulárně cytogenetické laboratoři Hemato-onkologické kliniky FN v Olomouci. Cílem bylo naučit se v laboratoři pracovat, naučit se karyotypovat a seznámit se s nejčastějšími chromosomovými změnami u AML. Dalším cílem bylo seznámit se s metodou fluorescenční *in situ* hybridizace a vyzkoušet si tuto metodu na vzorcích již vyšetřených nemocných.

Sestavila jsem karyotypy celkem u 10 nemocných s akutní myeloidní leukemií. Abnormální karyotyp jsem sestavila u 2 pacientů. Seznámila jsem se prakticky i s metodou FISH. Hybridizovala jsem pacienta s lokus specifickou sondou pro fúzi genů *BCR/ABL1* a centromerickou sondou pro chromosom 8, dále jsem hybridizovala pacienta s lokus specifickou sondou pro fúzi genů *TEL/AML1* a přítomnost genu *EVI*.

V teoretické části bakalářské práce jsem se v literárním přehledu vybraných typů AML soustředila především na cytogenetiku těchto vybraných typů AML a jejich charakterizaci.

7 Závěr

Příčinou vzniku akutních leukemií jsou poruchy diferenciací hematopoetických progenitorů. Kumulace genetických změn vede ke vzniku nádorového klonu s abnormální diferenciací, proliferací a apoptózou.

Pomocí cytogenetických a molekulárně cytogenetických metod můžeme určit specifické a nenáhodné chromosomové změny, které nám umožňují potvrdit klinickou diagnosu, určit prognózu a správnou volbu léčby.

Určení klonální změny může být využito pro monitorování odpovědi na léčbu a určení minimální reziduální nemoci. Cytogenetické a molekulárně cytogenetické metody jsou proto nedílnou součástí rutinních metod současné moderní medicíny.

8 Seznam použitých zkratek a symbolů

AL	akutní leukemie
ALL	akutní lymfatická leukemie
AML	akutní myeloidní leukemie
APL	akutní promyelocytární leukemie
ATRA	α -trans retinová kyselina
BCR	breakpoint cluster region
cDNA	komplementární deoxyribonukleová kyselina
CGH	comparative genomic hybridization = srovnávací genomová hybridizace
CML	chronická myeloidní leukemie
del	delece
DC	dual color
DF	dual fusion
DMs	double minutes
FAB	francouzsko-americko-britská klasifikace akutních leukemií
FAB M2	akutní myeloidní leukémie s vyzráváním
FAB M4	akutní myelomonocytární leukemie
FAB M5	akutní monocytární leukemie
FISH	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
HOK	Hemato-onkologická klinika Fakultní nemocnice v Olomouci
HSR	homogenously staining region
I-FISH	interfázní fluorescenční in-situ hybridizace
inv	inverze
LF UP	Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci
mar	marker chromosom
M-FISH	mnohobarevná fluorescenční in-situ hybridizace
p	krátké rameno chromosomu
PBS	phosphate-buffered saline = fosfátový fyziologický pufr
PCR	polymerase chain reaction = polymerázová řetězová reakce
q	dlouhé rameno chromosomu

RA	retinová kyselina
RT	reverzní transkripce
RT-PCR	reverzní transkripce - polymerázová řetězová reakce
t	translokace

9 Použitá literatura

Adam, Z.; Krejčí, M.; Vorlíček, J. (2008): Hematologie: přehled maligních hematologických nemocí. 2. doplněné a zcela přepracované vydání. Praha 7 : Grada Publishing. 390 s. ISBN 978-80-247-2502-4.

Ageberg, M., Drott, K., Olofsson, T., Gullberg, U. and Lindmark, A. (2008): Identification of a novel and myeloid specific role of the leukemia-associated fusion protein DEK-NUP214 leading to increased protein synthesis. *Genes, Chromosomes and Cancer*. 47: 276–287. doi: 10.1002/gcc.20531

Armstrong, S.A., Staunton, J. E., Silverman, L. B., Pieters, R., den Boer, M.L., Minden, M. D., Sallan, S. E., Lander, E. S., Golub, T. R., Korsmeyer, S. J. (2002): MLL translocations specify a distinct gene expression profile that distinguishes a unique leukemia. *Nature Genet*. 30: 41-47.

Asou, N. (2003): The role of a Runt domain transcription factor AML1/RUNX1 in leukemogenesis and its clinical implications. *Crit Rev Oncol Hematol*. 45:129–150; doi: 10.1016/S1040-8428(02)00003-3.

Baffa, R., Negrini, M., Schichman, S.A., Huebner, K., Croce, C.M. (1995): Involvement of the ALL-1 gene in a solid tumor. *Proc. Nat. Acad. Sci*. 92: 4922-4926.

Bennett, J.M., Catovsky, D., Daniel, M.T., Flandrin, G., Galton, D.A., Gralnick, H.R., Sultan, C. (1985): Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med*. 103:620–625

Boissel, N., Leroy, H., Brethon, B., Philippe, N., de Botton, S., Auvrignon, A., Raffoux, E., Leblanc, T., Thomas, X., Hermine, O., Quesnel, B., Baruchel, A., Leverger, G., Dombret, H., Preudhomme, C., Acute Leukemia French Association (ALFA), Leucémies Aiguës Myéloblastiques de l'Enfant (LAME) Cooperative Groups. (2006): Incidence and prognostic

impact of c-Kit, FLT3, and Ras gene mutations in core binding factor acute myeloid leukemia (CBF-AML). *Leukemia*. 20:965 - 970.

Caspersson, T., Zech, L., Johansson, C. (1970): Differential binding of alkylating fluorochromes in human chromosomes. *Exp Cell Res*. 60:315-319.

Current protocols in human genetics, volume 1 (1999)10.4.1

Current protocols in human genetics, volume 2 (1998)10.2.1-10.2.5

Döhner, H., Estey, E.H., Amadori, S., Appelbaum, F.R., Büchner, T., Burnett, A.K., Dombret, H., Fenaux, P., Grimwade, D., Larson, R.A., Lo-Coco, F., Naoe, T., Niederwieser, D., Ossenkoppele, G.J., Sanz, M.A., Sierra, J., Tallman, M.S., Löwenberg, B., Bloomfield, C.D. (2010): Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*.115:453-474.

Grimwade, D., Walker, H., Oliver, F., Wheatley, K., Harrison, C., Harrison, G., Rees, J., Hann, I., Stevens, R., Burnett, A., Goldstone, A. (1998): The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. *Blood*. 92: 2322–2333.

Huang, G., Shigesada, K., Wee, H.J., Liu, P. P., Osato, M., Ito, Y. (2004): Molecular basis for a dominant inactivation of RUNX1/AML1 by the leukemogenic inversion 16 chimera. *Blood*. 103: 3200-3207.

Chen, Z., Wang, Z.Y., Acute promyelocytic leukemia, In: Pui C.H., editor. (2003): Treatment of acute leukemias: New directions for clinical research. Towtowa (New Jersey). Humana Press. 291–308.

Indrák, K. (2006): Hematologie. Praha/Kroměříž: Triton. 278 s. ISBN 80-7254-868-9.

Krejci, O., Wunderlich, M., Geiger, H., Chou, F.S., Schleimer, D., Jansen, M., Andreassen, P.R., Mulloy, J.C. (2008): p53 signaling in response to increased DNA damage sensitizes AML1-ETO cells to stress-induced death. *Blood*. 111(4):2190-9

Krivtsov, A.V., Armstrong, S.A. (2007): MLL translocations, histone modifications and leukaemia stem-cell development. *Nature Rev. Cancer*. 7: 823-833.

Kuchenbauer, F., Schnittger, S., Look, T., Gilliland, G., Tenen, D., Haferlach, T., Hiddemann, W., Buske, C., Schoch, C. (2006): Identification of additional cytogenetic and molecular genetic abnormalities in acute myeloid leukaemia with t(8;21)/AML1-ETO. *Br J Haematol*. 134(6):616-619.

Lexová, S. (2000): *Hematologie pro zdravotní laboranty*, 1. díl. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví v Brně. 183 s. ISBN 80-7013-304-X.

Liu, P., Tarle, S. A., Hajra, A., Claxton, D. F., Marlton, P., Freedman, M., Siciliano, M. J., Collins, F. S. (1993): Fusion between transcription factor CBF-beta/PEBP2-beta and a myosin heavy chain in acute myeloid leukemia. *Science*. 261: 1041-1044.

Lutterbach, B., Hou, Y., Durst, K.L., Hiebert, S.W. (1999): The inv(16) encodes an acute myeloid leukemia 1 transcriptional corepressor. *Proc. Nat. Acad. Sci*. 96:12822 – 12827.

Marcucci, G., Mrózek, K., Ruppert, A.S., Maharry, K., Kolitz, J.E., Moore, J.O., Mayer, R.J., Pettenati, M.J., Powell, B.J., Edwards, C.G., Sterling, L.J., Vardiman, J.W., Schiffer, Ch.A., Carroll, A.J., Larson, R.A, Bloomfield, C.D. (2005): 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, *JCO*; 24: 5705-5717.

Martinelli, G., Ottaviani, E., Buonamici, S., Isidori, A., Borsaru, G., Visani, G., Piccaluga, P.P., Malagola, M., Testoni, N., Rondoni, M., Nucifora, G., Tura, S., Baccarani, M. (2003):

Association of 3q21q26 syndrome with different RPN1/EVI1 fusion transcripts. *Hematologica*. 88(11):1221-8.

Mayer, J., Starý, J. (2002): *Leukemie*. Praha 7: Grada Publishing. 357 s. ISBN 80-7169-991-8.

Michalová, K. (2000): *Úvod do lidské cytogenetiky*. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví v Brně. 172 s. ISBN 80-7013-281-7.

Miyoshi, H., Shimizu, K., Kozu, T., Maseki, N., Kaneko, Y., Ohki, M. (1991): t(8;21) breakpoints on chromosome 21 in acute myeloid leukemia are clustered within a limited region of a single gene, AML1. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 88: 10431-10434.

National cancer institut. [online]. [cit. 2012-03-19]. Dostupné z: <http://www.cancer.gov/>

Nečas, E. (2006): *Patologická fyziologie orgánových systémů, část 1*. Univerzita Karlova v Praze: Karolinum. 379 s. ISBN 80-246-0615-1.

Nowell, P.C., Hungerford, D.A. (1960): A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science*. 132:1497.

Pecka, M. (2002): *Laboratorní hematologie v přehledu, 1. díl: Buňka a krvetvorba*. Český Těšín: Finidr. 160 s. ISBN 80-86682-01-3.

Pecka, M. (2006): *Laboratorní hematologie v přehledu, 2. díl: Fyziologie a patofyziologie krevní buňky*. Český Těšín: Finidr. 304 s. ISBN 80-86682-02-1.

Pullarkat, S.T., Pullarkat, V., Kroft, S.H., Wilson, C.S., Ahsanuddin, A.N., Mann, K.P., Thein, M., Grody, W.W., Brynes, R.K. (2009): Systemic mastocytosis associated with t(8;21)(q22;q22) acute myeloid leukemia. *J Hematop.* 2(1): 27–33; doi: 10.1007/s12308-009-0023-2

Reikvam, H., Hatfield, K. J., Kittang, A.O., Hovland, R., Bruserud, Ø. (2011): Acute myeloid leukemia with the t(8;21) translocation: Clinical consequences and biological implications. *J Biomed Biotechnol.* Article ID104631,23 pages. Doi:10.1155/2011/104631.

Sandberg, A.A., Meloni-Ehrig, A.M. (2010): Cytogenetics and genetics of human cancer: methods and accomplishments. *Cancer Genetics and Cytogenetics.* 203:102-126.

Seabright, M. (1971): A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet.* 2:971-972.

Shaffer, L.G., Slovak, M.L., Campbell, L.J. (eds). *ISCN (2009): An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (2009). Recommendations of the International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature,* Karger.

Schichman, S.A., Caligiuri, M.A., Gu, Y., Strout, M.P., Canaani, E., Bloomfield, C.D., Croce, C.M. (1994): ALL-1 partial duplication in acute leukemia. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 91: 6236-6239.

Schlenk, R.F., Benner, A., Hartmann, F., del Valle, F., Weber, C., Pralle, H., Fischer, J.T., Gunzer, U., Pezzutto, A., Weber, W., Griminger, W., Preiss, J., Hensel, M., Froehling, S., Doehner, K., Haas, R., Doehner, H. (2003): Risk adapted postremission therapy in acute myeloid leukemia: Result of the German multicenter AML HD93 treatment trial. *Leukemia* 17:1521-1528.

Slovak, M.L., Gundacker, H., Bloomfield, C.D., Dewald, G., Appelbaum, F.R., Larson, R.A., Tallman, M.S., Bennett, J.M., Stirewalt, D.L., Meshinchi, S., Willman, C.L., Ravindranath, Y., Alonzo, T.A., Carroll, A.J., Raimondi, S.C., Heerema, N.A. (2006): A retrospective study of 69 patients with t(6;9)(p23;q34) AML emphasizes the need for a prospective, multicenter initiative for rare 'poor prognosis' myeloid malignancies. *Leukemia.* 20:1295–1297. doi:10.1038/sj.leu.2404233

Snustad, D.P., Simmons, M.J. (2009): Genetika. Brno. Masarykova univerzita. 871 s. ISBN 978-80-210-4852-2.

Swerdlow, S.H., Campo, E., Harris, N.L., Jaffe, E.S., Pileri, S.A., Stein, H., Thiele, J., Vardiman, J.W. eds (2008): WHO classification of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues. IARC, Lyon.

Szotkowski, T., Faber, E., Starý, J., Hubáček, J., Szotkowská, R., Holzerová, M., Jarošová, M., Indrák, K. (2008): Užití all-trans-retinové kyseliny u akutní promyelocytární leukemie – více než úspěšný model cílené léčby v hematologii. *Onkologie*. 2(3):145-149.

Takáčová, S., Jarošová, M., Divoký, V. (2007): Porucha v regulácii chromatinu ako molekulárny mechanizmus MLL-ENL1 leukemogenézy. *Transfúze Hematol*. No. 1, p.16-22.

Tenen, D.G. (2003): Disruption of differentiation in human cancer. AML shows the way. *Nat Rev Cancer*. 3:89–101. doi: 10.1038/nrc989.

Thirman, M.J., Gill, H.J., Burnett, R.C., Mbangkollo, D., McCabe, N.R., Kobayashi, H., Ziemien-van der Poel, S., Kaneko, Y., Morgan, R., Sandberg, A.A., Chaganti, R.S.K., Larson, R.A., Le Beau, M.M., Diaz, M.O., Rowley, J.D. (1993): Rearrangement of the MLL gene in acute lymphoblastic and acute myeloid leukemias with 11q23 chromosomal translocations. *New Eng. J. Med.* 329: 909-914.

Tjio, J.H., Levan, A. (1956): The chromosome number of man. *Hereditas*. 42:1-6.

Vardiman, J.W., Thiele, J., Arber, D.A., Brunning, R.D., Borowitz, M.J., Porwit, A., Harris, N.L., Le Beau, M.M., Hellström-Lindberg, E., Tefferi, A., Bloomfield, C.D. (2009). The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasm and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 114:5.

Vitoux, D., Nasr, R., de The, H. (2007): Acute promyelocytic leukemia: new issues of pathogenesis and treatment response. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39: 1063-1070.

Von Lindern, M., Fornerod, M., van Baal, S., Jaegle, M., de Wit, T., Buijs, A., Grosveld, G. (1992): The translocation (6;9), associated with a specific subtype of acute myeloid leukemia, results in the fusion of two genes, *dek* and *can*, and the expression of a chimeric, leukemia-specific *dek-can* mRNA. *Molec. Cell. Biol.* 12:1687-1697.

Ziemin-van der Poel, S., McCabe, N. R., Gill, H. J., Espinosa, R., III, Patel, Y., Harden, A., Rubinelli, P., Smith, S. D., Le Beau, M. M., Rowley, J. D., Diaz, M. O. (1991): Identification of a gene, *MLL*, that spans the breakpoint in 11q23 translocations associated with human leukemias. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 88: 10735-10739.