

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů



**Cytogenetika a molekulární cytogenetika u pacientů s  
chronickou lymfocytární leukemií (CLL) se zaměřením na  
zmnožení krátkého ramene chromosomu 2 (2p)**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Autor:	<b>Bc. Barbora Štefková</b>
Studijní program:	B1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>Mgr. Lenka Krůzová</b>
Konzultant práce:	<b>Mgr. Helena Urbánková, Ph.D.</b>
Rok:	2019

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Barbora Štefková
Název práce	Cytogenetika a molekulární cytogenetika u pacientů s chronickou lymfocytární leukémií (CLL) se zaměřením na zmnožení krátkého ramene chromosomu 2 (2p)
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Hematoonkologická klinika, Fakultní nemocnice Olomouc
Vedoucí práce	Mgr. Lenka Krůzová
Konzultant práce	Mgr. Helena Urbánková, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2019
Abstrakt	<p>Tato diplomová práce se zabývá chronickou lymfocytární leukémií (CLL) a jejími prognostickými markery, které jsou nezbytné pro stanovení diagnózy a případné léčby. Analýza genetických změn je v rámci této práce zaměřena na metody cytogenetiky a molekulární cytogenetiky. Od listopadu 2017 do prosince 2018 byly vyšetřeny dva soubory pacientů. Soubor vyšetřený metodou array komparativní hybridizace zahrnoval pacienty se zmnožením krátkého ramene chromosomu 2 (2p+). Byly graficky určeny nejčastěji zmnožené úseky na chromosomu, zahrnující kandidátní geny <i>MYCN</i>, <i>ALK</i> a <i>REL</i>. Délka přežívání pacientů byla statisticky porovnána se souborem bez zmnožení 2p. Prognostický marker 2p není zatím v rutinní praxi využíván, ačkoli zahrnuje důležité protoonkogeny a je detekován u nezanedbatelného množství CLL pacientů. Druhý soubor byl vyšetřen metodou fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace a výsledky byly porovnány s literaturou.</p>
Klíčová slova	Chronická lymfocytární leukémie, hematopoesa, prognostické faktory CLL, zmnožení 2p.
Počet stran	99
Počet příloh	0
Jazyk	Český

## Bibliographical identification

Author's first name and surname	Bc. Barbora Štefková
Title of thesis	Cytogenetics and molecular cytogenetics in patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL) with a focus on the gain of the short arm of chromosome 2 (2p)
Type of thesis	Master
Department	Dpt. of Hemato-oncology, University Hospital Olomouc
Supervisor	Mgr. Lenka Krůzová
Consultant of thesis	Mgr. Helena Urbánková, Ph.D.
The year of presentation	2019
Abstract	<p>This thesis deals with chronic lymphocytic leukemia (CLL) and its prognostic markers, which are necessary for diagnosis and treatment assesment. The analysis of genetic changes in this work is focused on methods of cytogenetics and molecular cytogenetics. Two sets of patients were examined from November 2017 to December 2018. The array comparative hybridization assay included patients with the duplication of the short arm of chromosome 2 (2p+). The most frequently gained segments on the chromosome, which included the candidate genes <i>MYCN</i>, <i>ALK</i> and <i>REL</i>, were graphically determined. The survival time of the patients was statistically compared to that of the non-2p population. Prognostic marker 2p is not yet used in routine practice, although it includes important protooncogenes and affects a significant amount of CLL patients. The second set was examined by fluorescence in situ hybridization and the results were compared with literature.</p>
Keywords	Chronic lymphocytic leukemia, hematopoiesis, CLL prognostic factors, 2p duplication.
Number of pages	99
Number of appendices	0
Language	Czech

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.

V Olomouci dne .....

.....

## **Poděkování**

Ráda bych tímto poděkovala Mgr. Lence Krůzové za metodické vedení, odborný dohled, cenné rady a osobní přístup v průběhu zpracování diplomové práce. Mé poděkování dále patří Mgr. Heleně Urbánkové, Ph.D. za konzultaci a příjemnou spolupráci a také celému kolektivu laboratoří cytogenetiky, molekulární cytogenetiky a molekulární biologie HOK FNOL.

*Tato práce byla podpořena granty: IGA\_LF\_2019\_001, RVO/FNOI 000-98892, VES16-32339A a MH CZ – DRO (FNOI, 00098892).*

## Obsah

1	Úvod.....	13
2	Současný stav řešené problematiky.....	14
2.1	Hematopoesa.....	14
2.1.1	Prenatální krvetvorba.....	15
2.1.2	Vývoj erytrocytů.....	16
2.1.3	Proliferace kmenových buněk.....	17
2.1.4	Maturace a diferenciaci B-lymfocytů.....	18
2.1.4.1	Germinální centra.....	18
2.2	Chronická lymfocytární leukemie.....	20
2.2.1	Obecná charakteristika onemocnění.....	20
2.2.2	Klasifikace.....	20
2.2.3	Klinické příznaky.....	21
2.2.4	Epidemiologie.....	22
2.2.5	Diagnostika.....	22
2.2.6	Léčba.....	22
2.2.7	Prognostické faktory.....	25
2.2.7.1	Mutační status <i>IGHV</i> .....	25
2.2.7.2	Expres ZAP-70.....	26
2.2.7.3	Expres CD38+.....	26
2.2.8	Molekulárně cytogenetické prognostické faktory.....	27
2.2.8.1	Delece 13q.....	27
2.2.8.2	Delece 11q.....	27
2.2.8.3	Trisomie chromosomu 12.....	28
2.2.8.4	Delece 17p.....	29
2.2.8.5	Delece 6q.....	30
2.2.8.6	Duplikace 8q24 ( <i>MYC</i> ).....	30
2.2.8.7	Přestavba <i>IGH</i> .....	31
2.2.8.8	Zmnožení chromosomu 2p (2p+).....	32
2.2.8.9	Komplexní karyotyp.....	33
2.3	Molekulární cytogenetika.....	34
2.3.1	Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace (FISH).....	34
2.3.1.1	Ideogramy.....	34
2.3.2	Array komparativní genomová hybridizace (aCGH).....	37
3	Materiál a metody.....	38
3.1	Biologický materiál.....	38
3.2	Postup.....	38
3.3	Kultivace biologického materiálu.....	38
3.3.1	Kultivace lymfocytů periferní krve (PK).....	38
3.3.2	Kultivace buněk kostní dřeně (KD).....	40

3.3.3	Kultivace lymfocytů z uzliny (UZL) .....	40
3.3.4	Zpracování biologického materiálu .....	40
3.4	Materiál a metody pro FISH vyšetření .....	41
3.4.1	Přístrojové vybavení a spotřební materiál.....	41
3.4.2	Použité chemikálie .....	41
3.4.3	Použité roztoky .....	42
3.4.4	Postup FISH.....	42
3.5	Materiál a metody pro aCGH .....	43
3.5.1	Přístrojové vybavení a spotřební materiál.....	43
3.5.2	Použité chemikálie .....	44
3.5.3	Kity .....	44
3.5.4	Software .....	45
3.5.5	Postup aCGH .....	45
3.5.5.1	Stanovení koncentrace DNA ve vzorku dle Qubit™ Assays, Invitrogen.....	45
3.5.5.2	Restrikce (SureTag DNA Labeling Kit).....	45
3.5.5.3	Fluorescenční značení gDNA.....	46
3.5.5.4	Přečištění značené gDNA.....	47
3.5.5.5	Hybridizace .....	48
3.5.5.6	Mytí microarraye.....	48
3.6	Statistická analýza.....	49
4	Výsledky .....	50
4.1	Výsledky komparativní genomové hybridizace na čipu .....	50
4.1.1	Soubor pacientů .....	50
4.1.1.1	Příklady grafického zobrazení zmnožení 2p .....	65
4.2	Výsledky FISH.....	72
4.2.1	Soubor pacientů .....	72
4.2.1.1	Kazuistika pacienta 37/M.....	78
5	Diskuze.....	82
6	Závěr .....	85
7	Seznam použité literatury.....	86
8	Internetové zdroje.....	99

## Seznam zkratk

- aCGH – array komparativní genomová hybridizace
- AGM – aorta, gonády a prvoledvina
- AID – aktivací indukovaná cytidin deaminasa
- ATM – ataxia-telangiectasia mutated
- BCR – receptor B-lymfocyту
- BFU-E – buňka tvořící velké shluky erytroidních buněk
- BM – kultivační medium (bone marrow)
- BTK – Brutonova tyrosinkinasa
- CFU-E – buňka vytvářející malé kolonie erytrocytů
- CFU-GEMM – koloniformní jednotka pro myelopoese
- CFU-GM – buňka vytvářející kolonie granulocytů a makrofágů
- CFU-L – koloniformní jednotka pro lymfopoese
- CGH – komparativní genomové hybridizace
- CK – Komplexní karyotyp
- CLL – chronická lymfocytární leukemie
- CNV – variace v počtu kopií
- DAPI – 4',6-diamidin-2-fenylindol
- EPO – erytropoetin
- FDA – Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
- FISH – fluorescenční in situ hybridizace
- G-CSF – faktor stimulující kolonie granulocytů
- GM-CSF – faktor stimulující kolonie granulocytů/makrofágů
- HSC – hematopoetické kmenové buňky
- ICD – Mezinárodní klasifikace nemocí a přidružených zdravotních problémů
- ICM – vnitřní masa buněk
- Ig – imunoglobulin
- IL-1 – Interleukin 1
- IL-2 – Interleukin 2
- IL-3 – Interleukin 3
- IL-6 – Interleukin 6
- In situ* – na místě
- ISCN – an international system for human cytogenomic nomenclature
- iwCLL – Mezinárodní seminář o CLL
- KCl – chlorid draselný
- KD – kostní dřev
- LDT – zdvojovací čas lymfocytů



LMWPTP – rodina fosfotyrosin fosfatas s nízkou molekulovou hmotností

LT-HSC – buňka zodpovědná za dlouhodobou repopulaci

MALT – slizniční imunitní systém

M-CSF – faktor stimulující kolonie makrofágů

MPP – populace multipotentního progenitoru

ND – not done, vyšetření neprovedeno

PI-3-K – fosfatidylinositol-3 kinasa

PK – periferní krev

SCF – faktor kmenové buňky

SSC – saline-sodium citrate pufr

ST-HSC – buňka zodpovědná za krátkodobou repopulaci

TGF- $\beta$  – transformující faktor  $\beta$

T-PLL – T-prolymfocytická leukemie

TPO – trombopoetin

UZL – uzlina

WHO – Světová zdravotnická organizace

ZAP-70 – zeta-chain-associated protein 70

## Seznam obrázků

Obr. 1 – Schéma hematopoesy, cytokiny stimulující hematopoetické buňky.....	17
Obr. 2 – Schéma maturace a diferenciacie B-lymfocytů, průchod germinálním centrem .....	19
Obr. 3 – Schéma aktuálních možností pro 1. linii léčby u pacientů s CLL.....	24
Obr. 4 – Schéma znázorňující gen pro <i>IGH</i> .....	31
Obr. 5 – Region ramene chromosomu 2 se označenými kandidátními geny .....	33
Obr. 6 – Ideogram sondy XL DLEU/LAMP/12cen (MetaSystems).....	35
Obr. 7 – Ideogram sondy XL ATM/TP53 (MetaSystems).....	35
Obr. 8 – Ideogram sondy CL 6q21/8q24 (MetaSystems) .....	36
Obr. 9 – Ideogram sondy XL IGH BA (MetaSystems).....	36
Obr. 10 – Poměr pacientů na základě rozdělení podle Binet <i>et al.</i> ....	51
Obr. 11 – Poměr pacientů na základě mutovaného/nemutovaného <i>IGHV</i> genu .....	51
Obr. 12 – Poměr četnosti zastoupení všech chromosomálních aberací u souboru pacientů vyšetřovaných metodami FISH a aCGH.....	52
Obr. 13 – Rozsah zmožení na chromosomu 2p se znázorněnými kandidátními geny <i>MYCN</i> , <i>ALK</i> , <i>REL</i> .....	53
Obr. 14 – Celkové přežívání pacientů se zmožením 2p.....	54
Obr. 15 – Celkové přežívání pacientů se zmožením 2p v době diagnózy.....	55
Obr. 16 – Celkové přežívání pacientů se zmožením 2p v průběhu onemocnění .....	56
Obr. 17 – Znázornění zmoženého úseku a ztráta genetické informace na chromosomu 2 u pacienta 14/M <sup>†</sup> .....	65
Obr. 18 – Znázornění zmoženého úseku na chromosomu 2p u pacienta 37/M .....	65
Obr. 19 – Znázornění zmoženého úseku na chromosomu 2p u pacienta 41/M <sup>†</sup> .....	66
Obr. 20 – Poměr zastoupení počtu chromosomálních změn u souboru pacientů vyšetřovaných metodou FISH.....	73
Obr. 21 – Typ chromosomové změny u pacientů s 1 genetickou změnou.....	73
Obr. 22 – Poměr četnosti zastoupení všech osmi chromosomálních aberací u souboru pacientů vyšetřovaných metodou FISH.....	74
Obr. 23 – Karyotyp pacienta 37/M s označeným derivovaným chromosomem 11 .....	78
Obr. 24 – Snímek parciální delecce 5' konce <i>IGH</i> genu (V segmentu) na chromosomu 14 .....	79
Obr. 25 – Snímek deletovaného genu <i>ATM</i> na dlouhém (q) rameni chromosomu 11 .....	79
Obr. 26 – Snímek tří kopií genu <i>ALK</i> na krátkém (p) rameni chromosomu 2 .....	80
Obr. 27 – Snímek derivovaného chromosomu 11 – prokázána translokace mezi chromosomy 2 (značen červeně) a 11 (značen zeleně).....	80

## Seznam tabulek

Tab. 1 – Klinické stážování dle Rai <i>et al.</i> .....	21
Tab. 2 – Klinické stážování dle Binet <i>et al.</i> .....	21
Tab. 3 – Objem periferní krve pro kultivaci s IL-2 a oligonukleotidy (EKAMPO MIX) podle počtu leukocytů.....	39
Tab. 4 – Štěpící Master Mix.....	46
Tab. 5 – Restrikční štěpení DNA za použití termocykleru .....	46
Tab. 6 – Značící Master mix .....	47
Tab. 7 – Značení DNA za použití termocykleru .....	47
Tab. 8 – Hybridizační Master Mix pro 4-čipovou microarray .....	48
Tab. 9 – Základní rozdělení souboru pacientů se zmnožením 2p dle pohlaví, věku a stadia.....	50
Tab. 10 – Přehled výsledků ISCN vyšetření metodou aCGH .....	57
Tab. 11 – Přehled výsledků vyšetření metodou FISH u pacientů se zmnožením 2p .....	67
Tab. 12 – Základní rozdělení souboru pacientů dle pohlaví a věku.....	72
Tab. 13 – Přehled výsledků cytogenetického vyšetření FISH .....	75

## **Cíle práce**

1. Vypracovat literární rešerši na dané téma.
2. Pomocí metody FISH (fluorescenční *in situ* hybridizace) vyhodnotit genetické změny u souboru pacientů s CLL.
3. U podsouboru pacientů s duplikací 2p určit pomocí aCGH (array komparativní genomové hybridizace) její rozsah, vyhodnotit nejčastěji sdružené cytogenetické změny a statisticky analyzovat.

# 1 Úvod

Chronická lymfocytární leukemie (CLL) patří mezi nejčastější leukemie dospělého věku a je charakteristická svou biologickou, klinickou a genetickou heterogenitou. CLL je typická klonální proliferací a akumulací neoplastických B-lymfocytů v periferní krvi, kostní dřeni, lymfatických uzlinách a ve slezině a postihuje častěji muže nad 60 let života. Mezi základní prognostické faktory patří pohlaví, věk, mutační status *IGHV* genu a chromosomální změny. Nejčastějšími změnami u CLL jsou delece oblastí 13q14, 11q22–q23 (*ATM*), 17p13 (*TP53*), 6q21, dále trisomie chromosomu 12, přestavba genu *IGH* a zmnožení oblasti 8q24 a krátkých ramen chromosomu 2. Mutace a delece genů *ATM* a *TP53* se ukázaly jako jedny z prognostických faktorů identifikující podskupiny pacientů s rychle progredujícím onemocněním. Další studie genomických aberací mohou vést k lepšímu pochopení molekulární patogeneze onemocnění.

Existuje řada metod, která pomáhá určit prognosticky významné faktory. Jednou z nejvyužívanějších metod molekulární cytogenetiky je fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH), která detekuje chromosomální změny na úrovni jedné, nedělící se buňky. Genomové oblasti mohou být detekovány sondami dostupnými z genomových knihoven. Aberace jsou pomocí FISH se specifickou sondou detekovány u více než 80 % nemocných CLL, proto je metoda FISH oblíbenou rutinní metodou pro analýzu cytogenetických změn. Array komparativní genomová hybridizace (aCGH) doplňuje často metodu FISH. Metoda aCGH poskytuje pohled na celý genom a detekuje počty kopií genomické DNA s vyšším rozlišením než metoda FISH. Naproti tomu je však méně citlivá při nižším procentuálním zastoupení jednotlivých aberací.

## 2 Současný stav řešené problematiky

### 2.1 Hematopoesa

Krev je jednou z nejčastěji se regenerujících tkání organismu a je zodpovědná za udržování homeostasy. Diverzita této trofní tkáně, jenž zahrnuje širokou škálu buněčných morfologií, vzniká vysoce regulovaným procesem krvetvorby, tzv. hematopoesou. Hematopoesa probíhá v krvetvorné tkáni, která je u dospělého člověka lokalizována v kostní dřeni a v lymfatických orgánech, tj. ve slezině, brzlíku, v lymfatických uzlinách a slizničním imunitním systému MALT (mucosa associated lymphatic tissue), (Nečas, 2006).

Za neustálou produkci krevních buněk po celou délku života organismu jsou odpovědné vzácné, nediferencované, multipotentní buňky kostní dřene – **hematopoetické kmenové buňky** (HSC, hematopoietic stem cells). Ruský biolog A. Maximow již v roce 1909 hematopoesu postuloval jako organizovanou hierarchii buněk, pocházejících ze společného prekursoru: hematopoetické kmenové buňky (Maximow, 1909). Funkcí těchto buněk je samostatné obnovování, proliferace a následná diferenciaci do všech krevních buněčných linií prostřednictvím progenitorů (Orkin, 2000). Diferenciaci je proces řízený růstovými a transkripčními faktory. Dle Ketley *et* Newland (1997), existuje řada hematopoetických růstových faktorů, které se podílejí na vývoji rozličných krevních buněk z progenitorů kostní dřene:

- Erytropoetin (EPO)
- Faktor kmenové buňky (stem-cell factor, SCF)
- Faktor stimulující kolonie granulocytů (granulocyte-colony stimulating factor, G-CSF)
- Faktor stimulující kolonie granulocytů/makrofágů (granulocyte/macrophage-colony stimulating factor, GM-CSF)
- Faktor stimulující kolonie makrofágů (macrophage-colony stimulating factor, M-CSF)
- Interleukin 1 (IL-1)
- Interleukin 3 (IL-3)
- Interleukin 6 (IL-6)
- Trombopoetin (TPO)

Níže jsou uvedeny některé transkripční regulační faktory hematopoesy, které mají schopnost změnit fenotyp buněčné linie, do které jsou přidány (Orkin *et al.*, 2000):

- GATA-1, GATA-2, GATA-3
- PU.1
- FOG 1
- Runx1
- C/EBP
- Pax5
- T-bet
- Ikaros
- MafB

Velký potenciál mají HSC buňky v klinických přístupech při léčbě poruch krvetvorby, například leukemie nebo imunodeficiencie. Transplantace, byť jen jediné hematopoetické buňky do dospělého příjemce, může obnovit celý hematopoetický systém nemocného jedince (Olsen, 2006). Dosavadní experimenty byly prováděny převážně na myších (*Mus musculus*), které slouží jako model pro lidskou hematopoesu.

Proces hematopoesy je zahájen v prenatálním období vývoje plodu a pokračuje v postnatálním období, jehož hlavní oblastí je kostní dřev (medulla ossium).

### 2.1.1 Prenatální krvetvorba

Počátek vzniku hematopoetického systému sahá do embryonálního vývoje, kde je rozdělen do několika anatomických celků embrya. Na úplném počátku, po oplodnění vajíčka, vzniká rýhováním zygoty morula. Z moruly se formuje blastocysta, v jejíž dutině (blastocelu) se nachází embryoblast – embryonální vnitřní masa buněk (ICM, inner cell mass). Embryoblast je tvořen pluripotentními kmenovými buňkami a může tak dát vzniknout všem typům buněk kromě trofoblastu, ze kterého se později vyvíjí placenta (Winkel *et al.*, 1988). Blastocysta se formuje procesem gastrulace na gastrulu, jejíž vrstvy se transformují na tři zárodečné listy embrya: entoderm, ektoderm a mezoderm (Thomson *et al.*, 2000).

První krevní buňky vznikají sedmý den těhotenství (E7) v mezodermální vrstvě embrya myši, v tzv. krevních ostrůvcích žloutkového váčku (Moore *et Metcalf*, 1970, Ferkowicz *et Yoder*, 2005) – tento proces je znám jako primitivní hematopoesa. U člověka je přítomnost prvních krevních buněk potvrzena v 18. – 20. dni gestace (Kelemen *et al.*, 1979). Funkce primitivní hematopoesy spočívá v produkci velkých jaderných červených krvinek (viz kapitola *Vývoj erytrocytů*), které umožňují okysličení tkání v rychle rostoucím embryu a produkci primitivních makrofágů (Xu *et al.*, 2001). Dalším místem primitivní hematopoesy je para-aortální splanchopleura (Godin *et al.*, 1993, Cumano *et Godin*, 1996). Se založením cirkulace se hematopoesa rozšiřuje do dalších míst embrya. Od desátého až jedenáctého dne (E10 – E11) vývoje myšního embrya je primární

hematopoetický systém nahrazen definitivní hematopoesou v *intraembryonálním* regionu obklopující dorzální aortu, gonády a prvoledvinu (*AGM, Aorta-Gonad-Mesonephros*), (Medvinsky *et al.*, 1993, Kumaravelu *et al.*, 2002). Zde se nacházejí první hematopoetické kmenové buňky se schopností dlouhodobé repopulace. Dalšími místy s bohatou produkcí multipotentních HSC buněk je placenta (Alvarez-Silva *et al.*, 2003), brzlík a slezina (Delassus *et al.*, 1996). Velkou roli v prenatální krvetvorbě hrají fetální játra, která se stávají v E11,5 hlavním orgánem s hematopoetickou aktivitou. Zde je udržována, dokud není vývoj krevních buněk přenesen brzy před narozením na kostní dřeň, celoživotní místo hematopoesy dospělých (Costa *et al.*, 2012). Ve fetálních játrech byla popsána také přítomnost makrofágů a primitivních megakaryocytů (Fukuda *et al.*, 1974).

Jednotky tvořící hematopoetické kolonie (tzv. CFU, colony forming unit) představují stupeň diferenciacce mezi hematopoetickými kmenovými buňkami a terminálně diferencovanými buňkami, svým označením odpovídají multipotentním progenitorům (Kaufman *et al.*, 2001).

Existuje řada buněk CFU, například:

- CFU-GEMM – koloniformní jednotka pro myelopoesu
- CFU-L – koloniformní jednotka pro lymfopoesu
- CFU-E – buňka vytvářející malé kolonie erytrocytů
- CFU-GM – buňka vytvářející kolonie granulocytů a makrofágů

Na základě těchto jednotek se za přítomnosti dalších diferenciačních faktorů vyvíjí odpovídající typy diferencovaných buněk.

### **2.1.2 Vývoj erytrocytů**

Erytropoesa představuje první diferencovanou hematopoetickou linii, která se během ontogeneze v embryu objevuje. Červené krvinky jsou vůbec nejpočetnější buněčnou složkou krve a během svého vysoce regulovaného vývoje prochází mnoha stádii, které zde nebudou podrobně popsány. Ve stručnosti je popsán pouze průřez erytropoesy.

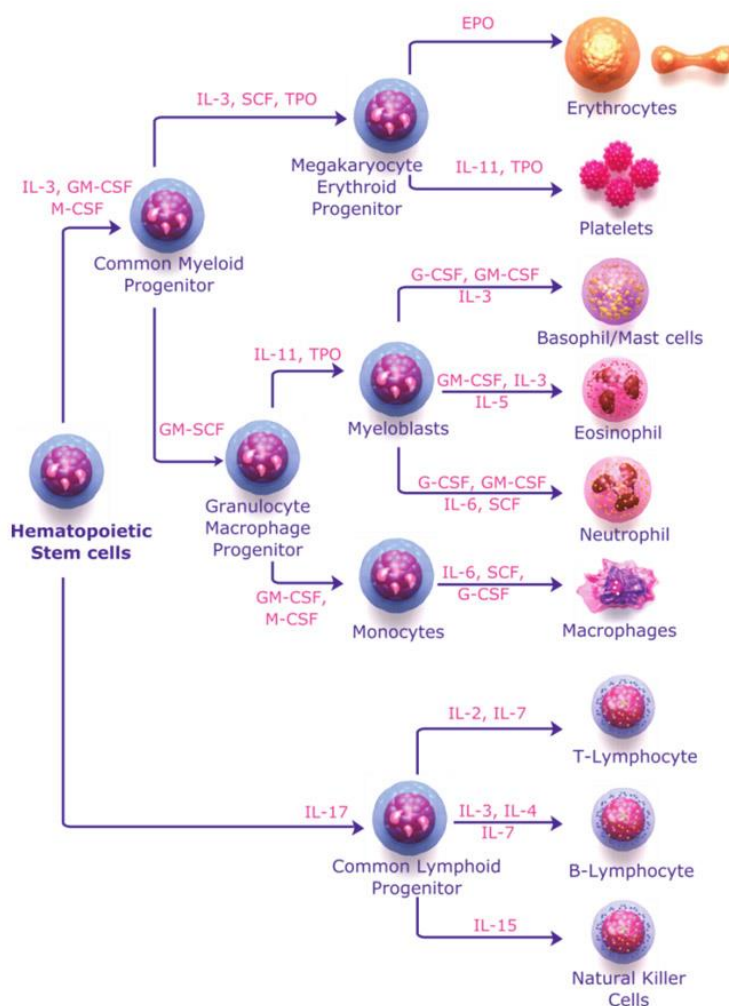
Ve žlutkovém váčku se objevují progenitory definitivní erytroidní řady: časný progenitor BFU-E (burst forming unit erythroid) který dozrává v progenitor CFU-E (colony forming unit erythroid). CFU-E dává vzniknout jadernému proerytoblastu. Z místa žlutkového váčku se tyto progenitory rozšiřují krevním řečištěm do fetálních jater mezi dny E11,5 a E12,5, kde začínají tvořit zralé, diferencované, bezjaderné krevní elementy – erytrocyty (Palis *et al.*, 1999, McGrath *et al.*, 2011). Pro srovnání, BFU-E v lidském embryu byly poprvé detekovány mezi čtvrtým a pátým týdnem gestace taktéž ve fetálních játrech (Migliaccio *et al.*, 1986). Pro schopnost CFU-E vytvářet kolonie je nezbytná funkce erytropoetinu (EPO), (Gregory *et Eaves*, 1978).



### 2.1.3 Proliferace kmenových buněk

Hierarchicky nejvýše se nachází dlouhodobě působící kmenové buňky v G0 fázi buněčného cyklu, LT-HSC (long term HSC), které jsou nezbytné pro celoživotní obnovu hematopoetického systému. LT-HSC produkují krátkodobě působící kmenové buňky ST-HSC (short term HSC), které mají sebeobnovu již limitovanou na několik týdnů. ST-HSC dávají vzniknout multipotentním progenitorům MPP (multipotent progenitor population), které již ztratily schopnost sebeobnovy, mají však zachovaný potenciál diferenciací (Morrisson *et al.*, 1994, Passegue *et al.*, 2005). V kostní dřeni se nachází asi 98 % HSC v klidovém stavu (v G0 fázi buněčného cyklu), zbylá 1 – 3 % HSC se účastní buněčného cyklu, tyto buňky odpovídají definici ST-HSC (Bowman *et al.*, 2007). Transplantace ST-HSC sice vede k osídlení kostní dřene těmito buňkami a dochází i ke tvorbě progenitorů všech krevních linií, ale obnova krvetvorby je pouze dočasná, protože ST-HSC buňky zanikají diferenačním dělením za vzniku progenitorů (Melchers *et Rolink*, 2001).

Multipotentní progenitory diferencují na dvě hlavní progenitorové řady – myeloidní (CMP – common myeloid progenitor) a lymfoidní (CLP – common lymphoid progenitor), viz obr. 1. Myeloidní řada produkuje makrofágy, granulocyty, monocyty, erythrocyty a megakaryocyty, lymfoidní řada produkuje B-lymfocyty, T-lymfocyty a NK-buňky (Seita *et al.*, 2010).



Obr. 1 – Schéma hematopoesy, cytokiny stimulující hematopoetické buňky

převzato z <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biofiles/hematopoietic-cytokines.html>

## 2.1.4 Maturace a diferenciacie B-lymfocytů

B-lymfocyty zajišťují humorální specifickou imunitu. Vyuvíjejí se z lymfoidního progenitoru (CLP) v kostní dřeni dospělých. Během embryonálního vývoje probíhá jejich produkce v rámci definitivní hematopoese ve fetálních játrech (Strasser *et al.*, 1989). Yoshimoto *et al.* (2011) odhalili, že první progenitory B buněk (B-1) byly objeveny již v E9 ve žlutkovém váčku. Vývojová řada B-lymfocytů zahrnuje fázi pro-B buňky (progenitorové buňky), pre-B (prekursorové B buňky), nedospělé naivní B buňky a dospělé naivní buňky. Vývoj naivních B buněk prochází dvěma fázemi – fází dozrávání a fází diferenciacie.

Dozrávání je lokalizováno ve stromatu kostní dřeni, k němuž adherují prekursorové B buňky a stimuluje se tak lymfopoese. Kostní dřen produkuje navíc růstové faktory c-Kit ligand, IL-7, které prekursor potřebuje k růstu a vývoji (Melchers *et al.*, 1992). Naivní B buňky se přesouvají do sekundárních lymfatických tkání, kde probíhá aktivace B buňky specifickým antigenem na terminální diferenciacní stádium B buněk: plasmatickou nebo paměťovou buňku.

Plasmatické buňky exprimují klonově odlišné povrchové receptory – imunoglobuliny (Ig), které rozpoznávají antigenně specifické epitopy (Cooper *et al.*, 2006, Mak *et al.*, 2013). Paměťové buňky se vyznačují svou imunologickou pamětí a jsou součástí sekundární imunitní odpovědi.

Imunoglobuliny jsou heterodimerní glykoproteiny, které se skládají ze dvou lehkých (*L*, *light*) a dvou těžkých (*H*, *heavy*) řetězců. Funkčně jsou rozděleny do variabilní domény (*V*, *variable*), která váže antigeny, a konstantní domény (*C*, *constant*), která zprostředkovává efektorové funkce. Těžké a lehké řetězce jsou kódovány jednotlivými subgeny V, D, J a C, které samy o sobě nejsou funkční, ale mají schopnost se spojovat a tvořit funkční imunoglobulinové geny. Variabilní domény těžkého řetězce jsou tvořeny přeskupováním V, D a J segmentů. Proces přeskupování a spojování těchto subgenů pro variabilní oblast se nazývá V(D)J rekombinace a je významným zdrojem variability protilátek. Geny, kódující variabilní oblast lehkého řetězce pak vznikají přeskupováním segmentů V a J. Konstantní oblast imunoglobulinu tvoří segmenty C. Přeskupování genových segmentů pro lehký a těžký řetězec je typické během raného vývoje lymfocytů a během primární fáze imunitní odpovědi. Výsledné imunoglobuliny mají afinitu k antigenu obvykle nízkou (Hesslein *et al.*, 2001, Feeney *et al.*, 2009).

Během terminální diferenciacie vstupují B-lymfocyty do germinálních center, která mají schopnost vyselektovat B buňky se zvýšenou afinitou k antigenu.

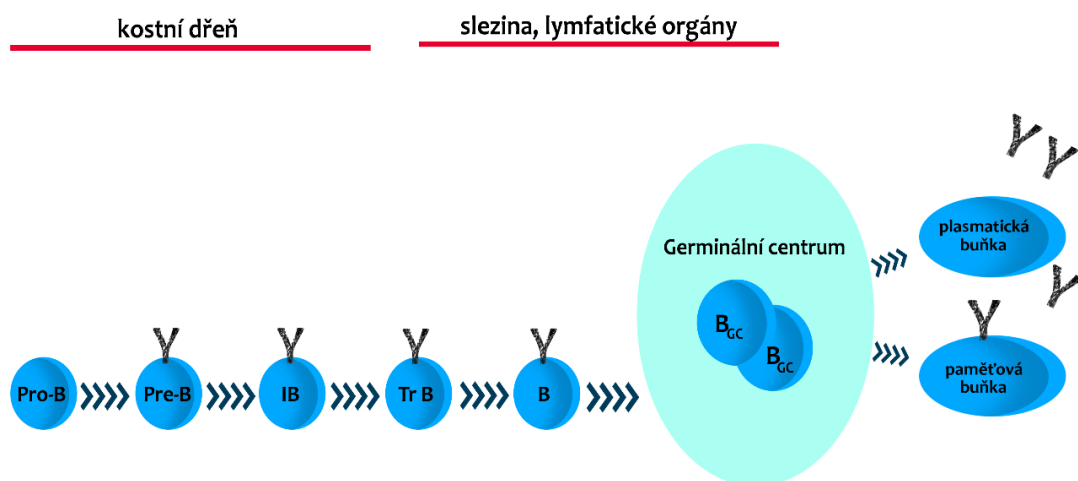
### 2.1.4.1 Germinální centra

Sekundární lymfatické orgány obsahují folikuly složené z naivních B-lymfocytů. Asi týden po expozici antigenem se v rámci sekundární fáze imunitní odpovědi v těchto B buněčných oblastech formují germinální centra. V těchto centrech (sekundárních folikulech) velkou většinu buněk tvoří již aktivované B buňky, morfologicky větší a rychleji se dělící než naivní (MacLennan *et al.*, 1994, Schroeder *et al.*, 2010).

Germinální centra jsou spojena s (viz Obr. 2):

- klonální expanzí B-lymfocytů, (Jacob *et al.*, 1991)
- somatickou hypermutací ve variabilních oblastech imunoglobulinů (IgV), (Berek, 1993)
- indukci diferenciaci na paměťové nebo plasmatické buňky (Coico *et al.*, 1983, Kalsoe *et al.*, 1994)

Somatická hypermutace zavádí ve vysoké míře mutace do variabilní oblasti genů. Jejím významem je tvorba protilátek s vysokou afinitou vůči antigenům (Neuberger *et al.*, 1995). Mechanismus tohoto procesu, známého jako afinitní maturace, je založen na enzymu zvaném *aktivací indukovaná cytidin deaminasa* (AID), která během transkripce genů kódujících variabilní část imunoglobulinového řetězce odstraňuje aminoskupinu z cytosinu a mění ji na uracil. Dochází tak k záměně báze v molekule RNA, která je mutagenní v případě párování zbytku deoxyuracilu s deoxyguanosem (Hořejší *et Bartůňková*, 2009). Na základě toho, jestli došlo k somatické hypermutaci, rozlišujeme mutovaný *IGHV*, pocházející z postgerminální paměťové buňky nebo nemutovaný *IGHV*, pocházející z naivní pregerminální CD5+ buňky. Mutační status *IGHV* je významným prognostickým faktorem a ovlivňuje léčbu a medián přežití (Chiorazzi *et al.*, 2005, Hamblin *et al.*, 1999, Chott *et al.*, 2000).



Obr. 2 – Schéma maturace a diferenciaci B-lymfocytů, průchod germinálním centrem

Převzato a upraveno z <https://medicine.gu.se/arif/gruppledare/martensson/forskning>

## 2.2 Chronická lymfocytární leukemie

### 2.2.1 Obecná charakteristika onemocnění

Chronická B-lymfocytární leukemie (CLL, dříve B-CLL) je nízce maligní lymfoproliferativní onemocnění, jehož podstatou je klonální novotvorba maligně transformovaných vyzrálých B-lymfocytů s charakteristickým imunofenotypem (CD5+, CD19+, CD20+, CD23+, CD43+ CD79a+). Tyto lymfocyty se kumulují v periferní krvi, kostní dřeni a v lymfatických orgánech a ztrácí svou přirozenou imunitní funkci.

Klíčovými prvky její patogeneze je narušení DNA reparace a kontroly buněčného cyklu (aberrace *TP53*, *ATM*, *BIRC3*), inhibice apoptózy a dysregulace buněčné proliferace. Vzhledem ke zvýšené expresi genu *BCL2* je inhibována fyziologická cesta apoptotické smrti patologických lymfocytů, vedoucí k jejich dlouhověkosti (Adam *et al.*, 2008, Döhner *et al.*, 2000). Úlohu v indukci proliferace maligních B-lymfocytů hraje transformující růstový faktor  $\beta$  (TGF- $\beta$ , transforming growth factor  $\beta$ ), který za fyziologických podmínek inhibuje proliferaci B-lymfocytů a limituje jejich klonální expanzi. Při ztrátě této negativní kontroly růstu je usnadněn rozvoj lymfoidních malignit (Israels *et al.*, 1993, Siegel *et al.*, 2003).

Podle Světové zdravotnické organizace (WHO, *World health organization*) je CLL vždy neoplasie B buněk, zatímco neoplasie dříve známá jako T-CLL je nyní označena jako T-prolymfocytická leukemie (T-PLL), (Jaffe *et al.*, 2001). Podle Mezinárodní klasifikace nemocí a přidružených zdravotních problémů (ICD, *International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems*) patří CLL do kategorie Novotvary, a je značena C91.1 (Internetový zdroj: ICD-10, verze 2010).

Chronická lymfocytární leukemie je onemocnění prozatím nevyléčitelné. V posledních desetiletích bylo dosaženo pokroku nástupem chemoimunoterapie, nejvýznamnějším se stal pokrok v nástupu cílené terapie a stálý vývoj nových léčiv pro pacienty s CLL. Dříve byla alogenní transplantace kostní dřene jedinou šancí na vyléčení (Kozák, 2008). Dnes je využívána pouze u specifických případů CLL.

### 2.2.2 Klasifikace

Pro většinu druhů onkologických onemocnění je zařazení do určitého klinického stadia užitečné při volbě léčby a pro zjištění, do jaké míry se choroba rozšířila. První stážovací klasifikace CLL dle Rai *et al.* (1975) byla rozdělena do pěti stádií, v roce 1987 byla modifikovaná pouze do tří rizikových stádií (Rai *et al.*, 1987).

Klasifikace podle Binet *et al.* (1977) je nejčastěji využívána v evropských zemích a má rovněž tři stadia. Nemoc je klasifikována podle počtu postižených oblastí (uzliny krční, podpažní, tříselné, slezina a játra) a podle přítomnosti anemie (snížená koncentrace hemoglobinu v krvi) nebo

trombocytopenie (snížené množství trombocytů v krvi). Pacienti jsou rozděleni na nízkorizikové (Binet A) a vysokorizikové (Binet B/C).

Tab. 1 – Klinické stážování dle Rai *et al.*

Klasifikace dle Raie (1975)			Modifikovaná klasifikace (1987)
Stádium	Příznaky	Medián přežívání [roky]	Riziko
0	Pouze lymfocytosa	10	Nízké riziko (LR)
I	Lymfocytosa se zvětšenými uzlinami	7	Střední riziko (IR)
II	Lymfocytosa se zvětšenou slezinou a/nebo zvětšená játra	7	
III	Lymfocytosa s anemií	1,5-4	Vysoké riziko (HR)
IV	Lymfocytosa s trombocytopenií	1,5-4	

Tab. 2 – Klinické stážování dle Binet *et al.*

Stádium	Charakteristika stádia	Medián přežívání [roky]
A	Méně než 3 postižené oblasti Bez anemie a trombocytopenie	10 a více
B	3 a více postižených oblastí Bez anemie a trombocytopenie	7
C	Anemie (Hb méně než 100 g/l)/ trombocytopenie (počet trombocytů menší než $100 \times 10^9/l$ )	2

*Postižené oblasti: axilární, krční, inguinální, mizní uzliny, at' jednostranné nebo oboustranné, slezina a játra. Oboustranné postižení je počítáno za jednu oblast*

### 2.2.3 Klinické příznaky

Choroba má většinou dlouhé bezpříznakové období, kdy jediným příznakem je zvětšený počet bílých krvinek (*leukocytosa*), který je často stanoven při náhodném vyšetření krevního obrazu. Leukocytosa je způsobena postupným nárůstem počtu bílých krvinek a zároveň neschopností jejich přirozené smrti. Zatímco tedy počet bílých krvinek roste, klesá jejich funkční potenciál, který se projeví poklesem imunity a častějšími infekcemi. Je pozorovatelný i nedostatek erytrocytů, který se projevuje anemií (Lissauer *et* Carroll, 2017). U nemocných se mohou vyskytovat další klasické příznaky leukemie, kterými jsou únava, horečky, noční pocení, nechutenství, bolesti kloubů, váhový úbytek a další. Při napadení tkání nádorovými buňkami se objevují zvětšené uzliny (*lymfadenopatie*), játra (*hepatomegalie*) a slezina (*splenomegalie*). V pokročilých stádiích pak může dojít k infiltraci nelymfatických orgánů (prostaty, jater, plic).

#### 2.2.4 Epidemiologie

Z hlediska incidence jde o nejčastější typ leukemie ve střední Evropě, kde tvoří téměř 30 % všech diagnostikovaných leukemií. Postihuje zejména starší populaci nad 65 let, dvakrát častěji muže než ženy (Redaelli *et al.*, 2004). Nemoc je heterogenní i v celkovém přežívání, kdy někteří pacienti přežívají mnoho let, zatímco jiní pouze několik měsíců. Přímí příbuzní pacientů s CLL mají třikrát vyšší pravděpodobnost získat tuto chorobu oproti průměrné populaci (Adam *et Vorlíček*, 2008). Lidé z afrických nebo asijských zemí mají nižší riziko vývoje nemoci v porovnání s bělochy (Dores *et Anderson*, 2007).

#### 2.2.5 Diagnostika

Přesně stanovená diagnóza je důležitá před zahájením léčby. Je nutné ověřit, zda má pacient skutečně CLL a nejde o jiné lymfoproliferativní onemocnění. Ke stanovení diagnózy je potřebné znát počet lymfocytů v periferní krvi a jejich imunofenotyp. Pracovní skupina National Cancer Institute – sponsored working group (NCI), publikovala nejprve v roce 1988, potom v roce 1996, kritéria pro stanovení CLL. Podle těchto kritérií musí být přítomno nejméně 5000/μl lymfocytů v periferní krvi (*lymfocytosa*). Charakteristický imunofenotyp CLL buňky je dán expresí povrchových antigenů CD5, CD19, CD20, CD23 a slabou expresí povrchového imunoglobulinu. O dvacet let později navrhla skupina profesora Halleka (2008), (iwCLL, International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia) nová kritéria pro stanovení CLL. Minimální hranice počtu lymfocytů je stejná, nezahrnuje však počet všech lymfocytů, ale omezuje se pouze na B-lymfocyty. Dále je pro onemocnění typické, že povrchový antigen CD20 a CD79b je zastoupen u CLL buněk v menším počtu kopií v porovnání s normálními B buňkami. Postižené B-lymfocyty mají zároveň atypickou morfologii. Jsou to malé, zralé lymfocyty s úzkým lem cytoplasmy a kondenzovaným jádrem, které postrádá jasné nukleoly (Matutes *et al.*, 2007, Mulligan *et al.*, 2009). V roce 2018 byla kritéria diagnostiky pro CLL aktualizována, zde se uvádí, že pro stanovení diagnózy je vyžadováno minimálně 5000/μl B-lymfocytů po dobu nejméně 3 měsíců (Hallek *et al.*, 2018).

#### 2.2.6 Léčba

Obecně platí, že pacienti s časným stádiem indolentního onemocnění (Binet A, Rai 0) jsou sledováni a většinou nevyžadují terapii. Léčba pacientů je zahájena až v pokročilých stádiích, kdy se může objevit masivní splenomegalie, masivní lymfadenopatie, progresivní selhání kostní dřeně či progredující lymfocytosa s nárůstem o více jak 50 % za 2 měsíce nebo LDT méně než 6 měsíců. Léčba CLL se stále vyvíjí, a zatímco před několika lety byla zaměřena zejména na potlačení symptomů a stabilizaci onemocnění, v současnosti je možné s využitím kombinovaného režimu obsahujícího monoklonální protilátku a chemoterapii navodit až několikaletou kompletní remisi onemocnění, která pacientovi zajišťuje dobrou kvalitu života (Panovská *et Doubek*, 2013).

Nejstarší alkylační látkou v terapii je chlorambucil. Celková odpověď na léčbu chlorambucilem se pohybuje mezi 75 a 80 %, avšak kompletní hematologickou remisi navodí pouze v 0 – 5 %

případech. Vzhledem k nízké toxicitě a perorálnímu užívání je dnes stále předepisován starším pacientům (Dighiero *et al.*, 1998, Kozák 2008). Fludarabin patří mezi purinová analoga a v monoterapii dokáže navodit vysoký počet odpovědí (63 – 89 %). Počet kompletních remisí při léčbě fludarabinem je udáván mezi 11 – 40 % (Rai *et al.*, 2000).

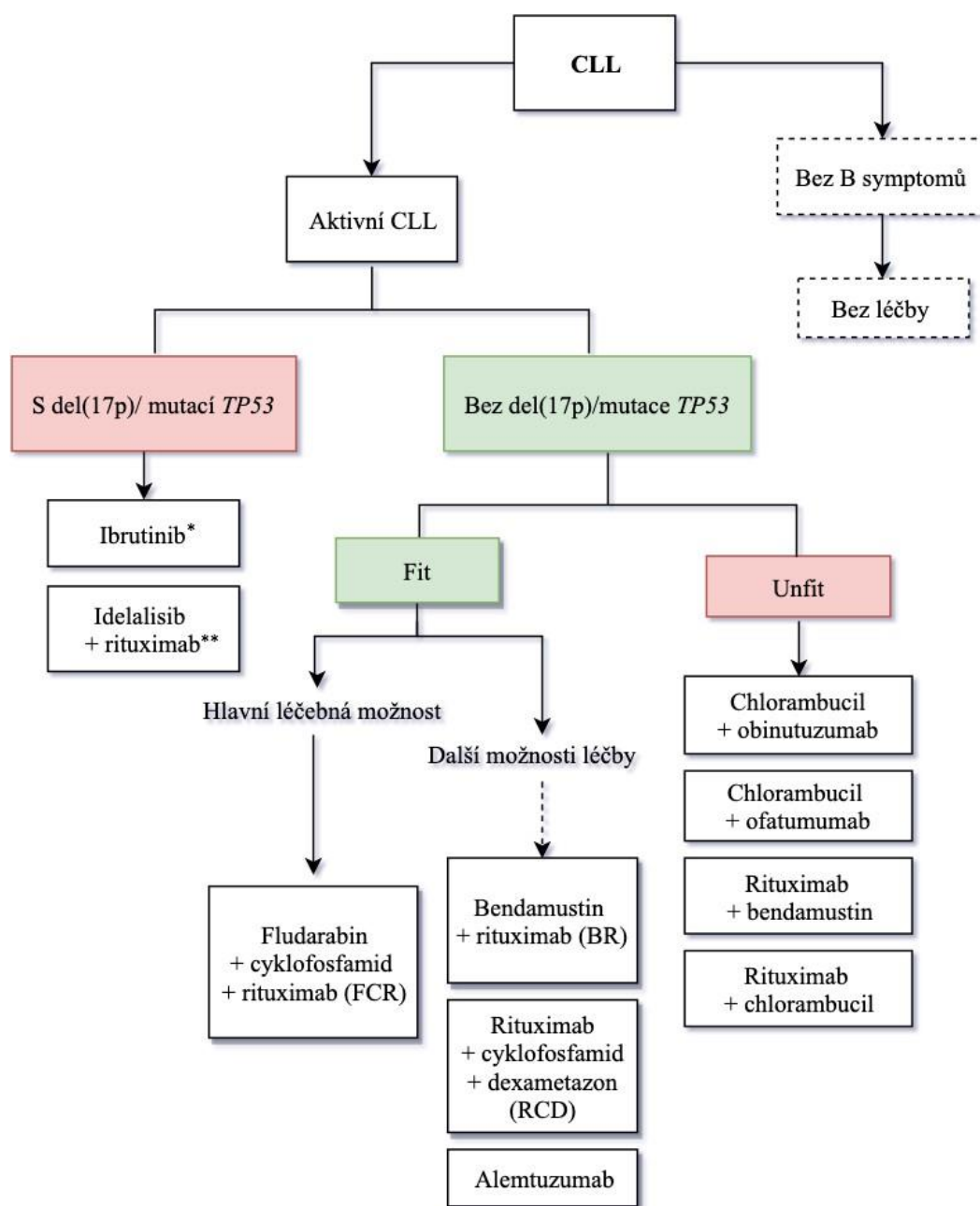
Monoklonální protilátky představují skupinu protinádorových preparátů, které jsou schopny působit cíleně na nádorovou buňku a způsobit její zánik. Účinkují několika mechanismy: navozují cytolyzu prostřednictvím aktivace komplementu, aktivují cytotoxicitu závislou na protilátce a současně přímo indukují apoptosu (Panovská *et al.*, 2013). Monoklonální protilátky se používají buď v monoterapii anebo v kombinaci s chemoterapií (chemoimunoterapie). Mezi monoklonální protilátky řadíme rituximab – chimérickou IgG monoklonální protilátku proti antigenu CD20, která je zásadní v léčbě agresivních i indolentních lymfomů z B buněk, u nichž je ve velkém množství exprimován antigen CD20 (Hallek *et al.*, 2010). Alemtuzumab je humanizovaná protilátka proti antigenu CD52, který je exprimován nejen na buňkách CLL, ale také na zdravých B i T lymfocytech. Alemtuzumab se dříve používal u pacientů CLL s delecí 17p-, tedy u CLL s defektním p53 a nejhorší prognózou. U nepřeléčených pacientů navodil kompletní remisi v 19 – 22 %, celková odpověď je udávána mezi 85 – 87 % (Hillmen *et al.*, 2007).

Pochopení mechanismů BCR (B-buněčného receptoru, B-cell receptor) signalizace vedlo k navržení nových terapeutických postupů založených na inhibici jednotlivých komponent této dráhy – jednou z nich je dráha Brutonovy tyrosinkinasy (BTK), (de Claro *et al.*, 2015). Inhibitor BTK – ibrutinib (IMBRUVICA), se stal nejúčinnější látkou pro pacienty CLL s 17p- (Jones *et al.*, 2018), viz kapitola *Delece 17p*.

Idelalisib je inhibitor fosfatidylinositol-3-kinasy (PI3K), konkrétně její delta isoformy fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát-3-kinasy. Je exprimována převážně na leukocytech a je kritickou signální molekulou BCR receptoru v normálních B i CLL buňkách. Inhibicí tohoto enzymu idelalisib inhibuje signální dráhu B buněčného receptoru (BCR) a indukuje apoptosu maligních buněk (Brown *et al.*, 2014, Okkenhaug *et al.*, 2003). Idelalisib se prodává pod názvem Zydelig. Venetoclax je vysoce selektivní inhibitor, jehož cílem je antiapoptický protein BCL2, který činí CLL buňky rezistentní k apoptose a následkem toho dochází k charakteristické akumulaci dlouho žijících lymfocytů. V roce 2016 FDA (FDA, Food and Drug Administration) schválila venetoclax pro použití u pacientů s CLL, kteří mají delecí 17p (Roberts *et al.*, 2016).

Hlavní možnost léčby 1. linie, u nemocných v dobrém stavu bez závažných přidružených onemocnění, je dnes režim FCR (fludarabin, cyklofosamid, rituximab). Pacientům s del(17p) nebo mutací *TP53* je předepisován ibrutinib. Idelalisib v kombinaci s rituximabem je možné předepsat pacientům s delecí či mutací *TP53* v případě nevhodnosti jakékoli jiné léčby. Alternativou k FCR léčbě u pacientů nad 65 let s vysokým rizikem infekcí je bendamustin + rituximab (BR). Pacientům, kteří mají významné přidružené choroby a nejsou tak vhodní k léčbě protokolem FCR je doporučena jedna z těchto možností: obinutuzumab + chlorambucil, ofatumumab + chlorambucil, bendamustin + rituximab, rituximab + chlorambucil (viz Obr. 3). U pacientů, u

kterých se očekává krátké přežití, je cílem ovlivnit symptomy – v monoterapii je volbou chlorambucil, cyklofosfamid či kortikoterapie (Doubek *et al.*, 2018). Alogenní transplantace je rozumnou volbou v případě pacientů dříve léčených, vysoce rizikových s delecí nebo mutací *TP53* s nedostatečnou odpovědí na léčbu. Následující schéma je zpracováno dle Doporučení pro diagnostiku a léčbu chronické lymfocytární leukemie (CLL) – 2018 (Doubek *et al.*, 2018).



Obr. 3 – Schéma aktuálních možností pro 1. linii léčby u pacientů s CLL

\* v případech, kde nemocný není vhodný k léčbě chemoimunoterapií

\*\* v případě nevhodnosti jakékoli jiné léčby

Zdroj: vlastní tvorba



### 2.2.7 Prognostické faktory

Chronická lymfocytární leukemie je klinicky i biologicky heterogenní onemocnění. Někteří pacienti mají indolentní klinické onemocnění, které často nevyžaduje léčbu, zatímco jiní mohou mít velmi agresivní průběh. Časná stádium této nemoci bývá asymptomatické, proto došlo k intenzivnímu hledání vhodných prognostických markerů, které by mohly usnadnit strategii léčby a usnadnit predikci přežití. Stážovací systémy dle Bineta nebo dle Raie (viz kapitola *Klasifikace*) jsou snadno použitelné a nejsou finančně náročné. Nezhledňují však vlastnosti CLL buněk, které mohou ovlivnit průběh onemocnění a reakci na léčbu. Proto v další prognóze hrají nezastupitelnou roli základní a genomické prognostické faktory.

Mezi základní faktory patří věk, pohlaví, rasa, absolutní počet lymfocytů, počet zasažených lymfatických uzlin, lymfadenopatie, zdvojovací čas lymfocytů (*LDT*, lymphocyte doubling time) a další. Dynamika zvyšování počtu lymfocytů v krevním obraze je prognosticky významná, protože ti nemocní, u nichž je zdvojovací čas počtu lymfocytů delší než 12 měsíců mají velmi dlouhé přežití, zatímco *LDT* kratší než 12 měsíců odpovídá rychlé progresi onemocnění. Jedná se však o retrospektivní faktor a nedá se tedy během prvního vyšetření předpovědět jeho vývoj (Wierda *et al.*, 2007, Vinolas *et al.*, 1987, Lee *et al.*, 1987).

Genomické aberace u chronické lymfocytární leukemie jsou také důležitými prediktory progresu onemocnění a přežití. Na jejich určení se od 70. let 20. století podílí řada cytogenetických a molekulárně-cytogenetických metod, jako je klasická cytogenetika, fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH), čipové technologie a v poslední době i nejmodernější technologie sekvenování nové generace (Navrkalova *et al.*, 2015). Molekulárně cytogenetické metody mohou detekovat genomové aberace u více než 80 % pacientů s chronickou lymfocytární leukemií (Döhner *et al.*, 2000). Metodou FISH, která je standardní pro analýzu genomových aberací u CLL, jsou nejčastěji pozorované delece 13q, delece 11q, trisomie chromosomu 12, delece 17p a delece 6q (Döhner *et al.*, 2000, Kröber *et al.*, 2002). Před zavedením cílené léčby je proto vhodné podstoupit vyšetření, která individuální prognózu můžou zpřesnit:

- vyšetření genetických aberací rutinním panelem CLL fluorescenční *in situ* hybridizací
- stanovení mutačního stavu genů pro variabilní část těžkého řetězce imunoglobulinu (*IGHV*)
- vyšetření mutace genu *TP53*

#### 2.2.7.1 Mutační status *IGHV*

Mutační status genu kódující *IGHV* je jeden z nejsilnějších prognostických markerů, který významně predikuje klinickou prognózu. Byla dána hranice, podle které je rozlišitelný mutovaný stav od nemutovaného: sekvence *IGHV*, které odpovídají sekvencím zárodečné linie s minimálně 98% identitou, jsou považovány za nemutované (Hamblin *et al.*, 1999). Analýza mutace variabilní části imunoglobulinového genu prokázala, že asi polovina případů CLL má přítomnou somatickou mutaci v rámci svých *IGHV* genů. To znamená, že tyto buňky mají původ v paměťových B

buňkách, které po kontaktu s antigenem prošly germinálním centrem. Přítomnost či nepřítomnost somatické mutace je spojená s určitými genetickými změnami, expresí znaku CD38 a prognózou. Pacienti s hypermutací *IGHV* mají obecně příznivou prognózu, delší čas do zahájení léčby, prodloužený medián doby přežití a indolentní klinický průběh ve srovnání s pacienty s nemutovaným stavem *IGHV* (Oscier *et al.*, 2002).

Prognóza pacientů s buňkami CLL typu paměťových buněk, majících často 13q14 delecii a nižší procento CD38+, je příznivá. Naproti tomu prognóza pacientů s naivním typem buněk, majících často delecii *TP53* a vyšší zastoupení CD38+ znaků je horší, a jejich choroba obvykle rychle progreduje (Adam *et Vorlíček*, 2008).

Významnou roli v patogenezi CLL hraje BCR receptor lymfocytů, jehož základní komponentou je membránový imunoglobulin, jehož strukturu tvoří preferenční typy určitých subgenů pro těžký řetězec. V souvislosti s mutačním stavem *IGHV* bylo popsáno preferenční využívání genové rodiny *VH1* a *VH3* (Messmer *et al.*, 2004). Subgen *VH1-69* je nadměrně exprimován zejména u nemutovaných *IGHV* (Potter *et al.*, 2003). Výraznější využití subgeneru *VH3-21* může definovat skupinu s horší prognózou bez ohledu na stav mutace, vyšší frekvencí výskytu *SF3B1* mutací a poškození dráhy p53. Pouhá přítomnost tohoto subgeneru v leukemickém klonu ukazuje na agresivní onemocnění a významně kratší přežití na rozdíl od jiných mutací v této oblasti (Tobin *et al.*, 2002, Strefford *et al.*, 2013).

S mutačním stavem *IGHV* koreluje exprese dvou molekul zapojených do BCR signalizace: *ZAP70* a *CD38* (Damle *et al.*, 1999). Dříve sloužily jako alternativa ke stanovení mutačního stavu genů *IGHV*, dnes se využívají už jen jako doprovodné prognostické faktory k jejich standardizovanému vyšetření.

### 2.2.7.2 Exprese ZAP-70

Mutovaný *IGHV* a nemutovaný *IGHV* se dají snadno rozlišit rozdílnou expresí několika desítek genů. Jeden z nejvíce odlišně exprimovaných genů je 70kDa *ZAP-70* (zeta-chain-associated protein 70). Protein *ZAP-70* je kinasa, která je fyziologicky exprimována v receptoru normálních T-lymfocytů a na CLL B-lymfocytech (Rosenwald *et al.*, 2001). Bylo zjištěno, že *ZAP-70* je pětikrát více exprimován u nemutovaného *IGHV* genu než u mutovaného a jeho exprese by mohla tyto dvě podskupiny odlišit s vysokou statistickou významností. Dále je dokázáno, že exprese *ZAP-70* identifikuje pacienty s agresivnějším klinickým průběhem nemoci, proto byla dříve klinicky užitečným molekulárním markerem prognózy u CLL (Wiestner *et al.*, 2003). Dnes už *ZAP-70* nahrazují spíše jiné a významnější prognostické faktory.

### 2.2.7.3 Exprese CD38+

*CD38* je transmembránový glykoprotein, který spolupracuje se *ZAP-70* během BCR signalizace. Může fungovat jako receptor i jako enzym a je regulován mikroprostředím nádoru. Exprese *CD38* je cenným a dostupným prognostickým markerem (D'Arena *et al.*, 2001). Při CLL je zvýšená

exprese CD38 spojena s několika nepříznivými prognostickými faktory, jako je pokročilé stadium onemocnění, vyšší incidence lymfadenopatie, hepatomegalie, vysoce riziková cytogenetika, špatná odpověď na léčbu a další (Amaya-Chanaga *et al.*, 2016). Pacienti s nemutovaným *IGHV* genem vykazovali vyšší procento exprese CD38 (nad 30 %) než pacienti s mutovaným *IGHV*, kteří vykazovali procento exprese tohoto znaku nižší (pod 30 %). Pacienti s vyšším procentem exprese CD38 reagovali hůře na chemoterapii a měli kratší dobu přežití (Damle *et al.*, 1999).

## 2.2.8 Molekulárně cytogenetické prognostické faktory

### 2.2.8.1 Delece 13q

Monoalelická delece oblasti 13q14 je nejčastější genomickou aberací v případě CLL s četností 40 – 60 %. Pacienti s delecí 13q14, jako solo aberací, mají příznivý klinický průběh s průměrně delším mediánem přežití než pacienti s normálním karyotypem (Döhner *et al.*, 2000). Buňky s del(13q) vykazují imunofenotyp CD20, FMC7, CD27, CD22, CD5 a bcl2 (Quijano *et al.*, 2008). U pacientů s CLL buňkami, které exprimují hypermutovaný *IGHV* je pravděpodobnější, že budou mít Binet stadium A a delecí 13q, což je spojeno s příznivou prognózou. Nepřítomnost delece 13q14 nebo naopak vysoké zastoupení této delece je spojeno s horší prognózou. Je možné charakterizovat dvě prognostické skupiny na základě procentuálního zastoupení buněk s delecí 13q: pacienti s příliš vysokým zastoupení této delece (vyšší než 80 %) mají kratší medián celkového přežití a kratší čas do první terapie než pacienti, kteří mají méně než 80 % buněk s touto delecí (Hernández *et al.*, 2009). Ačkoli je monoalelická delece příznivým znakem onemocnění, bialelická delece 13q14 byla považována za důvod rozvoje agresivní formy onemocnění, předpovídala kratší medián přežití a horší prognózu. Tento výzkum byl proveden na šesti pacientech s bialelickou delecí z celkového souboru 32 pacientů (Chena *et al.*, 2008). Následující studie Van Dyke *et al.* (2010) však tento jev na souboru 323 pacientů nepotvrdila, pacienti s heterozygotní i homozygotní delecí 13q14 měli stejný čas do první terapie a stejné přežití.

Pruh 13q14 zahrnuje řadu tumor supresorových genů a oblastí, které hrají roli v CLL. Podle Lui *et al.*, (1997) oblast, ve které dochází k delecí, není větší než 10 kb a zahrnuje části kódující sekvence dvou sousedních genů *DLEU1* a *DLEU2*. Dále byly v pruhu 13q14 lokalizovány microRNA *miR15* a *miR16*, retinoblastový tumor-supresorový gen *RBI* a region *D13S25*. Bylo zjištěno, že delece v regionu *D13S25* jsou častější než delece v *RBI* genu (Brown *et al.*, 1993). Gen *RBI* kóduje jaderný fosfoprotein, který je součástí kontroly buněčného cyklu a regulace transkripce (Weinberg *et al.*, 1995).

### 2.2.8.2 Delece 11q

Delece dlouhého ramene chromosomu 11 (11q-) se vyskytuje v 10 – 20 % případech pacientů s chronickou lymfocytární leukemií (Döhner *et al.*, 2000). Představuje tak druhou nejčastější genetickou abnormalitu této nemoci. Riziko vzniku leukemií je přibližně 70krát vyšší u pacientů

zasažených změnou v této oblasti než u normální populace (Negrini *et al.*, 2010). Del(11q) je spojena se silnější expresí povrchových znaků CD38, FMC7, CD25 a povrchového imunoglobulinu (Quijano *et al.*, 2008). Delece nebo mutace v oblasti 11q22-q23 definuje podskupinu pacientů CLL s progresivním onemocněním a celkově nepříznivou prognózou (Fegan *et al.*, 1995).

V chromosomální oblasti 11q22-q23 je uložen gen *ATM* (*ataxia-telangiectasia mutated*), který sestává z 66 exonů a je členem rodiny genů kódující fosfatidylinositol-3 kinasy (PI-3-K), (Savitsky *et al.*, 1995, Uziel *et al.*, 1996). Protein ATM o velikosti 350 kDa je aktivní při indukci chromosomálních dvojláknových zlomů, které vznikají endogenně nebo po vystavení látkám poškozující DNA, včetně ionizujícího záření a léčiv (Khanna *et al.*, 2001). ATM protein chrání integritu genomu regulováním buněčného cyklu v kontrolních bodech G1/S a G2/M. Aktivuje dráhu opravy poškozené DNA a zabraňuje tak jejímu rozšíření. Pokud poškozená DNA nelze opravit, indukuje apoptosu (Negrini *et al.*, 2010, Kastan *et al.*, 2000). Kinasa ATM se účastní též fosforylace proteinu p53 v odpovědi na poškození DNA (Banin *et al.*, 1998).

Dědičná inaktivace genu *ATM* je známá pro výskyt autosomálně recesivní poruchy zvané ataxia-telangiectasia (A-T), charakterizované neurologickými a imunologickými symptomy a predispozicí k malignitám převážně lymfatického systému (Taylor *et al.*, 1996).

Je možné rozdělit CLL pacienty s delecí chromosomu 11q na dvě genetické podskupiny – na ty, kteří mají mutaci *ATM* a na ty, kteří mutaci v tomto genu nemají. Guarini *et al.* (2001) uvedli, že mutace *ATM* nastaly i v případě nepřítomnosti delece 11q22-q23, což naznačuje, že k narušení genu *ATM* u nemocných CLL může dojít mutací, delecí nebo kombinací obou. Přítomnost mutace *ATM* v kombinaci s 11q delecí zvyšuje riziko progresu nemoci více, než samostatná mutace *ATM* nebo samostatná delece 11q. Dále rozlišujeme mutaci v jedné nebo v obou alelách *ATM*. Pacienti s bialelelickou inaktivací *ATM* mohou mít horší prognózu ve srovnání s pacienty s monoalelelickou ztrátou *ATM*. Mutace bialelelická vede ke ztrátě funkce proteinu ATM (Austen *et al.*, 2007, Schaffner *et al.*, 1999).

### 2.2.8.3 Trisomie chromosomu 12

Trisomie dvanáctého chromosomu je častá numerická abnormalita u CLL, vyskytující se až u 20 % nemocných (Döhner *et al.*, 2000). Definuje podskupinu s atypickou morfologií, imunofenotypem, časnou progresí, nemutovaným *IGHV* a vysokou frekvencí mutace *NOTCH1*. Studie Herling *et al.* (2016) uvedla pět nejčastěji mutovaných genů u CLL pacientů, a právě gen *NOTCH1* je jedním z nich (mezi další zmiňované patří *SF3B1*, *ATM*, *TP53* a *BIRC3*).

Pacienti s touto abnormalitou mají často trombocytopenii. Trisomie 12 byla spojena s vyšší frekvencí aneuploidie, silnější expresí CD19, CD20, CD22, CD24, CD27, CD79b, CD38, FMC7 a povrchového Ig (Quijano *et al.*, 2008).

Nejlépe je genetická změna chromosomu 12 detekovatelná metodou klasické cytogenetiky nebo interfázní FISH (Matutes *et al.*, 1996). Prozatím není její role v progresi onemocnění jasná, ale předpokládá se, že aktivace genu *NOTCH1* je silně spojena s buňkami nesoucími trisomii

chromosomu 12 a nemutované *IGHV* (Balatti *et al.*, 2012). Pacienti CLL s trisomií chromosomu 12 vykazovali zvýšenou expresi  $\beta 2$ -integrinů zapojených do trans-endotelové migrace CLL buněk z krevního oběhu do tkání. Interakce mezi *NOTCH1* a signálními dráhami  $\beta 2$ -integrinu jsou důležitou oblastí budoucích pokusů a pochopení úlohy mutací *NOTCH1* u agresivních případů CLL (Riches *et al.*, 2014).

Souvislost mezi vyššími hladinami transkriptů aktivací indukované cytidin deaminasy (AID), trisomií chromosomu 12 a nemutovaným stavem *IGHV* u pacientů s CLL přinesli Zaprazna *et al.* (2018). Abruzzo *et al.* (2018) prokázali, že CLL případy s +12 jako jedinou abnormalitou vykazují unikátní soubor aktivovaných drah ve srovnání s jinými cytogenetickými změnami. Mezi těmito dráhami je identifikovaná signální dráha NFAT a molekula imunitní kontroly NT5E (CD73), která může představovat nové terapeutické cíle.

#### 2.2.8.4 Delece 17p

Delece krátkého ramene chromosomu 17 není příliš častá změna u CLL, vyskytuje se asi u 4 – 9 % nemocných v době diagnózy. Tato delece zahrnuje vždy pruh 17p13, nesoucí tumor-supresorový gen *TP53*, jehož produkt p53 hraje zásadní roli při kontrole buněčného cyklu a indukcii apoptosy poškozené buňky. Není proto překvapením, že protein p53 je označován jako strážce genomu (Isobe *et al.*, 1986, Vogelstein *et al.*, 2000, Döhner *et al.*, 2000). Odpověď na poškození DNA je zprostředkována jednou ze signálních transdukčních molekul, kterou je ATM (dalšími jsou ATR, Chk1 a Chk2). Tyto molekuly stabilizují a aktivují protein p53 procesem fosforylace Ser/Thr kinasami (Saito *et al.*, 2002).

Nejčastěji je změna 17p způsobena ztrátou jedné kopie a mutací ve zbývající alele. Tato chromosomální aberace je vnímána jako silně negativní prognostický faktor, způsobující agresivní klinický průběh nemoci, zdvojnásobení času lymfocytů kratší než 12 měsíců, nedostatečnou odpověď na chemoterapii (zahrnující chlorambucil a fludarabin) a krátké přežívání (Wattel *et al.*, 1994).

Vzhledem k tomu, že medián přežití u pacientů s del(17p) je typicky  $\leq 3$  roky od zahájení léčby, doporučuje se u mladších pacientů s mutací *TP53* nebo delecí 17p alogenní transplantace kmenových buněk (Tam *et al.*, 2015). Alogenní transplantace tak představuje jedinou možnost v případě selhání primární léčby u pacientů CLL s delecí 17p, kteří patří do vysoce rizikové skupiny. Ačkoli je na jedné straně transplantace alogenních kmenových buněk příslibem vyléčení, na straně druhé je spojena s dvouletou mortalitou bez relapsu až u 15 – 30 % nemocných (Dreger *et al.*, 2014).

Velkou nadějí se pro pacienty s del(17p) stává ibrutinib, inhibitor Brutonovy tyrosinkinasy (BTK, *Bruton tyrosine kinase*). BTK je jednou z klíčových kinas signálních drah pro navázání antigenu na receptor B-lymfocytů (dalšími kinasami jsou Syk a PI3K). Stimulace BCR receptoru antigenem vede k expresi genů pro-proliferačních a anti-apoptických drah, což chrání buňky před spontánní i indukovanou apoptosou (Mraz *et al.*, 2013). Inhibice této kinas ibrutinibem vede k narušení přežívání CLL buněk a indukcii apoptosy mechanismem nezávislým na *TP53*. Dále

dochází k inhibici proliferace nádorových B-lymfocytů a útlumu jejich migrace (Seda *et al.* 2015). Výsledky klinických studií Jones *et al.* (2018) dokazují, že ibrutinib patří mezi nejúčinnější látky, které byly dosud vyvinuty pro léčbu CLL s del(17p). Přežití pacientů léčených tímto postupem dosahuje 30 měsíců, čímž předčí jiné dostupné terapie.

#### 2.2.8.5 Delece 6q

Delece dlouhého ramene chromosomu 6 se vyskytuje asi u 6 % případů s CLL, většinou jako sekundární chromosomální anomálie nebo jako součástí komplexního karyotypu (Finn *et al.*, 1998, Juliusson *et al.*, 1991).

Edelmann *et al.* (2012) definovali oblast 6q21 velkou 2,5 Mb, která byla deletována u 80 % pacientů s touto delecí, nebyl však identifikován žádný specifický gen odpovědný za patogenezi CLL. Ve stejném roce Urbánková *et al.* (2012) uvedli jako kandidátní gen *FOXO3A*, který byl nalezen v oblasti velké 1,4 Mb v lokusu 6q21. Gen *FOXO3A* je označován jako negativní regulátor buněčného cyklu, popřípadě apoptosy, a u CLL pacientů s delecí 6q je zastoupen v menší míře. *FOXO3A* je tumor supresorový gen, jehož produktem je transkripční faktor, který hraje roli v malignitách nejen hemapotoetického původu. Představuje tak možný terapeutický cíl (Liu *et al.*, 2018). Pomocí array komparativní genomové hybridizace byly jako součásti delece v lokusu 6q21 určeny další geny: *SCML4*, *SEC63*, *OSTM1*, *NR2E1*, *SNX3*, *LACE1*. Geny *FOXO3*, *LACE1*, *SNX3* a *SCML4* byly u pacientů s delecí 6q exprimovány méně než u pacientů bez této delece a u zdravých kontrolních jedinců (Jarošová *et al.*, 2017).

Chronická lymfocytární leukemie s delecí 6q je charakterizovaná atypickou morfologií, imunofenotypem s CD38 pozitivitou a střední incidencí hypersomatické mutace *IGHV*. Pacienti s delecí 6q mají vyšší počet bílých krvinek a rozsáhlejší lymfadenopatii, splenomegalii a významně snížený interval přežití ve srovnání s ostatními pacienty. Často byly pozorovány velké lymfocyty a lymfoplasmocytické buňky včetně buněk podobných imunoblastům. Klinicko-biologické výsledky ukazují, že tato cytogenetická podskupina CLL je zatížena nepříznivou prognózou a měla by být zařazena do středně rizikové kategorie (Cuneo *et al.*, 2004, Finn *et al.*, 1998).

#### 2.2.8.6 Duplikace 8q24 (*MYC*)

Abnormality na chromosomu 8 jsou v populaci CLL vzácné (~ 2 – 5 %), jsou omezeny téměř výhradně na lymfomy B buněk (vzácně lymfomy T buněk) a zahrnují především přestavby a amplifikace.

Při amplifikaci je duplikován pruh 8q24, na kterém se nachází gen pro proto-onkogenní transkripční faktor *MYC*, který reguluje proliferaci, růst a apoptosu a je jedním z genů, které se nejčastěji účastní lidské karcinogeneze (Blanco *et al.*, 2014). Dysregulace *MYC* indukuje buněčnou proliferaci ztrátou kontroly exprese, což vede k nadměrné expresi nefunkčního myc proteinu. Přímý důkaz účasti myc na lidské rakovině pochází z objevení a identifikace genu *MYC* na 8q24 a

jeho translokaci na lokus těžkého řetězce imunoglobulinu u Burkittova lymfomu (Nguyen *et al.*, 2017).

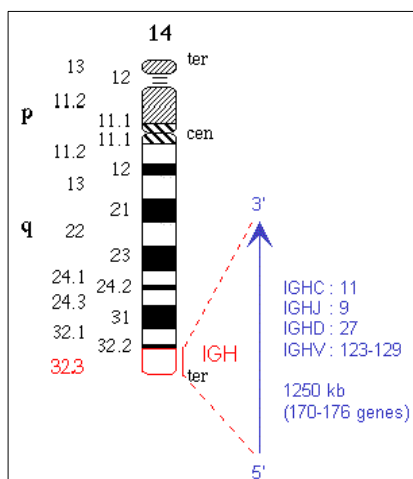
Souhrnně je u CLL přestavba genu *MYC* spojena se zvýšenými počty prolymfocytů, cytogenetickými abnormalitami, komplexním karyotypem a všeobecně horší prognózou nezávislou na stavu mutace *IGHV* nebo expresi ZAP-70 (Blanco *et al.*, 2014, Huh *et al.*, 2008).

### 2.2.8.7 Přestavba *IGH*

Gen *IGH*, kódující těžký řetězec imunoglobulinů, se nachází na chromosomu 14 v pruhu 14q32.33. Změny v oblasti 14q32 byly popsány jako druhá nejčastější abnormalita u pacientů s CLL, v zastoupení cca 32 % (Quintero-Rivera *et al.*, 2009).

Gen u pacientů CLL podléhá přestavbám i delecím. Přestavba (translokace) v oblasti 14q32 není častou změnou, vyskytuje se asi s 4% incidencí, nese však špatnou prognózu (Döhner *et al.*, 2000). Při translokacích je potřeba identifikovat partnerský gen, aby se zjistila prognóza a optimální léčba pacienta. Nejčastěji se jedná o translokace t(14;18)(q32;q21) s fúzí genů *IGH/BCL2*, t(11;14)(q13;q32) s fúzí genů *IGH/CCND1*, t(14;19)(q32;q13.2) s fúzí genů *IGH/BCL3* nebo t(8;14)(q24;q32) s fúzí genů *IGH/MYC* (McCarthy *et al.*, 2008).

Delece 3' konce *IGH* patří taktéž mezi méně často pozorované změny (~ 3 %) nesoucí nepříznivou prognózu (Berková *et al.*, 2008). Mnohem více je zastoupena delece 5' konce variabilního segmentu (V segment) *IGH* genu. Tato delece je fyziologická a je asociovaná s příznivými prognostickými faktory, jako je delece 13q14, normální karyotyp a negativní exprese CD38 a ZAP-70 (Quintero-Rivera *et al.*, 2009). Podle Wlodarska *et al.* (2007), delece různých částí variabilního segmentu *IGH* probíhá v rámci fyziologických V-D-J přestaveb při maturaci B-lymfocytů v kostní dřeni. Nejsou tedy považovány za onkogenní.



Obr. 4 – Schéma znázorňující gen pro *IGH*

Svislá červená čára označuje lokus *IGH* na 14q32.33. Modrá šipka označuje orientaci 5'→3' lokusu a pořadí genových skupin v lokusu. Počet genů v lokusu je uveden za názvem genu.

Zdroj: <http://www.imgt.org/IMGTrepertoire/index.php?section=LocusGenes&repertoire=chromosomes&species=human&group=IGH>

### 2.2.8.8 Zmnožení chromosomu 2p (2p+)

Zmnožení krátkého ramene chromosomu 2 bylo identifikováno čipovou metodou s vysokým rozlišením, jakou je například array komparativní genomová hybridizace (aCGH). Tato abnormalita byla nalezena u 8 – 28 % neléčených pacientů v pokročilém stádiu nemoci (Binet B/C) a v jedné ze studií byla dokonce druhou nejvíce zastoupenou změnou po deleci 13q (Chapiro *et al.*, 2010, Jarosova *et al.*, 2010). Proto ji lze považovat za další významný prognostický marker, který však prozatím není součástí rutinního vyšetření.

Fabris *et al.* 2013 zjistili, že se duplikace 2p může vyskytovat i v časném stádiu nemoci (Binet A), a to i jako samostatná aberace. V průběhu onemocnění se objevuje řada cytogenetických změn, a proto není překvapující, že v pokročilých stádiích je nemoc charakteristická různými nepříznivými prognostickými markery (Gunnarsson *et al.*, 2010). Detekce zmnožení 2p v časných stádiích onemocnění bez jiných aberací značí možnou roli této aberace v progresi onemocnění. Zisk 2p+ může představovat jak časnou genetickou změnu u jednoho pacienta s CLL, tak sekundární změnu spojenou s různými abnormalitami u pacienta druhého. V době do první léčby nebyl prokázán významný rozdíl mezi pacienty s a bez zmnožení 2p chromosomu (Fabris *et al.* 2013).

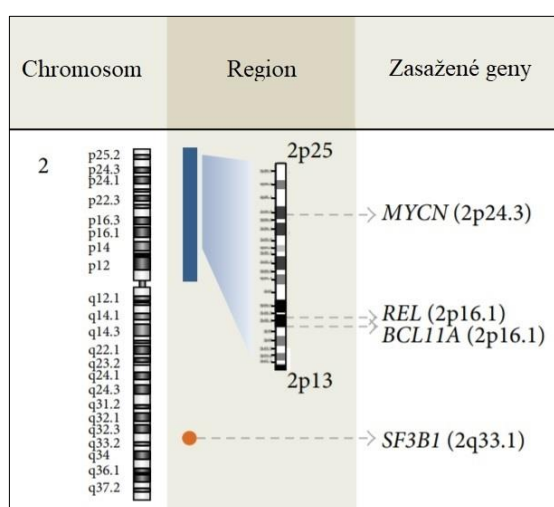
Kandidátními geny na 2p jsou *MSH2*, *MYCN*, *REL*, *BCL11A*, *ALK*, *ACPI* a *XPO1*. Geny *MYCN*, *ALK* a *REL* patří mezi onkogeny a u CLL nemocných je zvýšena jejich exprese. Pacienti se zmnoženým genem *MYCN* vykazovali mnohonásobně vyšší expresi tohoto genu v porovnání s pacienty, kteří zmnožení tohoto genu neměli (Ma *et al.*, 2011, Puente *et al.*, 2011, Cosson *et al.*, 2017, Chapiro *et al.*, 2010, Pfeifer *et al.*, 2007).

Onkogen *MYCN*, lokalizovaný v oblasti 2p24.3, je členem rodiny transkripčních faktorů MYC a kóduje transkripční faktor mycn, který se podílí na kontrole základních procesů během embryonálního vývoje. Protein mycn se účastní několika signálních drah, které podporují růst buněk, proliferaci a metabolismus progenitorových buněk v různých orgánech a tkáních. Deregulace signalizace *MYCN* podporuje vývoj různých nádorů (Ruiz-Pérez *et al.*, 2017). Gen *REL*, lokalizovaný v oblasti 2p16.1, patří do skupiny proto-onkogenů, jenž kódují jaderný transkripční faktor NF-κB. Tento faktor je často amplifikován v různých neoplasiích B buněčných linií. Gen *ALK*, lokalizovaný v oblasti 2p23.2-p23.1, kóduje ALK-tyrosin kinasový receptor, který je zapojen do signálního přenosu. Tyto signalizační cesty jsou významné v buněčném růstu, proliferaci a diferenciaci (Gerondakis *et al.*, 1998, Barth *et al.*, 2003). Gen *MSH2*, lokalizovaný v oblasti 2p21-p16.3, se podílí na opravě chybných úseků DNA při replikaci genomu a je zastoupen v regulaci buněčné proliferace a apoptosy. Bylo prokázáno, že gen *MSH2* má význam v patogenezi a progresi onkologických onemocnění (Seifert *et al.*, 2006). Gen *ACPI*, lokalizovaný v oblasti 2p25.3, je člen rodiny fosfotyrosin fosfatas s nízkou molekulovou hmotností (LMWPTP). Hraje klíčovou úlohu v buněčné proliferaci regulované defosforylací nebo aktivací receptorů tyrosinkinasy (Souza *et al.*, 2009). Dřívější studie ukázala, že *ACPI* reguluje signalizaci receptoru T buněk prostřednictvím aktivace proteinové kinasy spojené se ZAP-70 (Bottini *et al.*, 2002). Gen



*XPO1*, lokalizovaný v oblasti 2p.15, kóduje jaderný transportní protein exportin 1 a v buňkách tumoru je nadměrně exprimován. Tento gen zprostředkovává jaderný export mnoha RNA a buněčných regulačních proteinů, včetně nádorových supresorových proteinů (Jardin *et al.*, 2015). Vysoká míra exprese *XPO1* v CLL buňkách je spojena s nemutovaným *IGHV*, se špatnou prognózou a s rezistencí na léčbu u více typů rakovin (Turner *et al.*, 2012). Gen *XPO1* představuje potenciální terapeutický cíl CLL pacientů (Lapalombella *et al.*, 2012).

Většina případů CLL se zmnožením 2p exprimovala nemutované *IGHV* geny a aberace 2p byla též součástí dalších genetických změn nebo komplexního karyotypu. Zmnožení 2p bylo spojeno s progresí změn v karyotypu, s vysokou četností delecí 6q, 11q a zmnožení 1p, což naznačuje významnou onkogenní kooperaci mezi těmito abnormalitami. Zmnožení krátkého ramene chromosomu 2 může přispět k přirozenému vývoji onemocnění a je tedy spojeno s nepříznivou prognózou (Haferlach *et al.*, 2007, Chapiro *et al.*, 2010).



Obr. 5 – Region ramene chromosomu 2 se zaznačenými kandidátními geny, upraveno dle Puiggros *et al.* (2014)

### 2.2.8.9 Komplexní karyotyp

Komplexní karyotyp (CK) je charakterizován jako vysoce mutagenní stav se třemi a více nepřibuznými chromosomálními abnormalitami. Prognóza je horší u pěti a více změn. Komplexní karyotyp se vyskytuje přibližně u 15 – 30 % nově diagnostikovaných nemocných s CLL a představuje silný negativní prognostický faktor (Ouillette *et al.*, 2010).

U pacientů se zvýšenou komplexitou genomu je prokázán agresivní průběh CLL s rychlou progresí a krátkou remisí. Byla potvrzena asociace s del(11q) a del(17p), s nemutovaným stavem *IGHV*, expresí CD38 a krátkým mediánem přežití (Jagłowski *et al.*, 2012, Baliakas *et al.*, 2014). V poslední době byla prognostická hodnota komplexních karyotypů prokázána také u pacientů s CLL léčených ibrutinibem, který byl asociován se selháním léčby a vykazoval horší výsledky než u pacientů s del(17p). Pacienti bez komplexního karyotypu s delecí 17p mají příznivější odpověď na léčbu ibrutinibem (Maddocks *et al.*, 2015, Thomson *et al.*, 2015).

## 2.3 Molekulární cytogenetika

### 2.3.1 Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH)

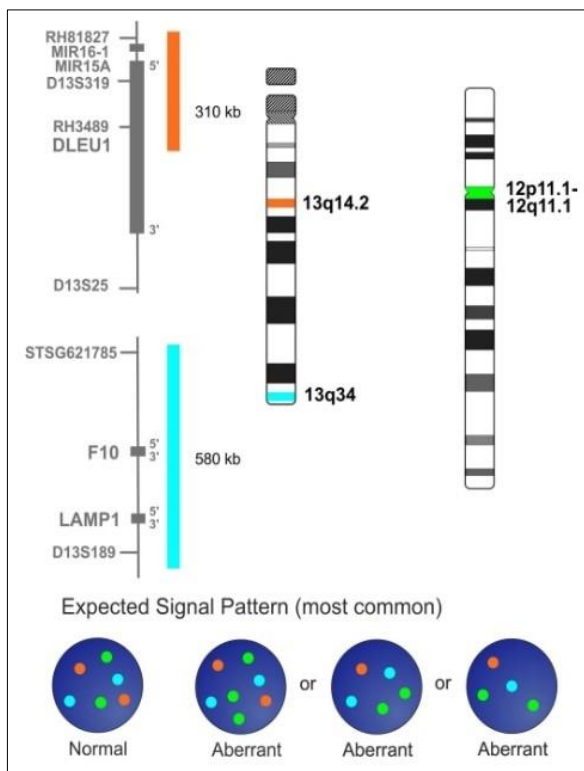
Fluorescenční *in situ* hybridizace je molekulárně cytogenetická metoda založená na hybridizaci specifické sondy (nukleové kyseliny pocházející z plasmidu nebo bakteriofágové molekuly DNA) s komplementární sekvencí DNA vyšetřovaného materiálu fixovaného na skle. Tato revoluční metoda zvýšila rozsah i přesnost rutinní cytogenetické analýzy. FISH slouží k detekci přítomnosti či k detekci absence specifických genových sekvencí a může vizualizovat chromosomální aberace – delece, duplikace či translokace (Moter *et* Göbel, 2000).

FISH využívá k detekci sond fluorochromy s různými excitačními a emisními maximy. Dvoubarevné či třibarevné aplikace jsou využívány v rutinní praxi jak v preparátech metafázních, tak v interfázních jádrech. Sondy jsou značeny a) přímo, zabudováním fluorescenčně značených nukleotidů anebo b) nepřímo, zabudováním reportérových molekul, které jsou následně detekovány fluorescenčními protilátkami nebo jinými afinitními molekulami (Volpi *et* Bridger, 2008).

Jedna z výhod metody FISH spočívá v tom, že není potřeba DNA z vyšetřovaného biologického materiálu izolovat. V prvním kroku je DNA vyšetřovaného pacienta denaturována na jednovláknový řetězec. Dále je specifická jednořetězcová sonda během inkubace hybridizována na cílovou sekvenci jednořetězcové DNA. Nenavázaná a přebytečná sonda je v dalším kroku odmyta. Po přidání fluorescenčního barviva jsou sondy nakonec odečítány *in situ* pomocí fluorescenčního mikroskopu (Chen *et al.*, 2013). Hojně využívaným fluorescenčním barvivem nukleových kyselin je například DAPI (4',6-diamidin-2-fenylindol), které se váže nekovalentně s velkou afinitou do oblastí bohatých na adenin a thymin (Zimmer *et* Wahnert, 1986). Detekované chromosomální aberace jsou vyjádřeny procentuálně.

#### 2.3.1.1 Ideogramy

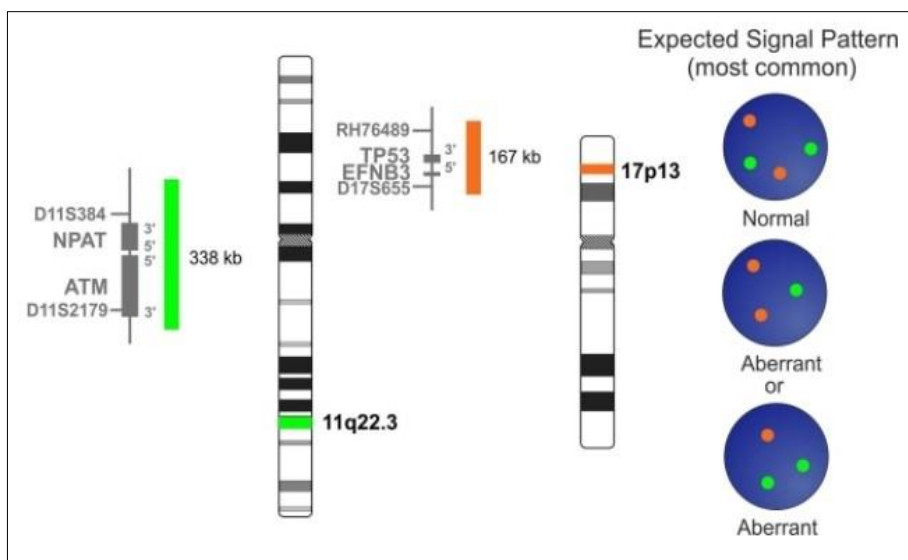
V průběhu experimentální části diplomové práce byly používány sondy od firmy MetaSystems. Panel pro CLL obsahoval sondy znázorněné na Obr. 6 – 9.



Obr. 6 – Ideogram sondy XL DLEU/LAMP/12cen (MetaSystems)

Sonda označuje lokusy 13q14, 13q34 a centromerickou oblast na chr. 12. Kit XL DLEU/LAMP/12cen je tříbarevný mix sond. Oranžová složka označuje genovou oblast *DLEU1* včetně markeru *D13S319*, modrá složka značí genovou oblast *LAMP1* na 13q34 a zelená centromerickou oblast chromosomu 12. Sonda je odečítána ve spektrech Orange/FITC/Aqua.

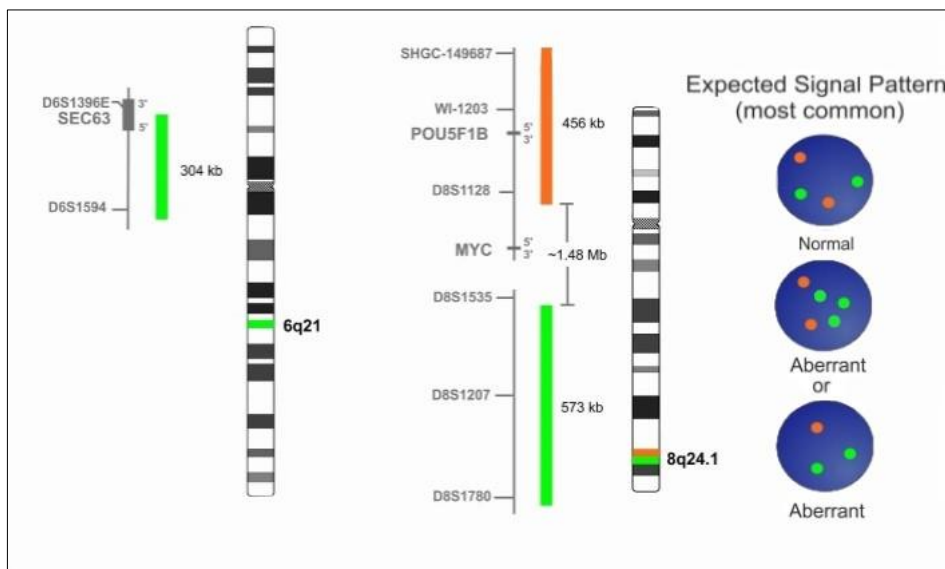
Zdroj: <http://www.alogo.cz/xl-hematology-4/xl-dleu-lamp-12cen-1603.html>



Obr. 7 – Ideogram sondy XL ATM/TP53 (MetaSystems)

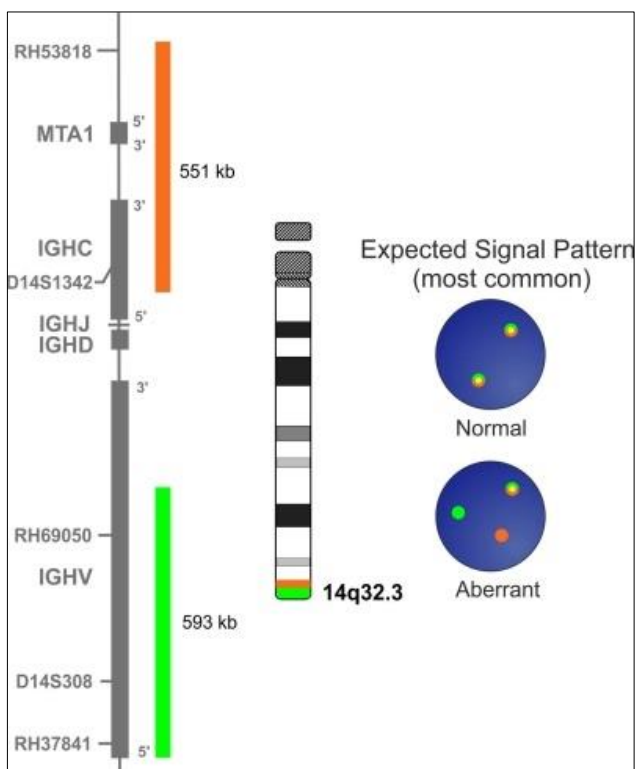
Sonda detekuje delece na dlouhém raménku chromosomu 11 (lokus 11q22) a krátkém raménku chromosomu 17 (lokus 17q13). Zelená složka detekuje specifickou oblast na 11q22 (včetně *ATM* genu). Oranžová složka hybridizuje ke genu *TP53* na oblasti 17p13. Sonda je odečítána ve spektrech Orange/FITC.

Zdroj: <http://www.alogo.cz/xl-hematology-4/xl-atm-tp53-1602.html>



Obr. 8 – Ideogram sondy CL 6q21/8q24 (MetaSystems)

Sonda označuje lokus 6q21/8q24. Detekuje delece dlouhého ramene 6. chromosomu. Zelená složka hybridizuje na oblasti 6q21 včetně *SEC63* genu. Oranžová složka hybridizuje na oblast *MYC* genu na 8q24. Sonda je odečítána ve spektrech Orange/FITC. *Upraveno podle:*  
<http://www.alogo.cz/xl-hematology-4/xl-6q21-6q23-939.html>,  
<http://www.alogo.cz/search/web/index.php?&app=probes&ch=8>



Obr. 9 – Ideogram sondy XL IGH BA (MetaSystems)

Sonda označuje lokus 14q32 a je navržena jako „break apart“ sonda, tvořena dvěma vedle sebe ležícími různě značenými sekvencemi. Její oranžová část hybridizuje ke konstantní oblasti *IGH* rozšířené ke genu *JAG2* na 14. chromosomu (14q32). Zelená část je specifická pro variabilní oblast *IGH*. Sonda je odečítána ve spektrech Orange/FITC.  
*Zdroj:* <http://www.alogo.cz/xl-hematology-4/xl-igh-ba-1580.html>

### 2.3.2 Array komparativní genomová hybridizace (aCGH)

ArrayCGH je molekulárně cytogenetická metoda umožňující analýzu počtu kopií (CNVs, copy number variations) v celém genomu během jednoho experimentu. Metoda je založena na hybridizaci vyšetřovaného a referenčního vzorku se sondami, které jsou nahybridizovány na mikročip. ArrayCGH byla vyvinuta z metody komparativní genomové hybridizace (CGH), kde byly využívány místo specifických sond metafázní chromosomy (Schena *et al.*, 1995). Mikročipy pro aCGH jsou vytvořeny uspořádanou imobilizací DNA sond na pevném nosiči (většinou sklíčku) čímž dochází k výraznému zvýšení rozlišovací schopnosti. Každý z těchto malých úseků genomu, který představuje jednotlivé geny, či jejich části má své přesné umístění v rámci mřížky, do které je rozčleněno podložní sklo. Sondy se liší svou velikostí: podle toho rozlišujeme aCGH na oligonukleotidové, které reprezentují oblasti zájmu (25 – 85 párů bází) a aCGH založeny na genomových klonech, jako jsou bakteriální umělé chromosomy (80 000 – 200 000 párů bází). Protože sondy jsou o několik řádů menší než metafázní chromosomy, rozlišení aCGH je úměrně vyšší než u tradičního CGH (Lucito *et al.*, 2003, Pinkel *et al.*, 1998).

Vyizolovaná DNA, která pochází ze zdravého jedince (referenční, kontrolní, dostupná např. komerčně) a DNA z vyšetřovaného jedince jsou označeny odlišnými fluorochromy, následně se smísí, zdenaturují a nanesou na mikročip. Při aplikaci na mikročip se postupně kompetitivně hybridizují s uspořádanými jednovláknovými sondami. Po hybridizaci je speciálním softwarem vyhodnocena relativní intenzita fluorescence značených DNA. Fluorescenční poměr hybridizačních signálů se stanoví v různých pozicích podél genomu a poskytuje informace o ziscích a ztrátách alelických kopií s vysokým rozlišením v testovaném genomu ve srovnání s normálním genomem (DeRisi *et al.*, 1996, Schena *et al.*, 1995, Shaffer *et al.*, 2007).

ArrayCGH jsou zaměřeny především na detekci genomických abnormalit u rakovinových buněk. Primární výhodou aCGH je schopnost současně detekovat aneuploidie, delece, duplikace a amplifikace jakéhokoliv lokusu reprezentovaného na mikročipu.

Pomocí kombinace analýz aCGH a FISH je možné identifikovat klinicky významnou genomovou nerovnováhu v 96 % případů CLL (Gunn *et al.*, 2008).

## 3 Materiál a metody

### 3.1 Biologický materiál

U pacientů s chronickou lymfocytární leukémií se pro cytogenetické a molekulárně cytogenetické vyšetření vyšetření odebírá periferní krev (PK), kostní dřeň (KD; BM, bone marrow) nebo uzlina (UZL).

### 3.2 Postup

Kultivace buněk PK, KD, nebo UZL a zpracování materiálu pro cytogenetické a molekulárně cytogenetické vyšetření bylo prováděno podle standardních operačních postupů (dle protokolu *Analýza karyotypu buněk nádorové tkáně konvenční cytogenetickou metodou*), které se používají v Laboratoři cytogenetiky a molekulární cytogenetiky Hematoonkologické kliniky Fakultní nemocnice v Olomouci. Cílem kultivace je získat co největší množství dělicích se buněk pro následující vyšetření.

Biologický materiál byl odebírán za sterilních podmínek do sterilních zkumavek s protisrážlivým činidlem (heparinát litný) a transportován za stanovených podmínek do laboratoře (podmínky jsou dostupné v katalogu laboratorních vyšetření). Pak byl zpracován buď přímo (pro vyšetření FISH) nebo byl nejdříve kultivován a teprve následně zpracován. Takto připravené buňky lze použít jak pro klasickou cytogenetiku, tak pro metodu FISH. Postup kultivace závisí na typu biologického materiálu. Zpracování bylo pak stejné pro všechny biologické materiály.

Vzorky pacientů byly během vyšetření uchovávány v ledničce při 4 °C, následně jsou archivovány při -20 °C.

### 3.3 Kultivace biologického materiálu

#### 3.3.1 Kultivace lymfocytů periferní krve (PK)

1. Před kultivací byla odebrána z odběrové zkumavky část PK pro přímé zpracování (odebráno pipetou cca 0,5 ml PK, která byla napipetována do centrifugační zkumavky o objemu 15 ml, dále bylo přidáno cca 5 ml 0,075 M roztoku KCl – takto připravený materiál byl zpracován pro použití k vyšetření FISH – viz kapitola *Zpracování*).
2. Periferní krev odebraná do odběrových zkumavek byla omyta od heparinu.
3. Bylo připraveno kultivační médium s EKAMPO MIX (IL2 a oligonukleotidy). Do každé kultivační nádoby s médiem bylo přidáno PK podle počtu lymfocytů (viz Tab. 3).
4. Směs byla umístěna do termostatu a byla inkubována v prostředí CO<sub>2</sub> při 37 °C po dobu 72 hodin.
5. Po 48 hodinách kultivace bylo přidáno do kultivační nádoby cca 30 µl kolcemidu a kultivovalo se dalších 24 hodin.
6. Takto připravený materiál byl následně zpracován (viz kapitola *Zpracování*).

Tab. 3 – Objem periferní krve pro kultivaci s IL-2 a oligonukleotidy (EKAMPO MIX) podle počtu leukocytů

Počet leukocytů	Objem krve cca (ml)	Počet leukocytů	Objem krve cca (ml)
5	2	40	0,25
6	1,67	41	0,244
7	1,43	42	0,238
8	1,25	43	0,233
9	1,11	44	0,227
10	1	45	0,222
11	0,91	46	0,217
12	0,83	47	0,213
13	0,77	48	0,208
14	0,71	49	0,204
15	0,67	50	0,2
16	0,63	51	0,196
17	0,59	52	0,192
18	0,56	53	0,189
19	0,53	54	0,185
20	0,50	55	0,182
21	0,48	56	0,179
22	0,45	58	0,172
23	0,43	60	0,167
24	0,42	62,5	0,16
25	0,4	65	0,154
26	0,38	67,5	0,148
27	0,37	70	0,143
28	0,36	72,5	0,138
29	0,34	75	0,133
30	0,33	77,5	0,129
31	0,323	80	0,125
32	0,313	82,5	0,121
33	0,303	85	0,118
34	0,294	87,5	0,114
35	0,286	90	0,111
36	0,278	92,5	0,108
37	0,27	95	0,105
38	0,263	97,5	0,103
39	0,256	100	0,1

### 3.3.2 Kultivace buněk kostní dřevě (KD)

1. Kostní dřevě byla z odběrových zkumavek s heparinem přelita do 15ml centrifugačních zkumavek a doplněna do 15 ml médiem RPMI1640.
2. Směs byla promíchána a centrifugována 10 minut při 188 x g.
3. Centrifugát byl přenesen do kultivační nádoby s BM médiem.
4. Ke kultivaci bylo přidáno 30  $\mu$ l kolcemidu a směs byla inkubována v prostředí CO<sub>2</sub> při 37 °C, po dobu 24 hodin
5. Takto připravený materiál byl následně zpracován (viz kapitola *Zpracování*).

### 3.3.3 Kultivace lymfocytů z uzliny (UZL)

1. Vzorek uzliny byl vložen do 50ml zkumavky Falcon s 10 ml kultivačního média (BM) a ihned přenesen do laboratoře k okamžitému zpracování.
2. Na Petriho misce s celým obsahem zkumavky byl vzorek UZL rozmělněn skalpelem, aby došlo k uvolnění buněk.
3. Rozmělněný vzorek UZL byl pomocí pasturovy pipety přenesen do plastové kultivační nádoby s kultivačním médiem.
4. Do nádoby bylo přidáno 30  $\mu$ l kolcemidu a směs byla kultivována v termostatu v prostředí CO<sub>2</sub> při 37 °C 24 hodin.
5. Následující den byl materiál zpracován (viz kapitola *Zpracování*).

### 3.3.4 Zpracování biologického materiálu

1. Smísením metanolu a ledové kyseliny octové v poměru 3:1 byl připraven fixační roztok Carnoye.
2. Obsah kultivačních nádob byl přenesen do 15ml centrifugačních zkumavek a centrifugován 10 minut při 188 x g a 37 °C.
3. Supernatant byl odstraněn a bylo přidáno 10 ml 0,075mol/l roztoku KCl vytemperovaného na 37 °C.
4. Po dobu 25 minut probíhala inkubace při 37 °C.
5. Byla přidána 1 kapka vychlazeného fixačního roztoku Carnoye a směs byla centrifugována 10 minut při 188 x g a 37 °C.
6. Supernatant byl odstraněn a bylo přidáno 10 ml vychlazeného fixačního roztoku Carnoye. Směs byla inkubována 30 minut při laboratorní teplotě.
7. Následně byla centrifugována 10 minut při 188 x g při 4 °C.
8. Supernatant byl odstraněn a byl přidáno 10 ml fixačního roztoku Carnoye, směs byla promíchána pomocí vortexu.
9. Kroky 7 a 8 byly opakovány tak dlouho, dokud neměla buněčná suspenze mléčné opaleskující zbarvení.



### 3.4 Materiál a metody pro FISH vyšetření

#### 3.4.1 Přístrojové vybavení a spotřební materiál

BM médium (Biological Industries)

CCD kamera

Centrifuga Heraeus Megafuge 16R (Heraeus Holding)

Centrifugační zkumavky Falcon (15 ml), (Thermo Fisher Scientific)

Centrifugační zkumavky Falcon (50 ml), (TPP®)

Digestoř

Fixogum Rubber Cement (Marabu)

Flowbox HERAsafe® (Heraeus Holding)

Fluorescenční lampa U-RFL-T (Olympus)

Imerzní olej (Olympus)

Incubátor ThermoBrite (Abbott Molecular)

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

Lednička

Mraznička

Pasteurovy pipety (10 ml), (Biosigma)

Pipety (Gilson)

Plastové kultivační láhve (40 ml), (Thermo Fisher Scientific)

Podložní skla SuperFrost® (Thermo Fisher Scientific)

Software ISIS (MetaSystems)

Stolní minicentrifuga C1301 (Labnet)

Světelný mikroskop Olympus BX60 (Olympus)

Špičky

Topná a sušící deska Medax (Nagel)

#### 3.4.2 Použité chemikálie

0,075M KCl (lékárna FNOL)

70%, 80%, a 96% etanol (Lékárna FNOL)

DAPI (Abbott Molecular, Des Plaines, IL, USA)

dH<sub>2</sub>O (HOK)

NP-40 (Abbott Molecular, Des Plaines, IL, USA)

Fluorescenčně značené sondy (MetaSystems):

- XL IGH BA (kat. č. D-5107-100-OG)
- XL CLL Kit (kat. č. D-5044-100-TC) – obsahuje jednu trojsložkovou (XL DLEU/LAMP/12cen) a jednu dvousložkovou (XL ATM/TP53) sondu.

- 6q21/8q24 (kat. č. D-5039-100-OG)
- XL ALK BA (kat. č. D-60001-100-OG)

20x SSC (saline-sodium citrate buffer)

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12 H<sub>2</sub>O (Lach-Ner, Neratovice, ČR)

### 3.4.3 Použité roztoky

**0,4x SSC/0,3% NP-40:** 20 ml 20x SSC, 950 ml injekční H<sub>2</sub>O, 3 ml NP-40 (pH 7 – 7,5), doplnit H<sub>2</sub>O do 1 l.

**20x SSC:** 132 g 20x SSC, 500 ml dH<sub>2</sub>O (pH 7)

**2x SSC/0,1% NP-40:** 100 ml 20x SSC, 850 ml injekční H<sub>2</sub>O, 1 ml NP-40 (pH 7 – 8), doplnit H<sub>2</sub>O do 1 l.

**2x SSC:** 100 ml 20xSSC doplnit H<sub>2</sub>O do 1 l.

### 3.4.4 Postup FISH

1. Suspenze buněk byla nakapána na podložní sklo a hustota buněk byla zkontrolována pod mikroskopem.
2. Podložní sklo s nakapanými buňkami bylo vloženo do roztoku 2x SSC na 10 minut.
3. Sklo bylo odvodněno v alkoholové řadě s 70%, 80% 90% a 96% etanolem po dobu 2 minut a usušeno na vyhřáté plotýnce při 45 °C.
4. Mezitím byly připraveny sondy, které byly zvortexovány a zcentrifugovány.
5. Na podložní sklo se suspenzí buněk bylo napipetováno 10 µl sondy a bylo přikryto krycím sklíčkem o velikosti 22x22 mm.
6. Okraje krycího sklíčka byly zalepeny rubber-cementem, aby nedošlo k vysychání vzorku.
7. Probíhala denaturace v inkubátoru (thermobrite) při 75 °C po dobu 2 minut.
8. Následně bylo sklo inkubováno ve vlhké komůrce v hybridizační peci do druhého dne při 37 °C.
9. Druhý den bylo podložní sklo s buňkami z inkubátoru vytáhnuto, byl odstraněn rubber-cement a sloupnuto krycí sklíčko, které bylo následně vloženo na 2 minuty do roztoku 0,4xSSC + 0,3% NP-40 v horké lázni (73 °C).
10. Poté bylo sklo přemístěno do 2xSSC + 0,1% NP-40 o laboratorní teplotě, na 2 minuty.
11. Sklo bylo usušeno na plotýnce při 45 °C.
12. Na sklo bylo napipetováno 10 µl DAPI, bylo přikryto krycím sklíčkem a snímáno pod fluorescenčním mikroskopem. Bylo hodnoceno vždy minimálně 300 buněk pro každou sondu. Výsledek byl zapsán podle ISCN (*An International System for Human Cytogenomic Nomenclature*) z roku 2016 (McGowan-Jordan *et al.*, 2016).

Pro vlastní vyšetření byly použity genové sondy od firmy MetaSystems, kdy každý genový lokus je označen jiným fluorochromem. Součástí CLL panelu byly následující sondy:

- XL IGH Plus MetaSystems – přestavba genu pro *IGH* je znázorněna oddělením oranžového a zeleného signálu, pokrývajícího konstantní a variabilní oblast genu *IGH*.
- XL ATM/TP53 MetaSystems – oblast značená zeleně odpovídá místu, ve které se nachází gen *ATM*, oblast značená oranžově pak místu výskytu genu *TP53*.
- XL DLEU/LAMP/12cen MetaSystems – geny *DLEU1* a *DLEU2* se nachází v oblasti 13q14 a jsou zobrazovány oranžově, centromera chromosomu 12 je zobrazována zeleně. Gen *LAMP1* se nachází v oblasti 13q34 a je zobrazován modře.
- 6q21/8q24 MetaSystems – oranžově značená je specifická oblast 6q21 obsahující gen *SEC63*. Oblast 8q24, obsahující gen *MYC*, je značena zeleně.
- XL ALK BA MetaSystems – oranžově značená sonda hybridizuje v oblasti, kde leží gen *ALK*. Zeleně je označena oblast 2p23.

### 3.5 Materiál a metody pro aCGH

Bylo postupováno dle protokolu Agilent Oligonucleotide Array-Based CGH for Genomic DNA Analysis Enzymatic Labeling for Blood, Cells, or Tissues (with a High Throughput option) Protocol, © Agilent Technologies, verze 7.5, červen 2016.

#### 3.5.1 Přístrojové vybavení a spotřební materiál

Mikročipová skla: SurePrint G3 Human CGH + SNP 4×180K Kit (Agilent Technologies)

Centrifuga 5425 nechlazená (Eppendorf®)

Časovač

Čistící kolony

Hybridizační pec; teplota nastavená na 67 °C (Agilent G2545A Shell Lab)

Hybridizační těsnící sklíčka na 4-čipovou microarray (Agilent Technologies)

Hybridizační, nerezový držák na mikročip (Agilent Technologies)

Hybridizační, nerezový držák na vyvážení (Agilent Technologies)

Kbelík na led

Kontejner na sklíčka Ozone-barrier slide covers (Agilent Technologies)

Microarray Surescan scanner a počítač (Agilent Technologies)

Microarray scanner průhledný držák na čip pro 4×180K (Agilent Technologies)

Mikrocentrifuga, MiniStar / MiniStar blueline, VWR Collection

Mini-centrifuga/vortex Combi-Spin FVL-2400N (Biosan)

N<sub>2</sub> box pro uchovávání mikročipů (slide holder)

Pinzeta

Pipety

Purifikační kolona (Ambion)  
Qubit Fluorometer, Life Technologies, p/n Q32857  
Qubit® 2.0 fluorometr (Life Technologies)  
RNase-free zkumavka, 1.5 ml (Ambion)  
Rukavice  
Sběrné 2 ml zkumavky (Agilent Technologies)  
Skleněné kopoliny s poklopem  
Sterilní špičky  
Stojan na zkumavky  
Stojánek ve tvaru hřebínku na odložení mikročipu při mytí  
Tenkostěnné 0,5 ml PCR zkumavky (Life Technologies)  
Tenkostěnné 0,5 ml Qubit Assay zkumavky (Life Technologies)  
Tenkostěnné 200 µl zkumavky (Agilent Technologies)  
Termocycler ProFlex™ 96-well PCR Systém (Applied Biosystems®)  
Termostat Dry block, Bio TDB-100 (Biosan)  
Thermomixer Compact (Eppendorf®)  
UV-Transilluminator se SYBR fotografickým filtrem (Alpha Innotech)  
UV-VIS spektrofotometr NanoDrop® ND-1000 (Thermo Scientific)

### 3.5.2 Použité chemikálie

1×TE pufr (pH 8.0)  
dH<sub>2</sub>O (HOK)  
DNA/RNA voda bez nukleas  
Human Cot-1 DNA (1.0 mg/ml), p/n 5190-3393 (Agilent Technologies)  
Milli-Q ultračistá voda (Millipore)  
Oligo aCGH/ChIP-on-chip Hybridization Kit (Agilent Technologies)  
Referenční DNA A12891 (European Male), NA12878 (European Female), 200 ng/µl  
SureTag DNA Labeling Kit (Agilent Technologies)

### 3.5.3 Kity

**GenElute PCR Clean-Up Kit** (Column Preparation Solution, Binding Solution, Wash Solution Concentrate, Elution Solution, GenElute plasmid mini spin column 2 mL, Collection Tube)  
**Oligo aCGH/ChIP-on-chip Hybridization Kit** (2× HI-RPM Hybridization Buffer, 10× aCGH Blocking Agent)  
**Oligo aCGH/ChIP-on-chip Wash Buffer Kit** (Agilent Oligo aCGH/ChIP-on-Chip Wash Buffer 1, Agilent Oligo aCGH/ChIP-on-Chip Wash Buffer 2)  
**Qubit dsDNA BR Assay Kit** (Qubit dsDNA BR reagent, Qubit dsDNA BR buffer, Qubit dsDNA BR standard 1, Qubit dsDNA BR standard 2)

**SureTag DNA Labeling Kit** (Restriction Enzyme Buffer, BSA, Alu I, Rsa I, Nuclease-Free Water, Exo (-) Klenow, 5× Reaction Buffer, Cyanine 5-dUTP, Cyanine 3-dUTP, 10× dNTPs, Random Primer)

### 3.5.4 Software

CytoGenomics v5.0.1 (Agilent Technologies)

SureScan (Agilent Technologies)

### 3.5.5 Postup aCGH

#### 3.5.5.1 Stanovení koncentrace DNA ve vzorku dle Qubit™ Assays, Invitrogen

DNA všech pacientů byla izolována v molekulárně biologické laboratoři HOK.

1. Byl připraven pracovní roztok smícháním Qubit™ reagentu v poměru 1:200 s Qubit™ dsDNA BR pufrům a promíchán (na jeden vzorek použito 199 µl pufru a 1 µl reagentu). Všechny používané chemikálie byly před začátkem analýzy vytemperovány na laboratorní teplotu.
2. Do dvou tenkostěnných 0,5ml Qubit zkumavek bylo napipetováno nejprve 190 µl pracovního roztoku, do první z těchto zkumavek bylo přidáno 10 µl Standardu 1, do druhé zkumavky 10 µl Standardu 2, na konečné množství 200 µl v každé zkumavce.
3. Do zbývajících připravených zkumavek bylo napipetováno 198 µl pracovního roztoku a 2 µl DNA vzorku pacientů (které byly krátce předem zvortexovány a zcentrifugovány), na konečné množství 200 µl v každé zkumavce.
4. Vzorky byly vortexovány 2 sekundy, stočeny na centrifuze a byla změřena jejich koncentrace fluorometrem dle návodu.

#### 3.5.5.2 Restrikce (SureTag DNA Labeling Kit)

5. Podle hodnot koncentrací z fluorometru byly vzorky DNA naředěny na koncentraci 1000 ng DNA/RNA vodou bez nukleas do 0,2 ml zkumavek na celkový objem 20,2 µl.
6. Naředěné vzorky i kontroly byly lehce zvortexovány a stočeny na centrifuze, komponenty Alu 1 a Rsa 1 byly uchovávány během práce na ledu.
7. Byl připraven štěpící Master Mix pro 4 - čipovou microarray podle Tab. 4.
8. Na každou reakci bylo napipetováno do 0,2ml PCR zkumavky s naředěnou DNA množství 5,8 µl připraveného štěpícího Master mixu na konečný objem 26 µl v každé zkumavce.
9. Řádně popsané zkumavky byly vloženy do termocykleru a je zvolen program podle Tab. 5. DNA je uložena v mrazáku při -20 °C.

Tab. 4 – Štěpící Master Mix

<b>Komponenty</b>	<b>Na reakci (μl)</b>	<b>x 8 vzorků (μl) *</b>
DNA/RNA voda bez nukleas	2,0	17
10 x Restriction Enzyme Buffer	2,6	22,1
BSA	0,2	1,7
Alu 1	0,5	4,25
Rsa 1	0,5	4,25
Konečný objem štěpícího Master Mixu	5,8	49,3

\*zahrnuje nadbytek

Tab. 5 – Restrikční štěpení DNA za použití termocykleru

<b>Krok</b>	<b>Teplota</b>	<b>Čas</b>
Krok 1	37°C	2 hodiny
Krok 2	65°C	20 minut
Krok 3	4°C	∞

### 3.5.5.3 Fluorescenční značení gDNA

Pozn. *cyanine 3-dUTP* a *cyanine 5-dUTP* jsou citlivé na světlo, proto jsou během práce uchovávány ve tmě na ledu. *Exo Klenow* je ponechán celou dobu práce v mrazáku.

10. Nejprve byly vzorky stočeny na stolní mikrocentrifuze.
11. Do reakčních zkumavek, které obsahují 26 μl gDNA, bylo přidáno 5 μl Random primeru, směs byla krátce zvortexována a zcentrifugována.
12. Zkumavky byly přeneseny na termoblok a byly inkubovány 3 minuty při 98 °C, poté byly přeneseny ihned na led a inkubovány 5 minut.
13. Vzorky byly stočeny na stolní mikrocentrifuze a byl připraven 1x cyanine 3-dUTP značící Master Mix a 1x cyanine 5-dUTP značící Master mix podle Tab. 6.
14. Bylo přidáno 19 μl cyanine 5-dUTP značícího Master Mixu do každé reakční zkumavky s pacientovou gDNA a 19 μl cyanine 3-dUTP značícího Master Mixu do každé reakční zkumavky s kontrolní gDNA na finální objem 50 μl v každé zkumavce.
15. Všechny vzorky byly krátce zvortexovány a zcentrifugovány na stolní centrifuze a přeneseny do cykleru. Byl zapnut program podle Tab. 7. Po reakci lze uchovávat vzorky po dobu 1 měsíce ve tmě při -20 °C.

Tab. 6 – Značící Master mix

Komponenty (SureTag DNA Labeling Kit)	Na reakci (μl)	x 4 vzorky (μl) *
5 x Reaction Buffer	10,0	42,5
10 x dNTPs	5,0	21,25
Cyanine 3-dUTP nebo Cyanine 5-dUTP	3,0	12,75
Exo Klenow	1,0	4,25
Konečný objem značícího Master mixu	19	161,5

\*zahrnuje nadbytek

Tab. 7 – Značení DNA za použití termocykleru

Krok	Teplota	Čas
Krok 1	37°C	2 hodiny
Krok 2	65°C	10 minut
Krok 3	4°C	∞

#### 3.5.5.4 Přechištění značené gDNA

*Pozn. Udržovat odděleně Cyanine 3 a Cyanine 5 značenou gDNA*

16. Vzorky byly nejprve zcentrifugovány při 6 000 x g po dobu 1 minuty, následně byla smíchána značená gDNA s 430 μl 1xTE (pH 8,0), směs byla přepipetována do přečišťující kolony umístěné ve sběrné 2 ml zkumavce a kolona byla uzavřena víčkem.
17. Centrifugace probíhá při 14 000 x g při laboratorní teplotě 10 minut. Následně byly vylity zbytky, které protekly kolonou. Je přidáno 480 μl 1xTE opět do každé kolony a směs je centrifugována 10 minut při 14 000 x g.
18. Pro sesbírání přečištěného vzorku byla otočena kolona do čisté 2ml sběrné označené zkumavky a centrifugována 1 minutu při 1 000 rpm.
19. Objem každého přečištěného vzorku je 20 – 32 μl.
20. Následně byla měřena koncentrace a značení vzorků pomocí Nanodropu 8000, na základě kterých byla dále vypočítána specifická aktivita:

$$\text{Specifická aktivita kontroly} = \frac{\text{Dye1 (pmol/}\mu\text{l)}}{c \text{ (ng/}\mu\text{l)}} \times 1000$$

$$\text{Specifická aktivita pacienta} = \frac{\text{Dye2 (pmol/}\mu\text{l)}}{c \text{ (ng/}\mu\text{l)}} \times 1000$$

21. Do zkumavek se vzorky pacientů bylo přidáno 20 μl ze vzorku kontroly a promícháno pipetou. Vždy byla mužská kontrola přidána k pacientovi, ženská kontrola k pacientce, přednostně byly voleny kombinace s podobnými specifickými aktivitami.

22. Vzorky je možné uchovat po dobu 1 měsíce v mrazáku při -20°C.

### 3.5.5.5 Hybridizace

23. Pokud ještě není 10 x Blocking Agent naředěn, je třeba jej naředit přidáním 1,350 µl DNA/RNA destilované vody bez nukleas do eppendorf zkumavky, obsahující lyofilizovaný 10 x aCGH Blocking Agent, obsažen v Oligo aCGH/ChIP-on-chip Hybridization Kitu.
24. Byl připraven hybridizační Master Mix smícháním předem protřepaných komponent uvedených v Tab. 8.

Tab. 8 – Hybridizační Master Mix pro 4-čipovou microarray

Komponenty	Objem na hybridizaci (µl)	4x vzorky (µl) *
Cot-1 DNA (1.0 mg/ml)	5	21,25
10x aCGH Blocking Agent	11	57,36
2x HI-RPM Hybridization Buffer	55	233,75
Konečný objem hybridizačního Master Mixu	71	301,75

\*zahrnuje nadbytek

25. Do zkumavek se smíchanou pacientovou a kontrolní DNA (kde bylo cca 39 µl vzorku) bylo napipetováno 71 µl hybridizačního Master Mixu do výsledného objemu cca 110 µl.
26. Směs byla lehce zvortexována a zcentrifugována.
27. Směs byla inkubována 3 minuty při 98 °C a poté 30 minut při 37 °C ve tmě. Vzorky byly stočeny na centrifuze 1 minutu při 6000 x g.
28. Bylo napipetováno ihned 100 µl na hybridizační těsnící skličko, které bylo položeno na hybridizačním držáku, mikročip byl aktivní stranou položen opatrně na napipetované vzorky.
29. Hybridizační držák byl zkompletován a vložen do vyvážené hybridizační pece, kde byly vzorky inkubovány při 67 °C po dobu 24 hodin. Otáčení rotoru bylo nastaveno na 20 rpm.

### 3.5.5.6 Mytí microarraye

30. Tři koplíny s víky, hřebínek a pinzeta byly omyty: nejprve 2x v destilované vodě a následně 2x v Milli-Q ultračisté vodě. Nechaly se volně oschnout ve flowboxu.
31. Dvě z nich byly naplněny mycím pufrem 1 o laboratorní teplotě, třetí byla naplněna mycím pufrem 2, který byl umístěn do vodní lázně o teplotě 37 °C.
32. Z hybridizační pece byl vytažen hybridizační držák a skla byla vložena do první koplíny s mycím pufrem 1, kde byla odlepena od sebe. Mikročip byl rychle přemístěn do hřebínku ve druhé koplíně s mycím pufrem 1 na 5 minut.



33. Poté byl přenesen hřebínek i se sklíčkem do třetí kopoliny, která obsahovala mycí pufr 2 zahřátý na 37 °C. Čip byl v kopolině ponechán 30 sekund.
34. Sklíčko bylo opatrně vytáhnuo a následně skenováno pomocí SureScan microarray scanneru, vyhodnocení výsledného souboru (.tif) se provádělo v programu CytoGenomics v5.0.1, výsledky byly zapsány podle aktuální verze ISCN (McGowan-Jordan *et al.*, 2016).

### **3.6 Statistická analýza**

Kaplan-Meierovy grafy přežití byly výsledkem statistické analýzy za použití statistického softwarového programu MedCalc, verze 19 (MedCalc Software bvba, Belgie). Celkové přežití (OS) bylo definováno jako doba od stanovení diagnózy do data posledního sledování nebo data úmrtí z jakékoli příčiny. Hodnota  $p < 0,05$  byla považována za významnou. Faktorem při analýze byla přítomnost/nepřítomnost duplikace 2p. Výsledek analýzy délky přežívání je udáván v měsících.

## 4 Výsledky

### 4.1 Výsledky komparativní genomové hybridizace na čipu

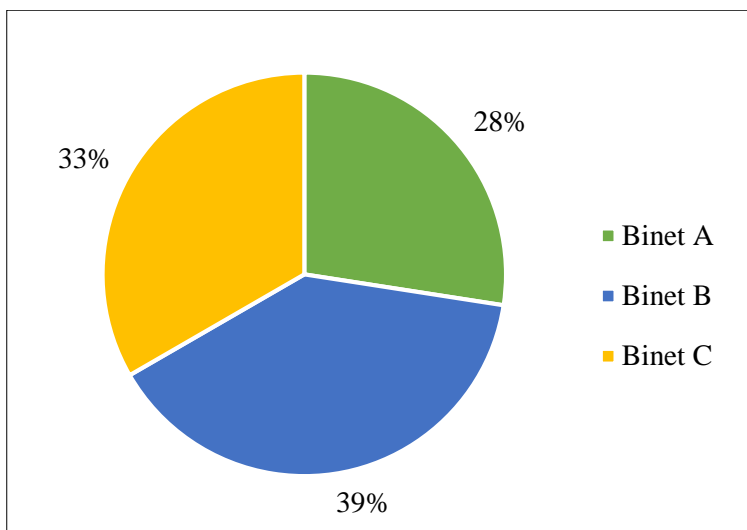
#### 4.1.1 Soubor pacientů

Od listopadu 2017 do prosince roku 2018 bylo vyšetřeno celkem 53 pacientů s diagnostikovaným onemocněním CLL. Všichni tito pacienti měli duplikaci krátkého ramene chromosomu 2, která byla již dříve prokázána cytogeneticky nebo pomocí metody FISH a jejíž rozsah byl následně v rámci této práce určen pomocí metody array komparativní genomové hybridizace.

Soubor tvořilo 43 mužů (81 %) a 10 žen (19 %). Medián věku v době stanovení diagnózy byl 61 roků, s rozmezím 34 – 92 let. Dle Bineta bylo ve stadiu nemoci A 14 pacientů (26 %), ve stadiu B 20 pacientů (38 %) a 17 pacientů ve stadiu nemoci C (32 %). U dvou nemocných nebylo stadium dle Bineta uvedeno. Vyšetřovaným materiálem byla u tří pacientů (6 %) kostní dřeň (KD), u tří pacientů (6 %) uzlina (UZL) a u 47 pacientů (89 %) byla vyšetřovaným materiálem periferní krev (PK). Všichni pacienti byli vyšetřeni laborantkami cytogenetické laboratoře konvenční cytogenetikou a také byla provedena FISH k detekci delece 13q14, trizomie chromosomu 12, delece genů *TP53* a *ATM*, delece 6q21, duplikace 8q24, přestavby genu *IGH*. U většiny pacientů byla také použita sonda k detekci zmnožení 2p. Podle tabulky 11 byl pomocí konvenční cytogenetiky u 9 pacientů (17 %) prokázán karyotyp bez komplexních změn, u 44 pacientů (83 %) se vyskytoval komplexní karyotyp.

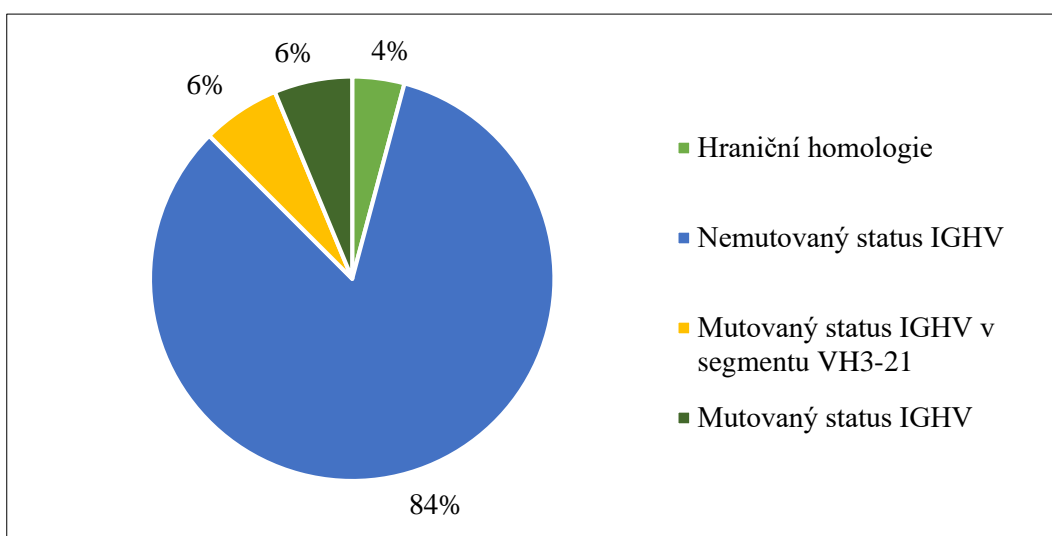
Tab. 9 – Základní rozdělení souboru pacientů se zmnožením 2p dle pohlaví, věku a stadia nemoci

Počet vyšetřených pacientů	53
Muži	43
Ženy	10
Věk při diagnóze (medián)	61
Rozmezí věku při diagnóze	34 – 92
Binet A	14
Binet B	20
Binet C	17
Binet neuveden	2



Obr. 10 – Poměr pacientů na základě rozdělení podle Binet *et al.*

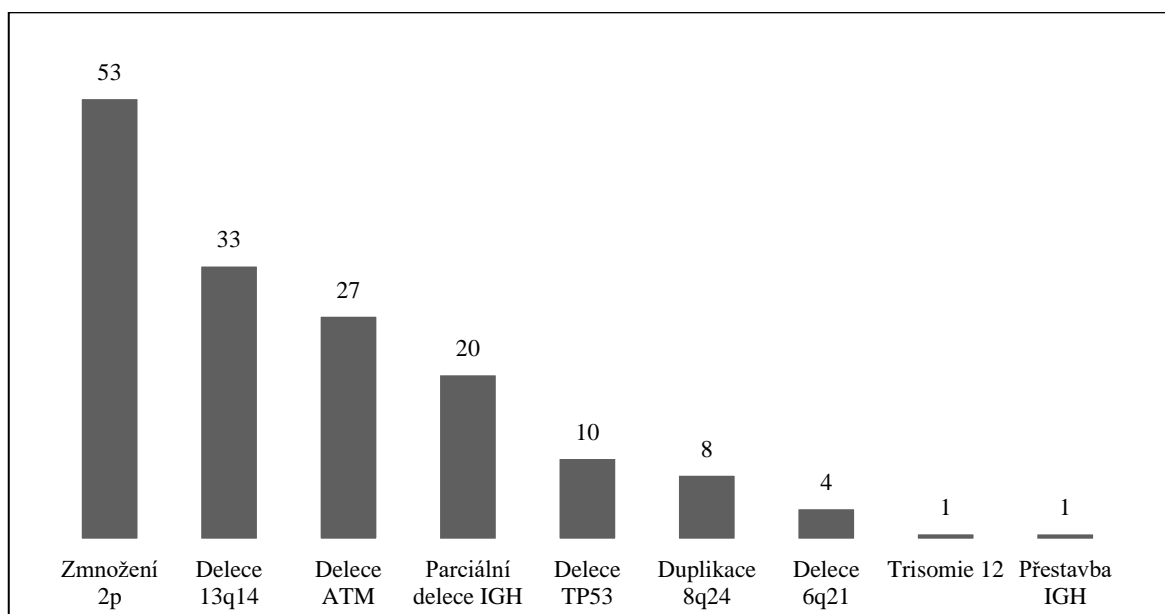
Mutační stav *IGHV* byl vyšetřen metodami molekulární biologie (vyšetření provedeno v Laboratoři molekulární biologie HOK) u 48 pacientů. Výsledky jsou zaznamenány v Tab. 11. U dvou pacientů (15/M, 53/F) byla pozorována hraniční homologie. Jen u šesti pacientů (12 %) byl gen pro *IGHV* mutován. Z toho tři pacienti (6 %) – č. 1/M, 13/M a 20/M, vykazovali mutaci v segmentu *VH3-21*. Čtyřicet pacientů (84 %) mělo nemutovaný status *IGHV*, viz Obr. 11.



Obr. 11 – Poměr pacientů na základě mutovaného/nemutovaného *IGHV* genu

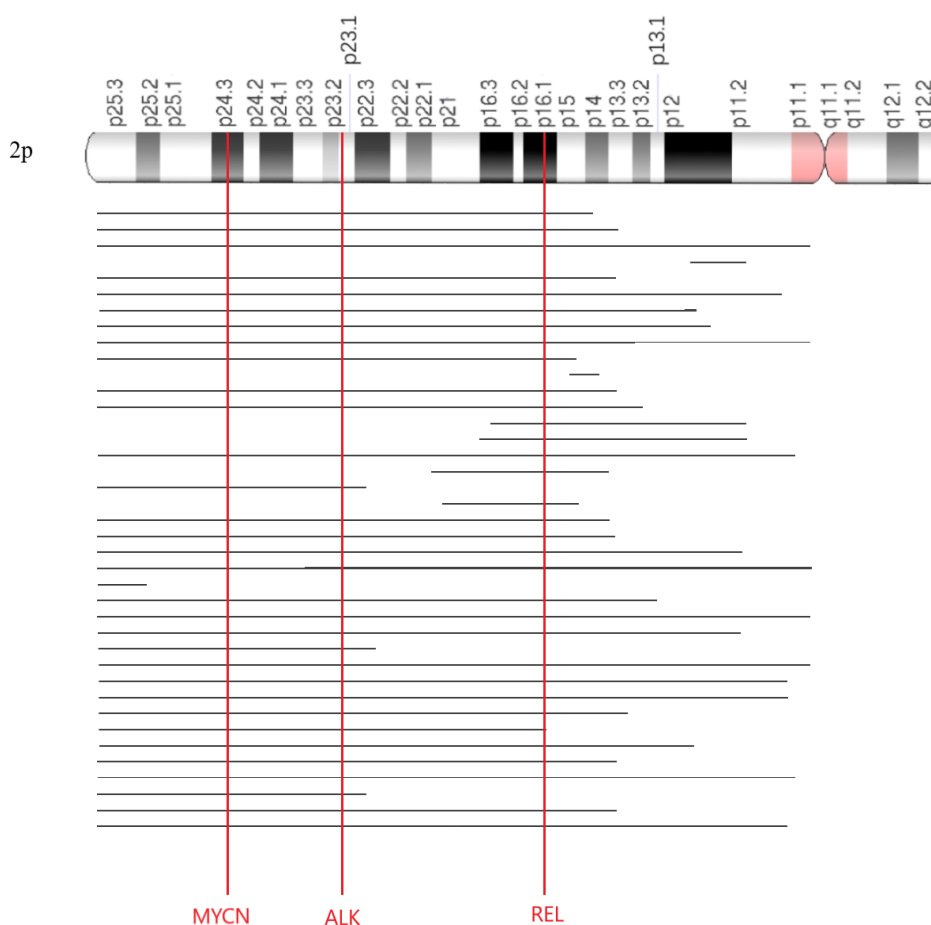
S duplikací 2p byla metodou FISH nalezena u 49 pacientů (92 %) ještě jiná chromosomální změna. Pouze u 4 pacientů (8 %) se duplikace 2p vyskytovala jako solo aberace.

Celkem 10 pacientů (20 %) mělo podle výsledků FISH u podsouboru pacientů s (2p+), (viz Tab. 11) delecí genu *TP53*. U všech deseti pacientů se spolu s delecí *TP53* vyskytovala i jiná chromosomální změna. Šest pacientů mělo zároveň nemutovaný status *IGHV*. Dva pacienti měli status *IGHV* mutovaný. U třech pacientů nebylo vyšetření delece *TP53* provedeno. Delece 13q14 byla detekována celkem u 33 pacientů (65 %), z toho monoalelická delece byla nalezena v 27 případech (82 %) a bialelická delece u 2 pacientů (6 %). Společná monoalelická i bialelická delece byla nalezena celkem u 5 pacientů (15 %). Delece *ATM* byla detekována u 27 pacientů (52 %). Parciální delece 5'konce *IGH* byla detekována u 20 pacientů (43 %), tato delece je fyziologická. U jednoho pacienta (2 %) byla detekována přestavba genu *IGH*. U všech pacientů se změnou v *IGH* genu se vyskytovala současně i jiná chromosomální aberace. Analýza *IGH* genu metodou FISH u jednoho pacienta nebyla úspěšná a u 5 pacientů nebyla provedena. Delece 6q21 byla objevena u 4 pacientů (9 %), u 7 pacientů nebyla analýza provedena. Duplikace 8q24 byla nalezena u 8 pacientů (20 %), u 12 pacientů nebyla analýza provedena. Trisomie chromosomu 12 byla detekována pouze u jednoho pacienta (3/M) a je tedy ve svém 2% zastoupení společně s přestavbou genu *IGH* nejméně častou chromosomální změnou u tohoto souboru pacientů.



Obr. 12 – Poměr četnosti zastoupení všech chromosomálních aberací u souboru pacientů vyšetřovaných metodami FISH a aCGH

Vyšetření metodou aCGH bylo úspěšně provedeno u všech 53 pacientů. U 14 pacientů byla duplikace 2p pod hranicí detekce metody aCGH (hranice detekce je asi 20 %). Je patrné, že metoda aCGH nezachytíla nižší procento aberací na rozdíl od metody FISH, která zachytíla duplikaci 2p i v nižším procentuálním zastoupení. Pomocí výsledků aCGH, zobrazených v softwaru CytoGenomics, byl pozorován začátek a konec duplikací krátkého ramene chromosomu 2. Rozsah duplikací byl určen na souboru 39 pacientů. U 29 pacientů (74 %) byly zasaženy všechny tři kandidátní geny – duplikace zasahovala celé krátké rameno chromosomu 2. U 10 pacientů (26 %) byly duplikované úseky značně heterogenní. Tato data jsou graficky zpracována, viz Obr. 13. Mezi protoonkogeny zasažené touto duplikací patří *MYCN*, *ALK*, *REL* a další.

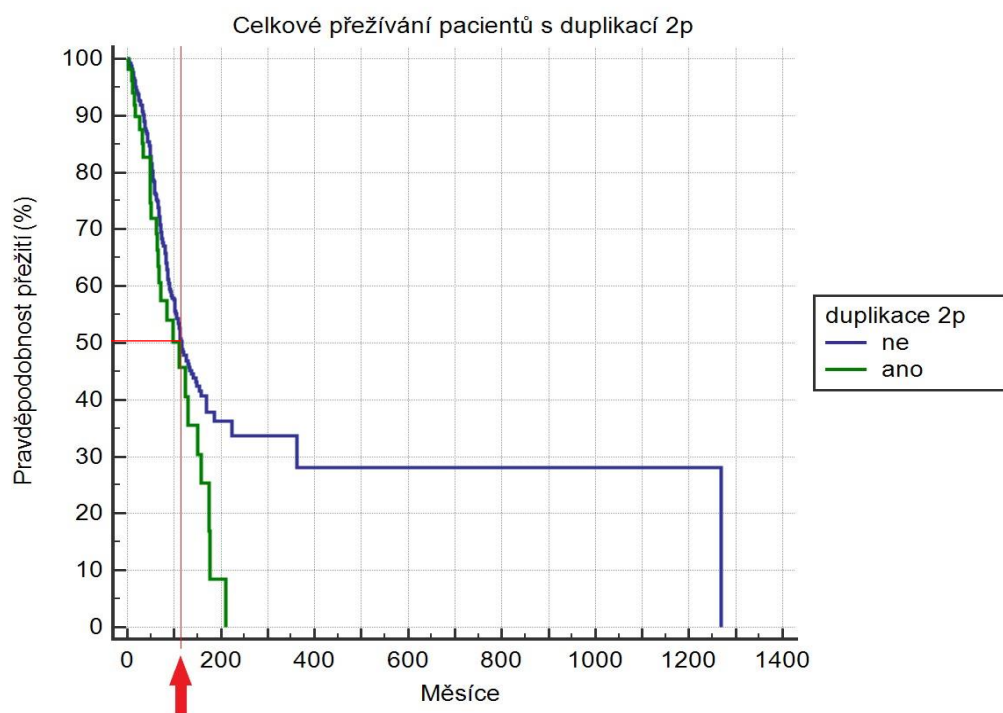


Obr. 13 – Rozsah zmnožení na chromosomu 2p se znázorněnými kandidátními geny *MYCN*, *ALK*, *REL*

Zdroj chromosomu: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/tools/gdp>

Statisticky bylo porovnáno přežívání u pacientů se zmnožením 2p v porovnání s kontrolní skupinou. Kontrolní skupina obsahuje 551 pacientů, u kterých nebyla detekována duplikace 2p ani komplexní karyotyp. Oběma skupinám byla diagnostikovaná CLL. Doba přežití je ohraničena počátečním datem (datum diagnózy) a konečným datem (datum poslední kontroly /*follow up*/ nebo úmrtím). Celkem bylo do analýzy zahrnuto 52 pacientů s duplikací 2p, jeden pacient byl vyřazen z důvodu ukončení sledování na HOK FNOL a přechodu do spádové hematologické ambulance.

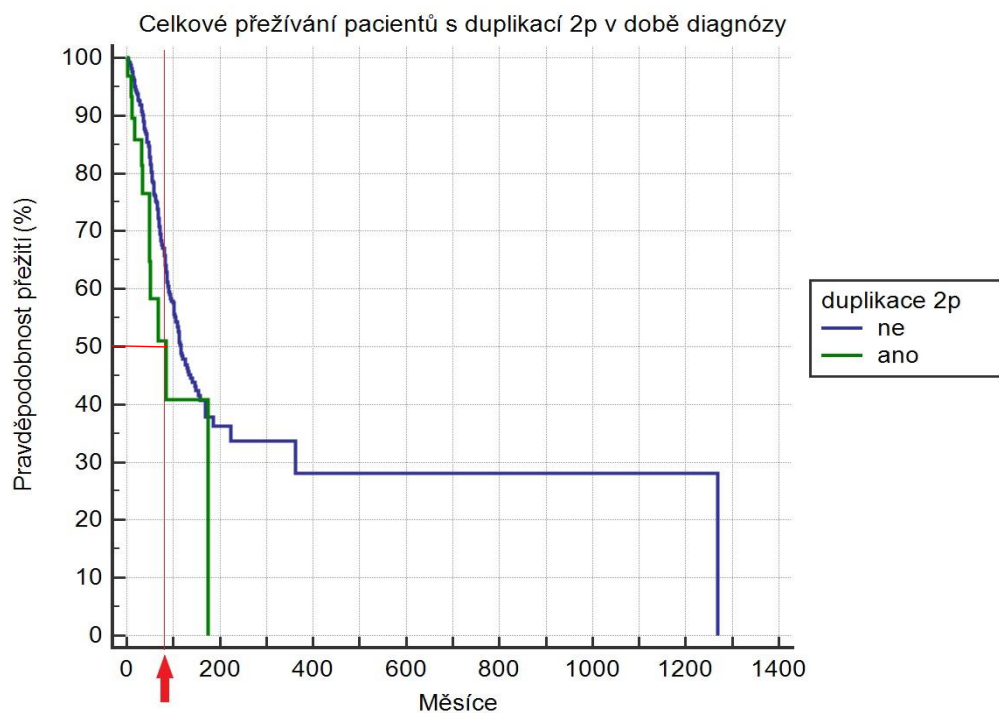
Obr. 14 zachycuje pravděpodobnost přežití (%) pacientů s/bez zmnožení 2p v čase (měsíce). Medián přežití těchto pacientů se zmnožením 2p byl určen na 111 měsíců, tj. 9,25 let. Medián přežití u kontrolní skupiny je 116 měsíců, tj. 9,6 let. Rozdíl mezi těmito skupinami je 5 měsíců. Signifikance (P hodnota) je 0,0382.



Obr. 14 – Celkové přežívání pacientů se zmnožením 2p

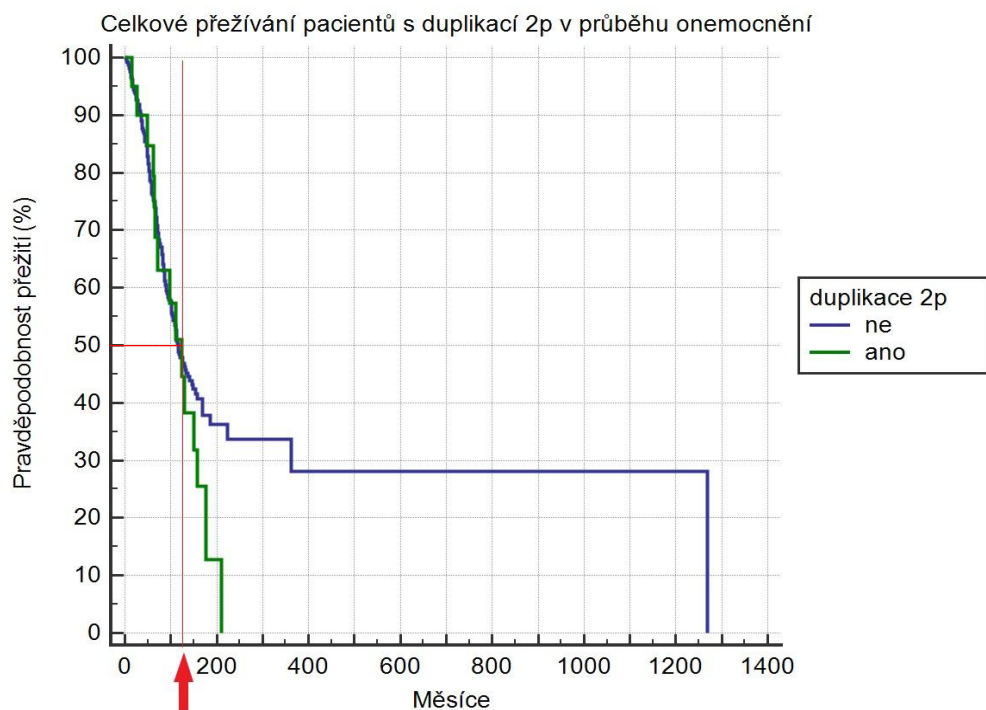
Díky malému rozdílu v přežívání (5 měsíců) byla provedena analýza k určení významu doby výskytu zmnožení 2p u pacientů s CLL. Pacienti byli tedy rozděleni do podskupin: 1. s prokázaným zmnožením 2p při diagnóze a 2. s prokázaným zmnožením 2p až v průběhu onemocnění.

1. Medián přežití pacientů, kterým bylo detekováno zmnožení 2p v době diagnózy je 84 měsíců, tj. 7 let. Počet pacientů z této podskupiny je 32 (62 %). Kontrolní skupina má opět medián přežívání 116 měsíců, tj. 9,6 let. Rozdíl v době přežívání mezi těmito skupinami pacientů činí 32 měsíců, tj. 2,6 let. Signifikance (P hodnota) je 0,0312 (viz Obr. 15).



Obr. 15 – Celkové přežívání pacientů se zmnožením 2p v době diagnózy

2. Statisticky bylo porovnáno i přežívání pacientů se zmnožením 2p, které jim bylo detekováno až v průběhu onemocnění, viz Obr. 16. Počet pacientů z této podskupiny je 20 (38 %). Tento soubor pacientů byl opět porovnán s kontrolní skupinou. Medián přežití pacientů, kterým bylo detekováno zmnožení 2p až v průběhu onemocnění, je 124 měsíců, tj. 10,3 let. Kontrolní skupina má medián přežívání 116 měsíců, tj. 9,6 let. Rozdíl v době přežívání mezi těmito skupinami pacientů činí 8 měsíců, tj. 0,6 let. Signifikance (P hodnota) je 0,2357.



Obr. 16 – Celkové přežívání pacientů se zmnožením 2p v průběhu onemocnění

Z výše uvedených statistických analýz vyplývá, že zmnožení 2p prokázané u pacientů CLL již v době diagnózy významně ovlivňuje jejich celkové přežívání. Zmnožení 2p detekované v průběhu onemocnění celkové přežívání pacientů s CLL neovlivňuje. K těmto dalším změnám v karyotypu dochází v rámci klonálního vývoje většinou vlivem předchozí léčby a může se vyskytovat až během několika let od stanovení diagnózy.



Tab. 10 – Přehled výsledků ISCN vyšetření metodou aCGH

P/Č	Datum vyšetření	Materiál	Věk při dg	Binet	ISCN zápis
1/M†	07.08.2013	KD	64	C	arr[GRCh37] 13q14.2q14.3(48941714_51637034)x1,8q22.2q24.3(100829780_146294098)x3*
2/M†	29.02.2012	PK	34	C	arr[GRCh37] 2p25.3p21(17019_44533462)x3,2p16.3p15(48086274_63985228)x3,8q11.21q11.23(51210232_54306826)x2 hmz,11q14.1q25(79992712_134934196)x1,13q14.11q14.3(41264453_54490011)x1
3/M	10.01.2018	PK	44	B	arr[GRCh37] 2p25.3p14(17019_67294799)x3,3p26.3p25.3(62199_11712047)x1,3q21.2q29(124267110_197837049)x3,(12)x3,15q26.1q26.3(93143013_102399819)x1
4/M	28.11.2018	KD	44	B	arr[GRCh37] 2p25.3p11.1(17019_92072301)x3
5/F†	17.02.2015	PK	65	A	arr[GRCh37] 2p25.3p14(44504_68524945)x3,10q26.2q26.3(129913184_135434178)x1,11q22.1q23.3(99121796_116973483)x1,15q11.1q11.2(20481702_22558756)x3
6/M	15.03.2017	PK	61	B	arr[GRCh37] 1p33p32.3(48482986_53589419)x2 hmz,?2p12p11.2(76510135_83844907)x3,6p25.3p25.1(439231_4269759)x3,11q14.1q24.2(84477029_127297143)x1,13q14.2q14.3(50781612_51462302)x1
7/M†	14.08.2002	PK	45	C	arr[GRCh37] 1p36.33p34.3(846680_39806604)x1,1p34.3p33(39826419_47090908)x4,1p21.2p21.1(100892469_105737173)x2 hmz,1q21.1q23.1(142727196_157652563)x3,1q23.1q44(157670441_249212668)x1,2p25.3p14(17019_66995748)x3,2q12.2q13(106719606_113754754)x2 hmz,6q16.1q27(96061693_170911240)x1,7q31.32q31.33(122355640_125364853)x2 hmz,10p15.3p11.1(102539_38789665)x1,10q11.21q22.3(42864605_81249841)x1,10q24.32q26.2(103424874_128613207)x1,10q26.3(130842118_135110353)x1,11q13.5q23.3(75562624_116644398)x1,13q13.3q21.1(38627949_57793413)x1,13q21.1q34(59567078_115092648)x3,15q11.1q22.31(20055137_65298512)x1,16p13.3p13.2(96766_9051815)x1,16p13.2p13.13(9141438_10777887)x4,16p13.13(10813122_11820119)x8,16p13.13p12.2(12117673_21574967)x3,17p13.3p11.2(44684_22183006)x1,17q11.1q21.31(25300199_42960557)x1,17q25.1q25.3(71374894_80270154)x3,17q25.3(80294080_81036106)x1,20p12.1(14629123_15219086)x1
8/M	06.02.2008	PK	61	C	arr[GRCh37] 2p25.3p11.2(17019_884328643)x3,11q14.1q23.3(83038154_121585073)x1

P/Č	Datum vyšetření	Materiál	Věk při dg	Binet	ISCN zápis
9/M†	26.08.2008	PK	70	C	arr[GRCh37] 2p25.3p12(235263_77340292)x3,11q14.1q23.2(78965050_115751183)x1,13q13.1(32231813_33944539)x1
10/M†	09.08.2010	PK	57	C	arr[GRCh37] 2p25.3p12(17019_79180898)x3,8p23.3p11.1(191530_43541986)x1,8q11.1q13.2(47229005_68343898)x1,8q13.2(68832961_70498318)x1~2,8q13.3(71238938_73440693)x1~2,8q13.3q24.3(73635634_146121090)x3,9p24.1p21.1(8352705_30767166)x1,11q22.3q24.3(102936356_127970238)x1,14q11.2q22.3(24328784_56729135)x1,15q26.2q26.3(95368273_99010585)x3,18p11.32p11.21(148963_15072794)x1,(Y)x0
11/M	29.06.2011	PK	60	C	arr[GRCh37] 4p16.3p15.1(41400_35117991)x1,11q21q24.2(95086389_125625763)x1,15q14q22.31(31652957_62007310)x1,17p13.3p11.2(66136_18177382)x1,17q21.31q23.1(41610162_55575105)x3,20p13q12.2(1670013_11145496)x1,20p12.2p12.1(11841700_12243624)x3,20p12.1(14747128_17504577)x1,20p11.23p11.22(19335135_21715861)x3
12/M†	12.04.2005	PK	50	A	arr[GRCh37] 2p25.3p11.1(17019_92262019)x3,3p26.3p21.31(117735_49926729)x1,3p14.1p12.3(68927704_75279055)x1,3p12.2p12.1(81523854_85098226)x1,3p12.1p11.1(85896326_90400870)x3,8p23.3p23.1(191530_8221982)x1,8p23.1p22(12404003_17984875)x1,8p12p11.21(29000703_40886605)x1,8q11.1q11.21(46924418_50207451)x1,10q24.2q25.2(99895278_112105252)x1,13q13.3(36698309_38460730)x1,13q14.2q21.32(49122864_66982944)x1,17p13.3p11.2(84287_22003066)x1,18p11.32p11.21(184254_14103971)x1,?19p12(20216230_24376837)x3,?19q13.42q13.43(56167796_59063507)x1
13/M†	13.12.2011	PK	58	B	arr[GRCh37] 2p25.3p15(17019_61866471)x3,2q32.3q33.1(193286938_200763224)x2 hmz,4p16.3p15.1(72447_32548772)x1,5p14.3(18866362_23226235)x2 hmz,5q31.1q35.3(134365423_180691052)x3,8q11.21q11.23(50204476_54910006)x2 hmz,10q21.1q21.2(58391568_61785973)x2 hmz,11q14.3q23.3(89308592_116149746)x1

P/Č	Datum vyšetření	Materiál	Věk při dg	Binet	ISCN zápis
14/M†	25.03.2003	PK	61	A	arr[GRCh37] Xp22.33(60701_2685674)x0,Xq21.31(88512785_90085154)x0,(Y)x0,2p25.3p21(30341_47715127)x1,2p16.1p14(60932053_64790014)x3,2p14p13.3(66842948_69936266)x1,2p12(76891511_78537044)x1,2q11.1q13(95529039_113291495)x1,2q13q14.2(113331042_120099217)x3,2q14.2(120123060_120405084)x1,2q21.3(135837264_136147960)x1,6p22.3p21.1(15250020_43069406)x1,8q21.11q24.3(76258615_146280020)x3,13q14.13q14.3(45966109_52064658)x1,17p13.3p11.2(24457_18899368)x1,17p11.2(19143173_20675339)x3,17p11.2p11.1(21336799_22225638)x1
15/M†	22.05.2008	PK	55	C	arr [GRCh37] 11q14.2q22.3(87531917_109017352)x1,13q14.2(49794639_50377937)x1
16/F	19.01.2017	PK	60	A	arr[GRCh37] 2p25.3p11(17019_89075755)x3,13q14.2q14.3(49829567_51764796)x1
17/M†	24.08.2006	UZL	50	B	arr[GRCh37] 2p25.3p14(17019_67073554)x3,5p15.3p14.1(2517569_26504031)x3,17p13.3p12(950505_15591491)x1,18p11.32p11.21(967553_15008646)x1,21q21.31q22.3(29332807_46269181)x3
18/M	27.11.2018	PK	67	?	arr[GRCh37] 2p25.3p13.3(17019_70488472)x3,8q11.21q24.3(48217908_146152184)x2 hmz,(13)x2 hmz
19/F†	22.04.2013	PK	66	?	arr[GRCh37]Xp22.33p11.3(60701_44036619)x3,2p25.3p14(17019_68100221)x3,8p23.3q11.22(61774_52320614)x1,8q12.1q13.2(60733056_69978446)x1,11p15.5p15.5(196966_1996800)x1,11p15.4p15.4(3645310_5574014)x1,11p14.3p12(24616945_39271543)x1,11q14.1q25(82413892_134934196)x1,13q11q12.12(19024748_25301612)x1,13q13.2q34(34263793_115092648)x1,17p13.3p13.2(1693_5935643)x1
20/M	14.06.2016	PK	68	B	arr[GRCh37] 2p16.3p16.2(50792617_53685611)x3,?2p12p11.2(76316196_83844907)x3,11q14.1q21(77386791_92950877)x1,11q22.2q23.3(102147226_116093284)x1,12q21.2q21.31(78964958_83019188)x2 hmz,13q14.13q21.32(47091739_68059049)x1
21/F	08.11.2018	PK	68	B	arr[GRCh37] 2p25.3p14(17019_65574538)x3,11q13.5q23.3(75870291_117965282)x1,17q25.1q25.3(74404855_75413830)x1

P/Č	Datum vyšetření	Materiál	Věk při dg	Binet	ISCN zápis
22/M	14.08.2017	PK	69	A	arr[GRCh37] Xp21.1(32543710_36600814)x2,?Xq26.3q27.3(136470785_146161159)x2,Yp11.32p11.31(269304_2606392)x1, Yp11.31p11.2(2620866_9937194x0),Yq11.21q11.221(13872502_15516454)x0,Yq11.222q11.223(21736567_24504676)x0, 1p36.32p36.31(2397056_5887122)x2~3,1p36.22p36.21(10869096_14991917)x3,1p36.21p36.13(15711763_16348419)x1~2, 1p36.13(17657965_19377308)x2~3,1p36.11(24255402_25657021)x1,1p33p31.3(47886257_62939646)x1, 1p21.3(95516702_96469036)x3,1p13.3p11.2(110058774_120613221)x1,1q31.3q32.1(198601789_201139346)x1, 1q41q42.12(220287406_226642553)x1,1q43(237776070_241438210)x2~3,2p16.3p16.2(49349082_53772378)x2~3, 2p16.3p16.1(49830871_55592318)x2 hmz,2p12p11.2(76316196_83911001)x2~3,2q14.3(122833040_127029805)x2~3, 3p26.3p21.31(1383619_44948539)x3,3p12.3p11.1(76328516_90458199)x3,3q11.1q13.12(93538467_107066628)x3, 3q13.2q22.3(111794100_136279149)x1,3q22.3q29(137103830_197861598)x3,?4q31.3(151422307_154848718)x1~2, ?4q32.1q32.2(161684293_163406399)x2~3,6p22.1(27520054_30368663)x2 hmz,6q14.1(77442663_78825652)x2~3, 6q22.31(120668819_125596650)x2~3,6q25.3q26(160961348_163554531)x2~3,6q27(165385171_170921089)x1, 7p21.1(16897091_19155193)x1,7p12.1p11.2(51468537_54611992)x2~3,7q31.2q32.1(115675240_127667650)x1, ?7q35q36.1(144763211_147949754)x2~3,8q23.3(114770781_117351973)x2 hmz,8q24.21(128778021_129599640)x1~2, 9q22.31q22.32(95768096_96866234)x1,10p12.31p11.1(19754774_39078788)x1,10q11.21q26.3(42864605_135338350)x1, 11p12(37836926_42382549)x2~3,11q23.1q23.3(111954967_114912686)x2~3,11q24.3(128076421_128962578)x1, 11q24.3q25(130535374_134904063)x2~3,12q24.32q24.33(126697503_130922651)x2~3, 13q11q31.1(19296544_81342834)x1,13q31.1q31.2(86589386_89898555)x1~2,13q33.3q34(108390715_115092648)x1, ?14q12(25684802_29237714)x2~3,?15q11.2q13.1(23689774_29683707)x2~3,16q21(59654949_66098014)x2~3, 16q21q22.2(66673018_72175342)x1,17p13.3p11.1(69852_22225638)x1,?17q11.1q11.2(25403446_25854990)x1, 17q11.2(27716871_29687375)x1~2,21q21.1q21.2(17669713_24683724)x2~3,21q21.3(30066563_30660728)x1~2, 21q22.11q22.3(35263761_48077982)x1,?22q11.21q11.22(21561470_23328175)x1~2, ?22q13.31q13.33(47909996_49531076)x2~3,?Xp21.1(32543710_36600814)x2,?Xq26.3q27.3(136470785_146161159)x2, Yp11.32p11.31(269304_2606392)x1,Yp11.31p11.2(2620866_9937194x0),Yq11.21q11.221(13872502_15516454)x0, Yq11.222q11.223(21736567_24504676)x0
23/M	20.09.2007	PK	58	B	arr[GRCh37] 2p25.3p11.2(61060_90133447)x3,11q14.1q23.3(83344386_118714084)x1,13q14.2(50368875_50546925)x1, 17q22q23.2(50511537_60118579)x3,17q25.1q25.3(72366509_80215871)x3

P/Č	Datum vyšetření	Materiál	Věk při dg	Binet	ISCN zápis
24M/†	28.11.2014	UZL	61	B	arr[GRCh37] 1q21.3q44(152453240_249166593)x2 hmz,2p21(43142825_44637779)x3,2p21(44664433_45685787)x1,2p21p16.3(45739484_50823100)x3,2p16.1p14(57692648_66033455)x3,2p13.1p12(74099992_75729253)x1,2p12(78970764_79706557)x1,2q14.2q14.3(121334064_126722063)x1,2q32.1q33.1(187922705_200676541)x3,2q32.3q33.1(193127346_199052600)x2 hmz,2q33.3q35(207210462_216748567)x3,2q37.1q37.3(234832485_239093573)x3,8q22.2q22.3(100990011_101970085)x3,11q13.1(64775062_65727456)x3,17p13.3p11.2(48539_22183006)x1,17q11.1q25.3(25343175_81044553)x3,17q11.1q12(25468600_32739642)x2 hmz,17q22q24.2(57455620_64387069)x2 hmz
25/M	08.07.2016	PK	56	C	arr[GRCh37] 13q14.2q14.3(47374693_52138508)x1,20p13p12.3(4709272_5224997)x1,20p12.3(7103757_7508659)x1
26/M†	02.03.2007	PK	52	B	arr [GRCh37] 2p25p11.2(17019_34777748)x3,6q16.3q25.3(102886426_158513393)x1,8q22.3q24.3(102720865_98080970)x3
27/M†	15.12.2016	PK	64	B	arr[GRCh37] 2p21p16.3(44518307_48733620)x3,2p16.1(56345448_56502361)x1,2p16.1(57398346_57906726)x1,2p16.1p15(58803074_62137798)x3,2p12(77312793_77968695)x1,3q25.1(150308796_150670902)x1,3q25.1(150699987_151560019)x3,3q25.1q25.2(151598781_152160975)x1,3q25.2q28(152203378_190896823)x3,3q28(190930274_192292314)x1,5q23.3q31.1(130143669_132219037)x1,(7)x3,8p23.1p21.3(6502461_23283299)x1,8p23.1(7239491_8079920)x0,9p24.3p13.2(207454_37125911)x2 hmz,9p22.3(14429257_14949084)x0,9p21.3(21920518_22707857)x0,9p21.3(22733912_25067482)x1,9p21.3(24262251_24313081)x0,9p12p11.2(43469486_43841603)x1,?10q11.22(46949255_48124262)x1,13q14.2q14.3(50500134_51523074)x1,?17q12q21.2(32783987_39596611)x2 hmz,(18)x3,20q11.23q13.31(35318605_55988288)x1,22q11.21(18706001_21505417)x3
28/F	02.03.2018	PK	64	B	arr[GRCh37] 2p25.3p11.1(17019_92072301)x3,11q14.1q23.3(79324026_118940294)x1

P/Č	Datum vyšetření	Materiál	Věk při dg	Binet	ISCN zápis
29/F†	20.06.2012	PK	48	C	arr[GRCh37] Xq25q26.3(127944087_135002573)x2 hmz,1q31.1q31.3(190073382_193883256)x2 hmz, 2p16.1p15(58288588_62563218)x4~5,3q26.31q26.32(173810957_176937896)x2 hmz,5q35.3(177630094_179019853)x1, 9p21.3(21200740_22733971)x0~1,9p21.3p21.2(22756866_26743237)x1,9q21.11q21.12(71046033_72561425)x1, 9q21.13(74030565_75252288)x1,9q21.13(75679946_75987507)x1,9q21.13(76698529_77396698)x1, 9q21.33(87019109_88989739)x1,9q22.1q22.31(91143188_94125339)x1,9q22.31(95590065_96481219)x1, 9q22.33q31.1(99711576_106212127)x1,9q31.2q31.3(110078757_111518899)x1,9q31.3(114543420_114828492)x1, 9q32(115899868_116536428)x1,9q33.2(123374564_123835439)x1,9q33.2q33.3(124897767_127480985)x1, 9q34.3(139665148_140309179)x1,13q14.11(42949750_43008771)x1,13q14.11(43455232_43987235)x1, 13q14.11q14.1(44311991_46197695)x1,13q14.1q21.32(46566052_68359448)x1,13q21.33(70126170_70286551)x1, 13q21.33q22.2(70639188_75849409)x1,13q22.2(76169404_76927740)x1,13q22.3(77244646_78641831)x1
30/M†	05.09.2007	KD	41	B	arr[GRCh37] 2p25.3p14(17019_109900976)x3,11q22.2q25(101871767_134331081)x1
31/M	12.07.2018	PK	92	B	arr[GRCh37] 2p25.3p14(20777_66898803)x3
32/M	02.11.2017	PK	61	B	arr[GRCh37] 21q21.2q22.3(25036672_48090317)x3
33/M	09.12.2014	PK	57	A	arr[GRCh37]2p25.p12(10702_83248070)x3,8q13.3q24.3(72972750_146293435)x3,11p15.1p14.3(17782804_23983072)x1, 11q22.3q23.3(107391362_116629101)x1,11q23.3q23.3(116672303_120308128)x3,11q25q25(133305633_134934196)x1, 12p13.32p13.31(4260747_7853479)x2 hmz,13q14.11q14.11(42218165_42660542)x1,13q14.2q14.3(49581965_51672767)x1, 18p11.31p11.23(4390986_7112200)x1,18q22.3q23(70130064_78010032)x1
34/M	14.11.2012	PK	62	B	arr[GRCh37]2p25.3p11.1(17019_922632019)x3,13q14.13q14.3(47091739_51229962)x1,20p13p11.1(607407_26312663)x1, 18q12.1q12.3(24807314_41068920)x3
35/M	13.01.2016	PK	60	B	arr[GRCh37] 2p25.3p25.2(44504_6354309)x3,2p12p11.2(76510135_83911001)x3,13q14.2q14.3(48886744_51541846)x1, 13q22.3q31.1(77402506_80608912)x2 hmz
36/M†	05.08.2008	PK	63	C	arr[GRCh37] 3p26.3p25.3(62199_10742366)x1,3q25.31q29(155406126_197861598)x3,8p23.3p12(119720_33791636)x1, 8q22.1q24.3(94543197_146128791)x3,11p13p12(35643941_40558241)x2 hmz,12q15q21.2(71054305_77544170)x2 hmz, 13q14.2q14.3(50516570_51764796)x1,17p12(12495048_13549498)x3

P/Č	Datum vyšetření	Materiál	Věk při dg	Binet	ISCN zápis
37/M	03.09.2018	PK	68	A	arr[GRCh37] 2p25.3p13.2(17019_72236601)x3,6p24.3p22.1(9062312_27713299)x2 hmz, 11q14.3q25(91319752_134934196)x1
38/M	15.03.2017	PK	42	B	arr[GRCh37] 13q14.13q14.3(46908948_51581347)x1
39/M†	11.10.2017	PK	54	B	arr[GRCh37] 2p25.3p11.1(17019_92072301)x3,6p25.3p24.3(132043_8040808)x3,11q22.3q23.3(106560095_117646858)x1, 18p11.32p11.21(64847_14158122)x1
40/M†	15.09.2017	PK	61	C	arr[GRCh37] 1p36.11p35.3(26342222_29262561)x1,1q21.1q21.3(145601454_152894510)x3,1q24.3q25.2(172759624_177852133)x3, 1q31.3q44(196854206_249176203)x1,2p25.3p21(23938_45171162)x3,2p12(76316196_83090093)x3, 6q22.31(122284521_125596650)x3,10q26.2q26.3(127728185_132748502)x3,12q13.12q13.13(50061704_52440336)x1, 14q21.2q21.3(45941038_48593068)x3,16p13.3(5435829_6796905)x3,16q12.2(53779703_55544163)x3, 17p13.2p13.1(4633908_7578257)x1,17q11.2(27245882_29667527)x1,17q25.1(72976958_73713052)x1
41/M†	12.04.2017	PK	86	A	arr[GRCh37] 2p25.3p11.2(17019_85035961)x3,2p22.3(33703730_35956680)x4,5q33.1q35.3(151697176_180696806)x3, ?6q14.1q27(82549233_167705549)x1,7p22.3p12.3(54185_46889809)x3,8p23.3p11.1(428130_43394163)x1, 8q11.1q13.2(47456485_70006435)x1,11q14.3q23.3(90337751_117844666)x1,12q24.33(131310205_133773528)x1, 13q14.11q34(42604898_115092648)x1,17p13.2p11.2(5849357_16260198)x2 hmz,?17q21.33q22(50067819_51146049)x3, 17q22q25.3(56739829_81044553)x3
42/F	08.03.2017	PK	38	A	arr[GRCh37] 8q21.11q21.13(77994123_82274071)x2 hmz,13q14.2q14.3(50572617_51501609)x1,20q11.21q13.33(31376282_60901986)x2 hmz
43/F†	26.01.2011	PK	66	C	arr[GRCh37] (X)x1,9q21.13q34.2(74235750_136431359)x1,11q13.5q23.3(75547969_120395006)x1, 13q12.13q21.31(25739332_61860451)x0
44/M	03.02.2015	PK	59	A	arr[GRCh37] 2p25.3p11.1(17019_92072301)x3
45/M†	09.04.2014	PK	70	C	arr[GRCh37] 2p25.3p11.2(17019_89109964)x3,10q21.1(55970290_58826684)x2 hmz,11q14.1q23.3(78364494_116304026)x1, 13q14.2q14.3(50516570_51711408)x1
46/F	02.11.2018	PK	65	B	arr[GRCh37] 2p25.3p11.2(17019_89160192)x3,3p23p22.3(31644716_32365048)x1~2,13q14.2q14.3(50500134_51841299)x1~2

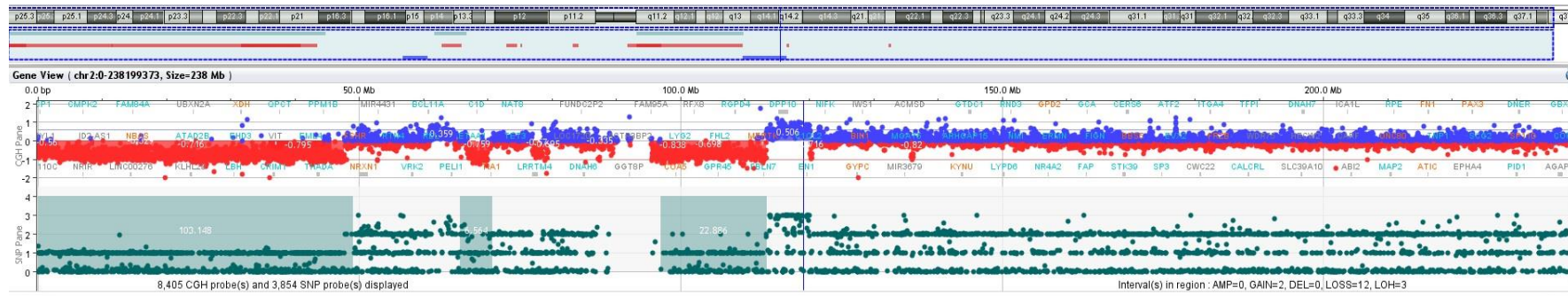
P/Č	Datum vyšetření	Materiál	Věk při dg	Binet	ISCN zápis
47/M	21.02.2018	PK	51	C	arr[GRCh37] 2p25.3p11.2(17019_89160192)x3,8q21.11q24.3(76372418_141070902)x3,11q13.5q24.2(77014699_124810014)x1, 13q14.11q14.3(41184150_53215470)x1,13q14.2q14.3(50544724_51501609)x0, 13q12.3q13.1(29049784_32893791)x2 hmz,13q13.1q13.3(33277086_36154966)x2 hmz, 13q13.3(36783312_39948767)x2 hmz,13q21.31q21.33(64191061_69644972)x2 hmz, 13q21.33q31.1(70007016_80399492)x2 hmz,13q31.1q31.2(81434585_89241406)x2 hmz, 13q31.2q31.3(89362784_94284016)x2hmz,13q33.2q34(105928571_113581291)x2 hmz
48/M <sup>†</sup>	22.12.2008	PK	60	A	arr[GRCh37] 6q21(107598545_108219131)x1,8q21.2q24.3(64738426_63741905)x3,11q11q13.1(47574004_64485122)x1, 11q22.3q25(46798326_133016325)x1,13q12.11q12.12(20360697_23584048)x1,13q14.2q14.3(48425685_51940068)x1
49/M <sup>†</sup>	23.08.2008	PK	57	C	arr[GRCh37] (1-22)x2,(X,Y)x1*
50/M	31.05.2017	PK	65	A	arr[GRCh37] (1-22)x2,(X,Y)x1
51/M <sup>†</sup>	15.06.2011	UZL	59	C	arr[GRCh37] (1-22)x2,(X,Y)x1*
52/M	28.11.2018	PK	74	A	arr[GRCh37] (1-22)x2,(X,Y)x1
53/F	21.10.2016	PK	65	A	arr[GRCh37] (1-22,X)x2

Legenda: **P/Č** – pohlaví a číslo pacienta, **M** – male (muž), **F** – female (žena), <sup>†</sup> – zesnulý(á), **PK** – periferní krev, **KD** – kostní dřeň, **UZL** – uzlina

\*metoda aCGH byla z důvodu nedostatku materiálu provedena z jiného biologického materiálu, než byla provedena metoda FISH

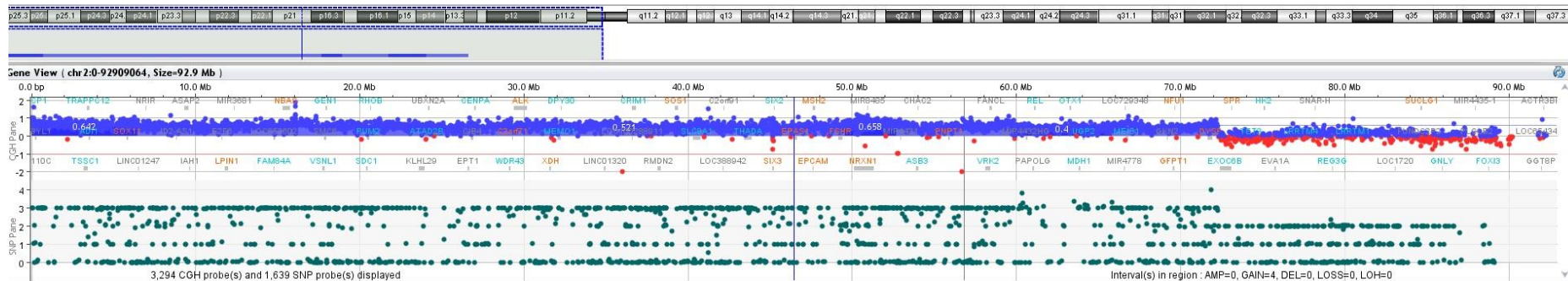


#### 4.1.1.1 Příklady grafického zobrazení zmožení 2p



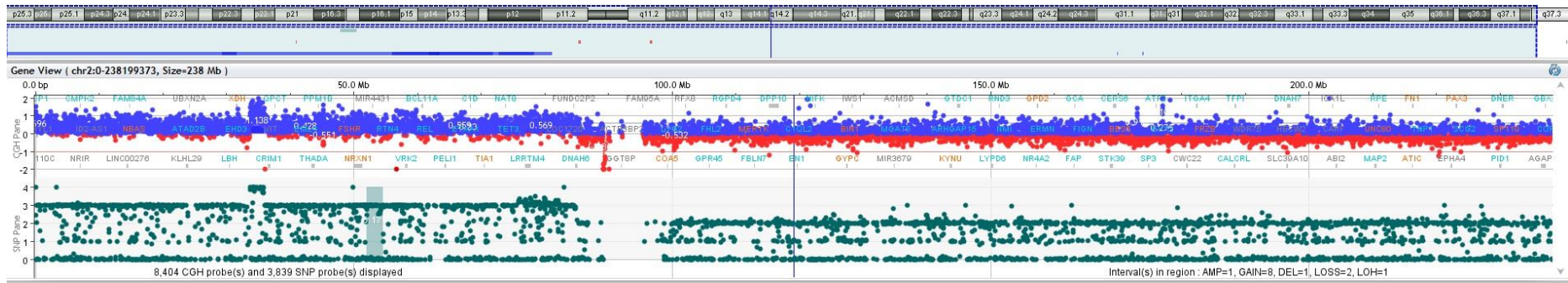
Obr. 17 – Znázornění zmoženého úseku a ztráta genetické informace na chromosomu 2 u pacienta 14/M†

Přítomná je rozsáhlá ztráta části 2p25.3-p21, zasahující úsek o velikosti 47684.787 kb, tj. 47684787 bp. Kandidátními geny v této oblasti jsou např. *MYCN*, *ALK*. V rámci této změny se jedná o chromotripsi – rozsáhlou přestavbu chromosomu 2. Zmnožení v úseku 2p16.1-p14 zasahuje gen *REL*. Snímek je pořízen z programu CytoGenomics.



Obr. 18 – Znázornění zmoženého úseku na chromosomu 2p u pacienta 37/M

Je zmožen úsek 2p25.3 – p13.2 o velikosti 72219.583 kb tj. 72219583 bp a zasahuje kandidátní geny *MYCN*, *ALK*, *REL*, *BCL11A*, *ACPI*, *MSH2*, *XPO1* a další. Snímek je pořízen z programu CytoGenomics.



Obr. 19 – Znáznornění zmnoženého úseku na chromosomu 2p u pacienta 41/M†

Zmnožen je úsek 2p25.3 – p11.2 o velikosti 85018.943 kb, tj. 85018943 bp a zasahuje kandidátní geny *MYCN*, *ALK*, *REL*, *BCL11A*, *ACPI*, *MSH2*, *XPO1* a další. Snímek je pořízen z programu CytoGenomics

Tab. 11 – Přehled výsledků vyšetření metodou FISH u pacientů se zmnožením 2p (hodnoty uvedeny v %)

P/Č	Věk při dg	ATM	TP53	13q14	12	IgH	6q21	8q24	2p+	IGHV status	Závěrečný karyotyp
1/M†	64	N	N	68/22*	N	N	N	55	55	mu (VH3-21)	46,XY,der(Y)t(Y;8)(q?12;q?23)[5]/ 46,XY,dic(2;18)(q12?;p?18),+2[5]
2/M†	34	82	N	83	ND	ND	ND	ND	81	unm	46,XY,der(11)t(2;11)(p?15;14),del(13)(q14.11q14.3)[6]/46,XX[4]
3/M	44	N	N	N	80	PD 90	N	N	83	unm	47,XY,+12[2]/ 47,XY,der(3)dup(3)(q21.2q29)t(3;3)(q21.2;p25.3)del(3)(p26.3p25.3),+12, der(15)t(2;15)(p14;q26.1)[52]/ 46,XY[2]
4/M	44	N	N	N	N	N	N	N	35 (trp)	unm	47,XY,i(2)(p10),+2,der(22)t(15;9;22)(q?15;q?11;p?11)[15]/ 47,XY,i(2)(p10),+2,der(22)t(13;15;9;22)(q?21;q?15;q?11;p?11)[2]/ 46,XY[17]
5/F†	65	92	N	N	N	PD 80	N	N	ND	unm	46,XX,der(1)t(2;10;9;1)(p?13;q?25;p?23;q?42),del(11)(q?14)[12]
6/M	61	66	N	42	N	PD 79	N	N	ND	unm	46,XY[14]
7/M†	45	96	94	97	N	N	ND	ND	ND	nd	Uns
8/M	61	88	N	81/7*	N	N	N	ND	54	unm	47,XY,+i(2)(p10),del(11)(q14.1q23.3),del(13)(q?14)[49] 46,XY,trp(2)(pterp10),del(11)(q14.1q23.3),del(13)(q?14)[ 5]/ 47,XY,+der(2)del(2)(q10?qter)t(2;?)(q11;?),del(11)(q14.1q23.3),del(13)(q?14)[4]
9/M†	70	94	N	91	N	PD 93	N	N	88	unm	Uns
10/M†	57	81	N	N	N	N	N	50	84	unm	45,X,-Y,i(8)(q10),der(18)t(2;18)(p?11;p11)[6]/ 46,XY,i(8)(q10),der(18)t(2;18)(p?11;p11)[2]/ 46,XX[2]
11/M	60	46	46	N	N	N	N	N	ND	unm	44,XY,der(4)t(15;10;9;4)(q22.32;q?11;p?14)del(4)(p16.3p15.1),-8, del(11)(q21q24.2),-15,del(17)(p13.3p11.2),t(17;20)(q21.31q23.1;?p) del(20)(p13p12.2)del(20)(p12.1),dup(20)(p12.2p12.1)dup(20)(p11.23p11.22), der(21)t(8;21)(?;?p)[5] 44,XY,der(4)t(15;10;9;4)(q22.32;q?11;p?14)del(4)(p16.3p15.1),-8, del(11)(q21q24.2),-15,del(17)(p13.3p11.2),t(17;20)(q21.31q23.1;?p) del(20)(p13p12.2)del(20)(p12.1),dup(20)(p12.2p12.1)dup(20)(p11.23p11.22)[4] 46,XY[3]

P/Č	Věk při dg	ATM	TP53	13q14	12	IgH	6q21	8q24	2p+	IGHV status	Závěrečný karyotyp
12/M†	50	N	93	93	N	ND	ND	ND	95 (trp)	unm	44,XY,+i(2)(p10),der(3)t(3;8)(?p;q?23),-8,del(13)(q14),?dic(13;17)(p11;p11) del(13)(q14),?dic(18;19)(?p11;q)[18]/ 46,XY[2]
13/M†	58	98	ND	ND	ND	ND	ND	ND	44	mu (VH3-21)	46,XY,der(22)t(2;22)(p?p?)[3] 46,XY,der(20)t(2;20)(p?:?)[4]/ 46,XY,der(8)t(2;8)(p?p?)[1]/ 45,XY,t(2;13)(p?q?),?dic(4;22)(?p;p?13),t(6;22)(q?q?)[1]/ 45,XY,der(13)t(2;13)(p?q?),-21,der(22)t(2;22)(p?p?)[1]/ 46,XY,der(4)t(2;4)(p?q),der(11)t(2;11)(p?:?), der(18)t(5;13;18)(?;q?;p)ins(18;5)(?;q)[1]/ 45,XY,?dic(4;22)(q39;q13)[2] 46,XY[5]
14/M†	61	N	92	91	N	ND	ND	90	90	nd	Uns
15/M†	55	85	N	63/35*	N	N	N	ND	83	hr	46,XY,del(11)(q14.2q22.3)[2]/ 46,XY,dic(2;18)(p24;p?11)dup(2)(p24),i(8)(q10),del(11)(q14.2q22.3), del(13)(q14.2)[6]/ 46,XY,dic(2;18)(p24;p?11)dup(2)(p24),i(8)(q10), del(11)(q14.2q22.3),del(13)(q14.2),del(13)(q14.2)[3]
16/F	60	N	N	90	N	PD 89	4	N	21	unm	46,XX,dic(2;18)(p?10;q?10),del(13)(q14.2q14.3)[4]/ 46,XX[14]
17/M†	50	ND	77	ND	ND	ND	ND	ND	75	unm	46,XY,der(1)dup(2)(p25.3p14)t(1;2)(q?p25.3),i(5)(p?10),der(17)t(5;17)(q?23;p?), der(18)t(18;21)(p?q?)[8]/ 46,XY[4]
18/M	67	N	N	N	N	N	N	N	72	unm	Uns
19/F†	66	81	N	77	N	N	N	N	70	unm	44,XX,-8,del(11)(q14.1q25),-13,der(13)dup(2)(25.3p14)t(2;13)(p?14;p?12), der(17)dup(X)(p22.33p11.3)t(X;17)(p?22;p?13)del(17)(p13.3p13.2), der(18)t(8;18)(q?13;p?11)[28]/ 46,XX[2]
20/M	68	72	N	77	N	N	N	N	70	mu (VH3-21)	46,XY,dic(2;18)(q?10;p?10),+2,der(11)del(11)(q14.1q21)del(11)(q22.2q23.3), del(13)(q14.13q21.32)[20]/ 46,XY[10]
21/F	68	98	N	N	N	PD 97	N	11	ANO	unm	46,XX,del(11)(q13.5q23.3),der(20)dup(2)(p25.3p14)t(2;20)(p14;q?33)[26]/ 46,XX[3]

P/Č	Věk při dg	ATM	TP53	13q14	12	IgH	6q21	8q24	2p+	IGHV status	Závěrečný karyotyp
22/M	69	N	27	32	N	PD 17	N	N	ND	mu	46,XY[29]
23/M†	58	78	N	80	N	PD 50	N	ND	72	unm	Uns
24/M†	61	N	50	N	N	PD 50	N	N	50	mu	45,XY,dic(2;10)(p?23;q?26),t(7;8)(q?31;q?21),i(17)(q10)[3]/ 46,XY[11]
25/M	56	N	N	99	N	PD 99	N	N	90	unm	46,XY,+2,dic(2;18)(q?11;p?11),t(2;13)(q?33;q?14)[12]/ 46,XY,der(20)t(13;20)(q?14;p?11)[6]/ 46,XY,t(2;13)(q?33;q?14)[3]
26/M†	52	N	N	N	N	N	67	ND	72	nd	46,XY,del(6)(q16.3q25.3),dic(2;14)(q11;p11), der(17)dup(8)(q22.3q24.3)t(8;17)(q?23;p?12)[10]/ 46,XY[2]
27/M†	64	N	N	76	N	69	N	N	35	unm	48,XY,+7,ins(9;3)(p?21;q?25q?28),ins(9;3)(p?21;q?25q?28),t(11;14)(q13;q32), +18[9]/ 49,XY,+7,ins(9;3)(p?21;q?25q?28),ins(9;3)(p?21;q?25q?28),t(11;14)(q13;q32),+13, +18[2]/ 46,XY,t(1;21;11;2)(p?21;q?22;q?13;p?12),ins(9;3)(p?21;q?25q?28), ins(9;3)(p?21;q?25q?28),t(11;14)(q13;q32)[4]/ 46,XY[5]
28/F	64	91	N	23	N	PD 94	N	N	78	unm	46,XX,dup(2)(p11.1p25.3),del(11)(q14.1q23.3)[9]/46,XX[1]
29/F†	48	N	N	39	N	N	N	N	ND	unm	46,XX,der(5)t(9;5)(p?21;q?34),der(9)t(X;9)(q?25;p?21),t(9;13)(q?21;q?13), der(18)t(9;18)(?;p?11.2)[8]/ 46,XX,der(5)t(9;5)(p?21;q?34),der(9)t(X;9)(q?25;p?21)t(9;22)(?;q?12), t(9;13)(q?21;q?13),der(18)t(9;18)(?;p?11.2)[3]/ 46,XX,der(5)t(9;5)(p?21;q?34),der(9)t(X;9)(q?25;p?21),t(9;13)(q?21;q?13), der(16)t(11;16)(q?;q?),der(18)t(9;18)(?;p?11.2)[3]/ 46,XX[3]
30/M†	41	90	N	N	ND	PD 87	N	ND	89	unm	46,XY[15]
31/M	92	N	N	N	N	PD 95	N	N	44	unm	46,XY,t(3;14)(?q?25;q?24),der(12)dup(2)(p25.3p14)t(2;12)(p14;q?24)[13]/ 46,XY[2]
32/M	61	N	N	N	N	N	N	N	25	mu	46,XY,der(18)t(2;18)(q?14;q?22)[5]/46,XY[5]
33/M	57	75	N	77	N	N	N	70	72	unm	Uns
34/M	62	N	N	68	N	N	N	N	65	unm	47,XY,+2,dic(2;20)(p10;q10),del(13)(q14.13q14.3)[6]/46,XY[2]
35/M	60	13	N	47	N	PD 87	N	N	ND	unm	46,XY[30]

P/Č	Věk při dg	ATM	TP53	13q14	12	IgH	6q21	8q24	2p+	IGHV status	Závěrečný karyotyp
36/M†	63	N	N	92	N	N	N	76	18	nd	46,XY,der(8)del(8)(p11pter)t(8;3;8)(q?22;p?25;p11),del(13)(q14.2q14.3)[5]/ 46,XY,der(2)dup(2)(p?25p?12),der(8)del(8)(p11pter)t(8;3;8)(q?22;p?25;p11), del(13)(q14.2q14.3)[3]/ 46,XY[4]/
37/M	68	93	N	N	N	PD 94	N	N	85	unm	46,XY,der(11)dup(2)(p25.3p13.2)t(2;11)(p13.2;q14.3)del(11)(q14.3q25)[49]/ 46,XY[1]
38/M	42	N	N	93	N	N	N	N	10	unm	46,XY,t(13;14;15;17)(q?13;q?24;q?21;q?21)ins(14;6)(q?24;p?21)[9]/ 46,XY,der(18)t(2;18)(p?12;p?11)[3]/ 46,XY[32]
39/M†	54	54	N	N	N	PD 49	N	N	54	unm	46,XY[20]
40/M†	61	N	N	4	N	PD 65	N	N	47	unm	46,XY,der(1;8)(1pter>1p?32::8p?12>8q?13::1p?32>1q?21::8?p?32>8?p?13::1q?21> 1q?44::8q?13>8qter),der(9)t(2;3;9)(p?13;p?23;p?13),der(17)t(12;17)(q?13;p13), ?del(19)(p?11),+mar[7]/ 46,XY,der(1;8)(1pter>1p?32::8p?12>8q?13::1p?32>1q?21::8?p?32>8?p?13::1q?21> 1q?44::8q?13>8qter),der(9)t(2;3;9)(p?13;p?23;p?13),t(13;13)(p?12;q?14), der(17)t(12;17)(q?13;p13),?del(19)(p?11),+mar[5]/ 47,XY,der(1;8)(1pter>1p?32::8p?12>8q?13::1p?32>1q?21::8?p?32>8?p?13::1q?21> 1q?44::8q?13>8qter),der(9)t(2;3;9)(p?13;p?23;p?13),der(17)t(12;17)(q?13;p13), ?del(19)(p?11),+2mar[3]
41/M†	86	57	N	51/3*	N	PD 57	10	N	ND	unm	Uns
42/F	38	N	N	56	N	N	N	N	5	unm	46,XX,der(2)(p?25p?12)[1]/46,XX[29]
43/F†	66	87	8	N/93*	N	N	ND	ND	35	unm	43,X,-X,t(2;3)(?q22;p?21),der(4)t(4;13)(?q35;p11),dic(9;11)(?q11;p11)[4]/ 42,X,-X,?dic(2;3)(?q;q)t(2;3)(?q;q)t(2;8)(?p;q),der(4)t(4;13)(?q35;p11), der(8)t(3;8)(?q;q)ins(8;2)(?q;q),dic(9;11)(?q11;p11)[3]
44/M	59	N	N	76	N	PD 80	N	N	78 (trp)	unm	47,XY,i(2)(p10),+2,del(13)(q14)[30]
45/M†	70	95,7	N	95,2	N	PD 98	N	N	ND	unm	46,XY,der(9)dup(2)(25.3p11.2)t(2;9)(?;?),der(18)t(11;18)(?;?) [16]/ 46,XY,t(2;3)(?;?) [1]/ 46,XY,der(18)dup(2)(25.3p11.2)t(2;18)(?;?) [1]/ 46,XY,der(9)dup(2)(25.3p11.2)t(2;7)(?;?) [1]/ 46,XY,der(13)dup(2)(25.3p11.2)t(2;13)(?;?) [1]



P/Č	Věk při dg	ATM	TP53	13q14	12	IgH	6q21	8q24	2p+	IGHV status	Závěrečný karyotyp
46/F	65	N	N	27	N	N	N	N	ND	nd	47,XX,+i(2)(p10)[7]/ 47,XX,+i(2)(p10),t(3;13)(p22;q14)del(3)(p23p22.3)del(13)(q14.2q14.3)[13]/ 46,XX,der(15)dup(2)(p25.3p11.2)t(2;15)(p?11;q?26)[5]/ 46,XX,der(10)dup(2)(p25.3p11.2)t(2;10)(p?11;p?15)[3]/ 46,XX,der(13)dup(2)(p25.3p11.2)t(2;13)(p?11;p?11)[3]/ 46,XX,der(21)dup(2)(p25.3p11.2)t(2;21)(p?11;p?11)[3]/ 46,XX,der(22)dup(2)(p25.3p11.2)t(2;22)(p?11;p?11)[1]/ 46,XX,der(X)dup(2)(p25.3p11.2)t(X;2)(p?22;p?11)[1]/ 46,XX[4]
47/M	51	80	25	N	N	N	N	10	23	unm	46,XY,+i(2)(p10),-8,der(21)t(8;13;21)(q?13;q?13;q?21)[3]/46,XY[7]
48/M <sup>†</sup>	60	48	N	45	N	UNS	50	60	20	unm	Uns
49/M <sup>†</sup>	57	96	N	96	N	N	N	ND	94	unm	Uns
50/M	65	N	N	N	N	N	N	N	13	unm	46,XY,dic(2;20)(q?11;p?11),+2[2]/ 46,XY[12]
51/M <sup>†</sup>	59	N	92	N	N	N	N	N	90	unm	45,XY,der(2)t(2;4)(p?25;?)ins(2;13)(p?;q?),?dic(17;22)(p12;p11)t(11;17)(q?24;p?), der(13)(p24)t(2;13)(p24;q?13)[3]/ 45,XY,der(2)t(2;15)(p?25;q?),der(13)t(2;13)(p24;q?13),t(2;?)(?;?) [3]/ 46,XY[5]
52/M	74	81	N	N	N	N	N	N	10	unm	46,XY,del(11)(q?22q?25),22ps+[22]/ 46,XY,dup(2)(p?21pter),del(11)(q?22q?25),22ps+[4]/ 46,XY,del(11)(q?22q?25),der(19)t(2;19)(p?21;p?13)dup(2)(p?21pter),22ps+[2]/ 46,XY,del(11)(q?22q?25),der(20)t(2;20)(p?21;p?13)dup(2)(p?21pter),22ps+[2]/ 46,XY,der(10)t(2;10)(p?21;p?15)dup(2)(p?21pter),del(11)(q?22q?25),22ps+[1]/ 46,XY,22ps+[1]
53/F	65	N	N	N/64*	N	N	N	N	4	hr	46,XX[10]

Legenda: **P/Č** – pohlaví a číslo pacienta, **F** – female (žena), **M** – male (muž), <sup>†</sup> – zesnulý(á), **N** – normální nálezn, **ND** – not done (neprovedeno),

\* – bialeická delece 13q14, **mu** – mutované IGHV, **unm** – nemutované IGHV, **hr** – hraniční homologie, **trp** – triplikace 2p, **PD** – parciální delece 5'konce V segmentu genu IGH, **UNS** – unsuccessful (neúspěšné)

## 4.2 Výsledky FISH

### 4.2.1 Soubor pacientů

Soubor tvořilo 41 pacientů, 25 mužů (61 %) a 16 žen (39 %). Tento soubor pacientů byl vyšetřen od listopadu 2017 do prosince roku 2018. Vyšetřovaným materiálem byla ve 40 případech periferní krev (PK), v jednom případě kostní dřev (KD). Všichni pacienti byli vyšetřeni konvenční cytogenetikou (vyšetření provedeno laborantkami cytogenetické laboratoře) a metodou FISH k detekci delece 13q14, trizomie chromosomu 12, delece genů *TP53* a *ATM*, delece 6q21, duplikace 8q24, přestavby genu *IGH*. U všech pacientů byla také použita sonda k detekci zmnožení 2p.

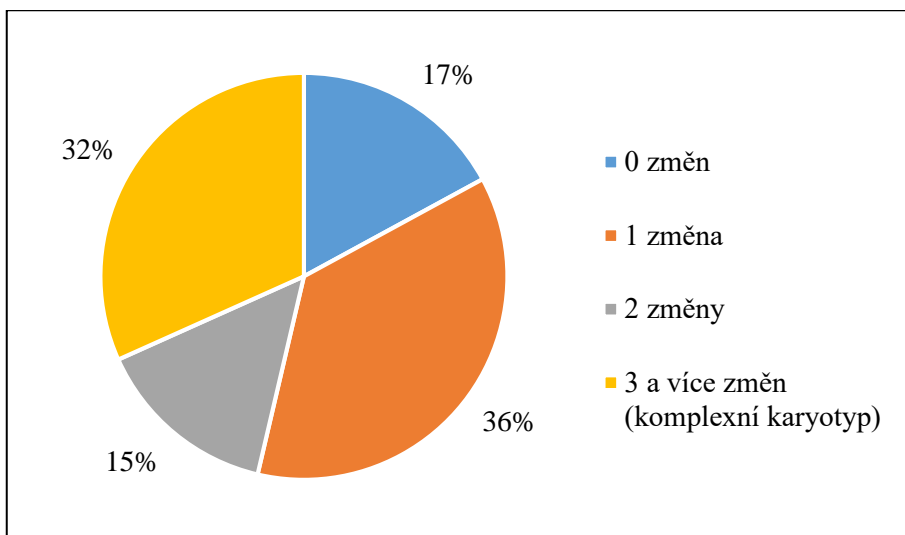
Celkem u 17 pacientů (41 %) byl pomocí konvenční cytogenetiky prokázán normální karyotyp, u 21 pacientů (51 %) byly nalezeny chromosomální změny. U tří pacientů nebyla kultivace buněk pro vyšetření úspěšná, viz Tab. 13.

U 7 pacientů (17 %) nebyla nalezena žádná chromosomální změna. U zbývajících 34 pacientů (83 %) byly prokázány chromosomální změny. Celkem 15 pacientů (37 %) mělo jednu chromosomální změnu, 6 pacientů (15 %) mělo dvě chromosomální změny a 13 pacientů (32 %) vykazovalo komplexní karyotyp (tři a více chromosomálních změn), viz Obr. 20. U pacientů se vychází z výsledků předchozích vyšetření. Aktuální výsledky zahrnují také kontrolní vyšetření pacientů po léčbě a patologické buňky jsou tak v nižším procentuálním zastoupení, popřípadě nedošlo k vydělení patologických mitos. Poměr typů aberací u pacientů s pouze jednou chromosomální změnou je znázorněn na Obr. 21. V rámci pacientů s jednou chromosomální změnou byly zaznamenány tyto tři solo aberace: delece 13q14 u 9 pacientů (60 %), delece *ATM* u 2 pacientů (13 %) a trisomie chromosomu 12 u 4 pacientů (27 %). Samostatně se nevyskytovaly delece *TP53*, 6q21, parciální delece *IGH*, duplikace 8q24 a zmnožení 2p. Základní rozdělení souboru pacientů dle pohlaví a věku je uvedeno v Tab. 12. Výsledky interfázní FISH s CLL panelem sond jsou přehledně uvedeny v Tab. 13.

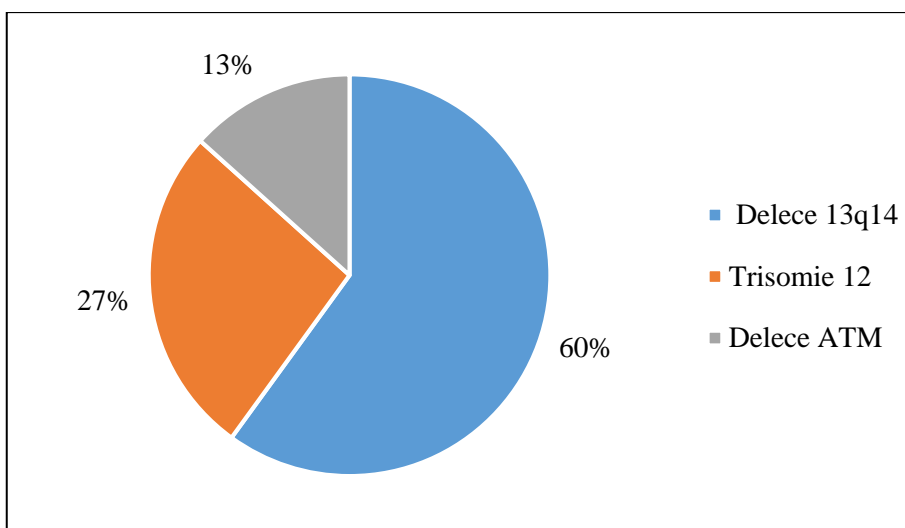
Tab. 12 – Základní rozdělení souboru pacientů dle pohlaví a věku

Počet vyšetřených pacientů	41
Muži	25
Ženy	16
Věk při diagnóze (medián)	67
Rozmezí věku při diagnóze	40 – 92
1 chromosomální změna	15
2 chromosomální změny	6
3 a více chromosomálních změn	13





Obr. 20 – Poměr zastoupení počtu chromosomálních změn u souboru pacientů vyšetřovaných metodou FISH



Obr. 21 – Typ chromosomové změny u pacientů s 1 genetickou změnou

Mutační status *IGHV* byl vyšetřen v molekulární laboratoři u 38 pacientů. Nemutovaný status *IGHV* byl objeven u 25 pacientů (66 %), u 11 pacientů byl detekován subgen *VH1-69*. Mutovaný status *IGHV* mělo 13 pacientů (34 %).

Celkově mezi nejčastěji pozorovanou změnu patřila delece v pruhu 13q14, která se vyskytla u 19 pacientů (46 %). Z nich byla monoalelická delece pozorována u 8 pacientů (42 %), monoalelická delece zároveň s delecí bialelickou byla prokázána u 11 pacientů (58 %). U 14 pacientů se spolu s delecí 13q14 vyskytovala i jiná chromosomální změna.

Druhou nejčastější aberací byla parciální delece 5' konce genu *IGH*, která se vyskytla u 14 pacientů (34 %). Tato delece zahrnuje V segment (variabilní segment) *IGH* genu a je považována za fyziologickou. Tato delece se vyskytovala ve všech případech ve vyšším procentu buněk

(od 40 – 97 % buněk). U 11 pacientů se spolu s delecí variabilního segmentu genu *IGH* vyskytovala i jiná chromosomální změna.

Sedm pacientů (17 %) mělo trisomii chromosomu 12. U čtyř pacientů se vyskytovala numerická změna chromosomu 12 samostatně, bez přítomnosti jiné aberace.

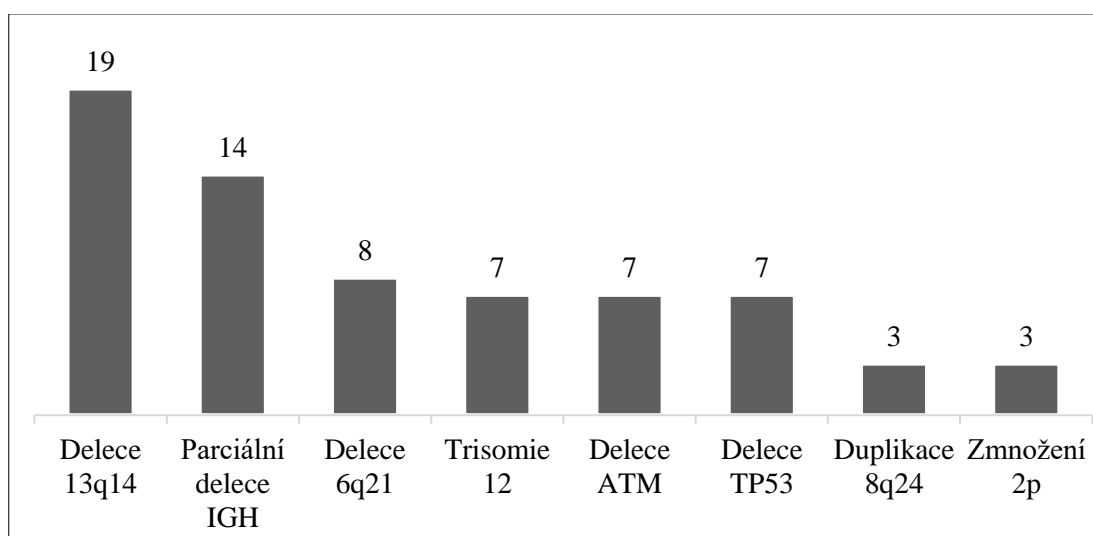
U 8 pacientů (20 %) byla detekována delece dlouhého ramene chromosomu 6. U šesti z těchto pacientů se spolu s delecí 6q21 vyskytovala i jiná chromosomální změna. U dvou pacientů (24/F, 38/M), u kterých je změna zastoupena v nejvyšším počtu (94 % a 90 %), se již žádná jiná chromosomální změna nevyskytovala.

Deletovaný gen *ATM* byl prokázán u 7 pacientů (17 %). Jiná chromosomální změna byla spolu s delecí *ATM* pozorována u čtyř pacientů.

Deletovaný gen *TP53* byl pozorován u 7 pacientů (17 %). Ve všech případech se spolu s delecí *TP53* vyskytovala i jiná chromosomální změna. U 3 pacientů (3/M, 13/F, 18/F) se vyskytuje společně s delecí *TP53* pouze jedna změna (delece oblasti 13q14 a 6q21).

Nejméně zastoupenými aberacemi v tomto souboru pacientů je duplikace 8q24 (3 pacienti, 7 %) a zmnožení 2p (3 pacienti, 7 %, z toho pacient 11/M měl navíc triplikaci v 13 % buněk). Obě tyto změny se ve všech případech vyskytovaly společně s dalšími chromosomálními změnami.

Poměr četností všech detekovaných genetických aberací v tomto souboru pacientů je znázorněn na Obr. 22. Je zřejmé, že nejčastěji byla prokázána delece 13q14 zastoupena celkově u 19 pacientů.



Obr. 22 – Poměr četnosti zastoupení všech osmi chromosomálních aberací u souboru pacientů vyšetřovaných metodou FISH

Tab. 13 – Přehled výsledků cytogenetického vyšetření FISH (hodnoty uvedeny v %)

P/Č	Vyšetření	Materiál	Věk při dg.	ATM	TP53	13q14	12	IGH	6q21	8q24	2p+	Závěrečný karyotyp
1/M	8.11.2017	PK	40	N	N	30/50*	N	N	N	N	N	46,XY[23]
2/F	8.11.2017	KD	76	N	N	N	N	N	N	N	N	46,XX[17]
3/M	16.11.2017	PK	76	N	25	4	N	N	N	N	N	45,X,-Y[8]/ 46,XY[2]
4/F	14.11.2017	PK	79	N	N	N	N	N	N	N	N	46,XX[15]
5/M	30.11.2017	PK	66	N	N	11/81*	N	N	N	N	N	45,X,-Y[3]/ 46,XY[13]
6/M	7.2.2018	PK	50	5	N	N	N	N	N	N	N	46,XY,del(11)(q14.1q23.3)[6]/ 46,XY[8]
7/M	9.2.2018	PK	67	N	N	10/3*	N	PD 7	N	N	N	46,XY[15]
8/F	13.2.2018	PK	68	N	N	N	81	N	N	N	N	47,XX,+12[30]/ 46,XX[1]
9/F	14.2.2018	PK	59	N	N	77	N	N	N	N	N	Neúspěšná kultivace
10/F	05.02.2018	PK	61	N	N	N	N	N	N	N	N	46,XX[26]
11/M	21.2.2018	PK	51	80	N	25/53*	N	N	N	10	53/13 (trp)	46,XY,+i(2)(p10),del(11)(q22)[5]/ 46,XY,+i(2)(p10),-8,del(11)(q22),der(21)t(8;13;21)(q?13;q?13;q?21)[3]/ 46,XY[5]
12/F	2.3.2018	PK	64	91	N	23/25*	N	PD 94	N	N	78	46,XX,dup(2)(p11.1p25.3),del(11)(q14.1q23.3)[9]/ 46,XX[1]
13/F	28.03.2018	PK	57	N	12	N	N	N	12	N	N	46,XX[19]
14/M	26.3.2018	PK	73	N	N	1,3/25*	N	N	N	N	N	46,XY[15]
15/F	10.4.2018	PK	46	N	93	92	N	N	N	92	N	44,XX,der(3)t(3;8)(q?29;q21.3),-6,der(17)t(6;17)(q?14;p?12),dic(20;22)(q10;q10), dic(21;22)(q10;q10),+22[4]/ 45,XX,der(3)t(3;8)(q?29;q21.3),-6,der(17)t(6;17)(q?14;p?12),dic(20;22)(q10;q10), dic(21;22)(q10;q10),+der(21)del(21)(q?12q?22.3),+22[2]/ 44,XX,der(3)t(3;8)(q?29;q21.3),-6,dic(13;14)(q10;q10),der(17)t(6;17)(q?14;p?12), dic(20;22)(q10;q10),dic(21;22)(q10;q10),+der(21)del(21)(q?12q?22.3),+22[4]
16/M	10.4.2018	PK	78	N	N	N	77	PD 96	N	N	N	47,XY,+12[3]/ 46,XY[7]
17/F	9.5.2018	PK	58	55	N	63/4*	N	N	N	N	N	Neúspěšná kultivace
18/F	2.5.2018	PK	49	N	93	N	N	N	4	N	N	46,XX[15]
19/M	28.06.2018	PK	57	N	N	68/28*	N	PD 53	N	N	N	46,XY[13]
20/M	02.07.2018	PK	72	N	N	N	36	N	N	N	N	47,XY,+12[5]/ 46,XY[7]
21/M	03.07.2018	PK	49	N	N	N	N	PD 95	N	N	N	46,XY[21]
22/F	10.07.2018	PK	70	N	16	26/38*	N	N	62	62	N	Neúspěšná kultivace

P/Č	Vyšetření	Materiál	Věk při dg.	ATM	TP53	13q14	12	IGH	6q21	8q24	2p+	Závěrečný karyotyp
23/M	12.07.2018	PK	92	N	N	N	N	PD 95	N	N	N	46,XY,t(3;14)(?q?25;q?24),der(12)t(2;12)(p14;q24)dup(2)(p25.3p14)[13]/46,XY[2]
24/F	31.7.21018	PK	69	N	N	N	N	N	94	N	N	45,XX,dic(6;20)(q12;p?11)[17]/46,XX[3]
25/F	31.07.2018	PK	84	N	N	70/23*	N	PD 94	N	N	N	46,XX,del(13)(q13.3q21.33)[15]/46,XX[4]
26/M	31.07.2018	PK	50	N	N	7	N	N	N	N	N	46,XY[24]
27/F	15.08.2018	PK	64	N	8	20/27*	N	PD 54	N	N	N	46,XX,der(3)t(3;18)(q?27;q?21),der(17)t(1;17)(q?23;p?13)[9]/46,XX,t(1;7)(q?21;p?15),der(3)t(3;18)(q?27;q?21),der(17)t(1;17)(q?23;p?13)[1]/46,XX,t(1;13)(q?21;p?33),der(3)t(3;18)(q?27;q?21),der(17)t(1;17)(q?23;p?13)[1]/43,XX,t(1;8)(q?21;q?22),der(3)t(3;18)(q?27;q?21),-7,-11,-13,der(17)t(1;17)(q?23;p?13)[1]/46,XX[1]
28/M	14.08.2018	PK	76	N	N	53	6	N	9	N	N	46,XY[15]
29/M	14.08.2018	PK	59	N	N	6	26	PD 41	3	N	N	47,XY,+12[2]/46,XY[29]
30/M	20.8.2018	PK	72	N	N	N	77	N	N	N	N	47,XY,+12[12]/46,XY[4]
31/M	21.8.2018	PK	66	N	N	90	N	PD 93	N	N	N	46,XY[14]
32/F	21.8.2019	PK	70	N	N	N	N	N	N	N	N	46,XX[17]
33/M	23.8.2018	PK	73	N	N	N	N	PD 97	N	N	N	46,XY[15]
34/M	27.08.2018	PK	57	N	N	N	N	N	N	N	N	46,XY[18]
35/M	28.08.2018	PK	79	N	26	N	38	PD 40	40	N	N	47,XY,del(11)(q22.3),+12[1] 45,XY,dic(6;14)(p?11;p?11)t(6;10)(q?24;q?24),+12,-17,der(18)t(17;18)(q?21;p?13)[6]/44,X,-Y,dic(6;14)(p?11;p?11)t(6;10)(q?24;q?24),+12,-17,der(18)t(17;18)(q?21;p?13)[3]/46,XY[5]
36/F	11.7.2018	PK	55	6	N	N	N	N	N	N	N	46,XX[15]
37/M	3.9.2018	PK	68	93	N	N	N	PD 94	N	N	85	46,XY,der(11)dup(2)(p25.3p13.2)t(2;11)(p13.2;q14.3)del(11)(q14.3q25)[49]/46,XY[1]
38/M	3.9.2018	PK	67	N	N	N	N	N	90	N	N	46,XY,del(6)(q13q25.3),del(9)(p21.3),del(11)(q14.1q22.1),t(14;18)(q32;q21)[3]/46,XY[7]
39/M	28.11.2018	PK	74	81	N	N	N	N	N	N	N	46,XY,del(11)(q?22q?25),22ps+[22]/46,XY,der(11)dup(2)(p?21pter),del(11)(q?22q?25),22ps+[4]/46,XY,del(11)(q?22q?25),der(19)t(2;19)(p?21;p?13)dup(2)(p?21pter),22ps+[2]/46,XY,del(11)(q?22q?25),der(20)t(2;20)(p?21;p?13)dup(2)(p?21pter),22ps+[2]/46,XY,der(10)t(2;10)(p?21;p?15)dup(2)(p?21pter),del(11)(q?22q?25),22ps+[1]/46,XY,22ps+[1]
40/M	27.11.2018	PK	63	N	N	N	N	N	N	N	N	46,XY,dic(1;9)(q?41;q?11)dup(1)(q21.1q41)del(1)(q41q44)dup(9)(q21.11q22.33),+der(9)t(9;11)(p?11;p?13)del(9)(q22.33q34.12)dup(9)(q34.12q34.3)dup(11)(p15.5p13)[9]/46,XY[11]

P/Č	Vyšetření	Materiál	Věk při dg.	ATM	TP53	13q14	12	IGH	6q21	8q24	2p+	Závěrečný karyotyp
41/M	13.12.2018	PK	73	N	N	83	N	PD 87	N	N	N	46,XY[18]

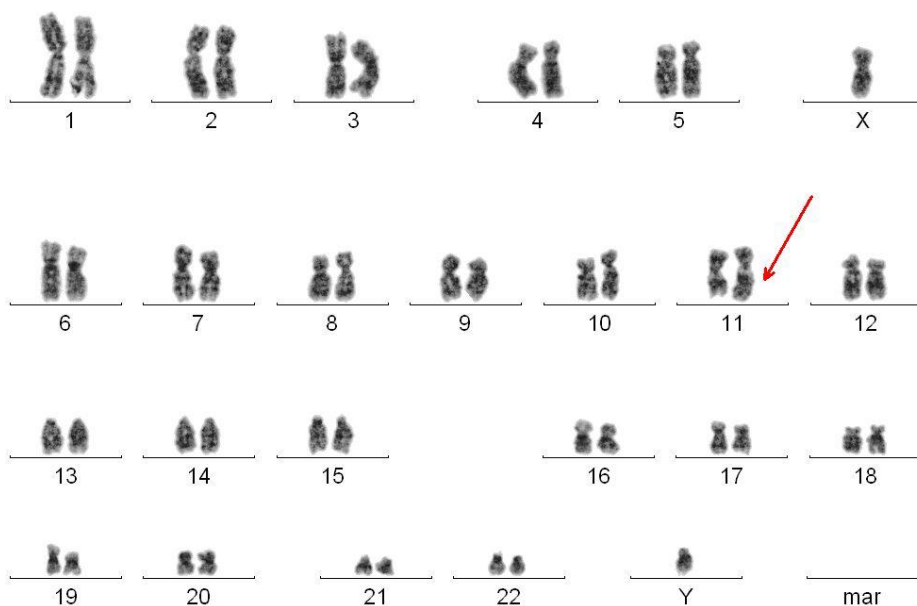
Legenda: **P/Č** – pohlaví a číslo pacienta, **M** – muž (male), **F** – žena (female), **PK** – periferní krev, **KD** – kostní dřeň, **PD** – parciální delece, **N** – normální nález,

\* – bialeická delece 13q14, **trp** – triplikace 2p.

#### 4.2.1.1 Kazuistika pacienta 37/M

Pacient 37/M (narozen r. 1950) s diagnózou M. Bechtěrev (v léčbě metotrexátem) přichází na kliniku 11. 9. 2018 z důvodu došetření náhodně zachycené lymfocytosy v periferní krvi. V krevním obraze byla prokázána leukocytosa ( $38,50 \times 10^9/l$ ) s lymfocytosou (82,2 %), s hemoglobinem (139 g/l) a trombocyty ( $184 \times 10^9/l$ ) v normě. Dle imunofenotypického vyšetření byla, na základě pozitivity znaků CD19, CD20, CD22, CD23, CD200 a CD5 a přítomnosti 65 % B-lymfocytů v periferní krvi, stanovena diagnóza CLL. V Laboratoři molekulární biologie byl určen nemutovaný *IGHV* status (v subgenu *VH1-69*, 100 %).

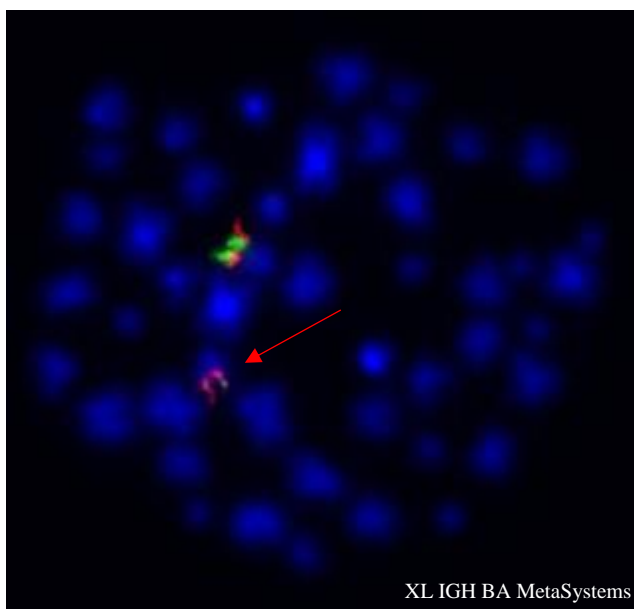
Periferní krev byla taktéž odeslána do Laboratoře cytogenetiky a molekulární cytogenetiky k určení genetických změn. Konvenční cytogenetikou byl prokázán nález derivovaného chromosomu 11,



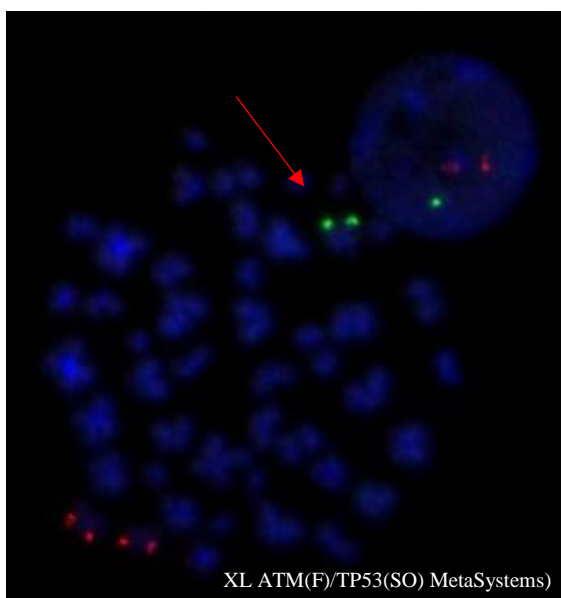
Obr. 23 – Karyotyp pacienta 37/M s označením derivovaným chromosomem 11

Metodou FISH pak byly prokázány následující změny: parciální delece 5'konce *IGH* genu (V segment, fyziologická varianta), delece *ATM* a duplikace genu *ALK* (v cca 90 % hodnocených buněk a 100 % hodnocených mitos).

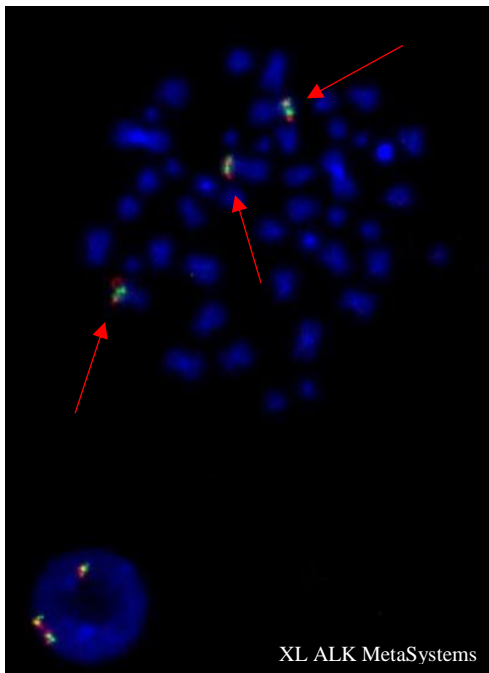
Následující snímky pochází z programu ISIS (MetaSystems), foceny z fluorescenčního mikroskopu (zvětšení 100x) CCD kamerou.



Obr. 24 – Snímek parciální delece 5'konce *IGH* genu (V segmentu) na chromosomu 14

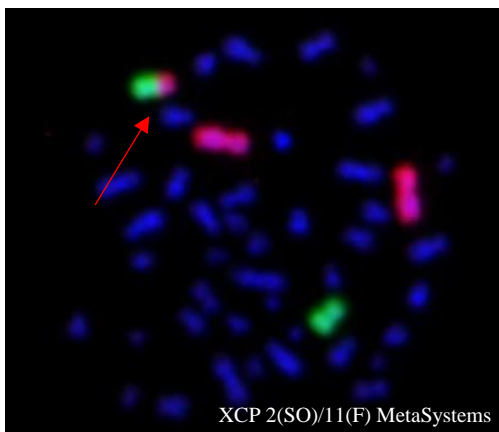


Obr. 25 – Snímek deletovaného genu *ATM* na dlouhém (q) rameni chromosomu 11



Obr. 26 – Snímek tří kopií genu *ALK* na krátkém (p) rameni chromosomu 2

Z důvodu nalezených změn byla dále provedena FISH s celochromosomovými sondami k přesné identifikaci derivovaného chromosomu 11. Byla použita kombinace celochromosomových sond 2 a 11 (MetaSystems).



Obr. 27 – Snímek derivovaného chromosomu 11 – prokázána translokace mezi chromosomy 2 (značen červeně) a 11 (značen zeleně)

Bylo tedy prokázáno, že duplikovaná část krátkých ramen chromosomu 2 (s genem *ALK*) je translokována na deletovaná dlouhá ramena chromosomu 11 (viz Obr. 27).

Také byla provedena metoda aCGH, kde byly stanoveny přesné hranice a delece derivovaných chromosomů: duplikace v oblasti krátkých ramen chromosomu 2 (od 2p25.3 do 2p13.2), delece v oblasti dlouhých ramen chromosomu 11 (od 11q14.3 do 11q25). Odhalena byla také ztráta heterozygosity v oblasti krátkých ramen chromosomu 6 (od 6p24.3 do 6p22.1). Rozsah duplikace 2p je znázorněn Obr. 18, str. 65.



Kombinací všech uvedených metod byl tedy uzavřen závěrečný karyotyp:  
46,XY,der(11)dup(2)(p25.3p13.2)t(2;11)(p13.2;q14.3)del(11)(q14.3q25)[49]/  
46,XY[1]

Byla stanovena diagnóza chronické lymfocytární leukemie, která vznikla zřejmě na základě chronické imunosuprese (Bechtěrev). Díky normálním hladinám hemoglobinu a trombocytů a nehmatným uzlinám bylo určeno stádium Binet A. Pacient se stále cítí dobře a vzhledem k absenci B symptomů zatím nebyla splněna kritéria zahájení léčby. Pacient je observován.

Pacientova prognóza je však bohužel negativní – díky nemutovanému *IGHV* (*VH1-69*) a genetickým změnám (deleci *ATM* a duplikaci 2p).

## 5 Diskuze

Chronická lymfocytární leukemie je klonální lymfoproliferativní onemocnění vznikající maligní transformací zralých B-lymfocytů a jejich akumulací v těle nemocného. Jde o nejčastější typ leukemie v Evropě, jenž postihuje častěji osoby starší 65 let (Redaelli *et al.*, 2004).

Vzhledem k biologické i genetické heterogenitě onemocnění se využívají specifické prognostické markery – imunofenotypické, molekulární a cytogenetické. Tato práce se zabývá vyšetřením z cytogenetické a molekulárně-cytogenetické oblasti diagnostiky.

V průběhu diplomové práce byly od září 2018 vyšetřovány dva soubory pacientů metodou komparativní genomové hybridizace (aCGH) a metodou fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH). V naprosté většině pacientů byla vyšetřovaným materiálem periferní krev.

První soubor 53 pacientů byl vybrán na základě přítomnosti zmnoženého krátkého ramene chromosomu 2 (2p+). Medián věku při diagnóze CLL v tomto souboru nemocných byl 61 let, s rozmezím od 39 – 92 let. Medián se blíží citované literatuře (Redaelli *et al.*, 2004). Celkem 6 pacientů (11 %) mělo věk v době diagnózy pod 45 let, toto číslo je vyšší než v literatuře, kde byl počet pacientů pod 45 rok života menší než 2 %. Tento nesoulad může být způsoben menším souborem pacientů v této práci. Procentuální zastoupení pacientů ve věku s rozmezím 45 – 54 let je však v této práci téměř totožné s citovanou literaturou (9,1 % vs. 9,4 %), (Gribben, 2010). Vyšetřeno bylo celkem 43 mužů a 10 žen (4,3:1). Literatura udává, že muži jsou postiženi dvakrát více než ženy (Horner *et al.*, 2009). Nesoulad v zastoupení je pravděpodobně způsoben malým souborem pacientů a také tím, že většina z pacientů byla vyšetřena při kontrole. V tomto souboru pacientů bylo celkem 19 pacientů (36 %) vyšetřeno při diagnóze, 34 pacientů (64 %) při kontrole. To je jeden z důvodů, který zanáší odchylky do našich výsledků při porovnání s literaturou a je potřeba na něj brát zřetel, protože v literatuře se procentuální hodnoty vztahují zejména k nově diagnostikovaným pacientům.

Mutační status *IGHV* je významným prognostickým faktorem nejen u CLL pacientů. Pacienti s geny pro *IGHV*, jenž nenesou somatickou mutaci, mají všeobecně horší prognózu a kratší dobu přežití (Oscier *et al.*, 2002). Mutační status byl vyšetřen v molekulárně biologické laboratoři u 48 pacientů, kdy pouze u šesti pacientů (12 %) se vyskytovala somatická mutace. Tito pacienti měli tedy příznivější prognózu s předpokládaným indolentním průběhem. Literatura udává, že duplikace 2p je asociována s nemutovaným stavem *IGHV*. Ten byl detekován v práci Ma *et al.* (2011) u 76,5 % pacientů se zmnožením 2p. V naší práci je zastoupení mutačního stavu *IGHV* blízké hodnotě v literatuře, protože nemutovaný stav *IGHV* u pacientů se zmnožením 2p byl nalezen u 84 %. Mutace v segmentu *VH3-21* je podle Tobin *et al.* (2002) naopak špatným prognostickým faktorem. Mutace tohoto segmentu byla nalezena v našem souboru u třech pacientů se zmnožením 2p.

Při nízkém zastoupení aberací nebylo zmnožení 2p metodou aCGH zachyceno, následné srovnání s metodou FISH však zmnožení u většiny pacientů potvrdilo. Celkem bylo kombinací aCGH a FISH potvrzeno zmnožení 2p u všech 53 pacientů.

Duplikace krátkého ramene chromosomu 2 se podle Chapiro *et al.*, 2010 neobjevuje v genomu jako samostatná abnormalita. V této práci byla společně s duplikací 2p nalezena ještě jiná chromosomální změna celkem u 49 pacientů (92 %). Pouze u 4 pacientů (8 %) se duplikace 2p objevila jako solo aberace. V souboru pacientů s duplikací 2p bylo sledováno 33 pacientů s komplexním karyotypem, u dalších 11 pacientů se předpokládá, na základě výsledků FISH a aCGH, taktéž výskyt komplexního karyotypu (a to i v případě sledování normálního karyotypu či neúspěšného cytogenetického vyšetření u těchto pacientů). Pouze u 9 pacientů nebyl komplexní karyotyp prokázán. Nejčastěji byla společně s duplikací 2p sledována delece 13q14 v 65 % pacientů. Ma *et al.* (2010) tuto aberaci u pacientů s 2p potvrdili u 60 %. Při porovnání zastoupení delece genů *ATM* nebo *TP53* je v práci Ma *et al.* sledován rozdíl v zastoupení přibližně o 10 % nižší, než ve výsledcích této práce. Delece *ATM* byla v naší práci u souboru pacientů s duplikací 2p detekována v 52 % (vs. 42,9 %) a delece *TP53* byla v naší práci nalezena v 20% zastoupení (vs. 31,4 %).

Dále byly graficky zpracovány nejčastěji zmnožené úseky na krátkém rameni chromosomu 2. Mezi kandidátní geny, které jsou zasaženy touto změnou, patří například *MYCN*, *ALK*, *REL* a další, zmiňuje se o nich v této souvislosti například Ma *et al.* (2011) nebo Jarosova *et al.* (2010). Celkem u 74 % pacientů zasahovala duplikace 2p celé krátké rameno chromosomu 2 a s ním i zmiňované kandidátní geny. U zbylých 26 % pacientů byly duplikované úseky značně heterogenní. Stejného výsledku docílili i Jarošová *et al.* (2010), kteří potvrdili 75% duplikování všech tří genů *MYCN*, *ALK*, *REL* společně. Pro porovnání s jinou prací, Ma *et al.* pozorovali 83% zapojení genu *MYCN* v duplikacích 2p. V naší práci byla telomerická oblast 2p25.3, nesoucí gen *MYCN*, zmnožena v 82 %. Gen *MYCN* funguje jako transkripční faktor, je součástí rodiny protoonkogenů a účastní se buněčného růstu a proliferace. Dysregulace nebo overexprese *MYCN* je potvrzena až v 70 % lidských tumorů (Dang, 2012). Gen *ALK* kóduje ALK-tyrosin kinasový receptor, který je zapojen do signálního přenosu. Tyto signalizační cesty jsou významné v buněčném růstu, proliferaci a diferenciaci. Protoonkogen *REL* hraje roli v přežívání a proliferaci B-lymfocytů. Patří do rodiny NF- $\kappa$ B transkripčních faktorů, která reguluje geny podílející se na apoptóze, zánětu a imunitní reakci. Deregulace tohoto genu se uplatňuje v onkogenních procesech (Barth *et al.*, 2003).

V rámci diplomové práce byla statisticky vyhodnocena délka přežívání Kaplan-Meierovou regresní metodou u kontrolního souboru pacientů v porovnání se souborem pacientů s duplikací 2p. Medián přežívání celkového souboru pacientů s 2p byl 111 měsíců ( $P = 0,0382$ ). Medián přežívání kontrolního souboru byl 116 měsíců. Zvlášť pak byl zpracován soubor, u něž se duplikace 2p detekovala v době diagnózy a soubor ( $P = 0,0321$ ), u něž se duplikace 2p objevila až v průběhu onemocnění ( $P = 0,2357$ ). Významný statistický rozdíl 32 měsíců v porovnání s kontrolou byl pozorován u souboru, kde byla aberace detekována již v době diagnózy, medián přežití tohoto souboru činil 84 měsíců. Délka přežívání závisí především na aberacích, které měli pacienti v době diagnózy a jak dlouho popřípadě trvalo, než došlo ke klonálnímu vývoji.

Druhý soubor 41 pacientů byl vyšetřován pouze metodou FISH. Analýza zahrnovala 25 mužů a 16 žen (1,56:1), medián věku v době diagnózy byl 67 let s rozmezím 40 – 92 let, medián věku odpovídá hodnotám v literatuře (Redaelli *et al.*, 2004). Chromosomální aberace (jakákoliv) se vyskytla u 34 pacientů (83 %). Komplexní karyotyp nesoucí nepříznivou prognózu byl detekován u 13 pacientů (32 %), 15 pacientů mělo jednu chromosomální změnu (deleci 13q14, delecii *ATM*, trisomii chromosomu 12). Nemutovaný status *IGHV* byl objeven u 25 pacientů (66 %), u 11 pacientů byl detekován subgen *VHI-69*. Mutovaný status *IGHV* mělo 13 pacientů (34 %). Kröber *et al.*, 2002 udává 56% incidenci nemutovaného *IGHV* a 44% incidenci mutovaného *IGHV*. Hodnoty se liší o 10 % pravděpodobně z důvodu malého souboru pacientů.

Delece 13q14 je nejčastější změnou u pacientů s CLL a je spojována s příznivou prognózou, tato delece byla detekována u 46 % pacientů. Hodnota je shodná s literaturou, která udává 40 – 60 % zastoupení této delece (Döhner *et al.*, 2000). Dle literatury se objevuje jak monoalelická, bialelická tak i obě zároveň (Chena *et al.*, 2008). Nejvíce byla zastoupena monoalelická i bialelická delece společně (u 11 pacientů, 27 %). Druhou nejčastější změnou sledovanou v tomto souboru pacientů byla parciální delece variabilního segmentu genu *IGH*, který kóduje těžký řetězec imunoglobulinu. V této práci byla zachycena u 34 % pacientů, Quintero-Rivera *et al.* (2009) pozorovali tuto delecii u 26 % pacientů. Naše pozorování tak není zatíženo velkým rozdílem oproti literatuře. Je vhodné podotknout, že chromosomální změna je fyziologická a neovlivňuje prognózu pacienta. Aberací, která nese horší prognózu je delece 3' konce *IGH* a přestavba *IGH* genu, ani jedna z nich však pozorována v tomto souboru pacientů nebyla. Pacienti se zasaženými geny *TP53* del(17p) a *ATM* del(11q) patří do vysocerizikové skupiny (Pflug *et al.*, 2014). Delece *ATM* se týká podle literatury asi 18 % nemocných CLL. V této práci je přítomna u 17 % pacientů, tudíž koreluje s uvedenými daty v literatuře (Döhner *et al.*, 2000). Všichni pacienti s delecí *ATM* mají zároveň nemutovaný status *IGHV*. Delece pruhu 17p13, zasahující vždy tumor supresorový gen *TP53*, je v naší práci zastoupena přibližně dvakrát častěji než v literatuře, kde je udávána v 4 – 9 %. Rozdíl může být způsoben tím, že naše výsledky obsahují i kontrolní vyšetření a literatura udává výsledky vyšetření při diagnóze. V této práci byl nemutovaný status *IGHV* objeven u 5/7 pacientů se zasaženým genem *TP53* (71 %). Častější zastoupení vysoce rizikových genomových aberací, jako je delece 17p a delece 11q společně s nemutovaným statutem *IGHV* se vyskytly i v práci Kröber *et al.*, (2002) významně častěji. Trisomie chromosomu 12 byla v našem souboru pacientů vyšetřovaných metodou FISH přítomna ve 20 %, stejné číslo je udáváno i v literatuře (Döhner *et al.*, 2000). Zmnožení 2p bylo detekováno pouze u tří pacientů (7 %) a v tomto souboru se neobjevilo jako samostatná abnormalita – to odpovídá pozorování Chapiro *et al.* (2010). Zastoupení duplikace 2p je v literatuře udáváno poměrně ve velkém rozmezí. Naše výsledky se téměř shodují s výsledky Jarošová *et al.* (2010), kteří pozorovali 8% zastoupení této abnormality.

## 6 Závěr

Cílem této práce bylo sestavit literární přehled o chronické lymfocytární leukemii a popsat u dvou souborů pacientů nejčastější genetické změny metodami cytogenetiky a molekulární cytogenetiky.

V rámci této diplomové práce byly vyhodnoceny metodou aCGH, v souboru 53 pacientů, nejčastěji zmnožené oblasti na krátkém raménku chromosomu 2 a graficky zpracovány. Byly potvrzeny kandidátní geny *MYCN*, *ALK* a *REL*, které byly všechny společně zahrnuty u 74 % pacientů se zmnožením 2p. Ostatní zmnožené oblasti vykazovaly značnou heterogenitu. Zmnožení oblastí na chromosomu 2 se vyskytují zároveň s dalšími negativními prognostickými faktory, často se jedná o komplexní karyotypy, což má zásadní vliv na přežívání. Dále bylo statisticky zpracováno přežívání pacientů s touto genetickou abnormalitou, která je jednou z významných prognostických faktorů chronické lymfocytární leukemie. Nejvýznamnější rozdíl byl objeven u skupiny pacientů, kterým bylo 2p+ detekováno již v době diagnózy. Medián přežívání této skupiny činil 84 měsíců, tedy o 32 měsíců méně, než bylo u skupiny kontrolní. Tento výsledek poukazuje na vážnost zmnožení 2p u pacientů s CLL. V rutinní praxi však není prozatím tato aberace vyšetřována, do budoucna by bylo vhodné zvážit její zařazení do rutinních vyšetření u pacientů s CLL z důvodu přesnější volby léčby.

V druhé skupině 41 pacientů byly úspěšně metodou FISH s CLL panelem sond detekovány nejčastější genetické aberace pozorované u CLL pacientů a jejich zastoupení porovnáno s literaturou. Nejvíce pozorovanou změnou byla delece 13q14, následovala parciální delece V segmentu *IGH*. Trisomie chromosomu 12 se spolu s delecí *ATM* a *TP53* objevily ve stejném početním zastoupení.

## 7 Seznam použité literatury

Abruzzo L. V., Herling C. D., Calin G. A., Oakes C., Barron L. L., Banks H. E., Katju V., Keating M. J., Coombes K. R. (2018) Trisomy 12 chronic lymphocytic leukemia expresses a unique set of activated and targetable pathways. *Haematologica*, **103**(12), 2069-2078.

Adam K., Krejčí M., Vorlíček J. (2008). *Hematologie-Přehled maligních hematologických nemocí: 2., doplněné a zcela přepracované vydání*. Grada Publishing as., 404 stran, ISBN 978-80-247-2502-4.

Alvarez-Silva M., Belo-Diabangouaya P., Salaün J., Dieterlen-Lièvre F. (2003). Mouse placenta is a major hematopoietic organ. *Development*, **130**(22), 5437-5444.

Amaya-Chanaga C. I., Rassenti, L. Z. (2016). Biomarkers in chronic lymphocytic leukemia: clinical applications and prognostic markers. *Best Practice & Research Clinical Haematology*, **29**(1), 79-89.

Austen B., Skowronska A., Baker C., Powell J. E., Gardiner A., Oscier D., Majid A., Dyer M., Siebert R., Taylor A. M., Moss P. A., Stankovic T. (2007). Mutation status of the residual ATM allele is an important determinant of the cellular response to chemotherapy and survival in patients with chronic lymphocytic leukemia containing an 11q deletion. *Journal of Clinical Oncology*, **25**(34), 5448-5457.

Balatti V., Bottoni A., Palamarchuk A., Alder H., Rassenti L.Z., Kipps T.J., Pekarsky Y., Croce C.M. (2012). NOTCH1 mutations in CLL associated with trisomy 12. *Blood*, **119**(2), 329-331.

Baliakas P., Iskas M., Gardiner A., Davis Z., Plevova K., Nguyen-Khac F., Malcikova J., Anagnostopoulos A., Glide S., Mould S., Stepanovska K., Brejcha M., Belessi Ch., Davi F., Pospisilova S., Athanasiadou A., Stamatopoulos K., Oscier D. (2014). Chromosomal translocations and karyotype complexity in chronic lymphocytic leukemia: a systematic reappraisal of classic cytogenetic data. *American journal of hematology*, **89**(3), 249-255.

Banin S., Moyal L., Shieh S. I., Taya Y., Anderson C. W., Chessa L., Smorodinsky N. I., Prives C., Reiss Y., Shiloh Y., Ziv Y. (1998). Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science*, **281**(5383), 1674-1677.

Barth T. F., Martin-Subero J. I., Joos S., Menz C. K., Hasel C., Mechttersheimer G., Parwaresch R. M., Lichter P., Siebert R., Möller P. (2003). Gains of 2p involving the REL locus correlate with nuclear c-Rel protein accumulation in neoplastic cells of classical Hodgkin lymphoma. *Blood*, **101**(9), 3681-3686.

Berek, C. (1993). Somatic mutation and memory. *Current opinion in immunology* **5**(2), 218-222.

Berkova A., Pavlistova L., Babicka L., Houskova L., Tajtlova J., Balazi P., Cmunt E., Schwarz J., Karban J., Trneny M., Brezinova J., Zemanova Z., Michalova K. (2008). Combined molecular biological and molecular cytogenetic analysis of genomic changes in 146 patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Neoplasma*, **55**(5), 400.

Binet J. L., Lepage M., Dighiero G., Charron D., Vaugier G., Beral H. M., Natali J. C., Raphael M., Nizet B., Follezu J. Y. (1977). A clinical staging system for chronic lymphocytic leukemia. Prognostic significance. *Cancer*, **40**(2), 855-864.

Blanco G., Puiggros A., Rodríguez-Rivera M., Melero C., García-Malo M. D., Collado R., Ortega M., Calasanz M. J., Luño E., Vargas M. T., Grau J. (2014). Chromosome 8 Abnormalities (8p Losses and 8q Gains) in Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) and Del (17p). *Blood*, **124**(21), 5638.

- Bottini N., Stefanini L., Williams S., Alonso A., Jascur T., Abraham R. T., Couture C., Mustelin T. (2002). Activation of ZAP-70 through specific dephosphorylation at the inhibitory Tyr-292 by the low molecular weight phosphotyrosine phosphatase (LMPTP). *Journal of Biological Chemistry*, **277**(27), 24220-24224.
- Bowman T.V., Merchant A. A., Goodell M. A. (2007) Molecular Profiling of Hematopoietic Stem Cells. Marrow and Stem Cell Transplantation. Humana Press. *Methods in Molecular Medicine*, **134**, 1-16.
- Brown A. G., Ross F. M., Dunne E. M., Steel C.M., Weir-Thompson E. M. (1993). Evidence for a new tumour suppressor locus (DBM) in human B-cell neoplasia telomeric to the retinoblastoma gene. *Nature genetics*, **3**(1), 67.
- Brown J. R., Byrd J. C., Coutre S. E., Benson D. M., Flinn I. W., Wagner-Johnston N. D., Spurgeon S.E., Kahl B. S, Bello C., Webb H. K., Johnson D. M., Peterman S., Li D., Jahn T. M., Lannutti B. J., Ulrich R. G., Yu A. S., Miller L. L., Furman R. R. (2014). Idelalisib, an inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase p110 $\delta$ , for relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, **123**(22), 3390-3397.
- Coico R. F., Bhogal B. S., Thorbecke G. J. (1983). Relationship of germinal centers in lymphoid tissue to immunologic memory. VI. Transfer of B cell memory with lymph node cells fractionated according to their receptors for peanut agglutinin. *The Journal of Immunology*, **131**(5), 2254-2257.
- Cooper M. D., Alder M. N. (2006). The evolution of adaptive immune systems. *Cell*, **124**(4), 815-822.
- Cosson A., Chapiro E., Bougacha N., Lambert J., Herbi L., Cung H. A., Algrin C., Keren B., Damm F., Gabillaud C., Brunelle-Navas M.N., Davi F., Merle-Béral H., Le Garff-Tavernier M., Roos-Weil D., Choquet S., Uzunov M., Morel V., Leblond V., Maloum K., Lepretre S., Feugier P., Lesty C., Lejeune J., Sutton L., Landesman Y., Susin S.A., Nguyen-Khac F. (2017). Gain in the short arm of chromosome 2 (2p+) induces gene overexpression and drug resistance in chronic lymphocytic leukemia: analysis of the central role of XPO1. *Leukemia*, **31**(7), 1625.
- Costa G., Kouskoff V., Lacaud G. (2012). Origin of blood cells and HSC production in the embryo. *Trends in immunology*, **33**(5), 215-223.
- Cumano A., Dieterlen-Lievre F., Godin I. (1996). Lymphoid potential, probed before circulation in mouse, is restricted to caudal intraembryonic splanchnopleura. *Cell*, **86**(6), 907-916.
- Cuneo A., Rigolin G. M., Bigoni R., De Angeli C., Veronese A., Cavazzini F., Bardi A., Roberti M. G., Tammiso E., Agostini P., Ciccone M., Porta M., Tieghi A., Cavazzini L., Negrini M., Castoldi G. (2004). Chronic lymphocytic leukemia with 6q- shows distinct hematological features and intermediate prognosis. *Leukemia*, **18**(3), 476.
- Damle R.N., Wasil T., Fais F., Ghiotto F., Valetto A., Allen S. L., Buchbinder A., Budman D., Dittmar K., Kolitz J., Lichtman S. M., Schulman P., Vinciguerra V. P., Rai K. R., Ferrarini M., Chiorazzi N. (1999). Ig V Gene Mutation Status and CD38 Expression As Novel Prognostic Indicators in Chronic Lymphocytic Leukemia: Presented in part at the 40th Annual Meeting of The American Society of Hematology, held in Miami Beach, FL, December 4-8, 1998. *Blood*, **94**(6), 1840-1847.
- Dang C. V. (2012). MYC on the path to cancer. *Cell*, **149**(1), 22-35.
- D'arena G., Musto P., Cascavilla N., Dell'olio M., di Renzo N., Perla G., Savino L., Carotenuto M. (2001). CD38 expression correlates with adverse biological features and predicts poor clinical outcome in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia & lymphoma*, **42**(1-2), 109-114.

de Claro R. A., McGinn K. M., Verdun N., Lee S. L., Chiu H. J., Saber H., Brower M. E., Chang C. G., Pfuma E., Habtemariam B., Bullock J., Wang Y., Nie L., Chen X. H., Lu D. R., Al-Hakim A., Kane R. C., Kaminskas E., Justice R., Farrell A. T., Pazdur R. (2015). FDA approval: ibrutinib for patients with previously treated mantle cell lymphoma and previously treated chronic lymphocytic leukemia. *Clinical Cancer Research*, **21**(16), 3586-3590.

Delassus S., Cumano A. (1996). Circulation of hematopoietic progenitors in the mouse embryo. *Immunity*, **4**(1), 97-106.

Dighiero G., Maloum K., Desablens B., Cazin B., Navarro M., Leblay R., Leporrier M., Jaubert J., Lepeu G., Dreyfus B., Binet J. L., Travade P., Turpin F. L., Tertian G., Bichoffe A. (1998). Chlorambucil in indolent chronic lymphocytic leukemia. *New England Journal of Medicine*, **338**(21), 1506-1514.

Döhner H., Stilgenbauer S., Benner A., Leupolt E., Kröber A., Bullinger L., Döhner K., Bentz M., Lichter P. (2000): Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *The New England Journal of Medicine*, **343**(26), 1910-1916.

Dores G. M., Anderson W. F., Curtis R. E., Landgren O., Ostroumova E., Bluhm E. C., Rabkin C. S., Devesa S. S., Linet M. S. (2007). Chronic lymphocytic leukaemia and small lymphocytic lymphoma: overview of the descriptive epidemiology. *British journal of haematology*, **139**(5), 809-819.

Doubek M., Špaček M., Pospíšilová Š., Jarošová M., Papajík T., Urbanová R., Šimkovič M., Lysák D., Brejcha M., Smolej L. (2018). Doporučení pro diagnostiku a léčbu chronické lymfocytární leukemie (CLL)-2018. *Transfusiologie & Haematology Today/Transfuzie a Hematologie Dnes*, **24**(3).

Dreger P., Schetelig J., Andersen N., Corradini P., van Gelder M., Gribben J., Kimby E., Michallet M., Moreno C., Stilgenbauer S., Montserrat E. (2014). Managing high-risk CLL during transition to a new treatment era: stem cell transplantation or novel agents? *Blood*, **124**(26), 3841-3849.

Edelmann J., Holzmann K., Miller F., Winkler D., Bühler A., Zenz T., Bullinger L., Kühn M., Gerhardinger A., Bloehdorn J., Radtke I., Su X., Ma J., Pounds S., Hallek M., Lichter P., Korbel J., Busch R., Mertens D., Downing J. R., Stilgenbauer S., Döhner H. (2012). High-resolution genomic profiling of chronic lymphocytic leukemia reveals new recurrent genomic alterations. *Blood*, **120**(24), 4783-4794.

Fabris S., Mosca L., Cutrona G., Lionetti M., Agnell, L., Ciceri G., Barbieri M., Maura F., Matis S., Colombo M., Gentile M., Recchia A. G., Pesce E. A., Di Raimondo F., Musolino C., Gobbi M., Di Renzo N., Mauro F. R., Brugiattelli M., Ilariucci F., Lipari M. G., Angrilli F., Consoli U., Fragasso A., Molica S., Festini G., Vincelli I., Cortelezzi A., Federico M., Morabito F., Ferrarini M., Neri A. (2013). Chromosome 2p gain in monoclonal B-cell lymphocytosis and in early stage chronic lymphocytic leukemia. *American journal of hematology*, **88**(1), 24-31.

Feeney A. J. (2009) Genetic and Epigenetic Control of V Gene Rearrangement Frequency. V(D)J Recombination. Springer, New York, NY. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **650**, 73-81.

Fegan C., Robinson H., Thompson P., Whittaker J. A., White D. (1995). Karyotypic evolution in CLL: identification of a new sub-group of patients with deletions of 11q and advanced or progressive disease. *Leukemia*, **9**(12), 2003-2008.

Ferkowicz M. J., Yoder M. C. (2005). Blood island formation: longstanding observations and modern interpretations. *Experimental hematology*, **33**(9), 1041-1047.



- Finn W. G., Kay N. E., Kroft S. H., Church S., Peterson L. C. (1998). Secondary abnormalities of chromosome 6q in B-cell chronic lymphocytic leukemia: a sequential study of karyotypic instability in 51 patients. *American journal of hematology*, **59**(3), 223-229.
- Fukuda T. (1974). Fetal hemopoiesis. *B Cell Pathol. Virchows Archiv B*, **16**(1), 249.
- Gerondakis S., Grumont R., Rourke I., Grossman M. (1998). The regulation and roles of *REL/NF- $\kappa$ B* transcription factors during lymphocyte activation. *Current Opinions in Immunology*, **10**, 353-359.
- Godin I. E., Garcia-Porrero J. A., Coutinho A., Dieterlen-Lièvre F., Marcos M. A. (1993). Para-aortic splanchnopleura from early mouse embryos contains B1a cell progenitors. *Nature*, **364**(6432), 67.
- Gregory C. J., Eaves A. C. (1978). Three stages of erythropoietic progenitor cell differentiation distinguished by a number of physical and biologic properties. *Blood*, **51**(3), 527-537.
- Gribben J. G. (2010). How I treat CLL up front. *Blood*, **115**(2), 187-197.
- Gunn S. R., Mohammed M. S., Gorre M. E., Cotter P.D., Kim J., Bahler D. W., Preobrazhensky S. N., Higgins R.A., Bolla A.R., Ismail S. H., de Jong D. (2008). Whole-genome scanning by array comparative genomic hybridization as a clinical tool for risk assessment in chronic lymphocytic leukemia. *The Journal of molecular diagnostics*, **10**(5), 442-451.
- Gunnarsson R., Isaksson A., Mansouri M., Göransson H., Jansson M., Cahill N., Rasmussen M., Staaf J., Lundin J., Norin S., Buhl A. M., Smedby K. E., Hjalgrim H., Karlsson K., Jurlander J., Juliusson G., Rosenquist R. (2010). Large but not small copy-number alterations correlate to high-risk genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia: a high-resolution genomic screening of newly diagnosed patients. *Leukemia*, **24**(1), 211.
- Haferlach C., Dicker F., Schnittger S., Kern W., Haferlach T. (2007). Comprehensive genetic characterization of CLL: a study on 506 cases analysed with chromosome banding analysis, interphase FISH, IgV H status and immunophenotyping. *Leukemia*, **21**(12), 2442.
- Hallek M., Fischer K., Fingerle-Rowson G., Fink A. M., Busch R., Mayer J., Hensel M., Hopfinger G., Hess G., von Grünhagen U., Bergmann M., Catalano J., Zinzani P. L., Caligaris-Cappio F., Seymour J. F., Berrebi A., Jäger U., Cazin B., Trneny M., Westermann A., Wendtner C. M., Eichhorst B. F., Staib P., Bühler A., Winkler D., Zenz T., Böttcher S., Ritgen M., Mendila M., Kneba M., Döhner H., Stilgenbauer S. (2010). Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a randomised, open-label, phase 3 trial. *The Lancet*, **376**(9747), 1164-1174.
- Hallek M., Cheson B. D., Catovsky D., Caligaris-Cappio F., Dighiero G., Döhner H., Stilgenbauer S., Hillmen P., Keating M., Montserrat E., Chiorazzi N., Rai K. R., Byrd J. C., Eichhorst B., O'Brien S., Robak T., Seymour J. F., Kipps T. J. (2018). iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL. *Blood*, **131**(25), 2745-2760.
- Hallek M., Cheson B. D., Catovsky D., Caligaris-Cappio F., Dighiero G., Döhner H., Hillmen P., Keating M., Montserrat E., Rai K., Kipps T. J. (2008). Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood*, **111**(12), 5446-5456.
- Hamblin T. J., Davis Z., Gardiner A., Oscier D. G., Stevenson F. K. (1999). Unmutated Ig VH genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, **94**(6), 1848-1854.

- Herling C. D., Klaumünzer M., Rocha C. K., Altmüller J., Thiele H., Bahlo J., Kluth S., Crispatzu G., Herling M., Schiller J., Engelke A., Tausch E., Döhner H., Fischer K., Goede V., Nürnberg P., Reinhardt H. C., Stilgenbauer S., Hallek M., Kreuzer K. A. (2016). Complex karyotypes and KRAS and POT1 mutations impact outcome in CLL after chlorambucil-based chemotherapy or chemoimmunotherapy. *Blood*, **128**(3), 395-404.
- Hernández J.Á., Rodríguez A.E., González M., Benito R., Fontanillo C., Sandoval V., Romero M., Martín-Núñez G., de Coca A. G., Fisac R., Galende J., Recio I., Ortuño F., García J. L., de las Rivas J., Gutiérrez N. C., San Miguel J. F., Hernández J. M. (2009). A high number of losses in 13q14 chromosome band is associated with a worse outcome and biological differences in patients with B-cell chronic lymphoid leukemia. *Haematologica*, **94**(3), 364-371.
- Hesslein D. G. T., Schatz D. G. (2001). Factors and forces controlling V (D) J recombination. *Advances in immunology*, **78**, 169-232.
- Hillmen P., Skotnicki A. B., Robak T., Jaksic B., Dmoszynska A., Wu J., Sirard C., Mayer J. (2007). Alemtuzumab compared with chlorambucil as first-line therapy for chronic lymphocytic leukemia. *Journal of Clinical Oncology*, **25**(35), 5616-5623.
- Hořejší V., Bartůňková J. (2009) *Základy imunologie*. Praha. Triton.
- Huh Y. O., Lin K. I. C., Vega F., Schlette E., Yin C. C., Keating M. J., Luthra R., Medeiros L. J., Abruzzo L. V. (2008). MYC translocation in chronic lymphocytic leukaemia is associated with increased polymphocytes and a poor prognosis. *British journal of haematology*, **142**(1), 36-44.
- Chapiro E., Leporrier N., Radford-Weiss I., Bastard C., Mossafa H., Leroux D., Tigaud I., de Braekeleer M., Terré CH., Brizard F., Callet-Bauchu E. Struski S., Veronese L., Fert-Ferrer S., Taviaux S., Lesty C., Davi F., Merle-Béral H., Nguyen-Khac F. (2010). Gain of the short arm of chromosome 2 (2p) is a frequent recurring chromosome aberration in untreated chronic lymphocytic leukemia (CLL) at advanced stages. *Leukemia research*, **34**(1), 63-68.
- Chen A. Y. Y. and Chen A. (2013). Fluorescence in situ hybridization. *Journal of Investigative Dermatology*, **133**(5), 1-4.
- Chena C., Avalos J. S., Bezares R. F., Arrossagaray G., Turdó K., Bistmans A., Slavutsky I. (2008). Biallelic deletion 13q14. 3 in patients with chronic lymphocytic leukemia: cytogenetic, FISH and clinical studies. *European journal of haematology*, **81**(2), 94-99.
- Cheshier S. H., Morrison S. J., Liao X., Weissman I. L. (1999). In vivo proliferation and cell cycle kinetics of long-term self-renewing hematopoietic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **96**(6), 3120-3125.
- Chiorazzi N., Rai K. R., Ferrarini M. (2005). Chronic lymphocytic leukemia. *The New England Journal of Medicine*, **352**: 804-815.
- Choi K., Kennedy M., Kazarov A., Papadimitriou J. C., Keller G. (1998). A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development*, **125**(4), 725-732.
- Chott A., Raderer M. (2000). New developments in extracutaneous lymphomas. In *Seminars in cutaneous medicine and surgery*, **19**(2), 149-156.
- Isobe M., Emanuel B. S., Givol D., Oren M., Croce C. M. (1986). Localization of gene for human p53 tumour antigen to band 17p13. *Nature*, **320**(6057), 84.

- Israels L. G., Israels S. J., Begleiter A., Verburg L., Schwartz L., Mowat M. R. A., Johnston J. B. (1993). Role of transforming growth factor- $\beta$  in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia research*, **17**(1), 81-87.
- Jacob J., Kelsoe G., Rajewsky K., Weiss U. (1991). Intraclonal generation of antibody mutants in germinal centres. *Nature*, **354**(6352), 389.
- Jaffe E. S., Harris N., Stein H., Vardiman J. W. (2001). Tumours of Hematopoietic and Lymphoid Tissues. *World Health Organization Classification of Tumours*. Lyon, France, IARC Press.
- Jaglowski S. M., Ruppert A. S., Heerema N. A., Bingman A., Flynn J. M., Grever M. R., Jones J. A., Elder P., Devine S. M., Byrd J. C., Andritsos L. A. (2012). Complex karyotype predicts for inferior outcomes following reduced-intensity conditioning allogeneic transplant for chronic lymphocytic leukaemia. *British journal of haematology*, **159**(1), 82-87.
- Jardin F., Pujals A., Pelletier L., Bohers E., Camus V., Mareschal S., Dubois S., Ochman M., Lemonnier F., Viailly P. J., Bertrand P., Maingonnat C., Traverse-Glehen A., Gaulard P., Damotte D., Delarue R., Haioun C, Landesman Y., Senapedis W., Argueta Ch., Salles A. G., Jais J. P., Figeac M., Copie-Bergman Ch., Molina T., Picquenot J. M., Cornic M., Fest T., Milpied N., Lemasle E., Stamatoullas A, Moeller P., Dyer M. J. S., Sundstrom Ch., Bastard Ch., Tilly H., Leroy K. (2015). Recurrent mutations of the Exportin 1 gene (XPO1) in primary mediastinal B-Cell Lymphoma: A Lysa Study. *Blood*, **126**(23),129.
- Jarsova M., Hrubá M., Oltová A., Plevová K., Kruzová L., Kriegová E., Kriegová E., Fillerová R., Koritáková E., Doubek M., Lysák D., Procházka V., Mraz M., Indrak K., Papajík T. (2017). Chromosome 6q deletion correlates with poor prognosis and low relative expression of FOXO3 in chronic lymphocytic leukemia patients. *American journal of hematology*, **92**(10), E604.
- Johnson G. R., Jones R. O. (1973). Differentiation of the mammalian hepatic primordium in vitro: I. Morphogenesis and the onset of haematopoiesis. *Development*, **30**(1), 83-96.
- Jones J., Mato A., Coutre S., Byrd J. C., Furman R. R., Hillmen P., Osterborg A., Tam C., Stilgenbauer S., Wierda W. G., Heerema N. A., Eckert K., Clow F., Zhou C., Chu A. D., James D. F., O'Brien S. M. (2018). Evaluation of 230 patients with relapsed/refractory deletion 17p chronic lymphocytic leukaemia treated with ibrutinib from 3 clinical trials. *British journal of haematology*, **182**(4), 504-512.
- Savitsky K., Bar-Shira A., Gilad S., Rotman G., Ziv Y., Vanagaite L., Tagle D. A., Smith S., Uziel T., Sfez S. (1995). A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science*, **268**(5218), 1749-1753.
- Kastan M.B., Lim, D. S. (2000). The many substrates and functions of ATM. *Nature reviews Molecular cell biology*, **1**(3), 179-186.
- Kaufman D. S., Hanson E. T., Lewis R. L., Auerbach R., Thomson J. A. (2001). Hematopoietic colony-forming cells derived from human embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **98**(19), 10716-10721.
- Kelsoe G., 1994. B cell diversification and differentiation in the periphery. *Journal of Experimental Medicine*, **180**(1), 5-6.
- Ketley N. J., Newland A. C. (1997). Haemopoietic growth factors. *Postgraduate medical journal*, **73**(858), 215-221.
- Khanna K. K., Jackson S. P. (2001). DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nature genetics*, **27**(3), 247.

- Kozák, T. (2008). Chronická lymfocytární leukemie. *Onkologie*, **2**(3), 156-162.
- Kröber A., Seiler T., Benner A., Bullinger L., Brückle E., Lichter P., Döhner H., Stilgenbauer S. (2002). VH mutation status, CD38 expression level, genomic aberrations, and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, **100**(4), 1410-1416.
- Kumaravelu P., Hook L., Morrison A. M., Ure J., Zhao S., Zuyev S., Ansell J., Medvinsky A. (2002). Quantitative developmental anatomy of definitive haematopoietic stem cells/long-term repopulating units (HSC/RUs): role of the aorta-gonad-mesonephros (AGM) region and the yolk sac in colonisation of the mouse embryonic liver. *Development*, **129**(21), 4891-4899.
- Lapalombella R., Sun Q., Williams K., Tangeman L., Jha S., Zhong Y., Goettl V., Mahoney E., Berglund C., Gupta S., Farmer A., Mani R., Johnson A. J., Lucas D., Mo X., Daelemans D., Sandanayaka V., Shechter S., McCauley D., Shacham S., Kauffman M., Chook J. M., Byrd J. C. (2012). Selective inhibitors of nuclear export show that CRM1/XPO1 is a target in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, **120**(23), 4621-4634.
- Lee J. S., Dixon D. O., Kantarjian H. M., Keating M. J., Talpaz M. (1987). Prognosis of chronic lymphocytic leukemia: a multivariate regression analysis of 325 untreated patients. *Blood*, **69**(3), 929-936.
- Lissauer T., Carroll W. (2017). Illustrated textbook of paediatrics. Elsevier Health Sciences.
- Liu Y., Ao X., Ding W., Ponnusamy M., Wu W., Hao X., Yu W., Wang Y., Li P., Wang J. (2018). Critical role of FOXO3a in carcinogenesis. *Molecular cancer*, **17**(1), 104.
- Liu Y., Corcoran M., Rasool O., Ivanova G., Ibbotson R., Grandér D., Iyengar A., Baranova A., Kashuba V., Merup M. and Wu X., Gardiner A., Mullenbach R., Poltarau A., Hultström A. L., Juliusson G., Chapman R., Tiller M., Cotter F., Gahrton G., Yankovsky N., Zabarovsky E., Einhorn S., Oscier D. (1997). Cloning of two candidate tumor suppressor genes within a 10 kb region on chromosome 13q14, frequently deleted in chronic lymphocytic leukemia. *Oncogene*, **15**(20), 2463.
- Lu G., Kong Y., Yue C. (2010). Genetic and immunophenotypic profile of IGH@ rearrangement detected by fluorescence in situ hybridization in 149 cases of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Cancer genetics and cytogenetics*, **196**(1), 56-63.
- Lucito R., Healy J., Alexander J., Reiner A., Esposito D., Chi M., Rodgers L., Brady A., Sebat J., Troge J., West J. A., Rostan S., Nguyen K. C. Q., Powers S., Ye K. Q., Olshen A., Venkatraman E., Norton L., Wigler M. (2003). Representational oligonucleotide microarray analysis: a high-resolution method to detect genome copy number variation. *Genome research*, **13**(10), 2291-2305.
- Ma D., Chen Z., Patel K. P., Mishra B. M., Yao H., Abruzzo L. V., Medeiros L. J., Wierda W., Keating M., Sargent R., Luthra R. (2011). Array comparative genomic hybridization analysis identifies recurrent gain of chromosome 2p25.3 involving the ACP1 and MYCN genes in chronic lymphocytic leukemia. *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia*, **11**, S17-S24.
- MacLennan I. C. M. (1994). Germinal centers. *Annual review of immunology*, **12**(1), 117-139.
- Maddocks K.J., Ruppert A.S., Lozanski G., Heerema N.A., Zhao W., Abruzzo L., Lozanski A., Davis M., Gordon A., Smith L.L., Mantel R., Jones J.A., Flynn J.M., Jaglowski S.M., Andritsos L.A., Awan F., Blum K.A., Grever M.R., Johnson A.J., Byrd J.C., Woyach J.A. (2015). Etiology of ibrutinib therapy discontinuation and outcomes in patients with chronic lymphocytic leukemia. *JAMA Oncology*, **1**, 80-87.
- Mak T. W., Saunders M. E., Jett B. D. (2013). *Primer to the immune response*. Newnes. ISBN 978-0-12-385245-8.

- Matutes E., Oscier D., Garcia-Marco J., Ellis J., Copplestone A., Gillingham R., Hamblin T., Lens D., Swansbury G.J., Catovsky D. (1996). Trisomy 12 defines a group of CLL with atypical morphology: correlation between cytogenetic, clinical and laboratory features in 544 patients. *British journal of haematology*, **92**(2), 382-388.
- Matutes E., Wotherspoon A., Catovsky D. (2007). Differential diagnosis in chronic lymphocytic leukaemia. *Best Practice & Research Clinical Haematology*, **20**(3), 367-384.
- Maximow, A. A. (1909). Der lymphozyt als gemeinsame stammzelle der verschiedenen blutelement in der embryonalen entwicklung und im postfetalen leben der säugetiere.
- McCarthy B. A., Boyle E., Wang X. P., Guzowski D., Paul S., Catera R., Trott J., Yan X., Croce C. M., Damle R., Yancopoulos S., Messmer B. T., Lesser M., Allen S. L., Rai K. R., Chiorazzi N. (2008). Surface expression of Bcl-2 in chronic lymphocytic leukemia and other B-cell leukemias and lymphomas without a breakpoint t (14; 18). *Molecular Medicine*, **14**(9-10), 618-627.
- Mcgowan-Jordan J. (2016). ISCN 2016: An International System for Human Cytogenomic Nomenclature (2016). Recommendations of the International Standing Committee on Human Cytogenomic Nomenclature Including New Sequence-based Cytogenetic Nomenclature Developed in Collaboration with the Human Genome Variation Society (HGVS) Sequence Variant Description Working Group. Karger.
- McGrath K. E., Frame J. M., Fromm G. J., Koniski A. D., Kingsley P. D., Little J., Bulger M., Palis J. (2011). A transient definitive erythroid lineage with unique regulation of the  $\beta$ -globin locus in the mammalian embryo. *Blood*, **117**(17), 4600-4608.
- Medvinsky A. L., Samoylina N. L., Müller A. M., Dzierzak E. A. (1993). An early pre-liver intraembryonic source of CFU-S in the developing mouse. *Nature*, **364**(6432), 64.
- Melchers F., Haasner D., Streb M., Rolink A. (1992). B-Lymphocyte Lineage-Committed, IL-7 and Stroma Cell-Reactive Progenitors and Precursors, and Their Differentiation to B Cells. In: Gupta S., Waldmann T.A. *Mechanisms of Lymphocyte Activation and Immune Regulation IV. Advances in Experimental Medicine and Biology*, **323**, 111-117. Springer, Boston, MA.
- Melchers F., Rolink A. (2001). Hematopoietic stem cells: lymphopoiesis and the problem of commitment versus plasticity. *Cold spring harbor monograph series*, **40**, 307-328.
- Messmer B. T., Albesiano E., Messmer D., Chiorazzi N. (2004). The pattern and distribution of immunoglobulin VH gene mutations in chronic lymphocytic leukemia B cells are consistent with the canonical somatic hypermutation process. *Blood*, **103**(9), 3490-3495.
- Migliaccio G., Migliaccio A. R., Petti S., Mavilio F., Russo G., Lazzaro D., Testa U., Marinucci M., Peschle C. (1986). Human embryonic hemopoiesis. Kinetics of progenitors and precursors underlying the yolk sac----liver transition. *The Journal of clinical investigation*, **78**(1), 51-60.
- Monroe J. G., Rothenberg E. (2013). Molecular biology of B-cell and T-cell development. Springer Science & Business Media.
- Moore M. A. S., Owen J. J. T. (1967). Experimental studies on the development of the thymus. *Journal of Experimental Medicine*, **126**(4), 715-726.
- Moore, M. A., & Metcalf, D. (1970). Ontogeny of the haemopoietic system: yolk sac origin of in vivo and in vitro colony forming cells in the developing mouse embryo. *British journal of haematology*, **18**(3), 279-296.
- Morrison S. J., Weissman I. L. (1994). The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. *Immunity*, **1**(8), 661-673.

- Moter A., Göbel U. B. (2000). Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, **41**(2), 85-112.
- Mráz M., Doubek M., Mayer J. (2013). Inhibice signalizace B buněčným receptorem: první cílená léčba u chronické lymfocytární leukemie a dalších B buněčných lymfomů. *Klinická onkologie*, **26**(3), 179–185
- Mulligan C. S., Thomas M. E., Mulligan S. P. (2009). Lymphocytes, B lymphocytes, and clonal CLL cells: observations on the impact of the new diagnostic criteria in the 2008 Guidelines for Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL). *Blood*, **113**(25), 6496-6497.
- Navrkalová V., Kantorová B., Jarošová M., Pospíšilová Š. (2015). Molekulární prognostické markery chronické lymfocytární leukemie a jejich klinický význam. *Klinická onkologie*, **28**(3), 3S6-3S15.
- Nečas E., Kofránek E., Krijt J., Maršálek P., Mělková Z., Prokešová L., Šimák J., Šulc K., Vokurka M. (2009). *Obecná patologická fyziologie*. Univerzita Karlova v Praze. Karolinum, 377 stran, ISBN 80-246-0051-X.
- Negrini S., Gorgoulis V. G., Halazonetis T. D. (2010). Genomic instability—an evolving hallmark of cancer. *Nature reviews Molecular cell biology*, **11**(3), 220.
- Neuberger M. S., Milstein C. (1995). Somatic hypermutation. *Current opinion in immunology*, **7**(2), 248-254.
- Nguyen L., Papenhausen P., Shao H. (2017). The role of c-MYC in B-cell lymphomas: diagnostic and molecular aspects. *Genes*, **8**(4), 116.
- Okkenhaug K., Vanhaesebroeck B. (2003). PI3K in lymphocyte development, differentiation and activation. *Nature reviews Immunology*, **3**(4), 317.
- Olsen A. L., Stachura D. L., Weiss M. J. (2006). Designer blood: creating hematopoietic lineages from embryonic stem cells. *Blood*, **107**(4), 1265-1275.
- Orkin S. H. (2000). Diversification of haematopoietic stem cells to specific lineages. *Nature Reviews Genetics*, **1**(1), 57.
- Orkin S. H., Zon L. I. (2008). Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell*, **132**(4), 631-644.
- Oscier D. G., Gardiner A. C., Mould S. J., Glide S., Davis Z. A., Ibbotson R. E., Corcoran M. M., Chapman R. M., Thomas P. W., Copplestone J. A., Orchard J.A., Hamblin T. J. (2002). Multivariate analysis of prognostic factors in CLL: clinical stage, IGVH gene mutational status, and loss or mutation of the p53 gene are independent prognostic factors. *Blood*, **100**(4), 1177-1184.
- Ouillette P., Fossum S., Parkin B., Ding L., Bockenstedt P., Al-Zoubi A., Shedden K., Malek S. N. (2010) Aggressive chronic lymphocytic leukemia with elevated genomic complexity is associated with multiple gene defects in the response to DNA double-strand breaks. *Clinical Cancer Research*, **16**, 835–847.
- Palis J., Robertson S., Kennedy M., Wall C., Keller G. (1999). Development of erythroid and myeloid progenitors in the yolk sac and embryo proper of the mouse. *Development*, **126**(22), 5073-5084.

- Passegué E., Wagers A. J., Giuriato S., Anderson W. C., Weissman I. L. (2005). Global analysis of proliferation and cell cycle gene expression in the regulation of hematopoietic stem and progenitor cell fates. *Journal of Experimental Medicine*, **202**(11), 1599-1611.
- Pfeifer D., Pantic M., Skatulla I., Rawluk J., Kreutz C., Martens U. M., Fisch P., Timmer J., Veelken H. (2007). Genome-wide analysis of DNA copy number changes and LOH in CLL using high-density SNP arrays. *Blood*, **109**(3), 1202-1210.
- Pflug N., Bahlo J., Shanafelt T. D., Eichhorst B.F., Bergmann M. A., Elter T., Bauer K., Malchau G., Rabe K.G., Stilgenbauer S., Döhner H., Jager U., Eckart M. J., Hopfinger G., Busch R., Fink A. M., Wendtner C. M., Fischer K., Kay N. E., Hallek M. (2014). Development of a comprehensive prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, **124**(1), 49-62.
- Pinkel D., Seagraves R., Sudar D., Clark S., Poole I., Kowbel D., Collins C., Kuo W. L., Chen Ch., Zhai Y., Dairkee S. H., Ljung B. M., Gray J. W., Albertson D. G. (1998). High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nature genetics*, **20**(2), 207.
- Potter K. N., Orchard J., Critchley E., Mockridge C. I., Jose A., Stevenson F. K. (2003). Features of the overexpressed V1-69 genes in the unmutated subset of chronic lymphocytic leukemia are distinct from those in the healthy elderly repertoire. *Blood*, **101**(8), 3082-3084.
- Puente X. S., Pinyol M., Quesada V., Conde L., Ordóñez G. R., Villamor N., Escaramis G., Jares P., Beà S., González-Díaz M., Bassaganyas L., Baumann T., Juan M., López-Guerra M., Colomer D., Tubío J. M. C., López C., Navarro A. (2011). Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature*, **475**(7354), 101.
- Puiggros A., Blanco G., Espinet B. (2014). Genetic Abnormalities in Chronic Lymphocytic Leukemia: Where We Are and Where We Go. *BioMed Research International*, **2014**(435983).
- Quijano S., López A., Rasillo A., Sayagués J. M., Barrena S., Sánchez M. L., Romero M., Teodosio C., Giraldo P., Giralto M., Pérez M. C., Perdiguer L., Orfao A. (2008). Impact of trisomy 12, del (13q), del (17p), and del (11q) on the immunophenotype, DNA ploidy status, and proliferative rate of leukemic B-cells in chronic lymphocytic leukemia. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, **74**(3), 139-149.
- Quintero-Rivera F., Nooraie F., Rao P. N. (2009). Frequency of 5' IGH deletions in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Cancer genetics and cytogenetics*, **190**(1), 33-39.
- Rai K. R. (1987). A critical analysis of staging in CLL. *Chronic Lymphocytic Leukemia, Recent Progress and Future Directions*, 253-264.
- Rai K. R., Peterson P. L., Appelbaum F. R., Kolitz J., Elias L., Shepherd L., Hines J., Threatte G. A., Larson R. A., Cheson B. D., Schiffer Ch. A. (2000). Fludarabine compared with chlorambucil as primary therapy for chronic lymphocytic leukemia. *New England Journal of Medicine*, **343**(24), 1750-1757.
- Rai K. R., Sawitsky A., Cronkite E. P., Chanana A. D., Levy R. N., Pasternack B. S. (1975). Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, **46**(2), 219-234.
- Redaelli A., Laskin B. L., Stephens J. M., Botteman M. F., Pashos C. L. (2004). The clinical and epidemiological burden of chronic lymphocytic leukaemia. *European journal of cancer care*, **13**(3), 279-287.

- Riches J. C., O'Donovan C. J., Kingdon S. J., McClanahan F., Clear A. J., Neuberg D. S., Werner L., Croce C. M., Ramsay A. G., Rassenti L. Z., Kipps T. J., Gribben G. J. (2014). Trisomy 12 chronic lymphocytic leukemia cells exhibit upregulation of integrin signaling that is modulated by NOTCH1 mutations. *Blood*, **123**(26), 4101-4110.
- Roberts A. W., Davids M. S., Pagel J. M., Kahl B. S., Puvvada S. D., Gerecitano J. F., Kipps T.J., Anderson M. A., Brown J. R., Gressick L., Wong S., Dunbar M., Zhu M., Desai M. B., Cerri E., Enschede S. H., Humerickhouse R. A., Wierda W. G., Seymour J. F. (2016). Targeting BCL2 with venetoclax in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *New England Journal of Medicine*, **374**(4), 311-322.
- Rothenberg E. V. (1998). Gene regulation in T-cell lineage compartment. in Molecular biology of B-cell and T-cell development. *Humana Press Inc. Totowa, N.J.*, 337-365.
- Ruiz-Pérez M. V., Henley A. B., Arsenian-Henriksson M. (2017). The MYCN protein in health and disease. *Genes*, **8**(4), 113.
- Samokhvalov I. M., Samokhvalova N. I., Nishikawa S. (2007). Cell tracing shows the contribution of the yolk sac to adult haematopoiesis. *Nature*, **446**(7139), 1056-1061.
- Seda V., Mraz M. (2015). B-cell receptor signalling and its crosstalk with other pathways in normal and malignant cells. *European journal of haematology*, **94**(3), 193-205.
- Seifert M., Reichrath J. (2006). The role of the human DNA mismatch repair gene hMSH2 in DNA repair, cell cycle control and apoptosis: implications for pathogenesis, progression and therapy of cancer. *Journal of molecular histology*, **37**(5-7), 301-307.
- Seita J., Weissman I. L. (2010). Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, **2**(6), 640-653.
- Shaffer L. G., Bejjani B. A., Torchia B., Kirkpatrick S., Coppinger J., Ballif B. C. (2007). The identification of microdeletion syndromes and other chromosome abnormalities: cytogenetic methods of the past, new technologies for the future. *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics*, **145**(4), 335-345
- Schaffner C., Stilgenbauer S., Rappold G. A., Döhner H., Lichter P. (1999). Somatic ATM mutations indicate a pathogenic role of ATM in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, **94**(2), 748-753.
- Schena M., Shalon D., Davis R. W., Brown P. O. (1995). Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*, **270**(5235), 467-470.
- Schroeder Jr. H. W., Cavacini L. (2010). Structure and function of immunoglobulins. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **125**(2), S41-S52.
- Siegel P. M., Massagué J. (2003). Cytostatic and apoptotic actions of TGF- $\beta$  in homeostasis and cancer. *Nature Reviews Cancer*, **3**(11), 807.
- Souza A. C. S., Azoubel S., Queiroz K. C. S., Peppelenbosch M. P., Ferreira C. V. (2009). From immune response to cancer: a spot on the low molecular weight protein tyrosine phosphatase. *Cellular and molecular life sciences*, **66**(7), 1140-1153.
- Strasser A., Rolink A., Melchers F. (1989). One synchronous wave of B cell development in mouse fetal liver changes at day 16 of gestation from dependence to independence of a stromal cell environment. *Journal of Experimental Medicine*, **170**(6), 1973-1986.



- Strefford J. C., Sutton L. A., Baliakas P., Agathangelidis A., Malčíková J., Plevova K., Cahill N., Pedersen L. B., di Celle P. F., Tzenou T., Geisler C., Panagiotidis P., Langerak A. W., Chiorazzi N., Pospisilova S., Oscier D., Davi F., Belessi C., Mansouri L., Ghia P., Stamatopoulos K., Rosenquis R. (2013). Distinct patterns of novel gene mutations in poor-prognostic stereotyped subsets of chronic lymphocytic leukemia: the case of SF3B1 and subset# 2. *Leukemia*, **27**(11), 2196.
- Tam C. S., Stilgenbauer S. (2015). How best to manage patients with chronic lymphocytic leukemia with 17p deletion and/or TP53 mutation? *Leukemia & lymphoma*, **56**(3), 587-593.
- Taylor A. M., Metcalfe J. A., Thick J., Mak Y. F. (1996). Leukemia and lymphoma in ataxia telangiectasia. *Blood*, **87**(2), 423-38.
- Tang G., Banks H. E., Sargent R. L., Medeiros L. J., Abruzzo L. V. (2013). Chronic lymphocytic leukemia with t (14; 18)(q32; q21). *Human pathology*, **44**(4), 598-605.
- Thompson P. A., O'Brien S. M., Wierda W. G., Ferrajoli A., Stingo F., Smith S. C., Burger J. A., Estrov Z., Jain N., Kantarjian H. M., Keating M. J. (2015). Complex karyotype is a stronger predictor than del (17p) for an inferior outcome in relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia patients treated with ibrutinib-based regimens. *Cancer*, **121**(20), 3612-3621.
- Thomson J. A., Odorico J. S. (2000). Human embryonic stem cell and embryonic germ cell lines. *Trends in Biotechnology*, **18**(2), 53-57.
- Ticchioni M., Essafi M., Jeandel P. Y., Davi F., Cassuto J. P., Deckert M., Bernard A. (2007). Homeostatic chemokines increase survival of B-chronic lymphocytic leukemia cells through inactivation of transcription factor FOXO3a. *Oncogene*, **26**(50), 7081.
- Tobin G., Thunberg U., Johnson A., Thörn I., Söderberg O., Hultdin M., Roos G., Botling J., Enblad G., Sällström J., Sundström C., Rosenquist R. (2002). Somatically mutated Ig VH3-21 genes characterize a new subset of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, **99**(6), 2262-2264.
- Turner J. G., Dawson J., Sullivan D. M. (2012). Nuclear export of proteins and drug resistance in cancer. *Biochem Pharmacol*, **83**, 1021-1032.
- Urbankova H., Papajik T., Plachy R., Holzerova M., Balcarkova J., Divoka M., Prochazka V., Pikalova Z., Indrak K., Jarosova M. (2014). Array-based karyotyping in chronic lymphocytic leukemia (CLL) detects new unbalanced abnormalities that escape conventional cytogenetics and CLL FISH. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of Palacky University in Olomouc*, **158**(1).
- Uziel T., Savitsky K., Platzer M., Ziv Y., Helbitz T., Nehls M., Boehm T., Rosenthal A., Shiloh Y., Rotman G. (1996). Genomic organization of the ATM gene. *Genomics*, **33**(2), 317-320.
- Van Dyke D. L., Shanafelt T. D., Call T. G., Zent C. S., Smoley S. A., Rabe K. G., Schwager S. M., Sonbert J. C., Slager S. L., Kay N. E. (2010). A comprehensive evaluation of the prognostic significance of 13q deletions in patients with B-chronic lymphocytic leukaemia. *British journal of haematology*, **148**(4), 544-550.
- Vinolas N., Reverter J.C., Urbano-Ispizua A., Montserrat E., Rozman C. (1987). Lymphocyte doubling time in chronic lymphocytic leukemia: an update of its prognostic significance. *Blood cells*, **12**(2), 457-470.
- Vogelstein B., Lane D., Levine A. J. (2000). Surfing the p53 network. *Nature*, **408**(6810), 307.
- Volpi E. V., Bridger J. M. (2008). FISH glossary: an overview of the fluorescence in situ hybridization technique. *Biotechniques*, **45**(4), 385-409.

- Wattel E., Preudhomme C., Hecquet B., Vanrumbeke M., Quesnel B., Dervite I., Morel P., Fenaux P. (1994). p53 mutations are associated with resistance to chemotherapy and short survival in hematologic malignancies. *Blood*, **84**(9), 3148-3157.
- Weinberg R.A. (1995). The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*, **81**(3), 323-330.
- Wierda W.G., O'Brien S., Wang X., Faderl S., Ferrajoli A., Do K.A., Cortes J., Thomas D., Garcia-Manero G., Koller C., Beran M., Giles F., Ravandi F., Lerner S., Kantarjian H., Keating M. (2007). Prognostic nomogram and index for overall survival in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, **109**(11), 4679-4685.
- Wiestner A., Rosenwald A., Barry T. S., Wright G., Davis R. E., Henrikson S. E., Stetler-Stevenson M., Zhao H., Ibbotson R. E., Orchard J. A., Davis Z., Raffeld M., Arthur D. C., Marti G. E., Wilson W. H., Hamblin T. H., Oscier D. G., Staudt L. M. (2003). ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile. *Blood*, **101**(12), 4944-4951.
- Winkel G. K., Pedersen R. A. (1988). Fate of the inner cell mass in mouse embryos as studied by microinjection of lineage tracers. *Developmental Biology*, **127**(1), 143-156.
- Wlodarska I., Matthews C., Veyt E., Pospisilova H., Catherwood M. A., Poulsen T. S., Vanhentenrijk V., Ibbotson R., Vandenberghe P., Morris T. C. M., Alexander H. D. (2007). Telomeric IGH losses detectable by fluorescence in situ hybridization in chronic lymphocytic leukemia reflect somatic VH recombination events. *The Journal of molecular diagnostics: JMD*, **9**(1), 47-54.
- Xu M. J., Matsuoka S., Yang F. C., Ebihara Y., Manabe A., Tanaka R., Eguchi M., Asano S., Nakahata T., Tsuji K. (2001). Evidence for the presence of murine primitive megakaryocytopoiesis in the early yolk sac. *Blood*, **97**(7), 2016-2022.
- Yoshimoto M., Montecino-Rodriguez E., Ferkowicz M. J., Porayette P., Shelley W. C., Conway S. J., Dorshkind K., Yoder M. C. (2011). Embryonic day 9 yolk sac and intra-embryonic hemogenic endothelium independently generate a B-1 and marginal zone progenitor lacking B-2 potential. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **108**(4), 1468-1473.
- Zimmer C., Wähnert U. (1986). Nonintercalating DNA-binding ligands: specificity of the interaction and their use as tools in biophysical, biochemical and biological investigations of the genetic material. *Progress in biophysics and molecular biology*, **47**(1), 31-112.

## 8 Internetové zdroje

Agilent, Chemical Analysis, Life Sciences and Diagnostics. *Chemical Analysis, Life Sciences, and Diagnostics, Agilent* [online]. Copyright © [cit. 28.01.2019]. Dostupné z: [https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/G441090010\\_CGH\\_Enzymatic\\_7.5.pdf](https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/G441090010_CGH_Enzymatic_7.5.pdf).

ALOGO s.r.o. - vybavení genetických a cytogenetických laboratoří. *ALOGO s.r.o. - vybavení genetických a cytogenetických laboratoří* [online]. Copyright © 2012 ALOGO s.r.o. [cit. 14.02.2019]. Dostupné z: <http://www.alogo.cz/search/web/>.

Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology [online]. Copyright © [cit. 29.02.2019]. Dostupné z: [http://atlasgeneticsoncology.org/Indexbychrom/idxa\\_2.html](http://atlasgeneticsoncology.org/Indexbychrom/idxa_2.html).

Forskning - Göteborgs universitet. *Institutionen för medicin - start - Göteborgs universitet* [online]. Copyright © [cit. 15.02.2019]. Dostupné z: <https://medicine.gu.se/arif/gruppledare/martensson/forskning>.

Genome Decoration Page. *National Center for Biotechnology Information* [online]. Copyright © [cit. 16.01.2019]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/tools/gdp>.

Horner M. J., Ries L. A. G, Krapcho M., Neyman N., Aminou R., Howlader N., Altekruse S. F., Feuer E. J., Huang L., Mariotto A., Miller B. A., Lewis D. R., Eisner M. P., Stinchcomb D. G., Edwards B. K. (2009). *SEER Cancer Statistics Review, 1975-2006: National Cancer Institutem, Bethesda, MD* [online]. 2009 [cit. 4.3.2019]. Dostupné z: [https://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2006/](https://seer.cancer.gov/csr/1975_2006/).

IMGT Repertoire (IG and TR). *IMGT Home page* [online]. Copyright © [cit. 13.01.2019]. Dostupné z: <http://www.imgt.org/IMGTrepertoire/index.php?section=LocusGenes&repertoire=chromosomes&species=human&group=IGH>.

International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems 10th Revision. *ICD WHO* [online]. 2010 [cit. 29.01.2019]. Dostupné z: <https://icd.who.int/browse10/2010/en#/C91.1>.

Sigma-Aldrich: Hematopoietic Cytokines [online]. Darmstadt, Germany [cit. 27.12.2018]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biofiles/hematopoietic-cytokines.html>.