

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Bakalářská práce**

**Olomouc 2015**

**Martin Ondra**

**Univerzita Palackého v Olomouci**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Katedra buněčné biologie a genetiky**



**Molekulárně cytogenetická analýza značených  
plasmatických buněk a sledování klonálního  
vývoje chromosomových aberací  
u mnohočetného myelomu**

**Bakalářská práce**

**Martin Ondra**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2015**    **Vedoucí práce: prof. RNDr. Mgr. Marie Jarošová, CSc.**

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracoval zcela samostatně s použitím uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci dne .....

.....

Martin Ondra

## SOUHRN

Bakalářská práce se zabývá studiem chromosomových změn u pacientů s mnohočetným myelomem (MM) a klonálním vývojem těchto aberací u patologických plasmatických buněk.

V teoretické části bakalářské práce jsou shrnuty základní poznatky a informace o hematopoéze, problematice mnohočetného myelomu, současných metodách cytogenetiky a molekulární cytogenetiky, cytogenetických změnách u MM a o jejich klinickém významu.

Praktická část obsahuje soubor 25 pacientů, u kterých byla provedena molekulárně cytogenetická analýza FICTION. Celkový soubor nemocných byl rozdělen na pacienty nově diagnostikované s MM/monoklonální gamapatií nejasného původu (MGUS) (15 pacientů) a pacienty v relapsu/progresi s MM (10 pacientů). Chromosomové změny byly nalezeny u 24 pacientů, z toho u 14 nově diagnostikovaných a 10 pacientů vyšetřených v relapsu/progresi onemocnění. Zmnožení počtu kopií oblasti 1q21 (8 pacientů) a numerické změny počtu chromosomu 15 (8 pacientů) byly nejčastěji detekovanými změnami u nově diagnostikovaných pacientů. U 10 pacientů v relapsu/progresi byla vyhodnocena přítomnost klonálního vývoje, potvrzena byla u 6 z nich. Nejčastější změnou v klonálním vývoji bylo zmnožení oblasti 1q21.

Bakalářská práce potvrdila význam molekulárně cytogenetické analýzy metodou FICTION u nemocných s MM a MGUS.

## **SUMMARY**

This thesis deals with chromosomal changes in patients with multiple myeloma and also deals with clonal evolution of these changes in pathological plasma cells.

The theoretical part of thesis summarizes principal knowledge about hematopoiesis, the issue of multiple myeloma, contemporary methods of cytogenetic and molecular cytogenetic, cytogenetic changes in MM and its clinical meaning.

The experimental part contains group of 25 patients who were examined by molecular cytogenetic analysis FICTION. This group was divided into the patients newly diagnosed with MM/monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) (15 patients) and the patients in relapse/progression of MM (10 patients). Chromosomal aberrations were detected in 24 patients, in 14 patients examined at diagnosis and in 10 patients examined at relapse/progression. The most frequently detected changes in the newly diagnosed patients with MM/MGUS are multiplication of region 1q21 (8 patients) and numerical changes of chromosome 15 (8 patients). The presence of clonal evolution was confirmed in 6 out of 10 examined patients in relapse/progression of MM. The most frequent aberration in clonal evolution were gains 1q21.

This thesis confirmed important of molecular cytogenetic method FICTION in the patients with MM and MGUS.

## **Poděkování:**

Na prvním místě bych rád touto cestou poděkoval paní prof. RNDr. Mgr. Marii Jarošové, CSc. za odborné vedení celé bakalářské práce, cenné rady, čas a za příležitost pracovat na špičkovém pracovišti Hemato-onkologické kliniky Fakultní nemocnice Olomouc.

Dále bych rád chtěl poděkovat celému kolektivu laborantek HOK FN Olomouc. Velké díky patří kolektivu laboratoře cytogenetiky a molekulární cytogenetiky (RNDr. Mileně Holzerové, Ph.D., Mgr. Lence Krůzové, Mgr. Míše Mikešové), který mě mezi sebe přijal a především bych chtěl poděkovat Mgr. Miroslavě Vincové za seznámení s prací v laboratoři, za cenné rady a připomínky.

V neposlední řadě bych rád poděkoval své rodině za psychickou i finanční podporu po dobu mého studia.

# OBSAH

1. CÍLE PRÁCE .....	9
2. ÚVOD .....	10
3. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY .....	11
3.1. Hematopoéza .....	11
3.2. Mnohočetný myelom .....	12
3.2.1. Patogeneze MM .....	13
3.2.2. Diagnostika .....	15
3.2.3. Léčba .....	17
3.3. Cytogenetika a molekulární cytogenetika .....	18
3.3.1. Klasická cytogenetika .....	19
3.3.2. Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace (FISH) .....	20
3.3.3. FICTION (fluorescenční imunofenotypizace a interfázní <i>in situ</i> hybridizace) .....	21
3.3.4. Metoda mnohobarevné FISH a mnohobarevného pruhování .....	22
3.3.5. CGH (komparativní genomová hybridizace) a aCGH (array komparativní genomová hybridizace) .....	23
3.4. Cytogenetické změny u MM .....	24
3.4.1. Translokace genu <i>IGH</i> .....	25
3.4.2. Delece genu <i>RBI</i> na chromosomu 13 .....	27
3.4.3. Změny chromosomu 1 .....	28
3.4.4. Delece genu <i>TP53</i> na chromosomu 17 .....	29
3.4.5. Změny počtu chromosomů .....	30
3.4.6. Intraklonální heterogenita u MM .....	31
4. MATERIÁL A METODIKA .....	32
4.1. Odběr a zpracování materiálu .....	32
4.1.1. Fixace buněk kostní dřeně .....	33
4.1.2. Převedení suspenze fixovaných buněk do alkoholu .....	35
4.2. FICTION .....	36
4.2.1. Imunofluorescenční značení plasmatických buněk .....	36
4.2.2. Interfázní fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace (i-FISH) .....	38
4.3. Vyhodnocení preparátů .....	39
5. VÝSLEDKY .....	40
5.1. Soubor nově diagnostikovaných pacientů .....	42
5.2. Soubor pacientů v relapsu/progresi (sledování klonálního vývoje) .....	45
6. DISKUZE .....	49

7. ZÁVĚR .....	51
8. LITERATURA.....	52
9. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....	62



## **1. CÍLE PRÁCE**

- 1.** Vypracování rešerše bakalářské práce na téma molekulárně cytogenetická analýza značených plasmatických buněk a sledování klonálního vývoje chromosomových aberací u mnohočetného myelomu (MM).
- 2.** Shrnutí základních informací o MM, molekulárně cytogenetických metodách a cytogenetických změnách u pacientů s MM.
- 3.** Monitorování chromosomových aberací a klonálního vývoje pomocí metody FICTION na souboru pacientů s MM.

## 2. ÚVOD

Více než 50 let uplynulo od přesného určení počtu lidských chromosomů v roce 1956 (Thio *et* Levan, 1956). Od této doby se cytogenetika rozvíjela od počátečního konvenčního barvení, přes pruhování až po nejnovější molekulárně cytogenetické metody, jakou je např. array komparativní genomová hybridizace. Kombinací těchto metod se cytogenetika stala nepostradatelným nástrojem pro diagnostiku různých vrozených a získaných chromosomových změn (Kannan *et* Zilfalil, 2009). Cytogenetické studie přispěly významným dílem k identifikaci opakujících se chromosomových abnormalit u různých typů nádorů (leukémie, lymfomy, solidní nádory). Tyto určené genetické změny se staly důležitým kritériem v klinické diagnostice a při určení prognózy řady nádorů (Sandberg *et al.*, 2010).

Mnohočetný myelom (MM) je geneticky komplexní onemocnění, které je jako každý nádor spojeno s vícestupňovým procesem kumulace genetických změn v průběhu času. Tento vícestupňový proces umožňuje u MM diagnostikovat klinické fáze, které se během vývoje liší biologickými parametry. První z těchto fází se nazývá monoklonální gamapatie nejasného významu (MGUS). Toto premaligní stádium je asymptomatické a vyznačuje se malou klonální populací plasmatických buněk v kostní dřeni. (Prideaux *et al.*, 2014). Z MGUS se vyvíjí doutnající mnohočetný myelom (SMM), který je další asymptomatickou fází a od MGUS se liší větším počtem dřevových nádorových plasmatických buněk > 10 % (Kyle *et* Rajkumar, 2009). Následující fází je samotný symptomatický mnohočetný myelom (MM), kdy maligní klony způsobují orgánové postižení včetně hyperkalcémie, renální dysfunkce, anémie a onemocnění kostí. Konečnou fází vývoje je plasmacelulární leukémie (PCL), agresivní fáze, která je charakterizovaná existencí extramedulární klonů a rychlou progresí onemocnění končící smrtí (Prideaux *et al.*, 2014).

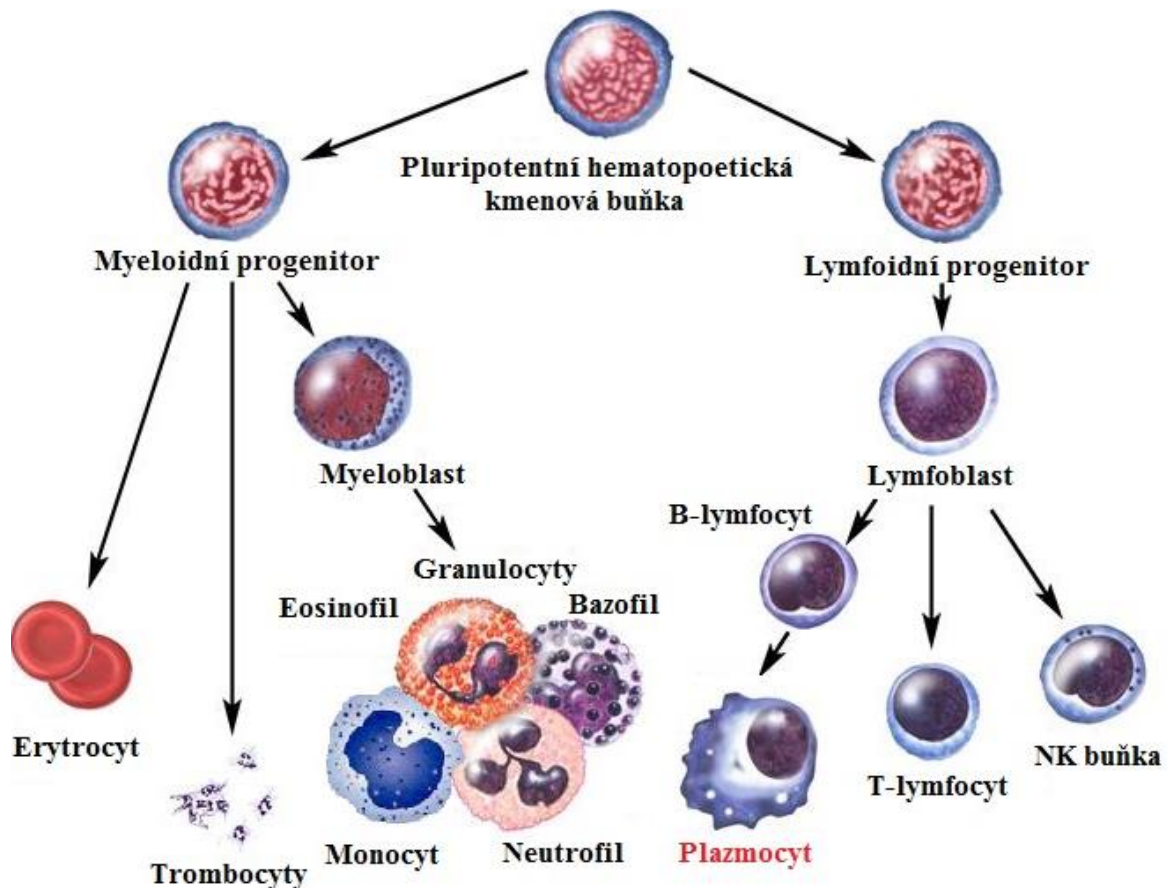
### 3. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

#### 3.1. Hematopoéza

Během života jedince probíhá krvetvorba ve dvou odlišných fázích. Jedná se o prenatální (předporodní) fázi a postnatální (poporodní), která trvá až do smrti. Jednotlivá období se od sebe liší místem krvetvorby a odlišným způsobem vzniku krvinek (Pecka, 2002). Vytvoření a udržování krevního systému v homeostáze závisí na sebe obnovujících se krvetvorných kmenových buňkách (HSC), které jsou za normálních okolností umístěny v malém množství v kostní dřeni dospělých jedinců (Orkin, 2008). Vzhledem k tomu, že zralé krvinky jsou převážně krátko žijící, kmenové buňky po celou dobu života doplňují progenitory a prekurzory jednotlivých hematopoetických linií. Z progenitorů následně vznikají diferenciací zralé krevní buňky (obr. 1), kterými jsou např. erytrocyty, megakaryocyty, myeloidní buňky (monocyty, makrofágové a neutrofilny) a lymfocyty (Orkin, 2000).

Tvorba lymfoidních krevních buněk (různé typy lymfocytů, plasmocyty, buňky podpůrných tkání) se nazývá lymfopoéza. Kostní dřeň a brzlík (*thymus*) jsou primární lymfatické orgány, kde lymfocyty vznikají a vyvíjí se z mateřských lymfoidních kmenových buněk. Vzniklé lymfoidní krevní elementy jsou transportovány v periferní krvi do sekundárních lymfatických orgánů (slezina, lymfatické uzliny, tonzily, lymfatická tkáň sliznic), kde dozrávají a dostávají se do kontaktu s antigeny (Buliková, 2000; Pecka, 2002).

Z B-lymfocytů vznikají po setkání s antigenem paměťové a plasmatické buňky. Plasmocyty (plasmatické buňky) produkují protilátky a mají velmi důležitou roli v humorální imunitě. Vývojová stádia aktivovaných B-lymfocytů antigenem jsou plasmoblast, proplasmocyt a plasmocyt (Pecka, 2002).



Obr. 1: Zjednodušené schéma hematopoézy (upraveno podle Winslow, 2008)

### 3.2. Mnohočetný myelom

Mnohočetný myelom (MM) je klonální onemocnění plasmatických buněk a tvoří asi 10 % všech hematologických malignit. Vznik MM je zapříčiněn maligní transformací B-lymfocytů ve folikulu lymfatické tkáně a nekontrolovatelnou klonální proliferací maligních plasmablastů a plasmatických buněk v kostní dřeni. Mikroprostředí kostní dřene má také klíčovou úlohu v patogenezi myelomových nádorových buněk (Raab *et al.*, 2009; Adam *et al.*, 1999). Vznik MM je většinou podmíněn vznikem pre-maligního nádorového onemocnění zvaného monoklonální gamapatie nejasného původu (MGUS) (Kyle *et al.*, 2003). Monoklonální gamapatie jsou obvykle bez příznaků, ale mohou někdy způsobovat primární amyloidózy v důsledku patologické kumulace monoklonálních imunoglobulinů (Ig) v postižených tkáních (Abraham *et al.*, 2003). MGUS je stabilní onemocnění, přičemž šance na přeměnu v MM každý rok stoupá o 0,6 až 3 % v závislosti na typu

monoklonálního imunoglobulinu (Ig) a u 1/3 nemocných dojde k vývoji MM (Kyle *et al.*, 2002). Současné poznatky o patogenezi MM ukazují, že vzniku MM předchází stádium MGUS (Prideaux *et al.*, 2014).

Průměrný věk při diagnóze MM je přibližně 62 let u mužů a 61 let u žen. Pouze 2 % pacientů jsou mladších 40 let. Onemocnění častěji postihuje muže než ženy a jeho výskyt je dvakrát častější u negroidní rasy než u europoidní. Příčina nerovnoměrného výskytu mezi rasami a pohlavím je zatím neznámá (Raab *et al.*, 2009). Medián přežití při aplikaci konvenční léčby se pohybuje v rozmezí 3 - 4 let, při léčbě a následné autologní transplantaci kmenových buněk může medián přežití stoupnout až na 5 - 7 let (Munshi, 2008). Přes významné pokroky v léčbě nemocných s MM, zůstává zatím toto onemocnění nevléčitelné (Dispenzieri *et al.*, 2005; Kyle *et al.*, 2003).

### 3.2.1. Patogeneze MM

Vznik a vývoj MM je charakterizován kumulací řady získaných genetických změn. Tyto změny můžeme rozdělit do dvou, více či méně vzájemně se vylučujících onkologických událostí. Přibližně v polovině případů dochází k translokacím lokusů těžkého imunoglobulinového řetězce (*IGH*) s různými partnerskými geny, kterými mohou být např. *cyklin D1 (CCND1)*, *cyklin D3 (CCND3)* nebo gen *FGFR3*. Druhá polovina případů je charakterizována zmnožením počtu chromosomů - hyperdiploidii s nejčastěji duplikovanými chromosomy 5, 7, 9, 11, 15, 19, a 21 (Liebisch *et al.*, 2006).

B-lymfocyty během svého vývoje prodělávají tři procesy modifikace DNA v genu *IGH* (obr. 2). Jedná se o: VDJC rekombinaci, somatickou hypermutaci (SHM) a tzv. „class switch rekombinaci“ (CSR) (Němec *et al.*, 2008). Nezralé B-lymfocyty s funkčními IgM receptory, které byly vytvořeny VDJC rekombinací, opouští kostní dřeň a vstupují do sekundární lymfatické tkáně jako zralé B-buňky. Při interakci s antigenem část lymfoblastů proliferuje a diferencuje na plasmatické buňky s krátkým poločasem života. Tyto krátkou dobu žijící plasmatické buňky exprimují IgM protilátky. V rámci primární imunitní odpovědi, lymfoblasty stimulované antigenem procházejí somatickou hypermutací a CSR v germinálních centrech lymfatických tkání. Buňky, které neexprimují imunoglobulinové receptory podstoupí apoptózu, zatímco zbývající buňky, které exprimují imunoglobulinové

receptory na svém povrchu se diferencují do paměťových B-buněk nebo do post-germinálních plasmablastů (Hallek *et al.*, 1998; Kuehl *et Bergsagel*, 2002).

Vysoký výskyt nádorů vzniklých z post-germinálních B-lymfocytů naznačuje, že chybná přestavba DNA je zásadní událost ve vývoji lymfoproliferativních onemocnění (Küppers *et al.*, 2001; Willis *et Dyer*, 2000).

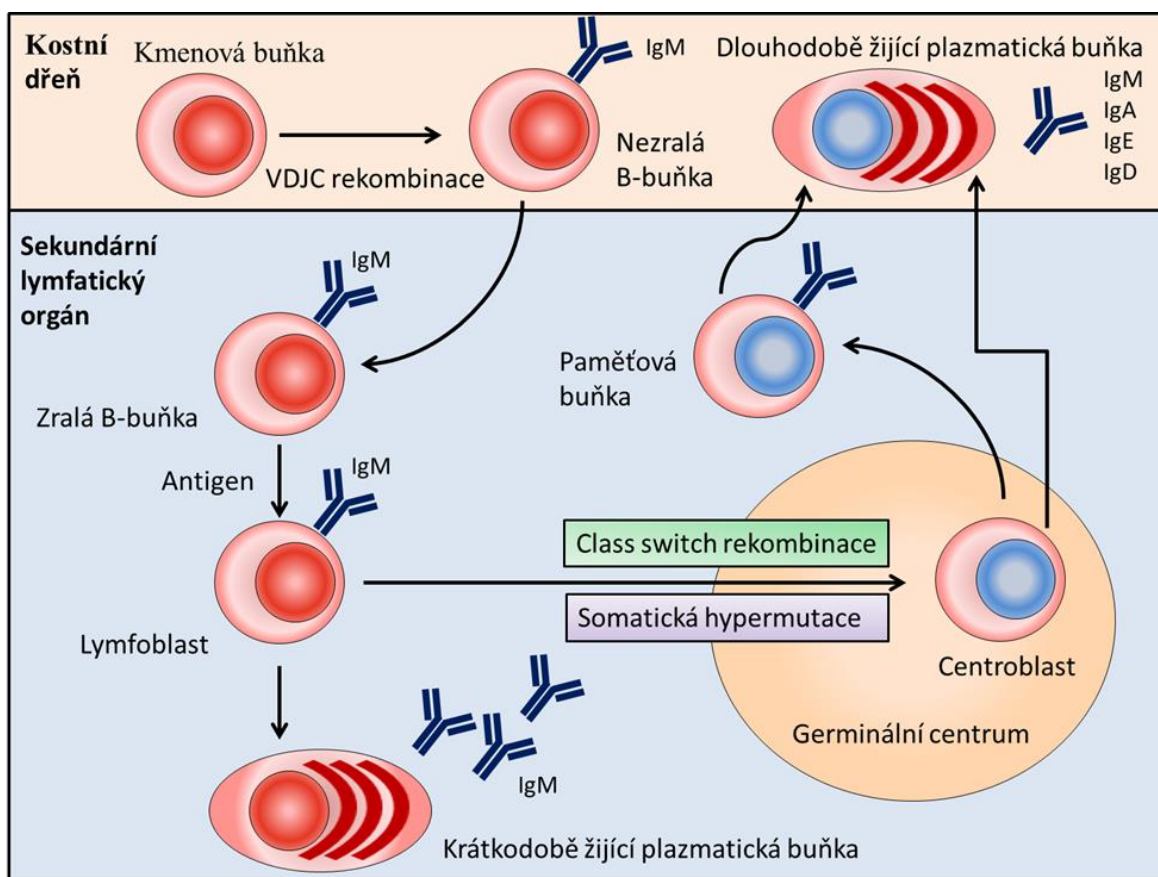
Byly provedeny analýzy sekvencí DNA genu *IGH* myelomových buněk, které potvrdily somatickou hypermutaci v těchto buňkách, což znamená, že buňky MM prošly germinálními centry, neboť sekvence DNA kódující variabilní oblast imunoglobulinového řetězce (VDJ segment) je v porovnání s ostatními zralými B-buňkami značně mutována. Myelomové buňky jednoho pacienta vykazují mezi sebou minimální heterogenitu mutací v *IGH* genu.

Z hlediska patogeneze myelomu je nejzásadnějším procesem tzv. class switch rekombinace (CSR) DNA. Tato rekombinace může proběhnout dvěma způsoby: legitimně (fyziologicky), kdy dochází k přesmyku isotypu vznikajícího imunoglobulinu z jedné třídy do druhé (např. z IgM do IgA) nebo nelegitimně (patologicky), jejímž výsledkem mohou být chromosomové translokace. Tyto translokace způsobují narušení regulace přítomných onkogenů na derivovaných chromosomech a vedou přímo nebo postupně k maligním transformacím B-buněk. (Němec *et al.*, 2008).

Buňky MM tedy vznikají z post-germinálních plasmablastů, které prošly všemi procesy modifikace DNA v *IGH* genu. Tyto buňky migrují do prostředí kostní dřeně, kde se vlivem prostředí mohou přeměnit na dlouho žijící plasmatické buňky (Shapiro-Shelef *et al.*, 2005). Maligní plasmablastické buňky mají zachovanou schopnost migrace a dělení, avšak zralá plasmatická buňka, která je terminálním stádiem, dále již neproliferuje a pouze sekretuje monoklonální imunoglobuliny. Hlavním rozdílem mezi fyziologickým a myelomovým procesem maturace plasmablastů je nekontrolovatelná proliferace a dlouhověkost u myelomové vývojové řady buněk, které jsou téměř nesmrtelné (Adam *et al.*, 1999).

Zásadní roli ve vývoji a progresi MM má mikroprostředí kostní dřeně. Přímé spojení mezi buňkami MM a buňkami stromatu kostní dřeně (KD), nebo extracelulárními matrix proteiny je uskutečňováno pomocí buněčných receptorů, kterými jsou např. integriny, kadheriny, selektiny a imunoglobulinové rodiny molekul buněčné adheze. Oba typy interakcí přímo zvyšují růst, přežití, migraci, odolnost myelomových buněk proti lékům a modulují funkci buněk stromatu kostní dřeně, např. zvýšením sekrece cytokinů (Raab *et al.*, 2009).

Adheze myelomových buněk k extracelulárním matrix proteinům kostní dřene, mezi které řadíme např. kolagen, fibronectin, laminin a vitronektin, způsobuje produkci a sekreci cytokinů a růstových faktorů. Nejvýznamnějšími jsou interleukin 6 (IL-6), VEGF a IGF (Podar *et al.*, 2005).



Obr. 2: Vývoj plazmatické buňky (upraveno podle Kuehl *et* Bergsagel, 2002)

### 3.2.2. Diagnostika

Diagnosa MM je laboratorně založena na určení abnormálních monoklonálních plazmatických buněk v kostní dřeni a na záchytu M-proteinu v séru nebo v moči (Kyle *et* Rajkumar, 2009).

Mezi typické klinické příznaky MM patří únava z důvodu anémie, opakující se infekce a bolesti kostí, které jsou výsledkem osteolytických lézí nebo zlomenin. Osteolytické léze patří mezi jeden s charakteristických rysů MM a jsou přítomny asi u 70 % pacientů. U 15 až 30 % pacientů je zjištěna hyperkalcemie a renální nedostatečnost,

kteřá je způsobena srážením monoklonálních lehkých řetězců ve sběrných kanálcích. U 10 % pacientů se mohou vyskytnout další méně časté příznaky, kterými jsou např. periferní neuropatie, krvácení, dušnost a hyperviskozní syndrom (Kyle *et al.*, 2003).

Obvykle je prováděno několik vstupních screeningových vyšetření u pacientů s podezřením na MM. Mezi tyto vyšetření patří radiografické vyšetření skeletu (zaměřené na bolestivé oblasti), kompletní krevní obraz, sedimentace erytrocytů, test viskozity krevní plasmy, elektroforéza krevního séra, obsah elektrolytů, koncentrace močoviny, kreatinu, vápníku, albuminů, kyseliny močové v séru nebo plasmě, kvantitativní vyšetření normálních imunoglobulinů a vyšetření přítomnosti lehkých řetězců v moči (Bradwell *et al.*, 2003).

Pro rozlišení klinických stádií MM existují dva základní systémy, které rozdělují MM dle určitých kritérií. V minulosti byl používán diagnostický systém podle Durie-Salmona, který byl vyvinut přibližně před 30 lety a vychází z teorie, že je možné matematicky odvodit celkový počet myelomových buněk a objem nádoru podle množství imunoglobulinů, který vytvoří každá plasmatická buňka, a podle poločasu rozpadu cirkulujících imunoglobulinů. Takto vypočtený objem nádoru je korelován s individuálními klinickými testy k definování klinického stádia. Pacienti jsou dle výsledků rozděleni do stádií I – III. Nedávno International Myeloma Working Group (IMWG) zavedla nový systém klasifikace MM, International staging system (ISS), který je založen na měření množství  $\beta 2$  mikro-globulinů a sérových albuminů. Tento způsob klasifikace MM však neposkytuje informace o rozsahu nádorové masy v organismu (Kyle *et Rajkumar*, 2009).

Průtoková cytometrie aspirátu kostní dřeně nám slouží k zjištění fenotypu plasmatických buněk a potvrzení klonality (Smith *et al.*, 2005). Odlišit normální fenotyp plasmatické buňky od myelomového můžeme díky identifikaci exprimovaných antigenů na povrchu cytoplasmatické membrány. Klasicky exprimovanými antigeny u B-lymfocytů jsou CD19-24, CD40, CD72 a CD79. Myelomové buňky exprimují odlišné antigeny než normální plasmatické buňky. Plasmatické buňky MM typicky exprimují CD138, CD38 a cytoplasmatické lehké řetězce imunoglobulinů. Zřídka exprimují antigen CD19, čímž se liší od ostatních lymfomů (Mahindra *et al.*, 2010; LeBien *et Tedder*, 2008).

Obdobně jako u jiných hematologických onemocnění mají cytogenetické a molekulárně cytogenetické analýzy prognostický význam pro pacienty s MM. Zlepšení znalostí v biologii MM má zásadní vliv na zlepšení léčby, např. při výběru optimální léčby pro každého pacienta, nebo při vývoji nových léků (Avet-Loiseau, 2007).



Chromosomální změny u pacientů s MM jsou nejčastěji detekovány fluorescenční *in situ* hybridizací v interfázních buňkách (i-FISH), protože proliferační aktivita myelomových buněk *in vitro* je nízká, tudíž získat metafáze nádorových plasmocytů je obtížné. Speciální metoda i-FISH pro detekování chromosomální změny u pacientů s MM se označuje FICTION (fluorescenční imunofenotypizace a interfázní *in situ* hybridizace) (Avet-Loiseau, 2007; Weber-Matthiesen *et al.*, 1992).

Současná molekulární cytogenetika MM využívá také microarray technologie, které dovolují analýzu celého genomu, avšak určují pouze změny v počtu kopií genů nebo chromosomů (Avet-Loiseau, 2007).

### 3.2.3. Léčba

První účinná léčba MM byla popsána v 60. letech 19. století a jednalo se o kombinaci léků melfalanu a prednisonu. Účinnost kombinace těchto látek byla zvýšena společně se zavedením autologní transplantace kmenových buněk (ASCT) (Kyle *et Rajkumar*, 2008).

Nicméně léčba mnohočetného myelomu se nejrazantněji změnila v posledních deseti letech, kdy došlo k nárůstu možných kombinací léků, které mohou být použity jak při první linii léčby tak i při relapsu MM. Do konce 90. let 20. století byl medián přežití u pacientů s MM cca 3 roky. Zavedením nových aktivních látek jako jsou thalidomid, bortezomib, lenalidomid v kombinaci s autologní transplantací kmenových buněk (ASCT) se od té doby medián přežití zvýšil přibližně na 5 let (Rajkumar, 2011).

Navzdory všem pokrokům v léčbě dochází vždy k relapsu u MM a prozatím je stále nevléčitelnou chorobou. Kromě toho léky thalidomid, bortezomib a lenalidomid jsou spojeny s různými nežádoucí vedlejší účinky, a proto je naléhavě nutná identifikace nových terapeutických cílů a odvození silnějších, ale méně toxických léčiv (Podar *et al.*, 2009).

### 3.3. Cytogenetika a molekulární cytogenetika

Do 70. let 20. století byly chromosomy rozlišovány pouze na základě velikosti a polohy centromery. Tímto způsobem mohly být chromosomy rozděleny do skupin, ale nemohly být přesně identifikovány. Jednou z klíčových událostí v cytogenetice bylo zavedení pruhovacích technik, díky kterým mohly být přesně určeny jednotlivé chromosomy. Přesněji také mohly být zjištěny translokace, chromosomální delece a další změny ve struktuře chromosomů. Celkový počet chromosomů v jádře buňky a jejich konstituce je znázorňován karyotypem. Normální karyotyp muže je 46,XY a ženy 46,XX (Strachan *et* Read, 1999). Pro přesné určení chromosomových změn mělo velký význam zavedení pruhovacích metod, kterými jsou G-, R-, Q- nebo C- pruhování. První pruhovací metodu pro určení chromosomové translokace použila J. Rowleyová v roce 1973. Mechanismus vzniku pruhů není doposud přesně objasněn (Snustad *et* Simmons, 2009). Tmavé pruhy vznikají v oblasti s vysokou přítomností adeninu a thyminu. Těmto pruhům se říká G-pozitivní. Rovněž se předpokládá, že se jedná o oblast s vysokým stupněm kondenzace a k její replikaci dochází až v poslední syntetické fázi buněčného cyklu. G-pruhy obsahují hodně disulfidových proteinů. G-negativní pruhy obsahují sulfhydrylové proteiny (Lexová *et al.*, 2000).

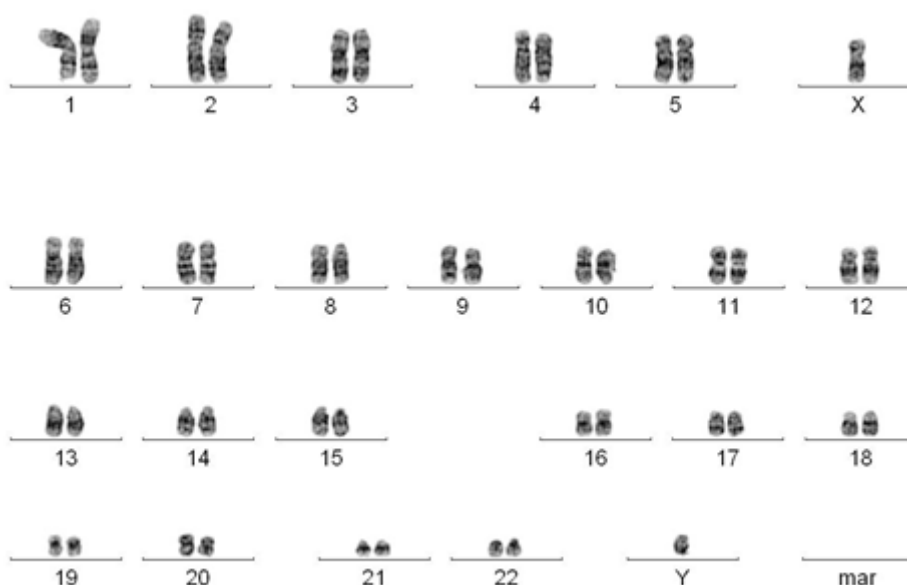
Existuje mnoho chromosomových aberací, které nejsou metodami klasické cytogenetiky detekovány. Pro rozpoznání takovýchto aberací je nutné použít metody molekulární cytogenetiky. Základní technikou molekulární cytogenetiky je fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH). Princip této metody spočívá v detekci specifických DNA sekvencí pomocí fluorescenčně značených sond. V průběhu let se vyvinuly metody, které jsou založeny na základním principu metody FISH. Mezi tyto metody řadíme např. vícebarevnou fluorescenční *in situ* hybridizaci (mFISH), komparativní genomovou hybridizaci (CGH) nebo array CGH (aCGH) (Wan, 2010).

### 3.3.1. Klasická cytogenetika

Klasická cytogenetika se zabývá studiem chromosomových změn. Nejčastěji používanými buňkami pro hematologická studia jsou leukocyty (Todd *et al.*, 2000). Rozdílné techniky pruhování umožňují nejen přesnou identifikaci každého chromosomu, ale také se pomocí nich detekují strukturální chromosomové přestavby. Kombinací několika pruhovacích metod získáme přesnější informace, potřebné pro chromosomální analýzy. Nejpoužívanější metodou v klasické cytogenetice se stalo G-pruhování, při kterém jsou oblasti na chromosomech barveny Giemsa roztokem (Kannan *et al.*, 2009)

Pro provedení základního cytogenetického vyšetření se používají dělící se buňky (nejčastěji v metafázi), ve kterých můžeme vizualizovat chromosomy. Při zakládání kultur jak krátkodobých (kostní dřeň), tak dlouhodobých je nezbytné použít vzorky co nejdříve po odběru (Sandberg *et al.*, 2010). Metody klasické cytogenetiky mohou být provedeny pouze na mitotických chromosomech, na rozdíl od metod molekulární cytogenetiky, které mohou být provedeny i na interfázních jádrech (Vorsanova *et al.*, 2010).

Pro hodnocení preparátů a sestavení karyotypu (obr. 3) je v současnosti používán mikroskop s digitální kamerou a počítačovou analýzou obrazu (Michalová, 1999). Karyotyp je sestaven podle počtu a struktury pruhů na chromosomech (Todd *et al.*, 2000).



Obr. 3: Karyotyp muže; 46,XY (převzato z HOK FNOL)

### 3.3.2. Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH)

Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) je založena na denaturaci a renaturaci DNA a navázání sond ke komplementárním úsekům DNA cílového genetického materiálu, kterým mohou být jak metafázní chromosomy, tak interfázní jádra buněk (Tönnies, 2002). Nabízí nám možnost studia jak celého genomu, tak specifických genomových oblastí (Vorsanova *et al.*, 2010). Pomocí FISH můžeme stanovovat a identifikovat numerické aberace (aneuploidie), submikroskopické přestavby, derivované chromosomy a chromosomové zlomy (Carpenter, 2001). Princip této molekulárně cytogenetické metody spočívá v denaturaci dvoušroubovice DNA teplotou nebo chemickou látkou, kdy dochází k zániku vodíkových můstků (denuraci) mezi vlákny DNA, které se od sebe oddělují. Jestliže při postupném snižování teploty dojde k setkání značených komplementárních řetězců sond s řetězcem DNA, mohou za příznivých podmínek (teplota, molarita) vytvořit zpětně dvouvláknovou DNA na základě komplementarity bází (Michalová, 1999). Fluorescenční signály navázaných sond je možné pozorovat ve fluorescenčním mikroskopu s použitím odpovídajících fluorescenčních filtrů (Tönnies, 2002). Pro klinické studie jsou používány čtyři základní kategorie DNA sond:

- **sondy jedinečných sekvencí DNA** detekují specifické sekvence v cílové DNA, které jsou přítomny pouze v jedné kopii a neopakují se v genomu. Sondy se mohou skládat z jednotlivých genů nebo DNA fragmentů, u kterých známe přesné umístění v určité chromosomové oblasti. Sondy jsou použitelné při detekci delecí nebo duplikací konkrétních oblastí chromosomů, oblastí zlomů u translokací a při amplifikacích genů.
- **sondy telomerické** se používají při studiu kryptických delecí a translokací, které nejsou viditelné klasickými pruhovacími metodami. Váží se na repetitivní sekvence na koncích chromosomů.
- **sondy satelitních sekvencí (centromerické)** obsahují repetitivní sekvence DNA, které se nacházejí především v oblasti centromery. Vyžadují kratší dobu hybridizace a vytváří intenzivní signály na metafázních chromosomech i v interfázních buněčných jádrech. Jsou užitečné zejména v případech, které vyžadují detekci numerických abnormalit např. aneuploidie, při posouzení výsledků transplantace kostní dřeně v případě

kdy pohlaví u dárce a příjemce není stejné a pro stanovení minimální reziduální nemoci po léčbě u pacientů s leukémií.

- **celochromosomové sondy („paintingové“ sondy)** vznikají kombinací velkého množství jedinečných a repetitivních sekvencí DNA, které jsou na jednom chromosomu. Fluorescenční signál je pozorovatelný po celé délce chromosomu. Sondy jsou aplikovány na metafázní chromosomy pro identifikaci neznámých (marker) chromosomů a komplexních přestaveb. **Všechny tyto typy sond jsou komerčně dostupné** (Carpenter, 2001).

### 3.3.3. FICTION (fluorescenční imunofenotypizace a interfázní *in situ* hybridizace)

Metoda FICTION (fluorescence immunophenotyping and interphase cytogenetic as a tool for the investigation of neoplasm) jako důležitý nástroj pro vyšetřování pacientů s MM, předchází falešnému hodnocení buněk v KD, které nejsou plasmatickými buňkami (Weber-Matthiesen *et al.*, 1992; Wang *et al.*, 2008).

Ve skutečnosti se jedná o kombinaci metod fluorescenční imunofenotypizace a interfázní FISH (i-FISH), které jsou současně provedeny na všech buňkách KD. Při imunofenotypizaci jsou k identifikaci plasmocytů používány přímé AMCA-konjugované protilátky proti lidským  $\kappa$  nebo  $\lambda$  lehkým imunoglobulinovým řetězcům. Metoda i-FISH je prováděna dle standardního postupu. Metoda FICTION je nezbytným nástrojem v moderních cytogenetických laboratořích pro detekci chromosomových aberací při diagnostice KD pacientů s MM (Leung *et al.*, 2012).

### 3.3.4. Metoda mnohobarevné FISH a mnohobarevného pruhování

V posledním desetiletí byly zavedeny nové molekulárně cytogenetické techniky, které vycházejí ze základních principů fluorescenční *in situ* hybridizace. Mezi tyto metody řadíme mnohobarevnou (multiplex) FISH (mFISH), spektrální karyotypizaci (SKY) a vícebarevné pruhovací techniky (mBAND). Metody mnohobarevné fluorescenční *in situ* hybridizace se staly nepostradatelnými hlavně při detekci komplexních chromosomových přestaveb (Liehr *et al.*, 2004).

SKY a mFISH umožňují vizualizaci všech 22 párů autozomů a pohlavních chromosomů X a Y lidského karyotypu v jednotlivých barvách během jednoho hybridizačního experimentu (Lichter, 1997). Obě tyto techniky jsou založeny na kombinatorickém značení všech lidských chromosomů pomocí celochromosomových barvicích sond, které využívají 5 spektrálně odlišných flouorchromů. Celkový počet dosažitelných barev (N) je dán rovnicí  $N = 2n - 1$ , kde n je počet spektrálně odlišných flouorchromů. Chromosomy jsou dále pomocí počítačového programu vizualizovány v 24 pseudobarvách (Kearney, 2006).

Metody mFISH a SKY se liší pouze ve způsobu zpracování výsledků hybridizace sondy s genetickým materiálem. Při vyhodnocení mFISH se mikroskopický obraz snímá postupně CCD kamerou s využitím šesti různých optických filtrů. Po analýze jednotlivých šesti obrazů následuje komplexní analýza pomocí specifického softwaru (Kearney, 2006). SKY zaznamenává fluorescenci všech sond v jeden okamžik spektrálním zobrazovacím systémem, který se skládá z interferometru a CCD kamery. Zachycené světlo se přenáší pomocí CCD kamery do interferometru, kde je zjištěno jeho složení. Emitované světelné spektrum je nakonec vyhodnoceno počítačovým programem (McNeil *et Ried*, 2000).

Do nedávné doby, byly zlomy a intrachromosomální přestavby chromosomů identifikovány pouze klasickými barvicími technikami, kterými jsou například G- nebo R-pruhování. Nicméně, bylo těžké identifikovat všechny tyto změny pomocí pruhů dvou barev. Díky nízké rozlišovací schopnosti byly často složitější chromosomové přestavby nesprávně interpretovány. S příchodem vícebarevné pruhovací techniky (mBAND) byla tato omezení překonána (Chudoba *et al.*, 1999).

Mnohobarevné pruhování vytváří řadu podélných barevných pruhů podél osy chromosomu. Použity jsou specifické dílčí barvy pro danou oblast v kombinaci s kvantitativní analýzou poměru těchto barev. Každý pruh je vytvořen pomocí jedinečné kombinace flouorchromů a částečně se překrývá se sousedním pruhem, aby docházelo

k vytvoření kontinuálního přechodu podél osy chromosomu. Pseudobarvy jsou přiřazeny chromosomovým úsekům, které mají podobný barevný poměr, a nezávisí na kondenzaci chromosomů. Pouze jeden chromosomový pár je napruhován pomocí pruhování, všechny ostatní chromosomy jsou obarvené pomocí DAPI. V zásadě, metoda mBAND je schopna detekovat jakoukoliv přestavbu vedoucí ke ztrátě nebo přeskupení barevných pruhů, a proto mBAND může být použita k analýze inter- a intrachromosomových aberací současně (Hada *et al.*, 2011).

### **3.3.5. CGH (komparativní genomová hybridizace) a aCGH (array komparativní genomová hybridizace).**

Komparativní genomová hybridizace patří mezi techniky, kterými můžeme detekovat nebalancované genetické změny v celém genomu. Princip této metody spočívá ve srovnání DNA izolované ze vzorku (testované DNA) a DNA z normálních buněk (referenční DNA). Pomocí této metody lze identifikovat všechny chromosomové oblasti, ve kterých došlo ke ztrátě, nebo zmnožení genetického materiálu. K provedení této metody jsou používány normální metafázní chromosomy (Nacheva *et al.*, 1998).

Ve snaze překonat některé z omezení tradiční CGH, byla vyvinuta novější metoda, která kombinuje principy CGH, avšak chromosomy jsou nahrazeny mikročipem (Skena *et al.*, 1995). Čipy jsou vytvořeny upevněním malého množství DNA (sondy) na pevný nosič, jako je např. podložní sklíčko, v přesně určeném pořadí. Velikost použitých sond se liší a může se jednat o oligonukleotidy (25 - 85 párů bází) nebo dokonce i o genomické klony (80,000 - 200,000 párů bází). Vzhledem k tomu, že sondy jsou o několik řádů menší než metafázní chromosomy, je rozlišení aCGH vyšší. Princip metody je shodný s klasickou CGH, kdy je rozdílně značena normální a nádorová DNA hybridizována na mikročip. Podle poměru fluorescence testovaných a referenčních hybridizačních signálů můžeme stanovit počet kopií určitých sekvencí v genomu (Theisen, 2008).

### 3.4. Cytogenetické změny u MM

U pacientů s MM se ve většině případů, podobně jako u pacientů s ostatními hematologickými malignitami, setkáváme se specifickými strukturními a početními abnormalitami chromosomů (Kuglík *et al.*, 2006). Vědecké studie za použití molekulárně cytogenetických metod odhalily, že v plasmatických buňkách mohou být přítomny různé chromosomové aberace, což způsobuje klinickou heterogenitu MM (Rajkumar *et Kyle*, 2005).

Chromosomové translokace genu pro těžký řetězec imunoglobulinu (*IGH*), který se nachází na 14. chromosomu v oblasti 14q32, jsou nejčastějšími strukturními přestavbami. Ovšem přibližně u 2/3 pacientů s MM se setkáváme pouze s početními odchylkami chromosomů (aneuploidie) (Kuglík *et al.*, 2006).

Podle genetických změn, které ovlivňují patogenezi plasmatických buněk, můžeme MM rozdělit na hyperdiploidní a non-hyperdiploidní podtyp. Non-hyperdiploidní typ MM je charakterizován přítomností translokací, které zahrnujících přestavbu genu pro těžké řetězce imunoglobulinů (*IGH*) a monosomii chromosomu 13, nebo jen delecí jeho dlouhého ramene (oblast 13q14). Obecně je tento typ asociován s kratší délkou života pacientů, protože se jedná o více agresivní typ onemocnění. Pro hyperdiploidní subtyp MM jsou typické trisomie chromosomů 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19, zatímco jen zřídka jsou detekovány translokace genu *IGH* (Hideshima *et al.*, 2004).

Hyperdiploidní a nonhyperdiploidní změny se vyskytují již v počátečních fázích onemocnění (již i u MGUS) a jsou považovány za iniciační mutagenní události tzv. primární genetické změny. Přibližně v polovině případů primární translokace vedou k deregulaci exprese onkogenů. Později se u pacientů s MM mohou vytvořit sekundární změny, kdy dochází k dalším změnám chromosomů, mutacím, nebo epigenetickým změnám, které vedou k proliferaci a nesmrtnosti plasmatických buněk. Mezi nejčastěji detekované sekundární aberace řadíme translokace genu *MYC*, který je lokalizován na dlouhém ramenu chromosomu 8, delecce, nebo amplifikace oblastí chromosomu 1 a ztráty oblasti 17p13. U translokací zahrnující gen *MYC* a lokus *IG* je známo, že se jedná o pozdní události, kdy se snižuje závislost nádorových buněk na stromatu KD. Tyto sekundární změny jsou indikátory progresu onemocnění a nejsou způsobeny specifickými rekombinačními mechanismy B-buněk v zárodečných centrech (Kuehl *et Bergsagel*, 2003; Hideshima *et al.*, 2004; Prideaux *et al.*, 2014; Sawyer, 2011).



### 3.4.1. Translokace genu *IGH*

Ve většině případů *IGH* translokace nejsou detekovatelné metodami konvenční cytogenetiky (karyotypováním) z důvodu velmi nízkého mitotického indexu buněk MM a také proto, že většina z nich jsou změny kryptické. Proto je nejčastěji používanou metodou pro detekci *IGH* translokací interfázní FISH (i-FISH), která bývá doplněna imunofluorescenčním značením plasmatických buněk (Bergsagel *et Kuehl*, 2001).

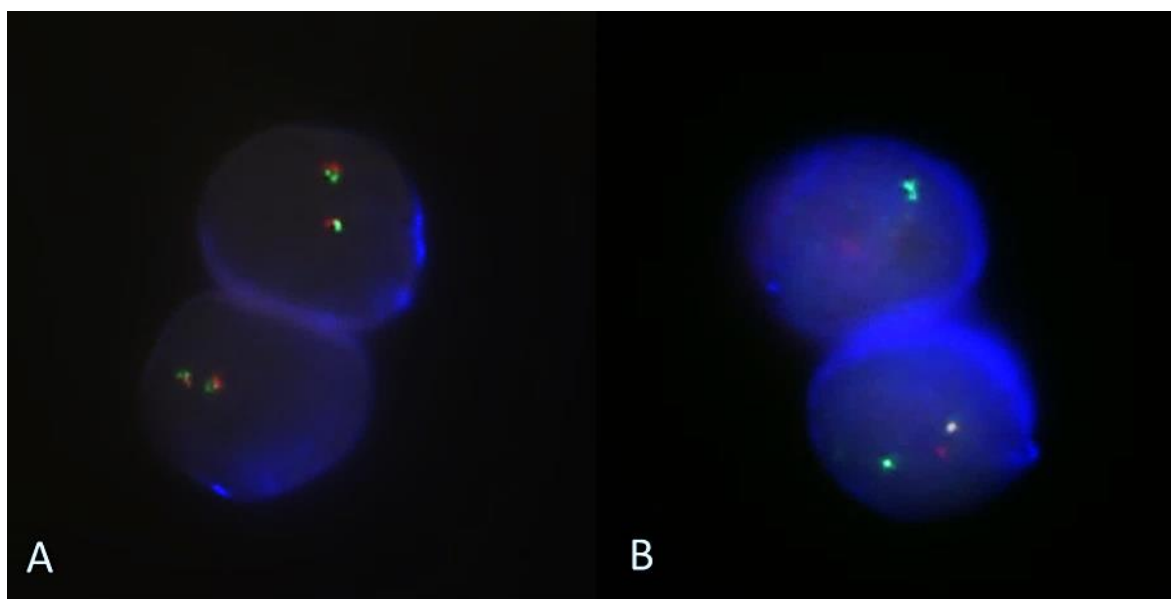
*IGH* gen je velmi promiskuitní a může translokovat s odlišnými partnery (Sawyer, 2011). Má se za to, že většina z recipročných translokací *IGH* genu je způsobena dvouřetězcovými zlomy v molekule DNA, které jsou specificky vytvořeny jedním z mechanismů modifikace DNA B-lymfocytů. Nejčastěji proběhne tzv. nelegitimní switch rekombinace (Vanasse *et al.*, 1999; Welzel *et al.*, 2001). U B-buněk translokace způsobují deregulaci onkogenů, která je způsobena přemístěním onkogenů do *IGH* lokusu (14q32), kde se nacházejí účinné enhancery (zesilovače). Méně často jsou pozorované translokace lehkých řetězců kappa (*IGK*) na chromosomu 2 (2p11) a lambda (*IGL*) na chromosomu 22 (22q11) (Dalla-Favera *et Gaidano*, 2001). Existují tři základní typy Ig enhancerů, které regulují expresi *IGH* v B-buňkách: intronový enhancer ( $E\mu$ ) a dva další enhancery za alfa genem ( $E\alpha 1$  a  $E\alpha 2$ ). Zatímco chromosomové translokace u myeloidních leukémií typicky vedou k vytvoření fúzního proteinu s novou nebo dysregulovanou funkcí, většina *IGH* translokací v MM buňkách vede k deregulaci exprese onkogenů (Bergsagel *et Kuehl*, 2001). Translokace genu *IGH* mohou být rozděleny na primární a sekundární.

Primární recipročné translokace *IGH* jsou přítomny přibližně ve stejné míře jak u MM, tak i u MGUS, a jsou považovány za jednu z iniciačních událostí v patogenezi MM (Bergsagel *et Kuehl*, 2001). Mezi 4 nejčastější primární translokace patří: t(4;14), t(11;14), t(14;16), t(6;14) (Fonseca *et al.*, 2004). Názvy jednotlivých primárně translokovaných onkogenů, jejich četnost výskytu a funkce je uvedena v tabulce 1.

Tab. 1: Primární translokace *IGH* genu (upraveno podle Liebisch, 2006; Fonseca *et al.*, 2004)

Translokovaný onkogen	Lokus	Incidence	Funkce
Cyclin D1 t(11;14)	11q13	15 - 20 %	regulace buněčného cyklu
<i>FGFR3 MMSET</i> t(4;14)	4p16.3	15 - 20 %	regulace růstu a diferenciaci buněk
<i>c-maf</i> t(14;16)	16q23	2 - 10 %	transkripční faktorYC
cyclin D3 t(6;14)	6p21	3 - 5 %	regulace buněčného cyklu

Mezi sekundární reciproké translokace *IGH* se řadí např. translokace t(14;18)(q32;q21) a t(8;14)(q24;q32), při translokaci genu *MYC*, který se nachází v oblasti 8q24, dochází ke zvýšené expresi proteinu c-myc, což může mít za následek přechod z fáze MGUS do fáze MM. Tyto translokace se objevují až v pozdějších fázích onemocnění a většinou souvisí se zhoršující se prognózou (Fonseca *et. al.*, 2004; Kuehl *et Bergsagel*, 2002).



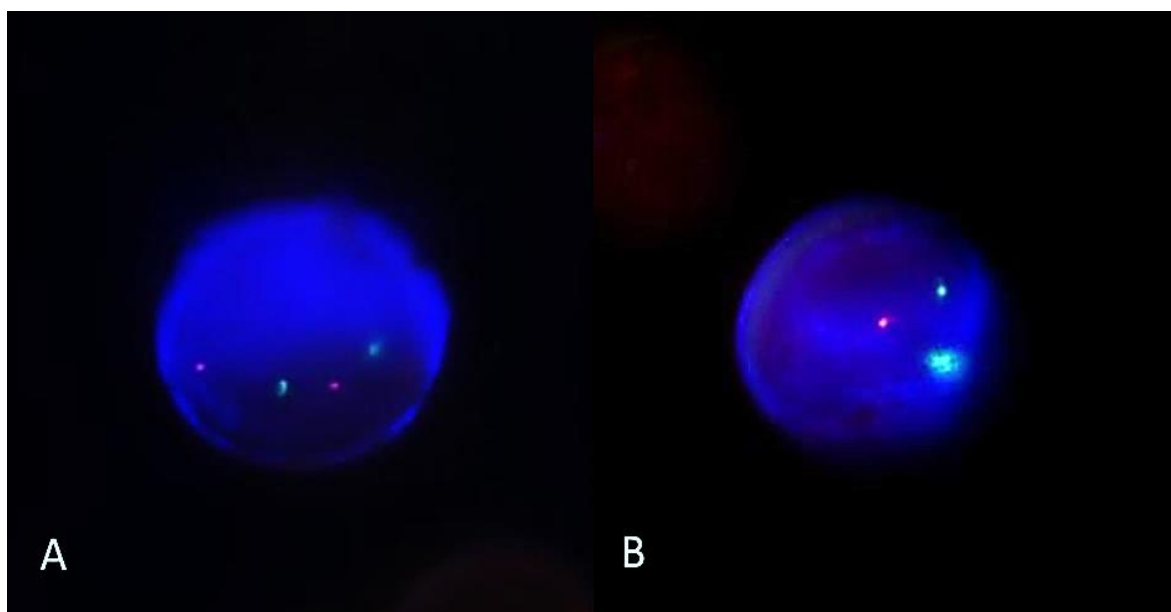
Obr. 4: Fotografie výsledků pro sondu LSI *IGH* u plasmocytů (převzato z HOK FNOL)

A) fyziologický nález; B) přestavba *IGH* genu

### 3.4.2. Delece genu *RBI* na chromosomu 13

Změny chromosomu 13 jsou spojeny často s monosomií a delecí, méně často dochází k translokacím. Monoalelická delece oblasti 13q patří mezi nejčastější a vyskytuje se přibližně u 50 % případů MM a 40 až 50% MGUS. Minimálně deletovaná oblast zahrnuje pruh 13q14, ve kterém leží gen *RBI* (retinoblastoma) (Chng *et al.*, 2007; Fonseca *et al.*, 2002).

Gen *RBI* je zapojen do buněčného růstu a diferenciaci. Produkt *RBI* (pRb) potlačuje přechod z G1 fáze do S fáze buněčného cyklu inhibicí různých genů zapojených do zahájení DNA syntézy (Drach *et al.*, 1995). pRb také potlačuje transkripci genu pro interleukin-6, jeden z nejdůležitějších cytokinů při vývoji myelomu. Inaktivace *RBI* genu a ztráta pRb byly popsány u řady dalších hematologických malignit. Delece 13q se vyskytuje jak u hyperdiploidních tak u non-hyperdiploidních MM. V případě non-hyperdiploidních MM se vyskytuje společně s *IGH* translokacemi, především s t(4;14) a t(14;16) (Juge-Morineau *et al.*, 1997; Hideshima *et al.*, 2004).



Obr. 5: Fotografie výsledku pro sondu LSI RB1/CEP 15 u plasmocytů (převzato z HOK FNOL)

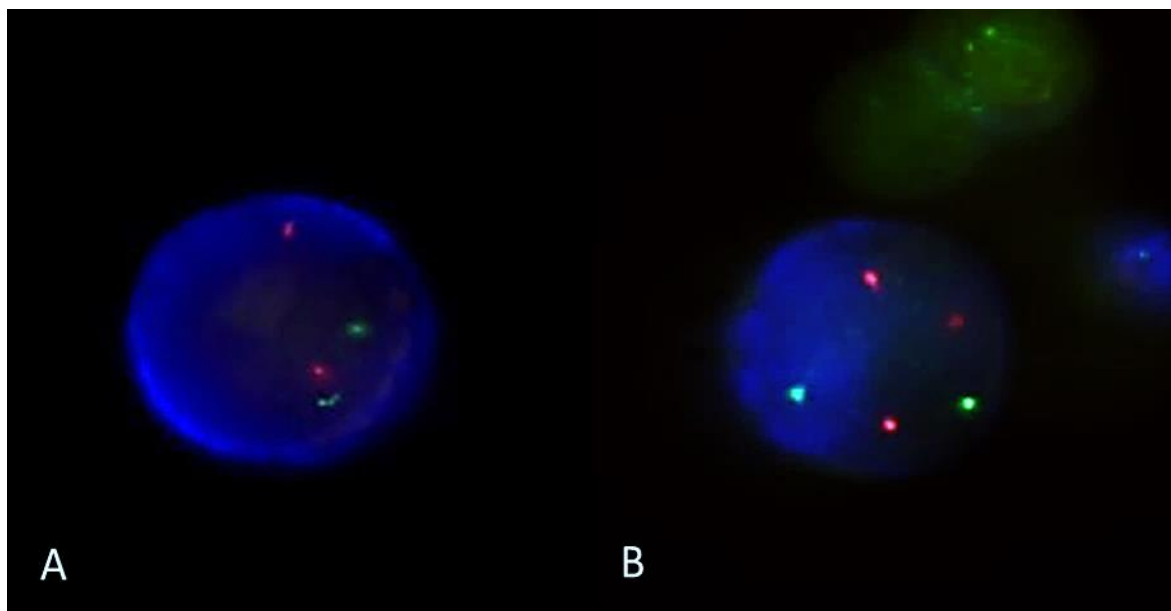
A) fyziologický nále; B) delece genu *RBI*(chybí 1červený signál)

### 3.4.3. Změny chromosomu 1

Změny chromosomu 1 patří mezi nejčastější cytogenetické nálezy nejen u MM, ale i u dalších hematologických malignit (Sawyer *et al.*, 1995).

Zmnožení dlouhého ramene chromosomu 1 (1q) je pozorováno přibližně u 35 až 40 % případů MM a často je asociováno s delecemi krátkého ramene (1p). Zmnožení oblasti 1q21 je spojeno s progresí, pokročilou fází onemocnění a se špatnou prognózou. Tato změna velmi často přetrvává, na rozdíl od jiných změn, i u intenzivně léčených pacientů (Prideaux *et al.*, 2014).

Předpokládá se, že zvýšená exprese genu *CKS1B*, který se nachází ve zmnožené oblasti 1q21, způsobuje větší proliferaci buněk v nádorech (Zhan *et al.*, 2007). Gen *CKS1B* má podíl na ubikvitin-proteasomové kaskádě degradace proteinů, která reguluje buněčný cyklus. Zvýšená ubikvitinace a následná degradace proteinu p27<sup>Kip1</sup>, který je inhibítoem cyklin-dependentních drah, je způsobena zvýšenou expresí genu *CKS1B*. Po degradaci tohoto proteinu mohou cyklin-dependentní kinázy fosforylovat cílové proteiny. Přechod buňky z G1 fáze buněčného cyklu do S fáze je zapříčiněn touto fosforylací a aktivací cílových proteinů (Shaughnessy, 2005).



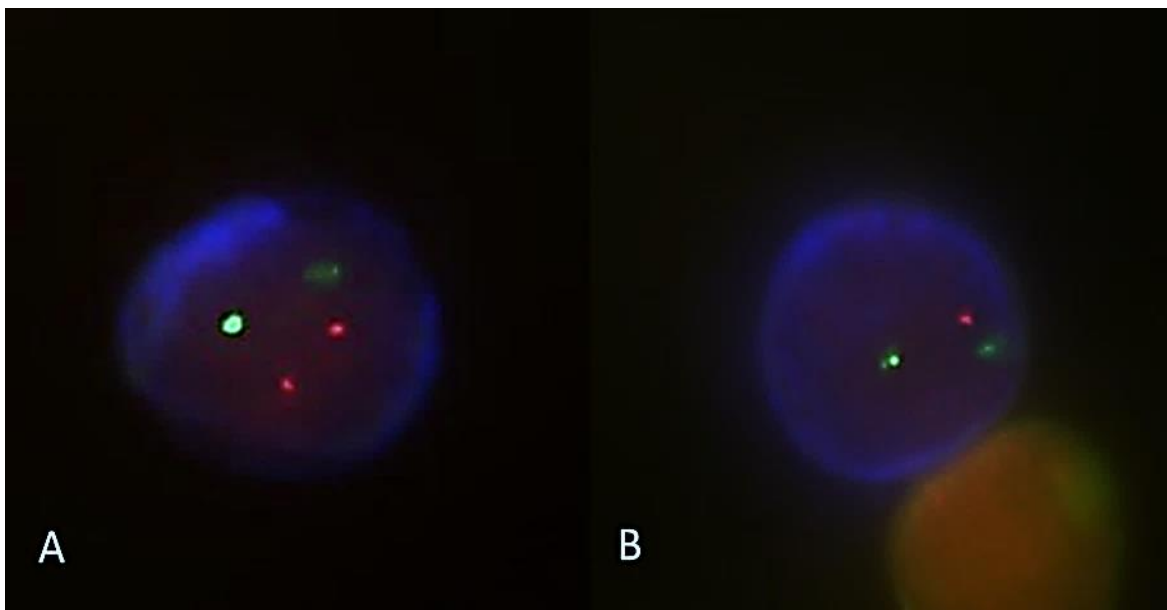
Obr. 6: Fotografie výsledku pro sondu LSI 1q21/1p32 u plasmocytů (převzato z HOK FNOL)

A) fyziologický nále; B) tři kopie 1q21 (nále tří červených signálů v jádře buňky)

#### 3.4.4. Delece genu *TP53* na chromosomu 17

*TP53* je tumor supresorový gen, který leží v oblasti 17p13. *TP53* je transkripční faktor, který kóduje informaci pro protein o molekulové hmotnosti 53 kD a také reguluje expresi genů zapojených do různých buněčných funkcí, včetně zástavy buněčného cyklu, opravy DNA a apoptózy. Funkce genu *TP53* a signální dráhy, které upravuje v patogenezi MM, jsou stále předmětem vědeckých studií.

Intersticiální monoalelická delece oblasti 17p13 detekována metodou FISH je detekována u nově diagnostikovaných případů MM v rozmezí od 9 až 34 % a souvisí spíše s progresí onemocnění a celkovou kratší dobou přežití. Frekvence výskytu této změny se zvyšuje přibližně o 30 % při relapsu. Nízká exprese genu *TP53*, která úzce souvisí s delecí 17p13, je významný a nezávislý nepříznivý prognostický faktor u nově diagnostikovaných MM (Xiong *et al.*, 2008; Chang *et al.*, 2005).



Obr. 7: Fotografie výsledku pro sondu LSI TP53/CEP17 (převzato z HOK FNOL)

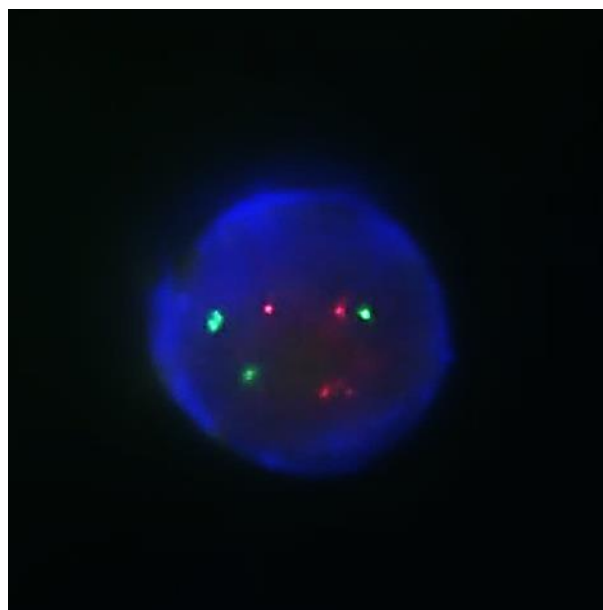
A) fyziologický nále; B) delece *TP53* (chybí 1 červený signál v jádře buňky)

### 3.4.5. Změny počtu chromosomů

V plasmatických buňkách MM může docházet k početním chromosomovým změnám jednotlivých chromosomů (aneuploidie), nebo v některých případech zmnožení celých chromosomových sad (polyploidie) (Chng *et al.*, 2007).

Podle celkového počtu chromosomů lze ploidie u MM rozdělit do 4 základních skupin: hypodiploidie (35 - 45 chromosomů), pseudodiploidie (46 chromosomů s přítomností změn), hyperdiploidie (47 - 57 chromosomů) a tetraploidie (92 chromosomů), nebo téměř-tetraploidie, označená jako near-tetraploidy (81 - 103 chromosomů). Nejčastějšími početními změnami jsou monosomie chromosomu 8, 13, 14, 16, 17 a 22, nebo trisomie chromosomů 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 a 21 (Debes-Marun *et al.*, 2003).

Nález hypodiploidie je považován za negativní prognostický faktor, ve většině případů je spojován se špatnou odpovědí na terapii a krátkým celkovým přežitím. Zatímco hyperdiploidie jsou většinou asociovány s lepší prognózou (Kuglík *et al.*, 2006).

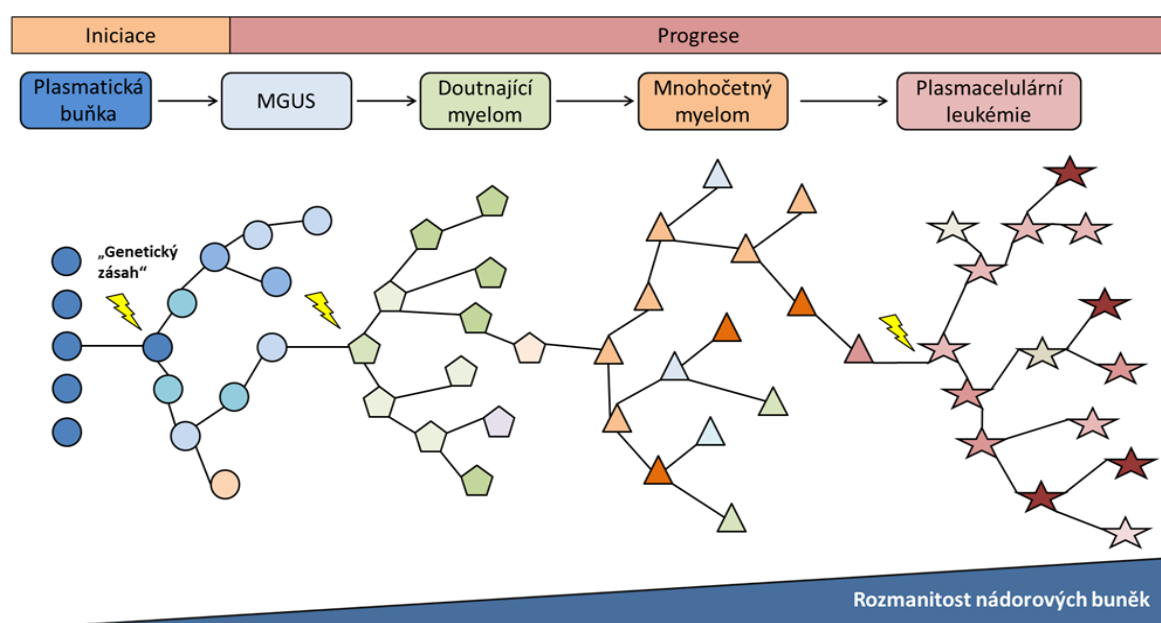


Obr. 8: Fotografie výsledku metody FISH s centromerickou sondou pro chromosom 17 (zelený signál), chromosom 15 (červený signál) potvrzuje tetrasomii chromosomu 15 a trisomie chromosomu 17 (převzato z HOK FNOL)

### 3.4.6. Intraklonální heterogenita u MM

Intraklonální heterogenita (různorodost) plasmatických buněk je jedním z patofyziologických rysů MM. Různorodost plasmocytů se podílí na komplexnosti MM (Chapman *et al.*, 2001; Egan *et al.*, 2012). Heterogenita genetických změn nevzniká akumulací změn lineárním způsobem, ale spíše nelineárním větvením, které je přirovnáváno k Darwinově teorii o evoluci druhů. Intraklonální model vývoje genetických změn plasmocytů je znázorněn na obrázku 9. Tento model je však koncipován zjednodušeně a jedná se jen o hrubý přehled progresu onemocnění, protože samotný proces je velmi složitý s více možnými cestami progresu. Klony plasmatických buněk při svém vývoji získávají náhodně různé genetické aberace a buňky s „nejvýhodnějšími“ aberacemi se pak v organismu na základě jejich výhody k přežití vyskytují v nejvyšším množství (Anderson *et al.*, 2011; Morgan *et al.*, 2012).

Posouzení intraklonální heterogenity jinou metodou než klasickou cytogenetikou je důležité, protože výsledky cytogenetiky určují chromosomové změny pouze v převažující klonální populaci. Pro studium intraklonální heterogenity se využívají především metody FISH a sekvenování nové generace (NGS). Léčbou může dojít k získání proliferační výhody klonu, který před léčbou byl minoritní. Tento klon mohou tvořit buňky, které jsou k použité léčbě rezistentní (Morgan *et al.*, 2012; Walker *et al.*, 2014).



Obr. 9: Intraklonální heterogenita u MM (upraveno podle Prideaux *et al.*, 2014; Morgan *et al.*, 2012)

## 4. MATERIÁL A METODIKA

### 4.1. Odběr a zpracování materiálu

Pro cytogenetickou a molekulárně cytogenetickou analýzu byly použity buňky kostní dřeně odebrané u pacientů s MM na Hemato-onkologické klinice Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci a Fakultní nemocnice Olomouc. Vzorky KD byly do laboratoří cytogenetiky a molekulární cytogenetiky dodávány ve zkumavkách s protisrážlivým činidlem (lithium heparin). Zkumavka s biologickým materiálem byla kultivována *in vitro* v kultivačním médiu při 37°C po dobu 24 hodin (K24).

#### **Přístroje:**

- centrifuga Rotina 420R (Hettich, Beverly, MA, USA), Flowbox HERAsafe® (Heraeus Holding, Hanau, Německo), inkubátor 37 °C Function Line (Heraeus Holding, Hanau, Německo), stolní minicentrifuga Labnet (Labnet International, Edison, NJ, USA), třepačka Heidolph Real top (Heidolph, Schwabach, Německo), lednička, mraznička

#### **Spotřební materiál:**

- pasteurovy pipety (Biosigma, Benátky, Itálie), centrifugační zkumavky 15ml (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), plastové kultivační nádoby 40ml (Nunclon TM Δ Surface)

#### **Chemikálie a roztoky:**

- heparin (Zentiva, Praha, ČR), BM médium (Bone marrow karyotyping medium) (Biological Industries, Kibbutz Beit Haemek, Izrael), kolcemid (Gibco®, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)



### **Pracovní postup kultivace:**

1. Do kultivační nádoby byl přenesen obsah zkumavky s KD a bylo přidáno 12 ml BM média (bone marrow medium).
2. Do kultivační nádoby byly přidány 2 kapky kolcemidu.
3. Směs byla kultivována v inkubátoru při 37 °C a 5% koncentraci CO<sub>2</sub> po dobu 24 hodin.
4. Po úspěšné kultivaci byla provedena fixace buněk kostní dřeně.

#### **4.1.1. Fixace buněk kostní dřeně**

##### **Chemikálie a roztoky:**

- methanol (Lach-Ner, Neratovice, ČR), ledová kyselina octová (Lach-Ner, Neratovice, ČR), chlorid draselný (lékárna FNOL)

##### **Přístroje:**

- třepačka Heidolph Real top (Heidolph, Schwabach, Německo), mraznička, lednička (obojí Labnet International, Edison, NJ, USA), centrifuga Rotina 420R (Hettich, Beverly, MA, USA), inkubátor Function Line (Heraeus Holding, Hanau, Německo), laboratorní sklo

##### **Spotřební materiál:**

- centrifugační zkumavky Falcon 15ml (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), pasteurovy pipety (Biosigma, Benátky, Itálie)

### **Pracovní postup:**

1. Po úspěšné kultivaci byl obsah kultivační nádoby přelit do označené 15ml centrifugační zkumavky.
2. Obsah zkumavky byl centrifugován po dobu 10 min. při rychlosti 1000 rpm a teplotě 37 °C.
3. Po centrifugaci byl ze zkumavky odsán supernatant.
4. Zbylý pelet byl vortexován a bylo k němu přidáno cca 10 ml vytemperovaného 0,075M KCl.
5. Celý obsah zkumavky byl inkubován v termostatu při 37°C po dobu 25 min.
6. Po inkubaci byla přidána 1 kapka „Carnoye“ fixačního roztoku (methanol:ledová kyselina octová; v poměru 3:1; - 20 °C).
7. Obsah zkumavky byl centrifugován v centrifuze po dobu 10 min. při 1000 rpm a teplotě 37 °C.
8. Po centrifugaci byl odsán supernatant.
9. Zbylý pelet byl zvortexován a bylo k němu přidáno cca 10 ml „Carnoye“ fixačního roztoku. První ml byl přidáván po kapkách.
10. Celý obsah zkumavky byl inkubován při pokojové teplotě 30 min.
11. Po inkubaci byl obsah zkumavky centrifugován po dobu 10 min. při rychlosti 1000 rpm a teplotě 4 °C.
12. Po centrifugaci byl odsát supernatant.
13. Bylo přidáno 10 ml fixačního roztoku a celá zkumavka byla vortexována.
14. Postup (centrifugace, odsátí supernatantu a přidání 10 ml fixačního roztoku) byl opakován 3-6 krát do dosažení mléčného zbarvení buněčné suspenze.

Vzniklá fixovaná buněčná suspenze je připravena pro různá molekulárně cytogenetická vyšetření a následně zamrazena k archivaci v popsanych 2ml mikrozskumavkách při teplotě - 20 °C.

#### **4.1.2. Převedení suspenze fixovaných buněk do alkoholu**

Pro provedení metody FICTION je nutno převést buňky KD z fixačního roztoku (Carnoye) do alkoholu (96% ethanol). Buňky jsou díky alkoholu lépe odlišitelné od ostatních buněčných elementů KD.

##### **Chemikálie a roztoky:**

- Ethanol (lékárna FNOL)

##### **Přístroje:**

- centrifuga Rotina 420R (Hettich, Beverly, MA, USA)

##### **Spotřební materiál:**

- pasterovy pipety (Biosigma, Benátky, Itálie), 15ml plastové zkumavky (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)

##### **Pracovní postup:**

1. Vzorek buněčné suspenze kostní dřene fixované v roztoku Carnoye byl převeden do fixace 96% etanolu následujícím postupem.
2. Suspenze byla centrifugována a supernatant byl odstraněn.
3. Pelet byl převrstven 96% etanolem a následně inkubován po dobu 15 min. při pokojové teplotě.
4. Kroky 2. a 3. byly opakovány 3x.
5. Pasterovou pipetou byl opatrně odsát ethanol, tak aby zůstaly ve zkumavce 2-3 ml, ve kterých byl pelet resuspendován.
6. Takto upravená fixovaná suspenze buněk je připravená na nakápnutí na podložní skla.

## **4.2. FICTION**

### **4.2.1. Imunofluorescenční značení plasmatických buněk**

Pro FICTION byly použity buňky KD, které prošly kultivací, fixací a byly převedeny do 96% ethanolu.

#### **Chemikálie a roztoky:**

- 10mM citrátový pufr (Lach-Ner, ČR), 10M PBS pufr (lékárna FNOL), AMCA Anti-Human kappa-chain (Vector Laboratories, Burlingame, USA), AMCA Anti-Human lambda-chain (Vector Laboratories, Burlingame, USA), AMCA Anti-goat IgG (Vector Laboratories, Burlingame, USA), deionizovaná H<sub>2</sub>O (lékárna FNOL), etanol 70%, 85% a 96% (Fagron, Nieuwerkerk a/d IJssel, Nizozemí)

#### **Přístroje:**

- třepačka Heidolph Reax top (Heidolph, Schwabach, Německo), vodní lázeň Thermomix BM (B. Braun Biotech International, Melsungen, Německo), inkubátor Grant Boeckel IS020 (Boeckel Grant, Shepreth, UK),

#### **Spotřební materiál:**

- skleněné kopoliny 25 - 30 ml, pasturovy pipety (Biosigma, Benátky, Itálie), podložní skla SuperFrost® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), špičky (Gilson, Middleton, WI, USA), krycí skla 22x22 mm (Menzel-Gläser, Braunschweig, Německo), rubber cement (Marabu, Tamm, Německo), parafilm (Bemis Company, Neenah, WI, USA)

### **Pracovní postup:**

1. Na podložní sklíčko byla nakápnuta buněčná suspenze v 96% ethanolu, která se nechala zaschnout.
2. Podložní sklíčko s buňkami bylo vloženo do koplíny a inkubováno v přehřátém 10mM citrátovém pufru na teplotu 95 °C ve vodní lázni po dobu 10 min.
3. Následně byla koplína se sklíčkem vyjmuta z vodní lázně a dále inkubována 30 min. při pokojové teplotě.
4. Po inkubaci bylo podložní sklíčko opláchnuto dvakrát po dvou minutách ve dvou koplínách s 1xPBS pufrem.
5. Na vlhké sklíčko bylo nanášeno 70 µl naředěné protilátky AMCA Anti-Human kappa-chain nebo AMCA Anti-Human lamda chain.
6. Podložní sklíčko s nanášenou protilátkou bylo překryto kouskem parafilmu a inkubováno 1 hod při 37 °C ve vlhké komůrce ve vodní lázni.
7. Po uplynutí inkubační doby byl odstraněn parafilm z podložního sklíčka a byl opakován krok č. 4.
8. Na sklíčko bylo nanášeno 70 µl naředěné AMCA Anti-IgG.
9. Podložní sklíčko s nanášenou protilátkou bylo překryto kouskem parafilmu a inkubováno 1 hod při 37 °C ve vlhké komůrce ve vodní lázni.
10. Po uplynutí inkubační doby byl odstraněn parafilm z podložního sklíčka a byl opakován krok č. 4.
11. Nakonec byla provedena dehydratace ve vzestupné alkoholové řadě (70%, 85% a 96% ethanol) po dobu 2 minut v každé koplíně.

#### **4.2.2. Interfázni fluorescenční *in situ* hybridizace (i-FISH)**

Metoda i-FISH byla použita pro určení chromosomových změn ve imunofluorescenčně značených plasmatických buňkách.

##### **Použité sondy a příprava:**

- byly použity sondy:
  - LSI RB1, LSI TP53, CEP 15, CEP 17, LSI IGH/FGFR3 (vše Abbott)
  - LSI 1q21/1p32, XL t(11;14), XL IGH/MAF (vše Metasystems),
  - ON IGH (14q32) Break Apart (Dako)

Sondy byly připraveny (naředěny) a následně denaturovány dle přiložených postupů od konkrétního výrobce.

##### **Chemikálie a roztoky:**

- deionizovaná H<sub>2</sub>O (lékárna FNOL), zásobní roztok 20xSSC (Abbott Molecular, Des Plaines, IL, USA), NP40 (Abbott Molecular, Des Plaines, IL, USA), Counterstain Diluent (Kreatech, Amsterdam, Nizozemí)

##### **Přístroje:**

- plotýnka Medax (Nagel, Kiel, Německo), vortex Heidolph Reax top (Heidolph, Schwabach, Německo), hybridizační komůrka Grant Boeckel IS020 (Boeckel Grant, Shepreth, UK), stolní centrifuga Labnet (Labnet International, Edison, NJ, USA), vodní lázeň Thermomix BM (B. Braun Biotech International), světelný mikroskop Olympus BX41 (Olympus, Tokyo, Japonsko), fluorescenční lampa U-RFL-T (Olympus, Tokyo, Japonsko), počítač, CCD kamera (MetaSystems, Altlusheim, Německo), počítačový software

##### **Spotřební materiál:**

- pasturovy pipety (Biosigma, Benátky, Itálie), 1,5ml plastové mikrozkuřavky (Eppendorf, Hamburg, Německo), špičky (Gilson, Middleton, WI, USA), rubber cement (Marabu, Tamm, Německo), krycí skla 22x22 mm, krycí skla 24x24 mm (obojí Menzel-Gläser, Braunschweig, Německo)

### **Pracovní postup:**

1. Naředěné sondy byly denaturovány ve vodní lázni při dané teplotě, která je doporučena výrobcem sond.
2. Denaturované sondy byly promíchány, vortexovány a nanесeny na suchá podložní sklíčka se značenými plasmatickými buňkami a překryty krycím sklíčkem (22 x 22 mm).
3. Okraje krycího sklíčka byly oblepeny rubber cementem, aby nedošlo k vyschnutí sond.
4. Podložní sklíčko s buňkami a sondami bylo inkubováno v předehřáté hybridizační komůrce při 37 °C po dobu 24 hodin.
5. Po inkubaci bylo odstraněno krycí sklíčko a vzorek byl promýván v předem předehřátém roztoku 0,4xSSC/0,3% NP40 při 73°C po dobu 2 min a znovu promýváno 2 minuty v 2xSSC/0,1% NP40 při laboratorní teplotě.
6. Na hybridizovanou oblast bylo napipetováno 10μl Counterstain Diluent pro zbarvení jader buněk a byla překryta krycím sklíčkem 24x24 mm.
7. Preparát byl hodnocen ve fluorescenčním mikroskopu.

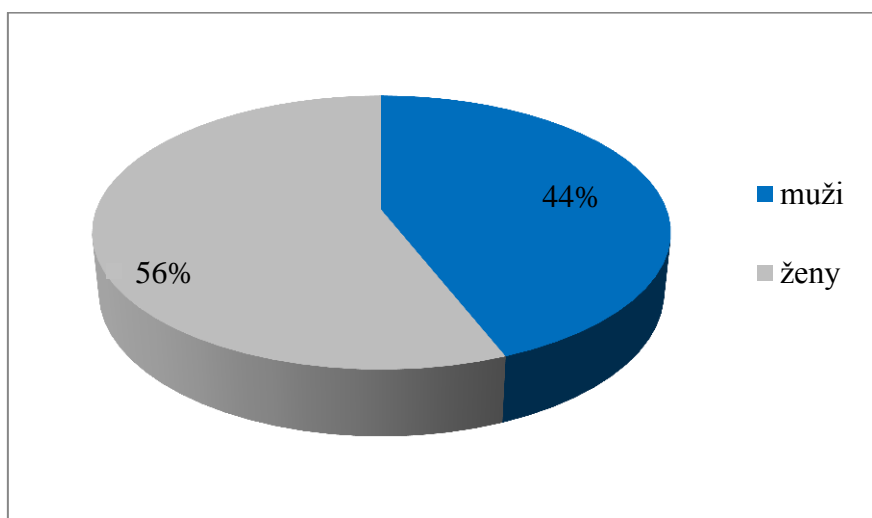
### **4.3. Vyhodnocení preparátů**

Preparáty zpracované metodou FICTION byly vyhodnoceny ve fluorescenčním mikroskopu. Při správné hybridizaci každá sonda vytváří specifický signál (jedno- nebo dvoubarevný). Jednotlivé fluorescenční signály mají podle použitého fluorochromu různou vlnovou délku, a proto byly snímány odpovídajícími excitačně bariérovými filtry firmy Olympus (DAPI, FITC a Spectrum Orange). Při vyhodnocení sondy pro určitou detekovanou oblast bylo hodnoceno 100 plasmatických buněk. Obraz z mikroskopu byl snímán digitální kamerou a zpracován počítačový softwarem ISIS pro analýzu obrazu.

## 5. VÝSLEDKY

V praktické části bakalářské práce byla provedena molekulárně cytogenetická analýza značených plasmatických buněk (FICTION) na souboru 25 pacientů, kteří byli vyšetřeni v období od září roku 2012 do března roku 2015. Zastoupení pohlaví v celém souboru pacientů bylo 14 žen a 11 mužů (graf 1).

Graf 1: Zastoupení pohlaví v souboru pacientů

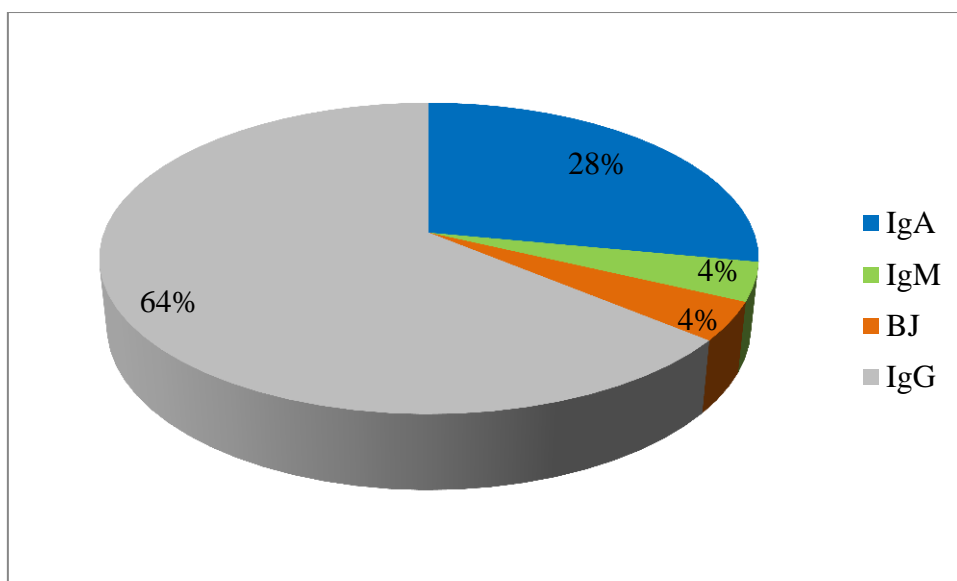


Věkový medián u celého souboru vyšetřených pacientů byl 68 let a věk se pohyboval v rozmezí 41 - 83 let.

Zastoupení jednotlivých sekrečních subtypů je znázorněno v grafu 2. Nejčastěji zastoupeným subtypem MM/MGUS byl IgG, určený u 16 pacientů.



Graf 2: Zastoupení jednotlivých sekrečních subtypů MM/MGUS



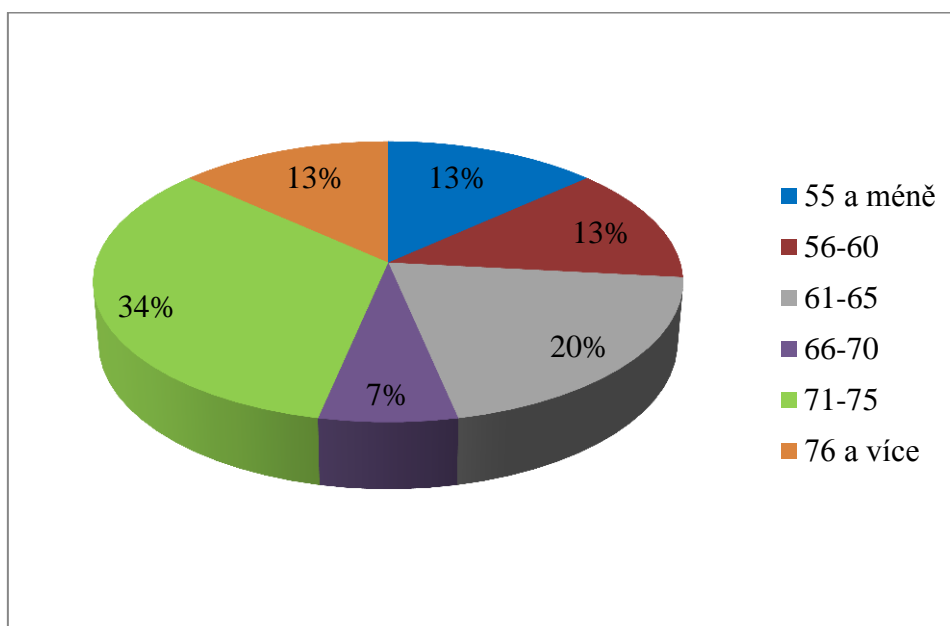
Celý soubor pacientů byl pro další vyhodnocení výsledků rozdělen do dvou skupin:

- První soubor tvořili pacienti s nově diagnostikovaným MM a pacienti s nově diagnostikovaným MGUS.
- Druhou skupinu tvořili pacienti vyšetřovaní v relapsu/progresi MM, u kterých byla sledována nejen přítomnost chromosomových aberací, jako u prvního souboru, ale byl zde navíc vyhodnocen i klonální vývoj patologických plasmatických buněk, díky získaným výsledkům vyšetření z doby diagnózy.

## 5.1. Soubor nově diagnostikovaných pacientů

Do tohoto souboru bylo zařazeno 10 nově diagnostikovaných pacientů s MM a 5 pacientů s MGUS. Věkový medián u souboru nově diagnostikovaných pacientů byl 65,8 let a věk se pohyboval v rozmezí 41 - 82 let (graf 3). Nejčastěji zastoupeným subtypem MM/MGUS byl IgG u 10 pacientů.

Graf 3: Věk v době diagnózy u nově diagnostikovaných pacientů

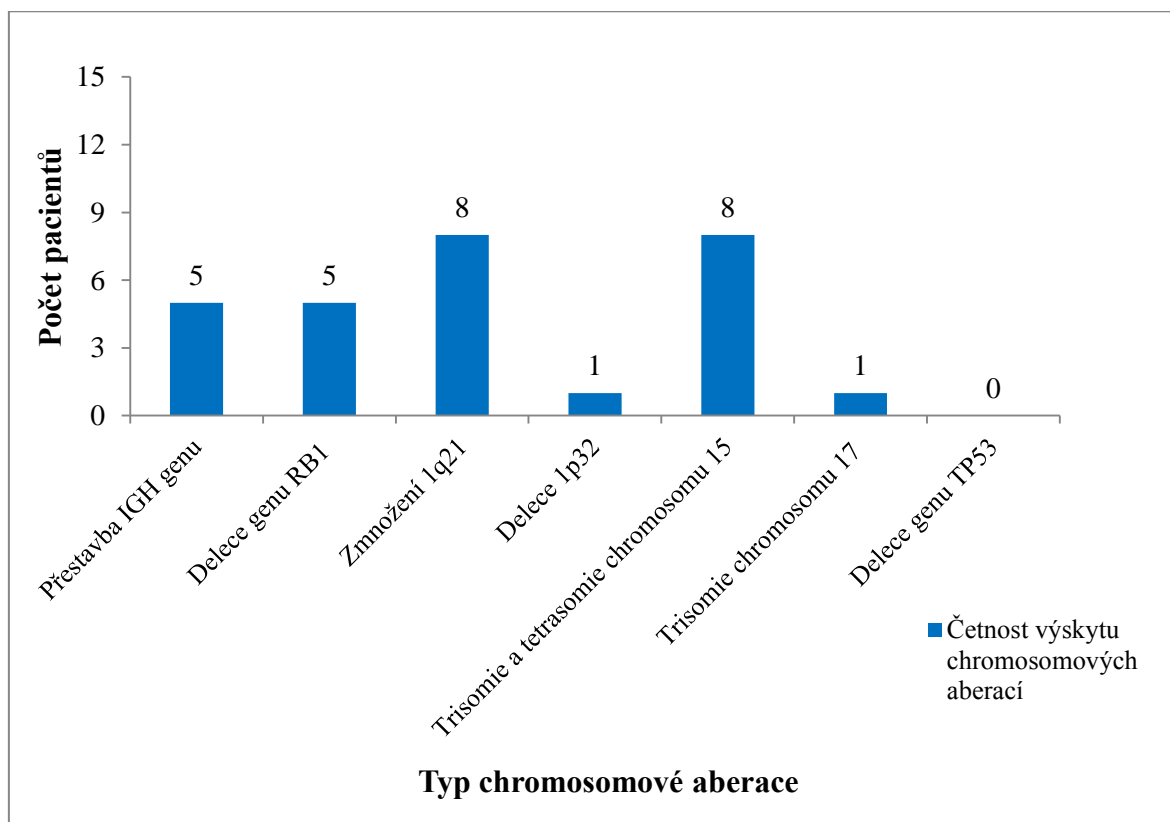


U každého pacienta z tohoto souboru byl nasazen základní vyšetřovací panel pro nově diagnostikované pacienty s mnohočetným myelomem (tabulka 2). Celkový přehled chromosomových změn detekovaných pomocí metody FICTION u souboru nově diagnostikovaných pacientů a jejich četnost výskytu je shrnuta v grafu 4. Celkem 14 z 15 pacientů vyšetřených v době diagnózy mělo určené genetické změny. Hyperdiploidie byla pozorována u 9 a non-hyperdiploidie u 5 pacientů.

Tab. 2: Základní panel pro vyšetření nově diagnostikovaných pacientů s MM

Název sondy	Výrobce sondy	Normální nález	Nejčastější změny
<i>IGH</i> (14q32)	DAKO	2 fúze	translokace <i>IGH</i> (pouze 1 fúze)
<i>TP53/CEP17</i>	ABBOTT	2 červené a 2 zelené signály	trizomie, tetrazomie, pentazomie chromosomu 17 (více než 2 červené signály)
<i>RBI/CEP 15</i>	ABBOTT	2 červené a 2 zelené signály	delece <i>RBI</i> (pouze 1 červený signál); tetrazomie, pentazomie chromosomu 15 (více než 2 zelené signály)
1q21/1p32	METASYSTEMS	2 červené a 2 zelené signály	změny počtu kopií v oblasti 1q21 a 1p32 (více než 2 červené/zelené signály)

Graf 4: Celkový přehled detekovaných chromosomových změn a jejich četnost u nově diagnostikovaných pacientů



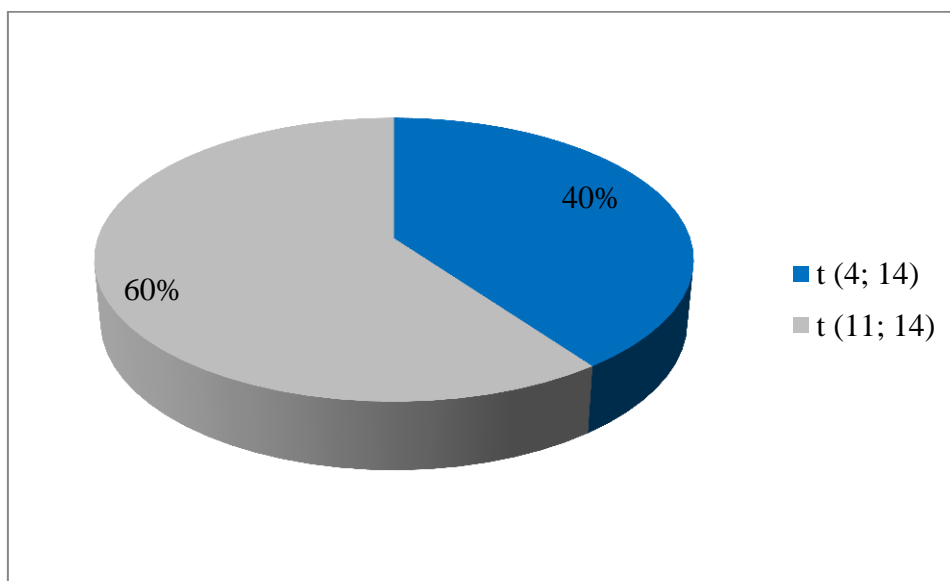
Celkově u 8 pacientů byly nalezeny početní chromosomové abnormality chromosomu 15. Z toho u 6 pacientů se jednalo o trisomie chromosomu 15 a u zbylých 2 pacientů byly nalezeny trisomie i tetrasomie 15.

U 5 pacientů byla nalezena delece genu *RBI* (oblast 13q14). Z nich u 4 pacientů se tato delece vyskytovala společně s přestavbou *IGH* genu a u 1 pacienta byly s přestavbou *IGH* přítomny i tři kopie oblasti 1q21. U 1 pacienta se delece *RBI* vyskytovala se třemi kopie oblasti 1q21 a trisomií a tetrasomií chromosomu 15.

Pouze u 1 pacienta byla nalezena trisomie chromosomu 17 v 80 % plasmatických buněk.

V 7 případech byla nalezena abnormalita v oblasti genu *IGH*. U 5 pacientů se jednalo o přestavbu genu *IGH* (graf 5). Translokačním partnerem *IGH* genu u 3 pacientů byla oblast 11q13 (gen *Cyclin D1*) na chromosomu 11; translokace t(11;14). U 2 pacientů byla detekována translokace t(4,14); oblast 4p16.3 (gen *FGFR3 MMSET*). U 1 pacienta byla nalezena bialeická delece *IGH* genu ve 100 % plasmatických buněk. Delece 5' konce *IGH* genu (fyziologická delece) byla nalezena u 1 pacienta v 60 % plasmatických buněk.

Graf 5: Výskyt jednotlivých přestaveb genu *IGH* u nově diagnostikovaných pacientů



Delece genu *TP53* (oblast 17p13) nebyla nalezena u žádného nově diagnostikovaného pacienta.

Celkem 8 pacientů z 15 mělo 3 kopie oblasti 1q21. Z toho pouze u 1 pacienta se tato změna vyskytovala společně s delecí oblasti 1p32.

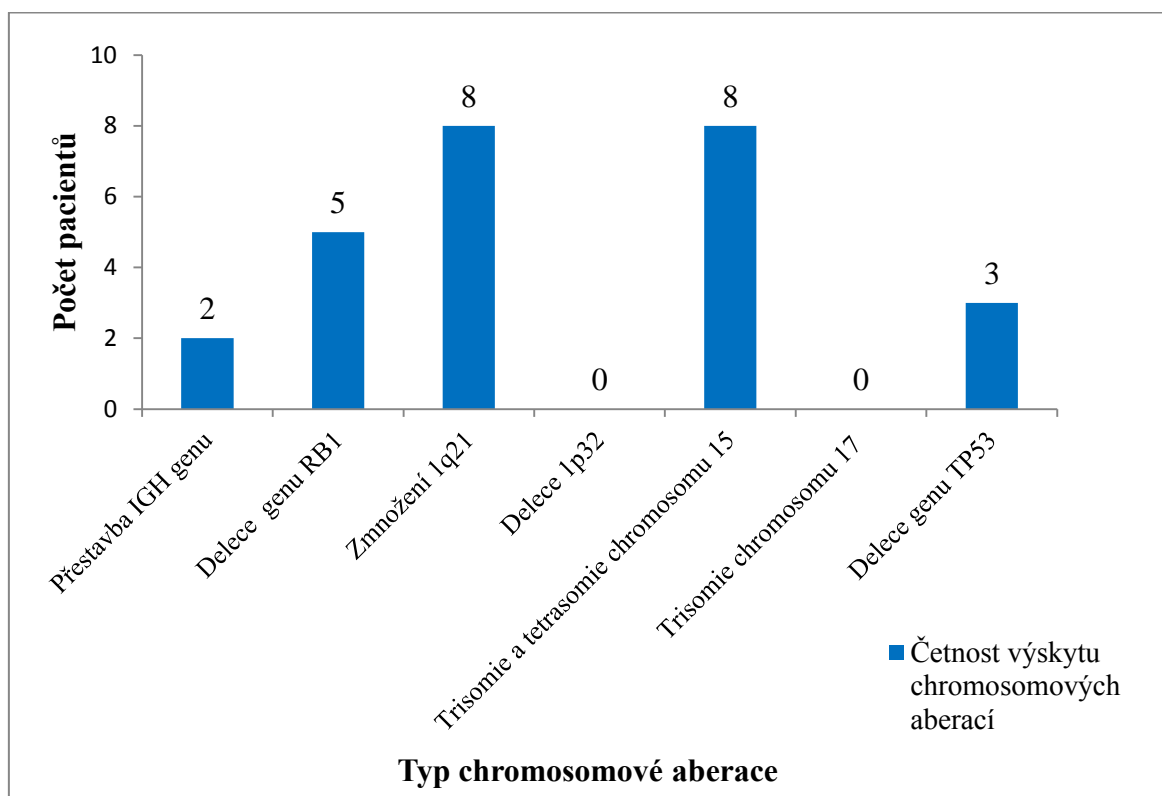
## 5.2. Soubor pacientů v relapsu/progresi (sledování klonálního vývoje)

Do tohoto souboru bylo zařazeno 10 pacientů s MM vyšetřovaných v době relapsu/progrese onemocnění (tab. 3). Všichni nemocní byli vyšetřeni v době diagnózy v cytogenetické laboratoři HOK a tyto výsledky byly použity pro určení klonálního vývoje v relapsu/progresi. Celkový přehled a četnost výskytu detekovaných chromosomových změn v době vyšetření u pacientů v relapsu/progresi je shrnut v grafu 6. U 6 pacientů byl určen klonální vývoj v nádorových plasmocytech.

Věkový medián u pacientů v relapsu/progresi byl 68 let a věk se pohyboval v rozmezí 58 - 83 let.

V celém soboru pacientů v relapsu/progresi se vyskytovaly 2 subtypy MM: IgG a IgA. Častěji zastoupeným subtypem MM byl IgG u 6 pacientů.

Graf 6: Celkový přehled detekovaných chromosomových změn a jejich četnost u pacientů v relapsu/ progresi



Celkově u 8 pacientů byly nalezeny početní chromosomové abnormality chromosomu 15. Z toho u 4 pacientů se jednalo pouze o trisomie chromosomu 15 a u dalších 4 pacientů byly nalezeny trisomie i tetrasomie 15.

U 5 pacientů byla nalezena delece genu *RBI* (oblast 13q14).

U 8 pacientů byly nalezeny více než 2 kopie oblasti 1q21. Z toho u 3 pacientů byly detekovány 3 kopie a u zbylých 5 byly detekovány 3 a 4 kopie oblasti 1q21. V malém procentu buněk (cca 10 %) se u 2 pacientů se 4 kopiemi vyskytovalo více než 5 kopií oblasti 1q21. U žádného pacienta se tato změna nevyskytovala společně s delecí oblasti 1p32.

Delece genu *TP53* (oblast 17p13) byla nalezena u 3 pacientů v relapsu/progresi.

V 5 případech byla nalezena abnormalita v oblasti genu *IGH*. U 2 pacientů se jednalo o přestavbu genu *IGH*. Translokačním partnerem *IGH* genu u 1 pacienta byla oblast 11q13 (gen *Cyclin D1*) na chromosomu 11; translokace t(11;14). U druhého pacienta s translokací *IGH* genu byla detekována translokace t(4,14); oblast 4p16.3 (gen *FGFR3 MMSET*). Delece 5' konce *IGH* genu (fyziologická delece) byla nalezena u 3 pacientů ve velkém procentu plasmatických buněk (84 a 100 %).

Celkem u 6 pacientů byly detekovány pomocí FICTION nově vzniklé chromosomové aberace (tab. 3), které nebyly přítomny při vyšetření v době diagnózy, což potvrzuje klonální vývoj nádorových plasmatických buněk.

Tab. 3: Chromosomové aberace u pacientů v relapsu/progresi

Číslo pacienta	Pohlaví	Rok narození	Subtyp MM	Změny v době diagnózy	Nově detekované chromosomové změny	Klonální vývoj
1	Ž	1947	IgA	delece 5' konce <i>IGH</i> , trisomie a tetrasomie chromosomu 15, delece <i>TP53</i>	žádné	ne
2	Ž	1956	IgG	delece <i>RBI</i> , delece 5' konce <i>IGH</i>	3 kopie 1q21, delece <i>TP53</i>	ano
3	Ž	1932	IgG	přestavba <i>IGH</i>	žádné	ne
4	M	1930	IgG	trisomie chromosomu 15, 3 kopie 1q21	tetrasomie chromosomu 15	ano
5	Ž	1939	IgA	delece 5' konce <i>IGH</i> , delece <i>RBI</i> , trisomie chromosomu 15, 3 kopie 1q21	4 - 5 kopií 1q21	ano
6	M	1953	IgG	delece <i>RBI</i> , trisomie chromosomu 15, 3 kopie 1q21	4 kopie 1q21	ano
7	M	1939	IgG	trisomie chromosomu 15, 3 kopie 1q21, delece <i>TP53</i>	žádné	ne
8	Ž	1941	IgG	delece <i>RBI</i> , trisomie chromosomu 15	3 - 6 kopií 1q21	ano
9	M	1944	IgA	trisomie chromosomu 15, 3 kopie 1q21	tetrasomie chromosomu 15; 4 kopie 1q21	ano
10	Ž	1950	IgA	delece <i>RBI</i> , přestavba <i>IGH</i> , trisomie a tetrasomie chromosomu 15, 3-4 kopie 1q21	žádné	ne

Pacient č. 2 byla žena, která v době diagnózy měla delecí genu *RBI* a fyziologickou delecí genu *IGH*. Při vyšetření, které jsme provedli v době progresu, byly nalezeny stejné změny jako v době diagnózy, ale navíc byly detekovány 3 kopie oblasti 1q21 a delecí genu *TP53*.

Pacient č. 4 byl muž, u kterého v době diagnózy byla přítomna trisomie chromosomu 15 a 3 kopie oblasti 1q21. Při vyšetření, které jsme provedli v době relapsu, byly nalezeny stejné změny jako v době diagnózy, ale ve větším počtu plasmatických buněk. Navíc byla detekována tetrasomie chromosomu 15.

Pacient č. 5 byla žena, která v době diagnózy měla delecí genu *RBI*, fyziologickou delecí genu *IGH* (obojí ve 100 % plasmatických buněk), trisomie chromosomu 15 a 3 kopie oblasti 1q21. Při vyšetření, které jsme provedli v době relapsu, byly nalezeny stejné změny jako v době diagnózy, ale ve větším počtu plasmatických buněk. Navíc byly detekovány 4 kopie oblasti 1q21 a v malém procentu plasmatických buněk dokonce 5 kopií oblasti 1q21 (méně než 10 %).

Pacient č. 6 byl muž, u kterého v době diagnózy byly přítomny delecí genu *RBI* (v 90 % plasmatických buněk), trisomie chromosomu 15 a 3 kopie oblasti 1q21. Při vyšetření, které jsme provedli v době relapsu, byly nalezeny stejné změny jako v době diagnózy, ale navíc byly detekovány 4 kopie oblasti 1q21.

Pacient č. 8 byla žena, která v době diagnózy měla delecí genu *RBI* (v 90 % plasmatických buněk) a trisomii chromosomu 15. Při vyšetření, které jsme provedli v době progresu, byly nalezeny stejné změny jako v době diagnózy, ale navíc byly detekovány 3 kopie oblasti 1q21 a v malém procentu plasmatických buněk dokonce 5 - 6 kopií oblasti 1q21 (méně než 10 %).

Pacient č. 9 byl muž, u kterého v době diagnózy byla přítomna trisomie chromosomu 15 a 3 kopie oblasti 1q21. Při vyšetření, které jsme provedli v době progresu, byly nalezeny stejné změny jako v době diagnózy, ale navíc byla detekována tetrasomie chromosomu 15 a 4 kopie oblasti 1q21.



## 6. DISKUZE

Mnohočetný myelom (MM) je maligní nádorové onemocnění somaticky mutovaných plasmatických buněk, které obvykle vzniká z asymptomatického nádorového onemocnění zvaného monoklonální gamapatie nejasného významu (MGUS) (Bergsagel *et Kuehl*, 2001). Díky zavedení nových léků (thalidomid, bortezomib a lenalidomid), ASCT a chemoterapii došlo u pacientů s MM k zvýšení mediánu přežití přibližně na 5 let, avšak v současnosti MM zůstává stále nevléčitelným onemocněním (Maisnar *et Hájek*, 2008; Rajkumar, 2011).

Celý soubor 25 pacientů (15 nově diagnostikovaných, 10 pacientů v relapsu/progresi) byl vyšetřen molekulárně cytogenetickou metodou FICTION. Materiálem byly buňky KD pacientů s MM/MGUS. U všech pacientů byly sledovány tyto změny: změny v oblasti *IGH* genu, početní změny chromosomu 15 a 17, delece *RBI* genu, delece genu *TP53*, zmnožení počtu kopií oblasti 1q21 a delece oblasti 1p32. Celkově byly chromosomové změny zjištěny u 96 % pacientů s MM, což je ve větší míře než udává např. Debes-Marun *et al.* (2003). Vyšší procento výskytu těchto změn u pacientů může být zkresleno velikostí vyšetřovaného souboru.

Ve vyšetřeném souboru byly pozorovány translokace genu *IGH* u 7 pacientů. Z toho u 5 pacientů vyšetřených v diagnóze a v relapsu/progresi u 2 pacientů. Fonseca *et al.* (2003) uvádí, že translokace *IGH* genu se nacházejí v myelomových buňkách přibližně u 60 % pacientů s MM, avšak námi detekované translokace *IGH* genu byly zjištěny pouze u 33 % nově diagnostikovaných pacientů s MGUS/MM a 20 % pacientů s MM v relapsu/progresi. Odlišné výsledky mohly být způsobeny velikostí našeho souboru pacientů. V celém souboru byly také nalezeny delece *IGH* genu u 5 (20 %) pacientů. Delece 5' konce *IGH* genu (fyziologická delece) byla nalezena u 4 pacientů ve velkém procentu plasmatických buněk (60 až 100 %). U 1 pacienta byla nalezena bialelická delece *IGH* genu ve 100 % plasmatických buněk. Delece telomerických částí *IGH* genu vznikají v důsledku VDJ rekombinace v průběhu vývoje B-lymfocytu a jsou považovány za fyziologické (Wlodarska *et al.*, 2007).

Všichni pacienti byli vyšetřeni na početní změny chromosomů 15 a 17. Chromosom 15 patří mezi chromosomy, u kterých je nejčastěji pozorován výskyt trisomií a tetrasomií (Fonseca *et al.*, 2003; Debes-Marun *et al.*, 2003). Trisomie a tetrasomie chromosomu 15 byly nalezeny celkově u 16 (64 %) pacientů. U 8 nově diagnostikovaných

pacientů (50 %) byly nalezeny početní změny chromosomu 15, stejně jako u 8 pacientů v relapsu/progresi MM (50 %). Pouze u 1 pacienta byla nalezena početní změna chromosomu 17. Hyperdiploidní varianta MM je spojována nejen s trisomií chromosomů, ale také s výskytem delece genu *RBI* a nižším výskytem *IGH* translokací (Hideshima *et al.*, 2004; Chng *et al.*, 2006).

Delece genu *RBI* byla metodou FICTION detekována celkově u 10 pacientů (40 %), z toho u 5 nově diagnostikovaných a 5 pacientů v relapsu/progresi MM. Tyto nálezy jsou ve shodě s nálezy dalších autorů. Avet-Loiseau *et al.* (2000) uvádí výskyt delece genu *RBI* u 42 % pacientů.

Z celkového souboru u 3 pacientů (12 %) v relapsu/progresi byla nalezena delece genu *TP53*, zatímco u nově diagnostikovaných pacientů tato změna nebyla nalezena. Tento výsledek souhlasí s prací Drach *et al.* (1998), který uvádí, že se delece genu *TP53* vyskytuje častěji u pacientů v relapsu /progresi MM než u nově diagnostikovaných pacientů.

Další pozorovanou změnu u pacientů s MM bylo zmnožení oblasti 1q21 a delece oblasti 1p32, které mohou být spolu asociovány. Celkově bylo zmnožení oblasti 1q21 nalezeno u 16 pacientů (64 %) s MM/MGUS. Z počtu 15 nově diagnostikovaných pacientů bylo zmnožení oblasti 1q21 nalezeno u 8 pacientů (53 %) a z toho pouze u 1 pacienta se tato změna vyskytovala společně s delecí oblasti 1p32. Hanamura *et al.* (2006) udává, že zmnožení oblasti 1q21 nebylo nalezeno u žádného pacienta s MGUS, ačkoliv v našem souboru pacientů byly detekovány 3 kopie oblasti 1q21 u 3 nově diagnostikovaných pacientů s MGUS. U pacientů v relapsu/progresi se tato změna vyskytovala u 8 pacientů (80 %) z 10. Podle Hanamura *et al.* (2006) bylo nalezeno zmnožení oblasti 1q21 u 43 % nově diagnostikovaných a 72 % pacientů v relapsu/progresi MM, což odpovídá námi zjištěným výsledkům.

Klonální vývoj patologických plasmatických buněk byl detekován a vyhodnocen u pacientů v relapsu/progresi MM. Z celkového počtu 10 pacientů v relapsu/progresi MM byl klonální vývoj zjištěn u 6 pacientů (60 %). Nejčastěji detekovanou nově vzniklou klonální změnou bylo zmnožení oblasti 1q21 u 5 pacientů. Z toho u 4 případů došlo k zvýšení z 3 kopií oblasti 1q21 na 4 a více kopií oblasti 1q21 a pouze u 1 pacienta vznikly 3 kopie oblasti 1q21 v progresi *de novo*. Dalšími nalezenými klonálními změnami byly tetrasomie chromosomu 15 u 2 pacientů a delece genu *TP53* u 1 pacienta.

## 7. ZÁVĚR

Cílem bakalářské práce bylo shromáždění literárních údajů o mnohočetném myelomu, cytogenetických metodách, chromosomových změnách u pacientů s MM, identifikování genetických změn u souboru pacientů s MM/MGUS pomocí metody FICTION, detekování klonálního vývoje patologických buněk a celkové vyhodnocení výsledků.

Ve většině případů výsledky molekulárně cytogenetické analýzy souboru pacientů odpovídaly výsledkům jiných autorů uvedených v citované literatuře. V některých případech mohlo dojít k odlišným výsledkům z důvodů analýzy malého počtu pacientů.

V celém souboru pacientů byly detekovány tyto změny: změny *IGH* genu (12 pacientů), delece genu *RBI* (10 pacientů), zmnožení oblasti 1q21 (16 pacientů), delece oblasti 1p32 (1 pacient), trisomie a tetrasomie chromosomu 15 (16 pacientů), trisomie chromosomu 17 (1 pacient) a delece genu *TP53* (3 pacienti). Klonální vývoj patologických plasmatických buněk byl určen u 6 pacientů v relapsu/progresi MM.

Určení chromosomových změn je významným markerem prognostické stratifikace pacientů s MM/MGUS a významným způsobem přispívá ke studiu patogeneze MM.

## 8. LITERATURA

ABRAHAM, R. S., GEYER, S. M., PRICE-TROSKA, T. L., ALLME, C., KYLE, R. A., GERATZ, M. A., FONSECA, R. (2003): Immunoglobulin light chain variable (V) region genes influence clinical presentation and outcome in light chain-associated amyloidosis (AL). *Blood* 101: 3801-3808.

ADAM, Z., HÁJEK, R., MAYER, J., ŠČUDLA, V., VORLÍČEK, J. A KOLEKTIV (1999): Mnohočetný myelom a další monoklonální gamapatie. Masarykova univerzita. Brno.

ANDERSON, K., LUTZ, CH., DELFT, van F. W., BATEMAN, C. M., GUO, Y., COLMAN, S. M., KEMPSKI, H., MOORMAN, A. V., TITLEY, I., SWANSBURY, J., KEARNEY, L., ENVER, T., GREAVES, M. (2011): Genetic variegation of clonal architecture and propagating cells in leukaemia. *Nature* 469: 356-361.

AVET-LOISEAU, H. (2007): Role of genetics in prognostication in myeloma. *Best Practice & Research Clinical Haematology* 20: 625-635.

AVET-LOISEAU, H., DAVIET, A., SAUNER, S., BATAILLE, R., INTERGROUPE FRANCOPHONE DU MYÉLOME (2000): Chromosome 13 abnormalities in multiple myeloma are mostly monosomy 13. *British journal of haematology* 111: 1116-1117.

BERGSAGEL, P. L., KUEHL, W. M. (2001): Chromosome translocations in multiple myeloma. *Oncogene* 20: 5611-5622.

BERGSAGEL, P. L., KUEHL, W. M. (2003): Critical roles for immunoglobulin translocations and cyclin D dysregulation in multiple myeloma. *Immunol Rev.* 194: 96-104.

BRADWELL, A. R., CARR-SMITH, H. D., MEAD, G. P., HARVEY, T. C., DRAYSON, M. T. (2003): Serum test for assessing patients with Bence Jones Myeloma. *The Lancet* 361: 489-491.

CARPENTER, N. J. (2001): Molecular Cytogenetics. *Seminars in Pediatric Neurology* 8: 135-146.

CHANG, H., QI, X. Y., SAMIEE, S., YI, Q. L., CHEN, C., TRUDEL, S., MIKHAEL, J., REECE, D., STEWART, A. K. (2005): Genetic risk identifies multiple myeloma patients who do not benefit from autologous stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 36: 793-796.

CHAPMAN, M. A., LAWRENCE, M. S., KEATS, J. J., CIBULSKIS, K., SOUGNEZ, C., SCHINZEL, A. C., HARVIEW, CH. L., BRUNET, J. P., AHMANN, G. J., ADLI, M., ANDERSON, K. C., ARDLIE, K. G., AUCLAIR, D., BAKER, A., BERGSAGEL, P. L., BERNSTEIN, B. E., DRIER, Y., FONSECA, R., GABRIEL, S. B., HOFMEISTER, C. C., JAGANNATH, S., JAKUBOEIAK, A. J., KRISHNAN, A., LEVY, J., LIEFELD, T., LONIAL, S., MAHAN, S., MFUKO, B., MONTI, S., PERKINS, L. M., ONOFRIO, R., PUGH, T. J., RAJKUMAR, S. V., RAMOS, A. H., SIEGEL, D. S., SIVACHENKO, A., STEWART, A. K., TRUDEL, S., VIJ, R., VOET, D., WINCKLER, W., ZIMMERMAN, T., CARPTEN, J., TRENT, J., HAHN, W. C., GARRAWY, L. A., MEYERSON, M., LANDER, E. S., GETZ, G., GOLUB, T. R. (2011): Initial genome sequencing and analysis of multiple myeloma. *Nature* 471: 467-472.

CHNG, W. J., GLEBOV, O., BERGSAGEL, P. L., KUEHL, W. M. (2007): Genetic events in the pathogenesis of multiple myeloma. *Best Practice & Research Clinical Haematology* 20: 571-596.

CHNG, W. J., SANTANA-DÁVILA, R., VAN WIER, S. A., AHMANN, G. J., JALAL, S. M., BERGSAGEL, P. L., CHESI, M., TRENDLE, M. C., JACOBUS, S., BLOOD, E., OKEN, M. M., HENDERSON, K., KYLE, R. A., GERTZ, M. A., LACY, M. Q., DISPENZIERI, A., GREIPP, P. R., FONSECA, R. (2006): Prognostic factors for hyperdiploid-myeloma: effects of chromosome 13 deletions and IgH translocations. *Leukemia* 20: 807-813.

CHUDOBA, I., PLESCH, A., LÖRCH, T., LEMKE, J., CLAUSSEN, U., SENGER, G. (1999): High resolution multicolor-banding: a new technique for refined FISH analysis of human chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* 84: 156-160.

DEBES-MARUN, C. S., DEWALD, G. W., BRYANT, S., PICKEN, E., SANTANA-DAVILA, R., GONZALEZ-PAZ, N., WINKLER, J. M., KYLE, R. A., GERTZ, M. A., WITZIG T. E., DISPERENZI, A., LACY, M. Q., RAJKUMAR, S. V., LUST, J. A., GREIPP, P. R., FONSECA, R. (2003): Chromosome abnormalities clustering and its implications for pathogenesis and prognosis in myeloma. *Leukemia* 17: 427-436.

DISPENZIERI, A., KYLE, RA. (2005): Multiple myeloma: clinical features and indications for therapy. *Best Pract Res Clin Haematol* 18: 553-568.

DRACH, J., ACKERMANN, J., FRITZ, E., KRÖMER, E., SCHUSTER, R., GISSLINGER, H., DESANTIS, M., ZOJER, N., FIEGL, M., ROKA, S., SCHUSTER, J., HEINZ, R., LUDWIG, H., HEINZ, H. (1998): Presence of a p53 gene deletion in patients with multiple myeloma predicts for short survival after conventional-dose chemotherapy. *Blood* 92: 802-809.

DRACH, J., SCHUSTER, J., NOWOTNY, H., ANGERLER, J., ROSENTHAL, F., FIEGL, M., ROTHERMUNDT, C., GSUR, A., JÄGER, U., HEINZ, R., LECHNER, K., LUDWIG, H., HUBER, H. (1995): Multiple myeloma: high incidence of chromosomal aneuploidy as detected by interphase fluorescence in situ hybridization. *Cancer Res* 55: 3854-3859.

EGAN, J. B., SHI, C. X., TEMBE, W., CHRISTOFORIDES, A., KURDOGLU, A., SINARI, S., MIDDHA, S., ASMANN, Y., SCHMIDT, J., BRAGGIO, E., KEATS, J. J., FONSECA, R., BERGSAGEL, P. L., CRAIG, D. W., CARPTEN, J. D., STEWART, A. K. (2012): Whole-genome sequencing of multiple myeloma from diagnosis to plasma cell leukemia reveals genomic initiating events, evolution, and clonal tides. *Blood* 120: 1060-1066.

FONSECA, R., BARLOGIE, B., BATAILLE, R., BASTARD, CH., BERGSAGEL, P. L., CHESI, M., DAVIES, F. E., DRACH, J., GREIPP, P. R., KIRSCH, I. R., KUEHL, W. M., HERNANDEZ, J. M., MINVIELLE, S., PILARSKI, L. M., SHAUGHNESSY, J., STEWART, A. K., AVET-LOISEAU, H. (2004): Genetic and cytogenetics of multiple myeloma: a workshop report. *Cancer Res*. 64: 1546-1558.

FONSECA, R., DEBES-MARUN, C. S., PICKEN, E. B., DEWALD, G. W., BRYANT, S. C., WINKLER, J. M., BLOOD, E., OKEN, M. M., SANTANA-DÁVILA, R., GONZÁLEZ-PAZ, N., KYLE, R. A., GERTZ, M. A., DISPENZIERI, A., LACY, M. Q., GREIPP, P. R. (2003): The recurrent IgH translocations are highly associated with nonhyperdiploid variant multiple myeloma. *Blood* 102: 2562-2567.

FONSECA, R., HARRINGTON, D., OKEN, M. M., DEWALD, G. W., BAILEY, R. J., VAN WIER, S. A., HENDERSON K. J., BLOOD, E. A., RAJKUMAR, S. V., KAY, N. E., VAN NESS, B., GREIPP, P. R. (2002): Biological and prognostic significance of interphase fluorescence in situ hybridization detection of chromosome 13 abnormalities (delta13) in multiple myeloma: an eastern cooperative oncology group study. *Cancer Research* 62: 715-720.

HADAA, M., WUA, H., CUCINOTTAA, F. A. (2011): mBAND analysis for high- and low-LET radiation-induced chromosome aberrations: A review. *Mutation Research* 711: 187-192.

HALLEK, M., BERGSAGEL, P. L., ANDERSON, K. C. (1998): Multiple myeloma: increasing evidence for a multistep transformation process. *Blood* 91: 3-21.

HANAMURA, I., STEWART, J. P., HUANG, Y., ZHAN, F., SANTRA, M., SAWYER, J. R., HOLLMING, K., ZANGARRI, M., PINEDA-ROMAN, M., RHEE, F., CAVALLO, F., BURINGTON, B., CROWLEY, J., TRICOT, G., BARLOGIE, B., SHAUGHNESSY JR, J. D. (2006): Frequent gain of chromosome band 1q21 in plasma-cell dyscrasias detected by fluorescence in situ hybridization: incidence increases from MGUS to relapsed myeloma and is related to prognosis and disease progression following tandem stem-cell transplantation. *Blood* 108: 1724-1732.

HIDESHIMA, T., BERGSAGEL, P. L., KUEHL, W. M., ANDERSON, K. C. (2004): Advances in biology of multiple myeloma: clinical applications. *Blood* 104: 607-618.

JUGE-MORINEAU, N., HAROUSSEAU, J. L., AMIOT, M., BATAILLE, R. (1997): The retinoblastoma susceptibility gene RB-1 in multiple myeloma. *Leukemia Lymphoma* 24: 229-237.

KANNAN, T. P., ZILFALIL, B. A. (2009): Cytogenetics: Past, present and future. *Malaysian Journal of Medical Sciences* 16: 4-9.

KEARNEY, L. (2005): Multiplex-FISH (M-FISH): technique, developments and applications. *Cytogenetics and genome research*. 114: 189-198.

KUEHL, W. M., BERGSAGEL, P. L. (2002): Multiple myeloma: evolving genetic events and host interactions. *Nature Reviews Cancer* 2: 175-187.

KUGLÍK, P., FILKOVÁ, H., OLTOVÁ, A., HÁJEK, R. (2006): Význam a současné možnosti diagnostiky cytogenetických změn u mnohočetného myelomu. *Vnitřní lékařství* 52: 76-78.

KÜPPERS, R., DALLA-FAVERA, R. (2001): Mechanisms of chromosomal translocations in B cell lymphomas. *Oncogene*. 20: 5580-5594.

KYLE, R. A., GERTZ, M. A., WITZIG, T. E., LUST, J. A., LACY, M. Q., DISPERENZI, A., FONSECA, R., RAJKUMAR, S. V., OFFORD, J. R., LARSON, D. R., PLEVAK, M. E., THERNEAU, T. M., GREIPP, P. R. (2003): Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Mayo Clinic Proceedings* 78: 21-33.

KYLE, R. A., RAJKUMAR, S. V. (2008): Multiple myeloma. *Blood* 111: 2962-2972.

KYLE, R. A., RAJKUMAR, S. V. (2009): Criteria for diagnosis, staging, risk stratification and response assessment of multiple myeloma. *Leukemia* 23: 3-9.

KYLE, R. A., THERNEAU, T. M., RAJKUMAR, S. V., OFFORD, J. R., LARSON, D. R., PLEVAK, M. F., MELTON III, L. J. (2002): A long-term study of prognosis in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *New England Journal of Medicine* 346: 564-569.

LEBIEN, T. W., TEDDER, T. F. (2008): B lymphocytes: how they develop and function. *Blood* 112: 1570-1580.



LEE, CH., GISSELSSON, D., JIN, CH., NORDGREN, A., FERGUSON, D. O., BLENNOW, E., FLETCHER J. A., MORTON, C. C (2001): Limitations of Chromosome Classification by Multicolor Karyotyping. *Am. J. Hum. Genet.* 68: 1043-1047.

LEUNG, E. W., SIN, P. L., WAN, T. S. (2012): The impact of FICTION on the detection of genetic aberrations in multiple myeloma. *JHK Inst Med Lab Sci* 13: 1-8.

LEXOVÁ, S., BOURKOVÁ, L., BULÍKOVÁ, A., JAROŠOVÁ, M., KRAHULCOVÁ, E. (2000): Hematologie pro zdravotní laboranty. Skriptum 1. díl. Kapitola: Cytogenetika. Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví. Brno.

LICHTER, P. (1997): Multicolor FISHing: what's the catch. *Trends Genetics* 13: 475-479.

LIEHR, T., STARKE, H., WEISE, A., LEHRER, H., CLAUSSEN, U. (2004): Multicolor FISH probe sets and their applications. *Histol Histopathol* 19: 229-237.

MAHINDRA, A., HIDESHIMA, T., ANDERSON, K. C. (2010): Multiple myeloma: biology of the disease. *Blood reviews* 24: S5-S11.

MAISNAR, V., HÁJEK, R. (2008): Změny v diagnostických kritériích a kritériích léčebné odpovědi u mnohočetného myelomu. *Transfuze Hematol. Dnes* 14: 119-123.

MCNEIL, N., RIED, T. (2000): Novel molecular cytogenetic techniques for identifying complex chromosomal rearrangements: technology and applications in molecular medicine. *Expert Rev. Mol. Med.* 2: 1-14.

MICHALOVÁ, K. (1999): Úvod do lidské cytogenetiky. Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví. Brno.

MORGAN, G. J., WALKER, B. A., DAVIES, F. E. (2012): The genetic architecture of multiple myeloma. *Nature Reviews Cancer* 12: 335-348.

MUNSHI, N. C. (2008): Plasma cell disorders: an historical perspective. *ASH Education Program Book* 1: 297.

NACHEVA, E. P., GRACE, C. D., BITTNER, M., LEDBETTER, D. H, JENKINS, R. B., GREEN, A. R (1998): Comparative Genomic Hybridization: A Comparison with Molecular and Cytogenetic Analysis. *Cancer Genet Cytogenet* 100: 93-105.

NĚMEC, P., KUGLÍK, P., HÁJEK, R. (2008): Úloha chromosomových translokací při vzniku a vývoji mnohočetného myelomu. *Klinická onkologie* 21: 53.

ORKIN, S. H. (2000): Diversification of haematopoietic stem cells to specific lineages. *Nat. Rev. Genet.* 1: 57-64.

ORKIN, S. H., ZON, L. I. (2008): Hematopoiesis: An Evolving Paradigm for Stem Cell Biology. *Cell* 132: 631-644.

PECKA, M. (2002): Laboratorní hematologie v přehledu: Buňka a krvetvorba. Finidr. Český Těšín.

PODAR, K., HIDEHIMA, T., CHAUHAN, D., ANDERSON, K. C. (2005): Targeting signalling pathways for the treatment of multiple myeloma. *Expert opinion on therapeutic targets* 9: 359-381.

PODAR, K., TAI, Y. T., HIDEHIMA, T., VALLET, S., RICHARDSON, P. G, ANDERSON, K. C. (2009): Emerging therapies for multiple myeloma. *Expert Opin Emerg Drugs.* 14: 99–127.

PRIDEAUX, S. M., O'BRIEN, E. C., CHEVASSUT, T. J. (2014): The genetic architecture of multiple myeloma. *Advances in hematology.*

RAAB, M. S., PODAR, K., BREITKREUTZ, I., RICHARDSON, P. G., ANDERSON, K. C. (2009): Multiple myeloma. *Lancet* 374: 324-39.

RAJKUMAR, S. V. (2011): Treatment of multiple myeloma. *Nature reviews Clinical oncology* 8: 479-491.

SANDBERG, A. A., MELONI-EHRIG A. M. (2010): Cytogenetics and genetics of human cancer: methods and accomplishments. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 203: 102-126.

SAWYER, J. R. (2011): The prognostic significance of cytogenetics and molecular profiling in multiple myeloma. *Cancer Genetics* 204: 3-12.

SAWYER, J. R., WALDRON, J. A., JAGANNATH, S., BARLOGIE, B. (1995): Cytogenetic findings in 200 patients with multiple myeloma. *Cancer Genet Cytogenet* 82: 41-49.

SCHENA, M., SHALON, D., DAVIS, R. W, BROWN, P. O. (1995): Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270: 467-470.

SHAPIRO-SHELEF, M., CALAME, K. (2005): Regulation of plasma-cell development. *Nature Reviews Immunology* 5: 230-242.

SHAUGHNESSY, J. (2005): Amplification and overexpression of CKS1B at chromosome band 1q21 is associated with reduced levels of p25<sup>Kipl</sup> and an aggressive clinical course in multiple myeloma. *Hematology* 10: 117-126.

SMITH, A., WISLOFF, F., SAMSON, D. (2006): Guidelines on the diagnosis and management of multiple myeloma 2005. *British Journal of Haematology* 132: 410-451.

SNUSTAD, D. P., SIMMONS, M. J. (2009): Genetika. Přeloženo z anglického originálu „Principles of Genetics“, 5th ed., John Wiley et Sons. Masarykova univerzita. Brno. p871.

STRACHAN T., READ, A. P. (1999): *Human Molecular Genetics*. 2<sup>nd</sup> edition. Chapter 2: Chromosomes in cells. Wiley-Liss. New York.

THEISEN, A. (2008): Microarray-based Comparative Genomic Hybridization (aCGH). *Nature Education* 1: 45.

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

TODD, R., DONOFF, R. B., WONG, D. T. W. (2000): The Chromosome: Cytogenetic analysis and its clinical application. *J Oral Maxillofac Surg* 58: 1034-1039.

TÖNNIES, H. (2002): Modern molecular cytogenetic techniques in genetic diagnostic. *TRENDS in Molecular Medicine* 8: 246-250.

VORSANOVA, S. G., YUROV, Y. B., IOUROV, I. Y. (2010): Human interphase chromosomes: a review of available molecular cytogenetic technologies. *Molecular Cytogenetics* 3: 1.

WALKER, B. A., WARDELL, CH. P., MELCHOR, L., BRIOLI, A., JOHNSON, D. C., KAISER, M. F., MIRABELLA, F., LOPEZ-CORRAL, L., HUMPHRAY, S., MURRAY, L., ROSS, M., BENTLEY, D., GUTIÉRREZ, N. C., GARCIA-SANZ, R., MIGUEL, J. S., DAVIES, F. E., GONZALEZ, D., MORGAN, G. J. (2014): Intraclonal heterogeneity is a critical early event in the development of myeloma and precedes the development of clinical symptoms. *Leukemia* 28: 384-390.

WAN, T. S. (2010): Molecular cytogenetics: techniques, developments and applications. *Jurnal of Hong Kong institute of medical laboratory sciences* 12: 1-12.

WANG, X. W., LI, J. Y., CHEN, L. J., QIAN, S. X., HONG, M., QIAO, C., ZHANG, J. F., XU, W., LU, H. (2008): Fluorescence immunophenotyping and interphase cytogenetics as a tool for the investigation of cytogenetic aberrations of multiple myeloma. *Journal of experimental hematology/Chinese Association of Pathophysiology* 16: 1316-1319.

WEBER-MATTHIESEN, K., WINKEMANN, M., MULLER-HERMELINK, A., SCHLEGELBERGER, B., GROTE, W. (1992): Simultaneous fluorescence immunophenotyping and interphase cytogenetics: a contribution to the characterization of tumor cells. *J Histochem Cytochem* 40: 171-175.

WILLIS, T. G., DYER, M. J. (2000): The role of immunoglobulin translocations in the pathogenesis of B-cell malignancies. *Blood* 96: 808-822.

WINSLOW, T. (2008): National Cancer Institute. [online]. [cit. 2015-04-08]. Dostupné z: <http://m.cancer.gov/images/cdr/live/CDR596562-750.jpg>.

WLODARSKA, I., MATTHEWS, C., VEYT, E., POSPISILOVA, H., CATHERWOOD, M. A., POULSEN, T. S., VANHENTENRIJK, V., IBBOTSON, R., VANDENBERGHE, P., MORRIS, T. C., ALEXANDER, H. D. (2007): Telomeric IGH losses detectable by fluorescence in situ hybridization in chronic lymphocytic leukemia reflect somatic VH recombination events. *J Mol Diagn* 1: 47-54.

XIONG, W., WU, X., STARNES, S., JOHNSON, S. K., HAESSLER, J., WANG, S., CHEN, L., BARLOGIE, B., SHAUGHNESSY, J. D., ZHAN, F. (2008): An analysis of the clinical and biologic significance of TP53 loss and the identification of potential novel transcriptional targets of TP53 in multiple myeloma. *Blood* 112: 4235-4246.

ZHAN, F., COLLA, S., WU, X., CHEN, B., STEWART, J. P., KUEHL, W. M., BARLOGIE, B., SHAUGHNESSY, J. D. (2007): CKS1B, overexpressed in aggressive disease, regulates multiple myeloma growth and survival through SKP2- and p27Kip1-dependent and -independent mechanisms. *Blood* 109: 4995-5001.

## 9. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

aCGH	array komparativní genomová hybridizace
AMCA	7-amino-4-methylkumarin-3-octová kyselina
ASCT	autologní transplantace kmenových buněk
BM medium	bone marrow medium; médium pro kostní dřeň
CCD kamera	charge-coupled device camera; kamera se speciální technologií snímání obrazu
CGH	komparativní genomová hybridizace
<i>CKS1B</i>	gen kódující podjednotku proteinu Cks1
CSR	class switch recombination
DAPI	4',6-diamidino-2-fenylindol
<i>de novo</i>	od začátku, nově
DNA	deoxyribonukleová kyselina
FGFR3	fibroblast growth factor receptor 3; receptor fibroblastového růstového faktoru 3
FICTION	fluorescence immunophenotyping and interphase cytogenetic as a tool for the investigation of neoplasm; imunofluorescenční detekce myelomových buněk a následná i-FISH
FISH	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
FITC	fluorescein isothiocyanate
FNOL	Fakultní nemocnice Olomouc
HOK	Hemato-onkologická klinika
HSC	hematopoetic stem cells ; hematopoetické kmenové buňky
i-FISH	interfázni fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
Ig	imunoglobulin
IgA	imunoglobulin A
IGF	insulin-like growth factor
<i>IGH</i>	gen pro těžký řetězec imunoglobulinu
IgM	imunoglobulin M
IL-6	interleukin 6
IMWG	International myeloma working group

<i>in situ</i>	„na místě“
ISS	international staging system; mezinárodní stážovací systém
K24	kultivace 24 hodin
KCl	chlorid sodný
KD	kostní dřev
kD	kiloDalton
LSI	označení pro lokusově specifickou sondu
mBAND	vícebarevné pruhovací techniky
mFISH	multicolor FISH; mnohobarevná fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
MGUS	monoklonální gamapatie nejasného významu
MM	mnohočetný myelom
MMSET	multiple myeloma set domain
<i>MYC</i>	myelocytomatosis oncogene; gen kódující c-myc protein
NP40	nonyl phenoxypolyethoxyethanol
PBS	phosphate buffered saline; fosfátový pufr
PCL	plasma cell leukemia; plasmacelulární leukémie
<i>RBI</i>	retinoblastoma; retinoblastomový gen
SKY	spektrální karyotypizace
SMM	doutnající mnohočetný myelom
SSC	saline-sodium citrate buffer; citrátový solný pufr
<i>TP53</i>	gen kódující p53 protein
VDJ rekombinace	přeskupování subgenů pro těžké řetězce imunoglobulinů
VEGF	vascular endothelial factor; vaskulárně-endotelialní růstový faktor