

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2019

Bc. Jiřina Maňáková

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Detekce strukturních variant
u pacientů s mnohočetným myelomem
metodou optického mapování**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Jiřina Maňáková
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Ing. Regina Fillerová, Ph.D.
Rok:	2019

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením školitelky Ing. Reginy Fillerové, Ph.D. s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním diplomové práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	MNOHOČETNÝ MYELOM	2
2.1	Progrese u MM	3
2.2	Klinické příznaky	4
2.3	Diagnostické hodnocení	5
2.3.1	Vyšetřovací metody	6
2.4	Léčba a prognóza MM	7
2.5	Chromozomální abnormality u pacientů s MM a jejich význam	8
2.5.1	Aneuploidie	9
2.5.2	Translokace	10
2.5.3	Delece chromozomu 13	12
2.5.4	Abnormality chromozomu 1	13
2.5.5	Delece chromozomu 17	14
2.6	Cytogenetické vyšetřovací metody u pacientů s MM	15
2.6.1	Vyšetření karyotypu	15
2.6.2	<i>FISH</i>	16
2.6.3	Genomová komparativní hybridizace (arrayCGH)	17
3	OPTICKÉ MAPOVÁNÍ	18
3.1	Princip metody	19
3.2	Irys a Saphyr – BionanoGenomics	20
3.3	Metody značení DNA	21
3.3.1	Enzymatické značení DNA	21
3.3.2	Značení DNA na základě afinity	23
3.4	Nanokanálový čip	24
3.5	Sestavení genomových map	26
3.6	Detekce strukturních změn	27
3.7	Využití v klinické oblasti	29
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	31
4.1	Materiál	31
4.1.1	Chemikálie	31
4.1.2	Přístroje	31
4.1.3	Komerční soupravy	32
4.1.4	Roztoky	32
4.2	Metody	33
4.2.1	Izolace mononukleárních buněk z KD	33
4.2.2	Imunopozitivní magnetická selekce PB	33
4.2.3	Příprava plugu	34
4.2.4	Degradace proteinů a RNA	34
4.2.5	Promytí plugů	34
4.2.6	Lýze plugů	34
4.2.7	Rozpuštění agarosy	35
4.2.8	Dialýza pro přečištění DNA	35
4.2.9	Homogenizace DNA	35
4.2.10	DNA kvantifikace	35
4.2.11	Značení DNA – NLRS	36
4.2.11.1	Štěpení DNA	36
4.2.11.2	Značení, oprava a barvení celé molekuly DNA	37
4.2.12	Značení DNA – DLS	38
4.2.12.1	DLE – 1 značení	38
4.2.12.2	Odmytí nenavázané DL-green	39
4.2.12.3	Barvení DNA a homogenizace	39
4.2.12.4	Kvantifikace značené a barvené DNA	40
4.2.13	Nanesení vzorku na Bionano čip a spuštění běhu	40

4.2.14	Zpracování výsledků	40
5	VÝSLEDKY	42
5.1	Optimalizace metody	42
5.1.1	Separace myelomových buněk	42
5.1.2	Izolace vysokomolekulární DNA	46
5.1.3	Zobrazení molekul DNA	48
5.2	Studium nalezených SV u pacientů s mnohočetným myelomem	48
5.2.1	Klinická charakteristika pacientů	49
5.2.2	Cytogenetická vyšetření	50
5.2.3	Vytvoření optické mapy a analýza SV	52
5.2.4	Přídavné změny detekované metodou optického mapování	55
5.2.4.1	Translokace	55
5.2.4.2	IgH lokus	57
5.2.4.3	Chromozom 17	59
5.2.4.4	Chromozom 18	60
5.2.4.5	Chromozom 6	61
6	DISKUSE	62
7	ZÁVĚR	66
8	LITERATURA	67
9	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	75

Poděkování

Touto cestou bych ráda poděkovala především vedoucí mé diplomové práce Ing. Regině Fillerové, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost, cenné rady, připomínky a pomoc při psaní této práce. Dále bych velmi ráda poděkovala doc. Dr. Evě Kriegové a všem pracovníkům Laboratoře molekulární imunologie Ústavu imunologie FN a LF UP v Olomouci (přednosta prof. MUDr. Mgr. Milan Raška, Ph.D.) za vstřícný a přátelský přístup. Dále děkuji přednostovi Hemato-onkologické kliniky Fakultní nemocnice v Olomouci prof. MUDr. Tomáši Papajíkovi CSc. a doc. MUDr. Jiřímu Minaříkovi, Ph.D. za poskytnutí klinického materiálu. V další řadě bych ráda poděkovala Cytogenetické laboratoři Hemato-onkologické kliniky FN Olomouc (vedoucí Mgr. Helena Urbánková, Ph.D.) za poskytnutí výsledků cytogenetických analýz.

V neposlední řadě bych chtěla vyjádřit nesmírnou vděčnost své rodině a nejbližším za trvalou podporu po celou dobu mého studia.

Práce vznikla za finanční podpory grantu IGA_LF_2019_014.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Jiřina Maňáková
Název práce	Detekce strukturních variant u pacientů s mnohočetným myelomem metodou optického mapování
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Ústav imunologie, Laboratoř molekulární imunologie
Vedoucí práce	Ing. Regina Fillerová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2019

Abstrakt

Mnohočetný myelom (MM) je druhé nejčastěji se vyskytující hematologické onemocnění. Je charakterizováno klonální proliferací maligních B-buněk a jejich nekontrolovanou diferenciací v myelomové buňky v kostní dřeni. V patogenezi tohoto onemocnění hrají významnou roli genetické abnormality, které ovlivňují vývoj onemocnění, mají vliv na prognózu a také na terapeutickou odpověď.

V současné době jsou pro rutinní diagnostiku chromozomových aberací u mnohočetného myelomu používány tradiční cytogenetické metody (stanovení karyotypu, *FISH* nebo arrayCGH). V této práci byla pro detekci chromozomových změn u MM testována nová metoda optického mapování, která umožňuje studium strukturních a početních variant v celém genomu v podobě delecí, inzercí, duplikací, inverzí a translokací včetně změn v počtu kopií chromozomů v rozsahu stovek kbp, které současné metody nejsou schopny detekovat.

První část experimentální práce byla věnována optimalizaci separace myelomových buněk s cílem nalézt vhodnou separační metodu pro získání populace plazmatických buněk v dostatečné čistotě a množství pro metodu optického mapování. V neposlední řadě byla také optimalizována izolace vysokomolekulární DNA z myelomových buněk kostní dřene a srovnány metody fluorescenčního značení vysokomolekulární DNA.

V další části byla využitelnost metody optického mapování pro detekci chromozomových změn prezentována na analýze pěti vybraných vzorků kostní dřene nově diagnostikovaných pacientů s MM. Ze separovaných myelomových buněk byla izolována

vysokomolekulární DNA, která byla specificky fluorescenčně značena pomocí DLS chemie a vizualizována systémem Saphyr (BionanoGenomics). Poté byly sestaveny genomové mapy a porovnány s referenčním genomem (hg38) na základě značených specifických sekvenčních motivů. Nakonec byly nalezené strukturní variace (SV) porovnány s databází zdravých jedinců a byly analyzovány pouze *de novo* SV.

Výsledky optického mapování byly srovnány s nalezenými chromozomovými změnami pomocí cytogenetických analýz. Metoda optického mapování potvrdila všechny strukturní změny detekované standardními cytogenetickými metodami. Kromě těchto změn byly u všech pacientů nalezeny další *de novo* strukturní abnormality. Převážná část nalezených SV byly delece (60 %), dále byly detekovány nové translokace, z nichž většina byla intrachromozomální (64 %) na chromozomech 3, 4, 6, 14, 16, 17 a 18. Interchromozomální translokace (36 %) zahrnovaly chromozomy 2, 8, 3, 6, 12, 17 a 22. U všech vzorků byly také nalezeny *de novo* SV na chromozomu 17.

Naše výsledky ukazují, že nová technologie optického mapování má potenciál pro detekci chromozomových abnormalit v takovém rozsahu, který běžně dostupné metody neumožňují. Tyto nově nalezené strukturní změny by mohly vést k lepšímu pochopení variability genomu a také ovlivnit klinickou prognózu nebo odpověď na terapii u pacientů s MM.

Klíčová slova	Mnohočetný myelom, optické mapování, strukturní změny, genetické abnormality, translokace, delece, změny v počtu kopií chromozomů
Počet stran	76
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Bc. Jiřina Maňáková
Title	Detection of structural variants in patients with multiple myeloma by optical mapping
Type of thesis	Diploma
Department	Department of Immunology
Supervisor	Ing. Regina Fillerová, Ph.D.
The year of presentation	2019

Abstract

Multiple myeloma (MM) is the second most common haematological disease. It is characterized by clonal proliferation of malignant B cells and their uncontrolled differentiation in myeloma cells in the bone marrow. The genetic abnormalities play a critical role in the pathogenesis of this disease by affecting the progression of the disease, its prognosis and the therapeutic response.

Nowadays, karyotype and *FISH* or arrayCGH have been standard diagnostic tools for detection of chromosomal aberrations in multiple myeloma. In diploma thesis, a new method of optical mapping has been tested for the detection of chromosomal changes in multiple myeloma, which allows the study of structural variants of the whole genome in the form of deletions, insertions, duplications, inversions and translocations, including changes in copy number variations (CNV) in the hundreds of kbp range that the current methods are unable to detect.

The first part of the thesis was devoted to optimizing the myeloma cells separation in order to find a suitable separation method for obtaining a plasma cell population in sufficient purity and amount for the optical mapping method. Last but not least, the isolation from bone marrow myeloma cells was optimized, and the methods of the fluorescence labeling of high molecular weight DNA were compared.

In the next part of the thesis, the useability of the optical mapping method for the detection of chromosomal changes was presented on the analysis of five bone marrow samples from newly diagnosed MM patients. High molecular weight DNA was isolated

from the separated myeloma cells, specifically labeled with DLS chemistry and visualized using Saphyr system (BionanoGenomics). Genomic maps were then assembled as compared to the reference genome (hg38) based on known labeled specific motifs. Finally, the found SVs were compared with the database of healthy individuals and analyzed only *de novo* SV.

The results of optical mapping were compared with the found chromosomal changes by cytogenetic analyzes. The optical mapping method confirmed all structure changes detected by standard cytogenetic methods. In addition to these changes, all *de novo* structural abnormalities were found in all patients. The vast majority of SV were deletions (60 %), new translocations were detected, most of which were intrachromosomal (64 %) on chromosomes 3, 4, 6, 14, 16, 17 and 18. Interchromosomal translocation (36 %) included chromosomes 2, 8, 3, 6, 12, 17 and 22. *De novo* SV on chromosome 17 was also found in all samples.

Our results show that the new technology of optical mapping has the potential to detect large SV unidentifiable by commonly used methods. These newly found structural changes could lead to a better understanding of genome variability and also affect clinical prognosis or response to therapy in MM patients.

Keywords	Multiple myeloma, optical mapping, structural variation, genetic abnormalities, translocations, deletions, copy number variations
Number of pages	76
Number of appendices	0
Language	Czech

Cíle práce

V teoretické části diplomové práce byla vypracována literární rešerše zaměřená na studium genetických abnormalit u onemocnění mnohočetného myelomu a dále byly diskutovány možnosti detekce strukturních změn u tohoto onemocnění. Další část literární rešerše byla věnována nové metodě optického mapování, která umožňuje komplexní analýzu celého genomu.

Cílem experimentální části diplomové práce byla optimalizace postupu přípravy vysokomolekulární DNA ze separovaných myelomových buněk kostní dřeně pacientů s mnohočetným myelomem a srovnání metod fluorescenčního značení specifických motivů. Následně byla provedena vizualizace vysokomolekulární DNA na optickém čipu pomocí přístroje Saphyr, detekce molekul a sestavení genomových map (*de novo* assembly). V další části této práce bylo cílem porovnání výsledků optického mapování s cytogenetickými analýzami a identifikace nových strukturních změn detekovaných pouze optickým mapováním.

1 ÚVOD

Mnohočetný myelom je zhoubné nádorové onemocnění plazmatických buněk způsobené maligní transformací B lymfocytů, jejich nekontrolovanou proliferací a diferenciací. Patologické plazmatické buňky (myelomové buňky) produkují monoklonální imunoglobuliny a další cytokiny, které způsobující poměrně pestré a různě intenzivně vyjádřené projevy nemoci. Transformace normální B buňky na maligní plazmatickou buňku se odehrává v mnoha krocích, ve kterých dochází k četným změnám struktury chromozomů a dalším genetickým abnormalitám. Genetické změny jsou základem pro pochopení patogeneze tohoto onemocnění a jeho vývoj, ovlivňují prognózu a mají také dopad na léčebný postup u pacientů s mnohočetným myelomem (Corre *et al.*, 2015).

V současné době patří mezi rozhodující diagnostické metody, používané k detekci strukturních změn u mnohočetného myelomu, cytogenetická vyšetření, a to zejména karyotypování, fluorescenční *in situ* hybridizace (*FISH*) a komparativní genomová hybridizace (arrayCGH). S narůstajícími genetickými poznatky u tohoto onemocnění roste i význam vyšetření strukturních změn ve větším rozsahu, než současné cytogenetické metody umožňují, a to díky svým limitacím v podobě nižšího mitotického potenciálu plazmatických buněk a zaměření na detekci pouze klíčových chromozomových aberací během vyšetření (Saxe *et al.*, 2019).

Diplomová práce se zaměřuje na využití nové metody optického mapování pro detekci strukturních změn u mnohočetného myelomu. Tato metoda detekuje strukturní změny, především v podobě delecí, inzercí, duplikací, inverzí a translokací včetně změn v počtu kopií chromozomů, z vysokomolekulární DNA v rozsahu stovek kbp a poskytuje efektivní komplexní analýzu celého genomu v jediném experimentu (Pang *et al.*, 2017).

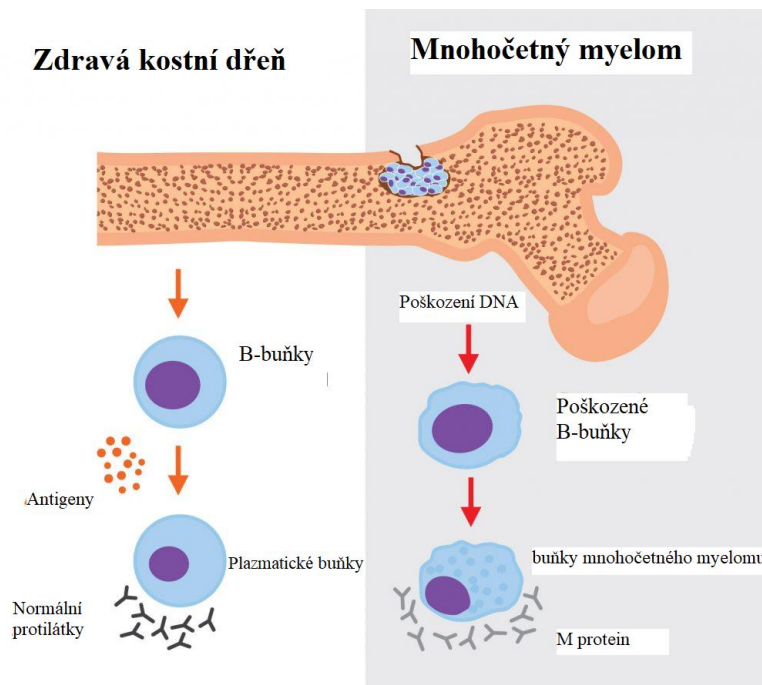
První studie ukázaly, že metoda optické mapování je schopna detekovat četné genetické abnormality, které mohou ovlivňovat progresi u pacientů s mnohočetným myelomem a současné metody nejsou schopné tyto abnormality identifikovat (Gupta *et al.*, 2015). Nová technologie optického mapování by mohla pomoci detekovat další důležité genetické změny, zlepšit pochopení příčin a rozvoje mnohočetného myelomu na molekulární úrovni.

2 MNOHOČETNÝ MYELOM

Mnohočetný myelom (MM) nazývaný také Kahlerova nemoc je neoplastické onemocnění plazmatických buněk (PB), charakterizované klonální proliferací maligních B-buněk v kostní dřeni (KD) a přítomností monoklonálního imunoglobulinu (protein M) v krvi nebo v moči (Obr. 1). Klonální buňky potlačují normální populaci plazmatických buněk, což vede k imunosupresi, poškození hematopoézy, přítomnosti kostních lézí a k dysfunkci orgánů především k poruchám ledvin (Rajkumar *et al.*, 2001).

Průměrný věk u diagnózy MM je 69 let. S příchodem efektivnější léčebné strategie a zlepšení podpůrné léčby v posledních dvou desetiletích se doba přežití zvýšila ze 3 na 6 let, i přesto zůstává MM nevyléčitelnou nemocí.

Mnohočetný myelom je druhé nejčastěji se vyskytující hematologické onemocnění. Incidence MM je 6/100 000 obyvatel v USA a Evropě, naopak u Afroameričanů se jedná o nejčastější hematologické onemocnění (Landgren *et al.*, 2006). Podle posledních dat národního onkologického registru byla v roce 2014 incidence MM 4,8/100 000 obyvatel v České republice. Prevalence dosáhla v tomto roce hodnoty 1982 osob a ve srovnání s rokem 2004 vzrostl počet žijících osob s MM o 74,4 % (Malúšková *et al.*, 2017).

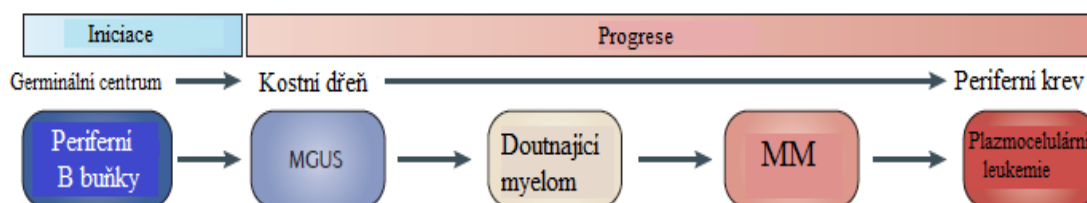


Obr. 1 Rozdíl mezi PB zdravého člověka a pacienta s MM. Normální PB vytvářejí protilátky, zatímco myelomové buňky produkují M protein (Diseases conditions: <https://diseasesandconditions.net/multiple-myeloma>, upraveno).

2.1 Progrese u MM

Monoklonální gamapatie nejasného významu (MGUS) a doutnající myelom (SMM) jsou stavy předcházející vzniku MM. U SMM a MGUS chybí na rozdíl od MM klinické příznaky. Tyto formy MM zůstávají po několik let stabilní a nevyžadují zahájení léčby po určení diagnózy. SMM signalizuje vysoké riziko vzniku MM a míra transformace na MM je přibližně 10 % v prvních pěti letech po diagnóze. Riziko progrese u MGUS je u 1 % pacientů. Důležité je opakované sledování klinického stavu a stabilita laboratorních hodnot pacienta (Kyle *et al.*, 2002; Kyle *et al.*, 2007).

Základním předpokladem iniciace a progrese myelomu jsou mnohočetné genetické mutace. Během progrese onemocnění však klonální buňky rozvíjejí schopnost proliferovat na místech mimo KD a v konečném stádiu se projevují jako plazmocelulární leukémie (PCL; Obr. 2). Tyto buňky tvoří koncové stavy ve víceúrovňovém transformačním procesu od normálních až po maligní PB (Chapman *et al.*, 2011).



Obr. 2 Iniciace a progrese u MM (Chapman *et al.*, 2011, upraveno).

2.2 Klinické příznaky

Mezi nejčastější klinické projevy u pacientů s MM patří hyperkalcémie, poškození ledvin, anémie a kostní abnormality („CRAB“; Tab. 1). Dalšími příznaky jsou také časté infekce a periferní neuropatie.

Anémie je nejběžnější hematologickou poruchou a je pozorována u 70 % pacientů. Kostní choroby se projevují jako kostní léze, zlomeniny nebo osteoporóza a jsou přítomny u 60 % pacientů (Kyle *et al.*, 2003b). Další častou metabolickou poruchou spojenou s MM je hyperkalcémie, nastává z velké části v důsledku úbytku kostní tkáně a resorpce kostí. Výsledkem je zvýšené uvolňování Ca^{2+} (Kastritis *et al.*, 2011). Porucha ledvin postihuje 20–30 % nemocných v době diagnózy a více než 50 % pacientů v průběhu onemocnění (Knudsen *et al.*, 1994).

Tab. 1 Kritéria poškození orgánů u pacientů s MM (Kyle *et al.*, 2003b, upraveno).

Kritérium poškození orgánů	Definice poškození
C – Hyperkalcémie	Vápník > 2,75 mmol/l
R – Renální selhání	Kreatinin > 173 mmol/l
A – Anémie	Hemoglobin < 10 g/dl nebo 2g/dl pod hladinou normálu
B – Kostní léze	Lytické léze nebo osteoporóza s kompresivními zlomeninami
Další	Symptomatická hyperviskozita, amyloidóza, opakující se bakteriální infekce

2.3 Diagnostické hodnocení

Diagnózu stanovují lékaři na základě biochemických, rentgenologických a cytologických nálezů v porovnání s diagnostickými kritérii pro MM. K posouzení progresu onemocnění a odpovědi na léčbu se lékaři nejvíce spoléhají na sledování monoklonálního imunoglobulinu v krvi a moči. U některých pacientů (1-3 %) se, ale vyskytuje nesekreční myelom a 10 % nově diagnostikovaných pacientů vykazuje oligosekreční onemocnění a hladina proteinu M je u nich příliš nízká, aby mohla být diagnostika spolehlivá (Chawla *et al.*, 2015). Další kritéria diagnostického hodnocení progresu u MM jsou uvedena v Tab. 2.

Mnohočetný myelom je standardně klasifikovaný dle Durieho a Salmola (1975), nicméně v tomto systému existují nedostatky. Ve snaze vyvinout objektivnější systém, Mezinárodní myelomová skupina (IMWG) zavedla v roce 2003 nové klasifikační uspořádání (Tab. 3). Nová kritéria zjednodušila diagnózu, protože využívají pouze dvou ukazatelů a to β_2 -mikroglobulinu a albuminu, což jsou snadno reprodukovatelné a dostupné laboratorní testy (Kyle *et al.*, 2003a).

Tab. 2 Diagnostická kritéria MGUS, doutnajícího myelomu a MM (Rajkumar *et al.*, 2001, upraveno).

MGUS	Doutnající myelom	MM
M-protein < 3 g / 100 ml	M-protein \geq 3 g / 100 ml	Přítomnost M-proteinu v krvi a moči
Klonální PB v KD < 10 %	Klonální PB v KD \geq 10 %	Klonální PB v KD \geq 10 %
Chybí poškození orgánů a další symptomy	Chybí poškození orgánů a další symptomy	Poškození orgánů, kostní léze a další symptomy

Tab. 2 Klinická stádia MM podle Mezinárodní myelomové skupiny (Kyle *et al.*, 2003a, upraveno).

Klinické stádium	Durie-Salmon systém	Mezinárodní systém
Stádium I	Všechny podmínky musí být splněny: Hemoglobin > 10 g/dl Vápník v séru ≤ 12 mg/dl Žádné kostní léze spojené s myelomem Nízká koncentrace M proteinu (IgG < 5g/dl, IgA < 3g/dl)	β ₂ -mikroglobulin < 3,5 mg/l Albumin ≥ 350 mg/l
Stádium II	Hodnoty jsou mezi stádii I a III	Hodnoty jsou mezi stádii I a III
Stádium III	Musí být splněna jedna nebo více podmínek: Hemoglobin < 8,5 g/dl Vápník v séru > 12 mg/dl Rozsáhlé kostní léze Vysoká koncentrace M proteinu (IgG > 7 g/dl, IgA > 5 g/dl)	β ₂ -mikroglobulin ≥ 5,5 mg/l

2.3.1 Vyšetřovací metody

Standardní screeningová vyšetření zahrnují elektroforézu bílkovin v séru a moči, imunofixaci a další metody (kompletní krevní obraz, sérový kreatinin a elektrolyty včetně vápníku, laktátdehydrogenasy a β₂-mikroglobulinu). U pacientů s MM by měl být dále proveden kompletní rentgenový skelet pro detekci lytických lézí nebo patologických zlomenin. Pokud symptomatické oblasti nevykazují žádné abnormality v rutinním rentgenovém zobrazování, může být použito MRI nebo CT (Kyle *et al.*, 2003a). Další techniky jako je průtoková cytometrie, fluorescenční *in situ* hybridizace (*FISH*) nebo PCR s použitím specifických alel, mohou přispívat k dalším informacím o MM (Puig *et al.*, 2014). Diagnostické metody používané u pacientů s MM jsou shrnuty v Tab. 4.

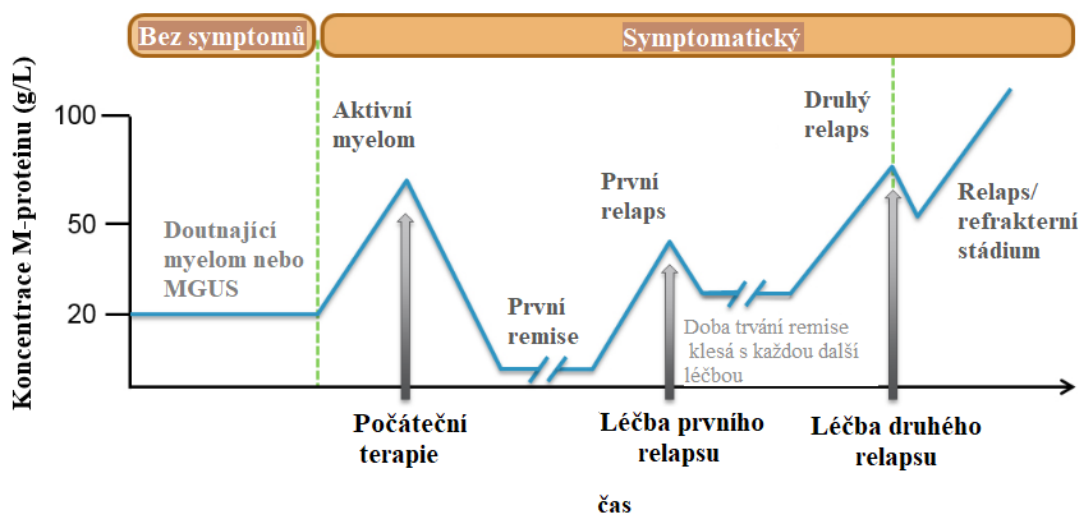
Tab. 4 Diagnostické metody používané u pacientů s MM (Kyle *et al.*, 2003a, upraveno).

Krev	Elektroforéza bílkovinného séra, imunofixace, celkový sérový protein, sérový albumin, kreatinin, vápník, elektrolyty, laktátdehydrogenasa, β_2 -mikroglobulin a hemoglobin
Moč	Elektroforéza proteinů, celkový protein v moči
Kostní dřeň	Aspirace a biopsie, <i>FISH</i> , morfologie
Kosti	RTG, MRI, PET-CT

2.4 Léčba a prognóza MM

Mnohočetný myelom je v současnosti dostupnými prostředky nevléčitelný. Cílem léčby je zničit co největší množství myelomových buněk, zmírnění příznaků nemoci a dosažení remise. Po dosažení remise se léčba přeruší a opět se obnovuje při relapsu (Obr. 3).

Volba léčby závisí na mnoha faktorech, jako je věk pacienta, dostupnost léků, reakce na předchozí terapii, agresivita relapsu či způsobilost pro autologní transplantaci kmenových krvevorných buněk (Sonneveld *et al.*, 2018).



Obr. 3 Postup léčby MM. Časová osa se u každého pacienta liší a je závislá na jednotlivých rizikových faktorech včetně genetických a fenotypových změn, odpovědi na léčbu a perzistenci myelomových buněk (Myeloma reveals: <https://www.myelomarevealed.com/multiple-myeloma-definition-and-statistics>, upraveno).

Při léčbě se jako účinné látky používají především Bortezomib nebo Thalidomid. Bortezomib je selektivní inhibitor proteasomu 26S, zasahuje do proliferace buněčného cyklu a apoptózy myelomových buněk prostřednictvím modulace signální transdukce. Způsobuje také inhibici nukleárního faktoru NF- κ B, který zvyšuje transkripci proteinů, které podporují přežití nádorových buněk (Palombella *et al.*, 1994). Thalidomid inhibuje tvorbu TNF- α , inhibuje proliferaci, aktivitu T buněk a podporuje apoptózu myelomových buněk (Deng *et al.*, 2003).

Určení prognózy u pacientů s MM závisí na mnoha faktorech, mezi které patří věk pacienta, jeho zdravotní stav a stádium nemoci. Mezi další silné prognostické faktory u nově diagnostikovaných pacientů s MM patří také chromozomální abnormality maligních PB (Smadja *et al.*, 2001).

2.5 Chromozomální abnormality u pacientů s MM a jejich význam

V posledním desetiletí došlo k rozvoji technologií molekulární biologie umožňující identifikaci chromozomálních a molekulárních abnormalit, které jsou základem pro objasnění patogeneze MM. Chromozomální abnormality u pacientů s MM byly identifikovány pomocí cytogenetických metod, jako je komparativní genomová hybridizace (arrayCGH), detekce jednonukleotidových polymorfismů (SNP) nebo metody *FISH* (Walker *et al.*, 2006). Přítomnost početních i strukturních změn (SV) v myelomových buňkách je významným prognostickým faktorem, který ovlivňuje rozdělení pacientů do jednotlivých podskupin s odlišným průběhem onemocnění a má také vliv na další léčebný postup (Avet-Loiseau *et al.*, 2007). V Tab. 5 jsou uvedeny nejčastější chromozomální abnormality u pacientů s MM. Tento výčet, ale není úplný, další abnormality se vyskytují u pacientů v menším zastoupení a jejich význam ještě není zcela objasněn.

Tab. 5 Nejčastější početní i strukturní změny u MM, prognóza a procento zastoupení u pacientů s MM (Rajkumar 2016, upraveno).

Typ změny	Postižené chromozomy/ lokalizace na chromozomu	Procento zastoupení u pacientů s MM	Prognóza
Trizomie	3, 5, 7, 11, 15, 17, 19	42	Příznivá
IgH translokace	t(11;14)(q13;q32)	15	Nepříznivá
	t(4;14)(p16;q32)	10-15	
	t(14;16)(q32;q23)	3-7	
	t(14;20)(q32;q11)	<1	
Další translokace		5	Nepříznivá
Kombinace IgH translokací a trizomie		15	Nepříznivá
Delece	1p12, 1p32.3	30	Nepříznivá
	Monozomie 13/delece 13q14	50	Nepříznivá
	17q13	10	Nepříznivá
Zisk	1q21	30	Nepříznivá

2.5.1 Aneuploidie

Velmi častým nálezem jsou početní změny chromozomů označované jako aneuploidie, které se vyskytují u 2/3 pacientů. U MM existují čtyři hlavní skupiny aneuploidie, a to pseudodiploidie (45-46 chromozomů), hypodiploidie (44 a méně chromozomů), hyperdiploidie (47 až 74 chromozomů) a tetraploidie (75 a více chromozomů). Pokud chybí jeden z párů chromozomu jedná se o monozomii, pokud se v jádru nacházejí tři homologní chromozomy je tento jev označován jako trizomie. Různé typy aneuploidie jsou spojeny s odlišnou prognózou (Smadja *et al.*, 2001).

Hyperdiploidie byla nalezena u 57 % pacientů s MM. Nejčastěji bývají přítomny trizomie chromozomů 3, 5, 7, 11, 15, 17, 18, 19 a 21. Zmnožení dalších chromozomů se může objevit, ale je méně časté např. trizomie chromozomu 13 je velmi vzácná (< 2 %; Fonseca *et al.*, 2003a). Hyperdiploidie u pacientů představuje lepší prognózu a méně agresivnější průběh onemocnění. Někdy však může být hyperdiploidie doprovázena dalšími SV velmi často s abnormalitami v úseku 13q, což má za následek zhoršení prognózy (Debes-Marun *et al.*, 2003).

Hypodiploidie byla nalezena u 40 % nemocných MM. Nejvíce se vyskytuje monozomie chromozomů 2, 3, 13, 14 a 19, ale může chybět i jiný chromozom (Fonseca *et al.*, 2003a).

Abnormality spojené s tímto karyotypem zahrnují chromozomální inserce, delece, translokace nebo ztráty celého chromozomu. Nejčastějšími změnami jsou translokace na chromozomu 14, které se vyskytují u 60 % pacientů s hypodiploidii, zatímco tyto translokace jsou mnohem méně časté u pacientů s hyperdiploidii (10 %). Obecně je hypodiploidie u neoplastických onemocnění PB jako je MM nebo akutní lymfocytární leukémie spojena se špatnou prognózou, kratší dobou přežití a také špatnou odezvou na terapii (Smadja *et al.*, 2003; Smadja *et al.*, 2001).

2.5.2 Translokace

Častými strukturními přestavbami v karyotypu MM bývají chromozomové translokace postihující lokus pro těžký řetězec imunoglobulinu IgH na chromozomu 14 v oblasti 14q32 (Avet-Loiseau *et al.*, 2002). Translokace jsou obecně považovány za nepříznivý prognostický ukazatel, zatímco pacienti bez SV v oblasti 14q32 mají střední prognózu. Nejběžnější jsou translokace t(4;14), t(14;16) a t(11;14), méně časté jsou t(6;14) a t(14;20). Translokace IgH v myelomových buňkách vždy vedou ke zvýšené transkripci onkogenů (většinou proliferací geny a transkripční faktory; Tab. 6). Kromě výše zmíněných SV se objevují také další translokace, které se vyskytují s 1% a menší prevalencí (Fonseca *et al.*, 2003b).

Translokace (11;14)(q13;q32) patří k nejčastějším přestavbám, které se nalézají u 15 % nemocných. Podle některých studií je provázána delším přežitím a na rozdíl od ostatních translokací v oblasti 14q32 je považována spíše za příznivější prognostický ukazatel (Moreau *et al.*, 2002). Pokud je přítomná tato translokace dochází k nadměrné expresi onkogenu *CCND1* (cyklin D1), který je regulátorem buněčného cyklu. *CCND1* se podílí na přechodu G1-S buněčného cyklu fosforylací a inaktivací Rb proteinu (Hideshima *et al.*, 2004).

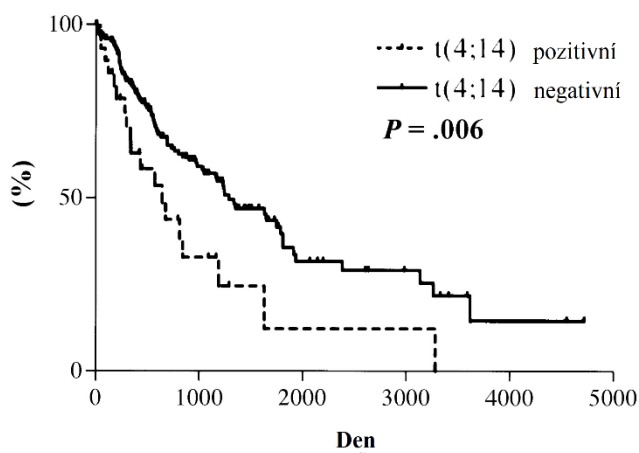
Tab. 6 Nejběžnější translokace u pacientů s MM a jejich geny (Fonseca *et al.*, 2003b, upraveno).

Translokace	Zasažený gen
t(4;14)	<i>MMSET, FGFR3</i>
t(14;16)	<i>c-maf</i>
t(11;14)	<i>CCND1</i>
t(6;14)	<i>CCND3, MUM1</i>
t(14;20)	<i>MAFB</i>

Další specifickou změnou je translokace (4;14)(p16;q32), která se objevuje asi u 10-15 % pacientů. Tato změna je provázena agresivnějším průběhem onemocnění a nepříznivou prognózou (Obr. 4; Chang *et al.*, 2004). U těchto pacientů dochází k aktivaci dvou genů *FGFR3* (onkogenní fibroblastový růstový faktor 3) a *MMSET* (Multiple myeloma SET), které jsou lokalizované v místě 4p16. Aktivace genu *FGFR3* následně vede k zahájení mitogen-kinázové dráhy *ras*, která se podílí na apoptóze buněk (Chesi *et al.*, 2001). Translokace t(4;14) v kombinaci s del (17p) má nejhorší vliv na přežití pacientů (Fonseca *et al.*, 2003a).

Translokace (14;16)(q32;q23) má rovněž nepříznivou prognózu a vyskytuje se u 3-7 % pacientů s MM a je spojena s agresivnějším průběhem onemocnění a kratší dobou přežití (Avet-Loiseau *et al.*, 2011). Výsledkem této translokace je zvýšení exprese onkogenů *c-maf* (Chesi *et al.*, 1998).

Translokace (14;20)(q32;q11) je méně častá. Studie ukazují výskyt u 1,5 % nemocných MM a 5% přítomností u pacientů s MGUS (Hanamura *et al.*, 2001). Přítomnost této změny vede k expresi onkogenu *MAFB* (Ross *et al.*, 2010).

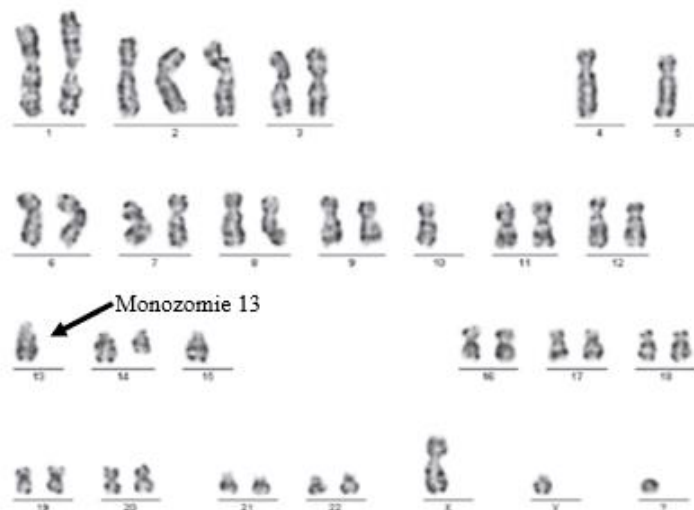


Obr. 4 Kaplan-Meierův graf celkového přežití u pacientů s MM. Tečkovaná čára označuje pacienty s t(4;14) a mediánem přežití 644 dnů; plná čára označuje údaje pro pacienty bez t(4;14) s předpokládaným mediánem přežití 1288 dní (Keats *et al.*, 2003, upraveno).

2.5.3 Delece chromozomu 13

Abnormality chromozomu 13 jsou pozorovány u poloviny pacientů s MM, z čehož v 85 % zahrnují monozomie, u zbývajících 15 % jsou to intersticiální delece, většinou lokalizované v oblasti 13q14. Při klasickém cytogenetickém vyšetření byly změny na chromozomu 13 nalezeny u 15 % nemocných (Obr. 5) a s využitím metody *FISH* až u 54 % nemocných. Pomocí této metody bylo také zjištěno, že delece chromozomu 13 se vyskytuje ve všech fázích neoplazmatických PB (MGUS i SMM; Fonseca *et al.*, 2002). Abnormality chromozomu 13 jsou často doprovázeny dalšími změnami, jako je translokace (4;14)(p16;q32) nebo delece 17p13 (Gutiérrez *et al.*, 2007). Studie ukázaly, že abnormality chromozomu 13 jsou spojeny s horší prognózou, která má také nepřímou souvislost s přítomnými translokacemi (Chiecchio *et al.*, 2006).

V oblasti 13q je umístěný tumor supresorový gen *RBI*. *RBI* se podílí na regulaci buněčného cyklu při přechodu z fáze G1 do S fáze. Bylo zjištěno, že u pacientů s delecí na chromozomu 13 dochází ke snížené expresi *RBI* i dalších genů nacházejících se v této oblasti. Za potenciální kandidátní gen je také považován *D13S25* (Walker *et al.*, 2010).



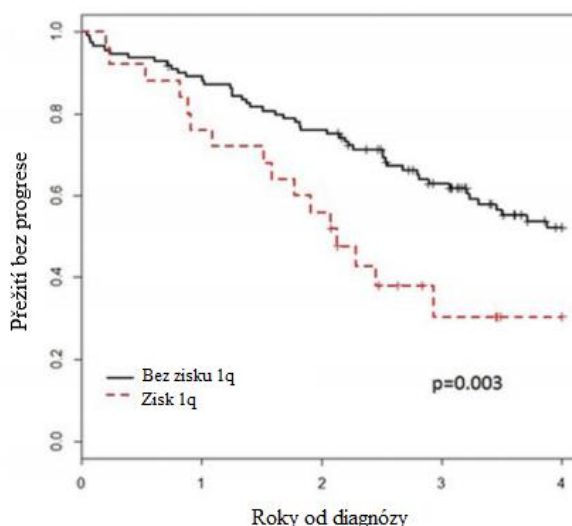
Obr. 5 Vyšetření chromozomových abnormalit u pacienta s MM pomocí metody karyotypování (Kuglík *et al.*, 2008).

2.5.4 Abnormality chromozomu 1

Nejběžnější aberace v oblasti dlouhých ramen chromozomu 1 jsou intersticiální delece nebo amplifikace v místě 1q21, které byly identifikovány u 20-50 % nově diagnostikovaných pacientů s MM.

Zisk 1q je pozorován u 35-40 % nemocných. Při amplifikaci dochází k expresi genu *CKS1B*, který se podílí na ubiquitin-proteasomové kaskádě degradace proteinů regulujících buněčný cyklus a jeho zvýšená exprese v myelomových buňkách ovlivňuje jejich proliferativní aktivitu (Fonseca *et al.*, 2006). Kromě *CKS1B* obsahuje oblast 1q21 mnoho dalších kandidátních genů (*ANP32E*, *BCL-9* a *PDZK1*). Pacienti s amplifikací v místě 1q21 vykazují rezistenci na bortezomib. Zisky 1q21 by proto měly být považovány za vysoce rizikový prvek u MM léčeného bortezomibem (An *et al.*, 2014). U pacientů s amplifikací v úseku 1q21 se předpokládá horší prognóza (Obr. 6). Toto riziko zhoršení prognózy se zvyšuje s přítomností translokace (4;14) nebo delece 17p13 (Shah *et al.*, 2017).

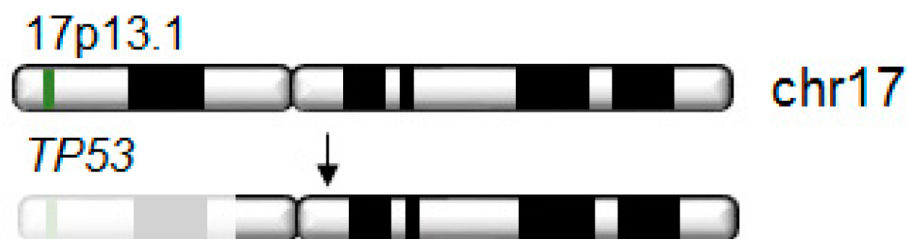
Intersticiální delece ramene chromozomu 1p jsou pozorovány u přibližně 30 % pacientů s MM a jsou spojeny se špatnou prognózou. V patogenezi MM jsou důležité delece oblasti 1p12 a 1p32.3. V místě 1p12 se nalézá tumor supresorový gen *FAM46C*. Oblast 1p32.3 obsahuje dva cílové geny (*FAF1* a *CDKN2C*). *CDKN2C* je inhibitor kinázy 4, který se podílí na negativní regulaci buněčného cyklu, zatímco *FAF1* kóduje protein zapojený do iniciace apoptózy (Boyd *et al.*, 2011).



Obr. 6 Kaplan-Meierův graf celkového přežití u pacientů s MM. Tečkovaná čára označuje pacienty s amplifikací v oblasti 1q21 a mediánem přežití 2,1 let; plná čára označuje údaje pro pacienty bez amplifikace v místě 1q21 s mediánem přežití 4,3 let (Shah *et al.*, 2017, upraveno).

2.5.5 Delece chromozomu 17

Delece na 17. chromozomu v oblasti p13 (Obr. 7) je přítomná u nově diagnostikovaných pacientů (8-10 %), ale její frekvence se zvyšuje během progresu onemocnění (70 %), proto je tato změna považována za velmi důležitý prognostický faktor u MM. Oblast 17p13 kóduje tumor supresorový gen *TP53*, který leží na krátkých ramenech chromozomu 17. *TP53* se podílí na proliferaci, diferenciaci a apoptóze buněk. Jedná se o nejvýznamnějších tumor-supresorový gen, též nazývaný strážce genomu. Má významnou roli při opravách DNA a obraně buněk proti genotoxickému/onkogennímu stresu, hypoxii a dalším kritickým změnám. Funguje také jako transkripční faktor, který spouští transkripci genů zapojených do mnoha buněčných procesů. Zastavuje buněčný cyklus a spouští opravy DNA, popřípadě apoptózu (Lane 1992). Delece genu *TP53* jsou spojeny s nižším přežitím u pacientů léčených konvenční chemoterapií. Nedávná studie potvrdila, že delece 17p13 v kombinaci s t(4;14) ukazuje také na horší prognózu (Chang *et al.*, 2005).



Obr. 7 Delece 17p13 u pacienta s MM (Herrero *et. al.*, 2003, upraveno).

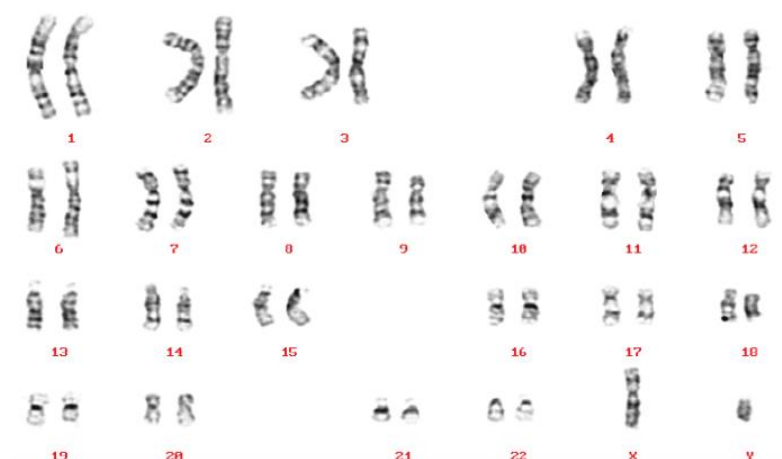
2.6 Cytogenetické vyšetřovací metody u pacientů s MM

V současné době tvoří cytogenetická vyšetření důležitou součást diagnostických metod u pacientů s MM. Důraz je kladen na požadavek vyšetřit u pacientů s MM všechny klíčové chromozomové aberace. Mezi rutinní cytogenetické metody patří vyšetření karyotypu, metoda *FISH* a technika arrayCGH (Kuglík *et al.*, 2008).

2.6.1 Vyšetření karyotypu

Karyotypování je proces párování a uspořádání všech chromozomů organismu. Karyotypy jsou připraveny použitím standardizovaných postupů barvení, které odhalují charakteristické strukturní rysy každého chromozomu. Karyotypování slouží k detekci hrubých genetických změn, jako jsou přestavby v počtu chromozomů spojených s aneuploidními stavy. Karyotypy se připravují z mitotických buněk v metafázi nebo profázi (Gatler, 2006).

G-pruhování je nejčastěji používaná metoda při určování karyotypu. Chromozomy jsou nejdříve krátce ošetřeny trypsinem a následně dochází k obarvení Giemsovým roztokem. Heterochromatické oblasti, které jsou bohatší na adenin a thymin se barví tmavě. Naproti tomu méně kondenzovaný chromatin, který hojně obsahuje guanin a cytosin je světlejší. Výhodou této metody je zobrazení celého genomu a vizualizace všech chromozomů (Obr. 8). Nevýhodou je rozlišení, které je omezeno přibližně na 5 Mb a časová náročnost (O'Connor, 2008).



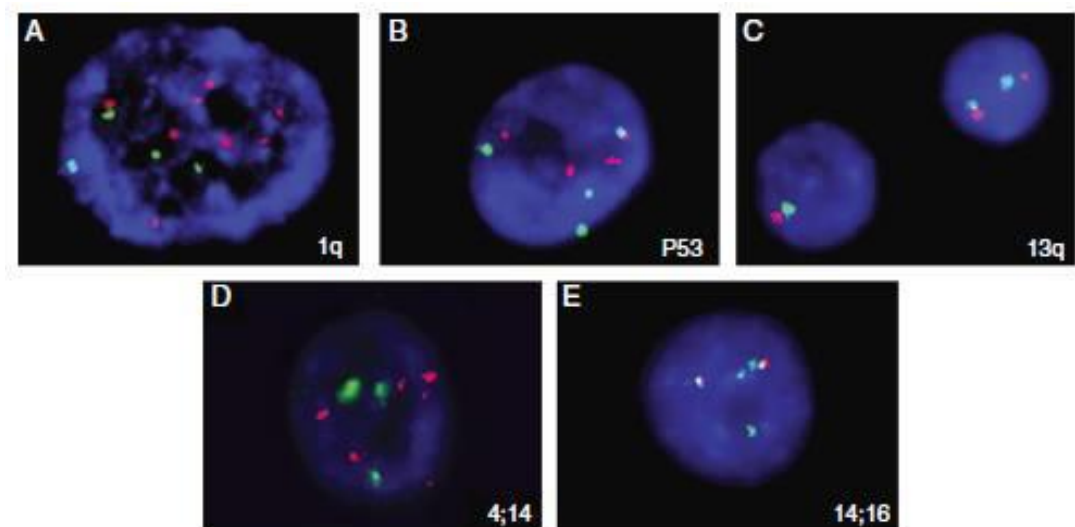
Obr. 8 Karyotyp zdravého muže (46, XY; Ponnuraj, 2011).

2.6.2 FISH

Metoda *FISH* slouží k detekci genů a chromozomových abnormalit jako jsou translokace, delece nebo počty kopií chromozomů. Tato technika je založená na hybridizaci fluorescenčně značené specifické sekvenční DNA sondy s komplementárními úseky cílové DNA pacienta. Následná detekce je provedena pomocí fluorescenčního mikroskopu, kdy je detekován počet fluorescenčních signálů v jádře (Obr. 9; Ponnuraj, 2011).

V porovnání s metodou G-pruhování má *FISH* mnohem vyšší rozlišení pro identifikaci delecí, inzercí a translokací. K častým změnám u MM patří delece/monozomie 13. chromozomu a při vyšetření karyotypu byla tato změna detekována u 15-20 % pacientů, zatímco metodou *FISH* až u 38-40 % nemocných s MM (Fonseca *et al.*, 2002).

Další výhodou této techniky je možnost použití buněk v jakékoli fázi buněčného cyklu a kratší doba zpracování. Nevýhodou techniky *FISH* je nutná znalost a charakterizace postižených genů. Další nevýhodou může být zobrazení pouze regionu komplementárnímu k použité sondě (Ronney, 2001).



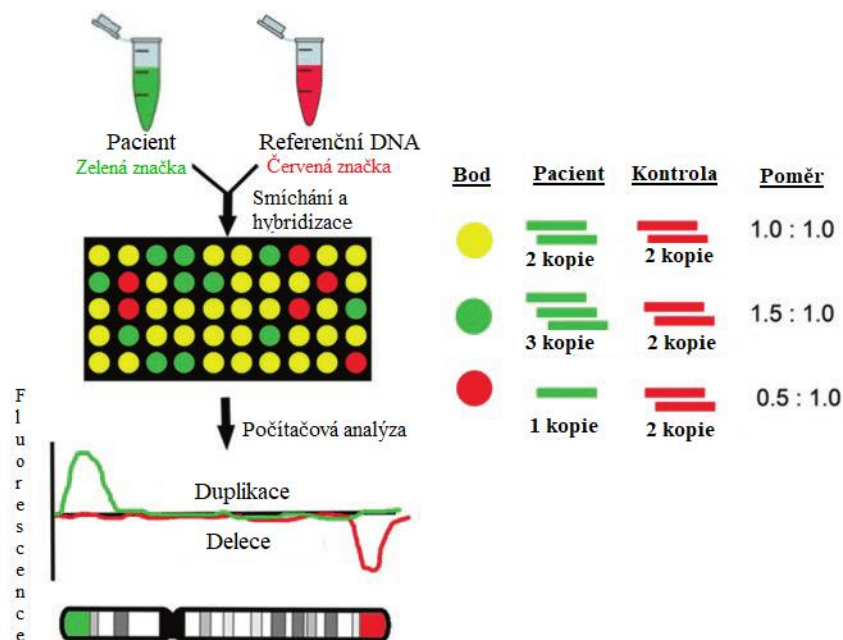
Obr. 9 Abnormality nalezené ve vzorcích pacientů s MM pomocí metody *FISH*. A – zisk 1q; B – trizomie 17; C - delece/monozomie 13; D – t(4;14); E – t(14;16), (Kishimoto *et al.*, 2016).

2.6.3 Genomová komparativní hybridizace (arrayCGH)

Metoda arrayCGH vznikla vývojem techniky *FISH*, umožňuje detekovat a mapovat relativní počet kopií jednotlivých sekvencí mezi různými genomy a je účinná zejména při vyšetřování změn jako jsou delece, nebo amplifikace některých genů, avšak nelze ji využít při vyšetřování translokací a inverzí, při kterých se nemění poměr počtu kopií sekvencí DNA. Důležitou výhodou arrayCGH je vyšetření celého genomu v jednom experimentu a potřeba pouze málo množství DNA (Kuglík *et al.*, 2008).

Izolovaná a fragmentovaná DNA od pacienta je fluorescenčně označena a smíchána s referenční DNA, která je označena jinou fluorescenční značkou. Tato směs DNA je hybridizována s denaturovanou DNA sondou. Poté je fluorescenčně analyzován každý bod a dochází k identifikaci rozdílů mezi oběma genomy (Obr. 10; Ponnuraj, 2011).

ArrayCGH je užitečnou technologií pro identifikaci genetických změn DNA v nádorech s nízkým proliferativním indexem, jako je MM. Mezi opakující se abnormality detekované arrayCGH u MM patřily zisky v oblastech 1q, 5q, 9q, 11q, 3q a 7q zatímco ztráty se týkaly především chromozomů 13, 16, 6 a 8 (Gutiérrez *et al.*, 2004).



Obr. 10 Princip komparativní genomové hybridizace (arrayCGH, Karampetsou *et al.*, 2014, upraveno).

3 OPTICKÉ MAPOVÁNÍ

Metoda optického mapování se v posledním desetiletí objevila jako velmi silný nástroj pro získání informací z dlouhých molekul DNA v rozsahu stovky kbp. Vůbec první optickou mapou byla mapa jednoho z chromozomů pивní kvasinky (*Sacharomyces cerevisiae*), kterou sestavil v 90. letech prof. Schwartz se svými spolupracovníky (Schwartz *et al.*, 1993). Na začátku byl systém optického mapování používán především k vytvoření genomových restričních map bakterií, parazitů hub a rostlin. U člověka bylo optické mapování použito poprvé v roce 2008, kde se vědci zaměřili především na inserce, delece a inverze. Objevili 525 nových inzercí, které nebyly přítomny v lidském referenčním genomu. Tato data poskytla podklady pro sestavení první mapy s vysokým rozlišením lidských SV (Kidd *et al.*, 2008).

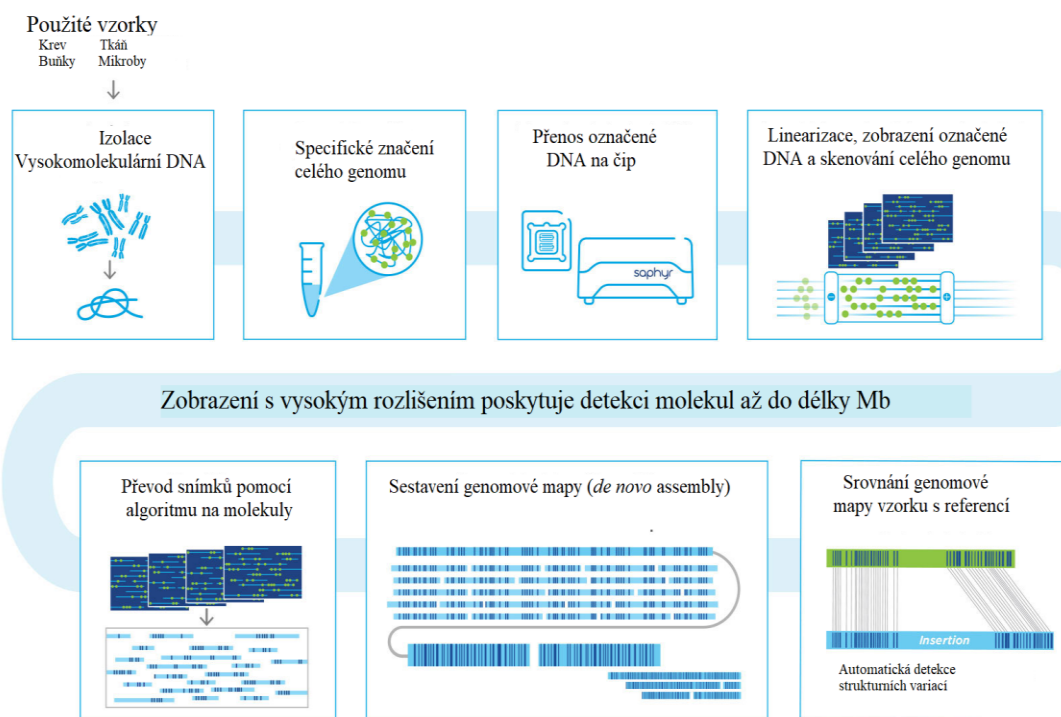
Strukturní variace v podobě delecí, inzercí, duplikací, inverzí a translokací mohou vést k fenotypové diverzitě a ovlivňovat průběh lidských onemocnění. U mnoha známých syndromů jsou klinicky významné SV dobře charakterizovány. Příkladem může být delece 15q11-q13 způsobující Prader-Williho syndrom nebo delece v oblasti 7q11.23 vyvolávající Williamsův-Beurenův syndrom (Jurado *et al.* 1998, Amos-Landgraf *et al.*, 1999).

Současné metody pro detekci SV se dělí na dvě skupiny, a to tradiční cytogenetiku a molekulární techniky. Metody tradiční cytogenetiky, zejména karyotypování, *FISH* a arrayCGH byly popsány v kapitole cytogenetické metody. Molekulární metody zahrnují především techniky NGS (next generation sequencing). Metoda NGS je sice schopná poskytnout detailní informaci o pořadí nukleotidů v sekvenované oblasti, jejím hlavním nedostatkem je však limitace délky čtecího rámce, což neumožňuje poskytovat jednoznačné informace v přítomnosti opakujících se prvků delších než jednotlivá čtení. Toto omezení má za následek podstatně sníženou citlivost na abnormality, jako jsou inserce, větší delece a duplikace (Hastie *et al.*, 2018).

Optické mapování kombinuje výhody různých technik při řešení jejich omezení. Tato metoda je vysoce přesná a citlivá pro detekci SV > 500 bp a může NGS vhodně doplňovat. Měla by také zlepšit standardní cytogenetické techniky, zejména zobrazit SV v genomu pacientů, a to v takovém rozsahu, na který již cytogenetická vyšetření nestačí (Hastie *et al.*, 2017). Nevýhodou optického mapování může být delší doba analýzy vzorku (5 dní) a vyšší náklady, které zatím omezují použití pro běžné rutinní aplikace.

3.1 Princip metody

Optická mapa je mapa výskytu krátkého sekvenčního motivu roztroušeného v desítkách až stovkách tisíců kopií podél dlouhých fragmentů molekuly DNA. Pro sestavení optické mapy s použitím nanofluidního čipu je potřeba získat dlouhé fragmenty neporušené DNA molekuly. Proto jsou nejprve izolovány celé buňky, které jsou zachyceny v agarosovém gelu a následně je z nich izolována vysokomolekulární DNA. Po rozpuštění gelu jsou fluorescenčně označeny specifické sekvenční motivy a zároveň obarvena celá molekula DNA. Značená DNA je nanosena na čip a za pomoci přístroje linearizována v nanokanálkách a vizualizována. Získaný obrazový materiál se převede do souboru nesoucího informaci o délce molekul a pozicích sekvenčních motivů. Na základě této informace je sestavena optická mapa (Obr. 11; Lam *et al.*, 2012).



Obr. 11 Princip konstrukce optické mapy. Izolace vysokomolekulární DNA → specifické značení molekul DNA → nanosení značené DNA na čip pro měření → linearizace molekul v nanokanálkách a vizualizace → získání informací o molekulách DNA → sestavení (*de novo* assembly) genomových map → porovnání s referenční mapou (Bionanogenomics: <https://bionanogenomics.com/technology/platform-technology>, upraveno).

3.2 Irys a Saphyr – BionanoGenomics

Firma BionanoGenomics založená v roce 2003 před sedmi lety přestavila novou technologii Irys pro metodu optického mapování, a to především jako doplňkový nástroj pro NGS. V roce 2017 uvedla tato firma na trh nejnovější technologii Saphyr (Obr.12), která nabízí vysoce výkonné řešení pro mapování celých genomů. Systém Saphyr přináší komplexní detekci SV s vyšší citlivostí, specifičností při vysokých rychlostech a vysokém výkonu, než tomu bylo u systému Irys (Tab. 7). Je také značně snížena doba potřebná k adaptivnímu načítání, která optimalizuje podmínky běhu pro každý vzorek. Zajišťuje dále bezproblémové zpracování obrazu a snižuje možnost manuálního zásahu, aby bylo maximalizováno množství získaných dat.

Důležitým parametrem je hodnota efektivního pokrytí, která je užitečná pro odhad množství vstupních dat a vypočítává se z předpokládané velikosti genomu (u člověka 3,2 Gbp) a množství filtrovaných vstupních dat. Pro detekci SV u člověka je minimální doporučené pokrytí 70x; pro lidské hybridní skládání je to nejméně 50x. (Tab. 8; Bionanogenomics: <http://bionanogenomics.com/wp-content/uploads/2017/02/Bionano-Genomics-AGBT-2017-Curtain-Raiser-FINAL-2-7-16.pdf>).



Obr. 12 Systém Irys a Saphyr pro metodu optického mapování od firmy BionanoGenomics (Bionanogenomics: <https://bionanogenomics.com/support-page/irys-instrument/>, <https://bionanogenomics.com/products/saphyr>).

Tab. 7 Propustnost molekul a počet průtokových komůrek u systémů Irys a Saphyr (Bionanogenomics: <https://bionanogenomics.com/wp-content/uploads/2018/04/30173-Data-Collection-Guidelines.pdf>, upraveno).

	Irys	Saphyr
Propustnost filtrovaných molekul v průtokové komůrce v jednom běhu	36 Gbp	320 Gbp
Počet průtokových komůrek na čipu	2	2
Propustnost filtrovaných molekul na čipu v jednom běhu	72 Gbp	640 Gbp

Tab. 8 Minimální počet dat, které je potřeba shromáždit pro analýzu SV a pro hybridní skládání (Bionanogenomics: <https://bionanogenomics.com/wp-content/uploads/2018/04/30173-Data-Collection-Guidelines.pdf>, upraveno).

	Analýza SV		Hybridní skládání	
	Irys	Saphyr	Irys	Saphyr
Cílené pokrytí genomu u prvotních molekul	120x	100x	80x	70x
Cílené efektivní pokrytí genomu	70x	70x	50x	50x
Filtrované molekuly DNA	384 Gbp	320 Gbp	256 Gbp	224 Gbp

3.3 Metody značení DNA

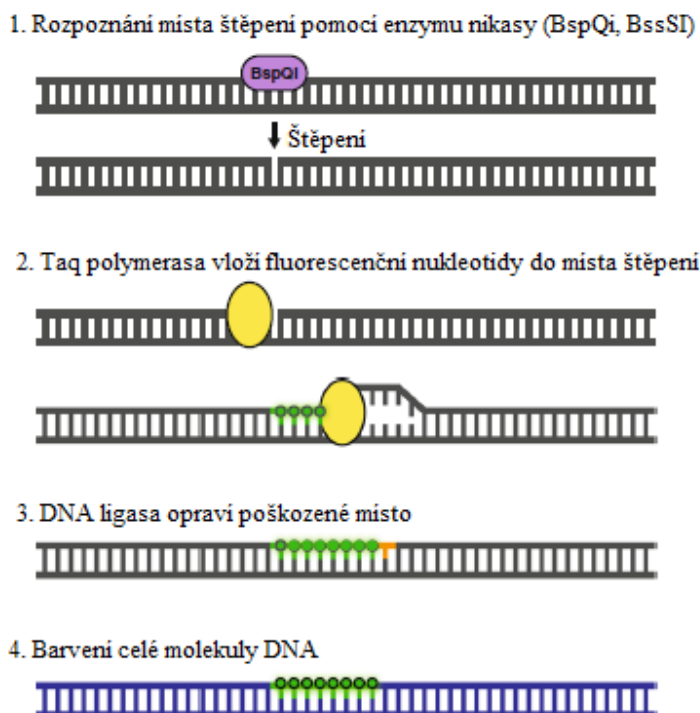
Sekvenční značení DNA se dělí na dvě hlavní kategorie, a to enzymatické značení a značení na základě afinity. Enzymatické značení se používalo především v lidské genetice a pro sestavení komplexních genomů, zatímco metody založené na afinitě byly primárně aplikované v bakteriologii například pro rychlou analýzu plazmidů kódující rezistenci vůči antibiotikům (Müller a Westerlund, 2017). V současnosti se začíná využívat značení na základě afinity i v lidské genetice.

3.3.1 Enzymatické značení DNA

Nejběžnější způsob enzymatického značení DNA pro optické mapování je použití enzymů nikas (z anglického nickase - EC 3.5.4.10). BionanoGenomics využívá pro značení enzym

nikasa Nt.BspQI (GCTCTTC) a technologii NLRS (nicks, labels, repairs, stains), která se skládá ze čtyř sekvenčních kroků. Nejdříve nikasy štěpí jedno vlákno dvouvláknové DNA v místech, které rozpoznávají na základě specifických motivů nukleotidových sekvencí. Poté DNA polymerasa odstraní nukleotidy, a ty současně nahradí přidáním značených dNTPS (spojeny s fluofory), které umožní vizualizaci štěpených míst pomocí fluorescenční mikroskopie. DNA ligasa následně poškozená místa v řetězci DNA opraví. Nakonec se barví celá molekula DNA fluorescenčním barvivem, typickým je bisinterkalátor YOYO-1, pro usnadnění detekce (Obr. 13; Jo *et al.*, 2007).

Analýza značené DNA v nanokálcích byla poprvé demonstrována v roce 2007, kde byl použit enzym nikasy Nb.BbvCI (cílová sekvence je GCTGAGG) a byly vytvořeny tzv. čarové kódy založené na relativní vzdálenosti označených míst na uměle vytvořených bakteriálních chromozomech (BAC; Jo *et al.* 2007). Bylo analyzováno celkem 95 BAC, které společně pokrývají 4,7 Mb lidského hlavního histokompatibilního komplexu, což umožnilo rozlišit haplotypové rozdíly mezi dvěma jednotlivci (Lam *et al.*, 2012). V dalších letech došlo ke kombinaci tradičních sekvenačních metod Illumina a SMRT (single molecule real-time) s optickým mapováním pro analýzu diploidního lidského genomu (Pendelton *et al.*, 2015).



Obr. 13 Jednotlivé kroky značení DNA pomocí enzymu nikasy (Barseghyan *et al.*, 2017 upraveno)

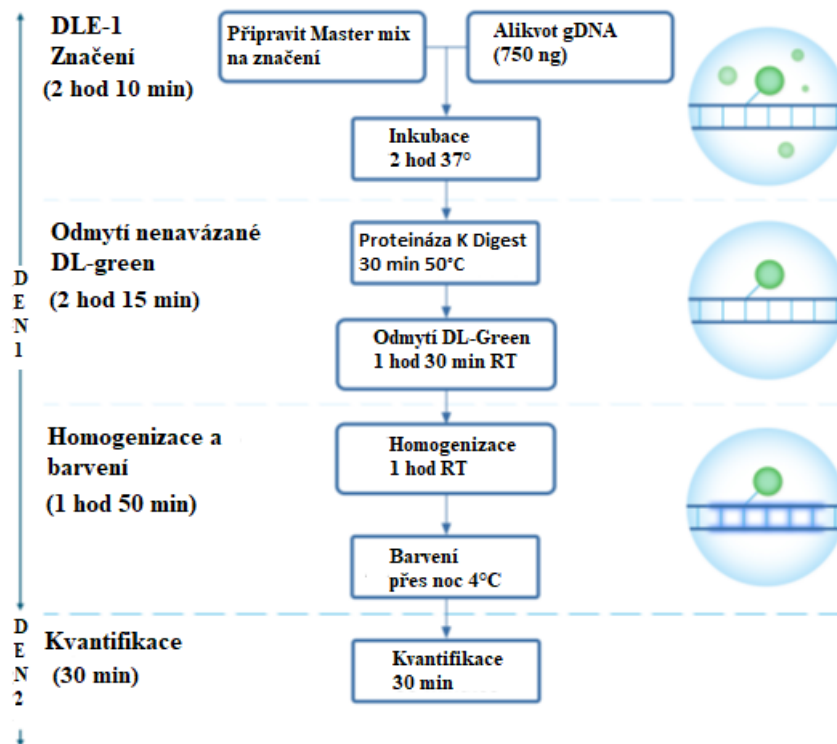
3.3.2 Značení DNA na základě afinity

Další možností značení DNA jsou metody založené na afinitě, kde je optická mapa vytvořená nekovalentními interakcemi. Při přímém značení a barvení (DLS – direct label and stain) konjuguje fluorofor přímo do enzymaticky definovaného místa nativní dvouvláknové gDNA rozpoznatelného na základě motivu specifické nukleotidové sekvence. Enzym DLE-1 využívaný při DLS značení (BionanoGenomics) rozpoznává specifickou sekvenci CTTAAG a vykazuje velmi vysokou specifičnost a účinnost reakce. Doporučená hustota značení DLE-1 enzymem se pohybuje v rozmezí 8 až 25 značek na 100 kbp dle původu značené DNA. Při značení DLS nejprve dochází k označení fluorescenční značkou. Ta se váže na specifickou oblast v cílové molekule. Následně dochází k odmytí nenavázané barvy DL-green a nakonec se provede barvení celé molekuly DNA pro zvýšení kontrastu. Fluorescenční tečky se pak nachází podél celé molekuly DNA za účelem záznamu čarového kódu (Obr. 14, Obr. 15; Bionanogenomics: <https://bionanogenomics.com/wp-content/uploads/2018/04/30206-Bionano-Prep-Direct-Label-and-Stain-DLS-Protocol.pdf>).

Tento způsob značení se obecně uplatňuje v bakteriologii, zejména při identifikaci různých typů bakteriální DNA, například u plazmidů kódujících rezistenci vůči antibiotikům (Nilsson *et al.*, 2014). DLE-1 je prvním enzymem z nové třídy enzymů BionanoGenomics. Tento enzym efektivně označuje vysokomolekulární genomovou DNA z různých organismů a pomáhá vytvářet velmi rozsáhlé genomové mapy (Bionanogenomics: <https://bionanogenomics.com/wp-content/uploads/2018/02/AGBT-2018-Amy-Files.pdf>).



Obr. 14 Fluorescenční tečky (zelené) označují místa, kde došlo k označení specifických sekvenčních motivů pomocí fluoroforu a celé molekula DNA je obarvená modře. DNA je detekována pomocí systémů BionanoGenomics (Bionanogenomics: <https://bionanogenomics.com/wp-content/uploads/2018/02/AGBT-2018-Amy-Files.pdf>).



Obr. 15 Přímé značení a barvení DNA pomocí enzymu DLE-1 (Bionanogenomics: <https://bionanogenomics.com/wp-content/uploads/2018/04/30206-Bionano-Prep-Direct-Label-and-Stain-DLS-Protocol.pdf>, upraveno).

3.4 Nanokanálový čip

Základem metody optického mapování je vizualizace značených molekul DNA pomocí nanofluidního čipu složeného z tisíců nanokanáleků, které udržují dlouhé molekuly DNA rovnoměrně v linearizovaném stavu. Fluorescenčně označené molekuly DNA jsou vtaženy do nanokanáleků, kde se rovnoměrně linearizují na 85 % délky dokonale lineární DNA a poté jsou automaticky zobrazeny pomocí systému BionanoGenomics (Das *et al.*, 2010). Tento proces se mnohokrát opakuje, dokud není DNA vyčerpána nebo jsou nanokanálinky nepoužitelné, což může být způsobeno jejich ucpáním. V Tab. 9 je uvedeno srovnání čipů u systémů Saphyr a Irys.

Nanofluidní čip obsahuje tři sady nanokanáleků, z nichž každá se skládá přibližně ze 4000 kanálků, které jsou dlouhé 0,4 mm a mají průměr 45 nm (Obr. 16). Molekuly DNA se v těchto nanokanálcích nemůžou zpět sbalit do nativní formy a jsou nuceny zůstat v linearizovaném stavu. Před nanokanálinky jsou umístěny pilíře, které vytváří dostatečně husté fyzikální omezení a molekuly DNA jsou nuceny proudit kolem pilířů, kde dochází

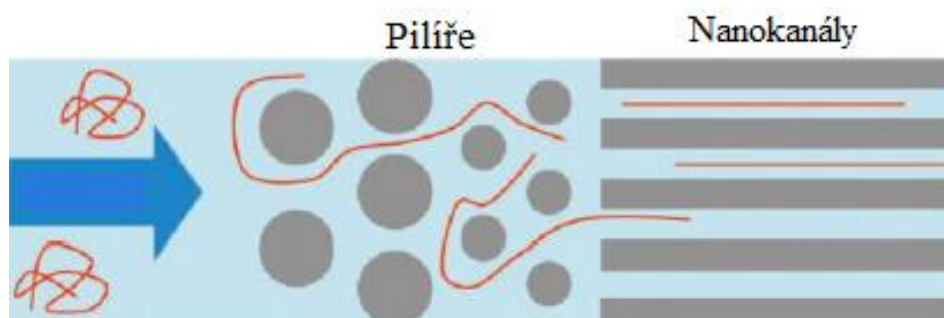
k jejich rozvolnění a ty poté proudí do nanokanálek (Obr. 17). Systém BionanoGenomics (Saphyr nebo Irys) poté elektroforeticky řídí pohyb DNA (nukleová kyselina nese záporný náboj, a proto se v elektrickém poli pohybuje od záporného pólu ke kladnému) v průtokové komůrce (Lam *et al.*, 2012).

Tab. 9 Srovnání dvou nanokanálových čipů systémů Irys a Saphyr (Bionanogenomics: <https://bionanogenomics.com/products/bionano-chips>, upraveno).

Prvek	Irys čip	Saphyr čip
Průtoková komůrka	2	2
Min/Max propustnost (lidský vzorek v jedné průtokové komůrce)	10 Gbp/50 Gbp	320 Gbp/ 480 Gbp
Min/Max propustnost (jiný než lidský vzorek/ průtoková komůrka)	10 Gbp/ 50 Gbp	100 Gbp/ 480 Gbp
Kompatibilní systém	Irys	Saphyr



Obr. 16 Detail nanokanálového čipu využívaný u systému Saphyr (Chan *et al.*, 2018).

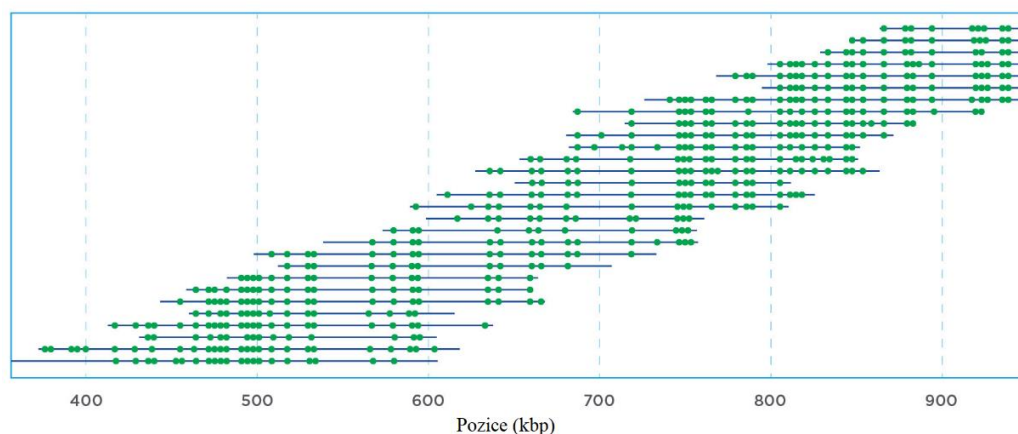


Obr. 17 Linearizace DNA v nanokanálovém čipu (Lam *et al.*, 2012, upraveno).

3.5 Sestavení genomových map

Vyobrazené molekuly detekované fluorescenčním mikroskopem uvnitř přístroje jsou digitalizovány pomocí softwaru BionanoAccess v1.3 do souborů, které obsahují informace o délce značených DNA fragmentů, pozicích sekvenčních značek a kvalitě vizualizace (na základě relativní fluorescence porovnáním signálů barviva a pozadí). Na základě těchto informací je provedeno (*de novo* assembly) vytvoření nové genomové mapy, které je založeno na uspořádání detekovaných fragmentů DNA a jejich vzájemným překrytím v místě shodného vzoru (Obr. 18). Vizualizace se realizuje pomocí „circus plot“ schématu, kde jsou zobrazeny nalezené SV spolu s další informací o změnách v počtu kopií chromozomů (CNV). Systém BionanoGenomics je schopen vytvořit genomovou mapu bez ohledu na to, zda existuje referenční genom, který například u rostlin často není k dispozici (Chan *et al.*, 2018).

Ke každé nové genomové mapě je vytvořena zpráva o kvalitě běhu, kterou definují předem určené parametry BionanoGenomics. Nejdůležitější je míra shody s referenčním genomem (map rate), ostatní parametry a jejich popis je uveden v Tab. 10. Díky dnes již detailnímu zmapování lidského referenčního genomu může být míra shody s nově vytvořenou mapou u lidské DNA až 90 % (BionanoGenomics: <https://bionanogenomics.com/wp-content/uploads/2018/04/30223-Saphyr-Molecule-Quality-Report-Guidelines.pdf>).



Obr. 18 Digitální zobrazení dlouhých molekul DNA (vytvoření nové genomové mapy založené na překrytí, uspořádání a shodného vzoru; Bionanogenomics.com: <https://bionanogenomics.com/technology/platform-technology>, upraveno).

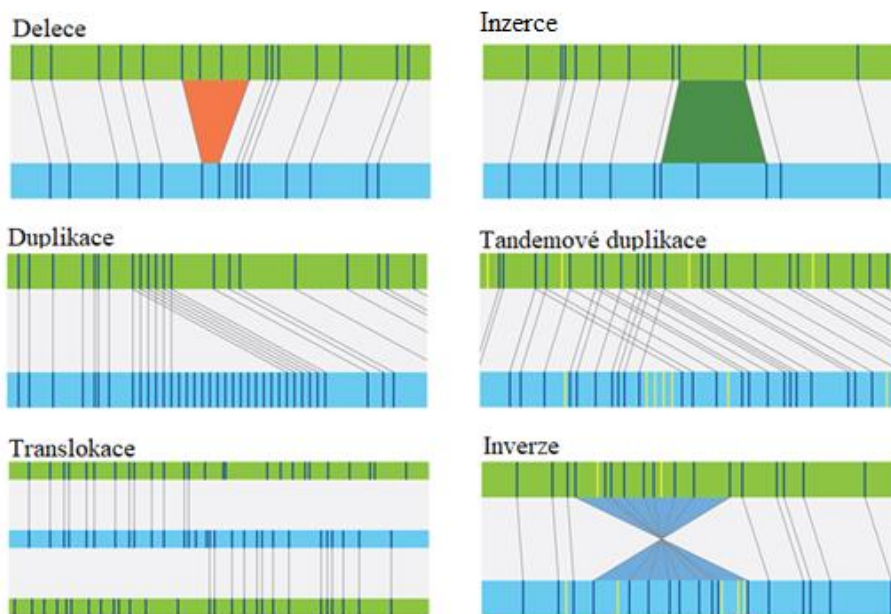
Tab. 10 Parametry o kvalitě běhu, jejich popis a rozsah (BionanoGenomics: <https://bionanogenomics.com/wp-content/uploads/2018/04/30223-Saphyr-Molecule-Quality-Report-Guidelines.pdf>, upraveno).

Parametr	Popis	Rozsah	
		Značení NLRS	Značení DLS
Celková DNA (≥ 150 kbp)	Celkové množství molekul DNA, které jsou ≥ 150 kbp		
N50 (≥ 150 kbp)	N50 (střední délka) molekul DNA, které jsou ≥ 150 kbp		
Průměrná hustota značení (≥ 150 kbp)	Průměrný počet značek na 100 kbp u celkové DNA ≥ 150 kbp	8-15	8-25
Míra shody s referencí (map rate)	Procento molekul DNA, které jsou ≥ 150 kbp a jsou srovnány s referenčním genomem	60-90 %	70-90 %
Efektivní pokrytí	Celkové množství srovnané DNA vztahované k velikosti referenčního genomu	70x	70x
Pozitivní rozptyl značení (PLV)	Procento molekulových značek, které chybí v referenčním genomu	< 15 %	3-10 %
Negativní rozptyl značení (NLV)	Procento referenčních značek, které chybí v označeném vzorku DNA	< 20 %	6-15 %

3.6 Detekce strukturních změn

Detekce SV jsou zásadní pro pochopení genetiky onemocnění. V první fázi dochází k porovnání vytvořené genomové mapy s referenčním genomem (hg19 nebo hg38) a zachycení SV. Metoda optického mapování může detekovat až tisíce inzercí, delecí, translokací, duplikací a inverzí v jednom vzorku (Obr. 19), a to ve velikosti větší než 1 kbp, kterou jiné metody neumožňují. Posouzení biologického a klinického významu těchto SV je náročnější.

Typy strukturních variant

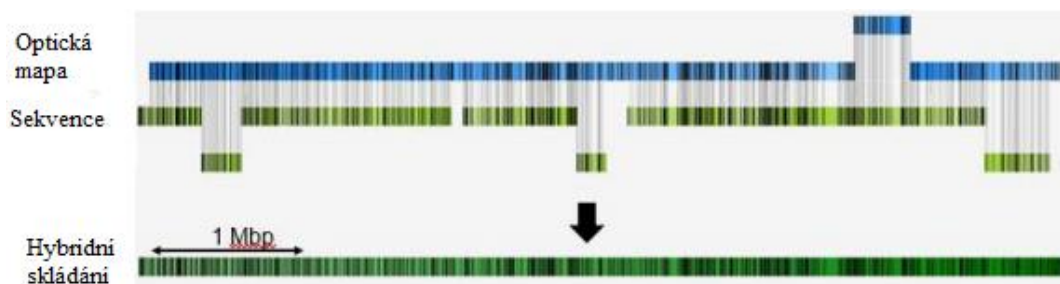


Obr. 19 Strukturní změny detekované metodou optického mapování – delece, inzerce, duplikace, translokace a inverze (zeleně je vyznačen referenční genom, modře genom pacienta, čárky označují fluorescenční značky; Bionanogenomics: <https://bionanogenomics.com/technology/structural-variation>, upraveno).

V dalším kroku lze využít nástroj Variant Annotation Pipeline (VAP), který je součástí softwaru BionanoAccess a automaticky analyzuje všechny detekované SV. Nejdříve shromáždí všechna relevantní data, včetně velikosti, zygotity a spolehlivosti pro každou SV. Dále jsou tyto SV porovnány s databází SV BionanoGenomics, která obsahuje více než 160 fenotypicky zdravých jedinců, aby se zjistila frekvence každé SV u kontrolní populace.

Jakmile jsou všechna srovnání provedena. VAP uvádí seznam genů ovlivněných SV nebo nejbližší geny a jejich vzdálenosti od SV. Uživatelé mohou filtrovat pouze *de novo* SV, vzácné SV nebo ty, které mohly ovlivnit některé kandidátní nebo známé onkogenní geny. Kromě toho pomocí VAP mohou být identifikovány jak vrozené, tak *de novo* SV. VAP může být také použita pro identifikaci vzácných a potenciálně zděděných *de novo* SV mezi rodiči a potomky (Bionanogenomics: <https://bionanogenomics.com/bionano-university/articles/thousands-svs-genes/>).

Kromě samotné detekce SV je možné i prohloubit informaci o studované oblasti pomocí tzv. hybridního skládání (hybrid scaffolding; Obr. 20). Tento přístup kombinuje data z optického mapování s informacemi z NGS. Optická mapa slouží k propojení sekvencí, které spolu sousedí, ale nepřekrývají se (Mostovoy *et al.*, 2016).



Obr. 20 Koncepte kombinování optické mapy a metod sekvenování pomocí hybridního skládání (Bionanogenomics: <https://bionanogenomics.com/wp-content/uploads/2018/04/30073-Bionano-Solve-Theory-of-Operation-Hybrid-Scaffold.pdf>, upraveno).

3.7 Využití v klinické oblasti

U onemocnění MM byla dosud publikována pouze jedna studie, kde bylo využito optické mapování pro detekci SV u pacienta v různých stádiích progresu MM. V této studii byly pomocí optického mapování a SNP identifikovány četné SV, především delece a inserce, které se mohou podílet na patogenezi a přispět k porozumění genomové struktury u pacientů s MM (Gupta *et al.*, 2015).

Dále se Barseghyan *et al.* zabývali schopností optického mapování identifikovat patogenní SV u pacientů s Duchenneovou svalovou dystrofií (DMD). V DMD identifikovali velké delece, duplikace a inverze zahrnující gen *CDMD1131*. Metoda optického mapování vylepšila informaci o umístění zlomových bodů v intronech u případů s delecí ve srovnání s běžně využívanou metodou PCR. Metoda byla také schopna identifikovat 5,1 Mbp inverzi zahrnující gen *CDMD1131*, dříve identifikovanou sekvenováním RNA, která je náročnější (Barseghyan *et al.*, 2017).

Další studie s využitím optického mapování byla provedena u pacienta s karcinomem prostaty. V této studii vědci použili genomovou mapu vytvořenou z DNA nádoru prostaty a porovnali ji s DNA získané z periferní krve stejného pacienta a pomocí optického mapování identifikovali 85 velkých SV přítomných pouze v nádorové tkáni. Převážná většina velkých SV nebyla detekovatelná pomocí NGS a tyto SV měly dopad na geny s onkogenním potenciálem a jsou pravděpodobně zodpovědné za tumorogenezi (Jaratlerdsiri *et al.*, 2017).

Účelem další studie bylo charakterizovat rozsáhlou tandemovou duplikaci zahrnující exony 1-19 genu *BRCA1* ve čtyřech nezávislých rodinách s dědičným syndromem rakoviny prsu a vaječníků. Data odhalila tandemovou duplikaci na chromozomu 17, která zahrnovala exony 1-19 genu *BRCA1* a dalších kandidátních genů. I když je v současné době tato změna

klasifikována jako varianta neznámého významu, data naznačují, že tato duplikace může být benigní variací (Du *et al.*, 2018).

V dalších publikacích, bylo zjištěno, že optické mapování rozšiřuje možnosti diagnózy onemocnění Facioskapulohumerální svalové dystrofie 1 (FSHD1). Molekulární diagnóza FSHD1 pomocí hybridizační metody Southern blot nebo *FISH* je obtížná a časově náročná. Ve studii pětigeneračního rodokmenu FSHD1, byli prostřednictvím optického mapování správně diagnostikováni pacienti a zdraví jedinci (Dai *et al.* 2018; Zhang *et al.*, 2019).

V nejnovější publikaci vědci použili kombinaci metod celogenomového sekvenování a optického mapování u řady dospělých i dětských pacientů s akutní myeloidní leukémií (AML). Metoda optického mapování identifikovala 97 % SV dříve nalezených karyotypovou analýzou a odhalila další SV, které nebyly rozpoznatelné současnými technikami. Nalezené SV opakovaně ovlivňovaly řadu genů asociovaných s AML. Tyto výsledky naznačují, že současné metody genomické analýzy nedokáží identifikovat většinu SV ve vzorcích AML a toto omezení může bránit diagnostice a další prognóze (Xu *et al.*, 2019).

Optické mapování má potenciál stát se novým nástrojem v diagnostice klinické genetiky kvůli své schopnosti citlivě detekovat velké SV. Na základě tohoto zjištění by optické mapování mohlo být spolehlivou a akumulární technikou vhodnou pro molekulární diagnostiku různých chorob včetně nádorových onemocnění, což bylo prokázáno již v několika studiích (Jaratlerdsiri *et al.*, 2017; Dai *et al.*, 2018; Xu *et al.*, 2019)

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Materiál

4.1.1 Chemikálie

- 96-100 % Ethanol (Fagron, ČR)
- Agarosa (Serva, Německo)
- Agarasa (ThermoFischer Scientific, USA)
- EDTA (Sigma-Aldrich, USA)
- HCl (Promega, USA)
- Heparin (Zentiva, ČR)
- Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich, USA)
- KH_2PO_4 (Penta, Německo)
- KCl (Promega, USA)
- NaCl (Promega, USA)
- Na_2HPO_4 (Penta, Německo)
- NaOH (Penta, Německo)
- Nuclease free water (Sigma-Aldrich, USA)
- Proteinasa K (Qiagen, Německo)
- RNAsa (Sigma-Aldrich, USA)
- RPMI (Sigma-Aldrich, USA)
- Tris (Sigma-Aldrich, USA)

4.1.2 Přístroje

- BD FACSAria (BD Biosciences, USA)
- Bionano čip (Bionano Genomics, USA)
- Centrifuga Z306 (Hermle, Německo)
- Centrifuga Z 323 (Hermle, Německo)
- Irys systém (Bionano Genomics, USA)
- Laminární box (ThermoFischer Scientific, USA)

- Mini Dry bath (Miu Lab, Čína)
- Orbital shaker inkubátor ES-20 (Biosan, Lotyšsko)
- Quibit 2.0 (Invitrogen, USA)
- Průtokový cytometer NovoCyte (Acea Biosciences, USA)
- Rotátor multi bio RS (Biosan, Lotyšsko)
- Saphyr systém (Bionano Genomics, USA)
- Sonifikátor S 40H (Elma Schmidbauer GmbH, Německo)
- Termocycler (Seegene, Jižní Korea)
- Thermoshaker TS 100C (Biosan, Lotyšsko)
- Thermomixer C (Eppendorf, Německo)
- Vortex Combi spin (Biosan, Lotyšsko)

4.1.3 Komerční soupravy

- Blood and Cell Culture DNA Isolation Kit (Bionano Genomics, USA)
- DNA Labeling Kit-DLS (Bionano Genomics, USA)
- DNA Labeling Kit-NLRS (Bionano Genomics, USA)
- EasySep™ Human CD138 Positive Selection Kit II (StemCell Technologies, Kanada)
- MACSprep™ Multiple Myeloma CD138 MicroBeads, human (Miltenyi Biotec, Německo)
- Quibit dsDNA HS Assay kit (ThermoFischer Scientific, USA)
- Quibit dsDNA BR Assay kit (ThermoFischer Scientific, USA)
- StraightFrom Whole Blood CD138 MicroBeads, human (Miltenyi Biotec, Německo)

4.1.4 Roztoky

1x PBS (fosfátový pufr)

- 1,37 M NaCl
- 27 mM KCl

- 18 mM KH₂PO₄
- 100 mM Na₂HPO₄, pH = 7,4

1x TE pufr

- 10 mM Tris
- 1 mM EDTA, pH = 8 (upravit pomocí HCl)

4.2 Metody

4.2.1 Izolace mononukleárních buněk z KD

Kostní dřev byla odebrána do média, které obsahovalo 8 ml RPMI a 5 kapek heparinu. Na průtokovou cytometrii bylo odebráno 50 µl vzorku a 1200 µl bylo použito na mikroizolaci DNA. Kostní dřev v EDTA byla naředěna 1:1 s PBS. Na 2,5 ml Histopaque-1077 byly navrstveny maximálně 4 ml kostní dřev. Následně byla provedena centrifugace při 400 g, 30 min, RT. Poté byl odebrán prstenec do 15ml zkumavky a byly přidány 4 ml PBS. Opět byla provedena centrifugace při 300 g, 10 min, RT. Poté se odlil supernatant a pelet byl resuspendován v 1 ml PBS a 25 µl bylo odebráno na průtokovou cytometrii, kde byla změřena infiltrace a celkový počet buněk ve vzorku KD. Dle výsledků bylo přepipetováno vše nebo porce minimálně 1x10⁸ buněk do 5ml zkumavky. Následně byla provedena centrifugace při 300 g, 10 min, RT. Supernatant byl odlit a pelet byl resuspendován v 1 ml (0,5 ml při malé buněčnosti) doporučeného média (RoboSep buffer nebo PBS s 2% FBS a 1 mM EDTA).

4.2.2 Imunopozitivní magnetická selekce PB

Z důvodu nízké infiltrace u pacientů s MM byly myelomové buňky ze vzorků KD izolovány magnetickou separací buněk. Pro selekci byly využity protilátky CD138, které byly navázány na magnetické kuličky a namířeny proti povrchovému antigenu CD138 na PB. Takto separované buňky, byly využity k dalším analýzám.

K 1 ml buněk bylo přidáno 50 µl Selection Cocktail a inkubace proběhla 3 min při RT. Magnetické kuličky Rapid Spheres byly vortexovány 30 s, 50 µl bylo přidáno ke vzorku, zamícháno a inkubováno opět 3 min při RT. Vzorek byl doporučeným médiem doplněn na celkový objem 2,5 ml a opatrně byl 3x propipetován. Zkumavka bez víčka byla vložena do magnetu a inkubována 10 min při RT. Magnet se zkumavkou byl převrácen a zkumavka byla ponechána 2-3 s v převrácené poloze a poté vrácena do původní polohy. Celý proces byl 2x

opakován. Poté byla zkumavka vyjmuta z magnetu a buňky byly resuspendovány v 1 ml PBS. Následně bylo 25 μ l odebráno na průtokovou cytometrii. Podle výsledků bylo použito 1,5-2 miliony buněk na přípravu jednoho plugu. Nejprve byl vzorek centrifugován při 300 g, 10 min, 4 °C. Poté byl odsán supernatant a suchý pelet byl zamražen při -80 °C.

4.2.3 Příprava plugu

Aliquot 2% agarosy byl rozpuštěn při 70 °C po dobu 10 min a poté byla agarosa temperována 10 min při 43 °C. Buňky byly resuspendovány v 60 μ l Cell bufferu (CB) a následně byly temperovány při 43 °C, 3 min. Pak bylo ihned přidáno 40 μ l vytemperované agarosy k buňkám v CB. Vzorek byl 10x propipetován a nanesen po stěně do komůrky v držáku na plugy, který byl položen na termobloku (70 °C). Kazeta s plugy byla umístěna do 4 °C na 15 min.

4.2.4 Degradace proteinů a RNA

Nejprve byl připraven roztok proteinasy (EC 3.4.21.62; 167 μ l Proteinasy K + 2,5 ml lyzačního pufru). Následně byly plugy (max 5) přeneseny do roztoku a inkubovány při 50 °C 2h na třepačce (10 s, 450 rpm + 10 min bez třepání). Poté byl připraven čerstvý roztok proteinasy a byl temperován 5 min při RT. Přes sítko byla vylita tekutina a nalita nová proteínasa a proběhla inkubace přes noc při 50 °C na třepačce za stejných podmínek. Poté bylo přidáno 50 μ l RNAsy (EC 3.1.11.2) a proběhla inkubace při 37 °C 1 hod bez třepání.

4.2.5 Promytí plugů

Nejdříve byla zkumavka se vzorkem temperována 5 min při RT a poté byl roztok proteinasy vylit přes sítko. Následně bylo přes sítko nalito 10 ml 1x Wash pufru po dobu asi 10 s a nakonec byla tekutina vylita přes sítko. Tento postup byl 3x opakován. Posléze bylo přes sítko nalito 10 ml 1x Wash pufru a směs byla třepána v horizontální poloze (180 rpm, 15 min). Opět byla tekutina vylita přes sítko. Tento postup byl opakován 4x. Plugy je možno skladovat v 1x Wash pufru při 4 °C 2 týdny. Nebo se pokračuje následujícím krokem.

4.2.6 Lýze plugů

Nejdříve byly plugy odebrány do nové zkumavky. Po nalití 10 ml TE pufru přes sítko byla zkumavka 15 min třepána v horizontální poloze při 180 rpm. Poté byla tekutina vylita přes sítko a tento postup byl 5x opakován.

4.2.7 Rozpuštění agarosy

TE pufr byl odlit, plugy byly přeneseny do nové 1,5ml zkumavky (1 plug = 1 zkumavka) a krátce stočeny. Poté byly plugy rozpuštěny v termobloku při 70 °C, 2 min. Následně byly přeneseny do termobloku při 43 °C na 5 min a byly přidány 2 µl enzymu agarasy (EC 3.2.1.158; 0,2U/µl). Nakonec proběhla inkubace v termobloku při 43 °C 45 min.

4.2.8 Dialýza pro přečištění DNA

Do 6 cm Petriho misky bylo napipetováno 15 ml TE pufru (pro každý plug jedna Petriho miska). Na hladinu byla položena 0,1 µm dialyzační membrána. Po 10 minutách byla všechna DNA, která byla propipetována širokou špičkou, nabrána a přenesena na střed membrány. Následně proběhla inkubace 1 hod při RT. Po inkubaci byla DNA přenesena do nové 1,5ml zkumavky.

4.2.9 Homogenizace DNA

Viskozita DNA byla testována tak, že celý objem DNA byl nasáván do 200µl špičky, zatímco byl pomalu uvolňován pipetový píst. Pokud DNA nebyla viskózní docházelo ke kontinuálnímu pipetování. Pokud po uvolnění pístu nedocházelo k nasávání DNA, opakovaně byla DNA nasávána a zároveň docházelo k míchání špičkou, až se celý vzorek pipetoval v kontinuálním toku. Tento postup byl opakován maximálně 9x. Nakonec se DNA pro lepší homogenitu nechala ustálit přes noc při RT.

4.2.10 DNA kvantifikace

Standardy a Quibit BR a vzorek DNA byly temperovány 30 min při RT. DNA byla 5x promíchána 200µl širokou špičkou. Poté bylo do nových Quibit zkumavek napipetováno 18 µl Quibit bufferu a byly přidány 2 µl DNA z horní, střední a spodní pozice a následně proběhla sonifikace 10 min. Pak bylo připraveno činidlo (ředěním 200x) a poté standardy (10 µl Quibit pufru + 10 µl standardu). Po sonifikaci bylo k DNA a standardům přidáno 180 µl činidla a vše bylo zvortexováno a krátce stočeno. Koncentrace byla změřena na přístroji Qubit v ng/µl. Výsledná koncentrace DNA musela být v rozmezí 36-150 ng/µl a CV muselo být menší než 25 %.

4.2.11 Značení DNA – NLRS

DNA byla vytemperována na RT a bylo vypočítáno množství DNA. Do jedné reakce bylo potřeba 300 ng DNA. Následně byly připraveny jednotlivé master mixy pro každý jednotlivý krok NLRS.

4.2.11.1 Štěpení DNA

Na ledu byl připraven master mix dle počtu vzorků (Tab. 11). Poté bylo k master mixu přidáno vypočítané množství DNA a vzorek byl 3x propipetován širokou špičkou. Následně proběhla inkubace v termocycleru 2 h při 37 °C a víčko bylo předehráno na 47 °C. Do dalšího kroku byl vzorek udržován při 4 °C.

Tab. 11 Příprava master mixu na štěpení DNA.

1 reakce	Objem
DNA (300 ng)	- μ l
10x Buffer 3	1 μ l
Nt.BspQI (10U/ μ l)	1 μ l
H ₂ O	doplnit na celkový objem
Celkový objem	10 μ l

4.2.11.2 Značení, oprava a barvení celé molekuly DNA

Nejprve byl připraven další master mix pro značení DNA podle Tab. 12. Vzorek DNA byl po vyjmutí z termocycleru krátce stočen a bylo přidáno 5 μl master mixu. Nakonec byl vzorek DNA 2-3x propipetován, inkubace proběhla v termocycleru 1h při 72 °C a víčko bylo předehráno na 82 °C.

Následně byl na ledu připraven master mix pro opravu DNA podle počtu vzorků (Tab. 13) a byl chráněn před světlem. Vzorek DNA byl po vyjmutí z termocycleru krátce stočen a bylo přidáno 5 μl master mixu. Nakonec byl vzorek DNA pomalu propipetován, inkubace proběhla v termocycleru 30 min při 37 °C a víčko bylo předehráno na 47 °C.

Nakonec byl při laboratorní teplotě připraven master mix pro barvení celé molekuly DNA podle Tab. 14 a byl chráněn před světlem. Vzorek DNA byl po vyjmutí z termocycleru krátce stočen a ke vzorku bylo přidáno 40 μl master mixu. Nakonec byl vzorek DNA 3x pomalu propipetován a inkubace proběhla přes noc při 4 °C pod alobalem.

Tab. 12 Příprava master mixu pro značení DNA.

1 reakce	Objem
10x Labeling Buffer	1,5 μl
10x Labeling Mix	1,5 μl
Taq DNA Polymerase	1,0 μl
H ₂ O	1,0 μl
Celkový objem	5 μl

Tab. 13 Příprava master mixu pro opravu řetězce DNA.

1 reakce	Objem
10x ThermoPol Rxn Buffer	0,5 μl
50x Repair Mix	0,4 μl
NAD ⁺ (50mM)	0,4 μl
Taq DNA Ligase (40U/ μl)	1,0 μl
Ultrapure water	2,7 μl
Celkový objem	5 μl

Tab. 14 Příprava master mixu na barvení celé molekuly DNA.

1 reakce	Objem
Stop Solution	1,0 μ l
4x Flow Buffer	15,0 μ l
5x DTT	12,0 μ l
DNA Stain	3,0 μ l
Ultrapure water	9,0 μ l
Objem	40 μ l

4.2.12 Značení DNA – DLS

DNA byla vytemperována na RT 30 min a 5x propipetována širokou špičkou. Do nové PCR zkumavky bylo přidáno 750 ng DNA a Free nuclease water, aby byl celkový objem 21 μ l.

4.2.12.1 DLE – 1 značení

Na ledu byl připraven master mix v neprůhledné zkumavce dle počtu vzorků (Tab. 15). Následně bylo 9 μ l master mixu přidáno k ředěné DNA a ta byla 5x propipetována. Poté proběhla inkubace v termocycleru 2 h při 37 °C a víčko bylo předehráno na 47 °C. Do dalšího kroku byl vzorek udržován při 4 °C.

Tab. 15 Příprava master mixu na DLE-1 značení DNA.

Látka	1 vzorek
gDNA (750 ng) + H ₂ O	21 μ l
5x DLE-1 Buffer	6 μ l
20x DL-Green	1,5 μ l
20x DLE-1 Enzyme	1,5 μ l
Konečný reakční objem	30 μl

4.2.12.2 Odmytí nenavázané DL-green

Ke vzorku bylo připipetováno 5 μ l proteinasy K do horní poloviny vzorku. Následně proběhla inkubace v termocycleru 30 min při 50 °C a víčko bylo předebráno na 60 °C. Poté bylo do středu mikrotitrační destičky napipetováno pro každý vzorek 25 μ l 1x DLE Bufferu a na něj byla pomocí pinzety položena DLS membrána. Dále byla značená DNA přenesena na střed membrány, jamka byla přelepena PCR folií a destička byla přikryta, aby byla chráněna před světlem. Inkubace proběhla při RT 1 hod. Před koncem inkubace (10 min) byla připravena druhá DLS membrána stejným způsobem. Pak byl vzorek přepipetován na novou membránu. Opět byla destička přelepena PCR folií a přikryta. Inkubace proběhla při RT 30 min. Poté byl vzorek přepipetován do nové PCR zkumavky a propipetován.

4.2.12.3 Barvení DNA a homogenizace

Nejdříve byl připraven master mix (Tab. 16) a do hnědé 1,5ml zkumavky napipetováno 20 μ l DNA. Poté bylo napipetováno 40 μ l master mixu na horní hladinu značené DNA a vzorek se nemíchal. Potom byl vzorek umístěn na rotátor na 1 hod, 5 rpm, RT. Nakonec byl krátce stočen a inkubován při RT přes noc, chráněný před světlem.

Tab. 16 Příprava master mixu na barvení DNA.

Látka	1 vzorek
Označený vzorek	20 μ l
4x Flow Buffer	15 μ l
5x DTT	12 μ l
DNA Stain	3,5 μ l
Nuclease Free H ₂ O	9,5 μ l
Konečný reakční objem	60 μl

4.2.12.4 Kvantifikace značené a barvené DNA

Standardy a Qubit HS a vzorek DNA byly temperovány 30 min při RT. DNA byla pomalu 5x promíchána 200 μ l širokou špičkou. Poté bylo do nových Qubit zkumavek napipetováno 18 μ l Qubit bufferu a byly přidány 2 μ l DNA ze dvou různých pozic a následně proběhla sonifikace 10 min. Pak bylo připraveno činidlo (ředěním 200x) a poté standardy (10 μ l Qubit bufferu + 10 μ l standardu). Po sonifikaci byla DNA krátce stočena a k DNA a standardům přidáno 180 μ l činidla a vše bylo zvortexováno a krátce stočeno. Vše bylo změřeno na Qubitu v ng/ μ l. Výsledná koncentrace DNA musela být v rozmezí 4-12 ng/ μ l a CV muselo být menší než 25 %.

4.2.13 Nanesení vzorku na Bionano čip a spuštění běhu

Saphyr čip byl vytemperován při RT 30 min. V softwaru BionanoAcces byl vytvořen nový experiment, byla vybrána použitá chemie a referenční mapa hg38. Napřed bylo pomalu napipetováno 8,5 μ l DNA do inlet jamky, tak aby se vzorek nasál do kanálků a inkubace proběhla 2 min. Poté byl napipetován další vzorek DNA do druhé inlet jamky. Po dvou minutách bylo napipetováno 11 μ l DNA do outlet jamek. Ve všech jamkách musela být rovná hladina. Pokud došlo k odpaření ihned se musela jamka doplnit vodou, tak aby ve všech jamkách byla rovná hladina a čip se ihned potom uzavřel klipem. Poté byl čip vložen do přístroje, kde proběhla vizualizace molekul DNA. Po ukončení běhu byl čip odebrán z přístroje a byl vyčištěn ubrousky na optiku a 70% ethanolem.

4.2.14 Zpracování výsledků

Pomocí Softwaru BionanoAccess bylo možné sledovat výsledky běhu v reálném čase (Obr. 21) a provádět různé bioinformatické analýzy (Tab. 17). Konečná vizualizace byla realizována pomocí „circus plot“ schématu, který usnadňuje identifikaci SV. Program umožňoval také detailní zobrazení každé SV. Pomocí funkce filtrování bylo možné nastavit vlastní kritéria jako byla délka molekul nebo hledané SV.



Obr. 21 Pohled na řídicí panel BionanoAccess pro monitorování průběhu běhu. Graf A popisuje propustnost DNA molekul, graf B ukazuje míru shody s referenčním genomem. (Bionanogenomics: <https://bionanogenomics.com/wp-content/uploads/2018/04/30142-Bionano-Access-Software-User-Guide.pdf>, upraveno).

Tab. 17 Popis jednotlivých bioinformatických operací prováděných v softwaru BionanoAccess (Bionanogenomics: <https://bionanogenomics.com/wp-content/uploads/2018/04/30142-Bionano-Access-Software-User-Guide.pdf>, upraveno).

Operace	Popis
Zpracování datových sekvencí	Transformuje soubory ve formátu fasta na formát Bionano cmap
Tvoření genomové mapy (<i>de novo</i> assembly)	Sestavení genomových map pro detekci SV a hybridního skládání
Sloučení dat (merge)	Sloučení dvou a více molekulových dat do jediného objektu (Irys)
Filtrování molekul	Filtrování molekul podle délky a celkového množství molekul
VAP	Analýza všech detekovaných SV
Srovnání map	Porovnání dvou map
Hybridní skládání	Sloučení genomových map se sekvenčními daty

5 VÝSLEDKY

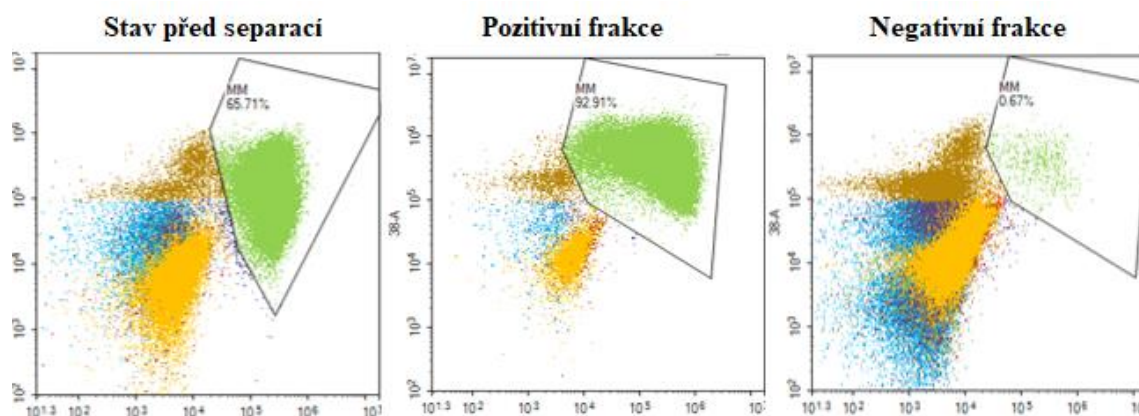
5.1 Optimalizace metody

První část diplomové práce byla věnována optimalizaci metody. Především řešení problémů vznikajících izolací vysokomolekulární DNA s vysokou viskozitou, její úpravě pro měření koncentrace a skladování. V neposlední řadě také metodám separace myelomových buněk.

5.1.1 Separace myelomových buněk

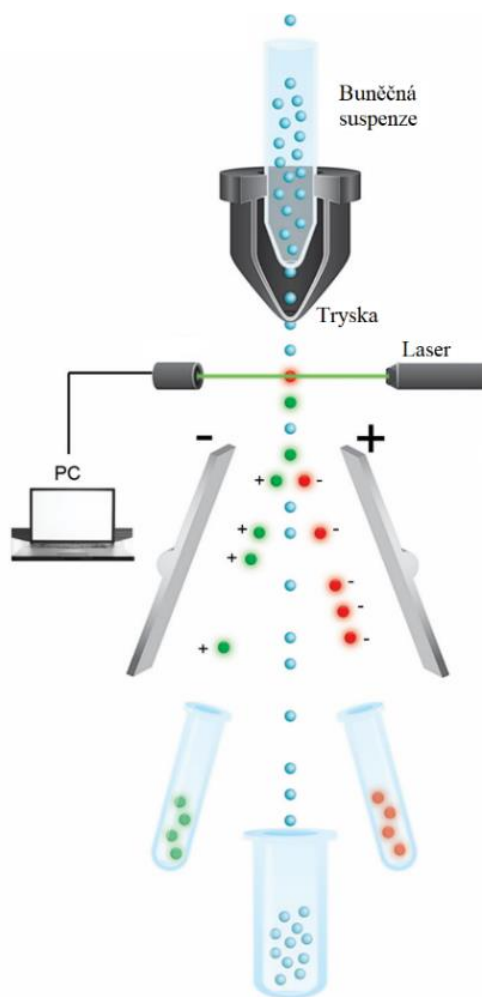
Diplomová práce byla zaměřena na studium SV u pacientů s MM. Právě u pacientů s MM je hlavním problémem při vyšetřování chromozomových aberací nízký podíl myelomových buněk v KD (infiltrace) a také velmi nízká proliferační aktivita maligních plazmatických buněk. Jednou z možností, jak obejít tyto problémy je izolace myelomových buněk, u kterých pak následně byla izolována vysokomolekulární DNA, pomocí separačních technik (Adam *et al.*, 2008). Cílem bylo nalézt separační metodu pro získání populace plazmatických buněk v dostatečné čistotě (> 90 %) a množství (nejméně 500 000 bb) pro optické mapování.

Separace byla provedena pomocí metod dostupných na školícím pracovišti. Mezi tyto metody patří imunomagnetická separace (MACS a StemCell) a fluorescenční imunomagnetická separace (FACS). Po jednotlivých separačních krocích byla provedena kontrola infiltrace a celkového počtu buněk na průtokovém cytometru (Obr. 22).



Obr. 22 Infiltrace myelomových buněk a celkový počet buněk měřený na průtokovém cytometru. Separace myelomových buněk byla provedena pomocí metody StemCell.

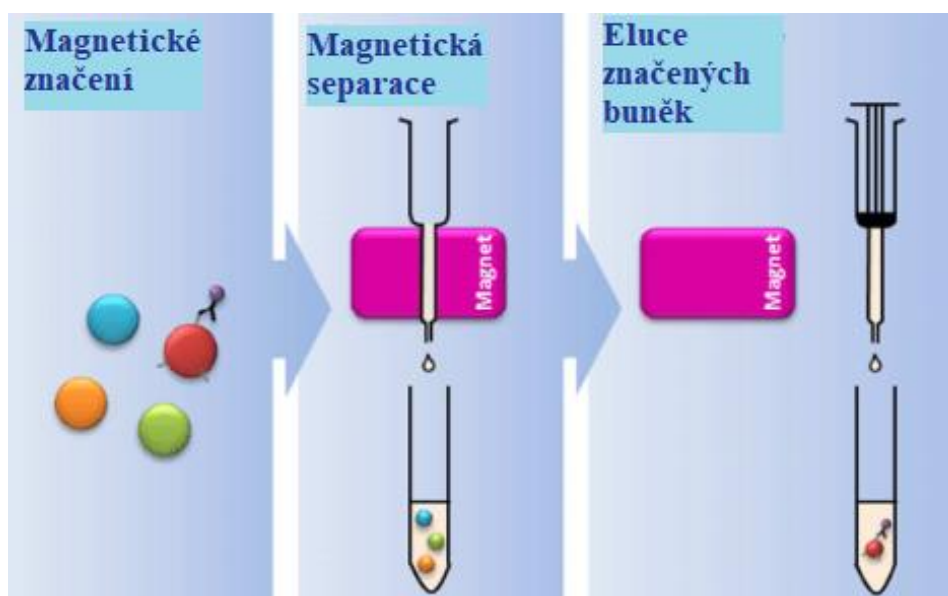
Fluorescenčně aktivované třídění buněk (FACS) je specializovaný typ průtokové cytometrie. Poskytuje způsob třídění heterogenní směsi buněk na základě specifického rozptylu světla a fluorescenčních charakteristik každé buňky. Suspenze buněk je označena specifickou fluorescenčně značenou protilátkou, v případě MM jsou to CD138. Buňky následně procházejí laserovým paprskem a měří se jejich fluorescence. Každá buňka nese kladný nebo záporný náboj na základě toho, zda je navázaná fluorescenčně značená protilátka. Procházející buňky jsou poté detekovány pomocí elektrického pole do sběrných zkumavek podle jejich náboje (Obr. 23). Výhodou této metody je vysoká čistota, nevýhodou je časová náročnost a také cena (Hodne a Weltzien, 2015).



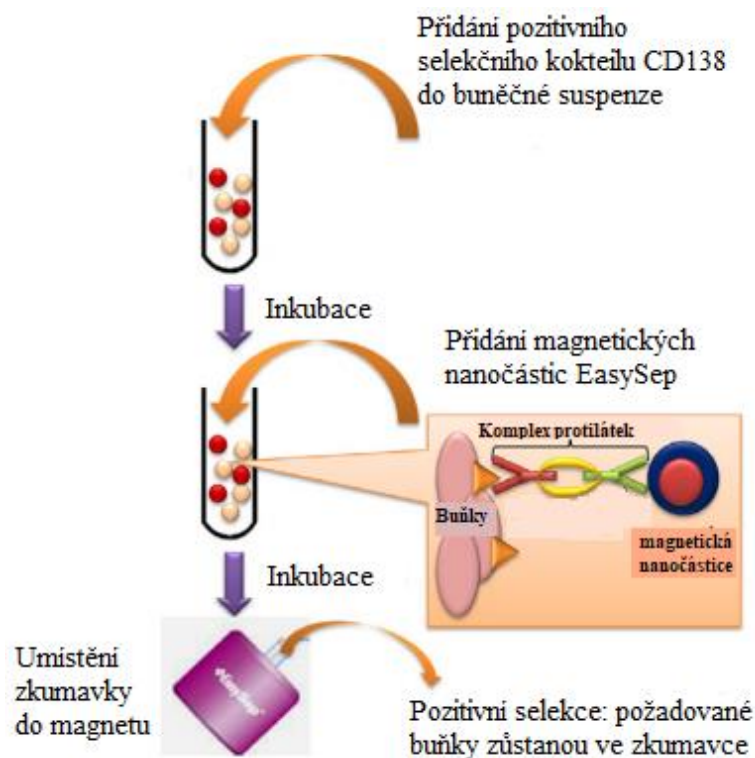
Obr. 23 Fluorescenčně aktivované třídění buněk (FACS, Hodne a Weltzien, 2015, upraveno).

Imunopozitivní magnetická separace (MACS) je dobře zavedená technologie třídění cílových buněk z heterogenních buněčných populací na základě vazby antigenů buněk ke specifickým protilátkám konjugovanými s magnetickými kuličkami. Po inkubaci kuliček a buněk se roztok převede do kolony v silném magnetickém poli. Buňky se specifickým antigenem zůstávají na koloně a následně jsou eluovány z kolony (Obr. 24, Marques *et al.*, 2014).

StemCell je metoda, kdy dochází k separaci založené na podobném principu jako MACS. Také dochází k navázání magnetických kuliček, na kterých je navázána protilátka a tyto komplexy se separují pomocí magnetu. Tento systém poskytuje separaci bez kolony, zkumavka se značenými buňkami je umístěna do magnetického stojanu (Obr. 25). Specifické buňky jsou vychytány na stěnu zkumavky, zatímco ostatní zůstanou v kapalné suspenzi. Výhodou těchto metod je jednoduchost a rychlost. Limitem může být dostupnost a specifita protilátky (Shin *et al.*, 2012).



Obr. 24 Kroky imunopozitivní magnetická separace (MACS, Marques *et. al.*, 2014, upraveno).



Obr. 25 Schématické znázornění magnetické izolace pomocí StemCell (Wartalski *et al.*, 2016, upraveno).

Výše uvedené separační metody byly provedeny u pacientů při různých infiltracích myelomových buněk. U každé separační techniky byla zhodnocena dostupnost metody, časový limit, náročnost provedení, konečná čistota buněk, výtěžek a také cena.

Metoda FACS byla využívána u pacientů s velmi nízkou infiltrací z důvodu časové náročnosti a ceně, naopak výhodou této metody byla vysoká čistota separovaných buněk. Metoda MACS byla použita u vzorků s infiltrací < 6 %, při vyšších infiltracích docházelo k ucpaní kolonky. Výhodou této metody je také možnost separace buněk přímo ze vzorku KD, kdy nedochází k velkým ztrátám buněk. Metoda StemCell byla aplikována u pacientů s vyšší infiltrací, protože bylo dosaženo větší výtěžnosti a tato technika je jednoduchá a rychlá. Její nevýhodou je, ale nižší čistota buněk. Využité separační metody jsou shrnuty v Tab. 18.

Tab. 18 Metody využití při separaci myelomových buněk. Jejich výhody, nevýhody a použití při různých infiltracích myelomových buněk.

Metoda	Infiltrace u pacientů s MM	Výhody	Nevýhody
FACS	< 2 %	Vysoká čistota buněk	Časová náročnost, cena
MACS	2–6 %	Rychlost, jednoduchost, přidání značených magnetických kuliček přímo do vzorku KD	Ucpání kolonky (při vyšších infiltracích), cena
StemCell	> 6 %	Jednoduchost a rychlost, vysoký výtěžek	Nižší čistota buněk

5.1.2 Izolace vysokomolekulární DNA

Na začátku diplomové práce byla prováděna experimentální část na přístroji Irys, který byl vyvinutý především pro mapování DNA rostlinných vzorků. Z tohoto důvodu byla nutná optimalizace postupu pro izolaci vysokomolekulární DNA u hematologických pacientů z krve nebo KD. Přehled těchto metod je shrnut v Tab. 19.

Při izolaci mononukleárních buněk byl podle protokolu používán lyzační pufr, který byl součástí dodávaného kitu, ale docházelo ke ztrátám 2/3 buněk, proto byla využita separace krevních buněk na základě hustotního gradientu s použitím flotačních roztoků (Ficoll, Histopaque), kdy nedocházelo k tak velkým ztrátám. V dalším kroku bylo potřeba snížit viskozitu DNA u hematologických pacientů, která způsobovala nemožnost pohybu DNA v nanokanálech, pomocí Proteinasy K nebo RNAsy.

Dále bylo potřeba zjistit množství buněk, aby výsledná koncentrace DNA pro optické mapování byla 36-150 ng/μl. Pomocí průtokové cytometrie bylo zjištěno, že při zamražení buněk je pro splnění této podmínky potřeba 1-2 miliony separovaných myelomových buněk a při skladování v agarosovém plugu pouze 500 000 - 600 000 buněk.

Nakonec byly vyzkoušeny různé možnosti skladování buněk. Podle doporučení protokolu bylo možné uchovávat DNA v agarosovém plugu 2 týdny při 4 °C. Po delší době docházelo k degradaci DNA. Z toho důvodu bylo vyzkoušeno uchovávání buněk při -80 °C. Tento způsob umožňoval dlouhodobější skladování buněk a vytváření biobanky, nevýhodou byla ztráta genetického materiálu (např. popraskání buněk) při opětovném rozmražení, i přesto byl tento způsob uchovávání buněk efektivnější.

Tab. 19 Přehled metod optimalizace při izolaci vysokomolekulární DNA.

Proces	Vyzkoušené metody		Vybraná metoda
	Podle protokolu	Změna	
Izolace mononukleárních buněk	Lyzační pufr	Histopague, Ficoll	Histopague
Koncentrace agarosy	1,5%	1,2% a 2 % (Sigma Aldrich a Thermo Scientific)	2%
Degradace proteinů	167 µl Proteinasy K + inkubace přes noc	167 µl Proteinasy K + inkubace 2 noci 200 µl Proteinasy K + inkubace přes noc	167 µl + inkubace přes noc
Degradace RNA	Bez přidání RNAsy	50 µl RNAsy inkubace 1 hod 37 °C	50 µl RNAsy inkubace 1 hod 37 °C
Degradace agarosy	2 µl gelasy + inkubace 45 min 43 °C	2 µl agarasy + inkubace 45 min 43 °C 4 µl agarasy + inkubace 1 hod 43 °C	2 µl agarasy + inkubace 1 hod 43 °C
Dialýza DNA	Inkubace 45 min při RT	Inkubace 1-2 hod při RT	Inkubace 1 hod při RT
Homogenizace DNA	Propipetování DNA 9x po dialýze Pokud není vzorek po dialýze homogenní inkubace přes noc při RT	Propipetování DNA 10x před i po dialýze a inkubace DNA při RT po dobu několika dnů (3-8 dnů)	Propipetování DNA 10x před a po dialýze Po dialýze inkubace DNA při RT přes noc
Uskladnění buněk	V agarosovém plugu	V agarosovém plugu Buňky v -80 °C	Buňky v -80 °C

5.1.3 Zobrazení molekul DNA

Počáteční práce byla realizována pomocí systému Irys a značení typu NLRS, ale během krátkého období došlo k uvedení novější technologie Saphyr a chemie DLS, tyto změny vyžadovaly další úpravy v přípravě vzorku a také technologie při analýze dat. Mezi významná pozitiva, která přinesl přechod od systému Irys k systému Saphyr patřilo zejména zvýšení kapacity čipu, a tím získání mnohem většího množství dat pro analýzu SV. Zatímco kapacita čipu u systému Irys byla 36 Gbp u systému Saphyr se zvětšila na 320 Gbp. Z tohoto důvodu je možné analyzovat vzorek pacienta v jednom experimentu, než tomu bylo u systému Irys.

S novým přístrojem Saphyr byl vyvinut také software BionanoAccess, který funguje jako webový server a lze jej snadno nainstalovat kdekoliv v síti a přistupovat k němu prostřednictvím libovolného webového prohlížeče. Tento systém je výkonnější, rychlejší a snadnější pro ovládání než předchozí verze IrysView. BionanoAccess také obsahuje nové vizualizační nástroje, které umožňují vizualizovat mapy genomu a jsou blíže popsány v kapitole zpracování výsledků (Bionanogenomics: <https://bionanogenomics.com/bionano-university/articles/bionano-access-software-perfect-companion-saphyr>).

Během přechodu k systému Saphyr byla také vyvinuta nová technologie značení vysokomolekulární DNA (DLS). S použitím přístroje Saphyr lze tedy využít obou typů značení (DLS, NLRS), dokonce je i kombinovat. U systému Irys je možné používat pouze techniku NLRS, kde dochází ke štěpení jednoho vlákna DNA. Pokud jsou štěpící místa blízko sebe na opačných vláknech vznikají systematické dvouvláknové zlomy, což omezuje tvorbu genomových map. Technika značení DLS u nového systému Saphyr ponechává DNA vzorek neporušený a eliminuje systematické zlomy molekul. Protokol DLS sestává z jedné enzymatické reakce, následované čištěním a barvením. Není třeba opravovat poškozená místa, což umožňuje získání delších nativních fragmentů DNA s průměrnou délkou > 2 Mbp. Genomové mapy sestavené pomocí DLS jsou v průměru 50x delší, což zlepšuje vizualizaci genomu a vytváří přesnější sestavy. Pro doplnění informací z NGS může být DLS kombinováno s technikou NLRS. Další výhodou DLS je mapování genomu za zlomek nákladů.

5.2 Studium nalezených SV u pacientů s mnohočetným myelomem

V rámci diplomové práce bylo analyzováno pět vzorků KD od nově diagnostikovaných pacientů s MM (P1-P5). Všichni pacienti byli odebráni na hematologické klinice ve Fakultní nemocnici Olomouc (FNOL).

5.2.1 Klinická charakteristika pacientů

U všech pacientů byla k dispozici jejich klinická charakteristika. Pacienti 2-5 byli diagnostikováni ve stádiu MM pouze P1 ve stádiu SMM, a proto je zatím bez terapie. Klinické stádium u všech pacientů bylo určeno podle standardní klasifikace MM dle Durieho a Salmola. U pacienta P1 byl SMM v kombinaci s AML a u pacienta P2 s myelodysplastickým syndromem (RCMD). Pacient P3 vykazoval typické příznaky pro MM jako bylo renální selhání, hyparkalcémie a extramedulární onemocnění. Podrobná charakteristika pacientů je uvedena v Tab. 20.

Tab. 20 Klinická charakteristika vyšetřovaných pacientů s MM.

Pacient	Pohlaví	Věk	Terapie	Datum diagnózy	Klinické stádium (Durie a Salmol)	Příznaky/ další onemocnění
P1	žena	86	NE	červen 2018	I	AML
P2	žena	76	ANO	srpen 2018	II	RCMD
P3	muž	74	ANO	srpen 2018	III	Renální selhání, hyperkalcémie a extramedulárním onemocnění
P4	muž	77	ANO	říjen 2018	III	-
P5	muž	74	ANO	srpen 2018	III	-

5.2.2 Cytogenetická vyšetření

Cytogenetická vyšetření (karyotypování, *FISH*, arrayCGH) byla realizována v rámci rutinního vyšetření běžných chromozomálních změn vyskytujících se u MM na hemato-onkologické klinice v laboratoři cytogenetiky ve FNOL.

Vyšetření *FISH* bylo provedeno na myelomových buňkách značených imunofluorescenčně pomocí anti-human kappa chain (AMCA), kromě pacienta P1, u kterého byla *FISH* provedena z plné KD, z důvodu špatné morfolgie chromozomů. Cytogenetické výsledky neprokázaly u žádného pacienta translokaci na IgH lokusu ani delecii *TP53*. Monozomie chromozomu 13 byla objevena u pacientů P1, P3 a P4. Změny na chromozomu 1 byly detekovány u pacientů P3 a P4. Výsledky *FISH* jsou uvedeny v Tab. 21.

Tab. 21 Výsledky cytogenetického vyšetření pacientů pomocí metody *FISH*.

Pacient	Přestavba IgH	Del 13q14	Změny chr 1	Del 17p13
P1	NE	ANO (87 % buněk)	NE	NE
P2	NE	ANO (85 % buněk)	NE	NE
P3	NE	NE	ANO (3 kopie 1q21 a delece 1q32)	NE
P4	NE	ANO (93 % buněk)	ANO (3 kopie 1q21)	NE
P5	NE	NE	NE	NE

Vyšetření arrayCGH bylo realizováno u všech pacientů na separovaných CD138 buňkách KD. Výsledky arrayCGH prokázaly trizomie chromozomů 3, 5, 7, 9, 11, 15, 17, 18, 19 a 21. U pacientů P4 a P5 byla nalezena také tetrazomie chromozomu 15 a 21. Kromě těchto změn detekovaných na celých chromozomech metoda arrayCGH prokázala zmnožení a delece pouze části řady dalších chromozomů. Podrobně jsou výsledky popsány v Tab. 22. a 23.

Tab. 22 Výsledky cytogenetického vyšetření pacientů pomocí metody arrayCGH. Změny detekované na celých chromozomech.

Pacient	Trizomie	Tetrazomie	Monozomie
P1	5, 7, 9, 11, 15, 19, 20	NE	13, 22, 23
P2	5, 7, 9, 15, 19	NE	13
P3	3, 5, 9, 11, 19, 21	NE	NE
P4	4, 11, 18, 19, 21	15	13
P5	3, 5, 9, 11, 15, 18, 19	21	NE

Tab. 23 Výsledky cytogenetického vyšetření pacientů pomocí metody arrayCGH. Zisky a delece na částech chromozomů.

Pacient	Delece	Zisky
P1	del 1p31.3-1p12, 6q11.1-6q12, 8p23.3-8p11.21, 16q11.2-16q24.3, 17p11.2, 17q11.1-17q21.31	-
P2	16q11.2-16q24.3, 18p11.32	-
P3	1p35.1-1p32.1, 1p31-1p12, 16q11.2-16q3	1q21.1q44, 9p24.3-9p11.2
P4	6q13-6q14.1, 6q15-6q27, 20q12	1q21.1-1q44, 3p13.2-3q13.31, 3q13.33, 3q21.3, 3q22.1, 5p15.33-5p11, 6p25.3-6p11.1, 6q11.1-6q12, 6q14.1, 6q14.3-6q15
P5	1p22.3-1p11.2, 2q36.1, 2q36.1-2q36.3, 4p16.3-4p16.2, 4p15.31, 4q13.3-4q21.1, 4q21.22-4q22.1, 4q22.3-4q23, 4q26-4q27, 4q31.1-4q31.2, 8q24.13-8q24.21, 12q12-12q13.13, 14q21.1, 16p12.3, 17q22	5p15.33-5p11, 5q11.1-5q13.1, 5q22.2q23.1, 5q31.1q35.3, 19p12, 19q12-19q13.2

5.2.3 Vytvoření optické mapy a analýza SV

Optické mapování bylo realizováno u všech pacientů pomocí systému Saphyr a chemie DLS. Byly sestaveny genomové mapy pacientů a porovnány s referenčním genomem (hg38) s průměrným efektivním pokrytím 124x. Jednotlivé běhy u pacientů splňovaly podmínky blíže popsané v kapitole sestavení genomových map (Tab. 24).

U všech pacientů byly identifikovány četné SV včetně delecí, inzercí, inverzí, duplikací a translokací (Tab. 25 a Tab. 26), přičemž u nově detekovaných SV převládaly delece (přibližně 60 %). Kromě změn, které byly nalezeny v rámci cytogenetického rutinního vyšetření byly také detekovány další SV včetně intra a interchromozomálních translokací, které nebyly detekovány pomocí *FISH* nebo arrayCGH. Většina translokací byla intrachromozomální (64 %) na chromozomech 3, 4, 6, 14, 16, 17 a 18. Další nově nalezené translokace (36 %) byly interchromozomální a byly detekovány na chromozomech 2, 3, 6, 8, 12, 17 a 22.

Tab. 24 Zpráva o kvalitě běhu u jednotlivých pacientů.

Parametr	Pacient 1	Pacient 2	Pacient 3	Pacient 4	Pacient 5
Celková DNA (Mbp)	5760,0	5840,5	5857,7	5810,2	5776,1
N50 (Mbp)	59,7	59,7	64,7	62,9	58,2
Efektivní pokrytí vzhledem k referenci (x)	123,9	107,3	131,1	124,7	120,5
Míra shody s referenčním genomem (%)	93,9	93,2	95,8	92,2	93,5
Hustota značení (na 100 kbp)	15,2	15,6	16,5	16,5	14,9

Tab. 25 Souhrn nově nalezených delecí, inverzí, inzercí a duplikací pomocí optického mapování.

Pacient	Delece	Inverze	Inzerce	Duplikace
P1	42	10	14	5
P2	44	6	12	19
P3	53	4	20	2
P4	47	14	16	4
P5	35	11	22	2

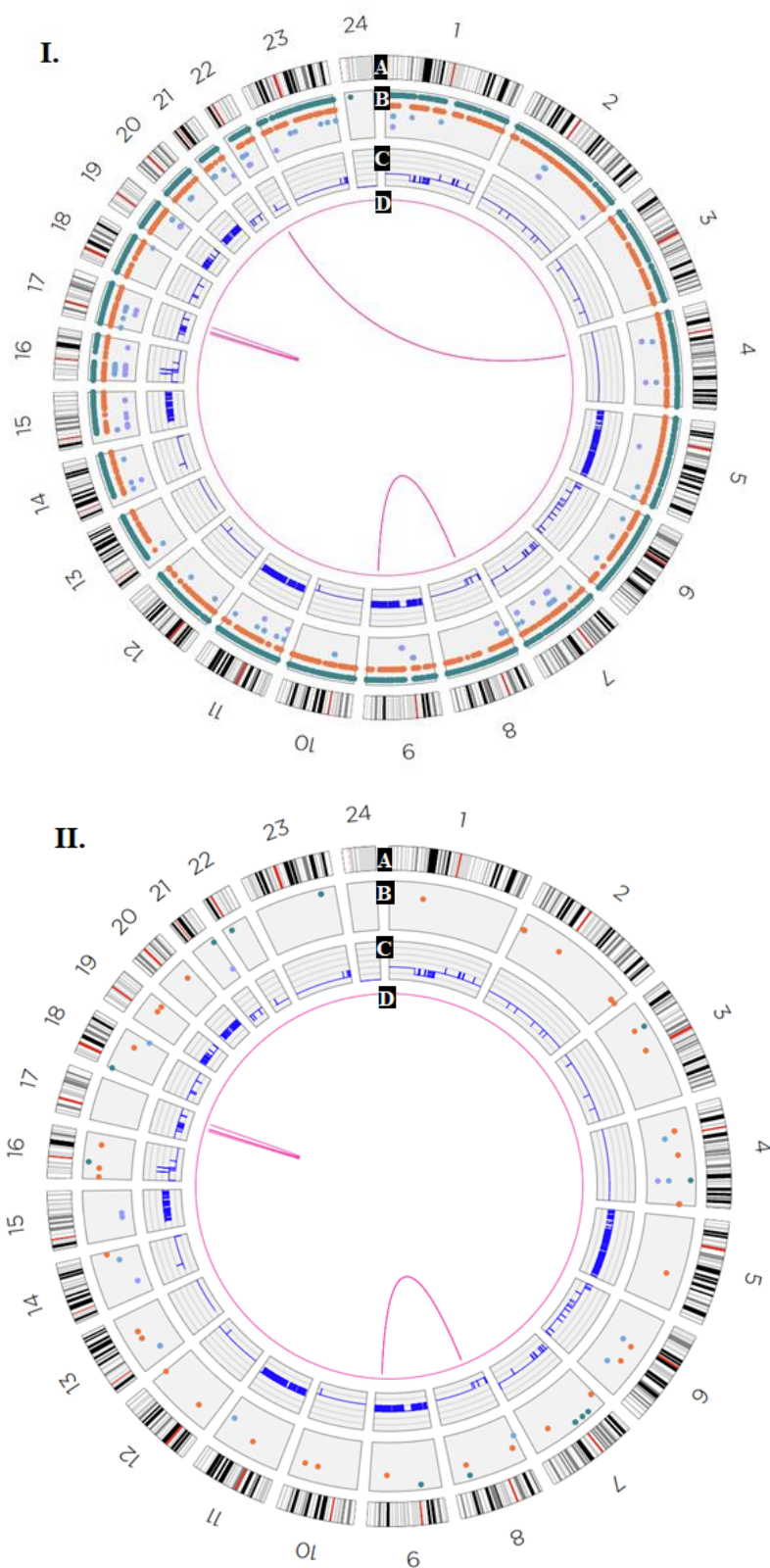
Tab. 26 Souhrn nově nalezených translokací pomocí optického mapování.

Pacient	Translokace	
	Interchromozomální	Intrachromozomální
P1	t(8;9)(p11.21;q24.13)	t(17;17)(q21.31;q21.33), t(17;17)(q21.33;q24.1)
P2	t(8;22)(p12;q24.21) t(8;22)(p21.3;q24.21) t(2;8)(q22.1;q37.1) t(3;12)(q21.1;q27.1) t(6;17)(p24.3;q14.1) t(6;8)(p24.3;q22.33)	-
P3	-	t(16;16)(p13.3;12.1)
P4	t(3;6)(p12.2;q13.32)	t(3;3)(q13.33;q21.3), t(6;6)(q12;q14.1), t(6;6)(q14.1;q14.3)
P5	-	t(3;3)(q13.13;q21.1), t(4;4)(p16.1;p15.31), t(4;4)(q28.1;q31.21), t(4;4)(q21.1;q22.3), t(4;4)(q13.1;q13.3), t(4;4)(q26;q31.1), t(14;14)(q22.1;q31.1), t(18;18)(q12.3;22.2)

Všechny nalezené SV a početní změny v rámci všech chromozomů byly zobrazeny pomocí „circus plot“ schématu. K vyhodnocení SV byl využit nástroj VAP, kdy došlo ke srovnání všech nově detekovaných SV s databází SV zdravých jedinců a následně k filtrování pouze *de novo* SV. V Tab. 27 je uveden počet všech nalezených změn pomocí optického mapování a počet nově nalezených změn (*de novo*) nevyskytujících se u kontrolní populace. Obr. 26 zobrazuje výsledky všech nalezených SV a pouze *de novo* SV u pacienta P1.

Tab. 27 Počet všech nalezených strukturních změn a počet *de novo* SV pomocí metody optického mapování. Písmenem A je označen počet všech nalezených SV a písmenem B počet *de novo* SV.

Pacient	Translokace		Delece		Inverze		Inzerce		Duplikace	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
P1	6	4	1657	42	136	10	3982	14	123	5
P2	6	6	1649	44	99	6	3997	12	151	19
P3	1	1	1756	53	130	4	4045	20	95	2
P4	7	4	1679	47	150	14	4058	16	314	4
P5	19	19	1529	35	106	11	4059	22	81	2



Obr. 26 Výsledek optického mapování pacienta P1 zobrazený pomocí „circos plot“ schématu. I – všechny nalezené SV. II – nově nalezené (*de novo*) SV. A – pozice na chromozomu, B – nalezené SV, C – počet kopií chromozomů, D – nalezené translokace. Zelené tečky označují nalezené inserce, oranžové delece, modré inverze, fialové duplikace a růžově jsou zobrazeny translokace.

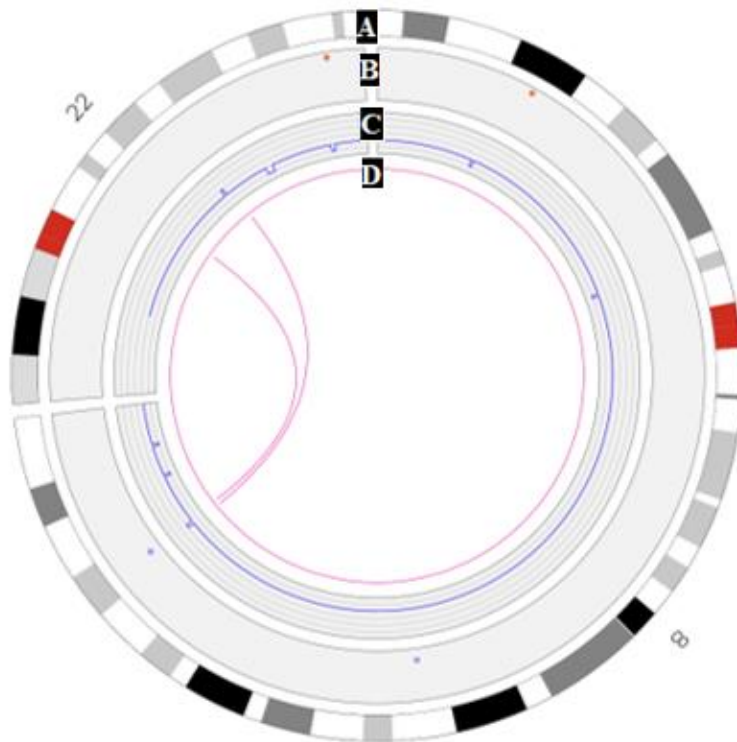
5.2.4 Přídavné změny detekované metodou optického mapování

Kromě změn detekovaných rutinními cytogenetickými metodami byly nalezeny další *de novo* SV. Tyto vybrané SV by mohly mít klinický dopad u pacientů s MM, jelikož jejich vliv byl již prokázán u pacientů s jinými chorobami. Mezi tyto nově nalezené změny patří především translokace, delece na chromozomu 6 a 18 a také změny v IgH lokusu a na chromozomu 17.

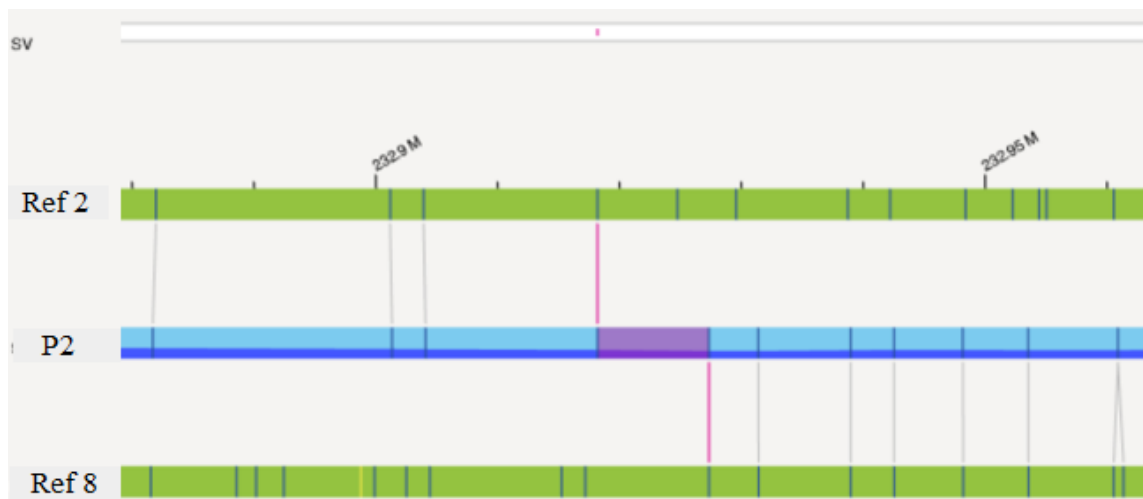
5.2.4.1 Translokace

U pacientů s MM se velmi často vyskytují translokace zasahující lokus IgH na 14. chromozomu v oblasti 14q32, které se nalézají u 30 % pacientů a jsou zahrnuty v rutinním vyšetření. Standardními cytogenetickými metodami ani optickým mapováním nebyly tyto translokace IgH lokusu detekovány. Ovšem u pacientů P2 a P4 byly nalezeny odlišné translokace, které byly v literatuře popsány u pacientů s jiným onemocněním nebo je jejich výskyt u nemocných s MM velmi ojedinělý (Fonseca *et al.*, 2003b).

U pacienta P2 byla detekována translokace t(8;22) (Obr. 27), která je nazývána jako Burkittova translokace t(8;22)(q24;q11), protože je přítomná u pacientů s Burkittovým lymfomem. Burkittův lymfom patří mezi rychle proliferující a vysoce agresivní zralá B lymfoproliferativní onemocnění. Výskyt této translokace je u MM velmi vzácný. V literatuře lze nalézt několik případů s MM, u kterých byla detekována tato translokace v pokročilém stádiu onemocnění. Další variantou Burkittovi translokace může být t(2;8)(p12q24), které byla také nalezena u pacienta P2 (Obr. 28; Kim *et al.*, 2011).

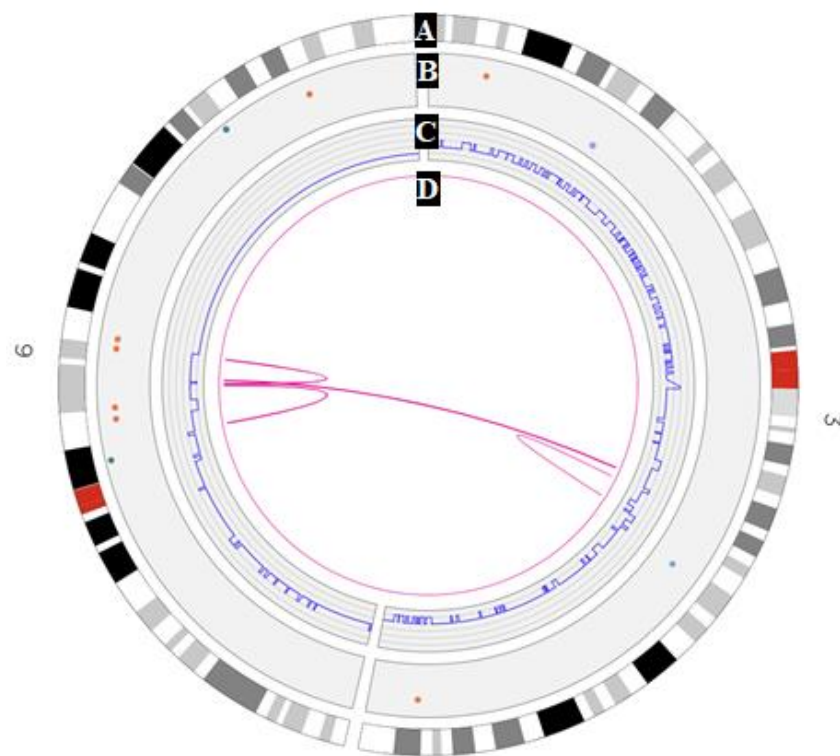


Obr. 27 Nalezená *de novo* interchromozomální translokace u pacienta P2 mezi chromozomy 8 a 22. Překrývající se geny *CASC8*, *JX003867*, *MORC2*. A – pozice na chromozomu, B – nalezené SV, C – počet kopií chromozomů, D – nalezené translokace. Zelené tečky označují nalezené inserce, oranžové delece, modré inverze, fialové duplikace a růžově jsou zobrazeny translokace.



Obr. 28 Nalezená interchromozomální translokace u pacienta P2 mezi chromozomy 8 a 2. Překrývající se geny *NGEF* a *PTK2*. Zeleně je vyznačen referenční chromozom, modře chromozom pacienta, čárky označují fluorescenční značky.

Odlišná translokace t(3;6) byla nalezena u pacienta P4 (Obr. 29). U pacientů s MM zatím nebyl zaznamenán výskyt této translokace, ale tato změna se často objevuje u pacientů s karcinomem ledvinových buněk (RCC). Mezi známé geny, které jsou nejbližší t(3;6) patří *PPP2R3A*, *PCCB*, *STAG1*, *RNF184*, *EPHB1* a *EPHA7*. *PPP2R3A* je regulační podjednotka proteinové fosfatázy 2A (*PP2A*), která se podílí na odstraňování fosfátových skupin z Mcl-1 a způsobuje rezistenci vůči léčivům u nádorových buněk (Foster *et al.*, 2007; Nifoussi *et al.*, 2014).



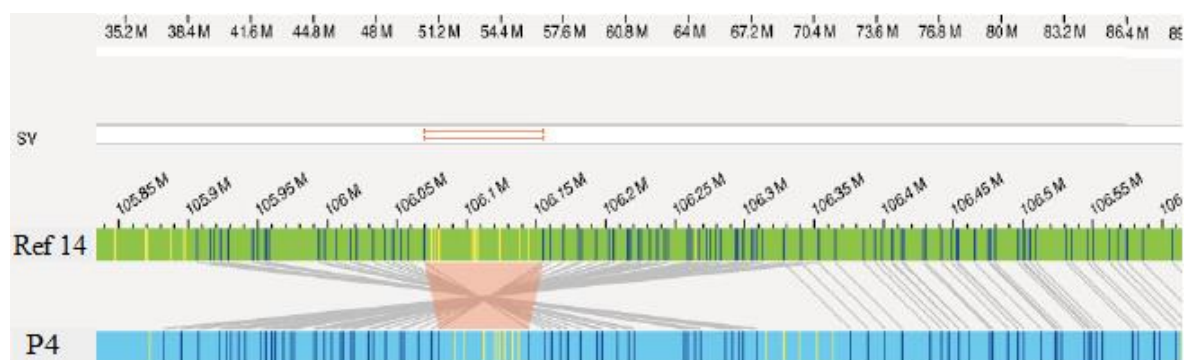
Obr. 29 Nalezená *de novo* interchromozomální translokace u pacienta P4 mezi chromozomy 6 a 3. A – pozice na chromozomu, B – nalezené SV, C – počet kopií chromozomů, D – nalezené translokace. Zelené tečky označují nalezené inserce, oranžové delece, modré inverze, fialové duplikace a růžově jsou zobrazeny translokace.

5.2.4.2 IgH lokus

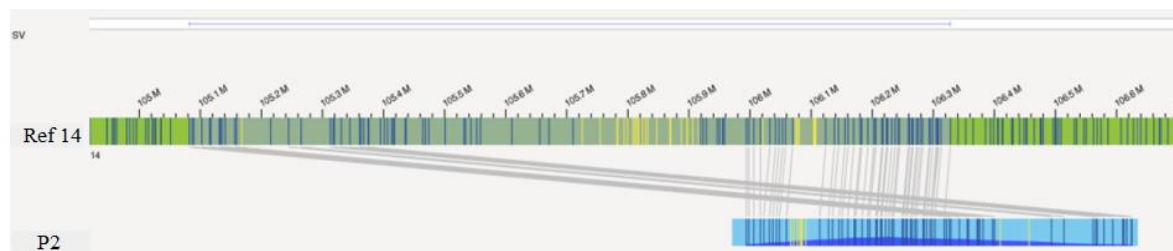
Lokus pro těžký řetězec imunoglobulinu (IgH), je umístěn na 14. chromozomu v oblasti 14q32 na telomerním konci dlouhého ramene. Nejčastěji detekované přestavby ve 14q32 jsou translokace (Rajkumar 2016). Translokace na 14. chromozomu nebyly detekovány u žádného vyšetřovaného pacienta.

Další abnormality v oblasti 14q32 byly nalezeny u 5,5 % pacientů s MM z nichž nejvýznamnější jsou delecce. Delece byla také detekována pomocí optického mapování u pacienta P4 (20,5 kbp) v oblasti 14q32.33 (Obr. 30). Klinický význam těchto abnormalit ještě není zcela objasněn (Rajan a Rajkumar, 2015).

U dalšího vzorku (P2) byla pomocí optického mapování v oblasti IgH lokusu na 14. chromozomu nalezena duplikace o velikosti 1,2 Mbp. Tato chromozomová změna zatím nebyla v literatuře popsána u pacientů s MM, ale byla nalezena u pacienta s Infantilní hyperkalcémií. Nalezená duplikace (7,1 Mbp) zahrnovala více, než 40 genů a byla detekována v kombinaci s delecí 13q34 a proto není zcela jasný její klinický dopad (Pallister *et al.*, 2011). Duplikace nalezená u pacienta P2 byla také v rozsahu několika Mbp a zahrnovala 38 genů (Obr. 31).



Obr. 30 Nalezená *de novo* delece (20,5 kbp) u pacienta P4 na chromozomu 14 v místě 14q32.33. Překrývající se gen *abParts*. Zeleně je vyznačen referenční chromozom, modře chromozom pacienta, čárky označují fluorescenční značky.

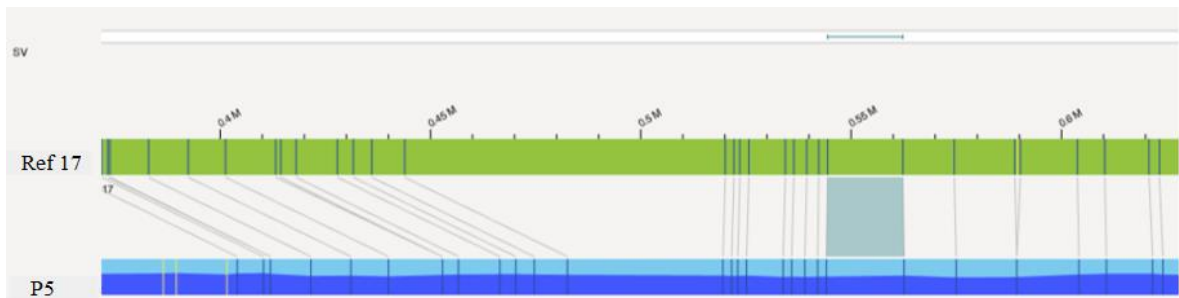


Obr. 31 Nalezená *de novo* duplikace (1,2 Mbp) u pacienta P2 na chromozomu 14 v místě 14q32.33. Překrývající se geny *DQ578550*, *DQ575296*, *DQ588545*, *JAG2*, *MIR6765*, *NUDT14*, *BRF1*, *BTBD6*, *PACS2*, *TEX22*, *MTA1*, *CRIP2*, *HV555659*, *CRIP1*, *C14orf80*, *TME*, *M121*, *abParts*, *BC033241*, *DQ596630*, *DQ596630*, *DKFZp686O16217*, *IGHE*, *MIR8071-1*, *AY748447*, *MIR8071-1*, *ELK2AP*, *Ig alpha 1-[alpha]2m*, *epsilon IgE*, *IGHG1*, *FLJ00385*, *DQ594820*, *MIR4507*, *KIAA0125*, *ADAM6*, *DQ578736*, *DQ593458*, *LINC00226*. Zeleně je vyznačen referenční chromozom, modře chromozom pacienta, čárky označují fluorescenční značky.

5.2.4.3 Chromozom 17

K nejčastějším změnám na chromozomu 17 u MM patří delece 17p13, kde se nachází tumor supresorový gen *TP53* nazývaný také strážce genomu (Lane 1992).

Při použití rutinních cytogenetických metod ani optického mapování nebyla u žádného pacienta nalezena delece *TP53* v oblasti 17p13. Při dalším studiu chromozomu 17 pomocí optického mapování byly nalezeny u všech pacientů nové SV na chromozomu 17, včetně dvou intrachromozomálních translokací (P1) a jedné interchromozomální translokace (P2), inzercí u čtyř pacientů (P2-P5) a delecí u dvou (P4-P5). Z nalezených *de novo* SV na chromozomu 17 byla v oblasti 17p13.3 detekována změna v podobě inzerce u pacienta P5 (Obr. 32). Klinický vliv této změny u pacientů s MM dosud nebyl v literatuře popsán, ale u pacientů s kolorektálním karcinomem (CRC) bylo zjištěno, že oblast 17p13.3 zahrnuje 22 genů, včetně pěti tumor supresorových genů (*HIC1*, *VPS53*, *RPA1*, *PFN1* a *MYBBP1A*; Qi a Ding, 2017).

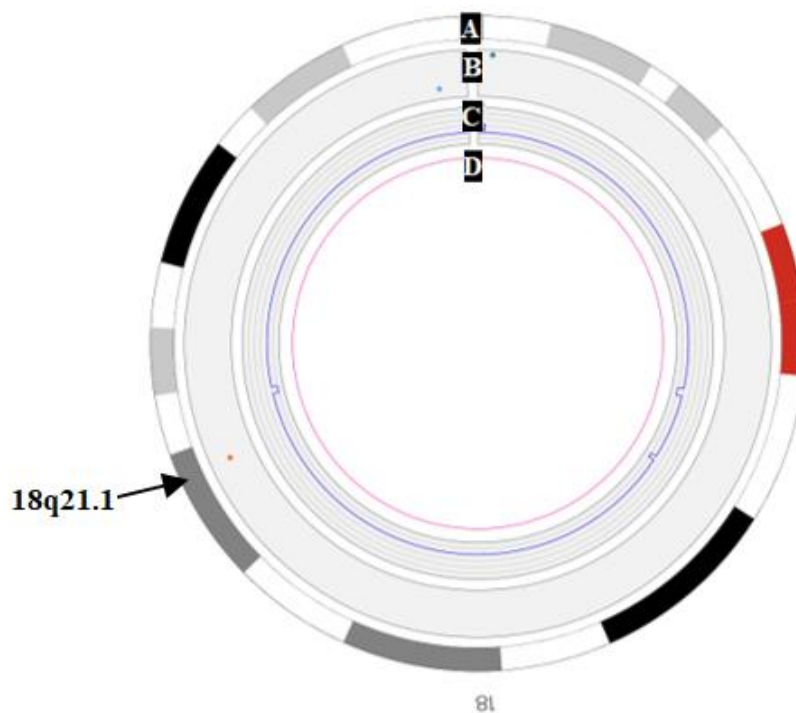


Obr. 32 Nově nalezená inzerce (589 bp) u pacienta P5 na chromozomu 17 v místě p13.3. Překrývající se gen *VPS53*. Zeleně je vyznačen referenční chromozom, modře chromozom pacienta, čárky označují fluorescenční značky.

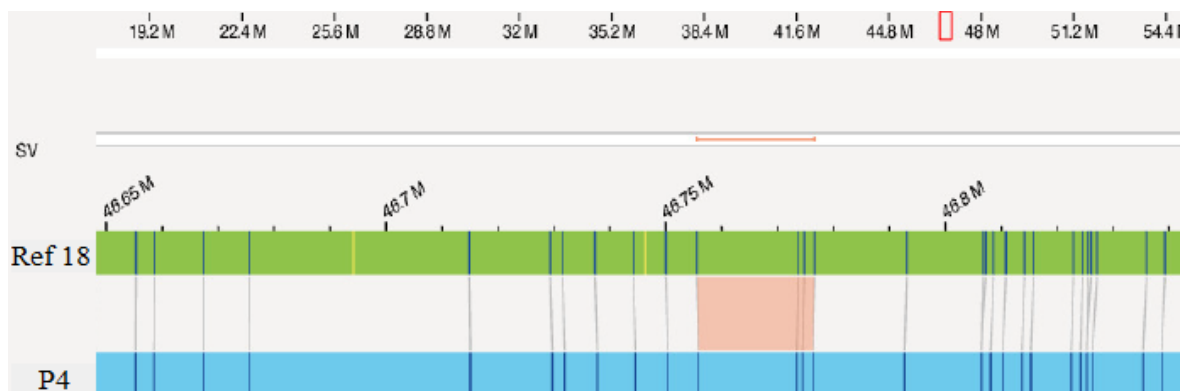
5.2.4.4 Chromozom 18

U chromozomu 18 bývá nejčastěji detekována trizomie další význam SV nalezených na 18. chromozomu u MM je předmětem dalších studií.

Pomocí optického mapování byla nalezena delece v oblasti 18q21.2 (P1; Obr. 33) o velikosti 2,1 kbp a delece v oblasti 18q21.1 (P4, 697 bp; Obr. 34) V oblasti 18q21 se nachází tumor supresorový gen *MBD1*. *MBD1* je transkripční represor a může negativně regulovat transkripční aktivitu promotoru RNA polymerázy II. Pomocí diagnostických testů u pacientů s kolorektálním karcinomem (CRC) bylo zjištěno, že delece 18q21 by mohla vést k abnormální aktivaci *MBD1* (Qi a Ding, 2017). Dřívější studie odhalily, že *MBD1* pravděpodobně přispívá k růstu nádorů také u karcinomu pankreatu (Xu *et al.*, 2013).



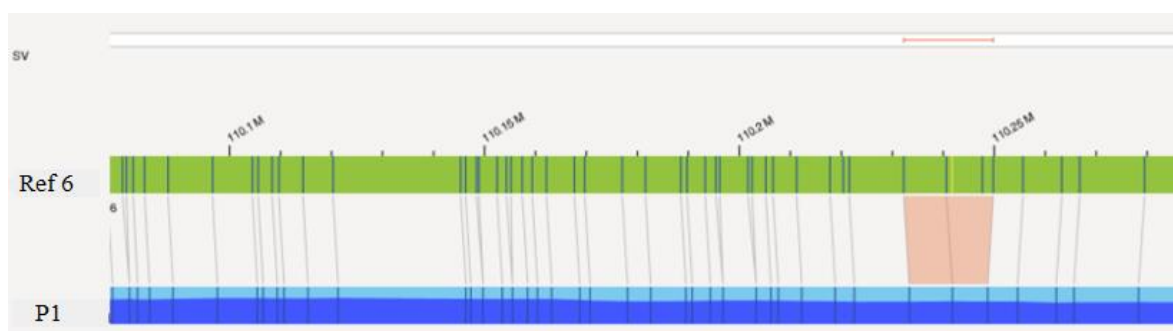
Obr. 33 Nalezená *de novo* delece (8,1 kbp) u pacienta P1 na chromozomu 18 v pozici q21.1 A – pozice na chromozomu, B – nalezené SV, C – počet kopií chromozomů, D – nalezené translokace. Zelené tečky označují nalezené inserce, oranžové delece, modré inverze, fialové duplikace a růžově jsou zobrazeny translokace.



Obr. 34 Nalezená *de novo* delece (697 kbp) u pacienta P4 na chromozomu 18 v místě 18q21.1. Překrývající se gen *T8SIA5*. Zeleně je vyznačen referenční chromozom, modře chromozom pacienta, čárky označují fluorescenční značky.

5.2.4.5 Chromozom 6

Metodou optického mapování byla u pacienta P1 nalezena delece v oblasti 6q21 (2,1 kbp; Obr. 35). Změny v této pozici jsou charakteristické pro lymfoidní malignity jako je chronická lymfocytární leukémie (CLL) nebo akutní lymfoblastická leukémie (ALL), ale u myeloidních onemocnění je tato delece vzácná. Molekulární mechanismus ani klinický význam této strukturní změny nebyl dosud zcela objasněn. V literatuře je oblast 6q21 spojována s výskytem řady tumor supresorových genů (*PRDMI*, *FOXO3A* a *HACE1*). Strukturní změny v této oblasti způsobují ztrátu jejich aktivity (Thelander *et al.*, 2008).



Obr. 35 Nalezená *de novo* delece (2,1 kbp) u pacienta P1 v místě 6q21. Překrývající se gen *METTL24*. Zeleně je vyznačen referenční chromozom, modře chromozom pacienta, čárky označují fluorescenční značky.

6 DISKUSE

Mnohočetný myelom se vyznačuje velkou variabilitou genetických změn přítomných v nádorových buňkách. V této práci jsme se zaměřili na využití nové metody optického mapování ke studiu strukturních variant u tohoto onemocnění. Technologie optického mapování umožňuje detekovat delece, inserce, duplikace, inverze a translokace celého genomu, které nejsou detekovatelné dostupnými laboratorními technikami.

V klinické praxi se pro detekci strukturních změn u MM využívají nejčastěji standardní cytogenetické metody karyotypování, *FISH* nebo arrayCGH. Mezi diagnosticky nejvýznamnější chromozomální aberace u MM patří translokace t(4;14) a t(14;16) nebo delece části krátkého ramene chromozomu 17 (Avet-Loiseau *et al.*, 2007, Tian *et al.*, 2015). Ukazuje se také, že výskyt strukturních mutací je u MM asociován s progresí a jejich detekce by mohla být významným predikčním markrem (Corre *et al.*, 2015; du Pont *et al.*, 2017). První studie prokázaly, že existuje celá řada dalších genetických změn, které se mohou na vývoji onemocnění podílet (Gupta *et al.*, 2015). Do současnosti však neexistovaly metody, jak tyto strukturní genetické změny prokázat a které by se díky své citlivosti mohly využívat v nádorové problematice. Nová technologie optického mapování představuje novou výzvu ke komplexní analýze variability lidského genomu.

V této diplomové práci jsme se proto zaměřili na využití této technologie ke zpřesnění genetické výbavy pacientů s MM. K sestavení optických map vizualizací vysokomolekulární DNA byly použity separované myelomové buňky z KD pacientů. Separace neoplastických plazmatických buněk je nezbytná pro specifickou detekci genetických změn u MM. Myelomové buňky jsou nejčastěji separovány pomocí antigenu CD138 (Nilsson *et al.*, 1994; Tai *et al.*, 2000; Shin *et al.*, 2012; Smetana *et al.*, 2014; Bolli *et al.*, 2018). V první části diplomové práce jsme optimalizovali metodu separace myelomových buněk a testovali komerční kity dvou firem: MACS a StemCell pomocí magnetické separace na kuličkách při vyšších infiltracích kostní dřene myelomovými buňkami (Shin *et al.*, 2012; Marques *et al.*, 2014). Při nižších infiltracích jsme testovali přímou separaci myelomových buněk pomocí průtokové cytometrie (FACS) a dvoukrokovou techniku s pozitivní selekcí myelomových buněk s následným využitím FACS. V souladu s literaturou jsme prokázali (Cumova *et al.*, 2010), že při vyšších infiltracích má magnetická separace vysoké výtěžky i požadovanou čistotu, u nižších infiltrací je nutné použít separace pomocí průtokového cytometru. U některých pacientů byla separace plazmatických buněk natolik obtížná z důvodu

velmi nízké infiltrace (< 1 %), že je nebylo možné použít pro optické mapování. U některých pacientů došlo ke skrytí znaku CD138 v průběhu separace, jak již bylo v literatuře popsáno (Matsui *et al.*, 2004). V těchto případech se doporučuje použít jiné znaky k detekci myelomových buněk (Flores-Montero *et al.*, 2016).

Po separaci myelomových buněk je nutné izolovat vysokomolekulární DNA. Izolace takové DNA vyžaduje uložení buněk do agarosových bločků a šetrnou izolaci přímo v agarose. Setkávali jsme s problémy vysoké viskozity a nehomogenity vzorků po rozpuštění agarosu. Tato DNA však nabízí možnost detekovat strukturní změny napříč celého genomu na jednotlivých vláknech DNA s vyšším rozlišením včetně automatické interpretace dat. S příchodem nového přístroje Saphyr s dokonalejším laserovým vybavením a lepší propustností nanokanáلكy čipu byla problematika vysoké viskozity vysokomolekulární DNA vyřešena. Dále bylo v naší studii použito fluorescenční značení pomocí zcela nové DLS chemie, které nevyžaduje štěpení vlákna DNA a následnou ligaci. Tato technika nahradila v minulém roce značení pomocí nikas (NLRS) a zvýšila kvalitu optických map díky vyšší denzitě fluorescenčních značek (Sadowski *et al.*, 2018).

Optické mapování bylo provedeno u pěti vzorků získaných u nově diagnostikovaných pacientů s MM. Výsledky optického mapování u všech vzorků potvrdily nalezené strukturní změny, které byly detekované pomocí standardních cytogenetických technik (karyotypování, *FISH*, arrayCGH). Podobně jako v publikovaných studiích výsledky optického mapování u myelomových pacientů našly velké množství dalších SV na všech chromozomech, ale u většiny z nich není dosud znám jejich klinický dopad (Gupta *et al.*, 2015; Jaratlerdsiri *et al.*, 2017; Xu *et al.*, 2019). Nejčastěji nalezenými změnami u studovaných pacientů byly delece. Delece byly dvakrát častější než inserce a další aberace a dle nálezů u jiných onkologických onemocnění se předpokládá, že delece pravděpodobně způsobují ztrátu funkčnosti tumor supresorových genů (Thelander *et al.*, 2008).

U analyzovaných vzorků byla nalezena velká heterogenita genetických změn. Mezi tyto změny patří především translokace, které jsou obecně spojovány s horší prognózou a vyskytují se u 30 % pacientů s MM nejčastěji na chromozomu 14 v oblasti IgH lokusu (Fonseca *et al.*, 2003b). Tato translokace nebyla detekována u žádného analyzovaného vzorku. U jednoho studovaného pacienta byly nalezeny Burkittovy translokace t(8;22)(q24;q11) a t(2;8)(p12q24), které způsobují expresi onkogenu *c-myc* u Burkittova lymfomu (Kim *et al.*, 2011). Další zajímavou translokací, která byla detekována optickým mapováním, byla

translokace t(3;6)(p12.2;q13.32), která se podílí na patogenezi karcinomu ledvinových buněk (Foster *et al.*, 2007). Další detekované translokace zahrnovaly chromozomy 12, 16, 17 a 18, které v literatuře u MM nejsou často zmiňovány (Fonseca *et al.*, 2003b).

Dále byly studovány nalezené změny na chromozomu 17, kde nejčastěji dochází u pacientů s MM k deleci tumor supresorového genu *TP53* (Chang *et al.*, 2005), který je považován za důležitý prognostický faktor progresu MM (Fonseca *et al.*, 2003b). Tato delece nebyla u námi studovaných pacientů detekována. V jednom případě byla v této oblasti nalezena inserce, jejíž klinický dopad v současnosti není znám.

U dvou námi studovaných pacientů byla detekována delece na chromozomu 18 v místě 18q21, kde se nachází tumor supresorový gen *MBD1*. U pacientů s CRC bylo zjištěno, že tato delece vede k abnormální aktivaci *MBD1* a přispívá také ke vzniku karcinomu pankreatu (Qi a Ding, 2017; Bader *et al.*, 2003). Další významnou změnou nalezenou pomocí optického mapování může být delece v oblasti 6q21, kde jsou lokalizovány tři tumor supresorové geny. Tato delece je charakteristická pro lymfoidní malignity jako je CLL nebo ALL, ale její klinický význam není dosud zcela objasněn (Thelander *et al.*, 2008). Také byla nalezena u jednoho z pacientů delece v oblasti 14q32, kde se nachází lokus IgH a nejčastější přestavbou jsou zde translokace (Rajan a Rajkumar, 2015). U jiného pacienta byla v lokusu IgH také nalezena rozsáhlá duplikace (1,2 Mbp). V této oblasti byla již duplikace popsána u pacienta s infantilní hyperkalcémií, což je jeden z hlavních klinických příznaků u pacientů s MM (Pallister *et al.*, 2011).

Předmětem dalšího studia bude ověření SV nalezených technikou optického mapování pomocí vhodně navržených sond a následná detekce metodou *FISH*. Další možností může být metoda celogenomového sekvenování (whole genome sequencing, WGS, technika cíleného NGS). Tato metoda umožňuje detekovat všechny typy SV a identifikovat nové změny ve srovnání s referenčním genomem. Další výhodou WGS je detekce SV i v nekódujících oblastech genomu, které mohou také ovlivňovat expresi genů spojených s MM (Hoang *et al.*, 2018). Nicméně velké množství získaných dat pomocí WGS klade vysoké nároky na jejich interpretaci a podobně jako další techniky NGS je WGS limitován délkou čtecího rámce, což snižuje citlivost pro detekci duplikací a velkých strukturních změn (Kwong *et al.*, 2015; Hastie *et al.*, 2018; Xu *et al.*, 2019).

Další možností získání detailní informace o strukturních změnách celého genomu je kombinace optického mapování s dalšími metodami. U pacientů s AML byla pro detekci SV

využita metoda optického mapování a WGS. Tato kombinace metod identifikovala v průměru desítky dříve nerozpoznatelných inverzí a duplikací a stovky inzercí a delecí. Ukazuje se, že kombinace metod WGS a optického mapování detekuje dvakrát více SV, než bylo zjištěno samotným WGS a že tato kombinace by mohla být vhodná k získání převážné většiny SV u nádorových onemocnění (Xu *et al.*, 2019).

Ačkoli se jedná o pilotní studii na malém souboru pacientů s MM, naše výsledky ukazují, že optické mapování je metoda, která dokáže detekovat velké strukturní změny, které běžně dostupné metody nejsou schopné identifikovat. Tyto nově nalezené strukturní změny by mohly přinést hlubší informace o příčinách progresu, rozdílné reakce na léčbu nebo přispět k pochopení tohoto závažného onemocnění.

Předmětem dalšího studia bude sledování vývoje pacientů v čase, jelikož se frekvence některých SV zvyšuje během progresu onemocnění a také rozšíření souboru pacientů o jedince nereagující na léčbu nebo pacienty s asymptomatickým stádiem MGUS a SMM, předcházejícím MM.

7 ZÁVĚR

Předkládaná diplomová práce sestávala ze dvou částí, teoretické a experimentální. V rámci teoretické části byla vypracována literární rešerše zaměřená na popis již známých chromozomových abnormalit u onemocnění mnohočetného myelomu. Současně byla v teoretické části popsána detekce strukturních změn pomocí nové metody optického mapování.

Experimentální část si kladla za cíl optimalizovat postup přípravy vysokomolekulární DNA pro potřeby optického mapování, včetně separace myelomových buněk kostní dřeně a fluorescenčního značení DNA. Následně byla izolovaná DNA pěti pacientů s MM vizualizována na optickém čipu pomocí přístroje Saphyr. Poté byly sestaveny genomové mapy a detekovány *de novo* strukturní změny porovnáním optických map pacientů s referenční mapou lidského genomu a kontrolní skupinou zdravých jedinců.

Výsledky optického mapování u všech pacientů potvrdily nalezené strukturní změny, které byly detekované pomocí standardních cytogenetických technik (karyotypování, *FISH*, arrayCGH). Kromě těchto změn byly u všech pacientů nalezeny další *de novo* strukturní abnormality, mezi které patřily delece, inserce, inverze, duplikace a translokace.

Z nalezených *de novo* strukturních změn byly vybrány a blíže popsány ty, které by mohly mít klinický dopad u pacientů s MM a již jsou popsány u jiných karcinomů. Mezi tyto změny patřily Burkittovi translokace $t(8;22)(q24;q11)$ a $t(2;8)(p12q24)$ a také translokace $t(3;6)(p12.2;q13.32)$, která se často objevuje u pacientů s karcinomem ledvinových buněk a může způsobovat rezistenci vůči léčivům. Pomocí optického mapování byla také detekována v oblasti 14q32 delece a rozsáhlá duplikace. Další nalezenou *de novo* strukturní změnou byla inserce v oblasti 17p13, kde se vyskytuje také tumor supresorový gen *TP53* nebo delece v oblasti 6q21, která se objevuje především u pacientů s lymfoidními malignitami.

V této diplomové práci bylo prokázáno, že je možné metodou optického mapování detekovat velké strukturní změny (> 1 kbp), které běžně dostupné metody nejsou schopné identifikovat. Tyto nově nalezené strukturní změny by mohly ovlivnit prognózu, odpověď na léčbu nebo přispět k objasnění patogeneze u pacientů s MM. Do budoucna se tedy nabízí možnost využití této nové technologie k detekci strukturních variant v klinické praxi.

8 LITERATURA

- Adam Z., Krejčí M., Vorlíček J. (2008): *Hematologie – přehled maligních hematologických nemocí*. 2nd ed., Grada, Česká republika.
- Amos-Landgraf J. M., Ji Y. G., Gottlieb W., Depinet T., Wandstrat A. E., Cassidy S. B., Driscoll D. J., Rogan P. K., Schwartz S., Nicholls R. D. (1999): Chromosome breakage in the Prader-Willi and Angelman syndromes involves recombination between large, transcribed repeats at proximal and distal breakpoints. *American Journal of human genetics* **65**, 370-386.
- An G., Xu Y., Shi L. H., Zhong S. Z., Deng S. H., Xie Z. Q., Sui W. W., Zhan F. H., Qui L. G. (2014): Chromosome 1q21 gains confer inferior outcomes in multiple myeloma treated with bortezomib but copy number variation and percentage of plasma cells involved have no additional prognostic value. *Haematologica* **99**, 353-359.
- Avet-Loiseau H., Facon T., Grosbois B., Magrangeas F., Rapp M. J., Harousseau J. L., Minvielle S., Bataille R. (2002): Oncogenesis of multiple myeloma: 14q32 and 13q chromosomal abnormalities are not randomly distributed, but correlate with natural history, immunological features, and clinical presentation. *Blood* **99**, 2185-2191.
- Avet-Loiseau H., Attal M., Moreau P., Charbonnel C., Garban F., Hulin C., Leyvraz S., Michallet M., Yakoub-Agha I., Garderet L., Marit G., Michaux L., Voillat L., Renaud M., Grosbois B., Guillemin G., Benboubker L., Monconduit M., Thieblemont C., Casassus P., Caillot D., Stoppa A. M., Sotto J., Wetterwald M., Dumontet C., Fuzibet J. G., Azais I., Dorvaux V., Zandecki M., Bataille R., Minvielle S., Harousseau J., Facon T., Mathio C. (2007): Genetic abnormalities and survival in multiple myeloma: the experience of the Intergroupe Francophone du Myélome. *Blood* **109**, 3489-3495.
- Avet-Loiseau H., Malard F., Campion L., Magrangeas F., Sebban C., Lioure B., Decaux O., Lamy T., Legros L., Fuzibet J. G., Michallet M., Corront B., Lenain P., Hulin C., Mathiot C., Attal M., Facon T., Harousseau J. L., Minvielle S., Moreau P. (2011): Translocation t(14;16) multiple myeloma: is it really an independent prognostic factor. *Blood* **117**, 2009-2011.
- Barseghyan H., Tang W., Wang R. T., Almalvez M., Segura E., Bramble M. S., Lipson A., Douine E. D., Lee H., Delot E. C., Nelson S. F., Vilain E. (2017): Next-generation mapping: a novel approach for detection of pathogenic structural variants with a potential utility in clinical diagnosis. *Genome medicine* **9**, <https://genomemedicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13073-017-0479-0>.
- Bionanogenomics: <https://bionanogenomics.com/technology/platform-technology> (30.11. 2018).
- Bionanogenomics: <https://bionanogenomics.com/wp-content/uploads/2018/04/30173-Data-Collection-Guidelines.pdf> (3.2. 2019).
- Bionanogenomics: <http://bionanogenomics.com/wp-content/uploads/2017/02/Bionano-Genomics-AGBT-2017-Curtain-Raiser-FINAL-2-7-16.pdf> (3.2. 2019).
- Bionanogenomics: <https://bionanogenomics.com/support-page/irys-instrument/> (10.2. 2019).
- Bionanogenomics: <https://bionanogenomics.com/products/saphyr/> (10.2. 2019).
- Bionanogenomics: <https://bionanogenomics.com/wp-content/uploads/2018/04/30206-Bionano-Prep-Direct-Label-and-Stain-DLS-Protocol.pdf> (17.2. 2019).
- Bionanogenomics: <https://bionanogenomics.com/products/bionano-chips/> (18.2. 2019).
- Bionanogenomics: <https://bionanogenomics.com/wp-content/uploads/2018/04/30223-Saphyr-Molecule-Quality-Report-Guidelines.pdf> (23.2. 2019).
- Bionanogenomics: <https://bionanogenomics.com/technology/structural-variation> (25.2. 2019).
- Bionanogenomics: <https://bionanogenomics.com/bionano-university/articles/thousands-svs-genes> (25.2. 2019).
- Bionanogenomics: <https://bionanogenomics.com/wp-content/uploads/2018/04/30073-Bionano-Solve-Theory-of-Operation-Hybrid-Scaffold.pdf> (2.3. 2019).
- Bionanogenomics: <https://bionanogenomics.com/wp-content/uploads/2018/04/30142-Bionano-Access-Software-User-Guide.pdf> (20.3. 2019).

- Bolli N., Biacon G., Moarii M., Gimondi S., Li Y. L., de Philippis C., Maura F., Sathiseelan V., Tai Y. T., Mudie L., O'Meara S., Raine K., Teague J. W., Butler A. P., Carniti C., Gerstung M., Bagranuti T., Kastritis E., Dimopoulos M., Corradini P., Andreson K. C., Moreau P., Mincielle S., Campbell P. J., Papaemmanuil E., Avet-Loiseau H., Munshi N. C. (2018): Analysis of the genomic landscape of multiple myeloma highlights novel prognostic markers and disease subgroups. *Leukemia* **32**, 2604-2616.
- Boyd K. D., Ross F. M., Walker B. A., Wardell C. P., Tapper W. J., Chicchio L., Dagrada G., Konn Z. J., Gregory W. M., Jackson G. H., Child J. A., Davies F. E., Morgan G. J. (2011): Mapping of chromosome 1p deletions in myeloma identifies *FAM46C* at 1p12 and *CDKN2C* at 1p32.3 as being genes in regions associated with adverse survival. *Clinical cancer research* **17**, 7776-7784.
- Corre J., Munshi N., Avet-Loiseau H. (2015): Genetic of multiple myeloma: another heterogeneity level. *Blood* **125**, 1870-1876.
- Cumova J., Kovarova L., Potacova A., Buresova I., Kryukov F., Penka M., Michalek J., Hajek R. (2010): Optimization of immunomagnetic selection of myeloma cells from bone marrow using magnetic activated cell sorting. *International journal of hematology* **92**, 314-319.
- Dai Y., Li P., Wang Z., Liang F., Yang F., Fang L., Huang Y., Huang S., Zhou J., Wang D., Cui L., Wang K. (2018): Single-molecule optical mapping enables accurate molecular diagnosis of facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD). *Biorxiv*, <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/286104v1>.
- Das S. K., Austin M. D., Akan M. C., Deshpande P., Cao H., Xiao M. (2010): Single molecule line analysis of DNA in nano-channel labeled with sequence specific fluorescent probes. *Nucleic acids research* **38**, <https://academic.oup.com/nar/article/38/18/e177/1069400>.
- Debes-Marun C. S., Dewals G. W., Bryant S., Picken E., Santana-Davila R., Gonzales-Paz N., Winkler J. M., Kyle R. A., Gertz M. A., Witzig T. E., Dispenzieri A., Lacy M. Q., Rajkumar S. V., Lust J. A., Greipp P. R., Fonseca R. (2003): Chromosome abnormalities clustering and its implications for pathogenesis and prognosis in myeloma. *Leukemia* **17**, 427-436.
- Deng L., Ding W. H., Granstein R. D. (2003): Thalidomide inhibits tumor necrosis factor-alpha production and antigen presentation by Langerhans cells. *Journal of investigative dermatology* **121**, 1060-1065.
- Diseases conditions: <https://diseasesandconditions.net/multiple-myeloma/> (7.10. 2018).
- Du C., Mark D., Wappenschmidt B., Bockmann B., Pabst B., Chan S., Cao H., Morlot S., Scholz C., Auber B., Rhiem K., Schmutzler R., Illig T., Schlegelberger B., Steinemann D. (2018): A tandem duplication of *BRCA1* exons 1-19 through *DHX8* exon 2 in four families with hereditary breast and ovarion cancer syndrome. *Breast cancer research and treatment* **172**, 561-569.
- du Pont S. R., Cleyne A., Fontan C., Attal M., Munshi N., Corre J., Avet-Loiseau H. (2017): Genomics of multiple myeloma. *Journal of clinical oncology* **35**, 963-967.
- Flores-Montero J., de Tute R., Paiva B., Perez J. J., Bottcher S., Wind H., Sanoja L., Puig N., Lecomte Q., Vidriales M. B., van Drogen J. J. M., Orfao A. (2016): Immunophenotype of normal vs. myeloma plasma cells: toward antibody panel specifications for MRD detection in multiple myeloma. *Clinical cytometry* **90**, 61-72.
- Fonseca R., Harrington D., Oken M. M., Dewald G. W., Bailey R. J., Van Wier S. A., Henderson K. J., Blood E. A., Rajkumar S. V., Kay N. E., Van Ness B., Greipp P. R. (2002): Biological prognostic significance of interphase fluorescence *in situ* hybridization detection of chromosome 13 abnormalities ($\Delta 13$) in multiple myeloma: An eastern cooperative oncology group study. *Cancer research* **62**, 715-720.
- Fonseca R., Debes-Marun C. S., Picken E. B., Dewald G. W., Bryant S. C., Wikler J. M., Blood E., Oken M. M., Santana-Davila R., Gonzales-Paz N., Kyle R. A., Gertz M. A., Dispenzieri A., Lacy M. Q., Greipp P. R. (2003a): The recurrent IgH translocations are highly associated with nonhyperdiploid variant multiple myeloma. *Blood* **102**, 2562-2567.
- Fonseca R., Blood E., Rue M., Harrington D., Oken M. M., Kyle R. A., Dewald G. W., Van Ness B., Van Wier S. A., Henderson K. J., Bailey R. J., Greipp P. R. (2003b): Clinical and biologic implications of recurrent genomic aberrations in myeloma. *Blood* **101**, 4569-4575.

- Fonseca R., Van Wier S. A., Chang W. J., Ketterling R., Lacy M. Q., Dispenzieri A., Bergsagel P. L., Rajkumar S. V., Greipp P. R., Litzow M. R., Price-Troska T., Henderson K. J., Ahmann G. H., Gertz M. A. (2006): Prognostic value of chromosome 1q21 gain by fluorescent *in situ* hybridization and increase *CKS1B* expression in myeloma. *Leukemia* **20**, 2034-2040.
- Foster R. E., Abdulrahman M., Morris M. R., Prigmore E., Gribble S., Ng B., Gentle D., Ready S., Weston P. M. T., Wiesener M. S., Kishida T., Yao M., Davison V., Barbero J. L., Chu C., Carter N. P., Latif F., Maher E. R. (2007): Characterization of a 3;6 translocation associated with renal cell carcinoma. *Genes chromosomes & cancer* **46**, 311-317.
- Gatler S. M. (2006): The chromosome number in humans: a brief history. *Nature reviews genetics* **7**, 655-660.
- Gupta A., Place M., Goldstein S., Sarkar D., Zhou S. G., Potamouisis K., Kim J., Flanagan C., Li Y., Newton M. A., Callander N. S., Hematti P., Bresnick E. H., Ma J., Asimakopoulos F., Schwartz D. C. (2015): Single-molecule analysis reveals widespread structural variation in multiple myeloma. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America* **111**, 7689-7694.
- Gutierrez N. C., Garcia J. L., Hernandez J. M., Lumbreras E., Castellanos M., Rasillo A., Mateo G., Perez S., Orfao A., San Miguel J. F. (2004): Prognostic and biologic significance of chromosomal imbalances assessed by comparative genomic hybridization in multiple myeloma. *Blood* **104**, 2661-2666.
- Gutierrez N. C., Castellanos M. V., Martin M. L., Mateos M. V., Hernandez J. M., Fernandez M., Carrera D., Rosinol L., Ribera J. M., Ojanguren J. M., Palomera L., Gardella S., Escoda L., Hernandez-Boluda J. C., Bello J. L., de la Rubia J., Lahuerta J. J., San Miguel J. F. (2007): Prognostic and biological implications of genetic abnormalities in multiple myeloma undergoing autologous stem cell transplantation: t(4;14) is not most relevant adverse prognostic factor, whereas RB deletion as a unique abnormality is not associated with adverse prognosis. *Leukemia* **21**, 143-150.
- Hanamura I., Lida S., Akano Y., Hayami Y., Kato M., Miura K., Harada S., Banno S., Wakita A., Kiyoi H., Naoe T., Shimizu S., Sonta S., Nitta M., Taniwaki M., Ueda R. (2001): Ectopic expression of *MAFB* gene in human myeloma cells carrying (14;20)(q32;q11) chromosomal translocations. *Japanese journal of cancer research* **92**, 638-644.
- Hastie A. R., Lam E. T., Pang A. W. C., Zhang X., Andrews W., Lee J., Liang T. Y., Wang J., Zhou X., Zhu Z., Anantharaman T., Džakula Ž., Bocklandt S., Surti U., Saghbini M., Austin M. D., Borodkin M., Holmlin E., Cao H. (2017): Rapid automated large structural variation detection in a diploid genome by NanoChannel based next-generation mapping. *Biorxiv*, <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/102764v2>.
- Hastie A., Pang A. W. C., Lee J., Lam E. T., Zhang X., Anantharaman T., Andrews W., Sadowski H., Borodkin M., Cao H. (2018): Broad range chromosomal abnormality detection through bio-nano genome mapping. Poster z conference Bionanogenomics, <https://bionanogenomics.com/wp-content/uploads/2018/02/AGBT-2018-Alex-Hastie.pdf>.
- Herrero A. B., Rojas E. A., Misiewicz-Krzeminska I., Krzeminski P., Gutierrez N. C. (2003): Molecular mechanisms of p53 deregulation in cancer: an overview in multiple myeloma. *International journal of molecular sciences* **17**, <https://www.mdpi.com/1422-0067/17/12/2003/htm>.
- Hideshima T., Bergsagel P. L., Kuehl W. M., Anderson K. C. (2004): Advances in biology of multiple myeloma: clinical applications. *Blood* **104**, 607-618.
- Hoang P. H., Dobbins S. E., Cornish A. J., Law P. J., Kaiser M., Houlston R. S. (2018): Whole-genome sequencing of multiple myeloma reveals oncogenic pathways are targeted somatically through multiple mechanisms. *Leukemia* **32**, 2459-2470.
- Hodne K., Weltzien F. A. (2015): Single-cell isolation and gene analysis: pitfalls and possibilities. *International journal of molecular sciences* **16**, 26832-26849.
- Chan S., Lam E., Saghbini M., Bocklandt S., Hastie A., Cao H., Holmlin E., Borodkin M. (2018): Structural variation detection and analysis using Bionano optical mapping. In: *Copy number variants*. Humana press inc, USA, 193-203.

- Chang H., Sloan S., Li D., Zhuang L. H., Yi Q. L., Chen C. I., Reece D., Chun K., Stewart A. K. (2004): The t(4;14) is associated with poor prognosis in myeloma patients undergoing autologous stem cell transplant. *British journal of haematology* **125**, 64-68.
- Chang H., Qi C., Yi Q. L., Reece D., Stewart A. K. (2005): p53 gene deletion detected by fluorescence *in situ* hybridization is an adverse prognostic factor for patients with multiple myeloma following autologous stem cell transplantation. *Blood* **105**, 358-360.
- Chan E. K. F., Cameron D. L., Petersen D. C., Lyons R. J., Baldi B. F., Papenfuss A. T., Thomas D. M., Hayes V. M. (2018): Optical mapping reveals a higher level of genomic architecture of chained fusions in cancer. *Genome research* **28**, 726-738.
- Chapman M. A., Lawrence M. S., Keats J. J., Cibulskis K., Sougnez C., Schinzel A. C., Harview C. L., Brunet J. P., Ahmann G. J., Adli M., Anderson K. C., Ardlie K. G., Auclair D., Baker A., Bergsagel P. L., Bernstein B. E., Drier Y., Fonseca R., Gabriel S. B., Hofmeister C. C., Jagannath S., Jakubowiak A. J., Krishnan A., Levy J., Liefeld T., Lonial S., Mahan S., Mfuko B., Monti S., Perkins L. M., Onofrio R., Pugh T. J., Rajkumar S. V., Ramos A. H., Siegel D. S., Sivachenko A., Stewart A. K., Trudel S., Vij R., Voet D., Winckler W., Zimmerman T., Carpten J., Trent J., Hahn W. C., Garraway L. A., Meyerson M., Lander E. S., Getz S., Golub T. R. (2011): Initial genome sequencing and analysis of multiple myeloma. *Nature* **471**, 467-472.
- Chawla S. S., Kumar S. K., Dispenzieri A., Greenberg A. J., Larson D. R., Kyle R. A., Lacy M. Q., Gertz M. A., Rajkumar S. V. (2015): Clinical course and prognosis of non-secretory multiple myeloma. *European journal of haematology* **95**, 57-64.
- Chesi M., Bergsagel P. L., Shonukan O. O., Martelli M. L., Brents L. A., Chen T., Schrock E., Ried T., Kuehl V. M. (1998): Frequent dysregulation of the *c-maf* proto-oncogene at 16q23 by translocation to an Ig locus in multiple myeloma. *Blood* **91**, 4457-4463.
- Chesi M., Brents L. A., Fly S. A., Bais C., Robbiani D. F., Mesri E., Kuehl W. M., Bergsagel P. L. (2001): Activated fibroblast growth factor receptor 3 is an oncogene that contributes to tumor progression in multiple myeloma. *Blood* **97**, 729-736.
- Chiechio L., Protheroe R. K. M., Ibrahim A. H., Cheung K. L., Rudduck C., Dagrada G. P., Cabanas E. D., Parker T., Nightingale M., Wechalekar A., Orchard K. H., Harrison C. J., Cross N. C. P., Morgan G. J., Ross F. M. (2006): Deletion of chromosome 13 detected by conventional cytogenetics is a critical prognostic factor in myeloma. *Leukemia* **20**, 1610-1617.
- Jaratlerdsiri W., Chan E. K. F., Petersen D. C., Yang C., Croucher P. I., Bornman M. S. R., Sheth P., Hayes V. M. (2017): Next generation mapping reveals novel large genomic rearrangements in prostate cancer. *Oncotarget* **8**, 23588-23602.
- Jo K., Dhingra D. M., Odijk T., de Pablo J. J., Graham M. D., Runnheim R., Forrest D., Schwartz D. C. (2007): A single-molecule barcoding system using nanoslits for DNA analysis. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America* **104**, 2673-2678.
- Jurado L. A. P., Wang Y. K., Peoples R., Coloma A., Cruces J., Francke U. (1998): A duplicated gene in the breakpoint regions of the 7q11.23 Williams-Beuren syndrome deletion encodes the initiator binding protein TFII-I and BAP-135, a phosphorylation target of BTK. *Human molecular genetics* **7**, 325-334.
- Karampetsou E., Morrogh D., Chitty L. (2014): Microarray technology for diagnosis of fetal chromosomal aberrations: which platform should we use. *Journal of clinical medicine* **3**, 663-678.
- Kastritis E., Katodritou E., Pouli A., Hatzimichael E., Delimpasi S., Michalis E., Zomas A., Kastasis Z., Parcharidou A., Gika D., Repousis P., Stefanoudaki E., Symeonidis A., Panayioditis P., Konstatopoulos K., Terpos E., Dimopoulos M. A. (2011): Frequency and prognostic significance of hypercalcemia in patients with multiple myeloma: an analysis of the database of the Greek myeloma study group. *Blood* **118**, <http://www.bloodjournal.org/content/118/21/5083>.
- Keats J. J., Reiman T., Maxwell C. A., Taylor B. J., Larratt L. M., Mant M. J., Belch A. R., Pilarski L. M. (2003): In multiple myeloma, t(4;14)(p16;q32) is an adverse prognostic factor irrespective of *FGFR3* expression. *Blood* **101**, 1520-1529.
- Kidd J. M., Cooper G. M., Donahue W. F., Hayden H. S., Sampas N., Graves T., Hansen N., Teague B., Alkan C., Antonacci F., Haugen E., Zerr T., Yamada N. A., Tsang P., Newman T. L., Tuzun

- E., Cheng Z., Ebling H. M., Tusneem N., David R., Gillett W., Phelps K. A., Weaver M., Saranga D., Brand A., Tao W., Gustafson E., McKernan K., Chen L., Malig M., Smith J. D., Korn J. M., McCarroll S. A., Altshuler D. A., Peiffer D. A., Dorschner M., Stamatoypoulos J., Schwartz D., Nickerson D. A., Mullikin J. C., Wilson R. K., Bruhn L., Olson M. V., Kaul R., Smith D. R., Eichler E. E. (2008): Mapping and sequencing of structural variation from eight human genomes. *Nature* **453**, 56-64.
- Kim H., Moon H. W., Yun Y. M., Park C. M., Lee M. H. (2011): Variant Burkitt-type translocation (8;22)(q24;q11) in plasma cell myeloma. *The Korean journal of hematology* **46**, 135-138.
- Kishimoto R. K., Vaughan Vulcani de Freitas S. L., Ratis C. A., Borri D., Sitnik R., Rodrigues Pereira Velloso E. D. (2016): Validation of interphase fluorescence *in situ* hybridization (iFISH) for multiple myeloma using CD138 positive cells. *Brazilian Journal of hematology and hemotherapy* **38**, 113-120.
- Knudsen L. M., Hippe E., Hjorth M., Holmberg E., Westin J. (1994): Renal function in newly diagnosed multiple myeloma – a demographic study of 1353 patients. *European journal of hematology* **53**, 207-212.
- Kuglík P., Vallová V., Filková H. (2008): Metody klasické a molekulární cytogenetiky v diagnostice mnohočetného myelomu. *Klinická onkologie* **21**, 187-189.
- Kyle R. A., Therneau T. M., Rajkumar S. V., Offord J. R., Larson D. R., Plevak M. F., Melton L. (2002): A long-term study of prognosis in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *New England journal of medicine* **346**, 564-569.
- Kyle R. A., Child J. A., Anderson K., Barlogie B., Bataille R., Bensinger W., Blade J., Boccadoro M., Dalton W., Dimopoulos M., Djulbegovic B., Drayson M., Durie B., Facon T., Fonseca R., Gahrton G., Greipp P., Harousseau J. L., Harrington D., Hussein M., Joshua D., Ludwig H., Morgan G., Oken M., Powles R., Richardson P., Roodman D., San Miguel J., Shimizu K., Shustik C., Sirohi B., Sonneveld P., Tricot G., Turesson I., Van Ness B., Vesole D., Weber D., Westin J., Wheatley K. (2003a): Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the international myeloma working group. *British journal of haematology* **121**, 749-757.
- Kyle R. A., Gertz M. A., Witzig T. E., Lust J. A., Lacy M. Q., Dispenzieri A., Fonseca R., Rajkumar S. V., Offord J. R., Larson D. R., Plevak M. E., Therneau T. M., Greipp P. R. (2003b): Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Mayo clinic proceedings* **78**, 21-33.
- Kyle R. A., Remstein E. D., Therneau T. M., Dispenzieri A., Kurtin P. J., Hodnefield J. M., Larson D. R., Plevak M. F., Jelinek D. F., Fonseca R., Melton L. J. I., Rajkumar S. V. (2007): Clinical course and prognosis of smoldering (asymptomatic) multiple myeloma. *New England journal of medicine* **356**, 2582-2590.
- Kwong J. C., McCallum N., Sintchenko V., Howden B. P. (2015): Whole genome sequencing in clinical and public health microbiology. *Pathology* **47**, 199-210.
- Lam E. T., Hastie A., Lin C., Ehrlich D., Das S. K., Austin M. D., Deshpande P., Cao H., Nagarajan N., Xiao M., Kwok P. Y. (2012): Genome mapping on nanochannel arrays for structural variation analysis and sequence assembly. *Nature biotechnology* **30**, 771-776.
- Landgren O., Gridley G., Turesson I., Caporaso N. E., Goldin L. R., Baris D., Fears T. R., Hoover R. N., Linet M. S. (2006): Risk of monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and subsequent multiple myeloma among African American and white veterans in the United States. *Blood* **107**, 904-906.
- Lane D. P. (1992): Cancer – p53, guardian of the genome. *Nature* **358**, 15-16.
- Malúšková D., Svobodová I., Kučerová M., Brožová L., Mužík J., Jarkovský J., Hájek R., Maisnar V., Dušek L. (2017): Epidemiology of Multiple Myeloma in the Czech Republic. *Klinická onkologie* **30**, 35-42.
- Marques G., Silva Z., Videira P. (2014): *Establishing a cell biology platform: isolation and Preservation of human blood products*. 1st ed., Lambert academic publishing, Německo, 120 stran.

- Matsui W., Huff C. A., Wang Q. J., Malehorn M. T., Barber J., Tanhehco Y., Smith B. D., Civin C. I., Joner R. J. (2004): Characterization of clonogenic multiple myeloma cells. *Blood* **103**, 2332-2336.
- Muller V., Westerlund F. (2017): Optical DNA mapping in nanofluid devices: principles and applications. *Lab on chip* **17**, 579-590.
- Moreau P., Facon T., Leleu X., Morineau N., Huyghe P., Harousseau J. L., Bataille R., Avet-Loiseau H. (2002): Recurrent 14q32 translocation determine the prognosis of multiple myeloma, especially in patients receiving intensive chemotherapy. *Blood* **100**, 1579-1583.
- Mostovoy Y., Levy-Sakin M., Lam J., Lam E. T., Hastie A. R., Marks P., Lee J., Chu C., Lin C., Dzakula Z., Cao H., Schlebusch S. A., Giorda K., Schnall-Levin M., Wall J. D., Kwok P. Y. (2016): A hybrid approach for *de novo* human genome sequence assembly and phasing. *Nature methods* **13**, 587-590.
- Myeloma reveals: <https://www.myelomarevealed.com/multiple-myeloma-definition-and-statistics/> (14.1. 2019).
- Nifoussi S. K., Ratcliffe N. R., Ornstein D. L., Kasof G., Strack S., Craig R. W. (2014): Inhibition of protein phosphatase 2A (PP2A) prevents Mcl-1 protein dephosphorylation at the Thr-163/Ser-159 phosphodegron, dramatically reducing expression in Mcl-1 amplified lymphoma cells. *Journal of biological chemistry* **289**, 21950-21959.
- Nilsson P., Mehle C., Remes K., Roos G. (1994): Telomerase activity in-vivo in human malignant hematopoietic cells. *Oncogene* **19**, 3043-3048.
- Nilsson A. N., Emilsson G., Nyberg L. K., Noble C., Stadler L. S., Fritzsche J., Moore E. R. B., Tegenfeldt J. O., Ambjornsson T., Westerlund F. (2014): Competitive binding-based optical DNA mapping for fast identification of bacteria – multi-ligand transfer matrix theory and experimental applications on *Escherichia coli*. *Nucleic acids research* **42**, <https://academic.oup.com/nar/article/42/15/e118/2434514>.
- O'Connor C. (2008): Karyotyping for chromosomal abnormalities. *Nature education* **1**, <https://www.nature.com/scitable/topicpage/karyotyping-for-chromosomal-abnormalities-298>.
- Pallister P. D., Pallister A. B., South S., Toydemir R., Johnson J. P., Beischel L., Opitz J. M. (2011): A deletion 13q34/duplication 14q32.2-14q32.33 syndrome diagnosed 50 years after neonatal presentation as infantile hypercalcemia. *American journal of medical genetics part a* **155A**, 833-839.
- Palombella V. J., Rando O. J., Goldberg A. L., Maniatis T. (1994): The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF-kappa-B1 precursor protein and the activation of NF-kappa-B. *Cell* **78**, 773-785.
- Pang A. W. C., Sugeran K., Lee J., Austin M., Saghbini M., Hastie A., Cao H., Borodkin M., Papoutsoglou G. (2017): Efficient structural variation analysis and annotation using Bionano's next-generation mapping (NGM). Poster z conference BionanoGenomics, https://bionanogenomics.com/wp-content/uploads/2017/07/Pang_poster_ESHG_2017.pdf.
- Pendelton M., Sebra R., Pang A. W. C., Ummat A., Franzen O., Rausch T., Stutz A. M., Stedman W., Anantharaman T., Hastie A., Dai H., Fritz M. H. Y., Cao H., Cohainl A., Deikusl G., Durrett R. E., Blanchard S. C., Altman R., Chin C. S., Guo Y., Paxinos E. E., Korbe J. O., Darnell R. B., McCombiemii W. R., Kwok P. Y., Mason C. E., Schadt E. E., Bashirl A. (2015): Assembly and diploid architecture of an individual human genome via single-molecule technologies. *Nature methods* **12**, 780-786.
- Ponnuraj K. T. (2011): Cytogenetic techniques in diagnosing genetic disorders. In: *Advances in the study of genetic disorders*. 1st ed. (Ikehara K.), Intech, London, United Kingdom, 45-64.
- Puig N., Sarasquete M. E., Balanzategui A., Martinez J., Paiva B., Garcia H., Fumero S., Jimenez C., Alcoceba M., Chillon M. C., Sebastian E., Marin L., Montalban M. A., Mateos M. V., Oriol A., Palomera L., de la Rubia J., Vidriales M. B., Blade J., Lahuerta J. J., Gonzales M., Miguel J. F. S., Garcia-Sanz R. (2014): Critical evaluation of ASO RQ-PCR for minimal residual disease evaluation in multiple myeloma. A comparative analysis with flow cytometry. *Leukemia* **28**, 391-397.

- Qi L., Ding Y. Q. (2017): Screening of tumor suppressor genes in metastatic colorectal cancer. *Biomed research international* **2017**, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5394352/pdf/BMRI2017-2769140.pdf>.
- Rajan A. M., Rajkumar S. V. (2015): Interpretation of cytogenetic results in multiple myeloma for clinical practise. *Blood cancer journal* **5**, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4635200/pdf/bcj201592a.pdf>.
- Rajkumar S.V., Dispenzieri A., Fonseca R., Lacy M. Q., Geyer S., Lust J. A., Kyle R. A., Greipp P. R., Gertz M. A., Witzig T. E. (2001): Thalidomide for previously untreated indolent or smoldering multiple myeloma. *Leukemia* **15**, 1274-1276.
- Rajkumar S. V. (2016): Multiple myeloma: 2016 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *American journal of hematology* **91**, 720-734.
- Ronney D. E. (2001): *Human cytogenetics: constitutional analysis*. 3rd ed., Oxford univerzity, United Kingdom, 282 stran.
- Ross F. M., Chiecchio L., Dagrada G., Protheroe R. K. M., Stockley D. M., Harrison C. J., Cross N. C. P., Szubert A. J., Drayson M. T., Morgan G. J. (2010): The t(14;20) is a poor prognostic factor in myeloma but is associated with long-term stable disease in monoclonal gammopathies of undetermined significance. *Haematologica-the hematology journal* **95**, 1221-1225.
- Sadowski H. B., Zhou Z., Files A., Proskow C., Zhang Y., Saghbini M., Hastie A., Pljevaljcic G., Lam E., Wang J., Zhang L., Cao H., Borodkin M. (2018): Labeling human DNA with Bionano's direct labeling enzyme avoids nickase based double stranded breaks and allows for chromosome-arm length assemblies. Poster z konferencie BionanoGenomics, <https://bionanogenomics.com/wp-content/uploads/2018/02/AGBT-2018-Amy-Files.pdf>.
- Saxe D., Seo E. J., Bergeron M. B., Han J. Y. (2019): Recent advances in cytogenetic characterization of multiple myeloma. *International journal of laboratory hematology* **41**, 5-14.
- Shah G. L., Landau H., Londono D., Devlin S. M., Kosuri S., Lesokhin A. M., Lendvai N., Hassoun H., Chung D. J., Koehne G., Jhanwar S. C., Landgren O., Levine R., Giral S. A. (2017): Gain of chromosome 1q portends worse prognosis in multiple myeloma despite novel agent based induction regimens and autologous transplantation. *Leukemia & lymphoma* **58**, 1823-1831.
- Schwartz D. C., Li X. J., Hernandez L. I., Ramnarain S. P., Huff E. J., Wang Y. K. (1993): Ordered restriction maps of *Saccharomyces cerevisiae* chromosomes constructed by optical mapping. *Science* **262**, 110-114.
- Shin S. Y., Jang S., Park C. J., Chi H. S., Lee J. H., Lee K. H., Suh C., Lim S. E., Seo E. J. (2012): Application of an immune-magnetic cell sorting method for CD138 positive plasma cell in *FISH* analysis of multiple myeloma. *International journal of laboratory hematology* **34**, 541-546.
- Smadja N. V., Bastard C., Brigaudeau C., Leroux D., Fruchart C. (2001): Hypodiploidy is a major prognostic factor in multiple myeloma. *Blood* **98**, 2229-2238.
- Smadja N. V., Leroux D., Soulier J., Dumont S., Arnould C., Taviaux S., Taillemite J. L., Bastard C. (2003): Further cytogenetic characterization of multiple myeloma confirms that 14q32 translocations are a very rare event in hyperdiploid cases. *Genes chromosomes & cancer* **38**, 234-239.
- Smetana J., Frohlich J., Zaoralova R., Vallova V., Greslikova H., Kupska R., Nemecek P., Mikulasova A., Almasi M., Pour L., Sandecka V., Zahradova L., Hajek R., Kuglik P. (2014): Genome wide screening of cytogenetic abnormalities in multiple myeloma patients using arrayCGH technique: a Czech multicenter experience. *Biomed research international* **2014**, https://www.researchgate.net/publication/263710905_Genome-Wide_Screening_of_Cytogenetic_Abnormalities_in_Multiple_Myeloma_Patients_Using_ArrayCGH_Tecnique_A_Czech_Multicenter_Experience.
- Sonneveld P., Einsele H., Brioli A. M., Cavo M. (2018): Treatment of transplant eligible patients with multiple myeloma. In: *Multiple Myeloma and Other Plasma Cell Neoplasms*. 1st. ed. (Dimopoulos M. A., Facon T., Terpos E.), Springer, The United States of America, 29-60.
- Tai Y. T., Teoh G., Shima Y., Chauhan D., Treon S. P., Raje N., Hideshima T., Davies F. E., Anderson K. C. (2000): Isolation and characterization of human multiple myeloma cell enriched population. *Journal of immunological methods* **123**, 11-19.

- Thelander E. F., Ichimura K., Corcoran M., Barbany G., Nordgren A., Heyman M., Berglund M., Mungall A., Rosenquist R., Collins V. P., Grander D., Larsson C., Lagercrantz S. (2008): Characterization of 6q deletions in mature B cell lymphomas and childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia & Lymphoma* **49**, 477-487.
- Tian E. M., Epstein J., Qu P. P., Heuck C., van Rhee F., Zangari M., Hoering A., Sawyer J., Barlogie B., Morgan G. J. (2015): Deletion of *TP53* (17p13) is associated with poor outcome newly diagnosed high-risk multiply myeloma. *Blood* **126**, <http://www.bloodjournal.org/content/126/23/2982>.
- Walker B. A., Leone P. E., Jenner M. W., Li Ch., Gonzales D., Johnson D. C., Ross F. M., Davies F. E., Morgan G. J. (2006): Integration of global SNP-based mapping and expression arrays reveals key regions, mechanism, and genes important in the pathogenesis of multiple myeloma. *Blood* **108**, 1733-1743.
- Walker B. A., Leone P. E., Chiecchio L., Dickens N. J., Jenner M. W., Boyd K. D., Johnson D. C., Gonzales D., Dagrada G. P., Protheroe R. K. M., Konn Z. J., Stockley D. M., Gregory W. M., Davies F. E., Ross F. M., Morgan G. J. (2010): A compendium of myeloma associated chromosomal copy number abnormalities and their prognostic value. *Blood* **116**, 56-65.
- Wartalski K., Tabarowski Z., Duda M. (2016): Magnetic isolation and characterization of porcine ovarian putative stem cells (Pscs): an *in vitro* study. *Journal and fertilization: In vitro – IVF-worldwide, reproductive medicine, genetics and stem cell biology* **4**, <https://www.longdom.org/open-access/magnetic-isolation-and-characterization-of-porcine-ovarian-putative-stem-cells-pscs-an-in-vitro-study-2375-4508-1000191.pdf>.
- Xu J., Zhu W., Xu W., Yao W., Zhang B., Xu Y., Ji S., Liu C., Long J., Ni Q., Yu X. (2013): Up-regulation of *MDB1* promotes pancreatic cancer cell epithelial mesenchymal transition and invasion by epigenetic down-regulation of E-cadherin. *Current molecular medicine* **13**, 387-400.
- Xu J., Song F., Schleicher E., Pool Ch., Bann D., Hennessy M., Sheldon K., Batchelder E., Annageldiyev Ch., Sharma A., Chang Y., Hastie A., Goldenberg D., Mineishi S., Claxton D., Moldovan G. L., Yue F., Broach J. R. (2019): An integrated Framework for genome analysis reveals numerous previously unrecognizable structural variants in leukemia patient's samples. *Biorxiv*, <https://www.biorxiv.org/content/biorxiv/early/2019/02/28/563270.full.pdf>.
- Zhang Q., Xu X., Ding L., Li H., Xu C., Gong Y., Mu T., Leigh D., Cram D. S., Tang S. (2019): Clinical application of single-molecule optical mapping to a multigeneration FSHD1 pedigree. *Molecular genetics and genomic medicine* **7**, <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/mgg3.565>.

9 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

AMCA – monoklonální protilátky anti-human kappa chain

ALL – akutní lymfoblastická leukémie

AML – Akutní myeloidní leukémie

arrayCGH – komparativní genomová hybridizace

BAC – uměle vytvořené bakteriální chromozomy

CLL – chronická lymfocytární leukémie

CNV – počet kopií chromozomů

CRC – kolorektální karcinom

DLS – přímé značení DNA (direct label and stain)

DMD – duchenneova svalová dystrofie

FACS – fluorescenční imunomagnetická separace

FISH – fluorescenční *in situ* hybridizace

FNOL – Fakultní nemocnice Olomouc

FSHD1 – Facioskapulohumerální svalová dystrofie 1

IMWG – mezinárodní myelomová skupina

KD – kostní dřev

MACS – imunomagnetická separace

MGUS – monoklonální gamapatie nejasného významu

MM – mnohočetný myelom

NGS – sekvenování nové generace (next generation sequencing)

NLRS – enzymatické značení DNA (nicks, labels, repairs, stains)

NLV – negativní rozptyl značení

PB – plazmatické buňky

PCL – plazmocytní leukémie

PLV – pozitivní rozptyl značení

RCMD – myelodysplastický syndrom

SMM – doutnající myelom

SMRT – single molecule real-time

SNP – jednonukleotidové polymorfismy

SV – strukturní změny v genomu

VAP – variant annotation pipeline

WGS – Celogenomové sekvenování (whole genome sequencing)