

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Lékařská fakulta

Hemato–onkologická klinika FNOL a LF UP v Olomouci



**MOLEKULÁRNA BIOLÓGIA HEMATOLOGICKÝCH  
MALIGNÍT**

Dizertačná práca

Mgr. Beáta Katrincsáková

Olomouc 2016

Lékařská biologie

## Čestné vyhlásenie

Vyhlasujem, že som predloženú dizertačnú prácu vypracovala samostatne, s použitím uvedenej literatúry pod odborným vedením školiteľky prof. RNDr. et Mgr. Marie Jarošovej, CSc., školiteľky – špecialistu prof. Iwony Wlodarskej, PhD a s konzultáciami prof. MUDr. Karla Indráka, DrSc.

Grantová podpora: MSM 6198959205, IGA MZ ČR NR/9481-3/2007, LF\_2010\_004, LF\_2011\_006, LF\_2012\_007, BIL05/59, NFWO G.0610.07

V Olomouci, 6.10.2016

.....  
**Mgr. Beáta Katrincsáková**

## **Pod'akovanie**

Na tomto mieste by som rada poďakovala osobám, ktoré umožnili prehĺbiť moje vedomosti o molekulárnej biológii hematologických malignít. Som im nesmierne vďačná za to, že mi poskytli zázemie pre moju experimentálnu prácu a súčasne ma inšpirovali k neustálemu rozvoju počas môjho doktorandského štúdia.

Ďakujem svojej školiteľke, prof. RNDr. et Mgr. Marii Jarošovej, CSc. a školiteľke – špecialistovi prof. Iwone Wlodarskej, PhD. za odborný dozor nad mojou prácou.

Ďakujem prof. MUDr. Karlovi Indrákovi, DrSc. a prof. MUDr. Tomášovi Papajíkovi, CSc. za skvelé pracovné podmienky a príležitosti k prezentácii výsledkov mojej výskumnej práce.

Ďakujem všetkým kolegom z laboratórií Hemato-onkologickej kliniky FNOL, ktorí mi akoukoľvek formou pomohli počas mojej práce. Osobitné ďakujem patrí RNDr. Martine Divokej, Ph.D., doc. MUDr. Tomášovi Szotkowskému, Ph.D. a Kateřině Síčovej za spoluprácu na téme AML.

Ďakujem prof. Michel George, Carole Charlier, PhD., Haruko Takeda, PhD. a Katrien van Roosbroeck, PhD. za všestrannú pomoc a mimoriadne užitočné diskusie počas mojich zahraničných pobytov.

V neposlednom rade by som chcela poďakovať všetkým členom mojej rodiny za ich trpezlivosť a všestrannú podporu.

## Abstrakt

Predmetom tejto dizertačnej práce bolo určenie molekulárnych markerov, ktoré asociujú s prognózou akútnych myeloblastových leukémií (AML) a štúdium molekulárnej patogenézy chromozómových aberácií v oblasti ťažkého reťazca imunoglobulínu (*IGH*, 14q32.33), ktoré sú rekurentné u vybraných B-lymfoidných malignít.

V súbore AML s normálnym karyotypom (AML s NK) sme zhodnotili mutácie v *NPM1*, *FLT3*, *CEBPA*, *IDH1*, *IDH2*, *WT1* a *KMT2A* génoch a analyzovali sme liečebnú odpoveď v kontexte s heterogénnym molekulárnym pozadím. Na základe spoločnej analýzy 3 mutačných profilov – mutácií *NPM1*, *CEBPA* a internej tandemovej duplikácie *FLT3*, sme určili molekulárne skupiny s odlišným klinickým priebehom a prognózou. Zhodnotenie somatických mutácií v *IDH1/IDH2*, *WT1* resp. *KMT2A* prispelo k prehĺbeniu molekulárnej heterogenity AML s NK. Predpokladáme, že vzájomné pôsobenie mutačných profilov, ktoré charakterizuje genóm pacientov s AML, zodpovedá za odlišný priebeh leukémie, ktorý býva pozorovaný aj po stratifikácii pacientov do niektorej z molekulárnych prognostických skupín.

Štúdiá v skupine B-bunkových malignít s intersticiálnymi deléciami chromozómu 14 v oblasti *IGH* (14q32.33) nepodporuje hypotézu o nádorovom supresorovom géne v imprintovanej oblasti na 14q32, ktorý by bol reprimovaný cielenou deléciou jeho aktívnej (paternálnej alebo maternálnej) alely. V inej skupine B-bunkových malignít s vilóznymi lymfocytmi s  $t(14;14)(q32.13;q32.33)$  resp.  $inv(14)(q32.13q32.33)$  argumentujú prezentované dáta proti hypotéze, ktorá predpokladala dereguláciu kandidátnych dlhých nekódujúcich RNA v dôsledku aberácií chromozómu 14 v oblasti 14q32.13/14q32.33.

Výsledky tejto dizertačnej práce predstavujú podklad pre prognostickú a následne liečebnú stratifikáciu pacientov, ktorí sú diagnostikovaní a liečení ako AML s NK. Molekulárne genetické analýzy vykonané v skupine B-bunkových malignít prispievajú k detailnej charakterizácii chromozómových aberácií v oblasti *IGH* na 14q32.33.

Kľúčové slová: AML, normálny karyotyp, mutácie, molekulárna stratifikácia, prognóza, B-bunkové malignity, *IGH*, delécia, nádorový supresorový gén, *DLK1/GTL2* lokus, imprintované gény, metylácia DNA, vilózne lymfocyty, chromozómové translokácie, dlhé nekódujúce RNA

## Abstract

The object of this PhD thesis was to determine molecular markers that associate with the prognosis of acute myeloid leukaemia (AML) and to study the molecular pathogenesis of chromosomal aberrations involving the immunoglobulin heavy chain (*IGH*) at 14q32.33 that are recurrent in selected B-cell malignancies.

In a cohort of AML with normal karyotype (NK-AML) we evaluated mutations in the *NPM1*, *FLT3*, *CEBPA*, *IDH1*, *IDH2*, *WT1* and *KMT2A* genes and we analysed the therapeutic response in the context of the heterogeneous molecular background of the disease. Based on complex molecular profiling of mutations in *NPM1*, *CEBPA* and internal tandem duplications in *FLT3* we have identified molecular subgroups with different clinical outcome and prognosis. More certain molecular heterogeneity became obvious when considering somatic mutations in *IDH1/IDH2*, *WT1* and *KMT2A* genes. We assume that such complex and individually specific mutation interplay that hallmarks NK-AML genomes in our study may modify the prognosis of leukaemia in particular patients even after they are stratified to distinct molecular risk groups.

In a group of B-cell malignancies with interstitial deletions of chromosome 14 involving *IGH* at 14q32.33 our data do not support the hypothesis of a putative tumor suppressor gene located in the imprinted region at 14q32 that would be repressed by targeted deletion of its active (paternal or maternal) allele. In another group of B-cell malignancies with villous lymphocytes characterized by t(14;14)(q32.13;q32.33) or inv(14)(q32.13q32.33) respectively we present data that argue against the hypothesis that the candidate long non-coding RNAs are deregulated due to chromosome 14 aberrations in the 14q32.13 / 14q32.33 region.

The results of this PhD thesis are essential for the prognostic and therapeutic stratification of patients diagnosed and treated as NK-AML. The molecular genetic analyses performed in a group of B-cell malignancies contribute to the detailed characterization of chromosomal aberrations involving the *IGH* locus at 14q32.33.

Key words: AML, normal karyotype, mutations, molecular-risk stratification, prognosis, B-cell malignancies, *IGH*, deletion, tumor suppressor gene, *DLK1/GTL2* domain, imprinted genes, DNA methylation, villous lymphocytes, chromosomal translocations, long non-coding RNA

# OBSAH

<b>ZOZNAM SKRATIEK.....</b>	<b>8</b>
<b>I. TEORETICKÝ ÚVOD.....</b>	<b>10</b>
1. Normálna krvotvorba .....	10
2. Hematologické malignity .....	11
3. Molekulárny podklad vybraných hematologických malignít.....	12
4. Akútne myeloblastové leukémie .....	12
4.1. Genetická patogenéza AML.....	14
4.2. Vybrané génové mutácie rekurentné u AML.....	18
4.3. Klinický význam génových mutácií rekurentných u AML.....	22
5. Malignity odvođené od B-lymfocytov .....	26
5.1. Vznik a bunkový pôvod malignít B-lymfocytov.....	26
5.2. Genetická patogenéza malignít B-lymfocytov .....	27
5.3. Intersticiálne delécie chromozómu 14 u malignít B-lymfocytov .....	30
5.4. Aberácie chromozómu 14 v skupine B-lymfoidných neoplázií asociovaných s vilóznymi lymfocytmi .....	33
<b>II. CIELE PRÁCE .....</b>	<b>35</b>
<b>III. MATERIÁL A METÓDY .....</b>	<b>36</b>
1. Príprava templátu pre molekulárne analýzy .....	36
2. Experimentálna časť prvá: Analýza vybraných mutácií rekurentných u AML s NK .....	38
3. Experimentálna časť druhá: Určenie parentálneho pôvodu deletovaných aliel 14q v skupine B-lymfoidných malignít s intersticiálnou deléciou v oblasti <i>IGH</i> [ <i>del(14q/IGH)</i> ] .....	46
4. Experimentálna časť tretia: Stanovenie expresie vybraných <i>T-UCR</i> v skupine B-bunkových neoplázií asociovaných s cirkulujúcimi vilóznymi lymfocytmi a s abnormalitami na 14q32.13/14q32.33.....	53
<b>IV. VÝSLEDKY A DISKUSIA .....</b>	<b>55</b>
1. Analýza vybraných génových mutácií rekurentných u AML s NK.....	55
1.1. Výsledky .....	55
1.1.1. Klinický priebeh AML v študovanom súbore.....	55
1.1.2. Molekulárna analýza .....	58
1.1.3. Klinický význam molekulárnych markerov v študovanom súbore AML s NK.....	65

1.2. Diskusia.....	83
2. Štúdium molekulárneho mechanizmu intersticiálnych delécií na 14q u B-lymfoidných malignít .....	94
2.1. Výsledky .....	94
2.1.1. Kontrolný experiment .....	94
2.1.2. Analýza vzoriek s del(14q/ <i>IGH</i> ) .....	96
2.2. Diskusia.....	101
3. Štúdium molekulárnej patogenézy aberácií chromozómu 14 u vybraných neoplázií B - lymfocytov asociovaných s vilóznymi lymfocytmi .....	107
3.1. Výsledky .....	107
3.2. Diskusia.....	113
<b>VI. SÚHRN.....</b>	<b>118</b>
<b>VII. POUŽITÁ LITERATÚRA.....</b>	<b>121</b>
<b>VIII. ZOZNAM PUBLIKÁCIÍ A KONFERENČNÝCH PRÍSPEVKOV.....</b>	<b>130</b>
<b>IX. PRÍLOHY .....</b>	<b>134</b>
Príloha 1 - Zoznam použitých oligonukleotidových primerov .....	135
Príloha 2 - Metylačné dáta prípadov # 1, 2, 3 a 5 s dokumentovanou del(14q/ <i>IGH</i> ).....	136
Príloha 3 - Metylačné dáta prípadov # 6, 7 a 8 s dokumentovanou del(14q/ <i>IGH</i> ).....	137
Príloha 4 - Alelovo špecifický metylačný profil v prípadoch s dokumentovanou del(14q/ <i>IGH</i> ) a v kontrolnom súbore.....	138
Príloha 5 - Katrincsakova et al., 2009 .....	139
Príloha 6 - Urbankova et al., 2012 .....	140
Príloha 7 – Jarosova et al. 2012 .....	141
Príloha 8 – Raida et al. 2011 .....	142
Príloha 9 – Szotkowski et al. 2010.....	143
Príloha 10 – Katrincsáková et al. 2011 .....	144
Príloha 11 – Konferenčné príspevky (publikované abstrakty a postery) .....	145

# ZOZNAM SKRATIEK

aloTKB	- alogénna transplantácia krvotvorných buniek
AML	- akútna myeloblastová leukémia
AML s NK	- akútna myeloblastová leukémia s normálnym karyotypom
APL	- akútna promyelocytová leukémia
BSP	- bisulfid-sekvenačná PCR
cDNA	- komplementárna DNA
<i>CEBPAdm</i>	- dvojité mutácie génu <i>CEBPA</i>
<i>CEBPAm</i>	- mutácie génu <i>CEBPA</i>
CLL	- chronická lymfocytová leukémia
del(14q/ <i>IGH</i> )	- intersticiálna delécia v oblasti 14q, ktorá zahŕňa lokus pre <i>IGH</i>
DEPC	- dietylpyrokarbonát
DFS	- prežitie bez príznakov ochorenia ( <i>disease free survival</i> )
DLBCL	- difúzny veľkobunkový lymfóm
DMR	- diferenciálne metylovaná oblasť
DNA	- deoxyribonukleová kyselina
dNTPs	- zmes 4 deoxyribonukleosid trifosfátov
DTT	- dithiotreitol
EDTA	- kyselina etyléndiamíntetraoctová
ELN	- Európska leukemická sieť ( <i>European Leukemia Net</i> )
FA	- fragmentačná analýza
FL	- folikulárny lymfóm
<i>FLT3</i> -ITD/ <i>FLT3</i> -ITD + wt	- alelová nálož <i>FLT3</i> -ITD vzhľadom k celkovej distribúcii <i>FLT3</i>
<i>FLT3</i> -ITD-/ <i>NPM1</i> wt/ <i>CEBPA</i> wt	- trojnásobne negatívny mutačný profil vo <i>FLT3</i> , <i>NPM1</i> a <i>CEBPA</i>
<i>FLT3</i> -ITD	- interná tandemová duplikácia génu <i>FLT3</i> (+ /- = áno/nie)
<i>FLT3</i> m	- mutácie v géne <i>FLT3</i>
<i>FLT3</i> -TKD	- bodová mutácia v tyrozínkinázovej doméne génu <i>FLT3</i>
GC	- germinálne centrum
HCL	- vlasatobunková leukémia (hairy cell leukemia)
HCL-v	- variantná forma vlasatobunkovej leukémie
HSC	- krvotvorná kmeňová bunka ( <i>hematopoietic stem cell</i> )
<i>IDH1</i> m	- mutácie v géne <i>IDH1</i>
<i>IDH2</i> m	- mutácie v géne <i>IDH2</i>
<i>IDH</i> m	- mutácie v génoch <i>IDH1</i> a/alebo <i>IDH2</i>
Ig	- imunoglobulín
IG-DMR	- medzigénová diferenciálne metylovaná oblasť

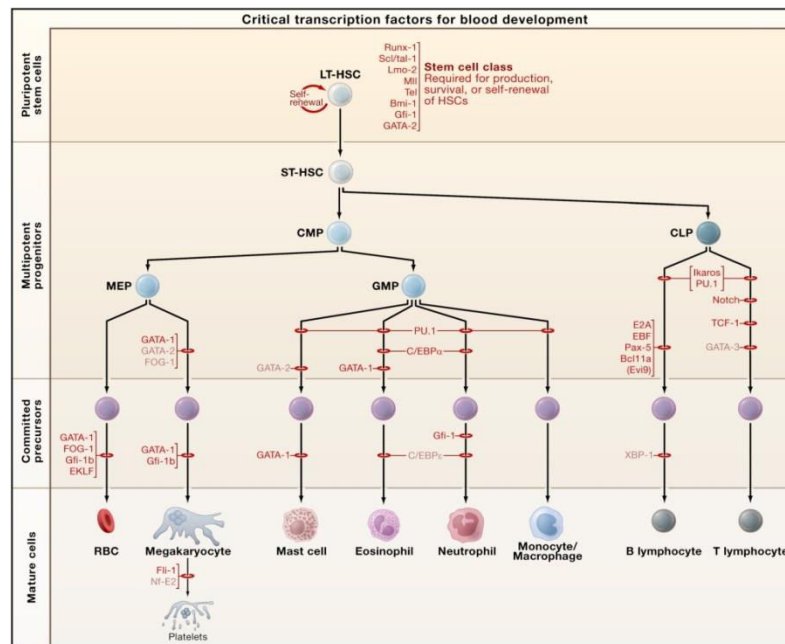


<i>IGH</i>	- ťažký reťazec imunoglobulínu
<i>KMT2A-PTD</i>	- parciálna tandemová duplikácia v géne <i>KMT2A</i>
KR	- kompletná hematologická remisia
MDR	- najmenšia spoločne deletovaná oblasť ( <i>minimally deleted region</i> )
miRNA	- micro RNA
MRD	- minimálna reziduálna choroba ( <i>minimal residual disease</i> )
NCCN	- <i>National Comprehensive Cancer Network</i>
<i>NPM1</i> m	- mutácie génu <i>NPM1</i>
<i>NPM1</i> m/ <i>FLT3</i> -ITD-	- genotyp <i>NPM1</i> mutovaný bez <i>FLT3</i> -ITD
<i>NPM1</i> m/ <i>FLT3</i> -ITD+	- genotyp <i>NPM1</i> mutovaný a súčasne <i>FLT3</i> -ITD pozitívny
<i>NPM1</i> wt/ <i>FLT3</i> -ITD-	- genotyp <i>NPM1</i> nemutovaný bez <i>FLT3</i> -ITD
<i>NPM1</i> wt/ <i>FLT3</i> -ITD+	- genotyp <i>NPM1</i> nemutovaný a <i>FLT3</i> -ITD pozitívny
OS	- celkové prežitie ( <i>overall survival</i> )
OS <sub>KR</sub>	- celkové prežitie v skupine, ktorá dosiahla KR
PCR	- polymerázová reťazová reakcia
RFS	- prežitie bez relapsu ( <i>relapse-free survival</i> )
RNA	- kyselina ribonukleová
RR	- riziko relapsu
RT-qPCR	- reverzne transkriptázová kvantitatívna PCR v reálnom čase
SEQ	- priame sekvenovanie podľa Sangera
SMZL	- splénický lymfóm marginálnej zóny
SNP	- jednonukleotidový polymorfizmus DNA
TF	- transkripčný faktor
TKB	- transplantácia krvotvorných buniek
T-UCR	- nekódujúce RNA transkribované z ultrakonzervovaných oblastí
WHO	- Svetová Zdravotnícka Organizácia
<i>WT1</i> m	- mutácie génu <i>WT1</i>

# I. TEORETICKÝ ÚVOD

## 1. NORMÁLNA KRVOTVORBA

Krvotvorba (hematopoéza) je mnohostupňový proces, počas ktorého nediferencovaná krvotvorná kmeňová bunka (*hematopoietic stem cell*, HSC) prechádza početnými štádiami proliferácie a diferenciácie a dáva vznik zrelým krvotvorným elementom. Predpokladom fyziologickej krvotvorby (znázornená a stručne popísaná na obrázku 1) je stav rovnováhy medzi proliferáciou, diferenciáciou a zánikom krvotvorných buniek na všetkých úrovniach krvotvorby.



**Obrázok 1 - Klasická schéma hematopoézy** Pluripotentná HSC je schopná (1) sebeobnovy a (2) diferenciácie do 2 základných krvotvorných línií multipotentných progenitorových buniek (multipotent progenitors), myeloidnej (common myeloid progenitor, CMP) a lymfoidnej (common lymphoid progenitor, CLP). Multipotentné progenitory sa delia a diferencujú na špecifické skupiny buniek prekursorových (committed precursors). Delením a diferencovaním unipotentných prekursorových buniek vznikajú plne diferencované krvotvorné elementy, ktoré strácajú schopnosť deliť sa a plnia v ľudskom organizme špecifické funkcie (LT-HSC, *long-term hematopoietic stem cell*; ST-HSC, *short-term hematopoietic stem cell*; MEP, *megakaryocyte/erythroid progenitor*; GMP, *granulocyte/macrophage progenitor*; RBCs, *red blood cells*) (Orkin a Zon, 2008)

## 2. HEMATOLOGICKÉ MALIGNITY

Hematologické malignity predstavujú početnú skupinu neoplázií, ktoré majú spoločný pôvod v nádorovej transformácii buniek krvotvorného a lymfoidného tkaniva. Na základe krvotvornej línie (obrázok 1), ktorá podlieha nádorovej transformácii je možné hematologické malignity rozdeliť na myeloproliferatívne a lymfoproliferatívne ochorenia, resp. neoplázie. Základné klinické jednotky sa odlišujú v bunkovom pôvode, pričom nádorovo sa transformujú krvotvorné bunky na všetkých úrovniach diferenciácie. Nádorová transformácia nezrelých krvotvorných elementov býva spojená s akútnym priebehom, ktorý v neliečených prípadoch končí fatálne v priebehu rádovo niekoľko týždňov až mesiacov od stanovenia diagnózy.

Primárne klinické jednotky odvodené od myeloidnej krvotvornej línie zahŕňajú 2 typy leukémií, akútnu myeloblastovú leukémiu (AML) a chronickú myeloidnú leukémiu (CML) a dve nenádorové hematologické diagnózy - myelodysplastický syndróm (MDS) a myeloproliferatívne neoplázie (MPN). V závislosti na štádiu, kedy dochádza k neoplastickému zásahu do vývoja (B-, resp. T-) lymfoidnej línie krvotvorných buniek býva diagnostikovaná (i) akútna lymfoblastová leukémia (ALL), (ii) chronická lymfatická leukémia (CLL), (iii) lymfóm alebo (iv) myelóm. V rámci hlavných klinických jednotiek sa rozlišujú početné podskupiny/podtypy leukémií a lymfómov, ktoré sa vyznačujú viac alebo menej špecifickým klinickým a biologickým obrazom a prognózou. Hranica medzi jednotlivými klinickými jednotkami však rozhodne nie je ostrá, prechod do akútnej leukémie býva pozorovaný v prípadoch s MDS, MPN aj CML (akcelerovaná fáza) a takmer každý lymfóm môže leukemizovať, pre niektoré lymfómy (CLL) je dokonca leukemický charakter typický.

Od roku 2001 je dostupná jednotná klasifikácia nádorov krvotvorných a lymfoidných tkanív podľa Svetovej zdravotníckej organizácie (*World Health Organisation*, WHO). V tejto klasifikácii, ktorá bola naposledy revidovaná v roku 2016, sú popísané klinické známky a špecifické morfológické, cytochemické, imunofenotypové a genetické charakteristiky všetkých známych hematologických neoplázií (Arber et al., 2016, Swerdlow et al., 2008, Swerdlow et al., 2016).

### 3. MOLEKULÁRNY PODKLAD VYBRANÝCH HEMATOLOGICKÝCH MALIGNÍT

Vo svojej experimentálnej práci som sa venovala molekulárnej biológii dvoch skupín hematologických malignít. Skúmala som molekulárny podklad AML, prednostne v skupine AML s normálnym karyotypom a venovala som sa štúdiu molekulárnej patogenézy vybraných malignít B-lymfocytov, konkrétne takých, u ktorých boli cytogenetickými a molekulárne cytogenetickými štúdiami určené špecifické aberácie na chromozóme 14 v oblasti ťažkého reťazca imunoglobulínu. g Primárne som sa zamerala na informácie o molekulárnej patogenéze študovaných skupín hematologických malignít resp. na tie poznatky, ktoré priamo súvisia s mojou experimentálnou prácou a s prezentovanými výsledkami.

### 4. AKÚTNE MYELOBLASTOVÉ LEUKÉMIE

Termín AML zahŕňa klinicky a biologicky heterogénnu skupinu hematologických malignít. Spoločným znakom tejto klinickej jednotky je klonálna proliferácia nezrelých hematopoetických progenitorov (myeloblastov), ktorá sa vymyká regulačným mechanizmom proliferácie a diferenciácie na rozličných stupňoch myelopoézy. Malígna proliferácia myeloblastov potláča normálnu krvotvorbu a vedie k abnormálnemu, AML špecifickému obrazu primárne v kostnej dreni a následne v periférnej krvi, prípadne v extramedulárnych tkanivách (Ferrara a Schiffer, 2013).

AML tvorí asi jednu štvrtinu všetkých leukémií. Vyznačuje sa dvoma zreteľnými vrcholmi výskytu, prvým vo veľmi skorom veku a druhým, oveľa výraznejším, v populácii starších ( $\geq 55$  až 60 rokov) dospelých; jej incidencia s narastajúcim vekom stúpa. Až na niekoľko výnimiek je prognóza AML neuspokojivá. Po 5 rokoch od stanovenia diagnózy preživa asi 25 % prípadov s diagnózou AML (Ferrara a Schiffer, 2013).

Jedným z kritérií stanovenia diagnózy AML je podľa WHO klasifikácie nález  $\geq 20$  % myeloblastov v periférnej krvi alebo v kostnej dreni, nezávisle na etiologickom podklade AML, t. j. či myeloidná neoplázia vznikla primárne (*de novo*) alebo sekundárne. V druhom prípade sa AML vyvíja z (i) predchádzajúcej hematologickej diagnózy – z MDS, z myelodysplasticko/myeloproliferatívneho syndrómu (MDS/MPN), resp. blastickou transformáciou primárnej MPN alebo (ii) vzniká

v dôsledku terapie pre inú malignitu (therapy - related AML) (Vardiman et al., 2009). Prehľad klinických jednotiek AML a príbuzných neoplázií klasifikovaných na základe kritérií WHO revidovaných v roku 2016 je uvedený v tabuľke 1.

**Tabuľka 1 – WHO klasifikácia AML a príbuzných neoplázií (upravené podľa Arber et al., 2016)**

#### **AML s rekurentnými genetickými zmenami**

AML s t(8;21)(q22;q22.1); RUNX1-RUNX1T1  
AML s inv(16)(p13.1;q22) alebo t(16;16)(p13.1;q22); CBFB-MYH11  
APL s PML-RARA  
AML s t(9;11)(p21.3;q23.3); MLLT3-KMT2A  
AML s t(6;9)(q23;q34.1); DEK-NUP214  
AML s inv(3)(q21.3;q26.2) alebo t(3;3)(q21.3;q26.2); GATA2, MECOM  
AML (megakaryoblastická) s t(1;22)(p13.3;q13.3); RBM15-MKL1  
Provizórna entita: AML s BCR-ABL1  
AML s mutovaným NPM1  
AML s bialelickými mutáciami CEBPA  
Provizórna entita: AML s mutovaným RUNX1

#### **AML spojená s myelodysplastickými zmenami**

##### **Myeloidné neoplázie v súvislosti s liečbou**

#### **AML inak nezaradená**

AML s minimálnou diferenciáciou  
AML bez maturácie  
AML s maturáciou  
Akútna myelomonocytová leukémia  
Akútna monoblastová/monocytová leukémia  
Čistá erytroidná leukémia  
Akútna megakaryoblastová leukémia  
Akútna bazofilná leukémia  
Akútna panmyelóza s myelofibrózou

#### **Myeloidný sarkóm**

##### **Myeloidné proliferácie pri Downovom syndróme**

Prechodná abnormálna myelopoéza  
Myeloblastová leukémia spojená s Downovým syndrómom

#### 4.1. GENETICKÁ PATOGENÉZA AML

Genóm myeloblastov býva v dobe diagnózy AML charakterizovaný genetickými zmenami variabilného rozsahu. Ide prevažne o získané (somatické) zmeny, ktoré sa prejavujú ako (i) chromozómové (cytogenetické) aberácie a/alebo ako (ii) submikroskopické (molekulárne) zmeny leukemického genómu (Döhner et al., 2015, Grimwade a Hills, 2009). AML s rekurentnými genetickými zmenami predstavuje samostatnú podskupinu vo WHO klasifikácii AML a príbuzných neoplázií (tabuľka 1).

##### *Klasický dvoj-zásahový model vzniku AML*

Kelly a Gilliland navrhli prvý model, v ktorom sa na procese leukemogenézy podieľajú 2 rôzne typy/skupiny mutácií (tiež dvoj-zásahový model leukemogenézy) (Kelly a Gilliland, 2002). Tento model predpokladá mutácie typu I (tiež signálne mutácie), ktoré umožňujú krvotvorným progenitorom prežívať a proliferovať na úkor buniek, ktoré takúto selekčnú výhodu nevlastnia. Druhá skupina zahŕňa transkripčné faktory (TF) a iné regulátory transkripčnej mašinérie, ktorých aberantné funkcie bývajú v leukemogenéze AML spájané s poruchou diferenciácie krvotvornej bunky (tabuľka 2). Z fenotypových štúdií na myších modeloch leukemogenézy AML je známe, že mutácie typu I a II sa samostatne prejavujú rozsiahlou proliferáciou a zástavou diferenciácie hematopoetických progenitorov, vedú k vzniku myeloproliferatívneho syndrómu (mutácie typu I), resp. myelodysplázie (mutácie typu II), samostatne však nepostačujú k progresii do AML (Reckzeh et al., 2012, Yuan et al., 2001). K týmto poznatkom je komplementárny kombinovaný *knock-in* myší model AML, na ktorom sa poukázalo na kooperáciu bialelických mutácií *CEBPA* (mutácia typu I) a internej tandemovej duplikácie *FLT3* (*FLT3-ITD*, mutácia typu II) pri vzniku a udržiavaní AML *in vivo* (Reckzeh et al., 2012).

##### *Model vzniku AML v genomickej ére*

Projekty založené na metódach novej generácie sekvenovania a genotypizovania otvorili možnosti podrobnej analýzy genómu/exómu resp. transkriptómu AML. Na priekopnícku prácu, ktorá v roku 2008 dokumentovala výsledky kompletne osekvenovaného genómu AML bez cytogenetických zmien, nadviazali ďalšie štúdie a napokon v roku 2013 boli pod záštitou medzinárodnej siete *The Cancer Genome Atlas*

*Research Network* zverejnené dáta z úplnej analýzy genómu/exómu celkom 200 rôznych *de novo* AML dospelých (Cancer Genome Atlas Research Network 2013, Ley et al., 2008, Mardis et al., 2009). Z týchto štúdií vieme, že pri manifestácii AML sú prítomné ďalšie, do vyššie zmieneného 2-zásahového modelu leukemogenézy neklasifikovateľné génové zmeny, resp. mutácie. Gény s rekurentným mutačným profilom u AML boli na základe biologickej funkcie a putatívnej úlohy v patogenéze AML kategorizované do 9 funkčných skupín (Cancer Genome Atlas Research Network 2013) (tabuľka 2).

Prehĺbenie poznatkov o genetických resp. epigenetických zmenách v genóme AML pri diagnóze a následne v období relapsu prinieslo pozvoľné revidovanie klasického 2-zásahového modelu leukemogenézy AML. Vznik/progresiu AML chápeme ako výsledok postupnej akumulácie náhodných a rôznorodých genetických/epigenetických zmien, ktoré zasahujú do funkcie hematopoetických progenitorov a súhrnne vedú k abnormálnej proliferácii nezrelých krvotvorných progenitorov a k manifestácii a udržiavaniu AML. Recentné výskumy sú v súlade s konceptom o mnohokrokovom procese leukemogenézy a štúdie opakovane dokumentujú, že pôvodný (tiež *founder*) leukemický klon, resp. jeho subpopulácia (subklon) kontinuálne získava nové, pre perzistenciu leukémie výhodné genetické zmeny. Uvažuje sa, že vybrané genetické zásahy môžu meniť rastové schopnosti AML buniek, rovnako ako zabezpečiť ich rezistenciu na podávanú chemoterapiu. Proces klonálnej evolúcie AML, ktorú charakterizuje selekcia a klonálna expanzia nových subklonov ostáva predmetom intenzívneho výskumu. Molekulárny výskum sa v genomickej ére významne orientuje na identifikáciu kauzálnych, leukémii spôsobujúcich mutácií. Prehĺbenie poznatkov o vzniku a evolúcii mutácií u AML a určenie kľúčových, AML iniciujúcich mutácií je základným predpokladom pri vyvíjaní nových, cielených terapeutických prístupov (Convey et al., 2014, Ding et al., 2012, Welch et al., 2012).

**Tabuľka 2 - Prehľad vybraných mutácií s kľúčovou úlohou pri vzniku AML a vývoj klasifikácie genetických zmien rekurentných u AML do funkčných skupín; upravené podľa (Meyer a Levine, 2014)**

Analýza	Do roku 2008	2008-2013	Od roku 2013
	Cytogenetické a molekulárne analýzy	Sekvenovanie novej generácie	Cancer Genome Atlas Projekt
Funkčné skupiny	Skupina 1: aktivovaná signalizácia mutácie <i>FLT3</i> , <i>KIT</i> , <i>RAS</i>	Skupina 1: aktivovaná signalizácia mutácie <i>FLT3</i> , <i>KIT</i> , <i>RAS</i>	Skupina 1: chimérické TF t(8;21), t(16;16), t(15;7), prestavby <i>KMT2A</i>
			Skupina 2: nucleophosmin 1 mutácie <i>NPM1</i>
			Skupina 3: nádorové supresory mutácie <i>TP53</i> , <i>WT1</i> , <i>PHF6</i>
	Skupina 2: transkripcia a diferenciácia t(8;21), t(16;16), t(15;7), mutácie <i>CEBPA</i>	Skupina 2: transkripcia a diferenciácia t(8;21), t(16;16), t(15;7), mutácie <i>CEBPA</i> , <i>RUNX1</i>	Skupina 4: gény spojené s metyláciou DNA: hydroxymetylácia DNA – <i>TET2</i> , <i>IDH1</i> , <i>IDH2</i> DNA metyltransferázy – <i>DNMT3A</i>
			Skupina 5: aktivačné mutácie v signálnych génoch mutácie <i>FLT3</i> , <i>KIT</i> , <i>RAS</i>
			Skupina 6: geny modifikujúce chromatín mutácie <i>ASXL1</i> , <i>EZH2</i> , prestavby <i>KMT2A</i> parciálne tandemové duplikácie <i>KMT2A</i>
	Skupina 3: epigenetické modifikátory mutácie <i>TET2</i> , <i>DNMT3A</i> , <i>ASXL1</i>	Skupina 3: epigenetické modifikátory mutácie <i>TET2</i> , <i>DNMT3A</i> , <i>ASXL1</i>	Skupina 7: myeloidné TF mutácie <i>CEBPA</i> , <i>RUNX1</i>
			Skupina 8: gény kohezínového komplexu mutácie <i>STAG2</i> , <i>RAD21</i> , <i>SMC1</i> , <i>SMC2</i>
			Skupina 9: gény spliceozómového komplexu mutácie <i>SRSF2</i> , <i>U2AF35</i> , <i>ZRSR2</i>



### *Cytogenetické zmeny u AML*

Nenáhodné, klonálne chromozómové zmeny sa vyskytujú u 55 až 60 % AML dospelého veku. Pacienti sa v závislosti na prítomnosti či neprítomnosti rekurentných cytogenetických markerov radia do priaznivej, nepriaznivej a intermediárnej rizikovej skupiny (Döhner et al., 2010). Priaznivou prognózou sa vyznačujú AML s cytogenetickým nálezom  $t(15;17)(q22;q12)/PML-RARA$ ,  $t(8;21)(q22;q22)/RUNX1-RUNX1T1$  a  $inv(16)(p13.1q22)$  resp.  $t(16;16)(p13.1;q22)/CBFB-MYH11$ . Pacienti s  $t(15;17)$  sú špecifické pre akútnu promyelocytovú leukémiu (APL) a bývajú vďaka významne odlišným liečebným výsledkom vyčleňovaní zo skupiny s dobrou prognózou do samostatnej skupiny s veľmi priaznivou prognózou. Nález vybraných numerických a štrukturálnych cytogenetických abnormalít, vrátane monozómií chromozómov 5q, 7q, delécie celého chromozómu 5, 7, prestavieb  $KMT2A/11q23$  [s výnimkou  $t(9;11)(p22;q23)/KMT2A-AF9$ ] a komplexný karyotyp (nález  $\geq 3$  klonálnych cytogenetických abnormalít) býva u AML známkou nepriaznivej prognózy (Grimwade et al., 2010, Katrincskáková et al., 2011). Monozomálny karyotyp (nález apoň 2 odlišných klonálnych autozomálnych monozómií alebo nález 1 autozomálnej monozómie spoločne so štrukturálnymi abnormalitami karyotypu) je u AML známkou mimoriadne nepriaznivej prognózy (Breems et al., 2008, Medeiros et al., 2010).

Početnú cytogenetickú skupinu AML (asi 40 až 45 %) predstavujú pacienti, u ktorých metódy klasickej cytogenetiky neumožňujú identifikovať žiadne (numerické ani štrukturálne) odchýlky od normálneho karyotypu. Cytogenetický nález je v prípade AML s normálnym karyotypom (ďalej AML s NK) prognosticky nevýznamný a radí pacientov uniformne do kategórie so strednou (cytogenetickou) prognózou.

### *Molekulárne zmeny spojené s AML*

Osobitnú skupinu zmien, ktoré bývajú pozorované v genóme leukemických blastov tvoria zmeny submikroskopického rozsahu, teda cytogenetickými technikami nedetekovateľné odchýlky od štandardného genotypu. Zmeny na molekulárnej úrovni sa veľmi často zaznamenávajú u AML s NK, vyskytujú sa však aj v cytogeneticky dobre definovaných podskupinách AML a celkovo sa významne podieľajú na komplexnej patogenéze AML (Cancer Genome Atlas Research Network 2013, Marcucci et al., 2011, Mrózek et al., 2007).

## 4.2. VYBRANÉ GÉNOVÉ MUTÁCIE REKURENTNÉ U AML

Úsilie, ktoré bolo venované štúdiu molekulárnej patogenézy AML v priebehu posledných 10 až 15 rokov viedlo k určeniu génov, ktorých mutácie sú rekurentné u AML, obzvlášť u AML s NK (Cancer Genome Atlas Research Network 2013, Döhner et al., 2015, Estey 2013, Katrincskáková et al., 2011). Nasledujúce kapitoly sa budú venovať génom, ktorých mutácie boli vyšetrené v súbore pacientov s AML s NK v tejto práci.

### *FLT3* (fms-like tyrosine kinase receptor 3, 13q12)

Ide o receptorovú tyrozínkinázu, ktorá sa exprimuje v krvotvorných kmeňových bunkách, v spoločnom lymfo-/myeloidnom progenitore a v monocytoch a po väzbe so svojím ligandom (*FLT3L*) podporuje proliferáciu a prežívanie týchto hematopoetických progenitorov (Berenstein, 2015). Mutácie *FLT3* (*FLT3m*) bývajú prítomné až u 30 % všetkých AML. Zvýšený výskyt *FLT3m* vykazuje AML s NK; v rámci špecifických molekulárnych a cytogenetických podskupín bývajú *FLT3m* obzvlášť časté u AML s parciálnou taemovou duplikáciou *KMT2A* (*KMT2A*-PTD, pôvodne *MLL*-PTD) alebo u APL (Martelli et al., 2013, Ofran a Rowe, 2013). Najpočetnejšie sú 2 typy *FLT3m*. Prvý typ, interná tandemová duplikácia (ďalej *FLT3*-ITD) je častejšia. Dĺžka duplikovaného úseku je variabilná, oblasť juxtamembránovej domény *FLT3* (resp. u časti prípadov 1. tyrozínkinázovej domény) sa duplikuje (*in-frame*) v úseku 3 až niekoľko stoviek až tisíc (prevažne do 400) bp (Schnittger et al., 2012). Prípady s *FLT3*-ITD+ AML vykazujú variabilitu v počte aliel s ITD, v mieste duplikácie resp. v samotnej sekvencii duplikovaných aliel; niektorí autori navrhujú pre tieto mutácie označenie *FLT3*-LM (*length mutations*) (Schnittger et al., 2012). *FLT3*-ITD bývajú prítomné asi u 20 % všetkých AML dospelých, mimoriadne často sa zaznamenávajú u AML s NK (28 - 34 % prípadov) (Döhner et al., 2015). Menej časté sú bodové mutácie v kinázovej doméne *FLT3* (ďalej *FLT3*-TKD), prevažne v kodóne D835, resp. I836. Tieto mutácie predstavujú asi 15 % všetkých *FLT3m* a vyskytujú sa asi u 10 % AML dospelého veku (Martelli et al., 2013, Ofran a Rowe, 2013). Obidva typy *FLT3m* vedú ku konstitutívnej aktivácii kinázy *FLT3* nezávisle na väzbe *FLT3L*. Nález *FLT3*-ITD je mnohonásobným negatívnym ukazovateľom klinického priebehu AML, zvyšuje riziko relapsu, má negatívny vplyv na celkové prežitie (OS), prežitie bez príznakov ochorenia (DFS) a býva asociovaný s chemorezistenciou. Opakovane sa poukázalo na odlišný klinický

priebeh skupiny s vysokou alelovou náložou ( $> 0.5$ ) *FLT3*-ITD/wt (Döhner et al., 2015, Gale et al., 2008, Schnittger et al., 2012). Prognostickú hodnotu *FLT3*-TKD sa dosiaľ nepodarilo zjednotiť (Mead et al., 2007, O'Donnel et al., 2016, Whitman et al., 2008).

#### *NPM1* (nucleophosmin, 5q35)

*NPM1* predstavuje multifunkčný fosfoproteín/chaperón, ktorý fyziologicky premáva medzi jadrom a cytoplazmou. Vyskytuje sa prevažne v jadierku a podieľa sa na biogenéze ribozómov, kontrole duplikácie centrozómu počas mitózy a cestou regulácie ARF/p19 (CDKN2A – inhibítor cyklín dependentnej kinázy 2A) a TP53 dokáže zasahovať do bunkovej proliferácie a apoptózy (Falini et al., 2007). Mutácie génu *NPM1* (ďalej *NPM1m*) sa u AML vyskytujú najčastejšie zo všetkých rekurentných mutácií, bývajú detekované u 45 - 60 % AML s NK, resp. u 25 - 30 % všetkých AML dospelého veku (Döhner et al., 2015). Ide o posunové mutácie, ktoré sa sústreďujú na C-terminálnom konci génu v 11. exóne (nukleotidová sekvencia zodpovedná jadriakovému lokalizačnému signálu, NM\_002520.6, pôvodne 12. exón podľa NM\_002520), majú najčastejšie podobu inzercie 4 nukleotidov a vedú k zadržaniu proteínu v cytoplazme (generujú nový jadrový exportný signál). Mutantný *NPM1* (tiež *NPMc*) si zachováva schopnosť interagovať s rôznorodými proteínmi, pričom svojich partnerov delokalizuje do cytoplazmy a poškodzuje tým ich funkciu (Leong et al., 2010). Štúdie dokumentujú niekoľko rôznych typov *NPM1m*, prevažne (asi v 80 % *NPM1m* AML) ide o mutácie typu A (inzercia/duplikácia TCTG). Skoré *in vivo* štúdie na myších modeloch ukázali, že inaktivácia štandardnej alely (*Npm1*<sup>+/-</sup>) sa prejavuje nestabilitou genómu a rapídnu onkogenézou (Grisendi et al., 2005). Nález *NPM1m* bez *FLT3*-ITD sa považuje za priaznivý marker u AML s NK ( $\leq 60$  rokov) (Döhner et al., 2015).

#### *CEBPA* (CCAAT/enhancer binding protein alpha, 19q13.1)

*CEBPA* predstavuje TF, ktorý sa významne podieľa na regulácii myelopoézy/granulopoézy (Friedman, 2015) (obrázok 1). Spoločne s ďalšími TF (*PU.1*, *c-Myb*, *RUNX1*) je zapojený napríklad do regulácie transkripcie génov pre myeloperoxidázu, receptoru pre granulocytové a/alebo makrofágové kolónie (*G-CSF*, *M-CSF*, *GM-CSF*). Najčastejšie bývajú u AML detekované 2 typy mutácií génu

*CEBPA* (ďalej *CEBPAm*) (1) posunové a nezmyselné mutácie v N-terminálnej oblasti (v transaktivačných doménach TAD1 alebo TAD2), ktoré predčasne skracujú proteín a vedú k vzniku jeho dominantne negatívnej formy a (2) *in-frame* mutácie (inzercie alebo delécie) na C-terminálnom konci, ktoré zasahujú do motívov zodpovedných za dimerizáciu (motív leucínového zipsu) resp. väzbu TF na DNA (DNA väzobná doména) (Pabst a Mueller, 2009). Asi v 2/3 prípadov AML postihujú mutácie N- aj C-terminálny koniec simultánne, každá mutácia zasahuje inú alelu (tiež bialelické/ dvojité *CEBPAm*, *CEBPAdm*), čo vedie k strate expresie TF CEBPA. Vo zvyšných prípadoch ostáva mutovaná jedna alela *CEBPA* (tiež monoalelické, *CEBPAmo*). *CEBPAm* sa vyskytujú asi u 15 až 19 % AML s NK (Baldus et al., 2007), pričom 6 – 10 % AML vykazuje *CEBPAdm* (Döhner et al., 2015). Štúdie opakovane potvrdili, že nález *CEBPAdm* je spojený s unikátnym profilom génovej expresie, iba sporadicky asociuje s *FLT3-ITD* a býva spojený s priaznivou prognózou v porovnaní s prípadmi bez akejkoľvek *CEBPAm*, ale predovšetkým v porovnaní s prípadmi s jednou *CEBPAm* (Dufour et al., 2010, How et al., 2013, Pabst a Mueller, 2009, Pastore et al., 2014, Taskesen et al., 2011, Wouters et al., 2009).

#### *WT1* (Wilm`s tumor, 11p13)

Zmeny v expresnom profile resp. v mutačnom statuse *WT1* vykazuje niekoľko ľudských nádorov, vrátane hematologických (Yang et al., 2007). Mutácie *WT1* (*WT1m*) sú rekurentné asi u 10 % AML s NK a sústreďujú sa v 2 mutačných hot-spotoch (exóny 7 a 9); niektoré štúdie poukázali na sporadický výskyt *WT1m* aj v ďalších exónoch, predovšetkým v exónoch 1, 2, 3 a 8 (Gaidzik et al., 2009). V exóne 7 prevládajú posunové mutácie, ktoré vedú k skráteniu proteínu WT1 a negatívne ovplyvňujú jeho schopnosť regulovať transkripciu. V 9. exóne *WT1* boli častejšie popísané mutácie meniace zmysel. *Missense* mutácie zasahujú do aminokyselinového zloženia výsledného proteínu, vedú k destabilizácii štruktúry zinkového prstu a touto cestou poškodzujú väzbu WT1 na DNA. U AML s NK bývajú *WT1m* spojené s RR (riziko relapsu), kratším RFS (prežitie bez relapsu), horším OS (celkové prežitie) a bývajú prítomné u prípadov primárne rezistentných na chemoterapiu (Becker et al., 2010, Hou et al., 2010, Owen et al., 2010). Niektoré práce upozornili na negatívny efekt *WT1m* na výsledky indukčnej liečby výlučne pri spoločnom výskyte *WT1m* a *FLT3-ITD* (Gaidzik et al., 2009).

### *IDH1 a IDH2 (isocitrate dehydrogenase 1 a 2, 2q33.3 a 15q26.1)*

Gény *IDH1* a *IDH2* kódujú cytoplazmatickú, resp. mitochondriálnu izoformu izocitrátdehydrogenázy, čo je *NADP+* závislý enzým zapojený do Krebsovho cyklu. V tomto cykle zodpovedajú izocitrátdehydrogenázy za dekarboxyláciu izocitrátu na  $\alpha$ -ketoglutarát ( $\alpha$ -KG). Pilotná štúdia v oblasti celogenómového sekvenovania AML poukázala na výskyt mutácií *IDH1* (*IDH1m*) až u 16 % AML s NK (Mardis et al., 2009). Následne sa popri *IDH1m* potvrdil výskyt mutácií v *IDH2* géne (*IDH2m*) u 8.7 % AML s NK (Marcucci et al., 2010). Rekurentný výskyt mutácií bol opakovane potvrdený v obidvoch génoch a odhaduje sa na 7 – 14 % (*IDH1m*) a 8 – 19 % (*IDH2m*) u AML dospelých (Döhner et al., 2015), resp. na ~ 11 % (*IDH1m*) (Patel et al., 2011) a ~ 15 % (*IDH2m*) (Abbas et al., 2010, Marcucci et al., 2010, Thol et al., 2010) u AML s NK. Popísané mutácie zasahujú vysoko konzervované kodóny arginínu R132 (*IDH1*), resp. R140 alebo R172 (*IDH2*), vyskytujú sa v heterozygotnej forme a je známe, že vďaka mutačnému zásahu získavajú izocitrátdehydrogenázy novú funkciu – dokážu premieňať  $\alpha$ -KG na 2-hydroxyglutarát (2-HG) (Ward et al., 2012). Mutácie v *IDH1* a *IDH2* sú sprevádzané zmenami v metylačnom profile DNA a histónov, spájajú sa s hypermetylovaným profilom v promótorových oblastiach kľúčových génov myelopoézy resp. všeobecne leukemogenézy a poškodzujú funkciu  $\alpha$ -KG dependentných enzýmov vrátane TET2 (Dang et al., 2010, Figueroa et al., 2010). Dáta zo štúdií, ktoré hodnotili prognostický význam *IDHm* u AML sú mimoriadne nekonzistentné (Im et al., 2014). V študovaných súboroch býva dokumentovaná asociácia *IDH1m* s *NPM1m*. Štúdie súčasne poukazujú na odlišnú klinickú hodnotu (i) *IDH1m* a *IDH2m*, resp. (ii) *IDH2m* v závislosti na zasiahnutom kodóne (R140 alebo R172) u AML. Výsledky ďalej naznačujú, že *IDH1m* (Marcucci et al., 2010, Paschka et al., 2010) a *IDH2m*, resp. konkrétne mutácie v kodónoch R140 a R172 génu *IDH2* (Marcucci et al., 2010, Patel et al., 2012) môžu ovplyvňovať prognózu v priaznivej molekulárnej skupine AML, resp. AML s NK s genotypom *NPM1m* bez *FLT3-ITD*. V tejto skupine vykazujú *IDH1m* a *IDH2*(R172) negatívny vplyv na klinický priebeh, naopak *IDH2*(R140) sa ukázali ako priaznivé markery AML v tejto molekulárnej skupine (Döhner et al., 2015).

*KMT2A (Lysine (K)-Specific Methyltransferase 2A, 11q23.3)*

Histónová metyltransferáza KMT2A (pôvodne MLL, *Mixed Lineage Leukemia*) plní významnú úlohu v regulácii krvotvorby a expresie homeobox génov a s akútnymi leukémiami býva spájaná primárne vďaka svojim početným onkogénnym chromozómovým prestavbám (Meyer et al., 2013). Asi u 5 % AML (5 – 11 % AML s NK) dochádza k čiastočnej tandemovej duplikácii *KMT2A* pozdĺž exónov 5 až 11, ktorá býva vložená (*in frame*) do intrónu 4 (Döhner et al., 2015, Mawad a Estey, 2012). Nález *KMT2A*-PTD býva dokumentovaný ako rizikový faktor skorého relapsu, čo má negatívny dopad na RFS u AML s NK (Baldus et al., 2007, Patel et al., 2012). Pri hodnotení prognostického významu tejto molekulárnej zmeny je potrebné zvážiť podiel (nezávislých a často nepriaznivých) kooperujúcich genetických markerov, medzi ktoré patrí trizómia 11 (~ 90 % prípadov), ale aj *FLT3*-ITD, ktoré konkurujú *KMT2A*-PTD asi u 30 % AML (Döhner et al., 2015, Kao et al., 2015).

#### 4.3. KLINICKÝ VÝZNAM GÉNOVÝCH MUTÁCIÍ REKURENTNÝCH U AML

Poznatky o cytogenetickom a molekulárnom pozadí leukemických blastov majú v klinickej praxi za cieľ prispieť k personalizovanej liečbe AML, ktorej spôsob a intenzita by sa volili na základe individuálnych charakteristík pacienta.

##### *Riziková stratifikácia AML*

Prvým terapeutickým cieľom, ktorý je spoločný pre všetkých pacientov s diagnózou AML, je navodiť kompletnú hematologickú remisiu ochorenia (ďalej KR, kritériá: < 5 % blastov v kostnej dreni, žiadne blasty s Auerovými tyčkami, žiadne blasty v krvi, normalizovaný krvný obraz – neutrofilý > 1.0 x 10<sup>9</sup>/L, trombocyty > 100 x 10<sup>9</sup>/L, hemoglobín > 100 g/L s nezávislosťou na transfúziách a neprítomnosť extramedulárnej leukémie (Döhner et al., 2010). Na úvodnú indukčnú liečbu obyčajne naväzuje intenzívna konsolidačná chemoterapia, ktorej súčasťou môže byť alogénna, prípadne autológna transplantácia krvotvorných buniek (TKB).

Odhaduje sa, že po indukčnej chemoterapii dosiahne KR asi 60 % až 85 % pacientov mladších (< 60 rokov), resp. 40 % až 60 % starších pacientov s AML (do hodnotenia nebvávajú zahrnuté prípady s diagnózou APL) (Döhner et al., 2015). U

väčšiny pacientov býva 1. KR vystriedaná relapsom ochorenia, najčastejšie v priebehu 2 až 3 rokov; s narastajúcim vekom sa riziko relapsu zvyšuje (z 50 % až 55 % u mladších na ~ 85 % u starších pacientov) (Burnett et al., 2011). Jedinou kuratívnu liečbou, ktorá dokáže u rizikových pacientov s AML ponúknuť šancu na dlhodobú, resp. stabilnú KR ostáva alogénna transplantácia krvotvorných buniek (aloTKB). Nezanedbateľné riziko úmrtnosti v súvislosti s absolvovaním aloTKB však vyžaduje individuálny prístup pri indikovaní takejto terapeuticko-terapeutickej intervencie, pričom je mimoriadne dôležité poznať faktory, ktoré pomáhajú vyčleniť zo skupiny rizikových AML takých pacientov, pre ktorých bude podstúpenie náročnej liečby aloTKB najviac prínosné.

Medzi stabilné indikátory odpovede na liečbu a celkovo predpokladu prežitia patria pri diagnóze AML karyotyp leukemických blastov a vek v dobe diagnózy (Döhner et al., 2010, Döhner et al., 2015, Szotkowski et al., 2010). Nález nepriaznivých cytogenetických zmien sa zaraďuje medzi kľúčové ukazovatele pre indikovanie aloTKB v 1. KR, pričom indikačné kritériá pre aloTKB všeobecne, nevynímajúc aloTKB s redukovanou intenzitou, nespĺňajú pacienti vo veku nad 65 až 70 rokov, ktorí tvoria asi jednu štvrtinu pacientov s AML.

Ako ďalší významný ukazovateľ klinického priebehu AML sa v posledných rokoch ukázali rekurentné génové mutácie prítomné v genóme leukemických blastov v dobe diagnózy (Döhner et al., 2015). Identifikácia prognosticky významných mutácií odštartovala v roku 2008 revíziu diagnostického a stratifikačného systému AML, ktorý sa primárne dotkol pacientov so strednou cytogenetickou prognózou (Vardiman et al., 2009, Swerdlow et al., 2008). Na základe návrhu ELN vznikla v roku 2010 prvá stratifikačná schéma, ktorá v klasifikácii AML zohľadnila mutačné profily v *NPM1*, *CEBPA* a *FLT3* génoch. V tejto schéme boli pacienti s *NPM1m* a *FLT3-ITD(-)* a súčasne pacienti s *CEBPAm* prvýkrát vyčlenení do priaznivej rizikovej skupiny AML (tabuľka 3) (Döhner et al., 2010). Zo stratifikácie sa vylúčili pacienti s APL, ktorí predstavujú samostatnú (mimoriadne priaznivú) rizikovú skupinu AML. V rámci strednej (intermediárnej) skupiny rozlíšila ELN dve podskupiny, podskupinu I a II (tabuľka 3). Do intermediárnej skupiny I sa zaradili všetky AML s NK, ktoré nebolo možné klasifikovať do priaznivej rizikovej skupiny; ide prevažne o prípady s nepriaznivou prognózou, ktoré boli odlišené z dôvodu potenciálne odlišnej odpovede na liečebné modality. Prognostickú hodnotu stratifikácie AML podľa kritérií ELN iniciálne otestoval Röllig a kolektív na súbore 1557 AML, ktorí boli liečení v rámci klinickej štúdie AML96 (Rollig et al., 2011). Výsledky tejto štúdie potvrdili, že na

základe modelu ELN je možné rozdeliť AML ( $\leq 60$  rokov) do 4 skupín, ktoré sa signifikantne odlišujú v prognóze na úrovni RR, DFS a OS. Intermediárna skupina II sa v tejto štúdií vyznačovala lepším klinickým priebehom v porovnaní s intermediárnou skupinou I. Identická stratifikácia nepotvrdila signifikantné rozdiely po rozdelení starších ( $> 60$  rokov) AML do 4 skupín, klinický priebeh intermediárnej skupiny I sa signifikantne nelíšil od intermediárnej skupiny II.

**Tabuľka 3 Cytogenetické a molekulárne rizikové skupiny AML stratifikované podľa kritérií ELN** (Döhner et al., 2010) Recentne prebehla revízia stratifikačnej schémy. Zmeny (vyznačené podčiarknutím) sa dotkli 3 bodov: (i) v rámci priaznivej rizikovej skupiny bola skupina *CEBPAm* AML obmedzená na skupinu *CEBPAdm* (bialelické), (ii) v rámci nepriaznivej skupiny *inv(3)(q21q26.2)* alebo *t(3;3)(q21;q26.2)* sa zaviedlo molekulárne značenie *GATA2-MECOM (EVII)*, (iii) pre označenie *MLL* sa zaviedol oficiálny symbol *KMT2A* (Döhner et al., 2015).

Genetická riziková	Podskupina
Priaznivá	<i>t(8;21)(q22;q22); RUNX1-RUNX1T1</i> <i>inv(16)(p13.1q22)</i> alebo <i>t(16;16)(p13.1;q22); CBFβ-MYH11</i> mutovaný <i>NPM1</i> bez <i>FLT3-ITD</i> (normálny karyotyp) <u>mutovaný <i>CEBPA</i></u> (normálny karyotyp)
Intermediárna I	mutovaný <i>NPM1</i> a <i>FLT3-ITD</i> (normálny karyotyp) <i>wild-type NPM1</i> a <i>FLT3-ITD</i> (normálny karyotyp) <i>wild-type NPM1</i> aj <i>FLT3</i> (normálny karyotyp)
Intermediárna II	<i>t(9;11)(p22;q23); MLLT3-<u>MLL</u></i> cytogenetické zmeny neklasifikovateľné ako priaznivé alebo
Nepriaznivá	<i>inv(3)(q21q26.2)</i> alebo <i>t(3;3)(q21;q26.2); <u>RPNI-EVII</u></i> <i>t(6;9)(p23;q34); DEK-NUP214</i> <i>t(v;11)(v;q23)</i> ; prestavby <u><i>MLL</i></u> -5 alebo <i>del(5q)</i> ; -7; 17p abnormality; komplexný karyotyp

Analýza *NPM1m*, *CEBPAm* a *FLT3-ITD* sa stala obligátnou súčasťou klinických štúdií a mutačné profily uvedených génov sa odporúča zhodnotiť u pacientov s AML s NK v dennej terapeutickú praxi (Rollig et al., 2011). Hoci klinický význam ďalších génových mutácií rekurentných u AML sa dosiaľ nepodarilo zjednotiť, snaha o ich uplatnenie pri rizikovej stratifikácii AML pretrváva. Napríklad Patel a kolektív rozdelili AML do rizikových skupín na základe schémy, ktorá v porovnaní s ELN integrovala do štandardnej cytogenetickej stratifikácie AML až 10 rôznych génových mutácií vrátane *NPM1m*, *FLT3-ITD* a *CEBPAm* a súčasne *IDH1m*, *IDH2m* a *KMT2A-PTD* (pôvodne *MLL-PTD*), ktoré boli vyšetrené aj v experimentálnej časti tejto práce (Patel et al., 2012) (tabuľka 4). Iný prognostický systém uniformne založený na



molekulárnej detekcii AML špecifických fúzných génov *PML/RARA*, *RUNX1/RUNX1T1*, *CBFB/MYH11* a súčasne 7 rekurentných génových mutácií (*CEBPA*, *NPM1*, *RUNX1*, *ASXL1*, *TP53*, *FLT3-ITD* a *KMT2A-PTD*) navrhla pre rizikovú stratifikáciu AML iná významná AML pracovná skupina (Grossmann et al., 2012).

**Tabuľka 4 - Riziková stratifikácia pacientov s AML na základe integrovanej genetickej analýzy (Patel et al., 2012); +/- - áno/nie**

Cytogenetická klasifikácia	Mutácie		Celkový odhad rizika
priaznivá	ktorákoľvek		priaznivé
normálny karyotyp alebo cytogenetické markery stredného rizika	<i>FLT3-ITD</i> (-)	<i>NPM1</i> m + <i>IDH1</i> m resp. <i>IDH2</i> m	stredné
	<i>FLT3-ITD</i> (-)	bez <i>ASXL1</i> m, <i>MLL-PTD</i> , <i>PHF6</i> m a <i>TET2</i> m	
	<i>FLT3-ITD</i> (-) alebo (+)	<i>CEBPA</i> m	
	<i>FLT3-ITD</i> (+)	bez <i>MLL-PTD</i> , <i>TET2</i> m a <i>DNMT3A</i> m, bez trizómie 8	nepriaznivé
	<i>FLT3-ITD</i> (-)	<i>ASXL1</i> m, <i>MLL-PTD</i> , <i>PHF6</i> m alebo <i>TET2</i> m	
<i>FLT3-ITD</i> (+)	<i>MLL-PTD</i> , <i>TET2</i> m a <i>DNMT3A</i> m, alebo trizómia 8, bez <i>CEBPA</i> m		
nepriaznivá	ktorákoľvek		

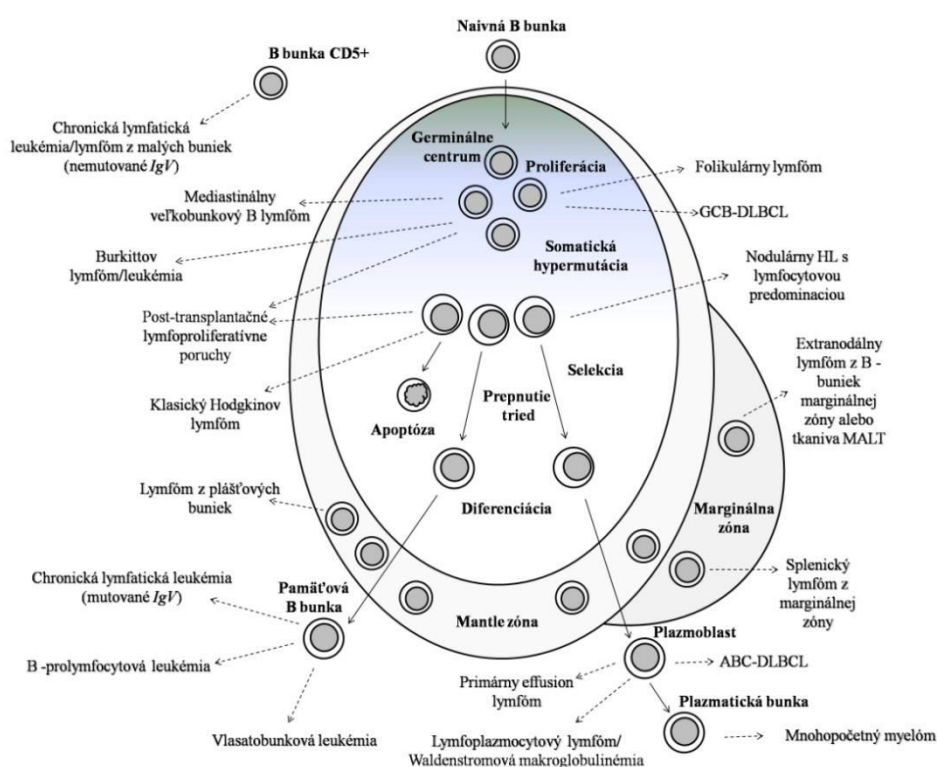
V súlade s vyššie zhodnotenými kritériami WHO a ELN rozlišuje aj *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) u AML s NK dve samostatné priaznivé molekulárne skupiny (i) *NPM1*m bez *FLT3-ITD* a (ii) izolované *CEBPA*m. Nález *FLT3-ITD* (bez zohľadňovania mutačného profilu *NPM1* resp. *CEBPA*) radí pacientov s AML s NK do nepriaznivej rizikovej skupiny; v tejto skupine AML s NK sa všeobecne očakáva horší priebeh leukémie a v prípade možnosti sa odporúča u pacientov s touto molekulárnou zmenou zvážiť ich zaradenie do klinických štúdií. Jedine v pokynoch NCCN sa v súvislosti s AML s NK dosiaľ vyskytli medzi molekulárnymi abnormalitami mutácie v *TP53*, ktoré sú považované podľa aktuálnych kritérií NCCN za marker nepriaznivej prognózu u AML s NK (O'Donnell et al., 2016).

V Laboratóriu molekulárnej biológie FNOL a LF UP v Olomouci som sa počas doktorandského štúdia venovala od roku 2006 analýze molekulárnych zmien u AML. Predpokladali sme, že poznanie špecifických mutačných profilov rozšíri možnosti prognostickej stratifikácie pacientov do rizikových skupín, čo nájde uplatnenie pri voľbe terapeutických modalít v tejto skupine hematologických malignít. Získané výsledky boli prezentované v experimentálnej časti tejto práce (kapitola IV, časť 1.).

## 5. MALIGNITY ODVODENÉ OD B-LYMFOCYTOV

### 5.1. VZNIK A BUNKOVÝ PŮVOD MALIGNÍT B-LYMFOCYTOV

Malignity odvozené od B-lymfocytov predstavujú mimoriadne početnú a rôznorodú skupinu hematologických neoplázií. Nádorová transformácia zasahuje B-lymfocyty na rozličnom stupni diferenciácie a je typické, že v priebehu neoplastickej transformácie bývajú zachované kľúčové znaky B-lymfoidného prekursora, vrátane špecifických ukazovateľov štádia diferenciácie, v ktorom sa v čase neoplastickej transformácie táto bunka nachádzala (obrázok 2).



**Obrázok 2 - Bunkový pôvod B-lymfoidných malignít.** Naivné B-bunky (ekvivalent B-lymfocytov) sú po vstupe do sekundárnych lymfoidných orgánov smerované k primárnym B-bunkovým folikulom a zakladajú tzv. germinálne centrum (GC, vnútorná ohraničená oblasť). Po aktivácii antigénom diferencujú v centroblasty, proliferujú (klonálna expanzia) a presúvajú sa do vonkajšej oblasti folikulu (tzv. *mantle zóna* okolo GC). Proliferujúce B-bunky sa sústreďujú v tmavej zóne GC, kde počas klonálnej expanzie podstupujú proces somatických hypermutácií a diferencujú v centrocyty. Centrocyty, ktoré získali nevýhodné mutácie podstupujú apoptózu. Centrocyty, ktoré získali mutácie zvyšujúce afinitu BCR k antigénu sú v svetlej zóne GC pozitívne selektované (CD4+ T-lymfocyty a folikulárne dendritické bunky), podstupujú prešmyk/prepnutie tried, diferencujú do pamäťových B-buniek alebo do plazmatických buniek a opúšťajú mikroprostredie GC. Väčšina B-lymfoidných malignít je odvozená od germinálnych, prípadne post-germinálnych B-buniek. Prevzaté a upravené (Seifert et al., 2013, Šmardová et al. 2014).

*ABC-DLBCL* – difúzny veľkobunkový lymfóm z aktivovaných B-lymfocytov; *GCB-DLBCL* – difúzny veľkobunkový lymfóm z B-buniek germinálneho centra, *MALT* – slizničné lymfatické tkanivo (*mucosa associated lymphoid tissue*)

Z pohľadu nádorovej transformácie B-lymfocyту sa za významný rizikový faktor považuje masívna proliferácia, ktorá sprevádza klonálnu expanziu B-lymfocytov v GC. Je tiež známe, že normálny vývoj B-lymfocytov v GC sprevádzajú somatické hypermutácie a izotypový prešmyk, ktoré významne editujú genetickú informáciu vyvíjajúcich sa buniek. Spoločné pôsobenie týchto faktorov stupňuje riziko nádorovej transformácie B - lymfocyту (obrázok 2) (Seifert et al., 2013).

## 5.2. GENETICKÁ PATOGENÉZA MALIGNÍT B-LYMFOCYTOV

Rozvoj malígneho fenotypu býva u B-lymfoidných malignít spájaný s poruchami vo viacerých kontrolných bodoch, ktoré súhrnne zodpovedajú za správny priebeh diferenciácie B-lymfocyту. Nádorovú transformáciu B-lymfocyту veľmi často charakterizujú poruchy kontroly v procesoch proliferácie a apoptózy. Počas svojej klonálnej evolúcie získavajú vybrané B-bunkové lymfómy vďaka rôznorodým genetickým zásahom schopnosti, ktoré im dovoľujú obísť signály zodpovedné za spustenie apoptózy, ktorú principiálne reguluje gén *TP53* (17p13.1) resp. jeho produkt – TF p53. Medzi kľúčové znaky malígneho B-lymfocyту patrí taktiež neprimeraná odpoveď na stres a poškodenie DNA, ktorá býva v týchto bunkách prepojená s inaktiváciou (mutácie, delécie, epigenetická deregulácia) lokusov, ktoré kódujú niektorý z regulátorov kontrolných bodov bunkového cyklu - *ATM* (11q22.3) resp. *CDKN2A* (9p21.3). Ďalší priebeh nádorového procesu významne určuje mikroprostredie, ktoré je tvorené nenádorovými bunkami. Je podstatné, že náhodné genetické zmeny sú v patogenéze tejto skupiny malignít združené s genetickými zásahmi, ktoré sprevádzajú fyziologicky naprogramovanú diferenciáciu B-lymfocyту. Bunky s evolučne najviac výhodným genotypom sú počas patogenézy B-lymfoidných malignít selektované a obyčajne pokračujú v akumulácii ďalších, vysoko variabilných zásahov, ktoré zahŕňajú napríklad zmeny na podklade vírusových infekcií, či zmeny genetické, resp. epigenetické (Seifert et al., 2013).

Medzi najčastejšie štrukturálne abnormality, ktoré pozorujeme v genóme B-lymfoidných malignít patria chromozómové translokácie (Šmardová et al. 2014). Najviac sa vyskytujú translokácie, ktoré zasahujú niektorý z lokusov pre ľudské imunoglobulíny (prevažne *IGH* na 14q32.33) a proto-onkogény. V patomechanizme lymfoidných malignít je kľúčové, že cestou Ig translokácií sa dostávajú proto-onkogény

lokalizované na rozličných chromozómových lokusoch do blízkosti mimoriadne aktívneho Ig zosilovača (enhancer), čo vedie k deregulácii ich expresie (k aktivácii proto-onkogénu v onkogén) v B-lymfocytoch. Napríklad, prevažná väčšina (> 90 %) folikulárných lymfómov sa vyznačuje translokáciou t(14;18) *BCL2/IGH*, ktorá zodpovedá za aktiváciu a kontinuálnu expresiu onkogénu *BCL2* (18q21.3) (Jäger et al., 2000). Podobne bývajú aktivované onkogény *MYC* (8q24) u Burkittovho lymfómu a *CCND1* (*PRAD1/BCL1/cyklinD1*, 11q31) u lymfómu z plášťových buniek. Tieto B-lymfómy sú často charakterizované rekurentnými chromozómovými translokáciami t(8;14) *MYC/IGH*, resp. t(11;14) *CCND1/IGH*. Iné malignity B-lymfocytov, vrátane DLBCL a mnohopočetného myelómu sa naopak vyznačujú významne heterogénnou genetickou bázou s nálezom viacerých odlišných typov chromozómových translokácií.

Okrem početných cytogenetických a molekulárnych markerov poukázali recentné štúdie na abnormálny profil histónového kódu a/alebo metylácie DNA, ktorý charakterizuje lymfómové bunky v porovnaní s nemalígnymi bunkami (Ammerpohl et al., 2012, Hopp et al., 2015a, Hopp et al., 2015b, Martin-Subero et al., 2009). Osobitná pozornosť sa v posledných rokoch obrátila aj na štúdium nekódujúcich RNA a ich úlohy v tumorigenéze. Tieto gény bývajú evolučne vysoko konzervované a často ich nachádzame vo fragilných miestach ľudského genómu resp. v oblastiach asociovaných s nádormi (oblasti straty heterozygoty, najmenšie oblasti amplifikácie genetického materiálu, oblasti chromozómových zlomov). Ide o mimoriadne heterogénnu skupinu transkriptov bez otvoreného čítacieho rámca (nekódujú proteíny), ktoré zahŕňajú krátke nekódujúce RNA, vrátane intenzívne študovaných miRNA (~ 22 nt), ale aj dlhé nekódujúce RNA (> 200 nt dlhé) (Van Roosbroeck et al., 2013). Dlhoročný výskum ukázal, že deregulácia nekódujúcich RNA sprevádza patogenézu takmer všetkých hematologických malignít, pričom je kľúčové, že nekódujúce RNA môžu v nádorovej transformácii krvotvornej bunky fungovať ako nádorové supresory a/alebo proto-onkogény podobne, ako to poznáme u génov kódujúcich proteíny. Známym príkladom z molekulárnej patogenézy CLL je del13q14, ktorá vedie k inaktivácii dvoch miRNA - *miR15a/16-1* (ide o lokus *DLEU2*, *deleted in lymphocytic leukemia-2*) (Calin et al., 2002). Výsledkom je aberantná expresia cieľových génov *miR15a/16-1*, vrátane *BCL2* (B-cell CLL/lymphoma 2, 18q21.3), cyklínov *CCND1*, *CCND3*, cyklínindependentnej kinázy 6 (*CDK6*). Je súčasne známe, že transgénne myši s deléciou *miR15a/16-1* dokážu rozvinúť CLL, resp. typ leukémie príbuzný CLL (Klein et al., 2010).

Predmetom štúdia sa v mojej dizertačnej práci stali pacienti s vybranými skupinami B-lymfoidných malignít, u ktorých cytogenetické a molekulárne cytogenetické štúdie poukázali na chromozómové aberácie (delécie, inverzie, translokácie) v oblasti *IGH* (14q32.33). Predpokladali sme, že v mieste špecifických chromozómových aberácií na 14q sa budú vyskytovať kandidátne gény, ktoré zodpovedajú za patogenézu študovaných B-lymfoproliferatívnych malignít. Podieľala som sa na štúdiu molekulárnej patogenézy 2 skupín lymfoproliferatívnych neoplázií: prvý súbor predstavovali pacienti s malignitami B-lymfocytov, ktoré charakterizujú intersticiálne delécie chromozómu 14 v oblasti *IGH* (14q32.33); druhý súbor tvorili pacienti s diagnózou B-lymfoidných neoplázií, ktoré sú asociované s vilóznymi lymfocytmi a s rekurentnými inter- resp. intrachromozómovými aberáciami v oblasti 14q32.13/14q32.33.

### 5.3. INTERSTICIÁLNE DELÉCIE CHROMOZÓMU 14 U MALIGNÍT B - LYMFOCYTOV

Intersticiálne delécie na dlhom ramene chromozómu 14 (ďalej 14q) boli pôvodne popísané u 21 prípadov s diagnózou rôznych leukémií a lymfómov odvodených od B-lymfocytov, vrátane CLL, indolentného (nízko agresívny) lymfómu a mnohopočetného myelómu. Molekulárne cytogenetické štúdie identifikovali na 14q dva rôzne typy delécií: i) zahŕňajúce lokus *IGH* v oblasti 14q32.33 [ďalej del(14q/*IGH*)] a ii) nezahŕňajúce lokus *IGH*. Iniciálna hypotéza predpokladala neznámy proto-onkogén na 14q, ktorý je v prípadoch s del(14q/*IGH*) deregulovaný regulačnými elementmi *IGH*. Napriek komplexnému prístupu pilotnej štúdie, ktorá stanovila expresný profil početných kandidátnych génov z proximálnej oblasti zlomu rekurentných del(14)(q24.1q23.33) sa nepodarilo identifikovať žiadny uniformne nadexprimovaný gén (Pospisilova et al., 2007).

V predloženej dizertačnej práci som zhrnula výsledky štúdie, ktorá mala za cieľ objasniť neznámy molekulárny mechanizmus del(14q/*IGH*) v dokumentovaných prípadoch s malignitami B-lymfocytov. Uvažovali sme, že nález del(14q/*IGH*) môže u týchto malignít poukazovať na putatívny nádorový supresorový gén, ktorý mapuje do oblasti s deletovanou genetickou informáciou na 14q.

Najmenšia spoločne deletovaná oblasť (MDR) predstavuje úsek v rozsahu asi 10.5 Mb (14q32.13q32.33). Tento úsek zahŕňa imprintovanú doménu, ktorá sa u človeka nachádza na lokuse 14q32.2q32.31 (Wylie et al., 2000). Imprintované gény predstavujú osobitnú kategóriu epigeneticky regulovaných génov. Napriek 2 homologickým alelám sú funkčne haploidné, čo znamená, že vykazujú parentálne špecifický profil expzie iba z 1 alely, druhú majú imprintovanú, čiže transkripčne neaktívnu.

V regulácii imprintingu sú esenciálne vybrané úseky genómu, známe tiež ako oblasti riadiace imprinting (*imprinting control regions*, ICR), čo sú diferenciálne metylované časti DNA, ktoré asociujú s imprintovanými doménami (Bartolomei a Ferguson-Smith, 2011). S imprintovanou doménou na 14q32.2q32.31 sú spojené aspoň 2 diferenciálne metylované oblasti (*differentially methylated region*, DMR), ktoré plnia úlohu ICR: (i) primárna, zárodočná DMR medzi génmi *DLK1* a *GTL2*, tiež *DLK1-GTL2* IG-DMR (*intergenic differentially methylated region*) a (ii) sekundárna, post-fertilizačne derivovaná *MEG3 (GTL2)* DMR. V somatických bunkách bývajú DMR

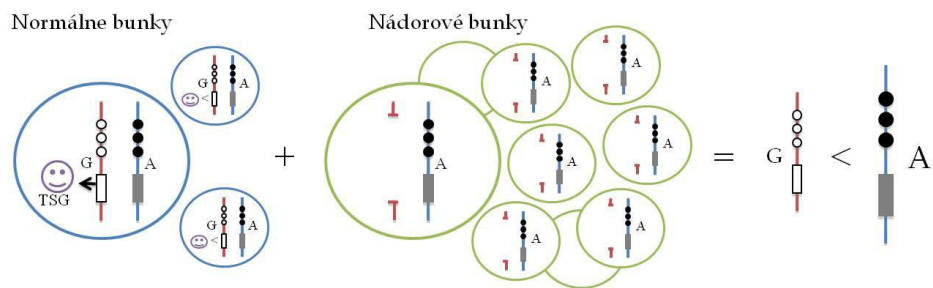
v oblasti 14q32 uniformne paternálne hypermetylované; pokiaľ sú tieto úseky maternálneho pôvodu, vyznačujú sa hypometylovaným profilom. Diferenciálne metylované oblasti regulujú imprinting všetkých génov združených v imprintovanej doméne na 14q32. Z práce Kagami a kolektívu vyplynulo, že IG-DMR predstavuje hierarchicky vyšší ICR, ktorý ovplyvňuje nielen metylačný profil génov združených v 14q32 imprintovanej doméne, ale aj *MEG3* (*GTL2*) DMR (Kagami et al., 2010).

V imprintovanej doméne na 14q32.2q32.31 sa nachádzajú 3 proteín kódujúce gény - *DLK1*, *RTL1* a *DIO3*, ktoré sú exprimované selektívne z paternálnej alely (*paternally expressed genes*, PEGs). K nim recipročne imprintované sú gény *GTL2* (tiež *MEG3*), *MEG8* (tiež *RIAN*) a antisense *RTL1* (*asRTL1*), ktoré predstavujú dlhé nekódujúce RNA (*long non-coding RNA*, *lncRNA*) a vyznačujú sa expresiou selektívne z maternálnej alely (*maternally expressed genes*, MEGs). Mimoriadne početnú kategóriu tvoria malé nekódujúce RNA, ktoré zahŕňajú niekoľko malých jadierkových RNA (*small nucleolar RNA*, *snoRNA*) a jeden z najrozsiahlšieho zhluku (> 50) *microRNA* (*miRNA*) v ľudskom genóme (Benetatos et al., 2013).

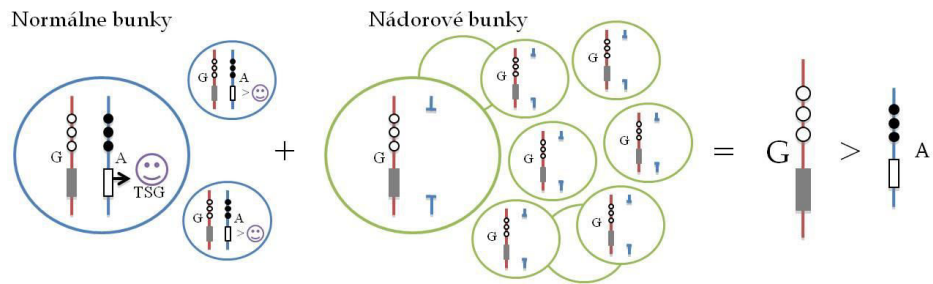
Zmeny v epigenetických profiloch, vrátane zmien v metylácii DNA sprevádzajú patogenézu mnohých humánnych nádorov. Z nich vybrané vykazujú zmeny v metylačnom profile aj v imprintovanej *DLK1-GTL2* doméne (Astuti et al., 2005). Paternálne exprimovaný *DLK1* plní úlohu nádorového supresora u karcinómu renálnych buniek (Kawakami et al., 2006). Nekódujúca RNA *MEG3* interaguje s p53/MDM2, je zapojená do regulácie proliferácie, diferenciácie a prežívania buniek a ovplyvňuje kľúčové signálne dráhy spojené s angiogenezou. Predstavuje putatívny nádorový supresor vo viacerých typoch solídnych aj hematologických nádorov (Benetatos et al., 2011, Gejman et al., 2008, Zhou et al., 2012). Napokon *miRNA* lokalizované v imprintovanej oblasti na 14q32.2q32.31 sú významne zahrnuté v kontrole bunkového cyklu a imunitnej odpovede a plnia úlohu kandidátneho nádorového supresora (tiež *anti oncomir*) v patogeneze ľudských epiteliálnych nádorov (Benetatos et al., 2013, Zhang et al., 2008).

Naša hypotéza znela: ak je kandidátny nádorový supresorový gén asociovaný s *del(14q/IGH)* lokalizovaný v imprintovanej *DLK1-GTL2* doméne, môže byť inaktivovaný v 1 kroku – cieľenou deléciou jeho funkčnej alely. Popísaná pracovná hypotéza bola schématicky znázornená na obrázku 3. Získané výsledky boli prezentované v experimentálnej časti tejto práce (kapitola IV, časť 2.).

A) Delécia maternálne exprimovaného TSG



B) Delécia paternálne exprimovaného TSG



**Obrázok 3 - Pracovné hypotézy** Prvá hypotéza (A) predpokladala imprintovaný, maternálne exprimovaný tumor supresorový gén (TSG). Delécia maternálnej alely (G, červená) vedie k úplnej strate transkriptov TSG v neoplastických bunkách, nakoľko paternálna kópia (A, modrá) je epigeneticky umlčaná. Za predpokladu, že vzorky biologického materiálu predstavujú zmes neoplastických a fyziologicky normálnych buniek, delécia na 14q má za následok nerovnováhu alel v informatívnych jednonukleotidových polymorfizmoch DNA (SNP). Deletovaná alela je v porovnaní s intaktnou, homologickou alelou v minoritnom zastúpení. Parentálny pôvod deletovanej alely sa určí na základe špecifického metylačného profilu parentálnych alel (paternálnej *versus* maternálnej) v *DLK1-GTL2* IG-DMR. Alternatívna hypotéza (B) predpokladala paternálne exprimovaný TSG a rovnaký priebeh v prípade jeho delécie v nádorových bunkách (upravené podľa Katrincsakova et al., 2009, príloha 5)



#### 5.4. ABERÁCIE CHROMOZÓMU 14 V SKUPINE B-LYMFROIDNÝCH NEOPLÁZIÍ ASOCIOVANÝCH S VILÓZNYMI LYMFOCYTMÍ

Cytogenetické a molekulárne cytogenetické štúdie poukázali na rekurentné chromozómové aberácie v oblasti 14q32.13/14q32.33 celkom v 5 prípadoch s diagnózou malignita B-lymfocytov s cirkulujúcimi vilóznymi lymfocytmi. Táto súhrnná diagnóza zahŕňa celkom 3 rôzne neoplázie zrelých B-lymfocytov: vlasatobunkovú leukémiu (HCL), variantnú formu HCL (HCL-v) a splénický lymfóm marginálnej zóny (SMZL) (Tiacchi et al., 2006) (obrázok 2). Spoločným znakom týchto indolentných, chronických B-lymfoidných malignít je vilózna morfológia neoplastických buniek (Matutes et al., 1994a, Matutes et al., 1994b, Matutes et al., 2003); vilózne lymfocyty infiltrujú primárne slezinu, kostnú dreň a periférnu krv, lymfatické uzliny postihujú zriedkavo (Swerdlow et al., 2008). Molekulárne cytogenetické analýzy ukázali, že  $t(14;14)(q32.13;q32.33)$  zahŕňajú lokus *IGH* (14q32.33) a chromozómový zlom mapuje do oblasti 14q32.13, ktorá nesie zhluk 3 T cell leukemia/lymphoma génov (*TCL-1A*, *TCL-1B*, *TCL-6*), konkrétne do oblasti medzi *TCL6* a *TCL1B* (1prípád) resp. do oblasti distálne k *TCL1A* (2 prípady). Ďalšie 2 prípady sa vyznačovali kryptickou  $inv(14)(q32.13q32.33)$  taktiež zahŕňajúcou lokusy *IGH* a *TCL1-6* (Urbankova, 2009, Urbankova et al., 2012, príloha 6).

Posledná kapitola predloženej dizertačnej práce sumarizuje výsledky mojej experimentálnej práce na tejto skupine hematologických malignít. Do projektu som sa zapojila vo fáze, kedy boli dostupné výsledky molekulárnych analýz, ktoré stanovili hladinu expresie génov *TCL1A*, *TCL1B* a *TCL6* a expresný profil celkom 5 kandidátnych génov lokalizovaných centroméricky k lokusu 14q32.13, resp. ďalších 13 kandidátnych génov z oblasti teloméricky k 14q32.13 (Urbankova et al., 2012, príloha 6). Podnet k experimentom, ktoré som realizovala vychádzal z dát, ktoré publikoval Calin a kolektív vo svojej priekopníckej práci venovanej štúdiu dlhých nekódujúcich RNA transkribovaných z ultrakonzervovaných oblastí (*transcribed ultraconserved regions*, *T-UCR*) (Calin et al., 2007). Tieto inter/intragénové úseky ľudského genómu sú absolútne konzervované medzi humánnymi a hlodavčími genómami (myši a potkany) a citovaná práca patrí medzi pilotné štúdie, ktoré zmienili ich význam v patogenéze ľudských karcinómov a leukémií, konkrétne u CLL.

V snahe pátrať po molekulárnom mechanizme aberácií na 14q32.13/14q32.33 v skupine B-lymfoidných malignít asociovaných s vilóznymi lymfocytmi sme

predpokladali potenciálnu úlohu vybraných členov T-UCR v študovaných prípadoch. V oblasti chromozómu 14 sme identifikovali celkom 24 rôznych T-UCR. Z nich sme po detailnej analýze cieľovej oblasti v dokumentovaných prípadoch s t(14;14)(q32.13;q32.33) resp. inv(14)(q32.13q32.33) vybrali celkom 3 T-UCR, uc.379 (chr14: 95421409 – 95421660), uc.380 (chr14: 957526635 – 95752866) a uc.381 (chr.14:95869331 – 95869668). Tieto T-UCR mapujú do oblasti *upstream* od génu *VRK1* (14q32.2), ktorý patrí do skupiny 18 kandidátnych proteín kódujúcich génov v našej molekulárnej štúdii (Urbankova et al., 2012, príloha 6). Získané dáta o expresnom profile 3 kandidátnych T-UCR v študovanej skupine B-lymfoidných malignít boli prezentované v experimentálnej časti tejto práce (kapitola IV, časť 3.).

## II. CIELE PRÁCE

Predložená dizertačná práca s názvom Molekulárna biológia hematologických malignít bola venovaná dvom hlavným okruhom:

okruh I: Molekulárna charakterizácia akútnych myeloblastových leukémií s normálnym karyotypom (AML s NK)

okruh II: Štúdium molekulárnej podstaty abnormalít chromozómu 14 v oblasti *IGH* (14q32.33) u vybraných B-lymfoidných malignít

V časti venovanej AML mala táto práca za cieľ:

- o zaviesť detekciu génových mutácií s rekurentným výskytom u AML s NK do laboratórnej praxe
- o vytvoriť súbor AML s NK a určiť frekvenciu a distribúciu génových mutácií v tomto súbore
- o zhodnotiť, či molekulárna stratifikácia má klinický význam v študovanom súbore AML s NK diagnostikovaných a kuratívne liečených na HOK FNOL a zhodnotiť získané dáta v kontexte s publikovanými štúdiami

V časti venovanej štúdiu molekulárnej podstaty abnormalít chromozómu 14 u vybraných B-lymfoidných malignít s cytogenetickými aberáciami v oblasti *IGH* (14q32.33) mala táto práca za cieľ:

- o overiť hypotézu o nenáhodnom výbere deletovaných aliel 14q v súbore pacientov s cytogeneticky potvrdenou intersticiálnou del(14q/*IGH*)
- o overiť hypotézu o úlohe nekódujúcich RNA transkribovaných z ultra konzervovaných oblastí (T-UCR) na 14q32 v molekulárnej patogenéze B-lymfoidných malignít asociovaných s vilóznymi lymfocytmi s abnormalitami v oblasti 14q32.13/14q32

### III. MATERIÁL A METÓDY

#### 1. PRÍPRAVA TEMPLÁTU PRE MOLEKULÁRNE ANALÝZY

##### IZOLÁCIA DNA

Genómická DNA bola izolovaná metódou fenol-chloroformovej extrakcie nukleových kyselín. V časti prípadov bola genómická DNA získaná pomocou komerčného kitu *Gentra Puregene Blood Kit* na základe postupu odporúčaného výrobcom (*Qiagen, Hilden, Germany*). DNA bola homogenizovaná v roztoku 10 mmol.l-1 TRIS pH 7.5. Jej koncentrácia a čistota bola určená spektrofotometricky na prístroji NanoDrop ND 1000 (*Thermo Fisher Scientific, Wilmington USA*).

##### IZOLÁCIA RNA A REVERZNÁ TRANSKRIPCIA

###### *Analýza molekulárnych zmien u AML s NK na úrovni RNA*

Celková RNA bola izolovaná pomocou Trizol reagentu podľa protokolu výrobcu (*Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA*); kvalita a kvantita RNA bola overená spektrofotometricky (NanoDrop ND 1000, *Thermo Fisher Scientific, Wilmington USA*) a agarózovou gélovou elektroforézou. Reverzná transkripcia: RNA (1 µg) bola inkubovaná 10 min pri 70 °C a po ochladení (5 min/ľad) bola zmiešaná s RT pre-mixom: *5xExpand TM reverse transcriptase buffer first str*a (4 µl, 1x), 50mM MgCl<sub>2</sub> (2 µl, 5 mM), 10 mM dNTPs (2 µl, 1 mM), 100 mM DTT (2 µl, 10 mM), inhibítor RNáz (0.5 µl, 20 U), náhodné hexaméry (5 µl, 25 µM), reverzná transkriptáza Superscript II (0.5 µl, 100 U) a DEPC voda do celkového objemu 20 µl. Objem jednotlivých zložiek a výsledná koncentrácia v reakčnej zmesi bola uvedená v zátvorkách. Algoritmus reverznej transkripcie: 20°C/10 min; 42°C/45 min; 99°C/3min. Získané vzorky cDNA boli doplnené na celkový objem 50 µl sterilnou vodou.

###### *Analýza expresie dlhých nekódujúcich RNA na chromozóme 14 v skupine B-lymfoidných malignít s abnormalitami v oblasti 14q32.13/14q32.33*

Vzorky RNA boli získané postupom, ktorý kombinoval štandardnú homogenizáciu buniek v Trizol reagente (slezina), resp. v Trizol LS (periférna krv) s protokolom extrakcie RNA pomocou komerčného kitu *RNAeasy mini kit* (*Qiagen, Hilden, Germany*). Rezy sleziny po splenektómii (50 až 10 mg tkanív resp. 5-10x10<sup>6</sup> buniek) boli homogenizované v 500 µl Trizol reagentu (resp. 250 µl periférnej krvi v 750 µl Trizol LS), inkubované (5 min/izbová teplota), homogenizované v 100 µl (slezina) resp. 200 µl (periférna krv) chloroformu a separované pri 12000 rpm/25 min/4 °C. K vrchnej (vodnej) fáze bol pridaný 1 objem 70 % etanolu a zmes sa preniesla na mini kolónku (súčasť komerčného kitu *RNAeasy mini kit, Qiagen, Hilden Germany*). Postup extrakcie

RNA prebiehal pomocou komerčne dodávaných roztokov podľa protokolu výrobcu (*RNeasy mini kit Handbook*). Genómická DNA bola z izolovanej RNA odstránená DNázou I (30 min / 37 °C) podľa postupu výrobcu enzýmu (*Roche, Basel, Switzerla*). Reverzná transkripcia prebiehala v celkovom objeme 20 µl nasledovne: K RNA (objem odpovedajúci 1 µg) boli pridané náhodné hexaméry (3µg/µl, 1 µl) a reakcia bola doplnená do celkového objemu 13 µl DEPC vodou. Vzorky boli inkubované 5 min pri 70 °C, schladené a bol k nim pridaný 5x *First Strand Buffer* (4 µl), 10mM dNTPs (1 µl) a 0.1 M DTT (2 µl). Počas inkubácie (10 min/izbová teplota) bol zo vzorky odpipetovaný objem 1 µl do 3 µl vody. Získané vzorky slúžili ako kontrolné vzorky (tzv. *non-amplification control, NAC*). K ostávajúcej reakčnej zmesi bola pridaná reverzná transkriptáza (0.5 µl) a zmes bola inkubovaná 50 min pri 42°C. Reakcia bola zastavená pri 70 °C/10 min; vzorky cDNA boli doplnené na celkový objem 50 µl vodou prostou RNáz (výsledná koncentrácia = 20ng/µl) a podrobené RT-qPCR.

## 2. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ PRVÁ: ANALÝZA VYBRANÝCH MUTÁCIÍ REKURENTNÝCH U AML s NK

### 3.1. SÚBOR PACIENTOV

Analyzovaný súbor tvorili pacienti diagnostikovaní a kuratívne liečení na HOK FNOL v rokoch 1997 – 2012 s diagnózou primárna (*de novo*) AML s NK. Cytogenetické vyšetrenie diagnostických vzoriek kostnej drene, resp. periférnej krvi pacientov prebiehalo v Laboratóriu cytogenetiky a molekulárnej cytogenetiky HOK FNOL. Pacienti s *de novo* AML boli do molekulárnej štúdie zaradení v prípade, ak metódami klasickej cytogenetiky neboli potvrdené žiadne zmeny karyotypu. Molekulárnej analýze boli podrobené vzorky kostnej drene a/alebo periférnej krvi pacientov z doby diagnózy. Súbor zahŕňal 89 *de novo* AML s NK (43 mužov a 46 žien) vo veku 22.4 – 72.2 (medián 54.8 rokov), podiel mladších pacientov do vekovej hranice 60 rokov (< 60.0 rokov) tvoril 66 % (59/89) (tabuľka 15). Každý pacient zaradený do súboru podpísal informovaný súhlas s odberom biologického materiálu pre potreby laboratórnej diagnostiky v súlade so štandardným operačným postupom na HOK FNOL.

Pacienti boli najčastejšie liečení indukčným režimom “7+3” (kombinácia cytarabín 7 dní + antracyklín 3 dni); ak nedosiahli KR po 1. indukčnom cykle, pokračovali v záchrannom (salvážovom) chemoterapeutickom režime FLAG (fludarabín, cytarabín a faktor stimulujúci kolónie granulocytov). Konsolidačná terapia pozostávala z ďalšieho cyklu chemoterapie v štandardnej dávke “7+3” (“5+2”) alebo vo vysokej dávke ARA-C (cytarabín). Pacienti, ktorí dosiahli KR po 2 cykloch konsolidačnej chemoterapie pokračovali v 3. cykle konsolidácie alebo boli indikovaní k aloTKB, pokiaľ bol dostupný príbuzný/nepříbuzný darca a pacient splnil indikačné kritériá pre aloTKB stanovené na HOK FNOL. V rámci postremisnej terapie podstúpilo 40 pacientov TKB, v 39 prípadoch išlo o aloTKB, v 1 prípade o autoTKB v 1. KR (tento pacient podstúpil po 1. relapse reindukčnú chemoterapiu, dosiahol 2. KR a absolvoval aloTKB). Alogénna TKB bola u 33 pacientov realizovaná v 1. KR, u 6 pacientov mimo remisiu (3x relaps, 2x chemorezistencia, 1x aktívna fáza AML; do hodnotenia nebol zahrnutý pacient, ktorý podstúpil aloTKB v 2. KR po predchádzajúcej autológnej TKB); 3 pacienti podstúpili viac ako 1 aloTKB.

### 3.2. FRAGMENTAČNÁ ANALÝZA PCR PRODUKTOV

Fragmentačnú analýzu (FA) PCR produktov pomocou kapilárnej elektroforézy som do LMB HOK FNOL zaviedla k detekcii špecifických molekulárnych zmien dvoch génov, *NPM1* a *FLT3*. Princíp molekulárnej analýzy spočíval v simultánnej detekcii ITD v oblasti juxtamembránovej domény génu *FLT3* (exóny 14, 15) a mutačného statusu génu *NPM1* (exón 12, recentne exón 11) podľa princípu, ktorý navrhli Noguera a kolektív (Noguera et al., 2005).

Sekvencie primerov, vrátane špecifických modifikácií boli uvedené v prílohe 1. Zloženie reakčných zmesí bolo v podmienkach LMB HOK FNOL optimalizované. Reakčná zmes pre analýzu *NPM1* obsahovala: 2 µl templátovej cDNA (~ 40ng RNA), zmes dNTPs (200 µM), 10x PCR Buffer II (-MgCl<sub>2</sub>) (1x), MgCl<sub>2</sub> (2mM),

oligonukleotidové primery (*NPM1\_12F* a *NPM1\_12R*, každý 0.12  $\mu\text{M}$ ) a Gold TAQ DNA polymeráza (0.02 U/ $\mu\text{l}$ ). Reakčná zmes pre analýzu *FLT3*-ITD obsahovala: 2  $\mu\text{l}$  templátovej cDNA (~ 40ng RNA), zmes dNTPs (200  $\mu\text{M}$ ), 10x PCR Buffer II (-MgCl<sub>2</sub>) (1x), MgCl<sub>2</sub> (2mM), oligonukleotidové primery (*FLT3\_ITD\_F* a *FLT3\_ITD\_R*, každý 0.8  $\mu\text{M}$ ) a Gold TAQ DNA polymerázu (0.04 U/ $\mu\text{l}$ ). Finálne koncentrácie jednotlivých komponentov reakčnej zmesi boli uvedené v zátvorkách. Amplifikácia cDNA prebiehala pre každý gén samostatne v 2 nezávislých PCR pri identických podmienkach teplotného a časového profilu, ktorý bol optimalizovaný v podmienkach LMB HOK FNOL (tabuľka 5).

**Tabuľka 5 - Teplotný a časový algoritmus PCR analýzy *NPM1* A *FLT3***

Názov kroku	Teplota	Čas	Počet cyklov
aktivácia	95°C	10 min	1
polymerizácia	95°C	45 s	40
	56°C	1 min	
	72°C	1 min	
	72°C	1 min	
záverečná polymerizácia	72°C	10 min	1
chladenie	4°C	$\infty$	1

Získané PCR produkty boli separované agarózovou gélovou elektroforézou s prídavkom etídium bromidu (0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) pri štandardných podmienkach elektroforézy 5V/cm po dobu 1h a boli vizualizované pri 260 nm pomocou UV transiluminátora s dokumentačným zariadením (Nanodrop ND 1000).

PCR produkty boli pred FA denaturované v roztoku deionizovaného formamidu (95 °C/5 min). Denaturovanú zmes v zložení deionizovaný formamid, fluorescenčne značený DNA veľkostný štandard a obidve PCR produkty boli analyzované kapilárnou elektroforézou na genetickom analyzátoe *ABI PRISM 310*, resp. na *ABI PRISM 3100* (obidve *Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA*) pri podmienkach stanovených v štandardnom operačnom postupe pre FA v LMB HOK FNOL. Výsledky FA boli hodnotené automaticky pomocou programu GeneMapper version 4 (*Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA*).

### 3.3. PRIAMA SEKVENAČNÁ ANALÝZA PODĽA SANGERA

Metódou priameho sekvenovania (SEQ) na úrovni genómickej DNA bola analyzovaná kompletná kódujúca sekvencia génu *CEBPA*, vybrané exóny génov *WT1* (exóny 7 a 9), *IDH1* (exón 4), *IDH2* (exón 4) a boli identifikované typy mutácií génu *NPM1* v prípadoch, v ktorých na mutácie *NPM1* poukázali výsledky skríningu pomocou FA (viď kapitola vyššie).

Príprava templátu na SEQ (PCR amplifikácia cieľového úseku genómickej DNA, resp. cDNA) bola zhrnutá pre každý analyzovaný gén samostatne.

**PCR amplifikácia génu CEBPA:** Kódujúca sekvencia *CEBPA* bola rozdelená na 4 vzájomne sa prekrývajúce oblasti (obrázok 4). Sekvencie oligonukleotidových primerov boli uvedené v prílohe (príloha 1).



**Obrázok 4 - Kódujúca oblasť CEBPA – polohy oligonukleotidových primerov** Referenčná *CEBPA* cDNA sekvencia GenBank U34070 (version U34070.1), analyzovaná oblasť nt 500 až 1726). Amplifikovaný úsek DNA zahŕňal kompletnú kódujúcu sekvenciu *CEBPA* (CDS: 592...1668) vrátane 92 nukleotidov z 5' neprekladanej oblasti (*untranslated region, UTR*) a 58 nukleotidov z 3' UTR. PCR amplifikácia prebiehala v 4 častiach pomocou 4 párov oligonukleotidových primerov Polohy 8 oligonukleotidových primerov *CEBPA\_1F* (500 – 519), *CEBPA\_1R* (824-844), *CEBPA\_2F* (744-761), *CEBPA\_2R\** (1087-1108), *CEBPA\_3F\** (1017-1036), *CEBPA\_3R* (1414-1441), *CEBPA\_4F\** (1336-1353) a *CEBPA\_4R* (1706-1726) sú vyznačené farebne, šípky naznačujú smer (5' → 3') nasadenia páru primerov pre každú zo 4 analyzovaných, vzájomne sa prekrývajúcich oblastí *CEBPA* (→ - forward/F, ← - reverse/R, jednotlivé oblasti sú odlišené farebne). V schéme je farebne vyznačená poloha iniciačného kodónu (ATG, nt 151) a stop kodónu (TGA, nt 1227). Primery označené \* som navrhla samostatne, nukleotidové sekvencie ostatných primerov som prevzala z publikovanej práce (Fröhling et al., 2004).

Amplifikácia *CEBPA* (~ 75 % podiel GC) prebiehala pomocou AccuPrime™ GC-Rich DNA polymerázy (*Invitrogen/Life technologies*). Zloženie reakčnej zmesi a podmienky teplotno/časového algoritmu PCR boli optimalizované na základe odporúčaní výrobcu DNA polymerázy. Reakčná zmes bola pre každú zo 4 analyzovaných oblastí uniformná, odlišovala sa párom oligonukleotidových primerov a obsahovala 50 ng templátovej DNA, pár oligonukleotidových primerov (každý 0.2 μM), AccuPrime™ GC-Rich DNA polymerázu (0.04U/μl) a reakčný pufor AccuPrime™ GC-Rich Buffer A (1x), ktorý predstavoval hotovú zmes MgSO<sub>4</sub>, dNTPs a AccuPrime™ proteínov. Finálne koncentrácie komponentov reakčnej zmesi boli uvedené v zátvorkách. Amplifikácia prebiehala podľa algoritmu uvedeného v tabuľke 6.



**Tabuľka 6 - Teplotný a časový algoritmus PCR analýzy *CEBPA* S výnimkou 1 oblasti (oblasť 1) boli všetky oblasti *CEBPA* amplifikované uniformne. Amplifikácia prvého úseku (oblasť 1) vyžadovala nižšiu teplotu nasadenia oligonukleotidových primerov v polymerizačnom kroku a menej cyklov amplifikácie v porovnaní so zvyšnými 3 úsekmi (oblasť 2, 3, 4). Rozdiely špecifické pre amplifikáciu 1. úseku sú v tabuľke vyznačené hviezdíčkou.**

Názov kroku	Teplota	Čas	Počet
aktivácia	95°C	3 min	1
polymerizácia	95°C	30s	30*/35
	65°C */70°C	30s	
	72°C	30s	
záverečná polymerizácia	72°C	10 min	1
chladenie	4°C	∞	1

**PCR amplifikácia vybraných exónov génu *WT1*:** Sekvencie oligonukleotidových primerov, ktoré slúžili na amplifikáciu exónov 7 a 9 *WT1* boli uvedené v prílohe (príloha 1). Zloženie reakčnej zmesi a podmienky teplotno/časového algoritmu PCR boli optimalizované na základe odporúčaní výrobcu Phusion® Hot Start High-Fidelity DNA polymerázy (*Thermo Fisher Scientific/Finzymes Oy, Vantaa, Finland*). Reakčná zmes obsahovala 50 ng templátovej DNA, pár oligonukleotidových primerov (každý 0.25 µM), zmes dNTPs (200 µM), DNA polymerázu (0.01U/µl) a reakčný pufo 5x Phusion® HF Buffer (1x). Finálne koncentrácie komponentov reakčnej zmesi boli uvedené v zátvorkách. Amplifikácia prebiehala podľa algoritmu, ktorý bol uvedený v tabuľke 7.

**Tabuľka 7 - Teplotno/časový profil amplifikácie vybraných exónov *WT1***

Názov kroku	Teplota	Čas	Počet
aktivácia	98°C	30s	1
polymerizácia	98°C	30s	35
	62°C	10s	
	72°C	15s	
záverečná polymerizácia	72°C	10 min	1
chladenie	4°C	∞	1

**PCR amplifikácia génov *IDH1* a *IDH2*:** Sekvencie oligonukleotidových primerov, ktoré som navrhla na amplifikáciu mutačných hot-spotov *IDH1* (exón 4) a *IDH2* (exón 4) boli uvedené v prílohe (príloha 1). Genómická DNA bola amplifikovaná pomocou Phusion® Hot Start High-Fidelity DNA polymerázy (*Thermo Fisher Scientific/Finzymes Oy, Vantaa, Finland*). Zloženie reakčnej zmesi a podmienky teplotno/časového algoritmu PCR boli optimalizované na základe odporúčaní výrobcu DNA polymerázy. Reakčná zmes obsahovala 50 ng templátovej DNA, oligonukleotidové primery (každý 0.5 µM), zmes dNTPs (200 µM), DNA polymerázu (0.01U/µl) a reakčný pufo 5x Phusion® HF Buffer (1x). Finálne koncentrácie jednotlivých komponentov reakčnej zmesi boli uvedené v zátvorkách. Amplifikácia prebiehala podľa algoritmu uvedeného v tabuľke 8.

**Tabuľka 8 - Teplotno/časový profil amplifikácie 4. exónu *IDH1* a *IDH2***

Názov kroku	Teplota	Čas	Počet
aktivácia	98°C	30s	1
polymerizácia	98°C	10s	35
	60°C	20s	
	72°C	15s	
	72°C	10 min	
záverečná polymerizácia	72°C	10 min	1
chladenie	4°C	∞	1

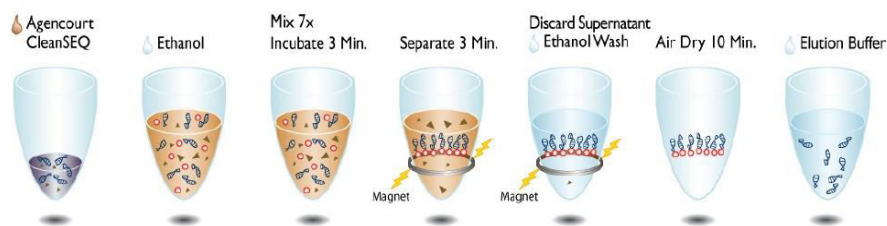
**PREČISTENIE PCR PRODUKTOV PRED SEQ:** Zvyšky oligonukleotidových primerov, nukleotidov, polymerázy, solí a ďalších nežiaducich zložiek boli pred SEQ z PCR produktov odstránené pomocou komerčného kitu *QIAquick PCR Purification Kit* podľa protokolu odporúčaného výrobcom (*Qiagen, Hilden, Germany*). PCR produkty boli vizualizované pomocou agarózovej gélovej elektroforézy a bol stanovený kvantitatívny výťažok amplifikácie templátu relatívne k odpovedajúcim fragmentom kvantitatívneho veľkostného štandardu 2 log DNA ladder 0.1 – 10.0 kb (*New England Biolabs*) (1µg/µl). Elektroforetická separácia prebiehala v 1.1 % agarózovom géli pri štandardných podmienkach elektroforézy, ktoré boli uvedené vyššie (kapitola 3.2).

**SEKVENAČNÁ ANALÝZA - URČENIE MNOŽSTVA TEMPLÁTU, ZLOŽENIE SEKVENAČNEJ ZMESI, TEPLOTNO/ČASOVÝ PROFIL SEKVENAČNEJ REAKCIE:** Množstvo amplifikovanej DNA určenej do sekvenačnej reakcie bol stanovený na základe dĺžky cieľového úseku DNA analyzovaného génu, resp. jeho úsekov (príloha 1) na základe vzorca: 2 ng templátovej DNA na každých 500 bp PCR produktu. Všeobecné zloženie reakčnej zmesi, teplotný a časový profil sekvenačnej reakcie bol uvedený v tabuľke 9. Príslušné úseky génov *CEBPA* a *WT1* boli sekvenované pomocou jedného z uniformných oligonukleotidov M13F resp. M13R. Gény *IDH1* a *IDH2* boli sekvenované jedným z oligonukleotidov, ktoré slúžili na amplifikáciu mutačných hotspotov týchto génov. Gén *NPM1* bol sekvenovaný pomocou primeru NPM\_12R bez 5` modifikácie (príloha 1).

**Tabuľka 9 - Zloženie reakčnej zmesi a teplotno/časový profil sekvenačnej PCR**

Reagencie	Zásobná koncentrácia	Výsledná koncentrácia	Teplota [°C]	Čas	Cykly
Pufor	5x	1x	96	4	1
Primer	10 µmol.l-1	0,2 µmol.l-1	96	20 s	31
BigDye	2,5x	0,5x	50	5 s	
DNA	2 ng/500 bp		60	4	
Celkový	10 µl		4	∞	

**PREČISTENIE PCR PRODUKTOV PRED KAPILÁRNOU ELEKTROFORÉZOU A KAPILÁRNA ELEKTROFORÉZA:** Produkty sekvenačnej reakcie boli purifikované pomocou komerčného kitu *Agencourt CleanSEQ* podľa návodu výrobcu (*Agencourt Bioscience Corporation, A Beckmann Coulter Company, Beverly, Massachusetts USA*). Proces purifikácie bol znázornený na obrázku 5 a prebiehal nasledovne: Sekvenačné produkty (plný objem, tj. 10  $\mu$ l) boli zmiešané s komerčnými magnetickými partikulami (10  $\mu$ l) a 85% etanolom (42  $\mu$ l). Zmes bola umiestnená na magnetickú platňu (*Agencourt SPRIPlate 96R*), ktorá špecificky viazala magnetické častice. Po 5 min inkubácie v magnetickom poli bol zo vzoriek odpipetovaný číry roztok. Nežiaduce zložky sekvenačnej reakcie boli odstránené opakovaným premývaním 85 % etanolom (celkom 2x po dobu 30s, á 100  $\mu$ l). DNA viazaná na magnetické častice a imobilizovaná v magnetickom poli počas purifikačných krokov bola z magnetického poľa uvoľnená pomocou elučného roztoku (0.1 mmol.l<sup>-1</sup> EDTA, štandardne 30  $\mu$ l).



**Obrázok 5 - Purifikácia PCR produktov pomocou kitu *AGENCOURT CLEANSEQ*** Postup bol popísaný v texte. Obrázok prevzatý z protokolu 000600v032 (*Agencourt Bioscience Corporation, A Beckmann Coulter Company, Beverly, Massachusetts USA, <https://www.beckmancoulter.com>*)

Kapilárna elektroforéza prebiehala na genetickom analyzátoe ABI 310, resp. ABI 3100 (*Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA*) pri podmienkach určených v štandardnom operačnom postupe LMB HOK FNOL. Hrubé dáta sekvenačnej analýzy boli hodnotené pomocou počítačových programov Chromas Lite version 2.33 (*Technelysium Pty Ltd, South Brisbane QLD Australia*), Sequence Scanner v1.0 (*Applied Biosystems, Foster City, CA USA*) a Sequencher® version 5.0 (*Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI USA*). Zistené sekvencie analyzovaných génov boli porovnávané s referenčnými sekvenciami publikovanými v databáze Ensembl, GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Zoznam referenčných sekvencií pre konkrétne gény bol uvedený v prílohe (príloha 1). Odchýlky od referenčnej sekvencie boli popisované na základe odporúčaní *Human Genome Variation Society* (<http://www.hgvs.org/mutnomen>).

### 3.4. RFLP ANALÝZA PCR PRODUKTOV

Princíp detekcie bodových mutácií v špecifických kodónoch *FLT3* (D835/I836) v exóne 20 (pôvodne exón 17) sa zakladal na princípe RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*). Postup zahŕňal amplifikáciu cieľového úseku *FLT3*, restriktívnu analýzu amplifikovanej DNA a detekciu genotypov agarózovou gélovou elektroforézou. Amplifikácia templátovej DNA prebiehala pomocou publikovaných oligonukleotidových primerov (Yamamoto et al., 2001) (príloha 1). Reakčná zmes obsahovala 2  $\mu$ l templátovej DNA (~ 100ng), zmes dNTPs (200  $\mu$ M), 10x PCR Buffer II (-MgCl<sub>2</sub>) (1x), 25 mM MgCl<sub>2</sub> (2mM), oligonukleotidové primery (D835\_F a D835\_R, každý 0.4  $\mu$ M) a Gold TAQ DNA polymerázu (0.01 U/ $\mu$ l). Templátová DNA bola amplifikovaná pomocou algoritmu, ktorý bol uvedený v tabuľke 10.

**Tabuľka 10 - Teplotný a časový algoritmus PCR analýzy *FLT3* (exón 20)**

Názov kroku	Teplota	Čas	Počet cvklov
aktivácia	95°C	10 min	1
polymerizácia	95°C	45 s	35
	63°C	1 min	
	72°C	1 min	
	72°C	10 min	
záverečná polymerizácia	72°C	10 min	1
chladenie	4°C	$\infty$	1

PCR produkty boli pred restriktívnu analýzu vyzrážané pri -20 °C pomocou 96 % etanolu (5  $\mu$ l) a 3M octanu sodného (150  $\mu$ l) v súlade so štandardným protokolom alkoholovej precipitácie, s možnosťou pridania nosiča (glykogén, 20  $\mu$ g/reakcia). Pelet bol získaný centrifugáciou, 1x premytý 70 % alkoholom a po ďalšom centrifugačnom kroku bol rozpustený v 12  $\mu$ l sterilnej vody. Všetky centrifugačné kroky prebiehali pri 14000 rpm / 4°C / 30 min. Restriktívnej analýze bola podrobená zmes zložená z precipitovaného PCR produktu (5  $\mu$ l) a restriktívneho mixu (15  $\mu$ l), ktorý sa skladal z pufru 10x NEBuffer 3.1 (1x), 10x BSA (1x) a restriktázy EcoRV (1U/ $\mu$ l), doplnený sterilnou vodou do objemu 15  $\mu$ l. Restriktívna analýza prebiehala pri 37 °C po dobu 3.5 h a bola ukončená elektroforetickou separáciou PCR produktov v 3 % agarózovom géli pri štandardných podmienkach elektroforézy, ktoré boli uvedené vyššie (kapitola 3.2). Princíp RFLP analýzy bol nasledovný: Vo vzorkách bez bodovej mutácie v tyrozínkinázovej doméne FLT3 došlo k štiepeniu PCR produktu (114 bp) restriktázou EcoRV na fragmenty veľkosti 68 bp a 46 bp. V prípade výskytu bodovej mutácie rozpoznávacie miesto pre restriktázu EcoRV zaniklo a nedochádzalo k štiepeniu PCR produktu.

### 3.5. KONVENČNÁ RT-PCR

Detekcia *KMT2A-PTD* prebiehala v podmienkach dennej laboratórnej praxe LMB HOK FNOL na úrovni cDNA s využitím páru oligonukleotidových primerov a podmienok RT-PCR, ktoré popísal Jamal a kolektív (Jamal et al., 2001). RT - PCR produkty boli separované agarózovou gélovou elektroforézou v 1.5 % agarózovom géli pri štandardných podmienkach elektroforetickej separácie, ktoré boli uvedené vyššie (kapitola 3.2).

### 3.6. ŠTATISTICKÁ ANALÝZA

Dichotomické premenné v rámci jednotlivých skupín boli porovnávané na základe Fisherovho exaktného testu, kontinuálne premenné boli hodnotené neparametrickým Mann-Whitney U testom. Kaplan-Meier-ové krivky prežitia boli generované po definovaní OS a DFS, ktoré bolo nasledujúce:

Celkové prežitie (*overall survival*, OS) - interval od doby diagnózy AML po dátum exitu. Žijúci pacienti boli cenzúrovaní k dátumu poslednej návštevy. Analýza sa týkala celého súboru vyšetovaných pacientov (n = 89).

Prežitie bez príznakov ochorenia (*disease free survival*, DFS) - interval od dátumu 1. KR po relaps alebo smrť, tj. v prípade úmrtia v KR bez relapsu bol dátum exitu hodnotený ako platný bod (*event*). Ak pacient prežival v KR, jeho dáta boli cenzúrované k dátumu poslednej návštevy na HOK FNOL. Analýza sa týkala skupiny (n = 80), ktorá dosiahla 1. KR.

Celkové prežitie pacientov, ktorí dosiahli KR (OS<sub>KR</sub>) – interval medzi dátumom diagnózy a dátumom exitu; hodnotenie sa týkalo pacientov, ktorí dosiahli po primárnej terapii KR.

Štatistické analýzy boli kalkulované pomocou softwaru SPSS Statistics 20 (SPSS, Chicago, IL) a GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, La Jolla, CA) a boli považované za signifikantné na úrovni  $P \leq 0.05$ .

### 3. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ DRUHÁ: URČENIE PARENTÁLNEHO PÔVODU DELETOVANÝCH ALIEL 14q V SKUPINE B-LYMFODIDNÝCH MALIGNÍT S INTERSTICIÁLNOU DELÉCIOU V OBLASTI *IGH* [del(14q/*IGH*)]

#### 3.1. SÚBOR PACIENTOV

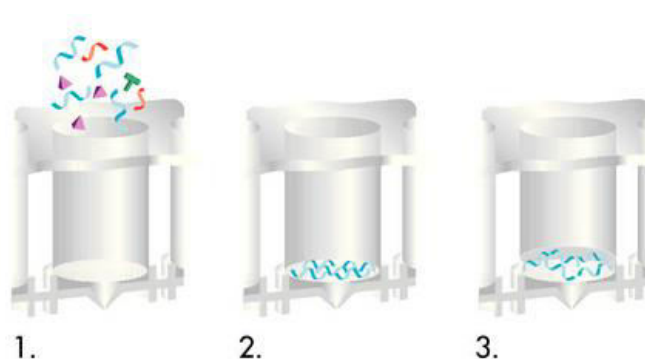
Do štúdie bolo zahrnutých 20 pacientov s cytogeneticky potvrdenou del(14q/*IGH*). Biologický materiál sa vyznačoval variabilnou infiltráciou neoplastickými bunkami s 15 až 70 % zastúpením buniek s del(14q/*IGH*) (tabuľka 17). Templátom molekulárnych analýz bola genómickej DNA extrahovaná z lymfatických uzlín (7 prípadov), periférnej krvi (4 prípady) a kostnej drene (9 prípadov) podľa postupu, ktorý bol uvedený vyššie (časť *Izolácia DNA*). Molekulárne štúdie boli povolené etickou komisiou Oddelenia ľudskej genetiky Fakultnej nemocnice Gasthuisberg belgickej katolíckej univerzity v Leuven (*Department of Human Genetics, University Hospital Gasthuisberg, Catholic University Leuven, Leuven, Belgium*).

#### 3.2. GENOTYPIZÁCIA JEDNONUKLEOTIDOVÝCH DNA POLYMORFIZMOV

Cieľová oblasť genotypizácie SNP (14q32.33) bola schématicky znázornená na obrázku 6. Oblasť v rozsahu ~ 0.85 kB zahŕňala *DLK1/GTL2* IG-DMR (GeneBank AL117190, 51015-51180 (Astuti et al., , 2005) a 86 nukleotidov z upstream a 600 nukleotidov z downstream oblasti. Cieľový úsek genómickej DNA bol rozdelený na 2 prekrývajúce sa oblasti A a B (obrázok 6). Amplifikácia DNA prebiehala pomocou Gold TAQ DNA polymerázy a 2 párov oligonukleotidových primerov: aF a aR (oblasť A), resp. bF a bR (oblasť B). Sekvencie oligonukleotidových primerov boli navrhnuté pomocou automatických nástrojov určených na dizajn primerov a ich kompletne sekvencie boli uvedené v prílohe (príloha 1). Reakčná zmes v celkovom objeme 50 µl obsahovala 1 µl templátovej DNA (~ 50 ng), zmes dNTPs (0.2 mM), 10x PCR Buffer II (-MgCl<sub>2</sub>) (1x), 25 mM MgCl<sub>2</sub> (2mM), oligonukleotidové primery (aF+aR resp. bF+bR, každý z dvojice 0.5 µM) a Gold TAQ DNA polymerázu (0.02 U/µl). Výsledné koncentrácie komponentov reakčnej zmesi boli uvedené v zátvorkách. Algoritmus PCR: iniciálna denaturácia dvojitá DNA 95°C/10 min a 30 cyklov denaturácie pri 94°C po dobu 30 s, pripojenia oligonukleotidových primerov pri 60°C (oblasť A) alebo 58°C (oblasť B) po dobu 30 s a polymerizácie pri 72°C po dobu 40 s. Cyklická amplifikácia templátu bola ukončená polymerizáciou pri 72°C po dobu 7 min. Získané produkty boli purifikované pomocou mikroplatničky so špecifickým membránovým filtrom *MultiScreen® PCRµ96 Filter Plate* na filtračnom zariadení pre vákuovú filtráciu, ktorý bol zostavený podľa odporúčaní výrobcu (*Merck KGaA/Millipore, Darmstadt, Germany*). Stručný postup purifikácie bol znázornený na obrázku 7.

GAACTGGGGCATTGTTTACACC CCAGGCTGGAATTGCTAAGAGTTTGTGGATCTGTGAGAAATGACTTCGCTCA  
 CTGGGCTGGGCC TTGCCAGTTGCCTGTGGTTCACCAGTTGCC CGCGGCTCACCAGTTGCC CGCGACTCACCAGG  
 TGCCTGCGGCTCACCAGTTGCCTGTGGTCCACCAGCTGCC CGTGGCTCACCAGCTGCC CGTGGCTTACAGTTGC  
 CCGAGGCTCACAGTTGCCCATGGCTTGCTA ATTGCCAGCGATTTGCCAATTGCGAGTGGTTCGCCAGTTGCCCG  
 CGGTCCGCTAAACCCGTAATCCTGT GGTACTGTAAGTGGCCACAATG GACTCGCCCTTTAGGCTTCCCGGCCCT  
 CTTTGGCCAAATGCAGTTCTCAGCAGTGCAGTTCAGTGTGATTACCCACAATT CGCCATGGTTTGTGATTTTCAT  
 GGGTCTGGTGATTCTCAGACCACAGG TTATCTACGGTCCCTCAGGCAACTT CCTGCTTGCCC TTTGGAGGAAA  
 GCTGCTGCCAAATTGCTCCAGGCTTGTGTCCTGCACCTCCCCATCCGAAACTCTACATTTCAAGAGAAATGGA  
 ATCTTGATGCTTAGGCAACCCTCCCCA TGTCTTGGTTACA TGAATTAGCCAGAACTCAGCCC AGGAATC  
 CCTGCTGGAGGCCAATGGTGGGGATGGTGGAGACAGAA GTGGGAAGGGCGGCACCTCCCATGCCAGGTCC  
 GCTTCTGCGCTCTCTGAGCTGTTTGAGCAGAGGTGGTGGAGACTGGGGTCTATCATTGAGGACTAGGTGGGT  
 GTGGTACTTCTGCAGGC GCAACCCTGAGCTATCATAAAC TGCAGCCCCAGCCTCATTCTCATTCCAACACACAA  
 GAGCGCGCCA

**Obrázok 6 - Cieľová oblasť genotypizácie na lokuse 14q32.33** (GeneBank AL117190, nt 50929 až 51780). Šípky označujú polohy oligonukleotidových primerov aF + aR (oblasť A, 496 bp, oranžové) resp. bF + bR (oblasť B, 531 bp, modré), ktoré slúžili k amplifikácii *DLK1/GTL2* IG-DMR (nt 51015 až 51180, sivá plocha) a príľahlých oblastí. Na obrázku boli farebne vyznačené polohy SNP, ktoré boli identifikované počas genotypizácie ohraničeného 852 bp dlhého úseku genómkej DNA (majoritné alely 3 kľúčových SNP boli zvýraznené zelene, ostatné polymorfne pozície sú žlté). Z celkového počtu 10 SNP bolo jedno SNP (C/G) lokalizované priamo v *DLK1/GTL2* IG-DMR, ostatné jednonukleotidové varianty sa vyskytovali v oblasti downstream od *DLK1/GTL2* IG-DMR (z 10 identifikovaných SNP dve SNP neboli zaradené do databázy dbSNP, [www.ncbi.nlm.nih.gov/dbSNP](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbSNP), údaj k roku 2009). Obrázok znázorňuje polohu 3 kľúčových SNP (všetky A/G varianty) a polohu 8 CpG ostrovčekov lokalizovaných v *DLK1/GTL2* IG-DMR (modro zvýraznené, podčiarknuté pozície).



**Obrázok 7 - Postup purifikácie PCR produktov vákuovou filtráciou pomocou millipore mikroplatničky** (1) PCR produkt sa nanesie do jamky mikroplatničky (finálny objem 100  $\mu$ l som získala pridaním 80  $\mu$ l sterilnej vody k 20  $\mu$ l PCR produktu). (2) Tekutina z platne sa odfiltróva vákuom po dobu ~ 10 min/tlak 20mm Hg, resp. kým sa tekutina úplne odsaje do zbernej nádoby (*manifold*). (3) Do jamky sa pridá 25  $\mu$ l sterilnej vody a mikroplatnička sa premiestni na trepačku. Po inkubácii (5 až 10 min) je postup purifikácie kompletný a PCR produkty zbavené primerov a nezabudovaných dNTPs sú pripravené k SEQ bez nutnosti centrifugácie alebo precipitácie.

Vzorky boli podrobené SEQ pomocou kitu *BigDye terminator cycle sequencing kit v3.1*. Zloženie a objem reakčnej zmesi a teplotno/časový profil sekvenačnej reakcie sa zhodovali s podmienkami, ktoré boli uvedené v tabuľke 9. Získané produkty boli precipitované pomocou absolútneho alkoholu (25 µl), 125 mM EDTA (1 µl) a NaAc pH 5.2 (1 µl); objem jednotlivých komponentov bol uvedený v zátvorkách. Po inkubácii (15 min/izbová teplota) prebehla separácia (3000 x g / 30 min/ 4°C) a pelet bol premytý v 70 % alkohole (40 µl) pri 3000 x g / 10 min/ 4°C. Centrifugačný krok bol zopakovaný pri 185 x g/ 1 min. Po inkubácii (15 min/izbová teplota) boli precipitované produkty rozpustené v HiDi deionizovanom formamide (10 µl) a analyzované na genetickom analyzátoe ABI PRISM 3730 (*Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA*). Pomer homologických aliel v mieste informatívnych SNP bol stanovený pomocou automatizovaného softwaru PeakPicker version 0.5 (Ge et al., 2005).

### 3.3. MODIFIKÁCIA DNA BISULFIDOM SODNÝM

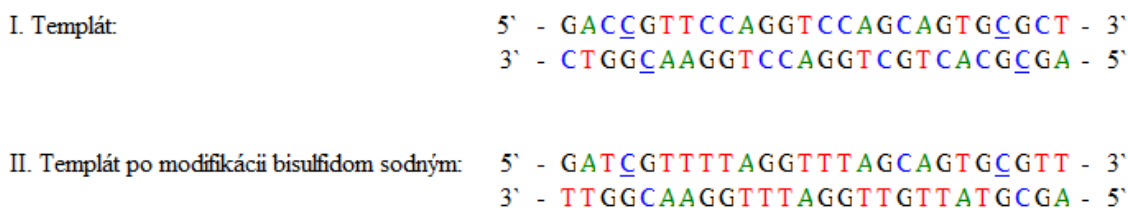
Genómická DNA (500 ng) bola modifikovaná bisulfidom sodným pomocou komerčného kitu *EZ DNA Methylation-Gold Kit<sup>TM</sup>* (Zymo Research Corp., Orange, CA USA). Postup prebiehal podľa protokolu výrobcu nasledovne:

1. K 20 µl DNA (~ 25 ng/µl) bola pridaná konverzná zmes (*CT Conversion Reagent*, 130 µl) pripravená podľa návodu výrobcu zmiešaním 900 µl sterilnej vody, 50 µl *M-Dissolving Buffer* a 300 µl *M-Dilution Buffer*). Získaný roztok bol inkubovaný v termocykléri pri 98°C/10 min, 64°C/2.5h, 4°C/20h (celkový počet opakovaní cyklu: 1).
2. Na separačnú kolónku *ZymoSpin IC Column* bol nanosený *M-binding Buffer* (600 µl) a kolónka sa vložila do zbernej skúmavky.
3. Vzorka pripravená podľa kroku 1 (150 µl) bola napipetovaná na separačnú kolónku z kroku 2.
4. Zmes vzorky a komerčných pufrov bola podrobená centrifúgačnému kroku pri maximálnych otáčkach (13000 rpm/30s).
5. Na kolónku bol napipetovaný premývací pufor (*M-wash Buffer*, 100 µl) pripravený podľa návodu výrobcu pridaním 25 ml absolútneho alkoholu) a zmes bola centrifúgovaná podľa kroku 4.
6. Na kolónku bol napipetovaný desulfonizačný pufor (*M-desulfonation Buffer*, 200 µl), zmes bola inkubovaná 20 min pri izbovej teplote (26.5°C / hybridizačná pec) a následne bola centrifúgovaná podľa kroku 4.
7. Na kolónku bol napipetovaný premývací pufor (200 µl) a zmes bola centrifúgovaná podľa kroku 4. Uvedený premývací krok bol 1x zopakovaný.
8. Kolónka bola premiestnená do čistej 1,5 ml centrifúgačnej skúmavky. Priamo na matricu kolónky bol napipetovaný elučný pufor (*M-elution Buffer*, 10 µl) a bisulfidom konvertovaná DNA bola uvoľnená do skúmavky centrifugáciou podľa kroku 4.



### 3.4. AMPLIFIKÁCIA BISULFIDOM MODIFIKOVANEJ DNA

Bisulfid-sekvenačné PCR (*bisulfite-sequencing PCR*, BSP) primery amplifikujú v porovnaní s konvenčnými PCR primermi iba jedno z vlákien genómickej DNA. V prípade bisulfidovej analýzy je potrebné určiť vlákno, ktoré bude podrobené sekvenovaniu, nakoľko vlákna DNA prestávajú byť po modifikácii bisulfidom sodným komplementárne. Vlákna DNA je nutné analyzovať samostatne, tj. navrhnúť špecifický pár oligonukleotidov pre každé z nich. Princíp metylačnej analýzy pomocou bisulfidu sodného bol znázornený na obrázku 8.



**Obrázok 8 - Princíp metylačnej analýzy pomocou bisulfidu sodného** Časť I: Genómická DNA zložená z 2 vzájomne komplementárnych vlákien 5'→3' a 3'→5'. Časť II: Po modifikácii DNA bisulfidom sodným sú všetky cytozíny okrem cytozínov v CpG ostrovčekoch (vyznačené modro, podčiarknuté) konvertované na uracyl, ktorý je v ďalšom replikačnom cykle zabudovaný do DNA v podobe tymínu (T). Vlákna DNA nie sú po modifikácii bisulfidom sodným komplementárne.

Vlákno určené k metylačnej analýze predstavovalo kódujúce (5'→3') vlákno DNA (GeneBank AL117190). V cieľovej sekvencii (obrázok 9) boli pomocou automatického softwaru *Methyl Primer Express software v1.0* (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA) umelo konvertované všetky cytozíny na tymíny (okrem cytozínov v CpG ostrovčekoch). Získaný templát slúžil k dizajnu oligonukleotidových primerov, ktoré boli navrhnuté pre účely tejto štúdie pomocou softwaru *Methyl Primer Express software v 1.0*. Výsledné sekvencie páru oligonukleotidových primerov bsF a bsR boli uvedené v prílohe (príloha 1). Cieľová sekvencia genómickej DNA určená k bisulfidovej analýze bola detailne znázornená na obrázku 9. Bisulfidom modifikovaná DNA bola amplifikovaná pri 95°C/5 min, (95°C/5 s, 60°C/2 min, 72°C/45 s)<sub>40x</sub> s použitím uvedeného páru BSP primerov. Amplifikácia DNA bola ukončená záverečnou polymerizáciou 72°C/10 min.

#### A: Genómičná DNA

```
CCAGGCTGGAATTGCTAAGAGTTTGTGGATCTGTGAGAAATGACTTCGCTCACTGGGCTGGGCCTTGCCAGTTG
CCTGTGGTTCACCAAGTTGCCCGCGGCTCACCAGTTGCCCGCGACTCACCAGGTGCCTGCGGCTCACCAGTTGCC
TGTGGCTCACCAGCTGCCCCGTGGCTCACCAGCTGCCCGTGGCTTACAGTTGCCCGAGGCTCACAGTTGCCCATG
GCTTGTCTAATTGCCAGCGATTTGCCAATTGCGAGTGGTTCGCCAGTTGCCCGCGGTCCGCTAAACCCGTAATCC
TGTGGTACTGTAAGTGGCCACAATGGACTCGCCCTTAGGCTTCCCGGCCCTCTTTTGCCCAAATGCAGTTCTCA
GCAGTGCAGTTCAGTGTGATTCACCACAATTGCCATGGTTTGTGATTTATGTTGCTTGGTGTGATTCAGACC
ACAGGTTATCTACGGTCTCAGGCAACTTCTGCTTGGCCCTTTGGAGGAAAGCTGCTGCCAAATGCTCCAGG
CTTGTGTCCTGCACCTCCCCCATCCGAAACTCTACATTTCAAGAGAAATGGAATCTTGATGCTTAGGCCAACCT
CCCCCAATGCTCTTGGTTACAATGAATTAGCCAGAATCAGCCCAAGGAATCCCTGCTGGAGGCCAATGGTGG
GGGATGGTGGAGACAGAAAGTGGGAAGGGC
```

#### B: Genómičná DNA konvertovaná bisulfidom sodným

```
TTAGGTTGGAATTGTTAAGAGTTTGTGGATTTGTGAGAAATGATTTTCGTTTATTGGGTGGGGTTTGTAGTTGT
TTGTGGTTTATTAGTTTTCGGGTTTATTAGTTTTCGGATTTATTAGGTGTTTCGGTTTATTAGTTTGTGT
GGTTTATTAGTTTTCGGTGGTTTATTAGTTTTCGGTGGTTTATTAGTTTTCGAGGTTTATTAGTTTATGGTTG
TTAATTGTTAGCGATTTGTTAATTGCGAGTGGTTCGTTAGTTTTCGGGTTTCGTTAAATTCGTAATTTTGTGGT
ATTGTAAATTGGTTAATAATGATTCGTTTTTAGGTTTTCGGTTTTTTTTGTTTAAATGTAGTTTATTAGTAGGT
AGTTTATTGTGATTTATTAAATTCTTATGGTTTGTGATTTATGGGTTTGGTGTATTTAGATTATTAGGTTAT
TTACGGTTTTAGGTTAAATTTTTGTTTGGTTTTTTGGAGGAAAGTTGTTGTTAAATGTTTATGGTTTGTGT
TATTTTTTTTATTCGAAATTTTATTATTTAAGAGAAATGGAATTTTGATGTTTAGGTTAATTTTTTTTATGTTTT
TGGTTATATGAATTAGTTAGAAATTTAGTTTAAAGGAATTTTTGTTGGAGGTTAATGGTGGGGGATGGTGGAGAT
AGAAGTGGGAAGGG
```

**Obrázok 9 - Cieľová sekvenca genómickej DNA určená k analýze bisulfidovým sekvenovaním** (A) Nukleotidová sekvenca, genómičná DNA (vláknko 5'→3', tiež označované forward, resp. + vláknko), (B) Nukleotidová sekvenca, genómičná DNA konvertovaná bisulfidom sodným. Všetky cytozíny s výnimkou cytozínov v CpG ostrovčekoch sú v genómickej DNA konvertované bisulfidom sodným na uracyl a v nasledujúcom replikačnom cykle sú do DNA zabudované v podobe tymínu, T (označené červene a podčiarknuté). Šípky v časti B znázorňujú polohy BSP primerov bsF a bsR, ktoré slúžili k amplifikácii odpovedajúceho 665 bp dlhého úseku zahŕňajúcej *DLK1/GTL2* IG-DMR a príľahlé SNP. Oblasť *DLK1/GTL2* IG-DMR znázorňuje v obidvoch templátoch sivá výplň. Polohy 8 diferencielne metylovaných CpG ostrovčekov (časť B) boli vyznačené farebne (modré, podčiarknuté pozície). Na schéme boli vyznačené polohy SNP; majoritné alely 3 kľúčových (informatívnych) SNP boli zvýraznené zelene, ostatné polymorfne pozície sú žlté.

### 3.5. TOPO TA KLONOVANIE PCR PRODUKTOV

BSP primermi amplifikované PCR produkty boli klonované do bakteriálneho vektora pomocou TOPO TA klonovacieho kitu podľa protokolu odporúčaného výrobcom (*Invitrogen, Carlsbad, CA*). Systém TOPO TA klonovania využíva nešpecifickú transferázovú aktivitu Taq DNA polymerázy a umožňuje klonovať PCR produkty, ktoré majú na 3' konci presah individuálneho deoxyadenozínu (A). Linearizovaný vektor nesie na 3' konci presah thymidínu (T) a je kovalentne viazaný s topoizomerázou I, ktorá katalyzuje ligáciu PCR produktu do vektora. Ligačná zmes celkového objemu 6 µl bola pripravená zmiešaním PCR produktu (2 až 4 µl), roztoku soli (1.2 M NaCl, 0.06 M MgCl<sub>2</sub>, 1 µl) a linearizovaného klonovacieho vektora pCR<sup>®</sup> 4-TOPO<sup>®</sup> (1 µl). Reakcia bola doplnená do celkového objemu sterilnou vodou. Po inkubácii (5 min / izbová teplota, 23 °C) bol získaný konštrukt transformovaný do TOP 10F<sup>®</sup> kompetentných buniek. Alternatívna ligačná reakcia obsahovala PCR produkt (2 µl), 10x reakčný pufo T4 DNA ligázy (1 µl), klonovací vektor pCR<sup>®</sup> 2.1 (25 ng/µl, 2 µl) a T4 DNA ligázu (5 U, 1 µl). Celkový objem reakcie 10 µl. Doba inkubácie cez noc pri 14°C.

### 3.6. TRANSFORMÁCIA KOMPETENTNÝCH BUNIEK

Klonovacia reakcia (2  $\mu\text{l}$ ) bola zmiešaná s TOP 10F<sup>+</sup>, DH5 $\alpha$ , resp. DH5 $\alpha$ -T1R kompetentnými bunkami *Escherichia coli* (obsahuje selekčný marker gén rezistencie na ampicilín a čítací rámec lacZ, do ktorého je vložený polylinker). Paralelná kontrolná skúmavka obsahovala kompetentné bunky a 1  $\mu\text{l}$  cirkulárneho plazmidu pCR<sup>®</sup> 4-TOPO<sup>®</sup>. Obidve skúmavky boli inkubované na ľade po dobu 5 min (v prípade kompetentných buniek DH5 $\alpha$ , resp. DH5 $\alpha$ -T1R bola doba inkubácie 30 min). Skúmavky boli inkubované pri 42 °C / 30 s (vodný kúpeľ). Po teplotnom šoku bola zmes okamžite ochladená (ľad) a bolo pridané SOC médium (250  $\mu\text{l}$ ; zloženie: 2 % tryptón, 0.5 % kvasinkový extrakt, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM glukóza). Skúmavky boli inkubované na trepačke (horizontálne) pri 37 °C / 1 h / 200 – 220 rpm. Na povrch agarových platní s ampicilínom (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) sa rozotrel X-gal (40 mg/ml) a IPTG (40  $\mu\text{l}$ ). Transformačná zmes (30  $\mu\text{l}$ /varianta 1 resp. 50  $\mu\text{l}$ /varianta 2) bola paralelne vysievaná na zahriate agarové platne (37 °C/30 min), ktoré boli následne inkubované cez noc pri 37 °C (termostat) a na 2. deň boli hodnotené bakteriálne kolónie.

### 3.7. SKRÍNING BAKTERIÁLNYCH KOLÓNII A COLONY PCR

Princíp skrínungu bakteriálnych kolónií po chemickej transformácii je známy ako tzv.  $\alpha$  - komplementácia  $\beta$ -galaktozidázy. Počas transformácie sa spájajú dva fragmenty génu pre  $\beta$ -galaktozidázu za vzniku aktívneho enzýmu; kratší fragment lacZ $\alpha$  je kódovaný na vektore a chromozóm hostiteľskej (bakteriálnej) bunky obsahuje dlhší z fragmentov lacZ $\Omega$ . Pridanie IPTG (induktor expresie  $\beta$ -galaktozidázy) navodí expresiu enzýmu, ktorého aktivitu je možné sledovať nasledovne: Do média sa pridá bezfarebný chrómogénny substrát (X-gal), ktorý aktívna  $\beta$ -galaktozidáza premieňa na farebný (modrý) produkt. V prázdnom vektore (bez inzertu) vytvára lacZ $\alpha$ -fragment spolu s fragmentom lacZ $\Omega$  funkčnú  $\beta$ -galaktozidázu, ktorá mení X-gal na farebný produkt ( $\alpha$ -komplementácia je úspešná, kolónie sú modré). Ak bol do bakteriálneho vektora vnesený inzert, čítací rámec génu pre  $\beta$ -galaktozidázu sa preruší, nevzniká funkčný enzým a kolónie sú biele. Skrínung individuálnych kolónií na prítomnosť inzertu prebiehal pomocou *colony PCR*. Náhodne vybrané (biele) bakteriálne kolónie *Escherichia coli* boli individuálne odpichované (špička od pipety) a prenášané do samostatných jamiek PCR doštičky. Uvoľnené bunky slúžili ako templát *colony PCR*. Bunky boli amplifikované v reakčnej zmesi celkového objemu 20  $\mu\text{l}$ , ktorá obsahovala: pár univerzálnych oligonukleotidových primerov M13F a M13R (každý 0.035  $\mu\text{M}$ ), zmes dNTPs (0.2 mM), DNA polymerázu (0.0175 U/ $\mu\text{l}$ ), Mg<sup>2+</sup> (1.5 mM) a reakčný pufor 10x PCR Buffer II (-MgCl<sub>2</sub>) (1x). Výsledné koncentrácie jednotlivých zložiek reakčnej zmesi boli uvedené v zátvorkách. Amplifikácia genetického materiálu individuálnych bunkových kolónií prebiehala pri 95°C/15 min, (94°C/30 s, 53°C/30 s, 72°C/2 min)<sub>45x</sub>, 72°C/5 min, 4°C/ $\infty$ . Kvalita a kvantita amplifikovanej DNA bola analyzovaná elektroforézou v 1.5 % agarózovom géli pri štandardných podmienkach elektroforetickej separácie, ktoré boli uvedené vyššie.

### 3.8. BISULFIDOVÁ SEKVENAČNÁ ANALÝZA

Každý z amplikónov *colony PCR*, ktorý odpovedal očakávanej dĺžke amplifikovaného úseku (tj. 665 bp + 180 bp = 845bp), bol podrobený priamej bisulfidovej sekvenačnej analýze. Sekvenačná analýza prebiehala v celkovom objeme 5  $\mu$ l v termocykléri *GeneAmp® PCR System 9700 Fast Thermal Cyclers* (*Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA*). Sekvenačná reakcia obsahovala PCR produkt (0.5  $\mu$ l), komerčný kit BigDye v3.1 (0.5  $\mu$ l), 5x sekvenačný pufor (0.75  $\mu$ l) a univerzálny sekvenačný primer M13F (0.1  $\mu$ M). Reakčná zmes bola doplnená sterilnou vodou do celkového objemu 5  $\mu$ l. Teplotno/časový algoritmus sekvenačnej PCR bol nasledovný: 96°C/2 min, (96°C/10 s, 50°C/5 s, 60°C/4 min)<sub>28x</sub>, 10 °C/ $\infty$ . Produkty sekvenačnej PCR boli pred kapilárnou elektroforézou vyvráždané alkoholovou precipitáciou pomocou 125 mM EDTA (1  $\mu$ l), 3M octan sodný (1  $\mu$ l), absolútny alkohol (25  $\mu$ l) nasledovne: zmes bola homogenizovaná a inkubovaná pri izbovej teplote po dobu 15 min. Pelet bol usadený centrifugáciou (3000 x g / 4°C/ 30 min) a získaný sediment bol 1x premytý v 70 % alkohole (40  $\mu$ l). Pelet bol zbavený supernatantu (1650 x g / 4°C / 15 min), krátko presušený (15 min/izbová teplota) a resuspendovaný v deionizovanom formamide (10  $\mu$ l). Získané vzorky boli analyzované na genetickom analyzátore ABI PRISM 3130 (*Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA*). Výsledky sekvenačnej analýzy boli hodnotené pomocou automatického softwaru Sequencher® version 4.7 (*Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI USA*).

#### 4. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ TRETIA: STANOVENIE EXPRESIE VYBRANÝCH *T-UCR* V SKUPINE B-BUNKOVÝCH NEOPLÁZIÍ ASOCIOVANÝCH S CIRKULÚJÚCIMI VILÓZNYMI LYMFOCYTMÍ A S ABNORMALITAMI NA 14q32.13/14q32.33

##### 4.1. SÚBOR PACIENTOV

Do štúdie bolo zahrnutých 5 pacientov, u ktorých bola iniciálne stanovená diagnóza vlasatobunková leukémia (HCL). Vzorky boli do štúdie zaradené na základe cytogeneticky potvrdenej t(14;14) alebo inv(14) v oblasti 14q32.13 a 14q32.33. Templátom molekulárnych analýz bola celková RNA extrahovaná z materiálu po splenektómii (3 prípady) resp. z periférnej krvi (2 prípady). V štúdiu boli súčasne vyšetrené vzorky RNA (získané z materiálu po splenektómii) od pacientov s iniciálnou diagnózou HCL bez abnormalít chromozómu 14 (n = 6) a vzorky RNA získané z normálnej (nenádorovej) sleziny (n = 3), resp. z normálnej (nenádorovej) periférnej krvi (zmes RNA od 4 rôznych zdravých jedincov). Kontrolné vzorky pochádzali z databázy *Center for Human Genetics, KUL, Belgium*. Molekulárne štúdie boli povolená etickou komisiou Oddelenia humánnej genetiky Fakultnej nemocnice Gasthuisberg belgickej katolíckej univerzity v Leuven (*Department of Human Genetics, University Hospital Gasthuisberg, Catholic University Leuven, Leuven, Belgium*).

##### 4.2. REVERZNE TRANSKRIPČNÁ KVANTITATÍVNA PCR V REÁLNO M ČASE (RT-qPCR)

Postup izolácie celkovej RNA a prípravy cDNA pre potreby RT-qPCR boli uvedené v časti Izolácia RNA a reverzná transkripcia. V každej z analyzovaných vzoriek cDNA bola hodnotená hladina expresie 4 génov – cieľových *T-UCR* génov uc.379, uc.380 a uc.381 a génu *HPRT*, ktorý predstavoval endogénny kontrolný (referenčný) gén. Kvantitatívna PCR analýza prebiehala s využitím *qPCR Master Mix Plus for SYBR Green (Eurogentec, Seraing, Belgium)* na detekčnom systéme ABI PRISM 7000 (*Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA*). Oligonukleotidové primery boli navrhnuté pomocou automatického softwaru Primer Express 3.0 (*Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA*) a ich sekvencie boli uvedené v prílohe (príloha 1). Reakcia prebiehala v celkovom objeme 25  $\mu$ l a reakčná zmes obsahovala 5  $\mu$ l templátu (5ng/ $\mu$ l), pár špecifických oligonukleotidových primerov (každý 2.5  $\mu$ l, zásobná koncentrácia 5 $\mu$ M; výsledná koncentrácia 0.5  $\mu$ M), 12.5  $\mu$ l 2x *qPCR Master Mix Plus for SYBR Green* (1x) a sterilnú vodu do celkového objemu 25  $\mu$ l. Teplotno/časový profil RT-qPCR bol uvedený v tabuľke 11.

**Tabuľka 11 - Teplotno/časový profil RT-qPCR na prístroji ABI PRISM 7000**

Krok	Teplota	Čas	Počet
UNG	50°C	2 min	1
iniciálna	95°C	10 min	1
amplifikácia	95°C	15 sec	40
	60°C	1 min	
disociačné štádium	95°C	15s	1
	60°C	20s	1
	95°C	15s	1
chladenie	40°C	10 sec	1

Každá vzorka bola analyzovaná v triplikáte. Súčasťou každej kvantitatívnej analýzy bola negatívna kontrola (namiesto templátu obsahovala vodu) a tzv. *non-amplification control* (vzorka neobsahovala reverznú transkriptázu, slúžila na kontrolu kontaminácie vzorky RNA genómickej DNA). Špecifita amplifikácie bola overená na základe stanovenia teploty topenia amplikónov (disociačná analýza, *melting curve analysis*, tabuľka 11). Podmienky RT-qPCR boli vyhodnotené ako optimálne, ak derivácia fluorescencie amplikónov určila unikátny pík v prípade každého z analyzovaných génov. Expresia cieľových génov vo vyšetovaných vzorkách bola kvantifikovaná metódou  $\Delta\Delta Ct$ . Expresia *uc.379*, *uc.380* a *uc.381* bola porovnávaná s referenčným génom *HPRT*. Relatívna normalizovaná koncentrácia templátu bola vypočítaná na základe vzorca  $N = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ , pričom  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{vz} - \Delta Ct_{kal}$  ( $\Delta Ct_{vz}$  - rozdiel nameraných hodnôt prahového cyklu cieľového génu a prahového cyklu referenčného génu v analyzovanej vzorke;  $\Delta Ct_{kal}$  – rozdiel nameraných hodnôt prahového cyklu cieľového génu a prahového cyklu referenčného génu v kalibrátore. Ako kalibračné vzorky slúžili vzorky RNA, ktoré pochádzali z nenádorových buniek sleziny, resp. periférnej krvi zdravých jedincov, ktoré boli prepísané do cDNA podľa postupu uvedeného vyššie.

## IV. VÝSLEDKY A DISKUSIA

### 1. ANALÝZA VYBRANÝCH GÉNOVÝCH MUTÁCIÍ REKURENTNÝCH U AML S NK

#### 1.1. VÝSLEDKY

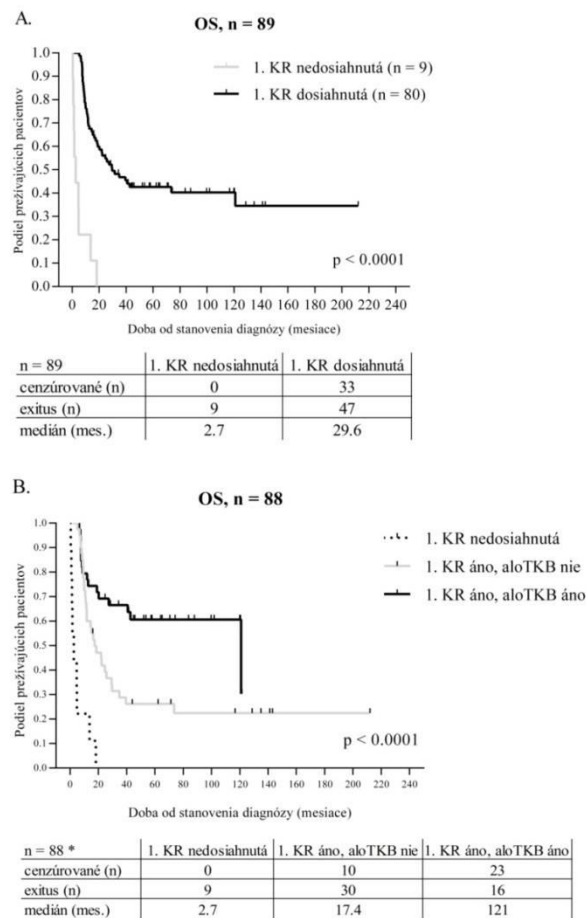
Prezentované výsledky sa týkajú (i) klinického priebehu AML, (ii) molekulárnej analýzy a (iii) zhodnotenia klinického významu molekulárneho profilovania v súbore 89 pacientov, ktorých jednotne charakterizovala diagnóza primárna (*de novo*) AML, normálny karyotyp v dobe diagnózy a kuratívna liečba, ktorá bola podaná podľa štandardizovaných liečebných protokolov HOK FNOL.

#### 1.1.1. KLINICKÝ PRIEBEH AML V ŠTUDOVANOM SÚBORE

##### **Analýza prežitia**

Medián sledovania prežitia súboru bol 74.3 mesiacov (6.2 rokov). Kompletnú remisiu dosiahlo po indukčnej chemoterapii 80 (90 %, 80/89) pacientov, z nich 63x po 1. indukcii, 1x po 2. indukcii, 3x po aloTKB a 13x po záchranej terapii. Súbor, ktorý dosiahol 1. KR tvorilo 66 % (53/80) mladších (< 60 rokov) resp. 34 % (27/80) starších ( $\geq$  60 rokov) pacientov. K dátumu posledného *follow up* (31.12.2014) bolo v súbore zaznamenaných 56 úmrtí (56/89, 63 %); medián prežitia celého súboru bol 24.6 mesiacov a pravdepodobnosť 5 ročného celkového prežitia bola 38 % (95 % CI, 28.3 % – 48.3 %). Z 9 pacientov bez dokumentovanej histórie 1. KR neprežíval k dátumu posledného *follow up* žiadny. Z 39 pacientov, ktorí v rámci postremisnej terapie podstúpili aloTKB prežívalo k dátumu posledného *follow up* 23 pacientov (23/39, 59 %), z nich každý absolvoval aloTKB v 1. KR; zo 6 pacientov transplantovaných mimo remisiu neprežíval žiadny. V tejto analýze nebol hodnotený pacient (n = 1), ktorý podstúpil aloTKB v 2. KR po predchádzajúcej autológnej TKB. Zo 40 pacientov, ktorí boli v rámci postremisnej terapie liečení výlučne chemoterapiou bez TKB prežívalo 10 pacientov (10/40, 20 %). Rozdiely v celkovom prežití v závislosti na odpovedi na indukčnú terapiu (1. KR áno/nie) a na následnej postremisnej therapeutickej intervencii

(aloTKB áno/nie) boli v študovanom súbore vysoko signifikantné ( $p < 0.0001$ , obrázok 10).



**Obrázok 10 - Kaplan-Meierove krivky prežitia súboru AML s NK v závislosti na odpovedi na indukčnú liečbu (1. KR dosiahnutá/nedosiahnutá) a na postremisnej terapii (aloTKB áno/nie) Počet zaznamenaných exitov bol uvedený pri každej skupine. \* - v tejto analýze nebol hodnotený pacient (n = 1), ktorý podstúpil aloTKB v 2. KR po predchádzajúcej autológnej TKB**

### Liečba a prežitie po relapse

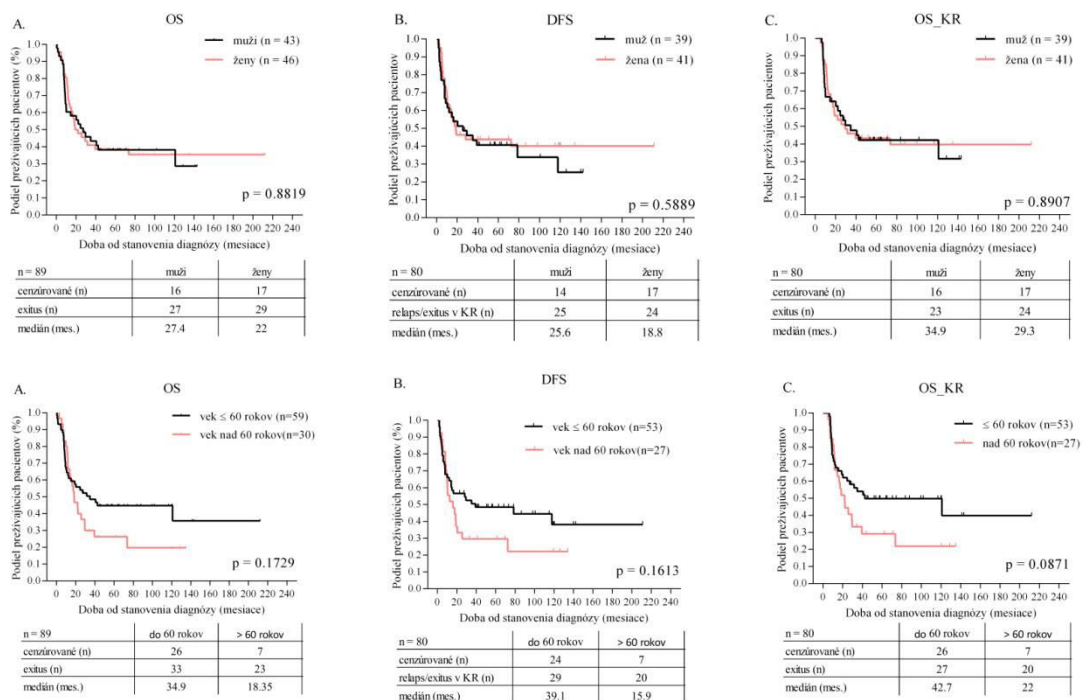
V súbore 80 pacientov, ktorí dosiahli 1. KR po indukčnej terapii bolo zaznamenaných 36 relapsov (36/80, 45 %) a 13 úmrtí v KR bez relapsu (13/80, 16 %); medián prežitia bez príznakov ochorenia (DFS) bol 19.75 mesiacov a pravdepodobnosť 5 ročného prežitia bez relapsu alebo smrti v KR bola 42 % (95% CI, 31.7 % - 52.7 %). Medián celkového prežitia v tejto skupine ( $OS_{KR}$ ) bol 29.6 mesiacov.



Relaps bol dokumentovaný v intervale 1.5 až 32 (medián 8.1) mesiacov od dátumu dosiahnutia 1. KR. V študovanej skupine 36 pacientov dosiahlo celkom 8 pacientov 2. KR (8/36, 22 %), ktorú vystriedal relaps v 5 prípadoch (5/8, 62.5 %) v intervale 1.2 až 9.9 (medián 3) mesiacov od 2. KR. Každý z 5 pacientov s opakovaným relapsom AML zomrel na progresiu ochorenia v priebehu 0.4 – 8 (medián 2.3) mesiacov od dátumu zachytenia 2. relapsu leukémie. Celkovo bol relaps dokumentovaný u 9 pacientov, ktorí podstúpili aloTKB (9/39, 23 %), u 26 pacientov, ktorí aloTKB neabsolvovali (26/40, 65 %) a bol zaznamenaný u pacienta po autológnej TKB (n = 1) (obrázok 18).

### Prežitie v závislosti na pohlaví a veku

Analyzovaný súbor nevykazoval významné rozdiely v klinickom priebehu v závislosti na pohlaví (muž/žena) resp. na porovnávaných vekových kategóriách (< 60 rokov vs ≥ 60 rokov) (obrázok 11).



**Obrázok 11 - Kaplan - Meierove krivky prežitia získané na základe analýzy OS (A), DFS (B) a OSKR (C) v závislosti na pohlaví (muž/žena) a veku (< 60 rokov / ≥ 60 rokov) v celom súbore 89 de novo AML s NK (A), resp. v súbore 80 de novo AML s NK, ktorí dosiahli 1. KR (B, C) Počet zaznamenaných exitov (OS/OS<sub>KR</sub>), resp. relapsov/exitov v KR bez relapsu (DFS) bol uvedený priamo pri analyzovaných skupinách.**

## 1.1.2. MOLEKULÁRNA ANALÝZA

Z molekulárnej analýzy študovaného súboru vyplynula nasledujúca distribúcia génových mutácií: *NPM1m* - 55 % (48/88), *FLT3m* - 48 % (43/89), *CEBPAm* - 13 % (12/89), *IDHm* - 26 % (23/88), *WT1m* - 7 % (6/89), *KMT2A-PTD* - 5% (4/86). Detailná frekvencia a distribúcia molekulárnych zmien v analyzovanom súbore je predmetom nasledujúcich kapitol.

### 1.1.2.1. Mutácie *NPM1* u AML s NK

Mutácie *NPM1* sa vyskytovali v 55 % (48/88) prípadov, v každom z nich boli pozorované v heterozygotnej forme. Genetický materiál (RNA) pre stanovenie mutačného profilu *NPM1* nebol dostupný u jedného pacienta. Identifikované *NPM1m* zodpovedali inzercii 4 nukleotidov do *wild-type* nukleotidovej sekvencie *NPM1* (referenčná sekvencia: NM\_002520.6 GeneBank). V analyzovanom súbore sa vyskytovalo celkom 6 typov inzerčných mutácií *NPM1* (tabuľka 12).

**Tabuľka 12 - Prehľad identifikovaných mutovaných aliel *NPM1* a ich distribúcia v súbore 48 AML s NK**

typ mutácie	počet prípadov	frekvencia (%)	wt 856-863	inzert	wt 864-868	inzert	wt 869 - 872	inzert	wt 873-891
A <sup>1</sup>	38	79	gatctctg	tctg	gca g	- t	gga	-	ggaggaagtcctttaa
O <sub>M</sub> <sup>2</sup>	6	13	gatctctg	tttg	gca g	- t	gga	-	ggaggaagtcctttaa
B <sup>1</sup>	1	2	gatctctg	catg	gca g	- t	gga	-	ggaggaagtcctttaa
D <sup>1</sup>	1	2	gatctctg	cctg	gca g	- t	gga	-	ggaggaagtcctttaa
M <sub>M</sub> <sup>2</sup>	1	2	gatctctg	-	gca a	agga t	gga	-	ggaggaagtcctttaa
neurčený	1	2	gatctctg	-	gca g	- c	gga	tgtc	ggaggaagtcctttaa

<sup>1</sup> – mutácie popísané vo (Falini et al., 2005), <sup>2</sup> – mutáci popísané v (Schnittger et al., 2005), wt – *wild type*; wt sekvencia bola číslovaná na základe referenčnej sekvencie NM\_002520.6 (CDS: 246..1130, ATG = 1)

### 1.1.2.2. Mutácie *FLT3* u AML s NK

Boli vyšetrené 2 typy mutácií *FLT3*, interná tandemová duplikácia *FLT3*-ITD a bodová mutácia v tyrozínkinázovej doméne *FLT3*-TKD. Distribúcia *FLT3m* bola nasledujúca: *FLT3*-ITD 36 % (32/89), *FLT3*-TKD 18 % (16/89); u časti pacientov (16 %, 5/32) boli identifikované obidve *FLT3m* súčasne.

Dĺžka duplikovaného úseku DNA dosahovala vo *FLT3*-ITD+ skupine 15 až 101 bp (medián 34 bp). Relatívne zastúpenie mutantnej alely vzhľadom k celkovej distribúcii *FLT3* aliel (alelová nálož) sa v analyzovanom súbore pohybovalo v intervale 0.01 až 0.97 (medián 0.36). Najčastejší bol nález *FLT3*-ITD/*FLT3*-ITD + wt =  $\leq 0.25$  -  $< 0.5$  (16/32, 50 %), ostatnú časť skupiny tvorili prípady s *FLT3*-ITD/*FLT3*-ITD + wt =  $< 0.25$  (10/32, 31 %) resp. s *FLT3*-ITD/*FLT3*-ITD + wt  $\geq 0.5$  (6/32, 19 %). Minoritná časť prípadov (5/32, 16 %) vykazovala viac ako jednu ITD alelu.

### 1.1.2.3. Mutácie *CEBPA* u AML s NK

Aspoň 1 mutácia *CEBPA* sa vyskytovala celkom u 12 pacientov (13 %, 12/89). Do súboru s mutovaným genotypom *CEBPA* neboli zaradené prípady (n = 2), u ktorých bola identifikovaná odchýlka od štandardnej nukleotidovej sekvencie *CEBPA* v podobe tichej bodovej mutácie 402 G>A (A134A). Mutácie boli rozptýlené po celej kódujúcej sekvencii *CEBPA* a vyskytovali sa v heterozygotnom stave. Na základe počtu identifikovaných mutácií boli pacienti rozdelení do 2 skupín, do skupiny s 1 mutáciou *CEBPA* (monoalelické, *CEBPAmo*, n = 5) a do skupiny, v ktorej boli identifikované 2 rôzne mutácie *CEBPA* (bialelické, dvojité, *CEBPAdm*, n = 7) (tabuľka 13). V analyzovanom súbore sa vyskytli 2 známe DNA polymorfizmy génu *CEBPA*, jednonukleotidový DNA polymorfizmus rs34529039 (G/T) a posunový DNA polymorfizmus pP194\_H195dup. Minoritné alely uvedených DNA polymorfizmov *CEBPA* boli identifikované u 18/89 (15 G/T, 3 T/T) resp. u 8/89 prípadov. V 3 prípadoch sa vyskytovali polymorfné alely rs34529039 spoločne s *CEBPAm* (1 z 3 prípadov vykazoval *CEBPAdm*); v rámci tejto skupiny bol v 2 prípadoch určený heterozygotný genotyp (G/T) rs34529039. Jeden z 8 dokumentovaných prípadov vykazoval polymorfnú alelu pP194\_H195dup spoločne s *CEBPAm*. Išlo o prípad s 1 mutáciou *CEBPA*.

**Tabuľka 13 - Prehľad *CEBP*Am a ich distribúcia v súbore 12 AML s NK**

Prípad	Pohlavie/vek (roky)	Mutácia <sup>1</sup>	Typ mutácie	Úroveň proteínu <sup>2</sup>
1	M/38	c.211_223del c.937_939dup	frameshift duplikácia v TAD1 in frame inzercia pred LZD	p.Asp75Thrfs*32 p.Lys313dup
2	Ž/63	c.149_161del c.937_939dup	frameshift pred TAD1 in frame inzercia pred LZD	p.Glu50Alafs*86 p.Lys313dup
3	M/51	c.238dupG c.846insA	frameshift v TAD1 frameshift inzercia medzi TAD2 a BR	p.Asp80Glyfs*28 p.Asn283Lysfs*38
4	M/25	c.244_245insCT c.929_930insTCT	frameshift v TAD1 missense substitúcia medzi DBD a LZD	p.Phe82Serfs*79 p.Gln311Leu
5	Ž/60	c.62_63dup c.944_945insCAC	frameshift duplikácia pred TAD1 frameshift inzercia pred LZD	p.Pro22Alafs*139 p.Glu316Thrfs*45
6	M/42	c.68dupC c.941_942dup	frameshift duplikácia pred TAD1 frameshift duplikácia pred LZD	p.His24Alafs*84 p.Leu314Cysfs*4
7	M/34	c.109_115 del c.943_945dup	frameshift duplikácia pred TAD1 in frame inzercia pred LZD	p.Ala40Argfs*120 p.Leu315dup
8	M/56	c.165_493del -	delécia TAD1, ktorá zasahuje až do TAD2	p.Ile55fs
9	Ž/54	c.707_713dup -	frameshift duplikácia medzi TAD1 a BR	p.Ala240Argfs*83
10	Ž/66	c.562_564del -	in frame delécia v TAD2	p.Pro188del
11	Ž/59	c.68dupC	frameshift duplikácia pred TAD1	p.His24Alafs*84
12	M/45	c.775_776delinsA -	frameshift inzercia medzi TAD2 a DBD	p.Ala259Thrfs*59

<sup>1</sup> - mutácie boli popisované na základe referenčnej sekvencie NM\_004364.4 (GeneBank) (kódujúca sekvencia 151-1227, číslovanie od iniciačného kodónu: ATG = 1)

<sup>2</sup> - posunové mutácie na úrovni proteínu boli odvodené teoreticky, \* - generovanie STOP kodónu  
M - muž, Ž - žena, TAD - transaktivačné domény, DBD - DNA väzobná doména, LZD - dimerizačná doména (leucínový zips)

#### 1.1.2.4. Mutácie *IDH1* a *IDH2* u AML s NK

V študovanom súbore boli *IDHm* identifikované u 28 % (25/88) vyšetrených prípadov. V jednotlivých génoch izocitrátdehydrogenázy bola incidencia mutácií nasledujúca: *IDH1m*, 10 % (9/88), *IDH2m* 18 % (16/89). U žiadneho pacienta sa nevyskytovali mutácie v oboch *IDH* génoch súčasne. Mutácie v *IDH1* (exón 4) predstavovali substitúciu zvyšku arginínu v kodóne 132 (R132). Vyskytli sa 2 rôzne substitučné varianty *IDH1*, R132H (n = 7) a R132C (n = 2). U 1 pacienta bola v géne *IDH1* potvrdená substitúcia T106M (ACG – ATG). Uvedený prípad nebol zahrnutý do hodnotenia mutačného profilu *IDH1*, nakoľko nebolo možné potvrdiť, či určená varianta *IDH1* predstavuje skutočnú mutáciu. V géne *IDH2* (exón 4) boli pozorované 2 typy nukleotidových substitúcií, c.G419A a c.G515A, ktoré zodpovedajú známym *IDH2m*, R140Q (n = 14) a R172K (n = 2). Všetky popísané bodové mutácie sa v študovanom súbore vyskytovali uniformne v heterozygotnom stave. U 11 pacientov (11/89, 12 %) bola identifikovaná minoritná alela synonymného jednonukleotidového polymorfizmu *IDH1* (exón 4), rs11554137 (kodón 105; GGC\_GGT). V každom z 11 prípadov sa vyskytol heterozygotný genotyp pre minoritnú alelu *IDH1*<sup>105GGT</sup>. V 1

prípade sa minoritná polymorfná SNP alela prezentovala paralelne s mutáciou *IDH1*(R132C). V analyzovanom súbore nebol pozorovaný výskyt žiadnej polymorfnej varianty génu *IDH2*.

#### 1.1.2.5. Mutácie *WT1* u AML s NK

Bol zhodnotený mutačný profil *WT1* v exónoch 7 a 9 a výskyt jednonukleotidového DNA polymorfizmu *rs16754* (G105G, A/G) v exóne 7. Identifikovalo sa celkom 7 rôznych typov mutácií *WT1* u 6 z 89 (7 %, 6/89) pacientov (tabuľka 14). U každého pacienta sa vyskytovali *WT1*m v heterozygotnom stave. Frekvencia genotypov *WT1* SNP *rs16754* bola v analyzovanom súbore nasledujúca: 2.3 % G/G (2/89), 27.3 % G/A (27/89), 67.4 % A/A (60/89).

**Tabuľka 14 - Prehľad identifikovaných *WT1*m u 6 AML s NK**

Prípado	Pohlavie/vek (roky)	Mutácia <sup>1</sup>	Exón	Typ mutácie	Úroveň proteínu <sup>2</sup>
1	M/23	c.1129_1135dup (c.1129_1135dupACTCTTG)	7	posunová	p.Val379Aspfs*8
2	Ž/56	c.1136_1143dup (c.1136_1143dupTACGGTTCG)	7	posunová	p.Ala382Tyrfs*8
3	Ž/60	c.1107dup (c.1107dupA)	7	posunová	p.Arg370Thrfs*15
4	Ž/60	c.1137_1138insAGGGTCTTGTA	7	posunová	p.Arg380Argfs*11
5	M/35	c.1142_C>A	7	meniaca zmysel /stop kodón/	p.S381X
6	Ž/49	c.1105_C>T c.1385_G>A	7 9	meniaca zmysel /stop kodón/ meniaca zmysel	p.R369X p.R462Q

<sup>1</sup> - mutácie boli popisované na základe referenčnej sekvencie NM\_024426.4 (GeneBank) (kódujúca sekvencia 191..1744 pri číslovaní od iniciačného kodónu: CTG = 1: exón 7: 1099..1249; exón 9: 1340..1432)

<sup>2</sup> - posunové mutácie na úrovni proteínu boli odvodené teoreticky, predpokladá sa, že všetky vedú k skráteniu proteínu (\* predčasne generovaný stop kodón)

M - muž, Ž - žena

#### 1.1.2.6. Mutácie *KMT2A*-PTD u AML s NK

V analyzovanom súbore sa vyskytli 4 prípady s mutáciou *KMT2A*-PTD (5 %, 4/86). Detekciu mutácie nebolo možné vykonať v 3 prípadoch z dôvodu nedostatku diagnostického genetického materiálu (RNA).

### 1.1.2.7. Zhodnotenie distribúcie 8 rekurentných mutácií u AML s NK

Súhrnné zhodnotenie frekvencie a distribúcie 8 rekurentných mutácií v súbore 89 AML s NK bolo spracované na obrázku 12. Aspoň 1 somatická mutácia bola detekovaná v 84 % (75/89) vyšetrených prípadov.

Kompletný a jasne definovateľný mutačný profil všetkých 8 molekulárných markerov bol dostupný u 85 z 89 prípadov. Somatická mutácia aspoň v 1 z analyzovaných génov bola v tomto súbore identifikovaná u 72 pacientov (85 %, 72/85). Z nich 51 (51/72, 71 %) pacientov nieslo mutáciu viac ako v 1 z analyzovaných génov. Prevažovala skupina s mutáciami v 2 rôznych génoch (n = 41), u časti pacientov sa vyskytovali mutácie v 3 rôznych génoch (n = 9) a v individuálnom prípade došlo k akumulácii génových mutácií v 4 rôznych génoch (spolu 5 rôznych mutácií, n = 1). Z hodnotených mutácií *NPM1m* významne asociovali s *FLT3-ITD* (p = 0.004), s *FLT3-TKD* (p = 0.005), pričom sa vylučovali s *CEBPAdm* (p = 0.044). V 12 z 25 (48 %) *IDHm* AML s NK sa vyskytla paralelne *NPM1m* (p = 0.8102), ktorá bola distribuovaná rovnomerne v súbore s *IDH1m* (n = 6, p=0.4979) a s *IDH2m* (n = 6, p = 0.2613). Častejšie sa *IDHm* vyskytovali aj s *FLT3m* (n = 8; 32 %, p = 0.0968; z toho *FLT3-ITD* n = 6, *FLT3-TKD* n = 1, *FLT3-ITD* aj *FLT3-TKD* n = 1) a v 3 prípadoch boli sprevádzané *KMT2A-PTD* (p = 0.0586). Okrem už zmieneného spoločného výskytu *KMT2A-PTD* s *IDHm* (*IDH1m*, n = 1 resp. *IDH2m*, n = 2, p = 0.0586), sa výskyt *KMT2A-PTD* vzájomne vylučoval s *NPM1m* (p = 0.035). Iné signifikantne významné asociácie medzi konkurentnými mutačnými profilmi potvrdené neboli.

Na základe kategorizácie mutácií do funkčných skupín v súlade s modelom, ktorý u AML navrhli členovia *The Cancer Genome Atlas Research Network* bol v analyzovanom súbore najčastejší nález *NPM1m* (55 %, 47/85), nasledovali aktivačné mutácie v signálnom géne (proliferačná výhoda - v tejto štúdii reprezentované *FLT3m*, 49 %, 42/85). Medzi častejšie rekurentné mutácie patrili mutácie v génoch regulujúcich metyláciu DNA (v tejto štúdii reprezentované *IDHm*, 27 %, 23/85) a mutácie v géne myeloidného TF (reprezentované *CEBPAm*, 14 %, 12/85) (obrázok 12).

Mutácia iba jedného funkčného typu bola identifikovaná u 29 % (21/72) prípadov (obrázok 12). Častejšie sa v súbore s kompletne definovaným molekulárnym profilom vyskytovali variabilné kombinácie mutačných profilov (51/72, 71 %). Z nich najčastejšie sa vyskytli kombinácie aktivačných signálnych mutácií (v tejto práci reprezentované *FLT3m*) a *NPM1m* (44 %, 32/72 prípadov). V tejto molekulárnej

skupine vykazovalo 10 (32 %, 10/32) pacientov mutáciu ďalšieho funkčného typu (obrázok 12).

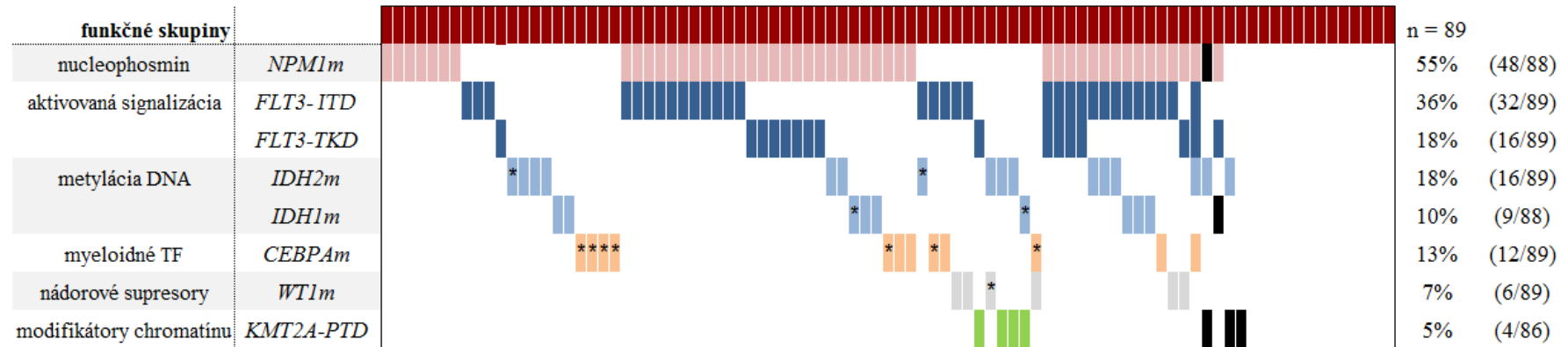
Vybraní pacienti niesli *NPM1m* v sprievode mutácie niektorého iného funkčného typu ako *FLT3m* (n = 8). V tomto súbore sa prezentovali mutácie v epigenetických regulátoroch (*IDHm*, n = 5) resp. v myeloidnom TF (*CEBPAm*, n = 3).

V skupine s aktivačnou mutáciou vo *FLT3* bez *NPM1m* (n = 5) sa vyskytovali mutácie v myeloidnom TF *CEBPA* (n = 2), v nemyeloidnom TF *WT1* (n = 2) alebo bola zachytená mutácia v epigenetickom regulátore (n = 1). V poslednom zo zmienovaných prípadov išlo o jedného z celkom dvoch pacientov, ktorí vykazovali v porovnaní s *IDH2(R140Q)* menej častú variantu *IDH2(R172K)*.

U 3 zo 4 pacientov s predpokladanou poruchou v metylácii DNA (*IDHm*) poukázala molekulárna analýza súčasne na poruchu na úrovni modifikácie chromatínu (*KMT2A-PTD*); v ostávajúcom prípade bola určená mutácia v nemyeloidnom TF *WT1* z funkčnej skupiny nádorových supresorov.

Ďalšie kombinácie funkčných skupín mutácií boli v študovanom súbore AML s NK viazané na individuálne prípady (n = 2). U prvého pacienta došlo k akumulácii aktivačnej mutácie v signálnom géne (*FLT3-TKD*) a súčasne k zásahu na úrovni modifikácie chromatínu (*KMT2A-PTD*); u ďalšieho pacienta bol zaznamenaný mutovaný profil v myeloidnom TF (*CEBPAdm*) súčasne s mutáciou v inom (nemyeloidnom) TF (*WT1m*).

Súhrnne bolo v študovanom súbore 89 AML s NK identifikovaných 151 mutácií, z nich v 13 prípadoch boli určené 2 rozličné mutácie v tom istom géne. Išlo o vyššie zmienené prípady so súčasným výskytom *FLT3-ITD* a *FLT3-TKD* (n = 5), o prípady s 2 *CEBPAdm* (n = 7) a o pacienta s 2 rozličnými mutáciami *WT1* (n = 1) (obrázok 12).



**Obrázok 12 - Celkové zhodnotenie frekvencie a distribúcie mutácií v *NPM1*, *FLT3*, *IDH1*, *IDH2*, *CEBPA*, *WT1* a *KMT2A* génoch v súbore 89 AML s NK** Každý stĺpec zodpovedá 1 pacientovi. Frekvencia mutácií bola vyznačená zostupne a bola farebne odlišená pre každý z analyzovaných génov, počet farebne vyznačených stĺpcov zodpovedá počtu identifikovaných mutácií. Mutačné profily boli zoskupené do 6 funkčných skupín – nucleophosmin (*NPM1m*, ružové), aktivovaná signalizácia (*FLT3-ITD* a/alebo *FLT3-TKD*, tmavo modré), metylácia DNA (*IDH1m*, *IDH2mut*, svetlo modré), myeloidné TF (*CEBPAm*, oranžové), nádorové supresory (*WT1m*, sivé), modifikátory chromatinu (*KMT2A-PTD*, zelené). Čierne plochy poukazujú na prípady s chýbajúcimi dátami o mutačnom profile, resp. na prípad, u ktorého nebolo možné spoľahlivo určiť, či identifikovaná substitúcia predstavuje skutočnú mutáciu. Na obrázku boli v príslušných funkčných skupinách vyznačené (\*) prípady s *IDH1*(R132C), *IDH2*(R172K), *CEBPAdm* a prípad s 2 rôznymi *WT1m* (v exóne 7 aj 9).



### 1.1.3. KLINICKÝ VÝZNAM MOLEKULÁRNYCH MARKEROV V ŠTUDOVANOM SÚBORE AML S NK

Predmetom nasledujúcich kapitol sú dáta, ktoré boli získané na základe analýzy klinickej hodnoty molekulárneho profilovania v študovanom súbore AML s NK, kedy sme postupovali od zhodnotenia prognostickej hodnoty mutačných profilov ako samostatných markerov AML (kapitola 1.1.3.1.) smerom k analýzam, kedy sme sa pokúsili zhodnotiť význam molekulárnej stratifikácie pri paralelnom zhodnotení viacerých mutačných profilov (kapitola 1.1.3.2. resp. 1.1.3.3.).

#### 1.1.3.1. Prognostická hodnota mutačných profilov ako samostatných markerov AML s NK

##### Samostatné molekulárne markery a vybrané klinické charakteristiky AML

V dobe stanovenia diagnózy koreloval nález *FLT3*-ITD a *NPM1*m s vyšším počtom leukocytov ( $p = 0.0009$ , resp.  $p = 0.0002$ ) (tabuľka 15). Iná významná asociácia mutačného profilu s niektorou zo sledovaných klinických charakteristík v študovanom súbore AML s NK potvrdená nebola (tabuľka 15).

##### Samostatné molekulárne markery a ukazovatele odpovede na liečbu

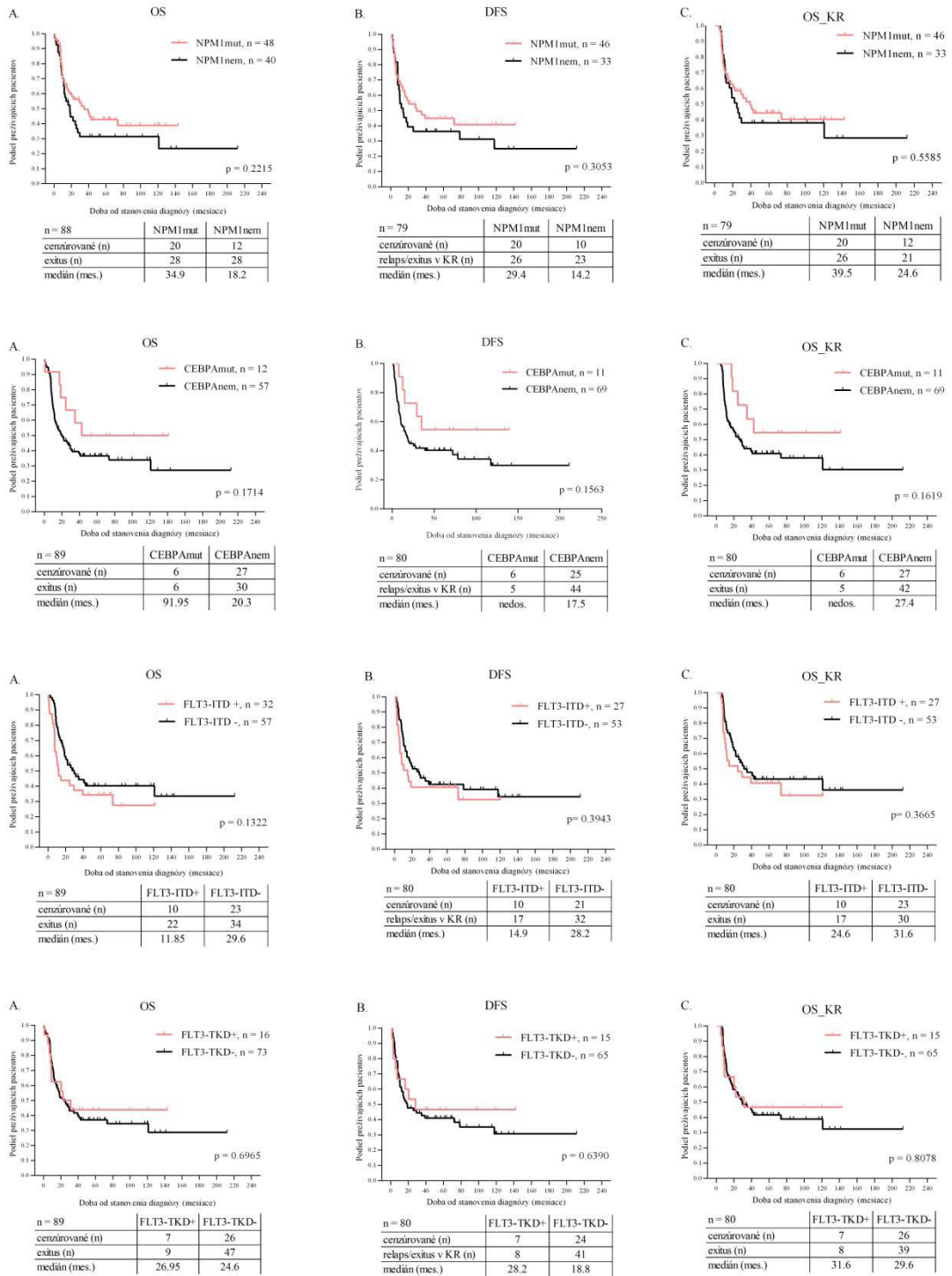
Trend smerom k priaznivému efektu na úspešnosť indukčnej liečby (podiel dosiahnutých 1. KR) bol naznačený v prípade nálezu *NPM1*m, zistené rozdiely však nedosiahli úroveň štatistickej významnosti ( $p = 0.0731$ ) v hodnotenom súbore. Záznam o 2. KR signifikantne asocioval s nálezom *CEBPA*m ( $p = 0.0053$ ) resp. sa vylučoval s nálezom *FLT3*-ITD ( $p = 0.0320$ ). Ostatné porovnávané skupiny sa signifikantne neodlišovali v počte zachytených udalostí (KR, relaps) (tabuľka 15).

##### Samostatné molekulárne markery a prežitie

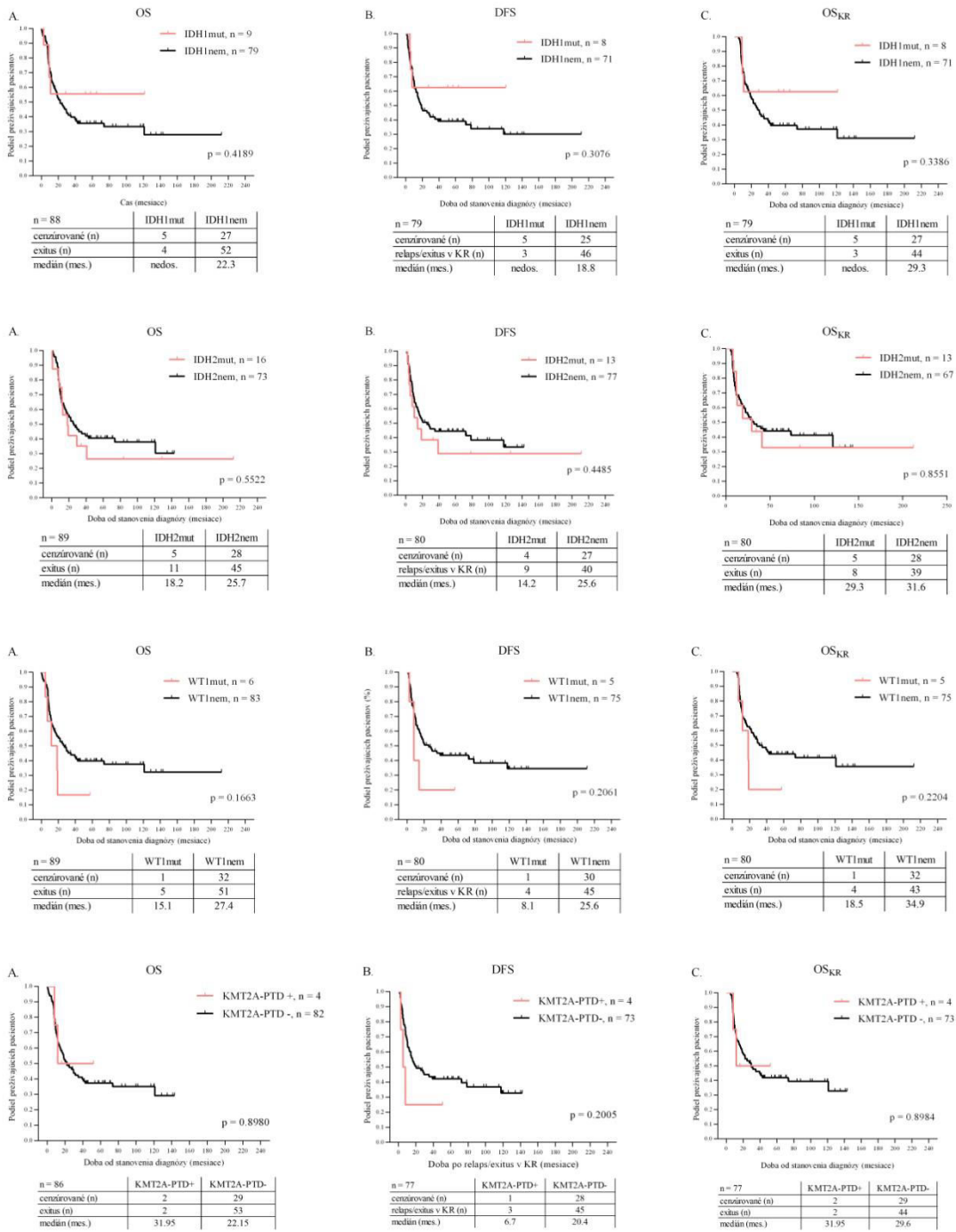
Iniciálne bol v univariantnej analýze zhodnotený klinický význam mutačných profilov ako samostatných markerov. Získané krivky prežitia Kaplan – Meiera boli znázornené na obrázku 13 resp. 14.

**Tabuľka 15 - Zhodnotenie (i) vzt'ahu medzi mutačnými profilmi a vybranými klinickými aspektmi z doby diagnózy AML s NK a (ii) klinický priebeh AML v závislosti na zistených mutačných profiloch +/- - áno/nie; KR – kompletná remisia; aloTKB – alogénna transplantácia krvotvorných buniek; OS – celkové prežitie; DFS – prežitie bez príznakov ochorenia; m – mutovaný; \* - chýbajúce, resp. nejasné mutačné profily v príslušných génoch neboli zahrnuté do analýzy; do hodnotenia aloTKB nebol zahrnutý pacient (n = 1; genotyp *NPM1m/FLT3*-TKD+; 1.KR +; relaps +; skorý relaps -; 2. KR +; 2. relaps -), ktorý podstúpil aloTKB v 2. KR po predchádzajúcej autológnej TKB**

	n	pohlavie		Vek (roky, rozsah)	Vek		WBC x 10 <sup>9</sup> /L medián (rozsah)	1.KR (+/-)	relaps (+/-)	skorý relaps (+/-)	2. KR (+/-)	2. relaps (+/-)	aloTKB (+/-)	aloTKB v 1.KR (+)	aloTKB mimo 1.KR (+)	medián OS	medián DFS	medián OS <sub>KR</sub>
		muži	ženy		< 60 rokov	≥ 60 rokov												
<i>de novo</i> AML s NK	89	43	46	54.8 (22.4 – 72.2)	59	30	45.69 (0.6 - 316.1)	80 (90 %)	36 (45 %)	16 (44 %)	8 (22 %)	5	39* (49 %)	33* (85 %)	6 (15 %)	24.6	19.75	29.6
<i>FLT3</i> -ITD																		
pozitívny	32	13	19	53.3 (23.3 - 65.3)	22	10	67.75 (2.3 - 282.3)	27/5	13/14	7/6	0/13	0/5	13/14	10	3	11.85	14.9	24.6
negatívny	57	30	27	55.0 (22.4 - 72.2)	37	20	22.1 (0.6 - 316.1)	53/4	23/30	9/14	8/15	0/3	27/26	24	3	29.6	28.2	31.6
<b>P</b>		0.377		0.5876	0.817		<b>0.0009</b>	0.2736	0.813	0.4932	<b>0.0320</b>	1.000	1.000			<b>0.1322</b>	<b>0.3943</b>	<b>0.3665</b>
<i>FLT3</i> -TKD																		
pozitívny	16	9	7	54.1 (22.5 - 61.7)	12	4	61.27 (3.1 - 206.3)	15/1	6/9	3/3	1/5	0/5	7*/7	7*	0	26.95	28.2	31.6
negatívny	73	34	39	55.9 (22.4 - 72.2)	47	26	41.68 (0.6 - 316.1)	65/8	30/35	13/17	7/23	1/2	32/33	26	6	24.6	18.8	29.6
<b>P</b>		0.584		0.5199	0.563		0.2752	1.000	0.777	1.000	1.000	0.375	1.000			<b>0.6965</b>	<b>0.6390</b>	<b>0.8078</b>
<i>CEBPA</i>																		
mutovaný	12	7	5	53.15 (25.7 - 66.7)	9	3	60.34 (4.630 - 316.1)	11/1	5/6	2/3	4/1	4/1	5/6	5	0	91.95	nedos.	nedos.
nemutovaný	77	36	41	55 (22.4 - 72.2)	50	27	42.8 (0.6 - 282.3)	69/8	31/38	14/17	4/27	0/3	35/34	29	6	20.3	17.5	27.4
<b>P</b>		0.542		0.5347	0.744		0.3098	1.000	1.000	1.000	<b>0.0053</b>	0.1429	1.000			<b>0.1714</b>	<b>0.1563</b>	<b>0.1619</b>
<i>NPM1</i> *																		
mutovaný	48	21	27	54.25 (22.5 - 72.2)	34	14	61.44 (1.76 - 282.3)	46/2	19/27	10/9	5/14	4/1	24*/21	20*	4	34.9	29.4	39.5
nemutovaný	40	22	18	55.45 (22.4 - 71.6)	25	15	10.77 (0.6 - 316.1)	33/7	17/16	6/11	3/14	1/2	14/19	12	2	18.2	14.2	24.6
<b>P</b>		0.392		0.5720	0.496		<b>0.0002</b>	<b>0.0731</b>	0.4924	0.3351	0.6951	0.4643	0.3682			<b>0.2215</b>	<b>0.3053</b>	<b>0.5585</b>
<i>IDH1</i> *																		
mutovaný	9	5	4	49.6 (32.7 - 69.9)	8	1	28.52 (2.5 - 244.4)	8/1	2/6	2/0	1/1	1/4	6/2	6	0	nedos.	nedos.	nedos.
nemutovaný	79	38	41	55.9 (22.4 - 72.2)	51	29	48.1 (0.6 - 316.1)	71/8	34/37	14/20	7/27	0/3	33/38	27	6	22.3	18.8	29.3
<b>P</b>		0.736		0.2683	0.263		0.8837	1.000	0.280	0.1905	0.4	1.000	0.1543			<b>0.4189</b>	<b>0.3076</b>	<b>0.3386</b>
<i>IDH2</i>																		
mutovaný	16	6	10	54.9 (22.4 - 66.0)	11	5	36.7 (0.6 - 184.9)	13/3	6/7	4/2	1/5	0/5	7/6	5	2	18.2	14.2	29.3
nemutovaný	73	37	36	54.8 (22.5 - 72.2)	48	25	45.69 (1.19 - 316.1)	67/6	30/37	12/18	7/23	1/2	33/34	29	4	25.7	25.6	31.6
<b>P</b>		0.413		0.5233	1.000		0.6586	0.2013	1.000	0.3738	1.000	0.375	1.000			<b>0.5522</b>	<b>0.4485</b>	<b>0.8551</b>
<i>WT1</i>																		
mutovaný	6	2	4	53.05 (23.3 - 60.4)	4	2	25.04 (1.36 - 159.5)	5/1	3/2	2/1	2/1	1/4	3/2	1	2	15.1	8.1	18.5
nemutovaný	83	41	42	54.8 (22.4 - 72.2)	55	28	48.1 (0.6 - 316.1)	75/8	33/42	14/19	6/27	1/2	37/38	33	4	27.4	25.6	34.9
<b>P</b>		0.678		0.4448	1.000		0.4746	0.4829	0.653	0.5741	0.1176	1.000	1.000			<b>0.1663</b>	<b>0.2061</b>	<b>0.2204</b>
<i>KMT2A</i> -PTD***																		
pozitívny	4	2	2	54.9 (50.0 - 66.0)	3	1	43.61 (0.6 - 206.3)	4/0	3/1	2/1	0/3	0/5	1/3	1	0	31.95	6.7	31.95
negatívny	82	41	41	54.8 (22.5 - 72.2)	55	27	48.55 (0.7 - 316.1)	73/9	32/41	14/18	8/24	1/2	38/35	32	6	22.15	20.4	29.6
<b>P</b>		1.000		0.6398	1.000		0.9115	1.000	0.325	0.5820	1.000	1.000	0.3584			<b>0.8980</b>	<b>0.2005</b>	<b>0.8980</b>



**Obrázok 13 - Kaplan - Meierove krivky prežitia získané na základe univariantnej analýzy OS (A) DFS (B) a OS<sub>KR</sub> (C) v závislosti na zistených mutačných profiloch *NPM1*, *CEBPA*, *FLT3-ITD* a *FLT3-TKD* ako samostatných markerov AML s NK mut/nem = mutovaný/nemutovaný; +/- = pozitívny/negatívny**

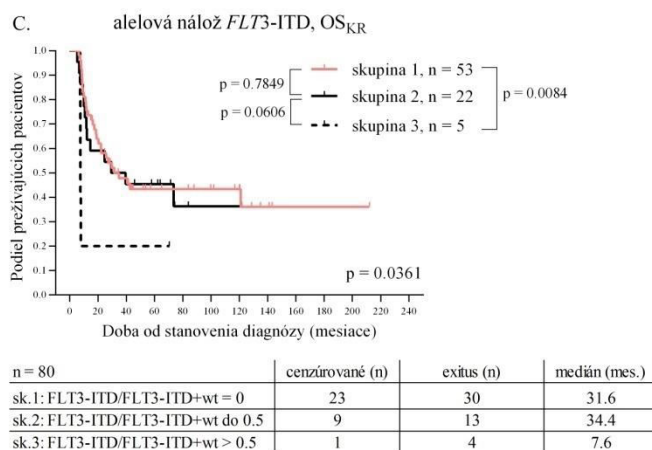
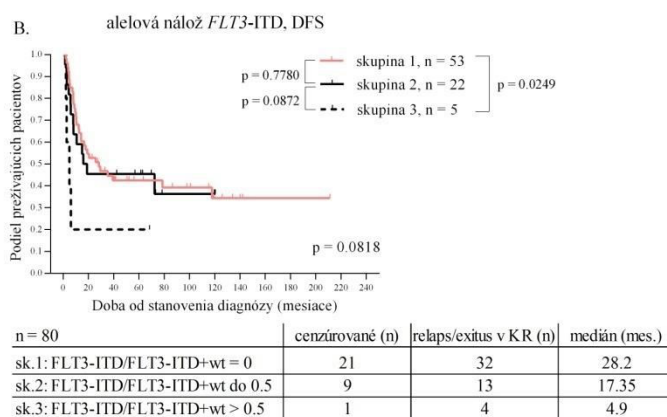
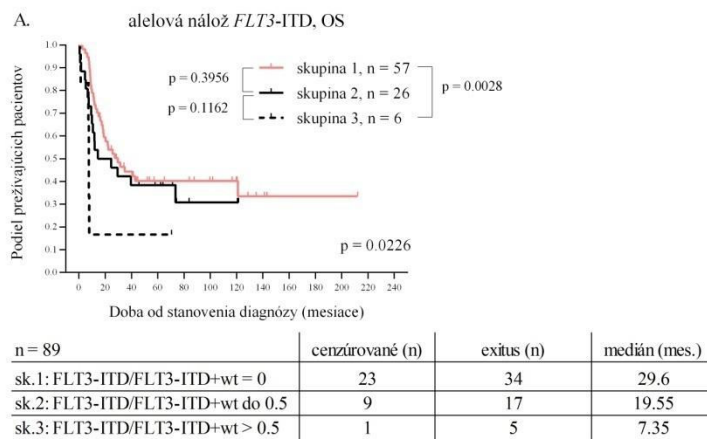


**Obrázok 14 - Kaplan - Meierove krivky prežitia získané na základe univariantnej analýzy celkového prežitia OS (A) DFS (B) a OS<sub>KR</sub> (C) v závislosti na zistených mutačných profiloch IDH1, IDH2, WT1 a KMT2A-PTD ako samostatných markerov AML s NK mut/nem = mutovaný/nemutovaný; +/- = pozitívny/negatívny**

### Prognostická hodnota alelovej náložie vo *FLT3-ITD*+ skupine AML s NK

V skupine s mutáciou *FLT3-ITD* bola analýza prežitia doplnená o zhodnotenie OS, resp. DFS/ $OS_{KR}$  v závislosti na alelovej náložii *FLT3-ITD* (viď kapitola 1.1.2.2). Boli porovnávané 3 skupiny pacientov: bez *FLT3-ITD* (skupina 1, n = 57), *FLT3-ITD* s alelovou náložou < 0.5 (skupina 2, n = 26) a *FLT3-ITD* s alelovou náložou  $\geq 0.5$  (skupina 3, n = 6). Získané výsledky štatistickej analýzy boli uvedené na obrázku 15 A, B, C.

Prežitie súboru v *CEBPAm* skupine (n = 12) v závislosti na variabilite v počte mutovaných aliel (*CEBPAmo* vs *CEBPAdm*) nebol vzhľadom na výrazne limitovaný podiel pacientov v porovnávaných podskupinách (n = 5 vs n = 7) štatisticky zhodnotený. V porovnaní s pacientmi s nálezom *CEBPAmo* (medián OS, DFS, resp.  $OS_{KR}$  = 34.9, 51.25 resp. 54.6 mesiacov), alebo s pacientmi bez *CEBPAm* (medián OS, DFS, resp.  $OS_{KR}$  = 10.3, 17.5 resp. 27.4 mesiacov, tabuľka 13, časť *CEBPA* nemutovaný), medián OS, DFS resp.  $OS_{KR}$  nebol u pacientov s *CEBPAdm* dosiahnutý.



**Obrázok 15 - Kaplan - Meierove krivky prežitia získané na základe analýzy celkového prežitia pacientov v závislosti na alelovej náloži *FLT3*-ITD Počet prípadov v jednotlivých skupinách vrátane počtu zaznamenaných exitov (OS / OS<sub>KR</sub>) resp. relapsov/ exitov v KR (DFS) bol uvedený priamo pri analyzovanej skupine.**

### 1.1.3.2. Prognostická hodnota nález *FLT3-ITD* v *NPM1m* AML s NK

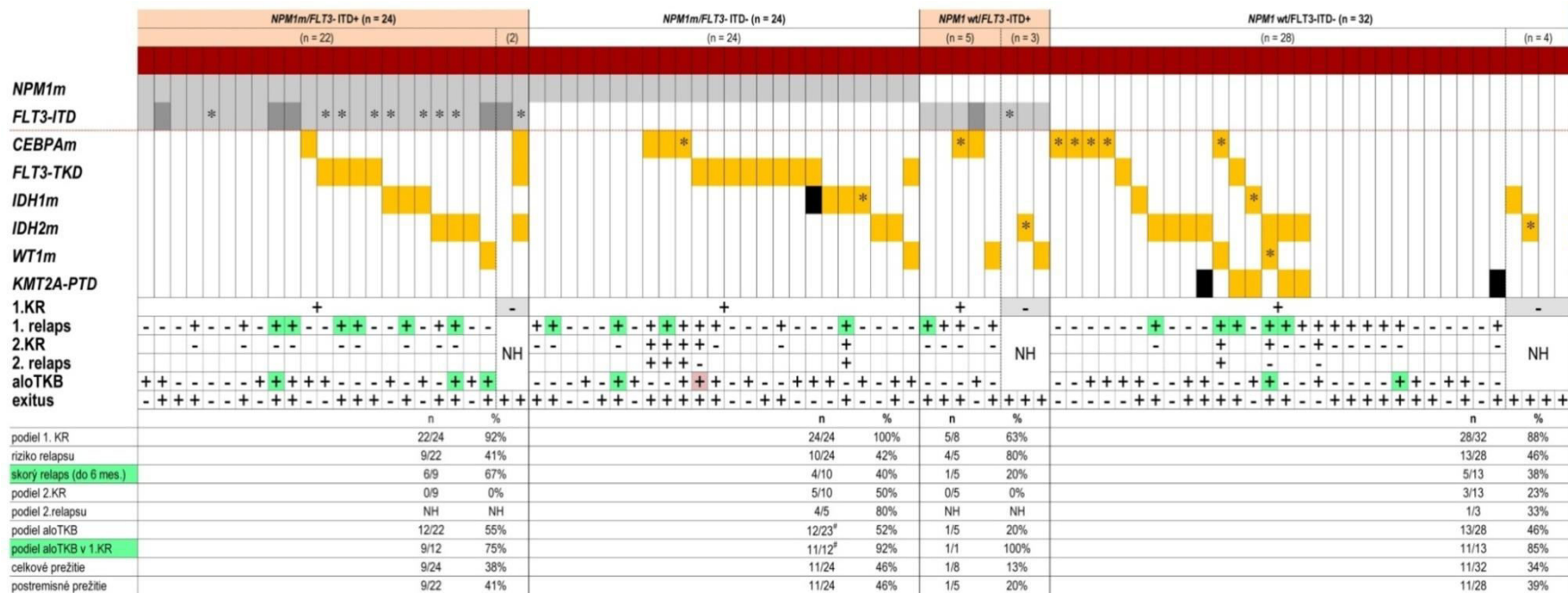
Ako bolo uvedené v príslušnej kapitole, nález *FLT3-ITD* významne asocioval s *NPM1m* ( $p = 0.004$ ) (obrázok 12). Vplyv týchto 2 molekulárnych markerov na OS resp. DFS/OS<sub>KR</sub> bol zhodnotený na základe rozdelenia súboru AML s NK do 4 skupín; boli porovnávané tieto skupiny: *NPM1mut* a súčasne *FLT3-ITD* pozitivita (skupina 1,  $n = 24$ ), *NPM1mut* bez *FLT3-ITD* (skupina 2,  $n = 24$ ), *FLT3-ITD* pozitivita bez *NPM1mut* (skupina 3,  $n = 8$ ) a žiadna z hodnotených mutácií (skupina 4,  $n = 32$ ).

#### Klinické ukazovatele odpovede na liečbu

Klinický priebeh AML (počet KR a relapsov) a typ absolvovanej postremisnej terapie (aloTKB áno/nie) v jednotlivých molekulárnych skupinách bol znázornený na obrázku 16.

#### Iné molekulárne markery

Komplexná molekulárna analýza poukázala u významného podielu pacientov, ktorí boli stratifikovaní na základe genotypu *NPM1* a *FLT3-ITD* na konkurentný výskyt ďalšieho mutačného profilu (*CEBPAm*, *FLT3-TKD*, *IDH1m*, *IDH2m*, *WT1m*, *KMT2A-PTD*) (obrázok 16). Aspoň 1 z týchto mutácií bola identifikovaná u 41 % (13/32) prípadov v skupine *NPM1m/FLT3-ITD+* resp. u 71 % (17/24) prípadov v skupine *NPM1m/FLT3-ITD-*. Niektorý ďalší molekulárny marker vykazovala aj prevažná časť prípadov (5/8, 63 %) s *FLT3-ITD* bez *NPM1m* (obrázok 16). Pri tejto stratifikácii boli pacienti s *CEBPAdm* sústredení prevažne do skupiny s *NPM1wt/FLT3-ITD-* (5/7, 71 %), ktorú zdieľali s prípadmi s nálezom *KMT2A-PTD* (4/4, 100 %).



**Obrázok 16 - Klinický priebeh AML (počet KR, relapsov) a typ absolvovanej postremisnej terapie (aloTKB áno/nie) pri stratifikácii súboru na základe mutačného statusu *NPM1* a *FLT3-ITD*** Súbor AML s NK bol rozdelený do 4 molekulárnych skupín nasledovne: *NPM1m/FLT3-ITD+* (skupina 1); *NPM1m/FLT3-ITD-* (skupina 2); *NPM1wt/FLT3-ITD+* (skupina 3) a žiadna z hodnotených mutácií (skupina 4). Počet farebne vyznačených stĺpcov (sivé polia) zodpovedá počtu identifikovaných mutácií príslušného typu. Okrem prognostických mutácií bola na obrázku vyznačená distribúcia mutácií ďalších funkčných typov (oranžové polia) v rámci definovaných molekulárnych skupín. Čierne polia znázorňujú prípady s nedostupným mutačným profilom príslušného génu. \* - prípady s alelovou náložou *FLT3-ITD/ITD+wt* < 0.25, prípady s nálezom *CEBPAdm*, prípady s *IDH1(R132C)*, resp. prípad s 2 rozličnými mutáciami *WT1*; na obrázku boli v rámci *FLT3-ITD+* skupiny vyznačené (tmavo sivé polia) prípady s alelovou náložou *FLT3-ITD/ITD+wt* ≥ 0.5. Prípady, ktoré neboli značené inak (\*, tmavo sivé polia) vykazovali alelovú nálož *FLT3-ITD/ITD+wt* = ≥ 0.25 - <0.5, *IDH1(R132H)*, *IDH2(R140Q)*, resp. 1 mutáciu *WT1*. # - pacient (*NPM1m/FLT3-TKD+*), ktorý podstúpil aloTKB v 2. KR po predchádzajúcej autológnej transplantácii nebol zahrnutý do hodnotenia podielu aloTKB v študovanom súbore AML s NK (pacient bol vyznačený ružovo). KR – kompletná remisia, aloTKB – alogénna transplantácia krvotvorných buniek, +/- - áno/nie, wt – štandardná (nemutovaná, *wild-type*) alela

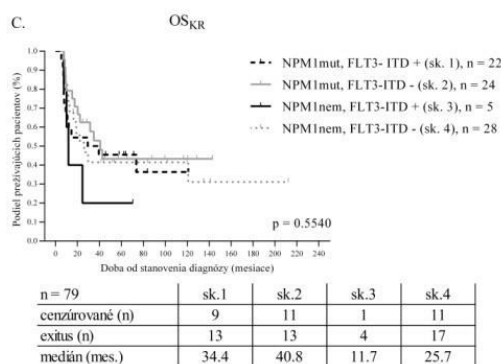
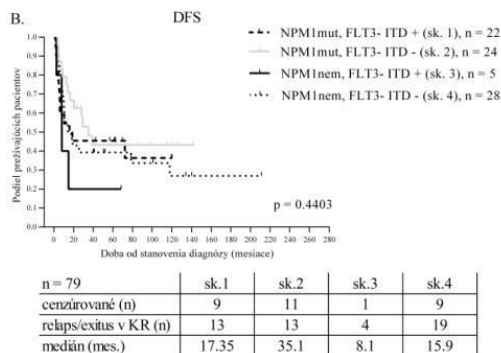
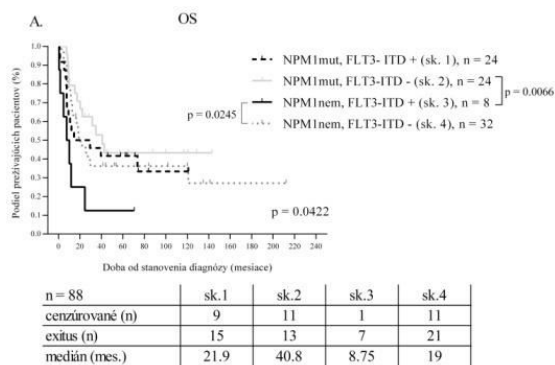


### Zhodnotenie klinického priebehu AML v molekulárnych skupinách po absolvovaní indukčnej terapie

Po absolvovaní indukčnej terapie bol medián OS najlepší v skupine s *NPM1*m bez *FLT3*-ITD (40.8 mesiacov) a najhorší v skupine s *FLT3*-ITD bez *NPM1*m (8.75 mesiacov), ostávajúce 2 molekulárne skupiny sa na základe mediánu OS (*NPM1*m/*FLT3*-ITD+ = 21.5 mesiacov resp. *NPM1*wt/*FLT3*-ITD- = 19 mesiacov) neodlišovali ( $p = 0.0422$ ) (obrázok 17A). Pri tejto stratifikácii boli krivky prežitia pacientov s *FLT3*-ITD+/*NPM1*wt signifikantne horšie v porovnaní so skupinou s *NPM1*m/*FLT3*-ITD- ( $p = 0.0066$ ), resp. v porovnaní so skupinou *NPM1*wt/*FLT3*-ITD- ( $p = 0.0245$ ). Ostávajúce kombinácie vždy 2 mutačných profilov nevykazovali pri danej stratifikácii signifikantné rozdiely v OS študovaného súboru (obrázok 17).

### Zhodnotenie klinického priebehu AML v molekulárnych skupinách po dosiahnutí 1. KR

Pri stratifikácii súboru AML s NK na základe mutačného profilu *NPM1* a *FLT3*-ITD sa rozdiely v OS nepremietli do signifikantných rozdielov v DFS ( $p = 0.4403$ ) ani v OS<sub>KR</sub> ( $p = 0.5540$ ) (obrázok 17B, C).



**Obrázok 17 - Kaplan - Meierove krivky prežitia získané na základe analýzy mutačných profilov *NPM1* a *FLT3-ITD*** Počet prípadov v jednotlivých skupinách vrátane počtu zaznamenaných exitov (OS / OS<sub>KR</sub>) resp. relapsov/ exitov v KR (DFS) bol uvedený priamo pri každej analyzovanej skupine. OS: sk.1 vs sk. 2 p = 0.3445; sk. 1 vs sk. 3 p = 0.0725; sk. 1 vs sk. 4 p = 0.8602; sk. 2 vs sk. 3 p = 0.0066; sk. 2 vs sk. 4 p = 0.2782; sk. 3 vs sk. 4 p = 0.0245; DFS: sk.1 vs sk. 2 p = 0.4605; sk. 1 vs sk. 3 p = 0.4325; sk. 1 vs sk. 4 p = 0.9764; sk. 2 vs sk. 3 p = 0.1041; sk. 2 vs sk. 4 p = 0.2803; sk. 3 vs sk. 4 p = 0.3283; OS<sub>KR</sub>: sk.1 vs sk. 2 p = 0.5609; sk. 1 vs sk. 3 p = 0.3730; sk. 1 vs sk. 4 p = 0.8217; sk. 2 vs sk. 3 p = 0.1719; sk. 2 vs sk. 4 p = 0.5476; sk. 3 vs sk. 4 p = 0.2360

### **1.1.3.3. Prognostická hodnota komplexného molekulárneho profilovania na základe *FLT3*-ITD, *NPM1*m a *CEBPA*m u AML s NK**

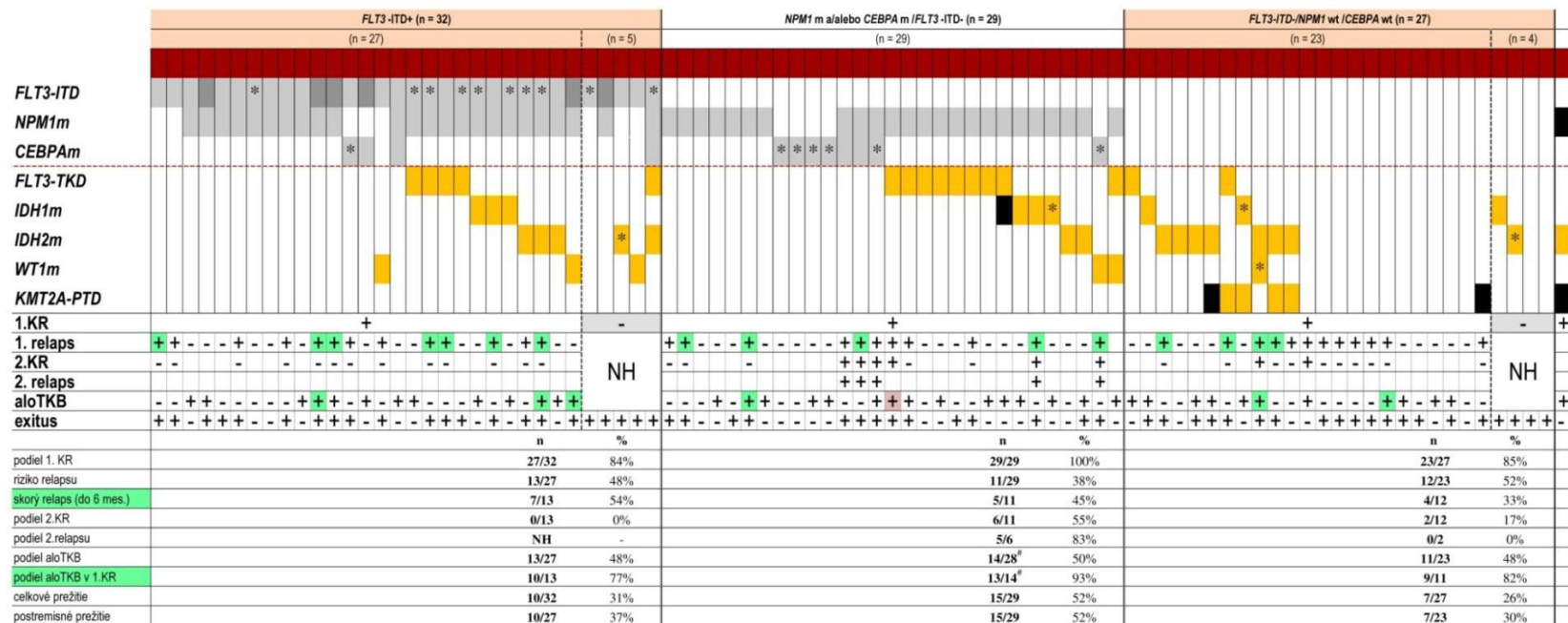
V ďalšom kroku bol súbor AML s NK rozdelený do 3 molekulárnych skupín na základe komplexného zhodnotenia mutačného profilu *NPM1*, *CEBPA* a *FLT3*-ITD.

#### Klinické ukazovatele odpovede na liečbu

Klinický priebeh AML (počet KR a relapsov) a typ absolvovanej postremisnej terapie (aloTKB áno/nie) v testovaných molekulárnych skupinách bol znázornený na obrázku 18 a detailne bol popísaný v tabuľke 16.

#### Iné molekulárne markery

Významný podiel pacientov, ktorí boli kategorizovaní do *FLT3*-ITD+ (16/32, 50 %) resp. do skupiny *NPM1*m a/alebo *CEBPA*m / *FLT3*-ITD- (16/29, 55 %) vykazoval okrem prognostických mutácií konkurentný výskyt ďalšieho mutačného profilu (*FLT3*-TKD, *IDH1*m, *IDH2*m, *WT1*m, *KMT2A*-PTD). Aspoň 1 z týchto mutácií bola identifikovaná aj u časti pacientov s genotypom *FLT3*-ITD-/*NPM1*wt/*CEBPA*wt (13/27, 48 %), pričom nález *KMT2A*-PTD (n = 4) bol viazaný selektívne na túto molekulárnu skupinu AML. Distribúcia rekurentných mutácií v jednotlivých molekulárnych skupinách bola znázornená na obrázku 18.



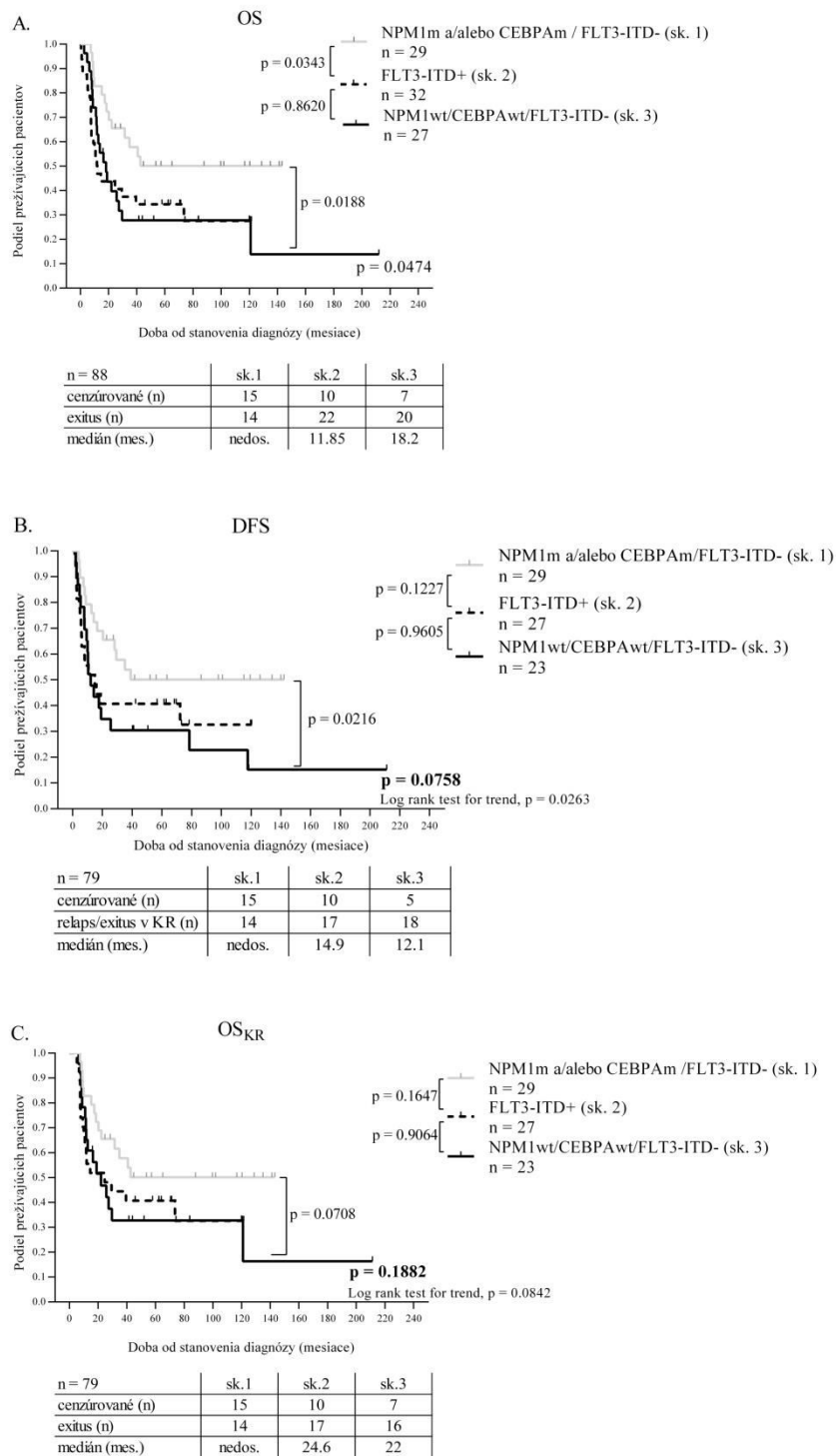
**Obrázok 18 - Distribúcia rekurentných mutácií, klinický priebeh AML (počet KR, relapsov) a typ absolvovanej postremisnej terapie (aloTKB áno/nie) po stratifikácii súboru AML s NK do 3 molekulárnych skupín** Súbor AML s NK bol rozdelený nasledovne: nález *FLT3-ITD* bez ohľadu na mutačný profil *NPM1* resp. *CEBPA* (skupina 1); nález aspoň 1 priaznivého markeru bez *FLT3-ITD* (skupina 2); žiadna z prognostických mutácií (skupina 3). Počet farebne vyznačených stĺpcov (sivé polia) zodpovedá počtu identifikovaných mutácií príslušného typu. Okrem prognostických mutácií bola na obrázku vyznačená distribúcia mutácií ďalších funkčných typov (žlté polia) v rámci definovaných molekulárnych skupín. Čierne polia znázorňujú prípady s nedostupným mutačným profilom príslušného génu. \* - prípady s alelovou náložou *FLT3-ITD/ITD+wt* < 0.25, prípady s nálezom *CEBPA*adm, prípady s *IDH1*(R132C), resp. prípad s 2 rozličnými mutáciami *WT1*; na obrázku sú v rámci *FLT3-ITD+* skupiny vyznačené (tmavo sivé polia) prípady s alelovou náložou *FLT3-ITD/ITD+wt* ≥ 0.5. Prípady, ktoré neboli značené inak (\*, tmavý odtieň sivej) vykazovali alelovú nálož *FLT3-ITD /ITD+wt* = ≥ 0.25 - <0.5, *IDH1*(R132H), *IDH2*(R140Q), resp. 1 mutáciu *WT1*. # - pacient (*NPM1m/FLT3-TKD+*), ktorý podstúpil aloTKB v 2. KR po predchádzajúcej autológnej transplantácii nebol zahrnutý do hodnotenia podielu aloTKB v študovanom súbore AML s NK (pacient bol vyznačený ružovo). KR – kompletná remisia, TKB – transplantácia krvotvorných buniek, +/- - áno/nie, wt – štandardná (nemutovaná, *wild-type*) alela

### Zhodnotenie klinického priebehu AML v molekulárnych skupinách po absolvovaní indukčnej terapie

Na obrázku 19 boli sumarizované krivky prežitia skupiny, ktorá vykazovala aspoň 1 z priaznivých mutácií bez *FLT3*-ITD (skupina 1) v porovnaní so skupinou, ktorá vykazovala *FLT3*-ITD bez ohľadu na mutačný profil ďalších 2 génov (skupina 2), resp. so skupinou v ktorej nebol zaznamenaný ani 1 z prognostických mutačných profilov (skupina 3). Rozdiely v prežití po absolvovaní indukčnej terapie boli pri danej stratifikácii AML s NK na hranici štatistickej významnosti ( $p = 0.0474$ ) (obrázok 19A). Lepší klinický priebeh vykazovala skupina s nálezom aspoň 1 priaznivého markeru bez *FLT3*-ITD v porovnaní so skupinou, ktorá združila prípady s nepriaznivým markerom *FLT3*-ITD ( $p = 0.0343$ ) alebo so skupinou bez akéhokoľvek molekulárneho markeru ( $p = 0.0188$ ); signifikantné rozdiely v OS medzi skupinou s *FLT3*-ITD a skupinou bez akéhokoľvek prognostického markeru potvrdené neboli ( $p = 0.8620$ ).

### Zhodnotenie klinického priebehu AML v molekulárnych skupinách po dosiahnutí KR

Podiel zaznamenaných KR v jednotlivých molekulárnych skupinách bol znázornený na obrázku 18 a klinický priebeh bol detailne popísaný v tabuľke 16. Postremisné krivky prežitia neboli signifikantne rozdielne na úrovni DFS ( $p = 0.0758$ ) resp. OS<sub>KR</sub> ( $p = 0.1882$ ) (obrázok 19 B, C); testovaná stratifikácia však smerovala k štatisticky významne rozdielnemu DFS (Log rank test for trend  $p = 0.0263$ ). Nález aspoň 1 z prognostických markerov (*NPM1*m a/alebo *CEBPA*m) bez *FLT3*-ITD bol spojený so signifikantne lepším DFS iba v porovnaní so skupinou s *FLT3*-ITD-/*NPM1*wt/*CEBPA*wt ( $p = 0.0216$ ). Iné kombinácie vždy 2 molekulárnych skupín nevykazovali významné rozdiely ( $p < 0.05$ ) na úrovni DFS/OS<sub>KR</sub> (obrázok 19 B, C).



**Obrázok 19 - Kaplan - Meierove krivky prežitia získané na základe porovnania 3 skupín: priaznivej (skupina 1), nepriaznivej (skupina 2) a prognostické markery nevykazujúcej skupiny (skupina 3) Počet prípadov v jednotlivých skupinách vrátane počtu zaznamenaných exitov (OS / OS<sub>KR</sub>) resp. relapsov/ exitov v KR (DFS) bol uvedený priamo pri každej analyzovanej skupine.**

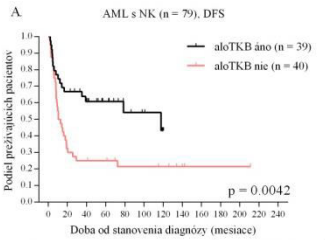
### Analýza prežitia súboru v závislosti na type absolvovanej postremisnej terapie

V prvom kroku bol zhodnotený klinický priebeh AML v závislosti na absolvovanej postremisnej terapii (aloTKB áno/nie) v celom súbore AML s NK (n = 80) (obrázok 20 A, B). Analýza poukázala na signifikantne lepší klinický priebeh v skupine, ktorá v rámci postremisnej terapie absolvovala aloTKB (DFS: p = 0.0042; OS<sub>KR</sub> = 0.0035). Do súboru pacientov, ktorí podstúpili aloTKB nebol zahrnutý pacient, u ktorého aloTKB (vykonaná v 2. KR po histórii relapsu) predchádzala autológa TKB. Prežitie v závislosti na postremisnej terapii nebolo možné zhodnotiť v prípade ďalšieho pacienta, u ktorého nebola dostupná informácia o mutačnom profile *NPM1* (obrázok 18).

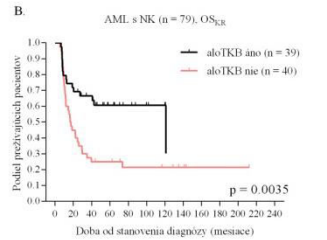
Prípady s genotypom *FLT3*-ITD+ nevykazovali štatisticky významné rozdiely v porovnaní so skupinou *NPM1*wt/*CEBPA*wt/*FLT3*-ITD- v OS (p = 0.8620), DFS (p = 0.9605) resp. v OS<sub>KR</sub> (p = 0.9064) s rizikom relapsu 23 % (3/13) vs 27 % (3/11) v prípade absolvovania aloTKB v porovnaní so 71 % (10/14) vs 75 % (9/12) v skupinách bez aloTKB (podiel aloTKB v oboch skupinách 48 %) (obrázok 18). Tieto 2 molekulárne skupiny boli zlúčené do spoločnej skupiny a porovnali sa krivky prežitia v závislosti na tom, či pacienti podstúpili aloTKB (skupina 1, n = 24) alebo aloTKB liečení neboli (skupina 2, n = 26) (obrázok 20 C, D).

Prežitie súboru v závislosti na absolvovanej postremisnej terapii v skupine s aspoň 1 priaznivým markerom (*NPM1*m a/alebo *CEBPA*m) bola s ohľadom na početnosť skupín určených k porovnaniu (aloTKB áno, n = 14 vs aloTKB nie, n = 14) hodnotená s popisným účelom (obrázok 20 E, F). V porovnaní s vyššie prezentovanými dátami z ďalších 2 molekulárnych skupín dosahovalo riziko relapsu pri náleze *NPM1*m a/alebo *CEBPA*m 21 % (3/14) v prípade absolvovania aloTKB v porovnaní s 50 % (7/14) v skupine bez aloTKB (podiel aloTKB 50 %) (obrázok 18).

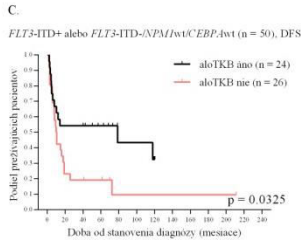
Pacienti, ktorí podstúpili aloTKB mimo 1. KR (n = 6) sa sústredili prevažne v skupine s *FLT3*-ITD+ (n = 3), resp. v skupine bez prognostického markera (n = 2) (obrázok 18, tabuľka 16). Klinický priebeh AML v závislosti na časovaní aloTKB (1. KR vs mimo 1. KR) bol znázornený na obrázku 18 resp. v tabuľke 16. V záverečnej analýze bol zhodnotený klinický priebeh osobitne v skupine, ktorá podstúpila aloTKB v 1. KR v porovnaní so skupinou, ktorá bola alogénne transplantovaná mimo 1. KR alebo bola liečená chemoterapeutickými režimami (obrázok 20 G, H, I, J).



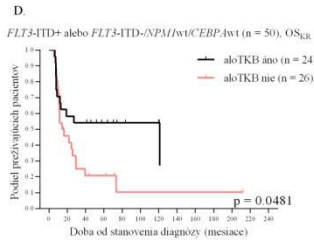
n = 79*	aloTKB áno	aloTKB nie
cenziurované (n)	22	9
relaps/exitus v KR	17	31
medián (mes.)	117.8	11.6



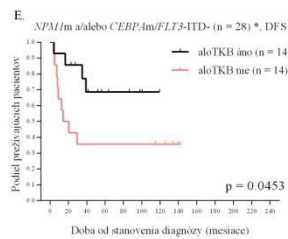
n = 79*	aloTKB áno	aloTKB nie
cenziurované (n)	23	9
exitus (n)	16	31
medián (mes.)	121	16.9



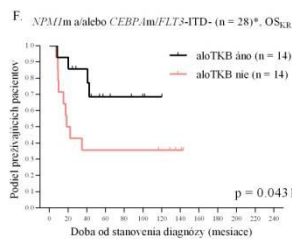
n = 50	aloTKB áno	aloTKB nie
cenziurované (n)	11	4
relaps/exitus v KR	13	22
medián (mes.)	78.5	10.25



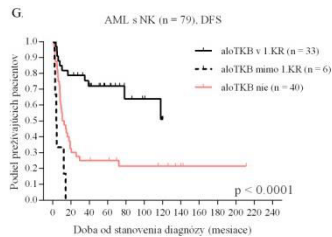
n = 50	aloTKB áno	aloTKB nie
cenziurované (n)	12	5
exitus (n)	12	21
medián (mes.)	121	15.45



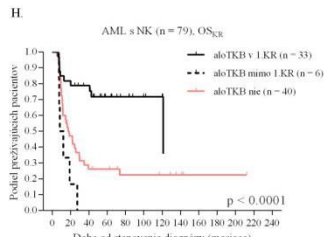
n = 28*	aloTKB áno	aloTKB nie
cenziurované (n)	10	5
relaps/exitus v KR	4	9
medián (mes.)	nedos.	17.3



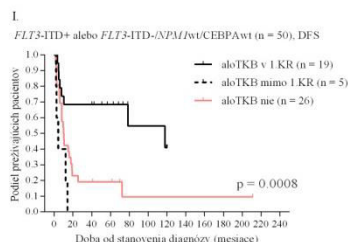
n = 28*	aloTKB áno	aloTKB nie
cenziurované (n)	10	5
exitus (n)	4	9
medián (mes.)	nedos.	20.4



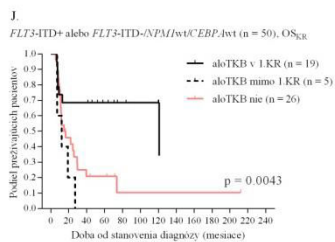
n = 79*	aloTKB v 1.KR	aloTKB mimo 1.KR	aloTKB nie
cenziurované (n)	22	0	9
relaps/exitus v KR	11	6	31
medián (mes.)	nedos.	4.2	11.6



n = 79*	aloTKB v 1.KR	aloTKB mimo 1.KR	aloTKB nie
cenziurované (n)	23	0	10
exitus (n)	10	6	30
medián (mes.)	121	10.2	17.4



n = 50	aloTKB v 1.KR	aloTKB mimo 1.KR	aloTKB nie
cenziurované (n)	11	0	4
relaps/exitus v KR	8	5	22
medián (mes.)	117.8	4.4	10.25

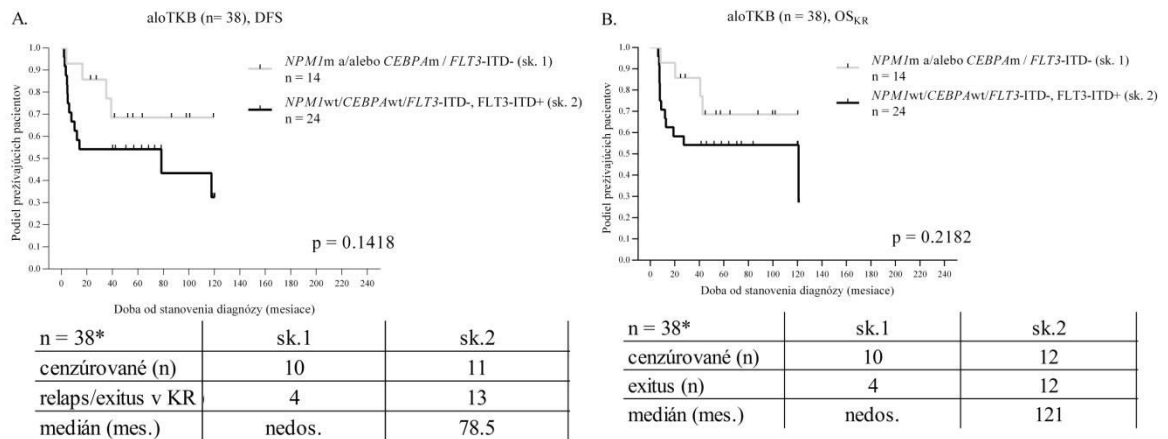


n = 50	aloTKB v 1.KR	aloTKB mimo 1.KR	aloTKB nie
cenziurované (n)	12	0	5
exitus (n)	7	5	21
medián (mes.)	121	12	15.45

**Obrázok 20 - Kaplan - Meierove krivky prežitia v závislosti na liečbe aloTKB (áno/nie) v celom súbore AML s NK (časti A, B), v skupine s genotypom FLT3-ITD+ alebo FLT3-ITD-/NPM1wt/CEBPΔwt (časti C, D) a v skupine s genotypom NPM1m a/alebo CEBPΔm/FLT3-ITD- (časti E, F). Priebeh kriviek prežitia po zohľadnení aloTKB v 1.KR resp. Mimo 1. KR znázorňujú časti G, H (celý súbor AML s NK) resp. I, J (genotypy FLT3-ITD+ alebo FLT3-ITD-/NPM1wt/CEBPΔwt) počet prípadov v jednotlivých skupinách vrátane počtu zaznamenaných exitov (OS / OS<sub>KR</sub>) resp. relapsov/ exitov v KR (DFS) bol uvedený priamo pri každej analyzovanej skupine. \* - pacient, ktorý podstúpil aloTKB v 2. KR po predchádzajúcej autológnej transplantácii nebol zahrnutý do hodnotenia podielu aloTKB v študovanom súbore AML s NK**



Vzhľadom na limitovanú veľkosť analyzovaného súboru nebolo možné relevantne porovnať krivky prežitia pacientov, ktorí podstúpili aloTKB a vyznačovali sa aspoň 1 priaznivým markerom AML (genotyp *NPM1*m a/alebo *CEBPA*m /*FLT3*-ITD-, n = 15) so skupinou, ktorá žiadny priaznivý marker AML nevykazovala (genotypy *FLT3*-ITD+ resp. *NPM1*wt/*CEBPA*wt/*FLT3*-ITD-, n = 24). Získané výstupy štatistickej analýzy dát, ktoré ostávajú na popisnej úrovni boli dokumentované na obrázku 21 A, B.



**Obrázok 21 - Kaplan - Meierove krivky prežitia v skupine AML s NK, ktorá bola liečená aloTKB** Obrázok znázorňuje krivky prežitia v priaznivej rizikovej skupine *NPM1*m a/alebo *CEBPA*m /*FLT3*-ITD- (skupina 1) v porovnaní so skupinou 2, ktorá združuje prípady s výskytom *FLT3*-ITD resp. prípady bez prognostického markeru (*NPM1*wt/*CEBPA*wt/*FLT3*-ITD-). Počet prípadov v jednotlivých skupinách vrátane počtu zaznamenaných exitov (OS / OS<sub>KR</sub>) resp. relapsov/ exitov v KR (DFS) bol uvedený priamo pri každej analyzovanej skupine. \* - pacient (*NPM1*m/*CEBPA*wt/*FLT3*-ITD-), ktorý podstúpil aloTKB v 2. KR po predchádzajúcej autológnej transplantácii nebol zahrnutý do hodnotenia podielu aloTKB v študovanom súbore AML s NK; prežitie v závislosti na absolvovanej aloTKB nebolo možné zhodnotiť v prípade ďalšieho pacienta (n = 1), u ktorého nebola dostupná informácia o mutačnom profile *NPM1*

**Tabuľka 16 - Klinický priebeh v celom súbore AML NK (n = 89) a po jeho stratifikácii do molekulárnych skupín na základe mutačného profilu *FLT3*-ITD, *NPM1* a *CEBPA***

	n	1.KR	relaps	skorý relaps	2. KR	2. relaps	aloTKB	aloTKB v 1.KR	aloTKB mimo 1.KR	medián OS	medián DFS	medián OS <sub>KR</sub>
<i>de novo</i> AML s NK	89	80 (90 %)	36 (45 %)	16 (44 %)	8 (22 %)	5	39 <sup>#</sup> (49 %)	33 <sup>#</sup> (85 %)	6 (15 %)	24.6	19.75	29.6
<b><i>FLT3</i>-ITD+</b>	<b>32</b>	<b>27 (84 %)</b>	<b>13 (48 %)</b>	<b>7 (54 %)</b>	<b>0 (0 %)</b>	<b>NH</b>	<b>13 (48 %)</b>	<b>10</b>	<b>3</b>	<b>11.85</b>	<b>14.9</b>	<b>24.6</b>
alelová nálož < 0.25	10	8	3	2	0	NH	4	3	1			
alelová nálož ≥ 0.25 - 0.5	16	14	8	3	0	NH	4	4	0			
alelová nálož ≥ 0.5	6	5	2	2	0	NH	5	3	2			
<i>FLT3</i> -ITD+/ <i>NPM1</i> wt/ <i>CEBPA</i> wt/*	3	2	2	1	0	NH	0	NH	NH			
<i>FLT3</i> -ITD+/ <i>NPM1</i> wt/ <i>CEBPA</i> wt/**	3	1	1	0	NH	NH	0	NH	NH			
<i>FLT3</i> -ITD+/ <i>NPM1</i> m/ <i>CEBPA</i> wt/*	11	10	4	2	0	NH	5	4	1			
<i>FLT3</i> -ITD+/ <i>NPM1</i> m/ <i>CEBPA</i> wt/**	11	11	5	4	0	NH	6	4	2			
<i>FLT3</i> -ITD+/ <i>CEBPA</i> dm/ <i>NPM1</i> wt	1	1	1	0	0	NH	0	NH	NH			
<i>FLT3</i> -ITD+/ <i>CEBPA</i> mo/ <i>NPM1</i> wt	1	1	0	NH	NH	NH	1	1	0			
<i>FLT3</i> -ITD+/ <i>CEBPA</i> mo/ <i>NPM1</i> m/*	1	1	0	NH	NH	NH	1	1	0			
<i>FLT3</i> -ITD+/ <i>CEBPA</i> mo/ <i>NPM1</i> m/**	1	0	NH	NH	NH	NH	NH	NH	NH			
<b><i>NPM1</i> m +/- <i>CEBPA</i> m / <i>FLT3</i>-ITD-</b>	<b>29</b>	<b>29 (100 %)</b>	<b>11 (38 %)</b>	<b>5 (45 %)</b>	<b>6 (54 %)</b>	<b>5</b>	<b>14<sup>#</sup> (50 %)</b>	<b>13<sup>#</sup></b>	<b>1</b>	<b>nedos.</b>	<b>nedos.</b>	<b>nedos.</b>
<i>NPM1</i> m/ <i>CEBPA</i> wt/*	7	7	3	2	0	NH	3	2	1			
<i>NPM1</i> m/ <i>CEBPA</i> wt/**	14	14	4	1	2	1	8 <sup>#</sup>	8 <sup>#</sup>	0			
<i>NPM1</i> m/ <i>CEBPA</i> mo/*	2	2	2	1	2	2	0	NH	NH			
<i>NPM1</i> m/ <i>CEBPA</i> dm/*	1	1	1	1	1	1	1	1	0			
<i>CEBPA</i> dm/ <i>NPM1</i> wt/*	4	4	0	NH	NH	NH	2	2	0			
<i>CEBPA</i> dm/ <i>NPM1</i> wt/**	1	1	1	1	1	1	0	NH	NH			
<b><i>NPM1</i> wt/<i>CEBPA</i> wt/<i>FLT3</i>-ITD-</b>	<b>27</b>	<b>23 (85 %)</b>	<b>12 (52 %)</b>	<b>4 (33 %)</b>	<b>2 (17 %)</b>	<b>0</b>	<b>11 (48%)</b>	<b>9</b>	<b>2</b>	<b>18.2</b>	<b>12.1</b>	<b>22</b>
<i>NPM1</i> wt/ <i>CEBPA</i> wt/ <i>FLT3</i> -ITD-/*	14	12	7	0	1	0	5	4	1			
<i>NPM1</i> wt/ <i>CEBPA</i> wt/ <i>FLT3</i> -ITD-/**	13	11	5	4	1	0	6	5	1			
										<b>p = 0.0474</b>	<b>p = 0.0758</b>	<b>p = 0.1882</b>
<b>NH: <i>FLT3</i>-ITD-<i>CEBPA</i> wt?<i>NPM1</i></b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>NH</b>	<b>NH</b>	<b>NH</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>0</b>			

\* - žiadna ďalšia rekurentná mutácia, \*\* - aspoň 1 iná rekurentná mutácia (*FLT3*-TKD +/-*IDH1* m+/-*IDH2* m+/-*WT1* m+/-*KMT2A*-PTD); wt - štandardná alela (wild-type); m - mutovaný; dm - dvojité mutácie; mo - monoalelické (jednoduché) mutácie; +/- - áno/nie

do molekulárnej stratifikácie boli zahrnuté iba prípady s kompletným mutačným profilom všetkých 3 molekulárnych markerov (n = 88)

# - do hodnotenia neboli zahrnutí pacienti, ktorí podstúpili aloTKB v 2. KR po autolóžnej transplantácii

NH - nehodnotené

## 1.2. DISKUSIA

Študovaný súbor AML s NK sme zostavili na základe týchto kritérií: i) *de novo* AML, ii) normálny karyotyp v dobe diagnózy, iii) dostupné diagnostické vzorky kostnej drene resp. periférnej krvi pre molekulárnu analýzu a iv) absolvovanie kuratívnej liečby. Tieto kritériá splnilo do konca roku 2012 celkom 89 pacientov.

V náväznosti na ciele definované v úvode tejto dizertačnej práce sme v prvej časti molekulárnej štúdie určili frekvenciu a distribúciu 8 rekurentných mutácií v tomto súbore. Molekulárna analýza ukázala nasledujúcu frekvenciu génových mutácií (zoradené zostupne od najčastejších po najmenej časté): *NPM1m* - 56 % (49/88), *FLT3m* - 48 % (43/89), *IDHm* - 27 % (24/89), *CEBPAm* - 13 % (12/89), *WT1m* - 7 % (6/89), *KMT2A-PTD* - 5% (4/86). Aspoň 1 molekulárny marker vykazovalo 84 % (75/89) AML s NK a v súbore bolo identifikovaných celkom 151 mutácií (obrázok 18). Frekvencia mutácií a heterogénna molekulárna báza študovaného súboru AML s NK je v súlade so štúdiami, ktoré dokumentujú výsledky komplexnej mutačnej analýzy na obsiahlejších súboroch AML resp. AML s NK (Krauth et al., 2015, Kao et al., 2015, Grossman et al., 2012, Schen et al., 2011, Ishikawa et al., 2009, Schlenk et al., 2008). Klasifikácia mutácií do funkčných mutačných skupín na základe modelu, ktorý recentne navrhli členovia *The Cancer Genome Atlas Research Network* (Cancer Genome Atlas Research Network, 2013) podporuje koncept o mutáciách najmenej 2 funkčných typov, ktoré sa podieľajú spoločne na patogeneze AML v študovanom súbore (obrázok 18).

Ďalšia časť štúdie bola venovaná zhodnoteniu klinického významu molekulárneho profilovania v prezentovanom súbore AML s NK. Naša štúdia sa primárne zakladala na určení *NPM1m*, *CEBPAm* a *FLT3-ITD*. Tieto mutácie sa stali súčasťou klasifikačných schém AML a ich prognostická hodnota u AML bola opakovane potvrdená (Arber et al., 2016, Döhner et al. 2015, O'Donnel et al., 2016, Port et al., 2014). Iniciálne sme pozorovali rozdielny klinický priebeh AML po rozdelení súboru do molekulárnych skupín na základe mutačného profilu *NPM1m*, *CEBPAm* resp. *FLT3-ITD* ako samostatných markerov. Tieto rozdiely sa však v univariantnej štatistickej analýze nepremietli do signifikantných rozdielov v OS/OS<sub>KR</sub> resp. DFS v porovnávaných molekulárnych skupinách (obrázok 13, časť *NPM1m*, *CEBPAm* resp. *FLT3-ITD*). V ďalšom kroku sme sa pokúsili aplikovať dáta o molekulárnom pozadí AML s NK do klinickej praxe zhodnotením klinického priebehu AML po

klasifikácii nášho súboru do molekulárnych skupín v súlade s recentne odporúčanou klasifikačnou schémou, ktorá u AML, osobitne u AML s NK zohľadňuje mutačný profil *FLT3* (*FLT3-ITD*), *NPM1* a súčasne *CEBPA* (Döhner et al., 2010, Döhner et al., 2015, O'Donnel et al., 2016). Na základe komplexného zhodnotenia mutačného profilu týchto 3 génov sme súbor AML s NK rozdelili do 3 molekulárnych skupín (obrázok 18). Po absolvovaní indukčnej terapie boli rozdiely v klinickom priebehu AML v testovaných molekulárnych skupinách na hranici štatistickej významnosti (OS,  $p = 0.0474$ ). Postremisné krivky prežitia signifikantne rozdielne neboli (DFS,  $p = 0.0758$  resp. OS<sub>KR</sub>,  $p = 0.1882$ ), hoci výsledky smerovali k štatisticky významne rozdielnemu DFS (Log rank test for trend  $p = 0.0263$ ) (obrázok 19 A, B, C). Domnievame sa, že získané výsledky odrážajú spoločne s limitmi, ktoré vyplývajú z veľkosti porovnávaných skupín, nezanedbateľný podiel aloTKB v rámci postremisnej terapie (distribúcia v jednotlivých skupinách 48 % vs 50 % vs 48 %, tabuľka 16, obrázok 18), ktorá mohla ovplyvniť krivky prežitia v testovaných molekulárnych skupinách. Na tento aspekt poukazujú aj naše dáta v časti venovanej prežitiu v závislosti na absolvovanej postremisnej terapii, ktorú budeme diskutovať v nasledujúcom bode.

Otázka smerovania intenzity postremisnej terapie AML na základe mutačných profilov *NPM1*, *CEBPA* a *FLT3* (*FLT3-ITD*) nie je plne zodpovedaná. Všeobecne je nález *FLT3-ITD* markerom prognosticky nepriaznivých AML (skoré relapsy, kratšie DFS, OS), pre ktoré sa ukazuje byť prínosné v prípade dostupnosti vhodného darcu a splnenia potrebných kritérií indikovať aloTKB (Döhner et al., 2015, Schlenk et al., 2008). V porovnaní s *FLT3-ITD*+ skupinou, nález aspoň 1 priaznivého markera (*NPM1*m a/alebo *CEBPAm*) bez *FLT3-ITD* predstavuje v klasifikačných schémach ELN a NCCN priaznivé rizikové skupiny AML (Döhner et al., 2010, Döhner et al., 2015, O'Donnel et al., 2016). Pri smerovaní intenzity postremisnej terapie existuje v klasifikačných systémoch trend, ktorý odporúča zväžiť pri diagnostickom náleze priaznivého markera bez *FLT3-ITD* chemoterapeutické režimy s odkladom indikácie aloTKB do fázy, kedy sa dokumentuje relaps AML. Naopak, molekulárna stratifikácia recentne nezasahuje do smerovania postremisnej terapie v 3. skupine AML, ktorá nevykazuje žiadny z 3 prognostických markerov (Walker a Marcucci, 2014).

Vzhľadom na málo početné súbory, ktoré vznikli po rozdelení nášho súboru do molekulárnych skupín, sme otázku klinického priebehu AML v závislosti na absolvovanej postremisnej terapii nemohli zhodnotiť samostatne pre každú z 3 molekulárnych skupín. V prezentovanom súbore sa skupina s *FLT3-ITD*-

*/NPM1wt/CEBPAwt* AML s NK (n = 23) významne neodlišovala od skupiny s nálezom *FLT3-ITD+* (n = 27) v podiele zaznamenaných 1. KR (85 % vs 84 %), v riziku relapsu (52 % vs 48 %) resp. v DFS (p = 0.9605) a OS<sub>KR</sub> (p = 0.9064), čo je v súlade s dátami, na ktoré sa poukázalo v iných publikovaných súboroch AML (Gale et al., 2008, Schlenk et al., 2008) (obrázok 18; resp. 19 B,C; tabuľka 16). Spoločná analýza týchto 2 molekulárnych skupín potvrdila, že pacienti s testovanými genotypmi, ktorí dosiahli 1. KR a podstúpili aloTKB (n = 24, riziko relapsu 6/24, 25 %) sa vyznačujú lepším klinickým priebehom v porovnaní s pacientmi, ktorí dosiahli 1. KR, ale boli liečení výlučne chemoterapeutickými režimami (n = 26, riziko relapsu 19/26, 73 %). Rozdiely v klinickom priebehu boli signifikantné na úrovni DFS (p = 0.0325) a boli na hranici štatistickej významnosti na úrovni OS<sub>KR</sub> (p = 0.0481) (obrázok 20 C, D). Pokiaľ sme pri hodnotení klinického priebehu AML pri danej stratifikácii zohľadnili časovanie transplantácie v 1. KR (n = 19, riziko relapsu 2/19, 11 %) resp. mimo 1. KR (n = 5, riziko relapsu 4/5, 80 %), rozdiely oproti skupine bez aloTKB (n = 26, riziko relapsu 19/26, 73 %) boli štatisticky vysoko signifikantné na úrovni DFS (p = 0.0008) aj OS<sub>KR</sub> (p = 0.0043) (obrázok 20 J, tabuľka 16). Tieto dáta poukazujú na význam indikovania aloTKB pri náleze *FLT3-ITD* (bez ohľadu na ďalší prognostický marker) resp. v skupine AML s NK, ktorá žiadny z 3 prognostických markerov nevykazuje. Naše výsledky sú v súlade s výsledkami pilotnej štúdie, ktorá na obsiahlejšom súbore dokumentuje prínos aloTKB v 1. KR pre obidva hodnotené rizikové genotypy *FLT3-ITD+* resp. *FLT3-ITD-/NPM1wt/CEBPAwt* u AML s NK (Schlenk et al., 2008).

Veľkosť súboru neumožnila zhodnotiť odpoveď na absolvovanú postremisnú terapiu (aloTKB áno/nie) v skupine s nálezom genotypu *NPM1m* a/alebo *CEBPAm* bez *FLT3-ITD* (n = 28, podiel 1. KR 100 %, riziko relapsu 10/28, 36 %) (obrázok 20 E, F, tabuľka 16). Rozdiely v klinickom priebehu (DFS, p = 0.0453 resp. OS<sub>KR</sub>, p = 0.0431 s rizikom relapsu v prípade absolvovania aloTKB 3/14, 21 % v porovnaní so skupinou bez aloTKB 7/14, 50 %) však naznačujú, že aloTKB prispieva k zlepšeniu klinického priebehu AML aj v skupine s nálezom *NPM1m* a/alebo *CEBPAm* pri súčasnej absencii *FLT3-ITD*. Je zrejmé, že nízky počet prípadov v porovnávaných skupinách limituje interpretáciu získaných dát na popisnú úroveň a vyžaduje zhodnotenie v ďalšej štúdii. V práci, ktorá hodnotila závislosť konsolidačnej liečby (aloTKB a autoTKB v porovnaní s intenzívnou chemoterapiou v 1.KR) a súčasne vplyvu reindukčnej terapie s následnou aloTKB po relapse osobitne v skupine *CEBPAdm* AML (n = 124) s intermediárnou cytogenetickou prognózou, malo absolvovanie aloTKB alebo autoTKB

v porovnaní s uniformne chemoterapeutickým postremisným režimom pozitívny efekt na RFS (ekvivalent DFS v tejto práci) u *CEBPAdm* AML (Schlenk et al., 2013). Súhlasne s našimi dátami (tabuľka 16) sa v súbore *CEBPAdm* AML vyskytovali prípady, ktoré po relapse dosiahli 2. KR, pričom reindukčná liečba s následnou aloTKB významne zlepšila prežitie v skupine *CEBPAdm* AML po relapse v tejto štúdii. Menej sľubné výsledky dokumentuje recentná práca, ktorá hodnotila klinický priebeh AML v závislosti na absolvovanej postremisnej terapii (aloTKB áno/nie) osobitne v skupine *NPM1m* AML (Bazarbachi et al., 2016). V tejto štúdii ostáva stav AML v čase aloTKB najvýznamnejším prediktorom úspešnosti aloTKB bez ohľadu na mutačný profil *NPM1*; pacienti transplantovaní v 1. KR prežívali v tejto štúdii lepšie ako pacienti transplantovaní v 2. KR resp. v aktívnej chorobe a autori upozorňujú na nezanedbateľné riziko relapsu u *NPM1m/FLT3-ITD-* AML s ~ 50 % pravdepodobnosťou prežitia pri odložení aloTKB do fázy 2. KR.

V súčasnosti sa všeobecne priznáva priaznivá hodnota mutácií *CEBPA* u AML iba v prípade nálezu dvojitých (tiež bialelických) mutácií (*CEBPAdm*) (Dickson et al., 2016, Dufour et al., 2010, Green et al., 2010, Taskesen et al., 2011, Wouters et al., 2009, Döhner et al., 2015, Arder et al., 2016). V našom stratifikačnom modeli je preto možné očakávať, že prognostická hodnota *CEBPAm* nie je v testovanej molekulárnej skupine (*NPM1m* a/alebo *CEBPAm /FLT3-ITD-*) uniformná; viaže sa selektívne na prípady s *CEBPAdm* a nie na prípady s *CEBPAmo*. V tejto súvislosti by sme uviedli, že nález monoalelického mutačného profilu *CEBPA* sa spájal s konkurentným výskytom iného prognostického markeru *NPM1m* a/alebo *FLT3-ITD* v každom z 5 dokumentovaných prípadov. Podobný nález vykazovali 2 zo 7 AML s *CEBPAdm*, na rozdiel od *CEBPAmo* sme však *CEBPAdm* v našom súbore pozorovali najčastejšie ako izolovanú molekulárnu zmenu, podobne, ako to dokumentujú iné štúdie (Dufour et al., 2012, Green et al., 2010, Taskesen et al., 2011). Na základe genotypu *NPM1m/FLT3-ITD-* sa 2 prípady s konkurentným výskytom *CEBPAmo* vyskytli v priaznivej molekulárnej skupine (obrázok 18). Ostávajúce 3 prípady *CEBPAmo* AML s NK boli pri konkurentnom výskyte *FLT3-ITD* (bez ohľadu na genotyp *NPM1*) kategorizovaní do nepriaznivej rizikovej skupiny, do ktorej sa zaradil aj prípad s genotypom *CEBPAdm/FLT3-ITD+* (obrázok 18). Ostáva nezodpovedané, či nález *CEBPAmo* dokáže modifikovať prognózu v skupine *NPM1m/FLT3-ITD+* AML, podobne ako sa na to poukázalo napríklad v molekulárnej podskupine *NPM1m/FLT3-ITD-*, v ktorej býva nález *CEBPAmo* markerom lepšieho prežitia (Dufour et al., 2012).

Hoci sme v skupine s *FLT3*-ITD+ zaznamenali limitovaný počet prípadov s vysokou alelovou náložou *FLT3*-ITD ( $\geq 0.5$ ), pozorovali sme signifikantne odlišný klinický priebeh v tejto molekulárnej skupine AML v porovnaní so skupinou bez *FLT3*-ITD. Klinický priebeh pacientov s alelovou náložou *FLT3*-ITD/ITD+wt  $< 0.5$  sa v našom súbore významne neodlišoval od skupiny bez *FLT3*-ITD (obrázok 15). S ohľadom na potenciálne odlišný klinický priebeh AML v závislosti na alelovej náloži *FLT3*-ITD, na ktorý súhlasne s našimi výsledkami poukázali štúdie na obsiahlejších súboroch AML resp. AML s NK, ostáva zhodnotenie prognostickej hodnoty ďalšej variability v zmysle konkurentných genotypov, vrátane nálezu N a/alebo C terminálnych *CEBP*Am v molekulárnej skupine *FLT3*-ITD+ mimoriadnou výzvou a čaká na objasnenie (Gale et al., 2008, Schnittger et al., 2012). Bolo súčasne dokumentované, že klinický priebeh AML s *NPM1*m sa pri nízkej alelovej náloži *FLT3*-ITD signifikantne neodlišuje od (priaznivej) skupiny s *NPM1*m bez *FLT3*-ITD (Schnittger et al., 2011). Nález *FLT3*-ITD+ významne asocjuje s *NPM1*m aj v našom súbore AML s NK ( $p = 0.004$ ). Je ďalej zrejmé, že iba minoritná časť *FLT3*-ITD+ prípadov vykazuje genotypy iné ako *FLT3*-ITD+/NPM1m (5/32, 25 %) a vyššie zmienené prípady s *FLT3*-ITD/ITD+wt  $\geq 0.5$ , resp. prípady s *FLT3*-ITD/ITD+wt  $< 0.25$  sa vyskytujú prevažne v sprievode *NPM1*m (5/6, 83 % resp. 9/10, 90 %) (obrázok 18). Zo stratifikácie nášho súboru iba na základe mutačného profilu *NPM1* a *FLT3*-ITD vyplynulo odlišné prežitie po absolvovaní indukčnej liečby iba medzi skupinami s izolovaným výskytom *NPM1*m resp. *FLT3*-ITD. Rozdiely v OS resp. DFS medzi skupinami *FLT3*-ITD+/NPM1m resp. *FLT3*-ITD-/NPM1wt pritom neboli potvrdené ani v iných pilotných štúdiách na obsiahlejších súboroch AML (Gale et al., 2008, Schlenk et al., 2008). Dáta o klinickej hodnote alelovej nálože *FLT3*-ITD v skupine *NPM1*m AML s NK nemáme s ohľadom na nízky počet prípadov v skupinách určených k porovnaniu k dispozícii. Naše dáta však ukazujú, že stratifikácia na základe *NPM1*m a *FLT3*-ITD nedokázala v našom súbore AML s NK odlíšiť prípady s priaznivým markerom *CEBP*Adm ( $n = 5$ ) od prípadov s potenciálne nepriaznivým markerom *KMT2A*-PTD ( $n = 4$ ); pacienti so zmienenými genotypmi sa pri stratifikácii na základe *NPM1*m a *FLT3*-ITD vyskytli spoločne v molekulárnej skupine *FLT3*-ITD-/NPM1wt (obrázok 16). Domnievame sa, že zmienená molekulárna heterogenita (alelová nálož *FLT3*-ITD, konkurentné mutačné profily) mohla zasiahnuť do klinického priebehu AML v porovnávaných skupinách (*FLT3*-ITD+/NPM1m resp. *FLT3*-ITD-/NPM1wt). Naše dáta sú v súlade s konceptom o prínose komplexného zhodnotenia molekulárnych

profilov u AML, pričom určenie *FLT3-ITD*, *NPM1m* a súčasne *CEBPAm* je kľúčové pre správnu stratifikáciu AML s NK do rizikových skupín.

Osobitnú distribúciu vykazovali v testovaných molekulárnych skupinách rekurentné mutácie, ktoré dosiaľ neboli implementované do klasifikačných schém AML podľa ELN ani NCCN (Döhner et al., 2010, Döhner et al., 2015, O'Donnel et al., 2016). Je známe, že iba časť prípadov a nie všetky AML vykazujú aktivačné mutácie v onkogénnych signálnych zložkách, ktoré boli donedávna považované za esenciálne faktory leukemickej transformácie AML. V genómoch AML bývajú mimoriadne často identifikované mutácie v génoch, ktoré sa súhrnne označujú termínom epigenetické regulátory, ktorý pôvodne použili Figueroa a kolektív v roku 2010 pre mutácie *IDH1/IDH2* a *TET2*, ktoré navrhli zaradiť do spoločnej, tretej skupiny mutácií (mutácie typu III, epigenetické) (Figueroa a kol. 2010) (tabuľka 2). V našej štúdií sme sledovali *IDH1m*, *IDH2m*, *FLT3-TKD*, *WT1m* a *KMT2A-PTD*. Tieto mutačné profily sme pozorovali prevažne v nízkej frekvencii pre relevantné zhodnotene ich prognostickej hodnoty v študovanom súbore AML s NK (obrázok 13, 14). Súčasne sme v prezentovanom súbore AML ich izolovaný výskyt (bez ďalších konkurentných mutácií) nepotvrdili, s výnimkou vybraných prípadov s nálezom izolovaných *IDH1m* resp. *IDH2m* (obrázok 16, resp. 18). Zistili sme však, že *KMT2A-PTD* sa sústreďujú výlučne v skupine *FLT3-ITD-/NPM1wt/CEBPAct* (obrázok 18). Naopak, *FLT3-TKD*, ktoré významne asociujú s *NPM1m* (88 %, 14/16 prípadov,  $p = 0.0005$ ) charakterizujú najčastejšie priaznivú molekulárnu skupinu; okrem časti prípadov, ktoré vykazovali popri *NPM1m* a *FLT3-TKD* aj *FLT3-ITD* (31 %, 5/16), ktorý je markerom nepriaznivej prognózy u AML (obrázok 18). V porovnaní s vyššie zmienenými mutačnými profilmi sa *WT1m* ( $n = 6$ ) nezdužovali v našom súbore AML s NK v žiadnej z molekulárnych skupín, hoci najviac prípadov s *WT1m* sme zaznamenali vo *FLT3-ITD+* skupine ( $n = 3$ ) (obrázok 18). Naopak, *IDH1m* a *IDH2m* ( $n = 25$ ) sa vyskytovali prednostne v skupine *FLT3-ITD-/NPM1wt/CEBPAct* ( $n = 11$ ), hoci ich výskyt sme nevyklúčili ani v ďalších molekulárnych skupinách (obrázok 18). Domnievame sa, že rekurentné mutačné profily, ktoré asociujú (*IDH1m*, *IDH2m*, *FLT3-TKD*, *WT1m*), resp. sa vzájomne vylučujú (*KMT2A-PTD*) s prognostickými mutáciami *FLT3-ITD*, *NPM1m* a *CEBPAm* v našom súbore AML s NK mohli ďalej modifikovať klinický priebeh a prognózu v jednotlivých molekulárnych skupinách. Na tento aspekt sa opakovane poukázalo napríklad u *IDHm*, ktoré sa v súlade s inými publikovanými súbormi často vyskytujú spoločne s *NPM1m* (13/48) aj v prezentovanom súbore AML s NK. Otázku



prognostickej hodnoty týchto mutácií v priaznivej skupine *NPM1m/FLT3-ITD-* sa dosiaľ nepodarilo spoľahlivo objasniť (Döhner et al., 2015, Marcucci et al., 2010, Paschka et al., 2010, Patel et al., 2012). Z našich dát jednoznačne vyplýva, že v molekulárnej skupine *NPM1m/FLT3-ITD-* (n = 24) sa sústreďuje iba časť prípadov s *IDHm* (5/13, 38 %), čo znamená, že u prevažnej časti pacientov diagnostikovaných a liečených na HOK FNOL (8/13, 62 %) konkuruje týmto mutáciám tretí prognostický marker, konkrétne *FLT3-ITD* (obrázok 18). Otázka prognostickej hodnoty konkurentného výskytu 3 mutačných profilov sa stáva mimoriadne komplexnou i s ohľadom na zmienený prognostický potenciál alelovej nálože *FLT3-ITD* a na recentné dáta, ktoré v skupine *IDHm* AML poukazujú na odlišnú prognostickú hodnotu *IDH1m* a *IDH2m*, ktorá sa v niektorých publikovaných súboroch v skupine s *IDH2m* ďalej diferencuje podľa typu mutácie v zmysle konkrétnej nukleotidovej substitúcie v špecifických kodónoch *IDH2* (Döhner et al., 2015). V tomto smere, podiel 1. KR u *IDH2(R140Q)* (93 %, 13/14) v porovnaní s *IDH2(R172K)* (0 %, 0/2) a s *IDH2wt* (79 %, 58/73) poukazuje na potenciálne odlišný klinický význam týchto mutácií aj v našom súbore AML s NK, čo je v súlade s jednou z pilotných štúdií a zasluhuje si ďalšie zhodnotenie na obsiahlejšom súbore (Marcucci et al., 2010). Recentné dáta poukázali na (i) nešpecifickú distribúciu *WT1m* v rámci všetkých AML subtypov a na (ii) nestabilitu týchto mutácií pri relapse AML, čo je v súlade s konceptom o sekundárnom charaktere *WT1m* v patogenéze AML (Krauth et al., 2015). Hoci sa neočakáva, že tieto mutácie budú implementované do klasifikačných schém AML, ich rekurentný charakter u AML je zrejmý aj z našej štúdie a ich negatívny vplyv na bezpríznakové prežitie (*event free survival*) recentne vyplynul z analýzy obsiahleho súboru 2699 AML so známym mutačným profilom *WT1* (Krauth et al., 2015). V tejto súvislosti je vhodné vyzdvihnúť, že medzi 5 prípadmi s *WT1m*, ktorí dosiahli 1. KR sme zaznamenali 3 relapsy, z nich 2 do 6 mesiacov od 1. KR (obrázok 18). V obidvoch prípadoch so skorým relapsom AML (do 6 mesiacov od 1. KR) sme určili *WT1m* v konkurencii s potenciálne priaznivým markerom AML, konkrétne s *CEBPAdm* resp. s *IDH2(R140Q)*. Z nich *CEBPAdm* predstavujú v revidovanej WHO klasifikácii samostatnú entitu AML s priaznivou prognózou (Döhner et al., 2015, Arber et al., 2016).

Výsledky našej retrospektívnej štúdie na etiologicky (*de novo*) a geneticky (normálny karyotyp) homogénnom súbore AML s NK s dlhým *follow-up* (medián 74.3 mesiacov/6.2 rokov), ktorý bol kuratívne liečený na HOK FNOL v rokoch 1997 – 2012 sú v súlade s recentnou klasifikačnou stratégiou AML, ktorá vychádza z komplexného

molekulárneho profilovania 3 markerov (*FLT3-ITD*, *NPM1m* a *CEBPA*m). Takýto prístup dokáže čiastočne zohľadniť funkčné väzby medzi konkurentnými markermi AML, čo sa pri selektívnej analýze niektorého z 3 molekulárnych markerov vylučuje. Recentné klasifikačné schémy sa pokúšajú rozšíriť panel prognostických molekulárnych markerov AML o ďalšie rekurentné mutácie. V týchto modeloch predstavuje nález *KMT2-PTD* marker nepriaznivej prognózy vo *FLT3-ITD+* aj vo *FLT3-ITD-* skupine (Grossmann et al., 2012, Patel et al., 2012, tabuľka 4), kým nález niektorej z *IDH*m (*IDH1*m alebo *IDH2*m) v konkurencii s *NPM1m*, ale bez *FLT3-ITD* radí pacientov do priaznivej rizikovej skupiny (Patel et al., 2012, tabuľka 4). Napriek významnému prínosu v pochopení molekulárnej patogenézy AML, je súčasne zrejmé, že komplexné molekulárne pozadie s variabilnými funkčnými väzbami medzi koexistujúcimi resp. vzájomne sa vylučujúcimi mutáciami v konkrétnych molekulárnych skupinách, je iba jeden z faktorov, ktorý určuje klinický priebeh AML. Prognóza AML je popri molekulárnym markerom závislá na ďalších činiteľoch, ktoré je potrebné zohľadniť v klinických štúdiách. Ani v našom súbore nie je možné opomenúť variabilitu v indukčnej terapii, ktorej forma (štandardná/*high-dose*) dokáže ovplyvniť klinický priebeh AML s vybraným mutačným profilom, vrátane *NPM1m* a *KMT2A-PTD* (Patel et al., 2012). Ďalej je vhodné zvážiť podiel aloTKB (39/79, 49 %) resp. aloTKB po autológnej TKB (n = 1) v našom súbore. Na lepšie prežitie po aloTKB v porovnaní s inými konsolidačnými modalitami sme iniciálne poukázali na obsiahlom súbore 1188 *de novo* AML (Szkotkowski et al., 2010). Výsledky prezentované v tejto dizertačnej práci korešponujú s našou publikovanou štúdiou a poukazujú na celkovo významný (priaznivý) vplyv aloTKB na prežitie pacientov aj pri analýze cytogeneticky homogénneho súboru AML s NK z jedného hematologického centra (DFS p = 0.0042, OS<sub>KR</sub> p = 0.0035, obrázok 20 A, B, G, H). Naše vlastné skúsenosti potvrdzujú, že prežitie pacientov po aloTKB je vysoko variabilné. Úspešnosť aloTKB a klinický priebeh AML po aloTKB určujú početné faktory vrátane typu darcu krvotvorných buniek (príbuzný/nepříbuzný) alebo absolvovaného transplantačného režimu, ktoré spoločne zodpovedajú za klinickú variabilitu v potransplantačnej fáze (aktivita štepu, infekčné komplikácie) a bývajú hodnotené ako rizikové faktory prežívania po aloTKB, ktorá je nezávislá na AML (Raida et al., 2011). A napokon, veľkosť študovaného súboru neumožnila relevantne zhodnotiť klinický priebeh AML v skupinách selektovaných na základe veku, ktorý aj na základe našich dát významne asocjuje s prognózou v súbore geneticky neselektovaných *de novo* AML (vrátane prípadov AML

s NK prezentovaných v tejto práci) (Sztokowski et al., 2010). Hoci v celkovej analýze sme signifikantné rozdiely v závislosti na vekovej hranici 60 rokov v prezentovanom súbore uniformne *de novo* AML s NK nepozorovali (obrázok 11), nie sme schopní vylúčiť podiel veku ako faktoru prežitia v študovaných molekulárnych skupinách. Domnievame sa, že zmienené (nemolekulárne) faktory spoločne s limitovanou veľkosťou analyzovaného súboru mohli zasahnuť do klinického priebehu AML a v náväznosti mohli ovplyvniť výsledky zhodnotenia klinického významu molekulárneho pozadia AML v našej retrospektívnej štúdií.

Výsledky tejto práce na súbore AML s NK, ktorý bol diagnostikovaný a kuratívne liečený na HOK FNOL predstavujú podklad pre modifikáciu prognostickej a liečebnej stratifikácie pacientov liečených ako AML, resp. AML s NK v našom hematologickom centre. Analýza mutačného profilu *NPM1*, *CEBPA* a *FLT3-ITD* predstavuje súčasť štandardných molekulárnych testov, ktoré sú indikované u AML pri náleze normálneho karyotypu. Medzi významné prínosy, ktoré vyplývajú z molekulárnej štúdie, ktorá bola zhrnutá v tejto dizertačnej práci patrí možnosť monitorovania MRD na molekulárnej úrovni, osobitne u pacientov s nálezom *NPM1m*, ktoré predstavujú najčastejšie určený molekulárny marker v dobe diagnózy AML. Poznanie molekulárneho profilu pacientov s AML je dôležité k určeniu vhodných kandidátov klinických štúdií, ktoré ponúkajú moderné, často molekulárne ciele terapeutické možnosti. Je súčasne zrejmé, že (i) významný podiel pacientov s AML s NK, resp. všeobecne s intermediárnou cytogenetickou prognózou nevykazuje žiadnu z 3 prognostických mutácií a navyše (ii) u časti pacientov pretrvávajú rozdiely v klinickom priebehu AML aj po úspešnej stratifikácii do niektorej z molekulárnych podskupín. V tomto smere očakávame, že pre rizikovú stratifikáciu AML môže byť prínosné zamerať sa na ďalšie gény s rekurentným mutačným profilom u AML (tabuľka 2), ktoré môžu prispieť k objasneniu klinickej variability v rámci prognostických skupín, ktoré sa recentne definujú na podklade mutačného profilu *NPM1*, *CEBPA* a *FLT3-ITD*. V súčasnosti sa molekulárny výskum a čiastočne aj diagnostika AML posúva smerom k technikám novej generácie sekvenovania a genotypizovania. Tento prístup sľubuje ďalší pokrok v pochopení molekulárnej bázy AML, príčin jej vzniku a perzistencie, vďaka komplexnej analýze želaných mutačných profilov, čo otvára možnosť individuálne zhodnotiť molekulárne pozadie a klonálnu evolúciu leukémie u konkrétneho pacienta.

S diskutovanou témou a výsledkami priamo súvisia celkom 4 publikácie, 2 publikované abstrakty, 1 poster a 6 prednášok prednesených na verejných odborných fórach.

Vymedzenie môjho podielu práce: Napísala som prvú verziu manuskriptu Katrincsáková et al. 2011 (**príloha 10**), v ktorom som okrem súhrnu literárnych poznatkov o klinickom význame génových mutácií u AML s NK ukázala príklady výstupov mnou vykonávanej molekulárnej detekcie mutácií *FLT3* (FLT3-ITD) a *NPM1* u AML pomocou fragmentačnej analýzy na kapilárnej elektroforéze, ktoré som popísala v časti Materiál a Metódy tejto dizertačnej práce.

V súlade s cieľmi definovanými v tejto časti mojej dizertačnej práce bolo mojou úlohou v rámci štúdie ALERT (Acute Myeloid Leukemia RegisTry), ktorú inicioval a zároveň garantoval prof. MUDr. Karel Indrák, DrSc., vyšetrovať známe i novo odhalené prognostické faktory u AML, osobitne v skupine *de novo* AML s NK, pacientov z ostávajúcich cytogeneticky definovaných rizikových skupín resp. odlišnej etiopatogenézy AML však nevynímajúc. Aktívne som spolupracovala s lekármi, kolegami z ďalších špecializovaných laboratórií a data manažermi na zostavení súboru AML s NK a zároveň s kolegami z Institutu biostatistiky a analýz (IBA) MU v Brne, ktorí pravidelne vykonávali štatistickú analýzu dostupných molekulárnych markerov na súbore AML s NK. Výsledky priebežných sumárnych analýz som v priebehu rokov 2007 – 2011 pravidelne prezentovala a diskutovala vo forme 2 abstraktov (**príloha 11**), 1 posteru (**príloha 11**) a 6 prednášok na tuzemských i zahraničných kongresoch. Finálne dáta našej štúdie ALERT, do ktorej sa napokon okrem HOK FNOL zapojili 4 ďalšie české hematologické centrá, 4 slovenské centrá intenzívnej hematologickej starostlivosti a 9 českých regionálnych hematologických pracovísk sa stali predmetom publikácie Szotkowski et al. 2010 (**príloha 9**).

Na publikácii Raida et al. 2011 (**príloha 8**) som sa podieľala diagnostikou, konkrétne som na základe analýzy vybraných krátkych jednonukleotidových polymorfizmov DNA (STR) pomocou fragmentačnej analýzy na kapilárnej elektroforéze monitorovala podiel darcovskej krvotvorby v definovaných časových intervaloch od dátumu vykonania alogénnej transplantácie krvotvorných buniek u všetkých pacientov s diagnózou AML zahrnutých do hodnotenia. Výsledky analýz (prezentované v publikovanej práci ako % darcovského chimérizmu) predstavovali kľúčový parameter nevyhnutný pre porovnanie

príslušných prípravných transplantačných režimov (podiel kompletného, 100 % darcovského chimérizmu). Monitorovanie bunkového chimérizmu predstavuje nedielnu súčasť potransplantačného monitorovania pacientov, umožňuje citlivo hodnotiť aktivitu štepu v konkrétnych časových intervaloch, resp. v cieľových bunkových populáciách. Poskytuje tým podklad, na základe ktorého je možné predpovedať relaps resp. progresiu základného ochorenia a úmerne tomu sa prikloniť k včasnej a odpovedajúcej terapeutickému intervencii. Ako už bolo zmienené v tejto práci, aloTKB predstavuje dosiaľ jediná formu kuratívnej liečby u AML, čomu zodpovedajú naše vlastné skúsenosti, ktoré ukazujú, že v prípade AML všeobecne (Sztokowski et al. 2010), resp. konkrétne u AML s NK (tabuľka 15) ostáva aloTKB zlatým štandardom medzi konsolidačnými terapeutickými modalitami. Na druhej strane, časť pacientov s AML podstupuje aloTKB pri signifikantnom riziku ťažkých post-transplantačných komplikácií. Osobitne v takýchto prípadoch je dôležité mať možnosť ponúknuť alternatívne transplantačné prípravné režimy, ktoré sú v porovnaní so štandardným režimom menej toxické, ale súčasne dokážu viesť u pacientov k efektívnej obnove krvotvorby so 100 % darcovským chimerizmom a nie sú pritom spojené so zvýšeným rizikom relapsu a progresie v porovnaní so štandardným prípravným režimom.

Na publikácii Jarosova et al. 2012 (**príloha 7**) som sa aktívne podieľala molekulárnymi analýzami, konkrétne som v prezentovanom prípade AML s myelodysplastickými zmenami, ktorá je definovaná ako AML s históriou MDS alebo MDS/MPN vyšetrila vybrané molekulárne markery AML (*NPM1m*, *FLT3-ITD*, *FLT3-TKD*) resp. mutačné hot-spoty vybraných génov, ktoré predstavujú markery MPN (*JAK2*<sup>V617F</sup>, *MPL*<sup>W515</sup>, *MPL*<sup>S505</sup>). Ide o zaujímavý prípad s komplexným karyotypom s rozsiahlou deléciou 5q v tetraploidnom klone, ktorý nevykazuje žiadnu z detekovaných génových mutácií, ktoré by mohli na molekulárnej úrovni prispievať k patogenéze AML resp. zodpovedať za progresiu MDS/MPN do AML.

## 2. ŠTÚDIUM MOLEKULÁRNEHO MECHANIZMU INTERSTICIÁLNYCH DELÉCIÍ NA 14q U B-LYMFOIDNÝCH MALIGNÍT

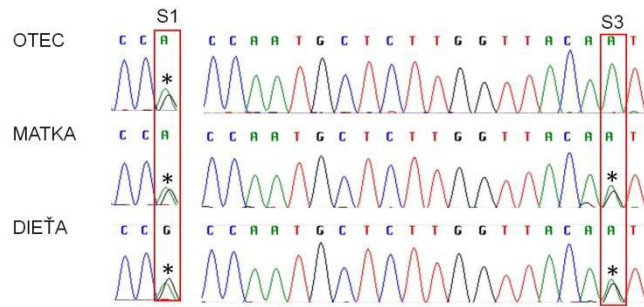
### 2.1. VÝSLEDKY

Overenie hypotézy o nenáhodnom výbere alely, ktorá sa stáva predmetom delécie v študovanom súbore B-lymfoidných malignít s *del(14q/IGH)* vyžadovalo určiť parentálny pôvod deletovanej alely v dokumentovaných prípadoch. Navrhnutý dizajn molekulárnej štúdie zohľadnil, že (i) jednonukleotidové polymorfizmy DNA sa do nasledujúcich generácií prenášajú klasickou Mendelskou dedičnosťou a súčasne, že (ii) regulačná oblasť IG-DMR, ktorá je špecifická pre imprintovanú doménu na 14q32, sa vyznačuje parentálne špecifickým metylačným profilom. Cieľom prezentovanej experimentálnej práce bolo (i) zamerať sa na heterozygotné SNP pozície, (ii) odlišiť od seba homologické alely 14q a (iii) určiť ich parentálny pôvod na základe metylačného statusu SNP aliel v *DLK1-GTL2* IG-DMR.

#### 2.1.1. KONTROLNÝ EXPERIMENT

Templátom kontrolného experimentu bola leukocytárna DNA získaná od 3 členov zdravej rodiny (otec, matka, dieťa). Podľa schémy uvedenej vyššie v časti Materiál a metódy bola genotypizovaná oblasť *DLK1-GTL2* IG-DMR vrátane *upstream* a *downstream* oblastí (obrázok 6) celkom vo 8 triádach.

Bola vybraná 1 informatívna rodina, v ktorej dieťa vykazovalo na vlákne určenom k bisulfidovému sekvenovaniu heterozygotný genotyp v 2 polymorfných polohách (v obidvoch prípadoch alelové varianty A/G). V databáze jednonukleotidových DNA polymorfizmov dbSNP ([www.ncbi.nlm.nih.gov/snp](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp)) boli polymorfné varianty identifikované ako rs1884538 a rs1884539 (ďalej S1 resp. S3). Získané výsledky boli spracované na obrázku 22.



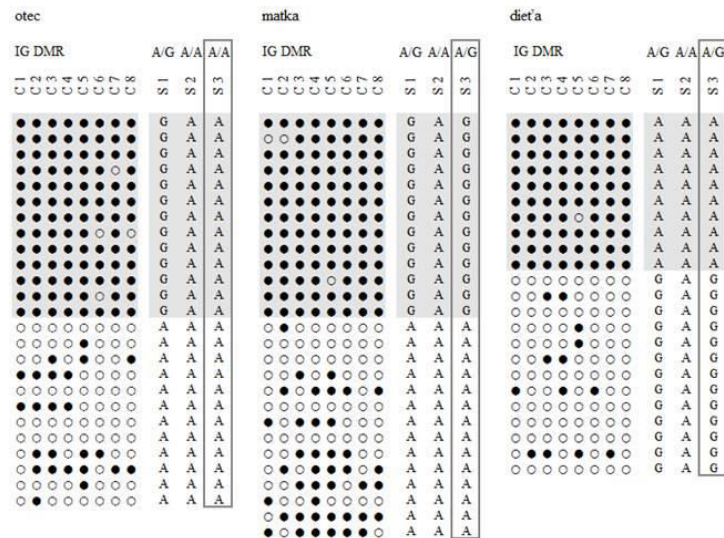
**Obrázok 22 - Genotypizácia SNP v študovanom úseku na 14q32, ktorý zahŕňal *DLKI-GTL2* IG DMR a príľahlé oblasti – kontrolná triáda (otec, matka, dieťa)** Informatívne SNP (S1 a S3) boli ohraničené a heterozygotné genotypy boli označené hviezdou (upravené podľa Katrincskova et al., 2009, príloha 5)

Obrázok 23 sumarizuje výsledky metylačnej analýzy vzoriek kontrolnej rodiny. U každého člena kontrolnej triády bola vykonaná priama sekvenačná analýza najmenej 21 individuálnych, náhodne vybraných bakteriálnych klonov. V každom z analyzovaných klonov bola zhodnotená úspešnosť konverzie genómickej DNA bisulfidom sodným. Percento konverzie nemetylovaných cytozínov na uracyl v analyzovanom úseku DNA dosahovalo 98 % (aritmetický priemer hodnôt získaných analýzou celkového počtu 181 nemetylovaných cytozínov v študovanom úseku, ktoré boli hodnotené v každom zo 70 individuálnych klonov celkom v 3 kontrolných vzorkách).

Zastúpenie haplotypov (resp. SNP aliel) v sekvenovaných klonoch sa významne neodlišovalo od štandardnej distribúcie aliel u žiadneho z 3 kontrolných jedincov.

Metylačný status IG-DMR bol zhodnotený vo 8 CpG ostrovčekov, ktoré lokalizovali priamo do IG-DMR. Jednotlivé haplotypy sa vyznačovali zreteľne odlišným metylačným profilom v každej z testovaných vzoriek. V hypermetylovanom haplotype vykazovalo metyláciu v priemere 97 % (rozsah 95 až 98 %) cytozínov. Druhý haplotyp sa vyznačoval metyláciou v priemere 24 % (rozsah 13 až 37 %) hodnotených cytozínov v CpG a predstavoval hypometylovaný haplotyp (tabuľka 17).

Kontrolný experiment poukázal u dieťaťa na hypermetylovaný profil paternálnej alely/haplotypu (AA) a na hypometylovaný profil maternálnej alely/haplotypu (GG) (obrázok 23).



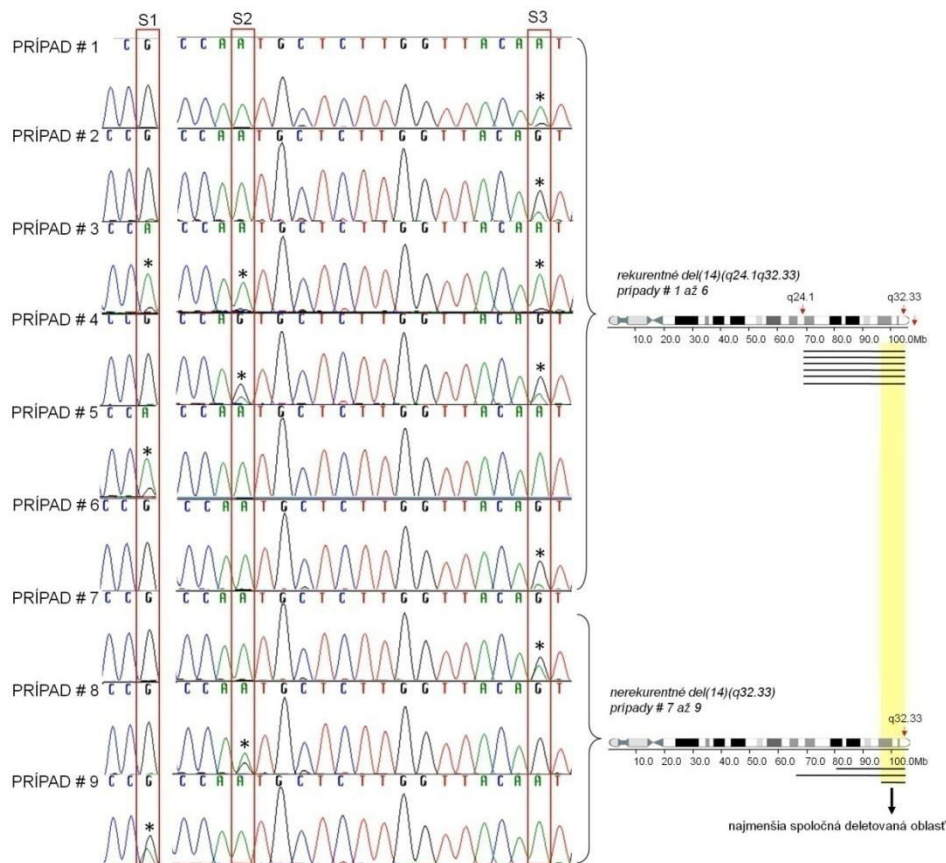
**Obrázok 23 - Metylačná analýza – validácia alelovo špecifickej metylačnej štúdie - kontrolná triáda** DNA členov kontrolnej rodiny bola modifikovaná bisulfidom sodným. Oblasť pokrývajúca *DLKI-GTL2* IG-DMR + SNP bola podrobená amplifikácii pomocou metylačne nešpecifickej PCR. Študovaný úsek DNA bol klonovaný do plazmidového vektora a získané klony boli sekvenované. Na obrázku zodpovedá každý riadok jednému analyzovanému klonu; každý plný resp. otvorený krúžok v stĺpcoch C1 až C8 reprezentuje metylovaný resp. nemetylovaný cytozín vo 8 hodnotených CpG ostrovčekoch. V stĺpcoch S1 až S3 boli znázornené korešpondujúce SNP alely; informatívne SNP bolo ohraničené. U otca, matky a dieťa boli v informatívnych polohách S1 a S3 určené tieto genotypy: GA/AA, GG/AA a AA/GG (podľa kľúča: haplotyp 1= alela S1 + alela S3/haplotyp 2= alela S1 + alela S3). U dieťa boli dáta z genotypizácie S3 v súlade s parentálne špecifickým metylačným profilom v IG-DMR a poukázali na hypermetyláciu paternálne derivovaných klonov (alela A) a hypometyláciu klonov, ktoré boli odvodené od maternálnej alely (alela G) (upravené podľa Katrincsakova et al., 2009, príloha 5)

### 2.1.2. ANALÝZA VZORIEK S del(14q/IGH)

Bolo genotypizovaných 20 prípadov s cytogeneticky potvrdenou del(14q/IGH) a dostupným genetickým materiálom. U 9 z nich bol identifikovaný heterozygotný genotyp aspoň v jednej polymorfnej pozícii (obrázok 24).

Spoločne s 2 vyššie popísanými jednonukleotidovými polymorfizmami S1 a S3 (viď časť Kontrolný experiment vyššie) bol v analyzovanom súbore určený ďalší polymorfny lokus (chr14: pozícia 100.347.524, ďalej S2), ktorý nebol popísaný vo vyššie zmienenej databáze dbSNP.





**Obrázok 24 - Genotypizácia SNP v študovanom úseku na 14q32, ktorý zahŕňal *DLKI-GTL2 IG DMR* a príbahlé oblasti – vzorky s *del(14q/IGH)*** Znáznornených je 9 vzoriek, v ktorých bol sekvenčnou analýzou určený informatívny (heterozygotný) genotyp aspoň v 1 SNP. Informatívne SNP (//9-) boli ohraňené a heterozygotné genotypy boli označené (\*). Rozsah delécie na 14q bol rekurentný v 6 prípadoch (prípady 1 až 6) a vykazoval odlišnosti v mieste proximálneho zlomu v 3 prípadoch (prípady 7 až 9) (upravené podľa Katrincsakova et al., 2009, príloha 5).

U 5 vzoriek bol určený heterozygotný genotyp v poradí štvrtom polymorfnom lokuse (chr14: pozícia 100.347.641). Toto SNP sa prezentovalo na vlákne DNA, ktoré bolo určené k metylačnej analýze tranzíciou cytozínu na tymín (C/T). Pacienti s polymorfným genotypom v tejto pozícii ani 6 prípadov bez informatívneho SNP neboli predmetom nasledujúcich metylačných analýz.

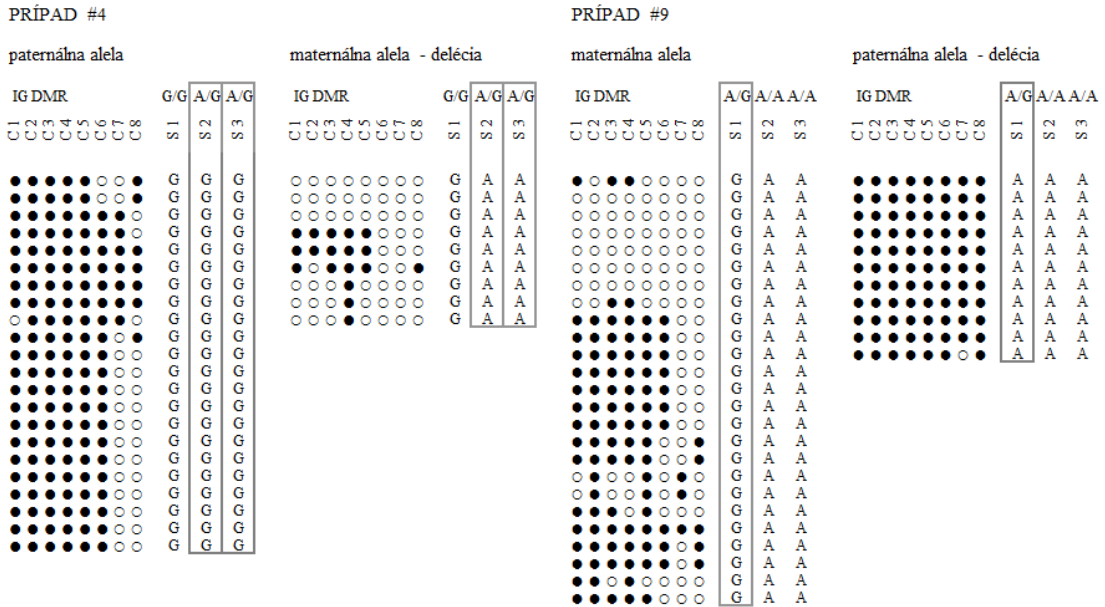
V súbore 9 prípadov s *del14q/IGH* bola zhodnotená nerovnováha aliel v informatívnych polymorfných lokusoch S1, S2 resp. S3. Pomer SNP aliel bol kvantifikovaný pomocou automatického softwaru *PeakPicker version 0.5* (Ge et al., 2005). Pomer aliel (minoritná/majoritná alela) sa v genetickom materiály študovaných prípadov pohyboval v rozmedzí 0.10 až 0.74 (tabuľka 17). Pre porovnanie, pomer aliel v kontrolnom súbore 3 jedincov bez *del(14q/IGH)* sa pohyboval v rozsahu 0.80 až 0.99.

V študovaných vzorkách bola minoritná alela/haplotyp považovaná za deletovanú alelu/haplotyp.

Každý z 9 študovaných prípadov s del(14q/IGH) bol podrobený bisulfidovej sekvenáčnej analýze. V každej vzorke bolo zhodnotených aspoň 19 individuálnych klonov (rozsah 19 až 53, Príloha 2 resp. 3). Do hodnotenia metylačného profilu boli zahrnuté iba neklonálne vlákna. Klony, ktoré vykazovali identický profil konverzie cytozínu na tymín v celej analyzovanej oblasti a súčasne sa vyznačovali rovnakým profilom iných substitúcií zavedených počas PCR /artefakty PCR/ boli považované za odvodené od identickej molekuly. Takéto sekvencie boli určené automatickou analýzou pomocou softwaru Sequencher (*Gene Codes corp., Ann Arbor MI*) a do hodnotenia boli zahrnuté iba 1x.

V analyzovaných vzorkách s del(14q/IGH) bolo v priemere 98 % nemetylovaných cytozínov úspešne konvertovaných na uracil. Prípady s del(14q/IGH) vykazovali metyláciu 82 až 100 % CpG v hypermetylovanej alele a metyláciu 25 až 74 % CpG v komplementárnej (hypometylovanej) alele.

Na základe metylačnej štúdie bola určená delícia paternálnej alely v 6 prípadoch (#2, 3, 5, 6, 7 a 9) a maternálnej alely v 3 prípadoch (#1, 4 a 8) s del(14q/IGH). Príklady výstupov metylačnej analýzy vzoriek s del(14q/IGH) ukazuje obrázok 25. Výstupy ostávajúcich 7 prípadov boli uvedené v prílohe (príloha 2, 3).



**Obrázok 25 - Metylačná analýza – vzorky s del(14q/IGH)** Každý riadok zodpovedá jednému analyzovanému klonu; každý plný resp. otvorený krúžok v stĺpcoch C1 až C8 reprezentuje metylovaný resp. nemetylovaný cytozín vo 8 hodnotených CpG dinukleotidoch. V stĺpcoch S1 až S3 boli znázornené korešpondujúce SNP alely; informatívne SNP boli ohraňované. Pravý panel predstavuje parentálny pôvod predpokladaného haplotypu 14q, ktorý sa stal predmetom delécie v znázornených prípadoch. Prípad 4 reprezentuje skupinu, v ktorej bola na základe vykonanej metylačnej štúdie určená delécia maternálnej alely. Prípad 9 dokumentuje delécia paternálnej alely na 14q32 (upravené podľa Katrincsakova et al., 2009, príloha 5)

**Tabuľka 17 - Charakteristiky súboru s del(14q/IGH), ktorý bol podrobený alelovo špecifickej metylačnej analýze a získané výsledky (upravené podľa Katrincsakova et al., , 2009, príloha 5)**

Prípado č.	Biologický materiál	Diagnóza	Typ del14 q	% neoplast bb.	SNP analýza					Alelovo špecifická metylačná analýza						Záver Parent. pôvod del(14q/IGH )
					Haplotyp		Alelový (AP) <sup>1</sup>			pomer			14q alela			
					minor	major	S1 <sup>2</sup>	S2 <sup>2</sup>	S3 <sup>2</sup>	H <sup>3</sup>	Σ <sup>4</sup>	M <sup>5</sup> [%]	H	Σ	M [%]	
1	LU	FL	R	80	GAG	GAA	x <sup>7</sup>	x	0.28	GAA	2	82	GA	7	41	maternálny
2 <sup>8</sup>	PK	aCLL	R	82	GAA	GAG	x	x	0.40	GAA	6	100	GA	2	63	paternálny
3 <sup>8</sup>	KD	WM/CLL	R	86	GGG	AAA	0.16	0.17	0.10	GG	6	92	AA	4	74	paternálny
4 <sup>8</sup>	LU	CLL	R	58	GAA	GGG	x	0.45	0.53	GG	1	84	GA	8	27	maternálny
5 <sup>8</sup>	KD	aCLL	R	62	GAA	AAA	0.26	x	x	GAA	3	96	AA	2	64	paternálny
6 <sup>8</sup>	KD	CLL/PL	R	78	GAA	GAG	x	x	0.28	GAA	1	100	GA	2	72	paternálny
7	LU	B-NHL	NR	29	GAA	GAG	x	x	0.74	GAA	8	94	GA	1	59	paternálny
8 <sup>8</sup>	KD	SLVL	NR	45	GGG	GAG	x	0.56	x	GAG	9	82	GG	1	25	maternálny
9	LU	DLBCL	NR	18	AAA	GAA	0.64	x	x	AAA	1	99	GA	1	55	paternálny
O <sup>6</sup>	PK	-	-	-	-	-	0,96	x	x	GAA	1	95	AA	1	22	
M <sup>6</sup>	PK	-	-	-	-	-	0,92	x	0,95	GA	1	97	AA	1	37	
D <sup>6</sup>	PK	-	-	-	-	-	0,80	x	0,99	AAA	8	98	GA	1	13	

Vysvetlivky: LU: lymfatická uzlina; FL: folikulárny lymfóm; R: rekurentná del(14)(q24.13q32.33); PK: periférna krv; aCLL: atypická chronická lymfocytová leukémia; KD: kostná dreň; WM: Waldenströmova makroglobulinémia; CLL: chronická lymfocytová leukémia; PL: B-bunková prolymfocytová leukémia; B-NHL NOS: non-Hodgkinov B lymfóm bližšie nešpecifikovaný; SLVL: splenický lymfóm s vilóznymi lymfocytmi; DLBCL: difúzny veľkobunkový B lymfóm; NR: nerekurentná del(14q/IGH); O: otec; M: matka; D: dieťa; <sup>1</sup>AP: minoritný/majoritný pomer alieli; <sup>2</sup>S1, S2, S3: hodnotené SNP; <sup>3</sup>H: 14q haplotyp; <sup>4</sup>Σ - počet klonov s daným metylačným profilom; <sup>5</sup>M: stupeň metylácie CpG (priemer); <sup>6</sup>výsledky kontrolnej skupiny; <sup>7</sup>x: neinformatívne SNP; <sup>8</sup>prípady publikované v Pospisilova et al., , 2007)

## 2.2. DISKUSIA

Testovali sme hypotézu o cielenej delícii homologických aliel v súbore pacientov s diagnózami malígnych proliferácií B-lymfocytov, u ktorých boli cytogeneticky potvrdené intersticiálne delécie v oblasti *IGH* [del(14q/*IGH*)]. Úplná pracovná hypotéza znela: Ak niektorý z imprintovaných génov resp. nekódujúcich RNA lokalizovaných v *DLK1/GTL2* oblasti na 14q32 plní funkciu nádorového supresoru v patogenéze B-lymfoidných malignít s identifikovanou del(14q/*IGH*), inaktivácia takéhoto génu bude vyžadovať stratu jeho aktívnej alely - paternálnej alely v prípade paternálne exprimovaného imprintovaného génu, resp. maternálnej alely v prípade maternálne exprimovaného imprintovaného génu.

V priamej genetickej analýze je možné určiť parentálny pôvod homologických aliel na základe paralelnej analýzy vyšetrovaných vzoriek a vzorky aspoň jedného z biologických rodičov. U žiadneho pacienta s cytogeneticky potvrdenou del(14q/*IGH*) nebolo možné zaistiť genetický materiál od parentálnej generácie.

Po vylúčení prístupu, ktorý ponúka priama genetická diagnostika sme navrhli experimentálny postup, v ktorom sme testovanie hypotézy o cielenej delícii 14q aliel založili na analýze informatívnych (heterozygotných) SNP pozícií v oblasti 14q32 a túto analýzu sme prepojili s určením metylačného profilu cytozínov v CpG dinukleotidoch lokalizovaných v *DLK1-GTL2* IG-DMR.

Študovali sme 20 prípadov s malignitami B-lymfocytov s del(14q/*IGH*). V experimentálnej práci sme postupovali v nasledujúcich krokoch:

- 1) na základe databázy SNP polymorfizmov (dbSNP) sme analyzovali výskyt jednonukleotidových DNA polymorfizmov priamo v oblasti IG-DMR a súčasne v oblasti 86 nt *upstream* a 600 nt *downstream* od IG-DMR,
- 2) vzorky s del14q/*IGH* sme podrobili genotypizovaniu SNP v cieľovej oblasti (celkový rozsah ~ 0.85kb),
- 3) vo vzorkách s heterozygotným genotypom aspoň v 1 polymorfnej polohe sme identifikovali deletovanú alelu na základe nerovnováhy aliel v informatívnych SNP (minoritnú alelu sme považovali za deletovanú alelu),
- 4) určili sme parentálny pôvod deletovanej alely na základe paternálne špecifického metylačného profilu homologických aliel vo 8 CpG dinukleotidoch, ktoré lokalizovali priamo do *DLK1-GTL2* IG-DMR

Využitelnosť popísanej metodologickej schémy sme potvrdili na kontrolnom experimente. Na základe molekulárnej analýzy triády (otec, matka, dieťa) sme u dieťaťa dokumentovali takmer kompletne metylovaný profil paternálnej alely/haplotypu. Pokiaľ bola IG-DMR prenesená z paternálnej alely, cytozíny v CpG dinukleotidoch sa vyznačovali prevažne metylovaným (hypermetylovaným) profilom. V prípade, že prenos nastal z maternálneho homológu, alely boli prevažne nemetylované (hypometylované) (obrázok 23). Na podobný, intermediárny (nie absolútny) metylačný profil IG-DMR v periférnej krvi zdravých dospelých poukázali aj ďalšie práce, ktoré študovali metylačný profil humánnej *DLK1-GTL2* IG-DMR pred resp. paralelne s našou štúdiou (Astuti et al., 2005, Kagami et al., 2008, Kawakami et al., 2006). Práca, ktorá študovala metylačný profil *DLK1-GTL2* IG-DMR v ľudských gamétach súhlasne s našimi výsledkami dokumentuje prevažne (nie kompletne) nemetylovaný profil CpG v ľudských oocytoch a prevažne (nie absolútne) metylovaný profil CpG v spermatoocytoch (Geuns et al., 2007).

Súhrnne sme určili parentálny pôvod deletovanej alely v 9 z celkového počtu 20 analyzovaných prípadov s *del(14q/IGH)*. Kompletnú molekulárnu analýzu ostávajúcich 11 prípadov sme na základe navrhutej experimentálnej schémy nevykonali, pretože sme neurčili žiadne informatívne SNP priamo v *DLK1-GTL2* IG-DMR ani v analyzovanej oblasti mapujúcej *upstream* resp. *downstream* od cieľovej DMR. Genotypizovali sme panel 10 SNP. Z nich iba 1 SNP (rs967189, G/C) sa vyskytovalo priamo v oblasti IG-DMR. V študovanom súbore sa toto SNP prezentovalo výlučne G alelou (neinformatívny homozygotný genotyp), čo vylučovalo aplikovateľnosť navrhutej experimentálnej schémy. Neinformatívny výsledok genotypizovania SNP rs967189 znemožnil určiť parentálny pôvod intermediárnych metylačných profilov individuálnych buniek aj v inej vyššie už citovanej štúdii (Geuns et al., 2007). Na kľúčové SNP, ktoré vykazovali v našom súbore heterozygotný genotyp poukázala až analýza nukleotidovej sekvencie *downstream* od IG-DMR. V tomto úseku sme určili 3 SNP pozície, ktoré boli informatívne v 9 z 20 genotypizovaných vzoriek s *del(14q/IGH)*. V každom z 9 prípadov s *del(14q/IGH)* sme pozorovali nerovnováhu aliel v informatívnych SNP pozíciách. Pomer homologických aliel (minoritná/majoritná alela) sa odlišoval od štandardnej distribúcie aliel v populácii (viď kontrolná triáda, obrázok 22, obrázok 24) a bol úmerný podielu infiltrácie biologického materiálu nádorovými bunkami (tabuľka 17). Homologické alely sa vo vzorkách s *del(14q/IGH)* vyznačovali špecifickým metylačným profilom. Hypermetylovaná (t. j. paternálna) alela

vykazovala zreteľný, takmer kompletne metylovaný profil v každom z analyzovaných vzoriek. Metylovaný profil sme určili v 82 až 100 % CpG pozícií (tabuľka 17). V porovnaní s hypermetylovanou paternálnou alelou sa homologická, maternálna alela vyznačovala hypometylovaným profilom. Zo získaných výsledkov je však zrejmé, že v alelách, ktoré predstavujú hypometylovaný homológ 14q je diferenciálny metylačný profil relatívne k hypermetylovanej alele menej výrazný. Metylačný profil, ktorý sme pozorovali vo vzorkách s *del(14q/IGH)* sa navyše odlišoval od metylačného profilu hypometylovanej alely v kontrolných vzorkách (25 až 74 % metylovaných CpG vo vzorkách s *del(14q/IGH)* v porovnaní s 13 až 37 % metylovaných CpG v kontrolnom súbore, tabuľka 17).

Za predpokladu, že paternálnu alelu charakterizujú hypermetylované CpG dinukleotidy v *DLK1/GTL2* IG-DMR sme určili, že *del(14q/IGH)* zasiahla paternálnu alelu v 6 prípadoch a maternálnu alelu v ostávajúcich 3 prípadoch (obrázok 25, príloha 2 a 3).

Výsledky našej štúdie nepodporujú testovanú hypotézu o uniformnej, t. j. systematickej strate paternálnej alebo maternálnej alely v študovaných prípadoch B-lymfoidných malignít s intersticiálnymi *del(14q/IGH)*. Je ďalej zrejmé, že na základe dostupných dát je možné vylúčiť vzťah medzi parentálnym pôvodom *del(14q/IGH)* a niektorou z foriem, v ktorej sa *del(14q/IGH)* v analyzovaných vzorkách prezentuje (rekurentný resp. proximálne variabilný zlom na 14q, obrázok 24) (Pospisilova et al., 2007). Ďalšie poznatky, ktoré vyplynuli z prezentovanej štúdie sa týkajú epigenetických zmien na intaktnej alele, t. j. na tej 14q alele, ktorá podľa získaných výsledkov nebola predmetom *del(14q/IGH)*. Očakávali sme, že táto alela nebude vykazovať zmeny v parentálne špecifickom epigenotype. V tejto súvislosti by sme poukázali na výsledky práce, ktorá študovala metylačný profil imprintovanej domény na 14q32 v prípadoch s dokumentovaným fenotypom podobným maternálnej resp. paternálnej uniparentálnej dizómii chromozómu 14 (*maternal a paternal UPD(14) like phenotype*). V dôsledku delécií, prípadne epimutácií nesú takíto jedinci 2 kópie chromozómu 14, ktoré sú identického parentálneho pôvodu, paternálneho [UPD(14)pat] alebo maternálneho [UPD(14)mat]. V citovanej štúdii sa vyznačovali prípady s UPD(14)pat (bez maternálnej alely) hypermetylovaným epigenotypom, kým prípady s UPD(14)mat (bez paternálnej alely) mali epigenotyp hypometylovaný (Kagami et al., 2008).

Po porovnaní metylačného profilu intaktnej alely vo vzorkách s *del(14q/IGH)* s profilmi korešpondujúceho parentálneho homógu v dizomických kontrolných

vzorkách sme zistili, že v prípadoch s del(14q/*IGH*) vykazuje intaktná alela 14q odchýlky od očakávaného metylačného profilu IG-DMR. Odchýlky od hypo-, resp. hypermetylovaného epigenotypu sme v príslušných CpG pozorovali nezávisle na tom, či bola ako deletovaná určená paternálna alebo maternálna alela (príloha 4).

Detailné analýzy ukázali, že v 6 prípadoch s deléciou paternálnej alely vykazovala intaktná (maternálna) alela viac metylovaných cytozínov v CpG (priemer 65 %, rozsah 55 až 74 % v individuálnych klonoch) v porovnaní s metyláciou maternálnej alely v kontrolnom súbore (priemer 34 %, rozsah 13 až 37 %) (príloha 4). Identické zhodnotenie nádorových vzoriek v 3 prípadoch s deléciou maternálnej alely taktiež nepotvrdilo zreteľný hypermetylovaný profil na intaktnej (paternálnej) alele, na ktorý poukazovali výsledky kontrolného experimentu. Na rozdiel od kontrolného súboru sme vo vzorkách B-lymfoidných malignít zaznamenali trend smerom k nižšiemu podielu metylovaných CpG na intaktnej paternálnej alele (v priemere 83 % metylovaných CpG, rozsah metylácie 82 až 84 % v nádorových vzorkách v porovnaní s metylačným profilom v priemere 97 %, rozsah 95 až 98 % v kontrolných vzorkách).

V ďalšom kroku sme porovnali metylačný profil aliel, ktoré boli v tejto štúdií určené ako deletované s metylačným profilom príslušných homológov v kontrolnom súbore. Percento metylácie v neoplastických vzorkách (priemer 31 %; rozsah 25 až 41 % v hypometylovanej, maternálnej alele a 97 %; rozsah 92 až 100 % v hypermetylovanej, paternálnej alele) boli v kontexte s metylačným profilom odpovedajúcich parentálnych homológov v kontrolnom súbore (tabuľka 17).

V súvislosti s vyššie diskutovanými výsledkami by sme uviedli, že analyzované vzorky predstavovali zmes neoplastických a normálnych buniek, ktoré boli získané z infiltrovaných lymfatických uzlín, kostnej drene, prípadne z periférnej krvi pacientov s nejednotnými diagnózami B-lymfoidných malignít (tabuľka 17). Metylačný profil týchto vzoriek bol porovnávaný so vzorkami zdravých kontrol, ktoré sa vyznačovali homogénnou skladbou normálnych (nenádorových) buniek a pochádzali uniformne z periférnej krvi. Na základe dostupných dát nedokážeme zhodnotiť, či resp. do akej miery sa tieto aspekty podieľali na vyššie dokumentované metylačných dátach.

Alternatívne by mohli získané metylačné dáta poukazovať na to, že delécia jedného z homológov 14q, ktorá zahŕňa aj IG-DMR, ovplyvňuje metylačný status ostávajúcej, intaktnej alely. Podobná, asymetrická regulácia imprintingu je známa napríklad u myší. Ľudská imprintovaná doména na 14q32.2q32.31 je vysoko konzervovaná v distálnej oblasti myšieho chromozómu 12. Cielená delécia



nemetylovaného (maternálneho) homológu IG-DMR je u myší spojená so stratou imprintingu a vedie k paternalizácii všetkých génov v imprintovanej *Dlk1-Gtl2* doméne na chromozóme 12. Na ostávajúcom maternálnom chromozóme dochádza k aktivácii štandardne maternálne reprimovaných génov (*Dlk1*, *Rtl1*, *Dio3*) a k represii transkriptov, ktoré bývajú za fyziologických podmienok exprimované na maternálnom chromozóme (*Gtl2*, *microRNA*, *C/D snoRNA*). Promótorové oblasti *Gtl2*, ktoré bývajú po fertilizácii metylované iba na paternálnom chromozóme vykazujú hypermetylovaný profil taktiež v promótorových oblastiach na maternálnom chromozóme. Identická delécia metylovaného (paternálneho) homológu IG DMR imprinting génov v tomto lokuse neovplyvňuje, z čoho vyplýva že (i) IG-DMR je primárny *cis*-regulátor expresie imprintovaných génov na distálnom chromozóme 12 a súčasne že (ii) parentálne homológy majú odlišný podiel na kontrole imprintingu u myší, pričom epigenotyp príslušnej imprintovanej domény dokáže regulovať iba maternálne derivovaná IG-DMR (Lin et al., 2003).

V súvislosti s dátami z myšieho modelu, odlišnosti v metylačnom profile intaktného, maternálneho homológu 14q v porovnaní s očakávaným hypometylovaným profilom maternálne derivovaného IG-DMR, ktorý sme pozorovali u časti prípadov s deléciou paternálnej alely by mohli upozorňovať napríklad na to, že v prípade delécie paternálnej alely dochádza k paternalizácii ostávajúceho maternálneho homológu. Ak by k takejto zmene epigenotypu u B-lymfoidných malignít dochádzalo, mohlo by to znamenať, že strata niektorého z homológov 14q zodpovedá za poruchu expresie maternálne exprimovaných génov v 14q32 imprintovanej doméne (vrátane kandidátnych, maternálne exprimovaných *miRNA*), pričom by išlo o mechanizmus patogenézy *del14q/IGH* u hematologických malignít nezávislý na parentálnom pôvode deletovanej alely. Overenie tejto hypotézy vyžaduje detailnú analýzu expresného profilu génov z *DLK1-GTL2* domény vo vzorkách s *del14q/IGH*, ktorá však nebola predmetom prezentovanej štúdie.

Alternatívne nie sme schopní vylúčiť, že rekurentné intersticiálne *del(14q/IGH)* predstavujú molekulárnu zmenu, ktorá je nezávislá na 14q32 imprintovanej doméne. Najmenšia spoločná deletovaná oblasť je rozsiahla (~ 10.5 Mb) a okrem imprintovanej domény *DLK1/GTL2* zahŕňa ďalšie gény kódujúce i nekódujúce proteíny. Platformy založené na analýze kompletného genómu, exómu, transkriptómu či epigenómu nádorových buniek sú mimoriadne perspektívne pre identifikáciu putatívnych nádorových supresorových génov v MDR. Limitom nasledujúcich štúdií bola

nedostupnosť biologického materiálu pre molekulárne analýzy, ktorý bol spotrebovaný aktuálne prezentovanou retrospektívnou štúdiou a molekulárnymi štúdiami, ktoré jej predchádzali. Do zostavenia nového súboru prípadov s del(14q/*IGH*) ostáva molekulárny mechanizmus týchto špecifických aberácií rekurentných u B-lymfoidných malignít neobjasnený.

Diskutované výsledky boli publikované v Katrincsakova et al. 2009 (príloha 5), boli prezentované vo forme posteru na medzinárodnej konferencii (príloha 11) a boli prednesené vo forme prednášky na tuzemskej konferencii s medzinárodnou účasťou.

Vymedzenie môjho podielu práce: Navrhla som dizajn štúdie, v rámci experimentálnej práce som vykonávala všetky molekulárne analýzy, vyhodnotila som získané dáta a napísala som prvú verziu manuskriptu resp. som aktívne prezentovala a diskutovala získané dáta na konferenciách.

### 3. ŠTÚDIUM MOLEKULÁRNEJ PATOGENÉZY ABERÁCIÍ CHROMOZÓMU 14 U VYBRANÝCH NEOPLÁZIÍ B-LYMFOCYTOV ASOCIOVANÝCH S VILÓZNYMI LYMFOCYTMÍ

#### 3.1. VÝSLEDKY

Metódou relatívnej kvantifikácie bola analyzovaná expresia 3 nekódujúcich RNA z kategórie T-UCR v biologickom materiáli 5 pacientov, u ktorých bola stanovená jednotná diagnóza *B-lymfoidná malignita asociovaná s vilóznymi lymfocytmi* a súčasne boli dokumentované aberácie chromozómu 14 v oblasti 14q32.13-q32.33. Experimenty boli vykonané na vzorkách, ktoré pochádzali z diagnostickej sleziny po splenektómii (n = 3, P1, P2, P3) resp. na vzorkách periférnej krvi (n = 2, P4, P5). Expresia T-UCR bola paralelne stanovená v kontrolných vzorkách B-lymfoidných malignít s vilóznymi lymfocytmi (iniciálna diagnóza HCL) bez dokumentovanej aberácie na chromozóme 14 (n = 6, K1, K3, K4, K5, K6, K7), resp. bola meraná vo vzorkách, ktoré pochádzali z normálnej sleziny (n = 3, N1 až N3) a z periférnej krvi (n = 1, N4, zmes RNA od 4 zdravých jedincov). Expresia 3 T-UCR – uc. 379, uc. 380 a uc. 381 v skupine 5 pacientov s t(14;14)(q32.13;q32.33) resp. inv(14)(q32.13q32.33) bola porovnaná s kontrolnou skupinou.

Dáta kvantitatívnej analýzy expresie uc.379, uc.380 a uc.381 boli uvedené v tabuľke 18 (pacienti s t(14;14)(q32.13;q32.33) resp. inv(14)(q32.13q32.33) s infiltrovanou slezinou), v tabuľke 19 (kontrolná skupina s infiltrovanou slezinou) a v tabuľke 20 (pacienti s t(14;14)(q32.13;q32.33) s infiltrovanou periférnou krvou). Na obrázku 26 boli porovnané výsledky relatívnej kvantifikácie hladiny uc. 379, uc. 380 a uc. 381 vo vzorkách s abnormalitami chromozómu 14 (n = 5) a v kontrolnej skupine (n = 2).

V dokumentovaných prípadoch s t(14;14)(q32.13;q32.33) resp. inv(14)(q32.13q32.33) bol určený nejednotný profil expresie T-UCR (tabuľka 18 a 20). Vzorky získané po splenektómii vykazovali unikátny profil expresie T-UCR v každom z 3 študovaných prípadov (tabuľka 18). Relatívne k expresii T-UCR v slezine zdravých jedincov bola v tejto skupine zaznamenaná významne zvýšená expresia niektorej z 3 T-UCR v 2 prípadoch, konkrétne bola zistená zvýšená expresia uc. 379 (P1) resp. uc. 380 (P2) (tabuľka 18). Ďalšie významné zmeny v expresii T-UCR v porovnaní s kontrolnými

prípadi zistené neboli. Vo vzorkách periférnej krvi s t(14;14)(q32.13;q32.33) neboli pozorované významné rozdiely relatívne k expresii v periférnej krvi zdravých jedincov takmer v žiadnom z 3 T-UCR. Expresiu detekovanú v krvi zdravých jedincov významne prevyšovala jedine expresia uc. 380, ktorá bola pozorovaná u 1 z 2 študovaných prípadov (tabuľka 20).

Expresia T-UCR v kontrolnom súbore (n = 6) sa pohybovala od nevýznamných rozdielov k veľmi výrazným zmenám s typickým, individuálne špecifickým expresným profilom (tabuľka 19).

Dáta z relatívnej kvantifikácie 3 T-UCR všeobecne nepokázali na rozdiely medzi neopláziami B - lymfocytov s aberáciou na chromozóme 14 a kontrolnou skupinou bez chromozómovej aberácie v oblasti 14q32.13-q32.33 (tabuľky 18, 19, 20, obrázok 26).

V celkovom súbore 11 neoplázií B - lymfocytov s cirkulujúcimi vilóznymi lymfocytmi, ktoré boli predmetom experimentov bola významná nadexpresia niektorej z 3 T-UCR detekovaná v 7 prípadoch, v týchto prípadoch bola zaznamenaná nadexpresia uc. 379 (n = 1) resp. uc. 380 (n = 6) (tabuľky 18, 19, 20). Tieto prípady vykazovali ~ 90 až takmer 500 násobný rozdiel v expresii uc. 380 v slezine (n = 5) resp. v periférnej krvi (n = 1) relatívne k expresii u zdravých jedincov.

**Tabuľka 18 - Analýza dát metódou  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  vo vzorkách 3 pacientov s infiltrovanou slezinou (P1, P2, P3)** Namerané dáta Ct boli normalizované k referenčnému génu (*HPRT*) ( $\Delta Ct$ , resp.  $dCt$ ) a hodnota  $\Delta\Delta Ct$  (resp.  $ddCt$ ) bola vypočítaná relatívne k hodnote  $\Delta Ct$  kalibrátora = priemerné  $\Delta Ct$  získané nezávislou analýzou expresie uc. 379, uc. 380, resp. uc. 381 celkom v 3 nenádorových slezinách (hodnoty vyznačené zelene). Rozdiel v génovej expresii relatívne k expresii v nenádorovej (normálnej) slezine od 3 rôznych jedincov bol vyjadrený na základe vzorca  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Vzorky s významne zvýšenou expresiou niektorého zo študovaných T-UCR boli vyznačené červeně. SEM – stredná chyba priemeru (*standard error mean*)

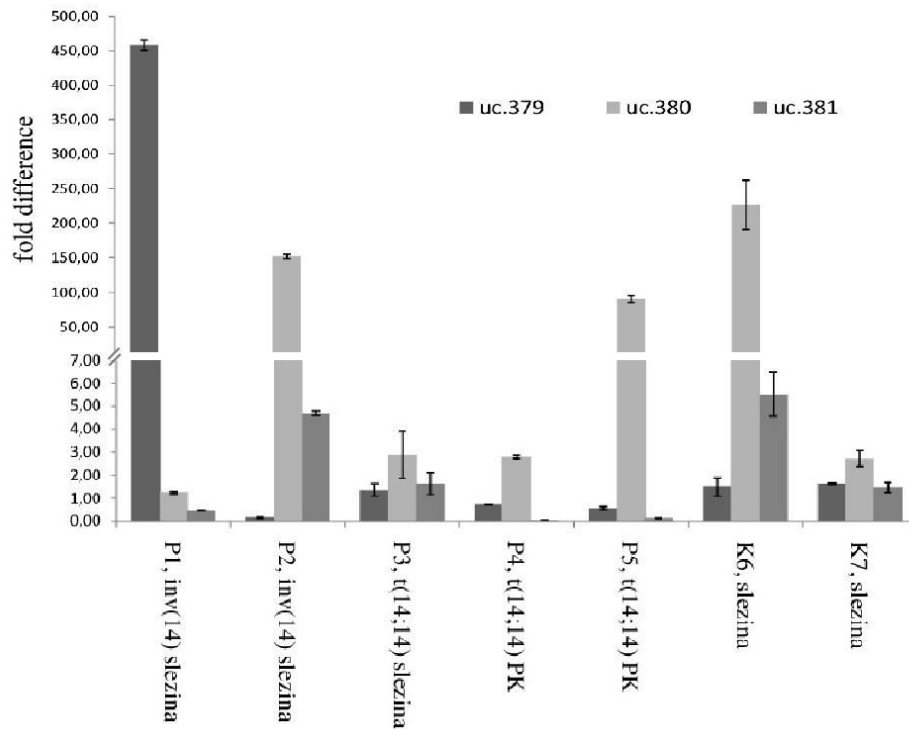
vzorka	mean Ct					dCt			ddCt			rozdiel v hladine expresie (fold difference)		
	ucr379	ucr380	ucr381	HPRT		ucr379	ucr380	ucr381	ucr379	ucr380	ucr381	ucr379	ucr380	ucr381
P1 P1 HCL inv(14)	26,24	35,60	30,02	25,88	exp.1	0,36	9,72	4,14	-8,82	-0,28	1,15	450,90	1,22	0,45
	26,18	35,47	29,85	25,86	exp.2	0,32	9,61	3,99	-8,86	-0,39	1,00	465,72	1,31	0,50
					fold diff. (priemer)							458,31	1,27	0,48
					smer. odchýlka SEM							10,48	0,07	0,03
					dCt (priemer)	0,34	9,67	4,07	-8,84	-0,34	1,08	458,25	1,26	0,47
P2 P2 HCL inv(14)	34,41	25,10	23,10	22,31	exp.1	12,10	2,79	0,79	2,92	-7,21	-2,20	0,13	148,40	4,59
	34,22	25,40	23,39	22,67	exp.2	11,55	2,73	0,72	2,37	-7,27	-2,27	0,19	154,70	4,82
					fold diff. (priemer)							0,16	151,55	4,71
					smer. odchýlka SEM							0,04	4,46	0,16
					dCt (priemer)	11,83	2,76	0,76	2,65	-7,24	-2,24	0,16	151,52	4,71
P3 P3 HCL t(14;14)	33,38	33,45	27,15	24,36	exp.1	9,02	9,09	2,79	-0,16	-0,91	-0,20	1,12	1,88	1,15
	33,33	32,89	26,76	24,86	exp.2	8,47	8,03	1,90	-0,71	-1,97	-1,09	1,64	3,93	2,13
					fold diff. (priemer)							1,38	2,91	1,64
					smer. odchýlka SEM							0,37	1,44	0,69
					dCt (priemer)	8,75	8,56	2,35	-0,43	-1,44	-0,65	1,35	2,72	1,56
N1	32,31	32,28	25,40	22,61	exp.1	9,70	9,67	2,79	0,52	-0,33	-0,20	0,70	1,26	1,15
N2 N2	31,77	32,54	25,93	21,96	exp.1	9,81	10,58	3,97	0,63	0,58	0,98	0,65	0,67	0,51
	31,47	32,57	25,73	22,31	exp.2	9,16	10,26	3,42	-0,02	0,26	0,43	1,01	0,84	0,74
					fold diff. (priemer)							0,83	0,75	0,62
					smer. odchýlka SEM							0,26	0,12	0,17
					dCt (priemer)	9,49	10,42	3,70	0,31	0,42	0,71	0,81	0,75	0,61
N3 N3	30,99	32,92	25,50	22,82	exp.1	8,17	10,10	2,68	-1,01	0,10	-0,31	2,01	0,94	1,24
	31,50	32,70	25,25	22,96	exp.2	8,54	9,74	2,29	-0,64	-0,26	-0,70	1,56	1,20	1,62
					fold diff. (priemer)							1,79	1,07	1,43
					smer. odchýlka SEM							0,32	0,19	0,27
					dCt (priemer)	8,36	9,92	2,49	-0,83	-0,08	2,49	1,77	1,06	0,18
				priemerná hodnota N1+N2+N3	9,18	10,00	2,99	0,00	0,00	0,00	1,00	1,00	1,00	

**Tabuľka 19 - Analýza dát metódou  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  v kontrolnej skupine bez cytogenetickej aberácie na chromozóme 14 (slezina, n = 6)** Vzorky boli analyzované v triplikátoch a u 2 vzoriek (K6, K7) boli uskutočnené 2 nezávislé merania. Namerané dáta Ct boli normalizované k referenčnému génu (HPRT) ( $\Delta Ct$ , resp. dCt) a hodnota  $\Delta\Delta Ct$  (resp. ddCt) bola vypočítaná relatívne k hodnote  $\Delta Ct$  kalibrátora = priemerné  $\Delta Ct$  získané nezávislou analýzou expresie uc.379, uc. 380, resp. uc. 381 v 3 nenádorových slezinách (hodnoty vyznačené zelene). Rozdiel v génovej expresii relatívne k expresii v nenádorovej (normálnej) slezine od 3 rôznych jedincov bol vyjadrený na základe vzorca  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Vzorky s významne zvýšenou expresiou niektorého z študovaných T-UCR boli vyznačené červenou. SEM – stredná chyba priemeru (*standard error mean*)

vzorka	mean Ct					dCt			ddCt			rozdiel v hladine expresie (fold difference)		
	ucr379	ucr380	ucr381	HPRT		ucr379	ucr380	ucr381	ucr379	ucr380	ucr381	ucr379	ucr380	ucr381
K1	33,58	26,68	28,25	25,01	exp.1	8,57	1,67	3,24	-0,61	-8,33	0,25	1,53	322,54	0,84
K3	35,39	34,74	30,60	24,34	exp.1	11,05	10,40	6,26	1,87	0,40	3,27	0,27	0,76	0,10
K4	34,39	25,42	23,53	22,83	exp.1	11,56	2,59	0,70	2,38	-7,41	-2,29	0,19	170,47	4,89
K5	33,09	23,85	23,57	22,80	exp.1	10,29	1,05	0,77	1,11	-8,95	-2,22	0,46	495,70	4,66
K6	30,62	24,35	22,67	22,38	exp.1	8,24	1,97	0,29	-0,94	-8,03	-2,70	1,92	261,98	6,50
K6	31,30	24,70	23,07	22,27	exp.2	9,03	2,43	0,80	-0,15	-7,57	-2,19	1,11	190,46	4,56
					fold diff. (priemer)							1,51	226,22	5,53
					smer. odchýlka							0,57	50,58	1,37
					SEM							0,40	35,76	0,97
					dCt (priemer)	8,64	2,20	0,55	-0,54	-7,80	-2,45	1,46	223,38	5,45
K7	35,50	35,75	29,24	27,00	exp.1	8,50	8,75	2,24	-0,68	-1,25	-0,75	1,60	2,38	1,68
K7	35,16	35,09	29,37	26,71	exp.2	8,45	8,38	2,66	-0,73	-1,62	-0,33	1,66	3,08	1,26
					fold diff. (priemer)							1,63	2,73	1,47
					smer. odchýlka							0,04	0,49	0,30
					SEM							0,03	0,35	0,21
					dCt (priemer)	8,48	8,57	2,45	-0,71	-1,44	-0,54	1,63	2,71	1,45
N1	32,31	32,28	25,40	22,61	exp.1	9,70	9,67	2,79	0,52	-0,33	-0,20	0,70	1,26	1,15
N2	31,77	32,54	25,93	21,96	exp.1	9,81	10,58	3,97	0,63	0,58	0,98	0,65	0,67	0,51
N2	31,47	32,57	25,73	22,31	exp.2	9,16	10,26	3,42	-0,02	0,26	0,43	1,01	0,84	0,74
					fold diff. (priemer)							0,83	0,75	0,62
					smer. odchýlka							0,26	0,12	0,17
					SEM							0,18	0,08	0,12
					dCt (priemer)	9,49	10,42	3,70	0,31	0,42	0,71	0,81	0,75	0,61
N3	30,99	32,92	25,50	22,82	exp.1	8,17	10,10	2,66	-1,01	0,10	-0,31	2,01	0,94	1,24
N3	31,50	32,70	25,25	22,96	exp.2	8,54	9,74	2,29	-0,64	-0,26	-0,70	1,56	1,20	1,62
					fold diff. (priemer)							1,79	1,07	1,43
					smer. odchýlka							0,32	0,19	0,27
					SEM							0,23	0,13	0,19
					dCt (priemer)	8,36	9,92	2,49	-0,83	-0,08	-0,51	1,77	1,06	1,42
					priemerná hodnota N1+ N2+ N3	9,18	10,00	2,99	0,00	0,00	0,00	1,00	1,00	1,00

**Tabuľka 20 - Analýza dát metódou  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  vo vzorkách 2 pacientov s postihnutou periférnou krvou (P4, P5)** Namerané dáta Ct boli normalizované k referenčnému génu (*HPRT*) ( $\Delta Ct$ , resp.  $dCt$ ) a hodnota  $\Delta\Delta Ct$  (resp.  $ddCt$ ) bola vypočítaná relatívne k hodnote  $\Delta Ct$  kalibrátora = vzorka periférnej krvi, ktorá predstavovala zmes RNA od 4 zdravých jedincov (hodnoty vyznačené zelene). Rozdiel v génovej expresii relatívne k expresii v periférnej krvi zdravých jedincov bol vyjadrený na základe vzorca  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Vzorky boli analyzované v triplikátoch v 2 na sebe nezávislých meraniach. Vzorky s významne zvýšenou expresiou niektorého z študovaných T-UCR boli vyznačené červene. SEM – stredná chyba priemeru (*standard error mean*)

vzorka	mean Ct					dCt			ddCt			rozdiel v hladine expresie (fold difference)		
	ucr379	ucr380	ucr381	HPRT		ucr379	ucr380	ucr381	ucr379	ucr380	ucr381	ucr379	ucr380	ucr381
<b>P4</b>	33,50	33,30	28,70	24,50	exp.1	9,00	8,80	4,20	0,43	-1,53	4,02	0,74	2,89	0,06
<b>P4</b>	33,70	33,54	29,57	24,67	exp.2	9,03	8,87	4,90	0,46	-1,46	4,72	0,73	2,75	0,04
<b>t(14;14)</b>					fold diff. (priemer)							<b>0,74</b>	<b>2,82</b>	<b>0,05</b>
<b>HCL</b>					smer. odchýlka							0,01	0,10	0,02
					SEM							0,01	0,07	0,01
					dCt (priemer)	9,02	8,84	4,55	0,44	-1,50	4,37	0,74	2,82	0,05
<b>P5</b>	35,60	30,30	29,50	26,40	exp.1	9,20	3,90	3,10	0,63	-6,43	2,92	0,65	86,22	0,13
<b>P5</b>	35,86	30,04	29,53	26,30	exp.2	9,56	3,74	3,23	0,98	-6,59	3,05	0,51	96,34	0,12
<b>t(14;14)</b>					fold diff. (priemer)							<b>0,58</b>	<b>91,28</b>	<b>0,13</b>
<b>HCL</b>					smer. odchýlka							0,10	7,15	0,01
					SEM							0,07	5,06	0,01
					dCt (priemer)	9,38	3,82	3,17	0,81	-6,51	2,99	0,57	91,14	0,13
<b>N4</b>	31,30	33,10	23,00	23,00	exp.1	8,30	10,10	0,00	-0,27	-0,23	-0,18	1,21	1,17	1,13
<b>N4</b>	31,38	33,09	22,89	22,53	exp.2	8,85	10,56	0,36	0,27	0,23	0,18	0,83	0,85	0,88
<b>normál</b>					dCt (priemer)	<u>8,58</u>	<u>10,33</u>	<u>0,18</u>	0,00	0,00	0,00	<b>1,00</b>	<b>1,00</b>	<b>1,00</b>
					smer. odchýlka									
					SEM									



**Obrázok 26-** Relatívna kvantifikácia hladiny uc. 379, uc. 380 a uc. 381 vo vzorkách pacientov s diagnózou B-lymfoproliferatívnych neoplázií s vilóznymi lymfocytmi s abnormalitami chromozómu 14 (P1 až P5) a v kontrolných vzorkách (K6, K7) Vzorky boli kvantifikované metódou  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  a získané dáta predstavujú rozdiel v génovej expresii, ktorý bol normalizovaný k endogénnemu referenčnému génu (*HPRT*) relatívne k expresii sledovaných génov v paralelne analyzovaných vzorkách sleziny resp. periférnej krvi zdravých jedincov bez aberácií na chromozóme 14. Merania boli uskutočnené v triplikátoch a znázornené výsledky predstavujú priemerné hodnoty z 2 nezávislých meraní. Súčasťou grafického zobrazenia výsledkov relatívnej kvantifikácie sú chybové úsečky, ktoré boli generované na základe strednej chyby priemeru (*standard error mean, SEM*) meraní



### 3.2. DISKUSIA

Predmetom tejto diskusie sú dáta o expresnom profile 3 dlhých nekódujúcich RNA z kategórie T-UCR (uc. 379, uc. 380 a uc. 381), ktoré sme zhodnotili u 5 pacientov s diagnózou *B-lymfoidné malignity asociované s vilóznymi lymfocytmi*. Cytogenetickými a molekulárne cytogenetickými technikami sme u týchto pacientov poukázali na abnormality chromozómu 14 v oblasti 14q32.13 (lokus *TCLIA* až *TCL6*) a 14q32.33 (lokus *IGH*) (Urbankova, 2009, Urbankova et al., 2012, príloha 6). Cieľom našej molekulárnej štúdie bolo objasniť molekulárnu patogenézu rekurentných aberácií chromozómu 14 v tejto skupine lymfoproliferatívnych neoplázií.

Z celkového zhodnotenia získaných expresných dát 3 kandidátnych T-UCR vyplýva, že (i) súbor s chromozómovými abnormalitami v oblasti 14q32.13-14q32.33 nevykazuje uniformný expresný profil ani v 1 z 3 dlhých nekódujúcich RNA (tabuľka 18 a 20) a (ii) tento expresný profil sa významne neodlišuje od expresného profilu študovaných T-UCR u B-lymfoidných malignít bez aberácií chromozómu 14 v oblasti 14q32.13-14q32.33 (tabuľka 19, obrázok 26). Tieto výsledky nepodporujú testovanú hypotézu, ktorá predpokladala, že rekurentné prestavby na chromozóme 14 v oblasti *IGH* (14q32.33) môžu byť zodpovedné za patogenézu lymfoidných malignít v študovanej skupine pacientov cestou deregulácie (nadexpresie) kandidátnych T-UCR, ktoré sú lokalizované v blízkosti zlomu v oblasti 14q32.13- 14q32.33.

Nejednotný expresný profil nekódujúcich RNA je v kontexte s výsledkami predchádzajúcej molekulárnej štúdie na tomto súbore, ktorá v rámci rozsiahleho panelu kandidátnych génov, vrátane zhľuku 3 *TCL* génov (*TCLIA*, *TCLIB*, *TCL6*) a ďalších 18 génov lokalizovaných proximálne resp. distálne od miesta zlomu na 14q32.13 nepoukázala na žiadny uniformne nadexprimovaný profil v študovaných prípadoch a nedokázala potvrdiť hypotézu, ktorá predpokladala, že rekurentné abnormality v oblasti 14q32.13-14q32.33 zasahujú do expresie testovaných génov v skupine B-lymfoidných malignít mechanizmom prestavby *IGH* (Urbankova, 2009, Urbankova et al., 2012).

Na základe analýzy celkom 11 prípadov s diagnózou B-lymfoidných malignít asociovaných s vilóznymi lymfocytmi (z nich 5 so špecifickými interchromozómovými resp. intrachromozómovými aberáciami na 14q) nedokážeme vylúčiť, že kandidátne T-UCR (uc. 379, uc. 380 alebo uc. 381) plnia úlohu v patogenéze týchto zriedkavých lymfoproliferatívnych porúch vo vybraných prípadoch. Malígne bunky viacerých

nádorov, vrátane CLL sa vyznačujú unikátnym spektrom expresie T-UCR v porovnaní s korešpondujúcimi normálnymi bunkami (Calin et al., 2007). Hoci uc. 379, uc. 380 a uc. 381 nevykazujú jednotný profil expresie v dokumentovaných prípadoch s chromozómovými prestavbami v oblasti 14q32.13-14q32.33, v širšom meradle nie je možné vylúčiť, že získané expresné dáta, vrátane nadexpresie uc. 380 vo vybraných prípadoch poukazujú na dereguláciu týchto nekódujúcich RNA a že pozorovaný expresný profil je patogénny v tejto skupine hematologických malignít avšak všeobecne, bez ohľadu na prítomnosť/nepřítomnosť cytogenetických abnormalít na 14q. Túto otázku však nie je možné zodpovedať bez poznania expresného profilu T-UCR na obsiahlejšom súbore zrelých B-lymfoidných malignít, ktoré bývajú asociované s vilóznymi lymfocytmi, prípadne štúdií priamo orientovaných na niektorú z konkrétnych entít, ktoré zahŕňajú HCL, SMZL resp. neklasifikovateľné formy splénických B - bunkových leukémií/lymfómov, medzi ktoré sa zaraďuje HCL-v na základe recentne revidovaných kritérií WHO klasifikácie lymfoidných neoplázií (Swerdlow et al., 2008, Swerdlow et al. 2016). Žiadna z načrtnutých štúdií však nebola predmetom našej molekulárnej štúdie.

Neoplázie zrelých B-lymfocytov, ktoré sme študovali v tejto práci patria medzi zriedkavé lymfoproliferatívne poruchy, klinické súbory sa zostavujú obtiažne a dostatočne početné súbory bývajú dokumentované unikátne (Shao et al., 2013). Navyše, v porovnaní s inými nekódujúcimi RNA, napríklad v porovnaní s microRNA, dlhé nekódujúce RNA, medzi ktoré sa zaraďujú aj T-UCR študované v tejto práci predstavujú napriek pokroku, ktorý recentne pozorujeme v ich charakterizácii, naďalej nedostatočne preštudovanú kategóriu nekódujúcich RNA (Peng et al., 2013). Ich podiel na patogenéze nádorov vrátane hematologických však ostáva vysoko potenciálny (Lujambio et al., 2010, Van Roosbroeck et al., 2013). Recentné publikácie poukazujú na aberantnú expresiu dlhých nekódujúcich RNA u diagnóz, ktoré sa v porovnaní s nami študovanými neopláziami zrelých B-lymfocytov vyskytujú častejšie a zahŕňajú napríklad AML (Garzon et al., 2014). Poznatky o expresnom profile nekódujúcich RNA u HCL, HCL-v alebo SMZL však ostávajú v dostupných literárnych zdrojoch výrazne obmedzené (Kitagawa et al., 2012).

V porovnaní s inými hematologickými malignitami, nevynímajúc zmienené, v tejto práci tiež študované AML alebo v porovnaní s ďalšími neopláziami zrelých B - lymfocytov, predchádzajúce štúdie upozornili na mimoriadne stabilný genóm pacientov s HCL bez rekurentných chromozómových translokácií (Tiacci, 2006). Molekulárna

báza ďalších non-HCL diagnóz s podobnou morfológiou neoplastických buniek vrátane HCL-v alebo SMZL bola dosiaľ ešte menej objasnená (Robak, 2011). V kontexte s týmito poznatkami sme na základe profilovania génovej expzie prípadu s t(14;14)(q32.13;q32.33) taktiež poukázali na vyrovnaný expresný profil bez kryptických zmien v počte kópií, resp. signifikantne nadexprimovaného génu na chromozóme 14 (Urbankova et al., 2012).

Nepochybne, čiastočný pokrok v diferenciálnej diagnostike zriedkavej skupiny B-lymfoproliferatívnych ochorení s vilóznymi lymfocytmi priniesli molekulárne štúdie v roku 2011, kedy bola spoločne s ďalšími génmi identifikovaná bodová mutácia *BRAF(V600E)*. Táto mutácia ostáva dosiaľ jediným molekulárnym markerom HCL, ale nie ostatných diagnóz, morfologicky pripomínajúcich HCL (Tiacci et al., 2011). Je vhodné zmieniť, že popri molekulárnej detekcii *BRAF(V600E)* sa diagnostika/diferenciálna diagnostika medzi HCL a HCL-v resp. SMZL naďalej zakladá na určení imunofenotypu proliferujúcich B-lymfocytov a na komplexnom zhodnotení niekoľkých (nešpecifických) ukazovateľov, ktoré v tejto skupine B-lymfoproliferatívnych neoplázií zahŕňajú (i) mutačný status *IGHV* génov (mutované prednostne u HCL, nemutované u 22 % HCL-v, a 15 až 41 % SMZL), (ii) repertoár *IGHV* subgénov (limitovaný v prípade HCL-v a SMZL, nelimitovaný u HCL), (iii) klinickú odpoveď na purínové analógy (dobrá u HCL, slabá u HCL-v resp. u SMZL) a (iv) medián OS (20 rokov u HCL, 9 rokov u HCL-v, 13 rokov u SMZL) (Urbankova et al., 2012). V súvislosti s našou štúdiou je potrebné spomenúť, že absencia *BRAF(V600E)* si vyžiadala retrospektívnu diferenciálnu diagnostiku študovaných prípadov, ktoré boli iníciaľne diagnostikované ako HCL/HCL-v resp. SMZL. Na základe molekulárnej analýzy mutačného hotspotu v *BRAF* a paralelnej imunohistochemickej detekcie anexínu A1 sme dokumentované prípady s ohľadom na neúplné imunofenotypové a klinické dáta (strata z *follow up*) preklasifikovali do kategórie *bližšie neurčené B-lymfoidné malignity asociované s vilóznymi lymfocytmi* (Urbankova et al., 2012).

Z našej štúdie vyplýva, že skupinu B-lymfoidných malignít asociovaných s vilóznymi lymfocytmi môžu na cytogenetickej úrovni charakterizovať chromozómové aberácie v oblasti lokusu *IGH* (14q32.33), pričom zlom, ktorý vzniká v oblasti *IGH* môže byť u týchto malignít zahrnutý v rozličných interchromozómových resp. intrachromozómových prestavbách v oblasti 14q32.13. Naše molekulárne cytogenetické štúdie potvrdili, že v dokumentovaných prípadoch sa abnormality chromozómu 14

prezentujú na úrovni unikátnej chromozómovej aberácie, čo si s ohľadom na všeobecnú absenciu (cyto)genetických markerov v tejto skupine hematologických neoplázií zasluhuje pozornosť. Poznatky o nejednotnom expresnom profile génov kódujúcich resp. nekódujúcich proteíny, na ktoré súhrnne poukázali naše molekulárne štúdie, nedokázali prispieť k určeniu kandidátneho génu resp. génov s aberantným expresným profilom, ktorý by dokázal jednotne objasniť molekulárnu patogenézu abnormalít na 14q v tejto skupine B-lymfoidných malignít. Pritom, molekulárna patogenéza leukémií a lymfómov odvodených od T-lymfocytov bola v minulosti spojená s podobnými inter- resp. intrachromozómovými prestavbami na 14q, konkrétne s  $t(14;14)(q11;q32)$  a jej variantou  $inv(14)(q11q32)$ . Je známe, že molekulárna podstata uvedených chromozómových aberácií je u T-lymfoproliferatívnych neoplázií spojená s prestavbou *TCRA/D* (14q11) a s následnou dereguláciou (nadexpresia) zhluku 3 *TCL* génov (*TCL1A/TCL1B/TCL6*) v oblasti 14q32.11 (Pekarsky et al., 1999, Saitou et al., 2000). Naše molekulárne dáta však nadexpresiu *TCL* génov v študovaných prípadoch B-lymfoidných malignít nepotvrdili. Na základe našich dát gény *TCL1B* a *TCL6* nie sú exprimované v tejto skupine B-lymfoidných malignít. Jediný z *TCL* génov z oblasti 14q32.13, ktorý je nadexprimovaný u časti študovaných prípadov B-lymfoproliferácií s aberáciami na 14q je *TCL1A* (14q32.13). Z našich dát však vyplynulo, že deregulovaný (nadexprimovaný) profil *TCL1A* sa neviaže na vybrané prípady s abnormalitami chromozómu 14, ale charakterizuje taktiež časť prípadov s diagnózou B-lymfoidné leukémie a lymfómy asociované s vilóznymi lymfocytmi, u ktorých sa abnormality chromozómu 14 v oblasti 14q32.13 resp. 14q32.33 nevyskytujú (Urbankova et al., 2012). Z iných štúdií je dokonca známe, že aktivácia *TCL1A* býva pozorovaná u širokého spektra zreých B-lymfoproliferatívnych malignít všeobecne. Na významný onkogénny potenciál *TCL1A* poukazujú transgénne myši, u ktorých bývajú pozorované variabilné malignity odvodené od T- aj B-lymfocytov vrátane neoplázií, ktoré pripomínajú humánne CLL (Bichi et al., 2002).

Naše dáta nepotvrdili uniformnú dereguláciu expresie žiadneho z génov kódujúcich resp. nekódujúcich proteíny, nevynímajúc 3 dlhé nekódujúce RNA z kategórie T-UCR, ktorých expresný profil bol prezentovaný v experimentálnej časti tejto práce. Molekulárna podstata abnormalít chromozómu 14 v skupine B-lymfoproliferatívnych neoplázií asociovaných s vilóznymi lymfocytmi ostáva neobjasnená.

Diskutované výsledky predstavujú súčasť publikácie Urbankova et al. 2012 (príloha 6) a súhrnné výsledky tejto štúdie boli prezentované na medzinárodnej konferencii (Wlodarska, 2011 – Prehľad publikácií).

Vymedzenie môjho podielu práce: Môj prínos do projektu, ktorý bol zhrnutý v našej publikácii bol dizajn a realizácia experimentu, v ktorom sa zhodnotil expresný profil 3 T-UCR génov lokalizovaných v kandidátnej oblasti 14q32.13/14q32.33.

## VI. SÚHRN

Neustále zdokonaľovanie techník analýzy genetického materiálu otvára široké možnosti štúdia molekulárneho pozadia hematologických malignít. Významným prínosom molekulárnej analýzy neoplastických buniek je identifikácii génov, resp. ich zmien na genetickej či epigenetickej úrovni, ktoré majú vzťah k patogenéze konkrétnych hematologických malignít. Všeobecne dokážeme generovať nesmierne komplexné molekulárne dáta, máme možnosť zhodnotiť mutačný status niekoľko rôznych génov, dokonca recentne sme schopní paralelne analyzovať celý genóm/exóm/transkriptóm resp. epigenóm malígnych buniek. Výsledkom našich molekulárnych štúdií sú obyčajne molekulárne profily s variabilnou kombináciou génových mutácií. Je zrejmé, že získané laboratórne dáta je potrebné aplikovať do klinickej praxe a preštudovať ich vlastný podiel na klinickom priebehu resp. klinickej variabilite na konkrétnych súboroch pacientov. Jedným z najvýznamnejších praktických výstupov molekulárnych štúdií je určenie diagnostických resp. prognostických markerov, ktoré umožňujú priradiť pacientov ku konkrétnej klinickej entite a klasifikovať ich do skupín s odlišným klinickým priebehom a prognózou, ktoré v náväznosti určujú charakter navrhovaných terapeutických modalít.

Napriek významnému pokroku v molekulárnej hemato-onkológii, stále poznáme také diagnózy, ktorých molekulárna patogenéza ostáva nedostatočne preštudovaná alebo je dokonca neznáma. U časti hematologických malignít s neznámou molekulárnou patogenézou bývajú rekurentné špecifické chromozómové aberácie, ktoré dokážu nasmerovať molekulárny výskum do konkrétnych oblastí (najmenešie oblasti straty/zmnoženia genetického materiálu, oblasti zlomov chromozómových prestavieb, a podobne), v ktorých je možné predpokladať putatívne gény, kódujúce resp. nekódujúce proteíny, ktoré zodpovedajú za patogenézu takýchto malignít na molekulárnej úrovni.

Predložená dizertačná práca pristupovala k štúdiu zadanej témy v obidvoch načrtnutých smeroch. V prvej časti experimentálnej práce sme sa pokúsili aplikovať molekulárne dáta do klinickej praxe a zhodnotili sme prognostickú hodnotu rekurentných mutačných profilov v súbore pacientov s AML s NK, ktorí boli diagnostikovaní a kuratívne liečení na HOK FNOL. Molekulárne štúdie prezentované v druhej časti experimentálnej práce sa pokúsili určiť neznáme gény zodpovedné za

patogenézu vybraných B-lymfoidných malignít, ktoré charakterizujú špecifické aberácie chromozómu 14 v oblasti 14q32.33 (*IGH*).

V kontexte s cieľmi definovanými v časti venovanej molekulárnej biológii AML sme na základe frekvencie a distribúcie 8 rekurentných mutácií v súbore 89 *de novo* AML s NK potvrdili významnú molekulárnu heterogenitu tejto klinicky variabilnej skupiny AML. Stratifikácia súboru na základe mutačných profilov ukázala, že komplexné zhodnotenie 3 génových mutácií (*FLT3*-ITD, *NPM1*m a *CEBPA*m) dokáže v študovanom súbore odlišiť pacientov s priaznivou prognózou od tých, ktorých prognóza je menej priaznivá. Molekulárna skupina s nálezom *NPM1*m a/alebo *CEBPA*m bez *FLT3*-ITD sa vyznačovala štatisticky významne odlišným klinickým priebehom v porovnaní s ostávajúcimi molekulárnymi skupinami, ktoré vykazovali *FLT3*-ITD, resp. sa u nich nevyskytoval žiadny z 3 molekulárnych markerov. Rozdiely v klinickom priebehu medzi skupinou s *FLT3*-ITD+ a skupinou bez akéhokoľvek z 3 prognostických markerov sme nepotvrdili. Ako potenciálne faktory, ktoré modifikujú klinický priebeh v molekulárnych skupinách AML s NK, ktoré sme definovali na základe *NPM1*m, *CEBPA*m a *FLT3*-ITD sme identifikovali rekurentné mutácie vrátane *IDH1*m, *IDH2*m, *WT1*m a *KMT2A*-PTD. Tieto génové mutácie konkurujú resp. sa vzájomne vylučujú s prognostickými mutáciami *FLT3*-ITD, *NPM1*m a *CEBPA*m v študovanom súbore AML s NK. Typ absolvovanej postremisnej terapie (aloTKB áno/nie) mal významný vplyv na klinický priebeh v študovanom súbore AML s NK a na prínos aloTKB na v postremisnom období sme poukázali aj po stratifikácii pacientov do molekulárnych skupín. Komplexná analýza 8 rôznych mutačných profilov poukázala na aspoň 1 molekulárny marker v 85 % (75/88) AML s NK, v porovnaní so 69 % (61/88) pri analýze *FLT3*-ITD, *NPM1*m a *CEBPA*m alebo so žiadnym markerom v súbore AML s NK bez molekulárnej analýzy. Identifikované mutácie, vrátane *NPM1*m, *IDH1/2*m, *CEBPA*m a *KMT2A*-PTD predstavujú perspektívne markery minimálnej reziduálnej choroby v postremisnom období (Debarri et al., 2015, Krönke et al., 2011, Krauth et al., 2015, Lambert et al., 2014, Thol et al., 2012). V prípadoch, ktoré nevykazovali ani 1 molekulárnu zmenu predpokladáme výskyt mutácií napríklad v epigenetických regulátoroch *ASXL1*, *DNMT3A* alebo *TET2*, ktoré sú taktiež rekurentné u AML (Cancer Genome Atlas Research Network, 2013).

Výsledky prvej štúdie, ktorá sa v predloženej dizertačnej práci týkala molekulárnej biológie B-bunkových malignít nepotvrdili hypotézu, podľa ktorej by dochádzalo v analyzovanom súbore leukémií a lymfómov s dokumentovanými

intersticiálnymi del(14q/*IGH*) cielene k delícii niektorého z parentálnych homológov 14q, paternálneho alebo maternálneho. Gény prítomné v imprintovanej doméne na 14q32 nie sú priamo, t. j. v podobe nádorového supresoru, či *anti-oncomir* zahrnuté v patogenéze študovaných hematologických malignít. U časti prípadov s paternálnou del(14q/*IGH*) by mohlo dochádzať k poruche expresie maternálne exprimovaných génov v 14q32 imprintovanej doméne (vrátane kandidátnych maternálne exprimovaných *miRNA*) na základe zmeny epigenotypu (paternalizácia intaktného maternálneho homológu); detailná analýza expresného profilu génov z *DLK1-GTL2* domény v aktuálnej štúdií nie je k dispozícii. Alternatívne môže byť kandidátny gén lokalizovaný mimo imprintovanú 14q32 doménu v 10.5 Mb minimálne deletovanej oblasti.

V študovaných prípadoch malignít B-lymfocytov s vilóznou morfológiou, ktoré charakterizujú t(14;14)(q32.13;q32.33) alebo inv(14)(q32.13q32.33) sa dlhé nekódujúce RNA uc.379, uc.380 resp. uc381 nevyznačujú uniformným expresným profilom. Získané výsledky nepodporujú testovanú hypotézu, ktorá predpokladala, že rekurentné chromozómové prestavby v oblasti *IGH* (14q32.33) môžu viesť k patogenéze B-lymfoidných malignít asociovaných s vilóznymi lymfocytmi v študovanom súbore cestou deregulácie (nadexpresie) kandidátnych T-UCR, ktoré sú lokalizované v blízkosti zlomu v oblasti 14q32.13- 14q32.33. Naše dáta nevyklučujú, že sa zistené expresné profily uc. 379, uc. 380 či uc. 381 uplatňujú v patogenéze malignít B-lymfocytov s vilóznou morfológiou vo vybraných prípadoch vrátane špecifickej skupiny, ktoré charakterizujú abnormality na chromozóme 14. Kandidátny gén, ktorý zodpovedá za molekulárnu patogenézu študovaných B-lymfoidných malignít ostal neznámy a jeho identifikáciu významne limitujú dáta o nejednotnom expresnom profile génov kódujúcich aj nekódujúcich proteíny, ktoré boli analyzované v našej molekulárnej štúdií.

Výsledky tejto dizertačnej práce predstavujú podklad pre modifikáciu prognostickej a následne liečebnej stratifikácie pacientov, ktorí sú diagnostikovaní a liečení ako AML s NK na HOK FNOL a jej poznatky prispievajú k detailnej charakterizácii molekulárneho pozadia špecifických chromozómových aberácií v oblasti 14q32.33 (*IGH*), ktoré bývajú rekurentné v študovanej skupine B - bunkových malignít.



## VII. POUŽITÁ LITERATÚRA

Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016 May 19;127(20):2391-405.

Abbas S, Lugthart S, Kavelaars FG, et al. Acquired mutations in the genes encoding IDH1 and IDH2 both are recurrent aberrations in acute myeloid leukemia: prevalence and prognostic value. *Blood*. 2010 Sep 23;116(12):2122-6.

Ammerpohl O, Haake A, Pellissery S, et al. Array-based DNA methylation analysis in classical Hodgkin lymphoma reveals new insights into the mechanisms underlying silencing of B cell-specific genes. *Leukemia*. 2012 Jan;26(1):185-8.

Astuti D, Latif F, Wagner K, et al. Epigenetic alteration at the DLK1-GTL2 imprinted domain in human neoplasia: analysis of neuroblastoma, pheochromocytoma and Wilms' tumour. *Br J Cancer*. 2005 Apr 25; 92(8):1574-80.

Baldus CD, Mrózek K, Marcucci G, Bloomfield CD. Clinical outcome of de novo acute myeloid leukaemia patients with normal cytogenetics is affected by molecular genetic alterations: a concise review. *Br J Haematol*. 2007 Jun;137(5):387-400. Review.

Bartolomei MS, Ferguson-Smith AC. Mammalian genomic imprinting. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011 Jul 1;3(7).

Bazarbachi A, Labopin M, Kharfan-Dabaja MA, et al. Allogeneic hematopoietic cell transplantation in acute myeloid leukemia with normal karyotype and isolated Nucleophosmin-1 (NPM1) mutation: outcome strongly correlates with disease status. *Haematologica*. 2016 Jan;101(1):e34-7.

Becker H, Marcucci G, Maharry K, et al. Mutations of the Wilms tumor 1 gene (WT1) in older patients with primary cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study. *Blood*. 2010 Aug 5;116(5):788-92.

Benetatos L, Hatzimichael E, Londin E, et al. The microRNAs within the DLK1-DIO3 genomic region: involvement in disease pathogenesis. *Cell Mol Life Sci*. 2013 Mar;70(5):795-814.

Benetatos L, Vartholomatos G, Hatzimichael E. MEG3 imprinted gene contribution in tumorigenesis. *Int J Cancer*. 2011 Aug 15;129(4):773-9.

Berenstein R. Class III Receptor Tyrosine Kinases in Acute Leukemia - Biological Functions and Modern Laboratory Analysis. *Biomark Insights*. 2015 Aug 5;10(Suppl 3):1-14.

Bichi R, Shinton SA, Martin ES, et al. Human chronic lymphocytic leukemia modeled in mouse by targeted TCL1 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 May 14;99(10):6955-60.

Breems DA, Van Putten WL, De Greef GE, et al. Monosomal karyotype in acute myeloid leukemia: a better indicator of poor prognosis than a complex karyotype. *J Clin Oncol*. 2008 Oct 10;26(29):4791-7.

- Burnett A, Wetzler M, Löwenberg B. Therapeutic advances in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*. 2011 Feb 10;29(5):487-94.
- Cancer Genome Atlas Research Network. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2013 May 30;368(22):2059-74.
- Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Nov 26;99(24):15524-9.
- Calin GA, Liu CG, Ferracin M, et al. Ultraconserved regions encoding ncRNAs are altered in human leukemias and carcinomas. *Cancer Cell*. 2007 Sep;12(3):215-29.
- Conway O'Brien E, Prideaux S, Chevassut T. The epigenetic landscape of acute myeloid leukemia. *Adv Hematol*. 2014;2014:103175.
- Dang L, Jin S, Su SM. IDH mutations in glioma and acute myeloid leukemia. *Trends Mol Med*. 2010 Sep;16(9):387-97.
- Debarri H, Lebon D, Roumier C, et al. IDH1/2 but not DNMT3A mutations are suitable targets for minimal residual disease monitoring in acute myeloid leukemia patients: a study by the Acute Leukemia French Association. *Oncotarget*. 2015 Dec 8;6(39):42345-53.
- Dickson GJ, Bustraan S, Hills RK, et al. The value of molecular stratification for CEBPA(DM) and NPM1(MUT) FLT3(WT) genotypes in older patients with acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol*. 2016 Feb;172(4):573-80. doi: 10.1111/bjh.13873. Epub 2015 Dec 21.
- Ding L, Ley TJ, Larson DE, et al. Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing. *Nature*. 2012 Jan 11;481(7382):506-10.
- Döhner H, Estey EH, Amadori S, et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*. 2010 Jan 21;115(3):453-74.
- Döhner H, Weisdorf DJ, Bloomfield CD. Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 2015 Sep 17;373(12):1136-52.
- Dufour A, Schneider F, Hoster E, et al. Monoallelic CEBPA mutations in normal karyotype acute myeloid leukemia: independent favorable prognostic factor within NPM1 mutated patients. *Ann Hematol*. 2012 Jul;91(7):1051-63.
- Dufour A, Schneider F, Metzeler KH, et al. Acute myeloid leukemia with biallelic CEBPA gene mutations and normal karyotype represents a distinct genetic entity associated with a favorable clinical outcome. *J Clin Oncol*. 2010 Feb 1;28(4):570-7.
- Estey EH. Acute myeloid leukemia: 2013 update on risk-stratification and management. *Am J Hematol*. 2013 Apr;88(4):318-27.
- Falini B, Albiero E, Bolli N, et al. Aberrant cytoplasmic expression of C-terminal-truncated NPM leukaemic mutant is dictated by tryptophans loss and a new NES motif. *Leukemia*. 2007 Sep;21(9):2052-4; author reply 2054; discussion 2055-6.
- Falini B, Mecucci C, Tiacci E, et al. Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *N Engl J Med*. 2005 Jan 20;352(3):254-66. Erratum in: *N Engl J Med*. 2005 Feb 17;352(7):740.

- Ferrara F, Schiffer CA. Acute myeloid leukaemia in adults. *Lancet*. 2013 Feb 9;381(9865):484-95. doi: 10.1016/S0140-6736(12)61727-9. Review.
- Figuroa ME, Abdel-Wahab O, Lu C, et al. Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. *Cancer Cell*. 2010 Dec 14;18(6):553-67.
- Friedman AD. C/EBP $\alpha$  in normal and malignant myelopoiesis. *Int J Hematol*. 2015 Apr;101(4):330-41. doi: 10.1007/s12185-015-1764-6. Epub 2015 Mar 10. Review.
- Fröhling S, Schlenk RF, Stolze I, et al. CEBPA mutations in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: prognostic relevance and analysis of cooperating mutations. *J Clin Oncol*. 2004 Feb 15;22(4):624-33.
- Gaidzik VI, Schlenk RF, Moschny S, et al. Prognostic impact of WT1 mutations in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a study of the German-Austrian AML Study Group. *Blood*. 2009 May 7;113(19):4505-11.
- Gale RE, Green C, Allen C, et al. The impact of FLT3 internal tandem duplication mutant level, number, size, and interaction with NPM1 mutations in a large cohort of young adult patients with acute myeloid leukemia. *Blood*. 2008 Mar 1;111(5):2776-84.
- Garzon R, Volinia S, Papaioannou D, et al. Expression and prognostic impact of lncRNAs in acute myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Dec 30;111(52):18679-84.
- Ge B, Gurd S, Gaudin T, et al. Survey of allelic expression using EST mining. *Genome Res*. 2005 Nov;15(11):1584-91.
- Gejman R, Batista DL, Zhong Y, et al. Selective loss of MEG3 expression and intergenic differentially methylated region hypermethylation in the MEG3/DLK1 locus in human clinically nonfunctioning pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008 Oct;93(10):4119-25.
- Geuns E, De Temmerman N, Hilven P, et al. Methylation analysis of the intergenic differentially methylated region of DLK1-GTL2 in human. *Eur J Hum Genet*. 2007 Mar;15(3):352-61.
- Green CL, Koo KK, Hills RK, et al. Prognostic significance of CEBPA mutations in a large cohort of younger adult patients with acute myeloid leukemia: impact of double CEBPA mutations and the interaction with FLT3 and NPM1 mutations. *J Clin Oncol*. 2010 Jun 1;28(16):2739-47.
- Grimwade D, Hills RK. Independent prognostic factors for AML outcome. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2009:385-95.
- Grimwade D, Hills RK, Moorman AV, et al. Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. *Blood*. 2010 Jul 22;116(3):354-65.
- Grossmann V, Schnittger S, Kohlmann A, et al. A novel hierarchical prognostic model of AML solely based on molecular mutations. *Blood*. 2012 Oct 11;120(15):2963-72.
- Hopp L, Löffler-Wirth H, Binder H. Epigenetic Heterogeneity of B-Cell Lymphoma: DNA Methylation, Gene Expression and Chromatin States. *Genes (Basel)*. 2015 Sep 7;6(3):812-40.

- Hopp L, Nersisyan L, Löffler-Wirth H, Arakelyan A, Binder H. Epigenetic Heterogeneity of B-Cell Lymphoma: Chromatin Modifiers. *Genes (Basel)*. 2015 Oct 21;6(4):1076-112.
- Hou HA, Huang TC, Lin LI, et al. WT1 mutation in 470 adult patients with acute myeloid leukemia: stability during disease evolution and implication of its incorporation into a survival scoring system. *Blood*. 2010 Jun 24;115(25):5222-31.
- How J, Sykes J, Minden MD, et al. The prognostic impact of FLT3-ITD and NPM1 mutations in patients with relapsed acute myeloid leukemia and intermediate-risk cytogenetics. *Blood Cancer J*. 2013 May 24;3:e116.
- Im AP, Sehgal AR, Carroll MP, et al. DNMT3A and IDH mutations in acute myeloid leukemia and other myeloid malignancies: associations with prognosis and potential treatment strategies. *Leukemia*. 2014 Sep;28(9):1774-83. doi: 10.1038/leu.2014.124.
- Ishikawa Y, Kiyoi H, Tsujimura A, et al. Comprehensive analysis of cooperative gene mutations between class I a class II in de novo acute myeloid leukemia. *Eur J Haematol*. 2009 Aug;83(2):90-8.
- Jäger U, Böcskő S, Le T, Mitterbauer G, et al. Follicular lymphomas' BCL-2/IgH junctions contain templated nucleotide insertions: novel insights into the mechanism of t(14;18) translocation. *Blood*. 2000 Jun 1;95(11):3520-9.
- Jamal R, Taketani T, Taki T, et al. Coduplication of the MLL and FLT3 genes in patients with acute myeloid leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*. 2001 Jun;31(2):187-90.
- Kagami M, O'Sullivan MJ, Green AJ, et al. The IG-DMR and the MEG3-DMR at human chromosome 14q32.2: hierarchical interaction and distinct functional properties as imprinting control centers. *PLoS Genet*. 2010 Jun 17;6(6):e1000992.
- Kagami M, Sekita Y, Nishimura G, et al. Deletions and epimutations affecting the human 14q32.2 imprinted region in individuals with paternal and maternal upd(14)-like phenotypes. *Nat Genet*. 2008 Feb;40(2):237-42.
- Kao HW, Liang DC, Kuo MC, et al. High frequency of additional gene mutations in acute myeloid leukemia with MLL partial tandem duplication: DNMT3A mutation is associated with poor prognosis. *Oncotarget*. 2015 Oct 20;6(32):33217-25.
- Katrincáková B, Szotkowski T, Divoká M, Indrák K, Jarošová M. Klinický význam génových mutácií u akútnych myeloidných leukémií s normálnym karyotypom: Transfúze a Hematologie dnes. 2011; 17: 72 - 80.
- Katrincakova B, Takeda H, Urbankova H, et al. Methylation analysis of the imprinted DLK1-GTL2 domain supports the random parental origin of the IGH-involving del(14q) in B-cell malignancies. *Epigenetics*. 2009 Oct 1;4(7):469-75.
- Kawakami T, Chano T, Minami K, et al. Imprinted DLK1 is a putative tumor suppressor gene and inactivated by epimutation at the region upstream of GTL2 in human renal cell carcinoma. *Hum Mol Genet*. 2006 Mar 15;15(6):821-30.
- Kelly LM, Gilliland DG. Genetics of myeloid leukemias. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2002;3:179-98. Epub 2002 Apr 15. Review.

- Kitagawa Y, Brahmachary M, Tiacci E, et al. A microRNA signature specific for hairy cell leukemia and associated with modulation of the MAPK-JNK pathways. *Leukemia*. 2012 Dec;26(12):2564-7.
- Klein U, Lia M, Crespo M, et al. The DLEU2/miR-15a/16-1 cluster controls B cell proliferation and its deletion leads to chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Cell*. 2010 Jan 19;17(1):28-40.
- Krauth MT, Alpermann T, Bacher U, et al. WT1 mutations are secondary events in AML, show varying frequencies and impact on prognosis between genetic subgroups. *Leukemia*. 2015 Mar;29(3):660-7.
- Krönke J, Schlenk RF, Jensen KO, et al. Monitoring of minimal residual disease in NPM1-mutated acute myeloid leukemia: a study from the German-Austrian acute myeloid leukemia study group. *J Clin Oncol*. 2011 Jul 1;29(19):2709-16.
- Lambert J, Lambert J, Nibourel O, et al. MRD assessed by WT1 and NPM1 transcript levels identifies distinct outcomes in AML patients and is influenced by gemtuzumab ozogamicin. *Oncotarget*. 2014 Aug 15;5(15):6280-8.
- Leong SM, Tan BX, Bte Ahmad B, et al. Mutant nucleophosmin deregulates cell death and myeloid differentiation through excessive caspase-6 and -8 inhibition. *Blood*. 2010 Oct 28;116(17):3286-96.
- Ley TJ, Mardis ER, Ding L, et al. DNA sequencing of a cytogenetically normal acute myeloid leukaemia genome. *Nature*. 2008 Nov 6;456(7218):66-72.
- Lin SP, Youngson N, Takada S, et al. Asymmetric regulation of imprinting on the maternal and paternal chromosomes at the Dlk1-Gtl2 imprinted cluster on mouse chromosome 12. *Nat Genet*. 2003 Sep;35(1):97-102.
- Lujambio A, Portela A, Liz J, et al. CpG island hypermethylation-associated silencing of non-coding RNAs transcribed from ultraconserved regions in human cancer. *Oncogene*. 2010 Dec 2;29(48):6390-401. doi: 10.1038/onc.2010.361. Epub 2010 Aug 30.
- Marcucci G, Maharry K, Wu YZ, et al. IDH1 and IDH2 gene mutations identify novel molecular subsets within de novo cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study. *J Clin Oncol*. 2010 May 10;28(14):2348-55.
- Marcucci G, Mrózek K, Radmacher MD, et al. The prognostic and functional role of microRNAs in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2011 Jan 27;117(4):1121-9. doi: 10.1182/blood-2010-09-191312. Epub 2010 Nov 2. Review.
- Mardis ER, Ding L, Dooling DJ, et al. Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. *N Engl J Med*. 2009 Sep 10;361(11):1058-66.
- Martelli MP, Sportoletti P, Tiacci E, Martelli MF, Falini B. Mutational landscape of AML with normal cytogenetics: biological and clinical implications. *Blood Rev*. 2013 Jan;27(1):13-22.
- Martín-Subero JI, Kreuz M, Bibikova M, et al. New insights into the biology and origin of mature aggressive B-cell lymphomas by combined epigenomic, genomic, and transcriptional profiling. *Blood*. 2009 Mar 12;113(11):2488-97.
- Matutes E, Morilla R, Owusu-Ankomah K, et al, Catovsky D. The immunophenotype of hairy cell leukemia (HCL). Proposal for a scoring system to distinguish HCL from B-cell disorders with hairy or villous lymphocytes. *Leuk Lymphoma*. 1994;14 Suppl 1:57-61<sup>a</sup>.

- Matutes E, Morilla R, Owusu-Ankomah K, Houlihan A, Catovsky D. The immunophenotype of splenic lymphoma with villous lymphocytes and its relevance to the differential diagnosis with other B-cell disorders. *Blood*. 1994 Mar 15;83(6):1558-62<sup>b</sup>.
- Matutes E, Wotherspoon A, Catovsky D. The variant form of hairy-cell leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2003 Mar;16(1):41-56. Review
- Mawad R, Estey EH. Acute myeloid leukemia with normal cytogenetics. *Curr Oncol Rep*. 2012 Oct;14(5):359-68.
- Mead AJ, Linch DC, Hills RK, et al. FLT3 tyrosine kinase domain mutations are biologically distinct from and have a significantly more favorable prognosis than FLT3 internal tandem duplications in patients with acute myeloid leukemia. *Blood*. 2007 Aug 15;110(4):1262-70.
- Medeiros BC, Othus M, Fang M, et al. Prognostic impact of monosomal karyotype in young adult and elderly acute myeloid leukemia: the Southwest Oncology Group (SWOG) experience. *Blood*. 2010 Sep 30;116(13):2224-8. doi: 10.1182/blood-2010-02-270330. Epub 2010 Jun 18.
- Meyer SC, Levine RL. Translational implications of somatic genomics in acute myeloid leukaemia. *Lancet Oncol*. 2014 Aug;15(9):e382-94.
- Meyer C, Hofmann J, Burmeister T, et al., The MLL recombinome of acute leukemias in 2013. *Leukemia*. 2013 Nov;27(11):2165-76.
- Mrózek K, Marcucci G, Paschka P, et al. Clinical relevance of mutations and gene-expression changes in adult acute myeloid leukemia with normal cytogenetics: are we ready for a prognostically prioritized molecular classification? *Blood*. 2007 Jan 15;109(2):431-48.
- Noguera NI, Ammatuna E, Zangrilli D, et al. Simultaneous detection of NPM1 and FLT3-ITD mutations by capillary electrophoresis in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2005 Aug;19(8):1479-82. Erratum in: *Leukemia*. 2007 May;21(5):1134.
- O'Donnel M.R. Tallman M.S, Abboud C.N, et al. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines<sup>®</sup>) Acute Myeloid Leukemia Version II.2016, [http://www.nccn.org/NCCN Guidelines for treatment of cancer by site/AML](http://www.nccn.org/NCCN_Guidelines_for_treatment_of_cancer_by_site/AML) (accessed on 2 October 2016).
- Ofran Y, Rowe JM. Genetic profiling in acute myeloid leukaemia--where are we and what is its role in patient management. *Br J Haematol*. 2013 Feb;160(3):303-20.
- Orkin SH, Zon LI. Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell*. 2008 Feb 22;132(4):631-44.
- Owen C, Fitzgibbon J, Paschka P. The clinical relevance of Wilms Tumour 1 (WT1) gene mutations in acute leukaemia. *Hematol Oncol*. 2010 Mar;28(1):13-9.
- Pabst T, Mueller BU. Complexity of CEBPA dysregulation in human acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res*. 2009 Sep 1;15(17):5303-7.
- Paschka P, Schlenk RF, Gaidzik VI, et al. IDH1 and IDH2 mutations are frequent genetic alterations in acute myeloid leukemia and confer adverse prognosis in cytogenetically normal acute myeloid leukemia with NPM1 mutation without FLT3 internal tandem duplication. *J Clin Oncol*. 2010 Aug 1;28(22):3636-43. doi: 10.1200/JCO.2010.28.3762. Epub 2010 Jun 21.

- Pastore F, Kling D, Hoster E, et al. Long-term follow-up of cytogenetically normal CEBPA-mutated AML. *J Hematol Oncol*. 2014 Sep 10;7:55.
- Patel JP, Gönen M, Figueroa ME, et al. Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2012 Mar 22;366(12):1079-89. doi: 10.1056/NEJMoa1112304. Epub 2012 Mar 14.
- Patel KP, Ravandi F, Ma D, et al. Acute myeloid leukemia with IDH1 or IDH2 mutation: frequency and clinicopathologic features. *Am J Clin Pathol*. 2011 Jan;135(1):35-45.
- Pekarsky Y, Hallas C, Isobe M, et al. Abnormalities at 14q32.1 in T cell malignancies involve two oncogenes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Mar 16;96(6):2949-51.
- Peng JC, Shen J, Ran ZH. Transcribed ultraconserved region in human cancers. *RNA Biol*. 2013 Dec;10(12):1771-7.
- Port M, Böttcher M, Thol F, et al. Prognostic significance of FLT3 internal tandem duplication, nucleophosmin 1, and CEBPA gene mutations for acute myeloid leukemia patients with normal karyotype and younger than 60 years: a systematic review and meta-analysis. *Ann Hematol*. 2014 Aug;93(8):1279-86.
- Pospisilova H, Baens M, Michaux L, et al. Interstitial del(14)(q) involving IGH: a novel recurrent aberration in B-NHL. *Leukemia*. 2007 Sep;21(9):2079-83.
- Raida L, Tucek P, Faber E, et al. Comparison of new flu-bu12-tg conditioning with the standard bu-cy myeloablative regimen in patients undergoing allogeneic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2011 Dec;155(4):327-32.
- Reckzeh K, Bereshchenko O, Mead A, et al. Molecular and cellular effects of oncogene cooperation in a genetically accurate AML mouse model. *Leukemia*. 2012 Jul;26(7):1527-36. doi: 10.1038/leu.2012.37. Epub 2012 Feb 9.
- Robak T. Hairy-cell leukemia variant: recent view on diagnosis, biology and treatment. *Cancer Treat Rev*. 2011 Feb;37(1):3-10.
- Röllig C, Bornhäuser M, Thiede C, et al. Long-term prognosis of acute myeloid leukemia according to the new genetic risk classification of the European LeukemiaNet recommendations: evaluation of the proposed reporting system. *J Clin Oncol*. 2011 Jul 10;29(20):2758-65.
- Saitou M, Sugimoto J, Hatakeyama T, et al. Identification of the TCL6 genes within the breakpoint cluster region on chromosome 14q32 in T-cell leukemia. *Oncogene*. 2000 May 25;19(23):2796-802.
- Schlenk RF, Döhner K, Krauter J, et al. Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2008 May 1;358(18):1909-18.
- Schlenk RF, Taskesen E, van Norden Y, et al. The value of allogeneic and autologous hematopoietic stem cell transplantation in prognostically favorable acute myeloid leukemia with double mutant CEBPA. *Blood*. 2013 Aug 29;122(9):1576-82.
- Schnittger S, Bacher U, Haferlach C, et al. Diversity of the juxtamembrane and TKD1 mutations (exons 13-15) in the FLT3 gene with regards to mutant load, sequence, length,

- localization, and correlation with biological data. *Genes Chromosomes Cancer*. 2012 Oct;51(10):910-24.
- Schnittger S, Bacher U, Kern W, et al. Prognostic impact of FLT3-ITD load in NPM1 mutated acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2011 Aug;25(8):1297-304.
- Schnittger S, Schoch C, Kern W, et al. Nucleophosmin gene mutations are predictors of favorable prognosis in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *Blood*. 2005 Dec 1;106(12):3733-9.
- Seifert M, Scholtysik R, Küppers R. Origin and pathogenesis of B cell lymphomas. *Methods Mol Biol*. 2013;971:1-25.
- Shao H, Calvo KR, Grönborg M, et al. Distinguishing hairy cell leukemia variant from hairy cell leukemia: development and validation of diagnostic criteria. *Leuk Res*. 2013 Apr;37(4):401-9.
- Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*. 2016 May 19;127(20):2375-90.
- Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, France: IARC Press; 2008.
- Szotkowski T, Muzik J, Voglova J, et al. Prognostic factors and treatment outcome in 1,516 adult patients with de novo and secondary acute myeloid leukemia in 1999-2009 in 5 hematology intensive care centers in the Czech Republic. *Neoplasma*. 2010;57(6):578-89.
- Šmardová J, Moulis M, Lišková K, et al. Lymfomy se dvěma zásahy: přehled literatury a kazuistika. *Klin Onkol*. 2014 27(1): 24-32.
- Taskesen E, Bullinger L, Corbacioglu A, et al. Prognostic impact, concurrent genetic mutations, and gene expression features of AML with CEBPA mutations in a cohort of 1182 cytogenetically normal AML patients: further evidence for CEBPA double mutant AML as a distinctive disease entity. *Blood*. 2011 Feb 24;117(8):2469-75.
- Thol F, Damm F, Wagner K, et al. Prognostic impact of IDH2 mutations in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Blood*. 2010 Jul 29;116(4):614-6.
- Thol F, Kölking B, Damm F, et al. Next-generation sequencing for minimal residual disease monitoring in acute myeloid leukemia patients with FLT3-ITD or NPM1 mutations. *Genes Chromosomes Cancer*. 2012 Jul;51(7):689-95.
- Tiacci E, Liso A, Piris M, Falini B. Evolving concepts in the pathogenesis of hairy-cell leukaemia. *Nat Rev Cancer*. 2006 Jun;6(6):437-48. Review.
- Tiacci E, Trifonov V, Schiavoni G, et al. BRAF mutations in hairy-cell leukemia. *N Engl J Med*. 2011 Jun 16;364(24):2305-15.
- Urbankova, H. Array comparative genomic hybridization studies of hematological malignancies: PhD thesis, Palacký University Olomouc, The Faculty of Medicine a Dentistry, Olomouc, 2009.
- Urbankova H, Baens M, Michaux L, et al. Recurrent breakpoints in 14q32.13/TCL1A region in mature B-cell neoplasms with villous lymphocytes. *Leuk Lymphoma*. 2012 Dec;53(12):2449-55.



- Van Roosbroeck K, Pollet J, Calin GA. miRNAs a long noncoding RNAs as biomarkers in human diseases. *Expert Rev Mol Diagn.* 2013 Mar;13(2):183-204.
- Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms a acute leukemia: rationale a important changes. *Blood.* 2009 Jul 30;114(5):937-51.
- Walker AR, Marcucci G. Management of patients with cytogenetically normal acute myeloid leukemia who have neither favorable nor unfavorable markers. *J Natl Compr Canc Netw.* 2014 Apr;12(4):527-34. Review.
- Ward PS, Cross JR, Lu C, et al. Identification of additional IDH mutations associated with oncometabolite R(-)-2-hydroxyglutarate production. *Oncogene.* 2012 May 10;31(19):2491-8. doi: 10.1038/onc.2011.416. Epub 2011 Sep 26.
- Welch JS, Ley TJ, Link DC, et al. The origin and evolution of mutations in acute myeloid leukemia. *Cell.* 2012 Jul 20;150(2):264-78.
- Whitman SP, Ruppert AS, Radmacher MD, et al. FLT3 D835/I836 mutations are associated with poor disease-free survival and a distinct gene-expression signature among younger adults with de novo cytogenetically normal acute myeloid leukemia lacking FLT3 internal tandem duplications. *Blood.* 2008 Feb 1;111(3):1552-9.
- Wouters BJ, Löwenberg B, Erpelinck-Verschueren CA, et al. Double CEBPA mutations, but not single CEBPA mutations, define a subgroup of acute myeloid leukemia with a distinctive gene expression profile that is uniquely associated with a favorable outcome. *Blood.* 2009 Mar 26;113(13):3088-91. doi: 10.1182/blood-2008-09-179895. Epub 2009 Jan 26.
- Wylie AA, Murphy SK, Orton TC, Jirtle RL. Novel imprinted DLK1/GTL2 domain on human chromosome 14 contains motifs that mimic those implicated in IGF2/H19 regulation. *Genome Res.* 2000 Nov;10(11):1711-8.
- Yamamoto Y, Kiyoi H, Nakano Y, et al. Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. *Blood.* 2001 Apr 15;97(8):2434-9.
- Yang L, Han Y, Suarez Saiz F, Minden MD. A tumor suppressor and oncogene: the WT1 story. *Leukemia.* 2007 May;21(5):868-76. Epub 2007 Mar 15. Review. Erratum in: *Leukemia.* 2007 Jul;21(7):1603.
- Yuan Y, Zhou L, Miyamoto T, Iwasaki H, et al.. AML1-ETO expression is directly involved in the development of acute myeloid leukemia in the presence of additional mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Aug 28;98(18):10398-403.
- Zhang L, Volinia S, Bonome T, et al. Genomic and epigenetic alterations deregulate microRNA expression in human epithelial ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 May 13;105(19):7004-9.
- Zhou Y, Zhang X, Klibanski A. MEG3 noncoding RNA: a tumor suppressor. *J Mol Endocrinol.* 2012 Apr 2;48(3):R45-53.

## VIII. ZOZNAM PUBLIKÁCIÍ A KONFERENČNÝCH PRÍSPEVKOV

### 1. Práce súvisiace s dizertačnou prácou:

#### a) Pôvodné vedecké publikácie *in extenso* uverejnené v časopisoch s IF

**Katrincsakova B**, Takeda H, Urbankova H, Michaux L, Jarosova M, Vandenberghe P, Georges M, Charlier C, Wlodarska I. Methylation analysis of the imprinted DLK1-GTL2 domain supports the random parental origin of the IGH-involving del(14q) in B-cell malignancies. Epigenetics. 2009 Oct 25;4(7) (IF 4.584) (**príloha 5**)

Urbankova H, Baens M, Michaux L, Tousseyn T, Rack K, **Katrincsakova B**, Ferreiro JF, Van Loo P, De Kelder W, Dierickx D, Demuynck H, Delannoy A, Verschuere J, Jarošová M, De Wolf-Peeters C, Vandenberghe P, Wlodarska I. Recurrent breakpoints in the 14q32.13/TCL1A region in mature B-cell neoplasms with villous lymphocytes. Leuk Lymphoma. 2012 Dec;53(12):2449-55 (IF 2.301) (**príloha 6**)

Jarosova M, Nedomova R, Hubacek J, Holzerova M, Mickova P, **Katrincsakova B**, Pikalova Z, Papajik T, Indrak K. Rare tetraploidy with large 5q deletion in acute myeloid leukemia with myelodysplasia-related changes (AML-MRC). Leuk Res. 2012 Apr;36(4):e68-70 (IF 2.764) (**príloha 7**)

Raida L, Tucek P, Faber E, Vondrakova J, Rusinakova Z, Skoumalova I, Hubacek J, Jarosova M, **Katrincsakova B**, Pikalova Z, Kurfurst P, Indrak K. Comparison of new flu-bu12-tg conditioning with the standard bu-cy myeloablative regimen in patients undergoing allogeneic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 2011 Dec;155(4):327-32 (IF 0.716) (**príloha 8**)

Szotkowski T, Muzik J, Voglova J, Koza V, Maaloufova J, Kozak T, Jarosova M, Michalova K, Zak P, Steinerova K, Vydra J, Lanska M, **Katrincsakova B**, Sicova K, Pavlik T, Dusek L, Indrak K. Prognostic factors and treatment outcome in 1,516 adult patients with de novo and secondary acute myeloid leukemia in 1999-2009 in 5 hematology intensive care centers in the Czech Republic. Neoplasma 2010, 57, 6, 578-89. (IF 1.449) (**príloha 9**)

#### b) Prehľadné/súborné vedecké práce uverejnené v ostatných recenzovaných vedeckých časopisoch

**Katrincsaková B**, Szotkowski T, Divoká M. et al. Klinický význam genových mutácií u akútnych myeloidných leukémií s normálnym karyotypom. Hematologie a transfuze dnes. 2011; 17: 72-80 (**príloha 10**)

#### c) Publikované abstrakty

**Katrincsakova B**, Szotkowski T, Muzik J, Smutna V, Divoka M, Sicova K, Holzerova M, Hubacek J, Jarosova M, Indrak K. Mutations in IDH1/2 genes in acute myeloid leukemia with

normal karyotype: A single centre study of 72 cases. 16<sup>th</sup> Congress of the European Hematology Association, London 2011, Suppl. Haematologica; 96, p. 606 (IF 6.424) (**príloha 11**)

**Katrinčáková B**, Szotkowski T, Divoká M, Holzerová M, Hubáček J, Indrák K, Jarošová M: Investigation of 4 molecular markers in 65 patients with de novo acute myeloid leukemia with normal karyotype – a single center experience. 13<sup>th</sup> Congress of the European Hematology Association, Copenhagen 2008, Suppl. Haematologica 93, p. 1266 (IF 5.978) (**príloha 11**)

#### **d) Zoznam prednášok/posterov prednesených na verejných odborných fórach**

**Katrinčáková B**, Jarošová M, Raida L. Detekce mutace BRAF V600E u nemocných s vlasatobuněčnou leukémií. 8. Moravské lymfomové sympodium. 3.2.2012, Olomouc

**Katrinčáková B**, Smutná V, Szotkowski T, Divoká M, Síčova K, Holzerová M, Hubáček J, Píkalová Z, Novák M, Galuszková D, Mužík J, Dušek L, Indrák K, Jarošová M. Mutácie v génoch *IDH1/2* u akútnych myeloidných leukémií s normálnym karyotypom: naše skúsenosti. XXV. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí. Suppl. Transfúze a Hematologie Dnes 2011 (17): 49-50

**Katrinčáková B**, Szotkowski T, Divoká M, Holzerová M, Hubáček J, Mužík J, Indrák K, Jarošová M.: Molekulárne zmeny a ich klinický význam u akútnej myeloidnej leukémie s normálnym karyotypom. Konferencie vedeckých prací studentů DSP, Olomouc, 7. - 8. 9. 2010, sborník abstrakt – **OCENENIE 2. miesto**

**Katrinčáková B**, Divoká M, Szotkowski T, Síčova K, Holzerová M, Hubáček J, Mužík J, Indrák K, Jarošová M. Zhodnotenie prognostického významu molekulárnej heterogenity u akútnej myeloidnej leukémie s normálnym karyotypom so zameraním na mutačný status NPM1 a FLT3-ITD a polymorfizmus rs16754 (A/G) v géne WT1. XXIV. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí. Suppl. Transfúze a Hematologie Dnes 2010 (16): 41

**Katrinčáková B**, Szotkowski T, Divoká M, Mužík J, Indrák K, Jarošová M. Význam génových mutácií v patogeneze AML s normálnym karyotypom. Naše skúsenosti. 14. celostátní konference DNA diagnostiky, Brno, 25. - 26. 11. 2010, sborník abstrakt

**Katrinčáková B**, Szotkowski T., Divoká M., Holzerová M., Hubáček J., Mužík J., Dušek L., Indrák K., Jarošová M.: Molekulárna heterogenita akútnej myeloidnej leukémie s normálnym karyotypom – prehľad výsledkov jedného centra. XXIII. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí, Suppl. Transfúze a Hematologie Dnes 2009, 15 (6): P59-1573 – **OCENENIE najlepšieho poster konferencie (príloha 11)**

**Katrinčáková B**, Charlier C, Urbankova H, Michaux L, Jarošová M, Vandenberghe P, George M, Wlodarska I: Methylation studies of the *DLK1-GTL2* imprinted domain in human B-cell malignancies with IGH-involving del(14)(q) XXII. Olomoucké hematologické dny, Olomouc, Suppl. Vnitřní lékařství 2008, 54 (5): 1240

**Katrinčáková B**, Charlier C, Urbankova H, Michaux L, Jarošová M, Vandenberghe P, George M, Wlodarska I: Methylation studies of the *DLK1-GTL2* imprinted domain in B-cell malignancies with IGH-involving del(14); 2<sup>nd</sup> MC-GARD Conference: Interplay among genetics, epigenetics and non-coding RNA's; Madrid 2008, Suppl. Cellular Oncology 30 (3): P28-260 (**príloha 11**)

**Katrincsáková B.** Szotkowski T, Divoká M, Holzerová M, Hubáček J, Mužík J, Dušek L, Indrák K, Jarošová M: Výskyt vybraných molekulárných markerov v súbore 65 pacientov s de novo akútnou myeloidnou leukémiou a normálnym karyotypom – naše skúsenosti. XXII. Olomoucké hematologické dny, Olomouc, Suppl. Vnitřní lékařství 2008, 54 (5): 1242

**Katrincsáková B.** Divoká M, Novosadová A, Szotkowski T, Indrák K, Jarošová M: Detekcia mutácií FLT3, MLL, NPM1 a BAALC génov u akútnej myeloblastickej leukémie s normálnym karyotypom – pilotná štúdia. XXI. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí, Olomouc, 16.6. – 19.6.2007, sborník abstrakt

**Katrincsáková, B.** Pacovská, T., Raida, L., Faber, E., Vondráková, J., Vodička, R., Vrbická, D., Vrtěl, R., Jarošová, M., Indrák, K.: Využitie polymorfizmu DNA pri monitorovaní chimérizmu hematopoetických buniek u pacientov po alogénnej HSCT. Dny diagnostické, prediktívni a experimentální onkologie, 9. – 10. 12. 2005, Olomouc

## 2. Ostatné publikácie

### a) Pôvodné vedecké publikácie in extenso v časopisoch s IF

Rohon P, Divoká M, Calabková L, Mojzíkova R, **Katrincsakova B.** Rusinakova Z, Lapcikova A, Raida L, Faber E, Jarosova M, Divoky V, Indrak K. Identification of e6a2 bcr-abl fusion in a Philadelphia-positive CML with marked basophilia: implications for treatment strategy. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 2011 Jun;155(2):187-90

Faber E, Friedecký D, Micová K, Divoká M, **Katrincsáková B.** Rozmanová S, Jarosová M, Indrák K, Adam T. Imatinib dose escalation in two patients with chronic myeloid leukemia, with low trough imatinib plasma levels measured at various intervals from the beginning of therapy and with suboptimal treatment response, leads to the achievement of higher plasma levels and major molecular response. Int J Hematol. 2010 Jun;91(5): 897-902

### b) Zoznam prednášok/posterov prednesených na verejných odborných fórach

**Katrincsáková B.** Jarošová M, Indrák K. Molekulární genetika v diagnostice a stanovení prognózy Ph-negativních myeloproliferativních neoplázií. XXVI. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí. 24.-26.6.2012. Sborník abstrakt: 9

**Katrincsáková B.** Hluší Antonín, Srovnalík Karel, Novosadová Alena, Jarošová M, Indrák K. Prínos mutácií v 12. exóne génu JAK2 k diagnostike pravej polycytémie u 2 pacientov s izolovanou erytrocytózou. XXVI. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí. 24.-26.6.2012. Sborník abstrakt: 58, P14/2241

**Katrincsáková B.** Pecúchová M., Novosadová A., Jarošová M., Indrák K. Význam stanovení mutace JAK2 pro diagnostiku a diferenciální diagnostiku myeloproliferativních chorob Pracovní setkání spolupracujících pracovišť střední a severní Moravy a Slezska; Olomouc, 14. – 15.11.2008

**Katrincsáková B.** Horváthová M, Veselovská J, Pecúchová M, Divoký V, Jarošová M, Indrák K: Význam mutácie V617F v géne JAK2 pri diagnostike chronických myeloproliferatívnych ochorení so zameraním na diferenciálnu diagnostiku pravej polycytémie a ostatných typov polycytémií. VII. Česko-Slovenské dny laboratorní hematologie s mezinárodní účastí Hradec Králové 2006

**Katrincsáková B.**, Naušová Jitka, Priwitzerová Monika, Plachý Radek, Pospíšilová Helena, Pecůchová Marie, Divoká Martina, Pospíšilová Dagmar, Divoký Vladimír, Jarošová Marie, Indrák Karel: Výskyt mutácie JAK2 génu v súbore pacientov s myeloproliferatívnymi ochoreniami. XX. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí, Olomouc, 31.5. – 3.6.2006, sborník abstrakt

**Katrincsáková B.**, Naušová J., Priwitzerová M., Plachý R., Pospíšilová H., Pecůchová M., Pospíšilová D., Divoký V., Jarošová M., Indrák K.: Výskyt mutácie JAK2 génu v súbore pacientov s myeloproliferatívnymi ochoreniami. Seminář Sepetná 2006: Modulace signálních a regulačních drah normální a nádorové buňky, 18.– 20.5. 2006, Ostravice

Wlodarska, I., Urbankova, H., Baens, T., Michaux, L., Rack, K., **Katrincsakova, B.**, Finalet Ferreira, J., Van Loo, P., De Kelder, W., Dierickx, D., Demuyne, H., Delannoy, A., Verschuere, J., Jarosova, M., Tousseyn, T., Peeters, C., Vandenberghe, P. (2011). Rearrangements of 14q32.13 targeting TCL1A are recurrent in hairy-cell lymphoproliferative disorders. Proceedings. 11-ICML 11th International Conference on Malignant Lymphoma. Lugano, 15-18 June, 2011

Indrák K., Voglová J., Jindra P., Mužík J., Szotkowski T., Žák P., Karas M., Jarošová M., **Katrincsáková B.**, Sičová K., Dušek V. Retrospektivní analýza některých prognostických faktorů u 1518 AML diagnostikovaných a léčených v posledních 17 letech ve 3 centrech intenzivní hemato-onkologické péče v ČR. XXVII. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí. 2013. Sborník abstrakt: 23-24

### c) Kapitoly v monografiách

Rohoň P. a kolektív, Molekulární biologie v hematonekologii - od základních vyšetřovacích metod ke klinické praxi, Univerzita Palackého v Olomouci 2009, 127 s., 2 kapitoly: Katrincsáková, Rohoň – Chronické myeloproliferativní nemoci a Molekulární nástroje potransplantačního sledování

## **IX. PRÍLOHY**

**Príloha 1 - Zoznam použitých oligonukleotidových primerov** Vybrané oligonukleotidy boli prevzaté z uvedených publikovaných zdrojov. \* - oligonukleotid bol oproti sekvencii publikovanej v uvedenom zdroji skrátený o 2nt od 3' konca.

Gén/oblasť	Názov primeru	Primery (5' - 3')	5' modifikácia	PCR produkt (bp)	Zdroj oligonukleotidov	Ref. Sekvencia (GeneBank)	Analyzovaná oblasť (nt)
<i>FLT3</i>	FLT3-ITD-F	F: GGTGTCGAGCAGTACTCTAAACAGGTG *	6-FAM	369	Noguera a kol. 2005	NM_004119	
	FLT3-ITD-R	R: GATCCTAGTACCTTCCCAAACCTC	žiadna resp. TAMRA		Noguera a kol. 2005		
	D835-S	F: CCGCCAGGAACGTGCTTG	-	114	Yamamoto a kol. 2001	NG_007066.1	
	D835-AS	R: GCAGCCTCACATTGCCCC	-		Yamamoto a kol. 2001		
<i>NPM1</i>	NPM1_12F	F: ACCATTTCATGTCTGAGCACC	HEX	349	Noguera a kol. 2005	NM_002520.6	1092 - 1449
	NPM1_12R	R: ATCAATTATGTGAAGAATTGCTTAC	-		Noguera a kol. 2005		(11. exón /pôvodne 12.exón/)
<i>CEBPA</i>	CEBPA_1F	F: GGCAGCAGGGTCTCCGGGT	M13F	345	Fröhling a kol. 2004	U34070.1 (CDS: 592...1668)	500 - 844
	CEBPA_1R	R: TGTGCTGGAACAGGTCGGCCA	M13R		Fröhling a kol. 2004		
	CEBPA_2F	F: GCTGGCGGCATCTGCGA	M13F	365	Fröhling a kol. 2004		744-1108
	CEBPA_2R	R: GCTGCTGGCTTCATCTCCTC	M13R				
	CEBPA_3F	F: GCTGGAGCCCTGTACGAGC	M13F	425			1017-1441
	CEBPA_3R	R: CGTTGCTTCTTGTCCACCGACTTCTT	M13R		Fröhling a kol. 2004		
	CEBPA_4F	F: CCTGGCAGCGCCTCAAG	M13F	391			1336-1726
	CEBPA_4R	R: AACCACTCCCTGGGTCCCGC	M13R		Fröhling a kol. 2004		
<i>WT1</i>	WT1_7F	F: CTCCAGTGCTCACTCTCCCTC	-	310	Gaidzik a kol. 2009	NM_024426	1289 - 1439
	WT1_7R	R: CCTTAGCAGTGTGAGAGCCTG	M13R		Gaidzik a kol. 2009		
	WT1_9F	F: GTGAGGCAGATGCAGACATTG	M13F	365	Gaidzik a kol. 2009	NM_024426	1530 - 1622
	WT1_9R	R: AGCCACGCACTATTCCTTCTC	-		Gaidzik a kol. 2009		
<i>IDH1</i>	IDH1_4F	F: TACTCAGAGCCTTCGCTTCTG	-	477		NM_001282387.1	486 - 777
	IDH1_4R	R: ACATACAAGTTGGAAATTCTGGG	-				
<i>IDH2</i>	IDH2_4F	F: GGGTCAAAATTCTGGTTGAAAG	-	328		NM_002168.3	538 - 698
	IDH2_4R	R: CAAAGTCTGTGGCCTTGTACTG	-				
<i>M13F</i>	-	F: GTTGTAACGACGGCCAGT	-	-		-	-
<i>M13R</i>	-	R: CAGGAAACAGCTATGACC	-	-		-	-
<i>MLL_PTD</i>	MLL- Ex5 - F1	F: GGAAGTCAAGCAAGCAGGTC	-		Jamal R a kol. 2001		
	MLL- Ex3 - R1	R: AGGAGAGAGTTTACCTGCTC	-		Jamal R a kol. 2001		
<i>DLK1-GTL2 1G-DMR</i>	aF	F: GAACTGGGGCATTGTTACACC	-	496		AL117190	50929 - 51424
	aR	R: AAGTTGCCTGAGGCCGTAGATAA	-				
	bF	F: GGTACTGTAAGTGGCCACAATG	-	531		AL117190	51250 - 51780
	bR	R: GTTTATGATAGCTCAGGGTTGC	-				
	bsF	F: TTAGGTTGGAATTTGTAAGAGTTTGTG	-	665		AL117190	50951 - 51615
	bsR	R: CACCATTAACCTCAACAAAAAT	-				
<i>T-UCR</i>	uc 379_F	F: GGGTGGAGGCGTTTGACTT	-	71			
	uc 379_R	R: GCCTTTCCTCCGCTCAACTCT	-				
	uc 380_F	F: GTGGGTAGAGGCTATGGTGA	-	101			
	uc 380_R	R: CCTCTTCTCTCTTTTCTTTT	-				
	uc 381_F	F: AAGTTTCTTATTAACCTTAGTAGTTCAG	-	69			
	uc 381_R	R: ATTATGTGCTCATGTAATGATTTCTAGAT	-				
	HPRT_F	F: TGACACTGGCAAAACAATGCA	-	94			
	HPRT_R	R: GGTCTTTTACCAGCAAGCT	-				

**Príloha 2 - Metylačné dáta prípadov # 1, 2, 3 a 5 s dokumentovanou del(14q/IGH) Pre bližší popis vid' obrázok 25 (Katrincsakova et al., 2009, supplement)**

**CASE # 1**

paternal allele

IG DMR

1 2 3 4 5 6 7 8  
O O O O O O O O

	methylation rate [%]	T	C	G
●●●●○○● (13)	75,0	G	A	A
●●●●○○● (2)	87,5	G	A	A
●●●●○○● (4)	100,0	G	A	A
●●●●○○● (1)	87,5	G	A	A
<b>Methylation rate [average]</b>	<b>82</b>			

maternal allele - deleted

IG DMR

1 2 3 4 5 6 7 8  
O O O O O O O O

	methylation rate [%]	T	C	G
○○●○○○○ (1)	37,5	G	A	G
○○●○○○○ (1)	75,0	G	A	G
○○●○○○○ (1)	37,5	G	A	G
○○○○○○○○ (1)	0,0	G	A	G
○○○○○○○○ (1)	50,0	G	A	G
○●●●○○● (1)	75,0	G	A	G
○○○○○○○○ (1)	12,5	G	A	G
<b>Methylation rate [average]</b>	<b>41</b>			

**CASE # 2**

maternal allele

IG DMR

1 2 3 4 5 6 7 8  
O O O O O O O O

	methylation rate [%]	T	C	G
●○○●○○● (10)	75,0	G	A	G
○○●○○○○ (2)	62,5	G	A	G
○○●○○○○ (1)	37,5	G	A	G
●●●●○○● (1)	87,5	G	A	G
○○●○○○○ (3)	62,5	G	A	G
●●●●○○● (4)	75,0	G	A	G
○○●○○○○ (3)	25,0	G	A	G
●○○●○○● (1)	62,5	G	A	G
○○○○○○○○ (1)	0,0	G	A	G
<b>Methylation rate [average]</b>	<b>63</b>			

paternal allele - deleted

IG DMR

1 2 3 4 5 6 7 8  
O O O O O O O O

	methylation rate [%]	T	C	G
●●●●○○● (7)	100,0	G	A	A
<b>Methylation rate [average]</b>	<b>100</b>			

**CASE # 3**

maternal allele

IG DMR

1 2 3 4 5 6 7 8  
O O O O O O O O

	methylation rate [%]	T	C	G
●●●●○○● (8)	87,5	A	A	A
●●●○○○○ (13)	75,0	A	A	A
●●●○○○○ (8)	75,0	A	A	A
○●○○○○○ (1)	12,5	A	A	A
○●●○○○○ (2)	50,0	A	A	A
●●●○○○○ (3)	100,0	A	A	A
●●●○○○○ (3)	62,5	A	A	A
●●●○○○○ (2)	75,0	A	A	A
●●●○○○○ (1)	62,5	A	A	A
●●●○○○○ (1)	87,5	A	A	A
●●●○○○○ (2)	62,5	A	A	A
○●●○○○○ (1)	50,0	A	A	A
●●●○○○○ (2)	62,5	A	A	A
●●●○○○○ (1)	50,0	A	A	A
<b>Methylation rate [average]</b>	<b>74</b>			

paternal allele - deleted

IG DMR

1 2 3 4 5 6 7 8  
O O O O O O O O

	methylation rate [%]	T	C	G
●●●○○○○ (1)	75,0	G	G	G
●●●○○○○ (5)	87,5	G	G	G
●●●○○○○ (3)	100,0	G	G	G
<b>Methylation rate [average]</b>	<b>90</b>			

**CASE # 5**

maternal allele

IG DMR

1 2 3 4 5 6 7 8  
O O O O O O O O

	methylation rate [%]	T	C	G
●●●●○○○ (21)	62,5	A	A	A
○●●●○○● (2)	75,0	A	A	A
●●●●○○○ (2)	75,0	A	A	A
●●●●○○○ (1)	75,0	A	A	A
●●●○○○○ (1)	37,5	A	A	A
<b>Methylation rate [average]</b>	<b>64</b>			

paternal allele - deleted

IG DMR

1 2 3 4 5 6 7 8  
O O O O O O O O

	methylation rate [%]	T	C	G
●●●●○○● (2)	100,0	G	A	A
●●●●○○○ (1)	87,5	G	A	A
<b>Methylation rate [average]</b>	<b>96</b>			



**Príloha 3 - Metylačné dáta prípadov # 6, 7 a 8 s dokumentovanou del(14q/IGH)** Pre bližší popis vid' obrázok 25 (Katrincsakova et al., 2009, supplement)

**CASE # 6**

maternal allele

IG DMR

IG DMR	methylation rate [%]	S	T	S	S
●●●●●○○● (22)	75,0	G	A	G	G
○○○○○○○○○ (1)	12,5	G	A	G	G
●●●●○○○○○ (2)	62,5	G	A	G	G
●○●●○○○○○ (2)	62,5	G	A	G	G
●●●●○○○○○ (2)	87,5	G	A	G	G
<b>Methylation rate [average]</b>	<b>72</b>				

paternal allele - deleted

IG DMR

IG DMR	methylation rate [%]	S	T	S	S
●●●●●●●● (2)	100,0	G	A	A	A
<b>Methylation rate [average]</b>	<b>100</b>				

**CASE # 7**

maternal allele

IG DMR

IG DMR	methylation rate [%]	S	T	S	S
●●●●●○○● (7)	87,5	G	A	G	G
●○●●●○○○ (2)	37,5	G	A	G	G
●●●●●●●○ (1)	87,5	G	A	G	G
●●●●●○○○ (4)	62,5	G	A	G	G
○○○○○○○○○ (2)	0,0	G	A	G	G
○○○○○○●○ (1)	12,5	G	A	G	G
<b>Methylation rate [average]</b>	<b>61</b>				

paternal allele - deleted

IG DMR

IG DMR	methylation rate [%]	S	T	S	S
○●●●●●●● (1)	87,5	G	A	A	A
●●●●●●●● (5)	100,0	G	A	A	A
●●●●●○○● (1)	87,5	G	A	A	A
●●●●●○●○ (1)	75,0	G	A	A	A
<b>Methylation rate [average]</b>	<b>94</b>				

**CASE # 8**

paternal allele

IG DMR

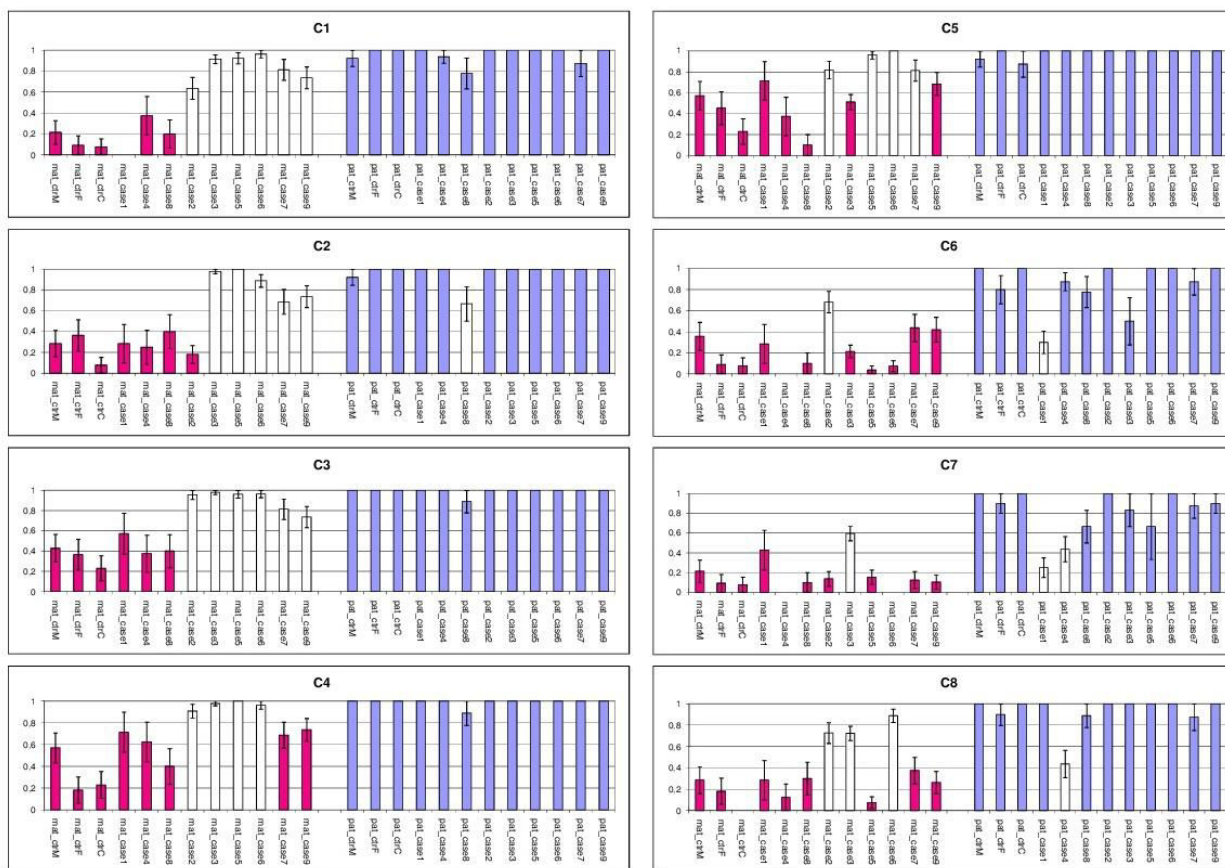
IG DMR	methylation rate [%]	S	T	S	S
●●●●●●●● (4)	100,0	G	A	G	G
●○●●●●○○ (1)	75,0	G	A	G	G
○○●●●○○● (1)	50,0	G	A	G	G
○○○○●●●● (1)	50,0	G	A	G	G
●●●●○○○○ (1)	75,0	G	A	G	G
●●●●○○○○ (1)	87,5	G	A	G	G
<b>Methylation rate [average]</b>	<b>82</b>				

maternal allele - deleted

IG DMR

IG DMR	methylation rate [%]	S	T	S	S
○○○○○○○○○ (5)	0,0	G	G	G	G
○○○○○○○○● (1)	12,5	G	G	G	G
○●●●●●●● (1)	87,5	G	G	G	G
●●●●○○○○● (1)	62,5	G	G	G	G
●●●●○○○○○ (2)	50,0	G	G	G	G
○●●●○○○○○ (1)	37,5	G	G	G	G
<b>Methylation rate [average]</b>	<b>27</b>				

**Príloha 4 - Alelovo špecifický metylačný profil v prípadoch s dokumentovanou del(14q/IGH) a v kontrolnom súbore (Katrincsakova et al., 2009, supplement)** Na obrázku bol znázornený priemerný podiel metylovaných cytozínov, ktorý bol zhodnotený jednotlivo v každej z 8 analyzovaných CpG pozícií (C1 až C8) v každom z vyšetovaných prípadov (prípady 1 až 9), osobitne v maternálnej (mat) a paternálnej (pat) alele. Získané výsledky boli porovnané s profilom, ktorý vykazovali 3 kontrolné (ctr) jedince (M/matka, F/otec, Ch/dieta). Metylačný profil mat/pat alely bol vyznačený farebne (ružové resp. modré stĺpce) pokiaľ sa vyskytoval v rámci štandardnej chyby priemeru aspoň 1 z kontrolných jedincov (M/F/Ch), v ostávajúcich prípadoch ostal farebne neodlišený (biele stĺpce). Dáta ukazujú na zvýšenú metyláciu alely, ktorá bola prenesená z maternálneho chromozómu vo vyšetovaných prípadoch v prevažnej väčšine analyzovaných CpG pozícií. Vybrané prípady vykazovali menej významné zníženie podielu metylácie paternálne derivovanej alely v určitých CpG pozíciách (C2, C6, C7, C8).



**Príloha 5 - Katrincsakova et al., 2009**

**Katrincsakova B**, Takeda H, Urbankova H, Michaux L, Jarosova M, Vandenberghe P, Georges M, Charlier C, Wlodarska I. Methylation analysis of the imprinted DLK1-GTL2 domain supports the random parental origin of the IGH-involving del(14q) in B-cell malignancies. *Epigenetics*. 2009 Oct 25;4(7) (IF 4.584)

**Príloha 6 - Urbankova et al., 2012**

Urbankova H, Baens M, Michaux L, Tousseyn T, Rack K, **Katrincsakova B**, Ferreira JF, Van Loo P, De Kever W, Dierickx D, Demuyneck H, Delannoy A, Verschuere J, Jarošová M, De Wolf-Peeters C, Vandenberghe P, Wlodarska I. Recurrent breakpoints in the 14q32.13/TCL1A region in mature B-cell neoplasms with villous lymphocytes. *Leuk Lymphoma*. 2012 Dec;53(12):2449-55 (IF 2.301)

**Príloha 7 – Jarosova et al. 2012**

Jarosova M, Nedomova R, Hubacek J, Holzerova M, Mickova P, **Katrincsakova B**, Pikalova Z, Papajik T, Indrak K. Rare tetraploidy with large 5q deletion in acute myeloid leukemia with myelodysplasia-related changes (AML-MRC). Leuk Res. 2012 Apr;36(4):e68-70 (IF 2.764)

**Príloha 8 – Raida et al. 2011**

Raida L, Tucek P, Faber E, Vondrakova J, Rusinakova Z, Skoumalova I, Hubacek J, Jarosova M, **Katrincsakova B**, Pikalova Z, Kurfurst P, Indrak K. Comparison of new flu-bu12-tg conditioning with the standard bu-cy myeloablative regimen in patients undergoing allogeneic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 2011 Dec;155(4):327-32 (IF 0.716)

**Príloha 9 – Szotkowski et al. 2010**

Szotkowski T, Muzik J, Voglova J, Koza V, Maaloufova J, Kozak T, Jarosova M, Michalova K, Zak P, Steinerova K, Vydra J, Lanska M, **Katrinčáková B**, Sicova K, Pavlik T, Dusek L, Indrak K. Prognostic factors and treatment outcome in 1,516 adult patients with de novo and secondary acute myeloid leukemia in 1999-2009 in 5 hematology intensive care centers in the Czech Republic. *Neoplasma* 2010, 57, 6, 578-89. (IF 1.449)

**Príloha 10 – Katrincšáková et al. 2011**

**Katrincšáková B**, Szotkowski T, Divoká M. et al. Klinický význam genových mutácií u akútnych myeloidných leukémií s normálnym karyotypom. Hematologie a transfuze dnes. 2011; 17: 72-80



**Príloha 11 – Konferenčné príspevky (publikované abstrakty a postery)**