

Univerzita Palackého v Olomouci

Lékařská fakulta



Doktorská disertační práce

Univerzita Palackého v Olomouci  
Lékařská fakulta

Využití sekvenování nové generace  
u myeloidních malignit

Doktorská disertační práce

### Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto disertační práci vypracovala samostatně pod vedením svého školitele doc. MUDr. T. Szotkowského, PhD. s využitím uvedených literárních zdrojů. V práci jsou uvedeny výsledky mé vlastní výzkumné práce vykonané v Laboratoři molekulární biologie Hemato-onkologické kliniky FN a LF UP Olomouc.

V Olomouci dne 30. 9. 2022

Jana Navrátilová

## Poděkování

Tímto bych velice ráda poděkovala svému školiteli doc. MUDr. Tomáši Szotkowskému PhD. za odborné vedení v průběhu celého mého studia, za poskytnuté rady a připomínky při zpracovávání této práce. Dále bych ráda poděkovala MUDr. Miroslavě Palové, PhD. za konzultaci a rady při interpretaci klinických poznatků u myelofibróz a Mgr. Tomáši Füstovi, PhD. za zpracování statistických analýz u myelofibróz. Děkuji Mgr. Heleně Urbánkové, PhD. a Mgr. Beátě Katrincsákové, PhD. za podporu v odborné laboratorní sekci a Mgr. Tomáši Hronovi, PhD. za podporu v oblasti bioinformatiky. Na závěr bych ráda vyjádřila svůj dík mým rodičům, kteří mě po celou dobu studia podporovali.

Práce byla podporována studentskými granty IGA-LF-UP 2016 - 2021.

## Souhrn

Myeloidní malignity zahrnují velké množství klinicky, biologicky a geneticky odlišných onemocnění, jako jsou akutní myeloidní leukémie, myeloproliferativní neoplázie, myelodysplastické syndromy a další. Diagnostika jednotlivých typů onemocnění se v současnosti opírá o morfologické, imunofenotypové, genetické a molekulárně biologické znalosti, které současně umožňují prognosticky stratifikovat jednotlivé pacienty. Nespornou výhodou znalostí přítomnosti specifických mutací u jednotlivých onemocnění je možnost vybrat optimální způsob léčby především na cílené terapie a využít ji také tam, kde může potencovat léčebný účinek konvenční chemoterapie. Napomáhá odhalit pacienty s potenciálně rizikovým onemocněním, kteří by měli na základě současných doporučení podstoupit alogenní transplantaci krvetvorných buněk.

Cílem této disertační práce bylo zavedení a optimalizace cíleného panelu ClearSeq AML (Agilent) pro sledování mutací v genech, jež mají podíl na patogenezi myeloidních malignit, a které se běžně v rutinní praxi nevyšetřují. Jejich detekce upřesňuje diagnostiku, ale především prognostickou stratifikaci pacientů s myeloproliferativními neopláziami a akutními myeloidními leukémiemi. U vybraných pacientů s akutní myeloidní leukémií jsme sledovali přítomnost specifických mutací v době diagnózy a porovnávali vývoj onemocnění na základě přítomnosti jednotlivých mutací ve vzorcích z průběhu léčby, abychom odhalili potenciální příčiny relapsů či rezistence onemocnění. U pacientů s diagnostikovanou akutní myeloidní leukémií s prognosticky příznivým onemocněním podle European Leukaemia Net 2017, jejichž průběh onemocnění byl netypický, jsme se zaměřili na podrobnější molekulární analýzu pomocí celoexomového sekvenování.

V předložené práci byl analyzován rozšířený mutační profil u 54 pacientů s akutní myeloidní leukémií s mutací v *NPM1* genu a 88 pacientů s verifikovanou myelofibrózou. Preleukemické mutace v době diagnózy byly detekovány u 46/54 pacientů s akutní myeloidní leukémií (85 %) a 41/88 pacientů s myelofibrózou (46 %). Nejčastějšími mutacemi v souboru akutních myeloidních leukémií byly mutace v genu *DNMT3A* (28/54), následně *NRAS* (16/54), *IDH2* (12/54), *IDH1* (9/54). *Passenger* mutace byly detekovány u 22/41 pacientů s primární myelofibrózou, u 4/16 pacientů v prefibrotickém stádiu myelofibrózy a u 15/31 pacientů se sekundární myelofibrózou,

což odpovídá frekvenci 53 %, 25 % a 48 %. Nejčastěji se v souboru myelofibróz vyskytovaly mutace v genech *ASXL1*, *TET2*, *SF3B1* a *U2AF1*. U *triple* negativních pacientů překvapivě ani sekvenování nové generace neodhalilo další subklonální změny. U pacientů s nízkým rizikem onemocnění byly mutace detekovány pouze sporadicky. Tito pacienti byli mladší a měli delší celkové přežití. Nejvyšší podíl nemocných s nízké rizikovým onemocněním byl právě ve skupině pacientů s prefibrotickým stádiem myelofibrózy. Nejpočetnější skupina (DIPSS INT-1) myelofibróz obsahovala pacienty, jejichž věk při diagnóze byl výrazně vyšší a měli kratší celkové přežití. Nejvyšší podíl mutací byl detekován u pacientů s DIPSS INT-2. Celoxomové sekvenování se prozatím využívá spíše na poli výzkumu. S jeho využitím byla sledována přítomnost mutací v genech zapojených v základních signálních drahách a dráze odpovědi buňky na DNA poškození (základní tumor supresorové geny, protoonkogeny). U všech pěti vybraných pacientů s akutní myeloidní leukémií celoxomová sekvenace odhalila mutace, zapojené ve výše zmíněných buněčných procesech. Zapojení těchto konkrétních mutací nemá v současnosti zatím jasně prokázaný význam, ale v konkrétním kontextu mohou tyto nálezy mít svůj vliv na průběh onemocnění.

Potvrzení přítomnosti mutací v prognosticky významných genech u pacientů s myeloidními malignitami zlepšuje diagnostickou i léčebnou úroveň tím, že zpřesňuje prognostické hodnocení a ve specifických případech může vést k úpravě léčebné strategie. Přítomnost mutací v době diagnózy napomáhá odhalit pacienty s rizikovějším onemocněním. Preleukemické mutace jsou molekulárními markery klonality a umožňují také potvrdit přítomnost klonální hematopoézy u pacientů, u nichž základními vyšetřovacími metodami nebyla žádná mutace potvrzena (*triple* negativní myeloproliferativní neoplázie). Mutace v těchto genech jsou spojovány s horší prognózou onemocnění. Jejich vysoká frekvence bývá zachycena u pacientů, u nichž došlo k progresi či transformaci choroby.

#### Klíčová slova

Akutní myeloidní leukémie, myeloproliferativní neoplázie, sekvenování nové generace, molekulární profilování, celkové přežití, relaps, myelofibróza

## Summary

Myeloid malignancies include a large number of clinically, biologically and genetically distinct diseases, such as acute myeloid leukemia, myeloproliferative neoplasia and myelodysplastic syndrome. Their diagnosis currently relies on morphological, immunophenotypic, genetic and molecular biological knowledge, which also allows prognostic stratification and risk evaluation of individual patients. The knowledge of specific mutations enables to select the optimal treatment, especially in targeted therapy, which can potentiate the curative effect of basic chemotherapy. In some cases, it helps to identify patients with potentially high-risk disease, who should undergo allogeneic hematopoietic cell transplantation on the basis of current recommendations.

The aim of this thesis was to implement and optimize the ClearSeq AML (Agilent) targeted panel for monitoring mutations in genes involved in the pathogenesis of myeloid malignancies, which were not routinely tested. Their confirmation affirms the diagnosis and promotes the prognostic stratification of patients with myeloproliferative neoplasms and acute myeloid leukemias. In selected group of patients with acute myeloid leukemia, we monitored the presence of specific mutations at the time of diagnosis. Then we compared them with the samples from disease progressions. We were searching for the reason of potential causes of relapse or disease resistance. In patients diagnosed with acute myeloid leukaemia with prognostically favourable disease according to European Leukaemia Net 2017, whose disease course was atypical, we focused on more detailed molecular analysis using whole-exome sequencing.

This thesis deals with analysis of the extended mutational profile in 54 patients with acute myeloid leukemia with mutation in nucleophosmin gene and 88 patients with verified myelofibrosis. Preleukemic mutations at the time of diagnosis were detected in 46/54 patients with acute myeloid leukemia (85%) and 41/88 patients with myelofibrosis (46%). The most frequent mutations in the acute myeloid leukemia cohort were mutations in the *DNMT3A* gene (28/54), followed by *NRAS* (16/54), *IDH2* (12/54) and *IDH1* (9/54).

Passenger mutations were detected in 22/41 patients with primary myelofibrosis, in 4/16 patients with prefibrotic state of primary myelofibrosis and in 15/31 patients

with secondary myelofibrosis, corresponding to 53%, 25% and 48%, respectively. Mutations in *ASXL1*, *TET2*, *SF3B1* and *U2AF1* genes were the most frequent in the cohort. Surprisingly, next generation sequencing did not reveal additional subclonal mutations in triple negative patients. Mutations were only sporadically detected in patients with low risk disease. These patients were younger and had longer overall survival. The highest proportion of patients with low risk disease was in the group of patients with prefibrotic state in primary myelofibrosis. The largest group contained patients with DIPSS intermediate-1 whose age at diagnosis was significantly higher and had a shorter overall survival. The highest proportion of mutations was detected in patients with DIPSS intermediate-2.

Nowadays, whole-exome sequencing is more often used in the basic research. We focused on finding mutations in genes involved in essential signaling pathways and the DNA damage response. In all five selected patients with acute myeloid leukemia, whole exome sequencing revealed mutations involved in the cellular processes mentioned above. The impact of these mutations is not yet clearly established. But in a specific context these findings may have an impact on the course of the disease in specific patients.

Confirming the presence of mutations in prognostically important genes in patients with myeloid malignancies improves the establishment of diagnosis and affects the therapeutic strategy by refining the prognostic assessment. It may lead to a modification of the treatment strategy in specific cases. The presence of mutations at the time of diagnosis helps to identify patients with high risk disease. Preleukemic mutations alone are molecular markers of disease clonality. They also allow confirmation of the presence of clonal hematopoiesis in patients in whom no driver mutation has been confirmed by basic testing (triple negative myeloproliferative neoplasm). In general, mutations in these genes are associated with a worse prognosis of the disease. Their high frequency tends to be detected in patients with progression or transformation of the disease.

#### Keywords

Acute myeloid leukaemia, Myeloproliferative neoplasia, Next generation sequencing, Molecular profiling, Overall survival, Relaps, Myelofibrosis



## Seznam použitých zkratek

AML	Akutní myeloidní leukémie
AR	Allelic ratio
C+	Cytoplasmatický
CML	Chronická myeloidní leukémie
CMMoL	Chronická myelomonocytární leukémie
CNV	Copy number variant
CR	Complete remission
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DIPSS	Dynamic International Prognostic Scoring System
DM	Double mutant
ET	Essential thrombocythemia
ELN	European leukaemia net
EtOH	Ethanol
FFPE	Formalin-fixed, paraffin embedded
Gb	Giga base
GIPSS	Genetically inspired prognostic scoring system
Hg	Human genome
HSC	Hematopoietic stem cell
HR	High risk
INT-1/2	Intermediate -1/2
ITD	Internal tandem duplication
LFS	Leukemia free survival
LR	Low risk
LSC	Leukaemic stem cell
MDS	Myelodysplastický syndrom
MM	Master mix
MPN	Myeloproferativní neoplázie
MRD	Minimální reziduální nemoc
MYSEC	Myelofibrosis secondary
NCCN	National comprehensive cancer network
NGS	Next generation sequencing
NK	Normální karyotyp

OS	Overall survival
PCR	Polymerase chain reaction
PDGFR	Platellet derived grow factor receptor
Ph- MPN	Philadelphia chromosome-negative myeloproliferative neoplasm
PMF/ MF	Primary myelofibrosis/ myelofibrosis
prePMF	Prefibrotic phase of PMF
PV	Polycythemia vera
RNA	Ribonukleová kyselina
RS	Ring sideroblast (prstenčitý sideroblast)
RT	Room temperature
RT-PCR	Reverse transcription PCR
rpm	Rotation per minute
SBS	Sequencing by synthesis
SBL	Sequencing by ligation
SMRT	Single molecule real time
SNV	Single nucleotide variant
TKB	Transplantace krvetvorných buněk
TKD	Tyrosine kinase domain
TS	Targeted sequencing
UTR	Untranslated region
VCF	Variant calling file
VUS	Variant of unknown significance
WES	Whole exome sequencing
WGS	Whole genome sequencing
WHO	World Health Organization
WT	Wild type

## Názvy genů

<i>ABL1</i>	Abelson murine leukaemia 1
<i>ALK</i>	Anaplastic lymphoma kinase
<i>APC</i>	Adenomatous polyposis coli
<i>ASXL1</i>	Additional Sex Combs Like Transcriptional Regulator 1
<i>BCR</i>	Breakpoint cluster region
<i>CALR</i>	Calreticulin
<i>CBF</i>	Core binding factor
<i>CBL</i>	Cbl proto-oncogene
<i>CEPBA</i>	CCAAT enhancer binding protein alpha
<i>CHEK2</i>	Checkpoint kinase 2
<i>CTNNB1</i>	Beta catenin 1
<i>DNMT</i>	DNA methyltransferase
<i>EZH2</i>	Enhancer of zeste 2 polycomb repressive complex 2 subunit
<i>FLT3</i>	FMS related tyrosine kinase 3
<i>IDH1/2</i>	Isocitrate dehydrogenase
<i>JAK2</i>	Janus kinase 2
<i>KIT</i>	KIT proto-oncogene receptor tyrosine kinase
<i>MPL</i>	MPL Proto-Oncogene, Thrombopoietin Receptor
<i>MYH11</i>	Myosin heavy chain 11
<i>MSH3</i>	DNA Mismatch Repair Protein Msh2
<i>NPM1</i>	Nucleophosmin
<i>RAD21</i>	Sister Chromatid Cohesion 1
<i>RAS</i>	Ras oncogene
<i>RUNX1</i>	Runt related transcription factor 1
<i>RUNXT1</i>	RUNX1 Partner Transcriptional Co-Repressor 1
<i>SF3B1</i>	Splicing factor 3b subunit 1
<i>SH2B3</i>	SH2B adaptor protein 3
<i>SRSF2</i>	Serine/arginine-rich splicing factor 2
<i>STAT</i>	Signal transducer and activator of transcription
<i>U2AF1</i>	U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1
<i>TET2</i>	Tetmethylcytosinedioxygenase 2
<i>TOP2A</i>	Topoisomerase 2A
<i>TP53</i>	Tumor protein p53

<i>U2AF1</i>	U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1
<i>WNT</i>	Wingless
<i>WT</i>	Wilms tumour

## Obsah

1.	Úvod.....	15
2.	Myeloidní malignity.....	15
2.1.	Akutní myeloidní leukémie.....	16
2.1.1.	Význam mutací u AML při diagnostice a prognostické stratifikaci.....	17
2.2.	Ph-negativní myeloproliferativní neoplázie.....	19
2.2.1.	Primární myelofibróza.....	20
2.3.	Sekvenování nové generace - next generation sequencing.....	21
2.3.1.	Sekvenační přístupy - WES, WGS, TS.....	22
2.3.2.	Amplikonové vs. hybridizační metody.....	24
2.3.3.	Sekvenování dlouhých readů - třetí generace.....	27
3.	Cíle práce.....	28
4.	Soubor pacientů.....	29
4.1.	Soubor pacientů s AML.....	29
4.2.	Soubor pacientů s myelofibrózou.....	29
4.3.	Informovaný souhlas.....	29
5.	Materiál a metody.....	30
6.	Sekvenování nové generace – postup.....	31
6.1.	Haloplex HS - ClearSeq AML panel.....	31
6.2.	Pracovní postup Haloplex HS 1-500 kb ILMFST.....	32
6.3.	Pracovní postup SureSelect XT HS - Human All Exon V7.....	37
7.	Výsledky.....	42
7.1.	Sledování rozšířeného mutačního profilu u pacientů s AML s mutací v genu <i>NPM1</i> v době diagnózy.....	42
7.2.	Sledování klonálního vývoje u pacientů s AML s mutací v <i>NPM1</i> genu.....	44
7.3.	Sledování mutačního profilu u pacientů s myelofibrózou.....	46
7.4.	Exomové sekvenování u pacientů s relabující/rezistentní akutní myeloidní leukémií.....	51
7.4.1.	UJ 1955 – Dg 12/2014.....	51
7.4.2.	KA1975 – Dg 10/2016.....	53
7.4.3.	SS 1975 – Dg 02/2017.....	54
7.4.4.	BI 1965 – Dg 02/2018.....	55
7.4.5.	WM 1970 – Dg 05/2016.....	56
8.	Diskuze.....	58
9.	Závěr.....	66
10.	Seznam tabulek, grafů, obrázků.....	68
11.	Literární zdroje.....	70

12.	Seznam publikací autora .....	75
-----	-------------------------------	----

## 1. Úvod

Všechny živé organismy jsou neustále ovlivňovány svým okolím. Na jejich tkáň i samotné buňky působí celá řada vnějších i vnitřních činitelů, které narušují jejich genomovou integritu. Přitom zachování celistvosti genomu je klíčové pro přenos nezměněné genetické informace do dalších generací, stejně tak jako pro správné fungování celého organismu. Každá buňka proto disponuje specializovanými mechanismy (sít' proteinů), jež mají za úkol nejen sledovat neporušenost genetické informace, ale především signalizovat přítomnost poškození DNA, a to následně opravovat, je-li to možné. Dojde-li ke kritickému narušení důležitých buněčných pochodů, jako jsou řízení buněčného cyklu, apoptóza (řízená buněčná smrt) či oprava poškození DNA, v buňce může dojít k nádorové transformaci. Základní mechanismy podílející se na nádorové transformaci buněk jsou mutace, které vyřazují z funkce tumor supresorové geny, nadměrná exprese protoonkogenů či aberantní epigenom. Díky přítomnosti těchto abnormálních genetických změn ve svém jádře se normální hematopoetické kmenové buňky (HSC – *hematopoietic stem cell*) stávají leukemickými (LSC – *leukaemic stem cell*). Každé onkologické onemocnění, včetně hematogických malignit, má genetický podklad.

## 2. Myeloidní malignity

Tato skupina onemocnění zahrnuje řadu klinicky, biologicky a geneticky odlišných nemocí, které se vyskytují především u starší populace. S rostoucím věkem se jejich incidence zvyšuje. Poruchou HSC či progenitoru myeloidní řady vznikají chronická i akutní onemocnění jako např. akutní myeloidní leukémie (AML), myeloproliferativní neoplázie (MPN) či myelodysplastický syndrom (MDS). Ne všechny jednotky jsou z klinického a morfoloického hlediska jasně definovatelné. Příkladem jsou myelodysplasticko-myeloproliferativní onemocnění (MDS/MPN) nesoucí znaky obou typů onemocnění výše zmíněných. Navíc, některá onemocnění mohou postupem času transformovat jedno ve druhé (přechod Polycytémia vera v postpolycytemickou myelofibrózu a následně AML). Některé rysy (hypercelularita kostní dřene, porucha diferenciac, různý stupeň dysplázie) těchto jednotek jsou obdobné. Současná klasifikace této skupiny onemocnění vychází z revidované WHO (World Health Organisation) klasifikace z roku 2022 (Khoury *et al.*, 2022).

Prognostická stratifikace pacientů je založena na doporučeních mezinárodních odborných organizací (např. NCCN, ELN) a pro jednotlivá onemocnění jsou vypracovány systémy hodnotící prognostické rizikové faktory (např. DIPSS, MYSEC-MF u myelofibrózy). Jednotlivé (pod)skupiny mají různou prognózu, přežívání i vlastní léčebné strategie. U některých skupin onemocnění byly nalezeny specifické kauzální "driver" mutace. Nejčastější je *JAK2*<sup>V617F</sup> u Ph–negativních MPN.

Cíleným sekvenováním technologií *Next Generation Sequencing* (NGS) se poznatky o přítomnosti dalších genetických i negenetických změn v genomech nádorových buněk podstatně rozšířily. Kromě kauzálních mutací je možné v širokém spektru myeloproliferativních onemocnění detekovat velké množství dalších preleukemických tzv. "passenger" mutací. Ty se podílí především na epigenetické regulaci genové exprese, sestřihu a procesování RNA transkriptů či jiných dějích. Některé z nich mají potenciální prognostický význam. U některých těchto genů je důležité, u které diagnózy jsou detekovány. Pak se významně liší jejich prognostický význam. Příkladem může být gen *SF3B1*, jehož přítomnost u MDS s prstenčitými sideroblasty je spojena s nízkou rizikovým onemocněním (Papaemmanuil *et al.*, 2013) a naopak u Ph–negativních MPN se jedná o nepříznivý prognostický marker (Zhao *et al.*, 2020).

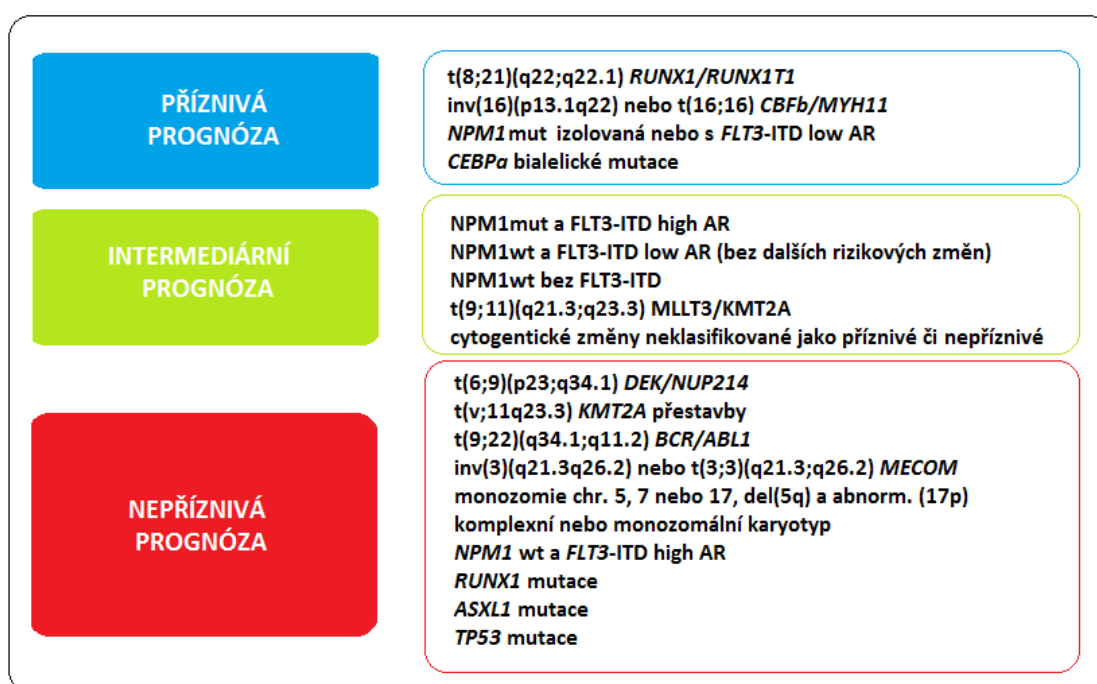
### **2.1. Akutní myeloidní leukémie**

Incidence AML v České republice je 3–4 případy na 100 000 obyvatel za rok s mediánem věku 65–70 let při diagnóze (Krejčí *et al.*, 2018). Typickým rysem AML je přítomnost nezralých hematopoetických buněk (myeloblastů) v kostní dřeni, které jsou klonálního původu a obvykle vykazují vysokou proliferační aktivitu. Postupně utlačují fyziologickou hematopoézu, přičemž důsledkem jsou nespecifické klinické příznaky vyplývající z nedostatečné produkce jednotlivých složek krve způsobené tímto útlakem.

Pětileté přežití ve skupině mladších nemocných (do 55 let) se průměrně pohybuje okolo 40–45 % (Kantarjian *et al.*, 2021). V dílčích prognostických podskupinách AML do 65 let je pak 64 %, 41 % a 11 % u AML s příznivou, střední a nepříznivou prognózou (Dohner *et al.*, 2017). Vyšetření karyotypu a molekulárních změn v době diagnózy je nezbytné pro správnou klasifikaci konkrétního typu onemocnění a přesnou stratifikaci pacienta k následné léčbě. Na základě přítomnosti specifické chromozomální změny či mutace rozděluje ELN (*European Leukaemia Net*)



pacienty do 3 základních prognostických skupin (Obr. 1). Ty reflektují pravděpodobnost dosažení kompletní remise (CR – *complete remission*) i pravděpodobnost vzniku relapsu po léčbě. Pacienti s nízké rizikovým onemocněním s příznivou prognózou tak podstupují intenzivní chemoterapii obvykle v kombinaci s cílenou léčbou monoklonálními protilátkami (gentuzumab ozogamicin), případně s inhibítorem FLT3 (midostaurin) v případě přítomnosti příslušných cílových struktur (povrchových antigenů a receptorů) na nádorových buňkách, bez nutnosti následné alogenní transplantace krvetvorných buněk (TKB). Pacienti se střední či nepříznivou prognózou jsou po chemoterapii obvykle indikováni k TKB.



Obrázek č. 1: Prognostická klasifikace AML podle ELN 2017

(převzato a upraveno podle Döhner *et al.*, 2017)

### **2.1.1 Význam mutací při diagnostice a prognostické stratifikaci u AML**

Genetickou podstatou nejen AML jsou chromozomální změny v karyotypu (monozomie, trizomie, translokace, komplexní změny) a mutace v genech podílejících se na regulaci normální hematopoézy. Prakticky jsou mutace rozdělovány do dvou základních skupin. Do první se řadí fúzní geny vznikající především z transkripčních faktorů (*RUNX1*, *CBFβ*). Ty díky fúzi nefungují správně a jejím důsledkem je narušená exprese podřízených diferenciačních genů. Do této skupiny náleží především tzv. *CBF*

leukémie (*core binding factor*; *RUNX1/RUNX1T1* a *CBFβ/MYH11*) a akutní promyelocytární leukémie s translokací  $t(15;17)(PML/RAR\alpha)$ . Přiřazovány sem bývají i AML s bialelickou mutací v genu *CEBPα<sup>dm</sup>* či izolovanou mutací v *NPM1<sup>c+</sup>/FLT3<sup>wt</sup>*. Tato skupina AML má primárně příznivou prognózu a pacienti profitují z intenzivní chemoterapeutické léčby. K alogenní transplantaci se přistupuje pouze v případech, objeví-li se relaps onemocnění. Na základě recentních poznatků se i v rámci této skupiny nově vyčleňují *high risk* (HR) nemocní (Heusser *et al.*, 2021). Jedná se o pacienty, u nichž je opakovaně detekována přítomnost molekulárního markeru reflektujícího přítomnost minimální reziduální choroby (MRD, *minimal residual disease*).

Druhá skupina je tvořena mutacemi v genech, jejichž podstatou je tyrozin kinázová aktivita (*FLT3*, *RAS*, *c-KIT*). Jsou zodpovědné za nadměrnou proliferační aktivitu postižených buněk. Tyto AML mají nepříznivou prognózu a jsou indikováni k TKB. Dnes se vyčleňuje ještě třetí a neméně důležitá skupina genů podílející se na nádorové transformaci HSC. Jedná se o epigenetické regulátory. Mutace v těchto genech jsou detekovány až u 40 % AML (Bewersdorf *et al.*, 2019). Vyskytují se především v kombinaci s jinou kauzální mutací. Považovány jsou za "předchůdce" leukemických buněk, což potvrzuje i jejich přítomnost ve vzorcích z doby kompletní remise, kdy kauzální mutace detekovány nejsou (Ravandi *et al.*, 2018).

Terapeutická strategie u pacientů s prognosticky nepříznivými změnami se ani na základě dalších informací příliš nezmění. Tito pacienti, splní-li ostatní indikační kritéria, budou směřováni k TKB. Podrobnější molekulární profil by jistě přinesl výhody u pacientů s příznivou prognózou, např. s izolovanou mutací v nukleofosminu (*NPM1<sup>c+</sup>/FLT3<sup>wt</sup>*) případně u AML s *NPM1<sup>c+</sup>* a nízkým alelickým poměrem *FLT3-ITD<sup>low</sup>* (AR < 0,5). *NPM1<sup>c+</sup>* je nejčastější mutací u AML s NK vyskytující se ve frekvenci 50–60 % a 30 % z celkového počtu všech AML (Fallini *et al.*, 2005). Pacienti s tímto subtypem AML velmi dobře reagují na podanou indukční léčbu (Marcucci *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2014), ale i v této skupině se navzdory příznivé prognóze objevují relapsy onemocnění (Bertoli *et al.*, 2020; Höllein *et al.*, 2018).

## **2.2. Ph-negativní myeloproliferativní neoplázie**

Myeloproliferativní neoplázie (MPN) byly dříve označované jako myeloproliferativní onemocnění (MPD, *myeloproliferative diseases*). Kategorie myeloproliferativních neoplázií dle WHO 2022 zahrnuje osm jednotek. Termín MPN je v současnosti využíván především k označení tří klasických Ph-negativních forem onemocnění (pravé polycytémie – PV, esenciální trombocytémie – ET a primární myelofibrózy – PMF). První označení pochází z roku 1951 a jeho autorem je známý americký hematolog W. Dameshek. Již tehdy předpokládal, že za zvýšenou proliferací u těchto onemocnění stojí ještě neznámý činitel. Dnes již víme, že příčinou jsou tzv. „*driver*“ mutace v genech *JAK2*, *CALR* či *MPL*. Ty hrají primární roli v proliferaci, diferenciaci a apoptóze. Způsobují nádorovou transformaci hematopoetických prekursorů, což vede ke zvýšenému přežívání a klonální proliferaci. Zároveň je u takto postižených buněk snížena či úplně potlačena schopnost apoptózy, ale diferenciaci do terminálních buněčných stádií zůstává zachována. Výsledkem je zmnožení krevních elementů v jedné nebo více řadách vedoucí k trombocytóze u ET, dominující polyglobulii u PV či změnám v krevním obraze u PMF, které odráží pokročilost onemocnění.

Diagnostika MPN prošla velkým vývojem. V minulosti se v zásadě opírala o klinický obraz daného onemocnění a výše zmíněné nálezy v krevním obraze (Campr, 2011). Histologické vyšetření kostní dřeně tvoří nedílnou součást diagnostického procesu a patří k základním diagnostickým kritériím u většiny stavů. Na rozdíl od CML, u které Peter Nowell a D. A. Hungerford objevili, a jako první popsali, specifickou změnu – fúzní gen *BCR/ABL1* vznikající na tzv. Filadelfském chromozomu, mohou být zbývající jednotky (PV, PMF, ET) klinicky podobné. Diagnostiku neulehčuje ani existence různých přechodových forem mezi těmito onemocněními. Díky rozvoji molekulární biologie a genetiky byly v minulosti objeveny a verifikovány mutace v různých genech, které mají podíl na správném průběhu metabolických i signálních drah v myeloidních elementech. Velký zlom v diagnostice a biologii myeloproliferativních chorob přinesl objev tzv. „aktivační“ bodové mutace *V617F* v genu pro Janusovu kinázu (*JAK2*) čtyřmi výzkumnými týmy v roce 2005 (Levine *et al.*, 2005; Baxter *et al.*, 2005; James *et al.*, 2005; Kralovics *et al.*, 2005). Tato mutace byla detekována u většiny (až 95 %) PV a části nemocných s ET a PMF (až 50 % ET

a 60 % PMF). U zbývajících 5 % PV byly nalezeny mutace v exonu 12 *JAK2* (Scott, 2007).

S vývojem pokročilejších technologií, např. sekvenování nové generace, byly objeveny další mutace s potenciálním prognostickým významem, které se podílejí na vzniku Ph-negativních MPN. Mezi nejvýznamnějšími lze jmenovat mutace v trombopoetinovém receptoru *MPL* (Pikman *et al.*, 2006) detekované u 5 % ET a PMF a mutace v genu pro calreticulin (*CALR*). Významným průlomem bylo zjištění, že se u velké části těchto pacientů vyskytují inzerčně – deleční mutace v genu *CALR* (Klampfl *et al.*, 2013; Nangalia *et al.*, 2013; Chi *et al.*, 2013).

Všechny tři základní *driver* mutace byly dlouhou dobu považovány za samostatné. Až Mansier 2016 prokázal společnou přítomnost mutací *JAK2*<sup>V617F</sup> a mutací v *CALR*. Po této práci se objevily další důkazy, které odhalily možnou koexistenci *driver* mutací (Usseglio *et al.*, 2017; Nussenzveig *et al.*, 2015). Odhalit přesnou podstatu patogeneze *double mutant* pacientů tak stále zůstává na seznamu úkolů do budoucna. Předpokládá se, že by koexistence mohla reflektovat přítomnost dvou samostatných leukemických klonů, spíše než leukemický klon nesoucí ve svém genomu obě mutace.

S prognózou onemocnění je spojen i výskyt dalších mutací. Preleukemické mutace v genech *ASXL1*, *SRSF2*, *EZH2*, *U2AF1*<sup>Q150R</sup> či *IDH1/2* jsou nazývány jako *high molecular risk* a ve velké části případů jsou zodpovědné za progresi choroby (Vannucchi *et al.*, 2013; Guglielmelli *et al.*, 2014). To potvrzuje jejich detekce především ve vzorcích z doby transformace do akutní leukémie (Lundsberg *et al.*, 2014).

### **2.2.1. Primární myelofibróza**

Charakteristickým rysem PMF je vznik a vývoj retikulinové/kolagenní fibrózy v kostní dřeni a přítomnost patologické populace megakaryocytů. U pacientů s PMF byl prokázán abnormální expresní profil cytokinů, především destičkového růstového faktoru (PDGF), jenž je zodpovědný za stimulaci tvorby kolagenu fibroblasty. B symptomů (noční pocení, horečky NS, úbytek váhy) vznikají jako důsledek abnormální exprese zánětlivých cytokinů. Základ diagnostiky stále tvoří biopsie kostní dřene a histologické zhodnocení přítomnosti a stupně fibrózy klinickým patologem. WHO klasifikace rozlišuje fázi prefibrotickou a fázi fibrotické PMF (Arber *et al.*,

2016). Část pacientů s PV a ET může časem vyvinout fibrózu (post-ET a post-PV MF) v kostní dřeni také (Barrossi *et al.*, 2008). Dnes je tato MF považována za sekundární a hodnocena pomocí skórovacího systému MY-SEC MF (Passamonti *et al.*, 2017). Její léčba a prognóza jsou v podstatě shodné s klasickou PMF.

Molekulárně geneticky se u 90 % případů PMF detekují *driver* mutace v genech *JAK2*<sup>V617F</sup>, *CALR* a *MPL* (Tefferi *et al.*, 2018). Přibližně 10 - 15 % pacientů je tzv. *triple* negativních, tzn., že u nich není detekovaná žádná ze tří klasických *driver* mutací. Dnes se spolu se 3 základními *driver* mutacemi doporučuje vyšetřovat ještě i mutace v genech *U2AF1*, *ASXL1* a *SRSF2* (Vannuchi *et al.*, 2013; Tefferi *et al.*, 2016). Tyto mutace samostatně nemají diagnostickou hodnotu, protože jejich výskyt není pro PMF specifický, ale velmi dobře napomáhají stratifikovat pacienty do rizikových podskupin. Za rizikové jsou považovány mutace v genech *ASXL1*, *EZH2*, *IDH1/2* a *SRSF2* (Guglielmmeli *et al.*, 2018). Tefferi *et al.* (2018) k nim přiřadil ještě i mutaci postihující kodon Gln157 v genu *U2AF1*. Všechny tyto mutace jsou zohledněny v různých skórovacích systémech a jejich přítomnost je spojena s kratším přežitím bez progresu a celkovým přežitím (OS – *overall survival*) (Lasho *et al.*, 2018; Tefferi *et al.*, 2018). Uplatňují se především v predikci transformace PMF do AML a jsou spojeny s vývojem onemocnění. Ovlivňují i rozhodnutí o podání cílené léčby např. ruxolitinibem.

### **2.3. Sekvenování nové generace - next generation sequencing**

Expanze znalostí o vzniku a rozvoji nádorových onemocnění na molekulární úrovni a snaha o zvýšení účinnosti a snížení toxicity léčby a moderních léčiv, jež specificky zasahují mechanismy alterované v nádorech, vedla k rozvoji cílené terapie. Tyto léčebné preparáty mají podstatně méně vedlejších účinků než klasická chemoterapie. Nicméně i přes slibné výsledky v klinických zkouškách se stále používají častěji v kombinaci s chemoterapií nežli v samostatném podání. Důvodem je i to, že jejich potenciál, v kombinaci s klasickou léčbou, je podstatně vyšší a účinnost prokazatelně lepší. Stále se také hledají nové molekulární cíle, geny a jejich mutace, které by umožnily vývoj dalších účinných léčiv cílených specificky na nádor, případně na jeho mikroprostředí. V klinické praxi se začaly používat prognostické stratifikační systémy založené na mutačních profilech konkrétních nádorů (GIPSS *genetically inspired prognostic scoring system*) (Tefferi *et al.*, 2018). Rozvoj znalostí

o molekulárně genetických změnách u AML vede postupně ke zpřesňování klasifikace, prognózy i léčebných postupů a molekulární profilování v rámci personalizované medicíny se stalo součástí běžných lékařských postupů.

Díky technologii NGS a využití sekvenace celého genomu/exomu byly objeveny známé mutace v genech jako je *CALR*, *SF3B1* (Klampfl *et al.*, 2013; Papaemmanuil *et al.*, 2016). NGS umožňuje detekci *driver* mutací zodpovědných za patologický fenotyp, podhalilo mechanismy rezistence buněk, přítomnost predispozičních germinálních variant a mutační nálož nádoru. „Projekt Lidského genomu“ navržený v 80. letech 20. století byl ukončen v roce 2003. Od té doby prodělaly technologie pro sekvenování DNA značný vývoj. Zvýšila se přesnost sekvenování a podstatně se snížila cena za osekvenovanou bázi. I přes to patří NGS k finančně náročnějším technologiím. Míru chybovosti spojenou s nepřesností polymerázy je možné ovlivnit pečlivým designem experimentu a výběrem vhodného přístupu, například upřednostněním hybridizace před amplifikací (Goodwin *et al.*, 2016). NGS má značné množství výhod. Tou největší je sekvenační kapacita. Jedná se o tzv. *high throughput* technologii, často označovanou jako masivně paralelní sekvenování, která v porovnání s klasickým Sangerovým sekvenováním umožňuje analýzu velkého množství vzorků a cílených sekvencí v jednom běhu. Na rozdíl od ostatních klasických molekulárních metod vyžaduje menší vstupní množství vzorků DNA/RNA a umožňuje sekvenaci i materiálů jako je DNA izolovaná z FFPE bločků. Dosahuje vysoké citlivosti a přesnosti (Serrati *et al.*, 2016) při detekci různých sekvenčních variant, především jednonukleotidových polymorfismů (SNV) a bodových mutací. Na základě specifických platforem je možné analyzovat inzerčně - deleční mutace, *copy number* variace (CNV) ale i translokační přestavby. Ziskem je velké množství dat (Gb až Tb u nových strojů), což vyžaduje bioinformatickou *pipeline* pro jejich zpracování. Nesmírně důležité a časově nejnáročnější je hodnocení detekovaných variant/mutací a zohlednění jejich vlivu na dané onemocnění. Je nezbytné posuzovat každou nalezenou variantu/mutaci v kontextu dalších informací a každý konkrétní případ jednotlivě.

### **2.3.1. Sekvenační přístupy - WES, WGS, TS**

Sekvenační přístupy se dělí podle toho, jak velká část genomu je analyzována. Beze sporu nejnáročnější je sekvenování celého genomu (WGS – *whole genome sequencing*) využívané v rámci experimentální praxe především k hledání nových genů,

ke srovnávání jednotlivých populací a především k porovnání "normálních" a patologických stavů (hledání zárodečných mutací). Na rozdíl od exomového sekvenování detekuje varianty i v negenových sekvencích (introny, promotory). WGS přináší poznatky umožňující propojovat a korelovat informace o přítomné mutaci v genu spojeném s patogenezi daného nádorového onemocnění, prognóze a výsledném klinicko-patologickém fenotypu. Exomové sekvenování slouží k detekci mutací přímo v kódujících oblastech genů (exonech). Až 85 % známých patogenních variant, jež jsou spojeny se vznikem daného onemocnění, je lokalizováno v kódujících oblastech (Hulick *et al.*, 2020). Současné výzkumné projekty se zapojují do celogenomového či celoexomového sekvenování s cílem nalézt a identifikovat nové genetické aberace u různých typů nádorů a jiných onemocnění.

Nejvyužívanějším přístupem stále zůstává cílené sekvenování (*targeted sequencing*). Jedná se o menší (20-30 genů) či větší panely (až 200 genů) zahrnující geny podílející se na patogenezi konkrétního typu ne/nádorového/dědičného onemocnění. V současnosti je na trhu k dispozici velké množství komerčních panelů pro přípravu NGS knihoven (Tab. 1). Některé jsou cílené na konkrétní onemocnění (Core Myeloid ArcherDx, ClearSeqAML Agilent), jiné zahrnují geny podílející se obecně na nádorové transformaci tzv. *pan-cancer* panely (Trusight Oncology Illumina, Accel Amplicon Plus 57G Pan cancer profiling panel Swift Bio). Většina společností také nabízí možnost designu vlastního tzv. *custom* panelu, kdy si zákazník může cíleně definovat, které geny a sekvence chce sekvenovat a následně analyzovat.

Všechny tyto postupy využívají jako vstupní materiál DNA. RNA sekvenování je využíváno především pro sledování MRD, detekci nových transkripčních variant či sledování přítomnosti chimerických transkriptů (Kukurba & Montgomery, 2015).

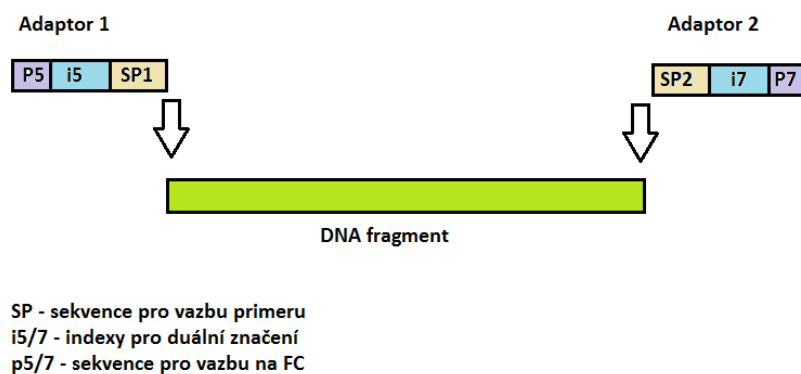
Název panelu	Výrobce	Počet genů	Vstup	Přístup
Phusion Plex Myeloid	Archer Dx	84	RNA	amplikon
Variant plex Core M.		37	DNA	
Variant plex Myeloid		75		
TruSigh Myeloid	Illumina	54		enrichment
Clear Seq AML	Agilent	20		
Sophia Myeloid sol.	Sophia Genetics	30		
SureSeq pan Myeloid	OGT	70		
SureSeq pan Myeloid		24		

Tabulka č. 1: Dostupné NGS panely pro detekci mutací u myeloproliferací

### **2.3.2. Amplikonové vs. hybridizační metody**

NGS se skládá z několika na sebe navazujících kroků. Prvním je příprava vzorků (měření koncentrace a kontrola kvality DNA, její ředění na příslušnou ekvimolární koncentraci) a na něj navazující příprava knihoven (*library prep*). Výsledkem všech těchto kroků je sekvenovatelná knihovna. Ve skutečnosti se jedná o soubor krátkých fragmentů DNA každého vzorku o definované délce. Fragmenty DNA jsou speciálně upraveny tak, aby měly na obou svých koncích naligovány adaptory, umožňující nejen jejich identifikaci pomocí molekulárních barkódů a indexů, ale i následnou sekvenaci prostřednictvím primerů (Obr. 2). Pro technologii NGS je nezbytné "nabohatit" úseky (geny, exony, UTR aj.), které budou následně sekvenovány. Proto se přístup nazývá cílené sekvenování. Existují dva přístupy pro přípravu knihoven. Prvním je tzv. amplikonové sekvenování a druhý je založen na hybridizaci cílových úseků se speciálními sondami.





Obrázek č. 2: Obecné schéma sekvenační knihovny

Metoda založená na amplifikaci je podstatně jednodušší a méně pracná. Konkrétní cíle se pomocí multiplexní PCR se speciálními primery namnoží a následně sekvenují. Problémem zůstává nabohacení např. *GC-rich* sekvencí, amplifikační bias, chyby v sekvencích vzniklé díky chybovosti DNA polymerázy, ale také artefakty z chybně navázaných primerů (Kanagawa, 2003; Fox *et al.*, 2014). Důkladný design primerů a jejich *multiplexing* je tedy u tohoto přístupu zásadní.

*Přístup target hybrid capture* využívá sekvenaci originálních DNA molekul, které jsou v rámci *library prep* postupu upraveny tak, aby byly sekvenovatelné. Jeho nezbytnou součástí je mechanická či enzymatická fragmentace genomické DNA. Neupravená genomická DNA není pro NGS vhodná z důvodu své velikosti. Současné NGS sekvenátory umožňují sekvenaci fragmentů o max. velikosti do 1000 bp (Goodwin *et al.*, 2016). Jedná se o tzv. *short-read* NGS. Nejčastěji využívaná platforma Illuminy umožňuje párové sekvenování o délce 2\*75 bp, 2\*100 bp či 2\*150 bp. Je-li nezbytné sekvenovat delší úseky, možností volby je 2\*300 bp verze sekvenční chemie Illuminy či 454 GS Junior od Roche. Knihovna by neměla obsahovat delší fragmenty, jelikož tyto molekuly nemají možnost se na bázi *flow celly* vůbec zachytit.

Štěpením upravená DNA následně hybridizuje se speciálními próbami (*RNA baits*) komplementárními se zvolenými cíly v genomu. Dále jsou ligovány adaptory, a provádí se *size* selekce fragmentů o vhodné délce (150 - 700 bp). V NGS postupech se uplatňuje hybridizace biotinylovaných sond v roztoku. Biotinylované sondy s vázanou molekulou jsou díky pevné vazbě se streptavidinovými kuličkami zachyceny pomocí

magnetického pole a zbytek nenavázaných molekul v roztoku se jednoduše v rámci ethanolového přečištění odstraní pryč. Každá takto připravená knihovna je následně amplifikována limitním množstvím PCR cyklů. Následuje samotná sekvenace na vysokokapacitním sekvenátoru (MiSeq, NextSeq, NovaSeq 6000 aj.) a bioinformatické zpracování dat (Obr. 3). Běžně využívané analyzátoři (Illumina, Roche) sekvenují fragmenty do velikosti 700 bp principem SSB - *sequencing by synthesis* či SBL - *sequencing by ligation*. Jedná se o sekvenaci klonálně amplifikovaných molekul (*clusterů*). Data získaná z genetických analyzátorů obsahují informace o sekvenci a současně je každé bázi udělena informace o její kvalitě. Aby bylo možné porovnat konkrétní sekvence s referenční sekvencí lidského genomu (Human genome - Hg19/Hg38), je nezbytné provést specifické bioinformatické operace zvané *adaptor trimming* a *variant calling*. První z nich odstraňuje uměle vytvořené sekvence (adaptoři) na obou koncích každého *readu* a druhý porovnává upravenou sekvenci s referenční. Vše provádí automaticky speciální programy (Finalist Dx, SureCall). Výsledkem celého procesu je report/zpráva obsahující detekované varianty a jejich vliv na případný fenotyp.



Obrázek č. 3: Schéma postupu NGS

### 2.3.3. Sekvenování dlouhých readů - třetí generace

Firmy Pacific Biosciences a Oxford Nanopore vyvinuly modernější sekvenátory, které jsou schopné sekvenovat mnohem delší úseky DNA (Tab. 2). Tento přístup byl nazván "*single molecule real-time*" - SMRT (McCarthy 2010). Obě technologie umožňují sekvenaci až kilobáze dlouhých templátů. Samotná sekvenace probíhá ve speciálních nanodestičkách. V každé jamce, mikroreaktoru, dochází k zachycení jedné molekuly DNA a ta se zde následně sekvenuje. Každá jamka obsahuje také DNA polymerázu. Detekce signálu může být založena na změnách elektrického napětí u Oxford Nanopore či standardně na fluorescenci u Pacific Biosystems.

		Princip	Délka čtení (bp)	Output
První generace	Sanger	PCR	≤900	Kb
Druhá generace (NGS)	MiSeq	SBS	≤150	4-15 Gb
	NovaSeq		≤300	Až Tb
	Ion Torrent		≤600	10 Gb
	Roche 454	Pyroseq	450-1000	700 Mb
	Solid	Ligace	50-75	80-320 Gb
Třetí generace	PacBio	SMRT	30 kb	Až 7 Gb
	Nanopore		0,9 Gb	Až 4 Gb

Tabulka č. 2: Srovnání jednotlivých sekvenačních technologií

### 3. Cíle práce:

1. Sledování rozšířeného mutačního profilu pacientů s AML s mutací v genu *NPM1* v době diagnózy
2. Sledování klonálního vývoje u pacientů s AML s mutací v *NPM1* genu
3. Sledování mutačního profilu pacientů s myelofibrózou
4. Exomové sekvenování u pacientů s relabující/rezistentní AML

## **4. Soubor pacientů**

### **4.1. Soubor pacientů s AML**

Náš soubor tvořilo 53 pacientů s AML s NK kurativně léčených a sledovaných na Hemato-onkologické klinice Fakultní nemocnice Olomouc (HOK) v období 2007-2021. Rozšířený mutační profil u AML s *NPM1* mutací (*NPM1*<sup>c+</sup> izolovanou a v kombinaci s *FLT3*-ITD) byl stanoven u čtyřiceti osmi s *de novo* AML a u pěti pacientů s AML transformovanou z chronické myelomonocytární leukémie léčených na HOK v letech 2007-2021. U jedné pacientky vznikla sekundární AML po chemoterapii podávané pro primární maligní onemocnění, kterým byla systémová mastocytóza. U všech pacientů byla provedena základní diagnostika a prognostická stratifikace (stanovení imunofenotypu AML, karyotypu a následně přítomnost základních mutací podle doporučení ELN 2017). Dvacet tři pacientů mělo izolovanou mutaci v genu *NPM1* a patnáct pacientů kombinaci *NPM1*<sup>c+</sup>/*FLT3*-ITD<sup>low</sup>, tito měli podle ELN příznivou prognózu. Intermediární prognózu na základě přítomnosti kombinace mutací *NPM1*<sup>c+</sup>/*FLT3*-ITD<sup>high</sup> mělo deset pacientů a šest pacientů se sekundární AML mělo izolovanou mutaci v genu *NPM1*.

### **4.2. Soubor pacientů s myelofibrózou**

Osmdesát osm pacientů s verifikovanou myelofibrózou (primární a sekundární) bylo na HOK léčeno v letech 1998-2021. Soubor tvořilo čtyřicet jedna pacientů s diagnózou primární myelofibrózy, čtrnáct pacientů s post-polycytemickou myelofibrózou, sedmnáct pacientů s post-ET myelofibrózou a šestnáct pacientů v prefibrotickém stádiu myelofibrózy.

### **4.3. Informovaný souhlas**

Všichni pacienti podepsali informovaný souhlas se zpracováním a uchováním biologického materiálu (DNA/RNA) a jeho využitím pro vědecké účely schválený etickým kodexem Světové zdravotnické asociace (WMA-The World Medical Association).

## 5. Materiál a metody

- **Přístroje:**
- Automatický izolátor DNA MagNa (Roche)
- Zařízení na úpravu vody Direct-Q 3UV (Millipore)
- Automatické pipety, multikanálové a elektronické (Eppendorf, Finnpiquette)
- Thermocycler (Biorad)
- Centrifuga (Eppendorf 5430)
- Thermo mixer (Eppendorf)
- TapeStation 5140 (Agilent)
- Qubit (Life Technologies)
- MiSeq (Illumina)
- NovaSeq (Illumina)
- Magnetický stojánek
- Mrazicí boxy (-80°C, -20°C)
- Ledničky (4-8 °C)
- Výrobník ledu
  
- **Spotřební materiál:**
- jednorázové špičky s filtrem
- kónické zkumavky 15 ml, 50 ml
- zkumavky 2 ml; 1,5 ml
- nitrilové ochranné rukavice
- 96-jamkové destičky
- adhezivní fólie na 96-jamkové destičky
  
- **Reagencie:**
- reverzně-osmotická a ultračistá voda ze systému Direct-Q 3UV (Millipore)
- ClearSeq AML kit (Agilent)
- SureSelect XT HS reagent kit for Illumina (Agilent)
- Human All Exon V7 Capture Library
- SureSelect Enzymatic Fragmentation Kit (Agilent)
- 10 M NaOH, molecular biology grade (Sigma)
- Dynabeads MyOne Streptavidin T1
- Agencourt AMPure XP
- 99,9 % ethanol, molecular biology grade
- D1000 a D1000 HS Screen Tape (Agilent)
- D1000 a D1000 HS reagent kit (Agilent)
- Quanti DNA BR Assay kit (Life Technologies)
- MiSeq v2 reagent kit (Illumina) (300 cyklů)
- NovaSeq S2 sequencing kit v1.5 (200 cyklů)
- PhiX control (Illumina)

## 6. Sekvenování nové generace – postup

Prvním krokem je příprava knihovny - *library prep*, která zahrnuje následující postupy (zaměřeno na technologii Agilent Haloplex a SureSelect XT HS):

1. kontrola kvality a koncentrace DNA pomocí Qubit spektrometru a její ředění na požadovanou koncentraci
2. enzymatická restrikce genomické DNA
3. hybridizace se sondami komplementárními k cílovým sekvencím (*RNA baits*)
4. ligace
5. velikostní selekce fragmentů o požadované délce pro sekvenaci (200-700 bp)
6. amplifikace pomocí PCR
7. přečištění výsledné knihovny

Kvalitu a koncentraci připravené sekvenační knihovny je nutné zkontrolovat na Bioanalyzáru/Tape Station. Knihovny se ředí na ekvivalentní koncentraci 2 nM a následně *poolují* do jedné zkumavky. Takto připravený *pool* je následně denaturován 5 minut při RT 2N NaOH a ředěn pomocí Hybridizačního HT pufru (Illumina) až na výslednou koncentraci 8 pM u Haloplex HS a 400 pM u Human All Exon V7.

### **6.1. Haloplex HS - ClearSeq AML panel**

Panel ClearSeq AML pokrývá vybrané oblasti 48 exonů 20 genů (801 amplikonů, Obr. 4), jejichž mutageneze je spojena s vývojem myeloproliferativních onemocnění (AML, MPN, MDS). Jedná se o malý panel, jehož velikost je 23,702 kb. Využívá technologii Haloplex HS, která je založena na vnesení molekulárních barkódů a specifické *rolling circle* amplifikace. Barkódy v bioinformatické analýze umožňují identifikaci a odstranění PCR duplikátů, které jsou hlavním zdrojem chyb v průběhu sekvenování.

Gene List (targeted exons)			
ASXL1	12	MPL	10
CSF3R	14, 17	NPM1	11
CBL	8, 9	NRAS	2, 3
CEBPA	1	RUNX1	3, 4, 8
DNMT3A	4, 8, 13, 15, 16, 18	SETBP1	3
	19, 20, 22, 23	SF3B1	13-15, 17
EZH2	8, 17, 18	SRSF2	1
FLT3	14, 20	TET2	3, 9, 10, 11
IDH1	4	TP53	5-8
IDH2	4	U2AF1	2, 6
JAK2	12, 14		

Obrázek č. 4: Cílové exony v panelu ClearSeq AML (převzato z Agilent.com)

## **6.2. Pracovní postup Haloplex HS 1-500 kb ILMFST**

### ✓ RESTRIKCE

- Master mix (MM) pro restrikci

Reagencie	Objem na 12 reakcí (μl)
RE Buffer	344
BSA solution	9
Celkem	353

- Rozpipetovat MM mix po 39,2 μl do 8-jamkového stripu
- Červený strip - do MM připipetovat 4,9 μl restrikčních enzymů
- Zelený strip - do MM připipetovat 4,9 μl restrikčních enzymů
- Lehce zvortexovat a zcentrifugovat
- Rozpipetovat po 3,5 μl do 96-jamkové destičky (směr 1-12, →)
- Přidat 3,5 μl DNA (směr A-H, ↓), celkem 50 ng DNA na reakci, c=1,8 ng/μl
- Centrifugovat - short spin
- Restrikce při 37 °C, 30 minut, vyhřívané víko thermocycleru
- Ihned pokračovat v postupu, nenechávat přes noc v -20 °C (nespecifické štěpení)

### ✓ HYBRIDIZACE

- Připravit hybridizační MM

Reagencie	Objem na 12 reakcí (μl)
Hybridization Solution	442
Haloplex HS Probe	65
Celkem	507

- Rozpipetovat hybridizační MM po 39 μl do 12-jamkového stripu
- Připipetovat do každé pozice 5 μl jednoho Indexing primeru
- Restrikční reakci ihned po skončení zcentrifugovat - short spin, RT
- Přepipetovat 7 μl všech restrikčních reakcí (8\*7 μl) do připraveného hybridizačního MM
- Hybridizovat při 95°C 5 minut/ 55 °C 2 hod.



✓ PŘEČIŠTĚNÍ

- Připravit Hybridization Stop solution

Reagencie	Objem na 12 reakcí (μl)
Hybridization stop solution	240
AMPure	960
Celkem	1 200

- Ihned připipetovat 100 μl připraveného Stop solution k hybridizované DNA
- Inkubovat 5 minut, RT, kontinuální třepání 1300 rpm
- Umístit strip na magnetickou destičku
- Inkubovat 5 minut RT, odstranit supernatant
- Připipetovat 200 μl 70% EtOH (čerstvě připravený)
- Inkubovat 1 minutu RT, odstranit supernatant
- Připipetovat 200 μl 70% EtOH
- Inkubovat 1 minutu RT, Odstranit supernatant
- Sušit 2-5 minut RT

✓ LIGACE

- Připravit ligační master mix

Reagencie	Objem na 12 reakcí (μl)
HS ligation solution	130,0
1 mM rATP	7,8
Nuclease free water	512,2
Celkem	650

- K suchým kuličkám přidat 50 μl ligačního MM
- Resuspendovat kuličky a inkubovat 2 minuty, RT
- Inkubovat na magnetu 5 minut, RT
- Přepipetovat 47,5 μl roztoku do nového 12-jamkového stripu
- Přidat 2,5 μl HS DNA ligase ke každému vzorku
- Ligovat 55°C, 10 minut

✓ ZÁCHYT LIGOVANÉ DNA

- Připravit 40 μl Dynabeads MyOne Streptavidin v HS Capture Solution pro každý vzorek
- Připravit Wash 1 solution (90 μl Wash 1 + 10 μl 1M NaOH) pro každý vzorek
- Ligační směs centrifugovat
- Přidat 40 μl Dynabeads MyOne Streptavidin v HS Capture Solution
- Inkubovat 15 minut, RT, 1300 rpm
- Inkubovat na magnetu 5 minut RT, odstranit supernatant
- Připipetovat 100 μl Wash 1, propipetovat 10x
- Inkubovat 1 minutu, RT
- Odstranit supernatant
- Připipetovat 150 μl Wash 2 solution, propipetovat 10x
- Inkubovat 1 minutu, RT
- Odstranit supernatant

✓ PCR

- Připravit PCR MM

Reagencie	Objem na 12 reakcí (μl)
Nuclease free water	691,6
Herculase II reaction buffer	390,0
100 mM dNTPs	10,4
Primer 1	52,0
Primer 2	104,0
Herculase II fusion DNA pol.	52,0
Celkem	1 300

- Připipetovat 100 μL PCR MM ke kuličkám
- Rozsuspendovat
- PCR

Teplota	Čas	Krok
98 °C	2 min	1x
98 °C	30 sec	počet cyklů dle doporučení výrobce (24-25X)
60 °C	30 sec	
72 °C	1 min	
72 °C	10 min	1x
8 °C	∞	1x

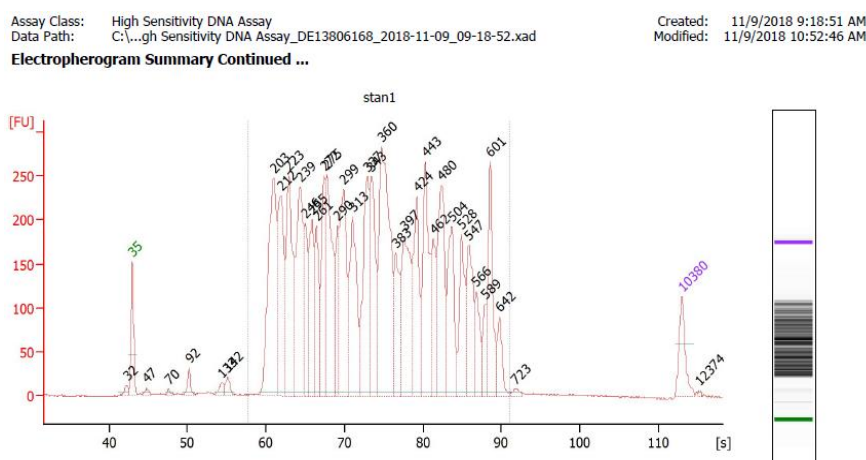
- Inkubovat na magnet 5 minut
- Přepipetovat 40 μl PCR produktu do čistého stripu

✓ PŘEČIŠTĚNÍ PCR

- Připravit 400 μl 70% EtOH pro každý vzorek
- Připravit AMPure XP (100 μl AMPure XP + 40 μL vody) pro každý vzorek
- Přidat 140 μl kuliček k 40 μl PCR
- Inkubovat 5 min, RT, 1300 rpm
- Centrifugovat - short spin
- Inkubovat na magnetu 5 minut, RT
- Odstranit supernatant
- Připipetovat 200 μL 70% EtOH
- Inkubovat 1 minutu, RT
- Odstranit supernatant
- Připipetovat 200 μL 70% EtOH
- Inkubovat 1 minutu, RT
- Odstranit supernatant
- Sušit kuličky 2-5 minut, RT
- Přidat 45 μl HS Elution Buffer
- Inkubovat 2 minuty, RT
- Inkubovat na magnetu 5 minut, RT
- Přepipetovat čistý vzorek do nového stripu

✓ KONTROLA KVALITY KNIHOVNY NA TAPE STATION

- Kontrola kvality a koncentrace knihovny na čipu podle návodu výrobce



Obrázek č. 5: Elektroforetogram výsledné NGS knihovny na Bioanalyzáru

✓ PŘÍPRAVA KNIHOVNY NA SEKVENACI

- Naředit vzorky na 2 nM
- Poolovat ekvimolární množství všech vzorků dohromady (po 5  $\mu$ l)
- Připravit 0,2 N NaOH (20  $\mu$ l 10 M NaOH + 980  $\mu$ l vody)
- Denaturace a ředění knihovny a PhiX control

Krok	Reagencie	Knihovna ( $\mu$ l)	PhiX ( $\mu$ l)	Koncentrace
1	10 mM Tris		2+3	
2	0,2N NaOH	10+10	5+5	2 nM $\rightarrow$ 1 nM
3	HT1	20+980	10+90	1 nM $\rightarrow$ 20 pM
4	HT1	600+400	375+225	20 pM $\rightarrow$ 8 pM
5	Pool	990	10	

- Denarovat 10  $\mu$ l knihovny a 5  $\mu$ l PhiX 0,2 N NaOH, 5 minut, RT
- Stočit - short spin
- Připipetovat 980 (990 k PhiX)  $\mu$ l HT1 pufru
- Promíchat, stočit, umístit na led
- K 600  $\mu$ l 20 pM knihovny přidat 400  $\mu$ l HT1 pufru a umístit na led
- Spikovat 10  $\mu$ l 12,5 pM PhiX
- Do cartridge MiSeq v2 reagent kitu napipetovat 600  $\mu$ l připravené knihovny s PhiX
- Spustit sekvenaci

✓ VYHODNOCENÍ A INTERPRETACE DAT

Demultiplexovaná data ve formě *fastq.gz* byla nahrána do programu SureCall (Agilent). Ten provádí všechny nezbytné kroky jako je odstranění PCR duplikátů, jenž jsou potenciálními zdroji sekvenačních chyb, ořezání adaptorů (*adaptor trimming*), mapování jednotlivých readů na referenční sekvenci Hg19 a vytvoření souboru detekovaných variant (VCF). Každá klinicky potenciálně relevantní (patogenní, potenciálně patogenní a VUS) varianta byla následně anotována za pomoci databází NCBI SNP a na ni navázaný ClinVar, COSMIC a Ensembl. Klinicky relevantní varianty byly popsány v reportu pro každý vzorek.

### **6.3. Pracovní postup SureSelect XT HS - Human All Exon V7**

Kit SureSelect XT HS Human All Exon V7 (Agilent) je designován speciálně pro přípravu knihoven na exomové sekvenování. Pokrývá všechny zásadní exony v genomu a jeho velikost je 47 Mb. Sekvenace probíhá na vysokokapacitním sekvenátoru Novaseq 6000 (Illumina).

#### ✓ RESTRIKCE

- MM pro restrikci templátu

Reagencie	Objem na reakci (μl)
5x SS Fragmentation Buffer	2
SureSelect Frag. Enzyme	1
DNA templát	200 ng v 7 μl
Celkem	10

- Lehce zvortexovat a zcentrifugovat
- Restrikce při 37 °C 17 minut/65 °C 5 minut
- Přidat 40 μl vody

#### ✓ END REPAIR/ dA TAILLING

- MM

Reagencie	Objem na reakci (μl)
End repair – A Tailing Buffer	16
End repair – A Tailing Enzyme	4
Celkem	20

- Připipetovat 20 μl MM k 50 μl naštěpené DNA
- Inkubovat 20 °C 15 minut/ 72 °C 15 minut /4 °C hold

#### ✓ LIGACE ADAPTORŮ

- MM

Reagencie	Objem na reakci (μl)
Ligation Buffer	23
T4 DNA Ligase	2
Celkem	25

- Připipetovat 25 μl ligačního MM
- Přidat 5 μl Indexu I5
- Inkubovat 20 °C 30 minut/4 °C hold

#### ✓ PŘEČIŠTĚNÍ

- Připravit 400 μl 80% EtOH pro každý vzorek
- Přidat 80 μl AMPure XP ke vzorku
- Inkubovat 5 minut, RT
- Centrifugovat short spin

- Inkubace na magnetickém stojánku 5 minut, RT
- Odstranit supernatant
- Připipetovat 200  $\mu$ L 80% EtOH
- Inkubace 1 minutu, RT
- Odstranit supernatant
- Připipetovat 200  $\mu$ L 80% EtOH
- Inkubovat 1 minutu, RT
- Odstranit supernatant
- Sušit kuličky 2 - 5 minut, RT
- Přidat 35  $\mu$ l vody
- Eluovat 2 minuty, RT
- Inkubovat na magnetickém stojánku 5 minut, RT
- Přepipetovat do čisté zkumavky

✓ PRE-CAPTURE PCR

- PCR MM

Reagencie	Objem na reakci ( $\mu$ l)
5x Herculase Buffer	10
100 mM dNTPs	0,5
F primer	2
Herculase II	1
Celkem	13,5

- Připipetovat 13,5  $\mu$ l MM k vyeluované DNA
- Připipetovat 2  $\mu$ L I7 Indexing primeru
- PCR

Teplota	Čas	Počet cyklů
98 °C	2 min	1x
98 °C	30 sec	8x
60 °C	30 sec	
72 °C	60 sec	
72 °C	5 min	1x
4 °C	$\infty$	1x

✓ PŘEČIŠTĚNÍ PCR

- Připipetovat 50  $\mu$ l AMPure ke vzorku
- Inkubovat 5 minut, RT
- Centrifugovat short spin
- Inkubovat na magnetickém stojánku 5 minut, RT
- Odstranit supernatant
- Připipetovat 200  $\mu$ L 80% EtOH
- Inkubovat 1 minutu, RT
- Odstranit supernatant
- Připipetovat 200  $\mu$ L 80% EtOH
- Inkubovat 1 minutu, RT
- Odstranit supernatant

- Sušit kuličky 2 minuty, RT
- Přidat 15 µl vody
- Eluovat 2 minuty, RT
- Inkubovat na magnetickém stojánku 5 minut, RT
- Přepipetovat do čisté zkumavky

✓ KONTROLA KNIHOVY TAPE STATION

- Kontrola kvality a koncentrace PCR knihovny na čipu podle návodu výrobce

✓ HYBRIDIZACE

- 1 500 ng precapture DNA do hybridizační reakce (možno poolovat až 3 vzorky)
- MM

Reagencie	Objem na reakci (µl)
25 % RNase block	2
Capture Library (Sondy)	5
SS Fast Hybridisation Bufer	6
Celkem	13

- Připipetovat 5 µl SS XT HS Low Input Blocker Mix
- Spustit program

Teplota	Čas	Počet cyklů
95 °C	5 min	1x
65 °C	10 min	1x
65 °C	PAUSE, skip	Připipetovat MM
65 °C	60 sec	60x
37 °C	3 sec	
20 °C	∞	1x

- V bodě 3 zapauzovat a připipetovat 13 µl hybridizačního MM
- Nechat program docyklovat do konce

✓ STREPTAVIDIN BIOTIN CAPTURE

- 50 µl SAB kuliček 3x promýt 200 µl Binding Buffer na 1 hybridizační směs
- Resuspendovat ve 200 µl Binding Buffer
- Připipetovat 30 µl hybridizační směsi k SAB kuličkám
- Inkubovat 30 minut, RT, 1400 rpm
- Inkubovat 6 x 200 µl WB2 Buffer na 1 vzorek při 70 °C
- Vzorky se SAB stočit
- Inkubovat na magnetickém stojánku 5 min, RT
- Odstranit supernatant
- Přidat 200 µl WB1, RT
- Odstranit supernatant

- Přidat 200  $\mu$ l WB2 nahřátého na 70 °C
- Inkubovat 70 °C 5 minut
- Opakovat promytí 6x
- Odstranit supernatant
- Připipetovat 25  $\mu$ l vody

#### ✓ POST-CAPTURE PCR

- PCR MM

Reagencie	Objem na reakci ( $\mu$ l)
Voda	12,5
Herculase II Buffer	10,0
10 mM dNTPs	0,5
Primer mix	1,0
Herculase II	1,0
Celkem	25

- Připipetovat 25  $\mu$ l MM ke vzorkům
- PCR

Teplota	Čas	Počet cyklů
98°C	2 min	1x
98°C	30 sec	10x
60°C	30 sec	
72°C	60 sec	
72°C	5 min	1x
4°C	$\infty$	1x

- Stočit
- Inkubovat magnetický stojánek 5 min, RT
- Přepipetovat do čisté zkumavky

#### ✓ PŘEČIŠTĚNÍ PCR

- 50  $\mu$ l AMPure ke vzorku
- Inkubovat 5 min, RT
- Centrifugovat short spin
- Inkubovat na magnetickém stojánku 5 minut, RT
- Odstranit supernatant
- Připipetovat 200  $\mu$ L 80% EtOH
- Inkubovat 1 minutu, RT
- Odstranit supernatant
- Připipetovat 200  $\mu$ L 80% EtOH
- Inkubovat 1 minutu, RT
- Odstranit supernatant



- Sušit kuličky 2-5 minut, RT
- Přidat 25  $\mu$ l vody
- Eluovat 2 minuty, RT
- Inkubovat na magnetickém stojánku 5 minut, RT
- Přepipetovat do čisté zkumavky

✓ KONTROLA KNIHOVNY NA TAPE STATION

- Kontrola kvality a koncentrace PCR knihovny na čipu podle návodu výrobce

✓ SEKVENACE NovaSeq 6000

Sekvence probíhá na vysokokapacitním sekvenátoru NovaSeq6000 za použití sekvenačního kitu NovaSeq6000 S2 sequencing kit v1.5 pro párové čtení fragmentů o délce 100 bp. Finální koncentrace poolovaných knihoven je 400 pM. Hodnocení variant probíhalo v programu VarSome Clinical (Saphetor).

## 7. Výsledky

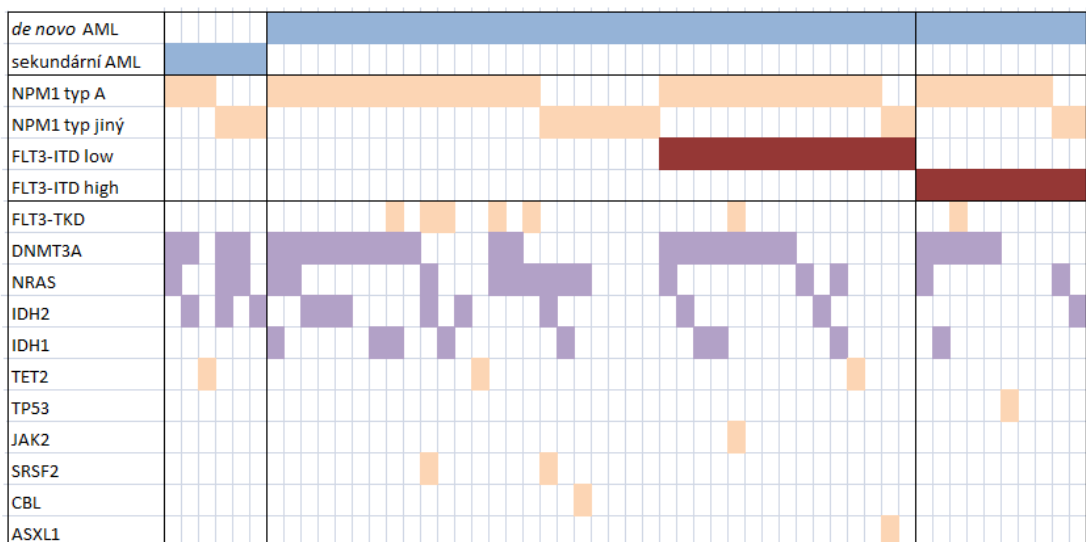
### 7.1. Sledování rozšířeného mutačního profilu u pacientů s AML s mutací v genu

#### *NPM1* v době diagnózy

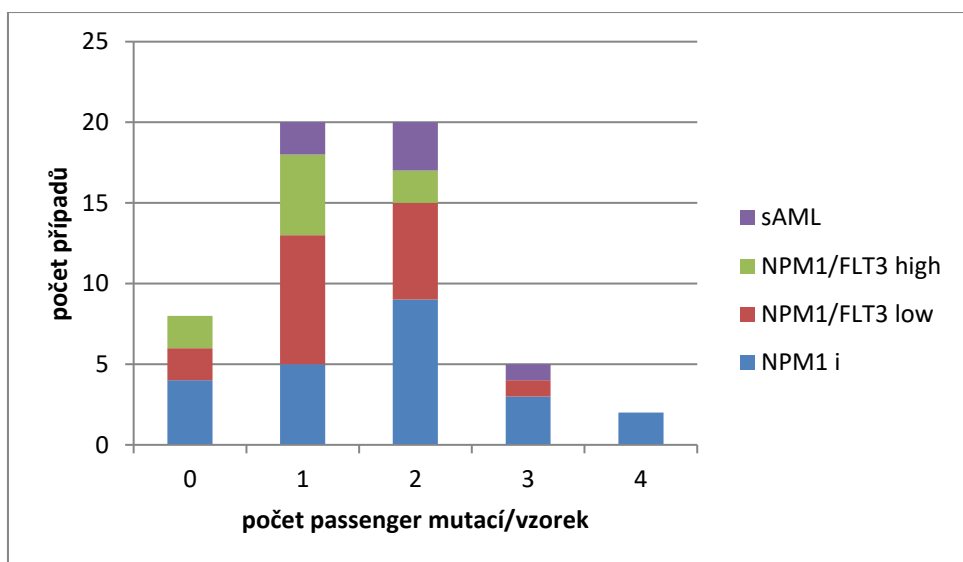
Analýza mutačního profilu pomocí technologie NGS probíhala retrospektivně z DNA izolovaných ze vzorků kostní dřeně z doby diagnózy. NGS analýzou byla v diagnostických vzorcích sledována přítomnost dalších *passenger* mutací, jež se rutinně nevyšetřují, ale je prokázán jejich podíl na leukemogenezi. *Passenger* mutace nebyly pomocí cíleného panelu detekovány pouze u osmi pacientů s *de novo* AML. Všichni pacienti se sekundární/post-terapeutickou AML měli přítomnu minimálně jednu *passenger* mutaci (Graf 1). Pacienti s  $NPM1^{c+}/FLT3-ITD^{high}$  vykazovali kombinaci maximálně dvou *passenger* mutací a až tři mutace byly detekovány ve skupině  $NPM1^{c+}/FLT3-ITD^{low}$  (Graf 1). V nejpočetnější skupině pacientů, s izolovanou mutací v *NPM1*, kopíroval počet přídatných mutací Gaussovo rozložení. Ve třech případech jsme detekovali kombinaci tří *passenger* mutací a ve dvou dokonce kombinaci čtyř (Graf 1).

Nejčastějším typem mutace  $NPM1^{c+}$  byla mutace A (40/54). Frekvence ostatních typů mutací byla stejná, mutace D (5/54), B (4/54) a ostatní raritní varianty čtyřnukleotidové inserce (typ J/G/DD10 v 5/54). Mutace typu A koexistovala nejčastěji s mutacemi v *DNMT3A* a *IDH1/2*. Nejfrekventovanějšími mutacemi v souboru byly mutace v genu *DNMT3A* (28/54), následně *NRAS* (16/54), *IDH2* (12/54), *IDH1* (9/54). Mutace postihující gen *DNMT3A* byly detekovány v kombinaci s dalšími mutacemi. Vyskytovaly se spolu s mutacemi v *IDH2* a *NRAS*. U dvou pacientů byly navíc v diagnostickém vzorku detekovány mutace  $JAK2^{V617F}$  a  $SRSF2^{P95H}$ , které se u AML vyskytují vzácně, ale častější jsou u MDS a MPN. Mutace v ostatních genech, jako je *TET2/ASXL1/CBL/TP53*, byly detekovány pouze v jednotlivých případech (Obr. 6).

Medián věku v době diagnózy u pacientů se sAML byl 51 let, u pacientů s  $NPM1^{c+}/FLT3-ITD^{high}$  49,5 roku, u  $NPM1^{c+}/FLT3-ITD^{low}$  58 let. 52 let byl medián věku pacientů s izolovanou mutací v *NPM1*. Medián přežití u jednotlivých podskupin byl 7/8,5/37 a 31 měsíců. Z pacientů s  $NPM1^{c+}/FLT3-ITD^{high}$  žijí v současnosti pouze dva a ze sAML polovina (3/6). Pět z patnácti pacientů s  $NPM1^{c+}/FLT3-ITD^{low}$  a 11/23 s izolovanou  $NPM1^{c+}$  zemřelo (Tab. 3).



Obrázek č. 6: Zastoupení mutací v jednotlivých vzorcích AML v době Dg.



Graf 1: Početní zastoupení mutací na vzorek v souboru AML  $NPM1^{c+}$

	Počet pacientů	Medián věku při Dg	Medián přežití (měsíce)	Počet přežívajících pacientů
$NPM1^{c+}/FLT3-ITD^{wt}$ (sAML)	6	51	7	3
$NPM1^{c+}/FLT3-ITD^{wt}$ (de novo)	23	52	31	11
$NPM1^{c+}/FLT3-ITD^{low}$	15	58	37	10
$NPM1^{c+}/FLT3-ITD^{high}$	10	49,5	8,5	2

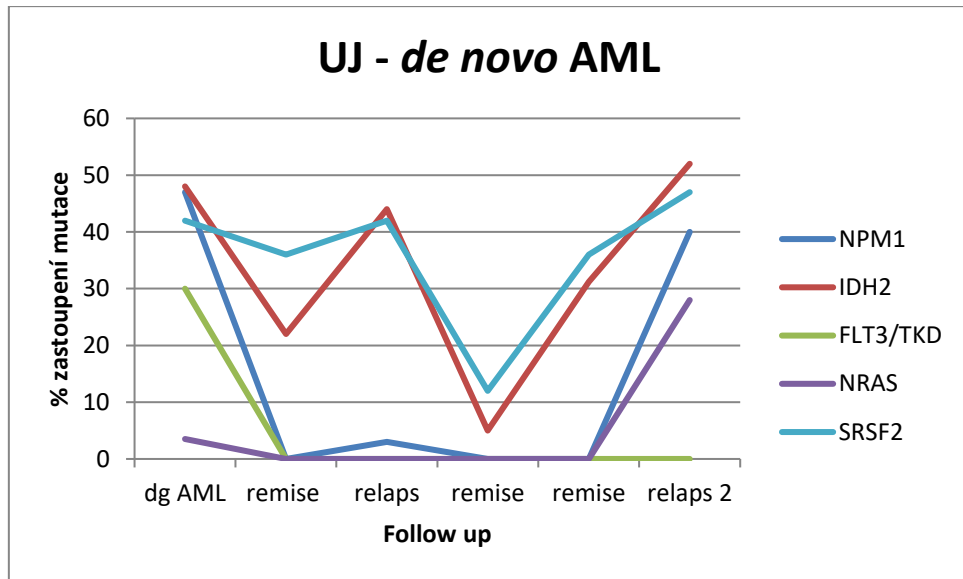
Tabulka č. 3: Charakteristika souboru AML s  $NPM1^{c+}$

## **7.2. Sledování klonálního vývoje u pacientů s AML s mutací v *NPM1* genu**

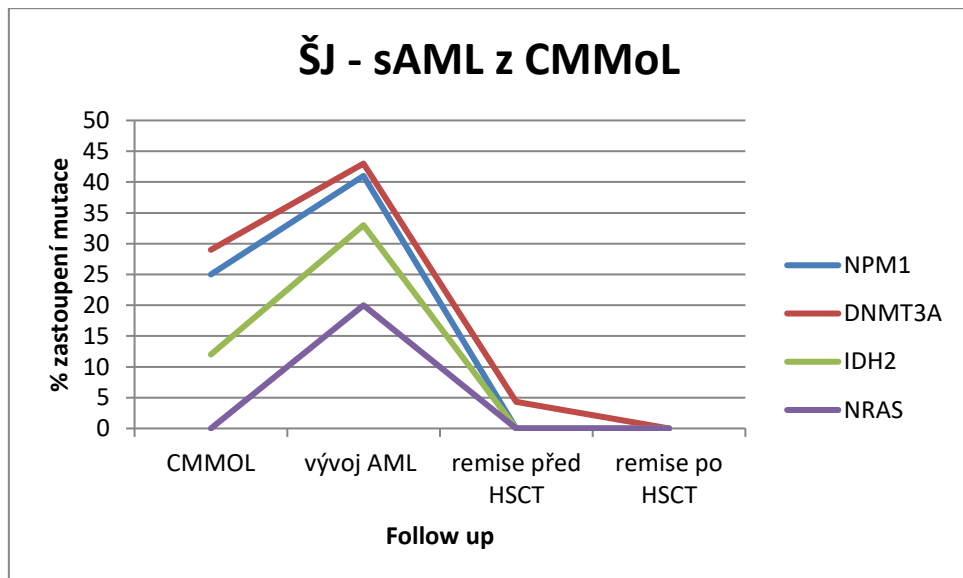
U dvaceti sedmi pacientů s *de novo* AML a pěti pacientů s CMMoL/MDS s následným přechodem do AML *NPM1*<sup>c+</sup> byla sledována přítomnost diagnostických *passenger* mutací v průběhu terapie. Mimo vzorky z doby diagnózy, skrínované v rámci základního souboru, byly zařazeny do sledování vzorky z doby remise onemocnění (po indukční a konsolidační chemoterapii), vzorky po TKB a z doby relapsu onemocnění. U části pacientů došlo k relapsu onemocnění (10 případů), dvě pacientky měly primárně rezistentní onemocnění a u další byla hodnocena odpověď na léčbu jako parciální.

V remisních vzorcích byla u velké části pacientů detekována přítomnost mutací v *DNMT3A*, *IDH2*, méně *IDH1*, *TET2* a v jednom případě *SRSF2*, jež byly nalezeny i v době diagnózy. Tato skutečnost odráží již dobře známý fakt, že se jedná o preleukemické mutace, jejichž hladina je stabilní v průběhu terapie (Graf 2). Dokazuje, že preleukemické buňky v organismu přetrvávají i navzdory podání léčebných režimů. Všechny tyto mutace vymizely po alogenní TKB u pacientů, kteří ji podstoupili. Naproti tomu mutace v genech *FLT3*<sup>TKD</sup> a *NRAS* byly poměrně nestabilní a v remisních vzorcích nebyly detekovány. U tří pacientů byly v průběhu sledování prokázány různé *missense* mutace v genu *TP53*. Ve dvou případech byly detekovány NGS analýzou v remisních vzorcích po léčbě a u třetího pacienta se tato mutace objevila ve vzorku z relapsu onemocnění po TKB. U jedné pacientky s izolovanou mutací *NPM1*<sup>c+</sup> bez dalších *passenger* změn byla v průběhu sledování po konsolidační chemoterapii (bez TKB) potvrzena nově vzniklá mutace *DNMT3A*<sup>R882H</sup>.

Tři pacienti měli v době diagnózy CMMoL retrospektivně detekovanou nízkou nálož *driver* mutace v *NPM1*<sup>c+</sup>. U dvou z těchto pacientů byla detekována kombinace *passenger* mutací v *DNMT3A* a *IDH2*. Při porovnání mutačního profilu vzorků z doby CMML a transformace do sAML byly u dvou pacientů navíc detekovány mutace v genu *NRAS* (Graf 3). Pravděpodobně tedy tento zásah spustil transformaci CMMoL do AML. Všichni tři pacienti podstoupili TKB. Mutace ve vzorcích po TKB nebyly detekovány.



Graf 2: *Follow up* pacienta s *de novo* AML



Graf 3: *Follow up* pacienta s transformovanou AML

### **7.3. Sledování mutačního profilu u pacientů s myelofibrózou**

Vyšetření bylo provedeno retrospektivně z DNA izolované z periferní krve a cílený panel NGS se zaměřením na *passenger* mutace v genech *IDH1/2*, *ASXL1*, *EZH2*, *U2AF1*, *SF3B1*, *TET2* a *DNMT3A* byl aplikován na vzorky z doby diagnózy u osmdesáti osmi pacientů s verifikovanou myelofibrózou (primární a sekundární) (Tab. 4).

	Počet pacientů			
	PMF	prePMF	Post-ET MF	Post-PV MF
Počet pacientů	41	16	17	14
JAK2 <sup>V617F</sup>	22	8	8	14
CALR	13	7	9	0
MPL	5	1	2	0
<i>Passenger</i> m.	22	4	7	8
DIPSS	Počet pacientů/počet pacientů s mutací			
LR	11/2	13/1	6/3	2/0
INT-1	17/10	2/2	7/2	9/5
INT2	12/9	1/1	3/2	2/2
HR	1/1	0/0	1/0	1/1

Tabulka č. 4: Incidence mutací u jednotlivých podskupin MF

*Passenger* mutace byly detekovány u 22/41 PMF, 4/16 prePMF a u 15/31 sekundárních MF, což odpovídá 53 %, 25 % a 48 %. Nejčastěji se v souboru vyskytovaly mutace v genech *ASXL1*, *TET2*, *SF3B1* a *U2AF1* (Graf 4). Nejvíce pacientů mělo kombinaci *driver* mutace a jedné *passenger* mutace (26/88), u 13/88 pacientů byly detekovány současně dvě *passenger* mutace a jeden pacient měl přítomny tři *passenger* mutace spolu s *driver* mutací (Graf 5). Koincidence mutací v jednotlivých podskupinách je ukázána na Obrázku 7.

Nejpočetnější skupinu tvořili pacienti s PMF s mediánem věku při diagnóze 62 let (18-77). Pacienti s PMF nejčastěji vykazovali přítomnost *frameshift* a *nonsense* mutací v genu *ASXL1* (13/41) a *missense* mutací v genech *U2AF1* (5/41), *SRSF2* (4/41) a *CBL* (4/41). Minoritně se vyskytovaly mutace v genech *TET2* (3/41), *DNMT3A* (2/41),

*SF3B1* (2/41). Po jednom případě byla detekována *missense* mutace ve *FLT3* a *TP53*. Pacienti PMF *ASXLI*<sup>mut</sup> měli tyto mutace detekovány nejčastěji v kombinaci s jinou další nepříznivou genetickou změnou (*U2AF1*<sup>Q157</sup>, *CBL1*, *DNMT3A*). Až na tři případy, se v této podskupině (*ASXLI*<sup>mut</sup>) jednalo o pacienty nad 60 let věku s prognostickým skóre DIPSS INT-1 (*intermediate-1*) a vyšším. U sedmi z nich došlo k progresi onemocnění na klinické úrovni (progrese velikosti sleziny, pokles hemoglobinu, vyplavování blastů), u jednoho s přechodem do sekundární AML po 125 měsících od stanovení diagnózy. Z dvaceti devíti pacientů *ASXLI* negativních měli tři pacienti kombinaci dvou mutací a u šesti byla detekována pouze jedna. Nejčastěji se vyskytovala mutace v *hot spotu* Pro95 v genu *SRSF2* (4/29), *U2AF1*<sup>Q157</sup> (2/29), *CBL* (2/29), *TET2* (2/29) a *SF3B1* (1/29). Obecně pacienti s PMF vykazovali nejvyšší frekvenci *passenger* mutací, které byly z velké části detekovány u vyšších DIPSS.

Šestnáct pacientů bylo diagnostikováno v prefibrotickém stádiu myelofibrózy s prognostickým skóre patřícím do *low risk* (LR) (13/16), INT-1 (2/16) a INT-2 (1/16) skupiny. Pacienti diagnostikovaní v tomto stádiu byli výrazně mladší s mediánem věku při diagnóze 49 let (23-76). *Passenger* mutace byly detekovány pouze u čtyř pacientů s prePMF. Tři z nich měli vstupně prognostické skóre DIPSS INT-1/2. Byli starší 60 let, s mutacemi v *SF3B1* a *nonsense* mutací v *TET2*. Jeden pacient s mutací *ASXLI* byl hodnocen jako LR onemocnění.

Pacientů se sekundární myelofibrózou bylo v souboru třicet jedna. Post-polycytemická myelofibróza byla diagnostikována u čtrnácti pacientů a post-trombocytemická u sedmnácti případů. Medián věku při diagnóze u postET-MF byl výrazně nižší než u pacientů s postPV-MF (51 vs. 60,5 roku). Pacienti s post-polycytemickou fibrózou s LR onemocněním byli pouze dva a ani u jednoho nebyla detekována *passenger* mutace. Devět pacientů mělo prognostické skóre DIPSS INT-1 s mutacemi detekovanými u čtyř z nich. DIPSS INT-2 skóre bylo popsáno v době diagnózy u dvou pacientů a jeden měl mutaci v genu *TET2*. Jeden pacient s HR (*high risk*) onemocněním vykazoval kombinaci mutací v *DNMT3A* a *CBL*. Progrese onemocnění na klinické úrovni byla prokázána u osmi pacientů.

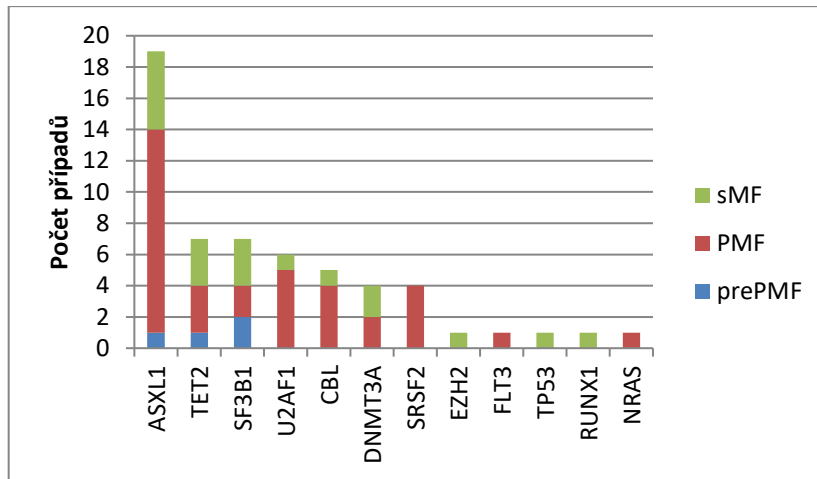
Sedmnáct pacientů v průběhu sledování vyvinulo v kostní dřeni post-ET myelofibrózu. *Low risk* onemocnění mělo šest pacientů a u tří z nich byly detekovány *passenger* mutace. Sedm pacientů mělo DIPSS INT-1 a tři DIPSS INT-2. *Passenger* mutace byly detekovány u 7/17 případů. Nejfrekventovanější byly mutace v *ASXLI*

a sestřihovém faktoru *SF3B1* (3/17). U jednoho případu byla dokonce detekována kombinace tří mutací. Progrese onemocnění byla prokázána u pěti pacientů a u čtyř byly detekovány nepříznivé genetické změny.

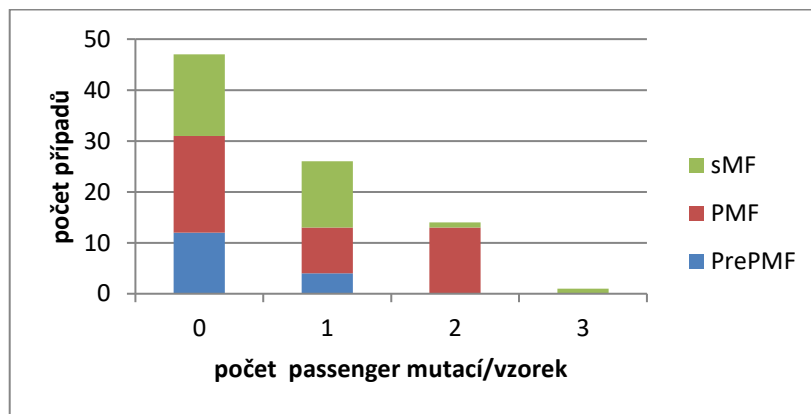
V souboru byli dva pacienti *triple* negativní (*JAK2/MPL/CALR wild type*). Jedna pacientka byla diagnostikována jako prefibrotické stádium PMF v kategorii LR bez *passenger* mutací. Druhá měla PMF s rizikovým skóre INT-1, také bez přídatných mutací. *Triple* negativní pacienti mají podle National Comprehensive Cancer Network (NCCN) v rámci prognostické stratifikace MPN prakticky nejhorší prognózu a je u nich doporučováno rozšířené molekulární testování (Barbui *et al.*, 2015).

Frekvence mutací byla nejnižší u pacientů s LR MF (6/32). Tito vykazovali výrazně mladší věk v době diagnózy. Ve skupině MF DIPSS INT-1 byly mutace pozorovány u 19/35 případů. Naopak nejvyšší frekvence byla ve skupině DIPSS INT-2 (14/18). Pacienti s HR onemocněním byli pouze tři a u dvou byly detekovány *passenger* mutace (Graf 6). Subanalýza podskupin MF (*ASXL1* mut vs. nemut) nevyšla ve statistické analýze signifikantně významná. Bylo to především z toho důvodu, že náš soubor je malý a také značně heterogenní, co se týká složení.

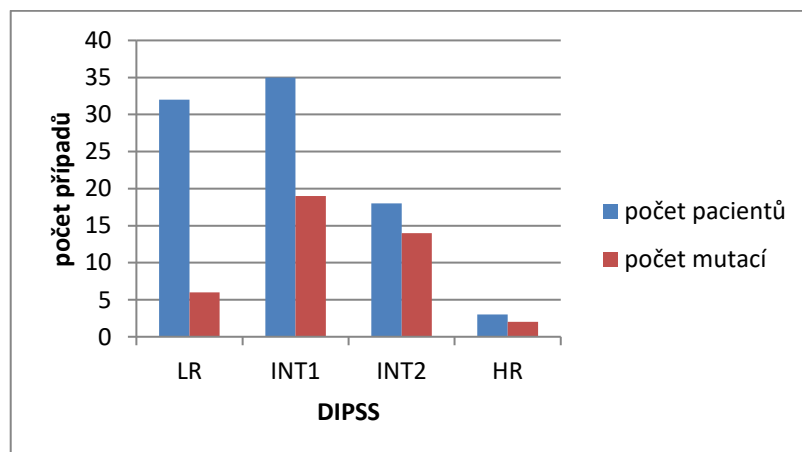




Graf 4: Frekvence jednotlivých mutací u MF



Graf 5: Počet *passenger* mutací na vzorek u MF



Graf 6: Počet mutací v jednotlivých DIPSS skupinách



## **7.4 Exomové sekvenování u pacientů s relabující/rezistentní akutní myeloidní**

### **leukémií**

Analýza exomu byla provedena retrospektivně. Byli pro ni vybráni pacienti, u nichž i přes jejich zařazení k prognosticky příznivé skupině dle ELN klasifikace byl průběh onemocnění netypický, např. nebyla dosažena kompletní remise nebo došlo k relapsu. Exomové sekvenování mělo pomoci odhalit další genetické změny spojené nejen s patogenezí AML, které v současnosti nejsme schopni pomocí cíleného panelu ClearSeq AML detekovat, a do budoucna zlepšit a zpřesnit i stávající prognostickou stratifikaci AML.

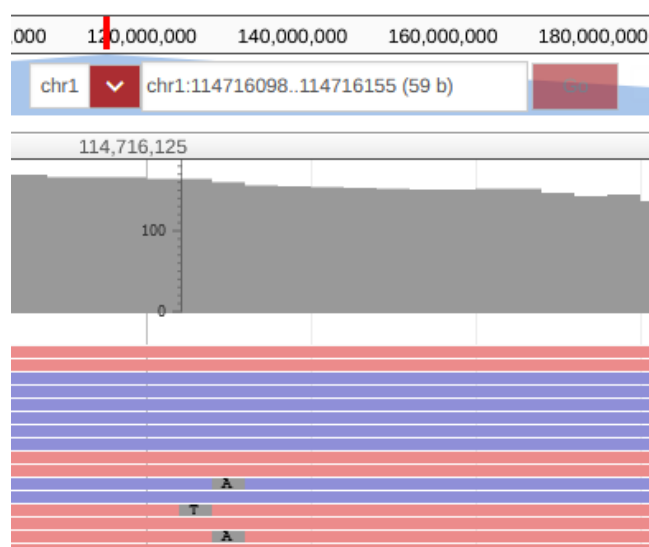
#### **7.4.1. UJ 1955 – Dg 12/2014**

Pacient s *de novo* AML s normálním karyotypem a izolovanou mutací v genu *NPM1* typ A. Věk při diagnóze byl 59 let. Pacient dosáhl po indukční chemoterapii kompletní hematologické remise. Následně došlo k opakovanému relapsu onemocnění. První relaps byl potvrzen 15 měsíců od stanovení diagnózy. Po podání záchranného režimu pacient dosáhl 2. kompletní remise, ale za dalších 15 měsíců od prvního relapsu byl verifikován relaps druhý. Pacient zemřel na infekční komplikace spojené se základním onemocněním.

Cílený panel zachytil mutaci v *IDH2*<sup>R140Q</sup>, *FLT3*<sup>TKD</sup>, *SRSF2*<sup>P95H</sup> a dvě nízkoalelické mutace v genu *NRAS* (Obr. 8). V obou relapsech byly zachyceny mutace *SRSF2* a *IDH2*. Obě byly detekovány ve stabilní hladině i v průběhu léčby a v obou remisních vzorcích. Exomové sekvenování v době diagnózy navíc odhalilo mutaci v *DNMT1*, která přetrvávala i v obou relapsech (Tab. 5). DNMT1 je nezbytná pro správnou funkci HSC.

Gen	Varianta	Dg (VAF)	Relaps 1 (VAF)	Relaps 2 (VAF)	ID	Predikce
<i>NPM1</i>	p.Trp288Cysfs*12	46 %	15 %	49 %	rs1057519744	patogenní
<i>FLT3</i>	p.Asp835Val	29 %	0 %	0 %	rs121909646	patogenní
<i>IDH2</i>	p.Arg140Gln	48 %	41 %	48 %	rs121913502	patogenní
<i>NRAS</i>	p.Gly12Cys	3,5 %	0 %	21 %	rs121913250	patogenní
<i>NRAS</i>	p.Gly12Asp	3,5 %	0 %	8 %	rs121913237	patogenní
<i>SRSF2</i>	p.Pro95His	44 %	38 %	42 %	rs751713049	patogenní
<i>DNMT1</i>	p.Arg1156Gln	43 %	38 %	35 %	COS3148771	patogenní

Tabulka č. 5: Detekované mutace u UJ pomocí exomového sekvenování



Obrázek č. 8: Mutace v genu *NRAS* u UJ

#### **7.4.2. KA1975 – Dg 10/2016**

Pacientka s *de novo* AML s izolovanou mutací v genu *NPM1* typ D a normálním karyotypem (46,XX). Věk v době diagnózy byl 41 let. *Passenger* mutace v době diagnózy nebyly NGS analýzou prokázány. Pacientka dosáhla kompletní hematologické remise (listopad 2016), ale s minimální hladinou mutace v *NPM1*, která postupně klesla až pod detekovatelnou mez qRT-PCR v prosinci 2017. Od března 2017 se ve vzorcích objevuje mutace *DNMT3A*<sup>R882H</sup> prokázaná pomocí cíleného panelu NGS a potvrzená Sangerovým sekvenováním. Byla detekována ve všech následujících kontrolních vzorcích kostní dřeně až do současnosti a vykazuje stabilní hladinu (Tab. 6). Tato mutace v době diagnózy nebyla prokázána ani cíleným NGS panelem ani exomovým sekvenováním. Navzdory tomu má pacientka normální hodnoty krevního obrazu a je sledována stran případného dalšího vývoje onemocnění. Exomové sekvenování navíc odhalilo v době diagnózy atypickou mutaci v genu *FLT3*, posunovou mutaci v genech *RAD21* a *MSH3*, které se podílejí na signalizaci a opravě DNA poškození.

Gen	Varianta	Dg (VAF)	Remise (VAF)	ID	Predikce
<i>NPM1</i>	p.Trp288Cys fs*12	39 %	0 %	rs1057519744	patogenní
<i>DNMT3A</i>	p.Arg882His	0 %	12 %	COSM52944	patogenní
<i>FLT3</i>	p.Ser451Phe	32 %	0 %	COSM28042	patogenní
<i>MSH3</i>	p.Lys308Met	53 %	0 %	rs74624321	VUS
<i>RAD21</i>	p.Tyr67Leu fs*13	36 %	0 %	VUS	VUS

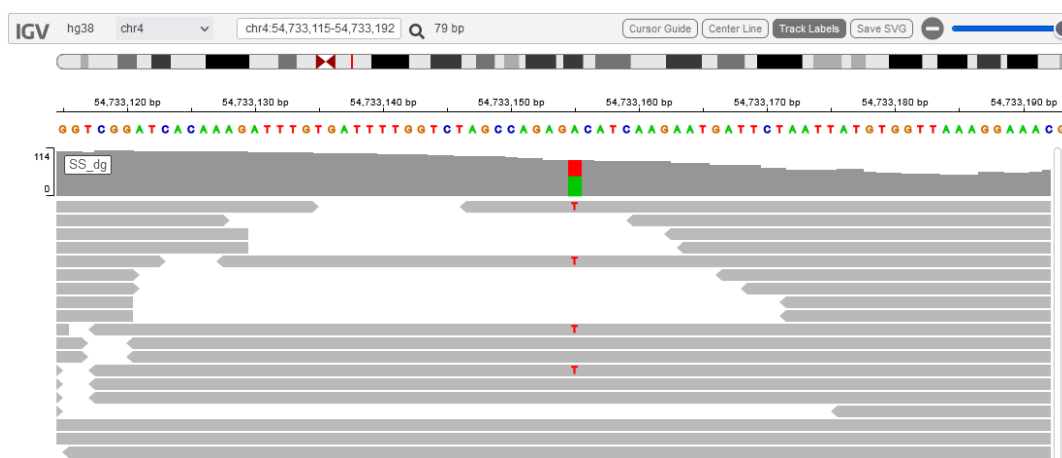
Tabulka č. 6: Detekované mutace u KA pomocí exomového sekvenování

### 7.4.3. SS 1975 – Dg 02/2017

Pacientka s *de novo* AML s izolovanou mutací v genu *NPM1* typ A. Věk v době diagnózy byl 42 let. Cytogeneticky u ní byly prokázány 4 klony, dominantní s normálním karyotypem (46,XX) a další s karyotypem (47,XX,del(3)(q?13),+?neo(3)(q13>qter)+). U pacientky byla po indukční terapii prokázána rezistence onemocnění a podána záchranná terapie, rovněž bez výrazného efektu. Kostní dřevň vykazovala stabilní, vysokou hladinu mutace v *NPM1*. Cílený panel NGS odhalil mutaci *DNMT3A*<sup>R882C</sup>. Exomové sekvenování bylo provedeno na vzorcích diagnóza – rezistence. Potvrzena byla mutace *DNMT3A*<sup>R882C</sup>, která byla zachycena již cíleným panelem. Navíc byly detekovány dvě mutace v genu *c-KIT* (Obr. 9) a mutace postihující geny *ALK* a *CHEK2* (Tab. 7). Kináza *CHEK2* hraje kritickou roli v signální dráze pro opravu dvouvláknových zlomů. Mutace v genu *CHEK2* jsou považovány za predispoziční k nádorovým onemocněním.

Gen	Varianta	Dg (VAF)	Rezistence (VAF)	ID	Predikce
<i>NPM1</i>	p.Trp288Cys fs*12	41 %	10 %	rs1057519744	patogenní
<i>DNMT3A</i>	p.Arg882Cys	43 %	0 %	COSM53042	patogenní
<i>c-KIT</i>	p.Asp816Val	45 %	8 %	COSM1314	patogenní
<i>c-KIT</i>	p.Cys233Ser	38 %	12 %	COSM6923678	patogenní
<i>ALK</i>	p.Tyr734*	48 %	45 %	VUS	
<i>CHEK2</i>	p.Arg223Cys	51 %	38 %	COSM5648771	patogenní

Tabulka č. 7: Detekované mutace u SS pomocí exomového sekvenování



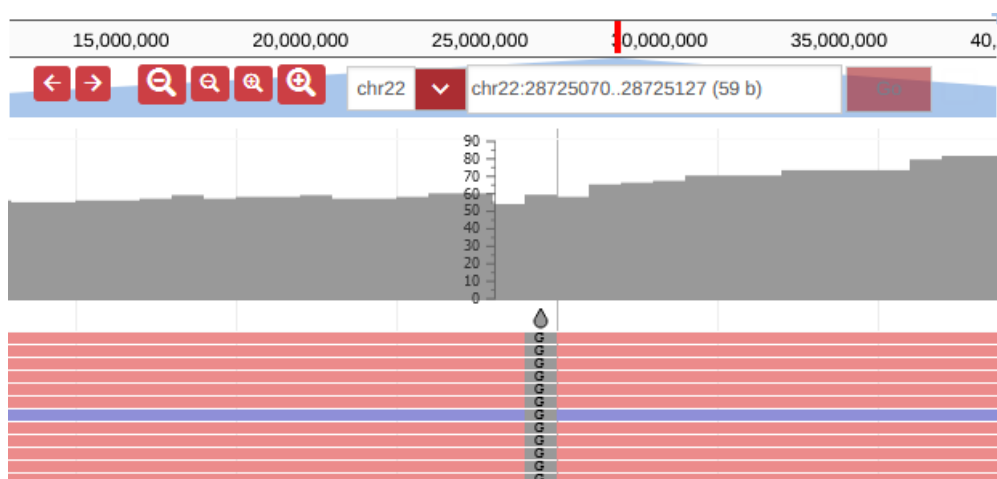
Obrázek č. 9: *c-KIT* p.Asp816Val

#### 7.4.4. BI 1965 – Dg 02/2018

Pacientka s *de novo* AML s izolovanou mutací v genu *NPM1* typ B a normálním karyotypem (46,XX). Věk v době diagnózy byl 53 let. Cíleným panelem NGS nebyla detekována žádná další mutace. Pacientka měla klinicky nepříznivý průběh s časným relapsem onemocnění. V dubnu 2018 bylo dosaženo kompletní hematologické remise, ale v kostní dřeni přetrvávala nízká hladina *NPM1* mutace,  $1 \times 10^3$  kopií/ $10^4$  *ABL1*, detekovaná pomocí kvantitativní RT-PCR. Po 10 měsících od diagnózy byl potvrzen relaps onemocnění. Retrospektivní analýza exomu vzorků diagnóza – relaps odhalila v obou vzorcích mutace v genu *CHEK2* v homozygotní formě (Obr. 10). Jedná se o mutaci, která má predispoziční význam pro nádorová onemocnění. Také u ní byla detekována posunová mutace v genu pro *WT1* tumor supresorový gen (Tab. 8).

Gen	Varianta	Dg (VAF)	Relaps (VAF)	ID	Predikce
<i>NPM1</i>	p.Trp288Cys fs*12	17 %	24 %	rs1057519744	patogenní
<i>CHEK2</i>	p.Ile200Thr	100 %	100 %	COSM3693	patogenní
<i>WT1</i>	p.Ala170His fs*67	17 %	0 %	VUS	patogenní

Tabulka č. 8: Detekované mutace u BI pomocí exomového sekvenování



Obrázek č. 10: Homozygotní mutace v *CHEK2*

#### **7.4.5. WM 1970 – Dg 05/2016**

Pacientka s diagnosticky obtížně hodnotitelným onemocněním, pravděpodobně CMMoL2 s hraničním přechodem do AML (10 % myeloblastů a 23 % monocytů). Věk v době diagnózy byl 49 let. V době diagnózy byl detekován normální karyotyp (46,XY) a izolovaná mutace v genu *NPM1* typ A. Cílený panel NGS odhalil další *passenger* změny v genech *IDH2* a *DNMT3A*. Pacientka dosáhla hematologické remise, ale s významnou reziduální hladinou mutace *NPM1* v kostní dřeni. Před TKB u ní byl prokázán incipientní relaps onemocnění. Po TKB u ní došlo k další progresi základního onemocnění, na které pacientka zemřela.

Exomovým sekvenováním byly v době diagnózy potvrzeny mutace v genech *IDH2*<sup>R140Q</sup>, *DNMT3A*<sup>R635W</sup> a *DNMT3A*<sup>S770L</sup>. Dále byly zachyceny mutace v genu pro topoizomerázu 2A (*TOP2A*), beta kateninu (*CTNNB1*) a tumor supresorovém genu *APC* (Tab. 9). Proteiny APC a CTNNB1 jsou významnými prvky signální dráhy *WNT/β-catenin*, aberantně aktivované především u leukemických kmenových buněk. Ta se podílí na jejich zvýšené proliferaci a buněčném přežívání. *APC* je významný tumor supresorový gen a mutace v kodonu Arg640 zasahuje protein v *Armadillo* doméně 5, která je podle databází velmi konzervovanou sekvencí a podílí se na protein-proteinových interakcích. Beta katenin v dráze WNT funguje jako signální transduktor, přenášející signál z receptoru *Frizzled* do buněčného jádra, kde jako transkripční koaktivátor spouští signály pro přežití.



Gen	Varianta	Dg (VAF)	ID	Predikce
<i>NPM1</i>	p.Trp288Cys fs*12	48 %	rs1057519744	patogenní
<i>IDH2</i>	p.Arg140Gln	13 %	COSM41590	patogenní
<i>DNMT3A</i>	p.Arg635Trp	16 %	COSM87012	patogenní
<i>TOP2A</i>	p.Arg1313*	27 %	COSM231549	patogenní
<i>CTNNB1</i>	p.Arg565Cys	15 %	VUS	VUS
<i>APC</i>	p.Arg640Thr	16 %	VUS	VUS

Tabulka č. 9: Detekované mutace u WM pomocí exomového sekvenování

## 8. Diskuze

Diagnostika myeloidních malignit se opírá o revidovanou WHO klasifikaci (Khoury *et al.*, 2022). Zhodnocení prognózy pacientů je založeno na detekci specifických mutací a chromozomálních změn v genech, které mají podíl na patogenezi jednotlivých onemocnění. Stále častěji se ukazuje, že současné prognostické systémy nejsou zcela dostačující a nereflektují plně heterogenitu jednotlivých typů hematologických malignit. Cílené sekvenování a využití dat ze sekvenace genomů/exomů se v současnosti uplatňuje v rámci personalizované medicíny a umožňuje vybrat optimální způsob léčby především na poli cílené terapie a využít ji tam, kde může potencovat léčebný účinek základní chemoterapie.

Prognostické skóre u pacientů s AML je stanovováno na základě základního mutačního profilu podle ELN 2017 (Döhner *et al.*, 2017). Tato nejpoužívanější prognostická stratifikace doporučuje, kromě základního skríninku chromozomálních přestaveb a cytogenetiky, rutinní testování minimálně šesti základních genů (*NPM1*, *CEBP $\alpha$* , *RUNX1*, *FLT3*, *TP53*, *ASXL1*) u všech pacientů s nově diagnostikovanou AML. NCCN rozšiřuje doporučení ELN 2017 ještě o další tři důležité geny, *IDH1/2* a *c-KIT* (Leish *et al.*, 2019). Vyšetření těchto genů představuje podle Döhner *et al.*, 2017 nepodkročitelné minimum pro stanovení co nejpřesnější prognózy a možnosti využití cílené terapie tam, kde bude mít smysl v rámci běžné praxe. Podle publikovaných studií na různě velkých souborech (93–1540 pacientů), jsou u AML nejčastěji zastoupeny *passenger* mutace v *DNMT3A* (10–28 %), *TET2* (8–26 %), *IDH1* (4–17 %), *IDH2* (9–18 %), *NRAS* (2–23 %) (Papaemmanuil *et al.*, 2016; Hussaini *et al.*, 2018; Ruffallo *et al.*, 2015; Lindsey *et al.*, 2015). Tyto frekvence odpovídaly frekvencím jednotlivých mutací i v našem souboru pacientů s *NPM1*<sup>c+</sup>. Publikované výsledky jsou ale značně variabilní, co do počtu sledovaných genů (21 – WES), složení základních souborů pacientů (*de novo*/sekundární, věk) i frekvencí výsledných změn (Leysch *et al.*, 2019).

NGS analýza základního souboru pacientů s mutacemi v *NPM1* neprokázala větší rozdíly mezi jednotlivými podskupinami (izol. *NPM1*<sup>c+</sup> x *NPM1*<sup>c+</sup>/*FLT3*<sup>low</sup> x *NPM1*<sup>c+</sup>/*FLT3*<sup>high</sup>). *Passenger* mutace nebyly pomocí cíleného panelu detekovány pouze u osmi pacientů s *de novo* AML. Překvapivě ale pacienti se sAML a intermediární prognózou měli v době diagnózy detekován menší počet *passenger*

mutací na vzorek než pacienti s příznivou prognózou. V nejpočetnější skupině pacientů, s izolovanou mutací v *NPM1*, kopíroval počet přídatných mutací Gaussovo rozložení. Ve třech případech jsme u nich detekovali kombinaci tří *passenger* mutací a ve dvou dokonce kombinaci čtyř. Nejfrekventovanějšími mutacemi v souboru byly mutace v genu *DNMT3A* (28/54), následně *NRAS* (16/54), *IDH2* (12/54), *IDH1* (9/54). Pilotní studie klinických souborů AML přinesly řadu kontroverzních dat. Tyto mutace jsou v řadě studií považovány za prognosticky nepříznivé markery, které zkracují OS, a DFS nejen u AML (Yuang *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2019; Green *et al.*, 2011). Autoři tyto mutace řadí mezi rekurentní a i přesto, že jejich podíl na leukemogenezi AML byl jasně prokázán, přínos pro rizikovou stratifikaci AML je stále zatím nejasný.

Je popsána silná asociace mezi výskytem mutací *DNMT3A* a *NPM1*. Koexistence je dle Janečkové *et al.*, 2016 až 80 % s AML *DNMT3A*<sup>mut</sup> (Janečková *et al.*, 2016). Naše studie se prioritně zabývala podskupinou *NPM1* pozitivních pacientů. Incidence *DNMT3A* mutací v našem souboru byla 51,8 %. Mutace v *DNMT3A* genu byly rovnoměrně rozděleny do všech čtyř podskupin. Jednoznačné zhodnocení jejich prognostického potenciálu není možné i vzhledem k tomu, že se vyskytují v kombinaci s ostatními *passenger* mutacemi, především *IDH1/2*. Ve dvanácti případech byla detekována mutace v *IDH2*. Zachytili jsme výhradně mutace v kodonu Arg140, i přesto, že kodon ArgR172 máme NGS panelem pokrytý. *IDH1* byla mutována u devíti pacientů a byla zachycena výhradně u *NPM1*<sup>c+</sup> typu A. V šestnácti případech byly detekovány mutace v *hot spot* Gly12/Gly13/Gln61 genu *NRAS*. U tří pacientů s AML transformovanou z CMMoL nebyl *NRAS* v době stanovení diagnózy CMMoL detekován. Objevil se až ve vzorku transformace do AML. U dvou pacientů byla zachycena mutace *SRSF2*<sup>P95H</sup> a u jednoho *JAK2*<sup>V617F</sup>. Mutace *SRSF2* genu podle Grimm *et al.*, 2021 je možné v souborech AML detekovat u 13-25 % případů a popisuje asociaci těchto mutací s vyšším věkem, mužským pohlavím a nižšími hodnotami WBC. Uvádí se také, že převážnou část je možné detekovat u sAML (Jentzsch *et al.*, 2021). První pacient s mutací *SRSF2* měl v době diagnózy 62 let a jeho přežití i přesto, že podstoupil TKB, bylo pouze 31 měsíců. U tohoto pacienta se opakovaně objevoval relaps onemocnění. Hladina mutací v *SRSF2* a *IDH2* u něj byla stabilní v průběhu celého sledování, včetně vzorků s potvrzenou hematologickou a molekulárně biologickou remisí základního molekulárního markeru *NPM1*. Druhý pacient se *SRSF2* byl diagnostikován s AML v 57 letech a jeho přežití bylo pouze jeden měsíc. Oba

vstupně náleželi do prognostické skupiny *NPM1*<sup>c+</sup> s izolovanou mutací a příznivou prognózou. Zpětně u nich byly pomocí NGS mimo *SRSF2* detekovány ještě mutace v dalších třech genech. Ani *JAK2* mutace se u AML běžně nevyskytují (Hidalgo-López *et al.*, 2017). Jeden pacient měl kromě *JAK2* mutace detekovány ještě mutace v *DNMT3A* a *FLT3*<sup>TKD</sup>. V době diagnózy byla nálož *JAK2* mutace malá (VAF=2 %), ale v remisním vzorku byla již VAF=13 %. Pacient byl indikován k TKB a v následujících post-transplantačních odběrech mutace vymizela. Doba přežití tohoto pacienta na začátku roku 2022 je 156 měsíců. Oba tyto případy naznačují, že se u výše zmíněných tří pacientů mohl vykytovat MPN subklon již v době diagnózy. Je tedy možné, že u nich existovalo chronické myeloproliferativní onemocnění, které se transformovalo do sekundární AML.

Studii věnujících se výhradně podskupině AML s *NPM1* mutací není mnoho. Mezi recentní lze uvést studii 112 genů na 238 *NPM1* pozitivních AML (Wang *et al.*, 2021). Také Rossi *et al.*, 2022 se věnovala podrobné molekulární analýze AML *NPM1*<sup>c+</sup>/*FLT3*<sup>wt</sup> u 54 pacientů intenzivně léčených chemoterapií. Vzhledem k tomu, že podle ní právě u této podskupiny chybí jakýkoliv relevantní rizikový marker predikující a identifikující pacienty s tendencí k relapsu, je nezbytné provádět podrobnější molekulární testování. Medián sledování tohoto souboru byl 36 měsíců, OS 43,4 měsíců a u poloviny pacientů v souboru došlo k relapsu onemocnění. Vysoké procento relapsů vysvětluje tím, že v organismu i po léčbě zůstávají chemorezistentní subklony s danými mutacemi, které není možné současnými metodami detekovat na tak nízké úrovni VAF. Náš soubor také obsahuje limitovaný počet vzorků. Statistické analýzy není možné z tohoto důvodu spolehlivě vyhodnotit. Medián celkového přežití naší podskupiny *NPM1*<sup>c+</sup>/*FLT3*<sup>wt</sup> je 31 měsíců.

Při analýze vzorků ze sledování jednotlivých pacientů byly u části z nich detekovány nové mutace, které mohly vzniknout jako důsledek mutagenního potenciálu základní chemoterapie, případně mohlo jít o selekci minoritního a při diagnóze nedetekovatelného klonu. U tří pacientů byly v průběhu sledování prokázány různé *missense* mutace v genu *TP53*. Ve dvou případech byly detekovány NGS analýzou v remisních vzorcích po léčbě a u třetího pacienta se tato mutace objevila ve vzorku z relapsu onemocnění po TKB. U jedné pacientky s izolovanou mutací *NPM1*<sup>c+</sup> bez dalších *passenger* změn byla v průběhu sledování po konsolidační chemoterapii potvrzena nově vzniklá mutace *DNMT3A*<sup>R882H</sup>.

Exomové sekvenování se uplatňuje především v experimentální a výzkumné praxi. My jsme pro analýzu exomu vybrali zajímavé případy nemocných s *de novo* AML, u nichž byla odpověď na léčbu či průběh nemoci něčím atypické. U čtyř pacientů jsme analyzovali párové vzorky diagnóza – relaps před TKB – relaps po TKB, diagnóza – remise či diagnóza – rezistence.

U pacientky SS1975 s primárně rezistentním onemocněním byly exomovým sekvenováním detekovány mutace v genu *c-KIT* (Asp816Val a Cys233Ser). Gen *c-KIT* (CD117) kóduje receptor spojený s tyrozin kinázou, který ovlivňuje proliferaci a přežívání hematopoetických prekurzorů. V současnosti má *c-KIT* prognostický význam ve skupině *CBF* leukémií, kde jejich přítomnost zhoršuje příznivou prognózu. Tyto mutace byly také popsány jako příčina rezistence na Imatinib u *c-KIT*<sup>D816V</sup> pozitivních mastocytóz. V kontextu AML s NK zatím nebyly tyto mutace spolehlivě zhodnoceny. Nicméně vzhledem k podstatě a funkci samotného receptoru je velmi pravděpodobné, že tyto mutace hrají důležitou roli i u dalších skupin AML. U této pacientky byla dále detekována *missense* mutace v genu *CHEK2*, což je kináza nezbytná pro správnou signalizaci DNA poškození, konkrétně dvouvláknových zlomů.

Pacient UJ1955 byl do exomového sekvenování zařazen z důvodu opakovaných relapsů. Přes příznivou vstupní prognózu se první relaps objevil po 15 měsících od diagnózy a druhý po 15 měsících od prvního. Pacientův mutační profil byl *NPM1*<sup>c+</sup>/*FLT3*<sup>TKD</sup>/*SRSF2*<sup>P95H</sup>/*IDH2*<sup>R140Q</sup>/*NRAS*. V diagnóze byly překvapivě detekovány dvě nízkoalelické mutace v genu *NRAS* s VAF = 3,5 %. Obě postihovaly kodon Gly12. Nemůžeme spolehlivě říci, zda se jednalo o dva klony či jeden, který nesl kompletně mutovaný gen *NRAS*. Překvapivě v době druhého relapsu značně převažovala mutace *NRAS*<sup>G12C</sup> nad *NRAS*<sup>G12R</sup> (VAF = 21 % vs 8 %). V obou relapsech byly zachyceny mutace *SRSF2* a *IDH2*. Obě byly detekovány ve stabilní hladině i v průběhu léčby a v obou remisních vzorcích. Exomové sekvenování v době diagnózy navíc odhalilo mutaci v *DNMT1*, která přetrvávala i v obou relapsech. *DNMT1* je nezbytná pro správnou funkci HSC.

Analýza exomu u pacientky BI1965 odhalila v obou vzorcích navíc mutace v genu *CHEK2* a *WT1*. Mutace v *CHEK2* mají predispoziční význam pro nádorová onemocnění. U pacientky byla v homozygotní formě (VAF=100 %) v obou vzorcích. Lze tedy usuzovat, že u ní byla tato mutace germinálního původu. To se nám nepodařilo ověřit vzhledem k tomu, že pacientka zemřela ještě před analýzou exomu na progresi

základního onemocnění. Mutace postihující *WT1* byly u AML s NK již popsány. U tohoto genu je kromě mutací sledována i overexprese, která je považována za nepříznivý prognostický faktor a odráží onkogenní potenciál *WT1* (Rampal & Figueroa, 2016). Mutace *WT1* byly podle Paschky *et al.*, 2008 asociovány s horším OS a v kombinaci s dalšími mutacemi byly považovány za příčinu selhání odpovědi na indukční chemoterapii (Summers *et al.*, 2007).

Pacientka WM1970 byla diagnosticky obtížně zařaditelná. Vzhledem k vysokému počtu monocytů a hraničnímu počtu blastů byla zvažována diagnóza CMMoL s transformací do AML. V diagnostickém vzorku byla detekována vysoká nálož *NPM1* mutace, exomovým sekvenováním byly zachyceny mutace v genech pro topoizomerázu 2A (*TOP2A*), beta kateninu (*CTNNB1*) a tumor supresorovém genu *APC* (Tab. 4). Proteiny APC a CTNNB1 jsou významnými prvky signální dráhy *WNT/β-catenin*, aberantně aktivované především u leukemických kmenových buněk. Ta se podílí na jejich zvýšené proliferaci a buněčném přežívání. *APC* je významný tumor supresorový gen a mutace v kodonu Arg640Thr zasahuje protein v *Armadillo* doméně 5, která je podle databází velmi konzervovanou sekvencí a podílí se na protein-proteinových interakcích. Beta katenin v dráze WNT funguje jako signální transduktor, přenášející signál z receptoru *Frizzled* do buněčného jádra, kde jako transkripční koaktivátor spouští signály pro přežití. Žádný z těchto genů nebyl v rámci AML s NK spolehlivě zhodnocen.

U KA1970 byla v remisních vzorcích díky NGS odhalena nově vzniklá mutace *DNMT3A<sup>R882H</sup>*. Detekovali jsme ji ve všech následujících kontrolních vzorcích kostní dřeně až do současnosti a vykazuje stabilní hladinu. Tato mutace v době diagnózy nebyla prokázána. Navzdory tomu má pacientka normální hodnoty krevního obrazu a je sledována stran případného dalšího vývoje onemocnění. Exomové sekvenování navíc odhalilo v době diagnózy atypickou mutaci v genu *FLT3*, posunovou mutaci v *caretakers* genech *RAD21* a *MSH3*, které se podílejí na signalizaci a opravě DNA poškození. Mutace v *MSH3* genu jsou popsány především u solidních nádorů s mikrosatelitovou nestabilitou (kolorektální karcinom).

Pacienti s PMF mají v rámci skupiny MPN nejkratší 5-leté přežití. Asi jedna třetina pacientů s PMF má v době diagnózy detekovány prognosticky významné cytogenetické změny (Reilly, 2008) a z toho pouze 14 % pacientů s PMF má změny nepříznivého charakteru. Na molekulárně biologické úrovni se rutinně stanovuje přítomnost *driver* mutací ve třech základních genech, tj. *CALR*, *JAK2* a *MPL*. Stále ovšem zůstává malá část pacientů s MF bez detekovaných základních změn. Tito *triple* negativní pacienti mají prognosticky nejrizikovější subtyp myelofibrózy (Vannucchi a Guglielmelli, 2008). NGS umožnilo detekci dalších subklonálních změn, které jsou podle současných publikací detekovány až u 80 % PMF (Tefferi *et al.*, 2016; Delic *et al.*, 2016). Nejčastěji mutovaným genem u PMF je popisován *ASXL1* s frekvencí až 22 % případů. Vannucchi *et al.*, 2013 detekoval mutace v genech *TET2*, *SRSF2*, *DNMT3A*, *EZH2*, *CBL* a *IDH1/2* s frekvencemi 10 %, 9 %, 6 %, 5 %, 4 % a 3 % na souboru 879 PMF. Tefferi *et al.*, 2016 na souboru 182 PMF zachytil vyšší frekvence mutací v jednotlivých genech; *ASXL1* (36 %), *TET2* (18 %), *SRSF2* (18 %) a *U2AF1* (16 %). Všechny tyto geny, navíc s *TP53*, *U2AF1*, *NRAS* a *KRAS*, považuje Paz *et al.*, 2021 za „*high risk*“ geny spojené s nepříznivou progózou. V současnosti se uplatňují v rámci prognostické stratifikace, např. NCCN (Gugliemi *et al.*, 2018; Tefferi *et al.*, 2018, Lasho *et al.*, 2018). Tefferi *et al.*, 2018 upravil rizikovou stratifikaci PMF do třístupňového módu a vyčlenil kromě HR a „*favorable*“ ještě i skupinu „*very high risk*“. Podle Guglielmelli *et al.*, 2014 navíc záleží i na tom, kolik *passenger* mutací je identifikováno pomocí NGS u konkrétního pacienta. Práce prokázala, že pacienti se dvěma a více nepříznivými mutacemi mají nejkratší OS. Samotný vliv mutací v genu *ASXL1* na OS je doposud rozporuplný. Některé výzkumné skupiny potvrdily kratší OS (Vannucchi *et al.*, 2013), jiné zase neprokázaly, že by izolovaná mutace v *ASXL1* jakkoliv ovlivňovala prognózu (Paz *et al.*, 2021). Většina studií prokázala asociaci *ASXL1<sup>mut</sup>* s vyšším věkem nemocných, přítomnou leukocytózou, anémií a konstitučními symptomy. Horší OS bylo potvrzeno i u pacientů s mutacemi v *SRSF2*. Mutace v *IDH1/2* zase ovlivňují LFS (Vannucchi *et al.*, 2013). Také mutace v genech *CBL*, *KIT*, *RUNX1*, *CEPBA* a *SH2B3* podle Tefferi *et al.*, 2016 náleží k prognosticky nepříznivým faktorům, s horším OS a LFS, nezávisle na DIPSS Plus a typu *driver* mutace.

Náš soubor pacientů s myelofibrózou byl značně heterogenní. Byl v něm vysoký podíl pacientů se sMF (31/88; 35 %), pacientů v prefibrotickém stádiu bylo 16/88

(18 %) a PMF 41/88 (46,5 %). Nejčetnější byly skupiny pacientů s DIPSS LR (32/88) a DIPSS INT-1 (35/88). Menší skupinu tvořili pacienti s DIPSS INT-2 prognostickým skóre (18/88) a DIPSS HR onemocnění měli pouze tři pacienti. Padesát tři procent pacientů (44/88) z našeho souboru MF bylo bez detekovaných *passenger* mutací. Náleží sem i dva *triple* negativní pacienti, u nichž překvapivě ani NGS neodhalilo další subklonální změny. Jednu *passenger* mutaci jsme detekovali u 29,5 % (26/88), dvě u 15,9 % (14/88) a tři u jednoho pacienta s DIPSS INT-2. U pacientů s LR onemocněním byly mutace detekovány pouze sporadicky. Tito pacienti byli mladší a měli delší OS. Nejvyšší podíl LR nemocných byl právě ve skupině prePMF. Nejpočetnější skupina DIPSS INT-1 MF obsahovala pacienty, jejichž věk při diagnóze byl výrazně vyšší a měli kratší OS. Nejvyšší podíl mutací byl detekován u DIPSS INT-2. Zvyšující se frekvence *passenger* mutací s rostoucím DIPSS v době diagnózy odráží skutečnost, že výskyt těchto mutací souvisí se zvyšujícím se věkem. To nám potvrdila i multivariační analýza, která jako jediný signifikantní faktor ukázala právě prognostický skórovací systém DIPSS mezi všemi ostatními sledovanými faktory (Graf 4, Navrátilová *et al.*, 2021). Naše vysvětlení je takové, že věk a ostatní klinicko-laboratorní parametry jsou základním hodnotícím kritériem pro stanovení prognostického skóre DIPSS. Parametry tak odráží aktuální stav pacienta a odhalují klinicko patologický fenotyp onemocnění. DIPSS je na základě našich výsledků velmi dobře navrženým skórovacím systémem pro stanovení a predikci přežití pacientů s myelofibrózou.

*Passenger* mutace v rámci jednotlivých podskupin byly detekovány u 22/41 PMF, 4/16 prePMF a u 15/31 sekundárních MF, což odpovídá 53 %, 25 % a 48 %. V podskupině PMF byly mutace prokázány u 53,6 %. To koreluje i s tím, že PMF zahrnovala nejvíce pacientů starších 60 let (24/41; 58 %) a v rámci souboru měla nejvyšší medián věku při diagnóze v porovnání s ostatními poskupinami (62 vs. 49/51/60,5). Nejčastěji se v této poskupině vyskytovaly mutace v genech *ASXL1*, *U2AF1*, *SRSF2* a *CBL*, *TET2*, *SF3B1* spolu s *DNMT3A* ve frekvencích 31,7 %, 12,2 %, 9,8 %, 7,3 %, 4,8 %. Mutace v *ASXL1* se samostatně (s *driver* mutací) vyskytovaly pouze u minoritního počtu vzorků. Převážně byly detekovány s jinou další *passenger* mutací. Koexistence mezi *JAK2* a *U2AF1* popsána Tefferi *et al.*, 2016 se potvrdila i na našem PMF souboru. Mimo PMF byla mutace v *U2AF1* detekována pouze u jednoho pacienta s post-ET MF, také v kombinaci s *JAK2*.



*Passenger* mutace byly také detekovány u 11/31 SMF (35 %). I v rámci skupiny sMF byly patrné rozdíly. Pacienti s post-ET MF byli v době diagnózy výrazně mladší než pacienti s verifikovanou post-PV MF (51 vs. 60,5 roku). U post-ET MF byla nejčastěji detekována mutace v sestřihovém faktoru *SF3B1*. U post-PV MF se nacházely mutace v různých genech. Alelická nálož *JAK2* všech pacientů s post-PV MF byla homozygotního charakteru (86-98 % VAF). U jedné pacientky s postPV MF jsme NGS analýzou detekovali mutaci v *TP53*. Choroba u této pacientky progredovala již po jednom roce léčby. Nejmenší frekvence mutací byla zjištěna u prePMF (3/16; 18,7 %). Mutace byly detekovány výhradně u pacientů s vyšším DIPSS, kteří byli starší 60 let.

Obecně jsou výsledky všech těchto analýz značně heterogenní. Rozdíly mezi jednotlivými studiemi a publikovanými daty lze vysvětlit v první řadě nesourodými základními soubory vyšetřovaných vzorků. Převážná část publikovaných studií se zaměřuje na soubory složené výhradně z pacientů s PMF. Velikost našeho souboru je poměrně malá v porovnání s ostatními publikacemi. Vliv na výsledky má zcela jistě i velikost a pokrytí NGS panelů (malé vs. velké vs. WES). Práce Tefferi *et al.*, 2016 používala sice malý NGS panel o 27 genech, ale její soubor tvořilo 182 pacientů. Vannucchi *et al.*, 2013 porovnávali mutační profily u 13 genů na souboru 879 PMF pacientů. Naš soubor tvořilo 88 pacientů a NGS panel pro skrínování genů obsahoval mutační *hot spoty* (48 exonů) pro 20 genů popsanych u myeloproliferativních onemocnění. Tím si také vysvětlujeme nižší záchytnost mutací oproti ostatním souborům (46 % vs 80 %).

## 9. Závěr

V práci byl analyzován rozšířený mutační profil u 54 pacientů s akutní myeloidní leukémií s mutací v *NPM1* genu a 88 pacientů s verifikovanou myelofibrózou. Preleukemické mutace v době diagnózy byly detekovány u 46/54 AML pacientů (85 %) a 41/88 pacientů s MF (46 %). Nejfrekventovanějšími mutacemi v souboru AML byly mutace v genu *DNMT3A* (28/54), následně *NRAS* (16/54), *IDH2* (12/54), *IDH1* (9/54). NGS analýza neprokázala větší rozdíly mezi jednotlivými podskupinami (izol. *NPM1*<sup>c+</sup> x *NPM1*<sup>c+</sup>/*FLT3*<sup>low</sup> x *NPM1*<sup>c+</sup>/*FLT3*<sup>high</sup>), ale to mohlo být ovlivněno velikostí NGS panelu, stejně jako malým počtem vzorků v jednotlivých podskupinách. U 27 pacientů vybraných z AML *NPM1*<sup>c+</sup> skupiny byl sledován průběh onemocnění a hodnocen případný klonální vývoj. Srovnávali jsme přítomnost specifických mutací v době diagnózy se vzorky z doby remise onemocnění (po indukční a konsolidační chemoterapii), relapsu a po TKB. V části remisních vzorků jsme potvrdili přítomnost preleukemických mutací (*DNMT3A*, *IDH1/2*), které svědčí o přítomnosti preleukemického klonu, který je potenciálním zdrojem relapsu onemocnění. Při analýze vzorků z průběhu sledování jednotlivých pacientů byly u části z nich detekovány nové mutace, které mohly vzniknout jako důsledek mutagenního potenciálu základní chemoterapie, případně mohlo jít o selekci minoritního a při diagnóze nedetekovatelného klonu. Ve dvou remisních vzorcích, od různých pacientů, byly detekovány *high risk* mutace v genu *TP53*, jež nebyly v době diagnózy prokázány. Další mutace v *TP53* se objevila ve vzorku z relapsu onemocnění. Tyto mutace mohou odrážet genotoxicitu používané intenzivní chemoterapie a její negativní vliv i na fyziologickou hematopoézu.

*Passenger* mutace u pacientů s verifikovanou myelofibrózou byly detekovány u 22/41 PMF, 4/16 prePMF a u 15/31 sekundárních MF, což odpovídá 53 %, 25 % a 48 %. Pacienti s prefibrotickým stádiem myelofibrózy měli nejnižší frekvenci výskytu mutací, zatímco pacienti s PMF a sMF měli frekvenci výskytu stejnou. Nejčastěji se v souboru vyskytovaly mutace v genech *ASXL1*, *TET2*, *SF3B1* a *U2AF1*. Nejvíce pacientů mělo kombinaci *driver* mutace a jedné *passenger* mutace (26/88), u 13/88 pacientů byly detekovány současně dvě *passenger* mutace a jeden pacient měl přítomny tři *passenger* mutace spolu s *driver* mutací.

Díky celoexomovému sekvenování, které se prozatím využívá spíše na poli výzkumu, byly u všech pěti vybraných pacientů s AML odhaleny mutace v genech podílejících se na základních signálních drahách a dráze odpovědi buňky na DNA poškození (základní tumor supresorové geny, protoonkogeny). Tyto mutace u AML nemají v současnosti zatím jasně prokázaný význam, ale v konkrétním kontextu mohou tyto nálezy mít vliv na průběh onemocnění (mutace v *DNMT1*, *c-KIT* aj.).

Zavedení vyšetřování mutací v prognosticky významných genech u pacientů s myeloidními malignitami pomocí NGS zlepšuje diagnostickou a léčebnou úroveň tím, že zpřesňuje prognostické hodnocení a v konečném důsledku může vést k úpravě léčebné strategie v rámci poskytované péče u uvedených skupin onemocnění. Detekce přítomnosti mutací v době diagnózy napomáhá odhalit pacienty s rizikovějším onemocněním a poskytuje důležité informace pro další zhodnocení a volbu léčebného postupu. Preleukemické mutace, jako molekulární markery klonality (nejčastěji mutace v genech *ASXL1*, *EZH2*, *TET2*, *IDH1/2*, *SRSF2*, *SF3B1*), umožňují také potvrdit přítomnost klonální hematopoézy a to především u pacientů, u nichž základními vyšetřovacími metodami nebyla žádná mutace potvrzena (*triple* negativní MPN). Mutace v těchto genech jsou obecně spojeny s horší prognózou onemocnění. Jejich vysoká frekvence bývá zachycena u pacientů, u nichž došlo k progresi či transformaci choroby. Sekvenování nové generace se v současné době jeví jako optimální metoda pro stanovení uvedených mutací.

## 10. Seznam tabulek, grafů, obrázků

- Tabulka 1: Dostupné NGS panely pro detekci mutací u myeloproliferací
- Tabulka 2: Srovnání jednotlivých sekvenačních technologií
- Tabulka 3: Charakteristika souboru AML s *NPM1*<sup>c+</sup>
- Tabulka 4: Incidence mutací u jednotlivých podskupin MF
- Tabulka 5: Detekované mutace u UJ pomocí exomového sekvenování
- Tabulka 6: Detekované mutace u KA pomocí exomového sekvenování
- Tabulka 7: Detekované mutace u SS pomocí exomového sekvenování
- Tabulka 8: Detekované mutace u BI pomocí exomového sekvenování
- Tabulka 9: Detekované mutace u WM pomocí exomového sekvenování
- 
- Graf 1: Početní zastoupení mutací na vzorek v souboru AML *NPM1*<sup>+</sup>
- Graf 2: *Follow up* pacienta s *de novo* AML
- Graf 3: *Follow up* pacienta s transformovanou AML
- Graf 4: Frekvence jednotlivých mutací u MF
- Graf 5: Počet *passenger* mutací na vzorek u MF
- Graf 6: Počet mutací v jednotlivých DIPSS skupinách
- 
- Obrázek 1: Prognostická klasifikace AML podle ELN 2017
- Obrázek 2: Obecné schéma sekvenační knihovny
- Obrázek 3: Schéma postupu NGS
- Obrázek 4: Cílové exony v panelu ClearSeq AML
- Obrázek 5: Elektroforetogram výsledné NGS knihovny na Bioanalyzáru
- Obrázek 6: Zastoupení mutací v jednotlivých vzorcích AML v době Dg
- Obrázek 7: Koincidence mutací u pacientů s MF v jednotlivých podskupinách
- Obrázek 8: Mutace v genu *NRAS* u UJ

Obrázek 9: *c-KIT* p.Asp816Val

Obrázek 10: Homozygotní mutace v *CHEK*

## 11. Literární zdroje

- Khoury JD, Solary E, Abla O, *et al.* The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. *Leukemia*. 2022; 36, 1703–1719.
- Papaemmanuil E, Gerstung M, Macolovati L. Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2013; 122 (22): 3616–3627.
- Zhao LP, Daltro De Oliveira R, Marcault R. *SF3B1* mutations in the Driver Clone Increase the Risk of Evolution to Myelofibrosis in Patients with Myeloproliferative Neoplasms. *Blood*. 2020; 136 (Supplement 1): 1.
- Krejčí D, Pehalová D, Talábová L, *et al.* Současné epidemiologické trendy novotvarů v České republice. Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR, 2018.
- Kantarjian H, Kadia T, DiNardo C, *et al.* Acute myeloid leukemia: current progress and future directions. *Blood Cancer J*. 2021; 11, 41.
- Pelcovits A & Niroula R. Acute Myeloid Leukemia: A Review *R I Med J*. 2020; 103 (3): 38-40.
- Döhner H, Estey E, Grimwade D, *et al.* Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*. 2017; 129: 424–47.
- Heusser M. *et al.* 2021 Update on MRD in acute myeloid leukemia: a consensus document from the European Leukemia Net MRD Working Party. *Blood*. 2021; 138 (26): 2753–2767.
- Bewersdorf, J.P. *et al.* Epigenetic therapy combinations in acute myeloid leukemia: what are the options? *Therapeutic Advances in Hematology*. 2019; 10: 1-19.
- Ravandi F, Walter RB & Freeman SD. Evaluating measurable residual disease in acute myeloid leukemia. *Blood Adv*. 2018; 2 (11): 1356–1366.
- Falini B, Mecucci C, Tiacci E, *et al.* Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *N Engl J Med*. 2005; 352: 254-66.
- Marcucci G, Haferlach T, Dohner H. Molecular genetics of adult acute myeloid leukemia: prognostic and therapeutic implications. *J Clin Oncol*. 2011; 29: 475-86.
- Liu Y, He P, Liu F, *et al.* Prognostic significance of NPM1 mutations in acute myeloid leukemia: A meta-analysis. *Mol Clin Oncol*. 2014; 2: 275-81.
- Bertoli S, Tavitian S, Bérard E, *et al.* More than ten percent of relapses occur after five years in AML patients with NPM1 mutation. *Leukemia & Lymphoma*. 2020; 61: 5, 1226-1229.
- Höllein A, Meggendorfer M, Dicker F, *et al.* *NPM1* mutated AML can relapse with wild-type *NPM1*: persistent clonal hematopoiesis can drive relapse. *Blood Adv*. 2018; 2 (22): 3118–3125.

- Campř V. Histologická diagnostika Ph-negativních myeloproliferativních neoplázií. Čes.-slov. Patol. 47, 2011, No. 3, p. 84-93.
- Levine RL, Wadleigh M, Cools J, *et al.* Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell.* 2005; 7: 387-397.
- Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, *et al.* Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 2005; 365: 1054-1061.
- James C, Ugo V, Le Couédic JP, *et al.* A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signaling causes polycythaemia vera. *Nature.* 2005; 434: 1144-1148.
- Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, *et al.* A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med.* 2005; 352: 1779-1790.
- Scott L. The JAK2 exon 12 mutations: comprehensive review. *Am. J. Hemat.* 86 (6): 668-676.
- Pikman Y, Lee BH, Mercher T, *et al.* MPL W515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *PLoS Med.* 2006; e270.
- Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS, *et al.* Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med.* 2013; 369: 2379-2390.
- Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ, *et al.* Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. *N Engl J Med.* 2013; 369: 2391-2405.
- Chi J, Nicolauo KA, Nicolaidou V, *et al.* Calreticulin gene exon 9 frameshift mutations in patients with thrombocytosis. *Leukemia.* 2014; 28: 1152-1154.
- Mansier O, Migeon M, Etienne G, *et al.* JAK2 V617F and CALR double mutations are more frequently encountered in patients with low JAK2V617F allelic burdens, *Leukemia & Lymphoma* 2016 (57): 1949-1951.
- Usseglio F, Beaufils N, Calleja A, *et al.* Detection of CALR and MPL Mutations in Low Allelic Burden JAK2 V617F Essential Thrombocythemia. *The Journal of Molecular Diagnostics.* 2017; 19 (1): 92-98.
- Nussenzveig RH, Pham HT, Perkins SL, *et al.* Increased frequency of coexisting JAK2 exon-12 or MPL exon 10 mutations in patients with low JAK2 V617F allelic burden. *Leukemia & Lymphoma,* 57:6, 1429-1435.
- Vannucchi AM, Lasho TL, Guglielmelli P, *et al.* Mutations and prognosis in primary myelofibrosis. *Leukemia.* 2013; 27: 1861–1869.
- Guglielmelli P, Lasho TL, Rotunno G, *et al.* The number of prognostically detrimental mutations and prognosis in primary myelofibrosis: an international study of 797 patients. *Leukemia.* 2014; 28: 1804–1810.
- Lundberg P, Karow A, Nienhold R, *et al.* Clonal evolution and clinical correlates of somatic mutations in myeloproliferative neoplasms. *Blood.* 2014; 123: 2220–2228.

- Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016; 127: 2391-2405.
- Barosi G, Mesa RA, Thiele J, et al. Proposed criteria for the diagnosis of post-polycythemia vera and post-essential thrombocythemia myelofibrosis: a consensus statement from the international working Group for Myelofibrosis Research and Treatment. *Leukemia*. 2008; 22: 437-438.
- Passamonti F, Giorgino T, et al. A clinical-molecular prognostic model to predict survival in patients with post polycythemia vera and post essential thrombocythemia myelofibrosis. *Leukemia*. 2017; 31: 2726–2731.
- Tefferi A. Primary myelofibrosis: 2019 update on diagnosis, risk stratification and management. *Am J Hematol*. 2018; 93: 1551–1560.
- Tefferi A, Lasho TL, Finke CM, et al. Targeted deep sequencing in primary myelofibrosis. *Blood Adv*. 2016; 1: 105-111.
- Guglielmelli P, Lasho TL, Rotunno G, et al. MIPSS70: mutation enhanced international prognostic score system for transplantation-age patients with primary myelofibrosis. *J Clin Oncol*. 2018; 36: 310- 318.
- Tefferi, A., Finke, C.M., Lasho, T.L. et al. U2AF1 mutation types in primary myelofibrosis: phenotypic and prognostic distinctions. *Leukemia*. 2018; 32: 2274–2278.
- Lasho TL, Mudireddy M, Finke CM, et al. Targeted next-generation sequencing in blast phase myeloproliferative neoplasms. *Blood Adv*. 2018; 2: 370-380.
- Tefferi, A., Guglielmelli, P., Nicolosi, M. et al. GIPSS: genetically inspired prognostic scoring system for primary myelofibrosis. *Leukemia*. 2018; 32: 1631–1642.
- Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L. Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 2016; 374 (23): 2209-21.
- Goodwin S, McPherson J. & McCombie W. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat Rev Genet*. 2016; 17: 333–351.
- Serrati S, De Summa S, Pilato B, et al. Next-generation sequencing: advances and applications in cancer diagnosis. *Onco Targets Ther*. 2016; 9: 7355-7365.
- Hulick P. Next-generation DNA sequencing (NGS): Principles and clinical applications. Up to date; 2020.
- Kukurba K. & Montgomery SB. RNA Sequencing and Analysis Cold Spring Harb Protoc. 2015; 11: 951–969.
- Kanagawa T. Bias and artifacts in multitemplate polymerase chain reactions (PCR). *J Biosci Bioeng*. 2003; 96: 317–323.
- Fox EJ, Reid-Bayliss KS, Emond MJ, et al. Accuracy of Next Generation Sequencing Platforms. *Next Gener Seq Appl*. 2014; 1:



- McCarthy A. Third generation DNA sequencing: pacific biosciences' single molecule real time technology. *Chem Biol.* 2010; 17(7): 675-6.
- Leisch M, Jansko B, Zaborsky N, *et al.* Next Generation Sequencing in AML On the Way to Becoming a New Standard for Treatment Initiation and/or Modulation? *Cancers (Basel).* 2019; 11 (2): 252.
- Hussaini MO, Mirza AS, Komrokji R, *et al.* Genetic Landscape of Acute Myeloid Leukemia Interrogated by Next-generation Sequencing: A Large Cancer Center Experience. *Cancer Genomics Proteomics.* 2018; 15: 121–126.
- Ruffalo M, Husseinzadeh H, Makishima H, *et al.* Whole-exome sequencing enhances prognostic classification of myeloid malignancies. *J. Biomed. Inform.* 2015; 58:104–113.
- Lindsley RC, Mar BG, Mazzola E, *et al.* Acute myeloid leukemia ontogeny is defined by distinct somatic mutations. *Blood.* 2015; 125:1367–1376.
- Yuan XQ, Peng L, Zeng WL, *et al.* DNMT3A R882 Mutations Predict a Poor Prognosis in AML A Meta-Analysis From 4474 Patients. *Medicine (Baltimore).* 2016; 95(18):e3519.
- Wang R, Gao X, Yu L. The prognostic impact of tet oncogene family member 2 mutations in patients with acute myeloid leukemia: a systematic-review and meta analysis. *BMC Cancer.* 2019; 1:1-11
- Green CL, Evans CM, Zhao L, *et al.* The prognostic significance of IDH2 mutations in AML depends on the location of the mutation. *Blood.* 2011; 118 (2):409–412.
- Janečková V., Semerád L., Ježíšková I., *et al.* Molekulárně genetické vyšetření u akutnímyeloidní leukemie. *Klin Onkol.* 2016; 29(6): 411–418.
- Grimm J, Jentzsch M, Bill M, *et al.* Clinical implications of SRSF2 mutations in AML patients undergoing allogeneic stem cell transplantation. *Am J Hematol.* 2021; 96(10):1287-1294.
- Jentzsch M, Grimm J, Bill M, *et al.* ELN risk stratification and outcomes in secondary and therapy-related AML patients consolidated with allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2021; 56(4): 936-945.
- Hidalgo-López JE, Kanagal-Shamanna R, Medeiros LJ, *et al.* Morphologic and Molecular Characteristics of De Novo AML With JAK2 V617F Mutation. *J Natl Compr Canc Netw.* 2017; 15(6):790-796.
- Wang, B., Yang, B., Wu, W. *et al.* The correlation of next-generation sequencing-based genotypic profiles with clinicopathologic characteristics in *NPM1*-mutated acute myeloid leukemia. *BMC Cancer.* 2021; 21 (788). doi.org/10.1186/s12885-021-08455-7
- Rossi M, Nizzoli ME, Gallì A, *et al.* Sequential next generation sequencing analysis in homogeneously treated low risk *NPM1*-mutated acute myeloid leukemia with an adverse clinical outcome. *Am J Hematol.* 2022; doi: 10.1002/ajh.26469.

Rampal R, Figueroa ME. Wilms tumor 1 mutations in the pathogenesis of acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2016;101(6):672-679.

Paschka P, Marcucci G, Ruppert AS, *et al.* Wilms' tumor 1 gene mutations independently predict poor outcome in adults with cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a cancer and leukemia group B study. *J Clin Oncol*, 2008, vol. 26:28: 4595-4602.

Summers KJS, Kakkas I, *et al.* Wilms' tumour 1 mutations are associated with FLT3-ITD and failure of standard induction chemotherapy in patients with normal karyotype AML. *Leukemia*. 2007; 3(21): 550-551.

Reilly JT. Pathogenetic insight and prognostic information from standard and molecular cytogenetic studies in the BCR-ABL negative myeloproliferative neoplasms (MPNs). *Leukemia*. 2008; 22: 1818–1827.

Vannucchi AM & Guglielmelli P. Molecular pathophysiology of Philadelphia-negative myeloproliferative disorders: beyond JAK2 and MPL mutations. *Haematologica*. 2008; 93(7): 972-976.

Vannucchi AM, Lasho TL, Guglielmelli P, *et al.* Mutations and prognosis in primary myelofibrosis. *Leukemia*. 2013; 27(9): 1861-1869.

Paz DL, Riou J, Verger E, *et al.* Genomic analysis of primary and secondary myelofibrosis redefines the prognostic impact of ASXL1 mutations: a FIM study. *Blood Adv*. 2021; 5 (5): 1442–1451.

Guglielmelli P, Lasho TL, Rotunno G, *et al.* The number of prognostically detrimental mutations and prognosis in primary myelofibrosis: an international study of 797 patients. *Leukemia* 2014; 28(9): 1804-1810.

Navrátilová, J, Palová, M, Szotkowski, T, *et al.* The role of new technologies in myeloproliferative neoplasms: Application of next-generation sequencing in myelofibrosis. *Int J Lab Hematol*. 2021; 43: 1070– 1077.

Ostatní zdroje:

Kulkarni S. & Pfeifer J. Clinical genomics. A guide to clinical next generation sequencing. Academic Press 2015.

## 12. Seznam publikací autora

### **Původní vědecké publikace in exteso v daném oboru uveřejněné v časopisech s IF**

**Navrátilová J**, Palová M, Szotkowski T, Hluší A, Katrincsáková B, Papajík T, Indrák K. *The role of new technologies in myeloproliferative neoplasms: Application of next-generation sequencing in myelofibrosis*. Int J Lab Hematol. 2021 Oct;43(5):1070-1077.

**IF (2022) = 2,877**

Palova M, Szotkowski T, Hlusi A, Indrak K, **Navratilova J**, Divoka M, Papajik T. *Effect of CALR and JAK2 mutations on the clinical and hematological phenotypes of the disease in patients with myelofibrosis – long term experience from a single center*. Neoplasma 2018; 65(2): 296-303.

**IF (2018) = 1,696**

Palova M, Slavik L, Hlusi A, Szotkowski T, Ulehlova J, Divoka M, **Navrátilova J**, Papajík T. *Thrombin generation testing in patients with myelofibrosis*. Clin Lab 2018; 64(9): 1373-1383.

**IF (2018) = 0,848**

### **Přehledné vědecké práce uveřejněné v recenzovaných časopisech bez IF**

**J. Navrátilová**; B. Katrincsáková; T. Szotkowski; K. Indrák; H. Urbánková; T. Papajík. *Mutace v epigenetických regulátorech – potenciální prognostické markery a terapeutické cíle u akutní myeloidní leukemie*. Transfuzie Hematol. dnes. 2020 (28), No. p. 1-7.

Palová M, Szotkowski T, Hluší A, **Navrátilová J**, Divoká M, Papajík T, Petrová P, Prošková J. *Hodnocení kostního obratu a významu deficitu vitamínu D u pacientů s myelofibrózou*. Transfuzie Hematol.dnes 1, 2018, No. online, p: 1-15,

**Seznam přednášek/ posterů přednesených uchazečem na odborných veřejných fórech (1. autor/ přednášející)**

**2016** - 30. OHD (poster)

Srovnání simplex RT-PCR a kvantitativní RT-PCR při sledování hladiny transkriptu nucleophosminu NPM1 u pacientů s akutní myeloidní leukémií v hematologické remisi

**2017** - 17. ČS konference laboratorní hematologie (poster)

Molekulárně genetická charakterizace pacientů s akutní myeloidní leukémií s normálním karyotypem – zkušenosti jednoho centra

**2017** - 31. OHD – ústní sdělení

Laboratorní diagnostika akutních leukémií podle WHO 2016 z pohledu molekulárního biologa

**2018** - 32. OHD (poster)

Detection of CALR mutations in JAK2 V617F positive patients

Skríning mutací v epigenetických regulátorech u pacientů s akutní myeloidní leukémií s mutací NPM1 pomocí sekvenování nové generace: první zkušenosti

Mutace genů *ASXL1*, *EZH2*, *IDH1*, *IDH2* a *SRSF2* u pacientů s myelofibrózou – pilotní analýza jednoho centra

**2019** - 33. OHD (poster)

Sledování klonálního vývoje u pacientů s akutní myeloidní leukémií s mutací v NPM1 pomocí sekvenování nové generace

**2019** - Dni molekulové patologie (Martin, SK) ústní sdělení

**Ostatní publikace**

Jorda R, Schütznerová E, Cankař P, Brychtová V, Navrátilová J, Kryštof V. Novel arylazopyrazole inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Bioorg Med Chem.* 2015 May 1;23(9):1975-81.

Jorda R, Navrátilová J, Hušková Z, Schütznerová E, Cankař P, Strnad M, Kryštof V. Arylazopyrazole AAP1742 inhibits CDKs and induces apoptosis in multiple myeloma cells via Mcl-1 downregulation. *Chem Biol Drug Des.* 2014 Oct;84(4):402-8.

Jorda R, Havlíček L, McNae IW, Walkinshaw MD, Voller J, Sturc A, Navrátilová J, Kuzma M, Mistrík M, Bártek J, Strnad M, Kryštof V. Pyrazolo[4,3-d]pyrimidine bioisostere of roscovitine: evaluation of a novel selective inhibitor of cyclin-dependent kinases with antiproliferative activity. *J Med Chem.* 2011 Apr 28;54(8):2980-93.